

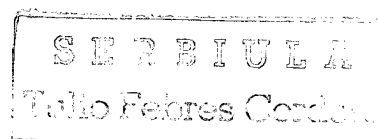


SD397
PGOV45

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES
CENTRO DE ESTUDIOS FORESTALES Y AMBIENTALES DE POST GRADO
MAESTRIA EN TECNOLOGIA DE PRODUCTOS FORESTALES

DURABILIDAD INDUCIDA DE LA MADERA DE PINO CARIBE
(*Pinus caribaea* var. *hondurensis*)
CON EXTRACTOS DE ALGUNAS LATIFOLIADAS DE
DURABILIDAD NATURAL ELEVADA



Ing. Ind. For. Jesús Velásquez
Tutor: Dr. Osvaldo Encinas.
Co-tutor: Msc. Luis Rojas.

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al grado de
Magíster Scientiae en Tecnología de Productos Forestales.

Mérida – Venezuela
Junio de 2000



ACTA DE VEREDICTO

Discusión del Trabajo de Grado titulado "DURABILIDAD INDUCIDA DE LA MADERA DE PINO CARIBE CON EXTRACTOS DE ALGUNAS LATIFOLIADAS DE DURABILIDAD NATURAL ELEVADA", presentado por el Ing. de Ind. For. JESÚS ENRIQUE VELÁSQUEZ GIL, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae en Tecnología de Productos Forestales.

Quienes suscriben, integrantes del jurado nombrado por el Consejo Directivo del Centro de Estudios Forestales y Ambientales de Postgrado, de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes, en su reunión extraordinaria del día 13-06-00, para conocer y emitir veredicto sobre el Trabajo de Grado mencionado declaramos:

PRIMERO: El día lunes 19 de junio de 2000 a las 11:00 a.m., reunidos en el cubículo del Prof. Osvaldo Encinas, en el Laboratorio Nacional de Productos Forestales de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, previa lectura del trabajo, se aceptó para su sustentación y se fijó el día 26-06-00 para su exposición y defensa.

SEGUNDO: El día señalado entre las 5:30 y 6:00 p.m., reunidos conjuntamente con el aspirante en la Sala de Usos Múltiples del LNPF de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, se realizó el acto público de sustentación de dicho trabajo.

TERCERO: El aspirante expuso los puntos fundamentales del mismo.

CUARTO: Una vez concluida la sustentación correspondiente, el jurado interrogó al aspirante sobre diversos aspectos del trabajo.

QUINTO: Terminado el acto, el jurado previa la deliberación correspondiente, le imparte en forma unánime su aprobación y recomienda su publicación.

En Mérida a los veintiséis días del mes de Junio del año dos mil.

Prof. Osvaldo Encinas
Tutor-Coordador



Prof. Luis Rojas
Co-Tutor

Representante por el Consejo
Directivo del Programa Tecnología
de Productos Forestales

Prof. Jorge Durán

Representante por el Consejo
del Centro de Estudios Forestales
y Ambientales de Postgrado

CONTENIDO

	Pag.
Agradecimientos.	
Resumen	I
Abstract	II
Índice de Figuras	III
Indice de Tablas	IV
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
Objetivos	4
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO II	
Revisión Bibliográfica	5
II.1. Anatomía de la madera	5
II.2. Naturaleza química de la madera	7
II.3. Formación del duramen	8
II.4. Química de los extractivos	8
II.5. Biodegradación de la madera	10
II.6. Durabilidad natural de la madera	13
II.7. Métodos para evaluar la durabilidad de la madera	13
II.8. Extractivos naturales como preservantes	14
CAPÍTULO III	
Actividad antifúngica in vitro del extracto de la madera de algunas latifoliadas de durabilidad natural elevada.	
III.1. Materiales y métodos.	16
III.1.1. Materiales	16
III.1.1.a. Microorganismos ensayados	16
III.1.2. Métodos	17
III.1.2.a. Preparación de los extractos	17
III.1.2.b. Ensayo microbiológico	17
III.2. Resultados y discusión.	18
III.3. Conclusiones	24

CAPÍTULO IV

Determinación de la capacidad antifúngica de los extractos etanólicos de especies latifoliadas, en madera de Pino caribe.

IV.1. Materiales y métodos	25
IV.1.1. Materiales	25
IV.1.1.a. Preservación de las probetas	25
IV.1.1.b. Bioensayo	25
IV.1.2. Métodos	26
IV.1.2.a. Preservación de las muestras	26
IV.1.2.b. Bioensayo	26
IV.2. Resultados y discusión	27
IV.2.1. Retención del producto químico	27
IV.2.2. Observaciones macroscópicas	28
IV.2.3. Pérdida de peso	29
IV.3. Conclusiones	32

CAPÍTULO V

Actividad antifúngica del extracto etanólico de la especie *Tabebuia serratifolia* y de las fracciones aisladas.

V.1. Materiales y métodos	33
V.1.1. Materiales	33
V.1.1.a. Madera	33
V.1.1.b. Fraccionamiento y purificación del extracto	33
V.1.2. Métodos	33
V.1.2.a. Obtención del extracto	33
V.1.2.b. Purificación y aislamiento del ingrediente activo	34
V.2. Resultados y discusión	35
V.3. Conclusiones.	41

CAPÍTULO VI

Conclusiones y Recomendaciones	43
Referencias Bibliográficas	45
Anexos	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura anatómica de las coníferas	6
Figura 2. Estructura anatómica de las latifoliadas	7
Figura 3. Inhibición del crecimiento de los extractos recuperados asociados con <i>trametes versicolor</i> .	21
Figura 4. Actividad antifúngica del extracto etanólico de las maderas ensayadas, frente a los hongos de prueba, al sexto día de incubación	23
Figura 5. Niveles de retención del madera de Pino caribe tratadas con extractos de latifoliadas a tres niveles de concentración	28
Figura 6. Pérdida de peso de bloques de Pino caribe tratados con el extracto etanólico de diferentes especies y expuestos a hongos de pudrición marrón y blanca	30
Figura 7. Esquema del fraccionamiento y purificación del extracto etanólico del especie puy.	35
Figura 8. Evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones del extracto etanólico de la especie.	37
Figura 9. TLC de la sub-fracciones F-8 en hexano : éter (4:1)	38
Figura 10. Evaluación de la actividad antifúngica de las sub-fracciones F-8 del extracto etanólico de la madera de puy.	38
Figura 11. Evaluación de la actividad antifúngica de las sub-fracciones F-8.2 del extracto etanólico de la madera de puy.	39
Figura 12. Espectro RMN ¹ H del Lapachol.	40
Figura 13. Espectro RMN C ¹³ de la estructura del Lapachol.	41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de extractivos en base al peso seco de la madera	19
Tabla 2. Inhibición del crecimiento en porcentaje de los extractos recuperados con acetona, etanol y agua después de 6 días de incubación.	20
Tabla 3. Pérdida de peso de la madera de Pino caribe asociada a <i>G. trabeum</i> y <i>T. versicolor</i> durante tres meses de incubación.	30
Tabla 4. Fracciones obtenidas en el extracto etanólico de la madera de puy.	36
Tabla 5. Señales del espectro IR del Lapachol.	41

Resumen

La potencialidad de los extractivos obtenidos de especies latifoliadas de elevada durabilidad natural fue evaluada con el objetivo de incrementar la durabilidad de la madera de Pino caribe, frente a dos agentes destructores de madera conocidos *Gloeophyllum trabeum* y *Trametes versicolor*. Los extractivos de la madera del duramen de Algarrobo (*Hymenaea courbaril* L.), Cartán (*Centrolubium paraense* Tul. Var. *orinocense* Benth), Puy (*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nicholson.), Teca (*Tectona grandis* L. F), y Zapatero (*Peltogyne porphyrocardia* Griseb.), se recuperaron empleando extractores Soxhlet y como solventes acetona, etanol y agua. La evaluación de la actividad antifúngica de estos extractos se realizó siguiendo el método dilución en gel con inoculación superficial en placa. El extracto etanólico de la especie Puy resultó ser el más tóxico de los extractos evaluados, a una concentración mínima inhibitoria del 0,2% (p/v), seguido por los extractos de Cartán y Teca. Las pruebas de durabilidad inducida sobre el Pino caribe se realizaron durante un tiempo de exposición de 12 semanas, utilizando los extractos etanólicos obtenidos de la madera de Puy, Cartán y Teca, como potenciales biopreservantes, la evaluación se realizó siguiendo las pautas establecidas en la norma ASTM-D1413 -76. los resultados muestran que todos los extractos controlaron el efecto degradante de los hongos de prueba, sin embargo sólo el extracto de la madera de Puy, aplicado al 2% logró proporcionar la mayor durabilidad al Pino caribe. Debido a la elevada potencialidad de este extracto, se aplicaron métodos cromatográficos y espectroscópicos en el aislamiento e identificación del compuesto químico con mayores propiedades fungicidas. El extracto etanólico de la madera de Puy, fue caracterizado por la presencia de compuestos naftaquinónicos como el Lapachol.

Abstract

Extractives potentiality obtained from hardwood of very naturally durables species were tested to increase Caribbean pine bioresistance against pure strain brown and white rot fungi *Gloeophyllum trabeum* *Trametes versicolor*. Extractives from heartwood of Algarrobo (*Hymenaea courbaril* L.), Cartán (*Centrolubium paraense* Tul. Var. *orinocense* Benth), Puy (*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nicholson.), Teak (*Tectona grandis* L. F) and Zapatero (*Peltogyne porphyrocardia* Griseb.), wood were extracted by Soxhlet extraction under reflux using acetone, ethylic alcohol and water as solvent. The fungal activity was determinate using agar dilution with superficial method. Ethanolic extract of Puy species resulted with higher biological activity between species tested, as inhibitory minimal concentration of 0,2 % (w/v), follow to Cartan and Teak species. Bioresistance enhance of Caribbean pine was tested according to Soil block test (ASTM D 1413-76 test method) during 12 week against rot fungi using ethanolic extract from Puy, Cartan and Teak wood as biopreservatives. Results show that all extract can to control the fungi tested, however only ethanolic extract from Puy heartwood at 2% (w/v) enhance durability of Caribbean pine. Because higher potentiality of this extract spectroscopy and chromatography method were applied to isolated compounds with biological activity higher. The ethanolic extract was characterized by the occurrence of naphthoquinone compounds such as Lapachol.

INTRODUCCIÓN

La madera, como todo material orgánico, es susceptible a la descomposición y deterioro provocados por diversos agentes de naturaleza biológica, física, mecánica y química, dentro de los cuales los agentes biológicos son reconocidos como los de mayor peligrosidad en la destrucción de los tejidos lignocelulósicos, razón suficiente para prestar especial atención a sus necesidades, limitaciones y forma de actuar (Santini, 1988). La pudrición resulta ser una de las mayores causas de deterioro microbiológico de la madera y puede originar por ejemplo fallas estructurales en las construcciones de madera y algunas veces de manera rápida. Los más importantes organismos de pudrición de la madera son los hongos de pudrición blanca, marrón, blanda y bacterias. La pudrición marrón es la más común y puede considerarse como el tipo de pudrición más destructivo de la madera en servicio (Eaton & Hale, 1993).

Si bien todas las maderas son susceptibles al deterioro biológico, muchas maderas de especies latifoliadas, particularmente aquellas que presentan una transición abrupta albura-duramen, poseen una particular resistencia, o mejor dicho una particular bioresistencia al deterioro por acción de hongos, bacterias y hasta al ataque de insectos. Esta resistencia es generalmente atribuida a la presencia en las paredes celulares de sustancias o compuestos químicos activos que se ha comprobado juegan un papel importante en la durabilidad natural de la madera, es decir su resistencia natural a los agentes destructores de la madera, ya que proporcionan a la madera por ejemplo propiedades fungicidas o fungistáticas que impiden o inhiben el crecimiento y desarrollo de los agentes xilófagos (Suttie & Orsler, 1996). Estos componentes químicos naturales presentes en la madera son comúnmente conocidos con el nombre de extractivos, los cuales son diferentes para cada especie y se identifican principalmente por que proporcionan a la madera color, sabor, olor e inflamabilidad típica de cada especie (Sjöström, 1981).

La mejor manera de proteger a la madera del biodeterioro es mediante su tratamiento con sustancias tóxicas a los microorganismos degradantes; desafortunadamente muchas de estas sustancias químicas son calificadas como contaminantes o peligrosas al contacto humano, por lo que debido al indeseable efecto que producen algunos fungicidas principalmente los sintéticos, existe una urgente necesidad de encontrar sustancias químicas de origen natural, alternativos para el control de agentes destructores de la madera y/o el deterioro de otros productos de origen orgánico. En la industria de la preservación de la

madera algunos compuestos como las sales CCA (cobre, cromo, arsénico) proporcionan un efecto insecticida y fungicida efectivo; sin embargo, su amplia aplicación ha incrementado la crítica mundial debido a la elevada toxicidad sobre las personas y su asociación con daños ambientales (Doppelreiter & Koriath, 1978). Es así que se está impulsando la utilización de ciertos compuestos originados de plantas superiores que presentan propiedades fungitóxicas y fungistáticas de gran potencial, pero que requieren de especial atención para ser utilizados en el control de agentes patógenos (Dubey & Kishore, 1987). La protección biológica representa en consecuencia una alternativa atractiva para el uso de sustancias bioquímicas, lo cual ha sido estimulado por investigaciones dirigidas a identificar y desarrollar bioprotectores en un gran número de productos para proteger a la madera.

Uno de los aspectos que persigue la protección biológica es prevenir en la madera los cambios que puede sufrir por acción de los hongos, más que controlar al hongo una vez que éste se ha establecido (Dawson & Morrell, 1990). Por otra parte, los problemas toxicológicos en la salud de muchas personas en contacto directo con algunos químicos empleados en la preservación de la madera, e incluso con la madera tratada, hacen necesario desarrollar productos alternativos capaces de inhibir el desarrollo de los agentes causantes de la pudrición en la madera, pero que a su vez presenten una deseada inocuidad ecológica y toxicológica (Peredo, 1993).

Por las razones indicadas, se ha intensificado el estudio de compuestos extraídos de las plantas, particularmente aquellas presentes en el duramen de especies resistentes a hongos y termitas, que funcionan como inhibidores o reguladores del crecimiento, los cuales podrían ser empleados en la formulación de preservantes con un mínimo de efectos colaterales (Doppelreiter & Koriath, 1978). En el futuro es posible llegar a reemplazar algunas de las propiedades de las formulaciones de preservantes de madera sintéticos con formulaciones basadas en ingredientes bioactivos naturales presentes en los extractos tóxicos de la madera o de otros componentes químicos resistentes aislados de productos naturales (Wong & Singh, 1997)

La presente investigación pretende evaluar los extractos de cinco especies latifoliadas, Puy (*Tabebuia serratifolia*), Zapatero (*Peltogyne porphyrocardia*), Algarrobo (*Hymenaea courbaril*), Cartán (*Centrolubium paraense*) y Teca (*Tectona grandis*), las cuales presentan elevada durabilidad natural a la acción de agentes destructores de la madera, para posteriormente ser aplicados mediante tratamientos preservantes a especies de baja durabilidad natural como es

el caso del pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*). En particular, se estudiará el efecto de la durabilidad inducida con estos biopreservantes ante dos hongos estandarizados para pruebas de durabilidad (ASTM D1413-76).

La mayor contribución de esta investigación se considera será la apertura de nuevos caminos en la obtención de compuestos orgánicos con carácter preservante a partir de material natural, los cuales pueden ser empleados en el área de conservación de maderas, disminuyendo así los riesgos o problemas toxicológicos generados en el manejo y uso de los preservantes tradicionales.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO I

Objetivos

I.1.- Objetivo general

Determinar la durabilidad inducida de la madera de Pino caribe, con extractos de maderas latifoliadas de elevada durabilidad natural.

I.2.- Objetivos específicos:

- Obtener extractivos de cinco especies venezolanas de reconocida durabilidad natural, en diferentes solventes hidrófilicos e hidrófóbicos
- Evaluar la capacidad fungicida, fungistática y el límite de toxicidad de los potenciales biopreservantes, obtenidos de los extractivos.
- Evaluar la durabilidad inducida de la especie Pino caribe mediante la norma ASTM D1413-76.
- Adicionalmente se tratará de identificar en el extracto de mayor actividad biológica el o los componentes con mayor actividad fungicida mediante el empleo de técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

Partiendo de la obtención de los extractivos de las maderas a ensayar, y para cumplir con los objetivos propuestos, se ha considerado conveniente realizar el trabajo de investigación en tres partes claramente definidas en sus objetivos, metodología y consecución de resultados:

Capítulo III. Actividad Antifúngica *in vitro* del extracto de algunas latifoliadas de durabilidad natural elevada.

Capítulo IV. Determinación de la capacidad antifúngica de los extractos etanólicos de especies latifoliadas, en madera de pino caribe.

Capítulo V. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto etanólico y fracciones de la especie *Tabebuia serratifolia*

CAPITULO II

Revisión bibliográfica

II.1.- La Madera: Estructura y Composición

II.1a.- Anatomía de la madera

La madera es un material de origen orgánico y es heterogéneo, su estructura anatómica varía considerablemente reflejándose sobre sus propiedades como permeabilidad, conductividad térmica, difusión y durabilidad natural, entre otros (Siau,1984). Está compuesta de células elongadas, la mayoría de las cuales se encuentran orientadas en dirección longitudinal al tronco del árbol, estas células varían en su forma de acuerdo a su función, proporcionando la resistencia mecánica al árbol, además de desempeñar funciones de transporte de líquidos y almacenamiento de sustancias de reservas (Sjöström, 1981).

El arreglo y disposición de las células de la madera pueden ser observadas, con mayor detalle en tres planos de corte: sección transversal, sección tangencial y radial. En la sección transversal de un árbol es posible distinguir macroscópicamente, tres partes: medula, madera y corteza. Entre la madera y la corteza existe un tejido muy delgado visible solo al microscopio, el cual produce madera al interior y corteza al exterior, este tejido es conocido como cambium vascular (Tsoumis,1991). Desde el punto de vista estructural la madera de coníferas (Gimnospermas), presenta una mayor uniformidad en sus estructuras anatómicas, en cambio las latifoliadas (Angiospermas) presentan extremas diferencias estructurales, lo que facilita la identificación una de otras visualmente (Siau,1984).

Las coníferas muestran una estructura anatómica relativamente simple (Figura 1). Consisten de aproximadamente 90 – 95 % de traqueídas las cuales son células largas y delgadas de extremos cerrados. El incremento en el espesor de las paredes celulares de estas estructuras, conlleva a la diferenciación entre madera temprana y tardía, las cuales difieren en color, densidad y otros aspectos estructurales (Fengel & Wegener, 1984). La madera está caracterizada por la presencia de capas concéntricas más o menos conspicuas conocidas como anillos de crecimiento o anillos anuales. En las coníferas estos anillos son adicionados cada año y pueden ser distinguibles a simple vista, en cambio en las latifoliadas estos anillos no son fácilmente distinguibles debido a la ausencia de estaciones climáticas bien definidas y cuando se distinguen corresponden a periodos de sequía y humedad; los anillos de crecimiento pueden distinguirse debido a la diferencia entre madera temprana y madera tardía (Tsoumis,1991).

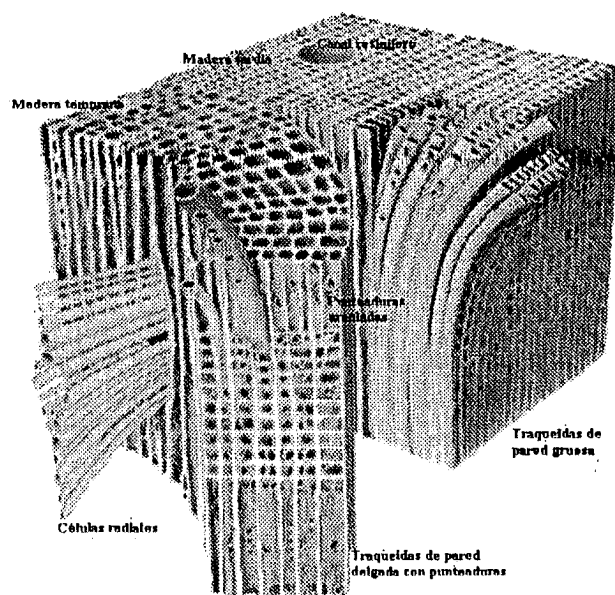


Figura 1. Estructura anatómica de las coníferas (Hugh, 1989).

Dependiendo de las condiciones de crecimiento de los árboles, es posible observar madera de compresión en coníferas y de tensión en latifoliadas, las cuales presentan propiedades físicas y químicas diferentes a la madera normal (Siau, 1984). En muchas especies la sección transversal del tronco no presenta un color uniforme, debido a que la porción central e inerte es más oscura que la zona periférica. Estas porciones son conocidas como duramen y albura respectivamente. La distinción entre albura y duramen es de tipo funcional ya que a medida que el diámetro del tronco se incrementa con el crecimiento, las células de los viejos anillos de crecimiento detienen su participación en los procesos activos del árbol originándose una translocación de las sustancias de almacenamiento. Estos cambios funcionales están asociados con los cambios químicos, estructurales y fisiológicos que dan origen a la formación del duramen (Hillis, 1971; Tsoumis, 1991).

La madera de las especies latifoliadas anatómicamente se encuentra conformada por estructuras conocidas como fibras *liberiformes* y *fibrotraqueidas*, además de estructuras en forma de tubos, alargadas y perforadas en los extremos, conocidas como vasos, los cuales desempeñan funciones de conducción y transporte de líquidos (Figura 2). Adicionalmente, es posible observar células de *parénquima* longitudinal y radial, las cuales son más numerosas en las latifoliadas que en las coníferas (Fengel & Wegener, 1984).

Observando las células con mayor detalle, es posible visualizar pequeñas aberturas formando cavidades en la pared celular (vasos, fibras, traqueidas), las cuales son diferentes

entre las especies, estas cavidades son conocidas como punteaduras y permiten la comunicación inter estructuras (Hillis, 1983; Fengel & Wegener, 1984).

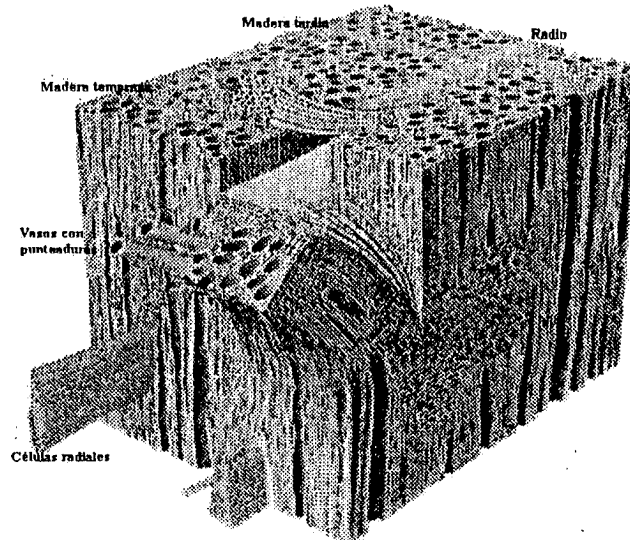


Figura 2. Estructura anatómica de las latifoliadas (Hugh, 1989).

II.2.- Naturaleza Química de la Madera.

La composición química elemental de la madera, como la de todo material orgánico, está conformada por carbono (C), oxígeno (O), hidrógeno (H) y pequeñas cantidades de nitrógeno (N). La combinación de todos estos elementos conlleva a la formación de los componentes estructurales principales de las fibras de la madera (Tsoumis, 1991).

La madera está formada por tres componentes principales:

Celulosa: usualmente es el componente dominante representando aproximadamente entre el 40 – 50 % del peso seco de la madera libre de extractivos. La celulosa está conformada por una cadena de moléculas, de elevado grado de polimerización, unidas por enlaces β 1:4 de unidades de glucosa, organizadas en estructuras cristalinas o micelar dentro de las microfibrillas (Sjöström, 1981; Rayner & Boddy, 1988).

Hemicelulosa: se encuentra asociada con la celulosa, son polímeros de pesos moleculares relativamente bajos, conformado por cinco azúcares neutros, las hexosas glucosa, manosa, galactosa y las pentosas xilosa y arabinosa, contienen adicionalmente unidades de ácidos urónicos. Las hemicelulosas representan aproximadamente entre el 25 – 40 % del peso seco

de la madera libre de extractivos en madera de coníferas y cerca del 25 – 30 % en madera de latifoliadas (Sjöström, 1981; Siau, 1984; Rayner & Boddy, 1988).

Lignina: el tercer componente macromolecular de importancia, es un polímero complejo de naturaleza fenólica, resultante de la polimerización de unidades de fenilpropano, para formar una molécula extremadamente compleja cuya estructura química y reactividad no está completamente definida. Por lo general la composición de la lignina es diferente para maderas coníferas y latifoliadas, presentándose en coníferas lignina tipo guayacil y en latifoliadas lignina tipo siringil y guayacil (Sjöström, 1981; Tsoumis, 1991). La lignina representa entre el 25 – 35 % del peso seco de la madera en coníferas, y aproximadamente 18 – 25 % del peso seco de la madera de latifoliadas (Rayner & Boddy, 1988).

Adicionalmente el duramen de casi todas las especies contiene compuestos orgánicos de bajo peso molecular, llamados extractivos, comúnmente localizados tanto en el lumen como en las paredes celulares de los elementos vasculares formando una película protectora sobre la pared celular, punteaduras y microfibrillas (Siau, 1984). El tipo y cantidad de los extractivos varía considerablemente entre especies e inclusive dentro de un mismo árbol; su presencia imparte a la madera las características de cambio de color, durabilidad natural, olor y sabor (Fengel & Wegener, 1984; Rayner & Boddy, 1988).

II.3.- Formación del Duramen

Los cambios asociados con la formación del duramen pueden ser tanto microscópicos como macroscópicos (cambio de color). Microscópicamente esta asociado con la muerte (pérdida del protoplasma y núcleo) de las células del parénquima como resultado de la acumulación de productos tóxicos secretados durante el metabolismo del árbol. Estas secreciones experimentan una traslocación desde el centro del árbol, alrededor del cual, el cilindro del duramen se forma y se expande gradualmente; además, la formación del duramen está asociada con la aspiración de las punteaduras, formación de tilosis y depósitos de extractivos que impregnan la pared celular de los tejidos de la madera (Hillis, 1987; Tsoumis, 1997).

II.4.- Química de los Extractivos

Los extractivos incluyen un gran número de compuestos que a menudo influyen en las propiedades físicas de la madera, por ejemplo, los constituyentes coloreados y volátiles proporcionan valores estéticos de carácter visual y olfativo; ciertos compuestos fenólicos dan resistencia al ataque de hongos e insectos y el sílice imparte resistencia a los perforadores

marinos; en general una de las funciones que presentan los extractivos es proporcionar protección contra predadores que desean consumir los componentes estructurales de la pared celular (Young,1991).

Los extractivos no están considerados como componentes estructurales en las paredes de las fibras, a menudo se encuentran dispersos y depositados en el lumen celular o impregnando las paredes de las células. Estos materiales extraños difieren significativamente en clases y composición química, por lo que es difícil establecer un sistema rígido de clasificación, y han sido generalmente agrupados como materiales orgánicos e inorgánicos (Fengel & Wegener, 1984). Los materiales inorgánicos consisten de trazas de minerales como sales de calcio e inclusiones de sílice, los cuales no son solubles en solventes orgánicos y representan entre el 0,1% al 1,0% del peso seco de la madera (Tsoumis,1997).

Los componentes orgánicos engloban todos los compuestos que pueden ser removidos o extraídos de la madera con solventes orgánicos neutros e inclusive agua, sin producir alteraciones de la estructura de la celulosa y la lignina. Estos extractivos incluyen taninos terpenos, materiales colorantes, azúcares, aceites esenciales, grasas, ceras, gomas, alcaloides, fenoles y almidón (Sjöström,1981; Fengel & Wegener, 1984; Hillis, 1987). El contenido de extractivos totales en la madera varía desde 1 % hasta 20 %, en casos excepcionales y extremos el 30 % del peso seco de la madera, presentándose en mayor cantidad en el duramen de especies latifoliadas (WRCLA, 1998).

La distribución y composición de los extractivos en el duramen, no es siempre la misma, de forma general, se ha observado un gradiente radial (Fischer & Höll, 1992), en el que se verifica una progresiva traslocación de los extractivos a una forma menos tóxica con concentraciones inhibitorias menores a medida que se avanza hasta la medula (Hillis,1987; Rayner & Boddy, 1988).

Muchos metabolitos como azúcares, almidones y lípidos se almacenan en la albura de la madera y son transportados dentro del árbol por las células del parénquima radial, los que con el transcurrir del tiempo, proporcionan los componentes secundarios para la transformación albura-duramen (Hillis, 1971, 1987; Saranppää & Nyberg, 1987; Saranppää & Höll 1989). Estos carbohidratos solubles se ven disminuidos durante del proceso fisiológico de transformación, sin embargo, en el duramen existe cierta cantidad de azúcares, los cuales varían con la especie, y pueden, en su mayoría ser el resultado de la hidrólisis parcial de las hemicelulosas que conforman la pared celular, por lo que con frecuencia es posible observar

cantidades variables de galactosa, arabinosa y xilosa en el duramen, pero en realidad el rol y origen fisiológico de estos azúcares en el duramen no está totalmente claro (Saranpää, 1989).

En el proceso de recuperación de extractos a partir de material vegetal, la selección del solvente a emplear depende en gran medida de lo que se desea hacer con el extracto; si la extracción se realiza para aislar y caracterizar componentes químicos, la toxicidad del solvente no tiene gran relevancia, debido a que éste puede removerse antes del procedimiento de aislamiento; en cambio si se desea depurar e identificar compuestos con actividad biológica, el solvente empleado en la extracción tiene gran importancia, ya que este puede inhibir el proceso de ensayo microbiológico más que la misma sustancia evaluada (Eloff, 1998).

En el continuo avance del conocimiento de los recursos naturales y en especial en el aislamiento, determinación e identificación de los extractivos, se han realizado diversas investigaciones empleando técnicas convencionales, las cuales incluyen cristalización, destilación fraccionada, saponificación, métodos espectroscópicos (UV, IR) y cromatográficos (papel, capa fina y gruesa, columnas, intercambio iónico y gases). Adicionalmente, métodos de fraccionamiento moderno como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de permeación de geles (GPC) y la aplicación de resonancia magnética nuclear (RMN), o la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), han incrementado significativamente la importancia e identificación de los extractivos de la madera. Actualmente el desarrollo de la técnica de cromatografía de gases empleando columnas capilares de grandes longitudes ha sido ampliamente aplicada en la identificación de extractivos hidrofílicos y lipofílicos de la madera así como de compuestos tóxicos en la industria de pulpa y papel (Girard et al. 1987; Jürgen et al. 1995; Pérez et al. 1997; Gutiérrez et al., 1998; Theodoridis, et al. 1998; Del Río, et al., 1999).

II.5.- Biodegradación de la Madera

Diversos factores externos al árbol pueden causar degradación de la apariencia, estructura y composición química de la madera, la cual puede comprender desde una simple decoloración hasta convertir a la madera en un producto sin utilidad futura. Este efecto no solo ocurre en la madera en servicio, ya que se ha observado en árboles en vida, madera aserrada y subproductos de madera (Tsoumis, 1997).

Los microorganismos más importantes que deterioran y degradan la madera, forman parte de un grupo primitivo de microorganismos mejor conocidos como hongos, los cuales tienen la capacidad de secretar enzimas especializadas a través de estructuras conocida como hifas, las cuales degradan la materia orgánica, modificándola químicamente para así ser utilizadas como fuente de carbono o alimento. Antes de que el hongo pueda colonizar la madera requiere de cuatro condiciones: suministro de oxígeno, temperatura adecuada, suministro de humedad y un sustrato como fuente de alimento; la eliminación de algunos de estos requerimientos puede prevenir el ataque (Smulski, 1996).

Los microorganismos pueden degradar madera bajo una amplia variedad de condiciones ambientales, sin embargo, mientras algunos pueden tolerar amplios rangos de temperatura, humedad y condiciones de pH, otros tienen una tolerancia limitada. En la madera el control natural está influenciado por el tipo y cantidad de lignina en la pared celular, así como la cantidad y toxicidad de los extractivos presentes (Singh & Kim, 1997).

El deterioro de la madera por efectos de los hongos, está referido a una cantidad de términos que incluyen pudrición marrón, blanca y blanda; los términos pudrición simultánea y específica han sido designados para describir formas de pudrición blanca (Eaton & Hale, 1993). Aunque tanto los hongos como las bacterias pueden degradar madera, los hongos, particularmente los Basidiomicetes son generalmente más agresivos que las bacterias, considerando estos últimos como degradadores de madera de bajo impacto (Erikson et al. 1990).

La colonización microbiana sobre la madera se produce a través de aquellas estructuras de más fácil acceso por las hifas del hongo, como vasos y células del parénquima radial y longitudinal, en estas últimas es posible localizar nutrientes o azúcares libres disponibles para su metabolización (Gao & Breuil, 1995).

Durante el deterioro de la madera, el hongo es capaz de consumir los carbohidratos presentes en la pared celular de las fibras a través de una secreción enzimática, las cuales, tienen la habilidad de disolver estas sustancias orgánicas que al ser modificadas forman compuestos asimilables por el hongo. A medida que avanza el estado de deterioro se produce el crecimiento de las hifas por elongación de sus extremos, pasando de una célula a otra por medio de las aperturas naturales de la madera (punteaduras), penetración pasiva, o por perforaciones realizadas sobre la pared celular tanto en el sentido longitudinal como transversal al eje de la fibra, penetración activa (Eaton & Hale, 1993; Tsoumis, 1997).

La mayoría de los hongos de degradación de madera presentan patrones de ataque más o menos definidos, lo que facilita su respectiva identificación en función de estas características. El deterioro causado a la madera por los hongos ha sido agrupado en tres categorías principales: pudrición blanda, blanca y marrón.

a.- Pudrición blanda

A este grupo pertenecen ciertos miembros de los Ascomicetes y Deuteromicetes, los cuales son particularmente activos bajo condiciones en las que la pudrición marrón y blanca no los son (madera preservada, elevados contenidos de humedad). El ataque sobre las coníferas resulta en la formación de cavidades en la pared secundaria, la cual se observa al microscopio óptico como perforaciones en un corte transversal de las fibras; en la sección longitudinal estas cavidades se observan orientadas paralelas a las microfibrillas de la celulosa; en latifoliadas se observa como erosión de la pared celular (Singh & Kim,1997).

b.- Pudrición blanca

Los hongos que producen este tipo de deterioro forman parte de los Basidiomicetes. Las especies latifoliadas a menudo son más susceptibles que las coníferas. Estos hongos pueden degradar todos los componentes de la pared celular, incluyendo lignina. Algunas especies especializadas degradan principalmente la lignina, permaneciendo la celulosa sin ataque, por lo que son llamadas hongos de pudrición selectiva; en cambio otras especies pueden degradar simultáneamente todos los componentes de la pared celular (celulosa, lignina, hemicelulosa), por lo que son llamados hongos de pudrición simultánea. Los hongos de pudrición blanca imparten a la madera un color claro o blanco además de proporcionar una apariencia esponjosa o fibrosa con bolsillos o grietas longitudinales separadas por áreas de madera aparentemente sana (Erikson et al.1990; Tsoumis,1997).

c.- Pudrición marrón

Los hongos de este tipo de deterioro pertenecen a los Basidiomicetes y son llamados de esta manera producto del color oscuro o marrón que imparten a la madera degradada debido mayormente a la presencia de lignina. Este tipo de pudrición es más abundante en coníferas que en latifoliadas y atacan tanto a madera tratada como no tratada. Una de las

características más importantes es la rápida depolimerización de la celulosa a tempranos estados de deterioro. La degradación de la pared celular es difusa y los carbohidratos son depolimerizados y removidos mientras que la lignina es simplemente modificada. En la superficie de la madera es posible observar grietas tanto paralela como perpendicular al grano formando estructuras cuboidales las cuales pueden ser fácilmente reducidas a polvo por presión (Singh & Kim,1997; & Tsoumis,1997).

II.6.- Durabilidad Natural

La resistencia natural de la madera a factores que pueden causar degradación es llamada durabilidad, y puede ser expresada como el tiempo en el cual la madera conserva sus propiedades y características en óptimas condiciones sin la aplicación de protección especial.

Todas las maderas son susceptibles al ataque de hongos e insectos; sin embargo, algunas son más resistentes que otras. Esta durabilidad se atribuye a diversos factores donde el mecanismo principal envuelve la producción de químicos a nivel tóxico durante la formación del duramen (Zabel & Morrell,1992). La albura es menos resistente debido al menor contenido de extractivos y a la presencia de sustancias nutritivas como azúcares y almidón que son gradualmente descompuestos (Tsoumis,1997).

Otro factor que está correlacionado con la resistencia al deterioro es la densidad de la madera. Muchas maderas exhiben elevada densidad y son naturalmente durables, pero otras maderas densas son rápidamente degradadas, por lo que la densidad no es el indicativo principal de durabilidad natural. Esta se encuentra relacionada con la composición química de los extractivos. La madera de baja densidad ofrece una resistencia relativamente baja debido a que los insectos tienen una mayor facilidad para masticarla y los hongos suficiente espacios para su crecimiento y disponer de oxígeno y agua; por lo que desde este punto de vista las maderas muy pesadas presentan paredes celulares gruesas limitando la accesibilidad de las hifas del hongo y la disponibilidad de oxígeno (Tsoumis, 1997).

II.7.- Métodos para Evaluar Durabilidad de la Madera

La pérdida de masa es utilizada como un criterio para evaluar la durabilidad natural y las diferentes resistencias que presentan las especies individuales cuando son expuestas frente a agentes de deterioro (Gunther,1979). Anteriormente las pruebas de durabilidad para evaluar resistencia de preservantes ante hongos e insectos involucraban pruebas de amplia duración a gran escala y al aire libre. Actualmente existen diversos métodos de pruebas acelerados en

laboratorio, que involucran muestras de pequeño tamaño expuestas bajo condiciones controladas que estimulan o maximizan el rápido deterioro de las muestras (Turner & Conraide, 1996).

Con respecto a la evaluación de la durabilidad natural o protección química de la madera, frente a microorganismos de deterioro, existen tres métodos comúnmente empleados: Las pruebas de bloques de madera sobre agar nutritivo, el método de bloques de madera sobre suelos estériles y los ensayos en cementerio de estacas.

a.- Las pruebas de bloques de madera sobre agar nutritivo - Agar / block - (European Standard Method EN-113-80), desarrolladas por Liese et al. (1935), la cual consiste en colocar bloques de madera preservada con diferentes soluciones, secas y esterilizadas sobre cultivos activos de hongos que deterioran la madera; la efectividad se evalúa por pérdida de peso en un tiempo determinado.

b.- Método de bloque de madera sobre suelo estéril – Soil / block - (ASTM D1413-76 y D2017-81), desarrolladas por Leutritz (1946), es una modificación del método agar/block, en la cual se colocan las muestras de madera sobre un cultivo activo que crece sobre una delgada placa de madera, la cual descansa sobre el suelo estéril. El método de soil-block ha demostrado ser mucho más apropiado para la evaluación gravimétrica de las muestras bajo ensayo (Montelro & Brazolin, 1997).

c.- Otro método comúnmente empleado, es el de cementerio de estacas enterradas en suelos no estériles, el cual puede ser inoculado con un microorganismo o mezcla de cultivos puros conocidos, o empleando la microflora natural y desconocida presente en el suelo. El método ha sido desarrollado principalmente para evaluar soft-rot (Rayner & Boddy, 1988).

II.8.- Extractivos Naturales como Preservantes.

El interés de los extractivos como preservantes naturales no es nuevo, diversos investigadores han discutido la contribución de los extractivos en la durabilidad natural de la madera y menciona que la clase de compuestos de tipo fenólico podrían ser los responsables de la actividad fungitóxicas de los extractos que impregnan el duramen (Kollmann, 1956; Hillis (1968, 1987; Schultz & Darle, 1997).

De forma general, se acepta que la resistencia de la madera al ataque de agentes xilófagos es debido a la presencia de extractivos solubles en alcohol y acetona, cuyas moléculas son

químicamente complicadas y difícil de sintetizar, además el valor tóxico de los extractos puros aislados es igual al de productos de uso industrial en la preservación de maderas (Carter & Beal ,1982; Deon, 1983). Por otro lado, aproximadamente el 80 % de estos componentes extraíbles, se encuentran localizados en los microcapilares de la pared celular y requieren de solventes altamente polares, como acetona y metanol para ser removidos; el 20 % restante se encuentran depositados en el lumen celular y presentan un efecto fungicida menor (Sutie & Orsler, 1996).

Adicionalmente, los extractivos presentes en la madera, principalmente los monoterpenos, son compuestos químicos con gran potencial en el desarrollo de nuevos agentes fungicidas debido a su baja toxicidad sobre los seres humanos y relativamente elevada actividad sobre insectos y hongos (Cornelius et al.1997).

La degradación de la madera por efecto del hongo se produce por una reacción enzimática, para alterar la estructura de la pared celular y crear microporos que posteriormente serán penetrados por las hifas y avanzar con la degradación de la sustancia madera, sin embargo Los extractivos naturales previenen esta acción y posterior colonización por parte del hongo (Schultz & Darrel,1997).

CAPITULO III

Actividad antifúngica *in vitro* del extracto de la madera de algunas latifoliadas de durabilidad natural elevada

La durabilidad natural de diversas especies forestales frente a la acción de hongos de pudrición, insectos y bacterias, ha sido atribuida a diversos factores, dentro de los cuales se mencionan ciertos compuestos extraíbles del duramen de maderas y otros materiales vegetales con propiedades fungicidas. El uso de estos extractivos naturales para el control de hongos que deterioran la madera ha sido estudiado como una atractiva alternativa para la protección de la misma, cuya principal ventaja es la de proveer productos naturales efectivos, de baja toxicidad a los seres humanos y ambientalmente aceptables. En este capítulo se compara la acción fungicida de los extractos o productos naturales del duramen de 5 especies forestales de durabilidad natural elevada, empleando tres solventes en la recuperación de los mismos. El ensayo de la actividad antifúngica de los extractos se realiza por el método de dilución en gel con inoculación superficial en placa, frente a dos hongos reconocidos como estándar para estas pruebas *Gloeophyllum trabeum* y *Trametes versicolor*.

III.1.- Materiales y métodos

III.1.1- Materiales

Se utilizaron muestras de madera del duramen de cinco especies latifoliadas, para realizar la recuperación de los extractos; cuatro de estas especies son comúnmente explotadas en la región de Guayana, Edo. Bolívar, y las muestras fueron donadas por el Aserradero Matamoros: Puy (*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nicholson.), Zapatero (*Peltogyne porphyrocardia* Griseb.), Algarrobo (*Hymenaea courbaril* L.) y Cartán (*Centrolubium paraense* Tul. Var. *orinocense* Benth). La quinta especie, Teca (*Tectona grandis* L. F.), fue donada por el aserradero del Laboratorio Nacional de Productos Forestales, madera proveniente de las plantaciones ubicadas en el Edo. Barinas. Es indispensable resaltar el hecho de que no se cuenta con la información referente a la edad del árbol, época de corte, ni de la altura del árbol a la cual fue tomada la muestra, factores estos que se reconoce tienen influencia en la variabilidad, proporción y distribución de los extractivos en la madera.

III.1.1b.- Microorganismos ensayados

Se emplearon dos hongos, uno representante del efecto de deterioro conocido como pudrición marrón, *Gloeophyllum trabeum* (Fr.) Murr. (Mad-617-R) y un representante de los

hongos de pudrición blanca, *Trametes versicolor* (L:Fr) Pilát (FP-133255-R). Ambos fueron seleccionados por su conocida capacidad como agentes destructores de la madera, de importancia económica y de empleo común en evaluaciones de preservantes para madera. Los hongos de prueba fueron facilitados por la sección Conservación de Maderas, del Laboratorio Nacional de Productos Forestales, en cápsulas de Petri sobre agar extracto de malta al 2,5% mantenidos en refrigeración (4 °C). Para la prueba de la actividad fungicida, los hongos se activaron inoculando nuevas cápsulas de Petri al 2,5 % de agar extracto de malta e incubados por seis días a 26 ± 2 °C.

III.1.2.- Métodos

II.1.2a.- Preparación de los extractos

Pequeñas astillas de duramen de las especies estudiadas, fueron molidas y tamizadas hasta obtener un tamaño de partículas adecuado para el proceso de extracción, 40 - 60 mesh, basado en la norma TAPPI T 257 cm-85

Para obtener los extractos, 30 g de material molido por cada madera se colocaron en extractores Soxhlet, extrayéndose con acetona y etanol (95 %). La extracción con cada solvente se realizó con muestras nuevas y por separado para cada tipo de madera. Normalmente 300 ml de solvente y un período de 8 horas, fueron suficientes para agotar completamente las muestras de madera. El extracto en agua se recuperó de acuerdo con lo establecido por la norma TAPPI T 207 om-93.

El extracto obtenido fue concentrado bajo vacío a una temperatura controlada de 50 °C, hasta la obtención de un residuo viscoso, el cual se colocó en estufa a 50 ± 2 °C hasta peso constante (variación de 0,01 g), hasta la obtención del extracto sólido. El extracto obtenido fue disuelto completamente en etanol (95 %) y mantenido en refrigeración (4 °C), en botellas ámbar hasta el momento de su uso.

III.1.2b.- Ensayo microbiológico

La evaluación de la actividad antifúngica de los diferentes extractos obtenidos, se realizó por el método de dilución en gel con inoculación superficial en placa (Jansser, 1987; García, 1995; Ajaiyeoba, 1998) modificado de acuerdo a las condiciones experimentales.

En cada cápsula de Petri de diez centímetros de diámetro y bajo condiciones asépticas, se vertieron 20 ml de agar extracto de malta con el extracto incorporado obteniéndose

concentraciones de 0,05 %, 0,1 % y 0,2 % (p/v). Simultáneamente se adicionó etanol (95 %) al medio de cultivo el cual se utilizó como control. El nuevo medio de cultivo con el extracto incorporado, se dejó solidificar a temperatura ambiente y luego fue inoculado, colocando sobre éste y en el centro de cada cápsula de Petri. un inóculo circular del hongo de prueba (10 mm) e incubadas durante seis días a 26 ± 2 °C, tiempo en el cual la inoculación testigo cubre completamente la cápsula de Petri. Las evaluaciones se realizaron por duplicado para cada concentración, extracto y hongo de prueba. El crecimiento diametral de cada microorganismo (mm) fue medido al final del periodo de incubación (6 días), y el porcentaje de inhibición fue expresado en función del crecimiento total del control calculado por la ecuación. (1) (Gopalakrishnam, et al., 1997).

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \left(\frac{\text{Tratamiento (mm)}}{\text{Control (mm)}} \right) * 100 \quad (1)$$

II.2.- Resultados y discusión

La recuperación de los extractivos de la madera se realizó empleando tres solventes de diferentes polaridades acetona, etanol y agua. La acetona fue utilizada porque tiene la habilidad de recuperar compuestos tanto hidrofílicos como lipofílicos de la madera (Gutiérrez et al., 1998; Gutiérrez et al., 1999), no interactuar con el extracto recuperado y por ser un solvente extremadamente volátil y fácil de remover del mismo; La acetona tiene mínima capacidad de inhibición, o toxicidad, sobre diversos microorganismos cuando lo que se persigue es realizar pruebas microbiológicas con los extractos recuperados (Eloff, 1998). El agua fue seleccionada por ser el típico solvente altamente polar y no presenta ninguna interferencia en las pruebas microbiológicas de los extractos. El etanol fue seleccionado por su polaridad intermedia en comparación con los solventes indicados. El metanol no fue utilizado porque está considerado como un solvente altamente tóxico sobre diversos microorganismos de ensayo y manejo biológico (Eloff, 1998), aún sabiendo que para realizar tanto la extracción como el aislamiento de productos biológicamente activos, los mejores resultados se obtienen empleando acetona, metanol, etanol y agua.

La recuperación de los extractivos del duramen de las diferentes maderas evaluadas, se realizó a partir de procesos térmicos (extractores soxhlet), en lugar de filtrado o maceración, ya que esta metodología de extracción logra remover la mayor cantidad de compuestos, en comparación con los otros dos métodos (Mitscher et al., 1972).

Considerando que los ingredientes activos presentes en la madera y que contribuyen a su durabilidad natural -muy estables y difíciles de extraer puesto que con frecuencia se encuentran depositados en los microcapilares de la pared celular- son de difícil acceso (Siau, 1984; Hillis, 1987; Sutie & Orsler, 1996; Tsoumis, 1997), se utilizó esta metodología de extracción para la recuperación de la mayor cantidad de compuestos, empleando solventes de bajo punto de ebullición que dilatan la pared celular y permiten la remoción de compuestos biológicamente activos (Bhargara et al., 1998; Eloff, 1998; Kennedy, 1999).

La Tabla 1 presenta la proporción de extractivos recuperados a partir de las muestras del duramen de las especies evaluadas (Algarrobo, Cartán, Puy, Teca y Zapatero). En estos resultados se observan que las especies Algarrobo, Cartán y Zapatero, presentaron la mayor proporción de extractos recuperados con los diferentes solventes empleados. En cada extracción, los extractos recuperados con acetona y etanol presentaron un color similar y característico a las especies, a diferencia del extracto acuoso el cual presentó una coloración completamente diferente al observado con los otros solventes.

El extracto recuperado con etanol mostró la mayor producción de extractivos entre las especies evaluadas (15,2 % (A), 16,5 % (B), 7,5 % (C) y 10,9 % (D)), con excepción de la especie Zapatero cuyo mayor porcentaje se obtuvo con el extracto soluble en agua (14,6 % del peso seco). El solvente siguiente de mayor capacidad de extracción fue la acetona seguido por el agua; sin embargo, para el caso de las especies Zapatero y Algarrobo ésta secuencia fue diferente porque los mayores resultados se obtuvieron con agua seguido de acetona (14,6 y 13,4 % – 7.1 y 11 % respectivamente).

Tabla 1. Cuantificación de extractivos (%) en base al peso seco de la madera

Especies	Solventes		
	Acetona (%)	Etanol (%)	Agua (%)
Algarrobo (A)	11,0	15,24	13,48
Cartán (B)	11,0	16,57	8,68
Teca (C)	7,00	7,59	4,23
Puy (D)	6,85	10,96	3,50
Zapatero (E)	7,10	11,43	14,68

El crecimiento de los microorganismos de prueba sobre el medio de cultivo empleado como control (etanol 95 %), señala que las condiciones de prueba fueron óptimas para el

crecimientos de los hongos de pudrición. Los resultados obtenidos se consideran válidos pues en las replicaciones se obtuvo un crecimiento homogéneo del microorganismo y no se observó inhibición por el etanol empleado para solubilizar los extractos.

La actividad antifúngica, de los diferentes extractos recuperados, empleando el método de dilución en gel con inoculación superficial en placa, señala que todos los extractos inhiben parcial o totalmente el crecimiento de los hongos de prueba (*Trametes versicolor* & *Gloeophyllum trabeum*). Los resultados de la inhibición del crecimiento después de 6 días de incubación se presentan en la Tabla 2. En todos los casos el resultado se refiere al promedio de ocho determinaciones.

Tabla 2. Inhibición del crecimiento en porcentaje de los extractos recuperados con acetona, etanol y agua después de seis días de incubación

Solvente	%	<i>Gloeophyllum trabeum</i>					<i>Trametes versicolor</i>				
		Alg.	Cartán	Puy	Teca	Zapat.	Alg.	Cartán	Puy	Teca	Zapat.
Acetona	0,05	16	62	85	50	10	35	39	78	72	18
	0,10	18	73	92	64	17	62	73	90	82	40
	0,20	37	93	96	78	23	67	81	90	82	40
Etanol	0,05	29	69	94	55	36	65	67	83	72	22
	0,10	44	80	96	65	60	75	76	95	86	39
	0,20	70	100	100	83	65	79	92	97	89	55
Agua	0,05	0	49	30	21	20	0	12	7	0	0

Los resultados demuestran que los extractivos del duramen son tóxicos para los dos hongos estándar, cuando se realiza la evaluación *in vitro* de su actividad sobre agar extracto de malta. Estos principios tóxicos extraídos del duramen de las maderas ensayadas, varían en intensidad, según la especie de la que proviene la madera extraída y con el solvente empleado.

En esta etapa, no se observó una relación directa entre el contenido de extractivo soluble en acetona, etanol y agua del duramen de las especies evaluadas (en un rango 3,5 % - 16,57 %) y la inhibición del crecimiento de los microorganismos de prueba, resultados que concuerdan con los obtenidos por Srinivasan et al., (1999), en la evaluación de la efectividad de los extractivos de varias especies de *Larix* sp. en un rango de 7,3 % - 26,85 % de extracto recuperado. Otros investigadores encontraron una relación directa entre la resistencia de la madera a microorganismos y el contenido de extractivos en diversas especies de *Larix* en un rango de 3,2 % - 20,5 %, Viitanen et al. (1997) destacando que a menores niveles de extractivos menor

es la resistencia de la madera. Esta falta de relación entre la resistencia al deterioro y el contenido de extractivo puede ser atribuida a la composición química intrínseca de cada especie y de cada extracto en particular.

El perfil de la actividad antifúngica del extracto soluble en agua, señala que es el más tolerante a los microorganismos de prueba, posiblemente por las características de la composición química de los extractos recuperados con este solvente; el agua fría y caliente tienen la propiedad de remover y extraer una gran cantidad de materiales orgánicos conocidos como azúcares solubles del duramen, representados mayormente por arabinosa, galactosa, glucosa, proteínas, trazas de xilosa y unidades de ácidos glucurónicos entre otros (Sarampää, 1982; Hillis, 1987. Sarampää & Höll, 1989; Fischer & Höll, 1991-92; Magel et al., 1994; Gansert & Sprick, 1998; Willfor et al., 1999), los cuales pueden ser fácilmente metabolizados por los microorganismos de deterioro de la madera y pueden estimular antes que inhibir el crecimiento de los mismos (Zabel & Morell, 1992).

Los resultados resumidos en la Figura 3, indican que los extractos acetónico y etanólico tienen la capacidad de extraer la mayor cantidad de compuestos tóxicos del duramen de las especies evaluadas. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos en investigaciones previas en las cuales se demostró que los compuestos fungicidas presentes en el duramen de diversas especies, son en su mayoría solubles en alcohol y acetona, siendo compuestos hidrofóbicos, de polaridad intermedia o compuestos poco polares (Walter 1975; Liese 1975; French, et al. 1983; Li, et al. 1995; Eloff, 1998).

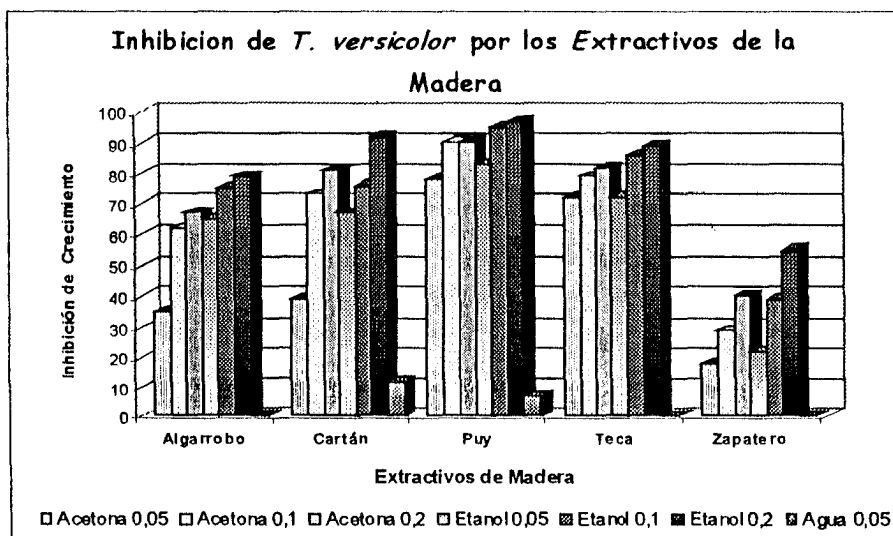


Figura 3. Inhibición del crecimiento de los extractos recuperados asociado con *Trametes versicolor*.

Los extractos etanólico y cetónico, fueron re-evaluados ocho días después de obtener los primeros resultados para verificar el resultado inicial y obtener una idea de la estabilidad de la o las sustancias con actividad antifúngica. Los resultados de estos ensayos fueron similares a los presentados en la Tabla 2.

En la evaluación *in vitro* de los extractos, se observó un marcado halo de color oscuro sobre el medio de cultivo, a pocos mm del inóculo de *Trametes versicolor*, el cual experimentó un aumento de tonalidad a medida que aumentaba la concentración del extracto en el medio, e incrementaba su amplitud conjuntamente con el crecimiento del microorganismo. Este marcado halo fue característico en los extractos etanólico y cetónico de las especies Algarrobo, Cartán y Zapatero, pero ausente en los extractos de las especies Puy y Teca. Este comportamiento podría ser una reacción enzimática secretada por el microorganismo para desarrollar resistencia a la efectividad del fungicida y adaptarse a los cambios generados en el nuevo medio de cultivo (Evans, 1971; Erikson et al.; 1975. Kirk, 1975; Shnabel, 1981; Cerjesl, 1982; Christine et al., 1991). La resolución de este punto requiere de un estudio dirigido a identificar el tipo de enzima secretada, la interacción entre hongo-sustrato-enzima, e identificar el rol de esas sustancias en la biodegradación de la madera.

En la Figura 3, se observan variaciones sobre la actividad biológica de los extractos acetónico y etanólico; estas diferencias muestran que el extracto en acetona presenta una actividad biológica menor, posiblemente debido a que la acetona como solvente tiene la capacidad de disolver y extraer muchos compuestos lipofílicos como grasas, ceras, gomas, resinas, ácidos grasos, materiales colorantes, fenoles y compuestos hidrofílicos altamente polares (Rindolf, 1965; River et al., 1994; Sutie & Osler, 1996; Eloff, 1998), los cuales pueden ser fácilmente asimilables por los hongos de prueba, de modo que la efectividad o acción de las sustancias biológicamente activas presentes en este extracto se vean levemente retardadas por la presencia de tales sustancias (compuestos menos activos en mayores proporciones).

En la Figura 4 se presenta el efecto fungicida de los extractos etanólicos de las 5 especies evaluadas (al 0,05 %). En ella se observa el orden decreciente de actividad de cada extracto; mayores actividades fueron desarrolladas por los extractos de la madera de Puy, Cartán y Teca, y las menores por extractos de madera de Algarrobo y Zapatero. Este mismo orden decreciente fue observado en el extracto en acetona. En el extracto soluble en agua en cambio, los extractos de la madera de Cartán, Puy y Teca presentaron mayor actividad biológica frente a los hongos de prueba en comparación a las especies Algarrobo y Zapatero.

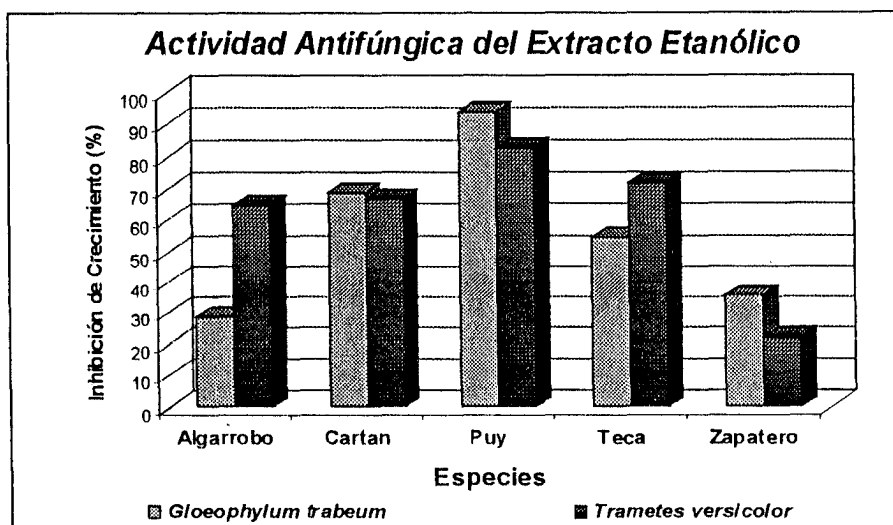


Figura 4. Actividad antifúngica del extracto etanólico de las maderas ensayadas, frente a los hongos de prueba, al sexto día de incubación

Es sabido que la actividad fungicida de diversos productos naturales extraídos se rige por el siguiente orden de componentes: fenoles > alcoholes > aldehídos > cetonas > éteres > hidrocarburos (Kurita & Koike, 1983; Abdelrhafour et al., 1993), así, la actividad antifúngica del extracto etanólico en comparación con los extractos acuoso y cetónico, podría estar en concordancia con la secuencia indicada, puesto que el etanol tiene la propiedad de extraer compuestos cíclicos y aromáticos, principalmente fenoles, polifenoles y compuestos relacionados (Sjöström, 1981; Eaton & Hale, 1993 y River, et al., 1994), así como fracciones de lignina de bajo peso molecular (Rindolf, 1965; Pereira, et al., 1986), las cuales tiene una marcada influencia en la durabilidad natural de la madera (Erikson et al., 1990; Eaton & Hale, 1993; Singh & Kim, 1997). Por otra parte, la efectividad fungicida de un extracto puede deberse en gran parte a la presencia de componentes minoritarios específicos, los cuales actúan sinérgicamente con los compuestos más activos, incrementando la efectividad de cada extracto en particular (Abdelrhafour, et al., 1993).

Los extractos de todas las maderas evaluadas presentan actividad antifúngica frente a *T. versicolor* y *G. Trabeum*, pero sólo los extractos etanólicos y cetónicos recuperados de la madera de Puy fueron los más tóxicos inclusive a niveles de concentración más bajos (0,05 %), con un porcentaje de inhibición de crecimiento del 85 y 94 % respectivamente para *G. trabeum*, y 78 – 83 % respectivamente para *T. versicolor*. Es importante resaltar que los extractos recuperados de las especies Teca, Algarrobo y Zapatero nunca inhibieron completamente el crecimiento de los hongos de prueba aún a los altos niveles de

concentración, aunque el extracto de la madera de Teca presentó mayor toxicidad e inhibición que las especies Algarrobo y Zapatero.

Se destaca por su actividad fungicida, el extracto de la madera de Puy (*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nicholson). Los resultados de estas evaluaciones concuerdan con investigaciones realizadas empleando diversas especies de la familia Bignoniaceae, pertenecientes a un grupo conocido como *Lapachol* en el cual se incluye la especie puy (Dos Santos & Millér, 1992), que demuestran que estas especies se caracterizan por poseer propiedades insecticidas, antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antitumorales, antiinflamatorias, y con propiedades curativas para úlceras y gastritis entre otras (Girard, et al., 1987; Goel, et al., 1987; Grazziotini et al., 1992.), atribuidos a la presencia en el género *Tabebuia* de compuestos conocidos comúnmente como lapachol y sus derivados (quinonas de amplio espectro). La presencia de sustancias biológicamente activas en la madera de Puy, hacen de ésta una fuente promisoría de posibles fungicidas naturales, por lo que amerita profundizar en el aislamiento e identificación de las sustancias responsables de dicha bioactividad.

II.3.- Conclusiones

El etanol resultó ser el solvente más eficiente en la recuperación de los extractivos de la madera en las especies evaluadas. En el caso particular de la madera de Zapatero el agua mostró mayor capacidad de extracción.

Aunque los extractivos recuperados del duramen de las especies latifoliadas empleando acetona, etanol y agua, inhiben el crecimiento de los hongos de deterioro, los extractos obtenidos con etanol presentan mayor toxicidad frente a estos microorganismos.

Frente a *Gloeophyllum trabeum* y *Trametes versicolor*, los extractos del duramen de las especies Puy, Cartán y Teca mostraron mayor efectividad en la inhibición del crecimiento de los microorganismos indicados. El extracto soluble en etanol de la madera de Puy, destaca por su superioridad en el control de los hongos causantes de la biodegradación de la madera, tanto a bajas como a elevadas concentraciones.

De los extractos recuperados en agua de la madera en las cinco especies evaluadas, sólo el obtenido de la madera de Cartán resultó más tóxico para *G. trabeum* y *T. versicolor*. Los compuestos hidrofílicos presentes en el duramen de la madera de las especies evaluadas, muestran un mínimo de efectos inhibitorios sobre los hongos que causan su deterioro.

CAPITULO IV

Determinación de la capacidad antifúngica de los extractos etanólicos de especies latifoliadas, en madera de Pino caribe

Generalmente las formulaciones de preservantes para madera consisten en una mezcla de sustancia con propiedades fungicidas e insecticidas y de otros componentes minoritarios como colorantes, dispersantes y aditivos repelentes al agua incorporados en la soluciones (Murphy et al., 1995). Debido a la necesidad de optimizar el desarrollo técnico de los preservantes de madera, existe paralelamente un gran interés en la protección del ambiente; en este contexto, el propósito de este capítulo es el de evaluar la durabilidad inducida de la madera de Pino caribe, empleando preservantes de origen natural. Para el efecto se consideraron ensayos con 12 semanas de duración de exposición de las maderas con durabilidad inducida a la acción degradante de los hongos *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum*.

IV.1- Materiales y métodos

IV. 1.1- Materiales

IV.1.1.a.- Preservación de las probetas

Se empleó el extracto etanólico de las especies Puy, Cartán y Teca para formular los biopreservantes empleados en el tratamiento de las probetas, siguiendo el método de preservación Lowry modificado (sin vacío final). Las concentraciones ensayadas 0,2 %, 1 % y 2 % (p/v), se prepararon utilizando etanol (95 %) como solvente.

IV.1.1.b.- Bioensayo.

Para evaluar la capacidad antifúngica de los extractos obtenidos, se utilizó el ensayo de durabilidad inducida de la madera de pino tratada con los biopreservantes obtenidos. Se siguió el método de "soill-block" basado en la norma ASTM D1413-76, sobre albura de la madera de Pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*). Se utilizó un suelo forestal de las cercanías del Laboratorio Nacional de Productos Forestales con las siguientes características: Textura franco, pH 5,67, CH: 55 %, capacidad de retención de agua 40 %. Se emplearon dos microorganismos de prueba: el hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor* (L:Fr) Pilát (FP-133255-R), y el hongo de pudrición marrón *Gloeophyllum trabeum* (Fr.) Murr. (Mad-617-R).

IV.1.2.- Métodos

IV.1.2.a.- Preservación de las muestras

Se trataron probetas de albura de Pino caribe, a tres niveles de concentración del biopreservante, partiendo de la concentración mínima inhibitoria del extracto de la madera de Puy (especie biológicamente más activa) y tomándola como punto de partida en la formulación de las soluciones preservantes, las otras dos concentraciones fueron de 5 y 10 veces el nivel de concentración inicial.

La madera de Pino caribe fue dimensionada a probetas de madera con dimensiones de 19 x 19 x 19 mm, denominados también mini-bloques, según lo establecido en la norma ASTM D1413 – 76. Se obtuvieron un total de 240 probetas. Se trataron 24 probetas por concentración y de cada extracto se ensayaron tres niveles de concentración, resultando 72 probetas por cada extracto. Para cada hongo ensayado y cada concentración se utilizaron 12 probetas, para obtener un diseño experimental que considere cuatro repeticiones y tres períodos de observación. Adicionalmente se seleccionaron 24 probetas como testigos, 12 de las cuales fueron tratadas con una solución de etanol y las otras 12 sin tratamiento, para verificar el posible efecto que pudiera tener el alcohol empleado en el proceso de preservación sobre los microorganismos de prueba.

Todas las probetas fueron impregnadas mediante tratamiento por presión, siguiendo el procedimiento a célula vacía (Lowry) modificado. Para ello las probetas, previamente secas y pesadas, fueron sumergidas en la solución preservante por espacio de 20 minutos y a presión de 15 Kg/cm². Al finalizar el tratamiento, se extrajeron las probetas de los recipientes y se removió el exceso de preservante de cada probeta con un papel absorbente, luego se pesaron para determinar por diferencia de peso la absorción y retención del biopreservante. Seguidamente se colocaron en bolsas de polietileno herméticamente cerradas, por un periodo de 10 días para permitir la fijación del biopreservante dentro de la madera. Luego las muestras se expusieron y secaron al ambiente durante cuatro días y posteriormente en estufa a 50 ± 2 °C hasta obtener peso constante.

IV.1.2.c.- Bioensayo

En cada frasco de vidrio de 500 ml se vertieron 200 g de suelo seco al aire y 70 ml de agua destilada con el objeto de llevar el suelo a 55 % de humedad. Luego en la superficie del suelo se colocaron las placas de alimentación obtenidas de la madera de albura de Pino caribe (4 x

20 x 40 mm) y se esterilizaron durante 20 minutos en autoclave a una temperatura de 120 °C y 1 atm de presión.

Cada placa de alimentación, previamente esterilizada, fue inoculada con el hongo de prueba, para lo que se colocó un segmento del micelio del hongo en el borde de cada placa de alimentación. Preparados estos frascos se incubaron hasta que fuera visible la colonización de toda la superficie de la placa de alimentación. Posteriormente se colocaron dos probetas de la madera tratada con el biopreservante a ensayar sobre la placa de alimentación y se llevó a incubación en un cuarto acondicionado a 26 ± 2 °C y 75 ± 5 % de humedad relativa, por un periodo de 12 semanas. El mismo procedimientos se utilizó para las probetas sin tratamiento alguno.

Se realizaron observaciones cada 4 semanas, por un periodo de tres meses. Las observaciones consistieron en la determinación de la pérdida de peso de las probetas, por acción de los hongos de prueba y la observación visual del grado de ataque por los hongos.. Para el efecto, se extrajeron las probetas de las cuales se removió cuidadosamente el micelio producido por el hongo y se secaron en estufa a 50 ± 2 °C hasta obtener peso constante.

Los resultados obtenidos en la prueba de pérdida de peso se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza y pruebas de regresión, utilizando un modelo estadístico factorial $2 \times 3 \times 3 \times 4$ y con auxilio del paquete estadístico Minitab V10 para Windows.

IV.2.- Resultados y discusión

IV.2.1.- Retención del Producto Químico.

En el proceso de preservación de las probetas de Pino caribe, se empleó etanol como solvente porque se considera que es el más adecuado para la solubilidad del biopreservante. El etanol además permite una adecuada distribución de los componentes del biopreservante, en términos de retención y penetración necesaria, ya que tiene la particularidad de dilatar la pared celular de las fibras (u otros componentes estructurales) de la madera, facilitando su deposición en los espacios microcapilares de la pared celular (Kennedy, 1999).

Los niveles de retención obtenidos en la madera de Pino caribe después del tratamiento con los biopreservantes obtenidos de la madera de Puy, Cartán y Teca, en sus diferentes concentraciones, se presenta en la Figura 5. La retención del producto fue calculada por diferencia de peso al inicio y final del tratamiento preservante aplicado. Debido a que la

madera de Pino caribe es muy permeable y fácil de tratar, con todas las concentraciones evaluadas se lograron elevadas retenciones y penetración total y uniforme.

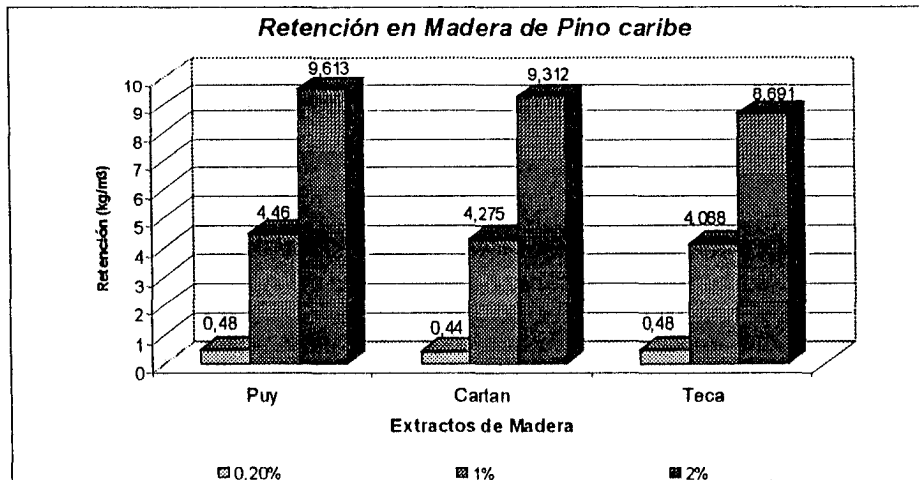


Figura 5. Niveles de retención de la madera de Pino caribe tratada con extractos de latifoliadas a tres niveles de concentración

A medida que aumenta la concentración del biopreservante, se incrementa el nivel de retención neta en la madera. Estos resultados pueden ser atribuidos a que a mayores concentraciones de la solución preservante (p/v), se incrementa la cantidad de los ingredientes activos dentro de la madera, lo cual se refleja en un aumento de peso, cuando la retención se calcula por diferencia de pesos.

IV.2.2.- Observaciones macroscópicas

El hongo de pudrición marrón *Gloeophyllum trabeum* cubrió completamente la placa de alimentación e inclusive el suelo del ensayo, antes de dos semanas de incubación. Sin embargo, al colocar las probetas de madera preservada sobre los bloques de alimentación, el desarrollo micelial del microorganismo, se vió disminuido, con un crecimiento poco uniforme y muy fino, limitado principalmente a la base de las probetas. Este escaso crecimiento del hongo sobre las probetas se observó durante los dos primeros meses de incubación; ya que para el final del segundo mes se observó un crecimiento más abundante sobre las probetas aunque sin cubrir totalmente la probeta.

A diferencia del hongo de pudrición marrón, el crecimiento micelial de *Trametes versicolor* sobre las placas de alimentación y el suelo, fue lento cubriendo el conjunto con un micelio blanco, claro y escaso en 2 semanas de incubación. Debe destacarse que, una vez colocadas las probetas preservadas sobre las placas, el micelio inició un crecimiento

abundante y uniforme en la base y parte media de las probetas, logrando cubrir después de seis semanas de incubación con un micelio claro y completamente a aquellas probetas preservadas con bajas concentraciones del biopreservante.

Si bien las probetas de Pino caribe tratadas y expuestas a la acción de *G. trabeum* no fueron totalmente cubiertas por el micelio del hongo, aún al final del periodo de incubación de 12 semanas, la pérdida de peso en todos los casos siempre fue superior que la obtenida con *T. versicolor*. Estos resultados pueden atribuirse a tres aspectos: primero, la capacidad degradante de los hongos de pudrición marrón sobre las coníferas, en comparación con los hongos de pudrición blanca (Kamden, 1994); segundo, la pudrición marrón tiene como característica producir un deterioro interno en las piezas de madera, observándose superficialmente sanas, pero internamente deterioradas (Eaton & Hale, 1993); y tercero, desde el punto de vista químico las traqueídas de las coníferas se encuentran mayormente constituidas por lignina del tipo guayacil, las cuales son relativamente difíciles de degradar por los hongos de pudrición blanca por lo que es poco frecuente la ocurrencia de hongos de pudrición blanca sobre las coníferas (Blanchete et al. 1990; Eaton & Hale 1993).

En las muestras preservadas a concentraciones más elevadas de cada biopreservante (2 %), la cantidad de micelio desarrollado siempre fue menor que las observadas en probetas preservadas a bajas concentraciones (0,2 % y 1 %). En lo que se refiere al desarrollo micelial, las probetas preservadas con el extracto de la madera de Puy a baja concentración, presentaron muy poco desarrollo micelial y prácticamente no apreciable en las probetas tratadas con más de 1 % de concentración. El desarrollo micelial fue observado mayormente en las probetas preservadas con extractos de las maderas de Teca y Cartán. El efecto de los biopreservantes fue evidente, tomando en consideración el abundante y uniforme desarrollo micelial en las probetas de madera sin tratamiento alguno.

IV.2.3. - Pérdida de Peso

La pérdida de peso causada por *T. versicolor* fue en términos generales menor que la causada por *G. trabeum* si se comparan los preservantes a la misma concentración, Tabla 3, lo que demuestra que los biopreservantes efectivamente inhiben a los basidiomicetes ensayados. Los resultados obtenidos en la evaluación de pérdida de peso en la madera de Pino caribe, tratada a tres niveles de concentración y empleando los extractos etanólicos de las especies Cartán, Teca y Puy, bajo la acción degradante de *T. versicolor* y *G. Trabeum*,

demuestran que después de 4 y 8 semanas de incubación los hongos causaron una baja pérdida de peso en todas las probetas tratadas (< 1 %), tanto a bajas como a elevadas concentraciones, Figura 6.

Tabla 3. Pérdida de peso de la madera de Pino caribe asociada a *G. trabeum* y *T. versicolor* durante tres meses de incubación

Biopreservante obtenido de la madera de:	Concentración %	Pérdida de peso causada por <i>Gloeophyllum trabeum</i>			Pérdida de peso causada por <i>Trametes versicolor</i>		
		Mes			Mes		
		1	2	3	1	2	3
Teca	0,2	0,51	0,79	31,61	1,10	1,56	26,83
	1	0,42	0,57	25,12	0,38	0,97	20,01
	2	0,34	0,41	20,86	0,10	0,70	16,75
Cartan	0,2	0,62	1,00	36,30	0,29	1,45	28,90
	1	0,56	0,89	29,99	0,20	0,68	22,30
	2	0,10	0,20	21,83	0,10	0,19	18,40
Puy	0,2	0,91	1,15	29,48	0,73	1,94	20,60
	1	0,27	0,42	19,99	0,32	0,84	15,12
	2	0,13	0,50	13,48	0,08	0,39	10,42

Al finalizar el experimento (12 semanas) súbitamente las probetas perdieron mayor peso que el observado durante las primeras semanas y esta pérdida fue de casi 10 veces la experimentada en el primer mes; este fenómeno fue explicado por Cerjesi (1982) y Shnabel (1981) quienes establecieron que los hongos son capaces de adaptarse a un nuevo y específico sustrato, si éste ha sido alterado, demorando algunas semanas en producir nuevas enzimas capaces de actuar sobre el nuevo sustrato.

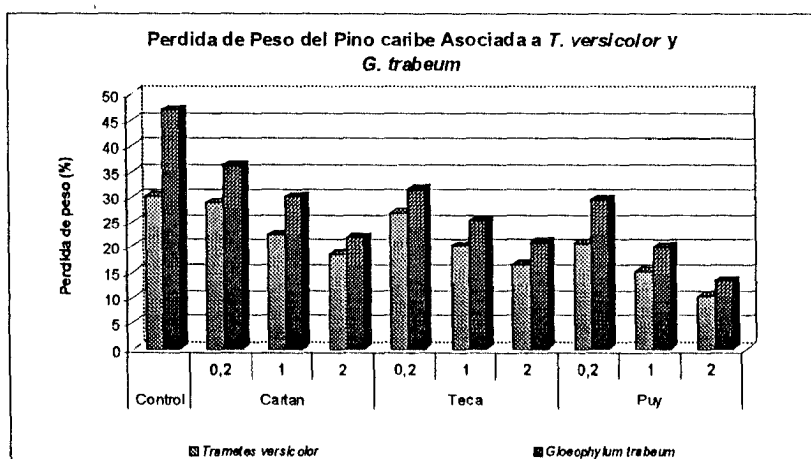


Figura 6. Pérdida de peso de bloques de Pino caribe tratados con el extracto etanólico de diferentes especies y expuestos a hongos de pudrición marrón y blanca.

La capacidad inhibitoria de los biopreservantes fue comprobada por la comparación con las pérdidas de peso de las probetas sin tratamiento alguno; la madera de Pino caribe sin tratamiento puede perder hasta 30,1 % de peso con el hongo *T. versicolor*, y hasta 47,3 % con *G. trabeum*.

Las diferencias en la pérdida de peso en función del tiempo de incubación se analizaron estadísticamente y se obtuvieron diferencias altamente significativas ($\alpha = 0,05$ y $p = 0,000$), principalmente en la última semana de evaluación. Se establecieron además diferencias significativas entre las variables tiempo de incubación, preservantes, hongos y concentración; el test de comparaciones múltiples explicó que las mayores diferencias resultan de incluir la variable preservante en primer lugar y luego el tipo de hongo. De todos modos, entre los tres extractos empleados como preservantes, estadísticamente no se observaron diferencias significativas en las pérdidas de peso, a pesar de que el biopreservante obtenido de la madera de Puy inhibió en mayor porcentaje la pérdida de peso (71 % para *G. trabeum* y 66 % para *T. versicolor*) en comparación con los extractos obtenidos de las maderas de Cartán y Teca. La variable concentración del producto químico (0,2 %, 1 % y 2 %), no presentó diferencias estadísticas, por lo que es posible inferir que la diferencia de las medias de los tratamientos se originó por efecto de los valores obtenidos con las probetas sin tratamiento alguno.

Los resultados en pérdida de peso de la especie Pino caribe sin tratamiento (47,3 %) por acción del hongo *G. Trabeum*, son similares a las pérdidas de peso en madera de *Pinus* sp. después de 8 semanas de incubación (Srinivasan et al., 1999) y en madera de Yellow pine (De Groot et al., 2000). Con maderas de latifoliadas, las pérdidas de peso pueden llegar a ser algo mayores, hasta un 50 % en madera de *Populus tremuloides* (Kamden, 1994).

Con respecto al hongo de pudrición blanca, *T. versicolor*, que causó una significativa pérdida de peso sobre la madera de Pino caribe (30,1 %), los resultados obtenidos en este experimento son algo diferentes a los obtenidos por Mora (1998) y Permadi et al., (1998), quienes, empleando el mismo método de evaluación, reportan pérdidas de peso promedio de 12, 59 % y 40,4 %, para Pino caribe y *Pinus merkusii* respectivamente. Estas diferencias podrían estar relacionadas con las características químicas en las maderas ensayadas y a las cepas utilizadas.

El extracto etanólico de las especies Cartán, Teca y Puy, mostró excelentes resultados en pruebas de toxicidad *in vitro*, utilizando agar - extracto de malta a una concentración de 0,2 % (p/v); sin embargo, cuando este extracto se reintrodujo en la madera de pino, su actividad se vio disminuida, posiblemente como consecuencia de lixiviación y volatilización del producto y la resultante interacción extracto / madera (Eaton & Hale, 1993).

IV.3.- Conclusiones

Preservantes de origen natural, diferentes a los convencionales, inducen en la albura de Pino caribe mayor durabilidad frente a los hongos tradicionalmente utilizados en la evaluación de la durabilidad de las maderas

Aunque los extractos de la madera de Cartán y Teca, empleados como preservantes para la madera de Pino caribe, controlan el efecto degradante de los hongos de prueba, sólo el extracto obtenido de la madera de Puy aplicado al 2 % (p/v) logró la mayor protección, o mejor durabilidad inducida.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

Actividad antifúngica del extracto etanólico de la especie *Tabebuia serratifolia* y de las fracciones aisladas

La resistencia natural al deterioro biológico en muchas especies forestales se atribuye a la presencia de ciertos metabolitos secundarios que poseen propiedades fungicidas, los cuales se encuentran depositados en las fibras de la madera. En los capítulos anteriores (Capítulos III y IV) se ha determinado la efectividad fungicida del extracto etanólico de la madera de la especie *Tabebuia serratifolia* frente a los hongos estandarizados *Gloeophyllum trabeum* y *Trametes versicolor*. En el presente Capítulo se realiza el fraccionamiento y purificación de los metabolitos biológicamente activos presentes en la madera de Puy, empleando métodos cromatográficos, además se evalúa la actividad antifúngica de las fracciones siguiendo la metodología descrita en el Capítulo III.

V.1.- Materiales y métodos

V.1.1- Materiales

VI.1.1.a - Madera

Se utilizaron 3 Kg de madera de duramen de Puy molido y tamizado (40-60 mesh), extractores Soxhlet y 16 litros de etanol (95 %) para la recuperación del extracto.

V.1.1.b - Fraccionamiento y Purificación del Extracto

El fraccionamiento del extracto etanólico, se realizó sobre una columna de vidrio de 120 cm de longitud y 12 cm de diámetro interno, conteniendo 1.800 gr. de silicagel 60 (120 -230 mesh). Para la elusión de las fracciones se utilizaron 4 litros de hexano, 4 litros de acetato de etilo, 3 litros de etanol y 1 litro de metanol. La purificación y aislamiento de la fracción biológicamente activa, se realizó sobre placas cromatográficas de vidrio para TLC (20 x 20 cm), recubiertas con silicagel (3 mm de espesor).

V.1.2.- Métodos

V.1.2.a - Obtención del Extracto.

Los 3 Kg. de madera de Puy molida fueron colocados en extractores Soxhlet, para su extracción con etanol (95 %) bajo reflujo durante el tiempo necesario para agotar completamente el materia extraíble. El extracto obtenido fue filtrado y luego concentrado bajo vacío a una temperatura controlada de 50 °C, hasta la obtención de un residuo viscoso, el cual se colocó en estufa a 50 ± 2 °C hasta peso constante (variación de 0,01 g), hasta la obtención del extracto sólido.

V.1.2.b.- Purificación y aislamiento del Ingrediente activo

Cuantificado el rendimiento en la extracción, el extracto sólido fue re disuelto completamente en etanol (95%) y se añadieron 300 g de silicagel 60 para formar la cabeza de la columna, luego se colocó en estufa a 50 ± 2 °C, hasta obtener un material completamente seco. Seguidamente se realizó el empacado en húmedo de la columna cromatográfica.

El fraccionamiento del extracto se realizó mediante la aplicación de cromatografía líquida en columna abierta con la aplicación de vacío (Coll & Bowden, 1986; Pelletier et al.1986), iniciando el gradiente de elusión con hexano (100%) y hexano-acetato de etilo de polaridad creciente (5, 10, 20...100 % AcOEt), para finalizar el fraccionamiento, se utilizaron 3 litros de etanol y 1 litro de metanol (solventes de mayor polaridad) para limpiar la columna. Durante la elusión cada fracción fue recuperada por un litro de solvente empleado.

Las fracciones recuperadas se concentraron bajo presión reducida y luego se examinaron mediante cromatografía de capa fina sobre silicagel G, utilizando cloroformo-ácido fórmico (99:1). Las capas fueron observadas bajo luz UV (λ 254 nm) y reveladas con ácido sulfúrico en etanol al 10 %.

Las fracciones separadas se disolvieron en etanol, y para determinar su actividad antifúngica frente a los hongos estándar *Gloeophyllum trabeum* y *Trametes versicolor*, se utilizó el método de dilución en gel con inoculación superficial en placa. La fracción biológicamente activa fue purificada mediante cromatografía de capa gruesa, en 4 recorridos con hexano-eter etílico (4:1) y visualizadas bajo la luz UV (λ 254 nm). Las sub fracciones resultantes se evaluaron nuevamente frente a los hongos estándar de prueba, obteniéndose una nueva fracción biológicamente activa, la cual fue nuevamente cromatografiada por el método descrito anteriormente.

V.2.- Resultados y discusión

De los 3 Kg de madera de Puy, se obtuvieron 300 g del extracto seco, resultando un 10 % de extractivos en etanol. Este extracto, que fue sometido a procesos de fraccionamiento y purificación, utilizando métodos cromatograficos conforme la secuencia presentada en la Figura 7, resultó estar constituido por 17 fracciones. Los rendimientos obtenidos se presentan en la Tabla 3, donde se puede observar que al tiempo de avanzar en el proceso de fraccionamiento, entre las fracciones F-1 y F-5 no hay recuperación de sustancias en el extracto. Sin embargo, se observó un ligero aumento a medida que se avanzó el proceso desde la fracción F-6 hasta F-9 (3.8% y 17.21% respectivamente). Las mayores proporciones se obtuvieron entre las fracciones F-16 y F-17 (29.35% y 17.79% del extracto seco).

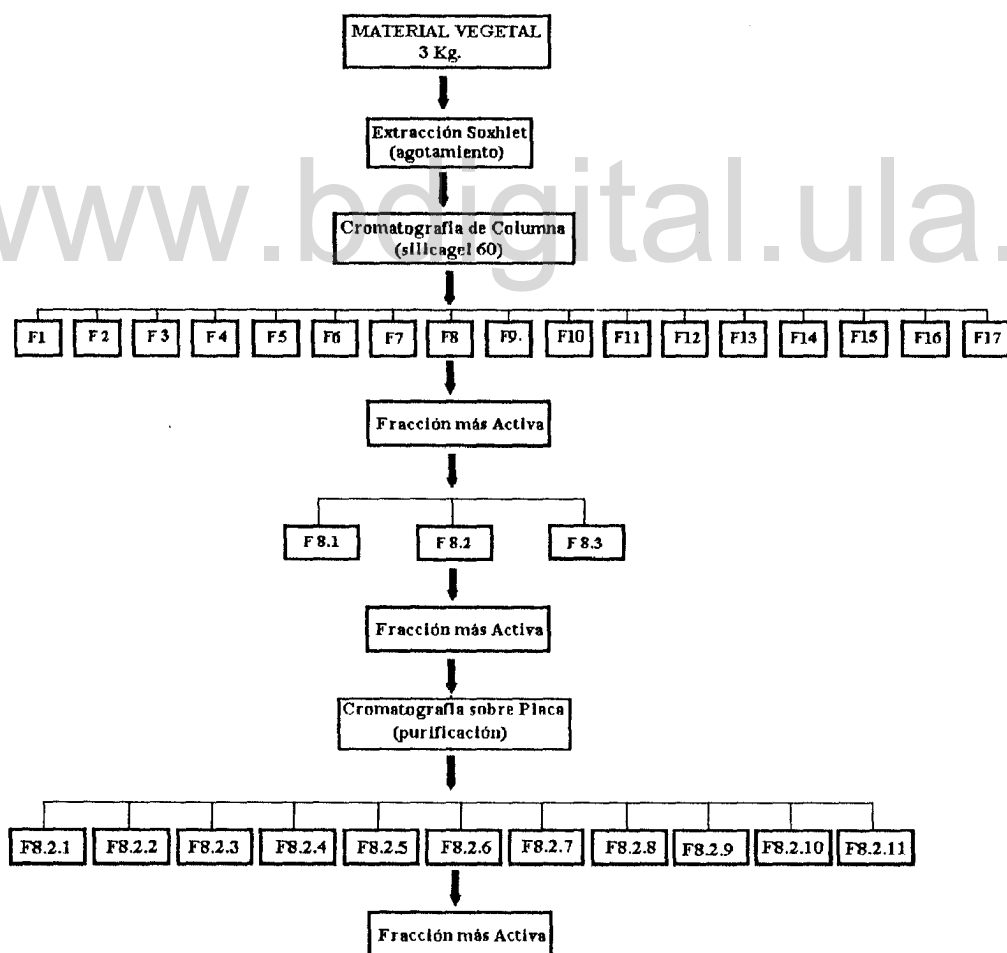


Figura 7. Esquema de fraccionamiento y purificación del extracto etanólico de la especie puy.

De acuerdo al gradiente de elusión utilizado, el mayor porcentaje del extracto (54,1 %) corresponde a las sustancias más polares; de existir diferencias cuantitativas, éstas están

directamente relacionadas con las diferencias estructurales de los compuestos químicos recuperados en cada fracción Fengel & Wegener, 1984; Jürgen et al., 1995; Ali- Shtayeh et al. 1998).

Tabla 3. Fracciones obtenidas en el extracto etanólico en la madera de Puy

Fracción	Solvente	Peso (gr)	%
F-1	Hexano	0	0
F-2	Hex-Acet (5%)	0	0
F-3	Hex-Acet (10%)	0	0
F-4	Hex-Acet (20%)	0	0
F-5	Hex-Acet (30%)	0	0
F-6	Hex-Acet (40%)	11.41	3.8
F-7	Hex-Acet (50%)	13.90	4.6
F-8	Hex-Acet (60%)	8.85	2.95
F-9	Hex-Acet (70%)	51.64	17.21
F-10	Hex-Acet (80%)	21.81	7.27
F-11	Hex-Acet (90%)	13.06	4.35
F-12	Acetato (100 %)	6.89	2.30
F-13	Acetato (100 %)	10.28	3.42
F-14	Etanol (100%)	6.13	2.05
F-15	Etanol (100%)	5.56	1.90
F-16	Etanol (100%)	88.06	29.35
F-17	Metanol (100%)	53.38	17.79
Total		290.95	97 %

Las fracciones en el extracto varían ampliamente en color y presentan una relación directa con la polaridad del solvente utilizado; con un incremento en la polaridad del solvente el color de las fracciones cambia de ligeramente amarillo (F-6), a un color marrón intenso (F-16). La cantidad de material extraíble también aumenta desde 3,8 % en la fracción F-6 hasta 29,35 % en la fracción F-16.

Todas las fracciones obtenidas se disolvieron completamente en un mínimo volumen de etanol y se ensayaron frente a los dos hongos estandarizados a una concentración de 0,01 % (p/v); los resultados de esta evaluación se muestran en la Figura 8, donde se observa un incremento en la actividad antifúngica frente a ambos hongos, aproximadamente hasta la fracción F-8, con inhibición en el crecimiento entre 86 y 77 %. A medida que aumenta la polaridad de los solventes, en la fracción F-17 se observa una inhibición del crecimiento del hongo hasta menos del 6 %. Esta disminución en la actividad antifúngica puede ser atribuida a la presencia de sustancias altamente polares, las cuales se ha demostrado tienen baja actividad sobre diversos microorganismos (Liese, 1975; French et al., 1983; Li et al., 1995).

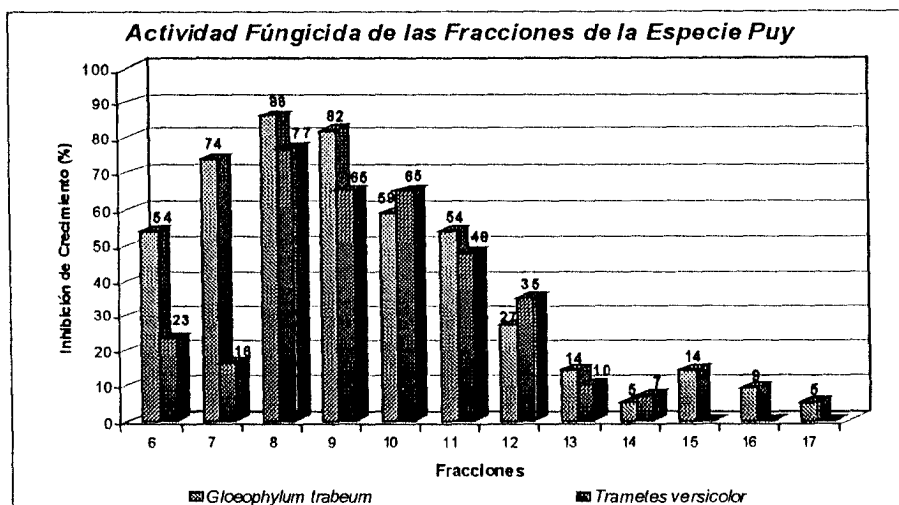


Figura 8. Evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones del extracto etanólico de la especie Puy

La mayor actividad biológica del extracto se encuentra en la zona central del proceso de fraccionamiento, representando un 27,43 % del extracto seco. Las fracciones F-14 hasta F-17 que constituyen el 54,51 % del extracto presentaron mínima actividad fungicida frente a *Gloeophyllum trabeum* y *Trametes versicolor*.

A las 24 horas de la disolución de todas las fracciones, se observó la formación de sólidos en las fracciones F-6, F-7, F-8 y F-9. En las primeras tres fracciones el sólido presentó una apariencia de polvo muy fino de color rosado en la fracción F-6, de color crema en la fracción F-7 y amarillo verdoso en la fracción F-8. Debe destacarse que la fracción F-8 presentó la formación de dos sólidos distintos entre sí; el polvo muy fino de color amarillo verdoso y cristales de color amarillo marrón. La fracción F-9 presentó cristales amarillos.

La fracción F-8 obtenida con la mezcla hexano-acetato de etilo (60 %) como eluyente, mostró la mayor actividad antifúngica frente a *G. trabeum* y *T. versicolor*, posiblemente en ésta fracción se encuentra la mayor proporción y concentración de las sustancias activas y que podrían ser responsables de la durabilidad natural de la madera de la provienen.

Tomando en consideración que la mayor actividad antifúngica se presentaba en la fracción F-8, ésta se fraccionó en tres componentes (sólidos F-8.1, F-8.2 y líquido F-8.3), que fueron cromatografiados sobre placas de TLC. Se observó que cada componente fraccionado

estaba constituido por más de una sustancia, Figura 9. De estas tres sustancias, la fracción F-8.2 resultó ser la más activa para ambos hongos, inhibiendo el crecimiento de los mismos en un 88 % y 60 % respectivamente, Figura 10.

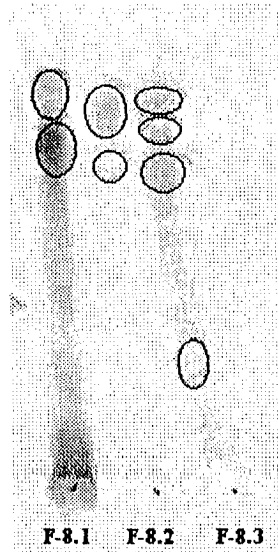


Figura 9. TLC de las sub-fracciones F-8 en hexano:éter (4:1)

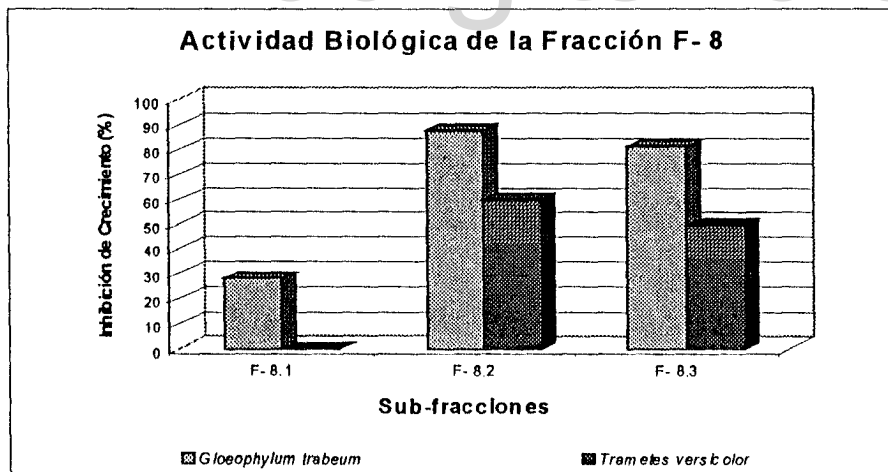


Figura 10. Evaluación de la actividad antifúngica de las subfracciones F-8 del extracto etanólico de la madera de Puy

La fracción F-8.2, se purificó por cromatografía de capa gruesa preparativa, eluyendo en cuatro recorridos con hexano – éter etílico (4:1). Al observar la placa cromatográfica bajo UV, se identificaron 11 subfracciones, cuyas actividades antifúngicas se presentan en la Figura 11.

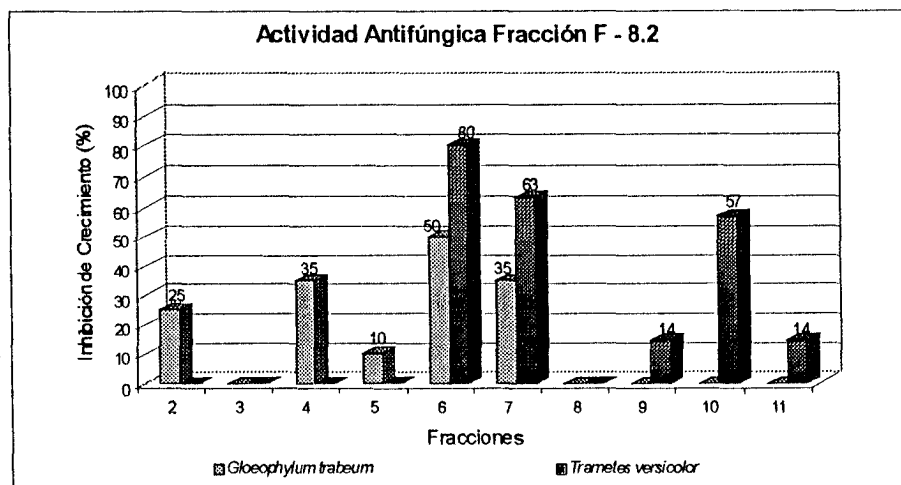


Figura 11. Evaluación de la actividad antifúngica de las sub. fracciones F-8.2 del extracto etanólico de la madera de Puy

La purificación y evaluación antifúngica de la fracción F-8.2 indica que la subfracción F-8.2.6 presenta la mayor actividad biológica frente a *Gloeophyllum trabeum* y *Trametes versicolor* (80 % y 50 %), además de constituir aproximadamente el 80% de la fracción F-8.2.

Los cristales de color amarillo de la fracción F-9 se cromatografiaron sobre TLC y se verificó que se trata de una sola sustancia, que fue evaluada en su actividad antifúngica inhibiendo el crecimiento de los hongos en un 75 % para *T. versicolor* y 87% para *G. trabeum* (0,005 % p/v). Debido a esta alta actividad antifúngica, esta sustancia fue analizada utilizando métodos espectroscópicos (RMN, IR), resultando ser lapachol, cuyo espectro RMN ^1H en cloroformo deuterado (CDCl_3), se presenta en la Figura 12. En este espectro es posible identificar 9 grupos de protones diferentes; las señales correspondientes a las absorciones a δ 1,62 y δ 1,76 representadas por un singulete cada una, corresponden a los grupos metil vinílicos de la molécula (4' y 5'); en los campos más bajos se identificaron como dobletes, las señales a δ 3,12 que corresponden a los hidrógenos metil alílicos (1'), en tanto que la absorción a δ 5,16 (2') corresponde al protón olefínico. Adicionalmente se identificó la señal correspondiente a un hidrógeno intercambiable (OH) a δ 7,3 y por último se identificaron las señales típicas correspondientes a los 4 hidrógenos aromáticos a δ 7,5 (6); δ 7,6 (7); δ 8,01(5) y δ 8,1(8). La estructura descrita corresponde al Lapachol. El resto de las señales corresponden a trazas de impurezas. El Lapachol es un compuesto químico común en las maderas de diversas especies de la familia Bignoniacea (Girard et al., 1987- 1988), y su nombre deriva de la madera del árbol de Lapacho, nombre común de *Tabebuia* sp en Argentina. La actividad antifúngica del Lapachol ha sido previamente demostrada y aplicada en el área de la salud pública, para

lo que se emplean extractos de la madera de árboles del género *Tabebuia*, familia Bignoniaceae, cuyos compuestos naftaquinónicos tienen propiedades terapéuticas y son ampliamente utilizados en la formulación de analgésicos, antifúngicos, antiinflamatorios, bactericidas, anticancerígenos y en el control de secreciones gástricas y úlceras (Kingston & Rao, 1982; Goel et al., 1987, Girard et al., 1988; De almeida et al., 1990; Grazziotin et al., 1992).

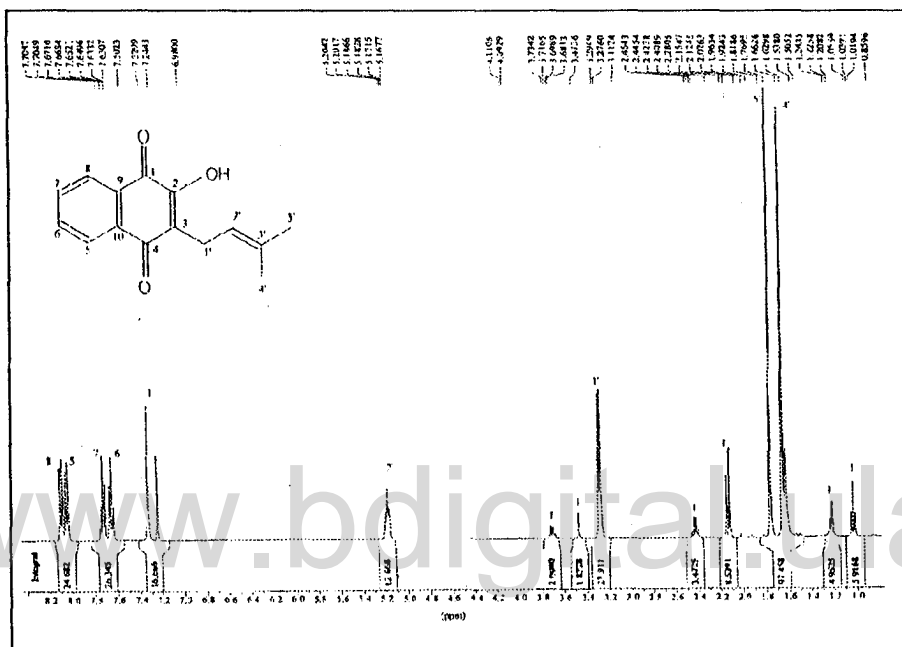


Figura 12. Espectro RMN ^1H , del Lapachol

Para confirmar la presencia del Lapachol, se obtuvo el espectro de RMN C^{13} que presenta las señales correspondientes a los átomos de carbono que conforman la estructura de esta sustancia, así como las señales características de los dos carbonos metílicos y al final del espectro los dos carbonos carbonilos. En la parte central se identificaron las señales correspondientes a los carbonos del anillo aromático. La asignación correspondiente a cada carbono se presenta en la Figura 13, que muestra el arreglo característico de la estructura del Lapachol. Este espectro se presenta en el anexo 2. También se efectuó la espectroscopia infrarroja del Lapachol; en el mismo se identifican las bandas de absorción características de las naftaquinonas y en la banda 3353 cm^{-1} la señal correspondiente al grupo hidroxilo (OH) y a 1660 cm^{-1} la señal de absorción característica de la función carbonil quinona. Las otras asignaciones de señales se presentan en la Tabla 4 y en Anexo 3 se presenta el espectro IR correspondiente.

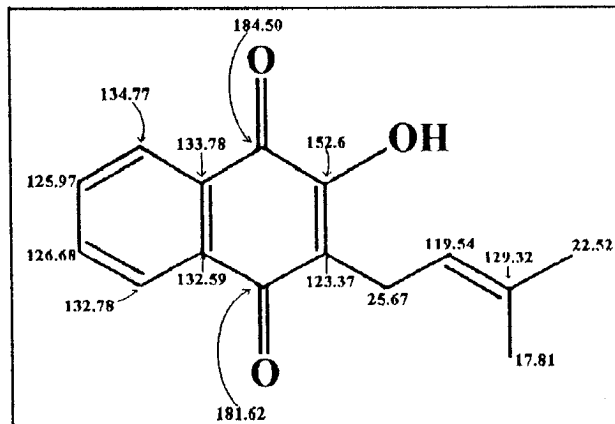
Figura 13. RMN C¹³ de la estructura del Lapachol

Tabla 4. Señales del espectro infrarrojo del Lapachol

Vcm ⁻¹ Teórico	Vcm ⁻¹ Experimental	Grupo Funcional
3600	3353	OH
3000	2971	C-H
1690	1661	C=O
1665	1639	C=O
1600	1593	C=C
1500	1389	C-C
1250	1221	C-C
800	755	C-O

V.3.- Conclusiones

El extracto etanólico de la madera de Puy está conformado por sustancias con composición química heterogénea y con actividad antifúngica variada.

La combinación de cromatografía de columna y cromatografía de capa fina y gruesa resulta un método eficiente y fiable para obtener las fracciones con capacidad antifúngica, que sumada al empleo de técnicas de espectroscopía y RMN, han permitido el aislamiento e identificación del Lapachol presente en el extracto etanólico de la madera de Puy.

La mayor cantidad de compuestos con capacidad antifúngica se identificaron en la zona central del proceso de fraccionamiento y purificación del extracto. Esta capacidad antifúngica disminuye a medida que se emplean solventes más polares.

La capacidad antifúngica, de las diferentes fracciones presentes en el extracto etanólico de la madera de Puy, posibilitan su uso potencial como fungicida de origen natural, cuya utilización es posible para el control y prevención de la biodegradación de la madera de Pino caribe por hongos de pudrición marrón y blanca.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO VI

Conclusiones y recomendaciones

Se ha logrado demostrar la potencialidad que tienen los extractos obtenidos de maderas latifoliadas de elevada durabilidad natural para la preservación de la madera de Pino caribe. La efectividad de los extractos es una función del solvente utilizado para su obtención.

El método de dilución en gel, resultó adecuado para evaluar la actividad de sustancias antifúngicas, sin purificar, de origen natural y con características físico químicas heterogéneas, representando una alternativa simple, rápida y de bajo costo para evaluar un gran número de potenciales agentes para el control de los hongos que degradan la madera.

Considerando que los compuestos extraíbles del duramen de maderas de elevada durabilidad natural necesitan solventes poco polares o medianamente polares, como acetona y etanol, este último ha resultado ser el solvente que logra extraer la mayor cantidad de compuestos con actividad antifúngica. El etanol resulta así un solvente suficientemente efectivo para extraer la mayor parte de los componentes elementales que pueden actuar como potenciales fungicidas.

El ensayo de la utilización de los extractos etanólicos de las especies Puy, Cartan y Teca, para incrementar la durabilidad del Pino caribe, ha permitido demostrar que estas especies contienen principios biológicamente activos contra microorganismos causantes del deterioro de la madera.

El fraccionamiento y purificación del extracto etanólico de la madera de Puy (*Tabebuia serratifolia*) ha permitido determinar que la actividad fungicida se encuentra limitada a una pequeña fracción (< 28 %) del extracto total, aspecto que debe ser tomado en consideración para evaluaciones posteriores, considerando que de otras especies del género *Tabebuia*, han sido ampliamente evaluadas, por su reconocida acción sobre diversos agentes patógenos para el hombre. El presente estudio confirma la potencialidad fungicida del extracto etanólico para microorganismos que deterioran la madera.

Los extractos solubles en solventes altamente polares como el agua, aportan un mínimo de efectos inhibitorios sobre diversos organismos que deterioran la madera, debido a que el

agua extrae mayores proporciones de compuestos constituidos principalmente por carbohidratos solubles no estructurales, los que tienden a estimular más que inhibir la acción de los hongos de deterioro de la madera.

Estos resultados justifican el interés para continuar con los estudios biológicos y para promover la síntesis de sus componente y derivados en el futuro. Estos compuestos o principios activos podrían ser empleados como biopreservantes a bajos niveles de concentración, con reducidos efectos en el ambiente o contacto con animales, por su origen natural.

Al haberse confirmado que los extractivos en las maderas de elevada durabilidad desempeñan un rol importante en esta cualidad, se ha mostrado factible su utilización para mejorar la durabilidad reducida que tienen especies de baja durabilidad natural, como el Pino caribe. Es necesario sin embargo profundizar en el estudio de estos compuestos.

Desarrollados estos compuestos para la bioprotección de la madera, es conveniente profundizar en el estudio del posible mecanismo de fijación que puede establecerse entre los potenciales biopreservantes y la madera en los cuales se introducen.

Tomando en cuenta que los extractivos de la madera, con potencial antifúngico están compuestos por un amplio numero de sustancias de diferentes clases, usualmente de bajos pesos moleculares característicos para cada especie, es necesario profundizar en la identificación y acción antifúngica de cada uno de ellos y debe tratar de entenderse el grado de sinergia existente entre los mismos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdelrhafour, T.E., Lattaoui, N. and Errifi A. (1993). Composition and Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus broussonettii*, *T. zygis* and *T. satureioides*. Journal of Essential Oil Research. Jan/Feb. 5, 45-53.
- Ahmad, V. Alam, N. (1995). New antifungal bithienylacetylenes from *Blumea obliqua*. Journal of Natural Products. 58 (9), pp 1426-1429.
- Ahmed, B. French, J. Kwint, P. Webb, G. (1997). Laboratory evaluation of fipronil as a candidate termicide in the protection of wood against the subterranean termite, *Coptotermes acinaciformis* Rhinotermitidae. The International Research Group on Wood Preservation. Document N° IRG/ WP/97-10225.
- Ajaiyeoba, E. Rahman, A. Choudhary, I (1998). Preliminary antifungal and cytotoxicity studies of extracts of *Ritchiea capparoides* var. *longipedicellata*. Journal of Ethnopharmacology. 62, N° 3.
- Ali-Shtayeh, M.S., Yaghmour, R.M., Faidi, Y.R., Salem, K., Al-Nuri, M.A. (1998). Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. Journal of Ethnopharmacology 60. 3, 256-271.
- American Society for Testing and Materials (1990). Standard method of testing wood preservatives by laboratory soilblock cultures. ASTM: D1413-76. Section 4, Construction, vol. 04.09. Wood.
- Balandrin, M. Klocke, J. (1988). Medicinal, aromatic, and industrial materials from plants. In Biotechnology in agriculture and forestry 4. Edited by Bajaj, Y. Germany. pp 550.
- Berger, I; Barrientos, A., Cáceres, A; Hernández, M; Rastrelli, L., Passreiter C.M., Kubelca W. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. Journal of Ethnopharmacology 62. 2, 107-115.
- Bhargava A., Srivastava A. and Kumbhare V. (1998). Antifungal activity of polyphenolic complex of *Acacia nilotica* bark. The Indian Forester. 124 (5).
- Blanchette, R., Nilson, T., Daniel, G., Abad, A. (1990). Biological degradation of wood. Archaeological Wood. 6:141-174.
- Carter, F. Beal, R. (1982). Termite responses to susceptible pine wood treated with antitermic wood extracts. The International Journal of Wood Preservation. 2 (4), pp 185 – 191.
- Claeson, P. Göransson, U. Johansson, S. Luijendijk, T. Bohlin, L. (1998). Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. Journal of Natural Products, 61, pp 77 – 81.
- Coll, J. Bowden, B. (1986). The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixture. Journal of Ethnopharmacology. 49, N° 5.

- Cornelius, M. Grace, K. Yates, J. (1997). Toxicity of monoterpenoids and other natural products to formosan subterranean termite. *Journal of Economic Entomology*. 90 (2), pp 320-325.
- Crowe, A. Hill, R. Smith, P. Cox, T. (1979). Laboratory Evaluations of Tributyltin Compounds as Wood Preservatives. *The International Journal of Wood Preservation*. 1 (3): 119 – 124.
- Cserjesi, A.J., Johnson, E.L. (1982). Mold and sapstain control: laboratory and field tests of 44 fungicidal formulations. *Forest Products Research Society*. 32(10): 59-68.
- Darrel, N. (1981). Multidisciplinary approach to the development of new wood preservatives. *Forest Products Journal*. 31 (9): 28-33.
- Dawson, B. Morrell, J. (1990). Effects of chemical pretreatment of douglas-fir heartwood on efficacy of potential bioprotection agents. *The International Research Group on Wood Preservation. Document N° IRG/ WP/1440*.
- De Groot, R; Woodward, B; Hennon, P. (2000). Natural decay resistance of heartwood from dead, standing Yellow-cedar trees: laboratory evaluations. *Forest Product Journal*. 50 (1): 53-59.
- Del Rio, J. Gutiérrez, A. González, F. Martín F. (1999). Application of pirólisis-gas chromatography-mass spectrometry to the analysis of pith deposits and synthetic polymers in pulp and pulp mills. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 49: 165-177.
- Delle, F. (1997). Productos naturales para el desarrollo de nuevas drogas. *En "V Congreso Colombiano de Fotoquímica"*. Medellín, Colombia. pp 151-157.
- Deon, G. (1983). About the relations Between the natural durability of some tropical species and their extractives content. *The International Research Group on Wood Preservation. Document N° IRG/ WP/ 12018*.
- Doppelreiter, H. Koriath, M. (1978). Inhibition of development of the subterranean termites *Hetertermes indicola* and *Reticulitermes Flavipes* caused by diflubenzuron (Dimilin[®]). *Holzforschung*. 32: 103 – 109.
- Dos Santos, G. Miller, R. (1992) Wood anatomy of Tecomeae. *In: Alwyn, H Gentry (ed.), Bignoniaceae – part II. Flora Neotropica. The New York Botanical Garden*. 336-358
- Dubey, N. Kishore, N. (1987). Fungitoxicity of some higher plants and synergistic activity of their essential oils. *Tropical Science* 27: 23-27.
- Eaton, R. Hale, M. (1993). *Wood: Decay, Pests and Protection*. Chapman & Hall, London. pp 546.
- Eloff, J. (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 60, N° 1.
- Erikson, K., Grünewals. A., Nilson, T. (1980). A scanning electron microscopy study of the grown an attackon wood by tree white rot fungi and their cellulose less mutants. *Holzforchung*. 34: 207-213.

- Erikson, K. Blanchette, R. Ander, P. (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Fengel, D. Wegener, G. (1984). Wood: Chemistry, Ultrastructure and reactions. W. de Gruyter, Berlin and New York. pp 613.
- Fischer, C. and Höll W. (1992). Food reserves of scots pine (*Pinus silvestris* L.). II. Seasonal changes and radial distribution of carbohydrate and fat reserves in pine wood. Trees structures and Function. 6(3):147-155.
- French, J.R., Robinson, P.J., and Creffield, J.W. (1983). Bioassays of extracts from scaly ash (*Ganophyllum falcatum* B1) against the subterranean termite *Coptotermes acinaciformis* (Froggatt). The International Research Group on Wood Preservation. Document IRG/WP/1206.
- Gao, Y. Breuil, C. (1995). Wood extractives as carbon sources for staining fungi in the sapwood of Lodgepole Pine and Trembling aspen. The International Research Group on Wood Preservation. Document N° IRG/ WP /95-10098.
- García, C. Correa, E. Rojas, N. (1995). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antimicrobiana de algunas plantas superiores colombianas. Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmaceuticas. 23: 42 – 48.
- Girard, M. Ethier, J. Kindack, D. Dawson, B. Awang, D. (1987). Mass spectral characterization of naphthoquinones related to Lapachol. Journal of Natural Products. 50, N° 6.
- Goel, R. Pathak, N. Biswas, M. Pandey, V. Sanyal, A. (1987). Effect of Lapachol, a naphthaquinone isolated from *Tectona grandis*, on experimental peptic ulcer and gastric secretion. Journal Pharmacia and Pharmacology 39: 2.
- González, R. (1996). Preservación de la madera con taninos. Madera y Bosque 2 (2): 67-73.
- Gopalakrishnan, G. Banumathi, B. Suresh, G. (1997). Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. Journal of Natural Products 60: 519-524.
- Graziotin, J. Schapoval, E. Chaves, C. Gleye, J. Henriques, A. (1992). Phytochemical and analgesic investigation of *Tabebuia chrsotricha*. Journal of Ethnopharmacology. 36: 249-251.
- Gunther, S. (1979). On The Variation of decay resistance in some African timbers. Holzforschung. 34: 21- 30.
- Gutierrez, A., Del Río, J., Martínez, A. (1999). Fungal degradation of lipophilic extractives in *Eucalyptus globules* wood. Applied and Environmental Microbiology. 65 (4): 1367-1371.
- Harborne, J. (1987). Natural fungitoxins. In Biologically active natural products. Oxford Science Publications.
- Hillis, W. (1968). Chemical aspects of heartwood formation. Wood Science and Technology. Vol 2, pp 241-259.

- Hillis, W. (1987). Heartwood and tree exudates. Syracuse, New York. USA. pp 267.
- Jansser, A. Senefief, J. Baerherm, A. (1987) Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Medica*.
- JUNAC.(1988). Manual del Grupo Andino para la Preservación de Maderas. Lima, Perú. pp 100.
- Jürgen, S. Hosni, K. Manfred, R. (1995) HPLC separation and determination of naphtol (2,3-b)furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). *Journal of Chromatography A*, 693: 281-287.
- Kamdem, D. (1994). Fungal decay resistance of aspen blocks treated with heartwood extracts. *Forest Products Journal*. 44, N° 1.
- Kamdem, D. Gruber, K. Freeman, M. (1995). Laboratory evaluation of the decay resistance of Red oak (*Quercus rubra*) pressure treated with copper Naphthenate. *Forest Products Journal*. 45, N° 9.
- Kenedy, M. (1999). Comunicación personal.
- Kirk, T. (1975). Chemistry of lignin degradation by wood-destroying fungi. *In: Biological transformation of wood by microorganisms*. Edite by Liese W. Springer-Verlag, New York . Chapter 13. 153-164.
- Li, E., Clark, A., Hufford, C. (1995). Antifungal evaluation of Psudolaric acid B, a major constituent of *Psudolarix kaempferi*. *Journal of Natural Products*. 58(1), 57-67.
- Line, M. (1983). The potential application of rapid gas chromatographic assay of microbial respiration to the monitoring of wood decay in field trial situations. The International Research Group on Wood Preservation. Document N° IRG / WP/2196.
- Mantilla, J. Sanabria, A. (1985) Actividad antibacteriana de plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas*. 4 (2): 25 – 34.
- Mitscher, L.A., Leu., R.P., Bathala, M.S., Wu, W. and Beal, J.L. (1972). Antimicrobial agents from higher plant. I. Introduction, rationales, and methodology. *Lloydia*. 35 (2).
- Monteiro, M. Brazolin, S. (1997) Comparation between agar-block and soil-block methods for wood destroying Basidiomycetes. The International Research Group on Wood Preservation. Document N° IRG / WP/97-2298.
- Mora, N. (1998). Efectos del ataque de hongos de pudrición marrón y blanca sobre la durabilidad natural e inducida de tres maderas venezolanas. Tesis, Magister Scientiae. ULA, Mérida. Venezuela. pp 84.
- Murphy, R.P., Barnes, H.M., Gray, S.M. (1995) Decay and soil depletion studies with polymer/boron preservative system. *Forest Products Journal*. 45(9): 77-81.
- Pelletier, W. Chokshi, H. Desai, H. (1986). Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. *Journal of Natural Products*. 49 N° 5.

- Pereira, H. Oliveira, M. Miranda, I. (1986). Kinetics of ethanol-water pulping and pulp properties of *Eucalyptus globulus* Lab. *Appita*. 39 N° 6.
- Peredo, M. (1993). Preservantes antimancha alternativo al pentaclorofenato de sodio. Chile Forestal. Documento técnico N° 68.
- Pérez, M.S., (1997). Análisis of volatile components of oak wood by solvent extraction and direct thermal desorption-gas chromatography-massspectrometry. *Journal of Chromatography A*. 427-434.
- Permadi, P. De Groot, R. Woodward, B. (1998). Alternative wood preservative for use in Indonesia. *Forest Products Journal*. 48 N° 11/12.
- Pettit, G. Smith, C. Singh, S. (1987). Recent advances in the chemistry of plant antineoplastic constituents. In *Biologically active natural products*. Oxford Science Publications.
- Prakash, S. Tej, K. Bhupinder, S. (1998). Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid. *Journal of Chromatography A*, 822.
- Rainer, A. and Boddy, L. (1988). Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology. Chapter 6. *Jhon Wiley & Sons*. London. 587.
- Ramírez, A. (1997). Biotecnología y la investigación en productos naturales. En: *La biodiversidad como fuente de moléculas activas*. "V Congreso Colombiano de Fitoquímica". Medellín, Colombia. pp 451-474.
- Remmal, A. Bouchikhi, T. Rhayour, K. Ettayebi, M. Tantaoui, A. (1993). Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oils Research* 5: 179 – 184.
- River, B., Vick, C., Gillespie, R. (1994). Wood as an adherend. *In: Treatise on Adhesion and adhesives*. Edited by Minford D. New York. Chapter 1. 1-230.
- Ritschkoff, A.C. (1991) The identification on the carbohydrate degrading enzymes from the crude extract of brown-rot fungus *gloephyllum trabeum*. The International Research Group on Wood Preservation. Document IRG/WP/1483.
- Sanabria, A; Ruiz, A; Moreno, A. (1998). Actividad antimicrobiana *In vitro* de angiospermas Colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas*. 27: 47 – 51.
- Sanbria, A. Sarmiento, G. Rodríguez, M. (1995). Actividad antifúngica y antibacteriana de *Ageratina ibaguensis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas* 23: 58 – 63.
- Sanabria, A. Mantilla, J. (1985). Actividad antifúngica de plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas*. 4(15):17 – 22.
- Sanabria, G. (1999). Comunicación personal.

- Santini, E. (1988). Biodeterioración e preservación da madeira. Centro de Pesquisas Florestais de Santa Maria. Sao Paulo, Brasil. pp. 30.
- Saranpää, P., Höll W. (1989). Soluble carbohydrates of *Pinus sylvestris* L. sapwood and heartwood. *Trees structures and Function*. 3(3): 138-143.
- Saranpää, P., Nyberg, H. (1989). Lipids and sterols of *Pinus sylvestris* L. sapwood and heartwood. *Trees structures and Function*. 1(2): 82-87.
- Schultz, T. Darrel, D. (1997). Susceptibility of angiosperm sapwood to white-rot fungal colonization and subsequent degradation: A hypothesis. The International Research Group on Wood Preservation. Document N° IRG/ WP/ 97-10211.
- Shibutani, S. Igarashi, K. Samejima, M. Saburi, Y. (1999). Antimicrobial activity of extractives from conifers Barks. In 10TH International Symposium on Wood and Pulping Chemistry. Yokohama, Japan. Tomo II, pp 28-31.
- Shnabel, W. (1981). Polymer degradation. Principles and Practical applications. Macmillan Publishing Co. New York. Chapter 2. 24-61.
- Siau, J. (1984). Transport processes in wood. Springer Verlag. Syracuse N.Y. pp 237.
- Singh, A. Kim, Y. (1997). Biodegradation of wood in wet environments: a review. The International Research Group on Wood Preservation. Document N° IRG/ WP/ 97-10217.
- Sing, J. and Tripathi, N.N. (1999). Inhibition of storage fungi on blackgram (*Vigna mungo* L.) by some essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 14(1).
- Sjöström, E. (1981). Wood Chemistry Fundamental and Applications. Orlando, Florida.
- Smulski, S. (1996). Wood destroying fungi in residential construction.
- Srivastava K.K., Gupta, P.K, Tripathi, Y. C. and Sarvate, R. (1997). Antifungal activity of plant products on spermoplane fungi of *Azadirachta indica* (Neem) seeds. *The Indian Forester*. 123 (2).
- Srivastava, K; Gupta, P; Mishra, D. (1998). Effect of neem seed kernel extracts on spermoplane fungi of Neem (*Azadirachta indica*) seed. *The Indian Forester*. Vol. 124, (12).
- Suttie, E. Orsler, R. (1996). The influence of the natural extractives of Opepe (*Nauclea diderrichii*) and African padauk (*Pterocarpus soyauxii*) timbers on their durability. The International Research Group on Wood Preservation. Document N° IRG/ WP/ 96-30098.
- Tantaoui, A. Lattaoui, N. Errifi, A. Benjilali, B. (1993). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus broussonettii*, *T. zygis* and *T. satureioides*. *Journal of Essential Oil Research* 5: 45-53.
- Teranishi, R. Kint, S. (1993). Bioactive volatile compounds from plants. American Chemical Society. U.S.A.
- Terry, L. (1994). Research on Biodeterioration of Wood, 1987-1992. Forest Product Laboratory. USA. pp 20.

- Theodoridis, G. Laskaris, G. Jong, C. Hofte, A. Verpoorte, R. (1998). Determination of paclitaxel and related diterpenoids in plant extracts by high-performance liquid chromatography with UV detection in high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 802, 297-305.
- Thornton, J. Collett, O. (1979). A laboratory test to determine potential uses of fungicides against *Serpula lacrymans* Gray. *The International Journal of Wood Preservation*. 1 (1): 21 – 25.
- Tsoumis, G. (1991). Science and technology of wood. structure, properties, utilization. Van Nostrand Reinhold. New York. pp 500.
- Turner, P, Conradie, D. (1996). In field accelerated test method for evaluation of wood preservative against african subterranean termites. The International Research Group on Wood Preservation. Document N° IRG/ WP/ 96-20100.
- Vandamme, E. (1984). Biotechnology of industrial antibiotics. Marcel Dekker, INC. Vol 22. pp 808.
- Vidovic, N. (1979). Evaluation of preservatives against *Hylotrupes bajulus* L. *The International Journal of Wood Preservation*. 1 (1): 35 – 40.
- Willcox, W. (1978). Review of literature on the effects of early stages of decay on wood strength. *Wood and Fiber*. 9 (4): 252-257.
- Willför, S. Sjöholm, R. Holmbom, B. (1999). Isolation and characterization of water-soluble arabinogalactans from the heartwood of Norway spruce and Scots pine. In 10TH International Symposium on Wood and Pulping Chemistry. Yokohama, Japan. Tomo II, pp 32-34.
- Wong, A. Singh, A. (1997). Microbial decay in an extremely durable Malaysian hardwood belian (*Eusideroxylon zwageri*) - an overview. The International Research Group on Wood Preservation. Document N° IRG/ WP/ 97-10216.
- WRCLA(1998). Understanding extractive blending. <http://www.wrcla.org/spec/ext/description.html>
- Young, R. (1991). Introducción a las Ciencias Forestales. Editorial Limusa, Mexico D.F. pp 630.
- Zabel, R. Morrell, J. (1992). Wood microbiology, decay and its prevention. Academic Press, INC. N.Y. pp 476.