

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO  
FACULTAD DE INGENIERIA EN TECNOLOGÍA DE LA MADERA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Evaluación de la actividad antifúngica de diferentes extractos del duramen de *Dalbergia congestiflora* P. y aislamiento e identificación del componente con actividad biológica.

---

TESIS QUE PRESENTA:

**Ma. del Carmen Martínez Sotres**

Como requisito parcial para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias y Tecnología de la Madera

**DIRECTOR**

**Dr. Rafael Herrera Bucio**

**CODIRECTOR**

**Dr. Gerardo Vázquez Marrufo**

**Dr. José Guadalupe Rutiaga Quiñones**

*Dedico este trabajo así como todos mis logros de vida, a mis dos grandes*

*maestros:*

*Fidel Martínez Guadarrama y Carmen Sotres Vázquez*

*Quienes con sus principios, valores y amor, me han guiado por el sendero*

*adecuado del trabajo y estudio.*

*Infinitamente: Gracias Papas.*

*A mis esperanzas de vida, mis hermosos hijos:*

*Andrea y Derek*

*Ya que sin ellos cualquier logro no tendría sentido, a ustedes les dedico toda mi*

*realización y mi vida entera.*

*A mi entrañable compañero de aventuras, mi mejor amigo, mi confidente, mi*

*apoyo y sobre todo el gran amor de mi vida: Pablo.*

## ***AGRADECIMIENTOS***

A mis padres les agradezco infinitamente, ya que durante la realización del presente trabajo estuvieron siempre brindándome su apoyo inigualable, en especial a mi mamá por estar presente cuando más la necesité.

A mis hermanos: Paty, Jorge y Lupita, que directa e indirectamente me apoyaron desde lejos.

A Pablo, por darme la mano para no caerme en los momentos difíciles, por su confianza, apoyo, valiosos consejos, paciencia y amorosa compañía. Gracias, eres único.

Al Dr. Gerardo Vázquez Marrufo, por su amable disposición, prestación de instalaciones de su laboratorio y por las observaciones para mejoras del proyecto.

Al Dr. José Cruz por sus comentarios y observaciones enriquecedoras.

Al Dr. José Guadalupe Rutiaga Quiñones, por su colaboración, revisión y mejoramiento del proyecto.

A mis profesores de Maestría: Marco Antonio Herrera Ferreyra por su gran calidad docente, a la profesora Teresa García Moreno por la donación e identificación de la madera estudiada.

A mis compañeros de laboratorio por su enorme ayuda: María Luisa López, Marina Arredondo y Juan Antonio Díaz López.

Mi especial agradecimiento al Dr. Rafael Herrera Bucio por la confianza que depositó en mí para la realización de este proyecto, por su acertada dirección así como su gran apoyo y entusiasmo para el buen término del mismo.

## RESUMEN

La preservación de la madera se encuentra limitada al manejo de productos comerciales que causan daños ambientales y a la salud humana, por lo que están cayendo en desuso, ya que el mercado demanda productos que sean eco-amigables y que garanticen efectividad en su aplicación. Una alternativa para el control de plagas y patógenos son los metabolitos extraídos de árboles y plantas con durabilidad natural al deterioro. La madera del duramen del árbol *Dalbergia congestiflora* Pittier es considerada de alta durabilidad natural y de gran belleza, por lo que es cotizada en el mercado internacional. Los extraíbles de dicha madera son nuestro objeto de estudio para evaluar la actividad antifúngica frente al hongo *Trametes versicolor*, conocido por su agresiva capacidad de degradación de tejidos lignocelulosicos. Se evaluaron los extractos obtenidos con los solventes: hexano, éter etílico, acetato de etilo y acetona. Siendo el extracto hexánico el que mostró 100% de inhibición. A partir de dicho extracto se aisló y se identificó el componente con actividad antifúngica, mediante estudios de elucidación estructural. La estructura elucidada corresponde a (+)- Medicarpina, la cual se sometió a estudios computacionales de anclaje molecular frente a un modelo tridimensional de la enzima Lacasa del hongo *Trametes versicolor*, observándose el mejor acoplamiento de Medicarpina en una cavidad cercana al sitio T2-T3 de la enzima. La vinculación entre los resultados experimentales y el modelado molecular, generaron la información necesaria para proponer el mecanismo de inhibición de la enzima del hongo degradador de lignina, en base al impedimento de la transferencia electrónica al sitio T2-T3 de la enzima debido al bloqueo de entrada de oxígeno, quedando inactiva la función enzimática.

**Palabras clave:** *Dalbergia congestiflora* P, preservación, durabilidad natural, extractos, actividad antifúngica, *Trametes versicolor*, Lacasa, Medicarpina.

## ABSTRACT

The preservation of wood is limited to the management of commercial products that cause environmental damage and human health, so they are falling into disuse, as the market demand for products that are eco-friendly and to pest in implementation. An alternative for the control of pests and pathogens are the metabolites extracted from plants and trees with natural durability. The heartwood of *Dalbergia congestiflora* Pittier has a high natural durability and its beauty is very appreciated in the international market. The extracts of this wood are our objects of study for evaluate antifungal activity against the fungus *Trametes versicolor*. Extracts obtained (hexane, ethyl ether, ethyl acetate and acetone) showed different levels of inhibition. The hexane extract inhibited 100% growth of the fungus *Trametes versicolor*, from this extract was isolated and identified the component with antifungal activity by structural elucidation studies. The elucidated structure corresponds to (+) - Medicarpina, which was subjected to computational studies of molecular anchor in front of a three-dimensional model of the enzyme laccase of the fungus *Trametes versicolor*, showing the best Medicarpina coupling in a cavity near the site T2-T3 of the enzyme. The link between the experimental results and molecular modeling, generated the information necessary to propose the mechanism of inhibition of the enzyme lignin-degrading fungus, based on electron transfer impairment to T2-T3 site of the enzyme due to blockage of entry of oxygen, leaving inactive enzyme function.

### Keywords:

*Dalbergia congestiflora* P, preservation, natural durability, extracts, antifungal activity, *Trametes versicolor*, laccase, Medicarpin.

## PRODUCTOS CIENTÍFICOS DEL PRESENTE TRABAJO

### **Congresos**

- Ma. del Carmen Martínez-Sotres, Teresa García-Moreno, Pablo López Albarrán, Rafael Herrera Bucio, José G. Rutiaga Quiñones, David Raya González (2010) Efecto antifúngico de los extraíbles del duramen de *Dalbergia congestiflora* Pittier. *VII Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia*, León Guanajuato.
- Ma. del Carmen Martínez Sotres, Juan Antonio Díaz López, Rafael Herrera Bucio, Gerardo Vazquez Marrufo, Pablo López Albarrán (2010) Actividad antifúngica del extracto hexánico de la madera del Campincerán. *6<sup>to</sup> Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología*, Morelia Michoacán.
- Ma. del Carmen Martínez Sotres, Pablo López Albarran, José Cruz De León, José G. Rutiaga Quiñones, Gerardo Vazquez Marrufo, Rafaél Herrera Bucio (2010) Actividad antifúngica de diferentes extractos provenientes de la madera *Dalbergia Congestiflora P.* *2do Congreso Iberoamericano de Protección de la Madera*, Mar Del Plata, Buenos Aires Argentina.

### **Formación de recursos humanos**

Servicio social prestado por:

- Juan Antonio Díaz López
- María Luisa López Ojeda

Alumnos de octavo semestre de la carrera Ingeniería en Tecnología de la Madera de la Universidad Michoacan de San Nicolás de Hidalgo.

## INDICE

Página

<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	
I.1	Generalidades	1
I.2	Composición química de la madera (Celulosa, hemicelulosa, lignina, extraíbles, componentes inorgánicos)	2
I.3	Biodegradación de la madera	10
I.4	<i>Trametes versicolor</i>	12
I.5	Hongos ligninolíticos	13
I.6	Enzimas ligninolíticas de los hongos	13
I.7	Enzima Lacasa	14
I.8	Modelado molecular	16
<b>II</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	
II.1	Género <i>Dalbergia</i>	19
II.2	Actividad biológica de algunas especies del género <i>Dalbergia</i>	19
II.3	<i>Dalbergia congestiflora</i> P.	21
II.4	<i>Anatomía de Dalbergia congestiflora</i> P.	22
II.5	Unidad Ribosomal de hongos.	23
II.6	Usos de la enzima Lacasa	26
II.7	Biopreservantes de maderas basados en extractos naturales	26
<b>III</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	29
<b>IV</b>	<b>OBJETIVOS</b>	31

<b>V</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
V. 1	Material biológico	32
V.2	Determinación del contenido de humedad	32
V.3	Obtención de extractos	32
V.4	Obtención del extraíble hexánico	33
V.5	Determinación del contenido de lignina	33
V.6	Determinación del contenido de holocelulosa	34
V.7	Análisis genético del hongo	34
V.7.1	Obtención de ADN	34
V.7.2	Reacciones de amplificación por PCR y RT-PCR	35
V.8	Ensayo antifúngico	36
V.8.1	Concentración mínima de inhibición con cristales	36
V.9	Ensayos bioquímicos para <i>Trametes versicolor</i>	37
V.9.1	Cinética de crecimiento en placa y medio líquido (Condiciones basales y con cristales)	37
V.9.2	Ensayos de actividad enzimática (Condiciones basales y con cristales)	37
V.9.3	Cuantificación de de proteína extracelular	38
V.10	Separación del extraíble hexánico mediante cromatografía	40
V. 11	Caracterización química del cristal	40
V.11.1	Espectroscopia de masas	41
V.11.2	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	41
V.12	Estructura tridimensional de la enzima lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	41
V.13	Modelado molecular	41

<b>VI</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
VI.1	Análisis genético de <i>Trametes versicolor</i>	44
VI.2	Contenido de lignina y holocelulosa	46
VI.3	Contenido de extraíbles	46
VI.3.1	Cromatografía en capa fina de los diferentes extractos	48
VI.4	Extracto hexánico	49
VI.4.1	Características físicas del cristal	51
VI.5	Actividad antifúngica	52
VI.6	Inhibición de crecimiento fúngico	54
VI.7	Concentración mínima de inhibición fúngica en presencia de cristales	55
VI.8	Cinética de crecimiento de <i>Trametes versicolor</i>	56
VI.9	Actividad enzimática de Lacasa	59
VI.10	Cuantificación de enzima Lacasa	60
VI.11	Elucidación estructural de la sustancia cristalina	61
VI.12	Medicarpina	64
VI.12.1	Propiedades medicinales de la medicarpina	65
VI.13	Espectros de H <sup>1</sup> RMN y <sup>13</sup> C RMN	69
VI.14	Modelado molecular	70
<b>VII</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>76</b>
<b>VIII</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>78</b>

## I INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades

La madera ha servido al hombre desde tiempos remotos y ha contribuido a la supervivencia y desarrollo de la civilización, su valor y uso se sigue conservando ya que con mayor frecuencia se usa para satisfacer las necesidades de la humanidad (**Tsoumis 1991**). La madera presenta ciertas cualidades como son: su dureza, resistencia y belleza, entre otras, que la favorecen para la elaboración de muebles, instrumentos musicales, herramientas, ebanistería, etc. Existen maderas con alta durabilidad natural por presentar resistencia al ataque de microorganismos sin tratamiento alguno.

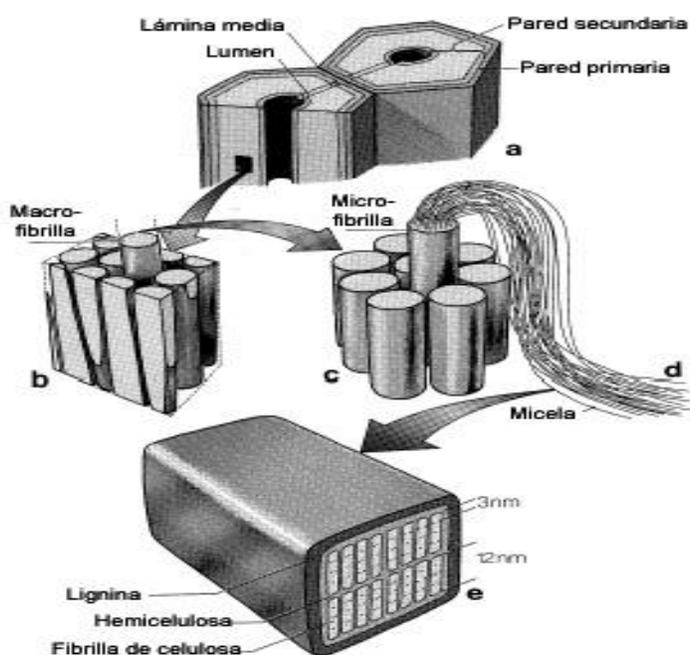
Se ha observado que el duramen de la madera de *Dalbergia congestiflora* Pittier es resistente a este ataque, dicha madera es ampliamente utilizada en la elaboración de muebles, artesanías y joyería. Esta resistencia se encuentra generalmente atribuida a la presencia, en las paredes celulares de la madera, de sustancias químicas activas que juegan un papel importante en la durabilidad natural. Estas sustancias proporcionan una actividad antifúngica o fungistáticas eliminando o inhibiendo el crecimiento de agentes xilófagos. (**Deon 1983**)

La pudrición de la madera es una de las mayores causas de deterioro microbiológico que ocasiona fallas estructurales de manera rápida, sobre elementos de madera en servicio. Los más potentes e importantes organismos de pudrición de la madera, son los hongos de pudrición blanca, marrón, blanda y las bacterias (**Mora y Encinas 2001**).

El hongo de pudrición blanca llamado *Trametes versicolor* es uno de los más agresivos para la madera razón por lo que la norma internacional Annual Book of Standar (**ASTM, 1986**) lo recomienda para los ensayos de durabilidad. Siendo la madera de *Dalbergia congestiflora* resistente al ataque de microorganismos, nuestro interés es evaluar la actividad antifúngica de los extractos de esta madera para identificar la o las sustancia químicas responsables de dicha actividad, con la finalidad de proponer una alternativa de protección de origen natural, cuya ventaja principal es la de proveer productos naturales efectivos, de baja toxicidad a los seres humanos y ambientalmente aceptables (**Velásquez 2000**).

## 1.2 Composición química de la madera.

La madera está compuesta de forma general por tres grupos de sustancias, las que conforman la pared celular, donde se encuentran las principales macromoléculas: celulosa, poliosas (hemicelulosas) y ligninas (**Figura 1**), que están presente en todas las maderas; el otro grupo lo conforman las sustancias de baja masa molar conocidas también como sustancias extraíbles que se encuentran en menor cantidad y las sustancias minerales. La proporción y composición química de la lignina y las poliosas difiere para las maderas de coníferas y latifolias, mientras que la celulosa es uniforme en composición en todas las maderas (**Browning 1967**); además la proporción de estos componentes varía con la especie, entre la madera de árboles de la misma especie y en diferentes partes del propio árbol, en la madera de la albura y duramen, en dirección radial y longitudinal (**Fengel y Wegener 1984**).



- Corte transversal de una fibra de madera mostrando la lámina media y la pared celular primaria y secundaria.
- Sección transversal de una porción de la pared secundaria con microfibrillas.
- Un manojo de microfibrillas.
- Los filamentos micelares.
- Corte transversal de una micela, mostrando la composición ultraestructural: la lignina, hemicelulosa y celulosa.

El espacio entre las fibras vegetales (lámina media), microfibrillas, microfibrillas y los filamentos micelares está ocupado por lignina (**Hüttermann 2001**)

**Figura 1** Representación esquemática de la pared celular vegetal a cuatro niveles.

## Componentes de la pared celular de la madera

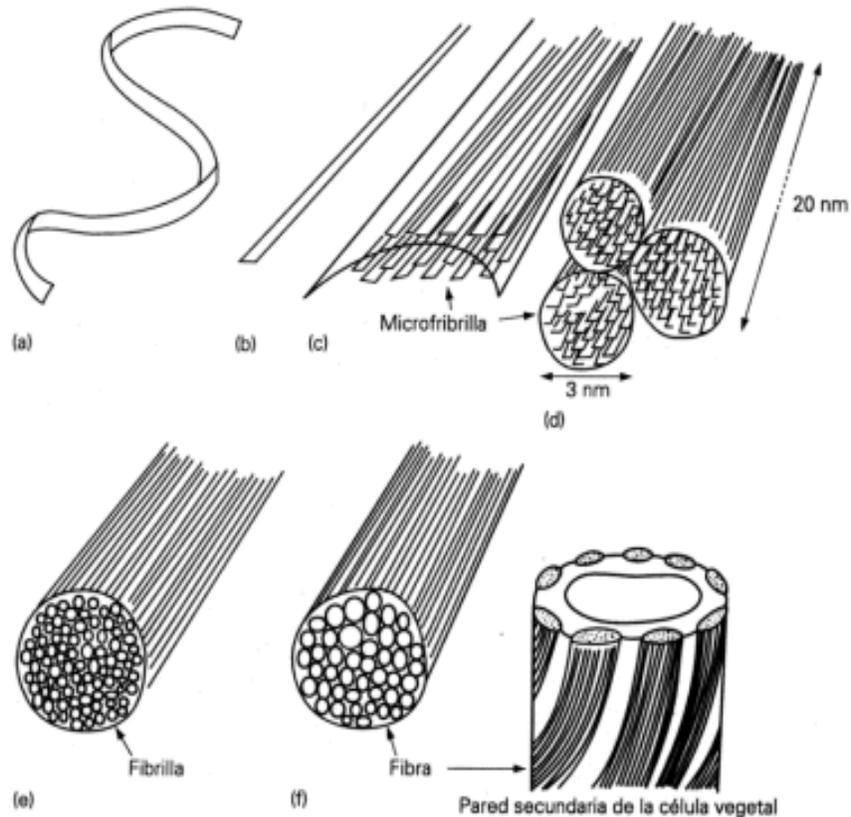
### 1.2.1 La celulosa.

La celulosa es el homopolisacárido que se encuentra en mayor proporción en la madera, es una estructura básica de las células de las plantas y la sustancia más importante producida por este organismo vivo (**Marx y Figini 1964**), siendo el principal componente de la pared celular (**Fengel 1984**). La celulosa consiste en unidades de anhidro-  $\beta$  - D (+) glucopiranosas en conformación  ${}^4C_1$ , unidos por enlaces glicosídicos  $\beta$  -1-4, por lo que se puede describir como un polímero lineal de glucanos. La unidad estructural de la celulosa es la celobiosa (disacárido) con una longitud de 1,03nm. (**Fengel 1984**).

El grado de polimerización es del orden de los 15,000, lo que equivale a una masa molar en el orden de los 2,3 millones. Debido al tipo de enlace ( $\beta$ -1-4) la molécula de celulosa tiene una forma lineal, estabilizada por la formación de numerosos puentes de hidrógeno intracadenales e intercadenales. Entre 40 y 70 moléculas se encuentran agrupadas en fibrillas elementales de un espesor de 3,5 y 7,5 nm y una longitud de varios  $\mu$ m. En ellas las moléculas de celulosa están orientadas longitudinalmente formando un agregado cristalino fuertemente ordenado, en el que todas las moléculas presentan la misma polaridad, lo que indica que tienen su extremo reductor orientado hacia el mismo extremo de la microfibrilla. En estos agregados las moléculas de celulosa no están unidas covalentemente, estabilizándose su estructura solamente por puentes de hidrógeno (C3-C6) y (C2-C5), que aunque muy débiles individualmente, su elevado número hace de la fibra de celulosa una estructura muy firme y poco sensible a la degradación (**Guardiola y Amparo 1995**).

Las microfibrillas construyen las macrofibrillas y estas a su vez las fibras de celulosa (**Figura 2**). La estructura cristalina de la celulosa de la madera ha sido estudiada por análisis de

Difracción de Rayos X y métodos basados en absorción de luz Infrarroja polarizada (Sjöstrom 1981). Mediante los espectros Infrarrojo de la celulosa se puede obtener información sobre los cambios estructurales de la celulosa oxidada, u obtenida por diferentes métodos (Higgins y McKenzie 1956), (Browning 1967).



**Figura 2.** Representación esquemática de celulosa.

Aspectos de la configuración y estructura de la celulosa. Tendencia del polímero lineal a extenderse totalmente (a y b) y asociarse después para formar microfibrillas (c) que a su vez se alinean con otras (d y e) para dar lugar a una fibra de celulosa (f). Orientación de las fibras en una capa de pared secundaria (g). (<http://www.genomasur.com/lecturas/Guia02-1.htm>)

La celulosa presenta un alto grado de cristalinidad, pero no es 100% cristalina, dependiendo de la materia prima de donde proviene. La presencia de hemicelulosas en la celulosa de las maderas parece causar disturbios en la cristalinidad. Cuanto más cristalina es la celulosa mayor es su densidad **(Browning 1967)**

La cristalinidad de la celulosa se encuentra en función de la gran cantidad de puentes de hidrógeno, hecho que además explica por qué la celulosa no es soluble en los sistemas de solventes usuales. Ella es la responsable de determinadas propiedades físicas y mecánicas de las maderas por constituir el material de sostén del árbol, dándole resistencia y tenacidad **(Coronel 1994)**.

### **1.2.2 Las hemicelulosas**

Las poliosas o hemicelulosas son heteropolisacáridos de alta masa molar, que se encuentran constituidos por diferentes unidades de monosacáridos: pentosas, hexosas y ácidos urónicos, enlazados entre sí por enlaces glicosídicos, formando estructuras ramificadas y en general amorfas. Pueden ser clasificadas como pentosanos y hexosanos, aunque también se clasifican en dependencia de su origen, su composición estructural y solubilidad en álcalis. **(Tanner y Loewus 1981)**.

Las maderas están conformadas por azúcares neutros de seis átomos de carbono: glucosa, manosa, galactosa y de cinco átomos de carbono: la xilosa y arabinosa. Algunas poliosas contienen adicionalmente ácido urónico. Se pueden encontrar los mananos, glucomanos, glucanos, xiloglucanos, ramnogalactouronanos, y en los xilanos encontramos los arabinoxilanos y O-acetil- 4- O- metilglucuronoxilano **(Tanner Loewus 1981)**. Las hemicelulosas se encuentran asociadas con la celulosa mediante fuertes interacciones polisacárido – polisacárido. El contenido de poliosas varía radialmente en la madera

aumentando hacia el centro y variado en su composición de azúcares **(Fengel 1984)**. El tipo y contenido de hemicelulosas presentes en la madera varía con la especie, la edad, parte del árbol, y en muchas especies su regularidad está relacionada con criterios taxonómicos.

Las hemicelulosas de las coníferas no son las mismas que las de las latifolias, siendo las de las coníferas más complejas. Diferencias existen también entre las hemicelulosas del tronco, de las ramas, de las raíces y de la corteza del propio árbol, así como diferencias en cuanto a contenido y composición entre la madera de compresión, tensión y normal.

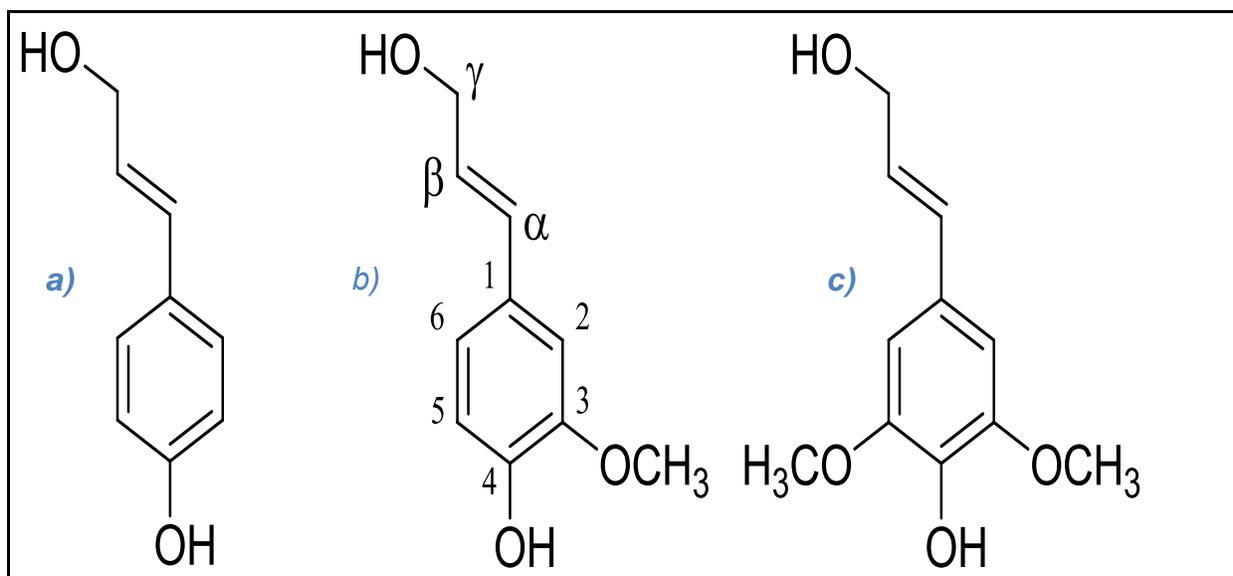
En las maderas de fibra corta o latifolias, sólo pueden separarse dos tipos de hemicelulosa en cantidades significativas y por extracción alcalina directamente de la madera, ellas son los xilanos y los arabinogalactanos **(Sjöström 1981)**. En las latifolias puede encontrarse el O-acetil- 4-O- metilglucuronoxilano que son las más abundantes, cantidades de glucomananos, entre 1-3% de arabinogalactano, y aparecen glucanos entre 0-3% con enlaces  $\beta$  1-3 **(Guardiola y Amparo 1995)**.

Las hemicelulosas son importantes en la madera y su localización cobra singular significación, pues todas las células contienen de 50-60% de carbohidratos a excepción de las células del parénquima de las latifolias que pueden llegar a poseer hasta 80% de O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano. Se conoce que las hemicelulosas se encuentran a lo largo de toda la pared celular, desde la lámina media, hasta la capa S3 de la pared secundaria. Las hemicelulosas presentes en estas paredes son:  $\beta$  (1-3),  $\beta$  (1-4) glucanos, calosa  $\beta$  (1-3), que normalmente se encuentran en pequeñas cantidades y se acumulan como respuesta a una lesión o durante la deformación de las placas cribosas en el floema **(Guardiola y Amparo 1995); (Fueller 1996)**.

La función de las hemicelulosas en la madera parece ser de intermediario entre la celulosa y la lignina, tal vez facilitando la incrustación de las microfibrillas. Probablemente no exista enlace químico alguno entre las hemicelulosas y la celulosa, mas suficiente adhesión mutua que es fortalecida por los puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals (**Fueller 1996**). Las hemicelulosas son importantes en la fabricación de pulpa ya que aumenta su rendimiento y aumentan la resistencia del papel. Algunas, como los arabinogalactanos después de separados pueden constituir un subproducto de la fabricación de celulosa, y ser utilizadas como tensoactivo en la industria de tintas (**Guardiola y Amparo 1995**), (**Kottes y Reinhardt 1996**).

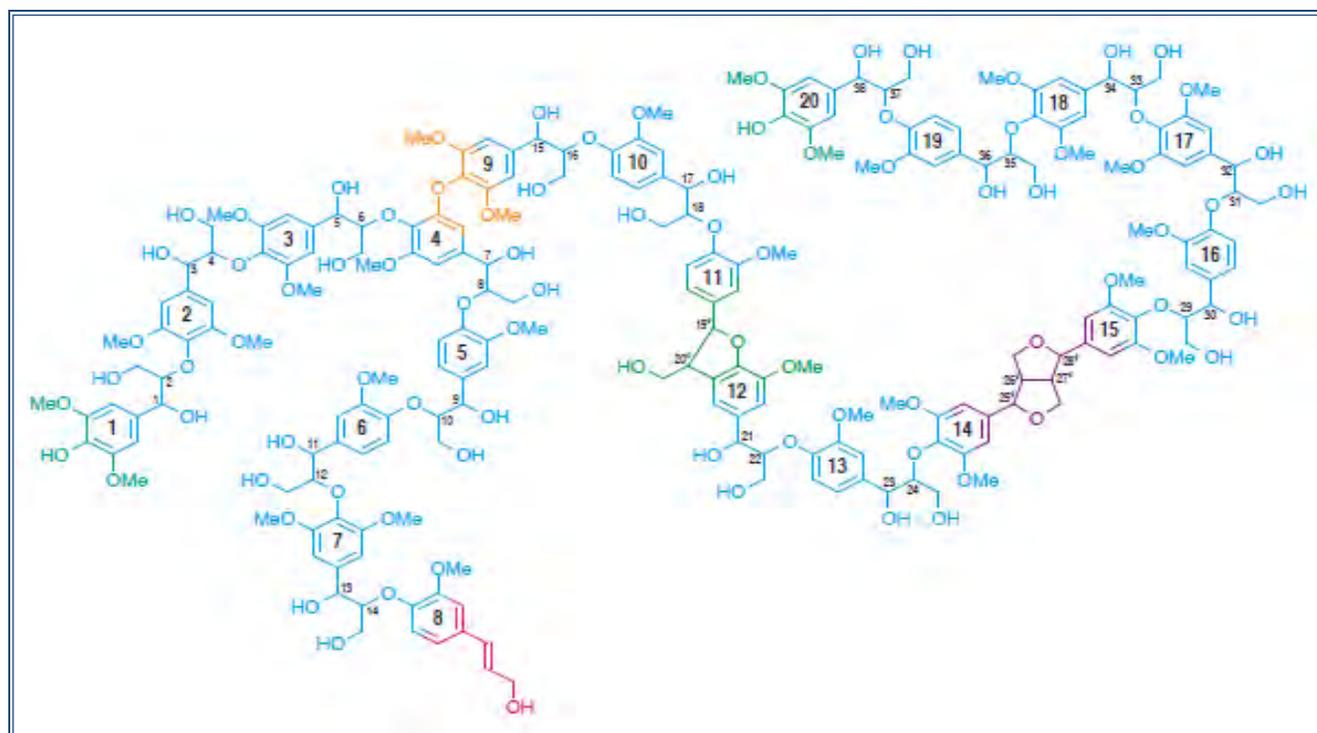
### 1.2.3 Lignina

La lignina después de la celulosa es el mayor componente de la madera y la forma más abundante de material aromático en la biosfera. La madera y otros tejidos vasculares contienen alrededor del 20-30% de lignina (**Lin y Dence 1992**). La mayor parte de la lignina se encuentra dentro de las paredes celulares, entremezcladas con las hemicelulosas y formando una matriz que rodea las microfibrillas de celulosa . Este compuesto provee de rigidez a las plantas superiores ya que actúa como pegamento entre las fibras de celulosa formando la lámina media (**Kirk y Farrell, 1987**). Este biopolímero contiene alrededor de 10-20% de grupos hidroxilo fenólicos que le confieren rigidez a la pared celular de las plantas y además las protege del ataque de organismos patógenos (**Lin y Dence 1992**). Biosintéticamente, la lignina proviene de tres alcoholes precursores (**Figura 3**): el alcohol p-hidroxicinámico o cumarol , el alcohol 4-hidroxi-3-metoxicinámico o coniferol y el alcohol 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico o sinapol .



**Figura 3.** Precursores de la lignina.

El monómero que sintetiza la planta para la conformación de la lignina es el coniferol (**b**). A medida que por procesos bioquímicos se va formando el resto de la molécula estos monómeros se modifican, agregando un grupo metoxilo en la posición 5, formando el alcohol sinapol (**c**), o por eliminación del grupo metoxilo del coniferol de la posición 3, dando el alcohol *p* – hidroxibencílico o cumarol (**a**). La proporción de los tres monómeros varía dependiendo del lugar de la planta y por especies. Sin embargo, la diferencia principal está entre coníferas, latifoliadas.



**Figura 4.** Modelo experimental lignina, obtenido por RMN.  
(Ralph y col 2001)

La copolimerización por radicales libres de estos alcoholes, iniciada por peroxidasas vegetales, da lugar al polímero de lignina (**Kirk y Farrell 1987**) Químicamente este polímero es heterogéneo, amorfo, ópticamente inactivo y altamente ramificado (**Fritsche y Hofrichter 1999**), donde no existe ninguna unidad repetida, las ligninas se clasifican en ligninas de coníferas y lignina de madera de latifolias (**Carballo 1990**). En el 2001 Ralph y colaboradores obtienen estructura parcial de lignina mediante análisis de resonancia Magnética Nuclear (**Figura 4**).

La lignina posee propiedades aglutinantes que conforman la consistencia fibrosa de las maderas (revistiendo las células del xilema), donde realizan la función mecánica de sostén. Su composición depende de muchos factores, entre ellos, el método utilizado para aislarla, la especie que se estudie, la edad, parte del árbol, condiciones ambientales en que se ha desarrollado el árbol, etc. (**Browning 1967; Carballo 1989**).

Esta sustancia amorfa es localizada como componente de la lámina media y también en la pared secundaria. Durante el desarrollo de la célula, la lignina es incorporada como último componente de la pared celular interpenetrando las fibrillas y fortaleciendo la pared celular (**Fengel 1984**). Las características estructurales de este heteropolímero vegetal imponen ciertas restricciones para su biodegradación. Definiendo a una molécula de lignina con un peso molecular de entre 600-1000 kDa, es evidente que su tamaño le impide poder ser degradada intracelularmente (**Kirk y Farrell 1987**). Además, por el tipo de enlaces covalentes que presenta (aril-éter, aril-aril y carbono-carbono) y su heterogeneidad, no puede ser degradado por mecanismos típicos de hidrólisis (**Fengel y Wegener 1984**). Por lo tanto, cualquier enzima o grupo de enzimas capaces de atacar inicialmente la lignina, deben ser además de extracelulares, no hidrolíticas y bastante inespecíficas (**Kirk y Farrell 1987**).

#### **1.2.4 Componentes extraíbles de la madera.**

Existen numerosos compuestos que pueden tener gran influencia en las propiedades y calidad de la madera, aunque ellos contribuyan sólo en algún porcentaje en la masa total de la madera. A este grupo de compuestos se les denomina comúnmente sustancias extraíbles de la madera. Los componentes químicos aquí presentes son de diferentes clases y pueden ser divididos a su vez, y de forma más simple en componentes orgánicos y componentes inorgánicos, siendo estos últimos en los que se puede encontrar ciertos iones metálicos que son esenciales para el normal desarrollo del árbol. Entre los compuestos orgánicos se pueden encontrar hidrocarburos alifáticos y aromáticos, alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, ácidos alifáticos, ceras, glicéridos, y compuestos nitrogenados (**Fengel 1984**).

#### **1.2.5 Componentes inorgánicos de la madera.**

Los componentes inorgánicos o sustancias minerales, varían en el árbol en dependencia de la parte que se estudie: altos contenidos pueden encontrarse en las hojas, ramas, corteza, raíces, por lo que es común encontrar diferencias entre las maderas de latifolias y las de coníferas; diferencias existen entre la madera joven y la tardía. Las condiciones del suelo y la edad influyen en los contenidos de sustancias minerales, según plantea **Carballo 1990**.

### **1.3 Biodegradación de la madera**

Los microorganismos más importantes que deterioran la madera forman parte de un grupo primitivo de microorganismos: los hongos, los cuales tienen la capacidad de secretar enzimas especializadas a través de estructuras conocidas como hifas, las cuales degradan la materia orgánica, modificándola químicamente para así ser utilizadas como fuente de carbono y alimento. Antes de que el hongo pueda colonizar la madera, requiere de cuatro condiciones:

- Suministro de oxígeno.
- Temperatura adecuada.
- Suministro de humedad.
- Sustrato como fuente de alimento.

La eliminación de algunos de estos requerimientos puede prevenir el ataque (**Smulski 1997**). El deterioro de la madera por efectos de los hongos, está referido a una cantidad de términos que incluyen: pudrición marrón, pudrición blanca, pudrición blanda.

### **Pudrición marrón:**

Es producida por hongos basidiomicetos, éstos son los más abundantes en las coníferas, pero pueden ser encontrados en otros tipos de ambientes tales como varios suelos. Estos hongos pueden atacar madera sin tratar y madera preservada, pero tiene preferencias por maderas que no han sido tratadas. Uno de los hechos característicos del ataque de la pudrición marrón es que la celulosa es rápidamente despolimerizada, aún en las etapas más tempranas de la pudrición y así la pérdida de la resistencia puede ser muy grande (**Singh y Kim, 1997**).

Durante la pudrición los carbohidratos son extensivamente despolimerizados y removidos. Además, la lignina también puede ser modificada, aunque residuos de la lignina permanecen. La degradación de la madera aparece marrón debido a la gran presencia de lignina (**Singh y Kim, 1997**).

### **Pudrición blanca:**

Los hongos que producen este tipo de pudrición también pertenecen a los basidiomicetos. Son particularmente activos en los ecosistemas forestales produciendo una extensiva pudrición en los árboles caídos dentro del bosque. Las especies latifoliadas son más susceptibles que las coníferas y las maderas no tratadas son más fácilmente atacadas que las maderas preservadas.

Los hongos de pudrición blanca pueden degradar todos los componentes de la pared celular, incluyendo la lignina y algunas especies están especializadas en la degradación primaria de la lignina con una amplia falta de ataque a la celulosa. Además, pueden originar

posteriormente la oxidación de los azúcares formados. Estos hongos causan "blanqueamiento de la madera". La formación de canales de erosión dentro de la pared celular es el hecho morfológico característico de este tipo de ataque (**Singh y Kim, 1997**).

### **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 lo son (madera preservada, elevados contenidos de humedad).

El ataque en 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 a las fibras: en la sección longitudinal estas cavidades se observan orientadas paralelas a las microfibrillas de la celulosa; en las latifoliadas se observa como erosión de la pared celular (**Singh y Kim, 1997**).

### **1.4 *Trametes versicolor***

Hongo que desarrolla cuerpos fructíferos o setas (basidiomas) con sombreros de 3 a 6 cm, delgados de borde ondulado, carece de pie, crecen de forma imbricada (sobrepujados unos de otros). La cara superior es aterciopelada, satinada y presenta anillos concéntricos de varios colores, del pardo al blanco y del marrón al ocre. Las esporas son cilíndricas ligeramente curvas de 5.5-7x2 micras. Posee un sabor agridulce y olor agradable, crece sobre madera muerta generalmente de árboles caducifolios. Este hongo tiene la capacidad de degradar lignina por lo que es un hongo ligninolítico.



**Figura 5.** *Trametes versicolor*

## 1.5 Hongos ligninolíticos

Los hongos ligninolíticos han desarrollado un sistema enzimático único y no específico que funciona en el ambiente extracelular. El mecanismo del sistema degradador de lignina está basado en la producción de radicales libres. Este mecanismo permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos **(Tien y Kirk 1984)**.

## 1.6 Enzimas ligninolíticas de los hongos.

A partir de los estudios realizados con hongos ligninolíticos en los años setenta, se comprobó que la degradación de la lignina daba lugar a productos que provenían de la ruptura oxidativa de anillos aromáticos. Por lo que se pensó que las oxigenasas extracelulares podían estar involucradas en la transformación de la lignina **(Kirk y Chang 1975)**. Algunos años después, tres grupos reportaron de manera independiente, el descubrimiento de una ligninasa capaz de oxidar y despolimerizar la lignina y compuestos modelo **(Glenn y col 1983)**, **(Shimada, y Higuchi 1983)** y cuya actividad enzimática depende del peróxido de hidrógeno teniendo pesos moleculares entre 41-42 kDa además se encontró que contenía un grupo prostético hemo**(Tien y Kirk 1983)**. Estudios espectroscópicos mostraron que esta ligninasa era distinta de las oxigenasas P450, compartía algunas características con las hemoproteínas transportadoras de oxígeno y que era en realidad una peroxidasa **(Kirk y Farrell 1987)**. A esta enzima se le denomina ahora como lignino peroxidasa (LiP).

A partir de este hallazgo, se encontró la producción de dos hemoperoxidasas más: la manganeso peroxidasa (MnP) que oxida el  $MnP^{2+}$  a la especie oxidante  $MnP^{3+}$  **(Glenn y Gold 1985)**, mientras que recientemente en los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera* se ha descrito una MnP versátil (VP). Esta enzima conjuga las propiedades catalíticas de LiP y MnP **(Heinfling y col 1998)**; **(Mester y Field 1998)**.

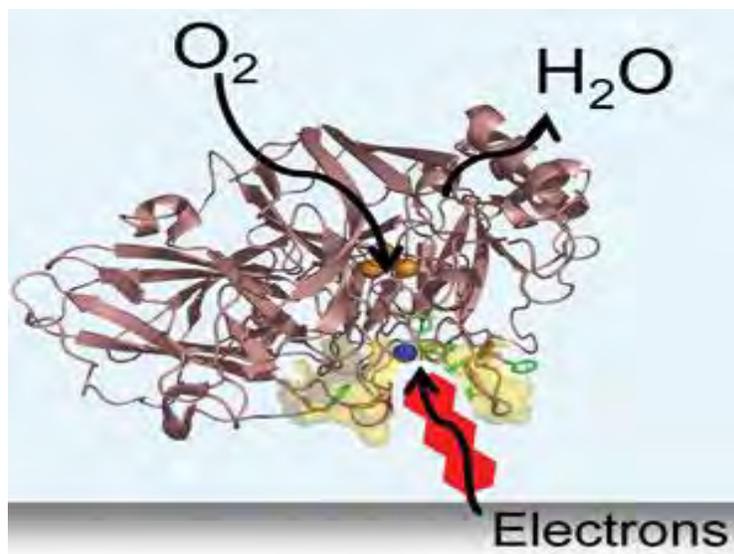
Además de estas peroxidases, se detectó la producción en hongos ligninolíticos de una cuarta enzima, una fenol oxidasa denominada lacasa. Esta enzima reduce el oxígeno molecular a agua, y a través la utilización de ciertos compuestos redox puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina (**Bourbonnais y Paice 1990**).

Estas enzimas ligninolíticas pueden actuar separadas o en cooperación, dependiendo de si el hongo es capaz de producir una o más. Además de estos sistemas enzimáticos, se ha considerado que la participación de compuestos de bajo peso molecular es también esencial en la degradación de la lignina. Esto se postula debido a que la lignina en su estado natural es inaccesible para enzimas tales como la LiP y MnP. Por lo que nos enfocaremos a la enzima Lacasa, por tener amplio espectro de degradación.

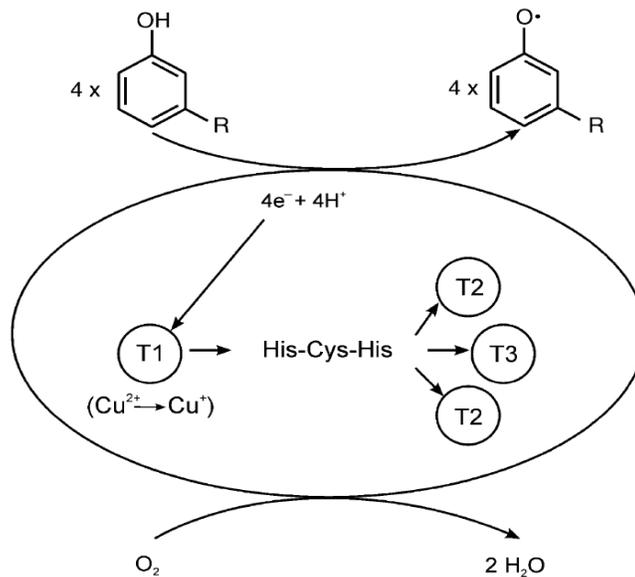
## 1.7 Enzima Lacasa

El hongo *Trametes versicolor* posee una de las enzimas más efectivas para degradar lignina, la enzima Lacasa (**Figura 6**). Esta enzima es una fenol oxidasa que debe su nombre al origen de su descubrimiento, hace más de un siglo, en el árbol japonés de la laca: *Rhus vernicifera* (**Yoshida.1883**). Se encuentra ampliamente distribuida en plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias (**Gianfreda y Bollag 1999**), siendo los hongos ligninolíticos los mejores productores de dicha enzima (**Leonowicz y col. 2001**). Las lacasas son glicoproteínas extracelulares (**Reinhamar 1984**) con pesos moleculares entre 60 y 80 kDa, y del 15 al 20% de su peso molecular está dado por carbohidratos (**Shah y Nerud 2002**). Además son capaces de catalizar la reducción del oxígeno a agua, sustrayendo 4 electrones y análogamente oxidar una variedad de sustratos.

Contiene cuatro tipos de cobre, uno llamado —azi” o tipo I ( $T_1$ ), que absorbe a 600nm y un acoplamiento con un cobre tipo II ( $T_2$ ) o cobre —normal”, indetectable por absorción óptica y un par tipo III ( $T_3$ ) o acoplamiento —atiferomagnético” que tiene una banda de absorción a 330 nm, acoplados binuclearmente a través de un puente hidróxido (**Santagostin y col 2004**). Este enzima se encuentra constituida por tres dominios (**Figura 7**). El cobre  $T_1$  mononuclear, se encuentra localizado en el dominio 3 quelado por dos histidinas y una cisteína. Los otros tres cobres están acoplados trinuclearmente junto con 8 residuos de histidina pertenecientes a los dominios 2 y 3. Comúnmente en las estructuras cristalográficas el cobre  $T_2$  se encuentra ligado a dos histidinas y una molécula de al agua o grupo dioxígeno, en cambio el sitio binuclear cobre  $T_3$  contiene 3 histidinas ligadas al cada cobre. Un promedio de las estructuras cristalográficas para la lacasa muestra que los cobres (cobre II y cobre III) del acoplamiento trinuclear se encuentran liigados entre si con una distancia de aproximadamente 4 Å y que el cobre I se encuentra a 13 Å del sitio trinucleado (**Solomon y col 1996**).



**Figura 6.** Estructura de Lacasa  
(Blanford y col 2007)



**Figura 7.** Ciclo catalítico de la enzima lacasa: Oxidación monoelectrónica de una molécula de sustrato (fenoles, aminas aromáticas ó alifáticas) al radical reactivo correspondiente. La base catalítica de la enzima está formada por el agrupamiento de cuatro átomos de cobre.

## 1.8 Modelado molecular

El Modelado molecular es un término general que engloba métodos teóricos y técnicas computacionales para modelar o imitar el comportamiento de moléculas. Las técnicas son utilizadas en los campos de la Química computacional, Biología computacional y Ciencia de materiales, para el estudio de sistemas moleculares que abarcan desde pequeños sistemas químicos a grandes moléculas biológicas y disposiciones materiales. Los cálculos más simples pueden ser realizados a mano, pero inevitablemente se requieren computadoras para realizar el modelado molecular de cualquier sistema medianamente complicado. La característica particular de las técnicas de modelado es la descripción a nivel atómico de los sistemas moleculares; el menor nivel de información es por átomos individuales (o un pequeño grupo de átomos) (Leach 2001).

Los métodos de modelado molecular son usados rutinariamente en la actualidad para investigar la estructura, dinámica y termodinámica de sistemas inorgánicos, biológicos y poliméricos. Los tipos de actividad biológica que han sido investigados usando modelado molecular incluyen plegamiento proteico, catálisis de enzimas, estabilidad de proteínas, cambios conformacionales asociados con la función biomolecular, y reconocimiento molecular de proteínas, ADN, y complejos de membranas (**Frenkel y Smith 1996**).

La Mecánica molecular es una parte del modelado molecular, ya que implica el uso de mecánica clásica/mecánica newtoniana para describir las bases físicas tras los modelos. Los modelos moleculares describen normalmente átomos (núcleos y electrones en conjunto) como cargas puntuales con una masa asociada. Las interacciones entre los átomos vecinos son descritas por interacciones tipo oscilador armónico, "resortes", que (representando enlaces químicos) y Fuerzas de van der Waals. El Potencial de Lennard-Jones es mayormente usado para describir las Fuerzas de van der Waals. Las interacciones electrostáticas son calculadas por la Ley de Coulomb. A los átomos se les asignan coordenadas en el espacio cartesiano o en Coordenadas internas, y también se les pueden asignar velocidades al realizar simulaciones dinámicas. Las velocidades atómicas están relacionadas a la temperatura del sistema, una cantidad macroscópica. La expresión matemática completa se conoce como una Función potencial y está relacionada a la energía interna del sistema ( $U$  - Entropía), una cantidad termodinámica igual a la suma de las energías potencial y cinética. Los métodos que minimizan la energía potencial, son conocidos como técnicas de disminución energética (como, steepest descent y Gradiente conjugado), mientras que los métodos que recrean el comportamiento del sistema con el correr del tiempo son conocidos como Dinámica molecular.

$$E = E_{bonds} + E_{angle} + E_{dihedral} + E_{non - bonded}$$

$$E_{non-bonded} = E_{electrostatic} + E_{vanderWaals}$$

Esta función, llamada Función potencial, calcula la energía potencial molecular como una suma de cantidades de energía que describen la desviación del largo de los enlaces, los ángulos de enlace y los ángulos de torsión fuera de los valores de equilibrio, más cantidades para los pares de átomos no enlazados, ayudando a describir las interacciones de van der Waals y las electrostáticas. El conjunto de parámetros que incluye las distancias de enlace equilibradas, los ángulos de enlace, valores de carga parciales, constantes de fuerza y parámetros de van der Waals; son conocidos de manera conjunta como un campo de fuerza. Distintas aplicaciones de la mecánica molecular usa expresiones matemáticas que difieren ligeramente y, por ende, distintas constantes para la Función potencial. Los campos de fuerza de uso corriente en la actualidad han sido desarrollados usando cálculos cuánticos de alto nivel y/o ajustándose a los valores experimentales. La técnica conocida como Disminución Energética es usada para encontrar posiciones de "gradiente cero" para todos los átomos; en otras palabras, un mínimo local de energía. Estados de menor energía son más estables y son comunmente investigados por su función en los procesos químicos y biológicos. Una simulación de Dinámica molecular, por otro lado, calcula el comportamiento de un sistema en función del tiempo. Esto implica resolver las leyes de Newton de movimiento, principalmente la segunda ley,  $F = ma$ . La Integración de las leyes de Newton del movimiento, usando diferentes algoritmos de integración, conduce las trayectorias atómicas en el espacio y el tiempo. La fuerza de un átomo es definida como el gradiente negativo de la función potencial de energía (**Rapaport 2004**).

## **II ANTECEDENTES**

### **II.1 Género *Dalbergia***

La madera de especies del género *Dalbergia* ha mantenido una considerable atención, debido a su distinguida belleza y excelentes propiedades físicas, mecánicas y acústicas, por lo que tiene gran demanda en el mercado nacional e internacional.

De las aproximadamente 100 especies de árboles y arbustos del género *Dalbergia* (**Mabberley 1987**), aproximadamente 15 están entre las maderas comerciales más valiosas, entre ellas el palo de rosa del Brasil (*Dalbergia nigra*), palo de Rosa de la India (*Dalbergia latifolia*), el palo negro de Africa (*D. melanoxylon*), el cocobolo de América Central y del sur de México (*Dalbergia retusa* Hemsl, *Dalbergia granadillo* P., *Dalbergia hipoleuca* P. y *Dalbergia leneata* P.) y el palo de rosa de Honduras (*Dalbergia stevensonni* Standl).

En China *Dalbergia odorifera* es utilizada en medicina tradicional como antiinflamatorio y anticoagulante (**Cheng y col 1998**). Se ha reportado que algunas especies de *Dalbergia* poseen alta durabilidad natural ya que presentan actividad antimicrobiana (**Barragán y col 1994**) y antifúngica, como es el caso de *D. granadillo* (**Rutiaga y col 1995**). Esta resistencia se encuentra generalmente atribuida a la presencia de sustancias químicas activas que le proporcionan una actividad antifúngica o fungistática (**Deon 1983**).

## **II.2 Actividad biológica de algunas especies del género *Dalbergia*.**

El género *Dalbergia*, además de su valor comercial por la elaboración de diferentes artículos, ha llamado mucho la atención por su gran resistencia a plagas y microorganismos, además de su aplicación de los extractivos de algunas especies en medicina tradicional.

Los extractivos del género *Dalbergia* representan una alternativa al uso de productos químicos sintéticos, tales como pesticidas, antimicrobianos, antioxidantes, colorantes, antiinflamatorios, antialérgicos anticoagulantes, entre otros.

En *Dalbergia granadillo* se ha encontrado actividad antifúngica contra *Trametes versicolor*, *Coniophora puteana*, *Chaetomium globosum* y *Trichoderma viridae* (**Rutiaga y col 1995**).

Se reporta actividad antimicrobiana para *D. granadillo*, *D. congestiflora* (**Barragan y col 1998**), *D. palo escrito* y para *D. candenatensis* (**Hamburguer 1989**).

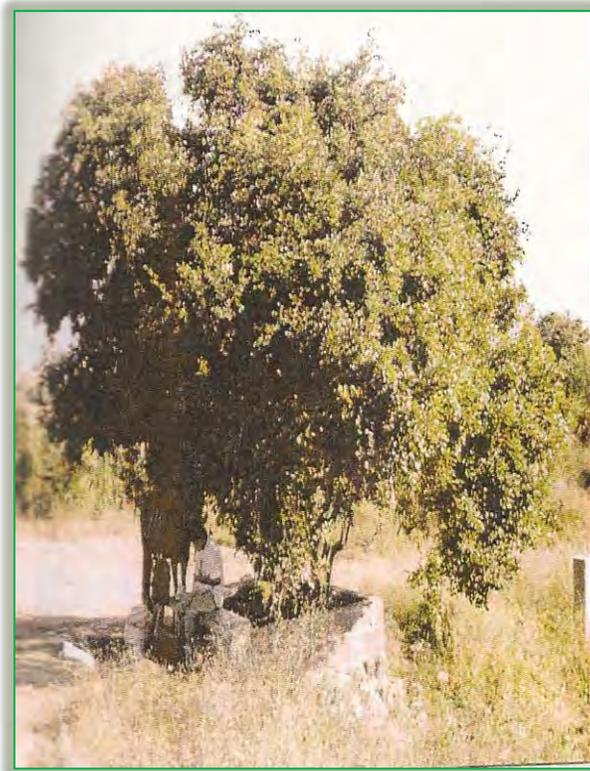
Estudios realizados con *Dalbergia melanoxylon* mostraron actividad antimicrobiana con los extractos acuoso y etanólico mientras que con el extracto obtenido con diclorometano tuvo efecto antifungico (**Gundidza y Naza 1993**).

*Dalbergia monetaria* presentó actividad antiúlcerogénica gástrica sin producir daños tóxicos, los autores sugirieron que los compuestos fenólicos presentes en esta especie fueron responsables de inhibir la enzima descarboxilasa histidina (**Souza 1997**).

El extracto alcohólico de las hojas de *Dalbergia sisso* presentó actividad analgésica y antipirética (**Hajare 2000**) así como una alta actividad nematocida (**Khurram 1997**) además se observó que el aceite de dicha madera presenta actividad larvicida y repelente contra mosquitos vectores de la malaria (**Ansari 2000**)

### II.3 *Dalbergia congestiflora* Pittier.

*Dalbergia congestiflora* Pittier es un árbol endémico de México que pertenece a la familia Leguminosae y a la subfamilia Papilionoideae, se le conoce con los nombres de campinceran, capincherán, granadillo y camotillo, se distribuye en la selva baja caducifolia de los estados de Michoacán, Jalisco, Guerrero y Morelos (**McVaugh 1987**). Por su belleza y excelentes propiedades físicas de esta madera es muy apreciada por los artesanos de Michoacán quienes la utilizan para la elaboración de artículos torneados e instrumentos musicales principalmente guitarras. La aplicación que se le ha dado a esta madera a demás de la fabricación de artesanías es la obtención de un colorante para la obtención de una tinta azul (**Barrangan y col 1994**)



**Figura 8.**Foto tomada por Abel García en Pareo Michoacán.

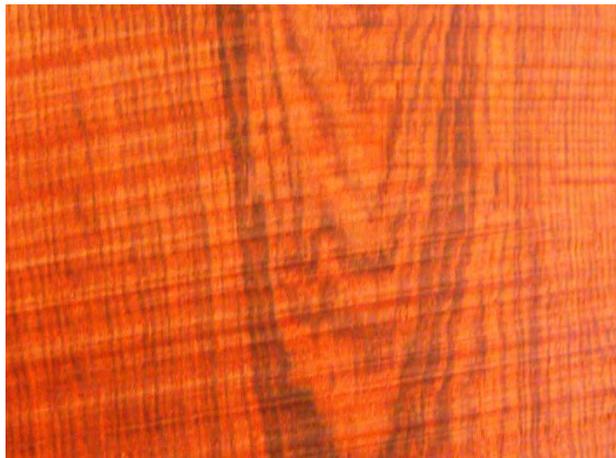
#### **II.4 Anatomía de *D. congestiflora* P.**

Es una madera excepcionalmente pesada, con marca diferencia de color entre la albura crema y el duramen violeta con vetas en diferentes tonalidades, algunas casi negra. No tiene olor ni sabor característico; textura muy fina, con veteado pronunciado; hilo entrecruzado y brillo medio. Presenta una densidad entre 0.94 a 1.23 g/cm<sup>3</sup>, el color de sus extractivos es violeta intenso y éstos representan aproximadamente el 30% en peso seco de la madera.

**(Richter y col 1996)**



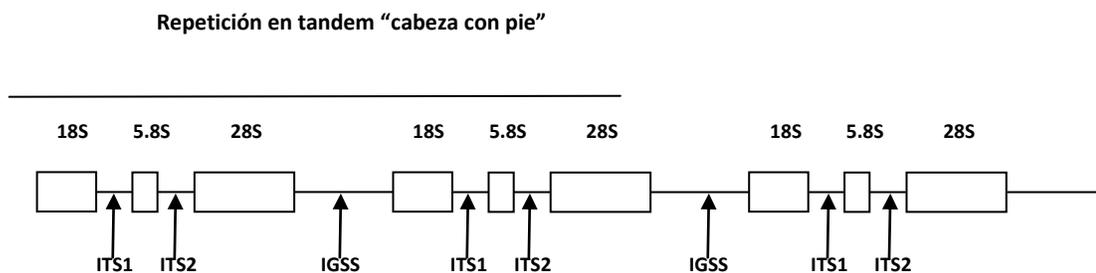
**Figura 9.** Duramen de la madera *D. congestiflora*, originaria de Michoacán México.



**Figura 10.** Corte transversal del duramen *D. congestiflora*, con veteado característico.

## II.5 Unidad Ribosomal de hongos, aplicaciones al estudio de hongos filamentosos.

En los hongos, como en otros grupos de eucariotes, las secuencias génicas (DNAr) que codifican para los diferentes RNA ribosomales (RNAr) se encuentran agrupadas en una misma región del genoma de un tamaño de 8-12 kb (**Vilgalys 2007**). Esta unidad básica, denominada Unidad Ribosomal (UR), puede encontrarse como una familia de genes que puede incluir hasta 100 copias de secuencias altamente similares, en un arreglo denominado —cabeza con cola” o —cabeza con pie” (**Figura 9**). La estructura característica de una UR fúngica consta de los genes 18S, 5.8S y 28S de RNAr separados por regiones interespaciadoras ITS, no codificadoras y entre cada UR se encuentra otra región no codificadora denominada espaciador intergénico (IGS, por sus siglas en inglés) (**Vilgalys 2007**). En algunos grupos de hongos (principalmente Basidiomycetes y algunas levaduras Ascomycetes) el gen 5.8S puede encontrarse presente dentro de la UR, aunque la posición y la dirección de la transcripción de este gen varían entre los diferentes grupos de hongos. Debido al hecho de combinar genes esenciales conservados con secuencias no codificadoras variables, la UR se ha convertido en una herramienta muy útil en estudios taxonómicos y filogenéticos de los eucariotes en general y del Reino Fungi en particular.



**Figura 11.** Estructura de la unidad ribosomal en hongos.

En la actualidad existe una amplia batería de oligonucleótidos que permiten la amplificación específica mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) de cada una de las regiones que componen la UR de los diferentes grupos de los hongos **(White y col, 1990; Borneman y Hartin, 2000; Vilgalys, 2007)**. Esto facilita considerablemente la secuenciación de cualquier región de interés dentro de la UR. Las características de tamaño y tasa de variación de cada región de la UR determinan las posibilidades de aplicación entre los distintos niveles taxonómicos. Así, mientras que las regiones codificadoras (28S y 18S, principalmente) son empleadas para los estudios filogenéticos y taxonómicos en un amplio rango de categorías taxonómicas, desde phylum hasta especie, las regiones no codificadoras (incluyendo muchas veces al gen 5.8S) se han empleado en rangos taxonómicos más estrechos, para la resolución de relaciones entre especies de un mismo género o entre aislados de una misma especie. Por ejemplo, el gen 18S ha sido utilizado como herramienta en estudios filogenéticos de los grandes grupos del reino Fungi **(Bowman y col. 1992; Tehler y col. 2000)**. Dentro de los grupos que contienen especies relacionadas con la degradación de la madera, la subunidad grande 28S ha sido empleada para estudios filogenéticos de agaricales **(Moncalvo y col., 2000; Moncalvo y col. 2002)**. La región ITS1-5.8S-ITS2 ha sido empleada para estudiar los patrones de especiación del género *Pleurotus* **(Vilgalys y Sun 1994)** y resolver afinidades entre especies cercanas **(Zervakis y col., 2004)**.

Otros grupos de hongos lignícolas en los que se ha empleado la región ITS para el estudio de relaciones filogenéticas y taxonómicas es el Basidiomycete *Ganoderma lucidum* y el género de hongos Ascomycetes *Xylaria* **(Lee y col. 2000)**.

Además de su utilidad taxonómica y filogenética, la UR se ha constituido en una región genética de gran importancia para estudios ecológicos. En la actualidad es posible amplificar mediante PCR distintas regiones de la UR para identificar hongos en muestras ambientales **(Borneman y Hartin 2000; Van Elsas y col., 2000; Jumpponen y Johnson 2005)**. En particular, el aislamiento de ADN de muestras ambientales y la amplificación mediante PCR ha posibilitado el estudio ecológico-molecular de los hongos degradadores de madera. Así, mediante iniciadores dirigidos a la región ITS1-5.8S-ITS2 se han podido describir las especies de Basidiomycetes y Ascomycetes asociados al proceso de degradación de madera, sin necesidad del aislamiento del micelio en cultivo puro **(Jasalavich y col. 2000; Adair y col. 2002; Allmér y col. 2006)**.

Los estudios taxonómicos y filogenéticos que utilizan regiones de ADN de la UR de los hongos permiten seleccionar nuevas cepas con potencial para la degradación de lignina basándose en las afinidades taxonómicas con cepas ya caracterizadas, asumiendo que aquellas especies taxonómica y filogenéticamente relacionadas poseen capacidades bioquímicas y fisiológicas semejantes, de lo cual existe evidencia para cierto grupo de hongos lignocelulolíticos **(Hibbet y Donoghue 2001)**. De hecho, la utilización de la región ITS ha permitido identificar el micelio de cepas ligninolíticas aisladas a partir de sustratos naturales **(Klonowska y col. 2003; Kamei y col. 2005)**, incrementando la posibilidad de aislar cepas con alto potencial biotecnológico en áreas naturales.

## **II.6 Usos de la enzima Lacasa**

Las enzimas Lacasas son ampliamente utilizadas actualmente en el campo biotecnológico ya que estas enzimas oxidan sustratos orgánicos como polifenoles, fenoles metoxisustituídos y

diaminas (**Solomon y col 1996**) En la actualidad se estudia a la lacasa con gran intensidad por sus numerosas aplicaciones en la industria textil para blanquear el color índigo de la mezclilla o en las plantas tratadoras de efluentes para la decoloración del mismo. También se utiliza la lacasa para remover compuestos fenólicos en el pulpeo del papel, en la remoción de polifenoles que causan la llamada neblina de los jugos o bebidas, así como en la remoción de compuestos irritantes para industria de cosméticos. Una las potenciales aplicaciones de la lacasa es la biorremediación de suelos, eliminando los contaminantes sólidos, hidrocarburos aromáticos y clorofenoles. Seguida de la generación de biocombustibles como el bioetanol mediante la degradación de gabazo de caña, fécula de maíz o yuca. Y aunque la enzima lacasa es una enzima cardinal y prometedora gracias a su variedad de aplicaciones industriales no es completamente estable en aplicaciones que conlleven temperaturas altas en su proceso (**Gottfried y Lew 2002**).

## **II.6 Biopreservantes de maderas basados en extractos naturales**

En la actualidad, el alto consumo de madera y sus productos derivados hacen que este material sea valioso, hecho significativo para el campo de la preservación de estos productos, pues deben ser tratados cuidadosamente para prolongar su periodo de servicio o vida útil. La durabilidad natural de la madera puede ser efectivamente incrementada por la protección química. Sin embargo, los químicos contaminan el ambiente y perjudican al ser humano, por esto, y hasta donde sea posible, el uso de fungicidas e insecticidas químicos debiera ser minimizado y debiera buscarse otras formas de protección de la madera (**Weissenfeld 1988**). De acuerdo con esto, la preservación química de la madera podría ser minimizada y aplicada solamente cuando sea necesario (**Willeitner 1991**).

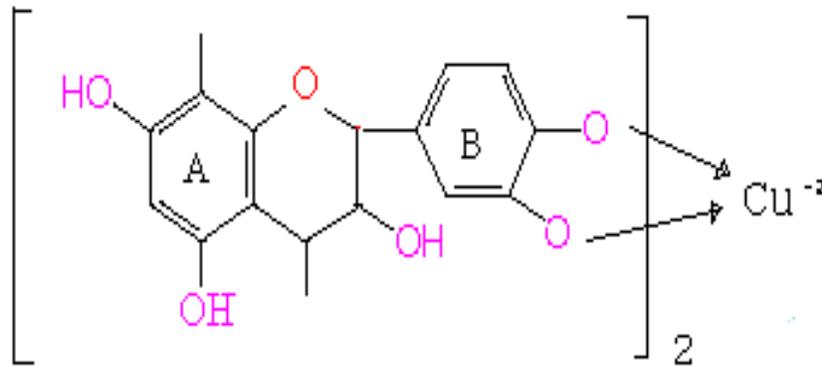
Esto es muy pertinente, fundamentalmente cuando restricciones ambientales recientes limitan el uso de una gran cantidad de biocidas para la preservación de la madera y cuando los estándares son más exigentes, cambiando dramáticamente el espacio donde actúa la preservación de la madera, fenómeno más notorio en los países desarrollados. En estos países surgen otros problemas relacionados: el incremento de los problemas de deposición de la madera tratada y que se encuentra fuera de servicio, como en el desarrollo de nuevos métodos, ambientalmente más amigables para el control de hongos e insectos xilófagos, sin contar con el periodo de "re- educación" para asimilar y asumir estos cambios.

Este enfoque ecológico implica el desarrollo de la llamada "protección natural" con preservantes menos dañinos al ambiente y al ser humano y que sean selectivos solamente a organismos que destruyan la madera. Estos preservantes deberán ser biológicamente degradables (**Barnes 1992**).

Así, los preservantes de madera basados en flavonoides y extractos fenólicos, fundamentalmente taninos, han despertado interés y están siendo desarrollados (**Lakes y Mc Kaig 1988; Dirol 1994; Pizzi y Baecker 1996**), debido a su habilidad de formar quelatos insolubles con varios iones metálicos, incluyendo cobre (**McDonald y col. 1996**). Este tipo de preservantes son muy ventajosos por generar un bajo impacto ambiental tanto en su preparación como durante su aplicación, además, por la posibilidad de brindar una gran seguridad a los usuarios y finalmente por los potenciales beneficios sociales y económicos de estos productos como sustitutos de los derivados del petróleo (**González y Pizzi 1996**).

Los compuestos tanino-metal se basan en la afinidad de un metal por los grupos oxidrilo en el anillo - B del flavonoide, El metal utilizado frecuentemente como biocida ha sido cobre (**Pizzi y col. 1998**). Existen investigaciones donde este metal ha sido reemplazado por Zinc.

Los compuestos así formados son influidos por la naturaleza del tanino, la concentración tanto de estos compuestos, como del cobre, así como la precipitación de este metal (**Mila y col 1995**). Por todo esto, se hace necesario optimizar los parámetros de fijación del cobre y el zinc para lograr su insolubilización en la madera, lo que garantizará el empleo de estos compuestos como preservantes de la madera (**McDonald y col. 1996**).



**Figura 12.** Preservantes de madera basado en compuestos tanino-metal.

También las propiedades insecticidas de los extractos han sido probados, en este caso contra termitas subterráneas, los que han resultado bastante efectivos; sin embargo, se debe pensar en diversificar los métodos de control a las formas de tóxicos, repelentes, atrayentes, baños tóxicos, tratamientos en las barreras de suelo y tratamiento tópicos de la madera (**Hutchins 1997**)

### III JUSTIFICACIÓN

La madera como material estructural ha permanecido en uso desde tiempos antiguos por su versatilidad, resistencia y trabajabilidad. Pero también tiene una importante desventaja al ser un material natural susceptible al ataque de agentes dañinos que la degradan, por lo que necesita de sustancias externas que incrementen su protección (**Groenier 2006**).

La durabilidad natural de la madera puede ser efectivamente incrementada por la protección química (**Hickin 1971**). Sin embargo, las sustancias aplicadas contaminan el ambiente y perjudican al ser humano, por esto, y hasta donde sea posible, el uso de fungicidas e insecticidas químicos debiera ser minimizado y debiera buscarse otras formas de protección de la madera (**Weissenfeld 1998**). Con las restricciones ambientales actuales se limita el uso de una gran cantidad de fungicidas para la preservación de la madera.

Una alternativa para el control de plagas y patógenos indeseables, son los metabolitos secundarios vegetales producidos por las plantas en su ciclo de vida para su supervivencia. Particularmente aquellos metabolitos extraídos de árboles y plantas utilizadas en la medicina tradicional de los pueblos contra algunas infecciones de humanos o de árboles con una probada durabilidad natural al deterioro (**Heal y col. 1991**). Este enfoque ecológico implica el desarrollo de la llamada "protección natural" con preservantes menos dañinos al ambiente y al ser humano y que sean selectivos solamente a organismos que destruyan la madera.

En la actualidad, el alto consumo de madera y sus productos derivados hacen que este material sea valioso por lo que requiere de su preservación para prolongar su periodo de servicio o vida útil (**Vignote y Jimenez 2000**).

Actualmente el diseño químico de compuestos que promuevan alguna actividad biológica, requiere la comprensión a nivel molecular del vínculo estructura-actividad (**Mahan y Myers 1990**). La química farmacéutica ha sido la pionera y modelo a seguir en este ámbito, apoyándose cada vez más en metodologías de modelado y simulación molecular (**Avendaño 1993**). Esta herramienta de estudio nos permite elucidar las interacciones moleculares disminuyendo así tiempo y costos en la investigación.

En la región de Michoacán se tiene un gran potencial para estudio de biocidas, debido a su gran diversidad de especies. Las especies potenciales útiles, son aquellas que presentan una alta durabilidad natural, dada la elevada presencia de compuestos químicos.

Por lo que la búsqueda de los principios activos de maderas de alta durabilidad con efecto biocida es nuestro objeto de estudio, con la posibilidad de diseñar en un futuro cercano preservantes para la madera de origen natural que sean eco amigables sin causar daño al ser humano. Para lograr tal objetivo haremos estudios químicos de los extractos, evaluación de actividad biológica de los extractos, identificación de principios activos y finalmente simulación computacional de las interacciones moleculares de las sustancias activas con las macromoléculas de los organismos que atacan a la madera.

## **IV OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar y caracterizar la actividad antifúngica provenientes de diferentes extractos del duramen del árbol *Dalbergia congestiflora* P., proveniente del estado de Michoacán frente al hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor*.

### **Objetivos específicos**

- ✓ Caracterizar al hongo *Trametes versicolor* por medio de huella genética.
- ✓ Obtener extractos del duramen de la madera *Dalbergia congestiflora* P. con solventes de polaridad creciente: hexano, éter etílico, acetato de etilo y acetona.
- ✓ Evaluar la actividad antifúngica de los extractos obtenidos frente al hongo *Trametes versicolor*.
- ✓ Determinar la actividad enzimática del hongo tanto basal como en presencia de los extractos que presenten actividad antifúngica.
- ✓ Elucidar estructuralmente al componente con actividad antifúngica mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas.
- ✓ Evaluar la interacción del componente antifúngico identificado, mediante un estudio de acoplamiento molecular (docking) ante la presencia de modelos tridimensionales de la enzima Lacasa del hongo *Trametes versicolor*

## **V MATERIALES Y MÉTODOS**

### **V. 1 Material biológico**

La muestra del árbol fue proporcionada e identificada por el laboratorio de Anatomía de la Madera perteneciente a la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera; las muestras de duramen fueron astilladas, molidas y tamizadas en malla 40.

### **V.2 Determinación del contenido de humedad.**

El contenido de humedad de la madera se determinó por el método de secado en estufa calculando la relación entre el peso seco y el peso húmedo:

$$\text{CH} = ((\text{Ph} - \text{Ps}) / \text{Ph}) \times 100$$

Donde: CH = Humedad de la madera expresada como un porcentaje de su peso seco.  
Ph = Peso de la madera en estado húmedo o peso inicial.  
Ps= Peso anhidro

### **V.3 Obtención de extractos.**

Las muestras de duramen fueron astilladas, molidas y tamizadas en malla 40. Para el proceso de extracción se empaquetaron 20 g de harina de madera y se sometió a extracción continua de 6 horas por solvente en equipo Soxhlet, empleando como solventes de polaridad creciente hexano, éter etílico, acetato de etilo y acetona.

Los extractos recuperados se concentraron hasta obtener una sustancia viscosa, se dejaron a temperatura ambiente hasta la evaporación de los respectivos solventes y se calculó porcentaje de rendimiento.

#### **V.4 Obtención del extracto hexánico.**

En el proceso de extracción con el solvente hexano se observó la formación de cristales en las paredes del matraz, los cuales se apartaron y se lavaron con diclorometano para eliminar las mieles del extracto, posteriormente los cristales se colocaron dentro de una estufa por 24 horas para evaporar el exceso de solvente, posteriormente dichos cristales se sometieron a análisis químico.

#### **V.5 Determinación del contenido de lignina.**

El contenido de lignina se determinó de acuerdo a la técnica Runkel y Wilke (1951).

Se utilizaron 2 gramos de harina de madera libre de extraíbles (\*), se colocó la harina en un vaso de precipitado y se vertió 50 ml de ácido sulfúrico al 72% y 5ml de ácido bromhídrico al 40%. Se dejó reposar por 2 horas agitando eventualmente. Al término del tiempo se agregó 200 ml de agua destilada y se dejó hervir por 5 minutos. Finalmente se filtró en embudo Buchner y se lavó repetidas ocasiones con agua destilada caliente hasta eliminar el ácido. Se colocó la muestra dentro de una estufa a una temperatura de 103°C hasta obtener peso constante para determinar el peso de la lignina.

Para determinar el peso de lignina obtenida se requiere determinar el peso seco de la harina utilizada. El peso seco se determinó con la siguiente formula.

$$\text{Peso seco} = Ph \left(1 - \frac{\%H}{100}\right)$$

Donde : Ph es el peso húmedo de la harina.  
%H es el porcentaje de humedad.

El porcentaje de lignina obtenida se determinó de la siguiente forma:

$$\%Lignina = \frac{\text{Peso lignina} \times 100}{\text{Peso seco}}$$

El proceso se realizó por duplicado, se calculó el promedio de los valores.

## **V.6 Determinación del contenido de holocelulosa.**

El contenido de holocelulosa se determinó mediante el método Wise (1946).

Se colocaron 2 gramos de harina de madera libre de extraíbles (\*) en un matraz Erlenmeyer, adicionando una solución de clorito de sodio y ácido acético (se preparó una solución con 64 ml de H<sub>2</sub>O y 4 gotas de ácido acético concentrado, posteriormente se añadió 0.6 g de clorito de sodio) dejando la reacción a baño de agua a 75°C con el matraz tapado. Añadiendo la misma solución cada hora por un periodo de 4 horas. La muestra se filtró con filtro de fondo poroso y se lavó con agua destilada fría y acetona. Finalmente se colocó dentro de una estufa a 40°C hasta obtener peso constante.

El porcentaje de holocelulosa se determinó de igual forma que con la lignina.

(\*) Se utilizó la harina de madera del proceso de extracción la cual queda libre de extraíbles al final del proceso de extracción continua.

## **V.7 Análisis genético del hongo.**

### **V.7.1 Obtención de ADN**

La obtención de ADN se realizó a partir de micelio vegetativo proveniente de cepas inoculadas en medio PDA. El micelio se cosecha utilizando una espátula estéril y se lleva a un mortero, se congela con nitrógeno líquido y se macera hasta obtener un polvo fino. La muestra pulverizada se transfiere a un microtubo de 1.5 ml y se le agregan 500 µl de regulador de lisis que contiene Tris HCl pH 8.0 100 mM, EDTA pH 8.0 100 mM, NaCl 20 mM, y SDS al 2 %. Después se agita en vortex por 5 min, se incuba a 60 °C por 30 min, se añaden 500 µl de fenol pH 8.0 y se agita en vortex por 5 min. La emulsión se centrifuga a 10 000 rpm durante 10 min en microcentrífuga (Eppendorf 5415D), se recupera la fase acuosa transfiriéndola a un microtubo de 1.5 ml estéril, se añade un volumen de fenol cloroformo y se agita en vortex un par de minutos, nuevamente se centrifuga a 10 000 rpm durante 10 min en

microcentrífuga (Eppendorf 5415D) y se extrae la fase acuosa transfiriéndola a otro tubo de 1.5 ml estéril. El ARN se elimina por digestión enzimática con RNAsa 10 mg/ml; se agregan 2  $\mu$ l de RNAsa a la fase acuosa con ADN y se incuba por 30 min a 37 °C. Una vez terminado el tiempo de incubación, el ADN se precipita añadiendo el mismo volumen de isopropanol frío, se agita suavemente y se incuba a -20 °C por 1 h o toda la noche. La muestra se centrifuga a 10 000 rpm durante 10 min y se elimina el sobrenadante por decantación, la pastilla se lava con 250  $\mu$ l de etanol al 70 %, se descarta el etanol, y para eliminar el exceso del mismo se seca a temperatura ambiente por 15 min. Para finalizar, se resuspende la pastilla en 25  $\mu$ l de agua destilada desionizada estéril. Para conocer la calidad del ADN obtenido se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (concentración final de 1  $\mu$ g/mL), en regulador TAE (solución de trabajo: Tris 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético glacial 1.2  $\mu$ L/mL, pH de 8.0) a 100 V (**Sambrook y Russel, 2001**). El ADN obtenido se almacenará a -20 °C para un uso posterior.

### **V.7.2 Reacciones de amplificación por PCR y RT-PCR**

Las reacciones de amplificación de las muestras de ADN del tejido fúngico se realizan en un volumen total de 25  $\mu$ l. Para todas las regiones genéticas amplificadas la composición de la mezcla de amplificación es la misma: Regulador para PCR 10 x, agua desionizada estéril (11.5  $\mu$ l), 1.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM de cada uno de los deoxinucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 200 mM de cada primer (Cu1F/CuR Luis et al., 2004) y 2.0 U de enzima *Taq* polimerasa. Para las reacciones de amplificación se utilizan 30 ng de ADN. Las condiciones de amplificación son las mismas para todas las regiones genéticas: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 3 min; 35 ciclos a 95 °C durante 1 min, 50 °C 30 s y 72 °C durante 2 min; y una extensión final a 72 °C durante 4 min. La reacción de amplificación se realiza en un Palm-Cycler™ Gradient thermal cycling (R Corbett life science,

USA). Los productos de amplificación obtenidos se analizan en geles de agarosa al 2 % (concentración final de 2 µg/mL) (**Sambrook y Rusell, 2001**). Los productos de amplificación se secuenciaron en los laboratorios MACROGEN, en EUA.

## **V.8 Ensayo antifúngico**

Una vez obtenidos los diferentes extractos se añadieron al medio de cultivo (agar dextrosa y papa al 3.9%) a una concentración de 250 y 500 µg/mL, el medio de cultivo mezclado con los diferentes extractos se vertieron a cajas Petri, realizando 3 repeticiones para cada tratamiento. Las cajas Petri se inocularon con micelio de *Trametes versicolor* y se incubaron por 7 días a 28°C. Se determinó el diámetro de crecimiento del hongo al cabo de los 7 días, determinando así el porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo comparándolo con la muestra control (sin micelio). El porcentaje de inhibición se determinó con la siguiente fórmula (**Rutiaga 2001**):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{crecimiento control} - \text{crecimiento tratamiento}}{\text{Crecimiento control}} \times 100$$

### **V.8.1 Concentración mínima de inhibición con cristales.**

Se inocularon cajas Petri con micelio del hongo a diferentes concentraciones de cristal: 200, 150, 100 y 50 µg/mL. Se incubaron por 7 días a 28 °C. Se midió el diámetro de crecimiento y se determinó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la formula anterior.

## **V.9 Ensayos bioquímicos para *Trametes versicolor*.**

### **V.9.1 Cinética de crecimiento.**

#### **V.9.1.1 En condiciones basales**

En placa:

Se inocularon cajas Petri ( medio PDA) colocando en el centro de la caja el inóculo obtenido con sacabocado de 6 mm de diámetro procedente de un cultivo previo en fase logarítmica de crecimiento, se midió cada 24 horas el diámetro del micelio hasta saturar la caja Petri.

En medio líquido:

Se incubaron matraces Erlenmeyer (capacidad de 125 ml) con 25 ml medio líquido PDB (24g/L) inoculados con micelio de *Trametes versicolor* en fase logarítmica, con 3 muestras de 6 mm de diámetro por matraz, a una temperatura de 28°C con agitación constante. El crecimiento se calculó determinando el peso seco de la biomasa cada 24 horas. Para lo cual se filtró el micelio y se dejó en estufa a 50°C hasta obtener peso constante.

#### **V.9.1.2 En presencia de cristales.**

Se adicionaron cristales a los medios de cultivo tanto en medio sólido y medio líquido a una concentración de 250 µg/mL y se determinó el crecimiento de la misma manera que el apartado anterior.

### **V.9.2 Ensayos de actividad enzimática**

#### **V.9.2.1 En condiciones bsales**

Se incubaron matraces con medio líquido PDB (24g/L) inoculados con micelio de *Trametes versicolor* en fase logarítmica, con 3 muestras de 6 mm de diámetro por matraz. A una temperatura de 28°C con agitación constante. Se tomaron alícuotas de 300 µL del medio cada 24 horas para la determinación de actividad.

La determinación de actividad enzimática se realizó de acuerdo a Nagai (2002). Se tomó una alícuota de 300  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo. La mezcla de reacción estará compuesta por 500  $\mu\text{L}$  de buffer Macllvaine pH 4.0 (0.1 M de ácido cítrico, 0.2 M de fosfato de sodio dibásico), 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril, 100  $\mu\text{L}$  de ABTS (2, 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) y 100  $\mu\text{L}$  de la fase acuosa del medio de cultivo centrifugado. Las muestras se incubaron a 30 °C durante 20 min y la reacción se detendrá añadiendo 400  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 5 % (v/v en agua). La formación del radical catiónico se detectará midiendo el incremento en la absorbancia a 420 nm ( $\epsilon_{420} = 36\,000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ). Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS en una reacción de 100  $\mu\text{L}$  a 30 °C en 1 min. El proceso se realizó por triplicado.

### V.9.2.3 En presencia del cristal

Para determinar la actividad enzimática en presencia del cristal, se realizó bajo las mismas condiciones anteriores añadiendo la sustancia cristalina a una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### V.9.3 Cuantificación de proteína extracelular

A los medios de cultivo se les cuantificó la proteína por medio del microensayo de Bradford (**Bradford 1976**). El método de Bradford se basa en la unión no covalente del Azul de Coomassie a las proteínas. El azul de Coomassie es un compuesto que presenta diferentes espectros de absorción según el estado de protonación en el que se encuentra: la forma catiónica es de color rojo-marrón (máximo de absorbancia a 470 nm), la neutra es verde (máximo a 650 nm) y la aniónica es azul (máximo a 595 nm).

La presencia de proteínas favorece el desplazamiento del equilibrio hacia la forma aniónica debido a la interacción de los grupos sulfónicos del Coomassie con los grupos catiónicos y las cadenas laterales de algunos residuos de aminoácidos de las proteínas (principalmente Arg y Lys), produciéndose entonces la coloración azul que puede medirse a  $\lambda = 595 \text{ nm}$ .

La curva de calibración se realizó con diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina, partiendo de una solución Stock de 1mg/ml. Las concentraciones de seroalbúmina fueron las siguientes:

**Tabla 1** Concentraciones de seroalbúmina bovina.

CONCENTRACION FINAL DE PROTEÍNA SEROALBÚMINA BOVINA ( $\mu\text{g /ml}$ )	VOLUMEN DE SOLUCIÓN STOCK DE SEROALBÚMINA BOVINA ( $\mu\text{L}$ )	AGUA DESIONIZADA ( $\mu\text{L}$ )	REACTIVO DE BRADFORD	VOLUMEN FINAL ( $\mu\text{L}$ )
0	0	800	200	1000
2	2	798	200	1000
4	4	796	200	1000
6	6	794	200	1000
8	8	792	200	1000
10	10	790	200	1000

Cada dilución se realizó por triplicado. A cada tubo de las diluciones se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford (Bio-Rad), se homogenizaron con vórtex y se dejaron reposar durante 5 minutos. Después de terminado el tiempo de reposo se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm

Con las absorbancias obtenidas y las concentraciones de seroalbúmina bovina de la curva de calibración se pudo obtener los parámetros de la ecuación de la recta.

$$y = mx + b$$

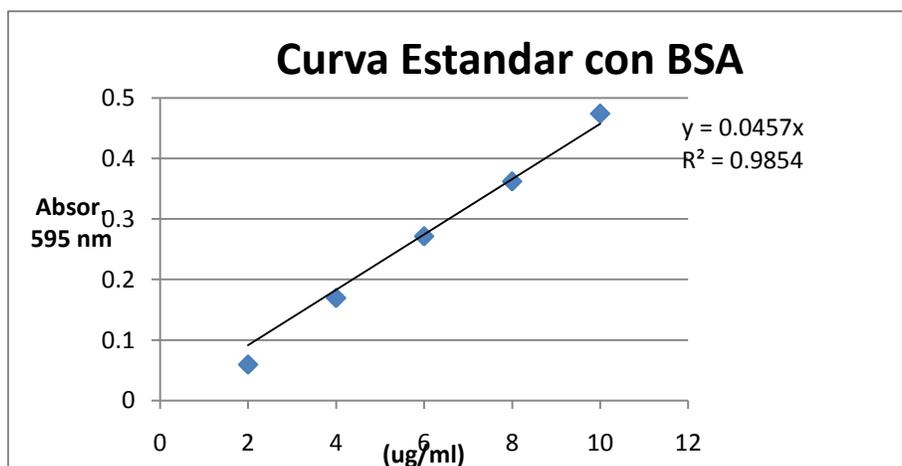
Donde:

$y$  = Absorbancia

$x$  = Concentración de proteína ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )

$b$  = Ordenada al origen

$m$  = Pendiente de la recta.



**Figura 13.** Curva estándar para calcular la concentración de proteína.

### V.10 Separación del extraíble hexánico mediante cromatografía en capa fina.

Se realizó cromatografía en capa fina (placas de aluminio de silica gel 60 F<sub>230</sub> ) para cada uno de los extractos obtenidos, así como con los cristales obtenidos, utilizando las siguientes fases móviles:

<b>Extracto</b>	<b>Fase móvil</b>
Hexánico	Hexano-acetato de etilo (8:2)
Eter etílico	Eter etílico-acetato de etilo (8:2)
Acetato de etilo	Acetato de etilo
Acetona	Acetona-acetato de etilo (8:2)

Las placas cromatográficas se observaron bajo luz ultravioleta para observar las señales.

### V. 11 Caracterización química del cristal.

Para identificar los componentes químicos del cristal se utilizaron las siguientes técnicas:

Espectrometría de Masas para estimar el peso molecular y Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de Protón y Carbono para determinar conectividad entre átomos.

### **V.11.1 Espectroscopia de masas**

Los espectros de masa se realizaron mediante el Espectrómetro de Masas Hewlett Packard (HP 5989 B), utilizando un detector de iones (multiplicador de electrones) y una energía de ionización de 20-30eV.

### **V.11.2 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) fueron analizados con el equipo Varian Mercury Plus 400, a 400 MHz, con un ángulo de pulso de 50°, con un tiempo de retención de 3.6 segundos, la ventana espectral fue de 6000 Hz con 16 repeticiones,. Se utilizó como disolvente cloroformo deuterado.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono (RMN-<sup>13</sup>C) fueron analizados con el equipo Varian Mercury Plus 400 a 100.6 MHz, con un ángulo de pulso de 45°, con un tiempo de retención de 1.19 segundos, ventana espectral de 25000 Hz, con 1040 repeticiones. Se utilizó como disolvente cloroformo deuterado.

El análisis se realizó en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### **V.12 Estructura tridimensional de la enzima lacasa de *Trametes versicolor*.**

La estructura tridimensional de la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* se obtuvo de la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI), con la clave 1GYC .

### **V.13 Modelado molecular**

El modelado molecular es una herramienta que nos ayuda a predecir la interacción de una macromolécula con un ligando, en este estudio se utilizó para analizar la interacción que existe entre la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* con la molécula antifúngica (cristal o sustrato) obtenida en el presente trabajo y poder describir el mecanismo molecular de inhibición de crecimiento del hongo.

El software utilizado fue Autodock 4.2, por ser de licencia libre además de su amplia difusión y aceptación en el campo científico. Dicho software mide la energía libre del sistema (enzima-molécula antifúngica) para una función que está basada en el análisis de regresión lineal, con el campo de fuerza AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement).

Para la visualización se utilizó Autodocktools versión 1.5.4.

Los cálculos de Autodock comprenden tres etapas:

(1) etapa de preparación para el sustrato y la proteína, donde hay información de átomos de hidrógenos polares, los cuales comprenden cargas parciales atómicas y de tipos de átomos, pero también de grados de libertad en los enlaces de torsión.

(2) cálculo en las propiedades atómicas, la cual es una evaluación de energía rápida que se realiza por el cálculo de las afinidades atómicas para cada átomo del sustrato.

(3) el anclaje o acoplamiento molecular, el cual mide la energía libre por métodos de mecánica molecular que utiliza base de datos que se ajustan sobre los resultados experimentales con el fin de simplificar los cálculos.

Autodock utiliza los métodos de la mecánica molecular para evaluar el campo de fuerza electrostático durante las simulaciones moleculares. El campo de fuerza molecular está parametrizado utilizando un gran número de complejos proteína-inhibidor con constantes del equilibrio de interacción conocidas.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VI.1 Análisis genético de *Trametes versicolor*

La razón por la cual se realizó la huella genética del hongo fue el hecho de que la muestra de micelio proporcionada por la Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera no había sido identificado hasta ese momento y con la finalidad de avanzar en el proyecto se decidió realizar análisis del ADN para confirmar su identidad.

El ADN purificado y secuenciado (correspondiente a la unidad ribosomal fúngica) arrojó la siguiente información, como se observa en el electroferograma (**Figura 14**)

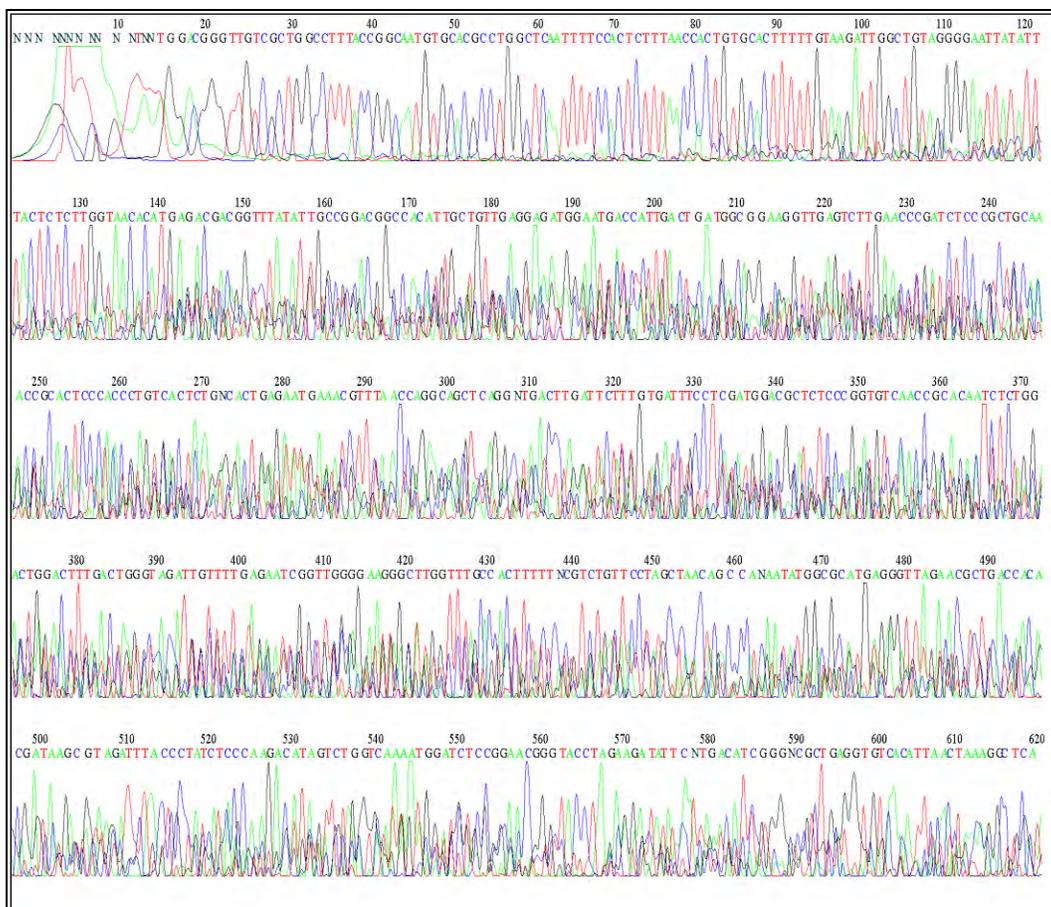


Figura 14. Electroferograma

La secuencia de nucleótidos de aproximadamente 600 pares de bases, fue suficiente para realizar el alineamiento de la secuencia.

```
TTGGACGGGTTGTCGCTGGCCTTTACCGGCAATGTGCACGCCTGGCTCAATTTTCC
ACTCTTTAACCCTGCACTTTTTGTAAGATTGGCTGTAGGGGAATTATATTTACTCT
CTTGGTAACACATGAGACGACGGTTTATATTGCCGGACGGCCACATTGCTGTTGAG
GAGATGGAATGACCATTGACTGATGGCGGAAGGTTGAGTCTTGAACCCGATCTCC
CGCTGCAAACCGCACTCCCACCCTGTCACTCTGNCACTGAGAATGAAACGTTTAAAC
CAGGCAGCTCAGGNTGACTTGATTCTTTGTGATTTCTCGATGGACGCTCTCCCGG
TGTC AACCGCACAATCTCTGGACTGGACTTTGACTGGGTAGATTGTTTTGAGAATC
GGTTGGGGAAGGGCTTGGTTTGCCACTTTTTNCGTCTGTTCTAGCTAACAGCCAN
AATATGGCGCATGAGGGTTAGAACGCTGACCACACGATAAGCGTAGATTTACCCTA
TCTCCAAGACATAGTCTGGTCAAATGGATCTCCGGAACGGGTACCTAGAAGATA
TTCNTGACATCGGGNCGCTGAGGTGTCACATTAATAAGGCTCAATCGACGTCAC
GAGCCTGGCAANTATCACTCGTGACCCTGATTTTAGAAANCAAAC
```

**Figura 15. Secuencia de nucleótidos de la unidad ribosomal fúngica.**

### **VI 1.2 Alineamiento de secuencia de nucleótidos.**

La secuencia de nucleótidos se analizó mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), el cual es un programa informático de alineamiento de secuencias, ya sea de ADN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos. El alineamiento nos da un 95% de identidad de *Trametes versicolor*. Con el dato de identidad se continuó con las pruebas biológicas.

## VI. 2 Contenido de lignina y holocelulosa a partir de la harina de madera.

Lignina	Holocelulosa
30.52%	80.53%

**Tabla 2** Porcentaje de lignina y holocelulosa

En primer lugar se calculó el contenido de humedad de la harina libre de extraíbles, con un contenido del 9.09% para determinar el contenido de lignina y holocelulosa en base seca. El contenido de lignina fue del 30.52% de lignina y un alto contenido de carbohidratos totales del 80.53%.



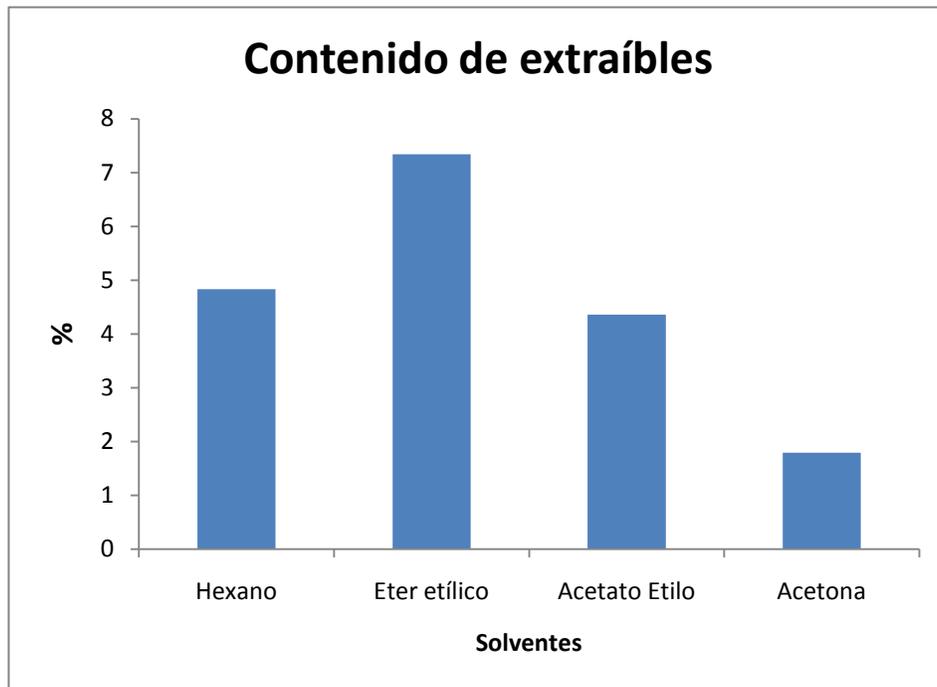
**Figra 16.** Lignina y holocelulosa obtenidas.

Se aprecia el color ocre característico de la lignina y un color amarillento de la holocelulosa, esto se debe al alto contenido de extraíbles en la madera.

## VI.3 Contenido de extraíbles

Se realizó extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente para obtener una separación de extraíbles de acuerdo a su polaridad (Hillis 1971). El contenido total de extraíbles fue del 18.32% (hexano 4.83%, éter etílico 7.34%, acetato de etilo 4.36% y acetona 1.79%) a diferencia de lo reportado por Richter en 1996, con de un valor del 29%.

Siendo el extracto con éter etílico el que produjo la mayor cantidad de extracción (**Figura 17**), por lo que esta madera es rica en sustancias de polaridad media, como pueden ser: aceites, ceras, resinas y esteroides (**Brito 1995**).



**Figura 17. Porcentaje de extraíbles obtenidos con los diferentes solventes.**



**Figura 18. Apariencia de los extractos obtenidos.**

Se aprecia un color amarillento en el extracto hexánico y un color violeta para el resto de las extracciones (**Figura 18**).

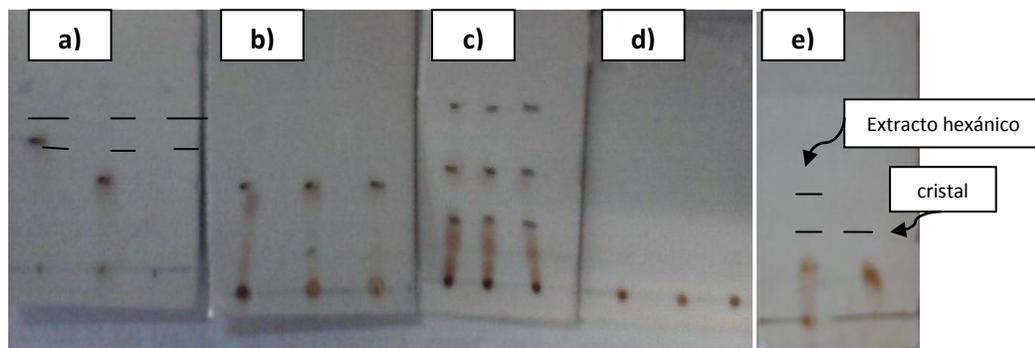
La alta cantidad de sustancias extraíbles presentes en la madera como es en este caso, puede ser una desventaja en los procesos de pulpeo ya que ocasiona amarillamiento en la pulpa (Fengel y Wegener 1984).

### VI.3.1 Cromatografía en capa fina de los diferentes extractos.

La cromatografía es una técnica de análisis químico utilizada para separar sustancias puras de mezclas complejas cuya fase móvil es líquida y la fase estacionaria es un sólido. La fase estacionaria es un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. La constante  $R_f$  (Ratio of Front) es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, mide la retención de un componente y se define como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}}$$

Los extractos obtenidos se analizaron mediante cromatografía en capa fina con la finalidad de darnos idea de la cantidad de componentes presentes en cada muestra.



**Figura 19.** Cromatogramas de los extractos obtenidos.

- a) En el cromatograma del extracto hexánico se aprecian dos señales.
- b) En el cromatograma del extracto con éter etílico se observa un barrido sin apreciarse señales aisladas.
- c) En el cromatograma del extracto con acetato de etilo se observan al menos 3 señales.
- d) En el cromatograma de extracto acetónico no se observan señales.
- e) Se corrió a la par el extracto crudo hexánico (primer carril) y muestra de cristal (segundo carril) para analizar a cuál de las dos señales del extracto hexánico correspondía el cristal.

Como se aprecia en la **Figura 19** hay diferentes señales para cada extracción con los diferentes solventes, observándose la presencia de 2 componentes en el extracto hexánico (a) una cantidad mayor de componentes para los extractos éter etílico (b) y acetato de etilo (c) y ausencia de componentes en el extracto acetónico (d), estos datos coinciden con los rendimientos de cada extracto ya que con los que mayor rendimiento mostraron fueron los extractos con éter etílico y acetato de etilo, esto se debe a que hay mayor cantidad de extraíbles con dichos solventes. La señal del cristal corresponde a la más polar del extracto crudo hexánico con el mismo Rf de 0.2.

#### **VI.4 Extracto hexánico**

En el proceso de extracción con el solvente hexano, se observó la formación de cristales en las paredes del matraz (**Figura 20**), los cuales se aislaron y se lavaron con diclorometano para eliminar las mieles del extracto, posteriormente los cristales se colocaron dentro de una estufa a 55°C para eliminar el solvente. Estos cristales fueron indicio de que se logró extraer una sustancia pura por lo que también fueron sometidos a la prueba de actividad antifúngica

a una concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$ . Se realizaron estudios químicos para los cristales paralelamente a los estudios de actividad biológica.



**Figura 20.** Formación de cristales en extracto hexánico.

Las aguas madres del extracto hexánico se dejaron reposando varios días para la formación de nuevos cristales, lo cual se logró al cabo de 6 días

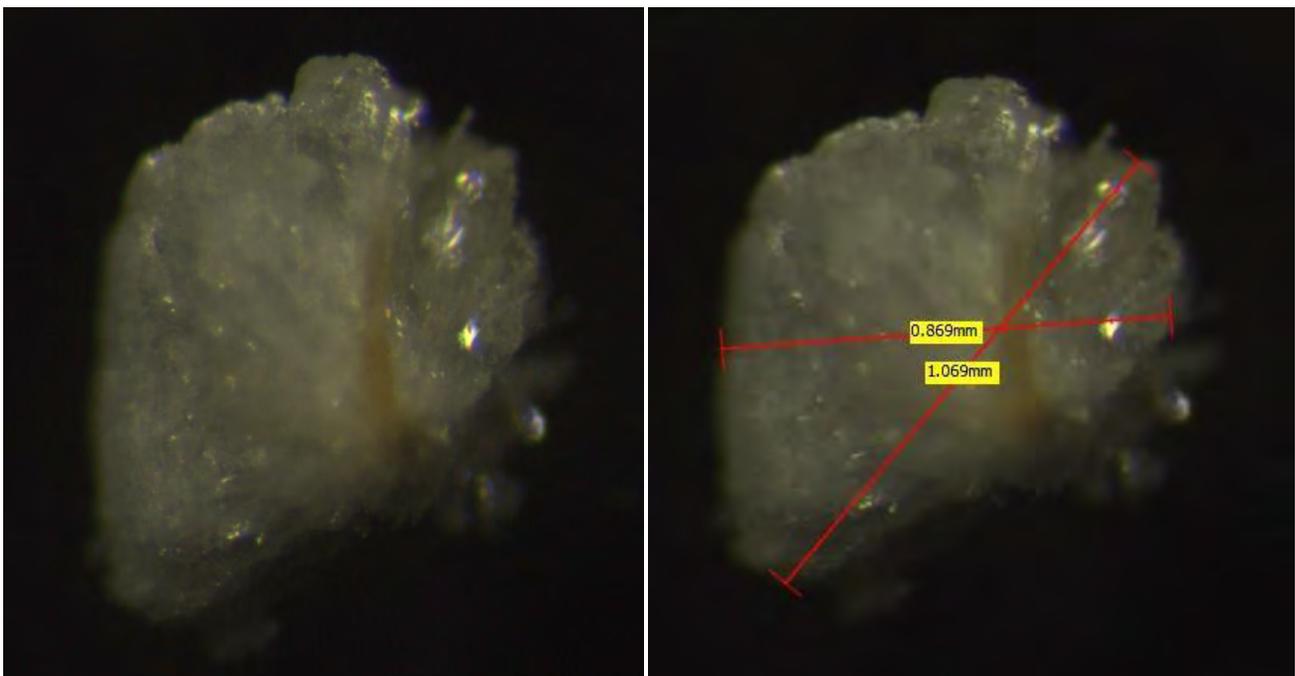


**Figura 21.** Aguas madres de extracto hexánico

#### VI.4.1 Características físicas del cristal:



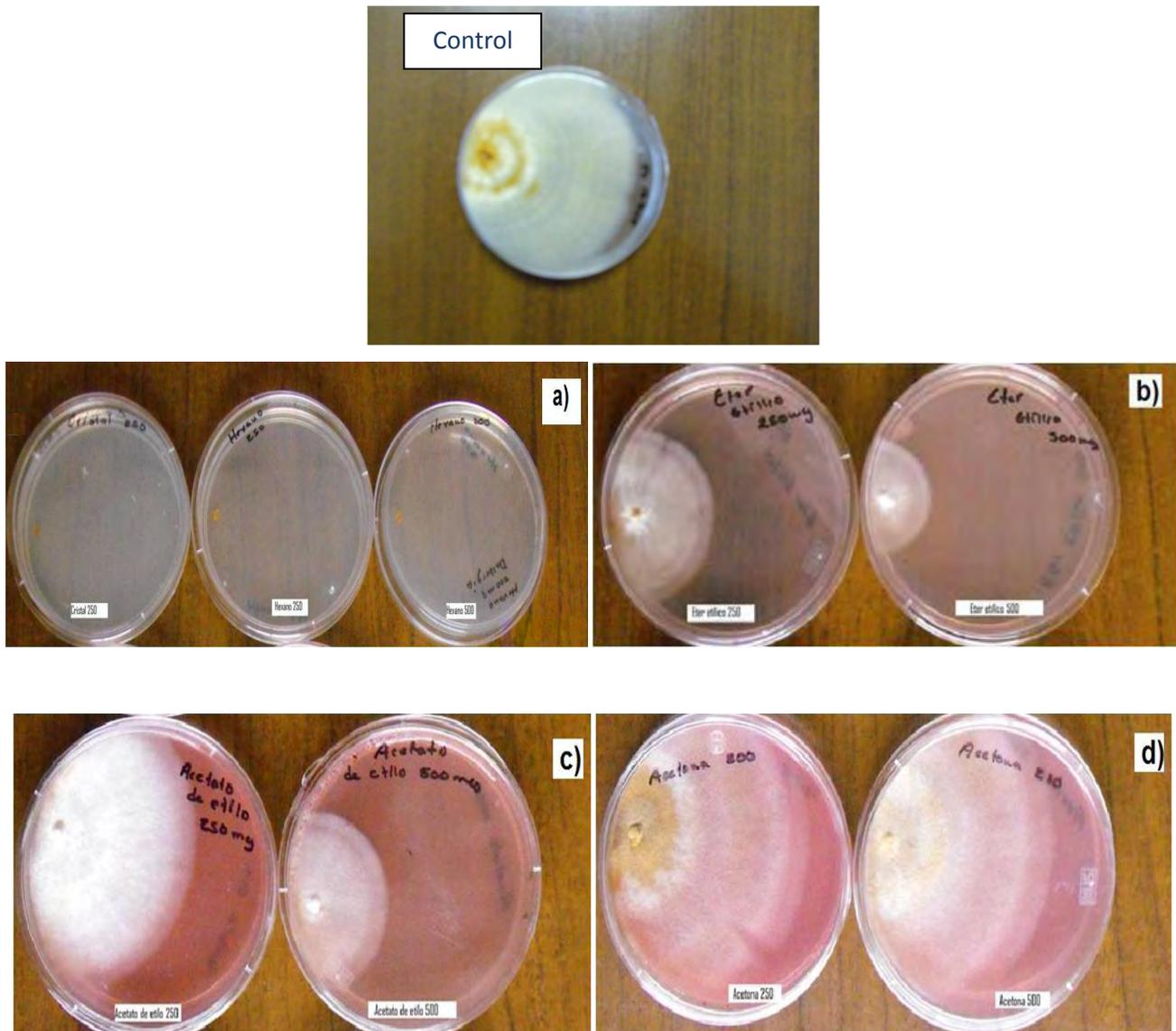
**Figura 22.** Conjunto de cristales



**Figura 23.** Medidas del cristal

Los cristales forman agregados en forma de arroz de color amarillento (**Figura 22**) Para observarlos a detalle se visualizaron bajo microscopio estereoscópico, las medidas promedio de los cristales fueron 0.86 mm de ancho y 1 mm de largo (**Figura 23**). El punto de fusión determinado fue de 72°C.

## VI.5 Actividad antifúngica



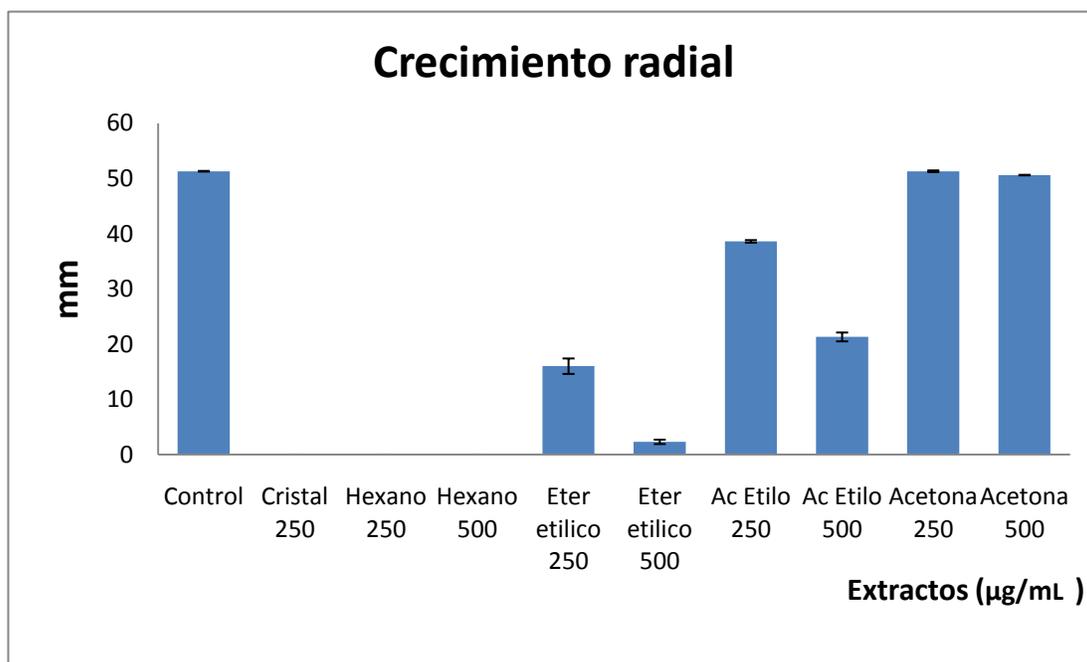
**Figura 24.** Actividad biológica de los diferentes extractos ante el hongo *Trametes versicolor*

- Cultivo con extracto hexánico a la concentración de 250 mg/L y 500 mg/L así como con cristal a 250 mg/L
- Cultivo con extracto éter etílico,
- Cultivo con extracto acetato de etilo,
- Cultivo con extracto acetónico.

(b, c y d a las concentraciones de 250 µg/mL y 500 µg/mL )

Se observaron diferentes niveles de actividad antifúngica de los extractos ante el hongo *Trametes versicolor*. El extracto hexánico a las concentraciones de 250  $\mu\text{g/mL}$  y 500  $\mu\text{g/mL}$ , así como con el cristal aislado a una concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$  mostraron el mayor efecto antifúngico (**Figura 24**), estos resultados son similares a los reportados por **Rutiaga y col. en 1995**, ya que el hongo *Trametes versicolor* fue inhibido al 100% con una fracción de extracto hexánico del duramen de la madera *Dalbergia granadillo*, por lo que sería interesante buscar la actividad antifúngica de otras Dalbergias usando hexano en la extracción.

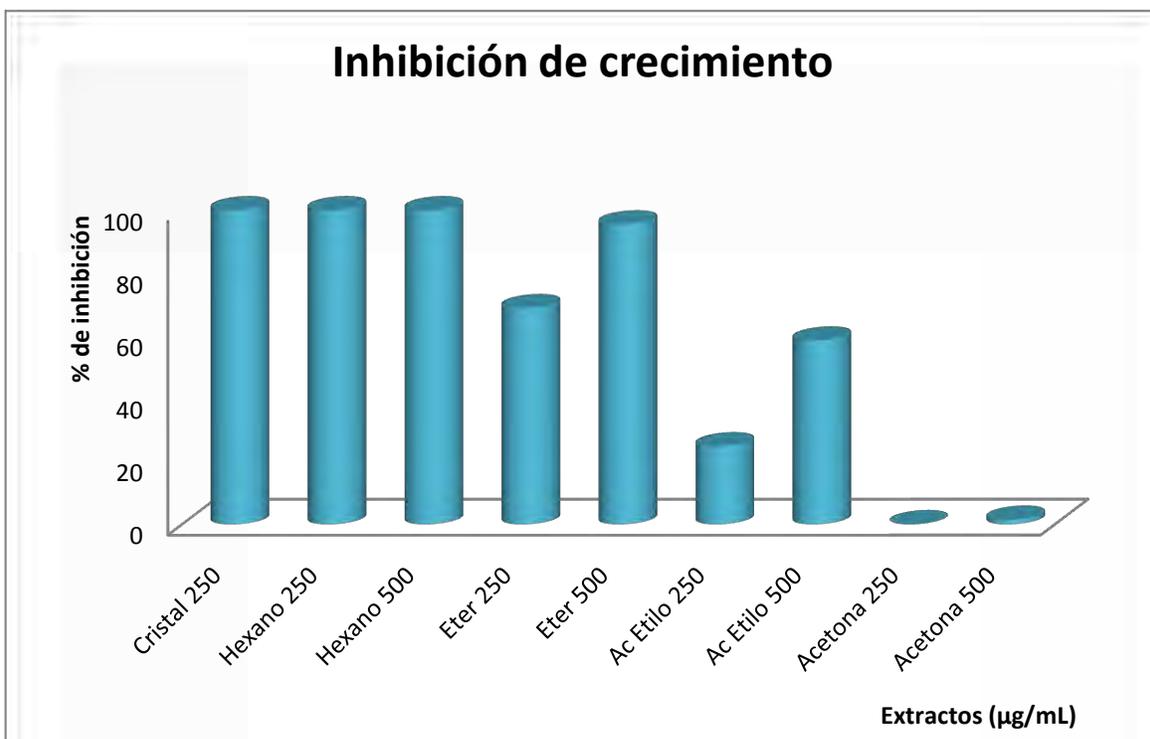
Los medios inoculados con los extractos éter etílico y acetato de etilo mostraron crecimiento, sin embargo éste disminuyó al aumentar la concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$  a 500  $\mu\text{g/mL}$ , en ambas concentraciones existe diferencia significativa de crecimiento con respecto al control, con el extracto acetónico no hubo cambio estadísticamente significativo (**Figura 25**)



**Figura 25.** Crecimiento radial del hongo *Trametes versicolor* en presencia de los diferentes extractos.

## VI.6 Inhibición de crecimiento fúngico.

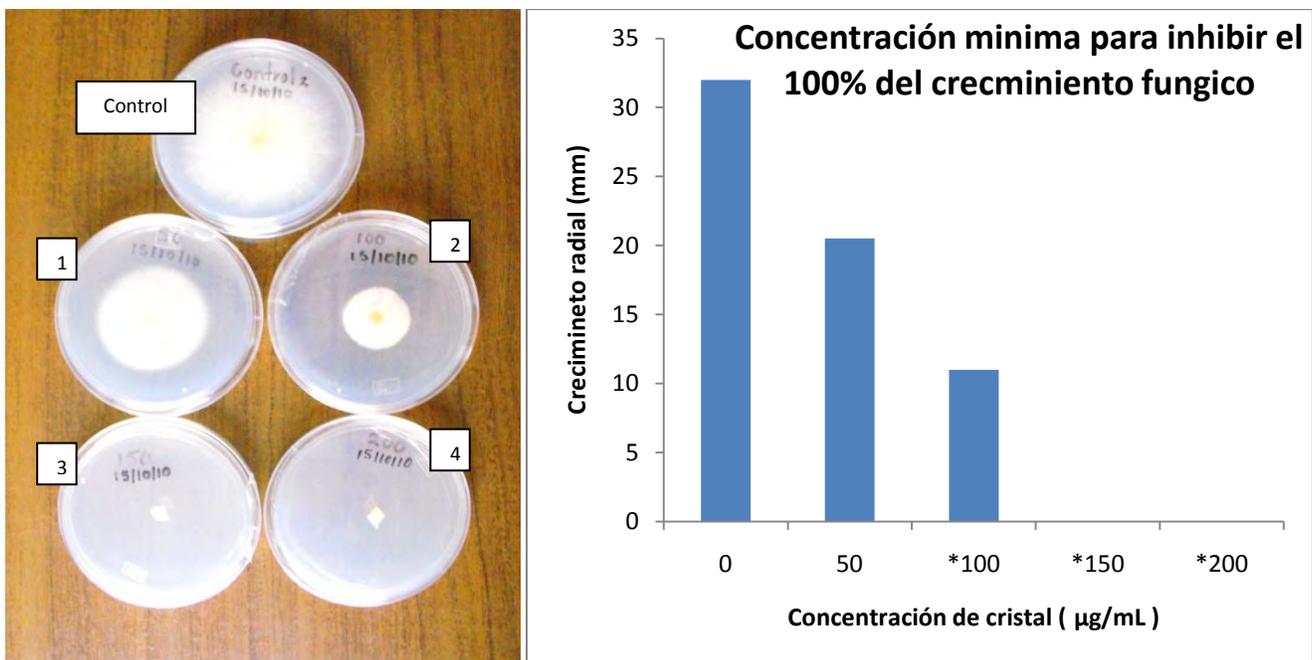
En cuanto al porcentaje de inhibición de crecimiento fungico, el extracto con mayor actividad inhibitoria fue el hexánico y con el cristal aislado , por lo que es posible que el cristal sea la sustancia responsable de la actividad antifungica, la cual podría seguir presente en el extracto con eter etílico asi como con acetato de etilo ya que con estos extractos se sigue observando inhibición de crecimiento del hongo, sin embargo esto no ocurre con el extracto acetónico (Figura 26).



**Figura 26.** Porcentaje de inhibición del hongo *Trametes versicolor*

## VI.7 Concentración mínima de inhibición fúngica en presencia de cristales.

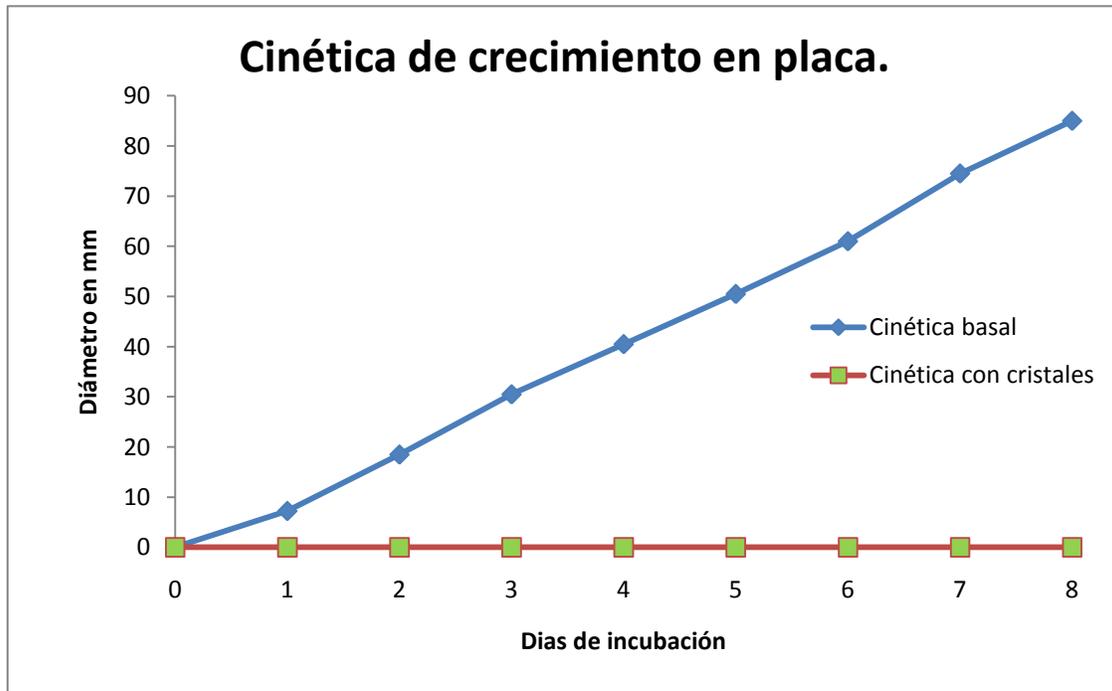
Una vez observada la inhibición del 100% con los cristales a la concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$  se determinó la concentración mínima de inhibición de crecimiento del hongo, partiendo de una concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$  y una mínima de 50  $\mu\text{g/mL}$ . El crecimiento del hongo se ve disminuido tanto a la concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  como a 100  $\mu\text{g/mL}$ , la disminución es estadísticamente significativa a partir de 100  $\mu\text{g/mL}$ , la inhibición del 100% se presentó a partir de 150  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 27**). El ensayo se realizó por triplicado.



**Figura 27.** Concentración mínima de inhibición del 100% del hongo *Trametes versicolor*  
Foto: 1) 50  $\mu\text{g/mL}$ , 2) 100  $\mu\text{g/mL}$ , 3) 150  $\mu\text{g/mL}$ , 4) 200  $\mu\text{g/mL}$

## VI.8 Cinética de crecimiento en placa de *Trametes versicolor*

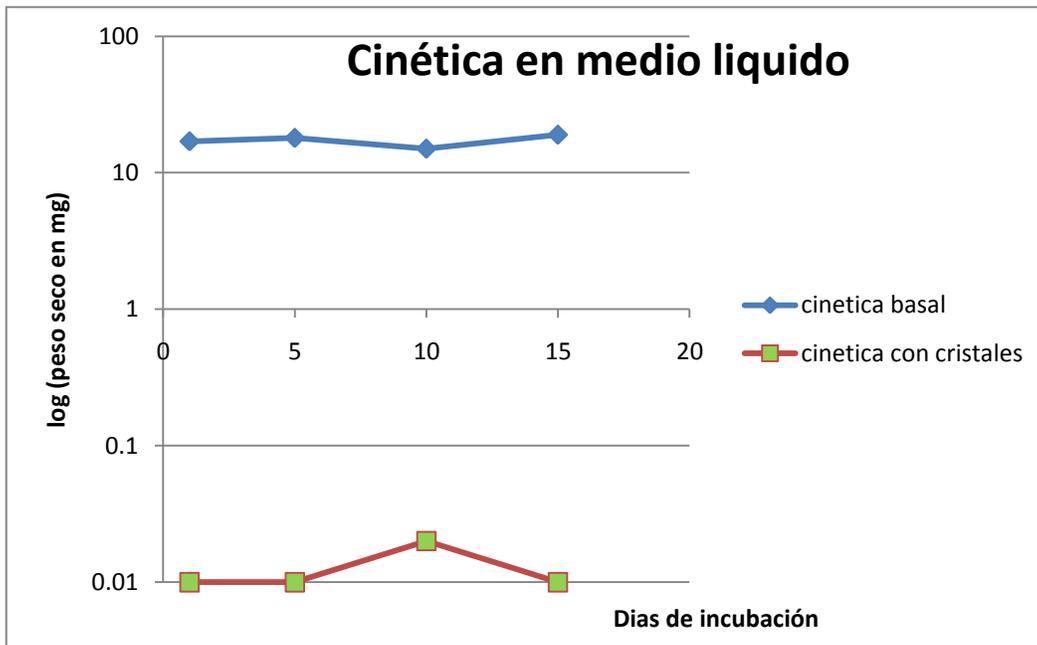
Para conocer el comportamiento del hongo se realizó la cinética de crecimiento en placa en condiciones basales y cinética de crecimiento en presencia de los cristales. Esto consiste en medir el crecimiento del micelio cada 24 horas hasta saturar la caja Petri.



**Figura 28.** Cinética de crecimiento de *Trametes versicolor* en condiciones basales y en presencia de cristales.

En condiciones basales se observa un crecimiento constante a partir del primer día de incubación, con un crecimiento acelerado del micelio a partir del segundo día, para el octavo día el micelio había saturado la caja Petri con un diámetro de 85 mm. Ante la presencia de cristales en el medio de cultivo a una concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$  el crecimiento fue nulo durante los 8 días de incubación (**Figura 28**).

## VI.8 Cinética de crecimiento en medio líquido de *Trametes versicolor*



**Figura 29.** Cinética de crecimiento de *Trametes versicolor* en medio líquido en condiciones basales y en presencia de cristales.

Los resultados de cinética en placa nos arrojan que el micelio fúngico no crece en presencia de los cristales, sin embargo pueden existir diferencias en el crecimiento si se somete a medio líquido y lo podemos observar en la cinética de la **figura 29**. En condiciones basales se presentó crecimiento desde el primer día de incubación y hasta el término del ensayo (igual comportamiento que en placa).

Adicionando cristales al medio líquido a la misma concentración que en placa (250  $\mu\text{g/mL}$ ), se observan cambios, ya que se aprecia un ligero crecimiento determinado por el peso seco del micelio a partir del quinto día hasta llegar a un máximo el día 10, disminuyendo la biomasa a partir de aquí y hasta el término de la prueba. En medio líquido el hongo tiene mayor superficie de contacto con los nutrientes y por lo tanto mayor captación de los mismos por lo que el hongo se mantuvo en cierta latencia.

## VI.9 Actividad enzimática de Lacasa

Teniendo el conocimiento de que la enzima lacasa es una de las enzimas responsable de la degradación de lignina presente en el hongo *Trametes versicolor*, uno de nuestros cuestionamientos es si la enzima es afectada en presencia de la sustancia cristalina y que ésta sea la razón de la inhibición del crecimiento del hongo, por lo que uno de nuestros objetivos es evaluar la actividad de la enzima en condiciones basales y en presencia de los cristales en un lapso de 15 días de incubación.

La actividad de la enzima se determinó utilizando como sustrato artificial el 2-2' azinobis-3 etilbenzotiazolin-6-sulfonato de diamonio (ABTS) el cual funge como lignina. La lacasa al oxidar al ABTS se produce un color azul debido a la formación del radical cationico el cual se detecta por incremento en la absorbancia. Se define una unidad de actividad enzimática (U) a la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS (Nagai y col 2002)

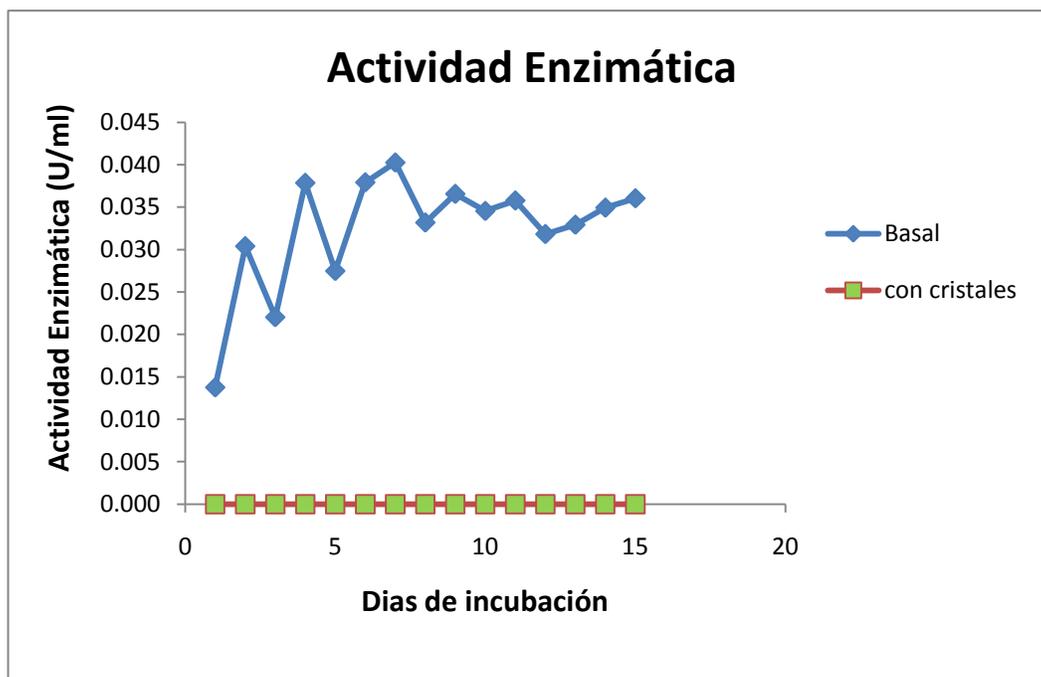


Figura 30. Actividad enzimática de Lacasa en condiciones basales y en presencia de cristales.

### **VI.9.1 En condiciones basales**

Como se observa en la **figura 30**, la actividad enzimática basal llega a su máximo en el día 7, disminuyendo su actividad y quedando estable a partir del octavo día y hasta el término de la prueba.

### **VI.9.2 En presencia de cristales**

Al añadir la sustancia cristalina al medio de cultivo hay drásticos cambios en la actividad enzimática, es nula. No hay actividad en ninguno de los 15 días analizados (**Figura 31**).

Este dato nos va dando repuesta a la inhibición del crecimiento del hongo, ya que podemos sugerir que la sustancia aislada (cristal) inhibió la actividad de la enzima Lacasa.

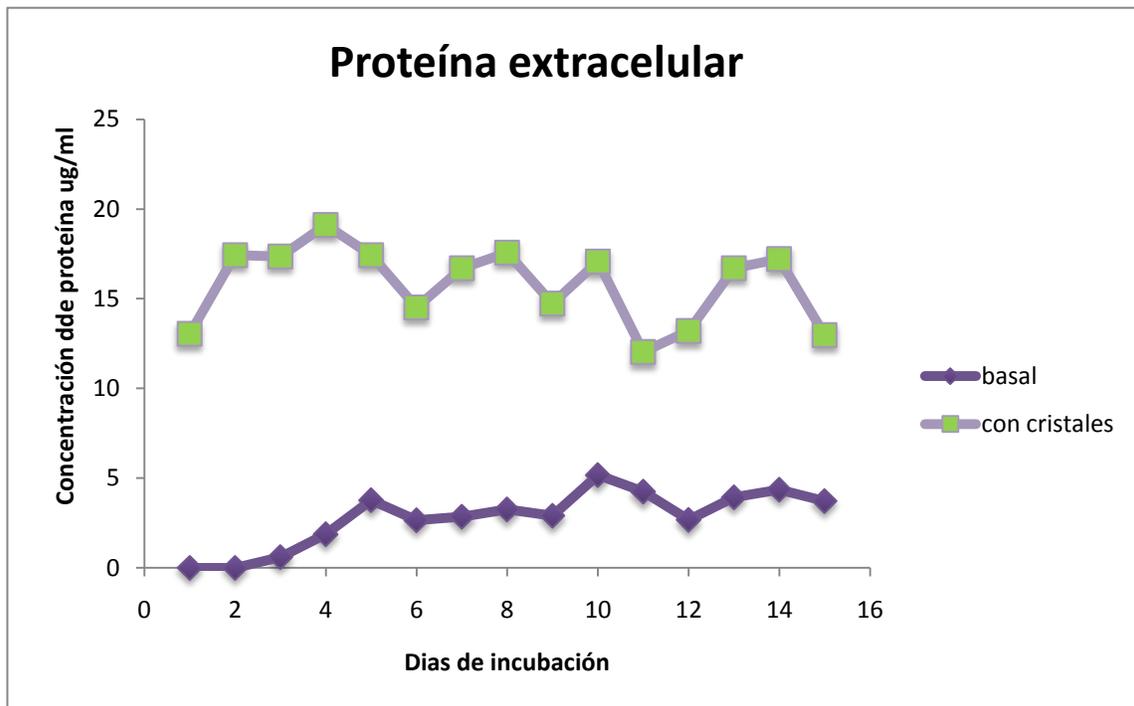
## **VI.10 Cuantificación de enzima Lacasa**

Una más de nuestras interrogantes es conocer si la cantidad de proteína extracelular (en la que se incluye a la enzima Lacasa) disminuía en presencia de los cristales siendo otra posible razón de la inhibición de crecimiento fúngico.

Para determinar la cantidad de proteína se tomaron alícuotas del medio líquido inoculado de los matraces utilizados para la determinación de actividad enzimática.

### **VI.10.1 En condiciones basales**

Con condiciones basales el hongo inicia la producción de enzima extracelular a partir del tercer día, con una producción continua durante los 15 días del ensayo, teniendo dos picos en los días 5 y 10, con una concentración máxima de 5 µg/ml. (**Figura 31**).



**Figura 31.** Cuantificación de proteína extracelular.

### VI.10.2 En presencia de cristales

A diferencia de las condiciones basales la cantidad de proteína producida por el hongo al añadir la sustancia cristalina al medio de cultivo, aumenta drásticamente desde el primer día de incubación, cuantificándose un valor de 13  $\mu\text{g/ml}$  mientras que en condiciones basales no hubo producción de enzima en los dos primeros días. La mayor concentración de enzima se observó en el día 4 con un valor de 18  $\mu\text{g/ml}$ , estos valores se mantuvieron relativamente cercanos durante los 15 días de incubación (**Figura 31**).

Con estos datos comprobamos que al añadir los cristales al medio de cultivo no solo hay producción de enzima si no que ésta aumenta casi un 300% con respecto a las condiciones basales. Una posible respuesta a este hecho es que el hongo produce una mayor cantidad de proteína como mecanismo de defensa ante la presencia de una sustancia extraña (sustancia cristalina).

## VI.11 Elucidación estructural de la sustancia cristalina

Los primeros estudios de Resonancia Magnética Nuclear se realizaron en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, los estudios de alta resolución fueron realizados en la Escuela de Ciencias Biológicas del IPN bajo la dirección del Dr. Joaquín Tamariz Mascarúa.

### Espectrometría de Masas, $^1\text{H}$ RMN y $^{13}\text{C}$ RMN de los cristales aislados

Los cristales aislados del extracto hexánico se analizaron en primer lugar por Espectrometría de Masas (**Figura 34**),  $^{13}\text{C}$  RMN (**Figura 35**) y  $^1\text{H}$  RMN (**Figura 36**). Los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) y constantes de acoplamiento ( $J$ ), determinados por  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN para el cristal aislado.

**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  3.52 (ddd,  $J = 11.0, 6.5, 5.0$  Hz, 1H, H-6  $\alpha$ ), 3.62 (t,  $J = 11.0$  Hz, 1H, H-6  $\beta$ ), 3.70 (s, 3H, OMe), 4.22 (ddd,  $J = 11.0, 5.0, 0.5$  Hz, 1H, H-6 a), 5.48 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, H-11a), 5.52 (a, 1H, OH), 6.40 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H-4), 6.45 (s a, 1H, H-10), 6.46 (dd,  $J = 9.0, 2.0$  Hz, 1H, H-8), 6.54 (dd,  $J = 8.5, 2.5$  Hz, 1H, H-2), 7.12 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-7), 7.37 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, H-1).

**$^{13}\text{C}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  39.42 (C-6a), 55.49 (MeO), 66.49 (C-6), 78.52 (C-11 a), 96.88 (C-10), 103.64 (C-4), 106.39 (C-8), 109.76 (C-2), 112.55 (C-11b), 119.10 (C-6b), 124.75 (C-7), 132.18 (C-1), 156.59 (C-10 a), 157.00 (C-9), 160.58 (C-4 a), 161.04 (C-3)

De acuerdo a los desplazamientos químicos arrojados por  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN, la estructura química del cristal aislado contiene: 16 átomos de Carbono, 14 de Hidrógeno y 4 de Oxígeno ( $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ), los análisis de masas de alta resolución indican que la masa es  $m/z = 270.0892$  mientras la masa calculada fue de 270.0888, con rotación específica  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +281.44$  (c 0.16,  $\text{CHCl}_3$ ). En base a referencias bibliográficas, se compararon los desplazamientos químicos obtenidos con estructuras reportadas anteriormente (**Tabla 4**), siendo éstos muy cercanos a los experimentales, con lo que se determinó que la estructura estudiada corresponde a:

**(+)- 3-hydroxy-9-methoxypterocarpan o Medicarpina.**

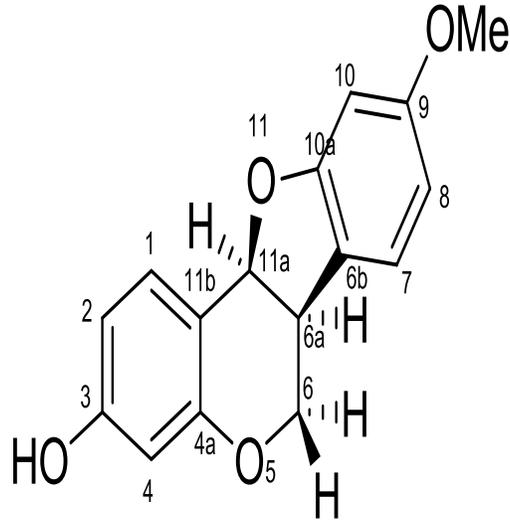
**Tabla 4** Comparación de las señales de RMN- $^1\text{H}$  de Medicarpinas reportadas.

(+)-Medicarpina <sup>1</sup>	(-)-Medicarpina Glucosilada <sup>2</sup>	(+)-Medicarpina Experimental
3.55 (m, 1H, H6a)	3.74 (m, 1H, H6a)	3.52 (ddd, $J = 11.0, 6.5, 5.0$ Hz, 1H, H-6a)
3.65 (1H, dd, $J = 10.9, 10.9$ Hz, H-6 $\beta$ )	3.75 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-6)	3.62 (t, $J = 11.0$ Hz, 1H, H-6 $\beta$ )
-----	3.75 (s, 3H, OMe)	3.70 (s, 3H, OMe)
4.26 (1H, dd, $J = 4.8, 10.9$ Hz, H-6 $\alpha$ )	-----	4.22 (ddd, $J = 11.0, 5.0, 0.5$ Hz, 1H, H-6 $\alpha$ )
5.23 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-11a)	4.37 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-11a)	5.48 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-11a)
-----	-----	5.52 (a, 1H, OH)
-----	6.62 (1H, dd, $J = 2.4$ Hz, H-4)	6.40 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-4)
-----	7.03 (1H, s, H-10)	6.45 (s a, 1H, H-10)
-----	7.12 (1H, dd, $J = 2.4$ Hz, H-8)	6.46 (dd, $J = 9.0, 2.0$ Hz, 1H, H-8)
-----	6.68 (1H, s, H-2)	6.54 (dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, 1H, H-2)
-----	7.55 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-7)	7.12 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-7)
-----	7.33 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-1),	7.37 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-1)

<sup>1</sup>(Deesamer y col. 2009). <sup>2</sup>(Tsunoda y col. 2008)

### VI.11.1 Estructura elucidada.

La estructura elucidada corresponde a la molécula: 3-hydroxy-9-methoxypterocarpan, conocida como Medicarpina, perteneciente a un grupo de sustancias llamadas fitoalexinas.



**Figura 32.** Medicarpina

**Tsunoda y col.**, en el 2008 reportan seis compuestos a partir de *Gueldenstaedtia multiflora*, planta usada en la medicina tradicional china como antiinflamatorio, analgésico y como remedio para combatir la ictericia. Entre los compuestos reportados se encuentra un derivado de la medicarpina, se trata de la medicarpina glucosilada.

Además se reporta el aislamiento e identificación de (+) Medicarpina a partir del duramen del árbol *Dalbergia oliveri*, el cual se distribuye ampliamente en Tailandia y es usado en la medicina tradicional para el tratamiento de ulcera crónica (**Deesamer y col. 2009**). La medicarpina fue aislada a partir del extracto hexánico del duramen, coincidiendo con nuestra metodología dando un mayor soporte a los resultados de nuestro trabajo, aún más por tratarse de una *Dalbergia*.

## VI. 12 Medicarpina

Medicarpina (también conocido como 3-hidroxi-9-methoxypterocarpan) fue aislada en 1971 (Smith 1971), como una respuesta química de la alfalfa (*Medicago sativa*) a la infección por hongos. La medicarpina pertenece a un grupo de sustancias llamadas fitoalexinas. Se encuentran comúnmente en los miembros de las leguminosas, se produce en casos de estrés biótico que incluye la invasión fúngica, bacteriana y presencia de metales pesados (Tsiri y col. 2009). Los detalles bioquímicos de esta defensa aún se desconocen. Sin embargo, se han realizado trabajos para identificar a los grupos funcionales involucrados, (grupo hidroxilo fenólico y el grupo dimetilalil) para poder así determinar el grado de toxicidad de la planta contra patógeno (Delserone 1992). La biosíntesis de la medicarpina se inicia con la molécula fenilalanina requiriendo de varias enzimas (Figura 33).

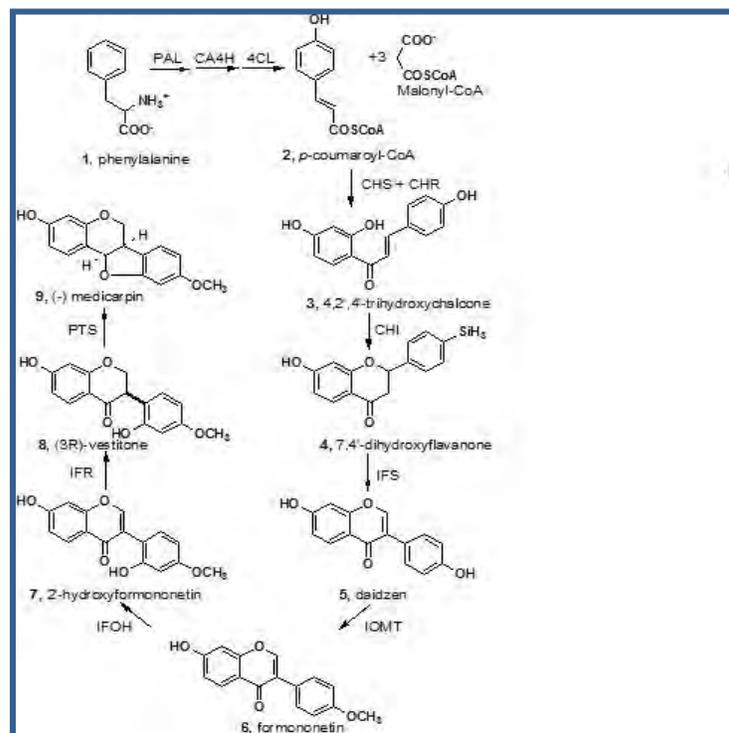


Figura 33. Biosíntesis de medicarpina

<http://commons.wikimedia.org/wiki/User:Nguyenkn>

Se ha identificado la presencia de medicarpina y diversas especies. En 1972 se reporta la existencia de 3-hydroxy-9-methoxy and 3-hydroxy8,9-methylenedioxypterocarpanos en *Andira inermis* Wright H. B. K. así como en *Dalbergia stevensonii* (Mcmurry y Martin 1972). En el 2009 se reporta la existencia de medicarpina en *Artabotrys odoratissimus* (Singh y col 2009) y en *Dalbergia oliveri* (Deesamer y col 2009).

#### **VI.12.1 Propiedades medicinales de la medicarpina**

Además de presentar actividad antifúngica y antibacteriana, especialmente en la familia de las leguminosas, la medicarpina posee potenciales usos medicinales (Miller y col 1985)

Se ha reportado que la medicarpina y sus derivados poseen la capacidad de inhibir la síntesis de leucotrienos (Miller y col 1989), así como una alta actividad antimitótica es decir inhibe el crecimiento celular al impedir la mitosis (división celular), por lo que se considera una potente sustancia anticancerígena (Militão y col 2005).

Numerosos estudios se han realizado para mostrar la versatilidad de la medicarpina, sin embargo no se han proporcionado detalles sobre las posibles interacciones moleculares entre la medicarpina y las diferentes macromoléculas. Por lo anterior el último de nuestros objetivos de este proyecto es evaluar las interacciones moleculares entre la medicarpina y la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor*

## VI.12.2 Fitoalexinas

Los primeros reportes sobre la presencia de fitoalexinas fueron descritos por Muller y Borger **(Kuc 1995)**, mostrando fuertes evidencias de la resistencia de la papa al hongo *Phytophthora infestans*. La base fisiológica y bioquímica de la resistencia de plantas al ataque de patógenos, hongos y bacterias; se encuentra relacionada con la biosíntesis de metabolitos secundarios implicados en los procesos infecciosos. Muchos cambios bioquímicos ocurren en las plantas después de una infección y algunos de estos cambios se han asociado con la expresión del mecanismo de defensa, produciendo sustancias llamadas fitoalexinas.

Conforme se avanzaba en el conocimiento de estos metabolitos, su definición también fue evolucionando, considerándose en la actualidad compuestos antimicrobiales de bajo peso molecular producidos por las plantas en respuesta a infección, agentes químicos, daño mecánico o a estrés. Aunque se podría cuestionar el concepto antimicrobial, ya que las investigaciones reportan su síntesis como producto del ataque de hongos, en menor frecuencia al de bacterias. Las fitoalexinas se sintetizan en las células sanas adyacentes a las células dañadas y se acumulan tanto en tejidos necróticos resistentes, como susceptibles, es decir, se producen restringidamente en un sitio alrededor del lugar de infección. Después de una infección son sintetizadas rápidamente, casi en horas después del ataque del patógeno y son tóxicas para un amplio espectro de hongos y bacterias patógenas **(Taiz y Zeiger 1991)**.

Se han identificado alrededor de 200 compuestos que por la presencia de microorganismos y condiciones de estrés han inducido la síntesis de fitoalexinas, por ejemplo la acumulación de pisantina en chícharo (*Pisum sativum*), faseolina en frijol (*Phaseolus vulgaris*) y gliceolina en soya (*Glycine max*).

La mayoría de las fitoalexinas se han identificado en las familias: Leguminosae y Solanaceae, pero es importante señalar que en cada familia se han llegado a detectar estos metabolitos pertenecientes únicamente a dos o tres clases de productos naturales, como ejemplo, se han detectado dos poliacetilenos: falcarinol y falcarindiol y un sesquiterpenoide: risitina en tomate (*Lycopersicon esculentum*, Solanaceae).

### **Biosíntesis de fitoalexinas**

La mayoría de las fitoalexinas identificadas derivan de la ruta biosintética de los fenilpropanoides (**Reichling 1999**). Se encuentran diversos metabolitos identificados, involucrados en la resistencia a enfermedades flavonoides, isoflavonoides, coumarinas, estilbenos, dihidrofenantrenos, lignina y otros fenoles. La secuencia de las reacciones de síntesis y las enzimas involucradas, también se encuentran identificadas. Las enzimas que catalizan los pasos son la fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato-4-hidrolasa y la 4-cumarato coenzima A ligasa. Existen otras enzimas que se encargan de reacciones específicas: como hidroxilaciones, metilaciones, etc. Una cercana relación de las enzimas y las rutas metabólicas y una aparente interdependencia en la regulación existente El mecanismo por el cual las fitoalexinas alcanzan su efecto tóxico no es aún claro.

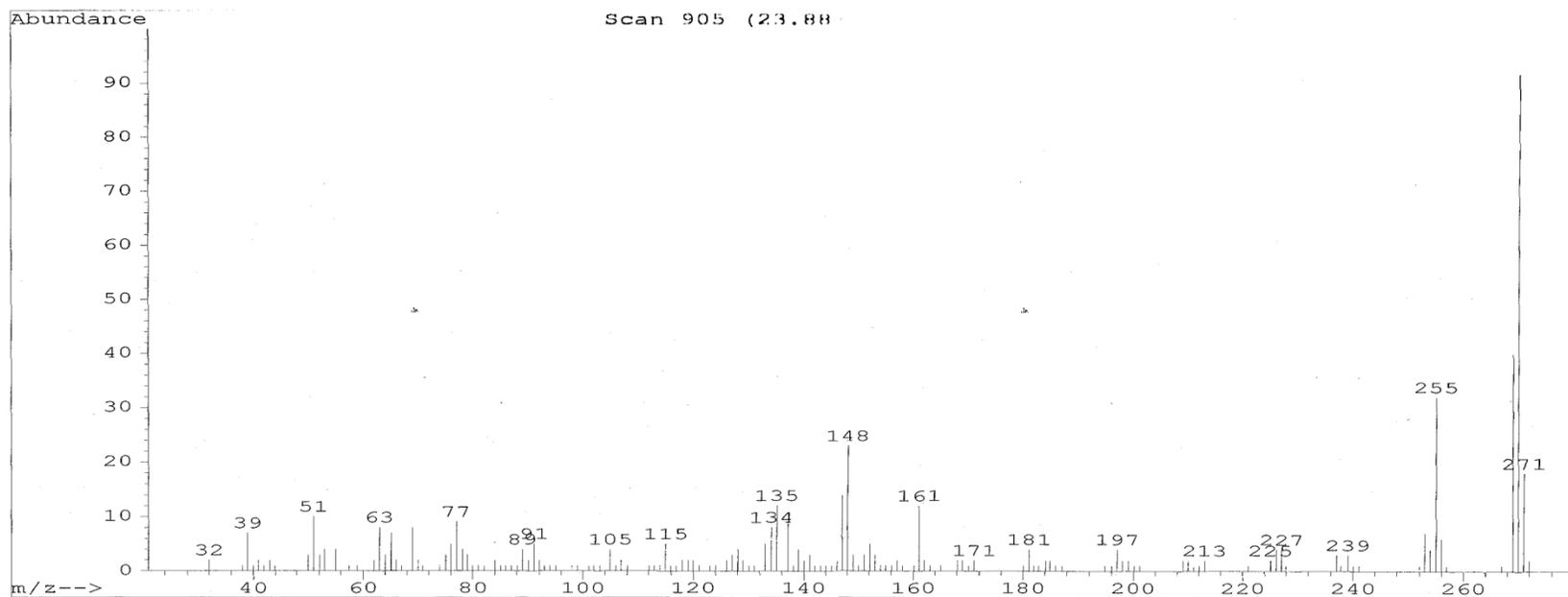
Considerando una gran diversidad de estructuras, un modo de acción es improbable, pero se cree que interactúan en diferentes sitios causando una disfunción en la integridad de la membrana. Estas especulaciones se establecen debido a que recientes estudios reportan el modo de acción del glicinoll identificado en soya (*Glycine max*) en sitios específicos (**Ebel 1986**).

### VI.13 Espectros H<sup>1</sup> RMN para los diferentes extractos

Se realizaron estudios de RMN de protón a cada uno de los extractos obtenidos, en los cuales se observa claramente el patrón de señales correspondiente a la Medicarpina en 3 de los 4 extractos obtenidos: hexánico, éter etílico y acetato de etilo (con cierto grado de impurezas en cada uno de ellos) (**Figura 41**), mientras que para el extracto acetónico, estas señales no están presentes.

Con estos resultados comprobamos que la Medicarpina es la sustancia responsable de la actividad antifúngica presente en los extractos: hexánico, éter etílico y acetato de etilo a diferencia del extracto acetónico ya que fue el único que no presentó actividad antifúngica por no estar presente la sustancia antes mencionada.

File : C:\HPCHEM\2\DATA\RHB-21.D  
Operator : J. L. Salvador H.  
Acquired : 5 Oct 109 2:48 pm using AcqMethod MS-C  
Instrument : 5989 - MA  
Sample Name: RHB-21.  
Misc Info :  
Vial Number: 1



**Figura 34.** Espectro de Masas correspondiente al cristal aislado

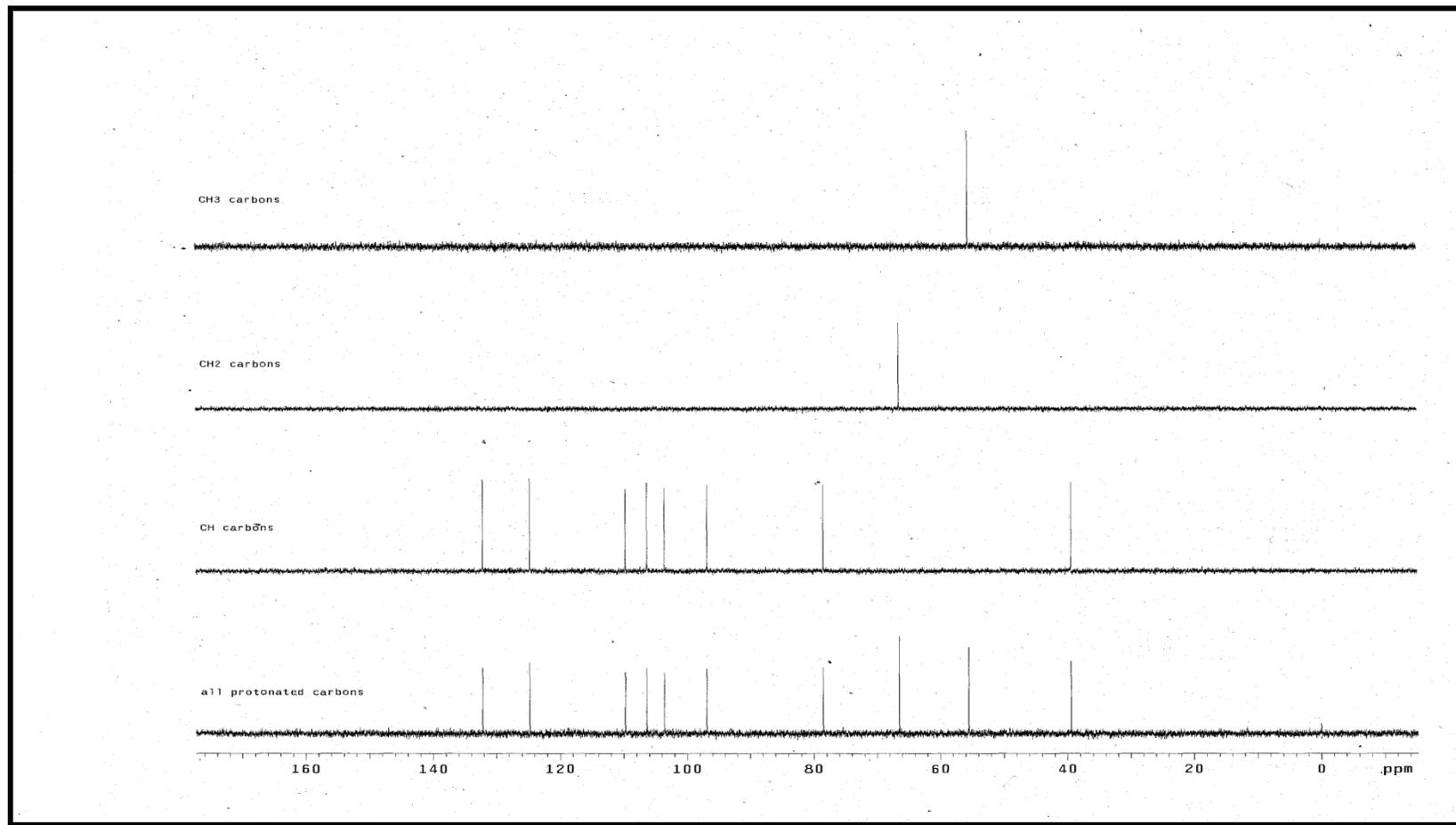


Figura 35. Espectro de <sup>13</sup>C RMN del cristal aislado del extracto hexánico de la harina de madera de *Dalbergia congestiflora* P.

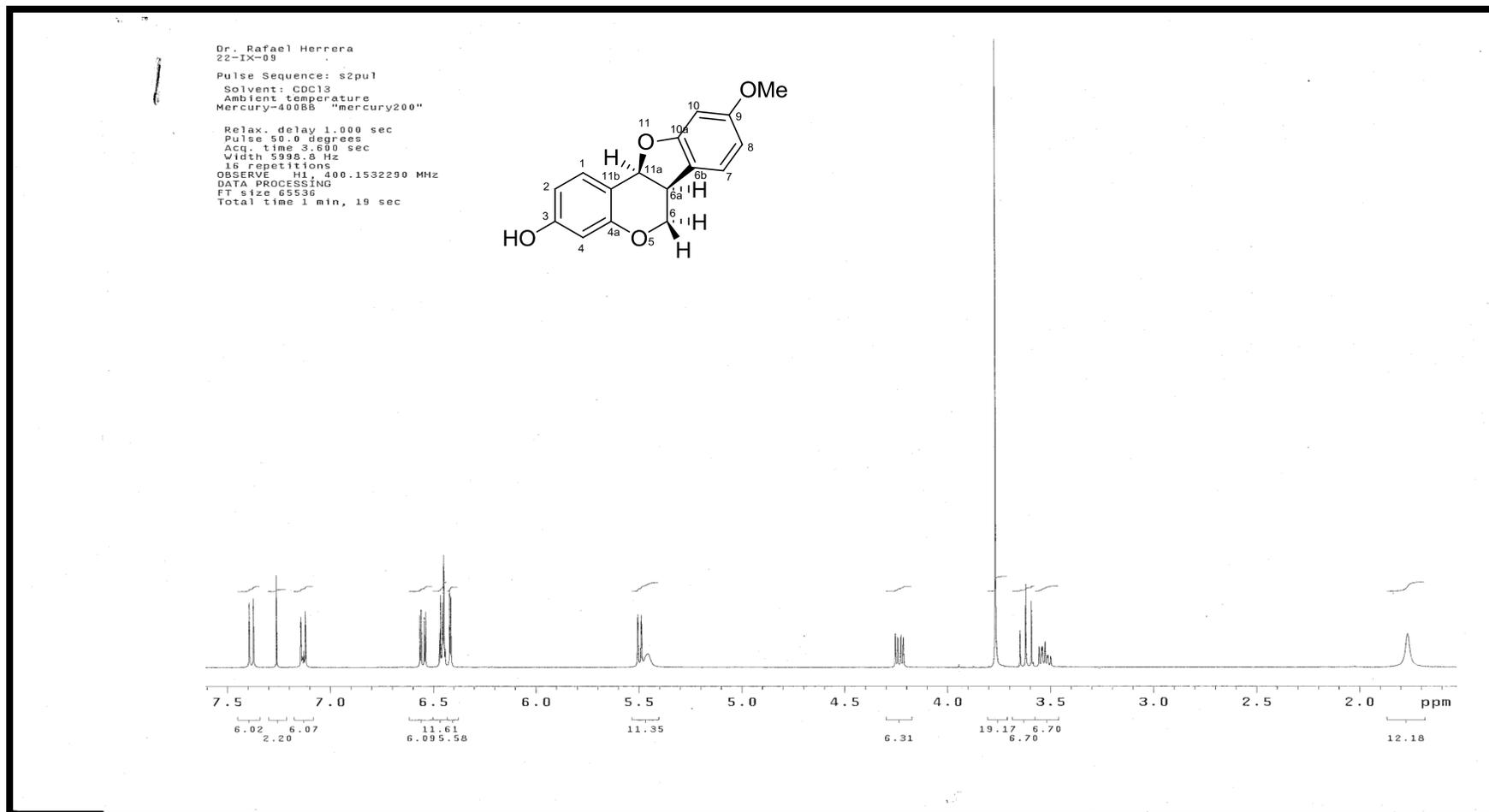


Figura 36. Espectro de  $H^1$  RMN del cristal aislado del extracto hexánico de la harina de madera de *Dalbergia congestiflora* P.

F hexano  
Dr. Rafael Herrera  
01-X-09  
Pulse Sequence: s2pul  
Solvent: CDC13  
Ambient temperature  
Mercury-400BB "mercury200"  
Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 50.0 degrees  
Acq. time 3.600 sec  
Width 5998.8 Hz  
64 repetitions  
OBSERVE H1, 400.1532264 MHz  
DATA PROCESSING  
FT size 65536  
Total time 5 min, 18 sec

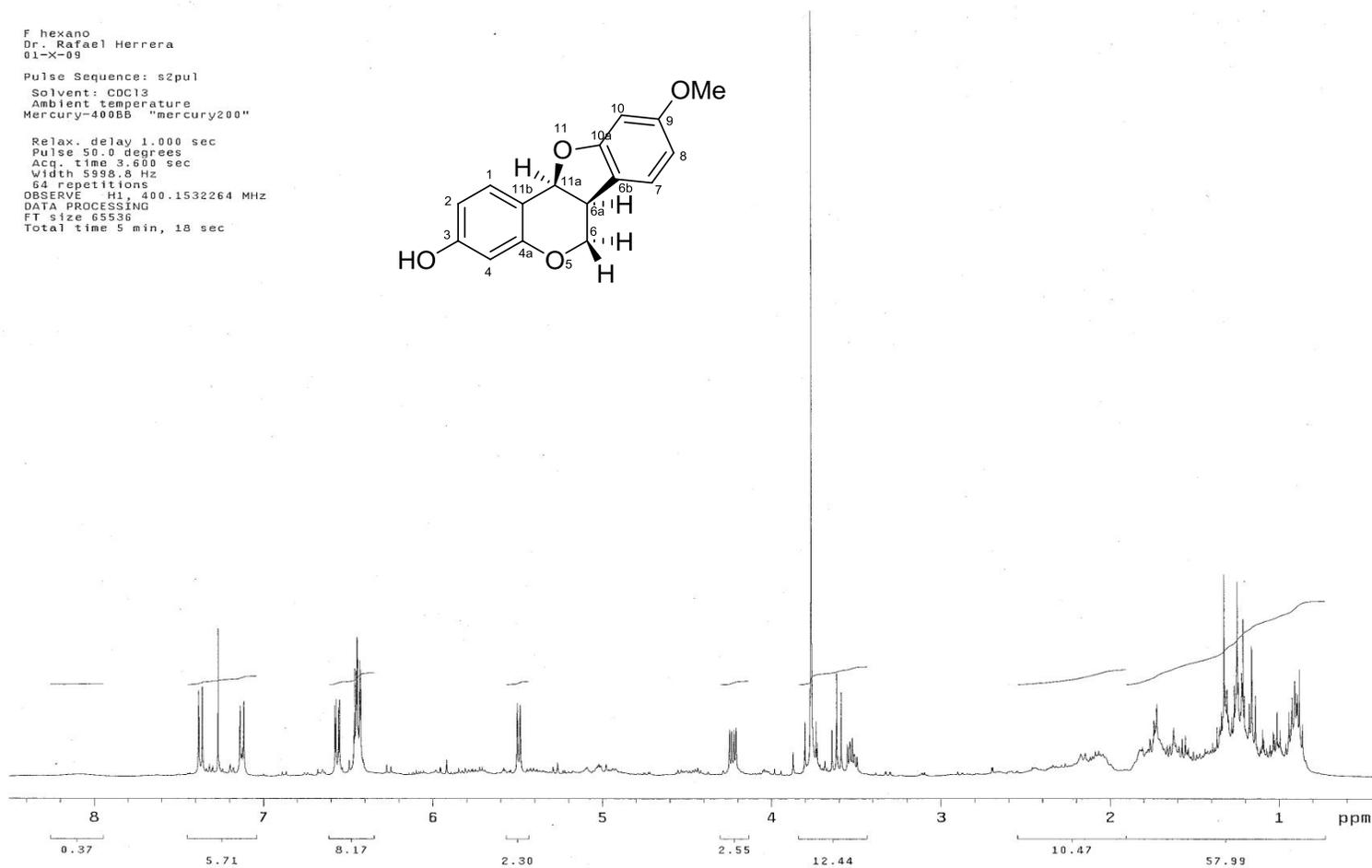
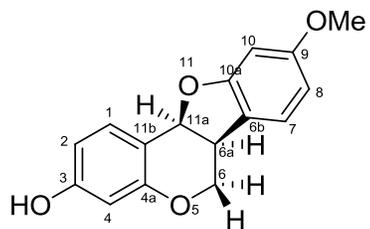


Figura 37. Espectro de H<sup>1</sup> RMN del extracto hexánico crudo de la harina de madera de *Dalbergia congestiflora* P.

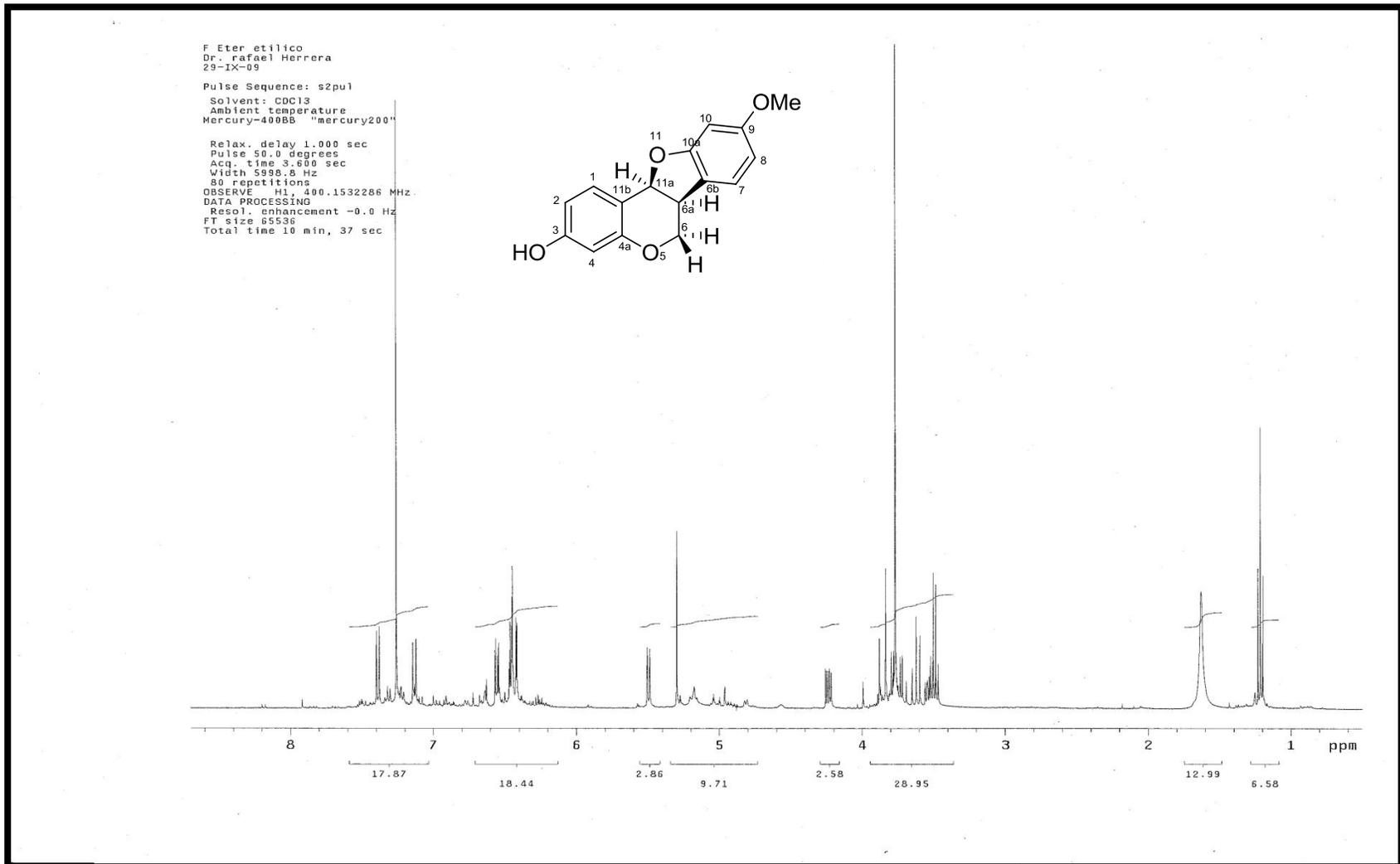
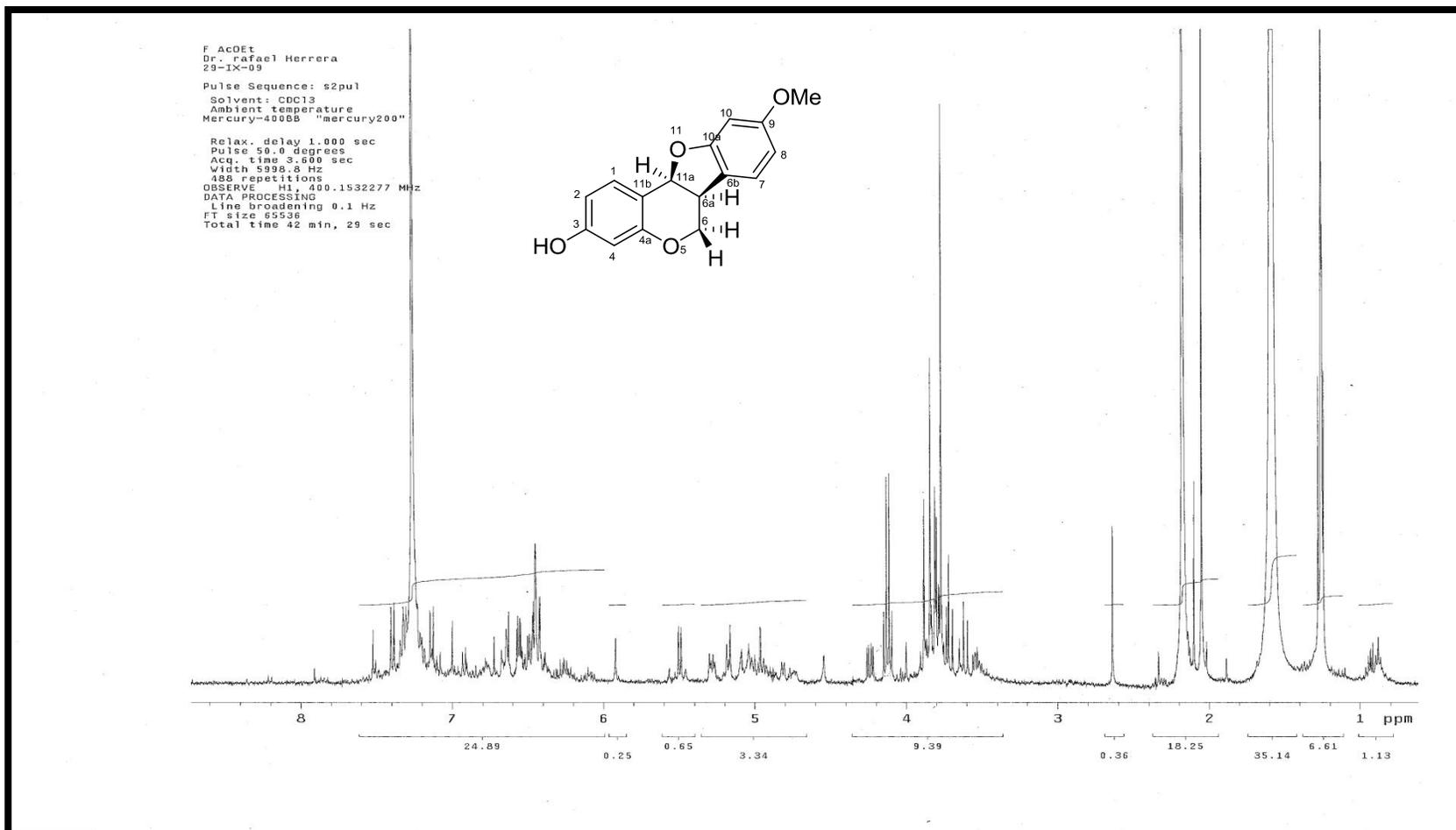


Figura 38. Espectro de H<sup>1</sup> RMN del extracto éter etílico de la harina de madera de *Dalbergia congestiflora* P.



**Figura 39.** Espectro de  $H^1$  RMN del extracto acetato de etilo de la harina de madera de *Dalbergia congestiflora* P.

F Acetona  
Dr. Rafael Herrera  
01-X-09  
Pulse Sequence: s2pul  
Solvent: CDCl3  
Ambient temperature  
Mercury-400BB "mercury200"  
Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 50.0 degrees  
Acq. time 3.600 sec  
Width 5998.8 Hz  
32 repetitions  
OBSERVE H1, 400.1532273 MHz  
DATA PROCESSING  
FT size 6556  
Total time 2 min, 39 sec

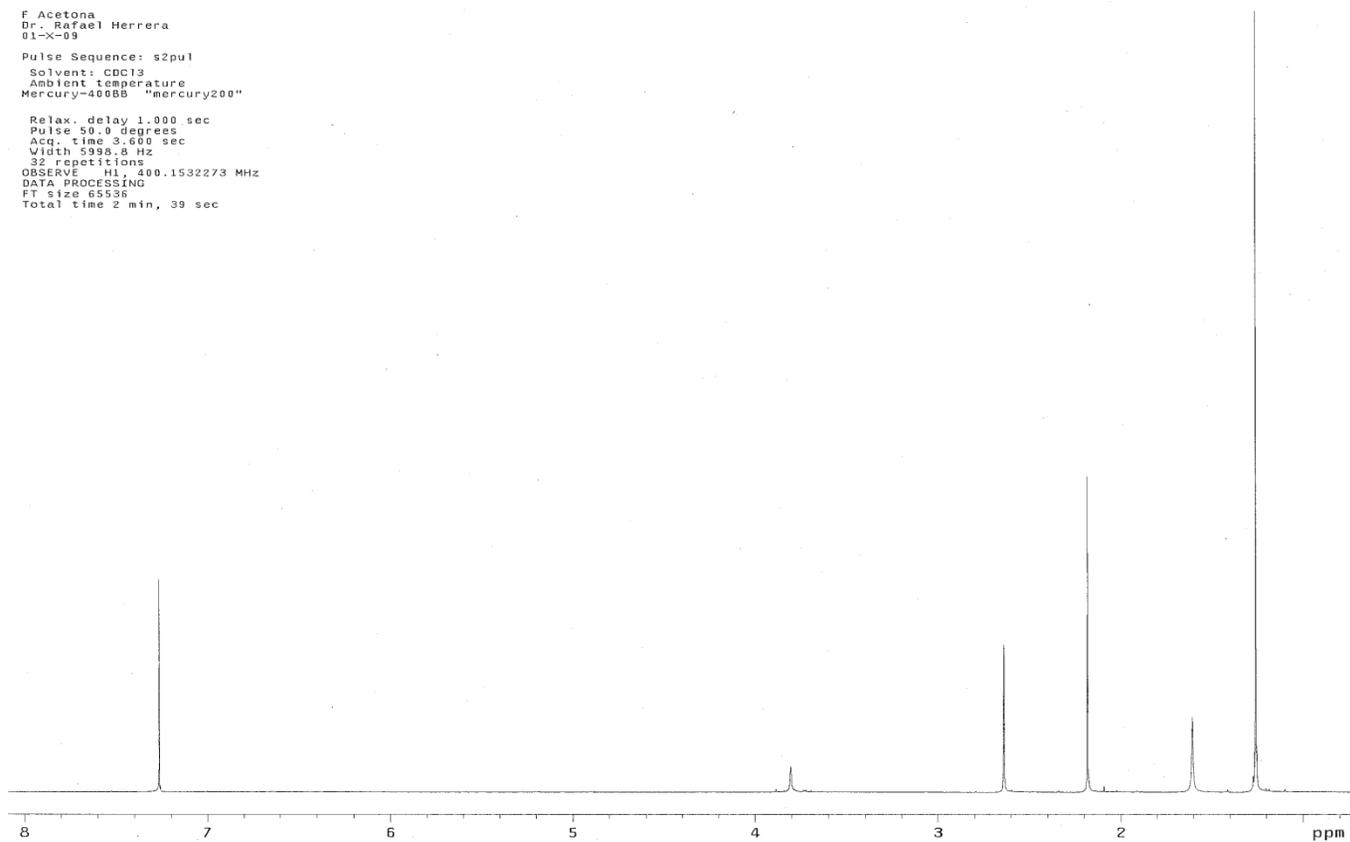
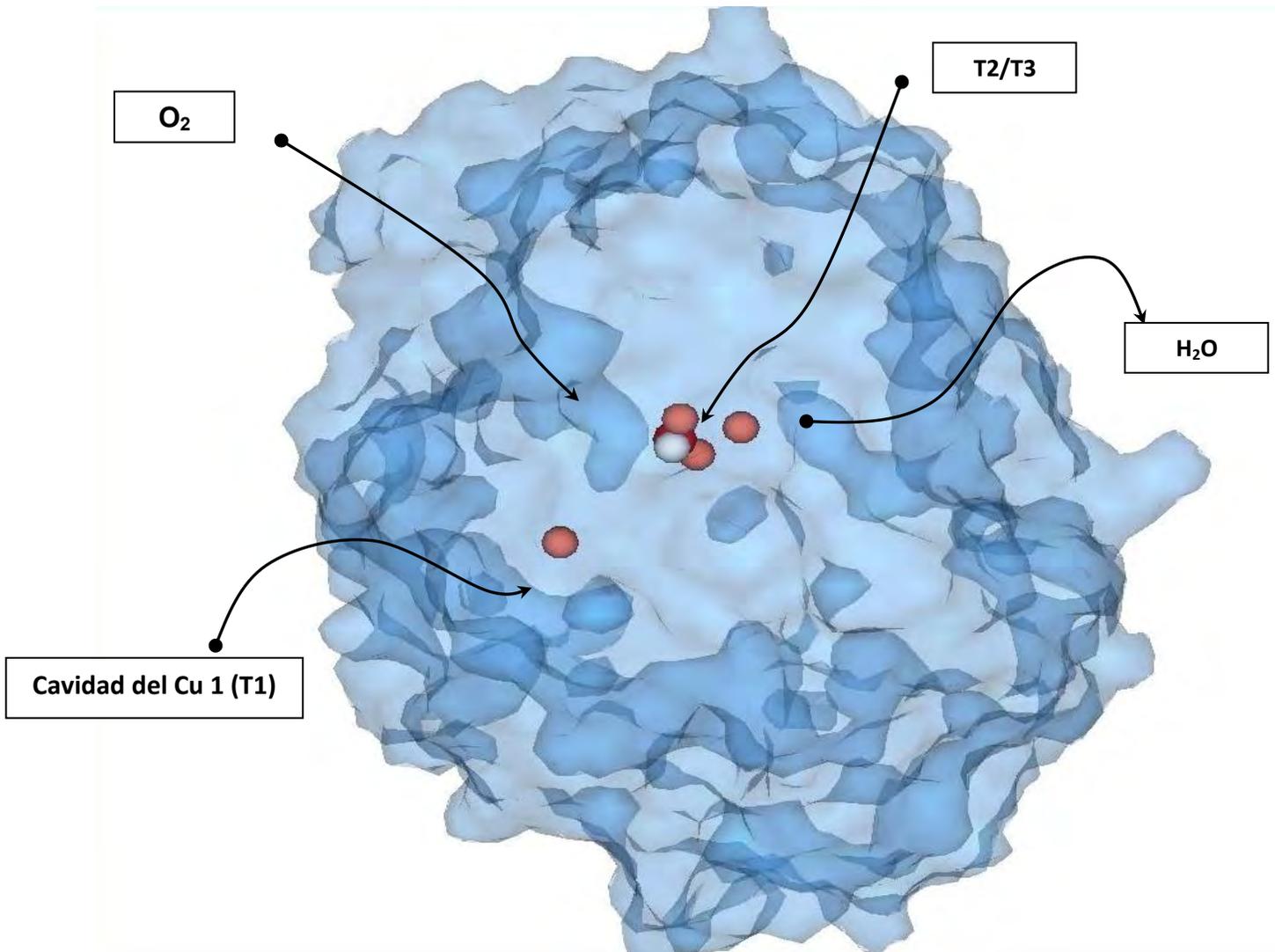


Figura 40. Espectro de H<sup>1</sup> RMN del extracto acetónico de la harina de madera de *Dalbergia congestiflora* P



## VI.14 Modelado Molecular



**Figura 42.** Enzima Lacasa de *Trametes versicolor*

Representación de la superficie de la enzima lacasa de *Trametes versicolor*, en la que se destaca el sitio catalítico conformado por cuatro átomos de cobre (Cu), el cobre tipo 1 (T1), tipo 2 (T2) y el tipo 3 (T3) formado por 2 átomos de cobre, los cuatro átomos están en el estado de oxidación 2 +.

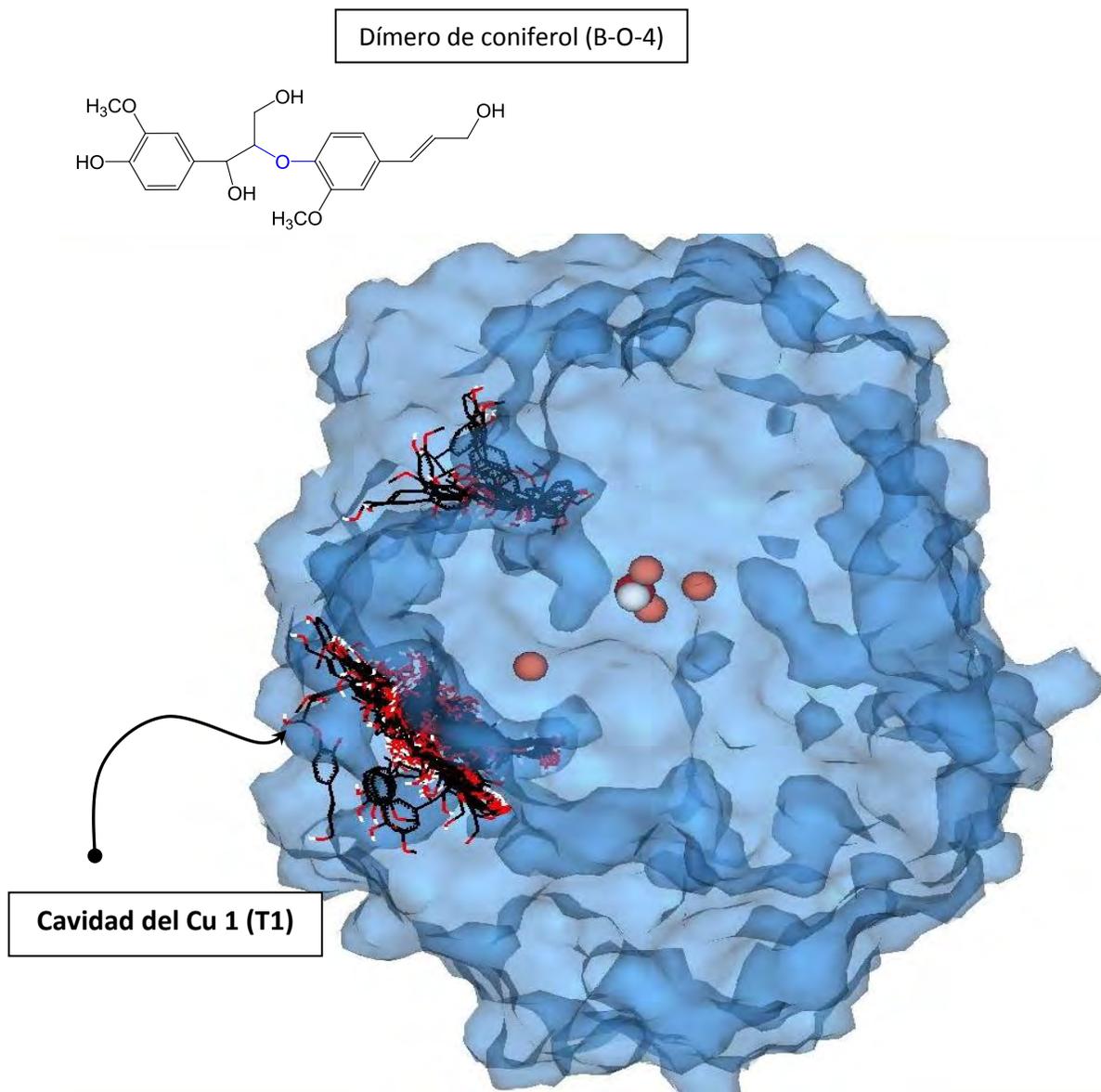
El sitio T1 se encuentra localizado en el dominio 3, ligeramente acostado en la superficie de la enzima. T2 y T3 forman un complejo trinuclear en la superficie entre el dominio 1 y 3 de la enzima. Además se resalta la cavidad en donde —descansa” el Cu1.

El sitio T1 es el aceptor primario de electrones donde la enzima cataliza la oxidación de 1e del sustrato. Los electrones extraídos del sustrato reducido son transferidos al centro trinuclear T2/T3 donde se lleva a cabo la reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. De acuerdo a los experimentos realizados por Blandford y col en el 2007, hay una cavidad próxima al sitio T2/T3 en la que se facilita la llegada del O<sub>2</sub> conduciendo a la reducción del mismo.

En la representación de la superficie de la lacasa (**Figura 42**) se puede apreciar claramente dos cavidades cercanas al T1/T3, en donde Blandorf representa como entrada de O<sub>2</sub> y salida de H<sub>2</sub>O.

Debido a que en la literatura no se ha reportado aun el mecanismo molecular por el cual es inhibida la actividad de la enzima lacasa, nuestro interés nos lleva al estudio de las interacciones de acoplamiento entre la enzima y la molécula aislada con la finalidad de poder dar respuesta a este fenómeno, ya que hasta el momento solo se hacen especulaciones al respecto.

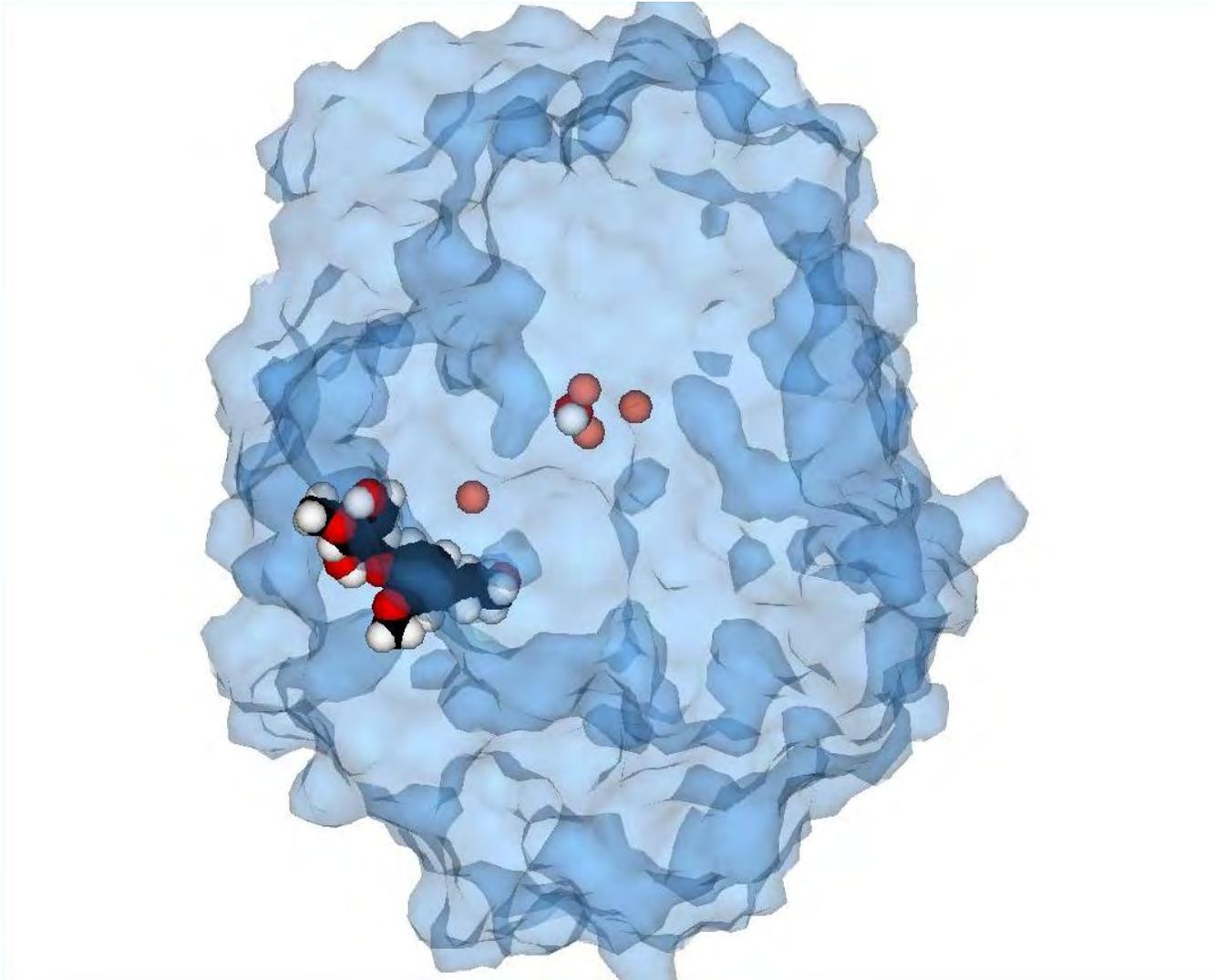
Se realizó el dockeo (acoplamiento) en primer lugar entre la enzima y un dinero de lignina (dilignol) como control positivo (**Figura 43**) posteriormente el acoplamiento entre la enzima y la molécula Medicarpina.



**Figura 43.** Acoplamiento entre enzima lacasa y dilignoles.

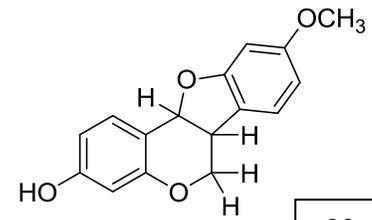
Se representan los 100 acoplamientos entre la enzima y el dilignol (dimeros de coniferol B-O-4). Los dimeros de lignina se acoplan mayoritariamente en la cavidad hacia el T1, lugar en donde se reporta el inicio la degradación de la lignina, acoplándose en menor proporción a la cavidad I T2/T3. Con este dato validamos nuestro modelo de estudio.

Los dilignoles se representan en modelos de varas.

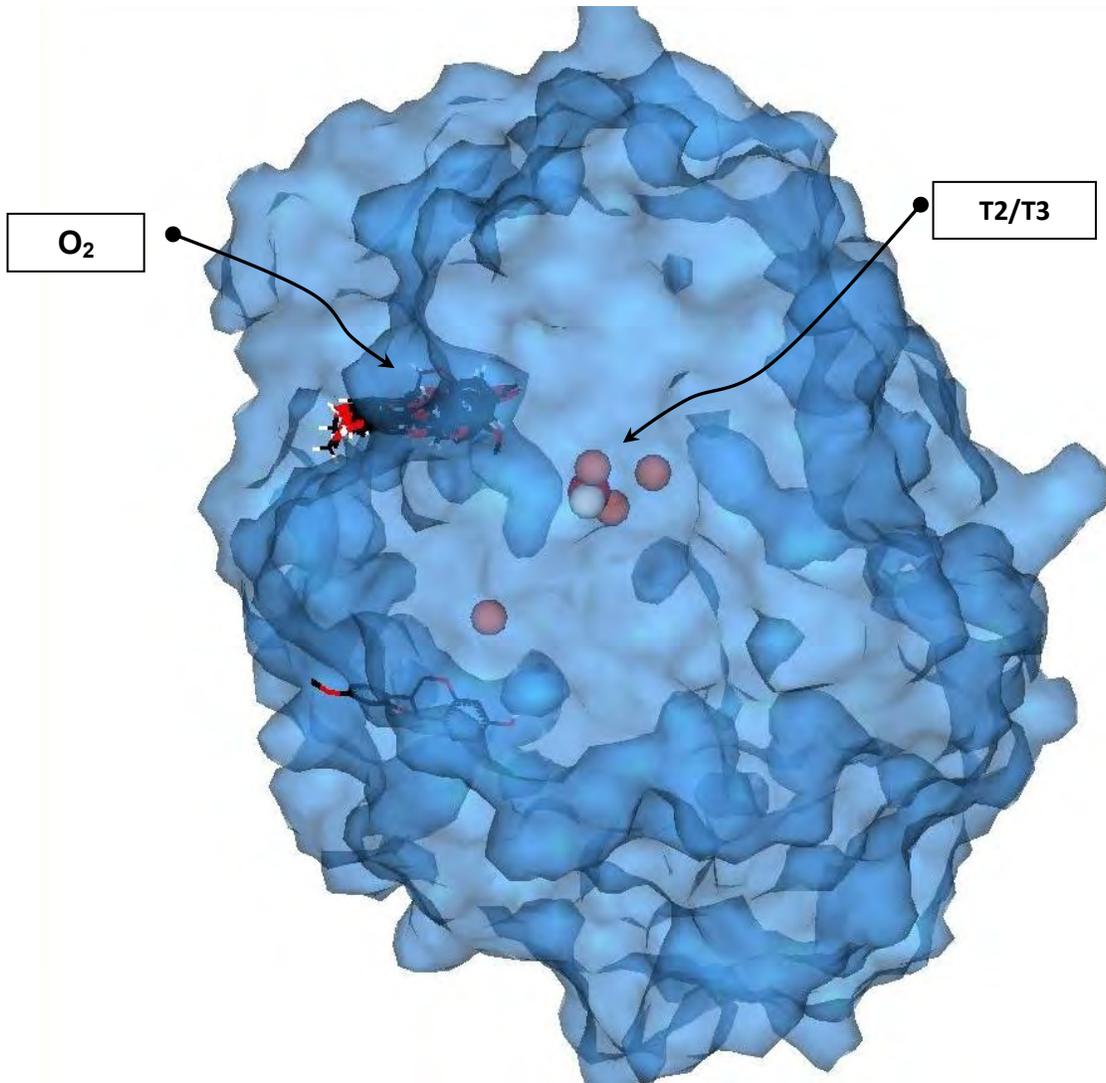


**Figura 44.** Mejor acoplamiento entre enzima lacasa y dilignol

Se representa el rotámero con la mejor energía de interacción de los 100 acoplamientos entre la enzima y los dímeros de lignina, el cual se ancla cerca del Cu 1, con lo que validamos el funcionamiento de nuestro modelo.

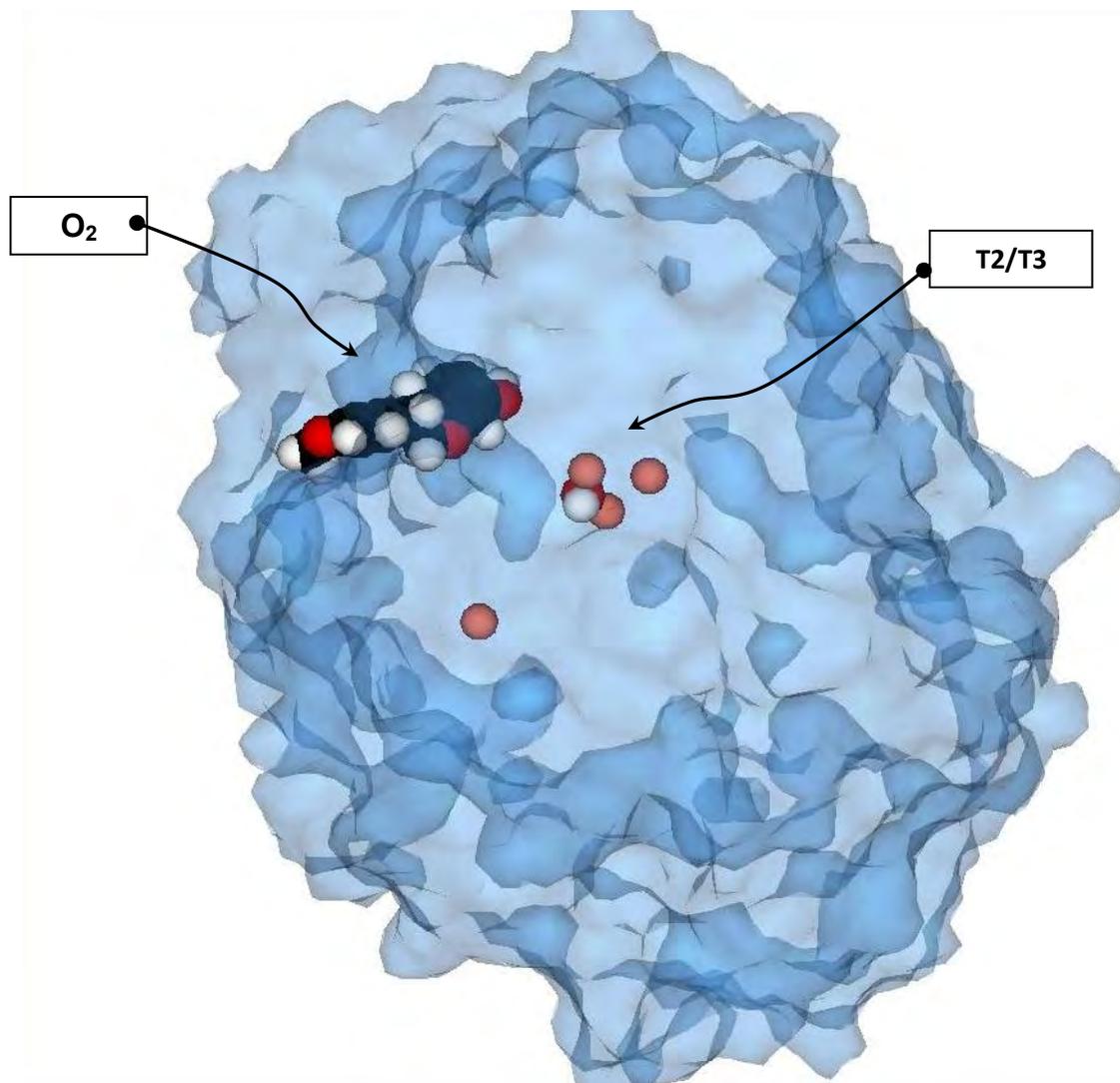


Medicarpina



**Figura 45.** Acoplamiento entre enzima lacasa y medicarpina

Se representan los 100 acoplamiento entre la enzima y la medicarpina, en su mayoría se acoplan cerca al sitio T2/T3. Modelo de medicarpina de varas.



**Figura 46.** Mejor acoplamiento entre enzima lacasa y medicarpina

Se esquematiza el rotámero de medicarpina con mejor energía de interacción (el mejor acoplado), el cual se ubica cercano al sitio T2/T3, al anclarse la molécula de medicarpina en esta cavidad es probable la interrupción de la transferencia electrónica al bloquear el canal de oxígeno, impidiendo así la transferencia de electrones al T2/T3. Esta es la posible respuesta al mecanismo de inhibición de la enzima.

## VII CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró evaluar la actividad antifúngica de diferentes extractos del duramen de *Dalbergia congestiflora* P., así como la identificar a la sustancia responsable de dicha actividad.

El duramen de *Dalbergia congestiflora* P. presentó un contenido del 30% de lignina y un alto contenido de carbohidratos totales alrededor del 80%, en base a madera libre de extraíbles, lo cual es congruente con la composición química de la mayoría de las latifoliadas, en cuanto al contenido total de extraíbles se determinó el 18.32%, logrando la mayor cantidad de extracción con éter etílico.

Los extractos del duramen que mostraron actividad antifúngica ante *Trametes versicolor* fueron: hexano, éter etílico y acetato de etilo.

En el proceso de extracción se identificó la formación de cristales en el extracto hexánico, los cuales se aislaron y se sometieron a la evaluación de la actividad antifúngica, mostrando 100% de inhibición de *Trametes versicolor* a partir de la concentración de 150 µg/mL.

El crecimiento del hongo *Trametes versicolor* ve afectado tanto en crecimiento en placa como en su actividad enzimática, ya que al adicionar la sustancia cristalina al medio de cultivo se abate tanto crecimiento como actividad, sin embargo en medio líquido el hongo se mantiene latente ya que se registró un mínimo crecimiento a diferencia del crecimiento en medio sólido.

Sin embargo al determinar la cantidad de proteína extracelular adicionando cristales, ésta aumentó drásticamente en comparación a condiciones basales.

Los análisis de elucidación estructural indican que los cristales aislados corresponden a la molécula: (+)3-hydroxy-9-methoxypterocarpan, conocida como (+)-Medicarpina, las señales correspondientes a esta molécula se identificaron en los espectros de  $H^1$  RMN de los extractos obtenidos con hexano, éter etílico y acetato de etilo, siendo la Medicarpina la sustancia responsable de la actividad antifúngica.

Mediante el estudio de acoplamiento molecular se observó que la medicarpina se acopló con la mejor energía en una cavidad cercana al sitio T2/T3 de la enzima lacasa, por lo que podemos sugerir un posible mecanismo de inhibición de la enzima: si se bloquea la entrada de oxígeno se ve interrumpida la transferencia de electrones por lo que no se puede llevar a cabo la degradación de los sustratos. Sin embargo es conveniente continuar con estudios que validen nuestra propuesta de inhibición, como es la determinación de actividad de lacasa adicionando Medicarpina en el momento de la medición y no en el medio de cultivo, así como medir el consumo de oxígeno.

## VIII REFERENCIAS

- Adair, S., S. H. Kim y C. Breuil (2002) A molecular approach for early monitoring of decay basidiomycetes in wood chips. *FEMS Microbiological Letters*. (211): 117-122
- Allmer, J., R. Vasiliauskas, K. Ihrmark, J. Stenlid y A. Dahlberg(2006) Wood-inhabiting fungal communities in woody debris of norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.), as reflected by scopocarps, mycelial isolations and T-RFLP identification. *FEMS Microbiology Ecology*. (55): 57-67.
- Ansari M. A., R.K. Razdan, M. Tandon y P. Vasudevan. (2000) Larvicidal and repellent actions of Dalbergia sissoo Roxb. (F. Leguminosae) oil against mosquitoes. *Biosource Technology* 73:207-211
- Anual book of standard (1986) Designación D:2017-81. Standard method of accelerated laboratory test of natural decay resistance of woods.
- Avendaño C. (1993) —Introducción a la Química Farmacéutica”, cap. 3, editorial McGraw-Hill, 1ª edición, Madrid, España
- Barragan B.E., B.M. Monrroy S, J Peralta C. (1994) Obtención y purificación de los colorantes presentes en la madera de campinceran (*Dalbergia congestiflora*) *Ciencia y Tecnología de la Madera*.
- Barragan Huerta B.E., L. Hernandez de Jesus, J. García Castro, E. Escamilla Avilés y M. Herrera Mata (1998). Evaluación de la actividad biológica de los extractos de plantas del genero Dalbergia. <http://clave.ucdavis.edu/silcibio98.html>  
*Biorem. J.* 3:1-25.

- Blanford Christopher F , Rachel S. Heath and Fraser A. Armstrong (2007) A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O<sub>2</sub> reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface, *Chem. Commun.*, 1710 - 1712, DOI: 10.1039/b703114a compounded materials
- Bollag, J.-M., Leonowicz, A. (1984) Comparative studies of extracellular fungal laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:849-854
- Borneman, J. y J. Hartin. 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology.* (66): 4356-4360.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G. (1990) Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267:99-102
- Bowman, B. H., J. W. Taylor, A. G. Brownlee, J. Lee, S. D. Lu, y T, J. White, T. (1992) Molecular evolution of the fungi: relationship of the basidiomycetes, ascomycetes and chytridiomycetes. *Molecular Biology and Evolution.* (9): 285-296.
- Bradford, M. (1976) "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *Anal. Biochem.* **72**:248-254
- Brito Berhouet, A. E., (1995) Las esencias de los Eucaliptos, sus posibilidades industriales. Uruguay Forestal N° 8.
- Browning, B.L., (1967) *Methods of wood chemistry*, Intersci, Public. N.Y., London, vol. 2, p.800

- Chen Z. J., S.C. Kuo, S.C. Chan, F.N. Ko y Ch. M. Teng (1998) Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochemica et Biophysica Acta* 1392:291-299
- Carballo, L.R., (1989) "The influence of chemical composition and age of caribea pine wood (*Pinus caribea*) on the physical and mechanical properties as well as on the yield of sulfite pulp". Report of Candidate Minimum Examination Faculty of wood Techplogy, University College of Forestry and wood Technology. Zvolen. Rep. Eslovaca.
- Carballo, L.R., (1990) "The influence of chemical composition and age of caribea pine wood (*Pinus caribea*) on the physical and mechanical properties as well as on the yield of sulfite pulp". Faculty of wood Technology, University College of Forestry and wood Technology. Dissertation Thesis of the degree of CSc Zvolen. Rep. Eslovaca
- Cornell WD., Cieplak P., Bayly CL., Gould I.R., Merz K.M. Jr., Ferguson DM., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A (1995) A second Generation Force Field for the simulation of proteins, nucleic acids and organics molecules. *J. Am Chem. Soc.* 117,5179-5197
- Coronel, E. O. (1994) Fundamentos de las propiedades físicas y mecánicas de las maderas. Primera Parte. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional Santiago del Estero, Argentina., p.13-28
- Crestini C, Jurasek L, Argyropoulos DS. (2003) On the mechanism of the laccase-mediator system in the oxidation of lignin. *Chemistry*. 9(21):5371-8.
- Deesamer Sujitra, Chavasiri Warinthorn, Chaichit Narongsak, Muangsin nongnuj and Kokpol Udom. (2009) 9-Methoxy-6a, 11a-dimethyl-6a,11a-dihidro-6H-1benzofuro[3,2-c] chromen-3ol from *Dalbergia oliveri* . *Acta Crystallographica Section E*.

- Delserone, L. M. (1992) Differential Toxicity of Enantiomers of Maackiain and Pisatin to Phytopathogenic Fungi. *Phytochemistry* 31, 3813-3819
- 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 num. IRG/WP/12018
- Dirol, D. (1994) Literature survey about factors influencing the variability of wood natural durability for their genetic control. Review report presented for the CONCERTED ACTION No. PL 95-253. CTBA. France
- Ebel, J. (1986) Phytoalexin Synthesis: The Biochemical Analysis of the Induction Process. *Annals Review Phytopathology* 24:235-264
- Fengel, D., Wegener, G. (1984) "Wood Chemistry, Ultrastructure Reaction", Walter de Gruyter, Berlín, p.2-220,
- Frenkel D., B. Smit (1996) *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications*, ISBN 0-12-267370-0
- Fritsche, W., Hofrichter, M. (1999) Aerobic degradation by microorganisms. En: *Advances in biochemical engineering biotechnology*. T. Scheper (Ed.), Springer-Verlag, Vol. 63.
- Fueller, G., Mckee, T. A and Bills, D.D. (1996) Agricultural Materials as Renewable Resources. ACS Symposium, Series 647, p.12-15
- Gianfreda, L., Xu, F. and Bollag, J.M. (1999). Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation J.* **3**; 1-25
- Glenn, J. K., Gold, M. H. (1985) Purification and characterization of an extracellular Mn(II)- dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 242:329-341.

- Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M., Gold, M. H. (1983) An extracellular HB2BOB2B-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 114:1077-1083.
- González J.; Pizzi, A. (1996) Influence of preparation procedure of pine tannin-based cold-set glulam adhesives. Holz-als-Roh-und-Werkstoff, 54:6, 389-392
- Gottfried Kandjoller and Lew Christov. (2002) Catalyst potential of laccase-mediator systems and transition metal polyoxometalates in oxygen bleaching of pulp. Internacional convention center, Durban.
- Gou SH, Qian M, Yu Z, Duan CY, Sun XF, Huang W.(2001) Synthesis, molecular structure and magnetic properties of tetranuclear copper(II) complexes with pendant-arm macrocyclic ligands .Journal of the chemical society-dalton transactions (21): 3232-3237
- Groenier, J. (2006) Preservative-Treated Wood and Alternative Products in the Forest Service, USDA Forest Service, Missoula, MT
- Guardiola, J. L. Y Amparo, G. L. (1995) Fisiología Vegetal, Nutrición y Transporte, Editora Síntesis, Valencia, España, p.27-63,.
- Gundidza M., N. Gaza (1993) Antimicrobial activity of *Dalbergia melanoxylon* extracts, J. Ethnopharmacolo. 40(2): 127-130
- Hamburguer M.O, G.A. Cordell, N. Ruangrunsi tantivatona. (1988) Candanatone a novel purple Pigment from *Dalbergia candenatensis* . J. of Organic Chemistry 53 (18):4161-4165
- Hajare S.W., S. Chandra, S.K. Tandan, J. Sarma, J. Lal y A.G. Telang. (2000) Analgesic and Antipyretic activities of *Dalbergia Sissoo* Leaves. Indian J Pharmacol 2000; 32: 357-360

- Heal, R., Wallace, R., Starnes, O. (1991) *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*, editorial: Academic Press, Inc. San Diego, USA.
- Heinfling, A., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., Bergbauer, M., Szewzyk, U., Martínez, A. T. (1998). A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Lett.* 428:141-146.
- Hibbett, D. S., Donoghue, J. M. 2001. Analysis of Character Correlations among Wood Decay Mechanisms, Mating Systems, and Substrate Ranges in Homobasidiomycetes. *Systematic Biology.* (2): 215-242.
- Hickin, N. (1971) *Wood Preservation, a guide to the meaning of terms*, editorial: Hutchinsion and Co. LTD, Londres,
- Higgins H.G., A.W. McKenzie (1958) The structure and properties of paper. *Australian J. Appl. Sci.* 9(2), p.,167
- Hillis, W. E. (1971) Distribution Properties and Formation of Some Wood Stability. *Wood Sc. Technol.* 5: 272-289
- Hofrichter, M., Wesenberg, D., Rogalski, J. (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic. Microbiol.* 41:185-227
- Huang HW, Sakurai T, Monjushiro H, Takeda S. (1998) Magnetic studies of the trinuclear center in laccase and ascorbate oxidase approached by EPR spectroscopy and magnetic susceptibility measurements. *Biochimica et biophysica acta-protein structure and molecular enzymology* 1384 (1): 160-170
- Hutchins, R. A. (1997) Evaluation of the natural antitermitic properties of *Aleuritis fordii* (tung tree) extracts. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences.* 42: 3, 163-172.

- Hüttermann, A., Mai, C., Kharazipour, A. (2001) Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:387-394.
- Jasalavich, C. A., A. Ostrofsky y J. Jellison. 2000. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. *Applied and Environmental Microbiology.* p.p. 4725-4734.
- Jumpponen A. y L. C. Johnson. (2005) Can rDNA analyses of diverse fungal communities in soil and roots detect effects of environmental manipulations a case study from tallgrass prairie. *Mycologia.* p.p. 1177-1194.
- Kamei, I., H. Suhara y R. Kondo. (2005) Phylogenetical approach to isolation of white-rot fungi capable of degrading polychlorinated dibenzo-p-dioxin. *Applied Microbiology Biotechnology.* (69): 358-366
- Khurram S., S. Vigar, A. Jehan, E.H. Syed (1997) Nematicidal activity of some medicinal plants. *Pakistan Journal of Nematology* 15(1-2):101-105
- Kirk, T. K., Chang, H. M. (1975) Decomposition of lignin by white-rot fungi. II. Characterization of heavily degraded lignins from decayed spruce. *Holzforschung* 29:56-64.
- Kirk, T. K., Farrell, R. L. (1987) Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:465-505.
- Kirk, T. K., Farrell, R. L. (1987) Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:465-505.

- Klonowska, A., C. Gaudin, M. Ruzzi, M. C. Colao y T. Tron. (2003) Ribosomal DNA sequence analysis shown that the basidiomycetes C30 belongs to the genus *Trametes*. *Research in Microbiology*. (154): 25-8.
- Kuc, J. (1995) Phytoalexins, Stress Metabolism and Disease Resistance in Plants. *Annual Review Phytopathology* 33:273-297
- Lakes, P.E. & Mc.Kaig, P.A. (1988) Flavonoid biocides: wood preservatives based on Condensed tannins. *Holforschung*. Berlin. V. 42. No. 5. 299-306pp
- Leach A.R, *Molecular Modelling: Principles and Applications* (2001) ISBN 0-582-38210-6
- Leonowicz, A., Cho, N. S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., Rogalski, J. (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J basic Microbiol*. 41:185-220.
- Lee, J-S., K. S. Ko y H. S. Jung. (2000) Phylogenetic analysis of xilaria based on nuclear ribosomal ITS 1-5. 8S-ITS2 sequences. *FEBS Letters*. (187): 89-93
- Lee SK, George SD, Antholine WE, Hedman B, Hodgson KO, Solomon E. I. (2002) Nature of the intermediate formed in the reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. *Journal of the american chemical society* 124 (21): 6180-6193
- Lin, S. Y., Dence, C. W. (1992) *Methods in lignin chemistry*. Springer-Verlag, Berlin.
- Mabberley D.J. (1987) *The plant book*. Cambridge University Press. Cambridge. USA
- MacVaugh, R. (1987). *Flora Novo-Galiciana*. Vol 5 Leguminosae. The University of Michigan Press. Ann Arbor. 786 pp.

- Mahan B. M., Myers R. J.,(1990) —Química, Curso universitario”, cap. 1, editorial Addison-Wesley Iberoamericana, 4ª edición, Wilmington, Delaware, E. U. A.
- Marx-Figini, M. (1964) Papier, 18,p. 546-549
- McDonald, M.: Mila,I. & Scalbert, A. (1996) Precipitation of metal ions by plant polyphenols: optimal conditions and origin of precipitation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44:2, 599-606 pp.
- McMurry T.B.H. and Martin E. (1972). 3-HYDROXY-9-METHOXY AND 3-METHOXY-9-HYDROXYPTEROCARPANS . Phytochemistry 1972, Vol. 11, pp. 3283-3286
- Mila, I.; Mc.Donald, M.; Scalbert, A. 1995. Precipitation of cupric ions by polyphenols – application to wood preservation. Polyphenols 94: 17 International Conference, Palma de Mallorca, Spain. 23-27 Mayo 1994. Les Colloques No. 69. 365-366 pp
- Miller, D. K.; Sadowski, S.; Joshua, H. (1985) Medicarpin Derivatives and Analogs. Chem. Abst. 180, 103-189.
- Miller, D. K.; Sadowski, S.; Han, G. Q.; Joshua, H.(1989) Identification and isolation of Medicarpin and A Substituted Bensofuran as Potent Leukotriene Inhibitors in an Anti-inflammatory Chinese Herb. Prostag. Leukotr. Ess. 38, 137-143
- Mester, T., Field, J. A. (1998). Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. J. Biol. Chem. 273:15412-15417.
- Moncalvo, J. M., F. M. Lutzoni, S. A. Rehner, J. Jonson y R. Vilgalys. 2000. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *System Biology*. (49): 278-305.
- Moncalvo, J. M., R. Vilgalys, S. A. Redhead, J. E. Johnson, T. Y. James, A. M. Catherine, V. Hofstetter, S. J. Verduin, E. Larsson, T. J. Baroni, T. R. Greg, S.

Jacobsson, H. Clémenton y O. Jr. Miller. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. (23): 357-400.

- Mora, N. y O. Encinas (2001) Evaluación de la durabilidad natural e inducida de *Pterocarpus acapulcensis*, *Tabebuia serratifolia* y *Pinus caribaea*, en condiciones de laboratorio. *Revista Forestal Venezolana* 45(1):23-31
- Militão GC, Jimenez PC, Wilke DV, Pessoa C, Falcão MJ, Sousa Lima MA, Silveira ER, de Moraes MO, Costa-Lotufo LVA (2005) Antimitotic properties of pterocarpan isolated from *Platymiscium floribundum* on sea urchin eggs. *Planta Med.* Jul;71(7):683-5
- Nagai T., Iwata K., Park E.S., Kubota, M., Mikoshiba K., Miyawaki A. (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20:87–90
- Palmieri G. Giardina P. Bianco C. Scaloni A. Capasso A & Sannia G (1977) A novel laccase from *Pleurotus ostreatus* *J. Biol. Chem.* 272:31301-31307
- Pizzi, A.; Baecker, A. (1996) A new boron fixation mechanism for environment friendly Wood preservatives. *Holzforschung.* 50:6. 507-510pp
- Pizzi, A.; Bruce, A.; Palfreyman, J.W. (1998) Wood/bark extracts as adhesives and Preservatives. *Forest-products-biotechnology*, 167-182.
- Ralph J, Lapierre C, Marita J, Kim H, Lu F, Hatfield RD, Ralph SA, Chapple C, Franke R, Hemm MR, Van Doorselaere J, Sederoff RR, O'Malley DM, Scott

JT, MacKay JJ, Yahiaoui N, Boudet A-M, Pean M, Pilate G, Jouanin L, Boerjan W. (2001) Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochem.* 57: 993-1003

- Rapaport D.C., *The Art of Molecular Dynamics Simulation*,(2004) ISBN 0-521-82586-7
- Reichling J. (1999) Plant-Microbe Interactions and Secondary Metabolites with Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties. In: Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Wink M (ed) Sheffield Academy Press. USA
- Reinhamar, B. (1984) Laccase. En: Copper proteins and copper enzymes. R. Lontie (Ed.), CRC Press. Boca Raton, pp 1-35.
- Richter H. G., U.J. Krause and Claudia Muche (1996) *Dalbergia congestiflora* Standl.: Wood structure and physico-chemical properties compared with other central American species of Dalbergia.
- Runkel, R.O.H. y K.D. Wilke (1951) Zur Kenntnis des thermoplastischen Verhaltens von Holz. *Holz Roh Werkst.* (9)7: 260-270
- Rutiaga Quiñones J. G, E. Windeisen y P. Shumacher. (1995) Antifungal activity of heartwood extracts from *Dalbergia granadillo* and *Enterolobium cyclocarpum*. *Holz als Roh-und Werkstoff.* 53(5):308
- Rutiaga Quiñones J.G. (2001). Chemische und Biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber Holzabbauenden Pilzen. Buchverlag Gräffelfing, München
- Sakakibara, K. and Neish, A.C. (1980) *Technology* 14,p. 80-100

- Santagostini L, Gullotti M, De Gioia L, Fantucci P, Franzini E, Marchesini A, Monzani E, Casella L.(2004) Probing the location of the substrate binding site of ascorbate oxidase near type 1 copper: an investigation through spectroscopic, inhibition and docking studies. *International journal of biochemistry & cell biology* 36 (5): 881-892
- Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. (Sambrook and Russell cites the paper: Glasel J. (1995). "Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios". *BioTechniques* 18: 62–63.)
- Serway, Moses et Moyen (2004) *Modern Physics*, 3rd edition, Brooks Cole.
- Shah, V., Nerud, F. (2002) Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Can. J. Microbiol* .48:857-870.
- Shimada, M., Higuchi, T. (1983) Recent advances in lignin biodegradation research. En: *Recent advances in lignin biodegradation research*. T. Higuchi, H. M. Chang y T. K. Kirk (Eds.), Uni Publishers. Tokio, pp 195-208.
- Sing, A.P. & Kim, Y.S., (1997) Biodegradation of wood in wet environments: a review. The International research Group of Wood Preservation. Document No. IRG/WP 97-10217.
- Singh Jagdish P, Singh Alok K., Singh Archana and Ranjan Rakesh, (2009) CHEMICAL CONSTITUENTS OF *ARTABOTRYS ODORATISSIMUS* (SEEDS), *RASAYAN J.Chem* Vol.2, No.1 156-158
- Sjöström, E. (1981) "Wood chemistry fundamentals and applications". New York, Academic Press.p. 98-103, 223

- Smith, D. G. (1971) Nature of the phytoalexin produced by alfalfa in response to fungal infection. *Physiol. Plant Path.* 1, 41-44
- Smulski, S. (1997) Controlling indoor moisture sources in wood-frame houses. *Wood-Design-Focus.* 8:4. 19-24 pp.
- Solomon E, Sundaram U, Machonkin T. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical reviews* 96 (7): 2563-2605
- Souza Brito R.M., S. Cota, D.S. Nunes (1997) Gastric antiulcerogenic effects of *Dalbergia monetaria* L. in rats. *Phytotherapy Research* 11(4):314-316
- Taiz, L., Zeiger E. (1991) *Plant Physiology.* The Benjamin/Cummings. Redwood City, California. U.S.A. 316 p.
- Tanner, W. and Loewus, F. A. (1981) Extracellular carbohydrates, *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, vol.13B, Plant Carbohydrates II, N.Y*
- Tehler, A., J. S. Farris, D. L. Lipscomb y M. Källersjo. (2000) Phylogenetic analyses of the fungi based on large rDNA data sets. *Mycologia.* (92): 459- 474.
- Tien, M., Kirk, T. K. (1983) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. *Science* 221:661-663.
- Tien, M., Kirk, T. K. (1984) Lignin degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2280-2284.
- Tsiri, D.; Chinou, I.; Halabalaki, M.; Haralampidis, K.; Ganis-Spyropoulos, C. (2009) The origin of copper-induced medicarpin accumulation and its secretion

from roots of young fenugreek seedlings are regulated copper concentration.  
Plant Sci. , 176, 367-374

- Tsoumis G. (1991) Science and Technology of Wood. Van Nostrand reinhold. New York. 494 pp
- Van Elsas, J. D., D. G. Frois, W. A. Keijzer y E. Smit. (2000) Analisis of dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Microbiological Methods. (43): 133-151.
- Velásquez, J. (2000) Durabilidad inducida de la Madera de Pino caribe (*Pinus caribaea var. hondurensis*) con extractos de algunas latifoliadas de durabilidad natural elevada. Tesis Magister Scientiae. ULA, Mérida Venezuela. 51 p.
- Vilgalys, R. y B. L. Sun. (1994) Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (91): 4599-4603.
- Vilgalys R. (2007) Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA.  
<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>
- Weissenfeld, P. (1998) Holzschutz ohne gift. Okobuch Verlag Staufen bei Freiburg.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee y J. W. Taylor. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols:

a guide to methods and applications. Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, San Diego California, USA. p.p. 315-322.

- Willeitner, H. (1991). Wo stech der holzschutz heute?. Holz. als. Roh-u. Werkstoff 41-49 pp
- Wise, L.E., Murphy, M. y D'Adieco, A. (1946) –*Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and studies on the hemicelluloses*” Paper Trade J. 122, 2, 35-43.
- Yoshida, H. (1883). Chemistry of lacquer (Urushi). J Chem Soc 43:472-486
- Tsunoda Yuki, Okawa Masafumi, Kinjo Junei, Ikeda Tsuyoshi, and Nohara Toshihiro (2008) Studies on the Constituents of *Gueldenstaedtia multiflora*. *Chem. Pharm. Bull.* **56**(8) 1138—1142
- Zervakis, G. I., J. M. Monclava y R. Vilgalys, R. (2004) Molecular phylogeny biogeography and speciation of the musroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology.* (150): 715-726
- Vignote, S., Jiménez, F. J., (2000)*Tecnología de la Madera*, editorial: Ministerio de Agricultura y Pesca, Madrid.