



**WYDZIAŁ LEŚNY I TECHNOLOGII DREWNA
UNIwersytet PRZYRODNICZY W POZNANIU**

KOFEINA JAKO POTENCJALNY FUNGICYD W OCHRONIE DREWNA

Patrycja Kwaśniewska-Sip

PROMOTOR:

PROF. UPP DR HAB. INŻ. GRZEGORZ COFTA

PROMOTOR POMOCNICZY:

DR INŻ. MONIKA BARTKOWIAK

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu

1

Kwaśniewska-Sip P., Cofta G., Nowak P. (2018) Resistance of fungal growth on Scots pine treated with caffeine. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 132, 178–184. doi: 10.1016/j.ibiod.2018.03.007

2

Kwaśniewska-Sip P., Woźniak M., Jankowiak W., Ratajczak I., Cofta G. (2021) Chemical changes of wood treated with caffeine. **Materials**, 14(3), 497. doi: 10.3390/ma14030497

3

Kwaśniewska-Sip P., Bartkowiak M., Cofta G., Nowak P.B. (2019) Resistance of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) after treatment with caffeine and thermal modification against *Aspergillus niger*. **BioResources**, 14(1), 1890–1898. doi: 10.15376/biores.14.1.1890-1898

4

Ratajczak I., Woźniak M., Kwaśniewska-Sip P., Szentner K., Cofta G., Mazela B. (2018) Chemical characterization of wood treated with a formulation based on propolis, caffeine and organosilanes. **European Journal of Wood and Wood Products** 76(2), 775-781. doi: 10.1007/s00107-017-1257-9

Wprowadzenie

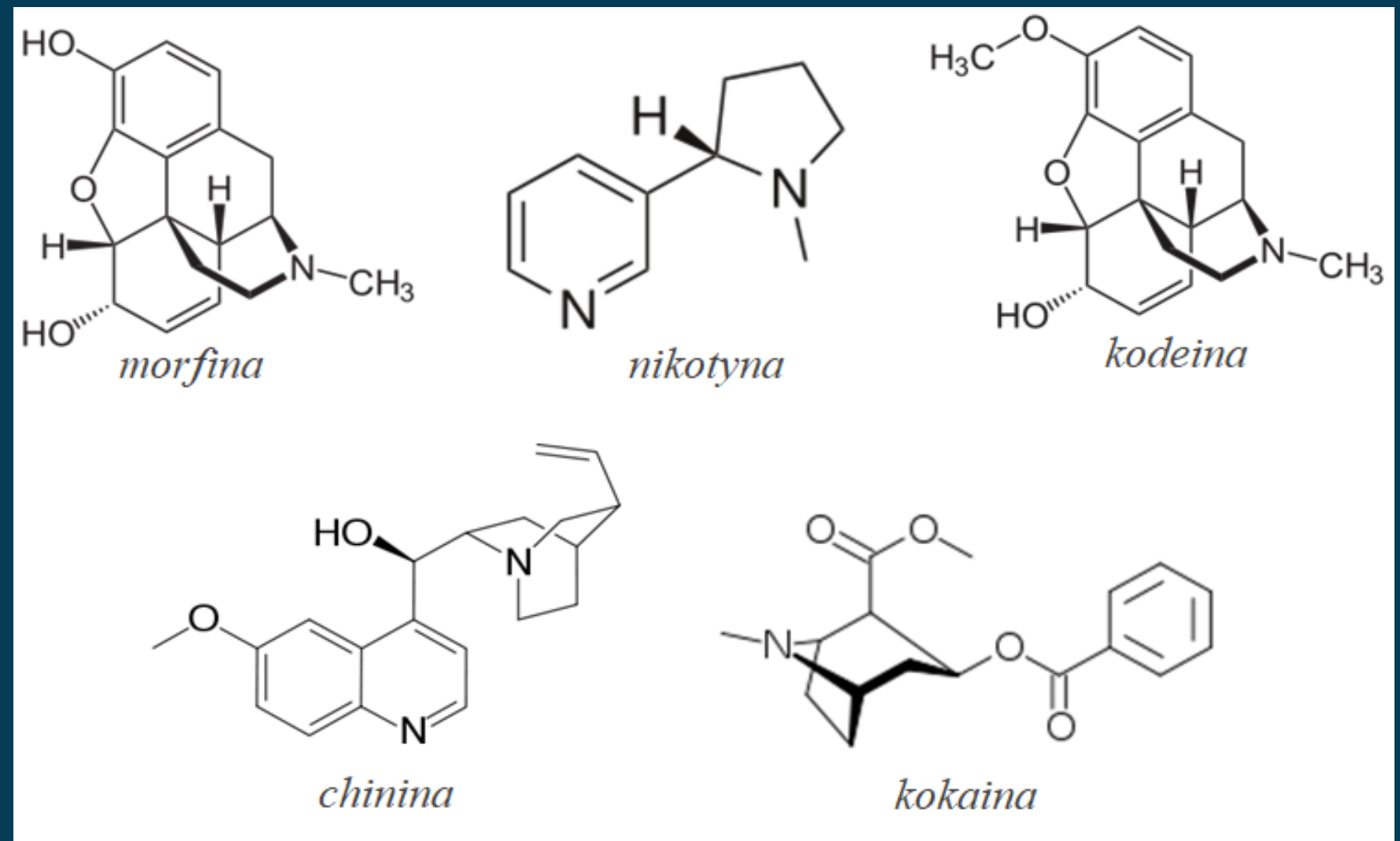
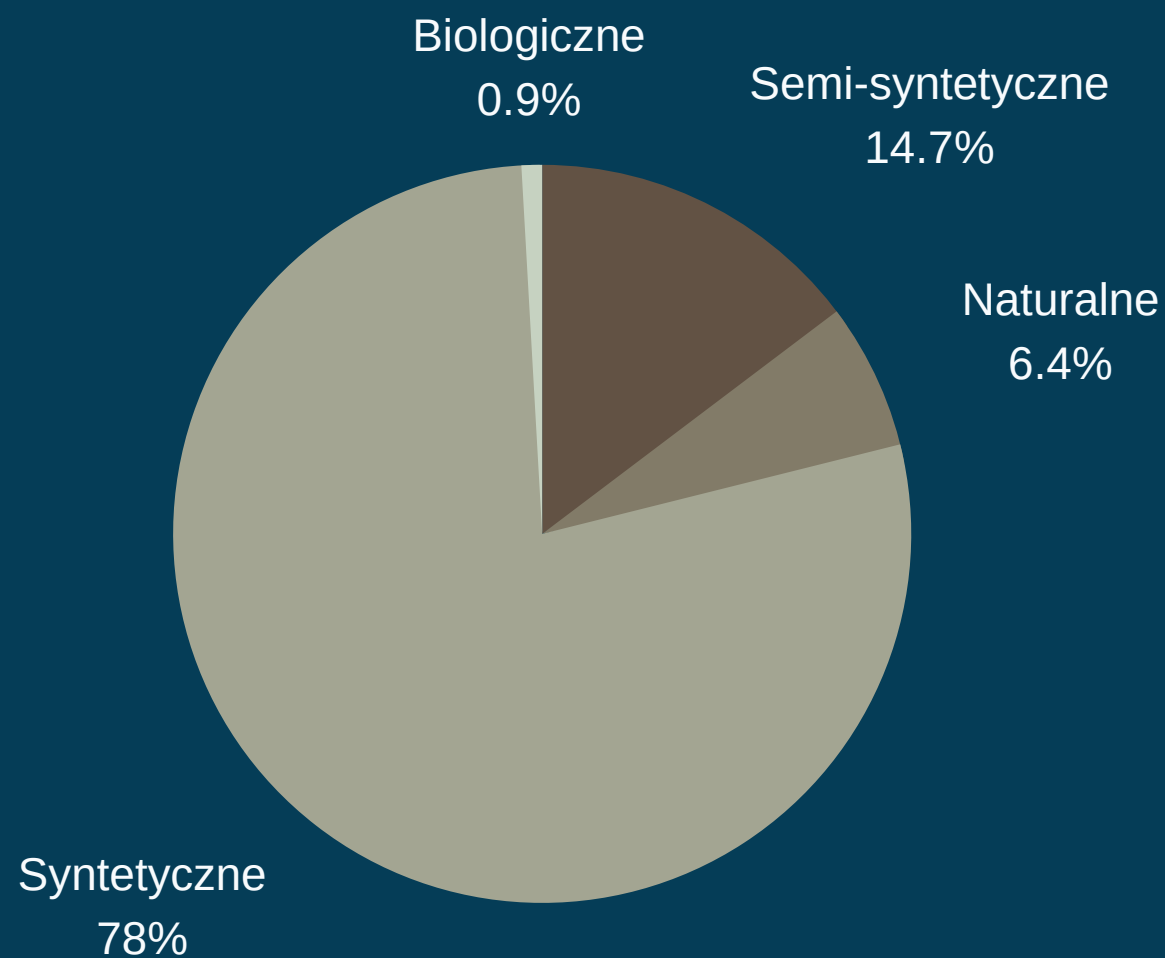
- związki arsenu
- związki chromu
- aminy alifatyczne (etanoloamina)
- pochodne chlorofenoli
- związki miedzi
- propikonazol
- związki boru
- węglowodory ropopochodne



Wprowadzenie

Alkaloidy

- zasadowe związki pochodzenia naturalnego
- atom azotu w układzie cyklicznym
- silne działanie fizjologiczne na organizm człowieka oraz zwierząt





Cel rozprawy

Celem naukowym rozprawy doktorskiej jest określenie właściwości fungistatycznych alkaloidu – kofeiny względem grzybów zasiedlających drewno oraz próba scharakteryzowania oddziaływań chemicznych występujących pomiędzy badanym alkaloidem purynowym, a materiałem drzewnym, co umożliwi ustabilizowanie substancji aktywnej w drewnie w celu opracowania systemu chroniącego drewno przed biodeterioracją.

Zakres pracy

1

wytypowanie na podstawie badań skryningowych alkaloidu o wysokiej aktywności biologicznej

2

ocena właściwości grzybobójczych kofeiny

3

ocena trwałości zabezpieczonego drewna preparatem którego głównym składnikiem jest kofeina

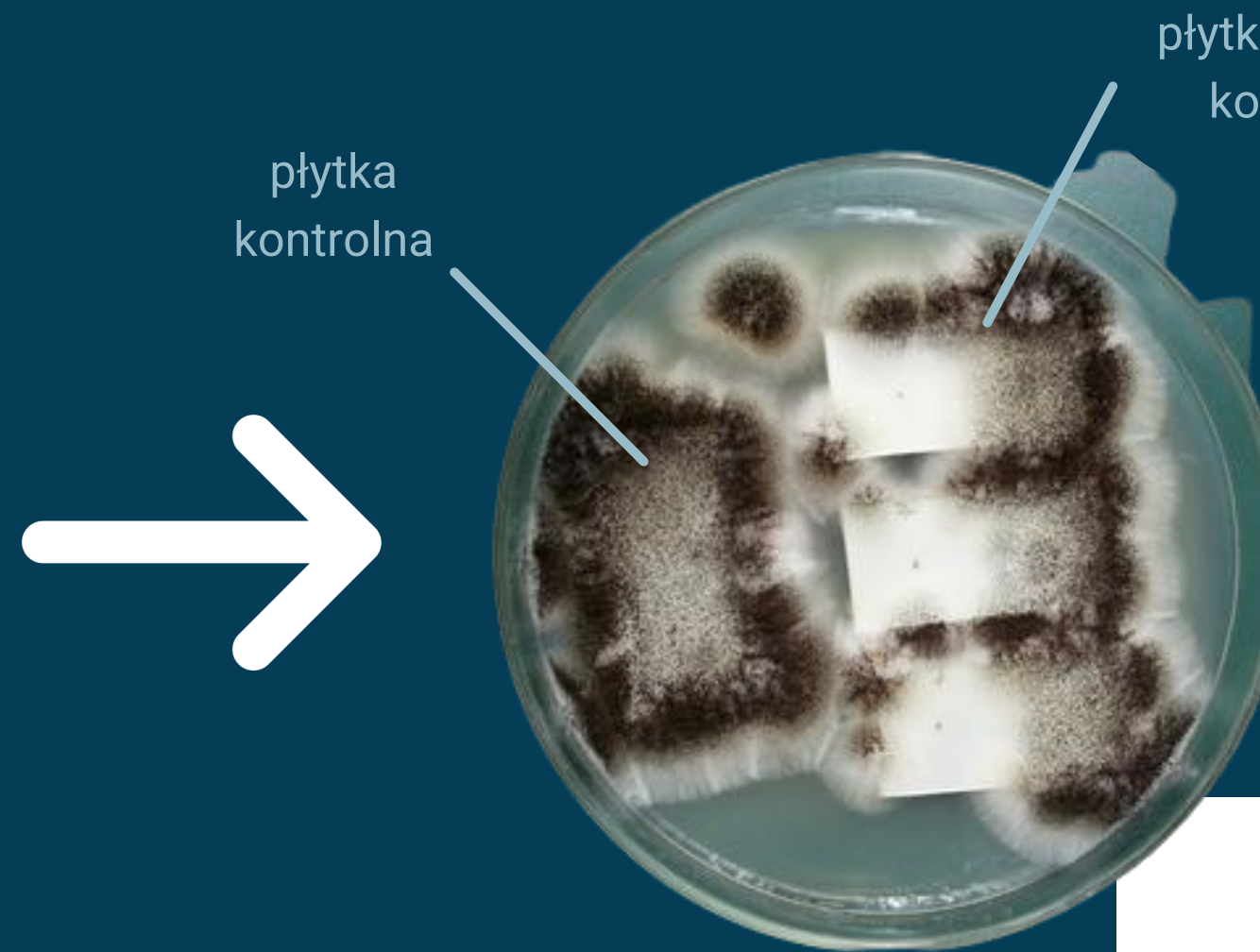
4

fizyko-chemiczna charakterystyka oddziaływań zachodzących w zabezpieczonym materiale drzewnym

5

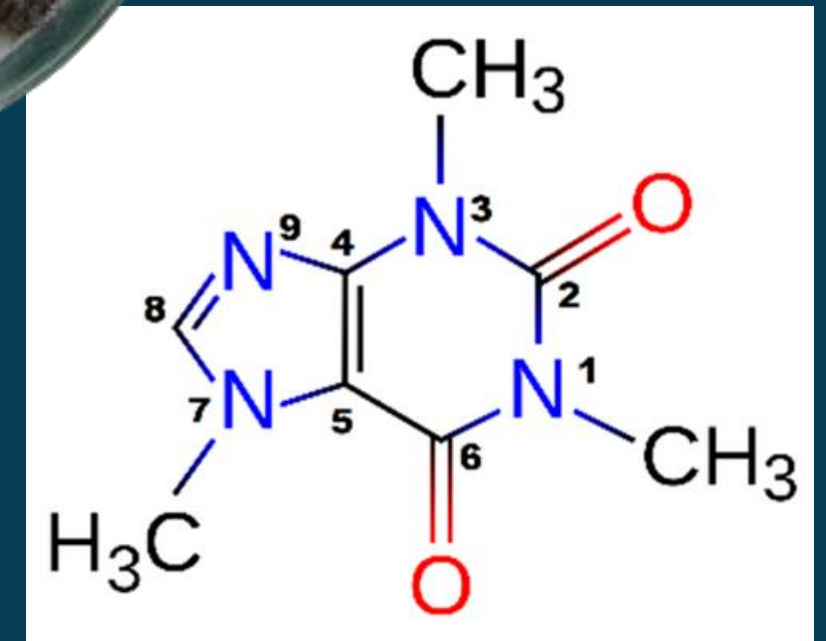
opracowanie preparatu do ochrony drewna odpornego na działanie warunków atmosferycznych

Badania przesiewowe - bioautografia TLC



84 związki pochodzenia naturalnego lub semisyntetycznego

- alkaloidów chinolizydynowe
- bischinolizydynowe
- purynowe



kofeina




Materialy i metody

DREWNO





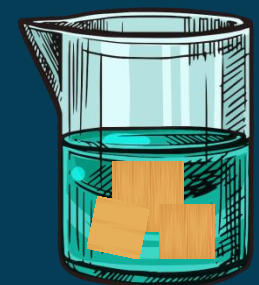
Biel sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L. (gęstość $540 \pm 50 \text{ kg/m}^3$)

ODCZYNNIKI

-  kofeina (1,2,3-trimetyloksantyna, Sigma-Aldrich)
-  celuloza *fibers* (medium, Sigma-Aldrich)
-  lignina Kraft (Sigma-Aldrich)

PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO BADAŃ

-  próbki nasycano przez 15 minut pod zmniejszonym ciśnieniem 0,08 MPa i 2 godziny w warunkach ciśnienia atmosferycznego (4,0; 6,3; 10; 20 i 25 mg/ml)
-  część próbek poddano testom starzeniowym (procedura wymywania wg PN EN-84)



Materialy i metody

TESTY MIKOLOGICZNE

BADANIE NA ODPORNOŚĆ WOBEC DZIAŁANIA GRZYBÓW ROZKŁADAJĄCYCH DREWNO



rozkład brunatny *Coniophora puteana* , *Rhodonia (Poria) placenta*
Gloeophyllum trabeum



rozkład biały *Trametes versicolor*



16 tygodni inkubacji

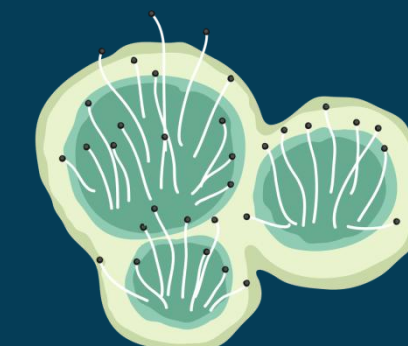
BADANIA NA ODPORNOŚĆ WOBEC GRZYBÓW PLEŚNIOWYCH



10 grzybów pleśniowych *Aspergillus niger* , *A. versicolor* ,
A. terreus , *Chaetomium globosum* , *Cladosporium herbarum* ,
Paecilomyces variotii , *Penicillium cyclopium* , *P. funiculosum* ,
Phoma violacea and *Trichoderma viride*



28 dni inkubacji

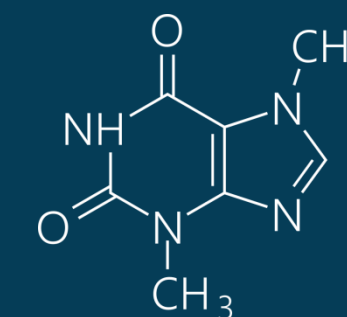


Materialy i metody

METODY INSTRUMENTALNE

ANALIZA ELEMENTARNA

- ⇒ zawartość atomu azotu [%]
- ⇒ oszacowanie stopnia wymycia azotu wchodzącego w skład cząsteczki kofeiny



SPEKTROSKOPIA W PODCZERWIENI Z TRANSFORMACJĄ FOURIERA (FTIR)

- ⇒ określenie zmian strukturalnych drewna poddanego impregnacji kofeiną i przyspieszonemu starzeniu
- ⇒ scharakteryzowanie oddziaływań pomiędzy kofeiną i głównymi składnikami drewna (celulozą i ligniną)

SKANINGOWA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA (SEM)

- ⇒ określenie położenia cząsteczki kofeiny w strukturze nasyconego drewna cząsteczek kofeiny

Materialy i metody

OBLICZENIA KWANTOWO-CHEMICZNE



analiza oddziaływań pomiędzy cząsteczką kofeiny a dimerem (β -O-4) jednostek gwajacylowych ligniny



Gaussian 09



BADANIA NAD OPRACOWANIEM METODY OCHRONY DREWNA ODPORNEGO NA DZIAŁANIE WARUNKÓW ATMOSFERYCZNYCH

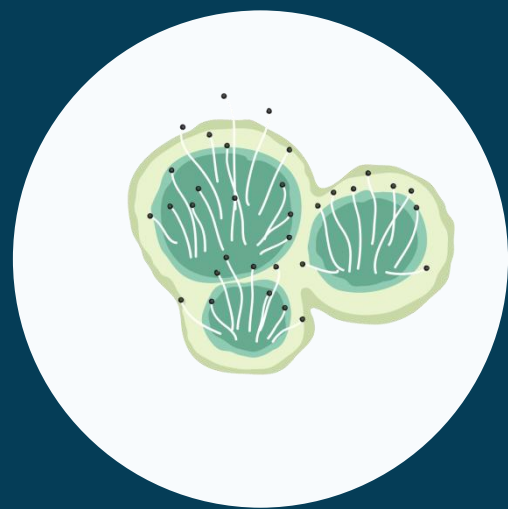


modyfikacja termiczna próbek drewna impregnowanych kofeiną



impregnacja drewna preparatem ochronnym składającym się z kofeiny, propolisu i silanów

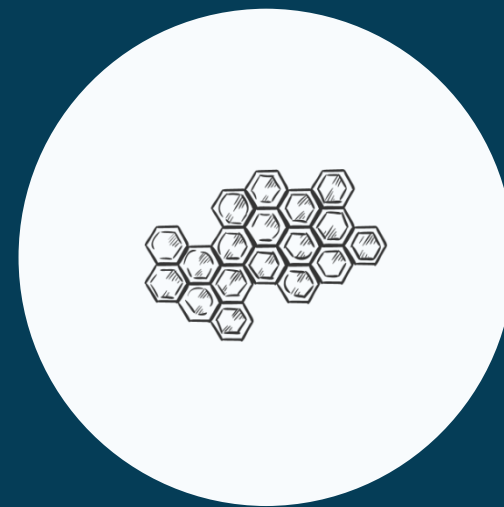
Najważniejsze wyniki



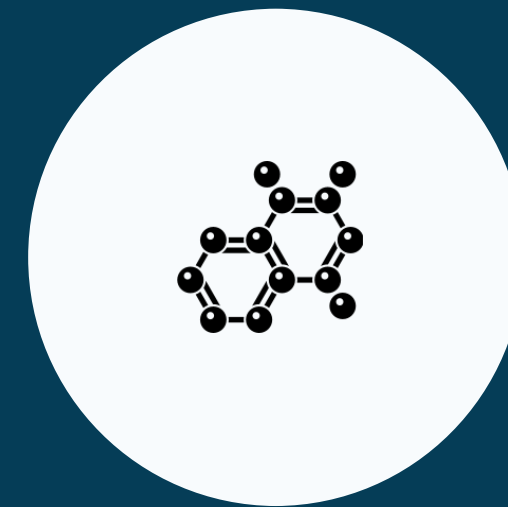
Testy mikologiczne



Analiza
instrumentalna



SEM

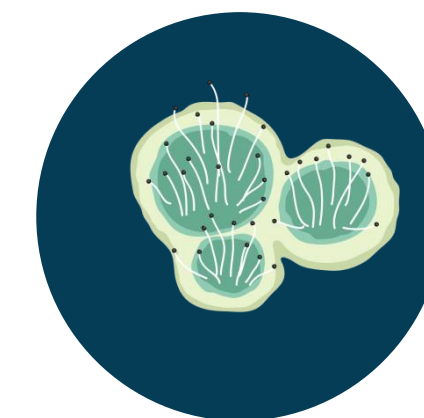


Symulacja
molekularna



Preparat
ochronny

Ubytki masy (ML) próbek w testach odporności na działanie grzybów rozkładających drewno.

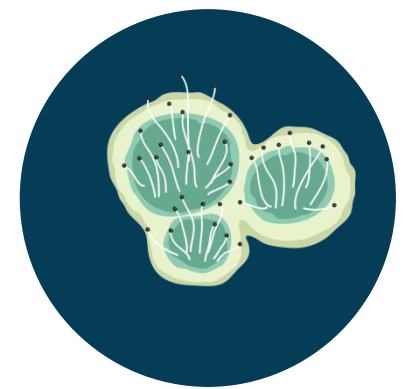


Testy mikologiczne

Grzyb	C _{caf} (mg/ml)	Niewymywane				Wymywane			
		Retencja (kg/m ³)	ML (%)	Duncan test	Dunnet test p value	Retencja (kg/m ³)	ML (%)	Duncan test	Dunnet test p value
<i>C. puteana</i>	0	0,0	41,9 (1,2)	a	-	0,0	41,9 (1,2)	a	-
	4	2,7 (0,1)	9,6 (6,1)	b	0,00	2,8 (0,1)	38,8 (2,4)	a	0,26
	6,3	4,7 (0,3)	1,3 (0,1)	c	0,00	4,6 (0,0)	32,2 (3,5)	b	0,00
	10	7,1 (0,4)	1,8 (0,1)	c	0,00	7,1 (0,2)	8,1 (3,1)	c	0,00
	20	14,6 (0,8)	1,5 (0,1)	c	0,00	14,8 (0,5)	3,7 (0,7)	d	0,00
	25	18,0 (0,4)	1,5 (0,2)	c	0,00	18,2 (0,6)	3,0 (0,0)	d	0,00
<i>P. placenta</i>	0	0,0	28,3 (4,9)	a	-	0,0	28,3 (4,9)	a	----
	4	2,8 (0,2)	11,1 (1,3)	b	0,00	2,9 (0,1)	21,3 (2,5)	b	0,01
	6,3	4,4 (0,2)	0,5 (0,1)	c	0,00	4,5 (0,2)	10,1 (0,2)	c	0,00
	10	7,1 (0,6)	0,6 (0,1)	c	0,00	7,5 (0,3)	2,1 (0,8)	d	0,00
	20	15,1 (0,5)	2,5 (0,2)	c	0,00	14,2 (0,8)	1,2 (0,4)	d	0,00
	25	17,2 (1,4)	0,4 (0,1)	c	0,00	18,1 (0,8)	0,9 (0,3)	d	0,00
<i>G. trabeum</i>	0	0,0	30,4 (4,0)	a	-	0,0	30,4 (4,0)	a	-
	4	2,9 (0,1)	6,0 (1,2)	b	0,00	2,9 (0,1)	26,0 (3,3)	b	0,13
	6,3	4,6 (0,1)	4,0 (3,5)	b	0,00	4,5 (0,1)	25,3 (4,5)	b	0,07
	10	7,1 (0,1)	0,8 (0,2)	c	0,00	6,9 (0,3)	5,7 (2,4)	c	0,00
	20	15,0 (0,1)	0,7 (0,1)	c	0,00	14,9 (0,5)	4,0 (2,4)	c	0,00
	25	18,3 (0,9)	0,6 (0,1)	c	0,00	18,1 (1,0)	1,8 (0,8)	c	0,00
<i>C. versicolor</i>	0	0,0	24,2 (2,2)	a	-	0,0	24,2 (2,2)	a	-
	4	2,9 (0,1)	4,3 (0,7)	b	0,00	2,9 (0,1)	15,3 (2,8)	b	0,00
	6,3	4,5 (0,2)	1,4 (0,3)	c	0,00	4,5 (0,2)	5,0 (2,7)	c	0,00
	10	6,9 (0,6)	1,4 (0,1)	c	0,00	6,9 (0,8)	2,0 (0,4)	d	0,00
	20	14,1 (0,2)	1,8 (0,1)	c	0,00	14,8 (0,4)	0,9 (0,4)	d	0,00
	25	17,6 (0,7)	0,9 (0,1)	c	0,00	18,7 (0,4)	1,8 (0,2)	d	0,00

**Ubytek
masy
ML < 3%**

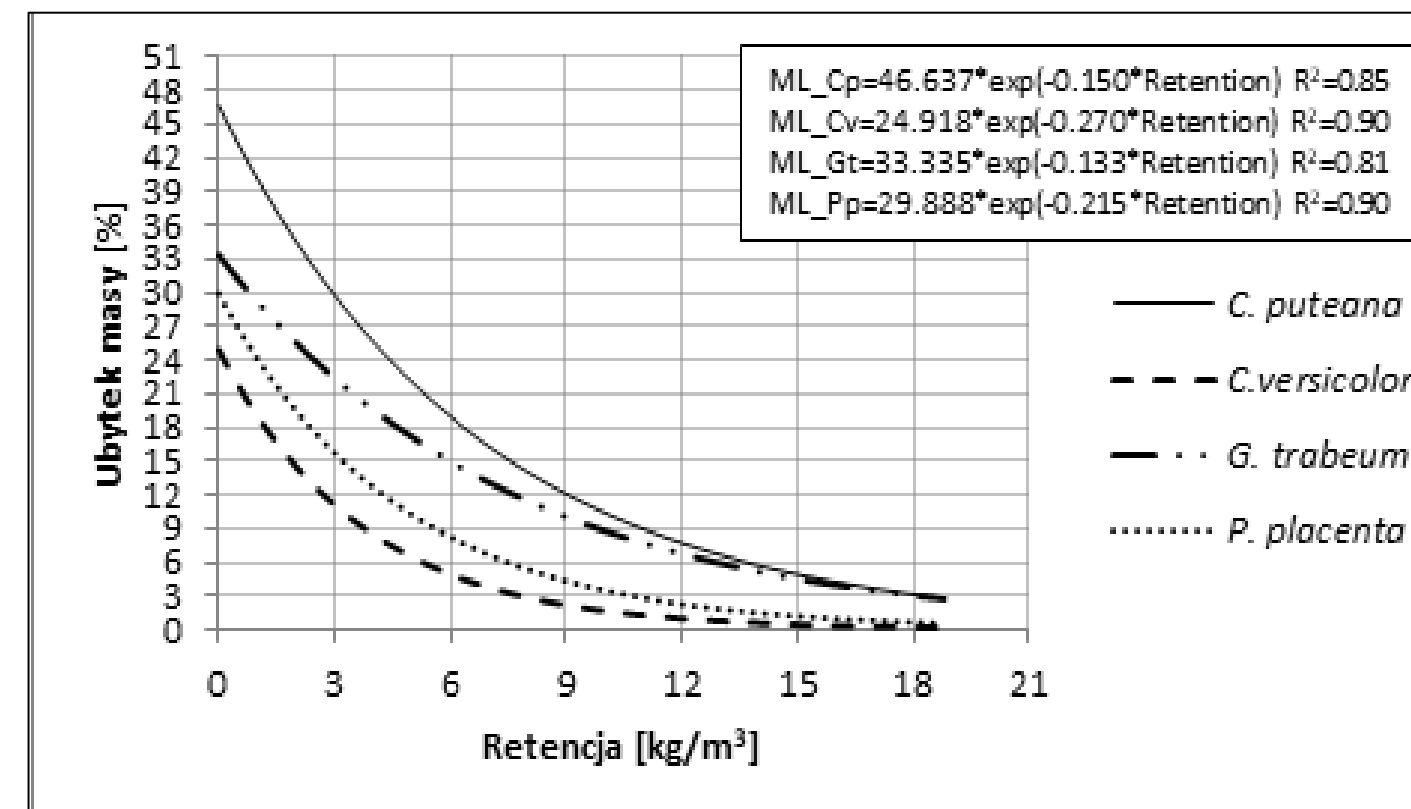
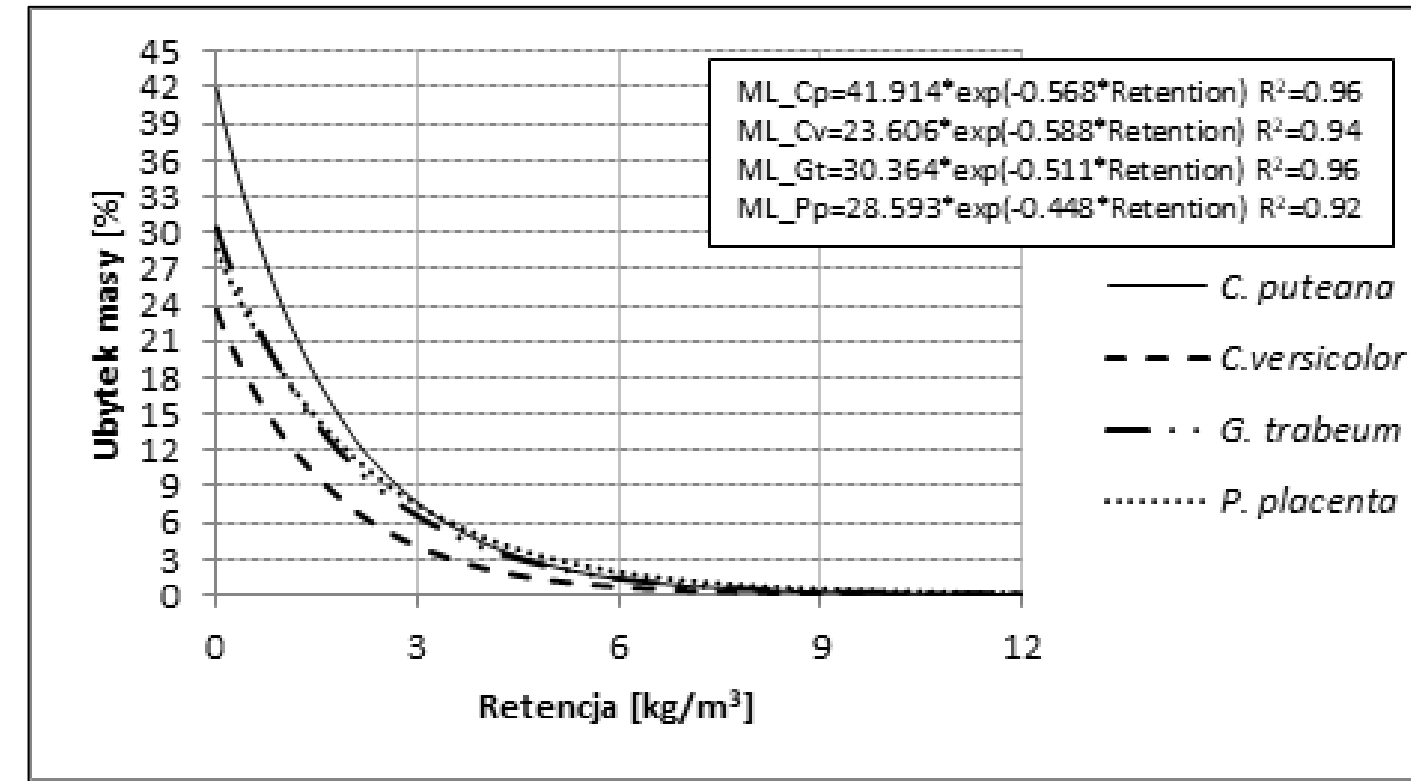
Oznaczenie minimalnej retencji i stężenia kofeiny w celu zapewnienia ubytku masy poniżej 3%.



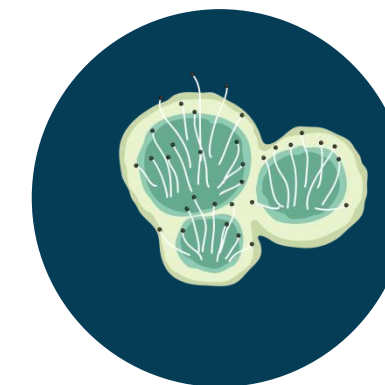
Testy mikologiczne

Graniczna wartość grzybobójcza 5,1 kg/m³

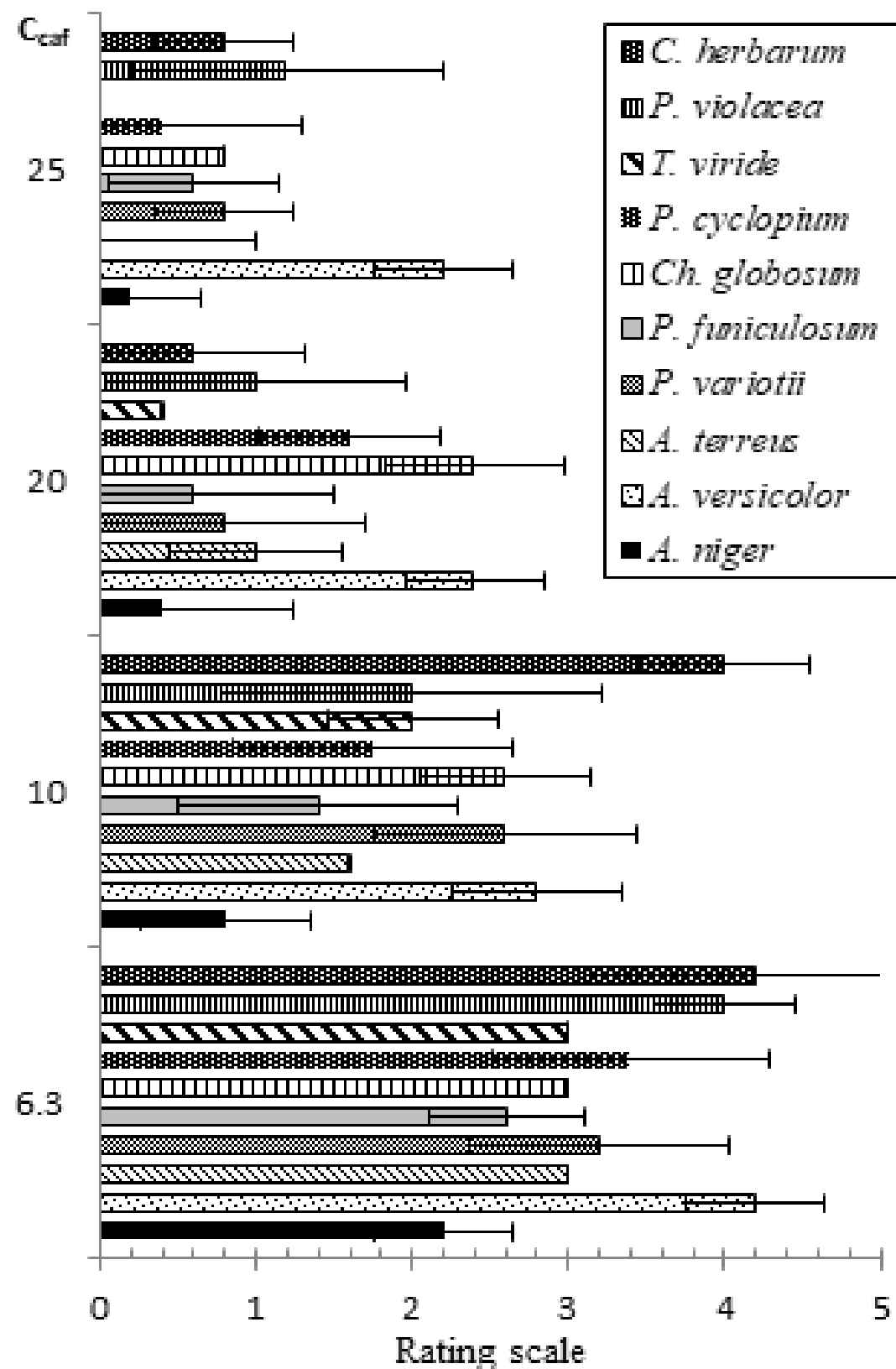
Grzyb	Niewymywane		Wymywane	
	Retencja [kg/m ³]	Caf [mg/ml]	Retencja [kg/m ³]	Caf [mg/ml]
<i>C. puteana</i>	4,65	6,42	18,11	24,99
<i>C. versicolor</i>	3,50	4,83	7,84	10,82
<i>G. trabeum</i>	4,53	6,25	18,10	24,98
<i>P. placenta</i>	5,03	6,94	10,69	14,75



Ocena wizualna wzrostu grzybów pleśniowych po 4 tygodniach inkubacji



Testy mikologiczne



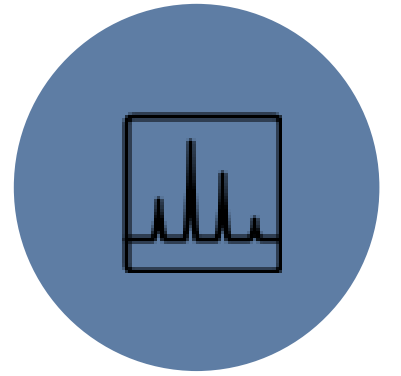
Odporność na pleśń oceniana w skali ocen ISO EN 846:

- 0 – brak widocznego wzrostu pod mikroskopem,
- 1 – wzrost niewidoczny gołym okiem, ale widoczny pod mikroskopem,
- 2 – powierzchnia porośnięta do 25%,
- 3 – pokrycie do 50%,
- 4 – pokrycie powyżej 50%,
- 5 – intensywny wzrost, cała powierzchnia pokryta grzybnią.



próbka kontrolna porośnięta *A.niger*

Analiza zawartości azotu wskazująca na obecność kofeiny w impregnowanym drewnie

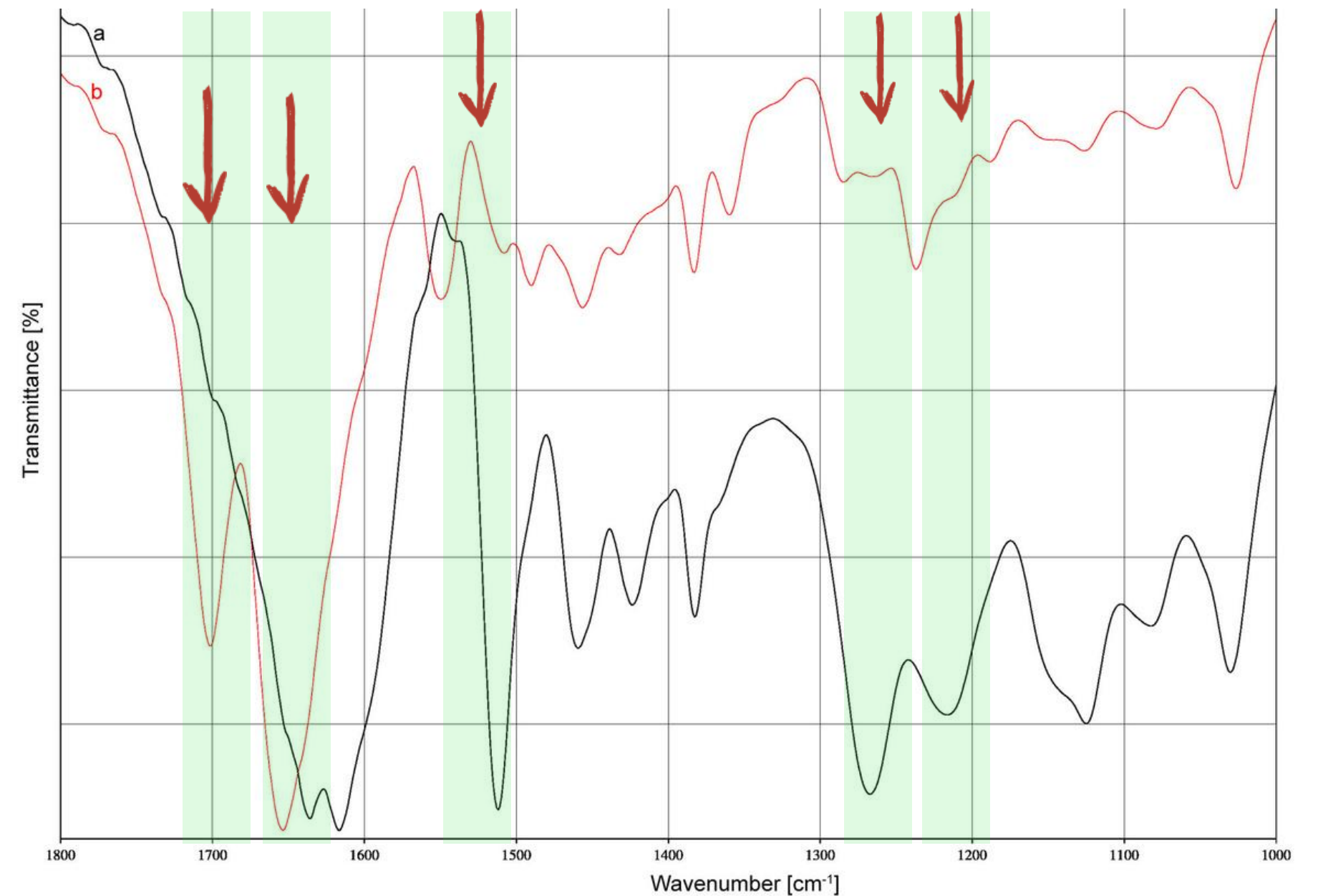


Analiza instrumentalna

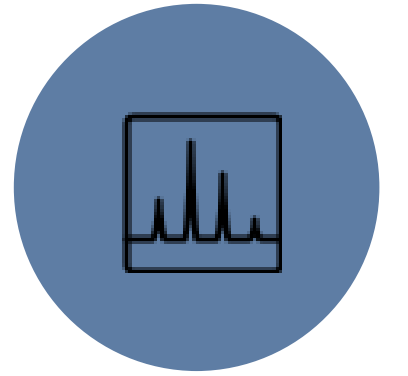
Próbki	Stężenie azotu [%]		
	N	C	H
Kontrolna	0,074 ^a ± 0,006	47,389 ^a ± 0,081	6,309 ^a ± 0,027
Niewymywane	0,980 ^a ± 0,041	47,592 ^a ± 0,006	6,259 ^a ± 0,042
Wymywana	0,469 ^b ± 0,003	47,536 ^a ± 0,070	6,309 ^a ± 0,174

Analiza FTIR ligniny (a) oraz mieszaniny kofeiny z ligniną (b)

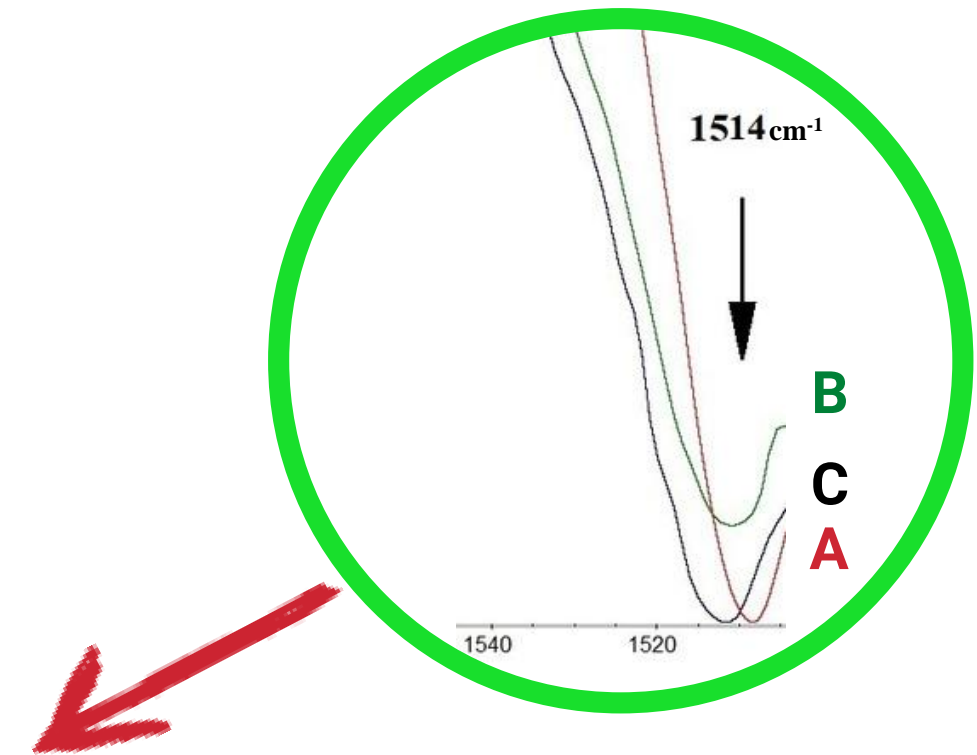
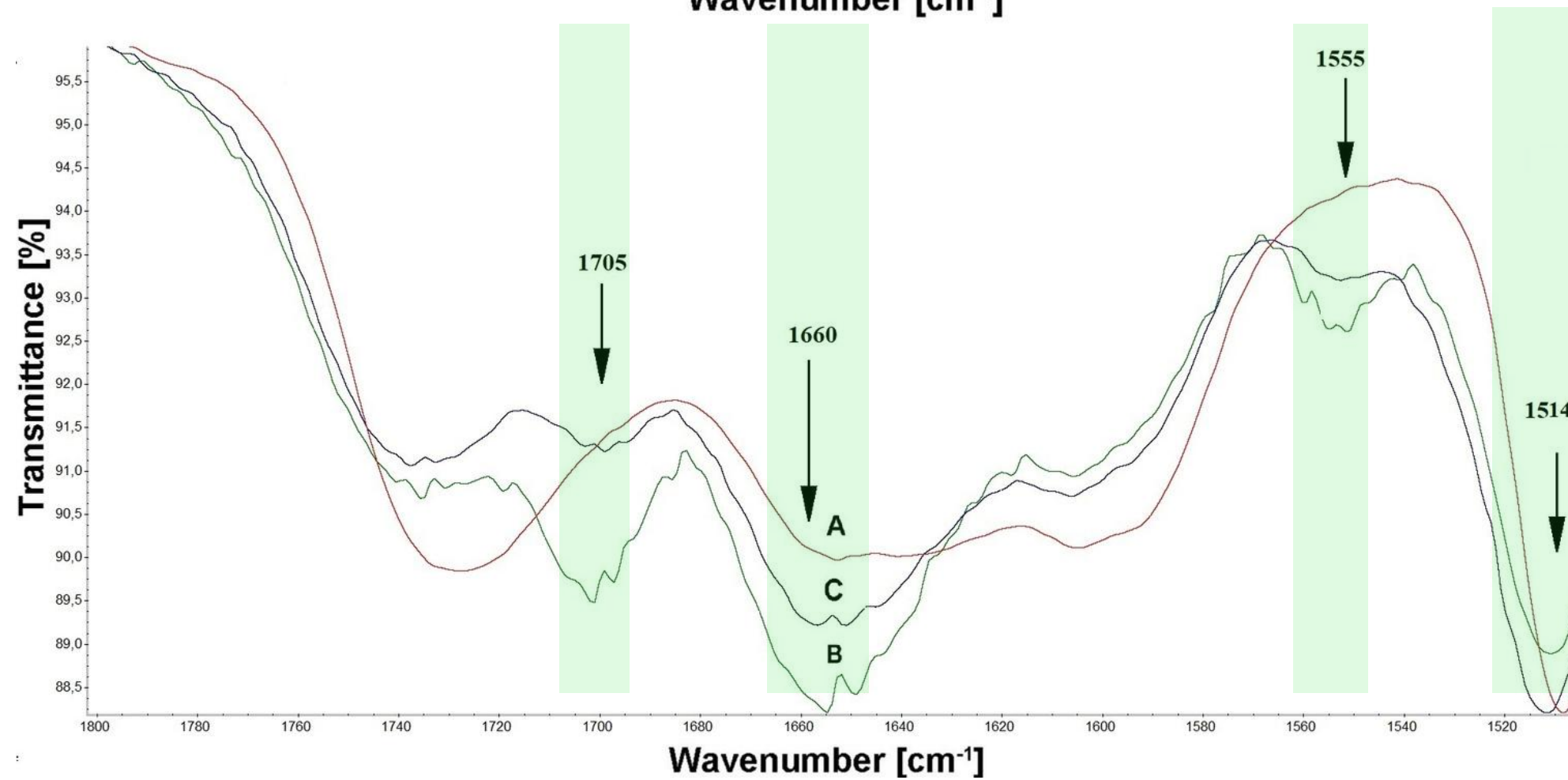
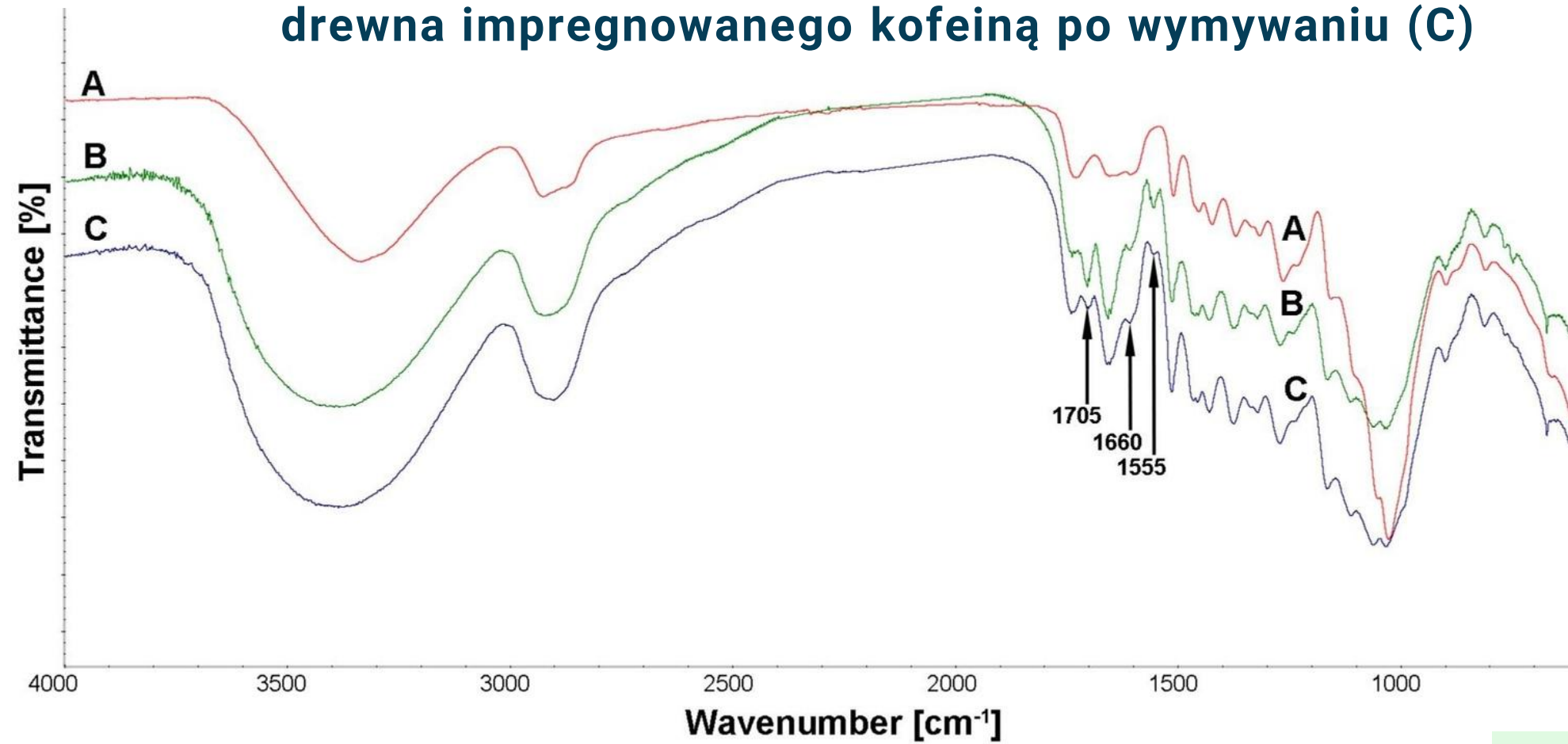
Drgania	Grupy	Zmiany
1705 cm ⁻¹	karbonylowa C=O(2)	przesunięcie
1660 cm ⁻¹	karbonylowa C=O(6)	spadek intensywności
1514 cm ⁻¹	szkielet aromatyczny	spadek intensywności
1280 cm ⁻¹	jednostka gwajacylowa	spadek intensywności
1214 cm ⁻¹	jednostka gwajacylowa	spadek intensywności

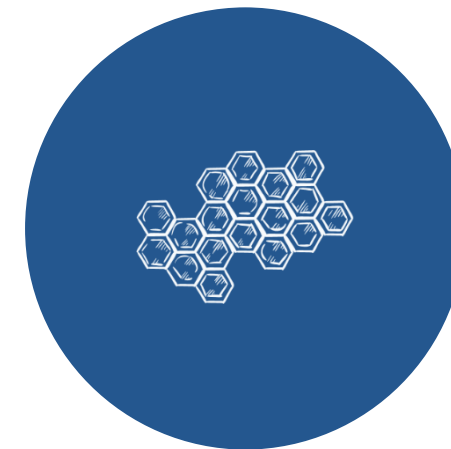


Widmo FTIR **sosny zwyczajnej (A)** i **drewna impregnowanego kofeiną (B)**,
drewna impregnowanego kofeiną po wymywaniu (C)

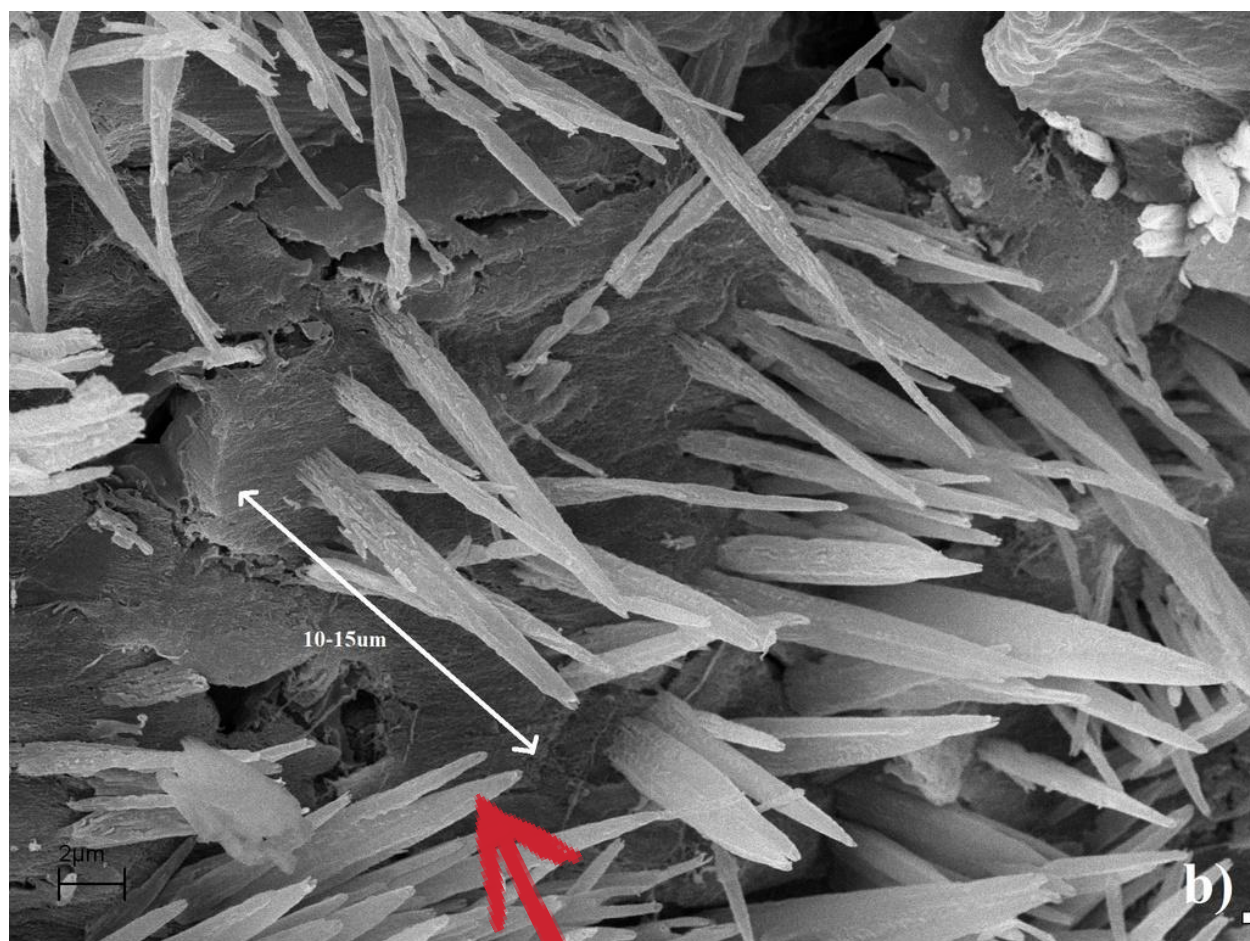


Analiza
instrumentalna

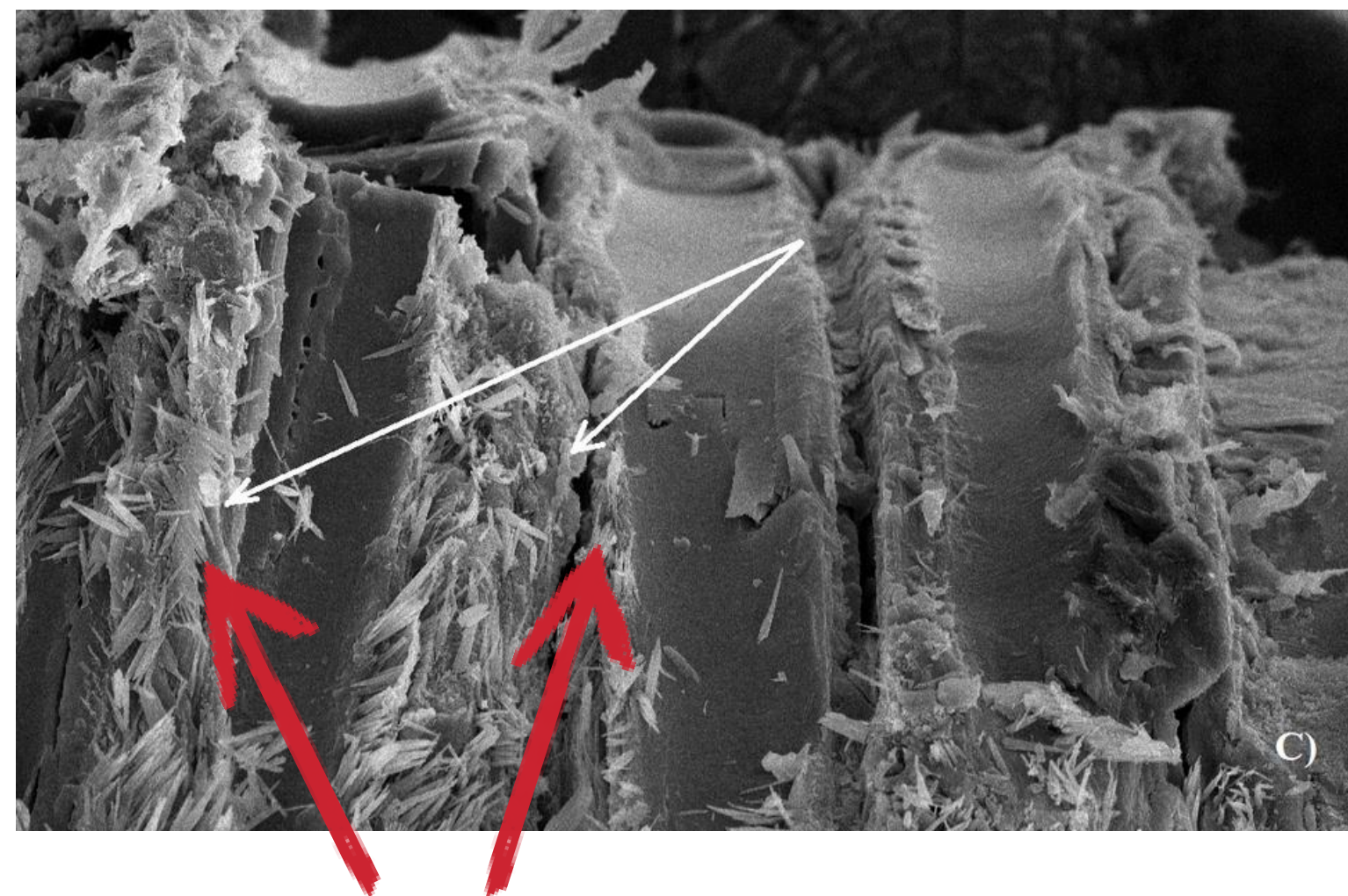




SEM

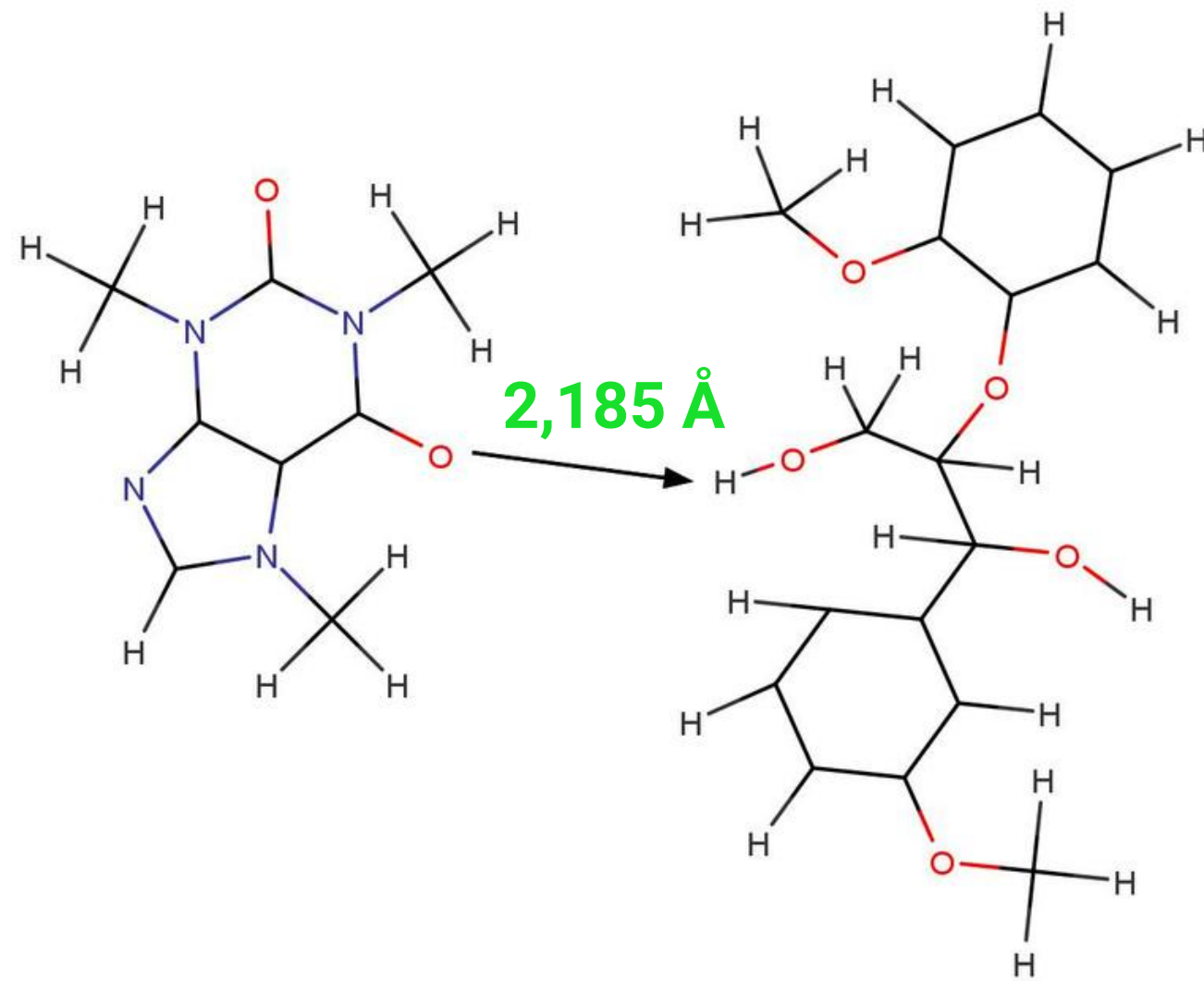


agregaty skryształizowanej kofeiny
(kryształy w kształcie igieł o długości
10-15 μm)

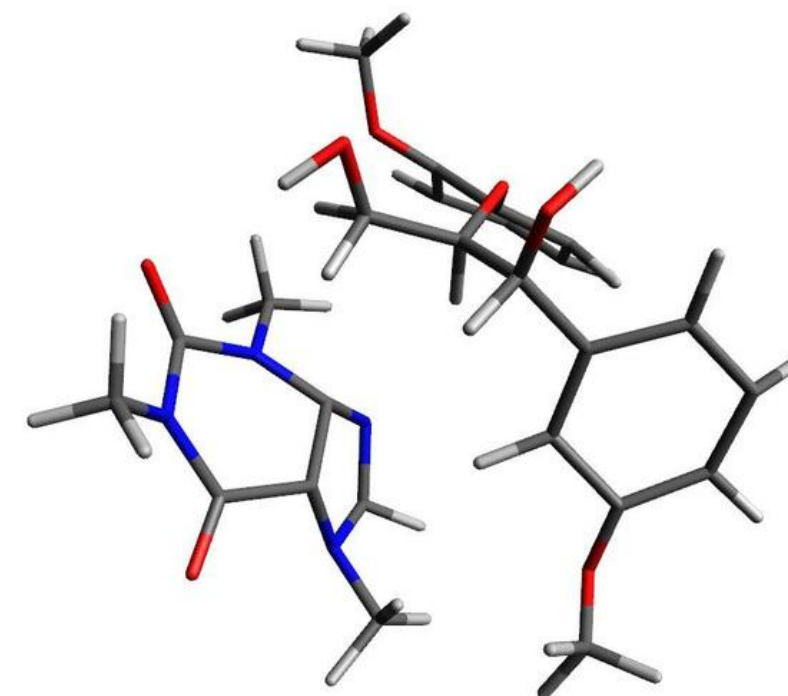
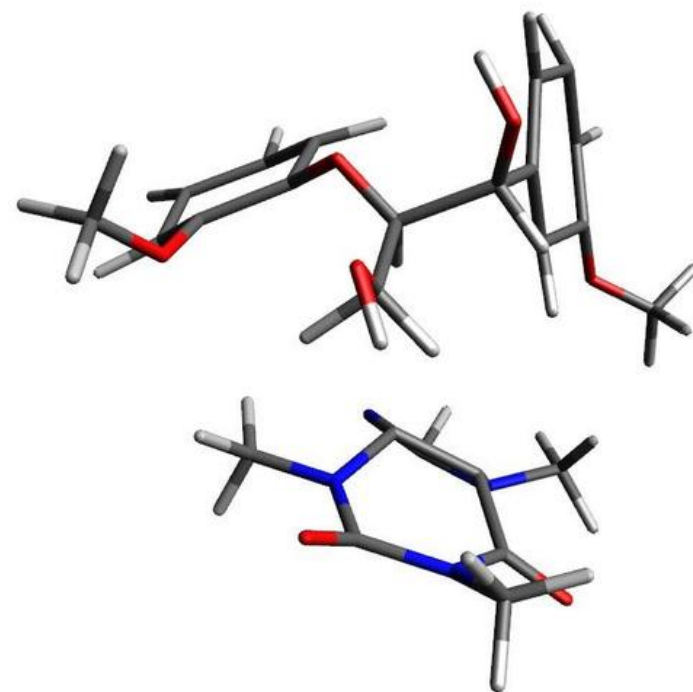
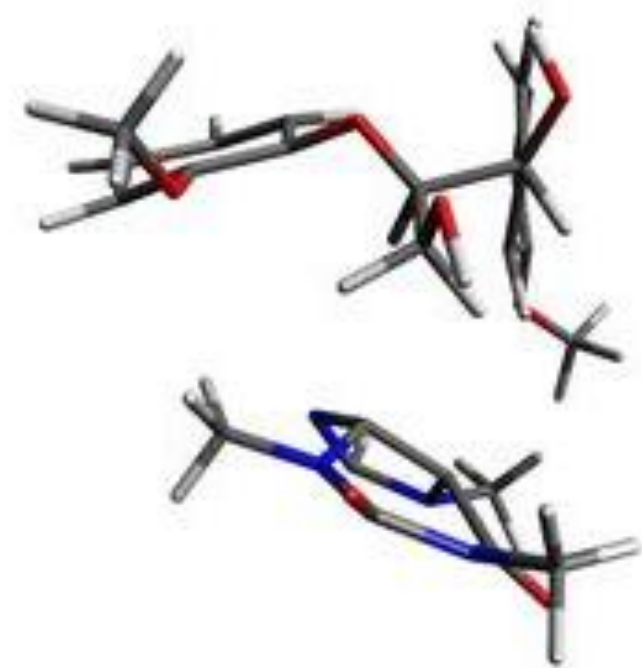


kofeina w przestrzeniach międzykomórkowych
drewna i zgromadzona pomiędzy włóknami
widocznymi w przekroju poprzecznym

Struktura oraz schemat oddziaływań cząsteczki kofeiny ze związkim modelowym, dimerem (β -O-4) jednostek gwajacylowych



Symulacja trajektorii wiązania między grupą metylenową strukturalnej części ligniny, a karbonylową grupą kofeiny (C6=O)

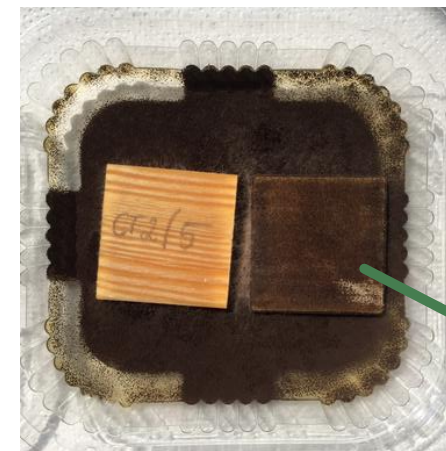
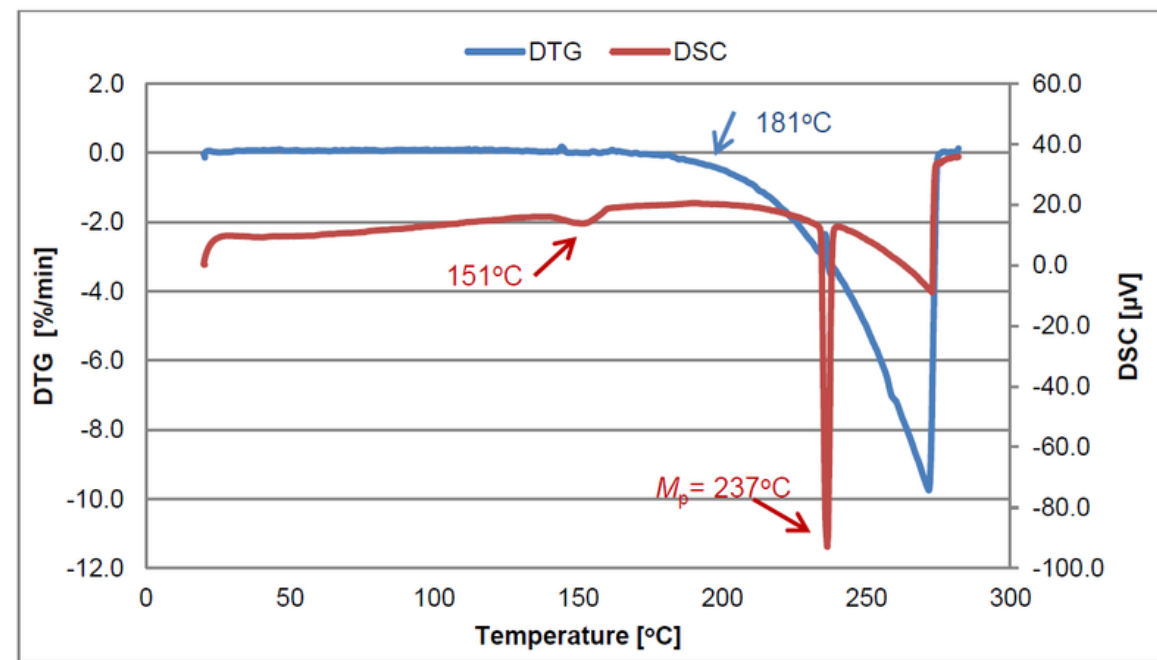


Symulacja molekularna

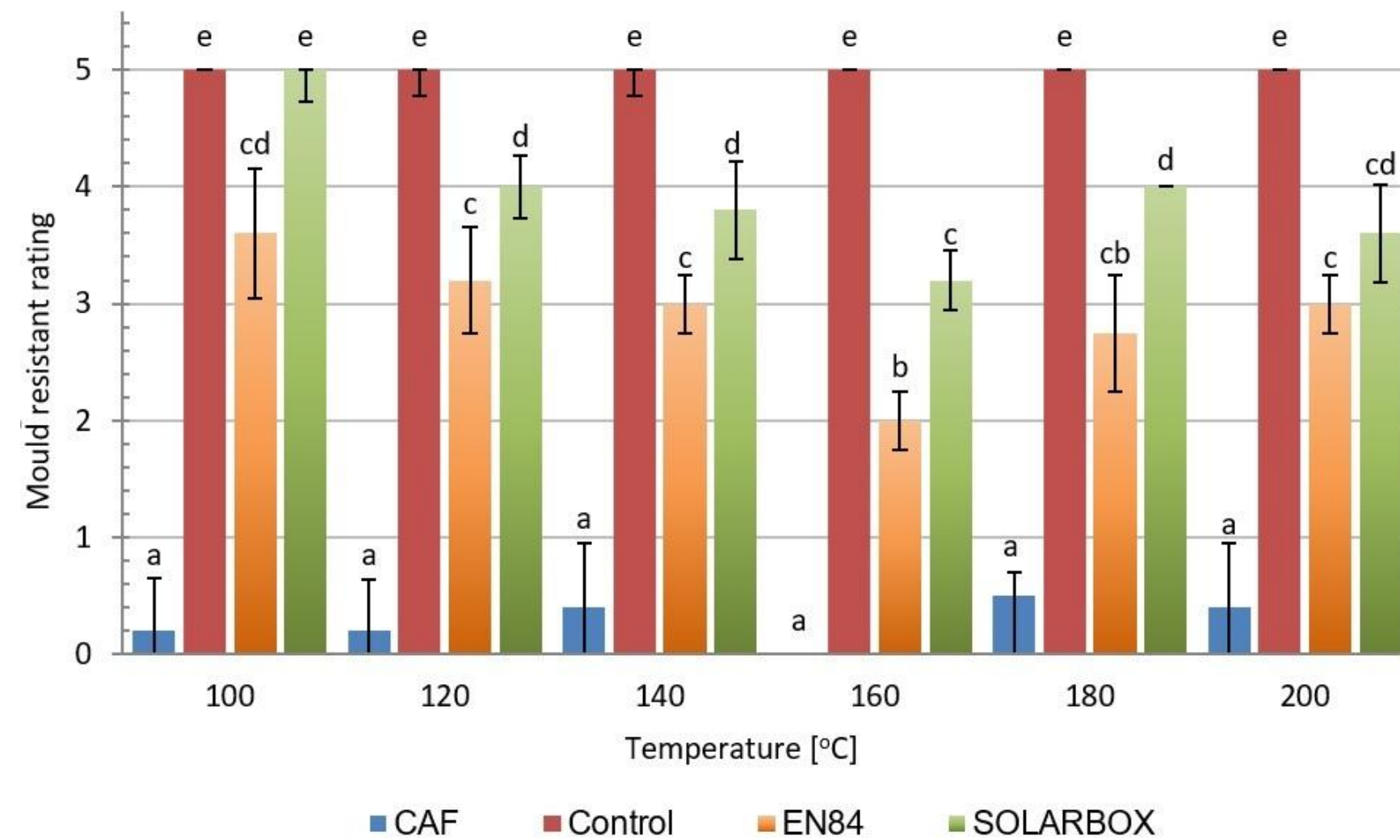
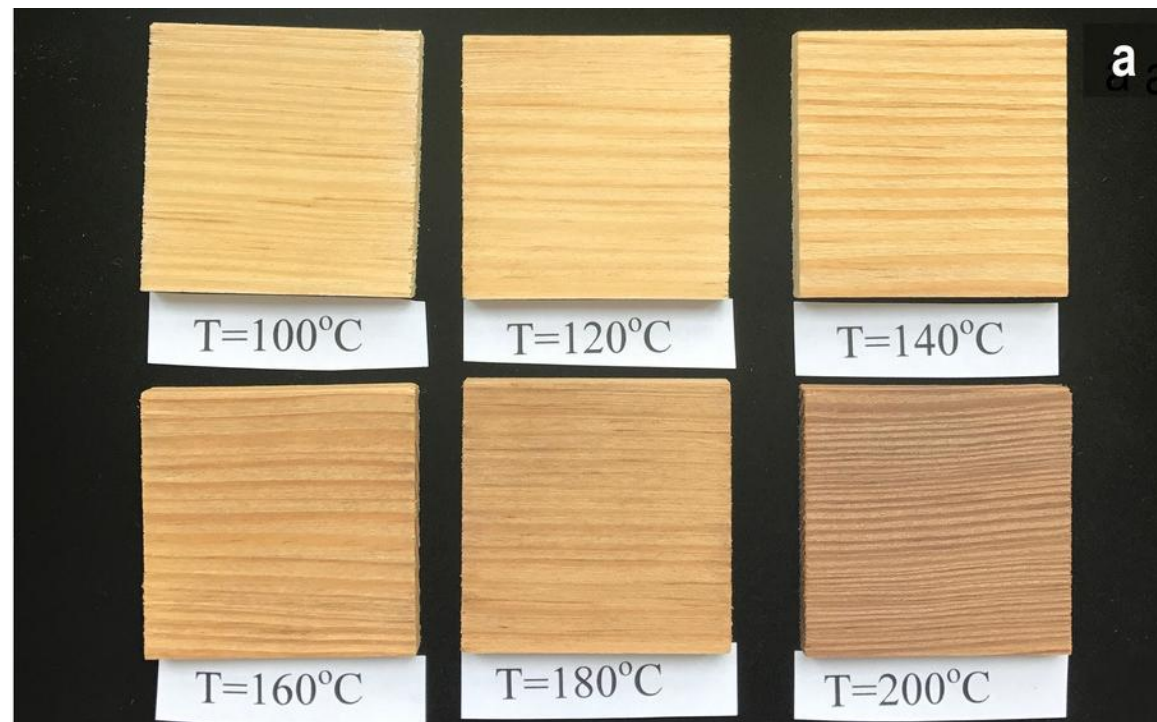
MODYFIKACJA TERMICZNA PRÓBEK DREWNA IMPREGNOWANYCH KOFEINĄ



Preparat
ochronny



próbka kontrolna
porośnięta
A.niger



Etap I - suszenie (24 h) w 103°C,
 Etap II - stopniowe nagrzewanie do max temp. (1 h),
 Etap III - właściwa MT (12 h)
 Etap IV - chłodzenie (5 h).

IMPREGNACJA DREWNA PREPARATEM OCHRONNYM SKŁADAJĄCYM SIĘ Z KOFEINY, PROPOLISU I SILANÓW



Preparat
ochronny

Zawartość procentowa azotu i krzemu w próbkach drewna

próbki	N [%]	stopień wycmycia [%]	Si [%]	stopień wycmycia [%]
niewymywane	0,549 ± 0,038	5,46	202,633 ± 0,437	23,62
wymywane	0,519 ± 0,036		154,767 ± 0,425	

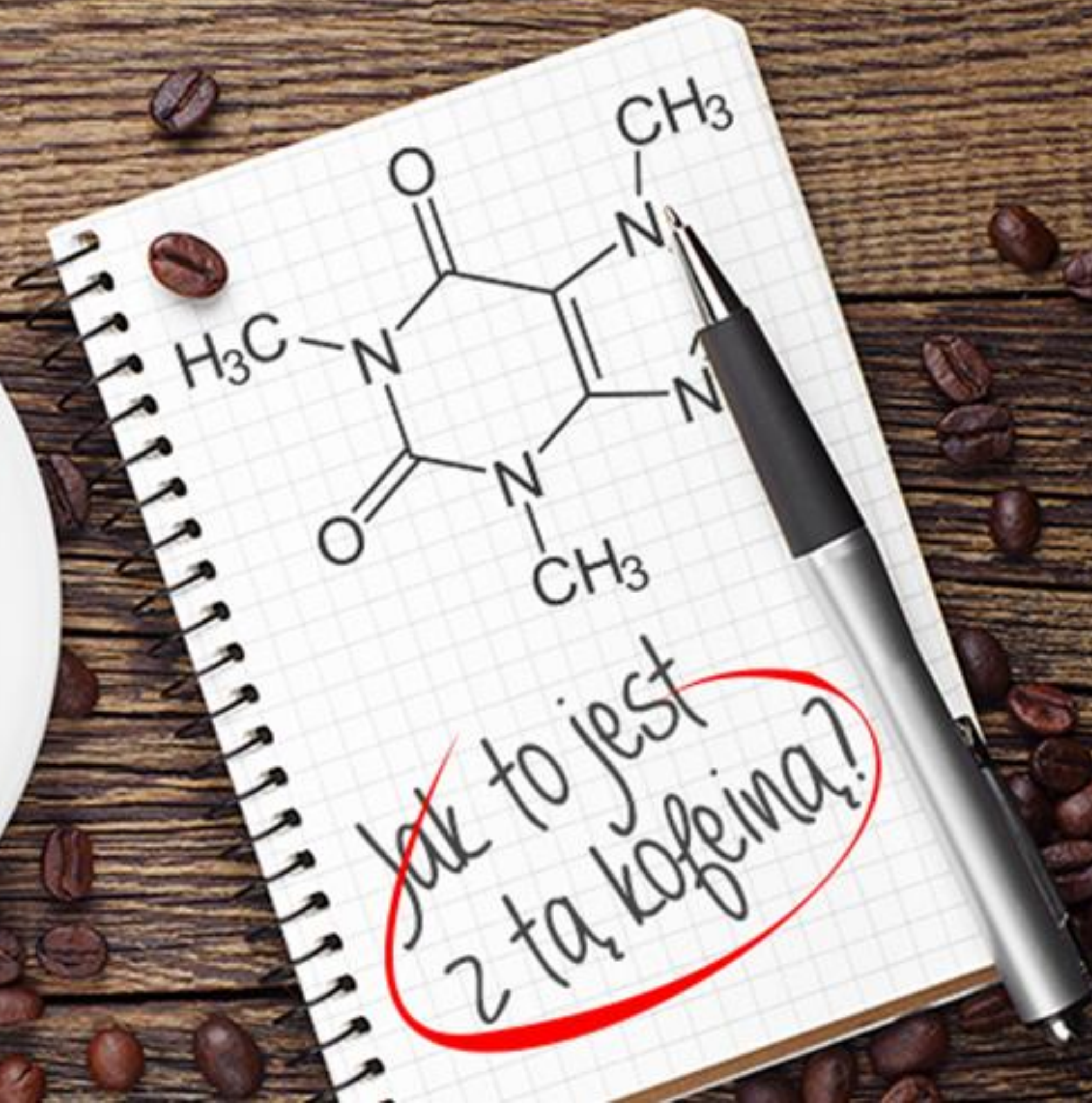
Wyniki badań mikologicznych względem *C.puteana*

próbki	retencja [kg/m ³]	RSD	WMC [%]	RSD	ML [%]	RSD
niewymywane	296,62	6,35	55,7	14,31	7,18	3,76
kontrolne			84,83	5,08	50,51	6,6
wymywane	297,96	3,28	31,58	2,21	1,61	0,46
kontrolne			85,42	3,46	49,67	4,94

WMC - wilgotność próbek drewna, ML - ubytek masy

Skład preparatu:

- 2% kofeina (Sigma – Aldrich),
- 30% etanolowy ekstrakt propolisu,
- 2,5% MTMOS (metylotrimetoksylan, Biesterfeld)
- 2,5% OTEOS (oktylotrietoksylan, Biesterfeld)



Wnioski i spostrzeżenia

1. Spośród przebadanych alkaloidów (chinolizydynowych, bischinolizydynowych i purynowych), kofeina charakteryzowała się właściwościami fungistatycznymi wobec *A. niger* i najwyższym potencjałem aplikacyjnym w kierunku ochrony drewna.

2. Drewno sosnowe zaimpregnowane kofeiną w ilości 5,1 kg/m³ jest odporne na rozkład powodowany przez grzyby rozkładu brunatnego (*C. puteana*, *G.trabeum*, *P. placenta*) i białego (*C. versicolor*). Zaimpregnowanie drewna roztworem kofeiny o stężeniu 20 mg/mL (przy retencji 15 kg/m³) powoduje zahamowanie lub opóźnienie wzrostu większości testowych grzybów pleśniowych (*A. niger*, *A. terreus*, *P. variotii*, *P. funiculosum*, *Ch. globosum*, *P. cyclopium*, *T. viride*, *C. herbarum*) i grzyba rozkładu szarego (*Ch. globosum*).



Wnioski i spostrzeżenia

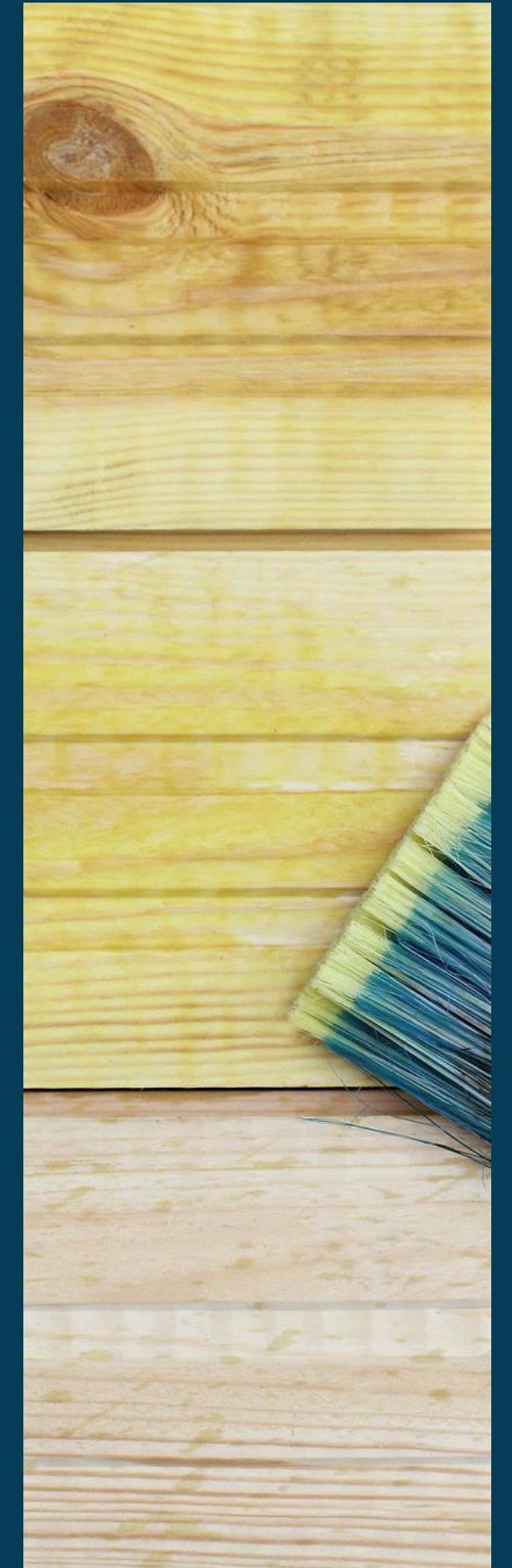
3. Kofeina ulega częściowemu wymyciu ze struktury drewna pod wpływem działania wody, na co wskazuje zmniejszona aktywność biologiczna oraz obniżenie zawartości azotu o 52%.
4. Analiza widm FTIR wykazała brak oddziaływań chemicznych między kofeiną, a celulozą.
5. Zaobserwowane zmiany w widmach FTIR, dotyczyły intensywności pasm pochodzących od grupy karbonylowej kofeiny C=O i pasm charakterystycznych dla ligniny.
6. Wyniki symulacji molekularnych wskazują, że interakcje mogą zachodzić pomiędzy grupą karbonylową (C=O) kofeiny i metylenową strukturalnej części ligniny. Odległość tlenu w pozycji O6 od wodoru wynosiła 2,185 Å. Ponadto, wyniki SEM wskazują, że kofeina gromadzi się w blaszce środkowej i ścianach głównych, które składają się większości z ligniny.



Wnioski i spostrzeżenia

7. Połączenie modyfikacji termicznej z wcześniejszą impregnacją drewna roztworem kofeiny, pozwala na częściowe wyeliminowanie wymywania kofeiny ze struktury drewna. Modyfikacja termiczna w temperaturze 160°C sosny zwyczajnej impregnowanej roztworem kofeiny, poprawiła odporność próbek poddanych przyspieszonemu starzeniu przed atakiem grzybów pleśniowych.

8. Preparat ochronny do drewna składający się z kofeiny, propolisu i organosilanów, przy retencji kofeiny 15 kg/m³, hamował rozwój grzyba rozkładu brunatnego *C. puteana*. Różnice w zawartości azotu (5,46%) odnotowane w próbkach drewna po impregnacji badanym preparatem, a następnie wymywaniu wodą, potwierdzają trwały charakter wiązania preparatu kofeinowo-propolisowo-silanowego z drewnem.



Dziękuję za uwagę





**WYDZIAŁ LEŚNY I TECHNOLOGII DREWNA
UNIwersytet PRZYRODNICZY W POZNANIU**

KOFEINA JAKO POTENCJALNY FUNGICYD W OCHRONIE DREWNA

Patrycja Kwaśniewska-Sip

PROMOTOR:

PROF. UPP DR HAB. INŻ. GRZEGORZ COFTA

PROMOTOR POMOCNICZY:

DR INŻ. MONIKA BARTKOWIAK