



UNIVERSIDAD
MICHOCANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO



Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera

División de Estudios de Posgrado

**Control de los hongos cromógenos de la madera con
aceites esenciales vegetales**

TESIS

Que para obtener el grado de:

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

Presenta:

Q.F.B. Wuilver Eder García Reynoso

Asesores:

Director: D.C. Crisanto Velázquez Becerra

Codirector: D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco

Morelia, Michoacán, México, agosto de 2021

Dedicatoria

A mis padres:

Prof. Ovidio García Chávez

Sra. Guillermina Reynoso Arroyo

A mi hermana:

Profr^a. Nadia García Reynoso

A mis amigos



*Es el privilegio del auténtico genio, y sobre todo
del genio que abre un camino, cometer impune-
mente grandes equivocaciones.*

Voltaire



Agradecimientos

INSTITUCIONALES

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

A la Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Al Laboratorio de Fisiología Celular

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

PERSONALES

D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco

M.C. Alberto Flores García

AL COMITÉ SINODAL

D.C. Crisanto Velásquez Becerra

M.C. Abril Munro Rojas

D.C. David Raya González

D.C. José Cruz de León

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DEL LABORATORIO DE FISIOLOGÍA CELULAR:

Rosy, Rita, Tania, Ali, Jared, Katy, David, Anita, Normando y Karen.



Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
I. Introducción	3
I.1. Producción y aprovechamiento forestal maderable en México.....	3
I.2. La madera y su composición química	6
I.3. Resistencia natural de la madera	7
I.4. Agentes del biodeterioro de la madera	8
□ 4.1. Insectos	8
□ 4.2. Hongos	9
□ 4.3. Hongos cromógenos	10
I.5. Preservación de la madera	12
I.6. Aceites esenciales	14
□ 6.1. Terpenos.....	15
□ 6.2. Terpenoides.....	17
□ 6.3. Derivados del fenilpropeno.....	17
□ 6.4. Otros componentes de los aceites esenciales	18
□ 6.5. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	18
I.7. Color	20
□ 7.1. Métodos de medición de color.....	20
□ 7.2. Colorimetría	21
II. Justificación.....	23
III. Hipótesis	24
IV. Objetivos.....	25
□ Objetivo general	25
□ Objetivos particulares	25
V. Metodología	26
V.1. Recolección de los hongos de hongos cromógenos	26
V.2. Aislamiento de los hongos cromógenos	26
V.3. Identificación molecular de los aislados fúngicos	27
V.4. Determinación del efecto antifúngico de los aceites esenciales	29



V.5. Escrutinio de los aceites esenciales.....	30
V.6. Establecimiento del modelo para la inducción de la mancha azul de la madera	30
V.7. Determinación <i>in situ</i> del efecto antifúngico de los aceites esenciales.....	31
□ 7.1. Método de inmersión	31
□ 7.2. Método de aspersión	32
V.8. Determinación de la absorción y retención de la madera de <i>Pinus</i> sp.....	32
V.9. Análisis colorimétrico	33
V.10. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	33
V.11. Análisis estadístico.....	34
VI. Resultados.....	35
VI.1. Aislamiento, descripción e identificación molecular de los hongos de la mancha azul de la madera	35
VI.2. Determinación del efecto antifúngico de los aceites esenciales	35
VI.3. Escrutinio de aceites esenciales	38
VI.4. Selección de los aceites esenciales con efecto antifúngico	40
VI.5. Componentes químicos de los aceites esenciales	42
VI.6. Inducción de la mancha azul de la madera	45
VI.7. Determinación <i>in situ</i> del efecto antifúngico de los aceites esenciales	47
□ 7.1. Método de inmersión	47
□ 7.2. Método de aspersión	53
VI.8. Absorción y retención de la madera de <i>Pinus</i> sp.....	58
VII. Discusión	59
VIII. Conclusión	65
IX. Referencias	66



Índice de figuras

Fig. 1. Producción forestal maderable en México, 2008-2017.	3
Fig. 2. Producción maderable por entidad federativa en 2017.	4
Fig. 3. Producción forestal maderable según especie en México, 1990-2017.	5
Fig. 4. Usos principales de la madera en México, 1997-2017.	5
Fig. 5. Anatomía de la madera (Corte transversal).....	8
Fig. 6. Tipos de insectos presentes en la madera.....	9
Fig. 7. Hongos de azulado.....	10
Fig. 8. Madera afectada por hongos de azulado.....	11
Fig. 9. Producción de plaguicidas en México, 2007-2020.....	12
Fig. 10. (a) Molécula de isopreno y (b) Regla del isopreno.....	15
Fig. 11. Monoterpenos	16
Fig. 12. Terpenoides.....	17
Fig. 13. Derivados del fenilpropeno.....	18
Fig. 14. Compuestos azufrados y nitrogenados.....	18
Fig. 15. Espectro electromagnético	20
Fig. 16. Espacio de color CIELAB.....	22
Fig. 17. Aislados monospóricos de la mancha azul de la madera de <i>Pinus</i> sp..	35
Fig. 18. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul de la madera a preservantes convencionales.....	37
Fig. 19. Imágenes representativas de la sensibilidad de los hongos de la mancha azul al aceite esencial de terpenos.....	38
Fig. 20. Análisis de componentes principales de los aceites esenciales.....	40
Fig. 21. Imágenes representativas de la sensibilidad de los hongos de la mancha azul a aceites esenciales.....	42
Fig. 22. Cromatogramas y espectros de masas representativos de los aceites esenciales ensayados.....	45
Fig. 23. Establecimiento del modelo para la inducción de la mancha azul de acuerdo con la norma ASTM D 4445-10.....	46
Fig. 24. Imágenes micrográficas de un corte provisional.....	47
Fig. 25. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul de la madera frente a preservantes convencionales (Método de inmersión).....	49



Fig. 26. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul de la madera frente a aceites esenciales (Método de inmersión).	50
Fig. 27. Pigmentación de madera de <i>Pinus</i> sp. postratamiento a los preservantes convencionales (Método de inmersión).....	51
Fig. 28. Pigmentación de madera de <i>Pinus</i> sp. postratamiento a aceites esenciales (Método de inmersión).	52
Fig. 29. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul frente a preservantes convencionales (Método de aspersion).	54
Fig. 30. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul frente a los aceites esenciales (Método de aspersion).	55
Fig. 31. Pigmentación de madera de <i>Pinus</i> sp. postratamiento a aceites esenciales (Método de aspersion).	56
Fig. 32. Pigmentación de madera de <i>Pinus</i> sp. postratamiento a aceites esenciales (Método de aspersion).	57



Índice de tablas

Tabla 1. Composición química de la madera.	6
Tabla 2. Clasificación de los preservantes para madera de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-C-419-ONNCCE.....	13
Tabla 3. Clasificación de los terpenos.	16
Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y compuestos químicos.	19
Tabla 5. Características macroscópicas de los hongos de la mancha azul de la madera de <i>Pinus</i> sp.	35
Tabla 6. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul expuestos a tres preservantes convencionales para madera y a una combinación de deltametrina-ácido bórico.....	36
Tabla 7. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul expuestos al aceite esencial de terpenos a 1 g/mL	38
Tabla 8. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul a los aceites esenciales.	39
Tabla 9. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul a los aceites esenciales.	41
Tabla 10. Compuestos químicos presentes en los aceites esenciales determinados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).....	43
Tabla 11. Absorción y retención de los aceites esenciales por la madera de <i>Pinus</i> sp.....	58



Resumen

La mancha azul de la albura de la madera de *Pinus* sp. es un defecto estético y la causan algunos ascomicetos y deuteromicetos. Las manchas se presentan como un rayado azul verdoso, gris o negro. Este defecto produce pérdidas económicas en la industria maderera e induce a la búsqueda de un mejor control. El propósito de este trabajo fue evaluar el posible efecto antifúngico de los aceites esenciales de cítricos y especias obtenidos de la industria química local en el control de la mancha azul. Para ello, de especímenes de madera de pino con mancha azul se aislaron por métodos microbiológicos a los hongos de la mancha azul. Su identificación fue mediante el marcador molecular gen ribosomal 18S (NS1 y NS6). Las determinaciones fueron la sensibilidad fúngica a los aceites esenciales, mientras que a la madera fueron el índice de retención y diferencia de color (ΔE), asimismo, la composición química de los aceites esenciales. Los resultados obtenidos fueron: un aislado fúngico de los géneros: *Alternaria* sp., *Hypocrea* sp., *Trichoderma* sp. y *Geosmithia* sp. Todos ellos fueron sensibles a los aceites esenciales de cítricos y especias a 1 g/mL, tanto, *in vitro* como *in situ*. Los aceites esenciales aplicados a la madera por inmersión o por aspersion resultaron efectivos en la preservación de la madera. El efecto preservante se asume que lo ejercen los compuestos químicos mayoritarios en los aceites esenciales. La diferencia colorimétrica (ΔE) obtenida mediante las coordenadas CIEL*a*b* indicó la ausencia de manchado en la madera tratada. Los aceites esenciales son una alternativa en la preservación de la madera contra hongos de azulado.

Palabras clave: Mancha azul, Identificación molecular, Aceites esenciales, Preservación de la madera, Colorimetría.

Abstract

The blue stain of the sapwood of *Pinus* sp. is an aesthetic defect and it is caused by some ascomycetes and deuteromycetes. The spots appear as a blue-green, gray or black streaking. This defect produces economic losses in the timber industry and leads to the search for better control. The purpose of this work was to evaluate the possible antifungal effect of citrus and spice essential oils obtained from the local chemical industry in the control of blue spot. To do this, blue stain fungi were isolated by microbiological methods from pine wood specimens with blue stain. Its identification was by means of the 18S ribosomal gene molecular marker (NS1 and NS6). The determinations were fungal sensitivity to essential oils, while to wood were the retention index and color difference (ΔE), as well as the chemical composition of essential oils. The results obtained were: a fungal isolate of the genera: *Alternaria* sp., *Hypocrea* sp., *Trichoderma* sp. and *Geosmithia* sp. All of them were sensitive to essential oils of citrus and spices at 1 g / mL, both *in vitro* and *in situ*. Essential oils applied to wood by immersion or spray were effective in preserving the wood. The preservative effect is assumed to be exerted by the major chemical compounds in essential oils. The colorimetric difference (ΔE) obtained using the CIEL* a* b* coordinates indicated the absence of staining in the treated wood. Essential oils are an alternative for preserving wood against bluish fungi.

Keywords: Blue stain, Molecular identification, Essential oils, Wood preservation, Colorimetry.

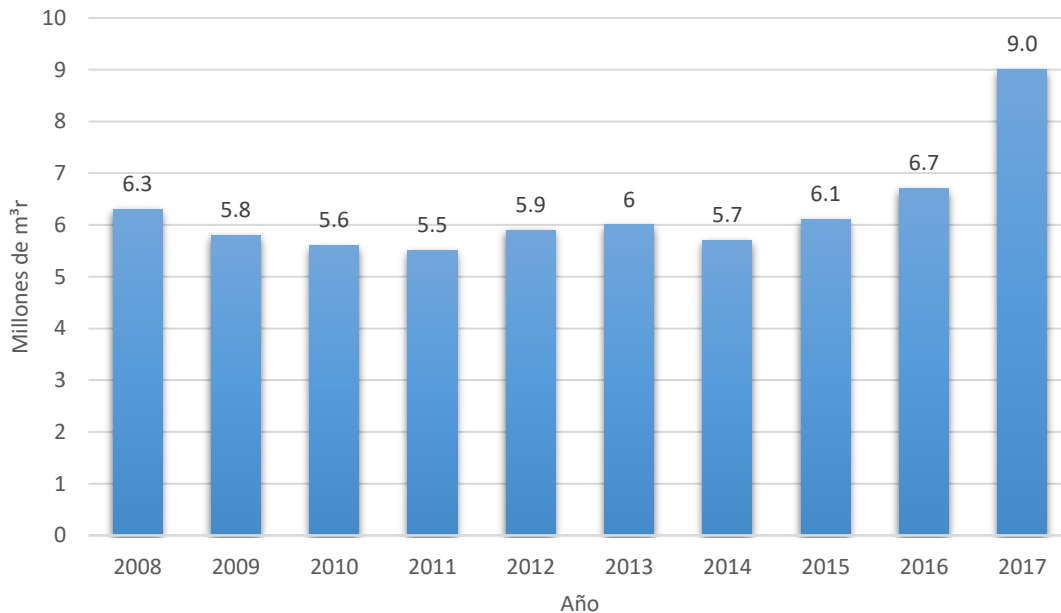
I. Introducción

I.1. Producción y aprovechamiento forestal maderable en México

De acuerdo con la Carta de Uso del Suelo y Vegetación en el 2014 el 71.4% de México (alrededor de 138 millones de ha) estaba cubierto por comunidades vegetales naturales; la superficie restante, alrededor de 55 millones de hectáreas (poco más de 28% del territorio) fue transformada a terrenos agropecuarios, áreas urbanas y otros usos del suelo antrópicos. En 2014, los matorrales fueron la formación vegetal predominante (casi 36% de la superficie natural remanente, lo que representa cerca del 26% del territorio); por su parte, los bosques (templados y mesófilos de montaña, 34 millones de ha) y las selvas (húmedas y subhúmedas, 32 millones de ha) ocuparon cerca del 34% del territorio (INEGI, 2017).

Durante el período 2008-2017 la producción forestal maderable fue fluctuante, inició con 6.3 millones de metros cúbicos rollo ($m^3 r$) en el año 2008 y finalizó con 9.0 millones de $m^3 r$ en el año 2017 (**Figura 1**) (SEMARNAT, 2017).

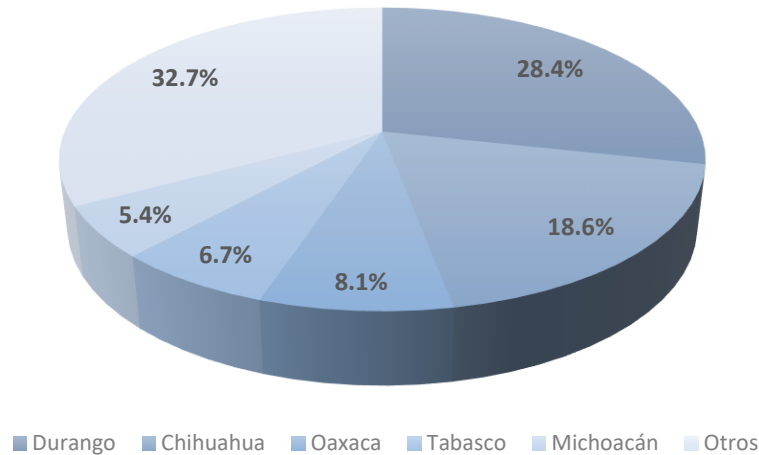
Fig. 1. Producción forestal maderable en México, 2008-2017.



Fuente: Adaptado de SEMARNAT, 2017.

Las principales entidades federativas mexicanas productoras de madera en 2017 fueron: Durango (28.4%), Chihuahua (18.6%), Oaxaca (8.1%), Tabasco (6.7%) y Michoacán (5.4%), que contribuyeron con el 67.3% de la producción total, equivalente a 6.1 millones de m³r (**Figura 2**) (SEMARNAT, 2017).

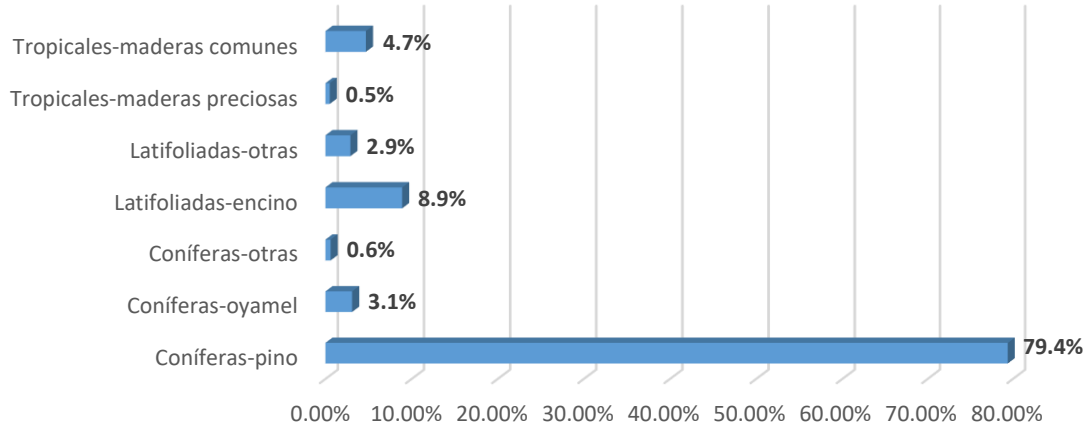
Fig. 2. Producción maderable por entidad federativa en 2017.



Fuente: Adaptado de SEMARNAT, 2017.

La producción nacional de madera está apoyada en los bosques templados de coníferas (principalmente constituidos por pinos, oyameles y cedros) y en los bosques de latifoliadas (encinos y otras especies). Entre 1990 y 2017 estos bosques contabilizaron cerca del 94.8% de la producción nacional, seguidos por las maderas tropicales comunes (4.7%) y las preciosas (0.5%). Las principales especies aprovechadas en ese periodo fueron el pino con 152 millones de m³r, 79.4% de la producción del periodo y el encino con 17 millones de m³r, 8.9% (**Figura 3**) (CONAFOR, 2017).

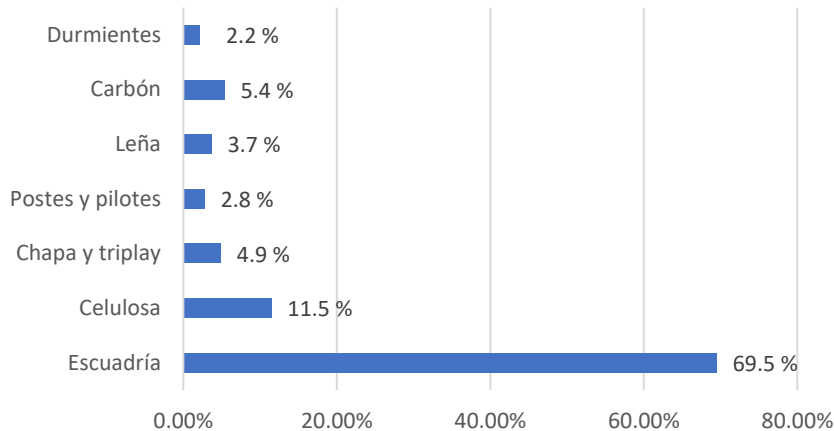
Fig. 3. Producción forestal maderable según especie en México, 1990-2017.



Fuente: Adaptado de CONAFOR, 2017.

En México, el principal uso de la madera ha sido para la producción de escuadría, es decir, tablas, tablones, vigas y material de empaque. El 69.5% del volumen total de madera extraída entre 1997 y 2017 se destinó a ese propósito; le siguen la extracción para la fabricación de celulosa (11.5% del volumen total del mismo periodo), carbón (5.4%), así como chapa y triplay (4.9%) (**Figura 4**).

Fig. 4. Usos principales de la madera en México, 1997-2017.



Fuente: Adaptado de CONAFOR, 2017.

I.2. La madera y su composición química

La madera es un material heterogéneo, ortotrópico, anisotrópico e higroscópico. La composición química de la madera es un conjunto complejo de macromoléculas como: la celulosa, las hemicelulosas, la lignina y materiales orgánicos a los que comúnmente se les denomina extraíbles (**Tabla 1**) (Fengel y Wegener, 1989).

Tabla 1. Composición química de la madera.

	Composición estructural	Composición química	Abundancia (%)	
			Maderas duras	Maderas suaves
MADERA	Celulosa	Glucosa	40-45	
	Hemicelulosa	Glucosa	35	25
		Manosa		
		Arabinosa Xilosa		
	Lignina	Alcohol cumarílico Alcohol coniferílico Alcohol sinapílico	21	25
Extraíbles	Terpenos Flavonoides Alcaloides Ácidos grasos	2-8		

Fuente: Adaptado de Sanjuan-Dueñas, 1997.

La formación de la madera se origina a partir de las células del xilema y del cambium, las cuales participan activamente en la síntesis de los metabolitos que la conforman. Un corte transversal del tronco de un árbol presenta al menos seis tipos distintos de madera: 1) madera temprana formada durante la primavera, 2) madera tardía que se forma durante el verano, 3) madera joven formada durante los primeros estados de desarrollo, 4) madera adulta, formada durante el crecimiento después de alcanzar madurez sexual, 5) madera de reacción y 6) madera de comprensión, ambas formadas en respuesta a la pérdida de la verticalidad del fuste. Cada tipo de madera posee características propias y bien definidas. El proceso es una condición celular única, donde tienen lugar varias etapas que se encuentran sincronizadas tales como: la división celular, expansión y elongación celular, exudación de metabolitos y formación de la pared secundaria hasta llegar a la muerte celular (Herrera *et al.*, 2007).

I.3. Resistencia natural de la madera

La resistencia natural de la madera contra organismos xilófagos depende principalmente, de ciertas sustancias con propiedades fungicidas o insecticidas que están incrustadas en las células del leño. Estos componentes corresponden a diversos grupos químicos de estructura compleja (Kraemer, 1958).

La madera es degradada por diversos organismos (factores bióticos), así como por agentes físicos y químicos (factores abióticos). La durabilidad natural de la madera se define como su capacidad intrínseca para resistir el ataque combinado de factores bióticos y abióticos que la degradan en condiciones de servicio. Esta propiedad varía entre las diferentes especies (Raya-González, 2007). La durabilidad natural de la madera varía en el tronco del mismo árbol, con diferencias entre la albura y el duramen. La albura es la parte activa del xilema que, en el árbol vivo, contiene células vivas y material de reserva, conduce gran cantidad de agua y de sales en solución, de la raíz a las hojas; provee rigidez al tallo y sirve de reservorio de sustancias de almacenaje. El duramen es el leño biológicamente inactivo, con funciones de sostén, que ocupa la porción del tronco entre la médula y la albura, generalmente es de estructura compacta y de coloración más oscura que la albura (**Figura 5**) (IAWA, 1964). Esta diferencia de coloración entre albura y duramen no siempre es claramente distinguible.

El duramen contiene metabolitos secundarios con diversas funciones en el árbol y genéricamente se les denomina “extraíbles”, los cuales son compuestos químicos naturales que le proporcionan su color y olor característicos; además son repelentes de insectos y hongos, permitiéndole resistir a los ataques de estos organismos (Reyes-Chilpa *et al.*, 1987). Sólo el duramen de algunas angiospermas es durable, mientras que la albura de todas las especies se considera como no durable (Scheffer, 1973).

El concepto de resistencia natural, se emplea cuando se refiere a la capacidad de una madera para resistir el ataque de un agente degradador en particular un hongo o un insecto (Raya-González, 2007).

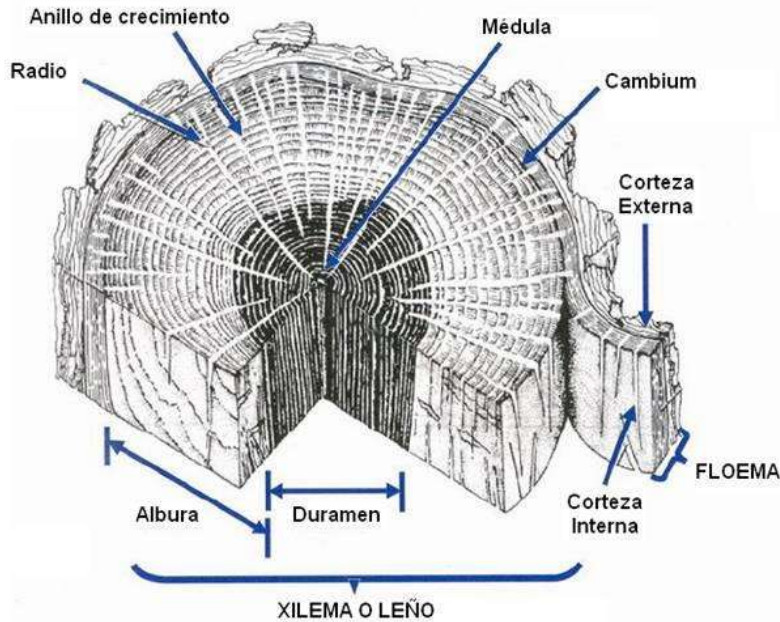


Fig. 5. Anatomía de la madera (Corte transversal) (Chavesta, C. M., 2006).

I.4. Agentes del biodeterioro de la madera

Los agentes que afectan la madera son de dos tipos: los bióticos y los abióticos. Entre los bióticos se encuentran principalmente los insectos, los hongos (Coulson *et al.*, 1990), las bacterias y las plantas. Entre los abióticos, el agua subterránea, la acción del sol y el efecto de la humedad (condiciones climáticas), entre otros (Cruz-de León, 2010).

- **4.1. Insectos**

Debido a las condiciones climáticas de México, que por lo general son secas comparadas con los países del norte o del sur del planeta, los insectos xilófagos son la primera causa de deterioro de la madera. Según sus necesidades de humedad se pueden dividir en: insectos de madera húmeda e insectos de madera seca. Los primeros deterioran especialmente árboles en pie o madera recién cortada del árbol. Los segundos deterioran madera con cierto contenido de humedad, desde medio húmeda (como postes o cercas), hasta muy seca (como techos y muebles). A su vez los insectos de madera seca son clasificados como insectos xilófagos en su fase larvaria e insectos adultos sociales (Cruz-de León, 2010). Los representantes xilófagos de los primeros son los escarabajos (coleópteros) y de los segundos, las termitas (isópteros) (**Figura 6**).

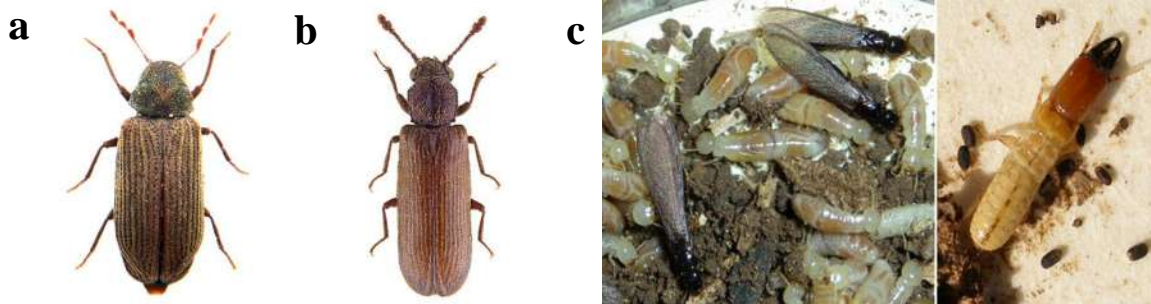


Fig. 6. Tipos de insectos presentes en la madera: a) *Anobium* sp., b) *Lyctus* sp. y c) *Incisitermes* sp. (<https://www.ukbeetles.co.uk/>; Scheffrahn R. H., 2020).

▪ 4.2. Hongos

El reino *Fungi* está representado por un diverso grupo de organismos que comprende entre 1,5 y 5 millones de especies (Heitman, 2011). Los hongos no producen clorofila por lo que son incapaces de elaborar su propio alimento a partir de la luz solar y están obligados a depender de otros organismos vivos o muertos. Para llevar a cabo esta función actúan como saprofitos (material orgánico muerto como madera) o parásitos (organismos vivos) (Sutter, 1997; Díaz-Barriga, 2002). Los que afectan a la madera, son saprófitos y endófitos.

Los hongos actúan cuando la madera se encuentra expuesta a altos contenidos de humedad. Una madera será sensible a la acción de los hongos cuanto mayor sea su grado de humedad. Diversos estudios demuestran que la madera con un 20% de humedad está expuesta al ataque de hongos, y con un 30% de humedad, éstos se encuentran en un ambiente óptimo donde desarrollarse. Los almidones y azúcares, así como algunos de los elementos de las paredes celulares, constituyen su principal fuente de nutrientes. Los hongos pueden desarrollarse en la superficie o en aberturas tales como grietas sobre maderas en condiciones de conservación muy desfavorables, humedad relativa alta, mala ventilación, contacto directo con la tierra, etcétera (Armengol *et al.*, 2004). De acuerdo con el lugar de la célula de la madera donde se alimentan los clasifican en: mohos, hongos cromógenos y hongos de pudrición. Estos últimos producen tres tipos de pudriciones: parda o cúbica, blanca y blanda. Sin embargo, otros autores solamente los clasifican en: cromógenos (lumen) y de pudrición (pared celular) (Sutter, 1997; Rodríguez-Barrenal, 1989).

▪ 4.3. Hongos cromógenos

Los hongos de azulado producen manchas pigmentadas en la albura de la madera en rollo o madera aserrada húmeda (Cruz-de León, 2010), las manchas se presentan como un rayado azul verdoso, gris o negro (Ávila *et al.*, 2012). La mancha azul es causada por aproximadamente 100 a 250 (Käärik, 1980) especies de hongos pertenecientes a los ascomicetos y deuteromicetos (Seifert, 1999) y otros tres grupos diferentes de hongos de azulado: *Ceratocystis*, *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis* (Upadhyay, 1981; Perry, 1991; Gibbs, 1999). Levaduras negras como *Hormonema dematioides*, *Aureobasidium pullulans* y *Rhinoctadiella atrovirens*; mohos oscuros como *Alternaria alternata*, *Cladosporium sphaerospermum* y *C. cladosporioides*. Yang (1999), distinguió hongos de tinción oscura, tales como *Ophiostoma piliferum* en pino, *Ceratocystis minor* en pino blanco y *C. coerulescens* en abeto blanco, y hongos de tinción clara, como *O. piceae*, *C. adiposa* y *Leptographium* sp. También son hongos de azulado *Ceratostomella piceae* y *C. coerulea* (Figura 7) (Ávila *et al.*, 2012).

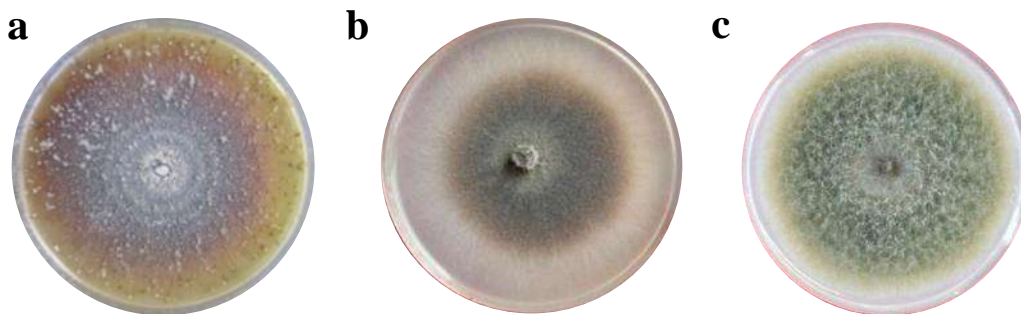


Fig. 7. Hongos de azulado: a) *Ophiostoma* sp., b) *Leptographium* sp. y c) *Alternaria* sp. (Pérez-Vera *et al.*, 2009; Xue-Wei *et al.*, 2017; Guoping *et al.*, 2020).

Las hifas de los hongos de azulado penetran en la madera a través de las secciones transversales o radiales en las fisuras de la corteza y colonizan los radios medulares. Una vez colonizadas las células radiales, las hifas penetran en las traqueidas longitudinales mediante presión mecánica a través de las puntuaciones para desarrollarse (Schmidt, 2006). Los hongos cromógenos se alimentan de los nutrientes del tejido parenquimatoso. Los hongos de azulado necesitan condiciones óptimas de humedad y temperatura para desarrollarse: la humedad debe encontrarse entre 20 y 140 % aunque por debajo del 20% pueden permanecer

en estado latente y volver a su actividad normal, cuando la humedad es favorable y la temperatura oscila entre 5 y 35 °C.

En términos generales se pueden distinguir dos tipos de hongos del azulado: hongos primarios del azulado y hongos secundarios del azulado. Los primarios son aquellos que se presentan en árboles debilitados en pie o en madera aserrada. Los secundarios son aquellos que después del secado de la madera se presentan cuando existe una adecuada humedad para su desarrollo (Sutter, 1997). El azulado se presenta, en principio, en forma de manchas irregulares o en líneas concentradas preferencialmente en la albura (Junta del Acuerdo de Cartagena, 1987). La mancha puede ser superficial o penetrar profundamente la madera (**Figura 8**) (Schmidt, 2006). En el duramen el ataque es muy escaso, debido a la ausencia de sustancias alimenticias y posible presencia de productos que son tóxicos para la vida del hongo.



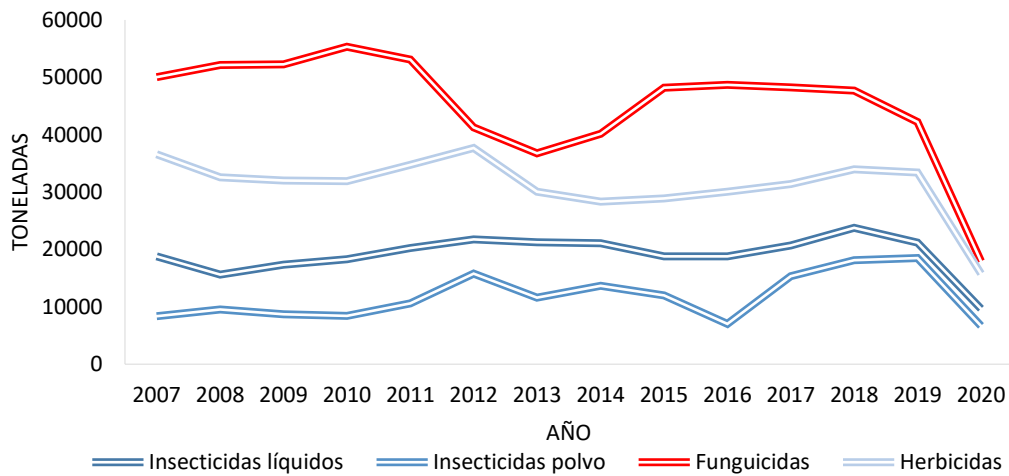
Fig. 8. Madera afectada por hongos de azulado.

El color de la madera muestra estrecha relación con la presencia de la mancha azul. Las maderas de colores claros tienden a mancharse con mayor facilidad que las maderas oscuras. Asimismo, las maderas menos densas tienen una mayor tendencia al manchado (Junta del Acuerdo de Cartagena, 1987). La mancha azul ocurre en las coníferas, particularmente en el pino, pero también en el abeto, la picea y el alerce, en maderas duras, como el haya y el abedul, y en especies tropicales (Schmidt, 2006). Los hongos de azulado colorean la madera, empeorando su aspecto y reduciendo notablemente su precio de venta para sierra o chapa. Las propiedades físicas de la madera afectada por azulado no se alteran, a excepción de la higroscopicidad y la permeabilidad si el ataque es severo (Byrne *et al.*, 2005; Vignote y Martínez, 2006; Riesco *et al.*, 2008).

I.5. Preservación de la madera

Actualmente, a nivel mundial están registrados 6,400 ingredientes activos correspondientes a plaguicidas que al combinarse con compuestos “inertes” resultan en más de 100,000 productos agroquímicos (Kegley *et al.*, 2016). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2015) reportó que en el año 2013 se obtuvo una producción agrícola a nivel mundial de 23.34 billones de toneladas; para lo cual se aplicaron 1.29 millones de toneladas de plaguicidas (insecticidas, herbicidas, funguicidas y bactericidas). En México se estima que en 2007 se comercializaron 100,000 toneladas de estos compuestos, equivalentes al 4% del consumo mundial (FAO, 2017). Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), los funguicidas son los plaguicidas que más se producen en México con 17,940 toneladas para el año 2020 (**Figura 9**).

Fig. 9. Producción de plaguicidas en México, 2007-2020.



Fuente: Adaptado de INEGI, 2020.

La conservación de la madera se define como el proceso de agregar cantidades adecuadas de sustancias tóxicas o repelentes, para proporcionarle a un producto de madera un mayor grado de resistencia al ataque biológico (Ávila *et al.*, 2012). Sin embargo, la protección de madera en el sentido amplio comprende métodos no químicos, como uso de

maderas durables de forma natural, aplicación de antagonismos o modificaciones de la madera que no afecten el ambiente (Schmidt, 2006).

La preservación química de la madera se utiliza sin las medidas constructivo-estructurales, la durabilidad natural, o las modificaciones de la madera son insuficientes para aumentar el requisito de uso a largo plazo de la madera. Las especies de madera no duraderas o de durabilidad insuficiente y la albura de todas las especies de madera pueden hacerse resistentes durante mucho tiempo contra daños, siempre que la madera adsorba los preservantes para madera apropiados (Schmidt, 2006). Los preservadores para madera se clasifican en cuatro clases de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-C-419-ONNCCE (**Tabla 2**).

Tabla 2. Clasificación de los preservantes para madera de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-C-419-ONNCCE.

Preservadores solubles en agua			
Clase I	Subclase I	Cobre-cromo-arsenicales	CCA
	Subclase II	Arseniato de cobre amoniacal	ACA
	Subclase III	Flúor, cromo arseniato, fenol	FCAF
	Subclase IV	Ácido bórico	BORO
	Subclase V	Arseniato de cobre cromado	ACC
Preservadores solubles en solventes orgánicos			
Clase II	Pentaclorofenol		
	Naftenato de cobre		
Creosotas			
Clase III	Creosota obtenida de la destilación de hulla		
Productos antimancha			
Clase IV	Pentaclorofenato de sodio		
	2-fenilfenol		

Fuente: Adaptado de Ramírez-López, 2014.

Los preservadores contienen una serie de principios activos que dependen de su composición química. En general, son solubles en líquidos corporales o celulares de los organismos; al entrar en ellos bloquean la respiración o el metabolismo celular, inhibiendo o matando al organismo. En el caso de algunos preservantes su modo de acción consiste en actuar como repelentes, especialmente en insectos (Ávila *et al.*, 2012). El principio de la protección de la madera consiste en cambiar al menos uno de los tres requisitos previos (humedad, comida y oxigenación) de vida de los hongos en la madera de tal manera que el desarrollo de hongos sea imposible o al menos inhibido. El requisito previo es, correspondiente al uso de la madera, llevar formulaciones efectivas en cantidad suficiente a profundidad en la madera usando métodos apropiados (Schmidt, 2006).

Las maderas impregnadas por productos químicos liberan por lixiviación determinadas cantidades de componentes tóxicos; una alternativa al uso de plaguicidas sintéticos es el empleo de productos naturales, los cuales son abundantes, de baja toxicidad con interesante. Las iniciativas que buscan el desarrollo de los productos naturales y sostenibles para la protección de maderas han crecido en varios países, incluyendo los aceites esenciales mezclados, los extractos de plantas, frutos cítricos, las ceras y las resinas de la corteza de diferentes especies arbóreas (Singh y Singh, 2012). Además, los fitocompuestos representan una ventaja sobre los plaguicidas sintéticos, por la magnitud de su complejidad, diversidad y novedad de sus químicos (Sharma, 1986).

I.6. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos y volátiles extraídos de material vegetal, como flores, raíces, corteza, hojas, semillas, cáscara, frutos y madera (Sánchez *et al.*, 2010). Los aceites esenciales se emplean en medicina, perfumería, cosmética, alimentos (especies o hierbas). La diversidad de los aceites esenciales es amplia, se conocen 3,000 aceites esenciales diferentes y 300 se utilizan comercialmente en el mercado de aromas y fragancias (Burt, 2004).

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios e importantes para la defensa de las plantas (Tajkarimi *et al.*, 2010). Además, sus componentes poseen propiedades antibacterianas de amplio rango (Oussalah *et al.*, 2007). También, antiparasitarias (George *et al.*, 2009), insecticidas (Essam, 2001; Kim *et al.*, 2003), antivirales (Schnitzler *et al.*,

2011), antifúngicos (Fitzgerald *et al.*, 2003; Kalemba y Kunicka, 2003; Silva *et al.*, 2011; Tserennadmid *et al.*, 2011) y propiedades antioxidantes (Brenes y Roura, 2010).

Los componentes de los aceites esenciales son una familia diversa de compuestos orgánicos de bajo peso molecular con grandes diferencias en su actividad antimicrobiana y se dividen en cuatro grupos de acuerdo a su estructura química: terpenos, terpenoides, derivados del fenilpropeno, entre otros.

▪ 6.1. Terpenos

Los terpenos son hidrocarburos que se forman por la combinación de varias unidades de isopreno (C_5H_8) (**Figura 10**). Estos se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, que está activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP (Sierra *et al.*, 2018).

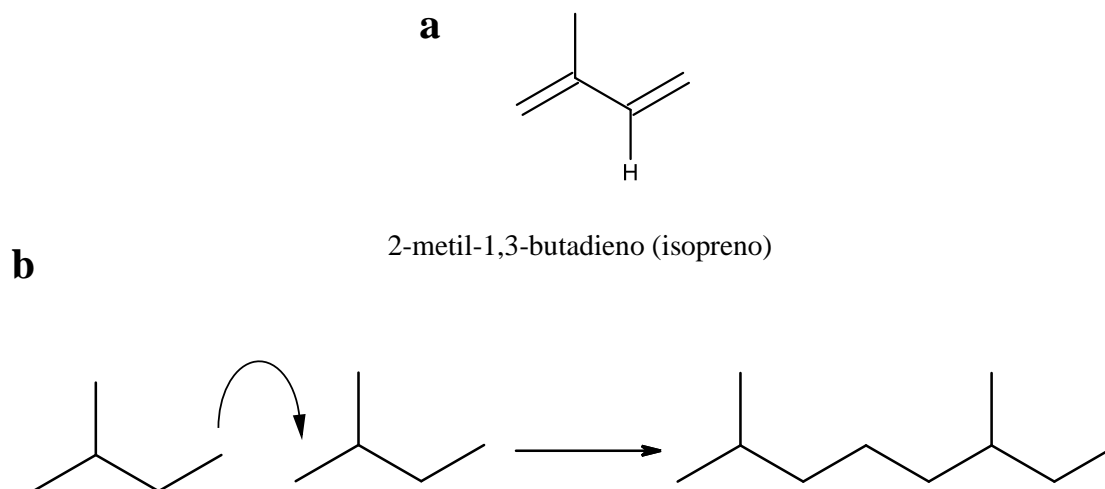


Fig. 10. (a) Molécula de isopreno y (b) Regla del isopreno (Elaboración propia: software Accelrys Draw 4.2, 2014, las estructuras se obtuvieron de la base de datos NIST 2011).

Los terpenos tienen una estructura hidrocarbonada que se puede reorganizar en estructuras cíclicas por acción de las ciclasas (monocíclicos o bicíclicos) (Caballero *et al.*, 2003). Los principales terpenos son monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) y sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), pero también existen cadenas más largas como diterpenos ($C_{20}H_{32}$) y triterpenos ($C_{30}H_{40}$)

(Tabla 3). Los terpenos incluyen *p*-cimeno, limoneno, terpineno, sabineno y pineno (Figura 11). Los terpenos representan un grupo de constituyentes con actividad antimicrobiana inherente.

Tabla 3. Clasificación de los terpenos.

Terpenos			
Clasificación	Unidades de isopreno	Átomos de carbono	Ejemplo
Monoterpenos	2	10	Limoneno, <i>p</i> -cimeno
Sesquiterpenos	3	15	Farnesol
Diterpenos	4	20	Fitol
Triterpenos	6	30	Escualeno
Tetraterpenos	8	40	β -caroteno

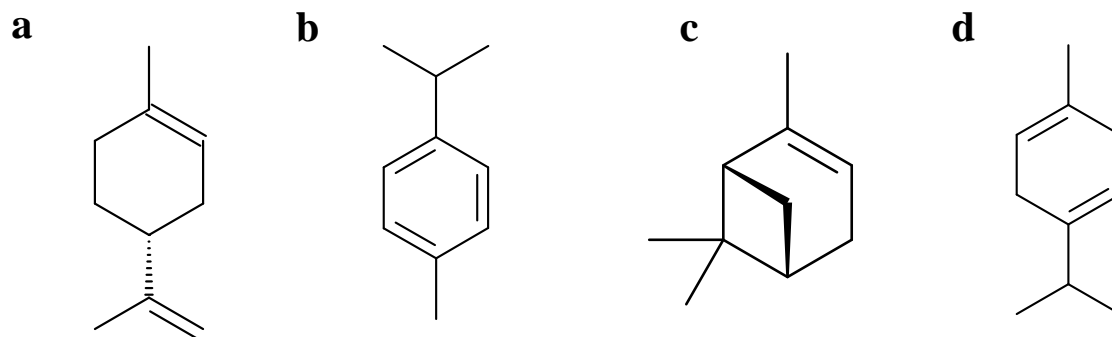


Fig. 11. Monoterpenos: a) limoneno, b) *p*-cimeno, c) α -pineno y d) γ -terpineno (Accelrys Draw 4.2, 2014; NIST 2011).

Los terpenos constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40,000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroides (de gran importancia en las estructuras de membranas).

Son insolubles en agua. Los terpenos constituyen uno de los tipos de compuestos volátiles mayoritarios en flores y en frutos (Sierra *et al.*, 2018).

▪ 6.2. Terpenoides

Los terpenoides son terpenos con modificaciones bioquímicas a través de enzimas que agregan moléculas de oxígeno y mueven o eliminan grupos metilo (Caballero *et al.*, 2003). Los terpenoides se subdividen en alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, éteres, fenoles y epóxidos. Ejemplos de terpenoides son: timol, carvacrol, linalool, acetato de linalilo, citronelal, piperitona, mentol y geraniol (**Figura 12**).

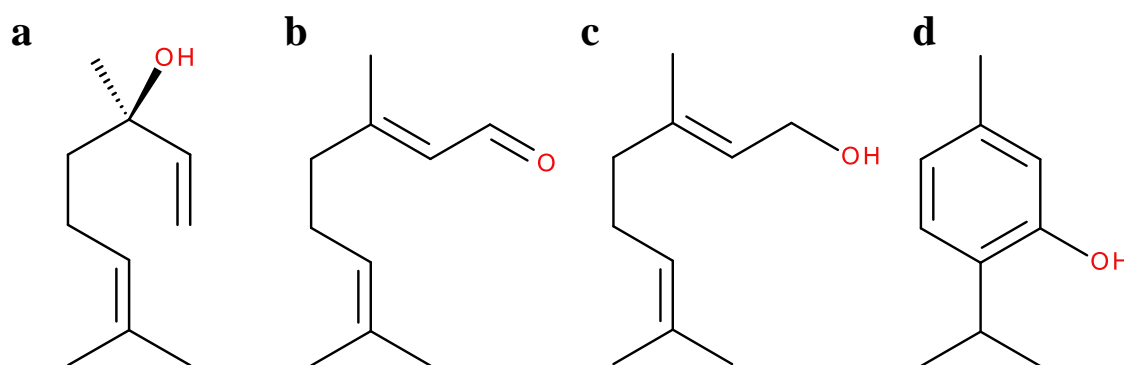


Fig. 12. Terpenoides: a) linalool, b) citral, c) geraniol y d) timol (Accelrys Draw 4.2, 2014; NIST 2011).

La actividad antimicrobiana de los terpenoides está relacionada con sus grupos funcionales, está demostrado que el grupo hidroxilo de los terpenoides fenólicos y la presencia de electrones deslocalizados son importantes para la actividad antimicrobiana (Dorman y Deans, 2000; Ultee *et al.*, 2002; Ben Arfa *et al.*, 2006).

▪ 6.3. Derivados del fenilpropeno

Los fenilpropenos constituyen una subfamilia entre los diversos grupos de compuestos orgánicos que se sintetizan a partir del aminoácido precursor fenilalanina en las plantas. Los fenilpropenos constituyen una parte relativamente pequeña de los aceites esenciales, entre los que se encuentran el eugenol, el isoeugenol, la vainillina, el safrol y el cinamaldehído (**Figura 13**). La actividad antimicrobiana de los fenilpropenos depende del tipo y número de sustituyentes en el anillo aromático (Pauli y Kubeczka, 2010).

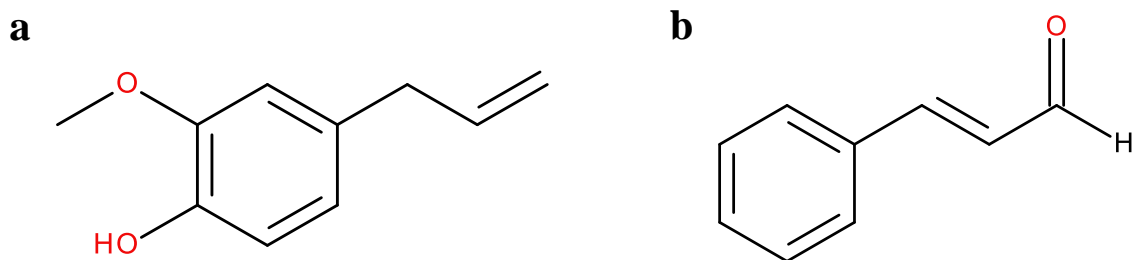


Fig. 13. Derivados del fenilpropeno: a) eugenol y b) cinamaldehído (Accelrys Draw 4.2, 2014; NIST 2011).

▪ 6.4. Otros componentes de los aceites esenciales

Los aceites esenciales contienen diversos productos de degradación que se originan a partir de ácidos grasos insaturados, lactonas, terpenos, glucósidos y compuestos que contienen azufre y nitrógeno (Caballero *et al.*, 2003) (**Figura 14**).

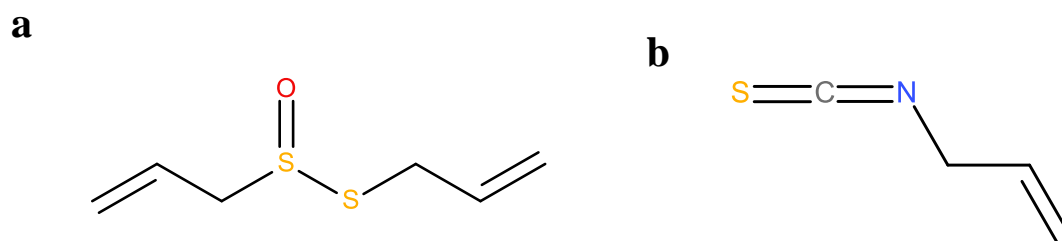


Fig. 14. Compuestos azufrados y nitrogenados: a) alicina y b) isotiocianato de alilo (Accelrys Draw 4.2, 2014; NIST 2011).

▪ 6.5. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

La diversidad de componentes de los aceites esenciales es enorme y presenta una amplia gama de compuestos. Algunos tienen una eficacia baja o nula contra los microorganismos, mientras que otros son potentes antimicrobianos. La mayoría de los compuestos antimicrobianos que se encuentran en los aceites esenciales son terpenoides y fenilpropenos, los más activos son los fenoles. Aunque algunos aldehídos y sustancias no fenólicas presentan una actividad antimicrobiana prometedora (**Tabla 4**) (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y compuestos químicos.

Aceite esencial o compuesto químico	Microorganismo	Referencia
Aceite esencial de cítricos	<i>Aspergillus niger</i> <i>A. flavus</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>P. verrucosum</i>	Viuda <i>et al.</i> , 2008
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Antrodia xantha</i> <i>Ophiostoma floccosum</i> <i>O. picea</i> <i>Leptographium procerum</i>	Singh y Chitteden, 2008
<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Shigella flexneri</i>	Shah <i>et al.</i> , 2011
Limoneno	<i>Sitophilus oryzae</i> <i>Oryzaephilus surinamensis</i> <i>Musca domestica</i> <i>Blatella germanica</i>	Tripathy <i>et al.</i> , 2001
α -pineno	<i>Tribolium castaneum</i> <i>B. germanica</i> <i>Periplaneta americana</i> <i>P. fuliginosa</i>	Lee <i>et al.</i> , 2003; Yoon <i>et al.</i> , 2009
Geranial	<i>Culex pipiens</i>	Tunaz <i>et al.</i> , 2009
4-terpineol	<i>Sitophilus zeamais</i> <i>T. castaneum</i> <i>Anisopteromalus calandrae</i> <i>Trichogramma deion</i>	Kim <i>et al.</i> , 2010
Eugenol	<i>B. germanica</i> <i>Pediculus capitis</i>	Suthisut <i>et al.</i> , 2011; Talbert <i>et al.</i> , 2012

I.7. Color

El color es una respuesta de percepción del espectro visible de la luz, la cual es reflejada o emitida por un objeto, dicha señal interactúa con la retina del ojo y se transmite al cerebro a través del nervio óptico (**Figura 15**) (Wu y Sun, 2013). El ojo percibe la señal mediante las células gliales y fotorreceptores (bastones y conos), que se ubican en la retina, las cuales transmiten en forma de impulsos eléctricos la información al cerebro traduciendo la sensación de color (Vásquez-Riascos, 2015).

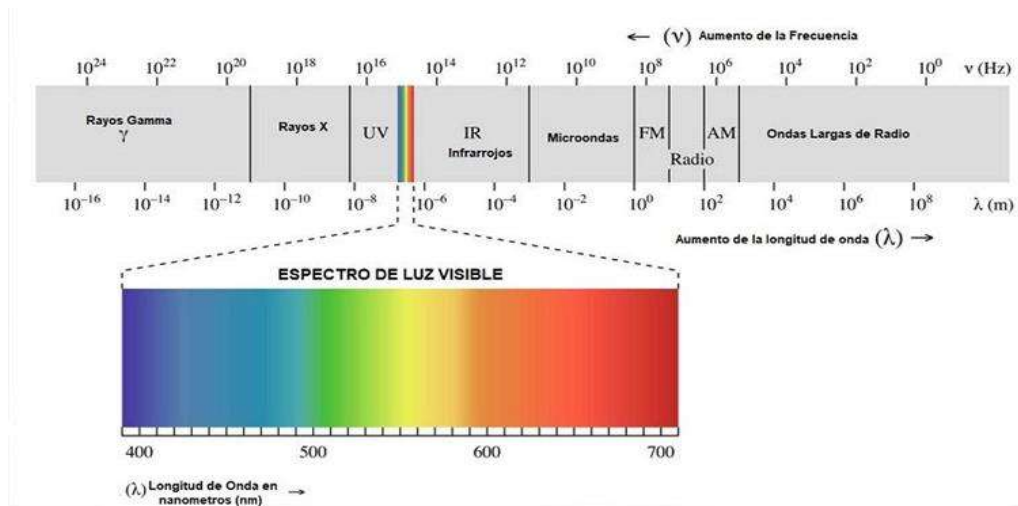


Fig. 15. Espectro electromagnético (<https://cifpn1.com/electronica/?p=4034>).

El color como sustancia, no existe, es un efecto óptico en el que intervienen procesos fisiológicos, físicos y químicos (Vásquez-Riascos, 2015). Por lo tanto, el color no es una propiedad intrínseca de la materia, ya que, si se cambia la fuente de luz, el color del objeto iluminado cambiará (Wu y Sun, 2013). La sensación de color depende de factores como: el objeto, el observador, el iluminante, la geometría, el área, superficie, brillo, temperatura, entre otros (Delmoro *et al.*, 2010; Wu y Sun, 2013).

▪ 7.1. Métodos de medición de color

Dos métodos básicos existen para la medición del color, el sensorial y el instrumental. El método sensorial utiliza un panel sensorial para evaluar visualmente el color (Delmoro *et al.*, 2010; Novoa y Ramírez Navas, 2012). El método instrumental, que consiste en el uso de técnicas que miden la reflectancia o transmitancia de las muestras, dicho método utiliza

equipos especializados como espectrofotómetros o colorímetros triestímulos (Delmoro *et al.*, 2010).

- **7.1.1. Sensorial**

La medición del color con el método sensorial utiliza un panel de evaluadores entrenados siguiendo las normas para la medición de color, además este método utiliza como referencia estándares de color como el Atlas RHS, las Guías Pantone y el Sistema Munsell (León *et al.*, 2006; Delmoro *et al.*, 2010).

- **7.1.2. Instrumental**

El método instrumental consiste en el uso de técnicas en las cuales se mide la reflectancia o transmitancia de la muestra. Instrumentos conocidos, tales como, espectrofotómetros o colorímetros triestímulos (Cuquerella *et al.*, 2004; Delmoro *et al.*, 2010).

- **7.2. Colorimetría**

La colorimetría es la ciencia que estudia la medición del color desarrollando los métodos para su cuantificación, estos métodos se basan específicamente en la geometría y distribuciones espectrales de tres elementos: la fuente de luz, la reflectividad del objeto y la sensibilidad visual del observador. Esta ciencia transforma la percepción sensorial en números, logrando medir, comparar y reproducir los diferentes colores (Vásquez-Riascos, 2015).

- **7.2.1. Modelo de color**

La definición de modelo de color es la representación digital de los colores contenidos en una muestra. Los sistemas de medición de color pueden ser percibidos por el ojo humano y consiste en un proceso en el cual se combina el conjunto de colores primarios (Noor *et al.*, 2012; Wu y Sun, 2013).

- **7.2.2. Modelo CIELAB**

El modelo de color CIELAB fue desarrollado por la CIE (Commission Internationale d'Eclairage) en el año 1976 y se considera el modelo de color más completo, se usa ampliamente para describir los colores que puede percibir el ojo humano (International

Commission on Illumination, 2004). El modelo $L^*a^*b^*$ determina el color de acuerdo a la posición en el espacio en tres dimensiones (3D) (Noor *et al.*, 2012).

Los componentes del modelo CIELAB utiliza las coordenadas L^* , a^* , b^* ; estos parámetros designan: L^* , la luminosidad (0=negro y 100=blanco); a^* , el color rojo (valores positivos) o verde (valores negativos) y b^* , el color amarillo (valores positivos) o azul (valores negativos), los valores de los dos componentes van desde -120 a 120 (**Figura 16**) (International Commission on Illumination, 2004; León *et al.*, 2006; Noor *et al.*, 2012).

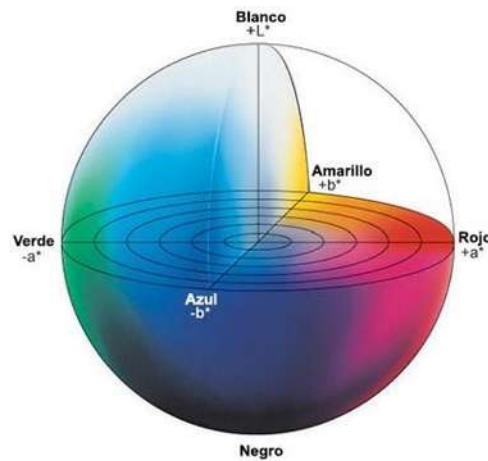


Fig. 16. Espacio de color CIELAB (<https://sensing.konicaminolta.us/mx/blog/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>).

II. Justificación

La preservación de la madera es uno de los desafíos para la industria maderera, ya que supone pérdidas económicas en la producción de madera aserrada por la afectación de hongos cromógenos de la madera de pino. Las técnicas y los compuestos que se utilizan en la preservación de madera aun eficientes, sin embargo, son costosos o tóxicos. Por ello es necesario desarrollar nuevos productos eficaces y amigables con el ambiente. Los aceites esenciales con actividad antifúngica son una alternativa para el control de los hongos que causan la mancha azul de la madera de *Pinus* sp. La diversidad química de los aceites esenciales los hace idóneos para utilizarlos como biopreservantes. Además, los productos secundarios de degradación no son potencialmente tóxicos para el ambiente, la salud o los sitios a donde se destine la madera.

III. Hipótesis

Los hongos cromógenos de la madera de *Pinus* sp. son sensibles a aceites esenciales vegetales.

IV. Objetivos

▪ **Objetivo general**

Evaluar la sensibilidad de los hongos cromógenos que causan la mancha azul en la madera de *Pinus* sp. a aceites esenciales de cítricos y especias.

▪ **Objetivos particulares**

- i. Identificar los hongos cromógenos que causan la mancha azul en la madera *Pinus* sp.
- ii. Seleccionar en ensayos *in vitro* a los aceites esenciales con efecto antifúngico sobre los hongos que causan la mancha azul en la madera.
- iii. Determinar la sensibilidad fúngica *in situ* a aceites esenciales.

V. Metodología

V.1. Recolección de los hongos de hongos cromógenos

Las muestras de madera (astillas de 5 x 2 cm aproximadamente) infectadas por hongos cromógenos se obtuvieron de vigas en proceso de secado de *Pinus* sp. del aserradero de la Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera (FITECMA-UMSNH). Las muestras se almacenaron en viales y humedecieron con agua desionizada hasta su procesamiento.

V.2. Aislamiento de los hongos cromógenos

Los medios de cultivo agar papa dextrosa (Bioxon[®]) y agar dextrosa Sabouraud (Bioxon[®]) se prepararon en un volumen de 500 mL de agua tridestilada, respectivamente, se esterilizaron en autoclave ECOSHEL model CVQ-B50L. Una vez que los medios gelificaron se procedió a frotar las astillas de madera sobre los mismos, el procedimiento se realizó por duplicado. La inoculación se efectuó en placas de Petri de 90 x 15 mm e incubaron a 26 °C en incubadora NOVATECH model A-550 durante ocho días y se observó el crecimiento microbiano. Las placas de Petri con agar papa dextrosa (APD) no presentaron crecimiento fúngico y sólo hubo crecimiento en placas de Petri con medio agar dextrosa Sabouraud (ADS). Diez placas de Petri con ADS se prepararon e inocularon con propágulos de 25 mm² de las placas de Petri que presentaron crecimiento fúngico e incubaron a 26 °C por ocho días. Las placas de Petri que se inocularon se observó crecimiento microbiano. Los cultivos fúngicos se encontraron asociados con otros microorganismos, por lo cual, se tomó una muestra para identificar el tipo de microorganismo. Una tinción de Gram se realizó y se observó al microscopio óptico Nikon ECLIPSE E100 LED MV R a 100x.

El medio ADS se acidificó con ácido láctico hasta un pH de 4.5, en un volumen de 300 mL, el pH se ajustó con potenciómetro pH meter model 420 (Thermo Orión[®]). La acidificación se llevó a cabo para inhibir el crecimiento bacteriano. Diez placas de Petri se sembraron con el crecimiento micelial e incubaron a 26 °C por ocho días. El crecimiento micelial se observó y presentó colonias bacterianas, en menor número. Por lo cual, se procedió a preparar 600 mL de medio ADS, al cual se le incorporó antibiótico, cefotaxima y kanamicina a una concentración de 250 mg/mL y 100 mg/mL, respectivamente. Diez placas de Petri de 60 x 15 mm, con cefotaxima y diez placas de Petri con kanamicina, se incubaron a 26 °C por ocho días y se observó el crecimiento micelial en ambas condiciones.

Los especímenes provenientes de ambas condiciones se propagaron y conservaron. Para lo cual, propágulos de 25 mm² se trituraron con perlas de vidrio en vórtex suspendidas en agua desionizada estéril. El homogeneizado se vertió en medio ADS y se incubó a 26 °C por ocho días. De las distintas morfologías en crecimiento se tomaron propágulos de 25 mm², se incubaron a 26 °C por ocho días. Cultivos monospóricos se obtuvieron. Los aislados fúngicos se describieron macroscópicamente.

V.3. Identificación molecular de los aislados fúngicos

La extracción de ADN, se sujetó al protocolo establecido por Reader y Broda con algunas modificaciones. La obtención de micelio, se realizó con una espátula por lo cual se hizo un barrido sobre la placa de Petri que contenía el aislado fúngico, obtenido el micelio (aproximadamente 100 mg) se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se incorporaron quince perlas de vidrio, 200 µL de buffer de lisis y 200 µL de solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se homogenizó en vórtex durante 10 min y se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 30 s. Terminada la centrifugación se formaron dos fases, la inferior de un color rosado y con partículas y la superior totalmente incolora y transparente (sobrenadante), se transfirieron 300 µL del sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, procurando no arrastrar ninguna partícula y se incorporaron 300 µL de solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y agitó en vórtex durante 10 s, se centrifugó a 14,000 r.p.m. por 30 s. Dos fases se diferenciaron, ambas incoloras y transparentes, de la primera fase se transfirió (200 µL) a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se incorporó 2.5 volúmenes de isopropanol (500 µL). Se agitaron por inversión del tubo y se incubaron a -20 °C.

La integridad del ADN genómico se comprobó mediante una electroforesis, las muestras de ADN, en forma de pastilla, se centrifugaron a 14,000 r.p.m. durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. El rendimiento se lavó con 500 µL de etanol al 70% y se centrifugaron a 14,000 r.p.m. durante 3 minutos, se decantó el alcohol y fueron secadas bajo campana de flujo laminar. Las pastillas se re-suspendieron en 30 µL de agua desionizada estéril. Para la electroforesis se prepararon 200 mL de agarosa al 1% (Sigma-Aldrich). La solución de agarosa se transfirió a una cámara para electroforesis y se dejó gelificar. La agarosa gelificada se cubrió con buffer TAE 1x. Con una micropipeta se depositaron 10 µL de una mezcla de ADN y colorante para electroforesis en los pocillos del gel de agarosa, para

lo cual se mezclaron 5 µL de la muestra de ADN con 5 µL de colorante. Las muestras se dejaron correr en el gel hasta alcanzar la mitad de la longitud total del soporte. Las muestras fueron observadas bajo luz ultravioleta y se cuantificaron en equipo NANODROP 2000 c (Thermo Scientific®).

Para la identificación de los aislados fúngicos, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) del gen ribosomal 18S, usando los oligonucleótidos NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') y NS6 (5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3'). Las muestras para PCR se prepararon en un volumen de 50 µL, para lo cual en un tubo Eppendorf para PCR se colocó 18 µL de agua libre de nucleasas, 25 µL de PCR Mix 2x (Promega®), 3 µL de NS1, 3 µL de NS6 y 1 µL de muestra de ADN genómico. La muestra se sometió a un programa de amplificación de 35 ciclos de amplificación a las siguientes rampas de temperatura: 94 °C por 1 min., 55 °C por 1 min. y 72 °C por 1 min., además de un ciclo final de extensión de 72 °C por 3 min. Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1% mediante electroforesis, con el fin de corroborar la amplificación y el tamaño del ADN, la banda esperada fue de alrededor de ~1400 pb. Una vez corroborada la amplificación, el producto de PCR se purificó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los genes ribosomales 18S amplificados y purificados, fueron enviados para su secuenciación (método Sanger) al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio, www.langebio.cinvestav.mx). Las secuencias se ensamblaron mediante el software CodonCodeAligner (CodonCode corp., www.codoncode.com/aligner). Una vez ensambladas, las secuencias fueron comparadas con secuencias depositadas en la base de datos del GenBank, usando la herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), con el fin de encontrar las secuencias homólogas más cercanas. Una vez que se ubicaron las secuencias más cercanas, los grupos taxonómicos fueron ampliados descargando secuencias pertenecientes a cada grupo de hongos. Todas las secuencias fueron cargadas al software MEGA-X, donde fueron alineadas usando ClustalW. Posteriormente se procedió a la generación de un árbol filogenético, con el método de Neighbor-joining y una prueba de soporte de la topología de 1,000 seudorréplicas (Bootstrap), esto con el fin de asignar las secuencias a grupos taxonómicos específicos.

V.4. Determinación del efecto antifúngico de los aceites esenciales

El efecto inhibitorio de los aceites esenciales (AE) y la concentración mínima inhibitoria (CMI) se evaluó, así como preservantes convencionales para madera como controles positivos: arseniato de cobre cromado (CCA) al 2%, Preventol (*o*-fenilfenol) al 2%, solución de ácido bórico (H_3BO_3) al 5% y deltametrina-ácido bórico al 3%. El control negativo fue dimetil sulfóxido (DMSO).

Las concentraciones evaluadas del aceite esencial de terpenos fueron de 1 g/mL, 100 mg/mL, 10 mg/mL, 1 mg/mL y 0.1 mg/mL; para lo cual se pesó 1.0106 g de aceite esencial de terpenos y se disolvió en 1 mL de DMSO, a partir de las soluciones stock se hicieron las diluciones sucesivas correspondientes. Cuatro aislados fúngicos fueron ensayados por el método de difusión en agar, se utilizó ADS adicionado con antibiótico (192 μ L de kanamicina y 77 μ L de cefotaxima, dosis calculadas para 300 mL de medio de cultivo), los discos de papel filtro estériles ($\Theta = 5$ mm) se colocaron en el centro de las placas de Petri de 60 x 15 mm y se impregnaron con 6 μ L de las sustancias a evaluar (aceite esencial y preservantes para madera), sobre cada disco se inoculó un propágulo de 25 mm² de los aislados fúngicos. Una R = 1 y n = 3 se utilizó por cada sustancia a evaluar. Las placas se sellaron y se almacenaron a temperatura ambiente.

El efecto inhibitorio se determinó a las 72 h, para lo cual se tomaron fotografías de cada muestra y se procesaron con el software Photoshop versión 21.0.3. El efecto inhibitorio se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$IC = Ct / Cc$$

Donde:

IC = índice de crecimiento

Ct = área del crecimiento del tratamiento (cm²)

Cc = área del crecimiento del control (cm²)

Un índice de crecimiento (IC) igual a 1, significa que no hay efecto del tratamiento sobre el microorganismo, IC > 1, nos indica que el tratamiento promueve el crecimiento del microorganismo y un IC < 1, significa que el tratamiento inhibe al microorganismo.

V.5. Escrutinio de los aceites esenciales

El escrutinio de los AE se efectuó por el método de difusión en agar, para lo cual se evaluaron los AE a una concentración de 1 g/mL, 1 g de aceite esencial se pesó en balanza analítica Denver Instrument XE-100 con una precisión de $e = 0.0001$ g posteriormente se disolvieron en 1 mL de DMSO. Los preservantes para madera empleados fueron: arseniato de cobre cromado (CCA) al 2%, *o*-fenilfenol (OPP) al 2% y ácido bórico (H_3BO_3) al 5%, como controles positivos.

El escrutinio se realizó en placas de Petri de 60 x 15 mm que contenían ADS adicionado con antibiótico (kanamicina y cefotaxima). Los discos de papel filtro estériles ($\Theta = 5$ mm) se colocaron en el centro de las placas de Petri y se impregnaron con 6 μ L de las sustancias a evaluar (aceites esenciales y preservantes para madera), sobre cada disco se inoculó un propágulo de 25 mm² de cada aislado fúngico. Una $R = 1$ y $n = 3$ se utilizó para cada sustancia a evaluar. Las placas se sellaron y almacenaron a temperatura ambiente.

El efecto inhibitorio se determinó a las 72 h, para lo cual se tomaron fotografías de cada muestra y se procesaron con el software Photoshop versión 21.0.3. El efecto inhibitorio se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$IC = Ct / Cc$$

Donde:

IC = índice de crecimiento

Ct = área del crecimiento del tratamiento (cm²)

Cc = área del crecimiento del control (cm²)

V.6. Establecimiento del modelo para la inducción de la mancha azul de la madera

El establecimiento del modelo para la inducción de la mancha azul se realizó de acuerdo a la norma ASTM D4445-10 Standard Test for Fungicides for Controlling Sapstain and Mold on Unseasoned Lumber (Laboratory Method).

En placas de Petri de 90 x 15 mm se colocaron cinco discos de papel filtro estériles ($\Theta = 90$ mm). Los cuales, con agua desionizada estéril se humedecieron hasta saturación. Posteriormente, sobre el papel filtro se colocaron dos probetas de madera de *Pinus* sp. de 7 x 3 mm en corte transversal y 70 mm en corte longitudinal, las cuales se humedecieron con

agua desionizada. Sobre cada probeta se inocularon dos propágulos de 25 mm², se evaluaron cuatro aislados fúngicos. Por cuatro semanas se incubaron a 26 °C y se realizaron revisiones periódicas durante la incubación para mantener las condiciones de humedad. Transcurrido el tiempo de incubación las probetas de madera se limpiaron con escalpelo y se dejaron secar en placas de Petri. La presencia de mancha azul se determinó visualmente.

La presencia de los hongos que causan la mancha azul en la madera se corroboró mediante cortes provisionales sobre las áreas manchadas en las probetas secas. Los cortes se realizaron en la cara radial de la probeta. Las probetas de madera fueron sumergidas en agua caliente por 30 s, los cortes se hicieron con navaja para escalpelo del no. 22 obteniendo láminas finas que se suspendieron en una placa de Petri de vidrio de 90 x 15 mm la cual contenía alcohol al 70%. Las láminas se colocaron sobre un portaobjetos y se tiñeron con safranina, se escurrió el excedente, se agregaron tres gotas de alcohol glicerinado y se cubrieron con cubreobjetos. Las láminas se observaron con microscopio óptico Nikon ECLIPSE E100 LED MV R a 40x y 100x.

V.7. Determinación *in situ* del efecto antifúngico de los aceites esenciales

▪ 7.1. Método de inmersión

La determinación *in situ* del efecto inhibitorio de los AE por el método de inmersión se realizó en probetas de madera de *Pinus* sp. de 5 x 3 mm en sección transversal y 35 mm en sección longitudinal. Las probetas se sumergieron durante 2 h en los AE, DMSO, CCA al 2% y OPP al 2%. Los AE se evaluaron a una concentración de 1 g/mL, utilizando DMSO como disolvente.

Las probetas se escurrieron sobre placas de Petri de vidrio, en placas de Petri de 90 x 15 mm se colocaron dos discos de papel filtro ($\Theta = 90$ mm) y se humedecieron hasta saturación con agua desionizada estéril, sobre el papel se colocaron las probetas de madera en sentido dextrógiro previamente numeradas, tres probetas por placa de Petri. Las probetas se inocularon con propágulos de 25 mm² de los aislados fúngicos e incubaron a temperatura ambiente durante cuatro semanas con revisiones periódicas para mantener las condiciones de humedad. Las probetas se limpiaron con escalpelo y se dejaron secar a temperatura ambiente. una R = 2 y una n = 6 se utilizó.

7.2. Método de aspersión

La determinación *in situ* del efecto inhibitorio de los AE por el método de aspersión se realizó en probetas de madera de *Pinus* sp. de 5 x 3 mm en sección transversal y 35 mm en sección longitudinal. Las probetas se asperjaron con los AE, DMSO, CCA al 2% y OPP al 2%. Los AE se evaluaron a una concentración de 1 g/mL, disueltos en DMSO.

Las probetas se asperjaron hasta humedecerlas totalmente con los AE, DMSO, CCA al 2% y OPP al 2%, posteriormente se colocaron en placas de Petri de 90 x 15 mm las cuales contenían dos discos de papel filtro ($\theta = 90$ mm) y se humedecieron hasta saturación con agua desionizada estéril. Las probetas se colocaron en las placas de Petri en sentido dextrógiro previamente numeradas (tres probetas por placa de Petri). Las probetas se inocularon con propágulos de 25 mm² e incubaron a temperatura ambiente por cuatro semanas con revisiones periódicas para mantener las condiciones de humedad. Después, las probetas se limpiaron con escalpelo y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una R = 2 y una n = 6 se utilizaron.

V.8. Determinación de la absorción y retención de la madera de *Pinus* sp.

La retención de los aceites esenciales se determinó mediante la ecuación (Ávila-Calderón *et al.*, 2012):

$$R = \frac{A * C}{100}$$

Donde:

R = Retención (kg / m³)

A = Absorción neta (kg / m³)

C = Concentración de la sustancia preservante (%)

La absorción de los aceites esenciales se determinó mediante la ecuación (Simsek *et al.*, 2010):

$$A = \frac{P_2 - P_1}{V}$$

Donde:

A = Absorción (kg / m³)

P₁ = Peso inicial de la probeta antes del tratamiento (kg)

P₂ = Peso final de la probeta después del tratamiento (kg)

V = Volumen de la probeta después del tratamiento (m³)

Los pesos y las dimensiones de cada probeta se determinaron antes de cada tratamiento. Posteriormente, las probetas se sumergieron en los preservantes para madera y los aceites esenciales durante 24 h. Las probetas se secaron a temperatura ambiente durante 24 h y se determinó su peso y dimensiones; el método de asperjado se realizó en las mismas condiciones descritas. La absorción y la retención fueron calculadas.

V.9. Análisis colorimétrico

La determinación del color de las probetas se realizó de acuerdo a la norma ASTM D 2244-05 Calculation of Color Tolerances and Color Differences from Instrumentally Measured Color Coordinates, para lo cual se utilizó un colorímetro COLOR METER TES-135A, se realizaron tres mediciones por probeta, en las secciones distales y media, con la finalidad de homogeneizar el color.

El color de las probetas secas se determinó después de los tratamientos con los preservantes y los aceites esenciales con colorímetro COLOR METER TES-135A, se realizaron tres mediciones por probeta, en las secciones distales y media, para homogeneizar el color. Las coordenadas colorimétricas empleadas fueron CIE L*a*b* y la diferencia de color (ΔE) se determinó mediante la ecuación (ASTM D 2244-05):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Donde:

ΔE^* = Diferencia de color

ΔL^* = Diferencia en luz-oscuridad

Δa^* = Diferencia rojo-verde

Δb^* = Diferencia amarillo-azul

V.10. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Los espectros de masas de los compuestos presentes en los aceites esenciales fueron obtenidos en un espectro de masas Thermo Scientific model ISQ LT (Single Quadrupole Mass Spectrometer), ionización por impacto electrónico a 200 °C y energía de ionización de 150 eV.

Los cromatogramas de gases se obtuvieron en un cromatógrafo de gases Thermo Scientific model TRACE 1310. La temperatura inicial del horno cromatográfico fue de 50 °C durante 5 min, la temperatura incrementó 20 °C/min hasta alcanzar 200 °C y permaneció 5 min, posteriormente se incrementó hasta 250 °C con un tiempo de permanencia de 10 min. La temperatura de la interfase fue de 260 °C. Helio se utilizó como fase móvil (gas de arrastre) y una columna con 15 m de longitud, con diámetro interno de 0.25 mm y capa de fase estacionaria de 0.25 μm .

Los espectrogramas se analizaron con el software Xcalibur (Thermo Scientific®), la base de datos que se utilizó para la comparación de señales fue NIST 2011 MS v. 2.0 (National Institute of Standards and Technology).

V.11. Análisis estadístico

Un análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) se realizó y una prueba de comparación de medias Tukey utilizando en software STATISTICA 10, utilizando una $\alpha = 0.5$, para determinar la diferencia significativa entre tratamientos. También, un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) se realizó con el software R versión 4.0.2., para seleccionar los aceites esenciales con efecto antifúngico.

VI. Resultados

VI.1. Aislamiento, descripción e identificación molecular de los hongos de la mancha azul de la madera

Cuatro aislados monospóricos se obtuvieron (**Fig. 17**), los cuales fueron descritos macroscópicamente (**Tabla 5**).

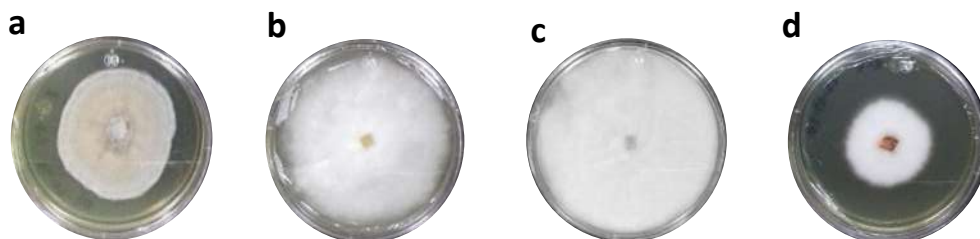


Fig. 17. Aislados monospóricos de la mancha azul de la madera de *Pinus* sp.: a) *Alternaria* sp. (E-1G), b) *Hypocrea* sp. (E-2), c) *Trichoderma* sp. (E-3) y d) *Geosmithia* sp. (E-5).

Tabla 5. Características macroscópicas de los hongos de la mancha azul de la madera de *Pinus* sp.

	E-1G	E-2	E-3	E-5
Forma	Irregular	Circular	Circular	Irregular
Superficie	Aterciopelada	Algodonosa	Algodonosa	Aterciopelada
Consistencia	Dura	Filamentosa	Filamentosa	Dura
Color	Café	Blanca	Blanca	Blanca/Amarillo
Pigmento	Ocre	No presenta	No presenta	No presenta

VI.2. Determinación del efecto antifúngico de los aceites esenciales

Con el objetivo de evaluar el efecto inhibitorio de los AE, se procedió a la obtención de un control experimental con los preservantes convencionales para madera: arseniato cromado de cobre (CCA 2%), *o*-fenilfenol (OPP 2%), ácido bórico (H_3BO_3 5%) y una mezcla de deltametrina-ácido bórico (3%). (**Tabla 6**). Los preservantes para madera eficaces fueron CCA y OPP con intervalo de valores de IC de 0.03 a 0.11. *Alternaria* sp. fue el aislado fúngico menos sensible al CCA con $IC = 0.58 \pm 001$, seguido de *Geosmithia* sp. con $IC =$

0.29 ± 0.14; el CCA presentó efecto fungicida sobre *Hypocrea* sp. y *Trichoderma* sp. ya que no se observó crecimiento micelial y los IC se ubicaron entre 0.03 ± 0.00 y 0.04 ± 0.00 respectivamente. *Geosmithia* sp. y *Alternaria* sp. fueron los aislados fúngicos sensibles al OPP con un IC de 0.26 ± 0.01 para *Geosmithia* sp. y 0.11 ± 0.02 para *Alternaria* sp. El OPP también presentó efecto fungicida sobre *Hypocrea* sp. y *Trichoderma* sp. con un IC = 0.03 ± 0.00 para ambos aislados. La menor sensibilidad de *Alternaria* sp. y *Geosmithia* sp. al CCA y al OPP nos indica la existencia moderada de sensibilidad a los preservantes convencionales para madera. Lo anterior se verifica al observar los IC ≥ 1 del ácido bórico y la combinación de deltametrina-ácido bórico no presentan actividad antifúngica sobre los cuatro aislados fúngicos. En la **Figura 18** se observan los halos de inhibición corroborando así la sensibilidad observada.

Tabla 6. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul expuestos a tres preservantes convencionales para madera y a una combinación de deltametrina-ácido bórico.

Preservantes para madera	Índice de crecimiento (IC)			
	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Hypocrea</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Geosmithia</i> sp.
CCA	0.58 ± 0.01b	0.03 ± 0.00a	0.04 ± 0.00a	0.29 ± 0.14a
OPP	0.11 ± 0.02a	0.03 ± 0.00a	0.03 ± 0.00a	0.26 ± 0.01a
H ₃ BO ₃	1.00 ± 0.04c	0.97 ± 0.06b	0.94 ± 0.06b	2.22 ± 0.38b
Deltametrina-H ₃ BO ₃	1.05 ± 0.01c	1.04 ± 0.04b	1.05 ± 0.03b	0.97 ± 0.05a

Los datos obtenidos son el promedio ± EE, n = 6
 Letras iguales en la misma columna no presentan diferencia significativa. Tukey (α = 0.5)

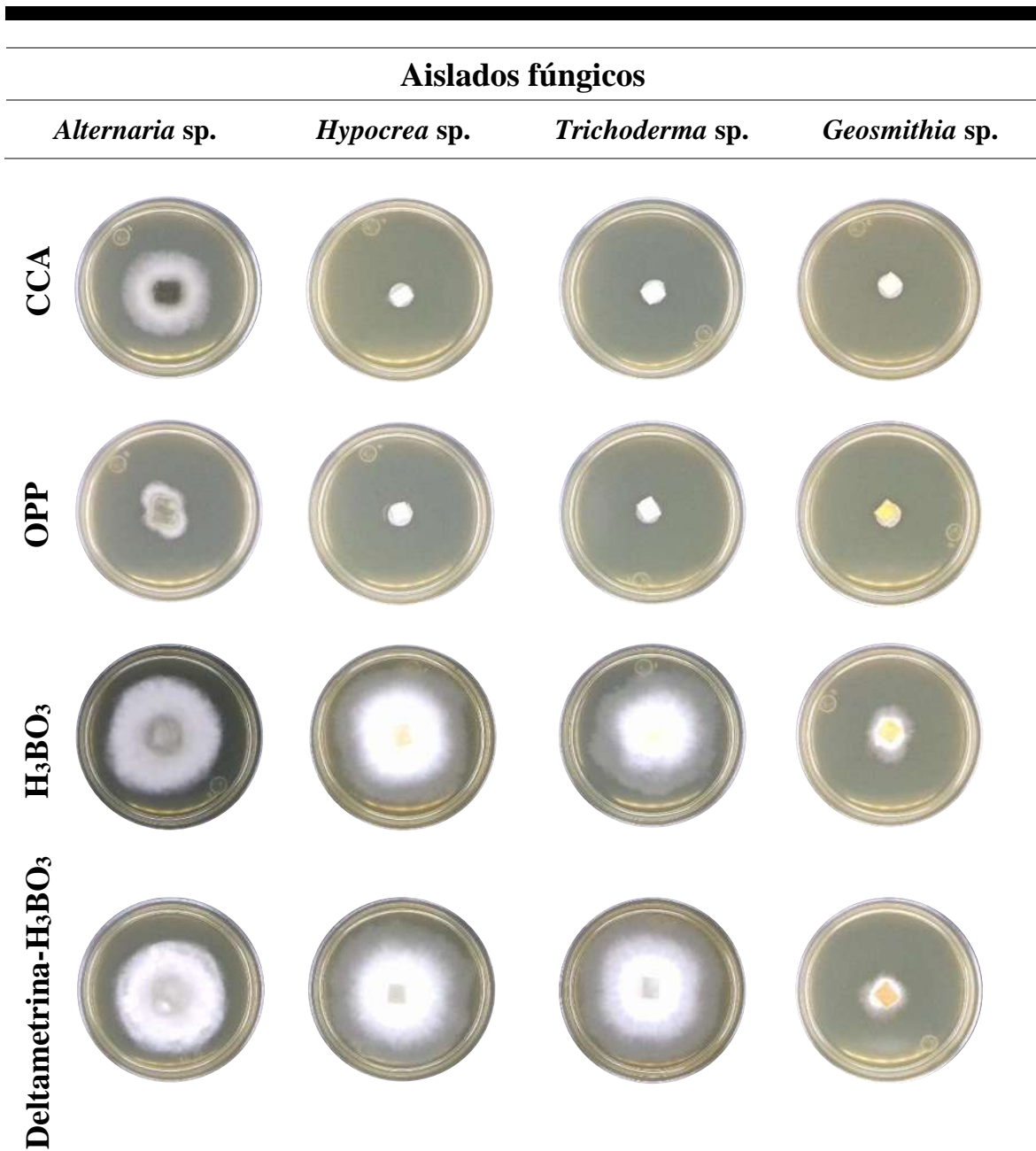


Fig. 18. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul de la madera a preservantes convencionales. CCA = arseniato de cobre cromado; OPP = *o*-fenilfenol y H₃BO₃ = ácido bórico.

La actividad inhibitoria del AE se determinó a las 72 h utilizando aceite esencial de terpenos (AET) a las concentraciones indicadas. A las diferentes concentraciones el AET presentó $IC < 1$ (**Tabla 7**) sobre tres de los cuatro aislados fúngicos. Siendo *Trichoderma* sp. el más sensible con IC de 0.81 ± 0.01 y *Geosmithia* sp. el más resistente al AET con $IC > 1$. En

la **figura 19** se observan los halos de inhibición de los cuatro aislados fúngicos a una concentración de 1g/mL.

Tabla 7. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul expuestos al aceite esencial de terpenos a 1 g/mL (72 h).

Índice de crecimiento			
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Hypocrea</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Geosmithia</i> sp.
0.91 ± 0.07	0.66 ± 0.27	0.84 ± 0.11	1.13 ± 0.12

Los datos obtenidos son el promedio ± EE, n = 3



Fig. 19. Imágenes representativas de la sensibilidad de los hongos de la mancha azul al aceite esencial de terpenos.

VI.3. Escrutinio de aceites esenciales

En el escrutinio de los aceites esenciales se evaluaron 26 AE a una concentración de 1 g/mL frente a los cuatro aislados fúngicos (**Tabla 8**). Los aislados fúngicos fueron sensibles a aceites esenciales. Varios aceites esenciales presentaron IC similares a los controles.

Tabla 8. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul a los aceites esenciales.

No.	Aislados fúngicos			
	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Hypocrea</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Geosmithia</i> sp.
1	0.59 ± 0.08cd	1.08 ± 0.11cd	0.65 ± 0.05b	0.75 ± 0.11bcd
2	0.70 ± 0.04cdef	1.11 ± 0.17cd	0.95 ± 0.06bcd	0.86 ± 0.17def
3	0.73 ± 0.03cdefg	1.27 ± 0.07cd	0.97 ± 0.03bcd	0.60 ± 0.00bcd
4	0.64 ± 0.04cde	1.19 ± 0.08cd	0.95 ± 0.01bcd	0.46 ± 0.06ab
5	0.71 ± 0.02cdef	1.26 ± 0.06cd	0.86 ± 0.02bcd	0.81 ± 0.05def
6	0.80 ± 0.02efghi	1.32 ± 0.06cd	0.88 ± 0.10bcd	0.82 ± 0.05def
7	0.56 ± 0.03c	0.43 ± 0.24ab	0.27 ± 0.21a	0.23 ± 0.01a
8	0.05 ± 0.00a	0.05 ± 0.00a	0.04 ± 0.00a	0.20 ± 0.00a
9	0.09 ± 0.02a	0.06 ± 0.00a	0.04 ± 0.00a	0.22 ± 0.02a
10	0.96 ± 0.09i	1.38 ± 0.04d	1.10 ± 0.00d	1.09 ± 0.05efg
11	0.87 ± 0.04fghi	1.38 ± 0.12d	1.08 ± 0.01d	0.81 ± 0.09cdef
12	0.63 ± 0.05cde	0.88 ± 0.05bc	0.92 ± 0.06bcd	0.99 ± 0.03efg
13	0.93 ± 0.02ghi	1.27 ± 0.01cd	0.96 ± 0.00bcd	1.19 ± 0.02g
14	0.96 ± 0.07i	1.26 ± 0.09cd	1.02 ± 0.02d	0.90 ± 0.02defg
15	0.95 ± 0.02i	1.19 ± 0.08cd	1.03 ± 0.07d	0.78 ± 0.04bcd
16	0.74 ± 0.04cdefgh	1.07 ± 0.10cd	0.92 ± 0.04bcd	1.11 ± 0.05fg
17	0.76 ± 0.02cdefghi	0.98 ± 0.06cd	0.93 ± 0.02bcd	0.97 ± 0.04defg
18	0.77 ± 0.02defghi	1.27 ± 0.03cd	0.95 ± 0.05bcd	1.11 ± 0.05fg
19	0.34 ± 0.03b	0.05 ± 0.00a	0.04 ± 0.00a	0.22 ± 0.00a
20	0.05 ± 0.00a	0.05 ± 0.00a	0.04 ± 0.00a	0.18 ± 0.00a
21	0.96 ± 0.01i	1.01 ± 0.00cd	0.98 ± 0.01bcd	1.05 ± 0.00efg
22	0.91 ± 0.01fghi	0.97 ± 0.05cd	0.95 ± 0.03bcd	1.02 ± 0.05efg
23	0.95 ± 0.03i	0.98 ± 0.03cd	1.06 ± 0.04d	0.98 ± 0.07efg
24	0.95 ± 0.05hi	0.99 ± 0.02cd	1.00 ± 0.02cd	0.98 ± 0.08efg
25	0.35 ± 0.00b	0.94 ± 0.08cd	0.80 ± 0.09bcd	0.47 ± 0.04abc
26	0.17 ± 0.02ab	0.91 ± 0.06cd	0.67 ± 0.03bc	0.23 ± 0.04a

Los datos obtenidos son el promedio ± EE, n = 3

Letras iguales en la misma columna no presentan diferencia significativa. Tukey ($\alpha = 0.5$)

VI.4. Selección de los aceites esenciales con efecto antifúngico

La actividad antifúngica de los aceites esenciales evaluados fue diversa frente a los hongos de la mancha azul de la madera, por lo cual se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para discriminar entre los AE, se obtuvieron dos grupos diferenciados. Por lo cual se seleccionaron los AE que presentaron un $IC < 0.7$ (polígono azul), ocho AE en total; no obstante, los AE 8, 9, 19 y 20 conforman el mayor aporte a la componente dos (PC2) con un 7.86% y mostraron un $IC \ll 0.7$ (Figura 20).

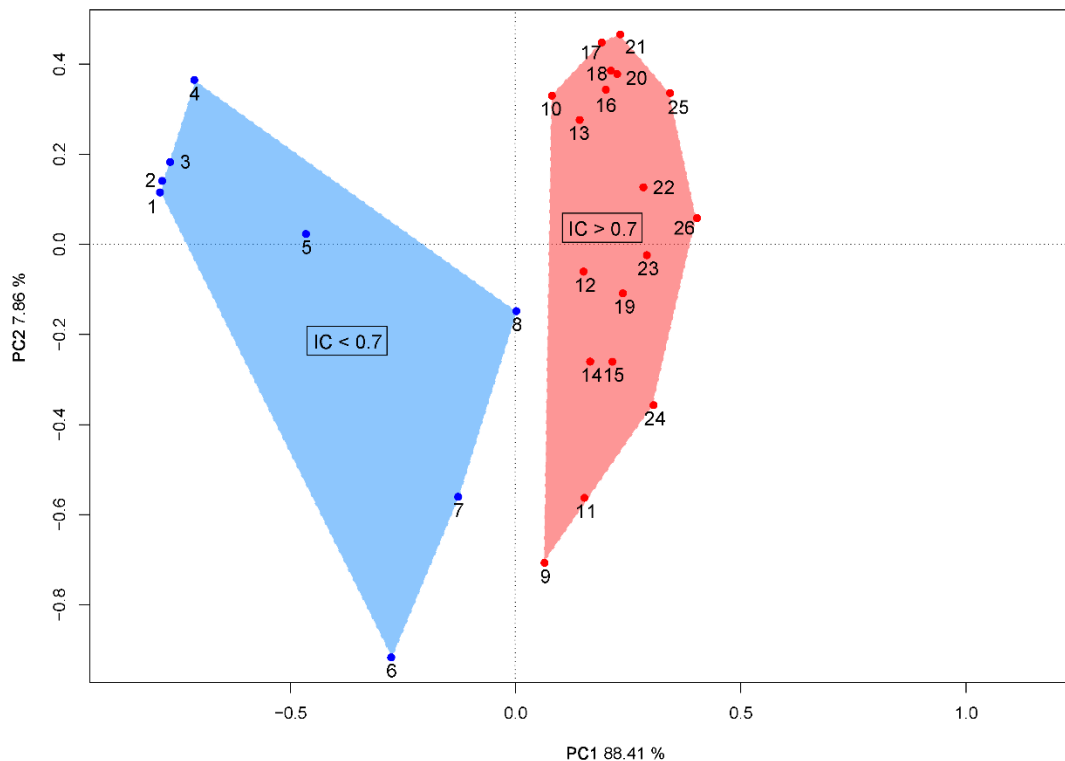


Fig. 20. Análisis de componentes principales de los aceites esenciales. En la figura se observa una separación definida en dos grupos de los aceites esenciales. El polígono azul representa los aceites esenciales con $IC < 0.7$ y el polígono rojo a los aceites esenciales con $IC > 0.7$.

En el análisis por PCA se identificaron ocho AE (polígono azul) con un comportamiento similar. Sin embargo, criterios rigurosos se aplicaron para seleccionar los AE, los criterios fueron:

- i. $IC \ll 0.7$
- ii. Inhibición de al menos tres de los cuatro aislados fúngicos.

El aceite esencial 7 fue seleccionado por inhibir a los cuatro aislados fúngicos, criterio que no cumplieron los AE 1, 25 y 26. El AE 20 presentó los menores IC, incluso resultó más eficaz que los controles, *Trichoderma* sp. fue el aislado más sensible con un IC = 0.04 ± 0.00 y *Geosmithia* sp. el aislado más resistente con un IC = 0.18 ± 0.00 , *Alternaria* sp. e *Hypocrea* sp. mostraron IC = 0.05 ± 0.00 respectivamente. El AE 8 presentó un comportamiento análogo al AE 20, salvo que *Geosmithia* sp. presentó un IC = 0.20 ± 0.00 , siendo el aislado fúngico más resistente a este aceite esencial. El AE 9 mostró IC ligeramente mayores para *Alternaria* sp. e *Hypocrea* sp. que los AE 20 y 8, *Trichoderma* sp. fue el aislado fúngico sensible con un IC = 0.04 ± 0.00 . Sin embargo, *Geosmithia* sp. resultó un aislado fúngico sensible con un IC = 0.22 ± 0.02 . Para el AE 19 *Alternaria* sp. también fue sensible con un IC = 0.34 ± 0.03 , *Geosmithia* sp. presentó sensibilidad con un IC = 0.22 ± 0.00 ; *Trichoderma* sp. fue el aislado fúngico más sensible con un IC = 0.04 ± 0.00 . El AE 7 exhibió un comportamiento muy diferente a los otros AE, en este caso *Alternaria* sp. fue el aislado fúngico más sensible con un IC = 0.56 ± 0.03 , seguido de *Hypocrea* sp. con un IC = 0.43 ± 0.24 ; *Geosmithia* sp. fue el aislado más sensible para este AE con un IC = 0.23 ± 0.01 y *Trichoderma* sp. con un IC = 0.27 ± 0.21 . (Tabla 9). El AE 7 presentó los mayores IC comparados con los otros AE evaluados *in vitro*; sin embargo, *Geosmithia* sp. mostró IC menores que los controles (Figura 21).

Tabla 9. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul a los aceites esenciales.

AE	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Hypocrea</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Geosmithia</i> sp.
7	0.56 ± 0.03	0.43 ± 0.24	0.27 ± 0.21	0.23 ± 0.01
8	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.20 ± 0.00
9	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.22 ± 0.02
19	0.34 ± 0.03	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.22 ± 0.00
20	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.18 ± 0.00

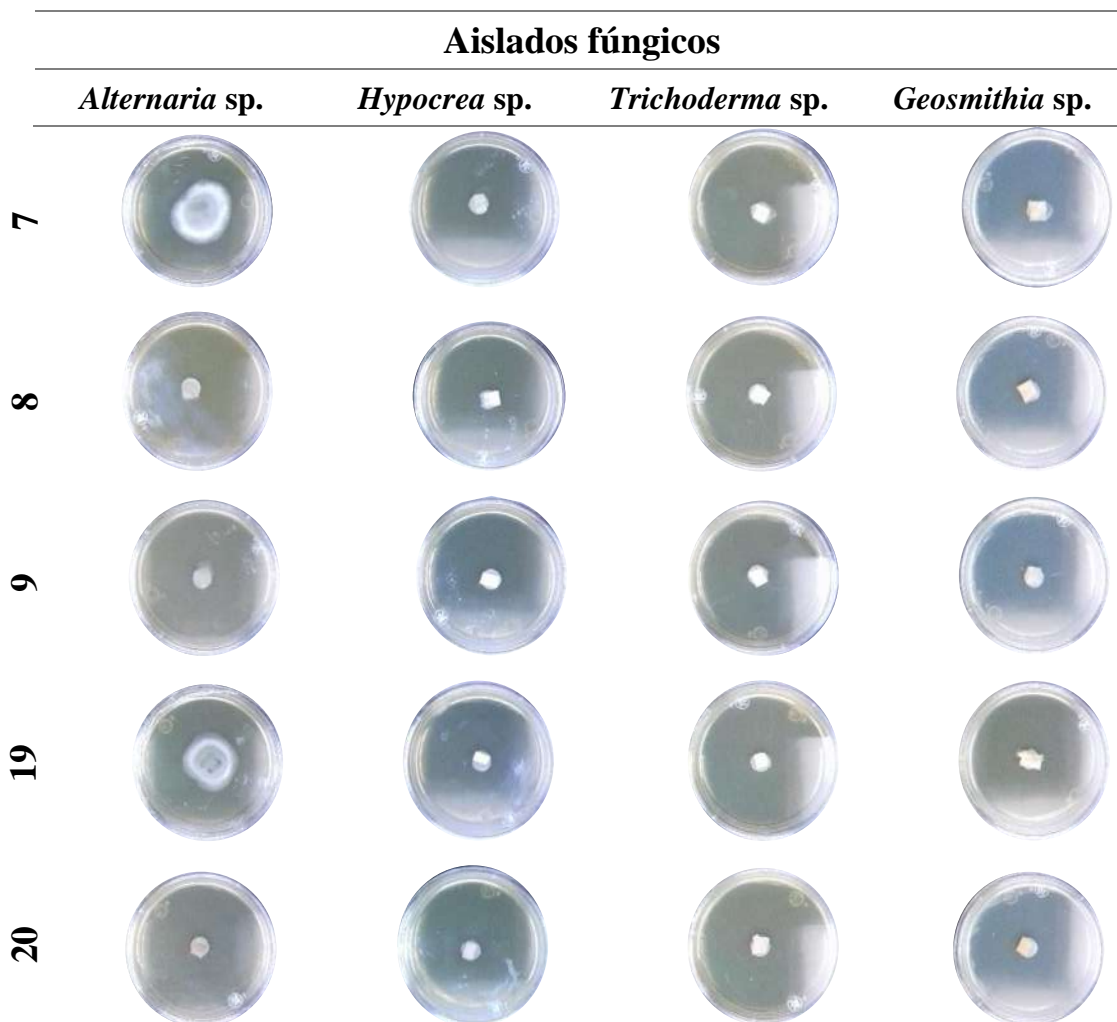


Fig. 21. Imágenes representativas de la sensibilidad de los hongos de la mancha azul a aceites esenciales.

VI.5. Componentes químicos de los aceites esenciales

Para dilucidar los compuestos químicos presentes en los AE se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). Se seleccionaron los compuestos que cumplieran con los siguientes criterios:

- i. Porcentaje de área (% área) $\geq 2\%$
- ii. Factor de coincidencia (Match factor) ≥ 900

En total se identificaron 26 compuestos químicos que cumplían con ambos criterios (**Tabla 10**). En el AE 20 los compuestos químicos identificados y con la mayor abundancia relativa fueron el eugenol (52.89%), cariofileno (14.17%) y acetato de eugenol (12.89%). Los compuestos químicos con mayor abundancia relativa para el AE 8 fueron el D-limoneno (14.83%), β -bisaboleno (9.30%), (-)-terpinen-4-ol (8.39%), α -terpineol (7.82%) y γ -terpineno (7.49%). El γ -terpineno (33.6%), α -terpineol (20.07%), D-limoneno (12.19%), β -bisaboleno (8.79%) y *cis*-geraniol (8.03%) fueron los compuestos químicos con mayor abundancia relativa para el AE 9. El D-limoneno (53.77%) fue el compuesto químico con la mayor abundancia relativa para el AE 19. Para el AE 7 los compuestos químicos con mayor abundancia relativa fueron el β -bisaboleno (16.90%), α -bergamoteno (8.70%) y cariofileno (7.13%). En la **figura 22** se muestran el cromatograma y espectro de masas de los aceites esenciales 7 y 20 respectivamente.

Tabla 10. Compuestos químicos presentes en los aceites esenciales determinados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).

Compuesto químico	RT*	Aceite esencial (Porcentaje de abundancia relativa)				
		7	8	9	19	20
<i>β-pineno</i>	5.95	2.43			3.09	
D-limoneno	6.60	3.19	14.83	12.19	53.77	
γ-terpineno	7.02	4.29	7.49	33.6		
Terpinoleno	7.39			5.53		
β-linalool	7.58		2.13			
<i>exo</i>-fenchol	7.72			2.30		
1-terpineol	7.95			5.11		
β-terpineol	8.06			4.15		
Isoborneol	8.27			4.26		
(-)-terpinen-4-ol	8.36	3.26	8.39	3.74		
α-terpineol	8.51	2.97	7.82	20.07		
<i>cis</i>-geraniol	8.83			8.03		

<i>β</i>-citral	8.91	4.63	4.60		4.13
Geraniol	9.04				7.93
<i>α</i>-citral	9.16	5.74	5.89		4.23
<i>δ</i>-elemeno	9.63	4.24			
Eugenol	9.84				52.89
(-)-<i>β</i>-elemeno	10.02	3.26			
Cariofileno	10.23	7.13	4.77	2.49	14.17
<i>α</i>-bergamoteno	10.31	8.70	5.91	3.63	
Humuleno	10.45	3.58	2.20		5.89
Germacreno D	10.62	3.63	2.40		
<i>β</i>-bisaboleno	10.78	16.90	9.30	8.79	
Acetato de eugenol	10.93				12.89
Longifoleno	10.98				2.29
Óxido de cariofileno	11.28				3.02

*El índice de tiempo de retención y los espectros de iones moleculares se compararon con la base de datos NIST 2011.

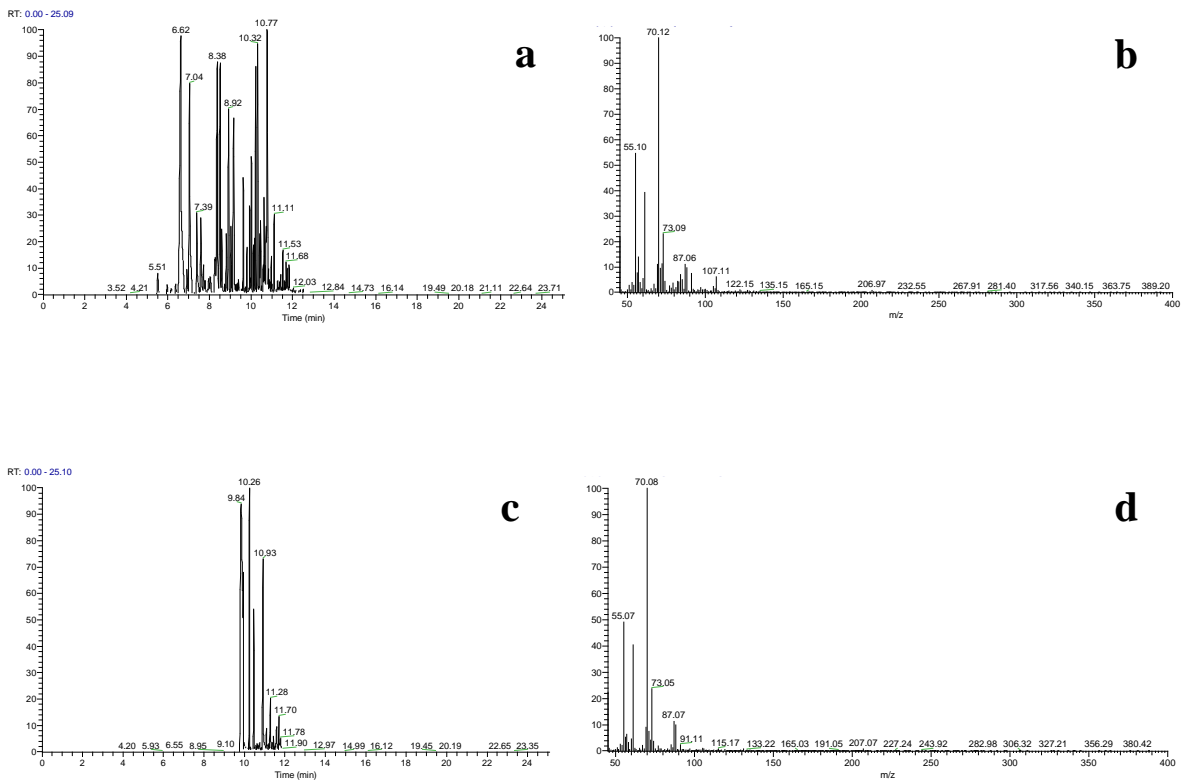


Fig. 22. Cromatogramas y espectros de masas representativos de los aceites esenciales ensayados: a) cromatograma del aceite esencial 8, b) espectro de masas del D-limoneno compuesto mayoritario del aceite esencial 8 (RT: 6.62), c) cromatograma del aceite esencial 19 y d) espectro de masas del eugenol compuesto mayoritario del aceite esencial 19 (RT: 9.84).

VI.6. Inducción de la mancha azul de la madera

Para la determinación *in situ* de la sensibilidad de los aislados fúngicos frente a aceites esenciales se estableció un modelo para la inducción de la mancha azul de acuerdo con la norma ASTM D 4445-10 (**Figura 23**). El establecimiento del modelo tuvo como finalidad corroborar la virulencia de los aislados fúngicos sobre la madera de *Pinus* sp. y validar los postulados de Koch.

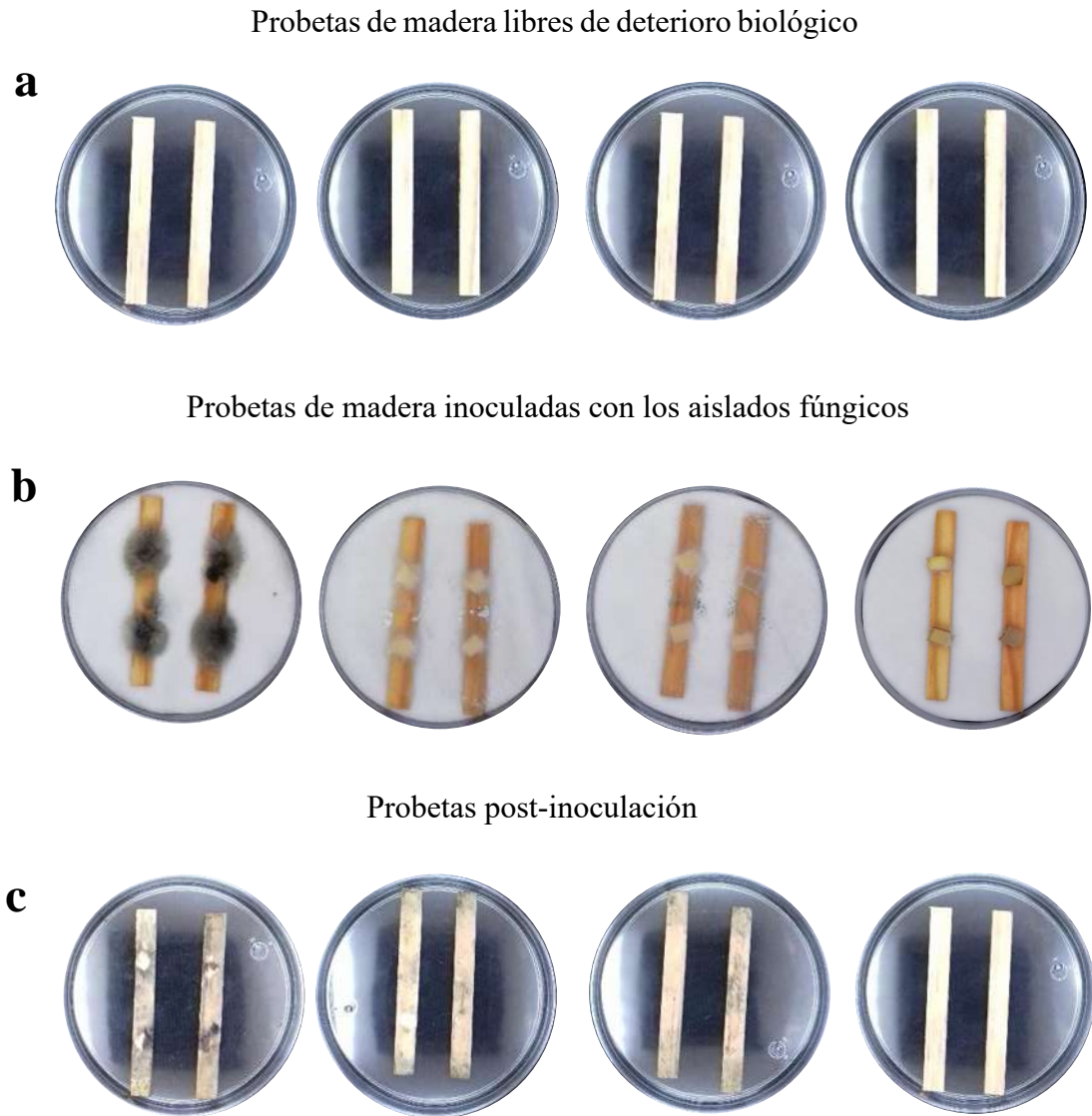


Fig. 23. Establecimiento del modelo para la inducción de la mancha azul de acuerdo con la norma ASTM D 4445-10. a) Probetas libres de daño biológico, b) Probetas inoculadas con hongos de la mancha azul (de izquierda a derecha): *Alternaria* sp., *Hypocrea* sp., *Trichoderma* sp. y *Geosmithia* sp. después de cinco días y c) Pigmentación de las probetas de madera post-inoculación después de 30 días.

Identificada la presencia de la mancha azul se procedió a realizar cortes provisionales sobre las probetas secas, las cuales se observaron al microscopio a 40x y 100x, se observó la presencia de estructuras fúngicas (esporas) acumuladas en los espacios interradiales y

localizadas cerca de las puntuaciones (**Figura 24**). Otras estructuras fúngicas no se observaron.

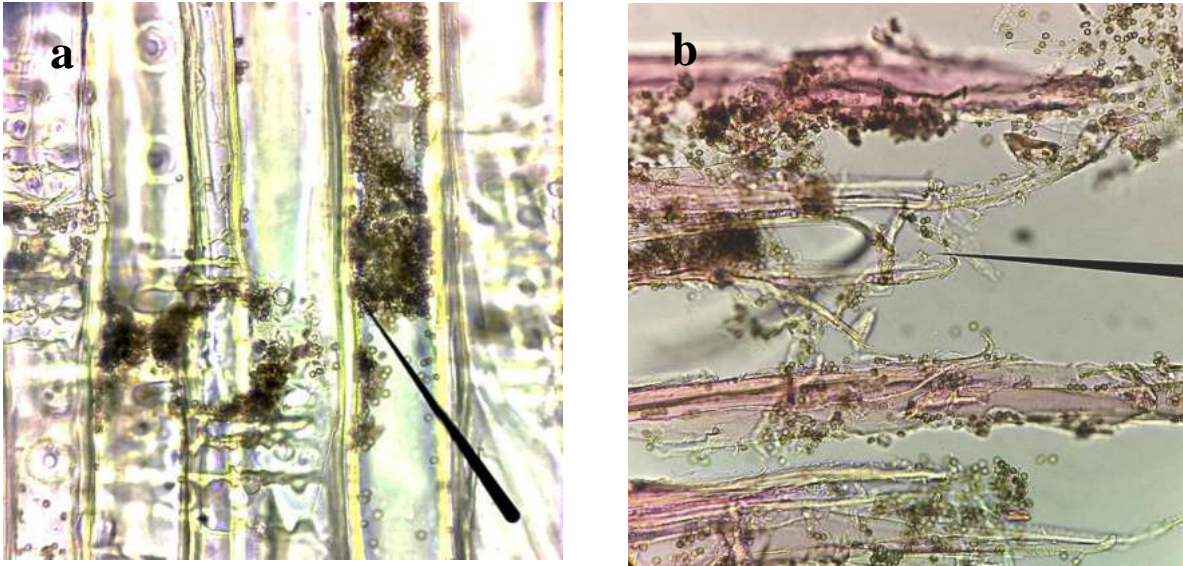


Fig. 24. Imágenes micrográficas de un corte provisional. Amplificación 100x donde: a) cúmulos de esporas se observan en los espacios interradales y b) esporas adheridas a las fibras de la madera.

VI.7. Determinación *in situ* del efecto antifúngico de los aceites esenciales

Con el fin de evaluar *in situ* el efecto inhibitorio de los AE, se ensayaron dos métodos para preservar madera: inmersión y aspersion.

▪ 7.1. Método de inmersión

Los controles presentaron un comportamiento heterogéneo. El CCA inhibió a *Trichoderma* sp. y a *Geosmithia* sp., en tanto *Alternaria* sp. e *Hypocrea* sp. mostraron resistencia al CCA ya que se observó crecimiento fúngico. El OPP inhibió a los cuatro aislados fúngicos. En el DMSO se observó escaso crecimiento fúngico (**Figura 25**).

Los AE evaluados 7, 8, 9, 19 y 20 inhibieron en su totalidad a los cuatro aislados fúngicos (**Figura 26**). Todos los AE evaluados exhibieron un comportamiento análogo al OPP. Su actividad funguicida, por el método de inmersión, es evidente, dicha actividad puede ser atribuida a la composición química específica de cada AE evaluado ya sea mediante un sinergismo de sus componentes químicos o al compuesto mayoritario del AE.

Las probetas libres de micelio fúngico mostraron un oscurecimiento general debido a los tratamientos; sin embargo, se observó presencia de manchado en las probetas inoculadas con *Alternaria* sp. e *Hypocrea* sp. ambas tratadas con CCA, las manchas se observaron en el sitio de inoculación y en la zona adyacente al propágulo. Las probetas tratadas con OPP no presentaron manchado ya que no hubo crecimiento fúngico. El crecimiento micelial en las probetas con DMSO fue escaso y no se observó presencia de manchado por acción de los inóculos fúngicos (**Figura 27**).

En las probetas tratadas con los aceites esenciales no se observó manchado por acción fúngica; no obstante, presentaron un oscurecimiento generalizado debido a los tratamientos (**Figura 28**). Las probetas que no recibieron ningún tratamiento químico mostraron un manchado notable, destacando las probetas inoculadas con *Alternaria* sp., *Trichoderma* sp. y *Geosmithia* sp; las probetas inoculadas con *Hypocrea* sp. exhibieron un menor manchado, pero conspicuo en las zonas distales al sitio de inoculación.

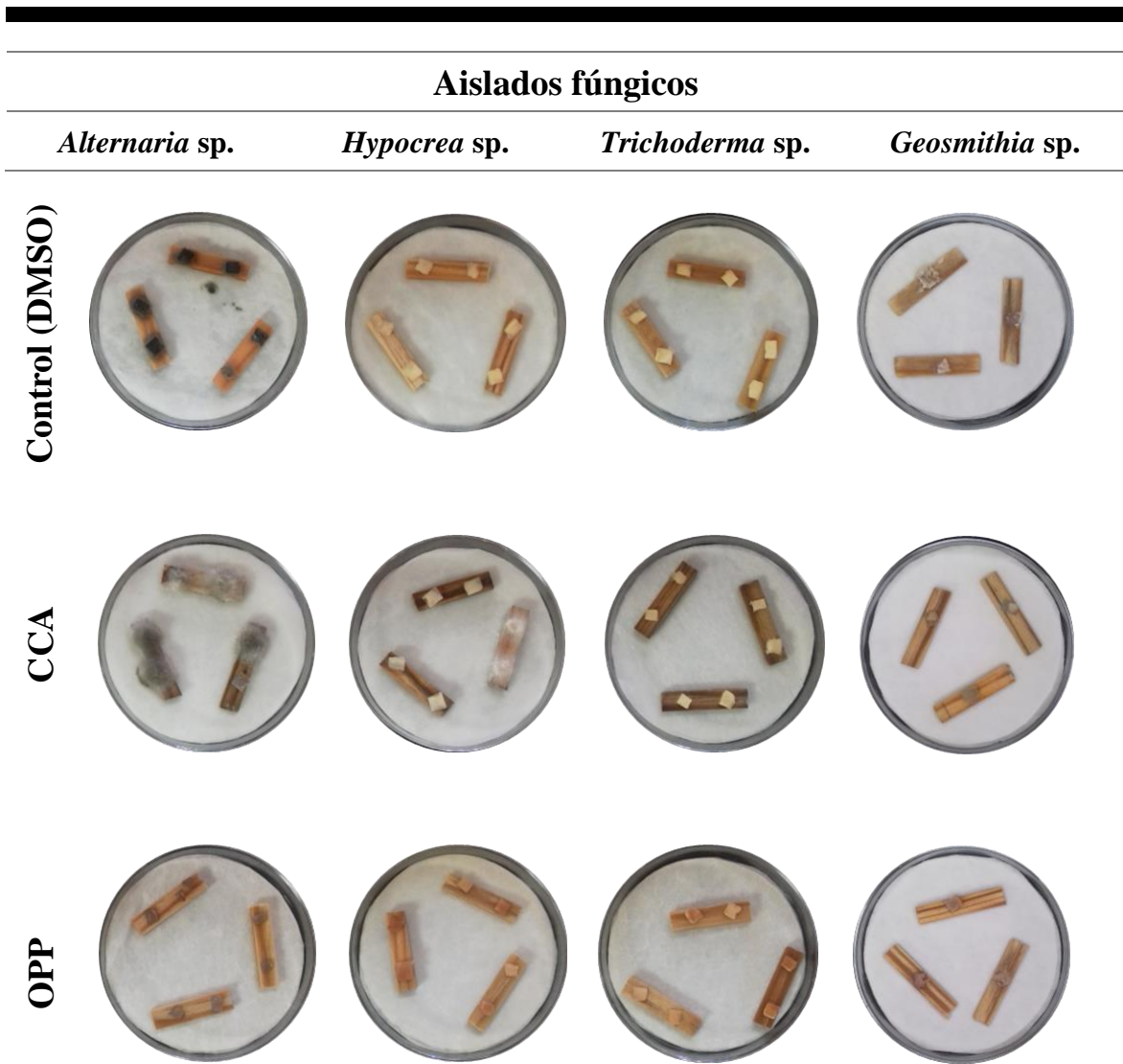


Fig. 25. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul de la madera frente a preservantes convencionales (Método de inmersión).

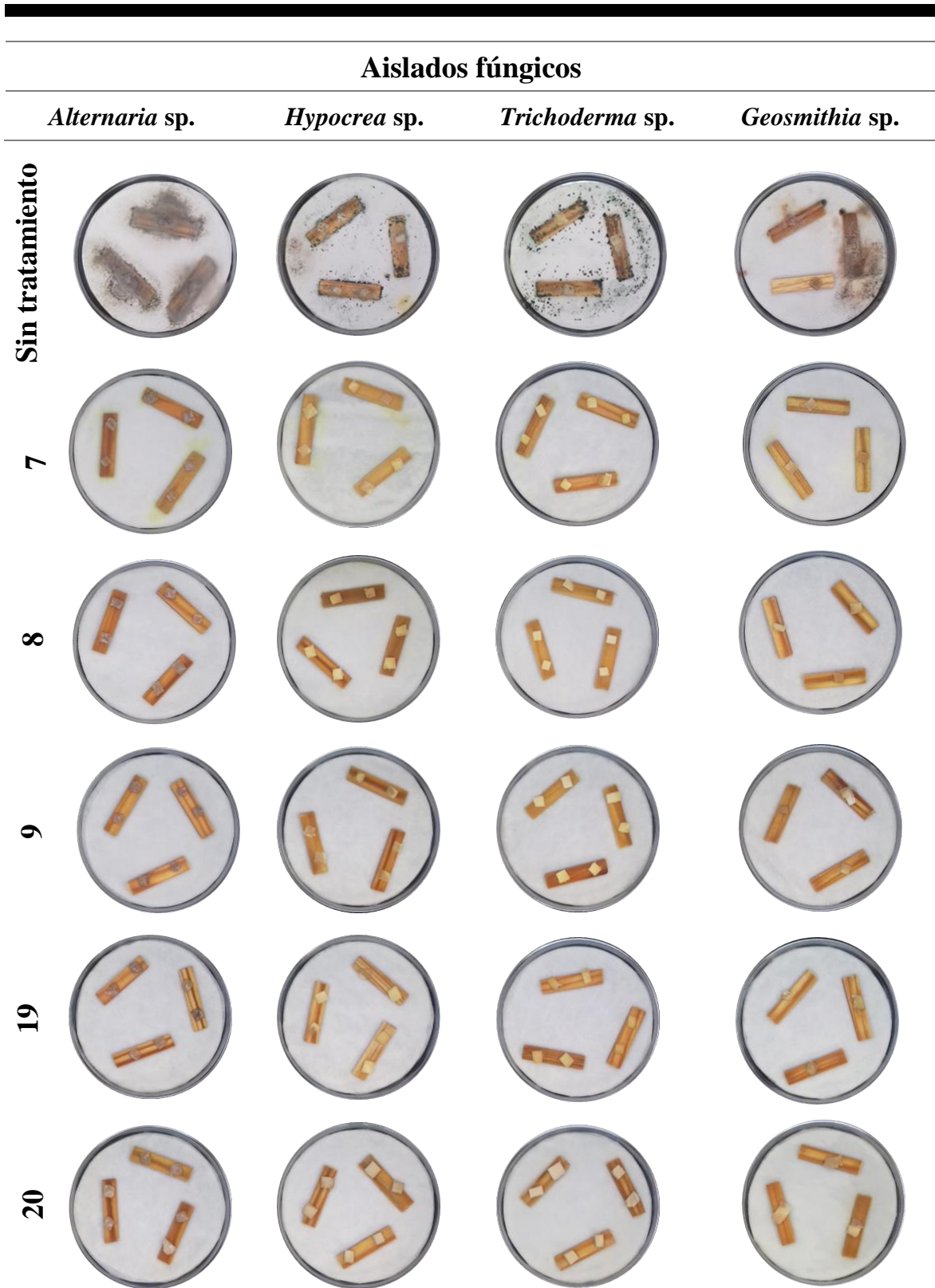


Fig. 26. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul de la madera frente a aceites esenciales (Método de inmersión).

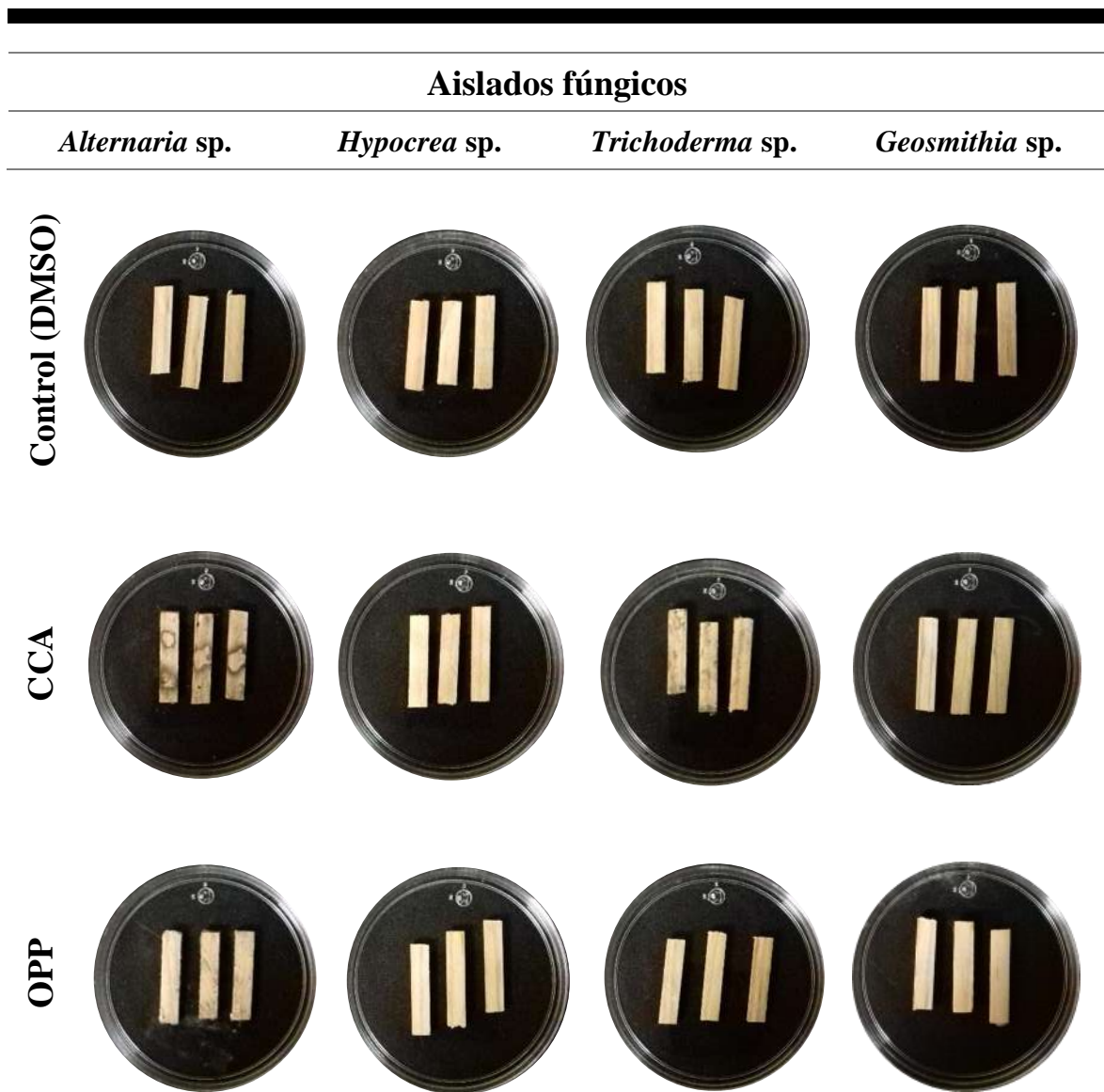


Fig. 27. Pigmentación de madera de *Pinus* sp. postratamiento a los preservantes convencionales (Método de inmersión).

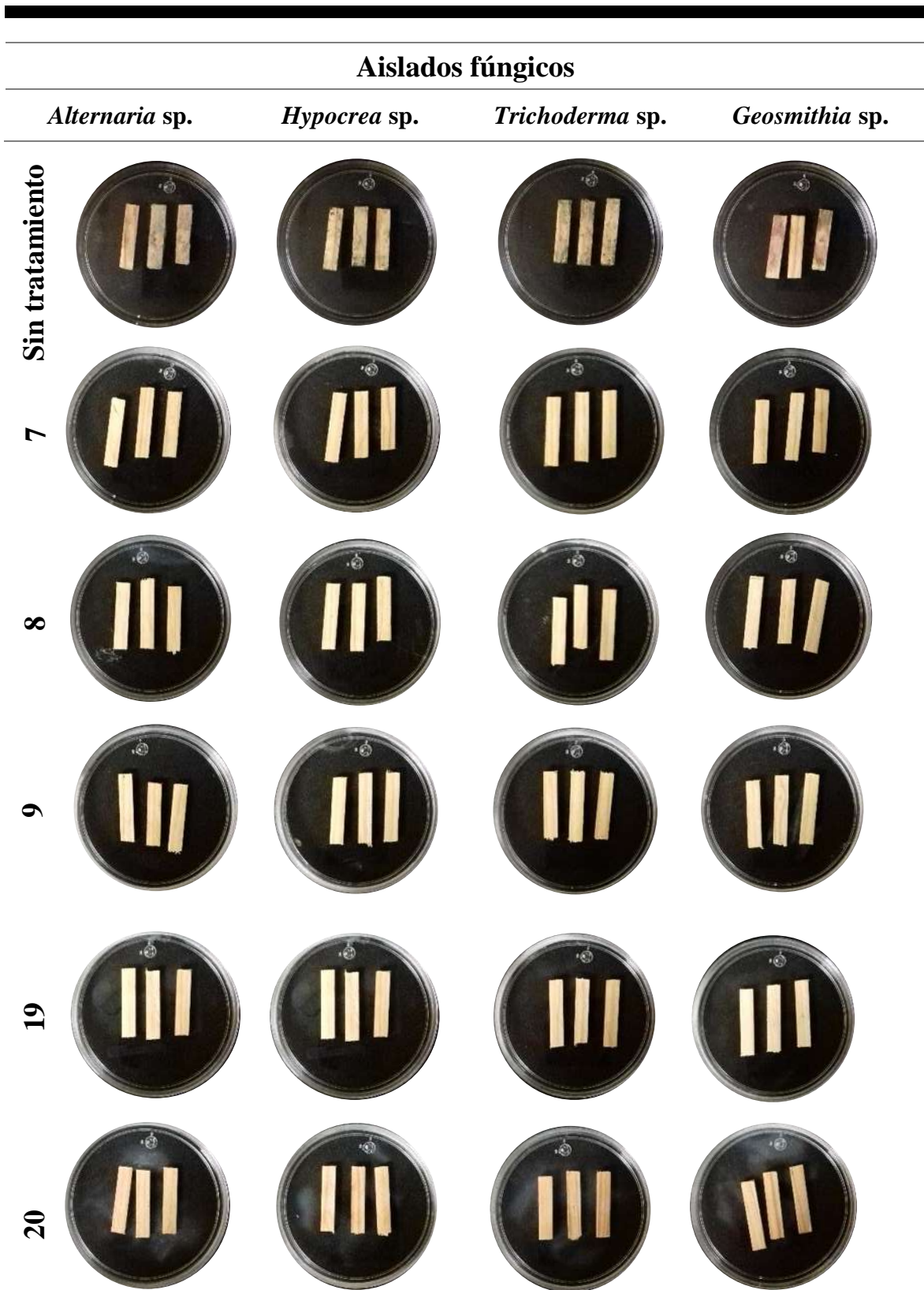


Fig. 28. Pigmentación de madera de *Pinus* sp. postratamiento a aceites esenciales (Método de inmersión).

▪ **7.2. Método de aspersión**

Por el método de aspersión los controles exhibieron un comportamiento distinto al observado en el método de inmersión (**Figura 29**). El CCA inhibió a los cuatro aislados fúngicos. El OPP presento efecto inhibitorio sobre *Hypocrea* sp. y *Geosmithia* sp., en tanto *Alternaria* sp. y *Trichoderma* sp. fueron resistentes al OPP ya que se observó crecimiento fúngico. Crecimiento fúngico considerable se observó sobre las probetas asperjadas con DMSO, destacando *Alternaria* sp. con el mayor crecimiento fúngico observado.

Los aceites esenciales evaluados por el método de aspersión presentaron efecto fungicida sobre todos los aislados fúngicos, ya que no se observó crecimiento sobre las probetas asperjadas con los diferentes aceites esenciales (**Figura 30**).

Las probetas tratadas con CCA no presentaron manchado por acción fúngica; empero, sí un oscurecimiento general a causa de la sal cromo arsenical. Las probetas inoculadas con *Alternaria* sp. y *Trichoderma* sp., tratadas con OPP exhibieron manchado debido al crecimiento fúngico. Las probetas tratadas con DMSO presentaron manchado notable por acción fúngica, sobresaliendo *Alternaria* sp. (**Figura 31**).

Las probetas tratadas con los aceites esenciales no presentaron manchado ya que no hubo crecimiento fúngico; no obstante, exhibieron un oscurecimiento generalizado debido al tratamiento con los aceites esenciales. Las probetas sin tratamiento alguno mostraron un manchado notable y similar al exhibido en las probetas tratadas por el método de inmersión (**Figura 32**).

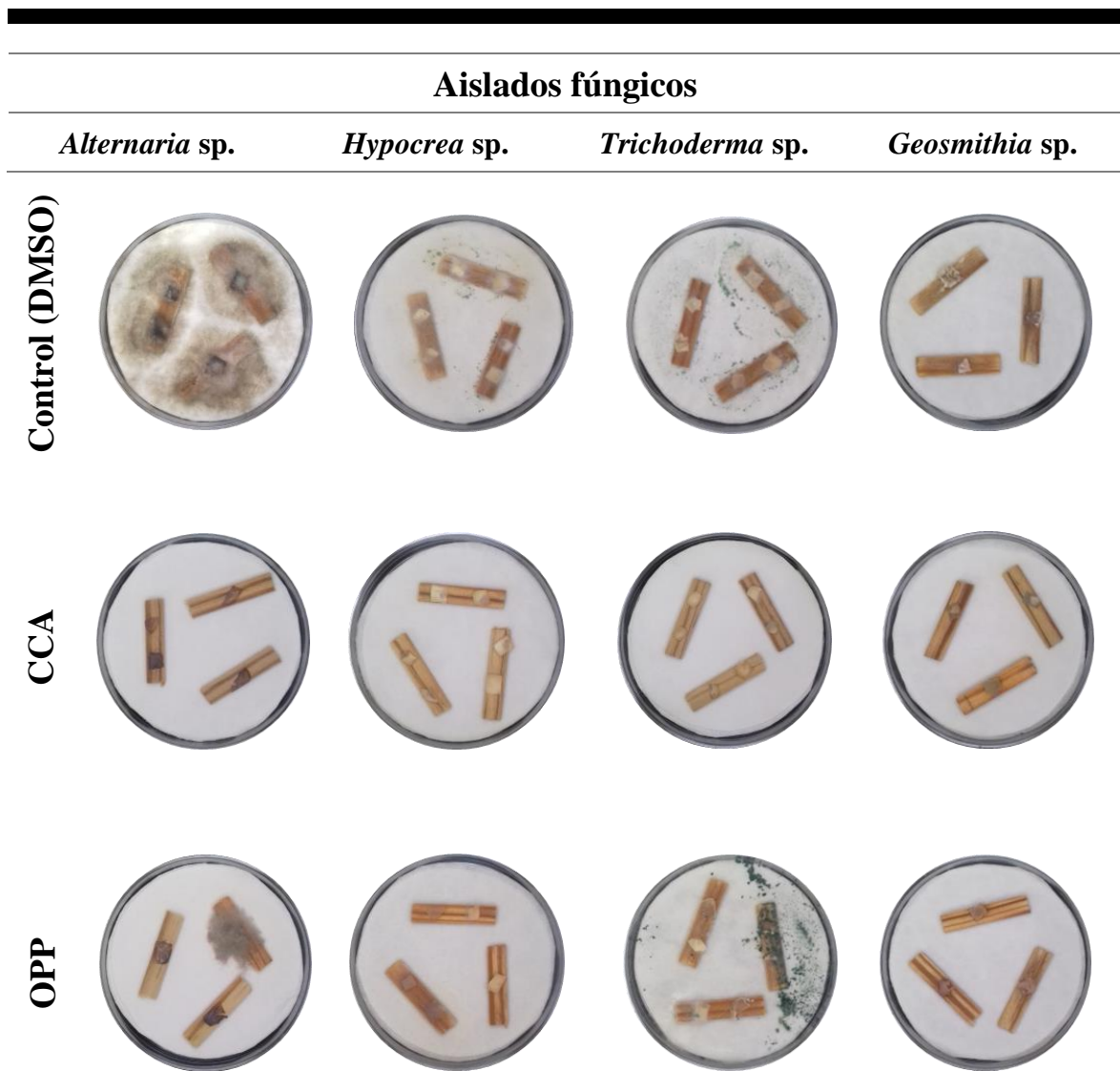


Fig. 29. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul frente a preservantes convencionales (Método de aspersión).

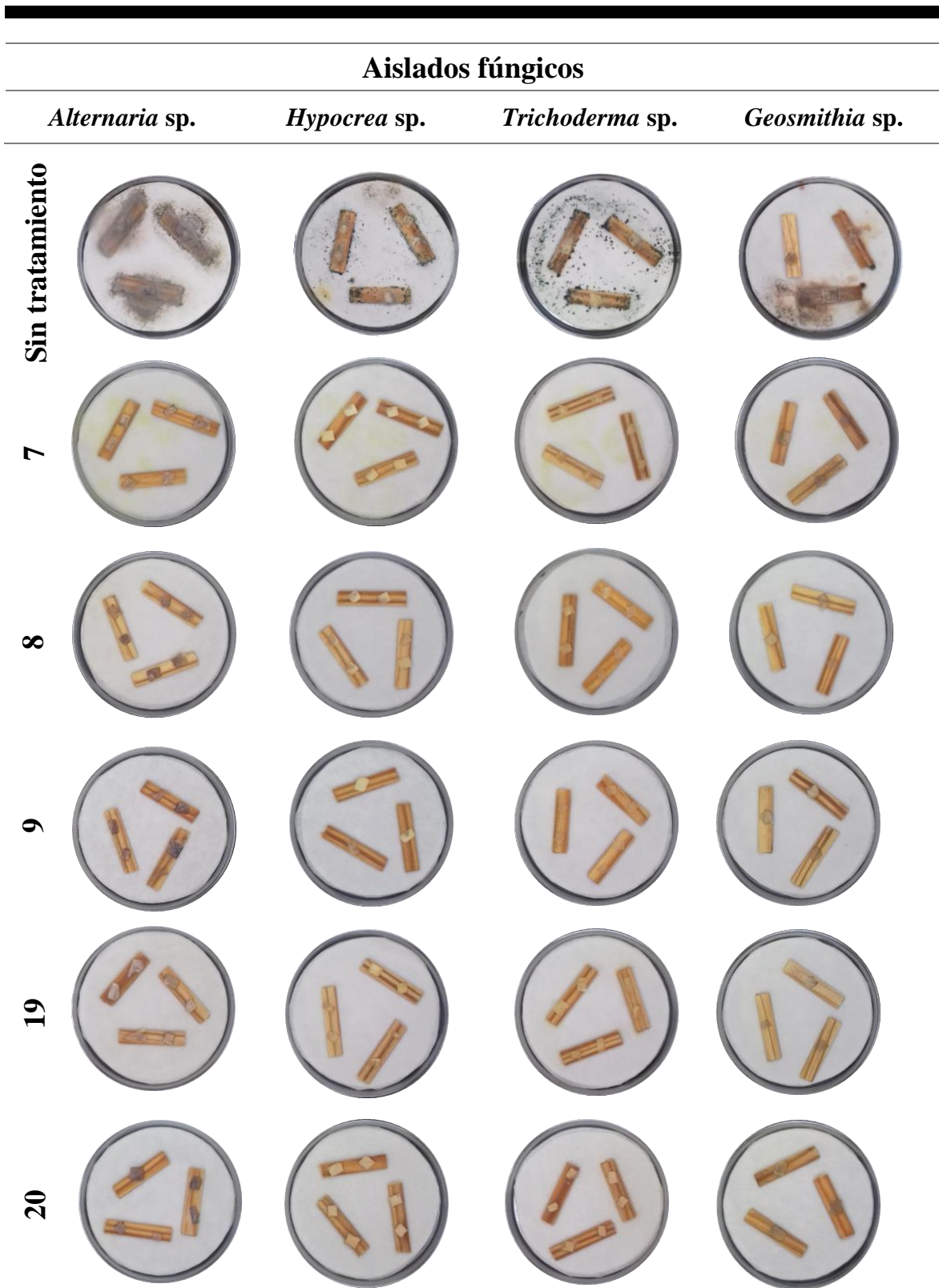


Fig. 30. Sensibilidad de los hongos de la mancha azul frente a los aceites esenciales (Método de aspersión).

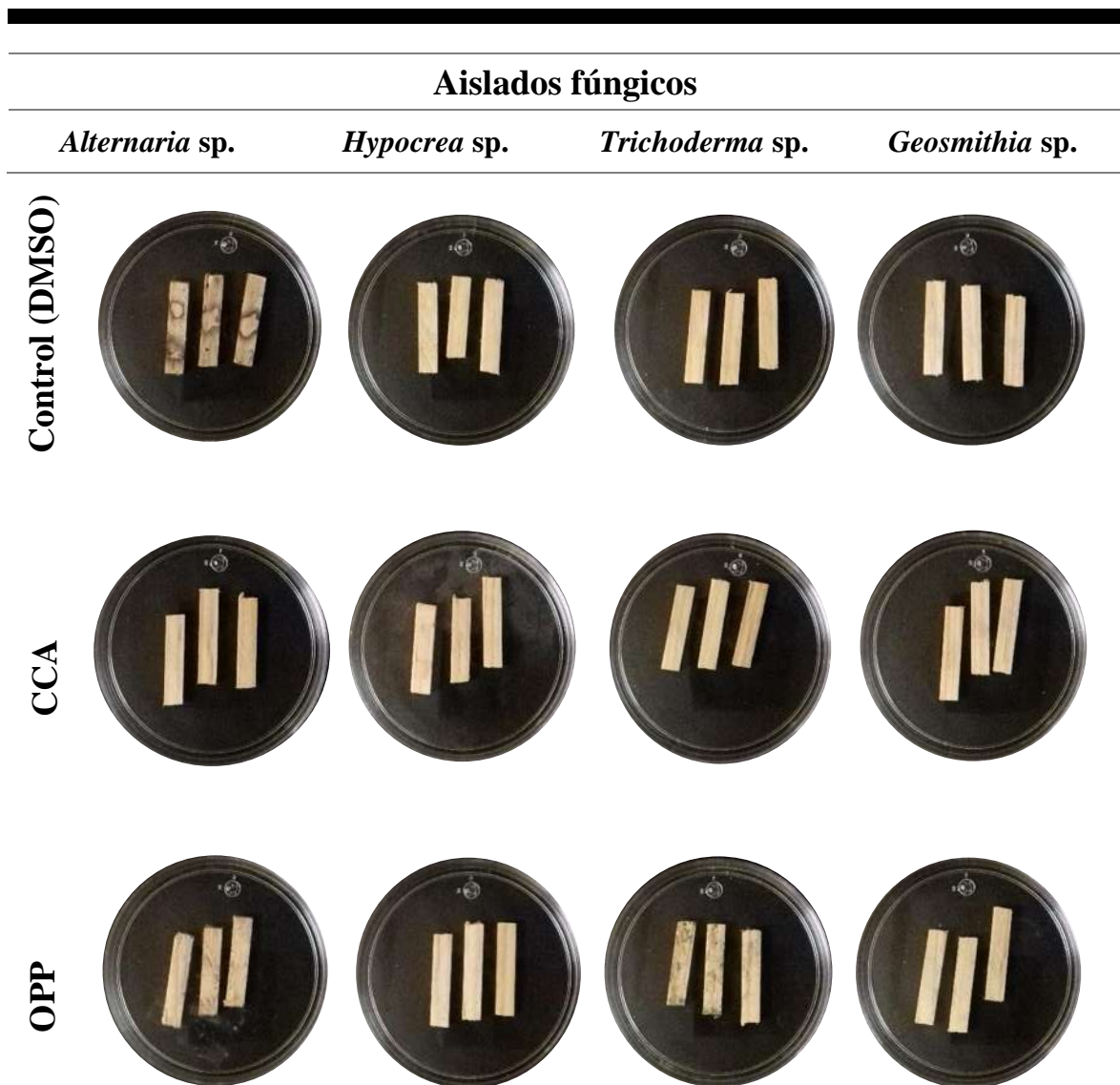


Fig. 31. Pigmentación de madera de *Pinus* sp. postratamiento a aceites esenciales (Método de aspersion).

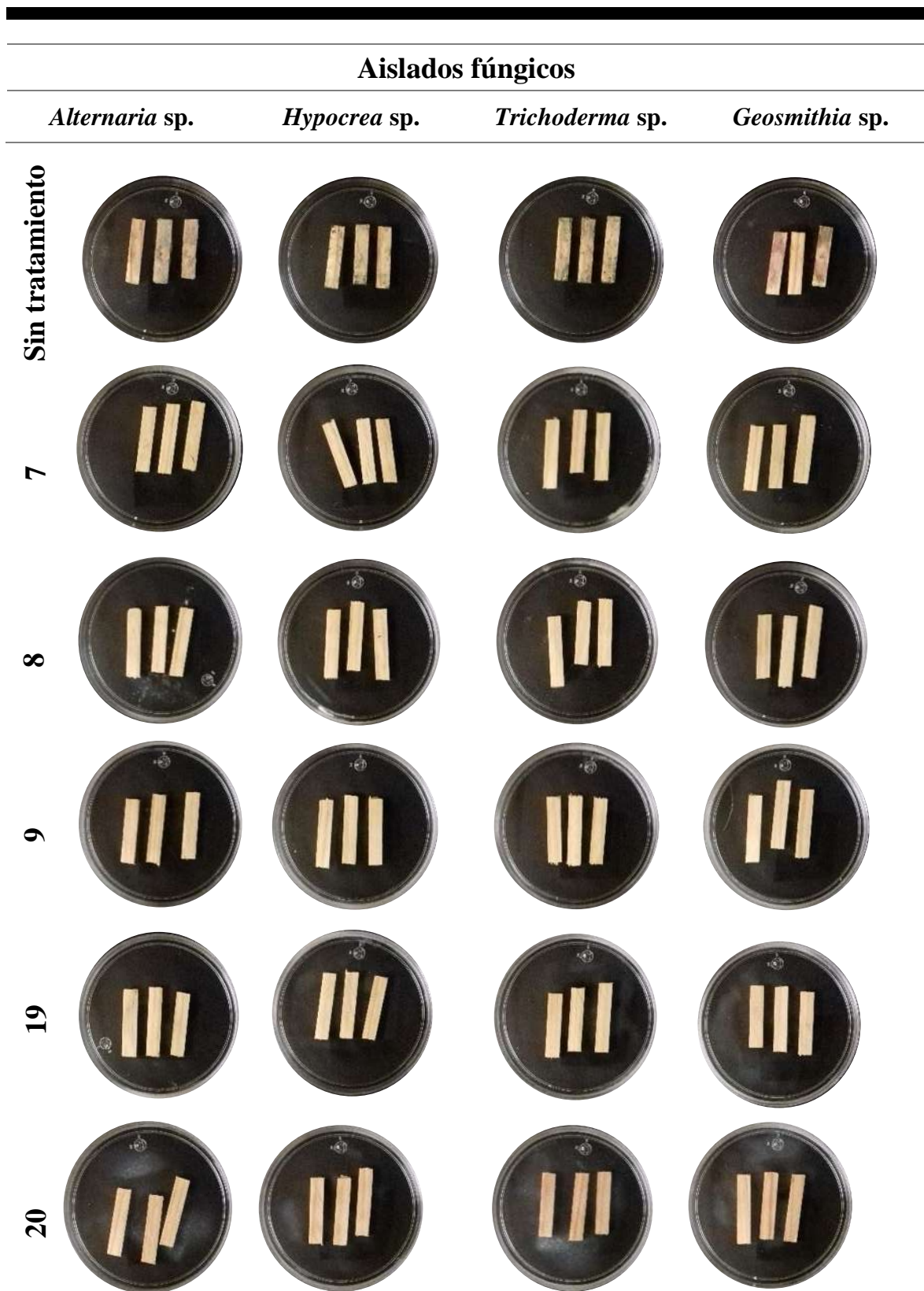


Fig. 32. Pigmentación de madera de *Pinus* sp. postratamiento a aceites esenciales (Método de aspersión).

VI.8. Absorción y retención de la madera de *Pinus* sp.

Las probetas impregnadas con los aceites esenciales por el método de inmersión presentaron una mayor absorción que el CCA y el OPP, los valores de absorción de los aceites esenciales oscilaron entre 144.48 ± 25.80 para el 8 y 245.62 ± 32.89 para el 20. Los valores de retención fueron similares para los AE 7, 9 y 19; el AE 8 presentó una retención de 11.67 ± 1.35 y el AE 20 de 63.01 ± 13.42 , ubicándose los valores extremos en estos aceites esenciales.

Los valores de retención para el CCA y el OPP por el método de aspersión fue de 0.16 ± 0.03 y 0.16 ± 0.01 respectivamente. Para los aceites esenciales los valores de retención en el método de aspersión oscilaron entre 6.82 ± 0.76 para el 8 y 18.01 ± 2.37 para el 20. En ambos métodos el aceite 20 obtuvo los mayores valores de retención y el 8 los valores menores (**Tabla 11**).

Tabla 11. Absorción y retención de los aceites esenciales por la madera de *Pinus* sp.

Tratamiento	Inmersión		Aspersión	
	Absorción (kg/m ³)	Retención (kg/m ³)	Absorción (kg/m ³)	Retención (kg/m ³)
DMSO	$203.92 \pm 12.53bc$	$71.37 \pm 4.38d$	$29.32 \pm 5.37b$	$11.62 \pm 2.37bc$
CCA	$15.83 \pm 1.08a$	$0.31 \pm 0.02a$	$8.41 \pm 1.51a$	$0.16 \pm 0.03a$
OPP	$11.71 \pm 1.35a$	$0.23 \pm 0.02a$	$8.24 \pm 0.73a$	$0.16 \pm 0.01a$
7	$231.08 \pm 15.92bc$	$34.57 \pm 6.48bc$	$61.22 \pm 4.70c$	$17.76 \pm 2.25c$
8	$144.48 \pm 25.80b$	$11.67 \pm 1.35ab$	$31.32 \pm 4.76b$	$6.82 \pm 0.76ab$
9	$198.85 \pm 23.13bc$	$38.73 \pm 6.64bc$	$37.78 \pm 5.40b$	$10.22 \pm 0.79bc$
19	$200.89 \pm 17.27bc$	$35.91 \pm 4.56bc$	$36.23 \pm 5.31b$	$9.06 \pm 1.95b$
20	$245.62 \pm 32.89c$	$63.01 \pm 13.42dc$	$63.52 \pm 5.09c$	$18.01 \pm 2.37c$

Los datos obtenidos son el promedio \pm EE, n = 6
 Letras iguales en la misma columna no presentan diferencia significativa. Tukey ($\alpha = 0.5$)

VII. Discusión

El empleo de conservantes químicos en la preservación de la madera genera un problema importante en la salud humana y la contaminación ambiental. Por lo tanto, la búsqueda de compuestos químicos bioactivos naturales, seguros y no contaminantes de las plantas como alternativa al conservante sintético se vuelve esencial (Loh *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2015). Muchos extractos de plantas y aceites esenciales pueden ser fuentes alternativas de agentes de control de hongos debido a sus ricas fuentes de químicos bioactivos, incluidos monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos alifáticos (Xie *et al.*, 2014).

En la presente investigación se evaluaron 26 aceites esenciales con potencial actividad antifúngica para controlar los hongos asociados a la mancha azul en la madera. Los aceites esenciales de cítricos y clavo se evaluaron por el método de difusión en agar a una concentración de 1 g/mL frente a cuatro aislados fúngicos: *Alternaria* sp., *Hypocrea* sp., *Trichoderma* sp. y *Geosmithia* sp.

Varios de los metabolitos secundarios con mayor abundancia relativa descritos en la presente investigación son considerados fitoquímicos con actividad antifúngica, *e.g.* al eugenol son sensibles los hongos *Trametes hirsuta*, *Schizophyllum commune* y *Pycnoporus sanguineus*. Mientras que *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *Penicillium aurantiogriseum*, fueron sensibles al aceite de clavo cuyo componente químico mayoritario fue el eugenol con un 67% de abundancia (Valdés-Pérez *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Otro ejemplo es la sensibilidad de *Alternaria alternata*, *Fusarium subglutinans*, *Chaetomium globosum*, *A. niger* y *Trichoderma viride* a los AE de *Eucalyptus camandulensis* y *Pinus rigida* cuyos compuestos químicos mayoritarios para *E. camandulensis* fueron eucaliptol (60.32%), α -pineno (13.65%), γ -terpineno (8.77%) y terpinen-4-ol (4.24%). Para el AE de *P. rigida* los compuestos químicos mayoritarios fueron el α -terpineol (34.49%), borneol (17.57%), alcohol fenchílico (14.20%), α -pineno (7.76%), L-limoneno (3.38%) e isoborneol (2.11%) (Salem *et al.*, 2016). El AE de *E. camandulensis* presentó actividad fungicida sobre *C. globosum* los otros aislados fúngicos presentaron algún tipo de crecimiento. El AE de *P. rigida* mostró actividad fungicida sobre *A. alternata*, *F. subglutinans*, *C. globosum* y *A. niger*, pero no inhibió a *T. viride*. También, una mezcla de terpenos de naranja inhibió el crecimiento de *Alternaria tenuissima* donde D-limoneno fue el metabolito secundario más

abundante y concluyen que es una alternativa viable para el control de este hongo (Quintana-Obregón *et al.* 2017).

La actividad antifúngica de los aceites esenciales fue determinada *in situ* con la finalidad de observar su efectividad en la preservación de madera. Los métodos evaluados fueron los de inmersión y aspersión, que son los métodos comúnmente empleados en la preservación de madera al momento de aplicar los preservantes químicos de elección. En ambos métodos los AE (1 g/mL) resultaron eficaces en la preservación de la madera ya que no hubo crecimiento fúngico sobre las muestras (probetas). Respecto a los controles, estos mostraron un comportamiento diferente según el método de aplicación. El CCA al 2% mostró mayor efectividad en su aplicación por aspersión al inhibir a los cuatro aislados fúngicos, en cambio por inmersión resultó ineficaz frente a *Alternaria* sp. e *Hypocrea* sp. El OPP al 2% fue más eficaz por el método de inmersión, inhibiendo a los cuatro aislados fúngicos y resultó menos efectivo por asperjado, ya que se observó crecimiento fúngico en *Alternaria* sp. y *Trichoderma* sp. En la presente investigación se observó que *Alternaria* sp. mostró baja sensibilidad a los controles, lo cual indica el desarrollo de insensibilidad fúngica, ya que el crecimiento micelial quedó sujeto al método de aplicación; no obstante, *Alternaria* sp. resultó sensible a los aceites esenciales independientemente del método de aplicación. Por lo cual la investigación sobre la efectividad y uso de los aceites esenciales es un campo por desarrollar.

La eficacia de un preservante para madera depende del grado de absorción y retención de la sustancia química preservante. Una observación que concuerda con la impregnación de madera de albura de *Pinus pseudostrobus* Lindl con cobre azol (CA-B) al 1% (p/p) por los métodos de inmersión y baño caliente-frío (BCF). Para determinar la efectividad de los métodos de impregnación determinaron la absorción y la retención en cada pieza. Los resultados obtenidos por el método de inmersión simple fueron: absorción de 324 kg/m³, retención de 3.2 kg/m³, por el método de baño caliente-frío la absorción fue de 532.8 kg/m³ y la retención de 5.3 kg/m³ (Casimiro y Ávila, 2012).

El análisis de absorción y retención se realizó para los aceites esenciales y los controles. En ellos se encontró que las probetas tratadas por el método de inmersión presentaron los mayores niveles de absorción, siendo el AE 20 el que presentó valores mayores y el AE 8 el que obtuvo la menor absorción. El CCA y el OPP presentaron valores

bajos con respecto a los aceites esenciales. En cambio, en el DMSO se observaron valores de absorción similares a los que se reportan para los aceites esenciales. La retención para el método de inmersión guarda estrecha relación con los valores de absorción. Las probetas impregnadas con el AE 20 presentó el mayor valor de retención y el AE 8 el menor valor. El CCA y el OPP obtuvieron valores de retención ínfimos comparados con los aceites esenciales. El DMSO se comportó de manera similar a los aceites esenciales.

El método de aspersión presentó valores de retención menores comparados con el método de inmersión. No obstante, el AE 20 presentó el mayor valor de absorción y el AE 8 el menor. En el CCA y el OPP se observan valores de absorción similares e incluso cercanos a los que se obtuvieron por inmersión. El DMSO se comportó de manera diferente, ya que su absorción fue menor a los aceites esenciales. La retención de los aceites esenciales por el método de aspersión fue heterogénea comparada con la observada en el método de inmersión. Los AE 20 y 7 presentaron valores de retención muy similares, el AE 8 obtuvo el menor valor de retención. El CCA y el OPP obtuvieron valores similares de retención, incluso comparables a los que se observaron en el método de inmersión. El DMSO obtuvo una retención comparable a algunos aceites esenciales.

La uniformidad en el color de la madera es una preocupación importante ya que su variabilidad puede reducir el valor estético de la misma (Sotelo-Montes *et al.*, 2008, Villegas y Area, 2009). Por lo cual la colorimetría mediante la expresión de parámetros de color dentro del sistema CIE $L^*a^*b^*$, puede producir resultados confiables, especialmente por ser el sistema más utilizado para representar gráficamente el color de un objeto y determinar las diferencias de color (Camargo, 1999). Sin embargo, el color de la madera está influenciado por diversos factores, como: genéticos, anatómicos, composición química, plano de corte, posición dentro del árbol; tasa de crecimiento, factores ambientales, grado de humectación, contenidos de extractivos (Villegas y Area 2009; Boudouaya *et al.*, 2016). El color de la madera también es resultante, básicamente, de la composición química de las sustancias presentes en el xilema, en particular, extractivos y lignina (Fengel y Wegener, 1984). Asimismo, las propiedades físicas y químicas del suelo pueden producir diferencias en el color de la madera entre sitios de crecimiento (Sotelo-Montes *et al.*, 2008).

La aplicación de las técnicas colorimétricas en la determinación del color de la madera es un método infrecuente; no obstante, Cisneros *et al.*, 2019, emplearon las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$ para determinar la variación colorimétrica entre sitios, secciones y región de la madera de *Prosopis alba* y su correlación con los parámetros colorimétricos con rasgos morfométricos del árbol. La investigación reportó que las coordenadas a^* y b^* mantuvieron niveles bajos en relación a L^* . La coordenada a^* en duramen mantuvo niveles similares en los distintos sitios, con una variación promedio de 9.5-10.55. La albura presentó valores más bajos pero mayor variación entre sitios, con valores de 5.28-7.8. En tanto la coordenada b^* presentó valores superiores a la coordenada a^* tanto en duramen como en albura, la albura presentó valores promedio entre 23-30. El estudio comprobó una correlación entre los parámetros colorimétricos, con aumentos en la luminosidad (L^*) y la pigmentación amarilla (b^*) con correlaciones altas y positivas para todas las regiones de estudio (albura, duramen y médula); en cambio el pigmento rojo (a^*) disminuyó a medida que incrementó la L^* ; sin embargo, se observó una correlación débil para el duramen y la médula con valores de 0.18 y 0.22 respectivamente. Asimismo, el resultado obtenido concuerda con la observación en las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$ características colorimétricas de los pellets de eucalipto y residuos de la cafeicultura (Pegoretti *et al.*, 2019). La observación que reportaron es una diferencia colorimétrica (ΔE) entre los pellets, con una variación de ΔE entre 9.22-31.14, valores considerados perceptibles al ojo humano. La interpretación a los resultados obtenidos es que los aceites esenciales evitaron el oscurecimiento de la superficie de la probeta de madera de pino.

Con la finalidad de conocer la mejor manera de aplicación de los aceites esenciales a la madera se ensayaron los métodos; de inmersión y de aspersion. Para ello la pigmentación de la madera causada por hongos cromógenos se determinó registrando la variación colorimétrica (ΔE) de las probetas sometidas a cada uno de los tratamientos. La ΔE varió significativamente entre ambos métodos de aplicación, encontrando los valores más altos en el método de inmersión; no obstante, en las probetas tratadas con los aceites esenciales no se encontró diferencia estadística significativa. De acuerdo a Dirckx *et al.*, 1992, valores superiores de $\Delta E > 3$ son perceptibles al ojo humano, por lo cual no se aprecia una diferencia colorimétrica visual para las probetas tratadas con los aceites esenciales 8 en *Trichoderma* sp., 9 y 19 ambos en *Hypocrea* sp. Los controles presentaron valores superiores a 3, por lo

cual la ΔE es apreciable, encontrando los valores mayores para las probetas tratadas con CCA. La ΔE para las probetas tratadas con OPP y DMSO encontramos valores cercanos a los aceites esenciales, pero bajos respecto al CCA.

Para el método de aspersión las probetas tratadas con los aceites esenciales presentaron mayor diferencia significativa en la ΔE . Un oscurecimiento generalizado de las probetas se observó con excepción de las tratadas con el aceite esencial 19 en *Hypocrea* sp. Los controles presentaron mayor variación colorimétrica, el CCA obtuvo los valores mayores de ΔE . En cambio, en el OPP los valores fluctuaron entre valores cercanos a los aceites esenciales y otros similares a los observados para el CCA. Destacan las probetas tratadas con DMSO que se inocularon con *Alternaria* sp., ya que se observó el mayor valor de ΔE análogo al que presentaron las probetas tratadas con CCA por el método de inmersión. El oscurecimiento notorio de las probetas con DMSO se debió al excesivo crecimiento del hongo. Los resultados obtenidos nos sugieren que el método de inmersión es la mejor opción para la aplicación de los aceites esenciales de la madera. Las técnicas colorimétricas resultaron útiles y fáciles de aplicar en la determinación de la mancha azul; por lo cual el desarrollo de normas estandarizadas permitirá una identificación y una valoración más adecuada para evaluar la madera afectada con mancha azul.

De conocimiento general es que la madera tratada con conservantes comunes se clasifica como residuo peligroso en algunos países. Una realidad que estimula a los académicos y a la industria de la conservación de la madera a buscar nuevas alternativas ecológicas. Aunque, el concepto de protección de la madera contra la biodegradación se basa en el principio de toxicidad; no obstante, el uso de conservantes de madera tradicionales está sujeto hoy en día a limitaciones medioambientales y de los consumidores. Algunos de estos productos químicos son prohibidos o limitados por los mercados comerciales de todo el mundo.

También, que el aspecto y color natural de la madera en algunos mercados es una preocupación importante ya que su variabilidad reduce sus valores estético y económico. Sin embargo, en otros mercados, esa variabilidad no es un problema. Asimismo, el color es un factor que influye en la decisión de adquirir un producto de madera.

Varios aceites vegetales de producción regional y nacional se han utilizado para la impregnación de la madera con la finalidad de controlar el daño que causan las termitas. Sin embargo, en este trabajo engarzamos dos productos socioeconómica y políticamente importantes en la economía de la región; la producción maderable y la producción de aceites esenciales de origen vegetal, particularmente de cítricos y especias. En el caso particular de este trabajo las propiedades microbiológicas de los aceites esenciales se evidenciaron. En tanto sus propiedades fisicoquímicas son propicias para utilizarlos en la impregnación de madera.

VIII. Conclusión

Los aceites esenciales 8 y 20 muestran efecto antifúngico contra *Alternaria* sp., *Hypocrea* sp., *Trichoderma* sp. y *Geosmithia* sp., hongos de la mancha azul de la madera de *Pinus* sp.

IX. Referencias

- Andrew, H.; Wong, H. y Check, K. S. (2001). Observations of termite-fungus interactions of potential significance to Wood biodeterioration and protection. Timber Technology Centre (TTC). FRIM. No. 24.
- Armengol A. J.; Miró, E. P. y Farré, J. M. M. (2004). Restauración de Madera. Parramón Ediciones. Barcelona.
- Ávila-Calderón, Luz Elena A.; Herrera-Ferreira, Marco Antonio y Raya-González, David (2012). Preservación de la madera en México. UMSNH. México.
- ASTM D 2244-05: Calculation of Color Tolerances and Color Differences from Instrumentally Measured Color Coordinates.
- ASTM D 4445-10: Standard Test for Fungicides for Controlling SAPstain and Mold on Unseasoned Lumber (Laboratory Method).
- Ben Arfa, A.; Combes, S.; Preziosi Belloy, L.; Gontard, N. y Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. Lett. Appl. Microbiol. 43, 149–154.
- Brenes, A. y Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. Anim. Feed Sci. Technol. 158, 1–14.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. Int. J. Food Microbiol. 94, 223–253.
- Caballero, B.; Trugo, L. C., and Finglas, P. M. (2003). Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Amsterdam: Academic Press.
- Casimiro-Cenobio, J. C. y Ávila-Calderón, L. E. A. (2013). Impregnación de madera de *Pinus pseudostrobus* Lindl con sales de boro y cobre azol por métodos de inmersión simple y baño caliente-frío. Memorias de la VII Reunión Nacional de Innovación Forestal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Querétaro, Querétaro.

- Chavesta, C. M. (2006). Separata de capacitación sobre identificación de madera. Perú.
- Cheng, S. S.; Liu, J. Y.; Chang, E. H. y Chang, S. T. (2008). Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*. 99: 5145-5149.
- Cisneros, A. B.; Nisgoski, S.; Moglia, J. G. y Córdoba, M. (2019). Colorimetría en la madera de *Prosopias alba*. *Maderas, Ciencia y tecnología*. Córdoba, Argentina. 21(3): 393-404.
- Cisneros-Herrera, M.; Ávila-Calderón, L. E. A. y Raya-González, D. (2013). Impregnación de madera de *Quercus lauriana* Humb. & Bonpl con sales de boro y sales de cobre azol. *Memorias de Recursos Forestales*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila.
- Coulson, R. N. y Witter, J.A. (1990). *Entomología Forestal. Ecología y Control*. Limusa. México.
- Cruz, de León, José (2010). *Manual para la protección contra el deterioro de la madera*. Conafor. México.
- Cuquerella J.; Martínez-Jávega J. M^a; Monterde A.; P. Navarro y A. Salvador. (2004). Nuevo sistema de medida de color para cítricos. *Revista Levante Agrícola*, EDICIONES LAV Edición N° 372 Especial Postcosecha.
- Delmoro, J.; Muñoz, D.; Nadal, V.; Clementz, A.; Pranzetti, V. y Color, E. L. (2010). El color en los alimentos. 13: 145-152.
- Diaz-Barriga H. (2002). *Hongos macromicetos comestibles, venenosos, medicinales y destructores de la madera, de la reserva de la biosfera de la mariposa monarca, sierra Chincua, Michoacán, México*. Fundación Produce - Comisión Forestal del Estado de Michoacán (COFOM). México.
- Dirckx, O.; Triboulot-Trouy, M. C.; Merlin, A. y Degliese, X. (1992). Modifications de la couleur du bois d'grandis exposé à la lumière solaire. *Annals of Forest Science*, Les Ulis, v. 49, n. 5, p. 425-447.

- Dorman, H. J. D. y Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308–316.
- Essam, E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 130, 325–337.
- Fengel D.; Wegener, G. (1989). *Wood chemistry, ultrastructure, reactions.* Walter de Gruyter, Berlin.
- Fitzgerald, D. J.; Stratford, M. y Narbad, A. (2003). Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 113–122.
- George, D. R.; Smith, T. J.; Shiel, R. S.; Sparagano, O. A. E. y Guy, J. H. (2009). Mode of action and variability in efficacy of plant essential oils showing toxicity against the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Vet. Parasitol.* 161, 276–282.
- Gibbs, J. N. (1999) The biology of ophiostomatoid fungi causing sapstain in trees and freshly cut logs. In: Wingfield M.J., Seifert, K.A., Webber, J.F. (eds) *Ceratocystis and Ophiostoma*, 2nd Am Phytopath Soc Press, St. Paul, Minnesota, pp.153–160.
- Guoping, Ma; Bao, Shuwen; Zhao, Juan; Sui, Yuan y Wu, Xuehong (2020). Morphological and Molecular Characterization of *Alternaria* Species Causing Leaf Blight on Watermelon in China. The American Phytopatological Society (APS).
- Heitman, J. Microbial pathogens in the fungal kingdom (2011). *Fungal Biol. Rev.* 25:48-60.
- Herrera R.; Garces M. y Cancino L. (2006). Procesos moleculares de la formación de la madera. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. Universidad de Talca Chile. Vol. Encuentros en la Biología No. 108.
- Hu, J. B.; Chang, S. S.; Peng, K. Y.; Hu, K. F. y Thévenon, M. F. (2015). Bio-susceptibility of shells of *Camellia oleifera* Abel. fruits to fungi and termites. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 104: 219-223.

- Hyldgaard, Morten; Mygind, Tina y Meyer Rikke Louise (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in MICROBIOLOGY*, vol. 3.
- IAWA (1964). Multilingual glossary of terms used in wood anatomy. Committee on Nomenclature International Association of Wood Anatomists.
- Junta del acuerdo de Cartagena. (1987). Manual del grupo andino para la preservación de maderas. Colombia.
- Käärik, A. (1980) Fungi causing sap stain in wood. Swed Univ Agric Sci Dept Forest Prod 114.
- Kalembe, D. y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10, 813–829.
- Kim, S. I.; Roh, J. Y.; Kim, D. H.; Lee, H. S. y Ahn, Y. J. (2003). Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *J Stored Prod Res* 39, 293–303.
- Kim S. I.; Yoon J. S.; Jung J. W.; Hong K. B.; Ahn Y. J. y Kwon H. W. (2010). Toxicity and repellency of origanum essential oil and its components against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults. *J Asia-Pacific Entomol.* 13(4): 369–73.
- Kraemer K. G. (1958). Compendio de la conservación de maderas. Ed. Santa Lucia. Santander, España.
- Lee S.; Peterson C.J. y Coats J. R. (2003). Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J Stored Prod Res.* 39(1): 77–85.
- León, K.; Mery, D.; Pedreschi, F. y León, J. (2006). Color measurement in Lab units from RGB digital images. In *Food Research International*. Vol. 39.
- Loh, Y. F.; Paridah, T. M.; Hoong, Y. B.; Bakar, E. S.; Anis, M. y Hamdan, H. (2011). Resistance of phenolic-treated oil palm stem plywood against subterranean

- termites and White rot decay. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65: 14-17.
- Noor, A. I.; Mokhtar, M. H.; Rafiqi, Z. K. y Pramod, K. M. (2012). Understanding color models. Areview. *ARPN Journal of Science and Technology*. 2(3): 265-275.
- Novoa, D. F. y Ramírez Navas, J. S. (2012). Caracterización colorimétrica del manjar blanco del Valle. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 10(2): 54-61.
- Oussalah, M.; Caillet, S. y Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69, 1046–1055.
- Pauli, A. y Kubeczka, K. H. (2010). Antimicrobial properties of volatile phenylpropanes. *Nat. Prod. Commun.* 5, 1387–1394.
- Pegoretti, Héctor Jesús; Chávez, Donária Marina; Baptista Viduarre, Graziela, *et al.* (2019). Colorimetría de pellets de eucalipto y residuos de la cafeicultura y sus relaciones con los parámetros de calidad. *Scientia Forestalis.*, v. 47, n. 121: 114-124.
- Pérez-Vera, Omar Alejandro; Alvarado-Rosales, Dionicio; Cárdenas-Soriano, Elizabeth; Equihua-Martínez, Armando; Cibrián-Tovar, David; Álvarez-Moctezuma, José G.; Mejía-Sánchez, Dimas y C. Harrington, Thomas (2009). *Ophiostoma ips* asociado al insecto descortezador (*Dendroctonus adjunctus*) del pino de las alturas (*Pinus hartwegii*). *Revista Mexicana de Micología* 30: 9-18.
- Perry T. J. (1991) A synopsis of the taxonomic revisions in the genus *Ceratocystis* including a review of blue-staining species associated with *Dendroctonus* bark beetles. Gen Tech Rep SO-86, U.S. Dept Agricult Forest Serv, New Orleans.
- Quintana-Obregón, Eber Addi; Sánchez-Mariñez, Reyna Isabel; Cortez-Rocha, Mario Onofre y González-Aguilar, Gustavo Alfonso (2017). Actividad antifúngica *in*

- vitro* de mezcla de terpenos de naranja contra *Alternaria tenuissima*. *Scientia Fungorum*, vol. 45: 7-12.
- Ramírez-López, César Bonifacio (2014). Caracterización de *Eupatorium* spp. con efecto disuasivo en insectos barrenadores de madera seca. Tesis de doctorado. UMSNH. México.
- Raya-González, David (2007). Las maderas secas de encino (*Quercus* spp.) y pino (*Pinus* spp.) son protegidas del daño causado por *Lyctus* spp. e *Incisitermes marginipennis* (Latreille) con extractos vegetales acuosos. Tesis de doctorado. UMSNH. México.
- Reyes Chilpa R.; Pérez Morales V. y Del Ángel S. B. (1987). Influencia de los extractivos en la resistencia natural de seis maderas tropicales al hongo de pudrición morena *Lenzites trabea*. INIREB. Xalapa, Ver.
- Riesco, G.; Soilán, M. A. y Rodríguez, R. (2008). Physical properties of wood in thinned Scots pines (*Pinus sylvestris* L.) from plantations in northern Spain. *Annals of Forest Science* 65 (5): 507.
- Rodríguez, Barreal J. A. y F. Arriaga. (1989). Patología, tratamiento y consolidación de la madera puesta en obra. AITIM. Madrid.
- Salem, Mohamed Z. M.; Zidan, Yassin E.; Mansour, Maisa M. A.; El Hadidi, Nesrin M. N. y Abo Elgat, Wael A. A. (2016). Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial Woods deteriorated by five common mold fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 106: 88-96.
- Sánchez, E.; García, S., and Heredia, N. (2010). Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6888–6894.
- Sanjuán Dueñas R. (1997). Obtención de pulpas y propiedades de las fibras para papel. Universidad de Guadalajara. Departamento de madera celulosa y papel. Guadalajara, Jalisco, México.

- Scheffer, T. C. (1973). Microbiological degradation and the causal organisms. In: Wood deterioration and its prevention by preservative treatments. Vol. I. Degradation and protection of Wood. D.D. Nicholas (ed). Syracuse Wood Science Series 5. Syracuse Univ. Press. New York.
- Scheffrahn, Rudolf H. (2020). New records of the drywood termite, *Incisitermes platycephalus* (Light, 1933) (Isoptera, Kalotermitidae), from Central America and senior synonym of *I. nigrinus* (Snyder, 1946). Check List 16 (2): 501-505.
- Schmidt, Olaf. (2006). Wood and Tree Fungi. Biology, Damage, Protection, and Use. Springer, Germany.
- Schnitzler, P.; Astani, A., and Reichling, J. (2011). Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. Evid. Based Complement. Alternat. Med. PMID: 253643
- Shah, G.; R. Shri.; V. Panchal; N. Sharma; B. Singh, and A.S. Mann. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (*Lemon grass*). J. Adv. Pharm. Technol. Res. 2:3-8.
- Sharma R. C.; Vir D. (1986). Post-harvest diseases of grapes and studies on their control with benzimidazole derivatives and other fungicides. Pesticides (Bombay). 20: 14–15.
- Sierra, Sarmiento, Mauricio A.; Barros, Algarra, Ramón; Gómez, Paternina, Diomedes; Mejía, Terán, Adriana y Suarez, Rivero, Deivis (2018). *Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales*. UNIAGRARIA. Colombia.
- Silva, F.; Ferreira, S.; Duarte, A.; Mendonça, D. I., and Domingues, F. C. (2011). Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. Phytomedicine 19, 42–47.
- Simsek, H.; Baysal, E. y Peker, H. (2010). Some mechanical properties and decay resistance of wood impregnated with environmentally-friendly borates. Construction and Building Materials, 24(11): 2279-2284.

- Singh, T. y C. Chittenden. (2008). “Antifungal Activity of Essential Oils Against Common Wood Degrading/Decaying Fungi.” *International Research Group on Wood Preservation, IRG/WP 08-30465*. Stockholm, Sweden: IRG Secretariat.
- Suthisut, D.; Fields, P. G. y Chandrapatya, A. (2011). Fumigant toxicity of essential oils from three Thai plants (Zingiberaceae) and their major compounds against *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* and two parasitoids. *J Stored Prod Res.* 47(3): 222–30.
- Sutter, Hans-Peter. (1997). *Holzschädlinge an Kulturgütern erkennen und bekämpfen 3*. Unveränderte Auflage, Bern-Stuttgart-Wien, Verlag Paul Haupt.
- Tajkarimi, M. M.; Ibrahim, S. A. y Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199–1218.
- Talbert R.; Wall, R. (2012). Toxicity of essential and nonessential oils against the chewing louse, *Bovicola (Werneckiella) ocellatus*. *Res Vet Sci.* 93(2): 831-5.
- Tserennadmid, R.; Takó, M.; Galgóczy, L.; Papp, T.; Pesti, M.; Vágvölgyi, C.; Almássy, K. y Krisch, J. (2011). Anti-yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 480–486.
- Tunaz, H.; Er, M. K. e Isikber, A. A. (2009). Fumigant toxicity of plant essential oils and selected monoterpenoid components against the adult German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). *Turk J Agric For.* 33(2): 211–17.
- Ultee, A.; Bennik, M. H. J. y Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561–1568.
- Upadhyay H. P. (1981) A monograph of the genus *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. University Georgia Press, Athens.
- Valdés-Pérez, Oderlaise; Borrego-Alonso, Sofía; Vivar-González, Isbel; Anaya-Villalpando, Matilde y Molina-Veloso, Alian (2016). Actividad antifúngica del

- aceite esencial de clavo de olor en el control del biodeterioro fúngico de documentos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, vol. 47, no. 2, pp. 78-85.
- Vásquez-Riascos, Andrea Melisa (2015). Estimación de las coordenadas CIEL*a*b* en concentrados de tomate utilizando imágenes digitales. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia.
- Vignote, S.; Martínez, I. (2006). *Tecnología de la madera*. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Viuda, M.; Ruiz, Y.; Fernández, J. y Pérez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* 19 (12): 1130–1138.
- Wu, D. y Sun, D. W. (2013). Colour measurements by computer vision for food quality control. A review. *Trends in Food Science & Technology*. 29 (1): 5-20.
- Xie, Y. J.; Wang, K.; Huang, Q. Y. y Lei, C. L. (2014). Evaluation toxicity of monoterpenes to subterranean termite, *Reticulitermes chinensis*. Snyder. *Ind. Crops Prod.* 53: 163-166.
- Xue-Wei, Liu; Hui-Min, Wang; Quan, Lu; Cony, Decock; Yong-Xia, Li y Xing-Yao, Zhang. (2017). Taxonomy and pathogenicity of *Leptographium* species associated with *Ips subelongatus* infestations of *Larix* spp. in northern China including two new species. *Mycol Progress* 16: 1-13.
- Yang D-Q (1999). Staining ability of various sapstaining fungi on agar plates and on wood wafers. *Forest Prod J*49:78–90.
- Yoon C.; Kang S. H.; Yang J.O.; Noh D. J.; Gandhi P. y Kim G. H. (2009). Repellent activity of citrus oils against the cockroaches *Blattella germanica*, *Periplaneta americana* and *P. fuliginosa*. *J Pestic Sci.* 34(2): 77–88.
- Zhang, Zhilin; Yang, Ting; Mi, Na; Wang, Yong; Li, Guoyuan; Wang, Lihua y Xie, Yongjian (2016). Antifungal activity of monoterpenes against Wood White-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 106: 157-160.

