



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA  
DE LA MADERA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA**

**TESIS:**

**CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE LA MEDICARPINA SOBRE HONGOS  
XILÓFAGOS Y PATÓGENOS DE ÁRBOLES MADERABLES**

**Que presenta:**

**Q.F.B. RAFAEL AYALA PONCE**

**para obtener el título de**

**MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA**

**Directores de Tesis:**

**D.C. RAFAEL HERRERA BUCIO  
D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

**Morelia, Michoacán, Septiembre de 2020**

**LA PRESENTE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADA EN LOS LABORATORIOS DE QUÍMICA ORGÁNICA Y DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN Y ASESORÍA DE LOS DRES. RAFAEL HERRERA BUCIO Y RAFAEL SALGADO GARCIGLIA. ES PARTE DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN APOYADO POR LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA (CIC 2.10 RSG 2018-2020).**



## **Dedicatoria**

Dedico con mucho cariño este trabajo de tesis a mis queridos padres, quienes me dieron todo su apoyo incondicional para que yo pudiera concluir este posgrado, así como todo el resto de mi familia que colaboraron y me acompañaron a lo largo de este proceso.

## **Agradecimientos**

A Dios, por permitirme culminar un logro más, y afrontar todos los retos que hay detrás de toda esta travesía. Asimismo, a mis padres Luis Ayala García y Silvia Ponce Betancio, quienes, con sus consejos y cariño incondicional, demostraron ser el apoyo más grande que tengo en mi vida.

Al Dr. Rafael Salgado Garciglia, por haber confiado en mí para llevar a cabo el presente trabajo, y abrirme las puertas de su laboratorio, por ser un excelente investigador en toda la extensión de la palabra, así como nutrirme de consejos, enseñanzas y las herramientas académicas necesarias para llevar a cabo este trabajo. Por eso y mucho más, MUCHAS GRACIAS.

Al Dr. Rafael Herrera Bucio, por aceptarme como estudiante del programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera, por sus enseñanzas que fueron de infinita utilidad, así como poner a mi disposición su laboratorio de Química Orgánica para realizar el presente trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en especial al Posgrado de Ciencia y Tecnología de la Madera (POSTECMA), así como a la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, por darme la oportunidad de realizar estos estudios de maestría.

Al CONACYT por la beca otorgada para cursar esta maestría

Al M.C. Fredy Geovannini Morales Palacios, por haberme capacitado y apoyarme para usar las técnicas y equipos necesarios para realizar los experimentos del presente trabajo.

A la M.C. Alejandra Hernández García, técnico del laboratorio de Biotecnología Vegetal por sus consejos, paciencia y apoyo brindado desde mi llegada, infinitas gracias.

A mis compañeros de ambos laboratorios, por todo el compañerismo, amistad y comunicación brindado a mi persona, lo cual contribuyó a ser más fácil y ameno el trabajo.

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE CUADROS	<i>i</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>ii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
ABSTRACT	<i>v</i>
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. HONGOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES EN ÁRBOLES MADERABLES Y DEGRADADORES DE MADERA	4
2.2. MÉTODOS DE CONTROL DE HONGOS EN ÁRBOLES MADERABLES Y EN MADERA	7
2.3. COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	11
2.3.1. Árboles maderables fuente de antifúngicos	14
2.3.2. Ensayos <i>in vitro</i> para la determinación de actividad antifúngica	18
2.4. (+)-MEDICARPINA	20
2.5. <i>Andira inermis</i> (W. WRIGHT) D.C. (FABACEAE)	22
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVO GENERAL	28
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29

	Pág.
<b>7. RESULTADOS</b>	30
<b>7.1. CAPÍTULO I. Actividad antifúngica del extracto del duramen de <i>Andira inermis</i> sobre hongos xilófagos y fitopatógenos</b>	30
Resumen	30
Abstract	30
Introducción	31
Materiales y Métodos	33
Material biológico	33
<i>Andira inermis</i>	33
Hongos xilófagos ( <i>Irpex lacteus</i> , <i>Phlebiopsis</i> sp. y <i>Trametes versicolor</i> )	33
Hongos fitopatógenos ( <i>Alternaria solani</i> y <i>Fusarium solani</i> )	33
Obtención del extracto de <i>Andira inermis</i>	33
Ensayos antifúngicos	34
Análisis estadístico	35
Resultados y Discusión	35
Efecto antifúngico del extracto de <i>Andira inermis</i>	37
Conclusiones	41
Referencias	41
<b>7.2. CAPÍTULO II. Actividad antifúngica de (+)-medicarpina purificada del extracto de duramen de <i>Andira inermis</i> sobre hongos xilófagos y fitopatógenos</b>	45
Resumen	45
Abstract	46
Introducción	48
Materiales y Métodos	48
Material biológico	48
Hongos xilófagos ( <i>Irpex lacteus</i> , <i>Phlebiopsis</i> sp. y <i>Trametes versicolor</i> )	48
Hongos fitopatógenos ( <i>Alternaria solani</i> y <i>Fusarium solani</i> )	49
Purificación de (+)-medicarpina	49
Ensayos antifúngicos	50
Análisis estadístico	50
Resultados y Discusión	51
Efecto antifúngico de (+)-medicarpina	55
Conclusiones	56
Referencias	56

	<b>Pág.</b>
<b>7.3. CAPÍTULO III. Evaluación y pruebas de eficiencia antifúngica del extracto y (+)-medicarpina purificada del duramen de <i>Andira inermis</i> sobre <i>Trametes versicolor</i> en bloques de madera de <i>Ficus benjamina</i>.</b>	60
Resumen	60
Abstract	61
Introducción	61
Materiales y Métodos	63
Material biológico	63
<i>Ficus benjamina</i>	63
Hongo xilófago ( <i>Trametes versicolor</i> )	63
Purificación de (+)-medicarpina	64
Ensayo de eficiencia antifúngica	64
Análisis estadístico	65
Resultados y Discusión	65
Efecto antifúngico del extracto y (+)-medicarpina purificada en bloques de madera inoculados con <i>T. versicolor</i>	66
Efecto del extracto y (+)-medicarpina sobre el deterioro y crecimiento de micelio en bloques de madera infestados con <i>T. versicolor</i>	68
Efecto del extracto y (+)-medicarpina sobre la pérdida de masa en bloques de madera infestados con <i>T. versicolor</i>	69
Conclusiones	71
Referencias	71
<b>7.4. CAPÍTULO IV. Avances sobre los estudios de la simulación computacional enzima-ligando por Autodock Tools, utilizando (+)-medicarpina.</b>	75
Resumen	75
Abstract	75
Introducción	75
Metodología	76
Análisis de los resultados	77
Conclusiones	80
Referencias	80
<b>8. CONCLUSIONES GENERALES</b>	81
<b>9. LITERATURA CITADA GENERAL</b>	82
<b>10. ANEXOS</b>	96

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Especies vegetales de las que se derivan moléculas con actividad antifúngica sobre hongos fitopatógenos.	14
<b>Cuadro 2.</b> Especies maderables de las que se derivan moléculas con actividad antifúngica contra hongos xilófagos.	15
<b>Cuadro 3.</b> Valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) y concentración letal total (CL <sub>100</sub> ) del extracto de <i>A. inermis</i> , observados en los hongos xilófagos y fitopatógenos (a los 8 días del cultivo), en ensayos con el extracto del duramen de <i>A. inermis</i> .	39
<b>Cuadro 4.</b> Valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) y concentración letal total (CL <sub>100</sub> ) observados en los hongos xilófagos y fitopatógenos (a los 8 días del cultivo) en ensayos con (+)-medicarpina.	54



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura química de (+)-medicarpina [(+)-3-hidroxi-9-metoxipterocarpano].	20
<b>Figura 2.</b> Árbol (A), rodaja de madera (B) y tablilla de madera (C) de <i>Andira inermis</i> (Fotografías tomadas de Téllez-Sánchez <i>et al.</i> 2009).	23
<b>Figura 3.</b> Rendimiento del extracto de duramen del fuste de <i>Andira inermis</i> por cada 60 g de harina/L de acetato de etilo bajo extracción en sistema Soxhlet.	36
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de inhibición del extracto de <i>Andira inermis</i> sobre: A) hongos xilófagos ( <i>Irpex lacteus</i> , <i>Phlebiopsis sp.</i> y <i>Trametes versicolor</i> ); y B) hongos fitopatógenos ( <i>Alternaria solani</i> y <i>Fusarium solani</i> ). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ , $n=3$ , prueba de Tukey).	38
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de inhibición de (+)-medicarpina sobre: A) hongos xilófagos ( <i>Trametes versicolor</i> , <i>Phlebiopsis sp.</i> e <i>Irpex lacteus</i> ); y B) hongos fitopatógenos ( <i>Fusarium solani</i> y <i>Alternaria solani</i> ). A los 8 días del cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ , $n=3$ , prueba de Tukey).	52
<b>Figura 6.</b> Crecimiento de <i>T. versicolor</i> después de 30 días del ensayo sobre cubos de <i>F. benjamina</i> con los diferentes tratamientos: A) metanol (control negativo); B) CL <sub>100</sub> del extracto (0.24 mg/L) de <i>A. inermis</i> ; C) CL <sub>50</sub> del extracto (CL <sub>50</sub> =0.11 mg/L) de <i>A. inermis</i> ; D) benomilo (control positivo, CL <sub>100</sub> =0.26 mg/L); E) CL <sub>100</sub> de (+)-medicarpina (CL <sub>100</sub> =0.81 mg/L); F) CL <sub>50</sub> (+)-medicarpina (CL <sub>50</sub> =0.31 mg/L).	67
<b>Figura 7.</b> Crecimiento de micelio de <i>T. versicolor</i> después de 30 días de incubación sobre cubos de <i>F. benjamina</i> en microscopio: A) Muestra transversal de cubo con tratamiento CL <sub>100</sub> de <i>A. inermis</i> (10X); B) vaso con crecimiento de micelio de cubo tratado con CL <sub>100</sub> de <i>A. inermis</i> (40X); C) Vaso con crecimiento de micelio en cubo tratado con CL <sub>50</sub> de (+)-medicarpina (40X); y D) Vaso con crecimiento de micelio en cubo tratado con metanol (40X).	68
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de pérdida de masa en bloques de madera en los diferentes tratamientos de CL <sub>100</sub> y CL <sub>50</sub> del extracto (ECL100 y ECL50) y la (+)-medicarpina (MCL100 y MCL50) de <i>A. inermis</i> , y con metanol (MeOH), agua estéril (H <sub>2</sub> O) y el benomil, sobre <i>Trametes versicolor</i> . Después de 30 días de incubación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ , $n=3$ , prueba de Tukey).	70

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 9.</b> Simulación computacional enzima-sustrato de Proteasa Aspártica de <i>I. lacteus</i> y (+)-medicarpina: A) 10% de los confórmeros; B) 55% de los confórmeros.	77
<b>Figura 10.</b> Simulación computacional enzima-sustrato de Cutinasa de <i>F. solani</i> y (+)-medicarpina: A) 40% de los confórmeros B) 23% de los confórmeros.	78
<b>Figura 11.</b> Simulación computacional enzima-sustrato de Lacasa de <i>T. versicolor</i> y (+)-medicarpina: A) Centro T1 con 35% de los confórmeros B) Centro TNC con 23% de los confórmeros.	79

## RESUMEN

En esta investigación se evaluó la actividad antifúngica del extracto con acetato de etilo y (+)-medicarpina, obtenidos del duramen de *Andira inermis* (almendra de río). El extracto se obtuvo por el método Soxhlet, determinando un óptimo rendimiento de 3.77 g/60 g de duramen a la 10 h de reflujo, que posteriormente al proceso de purificación y cuantificación de (+)-medicarpina por cromatografía en capa fina y espectrofotometría, mostró un contenido de 4.3 mg/mL de (+)-medicarpina. La confirmación de la pureza de la (+)-medicarpina se realizó con el compuesto aislado por cromatografía en columna con mezclas de acetato de etilo y hexano, utilizando resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H). La actividad antifúngica *in vitro* se determinó tanto con el extracto como con (+)-medicarpina en diferentes concentraciones (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/mL), sobre el crecimiento micelial de tres hongos xilófagos (*Trametes versicolor*, *Irpex lacteus* y *Phlebiopsis* sp.) y dos fitopatógenos (*Fusarium solani* y *Alternaria solani*). Se utilizó el método de difusión en agar con pozos, usando metanol como vehículo de dilución (control negativo) y el fungicida comercial benomilo a 1 mg/mL (control positivo). A los 8 días de incubación en medio PDA (papa-dextrosa-agar), a 28 °C en condiciones de oscuridad, se evaluaron los porcentajes de inhibición y se estableció la concentración mínima inhibitoria (CMI) tanto del extracto como de la (+)-medicarpina, así como la CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub>. El extracto mostró un 100% de inhibición sobre los hongos xilófagos, con una CMI de 0.05 mg/mL y valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub> relativamente bajos en *T. versicolor* y *Phlebiopsis* sp (CL<sub>50</sub>=0.11 mg/mL y CL<sub>100</sub>=0.24 mg/mL) y en *I. lacteus* (CL<sub>50</sub>=0.28 mg/mL y CL<sub>100</sub>=0.69 mg/mL). Sin embargo, la inhibición del extracto en los hongos fitopatógenos fue menor, obteniendo una CMI de 0.25 mg/mL y valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub> más altos tanto para *A. solani* (CL<sub>50</sub>=0.39 mg/mL y CL<sub>100</sub>=0.87 mg/mL) como para *F. solani* (CL<sub>50</sub>=0.41 mg/mL y CL<sub>100</sub>=0.98 mg/mL). Así mismo, aunque la (+)-medicarpina ejerció un 100% de inhibición sobre los hongos xilófagos, presentó valores de CMI, CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub> (0.25 mg/mL, 0.31 a 0.48 mg/mL, 0.8 a 1.1 mg/mL, respectivamente), significativamente mayores a lo mostrado por el extracto. Un efecto similar fue observado sobre los hongos fitopatógenos (*A. solani* y *F. solani*), pero con resultados mayores, ya que presentaron una CMI de 0.75 mg/mL y valores de CL<sub>50</sub> de 1.0 mg/mL y de CL<sub>100</sub> de 2.0 mg/mL. Con estas concentraciones de CL<sub>50</sub> y de CL<sub>100</sub>, se determinó la actividad protectora antifúngica tanto del extracto como de la (+)-medicarpina en ensayos *in vitro*, con el método de impregnación de bloques de madera (1.2 x 1 x 0.5 cm) de *Ficus benjamina*, utilizando un volumen de 15 mL de ambas muestras y un tiempo de inmersión de 8 h. Los bloques de madera posteriormente fueron cultivados en medio agar-agua por 30 días (28 °C), los cuales fueron inoculados con segmento de micelio (discos de 5 mm de diámetro) de *T. versicolor*. Al final del experimento, se obtuvo un 20% de inhibición antifúngica con la CL<sub>100</sub> tanto del extracto como de la (+)-medicarpina, similar al observado por el benomilo, en comparación a la nula actividad antifúngica en los bloques tratados con metanol. Con este ensayo, se obtuvieron valores mínimos de pérdida de masa en los bloques inoculados (11.03-17.06%), sin diferencia a lo mostrado por el benomilo y menores a los presentados por el control negativo (metanol) (22.5%). Los resultados de esta investigación demuestran el efecto antifúngico tanto del extracto como de la (+)-medicarpina de duramen de *A. inermis*, sobre hongos xilófagos y fitopatógenos, así como una significativa protección al deterioro en los bloques de madera de *F. benjamina* inoculados con *T. versicolor*.

**Palabras Clave:** *Andira inermis*, antifúngicos, hongos fitopatógenos, hongos xilófagos, (+)-medicarpina.

## ABSTRACT

This research evaluated the antifungal activity of the ethyl acetate extract and (+)-medicarpine, obtained from the Duramen of *Andira inermis* (river almond). The removable was obtained by the soxhlet method, determining an optimal performance of 3.77 g/60 g of duration at 10 h of reflux, which subsequently to the process of purification and quantification of (+)-medicarpine by thin layer chromatography and spectrophotometry, showed a content of 4.3 mg/mL of (+)-medicarpin. The purification of (+)-medicarpin was performed by column chromatography with mixtures of ethyl acetate and hexane, with confirmation of its purity with nuclear magnetic resonance (RMN-<sup>1</sup>H). *In vitro* antifungal activity was determined with both extract and (+)-medicarpin at different concentrations (0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 and 10 mg/mL), on the micellial growth of two phytopathogens fungi (*Fusarium solani* and *Alternaria solani*) and three xylophagous fungi (*Trametes versicolor*, *Irpex lacteus* and *Phlebiopsis* sp.). The agar well diffusion method was used, with methanol as a dilution vehicle (negative control) and the commercial fungicide benomyl [1-(butylcarbamoil) benzimidazole-2-ylcarbamate methyl] at 1 mg/mL (positive control). At 8 days of incubation in PDA (papa-dextrose-agar), at 28 °C in dark conditions, inhibition percentages were obtained and the minimum inhibitory concentration (MIC) of both extract and (+)-medicarpin, as well as CL<sub>50</sub> and CL<sub>100</sub>, were established. The extract showed 100% inhibition on xylophagous fungi, with a MIC of 0.05 mg/mL and relatively low CL<sub>50</sub> and CL<sub>100</sub> values on *T. versicolor* and *Phlebiopsis* sp. (CL<sub>50</sub>=0.11 mg/mL and CL<sub>100</sub>=0.24 mg/mL) and on *I. lacteus* (CL<sub>50</sub>=0.28 mg/mL and CL<sub>100</sub>=0.69 mg/mL). However, the inhibition of extract in phytopathogenic fungi was less, obtaining a higher 0.25 mg/mL MIC and CL<sub>50</sub> and CL<sub>100</sub> values for both *A. solani* (CL<sub>50</sub>=0.39 mg/mL and CL<sub>100</sub>=0.87 mg/mL) and for *F. solani* (CL<sub>50</sub>=0.41 mg/mL and CL<sub>100</sub>=0.98 mg/mL). Although (+)-medicarpin exerted 100% inhibition on xylophagous fungi, it had values of MIC, CL<sub>50</sub> and CL<sub>100</sub> (0.25 mg/mL, 0.31 to 0.48 mg/mL, 0.8 to 1.1 mg/mL, respectively), significantly higher than the extract. A similar effect was observed on phytopathogenic fungi (*A. solani* and *F. solani*), but with higher results, as they had a MIC of 0.75 mg/mL and CL<sub>50</sub> values of 1 .0 mg/mL and CL<sub>100</sub> of 2.0 mg/mL. With these concentrations of CL<sub>50</sub> and CL<sub>100</sub>, the antifungal protective activity of both extract and (+)-medicarpin was determined in *in vitro* assays, using the method of impregnation of wood blocks (1.2 x 1 x 0.5 cm) of *Ficus benjamina*, using a volume of 15 mL of both samples and an immersion time of 8 h. The wooden blocks were subsequently grown in agar-water medium for 30 days (28 °C), which were inoculated with mycelium segment (5 mm diameter discs) of *T. versicolor*. At the end of the experiment, 20% antifungal inhibition was obtained with CL<sub>100</sub> from both extract and (+)-medicarpin, similar to that observed by benomyl, compared to no antifungal activity in blocks treated with methanol. With this assay, minimum mass loss values were obtained in the inoculated blocks (11.03-17.06%), without difference to what was shown by benomyl and less than those presented by negative control (methanol) (22.5%). The results of this research demonstrate the antifungal effect of both the extract and (+)-medicarpin of *A. inermis* heartwood on xilophagous and phytopathogen fungi, as well as significant protection for deterioration in *F. benjamina* wood blocks inoculated with *T. versicolor*.

**Keywords:** *Andira inermis*, antifungal, phytopathogenic fungi, xylophagous fungi, (+)-medicarpin.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Una de las problemáticas en el sector forestal y las industrias madereras es causada por la degradación de materia lignocelulósica e infección por agentes bióticos como insectos, hongos, oomicetos y/o bacterias. Los árboles de las plantaciones forestales comerciales están sujetos al ataque de estos agentes causantes de plagas y enfermedades. El control sobre las enfermedades ocasionadas por hongos se considera como el más importante ya que muchos de ellos atacan el sistema de raíces (pudrición de la raíz) en plántulas de vivero y de plantas adultas establecidas en campo (Boyd *et al.*, 2013). Además de las enfermedades producidas en plantaciones agrícolas y forestales, los hongos también pueden causar problemas en la madera, ya sea como materia prima o productos terminados (Clausen, 2010).

Por otra parte, uno de los productos más importante derivado de árboles, es la madera, la que dependiendo de la especie proveniente, del tratamiento a la que se somete para su preservación y de las condiciones de almacén, está sometida a distintos tipos de deterioro por agentes bióticos y abióticos, destacándose los agentes bióticos por la gravedad de los daños que causan, como son los hongos degradadores de madera (xilófagos) y termitas, que originan las mayores pérdidas en volumen de madera con y sin valor agregado (Trujillo *et al.*, 1985).

Por lo anterior, en diversas investigaciones se han estudiado tanto los hongos que deterioran a la madera como aquellos que causan enfermedades en plantas de vivero o de plantaciones. Entre los primeros se encuentran los basidiomicetes y ascomicetes, así como de sus formas imperfectas, los deuteromicetes, que producen diversos tipos de pudriciones que afectan a la celulosa (pudrición destructiva), cuyos hongos causales son *Serpula lacrimans*, *Poria* spp. y *Coniophora puteana*; a la lignina (pudrición blanca) ocasionada por *Trametes* spp., *Ilex* spp., *Coriolus versicolor*, *Fomes* sp., *Pholiota* sp., *Pleurotus* sp. y *Phlebiopsis* spp.; y otros hongos que pueden ser tanto ascomicetes (*Chaetomium* spp., *Xylaria* spp., *Hypoxylon* spp.), deuteromicetes

(*Alternaria* spp., *Coniothyrium* spp., *Hemicola* spp., *Stemphylium* spp. y *Stysanus* spp.), que se alimentan principalmente de la celulosa, denominada pudrición blanda (CONAFOR, 2010).

Entre las estrategias actuales para controlar el daño que provocan tanto los hongos patógenos de árboles maderables como los degradadores de madera, está la aplicación de fungicidas como el ácido bórico, compuestos cuaternarios de amonio, mancozeb (fungicida) y los triazoles (Schmidt, 2007; Axelstad *et al.*, 2011; Bahraminejad *et al.*, 2011). Debido a la baja resistencia natural de algunas especies maderables, se requiere de tratamientos conservantes para mejorar su rendimiento y vida útil en sus diferentes usos. La mayoría de las maderas de baja durabilidad en el mercado son tratadas al vacío y a presión por métodos industriales con conservantes hechos a base de agua y de sales metálicas, que tienen una alta eficiencia para proteger la madera de los organismos que la destruyen (Lebow, 2010; Bolin y Smith, 2011). Sin embargo, Lin *et al.* (2009) y Kartal *et al.* (2015) mencionan que estos conservantes están hechos a base de metales pesados e incluyen diversos químicos, como arsénico, cromo, cobre y boro, que son considerados como contaminantes de alto riesgo.

Las consecuencias citadas por el uso de estos compuestos son el daño a corto plazo, por alterar las comunidades microbianas del suelo, así como efectos negativos en la salud humana (Schmidt, 2007; Milenkovski *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2013; Tetiana *et al.*, 2014). Además, la utilización de éstos, elevan el costo de los procesos y se requieren cuidados especiales para que se mantenga un período óptimo de la vida útil de la madera tratada, lo que representa un peligro en la eliminación y reutilización de este material (Wang *et al.*, 2016).

Los extractos derivados de plantas, como las medicinales herbáceas, algunos arbustos y hasta de árboles como coníferas y latifoliadas, se estudian desde hace varios años con fines de identificar extractos y compuestos con actividad antifúngica y

antimicrobiana, ya que desempeñan una función importante en la protección de la madera, como una alternativa sustentable, ya que son una opción esencial a los fungicidas sintéticos y tienen un impacto ambiental mínimo en ensayos de laboratorio (Verma y Dubey, 1999; Nakayama *et al.*, 2001; Rutiaga, 2001; Kiran y Raveesha, 2006; Mburu *et al.*, 2007; Syofuna *et al.*, 2012; Kirker *et al.*, 2013; Tascioglu *et al.*, 2013; Mohammed *et al.*, 2016).

Tal es el caso de algunas especies pertenecientes a la familia Fabaceae como *Dalbergia congestiflora* o *Andira inermis*, maderas de las cuales Martínez-Sotres *et al.* (2012) y Morales (2014), respectivamente, lograron extraer y purificar el metabolito (+)-3-hidroxi-9-metoxipterocarpano o medicarpina, un isoflavonoide tipo pterocarpano, del grupo de las fitoalexinas. Además, se ha demostrado su capacidad antifúngica sobre el hongo xilófago *Trametes versicolor* (Martínez-Sotres *et al.*, 2012).

La actividad de la medicarpina observada contra el hongo *T. versicolor*, la propone con un alto potencial antifúngico para ser probada con otros hongos xilófagos, pero también contra ciertos hongos fitopatógenos, además, de obtenerla de otras fuentes maderables, que muestren un mayor rendimiento, o bien, que seas especies forestales en riesgo de extinción como es el caso para diversas especies del género *Dalbergia*. Es por ello, que, en la presente investigación, se estableció como objetivo general el evaluar la actividad antifúngica del extracto y de la medicarpina purificada del duramen de *A. inermis*, sobre los hongos fitopatógenos *Alternaria solani* y *Fusarium solani*, y hongos degradadores de madera (xilófagos) como *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus* y *Phlebiopsis* sp.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. HONGOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES EN ÁRBOLES MADERABLES Y DEGRADADORES DE MADERA

Los agentes que causan daños en plantas maderables y no maderables pueden ser infecciosos (bióticos o vivos) y no infecciosos (abióticos o no vivos). Estos agentes bióticos incluyen las bacterias, hongos, micoplasmas, nemátodos y virus, aunque los agentes patógenos más comunes en las plantas son los hongos. Los hongos son organismos filamentosos simples, no tienen clorofila y dependen de una planta hospedera para obtener su alimento. Son más grandes que las bacterias y se identifican más fácilmente algunas de las estructuras que producen se pueden ver a simple vista y sirven en su identificación (Lundell *et al.*, 2014).

En nuestro país, se han identificado una gran variedad de hongos causantes de enfermedades en plantas, que pueden afectar diferentes cultivos, entre éstas podemos mencionar la fusariosis o punta seca del tallo en frijol cuyo causal es *Fusarium solani*, este hongo en plantas maderables causa Cancro y se ha encontrado en teca (*Tectona grandis* L.) y melina (*Gmelina arborea*); tiene cientos de hospedantes en el mundo, desde plantas herbáceas a leñosas. En teca se ha encontrado asociado con la muerte de puntas y muerte descendente de árboles en plantaciones de 2 a 4 metros de altura. En melina se asoció con árboles severamente estresados por estar en suelos anegables, arcillosos y con sequía prolongada (Navarrete *et al.*, 2009). Tiene distribución mundial, en México también se le conoce en varios estados del país. Esta enfermedad ocurre en los estados de Campeche, Nayarit, Tabasco, Veracruz y Yucatán (CONAFOR, 2013).

Otra enfermedad de importancia para cultivos forestales comerciales es el tizón foliar, causado por *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, un grupo de patógenos del suelo que puede afectar la raíz y el follaje de muchas plantas, se caracterizan por presentar micelio con ramificaciones en ángulo recto y formar esclerocios, macroscópicos en



*Sclerotium* y microscópicos en *Rhizoctonia*. Ambos son fitopatógenos con una distribución amplia en el mundo, producen enfermedades en una gran diversidad de hospedantes, como *Tectona grandis*, *Citrus* spp., *Hevea brasiliensis*. En viveros forestales en México, se han reportado en *Ligustrum japonicum*, *Pinus montezumae* y *Tabebuia rosea* (CONAFOR, 2013).

Hongos del género *Alternaria*, *Botrytis* y *Neofusicoccum*, generalmente se se asocian con enfermedades foliares y se sugiere que éstos son oportunistas, ya que se desarrollan en tejidos bajo diversos tipos de estrés, por lo que afectan a árboles maderables como *Angophora*, *Corymbia* y *Eucalyptus* (*Myrtaceae*) (Ladiges *et al.*, 2003; Crous *et al.*, 2019; Thornhill *et al.*, 2019).

La enfermedad moho de la ahuja en pinos es causada por *Lophodermium pinastri* (Schrad.) Chevall. y *Lophodermium seditiosum*, una de las enfermedades fúngicas más comunes en Europa y otras partes del mundo que ocurre en bosques de uno a cinco años. Asimismo, otros hongos como *Armillaria* sp., que causan la pudrición de las raíces de árboles, son de las más importantes desde un punto de vista económico, ya que ocurre principalmente en cultivos de *Pinus* y *Picea* (Klapwijk *et al.*, 2016; Matyjaszczyk *et al.*, 2019).

Además de las enfermedades causadas a plantaciones agrícolas y forestales, los hongos también pueden causar problemas en la madera, ya sea como materia prima o productos terminados, a este tipo de hongos se les conoce como xilófagos o degradadores de madera. El empleo generalizado de la madera en las diversas áreas de aplicación requiere obligatoriamente su clasificación en base a la presencia de defectos que influyen tanto en sus propiedades como en su costo de comercialización. Los defectos que tradicionalmente son observables en la madera aserrada pueden clasificarse en diferentes grupos: los naturales, que corresponde a la mayoría, los derivados de algún proceso de transformación (aserrío, secado, etc.) y los debidos a

la actividad biológica de insectos y hongos. Dentro de este último grupo, los hongos pueden ocasionar ya sea un manchado o una pudrición (Clausen, 2010).

En la naturaleza, los hongos xilófagos o destructores de madera cumplen una función por demás importante, al degradar los componentes de la pared celular a moléculas simples, capacidad de gran utilidad ya que reintegran la materia orgánica al suelo, lo cual es importante en las actividades forestales. Pero el daño no sólo se presenta en los bosques, sino también en la madera en servicio, lo cual ocasiona problemas para el usuario. La pudrición de la madera por microorganismos, especialmente hongos, dañan seriamente las estructuras de la madera, disminuyendo su resistencia mecánica. Los hongos xilófagos, o destructores de la madera, ocasionan pérdidas económicamente importantes en la industria de la construcción, de la elaboración de muebles y en general a aquellas industrias que elaboran productos a base madera (Zabel y Morrell, 1992; Zanni, 2009). Los diferentes tipos de podredumbre de la madera han sido nombrados tradicionalmente de acuerdo con la apariencia visual del material de madera descompuesto. Esta división ha dado como resultado la distinción entre los tipos de podredumbre blanca, podredumbre marrón, podredumbre blanda y mancha azul (Riley *et al.*, 2014; Floudas *et al.*, 2015; Nagy *et al.*, 2016).

En particular, los hongos filamentosos que pertenecen al filo Basidiomycota y Ascomycota incluyen especies que convierten eficientemente los compuestos presentes en las paredes celulares de la madera (Mäkelä *et al.*, 2014). Sin embargo, la capacidad de degradar e incluso mineralizar (a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O) los polímeros de lignina en la madera se limitan principalmente a los basidiomicetos de podredumbre blanca. En la naturaleza, los hongos de podredumbre blanca habitan diversas especies de madera, pero crecen más comúnmente en las angiospermas que en las especies de gimnospermas, algunos ejemplos de hongos de podredumbre blanca son *Trametes versicolor*, *Dichomitus squalens*, *Irpex lacteus*, *Obba ribulosa*, *Ganoderma applanatum* (Hatakka y Hammel, 2010).

Los hongos basidiomicetos de la podredumbre marrón despolimerizan rápidamente los polisacáridos de madera dejando lignina modificada, principalmente desmetoxilada, lo que da como resultado residuos de madera frágiles de color marrón y cúbico, estos hongos tienen mayor especificidad por especies de gimnospermas (Ryvarden, 1991; Mäkelä *et al.*, 2014). Las especies de podredumbre parda forman un grupo heterogéneo con representantes en los órdenes Polyporales (p.ej., *Fomitopsis pinicola* y *Postia placenta*), Boletales (p.ej., *Coniophora puteana* y *Serpula lacrymans*) y Gloeophyllales (p.ej., *Gloeophyllum trabeum*) (Floudas *et al.*, 2015; Nagy *et al.*, 2016).

Los hongos de podredumbre blanda son principalmente especies de ascomicetos que habitan en el suelo con capacidades intermedias para degradar la madera. Estos hongos (p.ej., *Xylaria*, *Daldinia*, *Chaetomium* y *Trichoderma*) típicamente atacan la madera en ambientes húmedos. La madera podrida suave es típicamente grisácea, suave y esponjosa. Los hongos que causan podredumbre blanda despolimerizan celulosa y hemicelulosas rápidamente, y puede convertir la lignina en cierta medida (Liers *et al.*, 2006; Shary *et al.*, 2007).

La mayoría de los hongos que degradan la madera son saprófitos filamentosos no patógenos que no colonizan árboles sanos. Aun así, algunos hongos que pudren la madera, incluidas las especies de los géneros *Heterobasidion*, *Ganoderma*, *Fomitopsis* y *Armillaria*, pueden matar árboles dañados o estresados (Korhonen y Stenlid, 1998; Kües *et al.*, 2015).

## **2.2. MÉTODOS DE CONTROL DE HONGOS EN ÁRBOLES MADERABLES Y EN MADERA**

La salud de los bosques y los sistemas de cultivos leñosos son de particular importancia. Sin embargo, una variedad de restricciones bióticas debido a los ataques de una diversidad de virus, fitoplasmas, bacterias, oomicetos, hongos, nemátodos, artrópodos y plantas parásitas comprometen continuamente la aptitud, el desarrollo y

la producción de árboles y plantas leñosas. Muchos fitopatógenos transmitidos por el suelo provocan graves pérdidas en los cultivos arbóreos y la silvicultura económicamente relevantes. Entre ellos, diferentes hongos (p.ej., *Fusarium*, *Armillaria*, *Heterobasidion*, *Rosellinia*, *Verticillium*, entre otros) (García-Jiménez *et al.*, 2010).

Para el control de las enfermedades causadas por hongos patógenos de árboles en viveros y plantaciones forestales, así como en el producto terminado, la madera, se realizan mediante control químico, control biológico, control cultural y control físico. El control químico se realiza principalmente utilizando fungicidas sintéticos de los que hay tanto específicos como de amplio espectro, de contacto y sistémicos (Cortinas *et al.*, 1996). De los distintos métodos de control biológico, el uso de fungicidas sintéticos es uno de los más usados para el control de agentes fitopatógenos, si bien hay una serie de compuestos antimicóticos disponibles para controlar la propagación de estos patógenos fúngicos agrícolas, como los bencimidazoles, fenilamidas, dicarboximidas, anilino pirimidinas, inhibidores externos de quinona (QoI) y amidas de ácido carboxílico (CAA) (Comité de Acción de Resistencia al fungicida, 2015), los antifúngicos azólicos son el tratamiento preferido debido a su costo relativamente bajo y su eficacia contra una amplia gama de hongos, lo que hace a los triazoles la clase de fungicidas sistémicos más utilizados (Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades, Estocolmo, Suecia, 2013).

De acuerdo a lo reportado para los mecanismos de acción de los fungicidas químicos sintéticos, éstos actúan por diferentes vías, los azoles regulan o inhiben la síntesis del ergosterol, actuando sobre la enzima esterol-14- $\alpha$ -desmetilasa CYP51 (un miembro de la familia del citocromo P450. Además, los fungicidas azólicos se unen a través de la coordinación directa del triazol N-4 o el nitrógeno del imidazol N-3 como el sexto ligando del hierro del grupo hemo, resultando un complejo CYP51-azole, que es catalíticamente inactivo, evitando la desmetilación de lanosterol y eburicol y, a su vez, la producción de ergosterol, que es esencial para mantener la fluidez y la permeabilidad de la membrana fúngica. Por lo tanto, el tratamiento con azoles reduce

la cantidad de ergosterol en la célula fúngica, que, junto con una acumulación de  $14\alpha$ , los esteroides desmetilados, interrumpen la estructura de la membrana, evitando el transporte activo de la membrana que resulta en fungistasis (Jefcoate, 1969).

Con la aplicación de diversos fungicidas comerciales (azoxystrobin, benomil, carbendazim, difenoconazol e hidróxido de cobre) para el control de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*, causantes de antracnosis, se obtuvieron excelentes resultados por su capacidad antifúngica. Sin embargo, algunos organismos internacionales han resaltado las alteraciones negativas de este tipo de fungicidas, como el clorotalonil, carbendazim y macozeb, por sus altos riesgos de carcinogenicidad (Saldarriaga et al., 2002; Marulanda et al., 2007; Saldarriaga et al., 2008; Afanador et al., 2009; Naranjo, 2011; Gaviria et al. 2013). Debido al impacto negativo de los químicos en los organismos que no son el blanco u objetivo de inhibir su crecimiento, el potencial de riesgo ambiental y para la salud, el rango y la tasa del uso de éstos, han sido gradualmente limitados y algunos de ellos han sido eliminados. Un ejemplo de ello es el bromuro de metilo, identificado como sustancia que agota el ozono estratosférico de Clase I, utilizado como fumigante del suelo en la agricultura durante más de 40 años, se está eliminando en todo el mundo (Duniway, 2002).

Aunque las especies maderables de alta durabilidad natural, tienen un mayor rango de uso y valor agregado en el mercado, algunas especies de madera con gran potencial de uso, tienen baja durabilidad natural y requieren tratamientos conservadores para mejorar su rendimiento y vida útil en sus diferentes usos (Lebow, 2010; Bolin y Smith, 2011). Existe una amplia variedad de compuestos químicos altamente tóxicos para tratar la madera y extender su vida útil por décadas, debido a la susceptibilidad de las maderas a la descomposición y al biodeterioro, que a menudo se ve contrarrestada por sustancias conservantes que se esfuerzan por protegerlas de los insectos, hongos y bacterias, las principales plagas de la madera. La importancia de usar tratamientos antifúngicos en las maderas es para evitar que el hongo se asiente en la madera,

inhibiendo la invasión del micelio, para que no se extiende a lo largo de las paredes. Los hongos invasores, segregan enzimas y metabolitos que causan la despolimerización de su estructura lignocelulósica (Chaparro *et al.*, 2009), la madera desprotegida puede provocar grandes pérdidas económicas y de recursos (Hassan *et al.*, 2016).

En los últimos años, algunos de los principales conservantes utilizados en el tratamiento de la madera, las formulaciones como el arseniato de cobre cromado (CCA), es uno de los más populares y aunque son muy efectivas para prolongar la vida útil de la madera, han generado una gran preocupación debido al peligro asociado (Mohajerani *et al.*, 2018). El uso de las soluciones de CCA en troncos de madera por presión, está asociado con la contaminación resultante de derrames y fugas de los tanques, que pueden contaminar con frecuencia las aguas subterráneas y aguas superficiales (Bhattacharya *et al.*, 2002; Hopp *et al.*, 2006). Desafortunadamente, el uso regular de agroquímicos es insostenible a mediano y largo plazo como resultado de su impacto en los ambientes acuáticos y terrestres, influyendo negativamente en la diversidad ecológica en estos ecosistemas, sus efectos indeseables en organismos no objetivo y el supuesto efecto cancerígeno de algunos productos químicos (Geiger *et al.*, 2010).

Desde hace 15 años, existe una preocupación de la sociedad acerca del uso de los plaguicidas sintéticos, entre ellos, los fungicidas. El uso irracional de éstos, como el incremento en la frecuencia y el uso de altas dosis de aplicación, uso de mezclas, deficiente aplicación y el uso de químicos muy persistentes, ha propiciado el surgimiento de múltiples efectos negativos en el ambiente. Como consecuencia de estos disturbios biológicos y ecológicos se han provocado cambios de un cultivo a otro menos redituable, ha disminuido la actividad agrícola y en algunos casos se ha abandonado. Ante esta situación, se considera impostergable el uso de medidas ecológicas en el combate de hongos (Rodríguez, 2000).

Los fungicidas actuales, a diferencia de los más antiguos, son compuestos orgánicos, con un alto grado de especificidad hacia su organismo objetivo, aunque continúa la preocupación por los riesgos para la salud y la contaminación ambiental, debido al uso de grandes cantidades de estos productos químicos (Gupta y Dikshit, 2010). Con el uso continuo y altas concentraciones de este tipo de fungicidas, se ha conseguido la resistencia de biotipos fúngicos, con resistencia simple, doble e incluso triple, resultando en aislados con resistencia hacia tres fungicidas (Palou *et al.*, 2008).

Es por ello, que actualmente se desarrollan compuestos antifúngicos u otras alternativas para el control de las enfermedades fúngicas. Estas alternativas se basan en obtener un mantenimiento de la madera aserrada y/o en almacén, con el uso de compuestos que muestren menos efectos en la salud de los organismos no blanco como mamíferos incluidos el humano, insectos benéficos, y que presenten un bajo impacto en el medio ambiente (Hernández, 2002; Mari *et al.*, 2016).

### **2.3. COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA**

Una alternativa sustentable al uso de los fungicidas sintéticos son los productos provenientes de las plantas. Una característica típica de las plantas son sus mecanismos de defensa, capacidad para producir un vasto y diverso tipo de los llamados metabolitos secundarios, es decir, de los compuestos presentes en células, tejidos u órganos especializados que no son directamente esenciales para el crecimiento y desarrollo básico, pero que son necesarios para la supervivencia de las plantas en el medio ambiente, además de defensa, son importantes para la atracción de polinizadores (Lattanzio *et al.*, 2008; Pagare *et al.*, 2015).

Los metabolitos secundarios de origen vegetal se dividen en dos grandes grupos: fitoanticipinas, que están presentes de forma constitutiva en las plantas; y las fitoalexinas, cuya presencia aumenta de forma considerable en respuesta a la invasión microbiana (Dixon, 2001).

Dentro de los diversos mecanismos de acción de los metabolitos secundarios, en particular de las fitoalexinas sobre los hongos, se incluye principalmente el efecto sobre la granulación citoplasmática, la desorganización de los contenidos celulares, la ruptura de la membrana plasmática y la inhibición de las enzimas fúngicas, lo que refleja la inhibición de la germinación de las esporas, el alargamiento del tubo germinal para la formación del apresorio y la reducción o inhibición del crecimiento micelial (Cavalcanti *et al.*, 2005)

Entre los productos derivados de plantas se pueden mencionar a los aceites esenciales, extractos acuosos, extractos orgánicos, así como también la posterior identificación y purificación de las moléculas activas (metabolitos secundarios) (Hernández, 2002; Mari *et al.*, 2016). Se han reportado numerosas especies vegetales productoras de compuestos con actividad antifúngica o fungistática entre las que destacan las familias Asteraceae, Brassicaceae, Caricaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Sapotaceae, Solanaceae y Verbenaceae (Bautista-Baños *et al.*, 2013).

Las plantas producen un gran número de metabolitos secundarios, se estima una cantidad de más de 100,000 estructuras diferentes, involucrados en la defensa de todas las especies de plantas, pero que solo se conoce de un 10% de ellas. Los grupos de compuestos mayormente reportados, con propiedades antifúngicas, están los terpenoides, ácidos fenólicos y polifenoles (liganos, taninos, flavonoides, antocianidinas, entre otros), así como algunos nitrogenados tipo alcaloides. De éstos, se han identificado diversos metabolitos antifúngicos, aunque los del grupo terpénico o fenoles, han sido estudiados mayormente (Mazid *et al.*, 2011; Tascioglu *et al.*, 2013).

Con la realización de los últimos 50 años, no sólo se ha demostrado la presencia de este tipo de compuestos antifúngicos, sino que se han obtenido algunos fungicidas que se comercializan con éxito en forma de extractos, aceites esenciales y compuestos puros en diferentes formulaciones. Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones con el interés de determinar el potencial de una gran cantidad de



especies vegetales (Pabón y Cuca, 2010; Prieto *et al.*, 2010; Lattanzio, 2013; Prieto *et al.*, 2013; Pagare *et al.*, 2015). De éstas, se ha demostrado, que especies de la familia *Poaceae* como el maíz, producen principalmente compuestos diterpenoides llamadas kauralexinas y sesquiterpenoides ácidos, conocidos como zealexinas (C y D), mientras que el arroz produce compuestos diterpenos (solenoides) como la momilactona A, B, para la resistencia contra hongos que incluyen: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus sojae*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Colletotrichum sublineolum*, *Fusarium graminearum*, *Rhizopus microspores* y *Ustilago maydis* (Huffaker *et al.*, 2011; Ahuja *et al.*, 2012).

Algunos productos secundarios que contienen nitrógeno como las caulilexinas A, B y C, han sido identificadas y reportadas en coliflor (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) con actividad antifúngica sobre los hongos fitopatógenos *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Pedras *et al.*, 2006). Además de las caulilexinas también se ha reportado el metabolito camalexina en diferentes especies de crucíferas como *Camelina sativa*, con actividad sobre los hongos *Alternaria brassicae* y *Alternaria alternata* (Glawischnig, 2007; Schuhegger *et al.*, 2007).

Dentro de la amplia gama de metabolitos secundarios distribuidos dentro del reino vegetal se encuentran los compuestos fenólicos, uno de los grupos más estudiados, de los cuales se han reportado su actividad antifúngica en hongos fitopatógenos y no fitopatógenos, algunos ejemplos de éstos son las fitoalexinas isoflavonoides reportadas en especies de la familia Fabaceae como los guisantes o chícharos (*Pisum sativum*) que producen pisatina, mientras que en garbanzo (*Cicer arietinum*) se produce maackiaína. La isoflavona daidzeína es el precursor de las principales fitoalexinas, incluidas la medicarpina y la glicololina que se producen en alfalfa (*Medicago sativa*) y soya (*Glicine max*), respectivamente (Graham, 1995; Morrisey y Osbourn, 1999). Otro ejemplo de esta familia de fitoalexinas, es el compuesto faseolina, reportado en frijol (*Phaseolus vulgaris*) que le aporta resistencia contra el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Durango, 2002) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Especies vegetales de las que se derivan moléculas con actividad antifúngica sobre hongos fitopatógenos.

Moléculas	Especies Vegetales	Especies de Hongos	Autores
Momilactona A, B	<i>Oryza sativa</i>	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Colletotrichum sublineolum</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Rhizopus microspores</i>	Huffaker <i>et al.</i> 2011 Ahuja <i>et al.</i> 2012
Caulilexinas A, B y C	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i>	<i>Leptosphaeria maculans</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Pedras <i>et al.</i> 2006
camalexina	<i>Camelina sativa</i>	<i>Alternaria brassicae</i> <i>Alternaria alternata</i>	Glawischnig 2007 Schuhegger <i>et al.</i> 2007
Faseolina	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Durango 2002
Cedrol	<i>Cunninghamia konishii</i>	<i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Cheng <i>et al.</i> 2011

### 2.3.1. Árboles maderables fuente de antifúngicos

Aunque son pocas las investigaciones de especies leñosas, que se han reportado como fuente de compuestos con actividad antifúngica sobre hongos fitopatógenos, extractos de árboles y sus respectivos compuestos, maderables y no maderables, algunos como los aceites esenciales o compuestos fenólicos son una alternativa para su aplicación en la industria de la preservación de la madera, que exhiben poca o nula toxicidad para el ser humano y el medio ambiente (Tascioglu *et al.*, 2013; Mansour y Salem, 2015; Salem *et al.*, 2015; Salem *et al.*, 2016<sup>a</sup>). En el cuadro 2 se señalan diversos compuestos provenientes de extractos de especies maderables con actividad antifúngica, así como el o los hongos blancos.

**Cuadro 2.** Especies maderables de las que se derivan moléculas con actividad antifúngica contra hongos xilófagos.

<b>Moléculas</b>	<b>Especies Vegetales</b>	<b>Especies de Hongos</b>	<b>Referencias</b>
Pinosilvin, pinosilvin momometiléter, pinosilvin dimetiléter	<i>Pinus pseudostrobus</i>	<i>Trametes versicolor</i> , <i>Coniophora puteana</i> , <i>Chaetomium globosum</i>	Rutiaga 2001
Aromadendreno	<i>Cedrela odorata</i>	<i>Trametes versicolor</i> , <i>Coniophora puteana</i> , <i>Chaetomium globosum</i>	Rutiaga 2001
$\alpha$ -terpineol, borneol	<i>Cunninghamia konishii</i>	<i>Trametes versicolor</i> <i>Pestalotiopsis fúnebre</i>	Cheng <i>et al.</i> 2011
Isorhapontigenina, piceatannol	<i>Picea abies</i>	<i>Phlebiopsis gigantea</i> <i>Fomitopsis pinicola</i> <i>Antrodia sinuosa</i> <i>Gloeophyllum sepiarium</i> <i>Serpula lacrymans</i>	Hedenstrom <i>et al.</i> 2016
Tetrahidroxiflavanona teracacidina	<i>Acacia auriculiformis</i>	<i>Phellinus badius</i>	Mihara <i>et al.</i> 2005
Medicarpina	<i>Dalbergia congestiflora</i>	<i>T. versicolor</i>	Martinez-Sotres <i>et al.</i> 2012
Tropolone	Árboles cupresáceos	<i>Postia placenta</i>	Diouf <i>et al.</i> 2002
Liriodenina	<i>Michelia formosana</i>	<i>Lenzites betulina</i> <i>T. versicolor</i> <i>Laetiporus sulphureus</i> <i>Gloeophyllum trabeum</i> <i>Fomitopsis pinicola</i>	Wu <i>et al.</i> 2012

La variabilidad dentro del contenido metabólico de los extractos maderables se observa de una especie a otra, y depende también de la parte del árbol usada para el aislamiento (Prida y Puech, 2006; Kebbi-Benkeder *et al.*, 2015), los contenidos de extractos químicos (orgánicos, acuosos, tánicos y fenólicos) son generalmente más altos en el duramen, la parte más coloreada de la madera que también es más resistente al ataque de hongos (Schultz y Nicholas, 2000). A lo largo de su vida los árboles sintetizan metabolitos secundarios para protección y/o defensa frente al ataque de agentes biótico y abiótico. Mientras permanecen dentro de la madera muerta, estas moléculas pueden ser importantes controladores de las tasas de descomposición. De hecho, se ha establecido una estrecha correlación entre la durabilidad natural de la madera y el contenido de extraíbles y la diversidad (Pometti *et al.*, 2010; Kirker *et al.*, 2016).

Debido a esto, existe una gran diversidad de especies maderables que han demostrado tener una resistencia natural al ataque de hongos fitopatógenos y hongos xilófagos. *Juniperus virginiana* al igual que otras especies como *J. occidentalis*, tienen comprobada actividad antifúngica contra hongos que pudren la madera (Karchesy, 1998). Sung y Prewitt (2011) evaluaron la actividad antifúngica de extractos de duramen de *J. virginiana* hacia los hongos *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum*.

Los compuestos identificados que mostraron mayores efectos inhibitorios contra *G. trabeum* y *T. versicolor* fueron el cedrol y tujopsenos respectivamente. Wang *et al.* (2011) evaluaron la actividad antifúngica de los extractos del duramen de la madera de *Cunninghamia lanceolata* hacia los hongos de pudrición *Postia placenta*, *Trametes versicolor*, *Gloeophyllum trabeum* e *Irpex lacteus*. Los extractos fueron obtenidos con hexano, acetato de etilo y metanol. El estudio mostró que el cedrol y algunos naftalenos fueron los compuestos responsables de la bioactividad y aun a bajas concentraciones, tuvieron efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de los hongos en estudio.

Aunque los extractos de madera son más comunes, en la actualidad se han estudiado diversas fuentes de metabolitos secundarios como son los aceites, que son una fuente importante de ácidos grasos, derivados y otras moléculas de alto peso molecular liposolubles con un alto potencial en aplicaciones biotecnológicas (Lima *et al.*, 2008; Shokri, 2016; Melo *et al.*, 2018). Principalmente están formado por triacilglicéridos (95-98% en peso) y se extraen de diversas partes de los árboles como semillas, cortezas, raíces, hojas, resinas o frutos (Sharmin *et al.*, 2015; Medeiros *et al.*, 2018).

Los aceites de las semillas del género *Carapa* han demostrado tener un poder antifúngico frente a hongos fitopatógenos. Nascimento *et al.* (2019) probaron los aceites de las especies *Carapa guianensis* y *C. vasquezii*, demostrando una buena actividad antifúngica para ambas especies maderables, pero los valores más bajos de aceite vegetal se observaron en *Carapa vasquezii*, sobre los hongos fitopatógenos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*. *C. vasquezii* contenía más ácidos grasos saturados (estearato de metilo - 10.5%, ácido palmítico - 8.4%, ácido esteárico - 3.5%, araquidato de metilo - 1.1%, benzoato de metilo - 0.3%) que el aceite de *C. guianensis*. Este aceite también contenía ácido araquídico (0.15%), un ácido graso saturado.

En otro estudio realizado por Liu *et al.* (2008), se determinó la acción antifúngica de los ácidos grasos sobre el crecimiento micelial e identificaron la capacidad antifúngica de ácido palmítico y ácido butírico contra los hongos fitopatógenos *Alternaria solani*, *lagenarium* y *Fusarium oxysporum*. Además se identificó la inhibición de la germinación de las esporas de *Colletotrichum lagenarium* y *Fusarium oxysporum*, usando diferentes concentraciones de los ácidos grasos caprílico, caproico y cáprico.

La actividad antifúngica de árboles maderables, considerados fuente de maderas resistentes y de alta calidad ornamental por su betado y color, también ha sido evaluada. Un ejemplo de ello, son los estudios del duramen de *Dalbergia congestiflora*,

de la familia Fabaceae, que indican la actividad antifúngica de varios extractos contra el hongos xilófago *Trametes versicolor*. Un extracto en hexano (0.150 mg/mL) causó el 100% de inhibición del crecimiento de este hongo y se identificó el compuesto responsables de tal actividad, una sustancia cristalina aislada caracterizada como (+)-3-hidroxi-9-metoxipterocarpano o (+)-medicarpina, sustancia perteneciente al grupo de las fitoalexinas (Martínez-Sotres *et al.*, 2012). Esta sustancia también fue reportada por Deesamer *et al.* (2009), obtenida en el extracto de hexano de *Dalbergia oliveri*, aunque también ha sido aislado de *Andira inermis* y *Dalbergia stevensonii* por McMurry y Martin (1972), así como de *Artabotrys odoratissimus* (Singh *et al.*, 2009).

### **2.3.2. Ensayos *in vitro* para la determinación de actividad antifúngica**

Para la realización de investigaciones científicas encaminadas a determinar el efecto antifúngico de extractos vegetales, su especificidad y la identificación de los principios activos, se desarrollan diferentes métodos en el laboratorio, con los que se evalúa la actividad antifúngica *in vitro* de éstos. Los métodos más utilizados son los métodos de difusión en disco y de dilución de caldo o agar, con diversas variantes como la difusión con pozos en agar (Rutiaga, 2001; Runyoro *et al.*, 2006; Mabona *et al.*, 2013; Nazzaro *et al.*, 2013).

La prueba de difusión en disco de agar desarrollada en 1940 es el método oficial utilizado en muchos laboratorios de microbiología (Heatley, 1944). En este procedimiento, las placas de agar se inoculan con un inóculo estandarizado del microorganismo de prueba, utilizando discos de papel de filtro (de 5-6 mm de diámetro), que contienen el compuesto de prueba a una concentración deseada, los que se colocan en la superficie de agar. Las cajas de Petri se incuban en condiciones adecuadas en el tiempo necesario para que el agente antimicrobiano se difunda en el agar e inhiba la germinación de esporas o el crecimiento del micelio del hongo en estudio. Finalmente, se determina el efecto antifúngico por la inhibición del crecimiento, midiendo los diámetros de las zonas de crecimiento (Jorgensen y Ferraro,

2009). Con este ensayo, se ha determinado el efecto antifúngico de fungicidas sintéticos como el posaconazol contra hongos filamentosos, La micafungina contra *Aspergillus* y la caspofungina contra *Aspergillus* y *Fusarium* (Arikan *et al.*, 2002; Arikan *et al.*, 2003; López-Oviedo *et al.*, 2006). Actualmente, se utiliza un enfoque antifúngico estandarizado de difusión en disco para analizar hongos filamentosos. Este método ofrece muchas ventajas sobre otros métodos: simplicidad, bajo costo, la capacidad de probar enormes cantidades de microorganismos y agentes antimicrobianos, así como la facilidad para interpretar los resultados proporcionados (Kreger *et al.*, 1980; Caron, 2012).

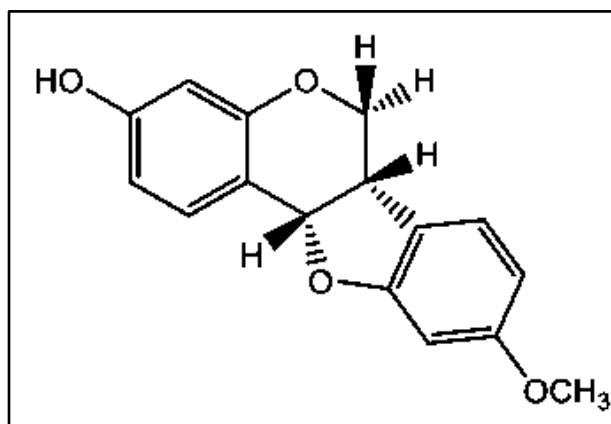
Además, el método de dilución es ampliamente usados en investigación, para medir cuantitativamente la actividad antimicrobiana *in vitro* contra bacterias y hongos. El valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI, o MIC, por sus siglas en inglés) registrado, se define como la concentración más baja del agente antimicrobiano analizado, que inhibe el crecimiento visible del microorganismo analizado, y generalmente se expresa en  $\mu\text{g/mL}$  o  $\text{mg/L}$  (Pfaller *et al.*, 2004). Este método implica la incorporación de concentraciones deseadas variables del agente antimicrobiano en un medio de agar (medio de agar fundido), habitualmente utilizando diluciones dobles en serie (p. Ej. 1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{g mL}$ ), seguido de la incorporación de un inóculo microbiano definido en la superficie de la placa de agar (CLSI, 2010).

Una variante del método de difusión en agar es el método de difusión de pozos de agar, que también se usa ampliamente para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas. De manera similar al procedimiento utilizado en el método de difusión en disco, la superficie de la placa de agar se inocula extendiendo un volumen del inóculo microbiano sobre toda la superficie del agar, luego, se perfora asépticamente un orificio con un diámetro de 5-8 mm con una punta, y se introduce un volumen (20–100  $\mu\text{L}$ ) del agente antimicrobiano o la solución de extracto a la concentración deseada en el pozo. Posteriormente se inocula el hongo y las placas de agar se incuban en condiciones adecuadas dependiendo del microorganismo de

prueba. El agente antimicrobiano se difunde en el medio de agar e inhibe el crecimiento de la cepa microbiana probada. Con la inhibición del crecimiento se determina la actividad, que puede ser expresada en porcentaje de inhibición, en relación a un control negativo (vehículo de disolución) o a un control positivo (antifúngico) (Magaldi *et al.* 2004; Valgas *et al.*, 2007).

## 2.4. (+)-MEDICARPINA

La (+)-medircarpina o (+)-3-hidroxi-9-metoxipterocarpano es un metabolito perteneciente al grupo de los isoflavonoides, en particular a la subdivisión de los pterocarpanos, un grupo de compuestos que puede ser descrito como benzo-pirano-furano-bencenos (Ingham, 1982; Martínez-Sotres *et al.*, 2012; Morales, 2014) (Figura 1).



**Figura1.** Estructura química de (+)-medircarpina [(+)-3-hidroxi-9-metoxipterocarpano].

Los pterocarpanos se sintetizan a través de la ruta isoflavonoide del metabolismo fenilpropanoide, en la que el cumaril-CoA y malonil-CoA se condensan para formar la trihidroxichalcona, que se isomeriza fácilmente a la dihidroxiflavanona. Una migración



del anillo arilo, catalizada por la isoflavona sintasa, forma el esqueleto carbónico básico del isoflavonoide y una serie de reacciones de metilación, hidroxilación y reducción sintetizan la (+)-medicarpina (Fahrendorf y Dixon, 1993).

Una de las respuestas de defensa de muchas especies de la familia Fabaceae, es la producción de metabolitos antimicrobianos del grupo de las fitoalexinas. Particularmente en la familia Fabaceae, más de 500 especies silvestres acumulan fitoalexinas, en respuesta al ataque de patógenos, metabolitos secundarios como vestitol, vestitona y sativán son algunos ejemplos de fitoalexinas de tipo pterocarpano que se acumulan rápidamente ante el ataque de patógenos, en especial ante la amenaza de infecciones por hongos y bacterias o por la elicitación de iones metálicos y otros efectores bióticos (Ingham, 1982; Ahuja *et al.*, 2012).

La (+)-medicarpina fue identificada y reportada por primera vez por Smith *et al.* (1971) en alfalfa (*Medicago sativa*), pero también se ha estudiado en haba (*Vicia faba*) (Hargreaves *et al.*, 1976), trébol rojo (*Trifolium pratense*) (Dewick, 1977) y garbanzo (*Cicer arietinum*) (Kraft *et al.*, 1987; Miao y Vanetten *et al.*, 1992). Sin embargo, en estas especies, este tipo de compuestos se producen en concentraciones bajas, solamente como respuesta al ataque de patógenos y solo en etapas tempranas de su desarrollo. La (+)-medicarpina además de encontrarla en especies herbáceas, como antes se mencionó, también se ha reportado en *Dalbergia congestiflora*, *D. oliveri*, *D. stevensoni* y *Andira inermis* (McMurry y Martin, 1972; Deesamer *et al.*, 2009; Martínez-Sotres *et al.*, 2012; Morales, 2014), identificando rendimientos significativamente altos.

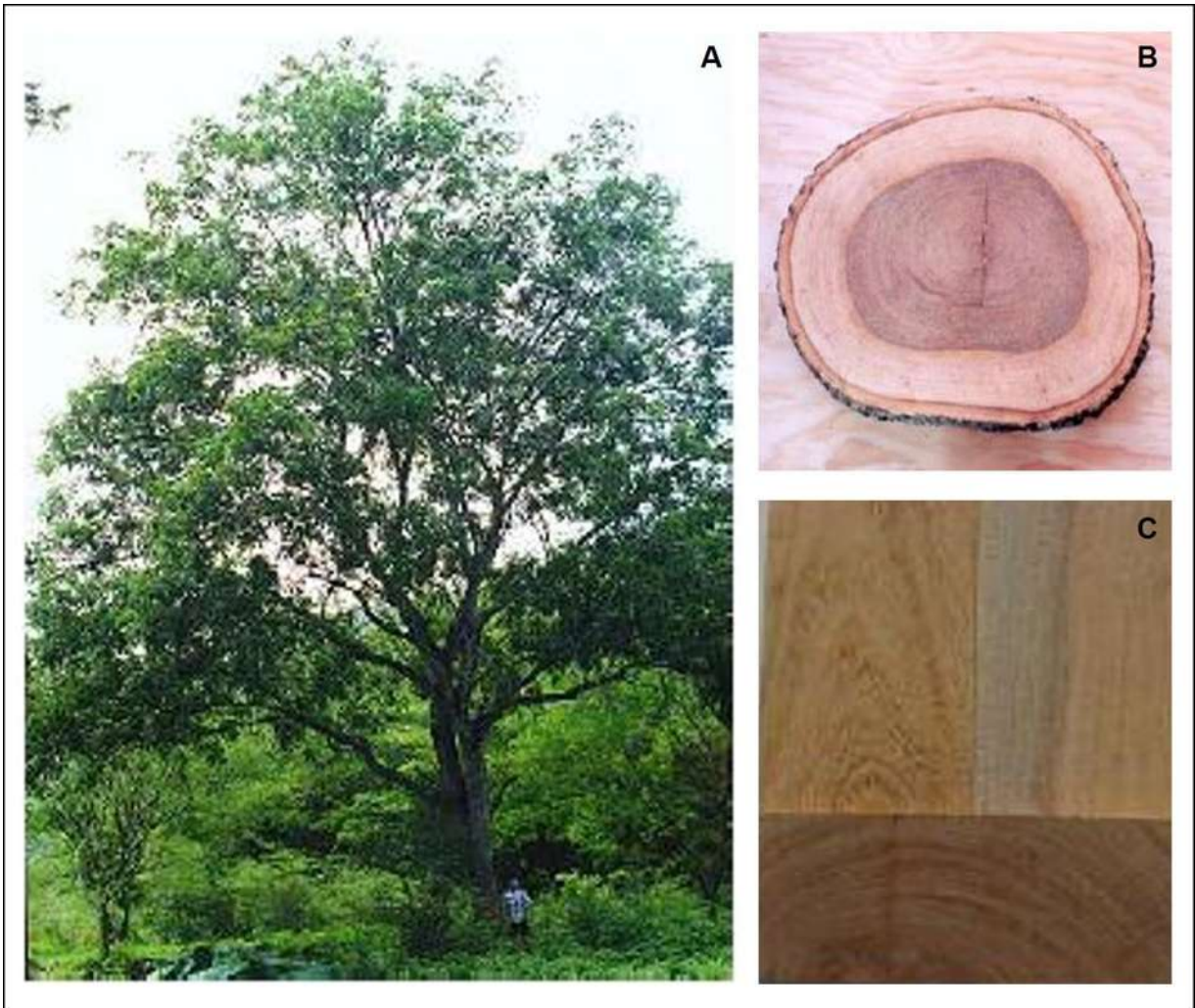
Se han reportado diferentes actividades atribuidas a la (+)-medicarpina como producción en el aumento de la formación de células osteoprogenitoras en la médula ósea, por lo que este pterocarpano puede ser un potencial agente osteogénico (Bhargavan, 2012), actividad nematocida contra *Caenorhabditis elegans* (Stadler, 1994).

Sin embargo, el mayor interés para la (+)-medicarpina en nuestro grupo de trabajo es su actividad antifúngica, debido a que solo se ha estudiado sobre el hongo xilófago de podredumbre blanca *Trametes versicolor* por Martínez-Sotres *et al.* (2012) y Morales (2014), reportando una alta actividad antifúngica con una CL<sub>100</sub> de 0.15 mg/mL. La mayoría de los estudios se han realizado con (+)-medicarpina derivada del duramen de especies del género *Dalbergia*, del cual diversas especies están consideradas en riesgo de peligro de extinción o amenazadas en México y a nivel mundial (SEMARNAT, 2010; CITES, 2017), por lo que existe el interés de estudiar otras fuentes de este compuesto, como es el caso de *Andira inermis*.

## **2.5. *Andira inermis* (W. WRIGHT) D.C. (FABACEAE)**

*Andira inermis* es una especie maderable perteneciente a la familia Fabaceae, conocida en Michoacán como almendra de río, quiringuca o cuilimbuca, aunque es una especie nativa que se distribuye desde el sur de México hasta Perú, Bolivia y Brasil. Sin embargo, fue introducida en Las Antillas, Las Islas Caribeñas, Florida y África (Witsberger *et al.*, 1982; Benítez y Montesinos, 1988). En México esta especie crece en la vertiente del Pacífico desde Nayarit hasta Chiapas y en la vertiente del Golfo únicamente en Tabasco. Se desarrolla desde el nivel del mar hasta casi 1000 m de altitud (Witsberger *et al.*, 1982; Benítez y Montesinos, 1988; Niembro, 1990; Pennington y Sarukhán, 1998).

Es una especie que está adaptada a una variedad de sitios, crece naturalmente en varios tipos de bosques, principalmente en los bosques subtropical húmedo y muy húmedo, aunque se ha registrado también en los bosques subtropicales secos, pero no crece bien en áreas con una temporada de estiaje muy marcada (Téllez-Sánchez *et al.*, 2009). *A. inermis* es un árbol que llega a medir hasta 25 m de altura y alcanza un diámetro hasta de 1.20 m (a la altura de 1.30 m del suelo). El tronco es derecho con las ramas horizontales o ascendentes y la copa es plana y redondeada (Niembro, 1990; Pennington y Sarukhán, 1998) (Figura 2A).



**Figura 2.** Árbol (A), rodaja de madera (B) y tablilla de madera (C) de *Andira inermis* (Fotografías tomadas de Téllez-Sánchez *et al.* 2009).

Las flores tienen forma de guisante, de color rosado a morado, cada una de alrededor de 2 cm de largo y que duran solamente un día, se producen en panículas terminales, debido a que *A. inermis* está adaptada a una variedad de sitios, crece en varios tipos de bosque, dando como resultado diferentes tipos de ciclos vitales, aparecen entre febrero y abril en el área de Guanacaste de Costa Rica (Janzen, 1967; Janzen *et al.*, 1976).

La sincronización de la florescencia ocurre entre los miembros de una población. Cada árbol florece por un período de alrededor de 20 días, y la florescencia dura aproximadamente 30 días dentro de una población (Frankie *et al.*, 1976). Los árboles maduros florecen una vez durante marzo y abril; los árboles de menor tamaño florecen dos veces, primero en marzo y abril y de nuevo en julio y agosto durante la estación seca de menor duración (Allen, 1956).

En estudios fenológicos comparativos entre los bosques secos y muy húmedos en Costa Rica, no muestra un período significativo de caducidad en el bosque muy húmedo, mientras que muestra una producción discontinua de nuevas hojas entre enero y junio y un período de florescencia en marzo (Frankie *et al.*, 1974). Esto se contrasta con el bosque seco, en donde la caída de las hojas y el rebrote foliar se concentraron durante noviembre y la florescencia ocurre más que nada en febrero (Frankie *et al.*, 1974). En Trinidad, la florescencia se observa en abril y octubre (Marshall, 1939). Las frutas son unas vainas ovoides, verdes y de 2.5 a 4 cm de largo conteniendo una sola semilla venenosa. En Costa Rica, las frutas se maduran desde la mitad de mayo hasta el final de junio. Las semillas están rodeadas de un hollejo grueso y fibroso, con una capa delgada de pulpa blanca y jugosa entre el hollejo y la epidermis de la fruta (Little *et al.*, 1964).

Su madera es dura y pesada ( $0.77 \text{ g/cm}^3$ ), según SEMARNAT el duramen está clasificado como moderadamente resistente a los hongos de pudrición (clase 3 según ASTM D 2017-5) y moderadamente resistente al ataque de termitas de madera seca y a taladradores marinos (Weaver, 1989; CONAFOR, 2007; Orwa *et al.*, 2009) (Figura 2B). Presenta porosidad difusa y marcada diferencia entre el color de la albura (amarillo pálido) y su duramen (rojizo amarillento), es de densidad alta y de contracción media, posee brillo mediano, veteado pronunciado, textura media e hilo entrecruzado (Téllez-Sánchez *et al.*, 2009).

Téllez-Sánchez *et al.*, 2009 la mencionan como una especie subutilizada, pues su madera se usa localmente como leña, implementos agrícolas y cercas. Aunque otros

reportes indican usos para muebles y ebanistería de alta calidad debido a su fibra y a su color atractivo. También se la usa para elaborar artículos torneados, puntas de tacos de billar, mangos de sombrillas, bastones, botes, ruedas para carretones, pilotes, traviesas de ferrocarril y de red eléctrica, vigas de puentes y otras construcciones pesadas, chapa decorativa y pisos de parqué (Weaver, 1989) (Figura 2C).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Por los efectos secundarios o negativos a corto y largo plazo que causan el uso de los fungicidas químicos sintéticos, surge la necesidad de buscar alternativas más amigables con el ambiente y la salud humana. Una alternativa es el uso de los metabolitos secundarios de plantas, de los que se ha demostrado su propiedad antifúngica, aunque mayormente con hongos patógenos de humanos y fitopatógenos de especies de valor agrícola, siendo pocos los estudios con aquellos que causan enfermedades en árboles maderables, sobre todo los xilófagos.

Es importante la búsqueda de antifúngicos de origen vegetal contra hongos xilófagos y patógenos, ya que influyen en grandes pérdidas de la industria maderera, en viveros, plantaciones y en la materia prima como lo es la madera. La medicarpina, obtenida del duramen de *Dalbergia congestiflora*, un pterocarpano con actividad antifúngica sobre *Trametes versicolor*, no ha sido probada en otros hongos xilófagos y en fitopatógenos. La presente investigación propone el realizar estudios de actividad antifúngica que demuestren el efecto tanto del extracto como la (+)-medicarpina del duramen de *A. inermisue* sobre otros hongos xilófagos y patógenos de árboles maderables.

## 4. HIPÓTESIS

El extracto de acetato de etilo y la (+)-medicarpina aislada del duramen de *Andira inermis* tienen la capacidad de inhibir el crecimiento tanto de hongos xilófagos como patógenos de árboles maderables.

## 5. OBJETIVO GENERAL

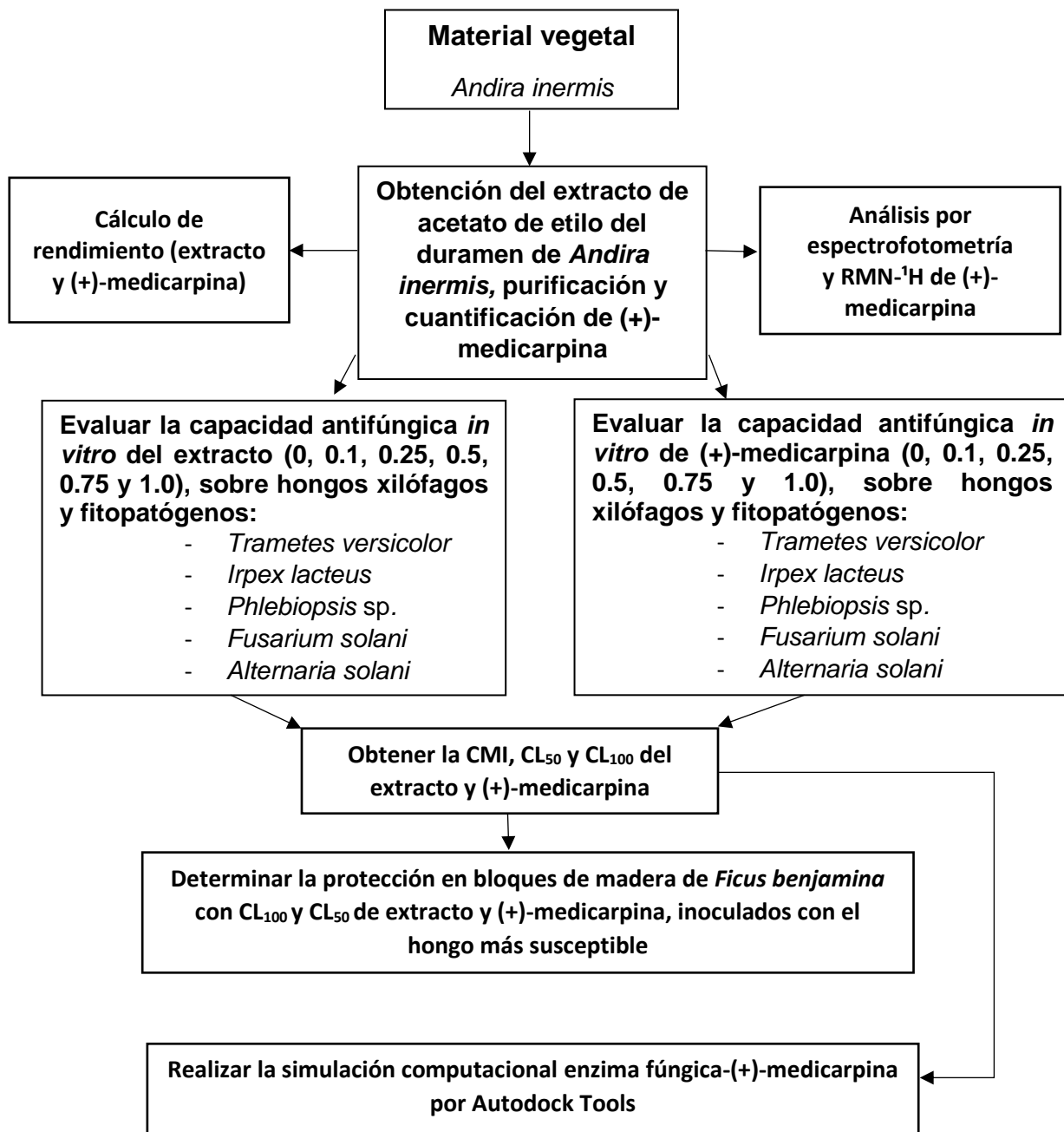
Evaluar la actividad antifúngica del extracto de acetato de etilo y de la (+)-medicarpina aislada del duramen de *Andira inermis* sobre hongos xilófagos y patógenos de árboles maderables.

### 5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el contenido de (+)-medicarpina purificada del extracto de acetato de etilo del duramen de *Andira inermis*.
2. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto y la (+)-medicarpina, obtenidos del duramen de *A. inermis*, sobre hongos xilófagos (*Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Phlebiopsis* sp.) y fitopatógenos (*Fusarium solani* y *Alternaria solani*).
3. Obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) y las concentraciones letales media (CL<sub>50</sub>) y del 100% (CL<sub>100</sub>) del extracto de *A. inermis* y la (+)-medicarpina purificada, en los hongos susceptibles.
4. Determinar la eficiencia antifúngica del extracto y (+)-medicarpina del duramen de *A. inermis* en las concentraciones CL<sub>100</sub> y CL<sub>50</sub> sobre bloques de madera inoculados con el hongo más susceptible.
5. Realizar la simulación computacional enzima-ligando para determinar la interacción de (+)-medicarpina con los sitios activos de enzimas fúngicas.



## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 7. RESULTADOS

### 7.1. CAPÍTULO I. Actividad antifúngica del extracto de acetato de etilo del duramen de *Andira inermis* sobre hongos xilófagos y fitopatógenos.

#### Resumen

La actividad antifúngica del extracto del duramen de *Andira inermis* (Fabaceae) fue evaluada en tres hongos xilófagos (*Irpex lacteus*, *Phlebiopsis* sp. y *Trametes versicolor*) y dos fitopatógenos (*Fusarium solani* y *Alternaria solani*). El extracto se obtuvo por el método Soxhlet, determinando las condiciones para un óptimo rendimiento, variando el tiempo de reflujo del disolvente (acetato de etilo) (6, 8 y 10 horas), utilizando 60 g de materia seca (harina de duramen). La actividad antifúngica fue determinada como porcentaje de inhibición con el método de difusión en agar con pozos, utilizando metanol como vehículo de dilución (control negativo) y el fungicida comercial benomilo [1-(butilcarbonil) 2-bencimidazol ácido carbámico] como control positivo (1.0 mg/L). Con los diferentes tiempos de extracción se obtuvo el mayor rendimiento del extracto con un tiempo de reflujo de 10 h, consiguiendo 3.77 g de extracto/60 g de duramen. El extracto obtenido con estas condiciones de extracción fue utilizado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y las concentraciones letal media (CL<sub>50</sub>) y 100 (CL<sub>100</sub>), sobre el crecimiento micelial de los hongos, con la aplicación *in vitro* de diferentes concentraciones de extracto (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg/L) con un tiempo de incubación de 8 días en medio PDA (papa-dextrosa-agar), a 28°C en condiciones de oscuridad. Se observó una CMI de 0.05 mg/L para los hongos xilófagos y de 0.25 mg/mL para los fitopatógenos probados, con un mayor efecto del extracto sobre *T. versicolor* y *Phlebiopsis* sp, mostrando valores de CL<sub>50</sub> y de CL<sub>100</sub> de 0.11 y 0.24 mg/L, respectivamente. E *I. lacteus* la CL<sub>50</sub> fue de 0.28 mg/L y la CL<sub>100</sub> de 0.69 mg/mL. Los valores observados de CL<sub>50</sub> y de CL<sub>100</sub> estuvieron en un rango de 0.39-0.41 mg/L y de 0.75-0.98, respectivamente. Con estos resultados se demostró el efecto antifúngico del extracto del duramen de *A. inermis*, mayormente sobre los hongos xilófagos, presentando *T. versicolor* y *Phlebiopsis* sp., una mayor susceptibilidad.

**Palabras clave:** *Andira inermis*, actividad antifúngica, hongos fitopatógenos, hongos xilófagos.

#### Abstract

The antifungal activity of the heartwood extract of *Andira inermis* (Fabaceae) was determined against xylophagous (*Irpex lacteus*, *Phlebiopsis* sp. and *Trametes versicolor*) and phytopathogenic (*Alternaria solani* and *Fusarium solani*) fungi. The extract was obtained by the soxhlet method, determining the conditions for optimal yield, varying the reflux time of the solvent (ethyl acetate) (6, 8 and 10 hours), using 60

g of dry matter (duramen flour). With the different extraction times, the highest yield of extract was obtained with a reflux time of 10 h, getting 3.77 g of extract/60 g of duramen. The extract obtained with these extract conditions was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the mean lethal concentrations (CL<sub>50</sub>) and 100 (CL<sub>100</sub>), on the mycelial growth of fungi, with the *in vitro* application of different concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 mg/L) using the agar well diffusion method. Methanol was a negative control and benomyl (1.0 mg/L) [1-(butylcarbonyl)-2-benzimidazole carbamic acid] a positive control, incubated 8 days on PDA medium (potato-dextrose-agar) (28 °C in darkness). The MIC at 0.05 mg/mL was observed for xylophagous fungi and 0.25 mg/mL for phytopathogens fungi probed, with a higher effect of extract on *T. versicolor* and *Phlebiopsis* sp., showing the CL<sub>50</sub> and CL<sub>100</sub> values of 0.11 and 0.24 mg/L, respectively. *E. lacteus* CL<sub>50</sub> was 0.28 mg/L and CL<sub>100</sub> was 0.69 mg/mL. The observed values of CL<sub>50</sub> and CL<sub>100</sub> for *A. solani* and *F. solani* were in a range of 0.39-0.41 mg/L and 0.75-0.98, respectively. These results demonstrated the antifungal effect of the extract of *A. inermis* heartwood, mostly on xylophagous fungi, presenting *T. versicolor* and *Phlebiopsis* sp., a higher susceptibility.

Keywords: *Andira inermis*, antifungal activity, phytopathogenic fungi, xylophagous fungi.

## Introducción

Como una forma de protección ante el daño ocasionado por heridas y al ataque por insectos y microorganismos patógenos, las plantas han logrado desarrollar una gran variedad de formas de defensa ante este tipo de condición de estrés biótico, como la protección química. Con este sistema de defensa, las plantas sintetizan metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, generalmente de tipo terpénico, fenólico (ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, entre otros) y alcaloides (Sepulveda *et al.*, 2003; Rowell *et al.*, 2005; Mazid *et al.*, 2011).

Aunque con diversas investigaciones se ha identificado un gran número de compuestos con propiedad fungicida, solo el 10% del total de las especies vegetales ha sido estudiado a nivel mundial, determinando que solo algunas presentan esta actividad en contra de hongos fitopatógenos, inhibiendo el crecimiento radial, formación de esporas, germinación de esporas y la formación de biomasa (Ikeura y Kobayashi, 2015; Rongai *et al.*, 2015; Sesan *et al.*, 2015). Mayormente han sido evaluadas plantas herbáceas aromáticas, utilizadas en la medicina tradicional de

varios países como India, China, Brasil, Colombia y México, entre otros, pertenecientes a familias como Lamiaceae, Asteraceae o Fabaceae (Boulogne *et al.*, 2012).

Sin embargo, algunas plantas de valor maderable como *Thuja plicata* (Stirling *et al.* 2007), *Juniperus virginiana* (Sung y Prewitt, 2011), *Cunninghamia lanceolata* (Wang *et al.* 2011) o *Schinopsis lorentzii* (Tascioglu *et al.*, 2013), también han demostrado la producción de compuestos antifúngicos, contra hongos fitopatógenos y hongos degradadores de madera (xilófagos). Extractos de árboles como *Dalbergia granadillo* y *Enterolobium cyclocarpum* han sido efectivos contra *Trametes versicolor*, *Coniophora puteana*, *Trichoderma viride* y *Chaetomium globosum* (Rutiaga *et al.*, 1995), también los extractos de duramen de *Gmelina arborea* tienen actividad inhibitoria contra *Trametes versicolor* y *Fomitopsis palustris*, del que se identificaron el (+)-7'-O-etilarboreol, (+)-paulownina, (+)-gmelinol y (+)-epieudesmina, como los principales compuestos responsables (Kawamura *et al.*, 2004).

Así mismo, extractos hexánicos obtenidos del duramen de *Dalbergia congestiflora* han presentado actividad contra el hongo xilófago, *Trametes versicolor*, de los que se identificó al principal compuesto antifúngico, el (+)-3-hidroxi-9-metoxipterocarpano o (+)-medicarpina, un isoflavonoide tipo pterocarpano, considerado en el grupo de la fitoalexinas, ya que se producen ante el ataque de ciertos tipos de estrés (Martínez-Sotres *et al.*, 2012). Recientemente, este metabolito también ha sido aislado de *Andira inermis* que también pertenece a la familia Fabaceae, cuyo nombre común es almendra de río (Morales, 2014).

La actividad antifúngica de la (+)-medicarpina, la propone como una molécula con un alto potencial antifúngico para ser probada no solamente con otros hongos xilófagos, sino también contra hongos fitopatógenos, por lo que existe la necesidad de buscar o confirmar fuentes maderables que la produzcan en alta cantidad, que no presenten problemas de protección. Es por ello que esta investigación se evaluó la actividad antifúngica del extracto de acetato de etilo obtenido del duramen de *Andira inermis*

contra los hongos xilófagos *Irpex lacteus* y *Phlebiopsis*, comparando su actividad con lo ya reportado para *T. versicolor*, así como los fitopatógenos *Alternaria solani* y *Fusarium solani*.

## **Materiales y Métodos**

### **Material biológico**

***Andira inermis***. La madera de *Andira inermis* fue colectada de una localidad del municipio de Taretán, Michoacán, de la cual solo se tomó el duramen del fuste.

**Hongos xilófagos (*Irpex lacteus*, *Phlebiopsis* sp. y *Trametes versicolor*)**. Las cepas utilizadas para los ensayos pertenecen al Cepario Michoacano Universitario del Dr. Gerardo Vázquez Marrufo (CMEB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), que se mantuvieron en medio de cultivo PDA (papa dextrosa-agar), preparado siguiendo las especificaciones del fabricante (Bioxon®) (39 g/L) a un pH de 7.2, y en incubadora (28°C, oscuridad). Las transferencias a medio fresco se realizaron cada 21 días por porción de micelio.

**Hongos fitopatógenos (*Alternaria solani* y *Fusarium solani*)**. Estas cepas fueron proporcionadas por el cepario del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH, cultivadas y con resiembra bajo mismas condiciones de hongos xilófagos.

### **Obtención del extracto de acetato de etilo de *Andira inermis***

El duramen de fuste de *A. inermis* fue astillado con formón y martillo hasta obtener astillas pequeñas, para poder ser trituradas en un molino eléctrico hasta producir harina, la cual se dejó expuesta al aire libre para la pérdida de humedad. Posteriormente, con el propósito de determinar un óptimo rendimiento de extracción,

la harina de duramen fue sometida a extracciones en un equipo de soxhlet con cargas de 60 g de harina/L de acetato de etilo, a 6, 8 y 10 horas. El extracto fue llevado a la evaporación del solvente mediante el rotavapor hasta la obtención del extracto seco (Morales, 2014).

## **Ensayos antifúngicos**

La actividad antifúngica se llevó a cabo con el método “agar well diffusion assay” o ensayo por difusión en pozos sobre agar, reportado por Magaldi *et al.* (2004), que consistió en realizar perforaciones de 5 mm en medio solidificado PDA con la parte posterior de una pipeta Pasteur de vidrio estéril como sacabocado. En estos pozos se aplicaron 50 µL del extracto para los bioensayos con cada uno de los hongos en estudio. Se realizaron ocho pozos por cada caja Petri.

Sobre los pozos, siete realizados alrededor y uno en el centro de la caja, se colocaron 50 µL de cada concentración del extracto (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg/L), así como también del control positivo, el fungicida comercial benomilo [1-(butilcarbonil) 2-bencimidazol ácido carbámico] a 1.0 mg/L, y del control negativo (metanol), utilizado como vehículo de disolución del extracto. Posteriormente, en cada pozo se cultivó un fragmento de micelio (5 mm de diámetro) de cada uno de los hongos en estudio. Las cajas Petri de los ensayos fueron incubadas por 8 días a 28°C (oscuridad) y en este tiempo se determinó el porcentaje de inhibición, considerando como máximo el crecimiento de los hongos en el control negativo (metanol) que fue de 2.5 cm de diámetro, tomando este valor como 0% de inhibición. El porcentaje de inhibición fue calculado de acuerdo a la fórmula reportada por Rutiaga (2001):

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(\text{crecimiento de control} - \text{crecimiento de tratamiento})}{\text{crecimiento de control}} \times 100$$

Además, con los diferentes valores de porcentajes de inhibición, se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI) así como las concentraciones letales media y total (CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub>), mediante una curva de concentración del extracto realizado contra los porcentajes de inhibición de cada uno de los hongos (Anexo 10.1).

### **Análisis estadístico**

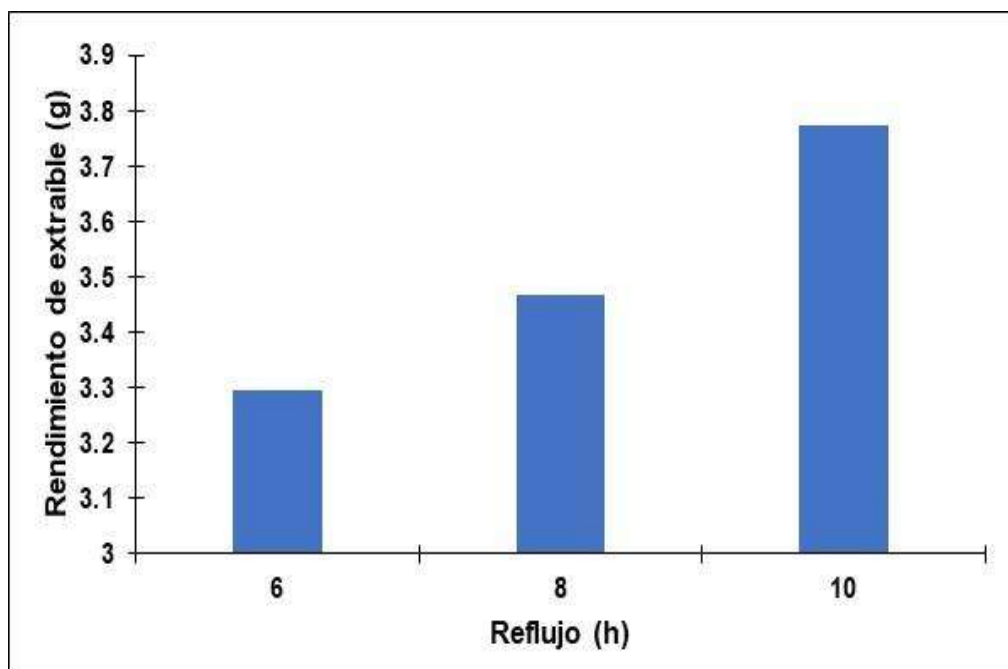
Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se expresaron a través de la media  $\pm$  desviación estándar. Los mismos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posteriormente se realizó una prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  ( $n=3$ ), utilizando el software JMP.

### **Resultados y Discusión**

En la presente investigación se determinó el efecto antifúngico del extracto de harina de duramen de *Andira inermis* (almendra de río), sobre hongos xilófagos (*Irpex lacteus*, *Phlebiopsis* sp y *Trametes versicolor*) y fitopatógenos (*Alternaria solani* y *Fusarium solani*), considerados como algunos de los hongos de mayor incidencia en daño en material lignocelulósico e infecciones de plántulas y especies establecidas en cultivos forestales respectivamente (Wang *et al.*, 2011; Boyd *et al.*, 2013; Lomelí *et al.*, 2013).

Debido a la necesidad de encontrar nuevas alternativas para reemplazar los fungicidas convencionales y de igual forma que sean sustentables para el medio ambiente y la salud humana, debido al importante papel que desempeñan los extraíbles en la protección de la madera, varios estudios han destacado el uso de sustancias extraídas de la madera de especies naturalmente duraderas como potenciales conservantes ecológicos (Tascioglu *et al.*, 2013; Mohammed *et al.*, 2016). De esta forma se tiene el sustento de que los extractos naturales de árboles naturalmente durables son una alternativa esencial a los fungicidas sintéticos y tienen un impacto ambiental mínimo en ensayos de laboratorio (Kiran y Raveesha, 2006).

Debido a que se ha reportado que el extracto de *A. inermis* contiene el metabolito (+)-medicarpina, con propiedades antifúngicas, pero de éste aún no se ha evaluado esta actividad, lo propone como una fuente potencial para controlar la actividad micótica de los agentes causantes de la problemática anteriormente mencionada. De esta manera, la actividad antifúngica el extracto del duramen de *A. inermis* fue evaluado sobre el crecimiento del micelio de los hongos en estudio. Posterior al proceso de extracción y evaporación al vacío en rotavapor, se determinó el rendimiento del extracto a los diferentes tiempos de extracción de reflujo en soxhlet, presentando rendimientos dependientes del tiempo de extracción, con un mínimo de 3.3 g en 6 h de reflujo. El rendimiento del extracto fue mayor con 10 h de reflujo, obteniéndose hasta 3.77 g/60 g duramen (Figura 3), por lo que esta condición de extracto fue utilizada para los ensayos *in vitro*.



**Figura 3.** Rendimiento del extracto de duramen de fuste de *Andira inermis* por cada 60 g de harina/L de acetato de etilo bajo extracción en sistema Soxhlet.



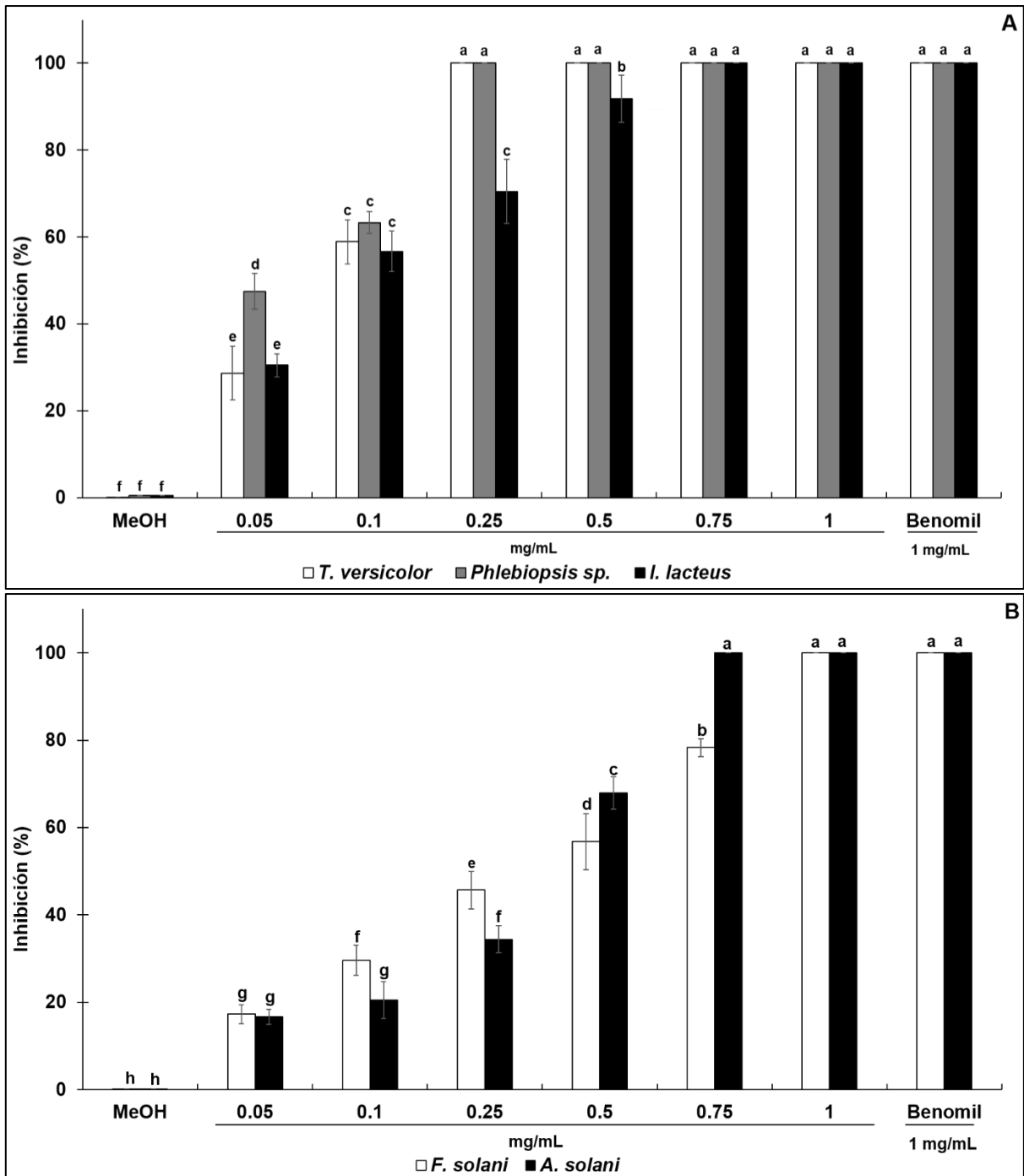
## **Efecto antifúngico del extracto de *Andira inermis***

A los 8 días de los ensayos de inhibición a diferentes concentraciones del extracto de duramen de *A. inermis*, se observó una clara y fuerte inhibición, principalmente sobre los hongos xilófagos, con un 100% de inhibición sobre *T. versicolor* y *Phlebiopsis* sp. en las concentraciones entre un rango de 0.25 a 1.0 mg/L, mientras que la inhibición en este mismo porcentaje para *I. lacteus* solo se presentó con 0.75 y 1.0 mg/L, con diferencias significativas con las demás concentraciones (Figura 4A).

Con 0.1 mg/L, los tres hongos xilófagos mostraron porcentajes de inhibición mayores al 50%. La inhibición alcanzada del 100% con el extracto de *A. inermis* fue similar al presentando por el fungicida comercial (benomilo) a 1.0 mg/L y no se presentó inhibición con el vehículo utilizado para el extracto (metanol) (Figura 4A).

La concentración de 0.05 mg/L se consideró como la CMI para los hongos xilófagos, debido a que los porcentajes de inhibición fueron menores al 50%, con 47.5%, 30.48% y 28.69 sobre *I. lacteus*, *Phlebiopsis* sp. y *T. versicolor*, con valores de  $CL_{50}$  0.28, 0.11 y 0.11 mg/L, respectivamente (Cuadro 3). La  $CL_{100}$  calculada para *Phlebiopsis* sp. y *T. versicolor* fue de 0.24 mg/L, menor a la requerida para *I. lacteus* con 0.69 mg/L (Cuadro 3).

A los 8 días del cultivo, el efecto del extracto de *A. inermis* sobre los dos hongos fitopatógenos (*A. solani* y *F. solani*) también mostró un efecto antifúngico, dependiente de la concentración, ya que a las concentraciones de 0.75 y 1.0 mg/L, se obtuvo un 100% de inhibición en *A. solani*, aunque el 100% en *F. solani* se obtuvo solo con 1.0 mg/L. En ambos hongos, se requirió más de 0.5 mg/L para que se presentaran porcentajes de inhibición mayores al 50% (Figura 4B). La CMI en ambos hongos fitopatógenos, fue de 0.25 mg/L, con la que se obtuvo menos del 50% de inhibición. Al igual que para los hongos xilófagos, el benomil (1.0 mg/L) ejerció un 100% de inhibición y el metanol no mostró inhibición sobre ellos (Figura 4B).



**Figura 4.** Porcentaje de inhibición del extracto de acetato de etilo de *Andira inermis* sobre: A) hongos xilófagos (*Irpex lacteus*, *Phlebiopsis sp.* y *Trametes versicolor*); y B) hongos fitopatógenos (*Alternaria solani* y *Fusarium solani*). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ,  $n=3$ , prueba de Tukey).

**Cuadro 3.** Valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y concentración letal total (CL<sub>100</sub>) del extracto de acetato de etilo de *A. inermis*, observados en los hongos xilófagos y fitopatógenos (a los 8 días del cultivo), en ensayos con el extracto del duramen de *A. inermis*.

Hongo	CMI	CL50	CL100
	[mg/L]		
<i>Irpex lacteus</i>	0.05	0.28	0.69
<i>Phlebiopsis sp</i>	0.05	0.11	0.24
<i>Trametes versicolor</i>	0.05	0.11	0.24
<i>Alternaria solani</i>	0.25	0.36	0.75
<i>Fusarium solani</i>	0.25	0.41	0.98

Con estos resultados se demuestra el efecto antifúngico del extracto del duramen *A. inermis* obtenido con acetato de etilo, ya que en todos los casos se obtuvo una inhibición del 100% (CL<sub>100</sub> calculada) con una concentración menor a 1 mg/L. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre los valores calculados para la CL<sub>50</sub> y CMI de los tres hongos xilófagos y los dos fitopatógenos. Las CL<sub>50</sub> para *A. solani* y *F. solani* fueron las más altas con 0.36 y 0.41 mg/L, obteniendo valores de CL<sub>100</sub> de 0.75 y 1.0 mg/L, respectivamente, aproximadamente 5 veces más que los mostrados para *Phlebiopsis sp.* y *T. versicolor* (Cuadro 3).

Los extractos de plantas se han utilizado ampliamente en varios estudios y potencialmente son útiles para proteger la madera contra el crecimiento de hongos (Mansour y Salem, 2015; Salem *et al.*, 2016<sup>a</sup>; Zhang *et al.*, 2016), o sobre hongos fitopatógenos que afectan plántulas de árboles bajo cultivo en vivero, ya que actúan como agentes antimicóticos (Salido *et al.*, 2015). Aunque son pocas las investigaciones sobre la actividad antifúngica de extractos derivados de especies leñosas (Muanza *et al.*, 2008; Salem *et al.*, 2016<sup>b</sup>; Say *et al.*, 2018), los extraíbles de

*Juniperus virginiana*, *Dalbergia granadillo*, *D. congestiflora* y de *Cunninghamia lanceolata*, han mostrado inhibición contra hongos xilófagos como *I. lacteus*, *Phlebiopsis* sp y *T. versicolor* (Rutiaga *et al.*, 1995; Sung y Prewitt, 2011; Wang *et al.* 2011; Martínez-Sotres *et al.*, 2012). Los resultados de la presente investigación demuestran actividad antifúngica del extracto de *A. inermis* sobre los hongos xilófagos *Phlebiopsis* sp. y *T. versicolor*, aunque menor en *I. lacteus* y en los hongos fitopatógenos *A. solani* y *F. solani* (Figura 4).

La CL<sub>100</sub> considerada para los hongos xilófagos *T. versicolor* y *Phlebiopsis* sp. (0.24 mg/L) ejercida por el extracto de *A. inermis* (Cuadro 3), es menor que la reportada para extractos de otras especies maderables como la inhibición de estos dos hongos por los extractos metanólicos de duramen de *Juniperus virginiana*, que presentaron una inhibición del 100% a concentraciones de 2.5 mg/L (Sung y Prewitt, 2011). Éstos, coinciden con lo reportado para diferentes extractos con actividad antifúngica mayor sobre *T. versicolor*, como la fracción hexánica de duramen de *Dalbergia granadillo* y el extracto hexánico del duramen de *D. congestiflora*, con valores de 0.25 mg/L y 0.15 mg/L, respectivamente (Rutiaga *et al.*, 1995; Martínez-Sotres *et al.*, 2012).

Los valores de la CL<sub>50</sub> calculada para los extractos de duramen de *A. inermis* sobre la inhibición del crecimiento de *T. versicolor* y de *Phlebiopsis* sp. (0.11 mg/L) (Cuadro 3) son similares a lo observado por el extracto de acetato de etilo de *Cunninghamia lanceolata* sobre *T. versicolor* e *I. lacteus* (Wang *et al.*, 2011). La CMI del extracto de *A. inermis* sobre los hongos xilófagos en estudio (0.05 mg/L) también es similar a lo reportado para el extracto metanólico de hojas de *Annona squamosa* que inhibió a *F. solani* con una CMI de 0.6 mg/L (Kalidindi *et al.*, 2015). Sin embargo, los valores de CMI de diversos extractos para *A. solani*, son menores (< 0.1 mg/L) a los encontrados en el presente trabajo (0.25 mg/L). En esta investigación se observó una relación entre la concentración y el crecimiento de los hongos fitopatógenos, demostrándose que el extracto de *A. inermis* posee la capacidad de inhibirlos a concentraciones relativamente bajas.

Este es el primer estudio de la capacidad antifúngica del extracto *A. inermis* sobre los hongos xilófagos *I. lacteus*, *Phlebiopsis* sp. y *T. versicolor*, y los hongos fitopatógenos *A. solani* y *F. solani*, lo que sugiere continuar con las investigaciones para determinar el efecto antifúngico de (+)-medicarpina, el principio activo del extracto del duramen de *A. inermis*, del que ha sido demostrado su actividad antifúngica y probada sobre *T. versicolor*.

## Conclusiones

El extracto de la muestra del fuste de *A. inermis* a 10 horas de reflujó presentó el rendimiento más abundante con 3.77 g/60 g duramen, el que mostró una mayor actividad antifúngica sobre *Phlebiopsis* sp. y *T. versicolor*, presentando los más bajos valores de CMI, CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub>. Aunque la inhibición del crecimiento sobre *I. lacteus*, *F. solani* y *A. solani* fue menor, los valores de CMI, CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub> son considerados con un óptimo efecto antifúngico.

## Referencias

- Boulogne, I., Petit F., Ozier-Lafontaine H., Desfontaines L. y Loranger-Merciris G.** (2012). Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: A review. *Environ. Chem. Lett.*, 10:325–347.
- Boyd, I.L., Freer-Smith P.H., Gilligan C.A. y Godfray H.C.J.** (2013). The consequence of tree pests and diseases for ecosystem services. *Science*, 342(6160):832-831.
- Ikeura, H. y Kobayashi F.** (2015) Antimicrobial and antifungal activity of volatile extracts of 10 herb specie against *Glomerella cingulata*. *J. Agric. Sci.*, 7(14):77-84.
- Kalidindi, N., Nandeep R., Swetha S. y Kalidindi B.** (2015). Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. *J. Food Drug Anal.*, 23:795-802.
- Kawamura, F., Ohara S. y Nishida A.** (2004). Antifungal activity of constituents from the heartwood of *Gmelina arborea*: Part 1. Sensitive antifungal assay against Basidiomycetes. *Holzforschung* 58:189- 192.

**Kiran, B. y Raveesha K.A.** (2006). Antifungal activity of seed extract of *Psoralea corylifolia* L. *Plant Dis. Res.*, 20:213-215.

**Lomelí, R.M.G., Contreras Q.H.J. y García E.S.** (2013). Metabolitos secundarios con actividad antifúngica hacia hongos xilófagos. En: Los recursos forestales del Occidente de México: Biodiversidad, manejo, producción, aprovechamiento y conservación. Tomo II, (Eduardo Salcedo Pérez, Efrén Hernández Álvarez, José Antonio Vázquez García, Nancy Díaz Echavarría, Editores) Amaya Ediciones, pp.645.

**Magaldi, S., Mata E.S., Hartung de Capriles C., Perez C., Colella M. T. y Olaizola C.** (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1):39-45.

**Mansour, M.M.A. y Salem M.Z.M.** (2015). Evaluation of wood treated with some natural extracts and Paraloid B-72 against the fungus *Trichoderma harzianum*: Wood elemental composition, *in-vitro* and application evidence. *Int. Biodeterior. Biodegr.*, 100:62-69.

**Martínez-Sotres, C., López-Albarrán P., Cruz-de-León J., García-Moreno T., Rutiaga-Quiñones J. G., Vázquez-Marrufo G., Tamariz-Mascarúa J. y Herrera-Bucio R.** (2012). Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 69:38-40.

**Mazid, M., Khan T. y Mohammad F.** (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Journal Biology and Medicine*, 3(2):232-249.

**Mohammed, S. A., Madhan B., Demissie B.A., Velappan B. y Tamil S.A.** (2016). *Rumex abyssinicus* (mekmeko) Ethiopian plant material for preservation of goat skins: approach for cleaner leather manufacture. *J. Clean. Prod.*, 133:1043-1052.

**Morales, P.F.G.** (2014). Análisis espectroscópico de compuestos del duramen de maderas durables que inhiben el crecimiento de *Trametes versicolor*. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencia y Tecnología de la Madera. Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera. UMSNH. Morelia, Michoacán, México.

**Muanza, D.N., Kim B.W., Euler K.L. y Williams L.** (2008). Antibacterial and antifungal activities of nine medicinal plants from Zaire. *Pharmaceutical Biology*, 32(4):337-345.

**Rongai, D., Pulcini P., Pesce B. y Milano F.** (2015). Antifungal activity of some botanical extracts on *Fusarium oxysporum*. *Open Life Sci.*, 10:409-416.

**Rowell, R.M., Pettersen R., Han J.S., Rowell J.S. y Tshabalala M.A.** (2005). Cell wall chemistry. En Roger M. Rowell (ed). *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. CRC Press.

**Rutiaga, Q., Windeisen E. y Schumacher P.** (1995). Antifungal activity of heartwood extracts *Dalbergia granadillo* and *Enterolobium cyclocarpum*. Holz als Roh-und Werkstoff. 53(5):308-309.

**Rutiaga, Q.J.G.** (2001). Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen. Buchverlag Gräefelfing. München. p. 49.

**Salem, M.Z.M., Zidan Y.E., Mansour M.M.A., El Hadidi N. M. N. y Abo Elgat W. A. A.** (2016<sup>a</sup>). Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by five common mold fungi. Int. Biodeterior. Biodegr., 106:88-96.

**Salem, M.Z.M., Elansary H.O., Elkelish A.A., Zeidler A., Ali H.M., Mervat E.H. y Yessoufou K.** (2016<sup>b</sup>). *In vitro* bioactivity and antimicrobial activity of *Picea abies* and *Larix decidua* wood and bark extracts. BioRes., 11(4):9421-9437.

**Salido, S., Pérez-Bonilla M., Adams P. y Altarejos J.** (2015). Componentes fenólicos y actividad antioxidante de extractos de madera de 10 variedades principales de olivo español. J. Agric. Food Chem., 63 (29): 6493–64500.

**Say, A.J.B., Bobelé N.F., Faustin M., Virieux D., Pirat J.L., Adima A.A., Coulibaly K.S. y Amusant N.** (2018). The role of extractives in the natural durability of the heartwood of *Dicorynia guianensis* Amsh: new insights in antioxydant and antifungal properties. Annals of Forest Science, 75:15.

**Sepulveda, J.G., Porta D.H. y Rocha S.M.** (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología., 21(3):255-263.

**Sesan, T.E., Enache E. y Iacomi B.M.** (2015). Antifungal activity of some plant extracts against *Botrytis cinerea* Pers. In the Blackcurrant Crop (*Ribes nigrum* L.). Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus, 14(13):29-43.

**Stirling, R., Daniels C. R., Clark J. E. y Morris P.I.** (2007). Methods to determine the role of extracts in the natural durability of western red cedar heartwood. The international wood protection research group. Document no. IRG / WP 07-20356. Stockholm.

**Sung, P.M. y Prewitt L.** (2011). Antifungal activity of organic extracts from *Juniperus virginiana* heartwood against wood decay fungi. Forest Products Journal, 61(6):443-449.

**Tascioglu, C., Yalcin M., Sen S. y Akcay C.** (2013). Antifungal properties of some plant extracts used as wood preservatives. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85(1):23-28.

**Wang, J., Li J., Freitag C. y Morrell J.J.** (2011). Antifungal activities of *Cunninghamia lanceolata* heartwood extractives. *BioResources*, 6(1):606-614.

**Zhang, Z., Yang T., Mi N., Wang Y., Li G., Wang L. y Xie Y.** (2016). Antifungal activity of monoterpenes against wood white-rot fungi. *Int. Biodeterior. Biodegr.*, 106:157-160.



## 7.2. CAPÍTULO II. Actividad antifúngica de (+)-medicarpina purificada del extracto de acetato de etilo del duramen de *Andira inermis* sobre hongos xilófagos y fitopatógenos.

### Resumen

En esta parte de la investigación se desarrolló el método para el aislamiento de (+)-medicarpina del extracto de acetato de etilo del duramen de *Andira inermis*, por cromatografía en columna y se confirmó la pureza del compuesto por análisis con resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H), evaluando su actividad antifúngica. La actividad antifúngica fue determinada como porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de micelio de tres hongos xilófagos (*Trametes versicolor*, *Irpex lacteus* y *Phlebiopsis* sp.) y dos fitopatógenos (*Fusarium solani* y *Alternaria solani*), con el método de difusión en agar con pozos, utilizando metanol como vehículo de dilución (control negativo) y el fungicida comercial benomilo [1-(butilcarbamoil) benzimidazol-2-ilcarbamato de metilo] a 1.0 mg/L como control positivo. La concentración mínima inhibitoria de (+)-medicarpina sobre el crecimiento micelial de los hongos fue determinada con la aplicación *in vitro* de diferentes concentraciones de ésta (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg/L), incubando por 8 días en medio PDA (papa-dextrosa-agar) a 28°C en condiciones de oscuridad. A este tiempo, se observó un mayor efecto antifúngico de la (+)-medicarpina en los hongos xilófagos *T. versicolor* e *I. lacteus* con un 100% de inhibición en las concentraciones de 0.5 a 1.0 mg/L y una inhibición por debajo del 50% en la concentración de 0.25 mg/L, presentando valores de CL<sub>50</sub> de 0.31 y 0.33 mg/L, y CL<sub>100</sub> de 0.81 y 0.8 mg/L, respectivamente. Sin embargo, con 1.0 mg/L, mostró un 100% de inhibición de *Phlebiopsis* sp. con lo que se obtuvo una CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub> de 0.48 y 1.1 mg/L, respectivamente. La (+)-medicarpina mostró una mayor actividad antifúngica sobre los hongos xilófagos (CMI=0.25 mg/L) en relación al efecto sobre *F. solani* y *A. solani* ya que éstos exhibieron una inhibición de 60.9 y 48.3%, respectivamente, a la concentración máxima probada (1.0 mg/L), que representaron valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub> de 1.0 mg/L y de 2.0 mg/L, con una CMI de 0.75 mg/L. Los resultados demuestran un mayor efecto antifúngico de la (+)-medicarpina sobre los hongos xilófagos *I. lacteus*, *Phlebiopsis* sp. y *Trametes versicolor* en comparación a lo obtenido sobre los hongos fitopatógenos (*A. solani* y *F. solani*).

**Palabras clave:** Extractos, hongos xilófagos, hongos fitopatógenos, (+)-medicarpina, actividad antifúngica.

### Abstract

In this part of the investigation, the method for the isolation of (+)-medicarpine from *Andira inermis* heartwood ethyl acetate extract, was developed by column chromatography and the purity of the compound was confirmed by nuclear magnetic resonance analysis (RMN-<sup>1</sup>H), evaluating its antifungal activity. Antifungal activity was determined as a percentage of mycelial growth inhibition of three xylophagous fungi (*Trametes versicolor*, *Irpex lacteus* and *Phlebiopsis* sp.) And two phytopathogens

(*Fusarium solani* and *Alternaria solani*), with the diffusion method in well agar, using methanol as a dilution vehicle, as well as negative control. The commercial fungicide benomyl [1 (butylcarbamoyl) benzimidazol-2-ylcarbamate] at 1.0 mg/mL was used as a positive control. The minimum inhibitory concentration of (+)-medicarpin on fungal mycelial growth was determined with the *in vitro* application of different concentrations of this (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg/L), incubating for 8 days at 28 °C in dark conditions. At this time, a greater antifungal effect of (+)-medicarpin was observed xylophagous fungi *T. versicolor* and *I. lacteus* with 100% inhibition at concentrations of 0.5 to 1.0 mg/L and inhibition below 50% in the concentration of 0.25 mg/L, observin CL<sub>50</sub> values of 0.31 and 0.33 mg/L, and CL<sub>100</sub> of 0.81 and 0.8 mg/L, respectively. However, at 1.0 mg/L, it showed 100% inhibition of *Phlebiopsis* sp. obtaining a CL<sub>50</sub> and CL<sub>100</sub> of 0.48 and 1.1 mg/L, respectively. The (+)-medicarpin showed increased antifungal activity on xylofagous fungi (MIC=0.25 mg/L) in relation to the effect on *F. solani* and *A. solani* as they exhibited an inhibition of 60.9% and 48.3%, respectively, at the tested maximum concentration (1.0 mg/L), which represented CL<sub>50</sub> and CL<sub>100</sub> values of 1.0 mg/L and 2.0 mg/L, with a MIC of 0.75 mg/L. The results demonstrate a greater antifungal effect of (+)-medicarpin on the xylophagous fungi (*I. lacteus*, *Phlebiopsis* sp. and *T. versicolor*) in relation at obtained with phytopathogens fungi (*A. solani* and *F. solani*).

**Keywords:** Extracts, xylophagous fungi, phytopathogenic fungi, (+)-medicarpin, antifungal capacity.

## Introducción

En general, las plantas producen tres tipos de metabolitos secundarios, mayormente sintetizan compuestos fenólicos, terpenos y derivados de nitrógeno/azufre como los alcaloides. De estos metabolitos, los compuestos fenólicos son de los más ampliamente distribuidos, están presentes de manera ubicua en el reino vegetal e incluyen los ácidos fenólicos simples y a los polifenoles como flavonoides, ligninanos, taninos y antocianinas) (Lattanzio *et al.*, 2008; Lattanzio, 2013; Pagare *et al.*, 2015). Aunque entre los compuestos fenólicos se han identificado un gran número de metabolitos con actividad antimicrobiana, como ácidos fenólicos y flavonoides que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos (Tungmunnithum *et al.*, 2018), otros metabolitos de naturaleza fenólica principalmente con esta capacidad, pero con una alta especificidad frente a hongos y bacterias, que son inducidos para producirse como respuesta de defensa, se denominan fitoalexinas y son un grupo de metabolitos que

las plantas producen para defenderse del ataque de bacterias y hongos fitopatógenos (Hammerschmidt, 1999; Pedras *et al.*, 2011). Las fitoalexinas son un grupo heterogéneo de compuestos que se consideran marcadores moleculares de resistencia a enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos (Shinbo *et al.*, 2006; Huffaker *et al.*, 2011; Schmelz *et al.*, 2011).

Actualmente se ha reportado que las fitoalexinas son producidas por un amplio rango de plantas de importancia agrícola de las familias Brassicaceae, Solanaceae, Vitaceae, Poaceae y Fabaceae, cuando se enfrentan a diversos tipos de estrés. Particularmente en la familia Fabaceae, más de 500 especies silvestres acumulan fitoalexinas, en respuesta al ataque de patógenos (Ahuja *et al.*, 2012). Plantas como la soya (*Glycine max*), chícharo (*Pisum sativum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), alfalfa (*Medicago sativa*), trébol carretón (*Medicago truncatula*), cacahuate (*Arachis hypogaea*) y lupinus (*Lupinus angustifolius*), producen fitoalexinas, de diferentes clases de aglicón isoflavonas. Las de tipo pterocarpano como la medicarpina, vestitol, vestitona y sativán, son sintetizadas en respuesta a una infección fúngica o bacteriana, o por la elicitación de iones metálicos y otros efectores bióticos, en alfalfa, trébol carretón y garbanzo. En estas plantas, estos compuestos se producen en concentraciones bajas, solamente como respuesta al ataque de patógenos y solo en etapas tempranas de su desarrollo (Saunders y O'Neill, 2004; Naoumkina *et al.*, 2007; Arman, 2011; Ahuja *et al.*, 2012). La medicarpina además de encontrarla en especies herbáceas, también se ha reportado en especies maderables de la familia Fabaceae como *Dalbergia congestiflora*, *D. oliveri*, *D. stevensoni* y *Andira inermis* (McMurry y Martin, 1972; Deesamer *et al.*, 2009; Morales, 2014). Las especies de *Dalbergia* están protegidas y algunas están en peligro de extinción (CITES, 2017).

En diversas investigaciones, la medicarpina ha probado tener actividad antifúngica, purificada de corteza de *Butea monosperma* inhibió el crecimiento de *Cladosporium cladosporioides* (Bandara *et al.*, 1989), la proveniente de madera de *Dalbergia monetaria* mostró inhibición de *Rhizoctonia solani* y *Helminthosporium teres* (Miles *et*

al., 1991). Martínez-Sotres *et al.* (2012) y Morales (2014), también la reportan con actividad antifúngica, aunque solamente contra *Trametes versicolor*, un hongo xilófago.

Con el propósito de determinar la especificidad de la actividad antifúngica de la medicarpina sobre hongos patógenos y obtenida de plantas que no estén en alguna categoría en peligro de extinción, con un rendimiento mayor, en el presente estudio se evaluó la actividad antifúngica de la (+)-medicarpina, aislada del duramen de *Andira inermis*, con los hongos xilófagos *Irpex lacteus* y *Phlebiopsis* sp, comparando su actividad con lo ya reportado para *T. versicolor*, así como con los hongos fitopatógenos *Fusarium solani* y *Alternaria solani*.

## **Materiales y Métodos**

### **Material biológico**

**Hongos xilófagos (*Trametes versicolor*, *Irpex lacteus* y *Phlebiopsis* sp.).** Las cepas utilizadas para los ensayos pertenecen al Cepario Michoacano Universitario del Dr. Gerardo Marrufo (CMEB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), que se mantuvieron en medio de cultivo PDA (papa dextrosa-agar), preparado siguiendo las especificaciones del fabricante (Bioxon®) (39 g/L) a un pH de 7.2, y en incubadora (28°C, oscuridad). Las transferencias a medio fresco se realizaron cada 21 días por porción de micelio.

**Hongos fitopatógenos (*Fusarium solani* y *Alternaria solani*).** Estas cepas fueron proporcionadas por el cepario del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH, cultivadas y con resiembra bajo mismas condiciones de hongos xilófagos.

## Purificación de (+)-medicarpina

Después de la obtención del extracto de acetato de etilo del duramen de *A. inermis*, descrito en el capítulo I, la purificación de la medicarpina se realizó por cromatografía en columna con el método estandarizado por Morales (2014), que consistió en utilizar como fase estacionaria gel de sílice malla 70-230 Mesh ASTM (Whatman) y como fase móvil, proporciones de mezclas de disolventes (hexano y acetato de etilo) de 97:3. Estos disolventes utilizados fueron previamente destilados en el laboratorio. Posteriormente se confirmó la pureza, identificando el compuesto mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H), mediante la obtención del espectro respectivo de la molécula, utilizando el equipo de resonancia magnética nuclear del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH, en un espectrómetro Varian Mercuri plus a 400 MHz (Anexo 10.3). Las determinaciones se realizaron en CDCl<sub>3</sub> (Deuterocloroformo) y TMS (Tetrametilsilano) como referencia interna.

## Ensayos antifúngicos

La actividad antifúngica se llevó a cabo con el ensayo por difusión en pozos sobre agar, de acuerdo a Magaldi *et al.* (2004), que consistió en realizar perforaciones de 5 mm en medio solidificado PDA con la parte posterior de una pipeta Pasteur de vidrio estéril como sacabocado. En estos pozos se aplicaron 50 µL de (+)-medicarpina a diferentes concentraciones (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg/L) para los bioensayos con cada uno de los hongos en estudio. Se realizaron ocho pozos por cada caja Petri. Los datos se reportan como porcentajes de inhibición, que se determinaron con la siguiente fórmula (Rutiaga, 2001):

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(\text{crecimiento de control} - \text{crecimiento de tratamiento})}{\text{crecimiento de control}} \times 100$$

Además, con los diferentes valores de porcentajes de inhibición, se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI) así como las concentraciones letales media y

total (CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub>), mediante una curva de concentración de la medicarpina purificada, realizado contra los porcentajes de inhibición de cada uno de los hongos (Anexo 10.2).

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se expresaron a través de la media  $\pm$  desviación estándar. Los mismos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posteriormente se realizó una prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  ( $n=3$ ), utilizando el software JMP.

### **Resultados y Discusión**

Los hongos participan en la diversidad y productividad de los ecosistemas forestales, contribuyendo sustancialmente a un complejo fenómeno de reciclaje de nutrientes y carbono, participando en la descomposición y mineralización de madera muerta y hojarasca en bosques y plantaciones forestales (Baldrian y Lindahal, 2011; Krashevskaya *et al.*, 2015). Sin embargo, causan problemas cuando infectan árboles vivos en plantaciones, descomponen madera comercial y productos de madera (Bowyer *et al.*, 2003). Debido a esto, las plantas generalmente producen sustancias protectoras para prevenir infecciones por hongos y otros organismos (Singh y Singh, 2012), por lo que son una alternativa para reemplazar los plaguicidas o fungicidas convencionales y de igual forma que sean sustentables para el medio ambiente y la salud humana (Tascioglu *et al.*, 2013; Mohammed *et al.*, 2016).

En los últimos años se ha prestado mayor atención a las moléculas que se encuentran en los extractos de madera con alta resistencia a la degradación, pues con diversos estudios se ha demostrado la bioactividad atribuida por diversos mecanismos, como la eliminación de metales y radicales libres, la interacción directa con enzimas, la alteración de la integridad de la membrana y la perturbación de la homeostasis iónica (Valette *et al.*, 2017).

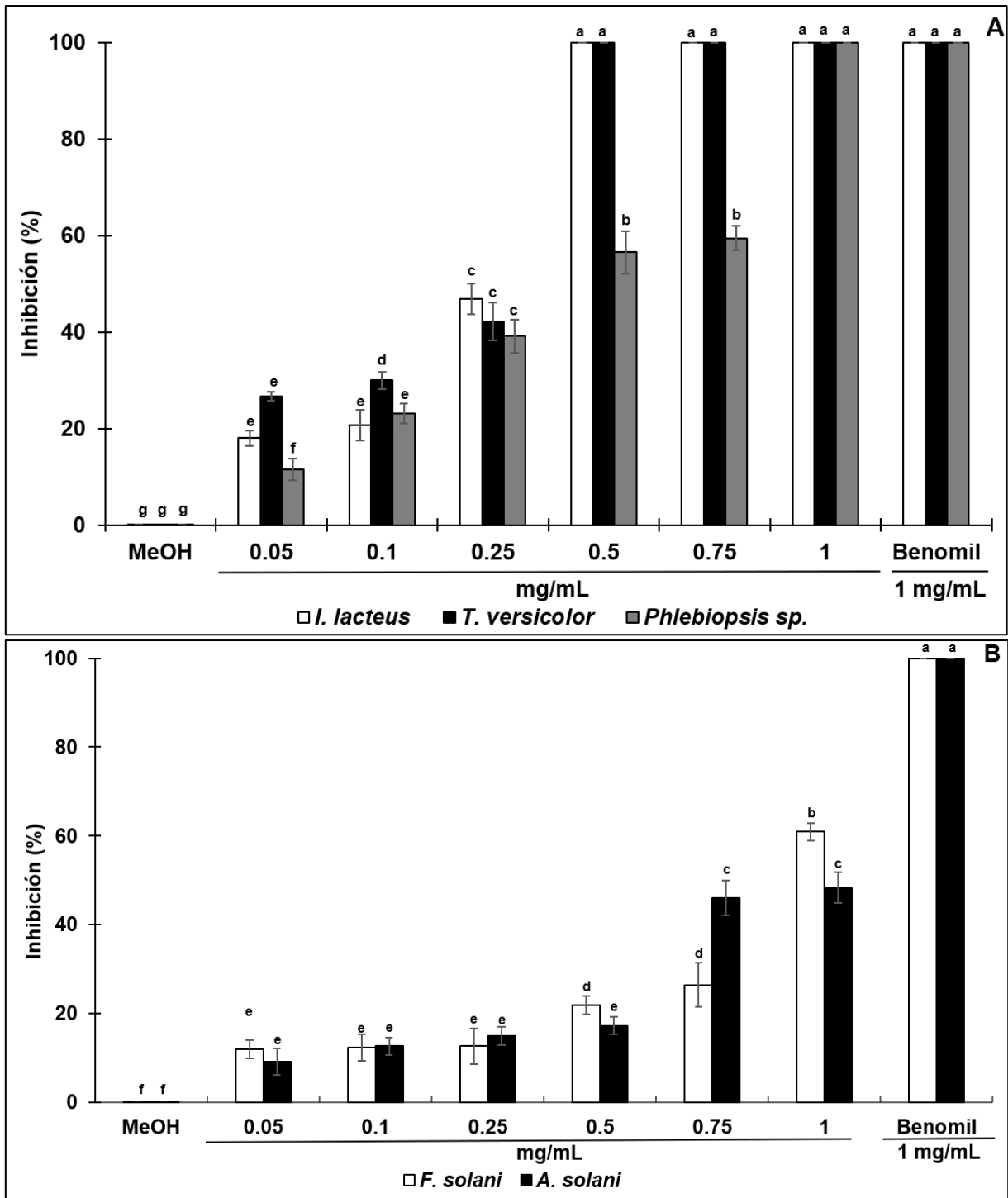
De acuerdo a los antecedentes sobre la actividad de (+)-medicarpina, uno de los metabolitos con capacidad antifúngica probada sobre el hongo xilófago *Trametes versicolor*, que es producida en especies de la familia Fabaceae, lo hace potencial para controlar la actividad antifúngica sobre otros hongos xilófagos como *Irpex lacteus* y *Phlebiopsis* sp., así como de los fitopatógenos *Fusarium solani* y *Alternaria solani*, considerados como algunos de los hongos de mayor incidencia en daño en material lignocelulósico e infecciones de plántulas y especies establecidas en cultivos forestales, respectivamente (Wang *et al.*, 2011; Boyd *et al.*, 2013; Lomelí *et al.*, 2013).

Es por ello que esta investigación se determinó el efecto antifúngico de la (+)-medicarpina purificada a partir del extracto de acetato de etilo de harina de duramen de *Andira inermis* (almendra de río) sobre los agentes micóticos mencionados.

### **Efecto antifúngico de (+)-medicarpina**

A los 8 días de los ensayos de inhibición a diferentes concentraciones de (+)-medicarpina purificada del extracto del duramen de *A. inermis* (Anexo 10.3), se observó una clara y fuerte inhibición, principalmente sobre los hongos xilófagos, con un 100% de inhibición en *T. versicolor* e *Irpex lacteus* en las concentraciones de 0.5, 0.75 y 1.0 mg/L, mientras que la inhibición en este mismo porcentaje para *Phlebiopsis* sp. sólo se presentó con 1.0 mg/L, con diferencias significativas con las demás concentraciones (Figura 5A).

Con estos resultados de inhibición, la concentración de 0.25 mg/L fue considerada como la CMI, ya que los porcentajes de inhibición fueron menores al 50%, con 42.2, 46.8 y 39.1%, sobre *T. versicolor*, *I. lacteus* y *Phlebiopsis* sp., respectivamente. La inhibición alcanzada del 100% con (+)-medicarpina fue similar al presentando por el fungicida comercial (benomilo) a 1.0 mg/L y no se presentó inhibición con el vehículo utilizado para la (+)-medicarpina (metanol) (Figura 5A).



**Figura 5.** Porcentaje de inhibición de (+)-medicarpina sobre: A) hongos xilófagos (*Trametes versicolor*, *Phlebiopsis sp.* e *Irpex lacteus*); y B) hongos fitopatógenos (*Fusarium solani* y *Alternaria solani*). A los 8 días del cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ,  $n=3$ , prueba de Tukey).



Al final del tiempo de cultivo, el efecto de (+)-medicarpina sobre los dos hongos fitopatógenos (*F. solani* y *A. solani*), también mostró un efecto antifúngico, significativamente menor en comparación con el observado con los hongos xilófagos, ya que a la concentración máxima usada (1.0 mg/L), se obtuvo una inhibición ligeramente mayor del 50%, con 60.9% y 50.6% sobre *F. solani* y *A. solani*, respectivamente (Figura 5B).

Es por ello que la CMI en ambos hongos fitopatógenos, fue más alta que para los xilófagos, con 0.75 mg/L, con la que se obtuvo menos del 50% de inhibición, y al igual que para los hongos xilófagos, el benomil (1.0 mg/L) ejerció un 100% de inhibición y el metanol no mostró inhibición sobre éstos (Figura 5B).

Las CL<sub>50</sub> de (+)-medicarpina calculadas para la inhibición de *T. versicolor* y de *I. lacteus* fueron de 0.31 y 0.33 mg/L, las más bajas encontradas en esta investigación, mediante el ensayo con las cinco especies de hongos. Así mismo, las CL<sub>100</sub> fueron también las menores, con 0.81 y 0.8 mg/L, que indican el gran efecto fungicida del compuesto purificado sobre estos hongos (Cuadro 4). Aunque para *Phlebiopsis* sp. la CMI fue de 0.25 mg/L, se requiere una mayor concentración para inhibir el 50% (CL<sub>50</sub> de 0.48 mg/L) y el 100% (CL<sub>100</sub> 1.1 mg/L).

Los valores de las CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub> obtenidos con la inhibición de la (+)-medicarpina sobre *F. solani* y *A. solani*, fueron de 1.0 mg/L y de 2.0 mg/L, respectivamente. Aunque el efecto antifúngico en estos hongos se consiguió a concentraciones más altas, la actividad se considera como efectiva (Cuadro 4). Con estos resultados se demuestra el efecto antifúngico de (+)-medicarpina purificada del extracto del duramen *A. inermis* obtenido sobre los tres hongos xilófagos (*T. versicolor*, *I. lacteus* y *Phlebiopsis* sp.) y los dos fitopatógenos (*F. solani* y *A. solani*).

**Cuadro 4.** Valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y concentración letal total (CL<sub>100</sub>) observados en los hongos xilófagos y fitopatógenos (a los 8 días del cultivo) en ensayos con (+)-medicarpina.

Hongo	CMI	CL <sub>50</sub>	CL <sub>100</sub>
	[mg/L]		
<i>Trametes versicolor</i>	0.25	0.31	0.81
<i>Irpex lacteus</i>	0.25	0.33	0.8
<i>Phlebiopsis sp.</i>	0.25	0.48	1.1
<i>Fusarium solani</i>	0.75	1.0	2.0
<i>Alternaria solani</i>	0.75	1.0	2.0

Aunque son pocas las investigaciones sobre la actividad antifúngica de los derivados de extractos de especies leñosas (Muanza *et al.*, 2008; Salem *et al.*, 2016; Say *et al.*, 2018), se han identificado compuestos como terpenos, estilbenos, flavonoides y fenilpropanoides en algunas plantas maderables como *Picea abies*, *Acacia auriculiformis*, *Dalbergia congestiflora* y *Cinnamomum sp.*, los cuales poseen una alta capacidad antifúngica contra hongos xilófagos y fitopatógenos (Mihara *et al.*, 2005; Martinez-Sotres *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013; Hedenstrom *et al.*, 2016; Schreaz *et al.*, 2016). Los resultados de la presente investigación demuestran la actividad antifúngica de (+)-medicarpina purificada a partir del extracto de acetato de etilo de *A. inermis* sobre los hongos xilófagos *T. versicolor*, *I. lacteus* y *Phlebiopsis sp.*, a concentraciones relativamente bajas y en concentraciones intermedias (mayores a 1.0 mg/L) sobre los hongos fitopatógenos *F. solani* y *A. solani* (Figura 5).

Wang *et al.* (2011), reportaron una CL<sub>50</sub> de 2.5 mg/L sobre *T. versicolor* tanto para cedrol y naftaleno, metabolitos antifúngicos identificados en el duramen de *Cunninghamia lanceolata* contra *T. versicolor*, una concentración mayor al mostrado

por (+)-medicarpina (0.31 mg/L) (Cuadro 4), pero similar a los reportado para cedrol y naftaleno, contra *I. lacteus* con una CL<sub>50</sub> de 0.3 y 0.24 mg/L, respectivamente. Otros metabolitos purificados como β-tujaplicina y γ-tujaplicina, han mostrado una actividad antifúngica en concentraciones también bajas de CL<sub>50</sub>, con valores de 0.25-0.4 mg/L contra *T. versicolor* y *Comuna schizophyllum* (Yen *et al.*, 2008).

Los compuestos piceatannol e isorhapontigenina, identificados en la corteza de *Picea abies*, son considerados con efecto antifúngico contra *Phlebiopsis gigantea*, ya que muestran una CL<sub>50</sub> de 0.35 y 0.8 mg/L, respectivamente. El valor de CL<sub>50</sub> de la (+)-medicarpina encontrado en la presente investigación sobre *Phlebiopsis* sp. fue de 0.48 mg/L, similar a lo reportado para los compuestos antes mencionados (Hedenstrom *et al.*, 2016).

La capacidad antifúngica de la (+)-medicarpina sobre los hongos fitopatógenos *F. solani* y *A. solani*, resultó ser aún más baja que para *Phlebiopsis* sp., ya que se requiere de una CL<sub>50</sub> de 1.0 mg/L para ambos hongos. Estos valores son mayores a las reportadas por Yen *et al.* (2008) sobre *Colletotrichum gloeosporioides* con β-tujaplicina (CL<sub>50</sub>=0.45 mg/L) y γ-tujaplicina (CL<sub>50</sub>=0.5 mg/L); así contra *F. solani*, con valores de CL<sub>50</sub> de 0.4 mg/L para β-tujaplicina y una CL<sub>50</sub> de 0.45 mg/L para γ-tujaplicina. Con 1.0 mg/L, se ha determinado también un alto efecto antifúngico del cedrol, componente del aceite esencial de madera de *Cunninghamia konishii*, contra *R. solani*, *F. oxysporum*, *G. australe*, *F. solani* y *P. funereal* (Cheng *et al.*, 2011).

## Conclusiones

La (+)-medicarpina purificada del extracto de acetato de etilo del duramen del fuste de *A. inermis* mostró una mayor actividad antifúngica sobre los hongos xilófagos (*I. lacteus* y *Phlebiopsis* sp.), similar al ejercido contra *T. versicolor*, con los más bajos valores de CMI, CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub>. La inhibición de la (+)-medicarpina sobre *F. solani* y *A. solani* fue menor que la observada sobre los hongos xilófagos.

## Referencias

- Ahuja, I., Kissen R. y Bones A. M.** (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* 17:73–90.
- Arman, M.** (2011). LC-ESI-MS characterisation of phytoalexins induced in chickpea and pea tissues in response to a biotic elicitor of *Hypnea musciformis* (red algae). *Nat. Prod. Res.*, 25:1352–1360.
- Baldrian, P. y Lindahal B.** (2011). Decomposition in forest ecosystems: after decades of research still novel findings. *Fungal Ecology*, 4:359-361.
- Bandara, B.M., Kumar N.S. y Samaranayake K.M.** (1989). An antifungal constituent from the stem bark of *Butea monosperma*. *J. Ethnopharmacol.*, 25(1):73-75.
- Bowyer, J.L., Shmulsky R. y Haygreen J.G.** (2003). Durabilidad y protección de la madera. En: Bowyer JL, Shmulsky R, Haygreen JG (eds) *Productos forestales y ciencia de la madera*, 4ª ed. Iowa State Press, Iowa, pp. 261–286
- Boyd, I.L., Freer-Smith P.H., Gilligan C.A. y Godfray H.C.J.** (2013). The consequence of tree pests and diseases for ecosystem services. *Science*, 342(6160):832-831.
- Cheng, S.S., Lin C.Y., Gu H.J., Chang S.T.** (2011). Antifungal activities and chemical composition of wood and leaf essential oils from *Cunninghamia konishii*. *J. Wood Chem. Technol.*, 31:204-217.
- CITES.** (2017). The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). Appendices I and II. Valid from 4 October 2017.
- Deesamer, S., Chavasiri W., Chaichit N., Muangsin N. y Kokpol U.** (2009). 9-Methoxy-6a, 11a-dimethyl-6a, 11a-dihidro-6H-1benzofuro[3,2-c] chromen-3ol from *Dalbergia oliveri*. *Acta Crystallographica Section E*65, o2387.
- Hammerschmidt, R.** (1999). Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37:285-306.
- Hedenström, E., Fagerlund E.A., Edman M. y Jonsson B.G.** (2016). Resveratrol, piceatannol, and isorhapontigenin from Norway spruce (*Picea abies*) debarking wastewater as inhibitors on the growth of nine species of wood-decaying fungi. *Wood Sci. Technol.*, 50:617-629.
- Huffaker, A., Kaplan F., Vaughan M.M., Dafoe N.J., Ni X., Rocca J.R., Alborn H. T., Teal P.E. y Schmelz E.A.** (2011). Novel acidic sesquiterpenoids constitute a dominant class of pathogen-induced phytoalexins in maize. *Plant Physiol.*, 156:2082–2097.

**Krashevskaja, V., Klarner B., Widyastuti R., Maraun M. y Scheu S.** (2015). Impact of tropical lowland rainforest conversion into rubber and oil palm plantations on soil microbial communities. *Biol. Fertil. Soils*, 51:1-9.

**Lattanzio, V., Kroon P.A., Quideau S. y Treutter D.** (2008). Fenólicos de plantas - metabolitos secundarios con diversas funciones F. Daayf, V Lattanzio (Eds.), *Avances recientes en Polyphenol Research*, vol.1, Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido, pp. 1–35.

**Lattanzio, V.** (2013). Phenolic compounds: Introduction. Chapter 50. *In: Natural Products* (Ramawat K.G. y Me ´rillon J.M., eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1543-1580.

**Lomelí, R.M.G., Contreras Q.H.J., García E.S.** (2013). Metabolitos secundarios con actividad antifúngica hacia hongos xilófagos. En: *Los recursos forestales del Occidente de México: Biodiversidad, manejo, producción, aprovechamiento y conservación*. Tomo II: Amaya Ediciones, pp.645

**Magaldi, S., Mata E.S., Hartung de Capriles C., Perez C., Colella M.T. y Olaizola C.** (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1):39-45.

**Martínez-Sotres, C., López-Albarrán P., Cruz-de-León J., García-Moreno T., Rutiaga-Quiñones J. G., Vázquez-Marrufo G., Tamariz-Mascarúa J. y Herrera-Bucio R.** (2012). Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 69:38-40.

**Mazid, M., Khan T. y Mohammad F.** (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Journal Biology and Medicine*, 3(2):232-249.

**McMurry, T.B.H. y Martin E.** (1972). 3-Hydroxy-9-methoxy and 3-methoxy-9-hydroxypterocarpan. *Phytochemistry*, 11:3283-3286.

**Miles, D. H., Meideros J., Chen L., Chittawongm V., Swithenbank C., Lidert Z., Payne A.M. y Hedin P.A.** (1991). A Search for Agrochemicals from Peruvian Plants. Chapter 28. *In: Naturally Occurring Pest Bioregulators*, ACS Symposium Series, 449:399-406.

**Mohammed, S. A., Madhan B., Demissie B.A., Velappan B. y Tamil S.A.** (2016). *Rumex abyssinicus* (mekmeko) Ethiopian plant material for preservation of goat skins: approach for cleaner leather manufacture. *J. Clean. Prod.*, 133:1043-1052.

**Morales, P.F.G.** (2014). Análisis espectroscópico de compuestos del duramen de maderas durables que inhiben el crecimiento de *Trametes versicolor*. Tesis de

Maestría. Maestría en Ciencia y Tecnología de la Madera. Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera. UMSNH. Morelia, Michoacán, México.

**Muanza, D.N., Kim B.W., Euler K.L. y Williams L.** (2008). Antibacterial and antifungal activities of nine medicinal plants from Zaire. *Pharmaceutical Biology*, 32(4):337-345.

**Naoumkina, M., Farag M.A., Sumner L.W., Tang Y., Liu C.J., y Dixon R.A.** (2007). Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:17909–17915.

**Pagare, S., Bhatia M., Tripathi N., Pagare S. y Bansal Y.K.** (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3):293-304.

**Pedras, M.S.C., Yaya E.E y Glawischnig E.** (2011). The phytoalexins from cultivated and wild crucifers: chemistry and biology. *Nat. Prod. Rep.*, 28:1381–1405.

**Rutiaga, Q.J.G.** (2001). Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen. Buchverlag Gräfelfing. München. p. 49.

**Salem, M.Z.M., Zidan Y.E., Mansour M.M.A., El Hadidi N.M.N. y Abo Elgat W.A.A.** (2016). Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by five common mold fungi. *Int. Biodeterior. Biodegr.*, 106:88-96.

**Saunders J.A. y O'Neill N.R.** (2004) La caracterización de las respuestas de defensa a la infección por hongos en alfalfa. *Biocontrol* 49: 715–728.

**Say, A.J.B., Bobelé N.F., Faustin M., Virieux D., Pirat J.L., Adima A.A., Coulibaly K.S. y Amusant N.** (2018). The role of extractives in the natural durability of the heartwood of *Dicorynia guianensis* Amsh: new insights in antioxydant and antifungal properties. *Annals of Forest Science*, 75:15.

**Schmelz, E.A., Kaplan F., Huffaker A., Dafoe N.J., Vaughan M.M., Ni X., Rocca J.R., Alborn H.T., Teal P.E.** (2011). Identity, regulation, and activity of inducible diterpenoid phytoalexins in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 5455–5460.

**Shinbo, Y., Nakamura Y., Altaf-UI-Amin M., Asahi H., Kurokawa K., Arita M., Saito K., Ohta D., Shibata D. y Kanaya S.** (2006). KNApSACk: a comprehensive species–metabolite relationship database. K. Saito, *et al.* (Eds.), *Plant Metabolomics*, Springer pp. 165-181.

**Singh, T. y Singh A.P.** (2012). Una revisión sobre productos naturales como protectores de madera. *Wood Sci. Technol.*, 46: 851-870.

**Tascioglu, C., Yalcin M., Sen S. y Akcay C.** (2013). Antifungal properties of some plant extracts used as wood preservatives. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85(1):23-28.

**Tungmunnithum, D., Thongboonyou A., Pholboon A. y Yangsabai A.** (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines (Basel)*, 5(3): 93-110.

**Valette, N., Perrot T., Sormani R., Gelhaye E. y Morel-Rouhier M.** (2017). Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biology Reviews*, 31:113–123.

**Wang, J., Li J., Freitag C. y Morrell J.J.** (2011). Antifungal activities of *Cunninghamia lanceolata* heartwood extractives. *BioResources*, 6(1):606-614.

**Yen, T.B., Chang H.T., Hsieh C.C. y Chang S.T.** (2008). Antifungal properties of ethanolic extract and its active compounds from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* (Florin) heartwood. *Bioresour. Technol.*, 99:4871-4877.

### 7.3. CAPÍTULO III. Evaluación y pruebas de eficiencia antifúngica del extracto de acetato de etilo y (+)-medicarpina purificada del duramen de *Andira inermis* sobre *Trametes versicolor* en bloques de madera de *Ficus benjamina*.

#### Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar la eficiencia antifúngica de extracto de acetato de etilo y (+)-medicarpina purificada del duramen de *Andira inermis* sobre la protección de la madera de *Ficus benjamina*, en contra del hongo *Trametes versicolor*. Las pruebas antifúngicas se realizaron con el método de impregnación de bloques de madera de *F. benjamina* de 1.2 x 1 x 0.5 cm, utilizando un volumen de 15 mL y un tiempo de inmersión de 8 h con el extracto ( $CL_{100}=0.24$  y  $CL_{50}=0.11$  mg/mL) y (+)-medicarpina ( $CL_{100}=0.81$  y  $CL_{50}=0.31$  mg/mL), concentraciones calculadas previamente (Capítulo II). También se utilizó metanol (solución vehículo) y benomilo ( $CL_{100}=0.26$  mg/L) como control positivo. Los bloques de madera posteriormente fueron cultivados en medio agar-agua por 30 días (28 °C), los cuales fueron inoculados con segmento de micelio (discos de 5 mm de diámetro) del hongo de podredumbre blanca *T. versicolor*, debido a que es uno de los más susceptibles al extracto de *A. inermis* y (+)-medicarpina purificada. Se determinó la inhibición del crecimiento del micelio del hongo sobre los bloques y medio de cultivo, la pérdida en porcentaje de la masa de los bloques de madera y se realizaron estudios a nivel microscópico para observar cambios en la degradación de la madera y el crecimiento micelial de manera interna, evaluando la eficiencia antifúngica. No se observó un efecto significativo del efecto inhibitorio sobre el micelio cultivado sobre los bloques de *F. benjamina*, aunque un 20% de inhibición fue observado por el benomilo, de manera similar al extracto en ambas concentraciones y sólo con la  $CL_{100}$  de (+)-medicarpina, en comparación a la nula actividad antifúngica en los bloques tratados con metanol. Así mismo, no se observaron cambios indicadores de degradación de la madera, pero se encontró la penetración del micelio del hongo en los vasos conductores de cada uno de los tratamientos. La protección sobre la pérdida de masa en los bloques infestados con *T. versicolor* fue demostrada con los valores registrados a los 30 días del tratamiento, obteniendo los más bajos porcentajes en los que fueron tratados con la  $CL_{100}$  y  $CL_{50}$  del extracto y con la  $CL_{100}$  de la (+)-medicarpina, similares al mostrado por el fungicida comercial benomilo, con solo porcentajes de pérdida de 11.0331%, 15.1515%, 17.0661%, 16.6804%, respectivamente. Esto, al compararse con los obtenidos con el tratamiento negativo (metanol) y con la  $CL_{50}$  de la (+)-medicarpina, que mostraron la pérdida de masa más alta con 22.5344% y 22.6033%, respectivamente. Los resultados demuestran protección moderada del extracto y (+)-medicarpina en los bloques de madera de *F. benjamina* infestados con *T. versicolor*.

**Palabras clave:** Eficiencia antifúngica, extractos, *Ficus benjamina*, podredumbre blanca, (+)-medicarpina.



## Abstract

The objective of this research was to evaluate the antifungal efficiency of the ethyl acetate extract and (+)-medicarpin purified of *Andira inermis* heartwood on the protection of *Ficus benjamina* wood, against the fungus *Trametes versicolor*. Antifungal tests were performed using the *F. benjamina* wood block impregnation method of 1.2 x 1 x 0.5 cm, using 15 mL and an immersion time of 8 h with the extract ( $CL_{100}=0.24$  y  $CL_{50}=0.11$  mg/L) y (+)-medicarpin ( $CL_{100}=0.81$  y  $CL_{50}=0.31$  mg/L), previously calculated (Chapter II). As well, wood blocks were impregnated with methanol (vehicle solution) and benomyl ( $CL_{100}=0.26$  mg/L) as positive control. The blocks were subsequently grown in medium agar-water for 30 days (28 °C), which were inoculated with mycelium segment (disks 5 mm in diameter) of the white rot fungus *Trametes versicolor*, because it is one of the most susceptible to the extract of *A. inermis* and (+)-medicarpin purified. The growth efficiency of the fungal mycelium on the blocks and culture medium, the loss percentage of mass and microscopic studies were determined to observe changes in wood degradation and mycelial growth internally, assess antifungal efficiency. No significant effect of the inhibitory effect on mycelium grown on *F. benjamina* blocks was observed, although 20% inhibition was observed by benomyl, similar to extract in both concentrations and only with  $CL_{100}$  of (+)-medicarpine, compared to no antifungal activity in methanol-treated blocks. Also, no changes were observed as indicators of wood degradation, but the penetration of the fungus mycelium was found in the conductive vessels of each of the treatments. Protection on mass loss in *T. versicolor*-infested blocks was demonstrated with values recorded within 30 days of treatment, obtaining the lowest percentages in which they were treated with the  $CL_{100}$  and  $CL_{50}$  of the extract and with the  $CL_{100}$  of the (+)-medicarpin, similar to that shown by commercial fungicide benomyl, with only percentages of loss of 11.0331%, 15.1515%, 17.0661%, 16.6804%, respectively. This, when compared to those obtained with negative treatment (methanol) and  $CL_{50}$  of (+)-medicarpin, which showed the highest mass loss with 22.5344% and 22.6033%, respectively. The results demonstrate moderate protection of the removable and (+)-medicarpin in the wood blocks of *F. benjamina* infested with *T. versicolor*.

**Keywords:** Antifungal efficiency, extractives, *Ficus benjamina*, (+)-medicarpin, white rot.

## Introducción

La madera es un material biológico y está sujeta a la variabilidad de sus propiedades, como la resistencia física, mecánica, química y natural, y al deterioro por agentes bióticos y abióticos. La resistencia natural a los organismos que destruyen la madera es una de las propiedades que determina el nivel de susceptibilidad de la madera a

éstos, como hongos, bacterias, termitas, escarabajos y barrenadores marinos, debido a que pueden crecer en las superficies de madera y otros materiales orgánicos, para utilizar los carbohidratos de la madera como fuente de nutrientes (Mansour y Salem, 2015; Xu *et al.*, 2015; Brocco *et al.*, 2017). Algunas especies de madera tienen baja durabilidad natural y requieren tratamientos conservadores para mejorar su rendimiento y vida útil en sus diferentes usos.

La mayoría de las maderas de baja durabilidad en el mercado se tratan al vacío y a presión mediante métodos industriales con conservantes a base de agua y sales metálicas, que tienen una alta eficiencia en la protección de la madera a los organismos que la destruyen (Lebow, 2010; Bolin y Smith, 2011). Sin embargo, Lin *et al.* (2009) y Kartal *et al.* (2015), mencionan que estas sustancias hacen que el proceso sea costoso y dañino para los humanos y el medio ambiente, y requieren cuidado durante y después del final de la vida útil de la madera tratada, lo que representa un peligro en la eliminación y reutilización de este material (Wang *et al.*, 2016).

Por lo tanto, es necesario la búsqueda de productos químicos conservantes de madera alternativos para ser desarrollados y probados. Los metabolitos secundarios de la madera son los componentes no estructurales de ella, que por lo general se concentran en el duramen y, a menudo, son producidos por el árbol en pie como compuestos defensivos frente al estrés ambiental. Ejemplos de éstos son los de origen fenólico como flavonoides, lignanos y taninos, así como los de tipo terpénico, principales productos de origen vegetal con propiedades protectoras contra la degradación biológica de la madera (Turner y Conradie, 1995; Martínez-Inigo *et al.*, 1999; Dorado *et al.*, 2001; Toshiaki, 2001; Windeisen *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002; Harju *et al.*, 2003).

La medicarpina, un isoflavonoide tipo pterocarpano, considerada una fitoalexina, purificada de diversos árboles de la familia Fabaceae, ha mostrado tener actividad antifúngica. La medicarpina purificada de corteza de *Butea monosperma* inhibió el

crecimiento de *Cladosporium cladosporioides* (Bandara *et al.*, 1989), la proveniente de madera de *Dalbergia monetaria* mostró inhibición sobre *Rhizoctonia solani* y *Helminthosporium teres* (Miles *et al.*, 1991). Así mismo, Martínez-Sotres *et al.* (2012) y Morales (2014), también han reportado la actividad antifúngica de la (+)-medicarpina purificada del duramen de *Dalbergia congestiflora*, aunque solamente contra *Trametes versicolor*, un hongo xilófago de podredumbre blanca.

Con el propósito de determinar la eficiencia antifúngica tanto del extracto de acetato de etilo como de la (+)-medicarpina purificada del duramen de *Andira inermis*, se realizaron pruebas de inmersión a diferentes concentraciones en bloques de madera de *Ficus benjamina* con el hongo xilófago de podredumbre blanca *T. versicolor*.

## **Materiales y Métodos**

### **Material biológico**

***Ficus benjamina*.** Los bloques de la madera de *Ficus benjamina* fueron realizados y donados por el laboratorio de anatomía de la madera, de la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo a cargo de la Ing. Teresa García Moreno.

**Hongo xilófago (*Trametes versicolor*).** La cepa utilizada para los ensayos pertenece al Cepario Michoacano Universitario del Dr. Gerardo Marrufo (CMEB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), que se mantuvo en medio de cultivo PDA (papa dextrosa-agar), preparado siguiendo las especificaciones del fabricante (Bioxon®) (39 g/L) a un pH de 7.2, y en incubadora (28 °C, oscuridad). Las transferencias a medio fresco se realizaron cada 21 días por porción de micelio.

## **Purificación de (+)-medicarpina**

Después de la obtención del extracto, descrito en el capítulo I, la purificación de la medicarpina se realizó por cromatografía en columna con el método estandarizado por Morales (2014), que consistió en utilizar como fase estacionaria gel de sílice malla 70-230 Mesh ASTM (Whatman) y como fase móvil, proporciones de mezclas de solventes (hexano y acetato de etilo) de 97:3. Estos solventes utilizados fueron previamente destilados en el laboratorio. Posteriormente se confirmó la pureza, identificando el compuesto mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H), mediante la obtención del espectro respectivo de la molécula, utilizando el equipo de resonancia magnética nuclear del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH, en un espectrómetro Varian Mercuri plus a 400 MHz. Las determinaciones se realizaron en CDCl<sub>3</sub> (Deuterocloroformo) y TMS (Tetrametilsilano) como referencia interna.

## **Ensayo de eficiencia antifúngica**

La eficiencia antifúngica se llevó a cabo con el método modificado de Salem *et al.* (2016<sup>a</sup>) y Mansour y Salem (2015) que consistió en lo siguiente: Los bloques de albura de *F. benjamina* con dimensiones de 1.2 (longitud) x 1 (ancho) x 0.5 (altura) en cm se secaron al aire a pesos constantes, posterior se esterilizaron en autoclave durante 25 minutos y se dejaron enfriar en desecador por 12 h. Una vez que se les determinó el peso, se sumergieron por 8 h, a las diferentes concentraciones de CL<sub>100</sub> y CL<sub>50</sub> de extracto (0.24 y 0.11 mg/L) y de la (+)-medicarpina purificada (0.81 y 0.31 mg/L), respectivamente. También se evaluó el efecto del benomilo (CL<sub>100</sub>=0.26 mg/L) como control positivo y el control negativo metanol (vehículo), con un volumen total de 15 mL. Posteriormente, se colocaron los bloques en cajas Petri con papel secante y selladas por 24 horas, una vez secas se colocaron en un medio solidificado de agar-agua y se colocó una porción de micelio de 5 mm extraído con una pipeta Pasteur

como sacabocado de una caja con medio PDA cultivada con el hongo *T. versicolor* por 15 días.

El ensayo se realizó por 30 días, con la incubación a 28 °C en completa oscuridad, tiempo en el que se determinó la eficiencia antifúngica, evaluando el crecimiento del micelio sobre los bloques. Posteriormente, los bloques fueron extraídos de las cajas Petri y se limpió el excedente de micelio de la superficie de los bloques con una solución de cloro al 10% y papel secante, para obtener el peso de cada uno de los bloques y relacionar la pérdida de éste con el de la masa lignocelulósica, que se calculó en porcentaje en comparación con el tratamiento de menor efecto. También se realizaron cortes delgados con navaja (0.2 a 0.4 cm) para observar el deterioro de la madera y el posible crecimiento de micelio en las células de la madera. Se utilizó el método de tinción con safranina, que consistió en colocar los cortes delgados sobre una caja Petri, colocando 8 gotas de colorante safranina al 3%, dejar reposar 5 minutos y lavar con etanol al 50% para realizar observaciones en microscopio óptico.

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se expresaron a través de la media  $\pm$  desviación estándar. Los mismos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posteriormente se realizó una prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  ( $n=5$ ), utilizando el software JMP.

### **Resultados y Discusión**

Los hongos participan en la diversidad y productividad de los ecosistemas forestales, contribuyendo sustancialmente a un complejo fenómeno de reciclaje de nutrientes y carbono, participando en la descomposición y mineralización de madera muerta y hojarasca en bosques y plantaciones forestales (Baldrian y Lindahal, 2011; Krashevskaya *et al.*, 2015 ). Sin embargo, además de las enfermedades producidas en

plantaciones agrícolas y forestales, los hongos también pueden causar problemas en la madera, ya sea como materia prima o productos terminados (Clausen, 2010).

Debido a la baja resistencia natural de algunas especies maderables se requiere de tratamientos conservantes para mejorar su rendimiento y vida útil en sus diferentes usos. Se han desarrollado varios productos químicos y métodos en la industria de preservación de la madera para proteger y extender la vida útil del material de madera. En algunos casos, los productos químicos para la preservación de la madera desarrollados para aplicaciones en exteriores se evitan para usarse en aplicaciones en interiores debido a sus compuestos volátiles que reducen la calidad del aire y pueden conllevar a problemas en la salud humana y el medio ambiente (Dorado *et al.*, 2001; Harju *et al.*, 2003; Lebow, 2010; Bolin y Smith, 2011).

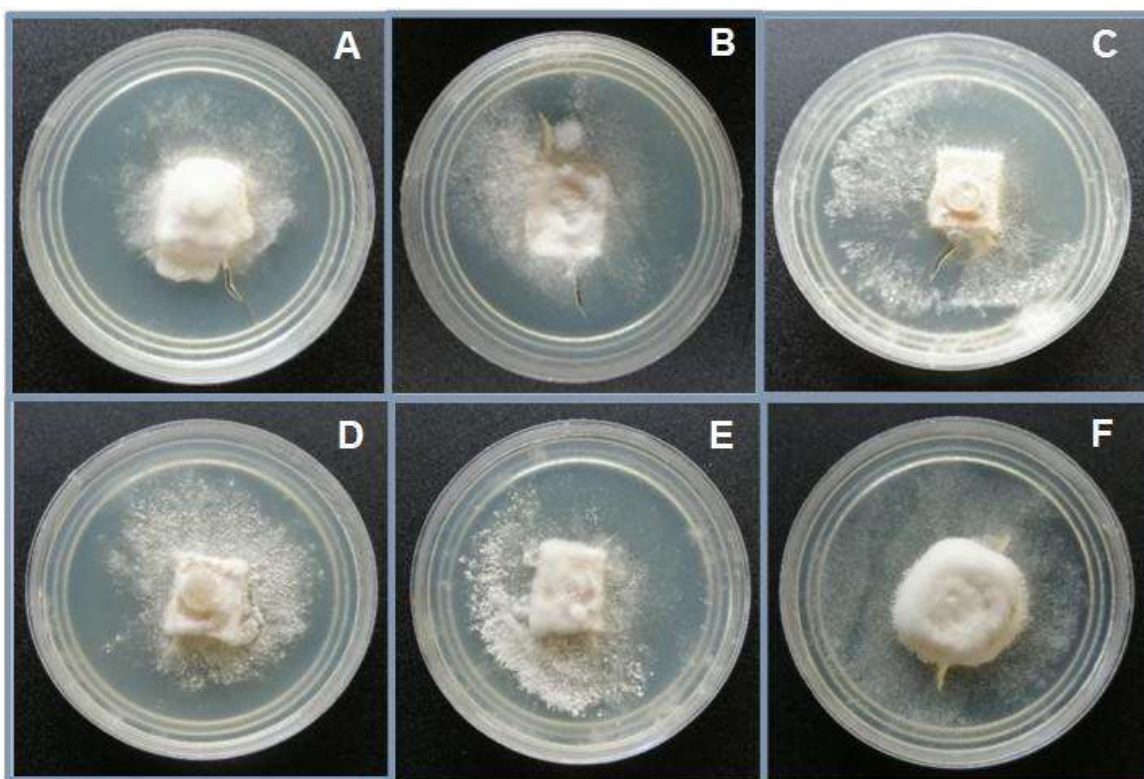
En los últimos años, se ha prestado mayor atención a las moléculas que se encuentran en los extractos de madera con alta resistencia a la degradación, ya que con diversos estudios se ha demostrado la bioactividad atribuida por diversos mecanismos, como la eliminación de metales y radicales libres, la interacción directa con enzimas, la alteración de la integridad de la membrana y la perturbación de la homeostasis iónica de los hongos (Valette *et al.*, 2017).

De acuerdo a los antecedentes sobre la actividad antifúngica del extracto y la (+)-medicarpina del duramen de *A. inermis*, sobre el hongo xilófago *Trametes versicolor*, en la presente investigación se determinó el efecto preservador de éstos sobre el hongo xilófago de podredumbre blanca mencionado, determinando la eficiencia antifúngica en bloques de madera de *F. benjamina*.

#### **Efecto antifúngico del extracto y (+)-medicarpina purificada en bloques de madera inoculados con *T. versicolor***

El efecto antifúngico del extracto (CL<sub>100</sub>=0.24 mg/L; CL<sub>50</sub>=0.11 mg/L) y de la (+)-medicarpina purificada (CL<sub>100</sub>=0.81 mg/L; CL<sub>50</sub>=0.31 mg/L), se evaluaron y

compararon con los tratamientos control metanol (control negativo) y benomilo (control positivo,  $CL_{100}=0.26$  mg/L), realizando dicho efecto con observaciones visuales, encontrando que en todos los tratamientos hubo desarrollo del crecimiento micelial de *T. versicolor*. Con estas observaciones, se demostró el mayor crecimiento del hongo sobre bloques de madera de *F. benjamina* tratados con la solución vehículo (MeOH) (Figura 6A), considerado como un 0% de eficiencia antifúngica, ya que se observó un crecimiento prominente del micelio de *T. versicolor* sobre los bloques de madera. Con la  $CL_{100}$  del benomilo se observó una ligera inhibición del crecimiento micelial sobre los cubos de madera, ya que se detuvo el crecimiento micelial de *T. versicolor*, aunque se observó un mayor crecimiento sobre el medio de cultivo, considerando un 20 % de inhibición (Figura 6B).

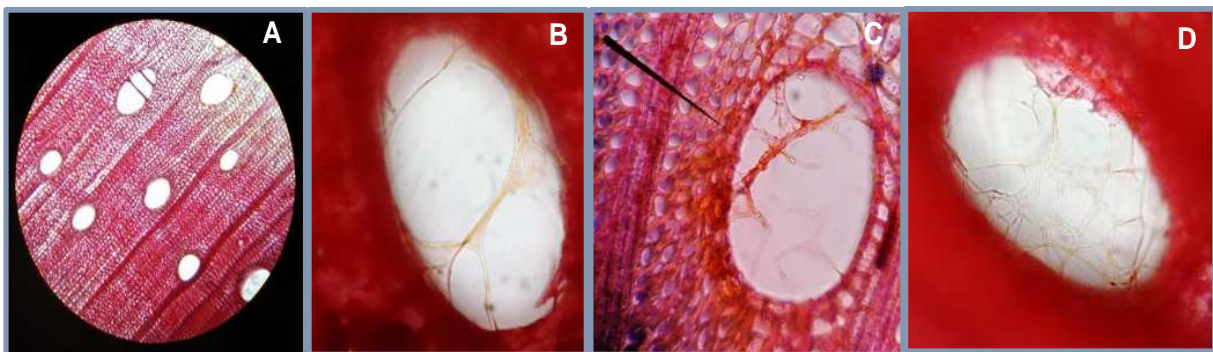


**Figura 6.** Crecimiento de *T. versicolor* después de 30 días del ensayo sobre cubos de *F. benjamina* con los diferentes tratamientos: A) metanol (control negativo); B)  $CL_{100}$  del extracto (0.24 mg/L) de *A. inermis*; C)  $CL_{50}$  del extracto ( $CL_{50}=0.11$  mg/L) de *A. inermis*; D) benomilo (control positivo,  $CL_{100}=0.26$  mg/L); E)  $CL_{100}$  de (+)-medicarpina ( $CL_{100}=0.81$  mg/L); F)  $CL_{50}$  (+)-medicarpina ( $CL_{50}=0.31$  mg/L).

Esta eficiencia antifúngica fue observada de manera similar en los cubos de madera tratados con la CL<sub>100</sub> y CL<sub>50</sub> del extracto del duramen de *A. inermis* (Figuras 6C y 8D), así mismo con la CL<sub>100</sub> de la (+)-medicarpina (Figura 6E), con una ligera inhibición del crecimiento micelial del hongo. Sin embargo, con la CL<sub>50</sub> de la (+)-medicarpina, el crecimiento fue similar al ejercido por el metanol, con una mayor abundante masa micelial en los cubos de madera que lo observado con el extracto (Figuras 6F).

### **Efecto del extracto y (+)-medicarpina sobre el deterioro y crecimiento de micelio en bloques de madera infestados con *T. versicolor***

Después de realizar la limpieza de los bloques de madera, se procedió a realizar cortes provisionales, para observar el deterioro de la madera a nivel celular, pero se obtuvo como resultado un nulo deterioro en la madera en cada uno de los tratamientos y controles utilizados para esta investigación, mostrando la integridad de las paredes (Figura 7A) en los que se define claramente que las células de *F. benjamina* se encuentran sanas a excepción de los vasos donde el crecimiento micelial inicio (observado en un corte transversal) (Figura 7B), encontrando el crecimiento del micelio de *T. versicolor* en 1 o 2 vasos de cada 10 vasos observados (Figuras 7C y 7D).



**Figura 7.** Crecimiento de micelio de *T. versicolor* después de 30 días de incubación sobre cubos de *F. benjamina* en microscopio: A) Muestra transversal de cubo con tratamiento CL<sub>100</sub> de *A. inermis* (10X); B) vaso con crecimiento de micelio de cubo tratado con CL<sub>100</sub> de *A. inermis* (40X); C) Vaso con crecimiento de micelio en cubo tratado con CL<sub>50</sub> de (+)-medicarpina (40X); y D) Vaso con crecimiento de micelio en cubo tratado con metanol (40X).

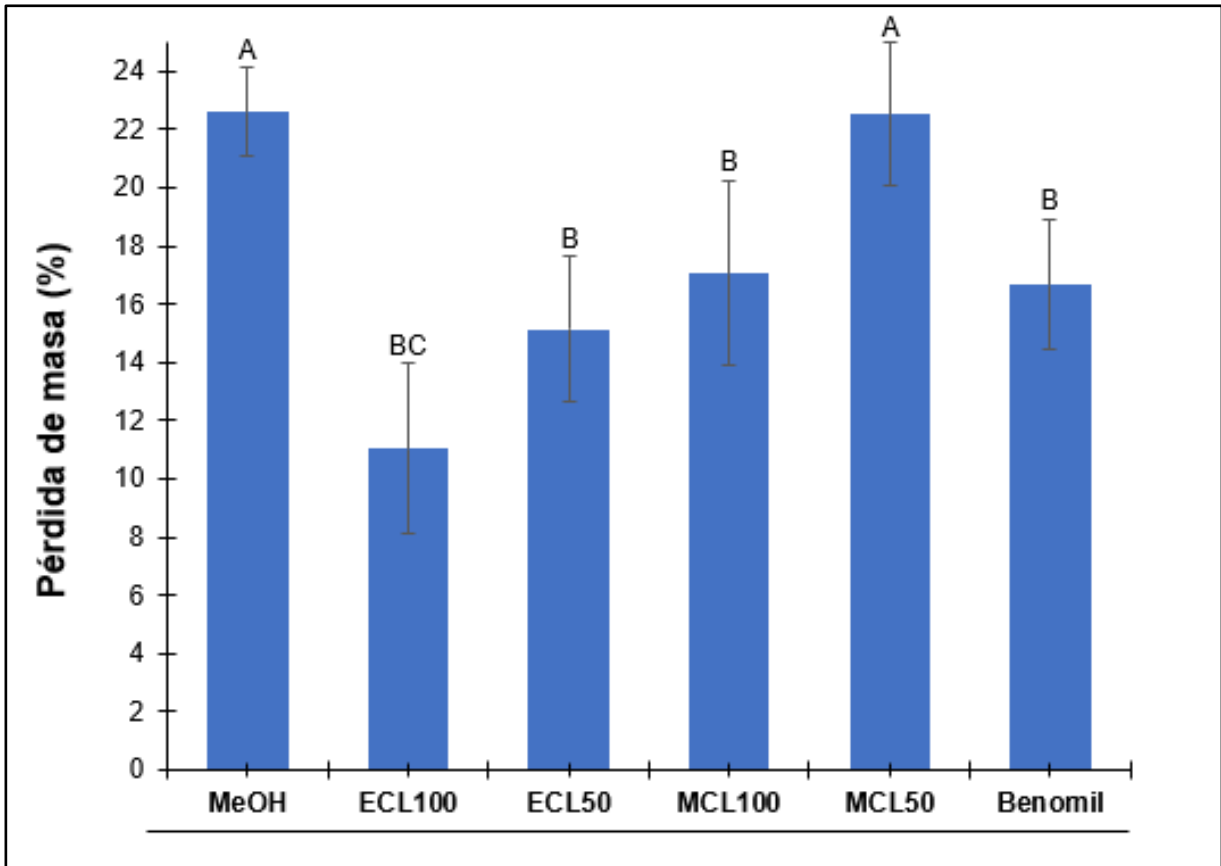


Esto sugiere que debido a que las estructuras de *F. benjamina* se caracterizan por la abundante presencia de látex (líquido lechoso) que puede contener entre otras cosas carbohidratos y algunos otros sustratos (Chew, 1989), el hongo penetra y lo utiliza como fuente de alimento, la no observación del deterioro, pudo deberse al lento crecimiento de *T. versicolor* y al corto tiempo del experimento, ya que se llevó a cabo en sólo 30 días y en otras investigaciones se realizan a más tiempo (Tascioglu *et al.*, 2013; Brocco *et al.*, 2017).

### **Efecto del extracto y (+)-medicarpina sobre la pérdida de masa en bloques de madera infestados con *T. versicolor***

Después de los 30 días del cultivo de los bloques de madera de *F. benjamina* infestadas con el micelio de *T. versicolor*, tratados con las diferentes dosis de CL<sub>100</sub> y CL<sub>50</sub> calculadas del extracto de *A. inermis* y (+)-medicarpina purificada, así como con la solución vehículo (metanol) y el control positivo (benomilo), se determinó el porcentaje de pérdida de masa por diferencia de peso, observando una clara protección por el extracto a las concentraciones de CL<sub>100</sub> y CL<sub>50</sub> del extracto y con la CL<sub>100</sub> de la (+)-medicarpina sin diferencias estadísticas sobre los bloques de madera, ya que éstos fueron los que presentaron los valores más pequeños de pérdida de masa, con 11.0331, 15.1515 y 17.0661%, respectivamente. De igual forma el control positivo benomil mostró un resultado similar a los ejercidos por el extracto y con la CL<sub>100</sub> de la (+)-medicarpina, perdiendo un 16.6804%, sin haber una diferencia significativa entre ellos (Figura 8).

Sin embargo, se observó diferencia significativa en cuanto al tratamiento con la CL<sub>50</sub> de (+)-medicarpina debido a que presentó una menor protección y en consecuencia una mayor pérdida de masa (22.5344%) (Figura 8). En el caso del control negativo (metanol), fue el que presentó la mayor pérdida de masa con 22.6033%, sin haber una diferencia significativa entre la pérdida de este tratamiento y con la CL<sub>50</sub> de (+)-medicarpina (Figura 8).



**Figura 8.** Porcentaje de pérdida de masa en bloques de madera en los diferentes tratamientos de CL<sub>100</sub> y CL<sub>50</sub> del extracto (ECL100 y ECL50) y la (+)-medicarpina (MCL100 y MCL50) de *A. inermis*, y con metanol (MeOH), agua estéril (H<sub>2</sub>O) y el benomil, sobre *Trametes versicolor*. Después de 30 días de incubación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ,  $n=3$ , prueba de Tukey).

Estos resultados demuestran la capacidad protectora del extracto de *A. inermis* y (+)-medicarpina purificada ya que las pérdidas de los tres mejores tratamientos son relativamente bajas. En otras investigaciones, como lo reportado por Tascioglu *et al.*, (2013), observaron que las pérdidas de masa fueron de 4.4, 33.7 y 40.4% en maderas de pino albar (*Pinus sylvestris*), haya (*Fagus orientalis*) y álamo (*Populus tremula*), respectivamente, tratadas con extracto de mimosa (*Acacia mollissima*).

Y aunque en el presente trabajo, el tratamiento con la CL<sub>50</sub> de (+)-medicarpina fue el que mostró la protección más baja con 22.5344% de pérdida de masa, también representa una óptima eficiencia antifúngica en comparación con otras pruebas realizadas con el uso del extracto de quebracho (*Schinopsis lorentzii*) obteniendo porcentajes de pérdidas de masa de 4.4, 26 y 45.1% y un 33.8, 53.8 y 56.9% al aplicar un extracto de corteza de pino (*Pinus brutia*), protegiendo la misma madera de pino albar, haya y álamo en contra de *T. versicolor* (Tascioglu *et al.*, 2013).

Con los resultados del efecto de la eficiencia antifúngica del extracto y medicarpina purificada del duramen de *A. inermis*, se sugiere un óptimo efecto de protección sobre el ataque de *T. versicolor* en una madera blanda como la de *F. benjamina*, quedando como perspectiva de esta investigación, probar el efecto en otros tipos de maderas, así como mayores tiempos de exposición y de incubación.

## Conclusiones

Se obtuvo un óptimo efecto de la eficiencia protectora del extracto (CL<sub>100</sub>=0.24 mg/L y CL<sub>50</sub>=0.11 mg/L) y de la (+)-medicarpina purificada a partir de éste, con la CL<sub>100</sub> de 0.81 mg/mL, del duramen del fuste de *A. inermis*, probados en bloques de *F. benjamina*, inoculados con el hongo xilófago de podredumbre blanca *T. versicolor*.

## Referencias

**Baldrian, P. y Lindahal B.** (2011). Decomposition in forest ecosystems: after decades of research still novel findings. *Fungal Ecology*, 4:359-361.

**Bandara, B. M., Kumar N. S. y Samaranayake K. M.** (1989). An antifungal constituent from the stem bark of *Butea monosperma*. *J. Ethnopharmacol.*, 25(1):73-75.

**Bolin, C. A. y Smith S.** (2011). Life cycle assessment of ACQ-treated lumber with comparison to wood plastic composite decking. *J. Clean. Prod.*, 19:620-629.

**Brocco, V.F., Paes, J.B., Costa, L.G.D., Brazolin, S., Arantes, M.D.C.** (2017). Potential of teak heartwood extracts as a natural wood preservative. *J. Clean. Prod.*

142, 2093e2099.

**Chew, W.L.** (1989) Moraceae. pp. 15 -68 in: Flora of Australian Government Publishing Service, Canberra.

**Clausen, C. A.** (2010). Biodeterioration of Wood. In: Wood Handbook, Wood as an engineering material. Chapter 14. Centennial Edition. General technical report FPL. Madison. Wi. 16p.

**Dorado, J., Van Beek T., Claassen F. y Sierra A.R.** (2001). Degradation of lipophilic wood extractive constituents in *Pinus sylvestris* by the white rot fungi *Bjerkandera* sp. and *Trametes versicolor*, Wood Science and Technology, 35(1-2):117-125.

**Harju, A. M., Venäläinen M., Anttonen S., Viitanen H., Kainulainen P., Saranpää P. y Vapaavuori E.** (2003). Chemical factors affecting the brown-rot decay resistance of Scots pine heartwood. Trees, 17(3):263-268.

**Kartal, S.N., Terzi E., H. Yilmaz y Goodell B.** (2015). Bioremediation and decay of wood treated with ACQ, micronized ACQ, nano-CuO and CCA wood preservatives. Int. Biodeterior. Biodegr., 99:95-101.

**Krashevskaya, V., Klarner B., Widyastuti R., Maraun M. y Scheu S.** (2015). Impact of tropical lowland rainforest conversion into rubber and oil palm plantations on soil microbial communities. Biol. Fertil. Soils, 51:1-9.

**Lebow, S.T.** (2010). Conservación de madera: Manual de madera - La madera como material de ingeniería. Informe técnico general FPL-GTR-190, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio Forestal, Laboratorio de Productos Forestales, Madison, WI.

**Lin, L.D., Chen Y.F., Wang S.Y. y Tsai M.J.** (2009). TsaiLeachability, metal corrosion, and termite resistance of wood treated with copper-based preservative. Int. Biodeterior. Biodegr., 63:533-538.

**Mansour, M.M.A. y Salem M.Z.M.** (2015). Evaluation of wood treated with some natural extracts and Paraloid B-72 against the fungus *Trichoderma harzianum*: Wood elemental composition, *in-vitro* and application evidence. Int. Biodeterior. Biodegr., 100:62-69.

**Martínez-Sotres, C., López-Albarrán P., Cruz-de-León J., García-Moreno T., Rutiaga-Quiñones J. G., Vázquez-Marrufo G., Tamariz-Mascarúa J. y Herrera-Bucio R.** (2012). Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. International Biodeterioration & Biodegradation, 69:38-40.

**Martinez-Inigo, M.J., Immerzeel P., Gutierrez A., Del Rio J. C. y Sierra A. R.** (1999). Biodegradability of extractives in sapwood and heartwood from scots pine by sapstain and white-rot fungi, *Holzforschung*, 53:247-252.

**Miles, D.H., Meideros J., Chen L., Chittawongm V., Swithenbank C., Lidert Z., Payne A. M. y Hedin P.A.** (1991). A search for agrochemicals from peruvian plants. Chapter 28. *In: Naturally Occurring Pest Bioregulators*, ACS Symposium Series, 449:399-406.

**Morales, P.F.G.** (2014). Análisis espectroscópico de compuestos del duramen de maderas durables que inhiben el crecimiento de *Trametes versicolor*. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencia y Tecnología de la Madera. Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera. UMSNH. Morelia, Michoacán, México.

**Salem, M.Z.M., Zidan Y.E., Mansour M.M.A., El Hadidi N.M.N. y Abo Elgat W.A.A.** (2016<sup>a</sup>). Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by five common mold fungi. *Int. Biodeterior. Biodegr.*, 106:88-96.

**Taylor, A.M., Gartner B.L. y Morrell J.J.** (2002). Formación de duramen y durabilidad natural: una revisión, *Wood and Fiber Science*, 34(4):587 – 611.

**Tascioglu, C., Yalcin M., Sen S. y Akcay C.** (2013). Antifungal properties of some plant extracts used as wood preservatives. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85(1):23-28.

**Toshiaki, U.** (2001). Chemistry of extractives Wood and Cellulosic Chemistry, Marcel Dekker, Inc, New York, 213-241.

**Turner, P. y Conradie D.** (1995). The Chemical Analysis and Biological Evaluation of Wood Extractives as Potential Timber Preservatives, The International Research Group on Wood Preservation, Japan, IRG/WP 95-30090.

**Valette, N., Perrot T., Sormani R., Gelhaye E. y Morel-Rouhier M.** (2017). Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biology Reviews*, 31:113–123.

**Wang, L., Chen S.S., Tsang D. C.W., Poon C.S. y Shih K.** (2016). Recycling contaminated wood into eco-friendly particleboard using green cement and carbon dioxide curing, *J. Clean. Prod.*, 137 (2016), pp. 861-870.

**Windeisen, E., Wegener G., Lesnino G. y Schumacher P.** (2002). Investigation of the correlation between extractives content and natural durability in 20 cultivated larch trees, *Holz als Roh-Werkst*, 60(5):373-374.

**Xu, K., Feng J., Zhong T., Zheng Z. y Chen T.** (2015). Effects of volatile chemical components of wood species on mould growth susceptibility and termite attack resistance of wood plastic composites *Int. Biodeterior. Biodegr.*,100:106-115.

## 7.4. CAPÍTULO IV. Avances sobre los estudios de la simulación computacional enzima-ligando por Autodock Tools, utilizando (+)-medicarpina.

### Resumen

Se realizó una simulación computacional enzima-sustrato de enzimas reportadas en la base de datos Protein Data Bank y (+)-medicarpina de algunos de los hongos estudiados en la presente investigación. Se observó que los sitios activos de las enzimas cutinasa de *F. solani* y proteinasa aspártica de *I. lacteus*, no tienen una adecuada interacción con (+)-medicarpina, mientras que la enzima lacasa de *T. versicolor* exhibió en el estudio una mejor interacción de (+)-medicarpina, con su sitio activo.

### Abstract

An enzyme-substrate computational simulation of enzymes reported in the Protein Data Bank and (+)-medicarpine database of some of the fungi studied was performed. It was observed that the active sites of the cutinase enzymes of *F. solani* and *aspartic proteinase* of *I. lacteus*, do not have an adequate interaction with (+)-medicarpine, while the study allowed to observe the adequate interaction of (+)-medicarpine, with the active site of the enzyme lacasa of *T. versicolor*.

### Introducción

Desde el punto de vista estructural, morfogenético y mecanicista, el proceso de infección por hongos es un fenómeno muy complicado. Hay algunos pasos cruciales antes de la infección y la patogénesis exitosas: la adhesión de esporas e hifas a la superficie de la planta, la germinación de las esporas, la formación de la clavija de penetración (hifa), la creación de estructuras de infección primaria, el proceso de reconocimiento y señalización, la diferenciación de la infección. Hifas y haustorios, el tejido del huésped seguido del proceso de patogénesis y colonización (Carroll y Tudzynski, 1997). Y todos estos pasos requieren de diferentes herramientas algunas pueden ser físico-mecánicas, pero en su mayoría estas están dadas por procesos enzimáticos específicos para cada especie patógena.

Uno de los primeros pasos cruciales en la infección del hongo, es la adhesión de esporas e hifas a la cutícula vegetal, así como la digestión de esta, en los cuales intervienen enzimas como celulasa, cutinasa, ADNasa, esterasa, invertasa, pectinesterasa, pectinasa, peroxidasa, poligalacturonasa y proteasas. La cutinasa es considerada una de las enzimas más importantes en esta etapa del desarrollo de hongos, es responsable de romper la cutícula y la penetración directa del tejido del huésped (Mendgen y Deising, 1993).

Por otro lado, los hongos xilófagos son organismos que dependen significativamente de las enzimas hidrolíticas que les ayudan a degradar la matriz de lignocelulosa que conforma la madera. Estos microorganismos se han adaptado para usar este complejo sustrato como fuente de carbono, los hongos de podredumbre blanca son los únicos microorganismos que se sabe que degradan eficientemente todos los componentes de la madera, incluida la lignina (Shary *et al.*, 2007; Bakar *et al.*, 2013). Usando un complejo sistema enzimático que incluyen celulasas, hemicelulosas, peroxidasas y lacasas (Martínez *et al.*, 2005).

## **Metodología**

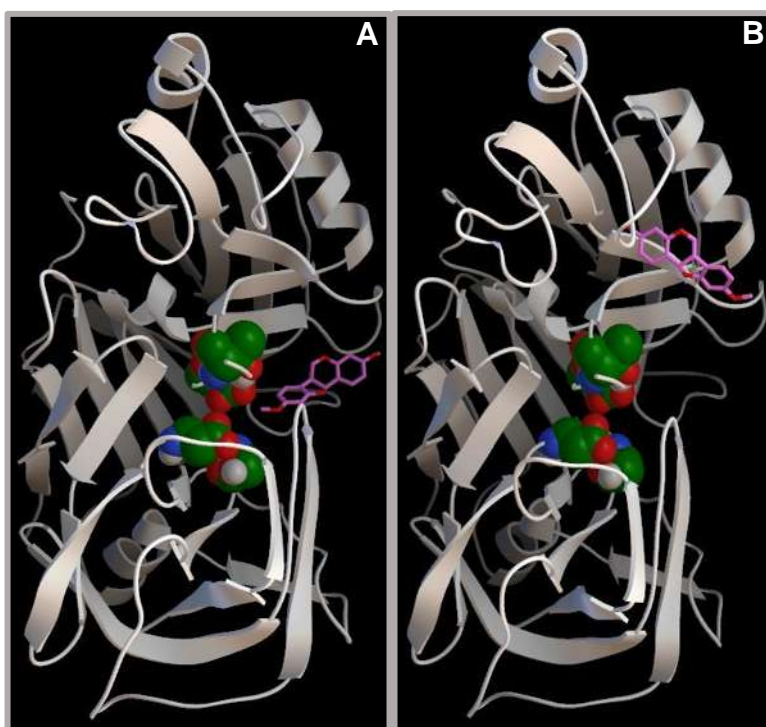
Las estructuras tridimensionales de las enzimas lacasa de *Trametes versicolor* (Piontek *et al.*, 2002), cutinasa de *Fusarium solani* (Longhi *et al.*, 1997) y Proteínasa aspártica (1WKR) de *I. lacteus* se obtuvieron de la base de datos Protein Data Bank (PDB), con las claves 1GYC, 1CEX y 1WKR, respectivamente.

El software empleado fue AutoDock Tools, en el cual se realizó una estrategia de búsqueda, lo cual es un análisis de todos los modos posibles de unión entre ligando y receptor, empleando un grid total de la enzima con 1000 poses en cada una de las enzimas ya mencionadas, con la finalidad de tener un número representativo de cada simulación y observar los sitios de mayor frecuencia y afinidad.



## Análisis de los resultados

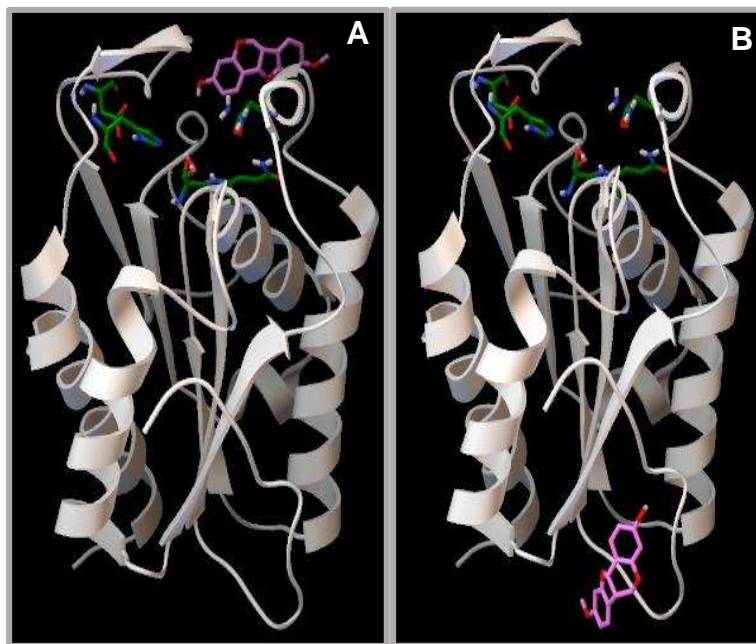
Se han descrito las estructuras cristalinas de las enzimas Proteinasa aspártica (1WKR) de *I. lacteus*, Cutinasa (1CEX) de *F. solani* y Lacasa (1GYC) de *T. versicolor*, así como también en la base de datos Protein Data Bank (Longhi *et al.*, 1997; Piontek *et al.*, 2002; Fujimoto *et al.*, 2004). Debido a estos antecedentes se realizó un estudio de interacción entre (+)-medicarpina y las enzimas mencionadas, con en el software AutoDock Tools, con 1000 conformeros de (+)-medicarpina. En el cual se observó que tanto la proteinasa aspártica que pertenece al grupo de las proteasas y la cutinasa, enzimas que participan en los procesos infecciosos de algunos hongos, tuvieron interacciones con la (+)-medicarpina muy alejadas al sitio activo.



**Figura 9.** Simulación computacional enzima-sustrato de Proteasa Aspártica de *I. lacteus* y (+)-medicarpina: A) 10% de los conformeros; B) 55% de los conformeros.

La proteinasa aspártica de *I. lacteus* sólo mostró una interacción cercana al sitio activo con 106 conformeros (Figura 9A) de (+)-medicarpina con una energía de unión de -5.9 a -5.54, lo que representa el 10% de todos los conformeros estudiados y situando más del 55% de los conformeros con una energía de unión de -6.18 a -5.9 lejos del sitio activo (Figura 9B).

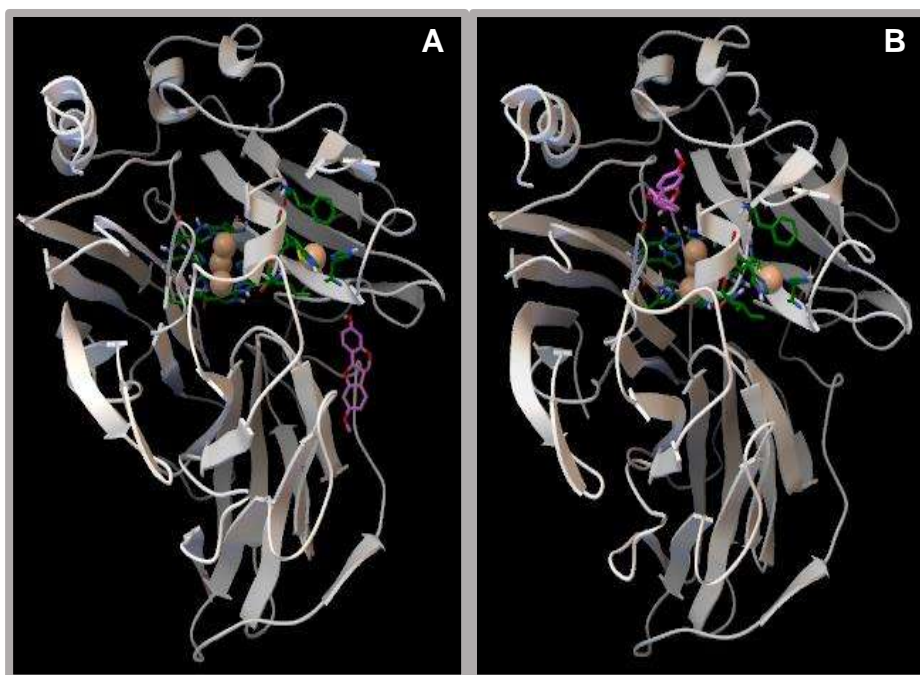
Los resultados de las interacciones de (+)-medicarpina con la enzima cutinasa de *F. solani* mostraron grupos de casi 40% con energía de -6.23 (Figura 10A) y 23% con una energía -6.26 a -5.76 (Figura 10B) de los 1000 conformeros en posiciones muy cercanas al sitio activo de la enzima, aunque estaban bastante cerca de ella, no tuvieron interacción.



**Figura 10.** Simulación computacional enzima-sustrato de Cutinasa de *F. solani* y (+)-medicarpina: A) 40% de los conformeros B) 23% de los conformeros.

En cambio, la interacción de (+)-medicarpina y lacasa de *T. versicolor*, mostró los mejores resultados, la lacasa divide su sitio activo en dos centros, el centro T1 o mono-Cu, responsable de la oxidación de los compuestos objetivo, donde interactuaron el 35% de los conformeros estudiados con una energía de -8.54 (Figura 11A), y el centro de Cu trinuclear (TNC) que reduce O<sub>2</sub>, donde interactuaron el 36% de los conformeros de (+)-medicarpina, con energía entre -7.9 a -7.35 (Figura 11B).

Con estos resultados, se sugiere que la fitoalexina (+)-medicarpina, tiene la preferencia de inhibir las enzimas involucradas en la degradación del material lignocelulósico como lacasa, lo que respalda la mayor capacidad antifúngica de (+)-medicarpina sobre los hongos xilófagos y menor en los fitopatógenos.



**Figura 11.** Simulación computacional enzima-sustrato de Lacasa de *T. versicolor* y (+)-medicarpina: A) Centro T1 con 35% de los conformeros B) Centro TNC con 23% de los conformeros.

## Conclusiones

La simulación computacional en AutoDock Tools mostró que (+)-medicarpina tiene un mayor número de interacciones con el sitio activo de la enzima lacasa, que con las enzimas proteinasa aspártica y cutinasa. Lo que respalda la alta capacidad antifúngica sobre los hongos xilófagos y una menor capacidad sobre los hongos fitopatógenos.

## Referencias

**Bakar, E.S., Hao J., Ashaari Z. y Yong A.C.C.** (2013). Durability of phenolic resin treated oil palm wood against subterranean termites a white-rot fungus. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 85:126-130

**Carroll, G.C. y Tudzynski P.** (1997). (eds.): *The mycota, Vo. IV. – Plant relationships, Part A.* Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg and New York.

**Fujimoto, Z., Fujii Y., Kaneko S., Kobayashi H. y Mizuno H.** (2004). Crystal structure of aspartic proteinase from *Irpex lacteus* in complex with inhibitor pepstatin. *J.Mol.Biol.*, 341:1227–1235.

**Longhi, S., Czjzek M., Lainzin V., Nicolas A. y Cambillau C.** (1997). Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis., *J. Mol. Biol.* 268, 779-799.

**Martínez, A.T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M., Gutiérrez A., del Río J.C.** (2005). Biodegradación de lignocelulósicos: aspectos microbianos, químicos y enzimáticos del ataque fúngico de lignina. *J. Span. Soc. Microbiol.*, 8:195 –204.

**Menògen, K. y Deising H.** (1993). Infection structures of fungal plant pathogens -a cytological and physio-logical evaluation. *New Phytol.*, 12(4):193-213.

**Piontek, K., Antorini M. y Choinowski T.** (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem.*, 277(40):37663–37669.

**Shary, S, Ralph S. A. y Hammel K. E.** (2007). New insights into the ligninolytic capability of a wood decay ascomycete. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:6691-6694.

## 8. CONCLUSIONES GENERALES

Se determinó un método óptimo para la obtención del extracto de acetato de etilo del duramen de *A. inermis*, así como la purificación de la (+)-medicarpina y confirmación de su pureza por resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H).

El extracto y la (+)-medicarpina obtenidos del duramen de *A. inermis* mostraron un efecto antifúngico tanto en los hongos xilófagos (*I. lacteus*, *Phlebospis* sp. y *T. versicolor*) como en los fitopatógenos (*A. solani* y *F. solani*) ensayados en este estudio.

Tanto el extracto como la (+)-medicarpina purificada, presentaron una mayor actividad antifúngica sobre los hongos xilófagos en comparación a la observada sobre los hongos fitopatógenos, obteniendo los más bajos valores de CMI, CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub>.

El extracto del duramen de *A. inermis* a las concentraciones media y 100 (CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub>) mostró un efecto sobre la protección al desarrollo de *T. versicolor* en bloques de madera de *F. benjamina*, inoculados con este hongo, similar a lo observado con la CL<sub>100</sub> de la (+)-medicarpina purificada.

Con los estudios de la simulación computacional enzima-(+)medicarpina, se determinó una mayor interacción del compuesto con el sitio activo de lacasa, lo que se relaciona con la alta actividad antifúngica de la (+)-medicarpina sobre los hongos xilófagos.

## 9. LITERATURA CITADA GENERAL

**Afanador, L., Álvarez E y Mejía J.** (2009). Especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en Colombia. Memorias del XXIX Congreso Nacional Fitopatología y Ciencias Afines –ASCOLFI-. Medellín, Editorial ASCOLFI, p. 107–108.

**Ahuja, I., Kissen R. y Bones A.M.** (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.*, 17:73–90.

**Allen P.H.** (1956). The rain forests of Golfo Dulce. Gainesville, FL: University of Florida Press. p. 417.

**Arikan, S., Paetznick V. y Rex J.H.** (2002). Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46:3084-3087.

**Arikan, S., Yurdakul P. y Hascelik G.** (2003). Comparison of two methods and three end points in determination of in vitro activity of Micafungin against *Aspergillus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47:2640-2643.

**Axelstad, M., Boberg J., Nellemann C., Kiersgaard M., Pernille R.J., Christiansen S., Sørig H.K. y Hass U.** (2011). Exposure to the widely used fungicide mancozeb causes thyroid hormone disruption in rat dams but no behavioral effects in the offspring. *Toxicol. Sci.*, 120:439-46.

**Bahraminejad, S., Saeed A. y Mehdi F.** (2011). *In vitro* antifungal activity of 63 Iranian plant species against three different plant pathogenic fungi. *Afr. J. Biotechnol.*, 10:16193-201.

**Bautista-Baños, S., Sivakumar D., Bello-Pérez A., VillanuevaArce R. y Hernández-López, M.** (2013). A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop Prot.*, 49:8–20.

**Benítez, R.R.F. y Montesinos L.J.L.** (1988). Catálogo de cien especies forestales de Honduras: Distribución Propiedades y Usos. Escuela Nacional de Ciencias forestales (ESNACIFOR). Siguatepeque, Honduras 9–10 p.

**Bhargavan, B., Singh D., Gautam A.K., Mishra J.S., Kumar A., Goel A., Dixit M., Pandey R., Manickavasagam L., Dwivedi S.D., Chakravarti B., Jain G.K., Ramachandran R., Maurya R., Trivedi A., Chattopadhyay N. y Sanyal S.** (2012). Medicarpin, a legume phytoalexin, stimulates osteoblast differentiation and promotes peak bone mass achievement in rats: evidence for estrogen receptor  $\beta$ -mediated osteogenic action of medicarpin., *J Nutr Biochem.*, 23:27–38.

**Bhattacharya, P., Mukherjee A.B., Jacks G., y Nordqvist S.** (2002). Metal contamination at a wood preservation site: Characterisation and experimental studies on remediation. *Sci. Total Environ.*, 290:165–180.

**Bolin, C.A. y Smith S.** (2011). Life cycle assessment of ACQ-treated lumber with comparison to wood plastic composite decking. *J. Clean. Prod.*, 19:620-629.

**Boyd, I.L., Freer-Smith P.H., Gilligan C.A. y Godfray H.C.J.** (2013). The Consequence of tree pests and diseases for ecosystem services. *Science.*, 342(6160):832-831.

**Caron F.** (2012). Antimicrobial susceptibility testing: a four facets tool for the clinician. *J. Des. Anti-Infect.*, 14:186-174.

**Cavalcanti, L.S., Brunelli, K.R. & Stangarlin, J.R.** (2005) Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: Cavalcanti, L.S., Di Piero, R.M., Cia, P., Pascholati, S.F., Resende, M.L.V. y Romeiro, R.S. (Eds.) *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba SP. FEALQ. pp. 81-124.

**Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades.** (2013). Evaluación de riesgos del ECDPC sobre el impacto del uso ambiental de los triazoles en el desarrollo y la propagación de la resistencia a los triazoles médicos en especies de *Aspergillus.*, Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades, Estocolmo, Suecia.

**Cheng, S.S., Lin C.Y., Gu H.J., Chang S.T.** (2011). Antifungal activities and chemical composition of wood and leaf essential oils from *Cunninghamia konishii*. *J. Wood Chem. Technol.*, 31:204-217.

**Chaparro D.F., Rosas D.C. y Varela A.** (2009). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Rev. Iberoam., Micol.* 26:238-246.

**CITES.** (2017). The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). Appendices I and II. Valid from 4 October 2017.

**Clausen, C.A.** (2010). Biodeterioration of Wood. In: *Wood Handbook, Wood as an engineering material*. Chapter 14. Centennial Edition. General technical report FPL. Madison. Wi. 16p.

**CLSI.** (2010). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*, Approved Guideline, 2nd. ed., CLSI document M45-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Roadn Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

**Comité de Acción de Resistencia al fungicida.** (2015). [En línea]. Disponible en: [www.frac.info](http://www.frac.info) [19 de febrero de 2015].

**CONAFOR.** (2007). Elaboración de fichas técnicas sobre las características tecnológicas y usos de maderas mexicanas de interés para las plantaciones forestales comerciales. [www.conafor.gob.mx/conacyt-conafor](http://www.conafor.gob.mx/conacyt-conafor)

**CONAFOR.** (2010). Manual para la protección contra el deterioro de la madera. <http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/Proteccion-Madera.pdf>

**CONAFOR.** (2013). Manual Para la Identificación y manejo de Plagas en plantaciones forestales comerciales. <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/ver.aspx?grupo=43&articulo=6043>

**Cortinas, N.C., Cristián, F.A. y Loredó M.O.** (1996). Los plaguicidas. Gaceta Ecológica, México, INE-SEMARNAP., 40:62-70.

**Crous, P.W., Wingfield M. J., Cheewangkoon R., Carnegie A.J., Burgess T.I., Summerell B.A., Edwards J., Taylor P.W.J. y Groenewald J.Z.** (2019) Foliar pathogens of eucalypts. *Studies in Mycology.*, 94:125-298.

**Deesamer, S., Chavasiri W., Chaichit N., Muangsin N. y Kokpol U.** (2009). 9-Methoxy-6a, 11a-dimethyl-6a, 11a-dihidro-6H-1benzofuro[3,2-c] chromen-3ol from *Dalbergia oliveri*. *Acta Crystallographica.*, Section E65, o2387.

**Dewick, P.M.** (1977). Biosynthesis of pterocarpan phytoalexins in *Trifolium pratense*. *Phytochemistry.*, 16:93-97.

**Diouf, P.N., Delbarre N., Perrin D., Gerardin P., Rapin C., Jacquot J.P., Gelhaye E.** (2002). Influence of tropolone on *Poria placenta* wood degradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:4377-4382.

**Dixon, R. A.** (2001) natural products and plant disease resistance. *Nature.*, 411:843-847.

**Dong, F., Jing L., Bezhan C., Yongpu C., Jun X., Xingang L., Yuanbo L., Xiu C., Bertucci C., Tedesco D., Zanasi R., e Yongquan Z.** (2013). Chiral triazole fungicide difenoconazole: Absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil. *Environ. Sci. Technol.*, 47:338-694.

**Duniway, J.M.** (2002). Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. *Phytopathology.*, 92:1337-43.



**Durango, D., Quiñones W., Torres F., Rosero Y., Gil J. y Echeverri F.** (2002). Phytoalexin accumulation in Colombian bean varieties and aminosugars as elicitors. *Molecules.*, 7:817-832.

**Fahrendorf, T., y Dixon, R.A.** (1993). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XVIII: Molecular cloning and expression of the elicitorinducible cinnamic acid 4-hydroxylase cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.*, 305, 509-515.

**Floudas, D., Held B.W., Riley R., Nagy L.G., Koehler G., Ransdell A.S., Younus H., Chow J., Chiniquy J., Lipzen A., Tritt A., Sun H., Haridas S., LaButti K., Ohm R.A., Kues U., Blanchette R.A., Grigoriev I.V., Minto R.E. y Hibbett, D.S.** (2015). Evolution of novel wood decay mechanisms in Agaricales revealed by the genome sequences of *Fistulina hepatica* and *Cylindrobasidium torrendii*. *Fungal Genetics and Biology.*, 76:78-92.

**Frankie, G.W., Baker H.G. y Opler P.A.** (1974). Comparative phenological studies of trees in tropical wet and dry forests in the lowlands of Costa Rica. *Journal of Ecology.*, 62: 881-919.

**Frankie, G.W., Opler P.A. y Bawa K.S.** (1976). Foraging behaviour of solitary bees: implications for outcrossing of a neotropical forest tree species. *Journal of Ecology.*, 64: 1049-1057.

**García-Jiménez J., Monte E. y Trapero A.** (2010) Los hongos y oomicetos fitopatógenos. In: Jiménez Díaz R, Montesinos Seguí E (eds.) Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. *Naturaleza y control integrado*, Phytoma, España, pp 23–50 (in Spanish).

**Gaviria-Hernández, V., Patiño-Hoyos L., y Saldarriaga-Cardona A.** (2013). Evaluación in vitro de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp. en mora de Castilla. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 14(1), 67-75.

**Geiger, F., Bengtsson J., Berendse F., Weisser W. W., Emmerson M., Morales M. B., Ceryngier P., Liira J., Tscharrntke T., y Winqvist C.** (2010). Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology.*, 11 (2):97-105.

**Glawischnig E.** (2007). Camalexin. *Fitoquímica.*, 68:401-406.

**Graham, T.L.** (1995). Cellular biochemistry of phenyl-propanoids responses of soybean to infection by *Phytophthora sojae*. In: Daniel, M. and Purkay-astha, R.P. (Eds.), *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*. Marcel Dekker, New York, pp. 85-116.

**Gupta S. y Dikshit A.K.** (2010). Biopesticides: an ecofriendly approach for pest control. *Journal of Biopesticides.*, 3(1):186–188.

**Hargreaves, J.A., Mansfield J.W., Coxon D.T. y Price K.R.** (1976). Weyerone epoxide as a phytoalexin in *Vicia faba* and its metabolism by *Botrytis cinerea* and *B. fabae* *in vitro*. *Phytochemistry.*, 15:1119-1121.

**Hassan, E.B., Abou-Yousef H., Steele P. y El-Giar E.** (2016). Characterization of bio-oils from the fast pyrolysis of white oak and sweetgum. *Energy Sources Part.*, 38:43–50.

**Hatakka, A y Hammel K.E.** (2010) Fungal biodegradation of lignocelluloses. In: Hofrichter M (ed.) *The Mycota, X, Industrial applications*, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York (in press).

**Heatley N.G.** (1944). A method for the assay of penicillin. *Biochem. J.*, 38:61-65.

**Hedenström, E., Edfeldt A.F., Edman M., Jonsson B.G.** (2016). Resveratrol, piceatannol, and isorhapontigenin from Norway spruce (*Picea abies*) debarking wastewater as inhibitors on the growth of nine species of wood-decaying fungi. *Wood Sci. Technol.*, 50:617-629.

**Hernández, A.L.M.** (2002). Uso potencial del quitosano y extractos vegetales en el control de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum* y *Fusarium oxysporum* de la papaya (*Carica papaya*). Tesis de maestría, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional. (Yautepec, Morelos, México).

**Hopp L., Peiffer S y Durner W.** (2006). Variabilidad espacial de arsénico y cromo en el agua del suelo en un antiguo sitio de conservación de madera. *J. Contam. Hidrol.*, 85:159–178.

**Hu, L., Wang D., Liu L., Chen J., Xue Y. y Shi Z.** (2013). Ca<sup>2+</sup> efflux is involved in cinnamaldehyde-induced growth inhibition of *Phytophthora capsici*. *PLoS One.*, 8:p. e76264.

**Huffaker, A., Kaplan F., Vaughan M.M., Dafoe N.J., Ni X., Rocca J.R., Alborn H.T., Teal P.E. y Schmelz E.A.** (2011) Novel acidic sesquiterpenoids constitute a dominant class of pathogen-induced phytoalexins in maize. *Plant Physiol.*, 156:2082–2097.

**Ingham, J.L.** (1982). Phytoalexins from the Leguminosae. In *Phytoalexins*; Bailey, J.A., Mansfield, J.W., Eds.; Blackie: Glasgow and London, UK, pp. 21–80.

**Janzen, D.H.** (1967). Synchronization of sexual reproduction of trees within the dry season in Central America. *Evolution.* 21:620-63.

**Janzen, D.H., Miller G.A., Hackforth-Jones J., Pond C.M., Hooper K. y Janos D.P.** (1976). Two Costa Rican bat-generated seed shadows of *Andira inermis* (Leguminosae). *Ecology.*, 57:1068-1075.

**Jefcoate, C.R.** (1978). Medición de la unión del sustrato y el inhibidor al citocromo P-450 microsómico mediante espectroscopía de diferencia óptica, en *Biomembranas, Parte C, Métodos en Enzimología*, vol. 52, ed. por S. Fleischer y L. Packer. Elsevier, Nueva York, Nueva York, pp. 258–279.

**Jefcoate, C.R., Gaylor J.L., y Calabrese R.L.** (1969). Ligand interactions with cytochrome P-450. I. Binding of primary amines. *Biochemistry.*, 8:3455–3463.

**Jorgensen, J.H. y Ferraro M.J.** (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin. Infect. Dis.*, 49:1749-1755.

**Karchesy, J.** (1998). The literature of Juniper utilization for oils and specialty products: A report to the western juniper steering committee. [http://juniper.oregonstate.edu/bibliography/documents/php80YmFy\\_literature.pdf](http://juniper.oregonstate.edu/bibliography/documents/php80YmFy_literature.pdf).

**Kartal, S.N., Terzi E., H. Yilmaz y Goodell B.** (2015). Bioremediation and decay of wood treated with ACQ, micronized ACQ, nano-CuO and CCA wood preservatives. *Int. Biodeterior. Biodegr.*, 99:95-101.

**Kebbi-Benkeder Z., Colin F., Dumarçay S., Gérardin P.** (2015). Cuantificación y caracterización de extractos de nudos de 12 especies europeas de madera blanda y dura. *Ana. Por. Sci.*, 72:277–284.

**Kiran, B. y Raveesha K.A.** (2006). Antifungal activity of seed extract of *Psoralea corylifolia* L. *Plant Dis. Res.* 20:213-215.

**Kirker, G.T., Blodgett A.B., Arango R.A., Lebow P.K. y Clausen C.A.** (2013). The role of extractives in naturally durable wood species *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 82:53-58.

**Kirker, G.T., Bishell A.B., Lebow P.K.** (2016). Laboratory evaluations of durability of southern pine pressure treated with extractives from durable wood species. *J. Econ. Entomol.*, 109:259-266.

**Klapwijk M.J., Bylund H., Schroeder M., Björkman C.** (2016) Forest management and natural biocontrol of insect pests. *Forestry.*, 89: 253–262.

**Korhonen, K. y Stenlid, J.** (1998) Biology of *Heterobasidion annosum*. In: *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control* (Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R. and Hüttermann, A., eds), pp. 43– 71. London: CAB International.

**Kraft B., Schwenen L., Stęcki D. y Barz W.** (1987) Degradation of the pterocarpan phytoalexin medicarpin by *Ascochyta rabiei*. *Arch Microbiol.*, 147:201–206.

**Kreger B.E., Craven D.E., McCabe W.R.** (1980). Gram-negative bacteremia: IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *Am. J. Med.*, 68:344-355.

**Kües U., Nelson D.R., Liu C., Yu G.J., Zhang J., Li J., Wang X.C., Sun H.** (2015) Genome analysis of medicinal *Ganoderma* spp. with plant-pathogenic and saprotrophic life-styles. *Phytochemistry.*, 114:18–37.

**Ladiges P.Y., Udovicic F., Nelson G.** (2003). Australian biogeographical connections and the phylogeny of large genera in the plant family Myrtaceae. *Journal of Biogeography.*, 30: 989–998.

**Lattanzio, V., Kroon P.A., Quideau S. y Treutter D.** (2008). Introduction: Plant Phenolics–Secondary Metabolites with Diverse Functions. In *Recent Advances in Polyphenol Research*; Daayf, F., Lattanzio, V., Eds.; Wiley-Blackwell: Chichester, UK, Volume 1, pp. 1–35.

**Lattanzio V.** (2013). Phenolic Compounds: Introduction, in: K.G. Ramawat, J.M. Mérillon (Eds.) *Natural products - Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, SpringerVerlag Berlin Heidelberg, pp. 1543-1580.

**Lebow, S.T.** (2010). Wood preservation, *Wood Handbook - Wood as an Engineering Material*. General Technical Report FPL-GTR-190, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, WI.

**Liers, C., Ullrich R., Steffen K.T., Hatakka A. y Hofrichter M.** (2006). Mineralización de lignina sintética marcada con <sup>14</sup>C y actividades enzimáticas extracelulares de los ascomicetos colonizadores de madera *Xylaria hypoxylon* y *Xylaria polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 69:573–579.

**Lima, R.B.S., Gonçalves J.F.C., Pando S.C., Fernandes A.V. y Santos A.L.W.** (2008). Primary metabolite mobilization during germination in rosewood (*Aniba rosaedora* Ducke) sedes. *Rev. Arvore.*, 32:19-25.

**Lin, L.D., Chen Y.F., Wang S.Y. y Tsai M.J.** (2009). TsaiLeachability, metal corrosion, and termite resistance of wood treated with copper-based preservative. *Int. Biodeterior. Biodegr.*, 63:533-538.

**Little, Elbert L., Jr. y Wadsworth Frank H.** (1964). Common trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. *Agric. Handb.* 249. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture. 548 p

**Liu S., Weibin R., Jing L., Hua X., Jingan W., Yubao G. y Jinguo W.** (2008). Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathologia.*, 166:93-102.  
**Longhi, S., Czjzek M., Lainzin V., Nicolas A. y Cambillau C.** (1997). Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis., *J. Mol. Biol.* 268, 779-799.

**López-Oviedo, E., Aller A. I., Martín C., Castro C., Ramírez M., Peman J.M., Canton E., Almeida C., y Martín-Mazuelos E.** (2006). Evaluation of disk diffusion method for determining posaconazole susceptibility of filamentous fungi: comparison with CLSI broth microdilution method. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50:1108–1111.

**Lundell, T.K., Mäkelä M.R., de Vries R.P. y Hildén K.S.** (2014). Genomics, lifestyles and future prospects of wood-decay and litter-decomposing Basidiomycota. *Advances in Botanical Research.*, 70:329-370.

**Mabona, U., Viljoen A., Shikanga E., Marston A. y Van Vuuren S.** (2013). Antimicrobial activity of southern African medicinal plants with dermatological relevance: From an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound. *Journal of Ethnopharmacology.*, 148:45-55.

**Magaldi, S., Mata E.S., Hartung de Capriles C., Perez C., Colella M.T. y Olaizola C.** (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases.*, 8(1):39-45.

**Mäkelä, M., Hildén K., de Vries R.** (2014). Degradation and modification of plant biomass by fungi. In: Esser, K., Nowrousian, M. (Eds.), *The Mycota. Fungal Genomics.* Springer-Verlag, pp. 175-208.

**Mansour, M.M.A. y Salem M.Z.M.** (2015). Evaluation of wood treated with some natural extracts and Paraloid B-72 against the fungus *Trichoderma harzianum*: wood elemental composition, in-vitro and application evidence. *Int. Biodeterior. Biodegr.*, 100:62-69.

**Mari, M., Sivakumar D., Bautista-Baños S.** (2016). Control de la descomposición en el sistema poscosecha: papel de los compuestos orgánicos volátiles microbianos y vegetales. *Postcosecha Biol. Technol.*, 122:70-81.

**Marshall, R.C.** (1939). *Silviculture of the trees of Trinidad and Tobago, British West Indies.* London, England: Oxford University Press. 247 p.

**Martínez-Sotres, C, López-Albarrán P, Cruz-de-León J, García-Moreno T, Rutiaga-Quiñones JG, Vázquez-Marrufo G, Tamariz-Mascarúa J, Herrera-Bucio R.** (2012). Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. *International Biodeterioration & Biodegradation.*, 69:38-40.

**Marulanda, M., López, A. y Aguilar, S.** (2007). Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop breeding and applied biotechnology.*, 7: 242-252.

**Matyjaszczyk E.** (2019) Problems of implementing compulsory integrated pest management. *Pest Manag Sci.*, 75(8):2063–2067.

**Mazid, M., Khan T.A. y Mohammad F.** (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biol. Med.*, 3:232–249.

**Mburu, F., Dumarçay S. y Gérardin P.** (2007). Evidence of fungicidal and termiticidal properties of *Prunus africana* heartwood extractives. *Holzforschung.*, 61:323-325.

**McMurry B. H., Martin E.** (1972). 3-Hydroxy-9-methoxy and 3-methoxy-9-hydroxypterocarpanes. *Phytochemistry.*, 11:3283-3286.

**Medeiros, R. S., Vieira, G., Almeida, D. R. A., y Tomazello Filho.** (2018). New information for managing *Copaifera multijuga* Hayne for oleoresin yield. *Forest Ecology and Management.*, 414:85-98.

**Melo K.M., Fascineli M.L., Milhomem-Paixão S.S.R., Grisolia C.K., Santos A.S., Salgado H.L.C., Muehlmann L.A., Azevedo R.B., Pieczarka J.C., y Nagamachi C.Y.** (2018). Evaluation of the Genotoxic and Antigenotoxic Effects of Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) Oil and Nanoemulsion on Swiss Mice. *J Nanomater.*, 1-8.

**Miao V. P. W. y Van Etten H. D.** (1992). Genetic analysis of the role of phytoalexin detoxification in virulence of the fungus *Nectria haematococca* on chickpea (*Cicer arietinum*). *Environmental Microbiology.*, 58: 809-814.

**Mihara, R. Barry K.M., Mohammed C.L. y Mitsunaga T.** (2005). Comparison of antifungal and antioxidant activities of *Acacia mangium* and *A. auriculiformis* heartwood extracts. *J. Chem. Ecol.*, 31:789-804.

**Milenkovski, S., Erland B., Per-Eric L. y Olof B.** (2010). Toxicity of fungicides to natural bacterial communities in wetland water and sediment measured using leucine incorporation and potential denitrification. *Ecotoxicology*, 19:285-94.

**Mohajerani, A., Vajna J., Ellcock R.** (2018). Chromated copper arsenate timber: A review of products, leachate studies and recycling. *J. Clean. Prod.*, 179:292–307.

**Mohammed, S.A., Madhan B., Demissie B.A., Velappan B. y Tamil S.A.** (2016). *Rumex abyssinicus* (mekmeko) Ethiopian plant material for preservation of goat skins: approach for cleaner leather manufacture. *J. Clean. Prod.*, 133:1043-1052.

**Morales, P.F.G.** (2014). Análisis espectroscópico de compuestos del duramen de maderas durables que inhiben el crecimiento de *Trametes versicolor*. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencia y Tecnología de la Madera. Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera. UMSNH. Morelia, Michoacán, México.

**Morrissey, J. y Osbourn A.** (1999). Resistencia fúngica a antibióticos de plantas como mecanismo de patogénesis. Revisiones de Microbiología y Biología Molecular., 63(3):708-724.

**Nagy, L.G., Riley R., Tritt A., Adam C., Daum C., Floudas D., Sun H., Yadav J.S., Pangilinan J., Larsson K.H., Matsuura K., Barry K., LaButti K., Kuo R., Ohm R.A., Bhattacharya S.S., Shirouzu T., Yoshinaga Y., Martin F.M., Grigoriev I.V. y Hibbett D.S.** (2016). Comparative genomics of early-diverging mushroom-forming fungi provides insights into the origins of lignocellulose decay capabilities. Mol. Biol. Evol., 33:959-970.

**Nakayama, F.S., Vinyard S.H., Chow P., Bajwa D.S., Youngquist J.A., Muehl J.H., Krzysik A.M.** (2001). Guayule as a wood preservative. Ind. Crops Prod., 14:105-111.

**Naranjo J.** (2011). Propuesta de un perfil de riesgo químico establecido para la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) producida en Colombia. Trabajo de grado para optar al título de Master en Gerencia de Programas Sanitarios en Inocuidad de Alimentos. San José, Costa Rica, Universidad para la Cooperación Internacional, 76 p.

**Nascimento, G.O., Souza D.P., Santos A.S., Batista J.F., Rathinasabapathi B., Gagliardi P.R. y Gonçalves J.F.C.** (2019). Lipidomic profiles from seed oil of *Carapa guianensis* Aubl. and *Carapa vasquezii* Kenfack and implications for the control of phytopathogenic fungi. Industrial Crops and Products., 129:67-73.

**Navarrete, R., Trejo E., Navarrete J., Prudencio, J.M. y Acosta J.A.** (2009). Relación de genotipos de frijol a *Fusarium spp.* y *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de campo e invernadero. Agricultura técnica en México., 35(4):459-470.

**Nazzaro, F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., y De Feo V.** (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals.*, 6(12):1451–1474.

**Niembro–Rocas, A.** (1990). Árboles y arbustos útiles de México –Naturales e Introducidos. LIMUSA Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México.

**Orwa C., Mutua A., Kindt R., Jamnadass R. y Simons A.** (2009). Agroforestry database: a tree reference and selection guide version 4.0. [www.worldagroforestry.org/af/treedb/](http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/).

**Pabón, L. C., y Cuca L. E.** (2010). Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). *Química Nova.*, 33:875-879.

**Pagare, S., Bhatia M., Tripathi N., Pagare S. y Bansal Y.K.** (2015). Secondary metabolites of plants and their role: overview. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.*, 9(3):293–304.

**Palou, L., Smilanick J.L. y Droby, S.** (2008). Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Rev.*, 2:1–16.

**Pedras, M.S.C., Adio A.M., Suchy M., Okinyo D.P., Zheng Q.A., Jha M., Sarwar M.G.** (2006). Detection, characterization and identification of crucifer phytoalexins using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 1133:172-183.

**Pennington, T. D. y Sarukhán J.** (1998). Árboles Tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. Texto Científico Universitario. Universidad Nacional Autónoma de México Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 521 pp.

**Pfaller, M.A., Sheehan D.J. y Rex J.H.** (2004). Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17:268-280.

**Pometti, C.L., Palanti S., Pizzo B., Charpentier J.P., Boizot N., Resio C. y Saidman B.O.** (2010). Durability of five native argentine wood species of the genera *Prosopis* and *Acacia* decayed by rot fungi and its relationship with extractive content. *Biodegradation.*, 21:753-760.

**Prida, A. y Puech J. L.** (2006). Influencia del origen geográfico y las especies botánicas en el contenido de extractos en los bosques de roble americano, francés y de Europa del Este. *J. Agric. Food Chem.*, 54:8115–8126.

**Prieto, J., Pabón L., Patiño O., Delgado W. y Cuca L.** (2010). Constituyentes químicos, actividad insecticida y antifúngica de los aceites esenciales de las hojas de dos especies del género *Ocotea* (Lauraceae). *Revista Colombiana de Química.*, 39:199-209.

**Prieto, J. A., Patiño O. J., Plazas E. A., Pabón L. C., Ávila M. C., Guzmán J. D., Delgado W. A. y Cuca L. E.** (2013). Natural products from plants as potential source agents for controlling *Fusarium*. En M. Nita (Ed.), *Fungicides. Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World* (pp. 233- 78). Croacia: Intech. doi:10.5772/52338



Riley, R., Salamov A.A., Brown D.W., Nagy L.G., Floudas D., Held B.W., Levasseur A., Lombard V., Morin E., Otilar R., Lindquist E.A., Sun H., LaButti K.M., Schmutz J., Jabbour D., Luo H, Baker S.E., Pisabarro G.A., Walton J.D., Blanchette A.R., Henrissat B, Martin F, Cullen D, Hibbett S.D. y Grigoriev V.I. (2014). Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 111:9923-9928.

Rodríguez, H. (2000). Plantas contra plagas: potencial práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. Red de Acción Sobre Plaguicidas y Alternativas en México (Rapam). Texoco, México.

Runyoro D.K.B., Matee M.I.N., Ngassapa O.D., Joseph C.C. y Mbwambo Z.H. (2006). Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-*candida* activity. *BMC Complem. Alternat. Med.* 6(11). doi: 10.1186/1472-6882-6-11.

Ryvarden, L. (1991). Genera of polypores: nomenclature and taxonomy. *Synopsis Fungorum.*, 5:1–363.

Saldarriaga, A, Rodríguez E y Arango R. (2002). Estudios biológicos de aislamientos de *Colletotrichum* sp., a partir de frutos de tomate de árbol, manzano y tallos de mora. En: *Memorias VIII Congreso Corporación para Investigaciones Biológicas –CIB- Medellín, CIB*, p. 21.

Saldarriaga C.A., Castaño Z.J. y Arango I.R. (2008). Caracterización del agente causante de antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. *Rev. Academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales.*, 32 (123): 145-156.

Salem, M.Z.M., Ashmawy N.A., Elansary H.O. y El-Settawy A.A. (2015). Chemotyping of diverse Eucalyptus species grown in Egypt and antioxidant and antibacterial activities of its respective essential oils. *Nat. Prod. Res.*, 29:681–685.

Salem, M.Z.M., Zidan Y.E., Mansour M.M.A., El-Hadidi N.M.N. y Abo-Elgat W.A.A. (2016<sup>a</sup>). Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by five common mold fungi. *Int. Biodeter. Biodeg.*, 106:88–96.

Sharmin, E., Zafar F., Akram D., Alam M., y Ahmad S. (2015). Recent advances in vegetable oils based environment friendly coatings: a review., *Ind. Crops Prod.*, 76:215-229.

Shary, S., Ralph S.A. y Hammel K.E. (2007). New Insights Into the Lignolytic capability of a wood decay ascomycete. *Applied and Environmental Microbiology.*, 73:6691–6694.

**Schmidt, O.** (2007). Indoor wood-decay basidiomycetes: Damage, causal fungi, physiology, identification and characterization, prevention and control. *Mycol. Prog.*, 6:261-79.

**Schuhegger, R., Rauhut T. y Glawischnig E.** (2007). Regulatory variability of camalexin biosynthesis. *J. Plant. Physiol.*, 164:636-644.

**Schultz, T.P. y Nicholas D.D.** (2000). Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry*, 54:47-52.

**Schmelz, E.A., Kaplan F., Huffaker A., Dafoe N.J., Vaughan M.M., Ni X., Rocca J. R., Alborn H.T., Teal P.E.** (2011). Identity, regulation, and activity of inducible diterpenoid phytoalexins in maize. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 108:5455–5460.

**SEMARNAT** (2010). Consideraciones tecnológicas de la madera. CONAFOR. pp. 7-9.

**Shokri H.** (2016). A review on the inhibitory potential of *Nigella sativa* against pathogenic and toxigenic fungi. *Avicenna J. Phytomed.*, 6(1):21-33.

**Singh, J.P., Singh A.K., Singh A. y Ranjan R.** (2009). Chemical constituents of *Artabotrys odoratissimus* (seeds). *Rasayan Journal of Chemistry.*, 2(1):156- 158.

**Smith D.G., McInnes A.G., Higgins V.J., Millar R.L.** (1971). Nature of the phytoalexin produced by alfalfa in response to fungal infection. *Physiol Plant Pathol.*, 1:41-44.

**Sung, P.M. y Prewitt L.** (2011). Antifungal activity of organic extracts from *Juniperus virginiana* heartwood against wood decay fungi. *Forest Products Journal.*, 61(6):443-449.

**Syofuna, A., Banana, A.Y. y Nakabonge G.** (2012). Efficiency of natural wood extractives as wood preservatives against termite attack. *Maderas Cienc. Technol.*, 14:155-163.

**Tascioglu, C., Yalcin M., Sen S. y Akcay C.** (2013). Antifungal properties of some plant extracts used as wood preservatives *Int. Biodeterior. Biodegr.*, 85:23-28.

**Téllez-Sánchez, C., Herrera-Ferreyra M.A. y Rutiaga-Quiñones J.G.** (2009). Anatomía, física y mecánica de la madera de *Andira inermis* (W. Wright) DC. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.*, 15(1):15-21.

**Tetiana, M. A, Kubrak O.I., Husak V.V., Kenneth B.S. y Volodymyr I.L.** (2014). The mancozeb-containing carbamate fungicide Tattoo induces mild oxidative stress in Goldfish brain, liver, and kidney. *Environ. Toxicol.*, 29:1227-35.

**Thornhill, A.H., Crisp M.D., Külheim C., Lam K.E., Nelson L.A., Yeates D.K. y Miller J.T.** (2019). A dated molecular perspective of eucalypt taxonomy, evolution and diversification. *Australian Systematic Botany.*, 32:29-48.

**Trujillo, F., y González V. R.** (1985). Durabilidad natural de ocho especies forestales del Perú en medio nutritivo natural. *Revista Forestal del Perú.*, 13(1):1–13.

**Valgas, C., de Souza S.M., Smânia E.F.A. y Smânia Jr. A.** (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbiol.*, 38:369–380.

**Verma, J. y Dubey N.K.** (1999). Prospectives of botanical and microbial products as pesticides of tomorrow. *Curr. Sci.*, 76:172-179.

**Wang, J., Li J., Freitag C. y Morrell J. J.** (2011). Antifungal activities of *Cunninghamia lanceolata* heartwood extractives. *BioResources.*, 6(1):606-614.

**Wang, L., Chen, S.S., Tsang, D.C.W., Poon C.S. y Shih Recycling K.** (2016). contaminated wood into eco-friendly particleboard using green cement and carbon dioxide curing. *J. Clean. Prod.*, 137:861-870.

**Weaver P. L.** (1989). *Andira inermis* (W. Wright) DC. SO-ITF-SM-20. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. Pp. 7.

**Witsberger, D., Current D. y Archer E.** (1982). Árboles del parque Deininger. Ministerio de Educación, El Salvador.146–147 p.

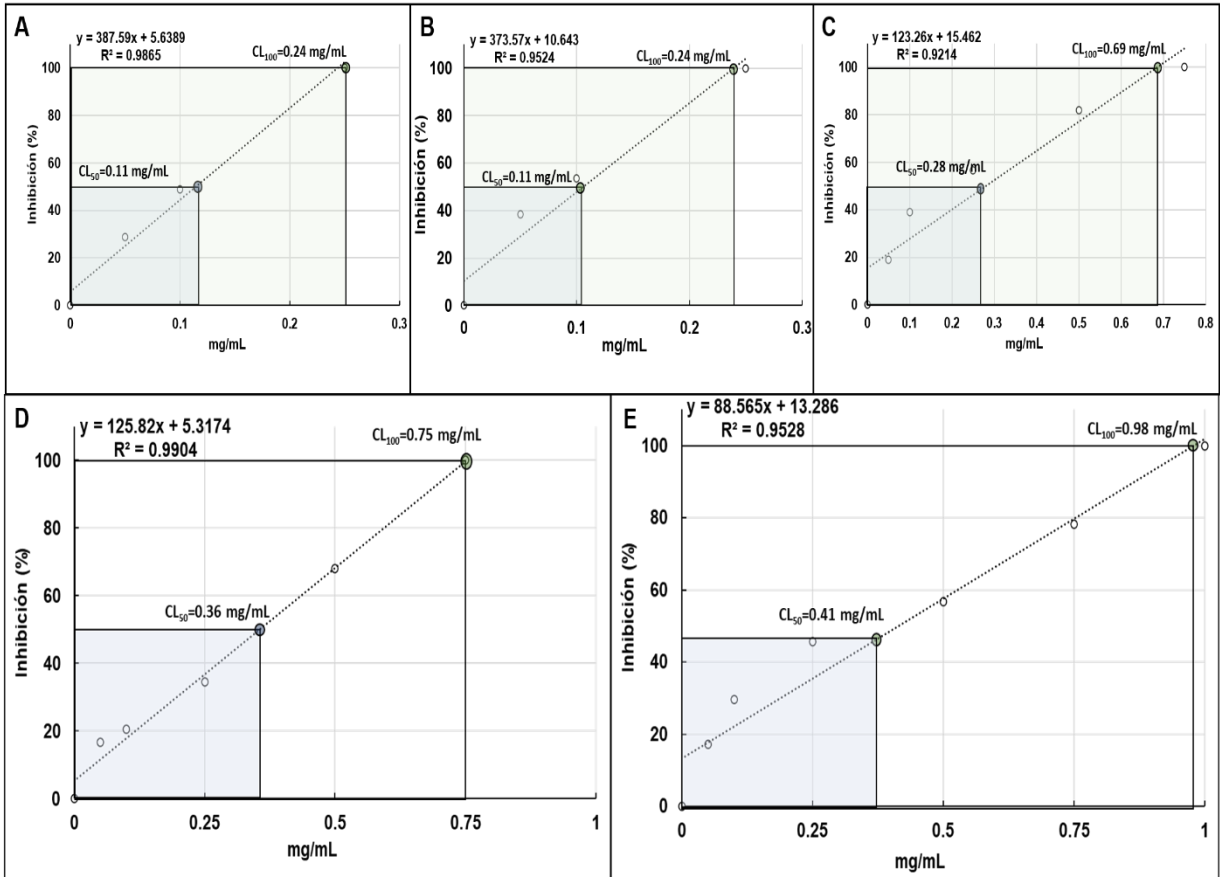
**Wu C.C., Wu C.L., Huang S.L., Chang H.T.** (2012). Antifungal activity of liriodenine from *Michelia formosana* heartwood against wood-rotting fungi. *Wood Sci. Technol.*, 46:737-747.

**Zabel, R. A. y Morrell, J. J.** (1992). Wood microbiology: Decay and its prevention. Academic Press, London. 476p.

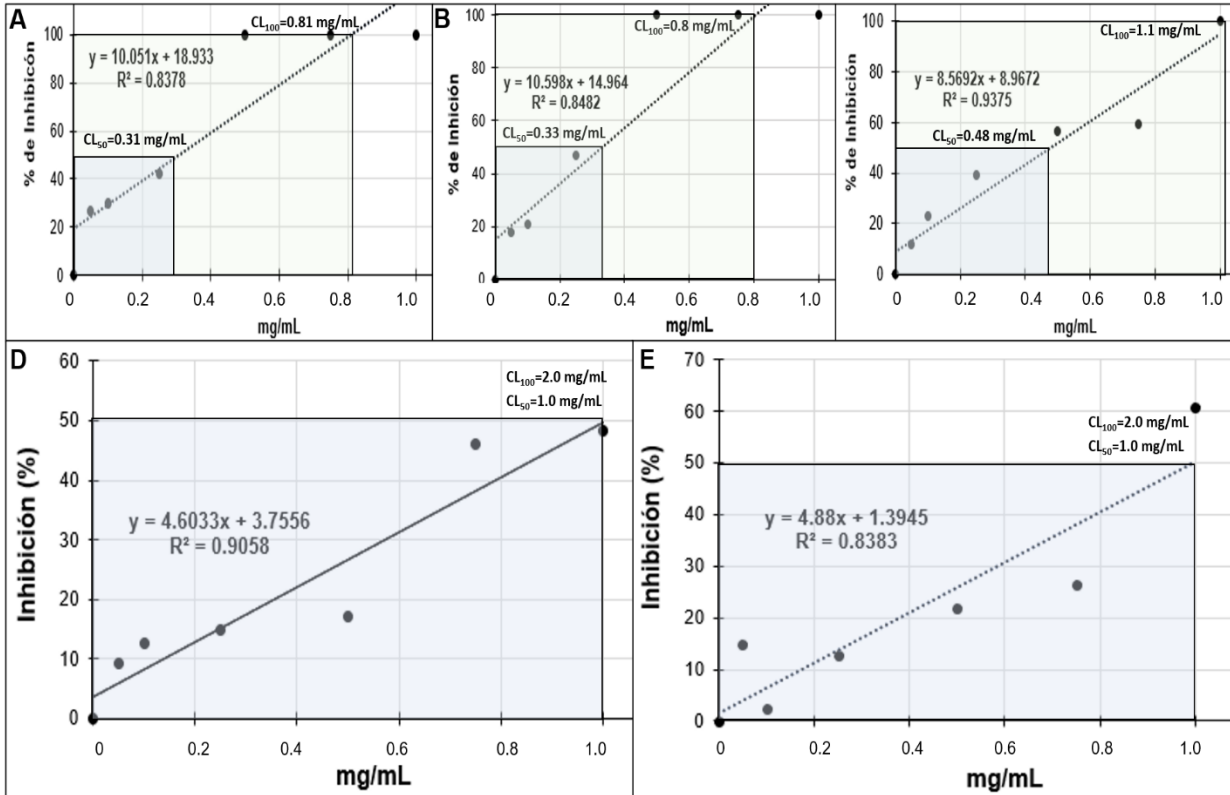
**Zanni, E.** (2009). Patología de la madera: degradación y reabilitación de estructuras de madera. Editorial Brujas. Argentina. 244p.

## 10. ANEXOS

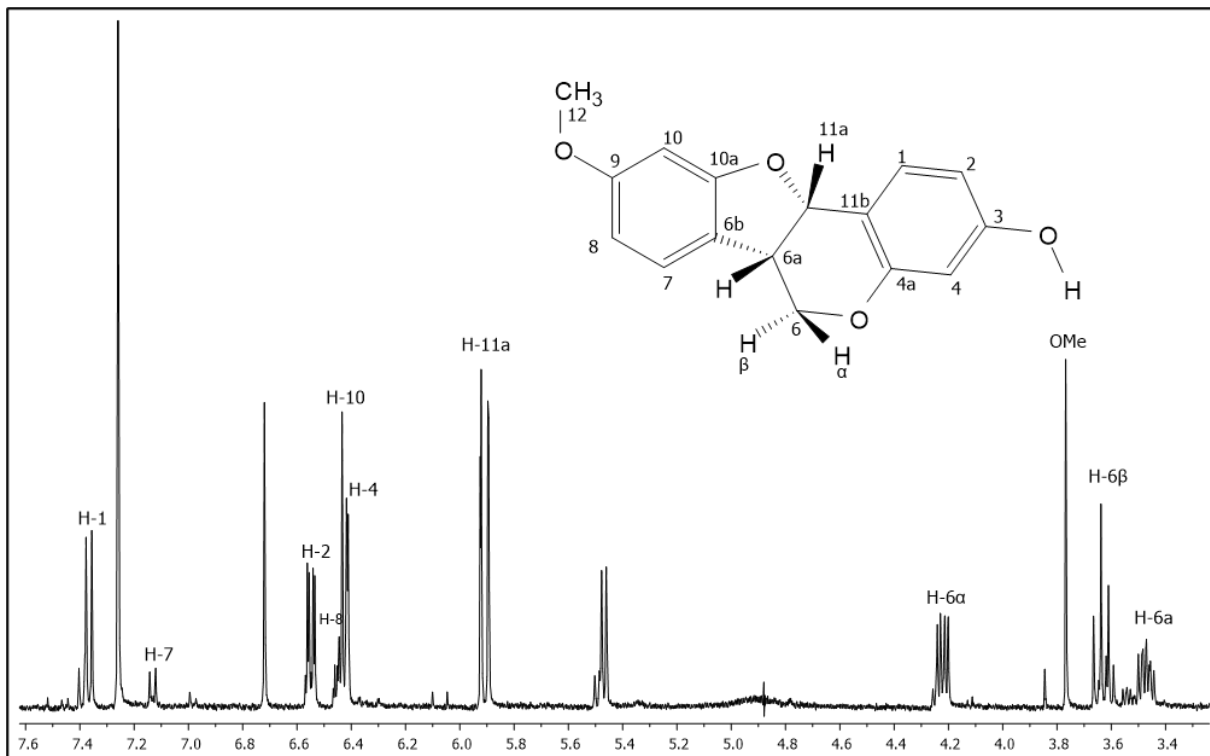
ANEXO 10.1. Curva de concentración del extracto de acetato de etilo de *Andira inermis* (mg/mL) para el cálculo de la CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub> del porcentaje de inhibición en los hongos bajo estudio: A) *Trametes versicolor*, B) *Phlebiopsis* sp, C) *Irpex lacteus*, D) *Alternaria solani* y E) *Fusarium solani*.



**ANEXO 10.2. Curva de concentración de (+)-medicarpina purificada a partir del extracto de acetato de etilo de *Andira inermis* (mg/mL) para el cálculo de la CL<sub>50</sub> y CL<sub>100</sub> del porcentaje de inhibición en los hongos bajo estudio: A) *Trametes versicolor*, B) *Phlebiopsis* sp., C) *Irpex lacteus*, D) *Alternaria solani* y E) *Fusarium solani*.**



**ANEXO 10.3. Análisis de (+)-medicarpina por Resonancia Magnética Nuclear (RMN-<sup>1</sup>H).**



**RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ** 3.52 (ddd, *J* = 10.2, 7.5, 4.1 Hz, 1H, H-6a), 3.62 (t, *J* = 10.9 Hz, 1H, H-6α), 3.77 (s, 3H, OMe), 4.24 (dd, *J* = 10.9, 5.0 Hz, 1H, H-6β), 5.07 (s, 1H, OH), 5.50 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-11a), 6.41 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-4), 6.45 (s, 1H, H-10), 6.46 (dd, *J* = 5.8, 2.1 Hz, 1H, H-8), 6.55 (dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H-2), 7.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-7), 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-1).