



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



**Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera
División de Estudios de Posgrado
Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera**

TESIS

**Escrutinio de la actividad antifúngica de extractos crudos de
Tectona grandis L.F. para la preservación de madera de baja
durabilidad**

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias y Tecnología de la
Madera

Presenta: Q.F.B. Enrique Carcamo Ibarra

Directores de Tesis:

Dr. Crisanto Velázquez Becerra
Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco

Sinodales:

M.C. Abril Munro Rojas
Dr. José Cruz de León
Dr. David Raya González

Morelia Michoacán, noviembre del 2021

AGRADECIMIENTOS PERSONALES**Mil gracias...**

A Dios, a Nuestra Señora del Tepeyac y a la vida por brindarme esta oportunidad de lograr y concluir esta meta personal.

A Trinidad (+) por ser una estrella más en mi firmamento.

A Clementina Ibarra Teniente y Enrique Carcamo Rodríguez, por darnos todo lo necesario e indispensable, en especial por brindarnos valores, buenas actitudes, cualidades y aptitudes, los quiero.

A Alejandrina y Montserrat, por ser mis hermanas y porque a pesar de las diferencias, el aislamiento por la pandemia, hubo poca más unión.

A Guadalupe Chiman Velázquez, por ser como una segunda madre para mí y ser parte de mi familia, por cuidar no solo de mí, sino de todos nosotros.

A Aury, por pintar de dorado mi realidad, por rescatarme de mis demonios, por escuchar lo que callo y sobre todo por estar en las peores, las malas, las buenas y en las mejores, te quiero <3.

A Germán, gracias por ser mi mejor amigo, por ser como un hermano para mí, a Gary, porque los tres compartimos esta aventura llamada posgrado, a mis amigos, por ser mi segunda familia, por compartir alegrías y sobre todo por escucharme cuando lo necesité, Gaby, Dorian, Fanny, Lupita, Rodrigo, Cinthya, Francisco, Noe, Iván, Memo, Meli ¡gracias por su amistad! A mis compañeros de la sección 05 de "farma", al licenciado en psic. Félix Cerda por su cálida atención profesional, también a la familia Rojas-Rodríguez por su noble y grato gesto hacia mi persona, en general tanto a la familia Carcamo e Ibarra. También quiero agradecer a toda aquella gente que nunca creyó, desconfió y se alejó de mí, aquellos que se bajaron del barco en medio del huracán, todos modos gracias.

Quiero dedicar este trabajo a todas esas personas que, a pesar de sus miedos, traumas, depresiones, duelos, frustraciones, desesperaciones e inseguridades, enfrentan estos fantasmas y demonios para superarse día a día.

"...A la vida hay que tenerle coraje y al amor no hay que tenerle miedo"

"...hay que aprovechar que estas vivo, hacer cosas positivas, para que la muerte nos reciba con los brazos abiertos y nos transporte al otro mundo..."

"pero tú, siempre estás ahí, tan libre como el león, tan firme como el sol, nunca te doblarás..."

A. Hernández Estrada

"So, if you need a hero just look in the mirror no one's gonna save you now, so you better save yourself..."

K. Loiza

"...el pasado puede doler, pero según lo veo, puedes huir de él o aprender..."

Rafiki, El rey león

"...sí un perdedor hace muchos esfuerzos quizás pueda sobrepasar el poder que tiene un guerrero distinguido..."

Son Goku, Dragon Ball Z

Todas las fotografías de este trabajo fueron tomadas por: @HenryCarcamo a través del dispositivo móvil Huawei Y9 2019

Instagram; henry.carcamo.92

Facebook; <https://www.facebook.com/henry.carcamo.92317>

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS E INSTITUCIONALES

Agradezco a...

A la Dra. nelly y a la Mta. Abril que por su apoyo fui aceptado al posgrado de la FITECMA, mil gracias profesoras, también al Dr. Crisanto, por fungir como asesor y director, por su paciencia y su confianza. También a la mesa sinodal conformada por los profesores Mauro Manuel Pacheco, Abril Munro, José Cruz y David Raya por sus aportaciones y colaboración a este trabajo.

Quiero agradecer a la maestra Adelaida por su apoyo, al maestro Fernando y al ingeniero Adalid, por la confianza y el espacio brindado en los laboratorios de química y física, y a mis compañeros de generación (Héctor, Wilber y Benjamín) también a Gerardo, Diana, Adriel, Rosa Isela por su compañerismo, a mis todos mis profesores de posgrado, a Estelita, al doctor Ambriz, a la contadora Claudia, al maestro Cristian, a Osmar, al doctor Josué Altamirano, al personal del CINVESTAV de Irapuato y del IQB (edificio 1 y 3), en general a todo el personal académico, técnico y administrativo de la FITECMA.

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada, a la MACITECMA por aceptarme y ser parte de su núcleo académico, por compartir sus áreas de física, química y microbiología, pero sobre todo brindarme la oportunidad de realizar una meta personal, al Laboratorio de Nutrición Vegetal que pertenece al CIDAM (Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentaria de Michoacán, A.C.), al laboratorio de Laboratorio de Ecología Microbiana y Biología del Desarrollo Vegetal, que pertenece al Instituto de Químico Biológicas de la UMSNH, a LANGEBIO del CINVESTAV campus Irapuato y al Departamento de Madera Celulosa y Papel de la Universidad de Guadalajara. **Gracias por todo, sin ustedes este proyecto nunca se hubiera logrado.**

INDICE

1 RESUMEN	2
2 INTRODUCCIÓN	4
3 ANTECEDENTES.....	6
3.1 Composición y estructura química de la madera	7
3.1.1 Celulosa	7
3.1.2 Lignina.....	7
3.1.3 Hemicelulosas	8
3.2 Agentes Biológicos	8
3.3.1 Agentes fúngicos	8
3.3.2 Hongos cromógenos	9
3.3.3 Hongos xilófagos	9
3.4 Pudrición blanda	10
3.5 Pudrición blanca	10
3.6 Pudrición café o marrón	11
3.7 Lacasa (Lac).....	12
3.8 Monooxigenasas Líticas de Polisacáridos (LPMO).....	12
3.9 Bacterias	13
3.10 Insectos.....	13
3.11.1 Humedad	13
3.11.2 Fuego.....	14
3.11.3 Acción climática y desgaste mecánico	14
3.11.4 Radiación solar.....	14
3.12 Ejemplos de maderas de alta durabilidad.....	15

3.13.1 Usos de la Teca.....	15
3.13.2 Taxonomía y botánica de <i>Tectona grandis</i> L.f.	16
3.13.3 Composición química de la Teca.....	17
3.13.4 Durabilidad de Teca	17
3.14 Preservantes.....	17
4 JUSTIFICACIÓN.....	20
5 HIPOTÉISIS	20
6 OBJETIVO GENERAL.....	21
6.1 Objetivos específicos.....	21
7 MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1 Obtención de la madera de <i>Tectona grandis</i> L. F.	22
7.1.1 Astillado de la muestra	24
7.1.2 Molienda de la muestra	24
7.1.3 Tamizado de muestras.....	25
7.2 Obtención de extractos crudos por la técnica Soxhlet	26
7.3 Cultivo de <i>Trametes versicolor</i> , <i>Gloeophyllum trabeum</i> y colecta de hongos provenientes de campo	28
7.4 Identificación molecular de aislados fúngicos.	30
7.4.2 Método de Neighbor-Joining (NJ) o vecino más cercano	32
7.5 PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	33
7.5.1 Pruebas de inhibición en placa	33
7.6 Efecto tóxico de los extractos crudos obtenidos del duramen de <i>Tectona grandis</i> por medio del cálculo de la concentración letal 50 <i>Artemia salina</i>	34
7.6.1 Crecimiento de <i>Artemia salina</i>	34
7.6.2 Determinación de la concentración de los extractos crudos para BSLT	35

7.6.3 Determinación de CL ₅₀	35
8 RESULTADOS.....	36
8.1 Características del tejido leñoso de <i>Tectona grandis</i>	36
8.1.1 Descripción de rodajas.....	36
8.2 Obtención de extractos del duramen.....	37
8.3 Organismos fúngicos colectados en campo.....	39
8.4 Identidad taxonómica de los aislados fúngicos.....	41
8.5 Ensayos de inhibición del crecimiento fúngico por extractos de <i>Tectona grandis</i>	42
8.6.1 Determinación de CL ₅₀	46
9 DISCUSIÓN.....	47
10 CONCLUSIONES.....	54
11 BIBLIOGRAFIA.....	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía y botánica de <i>Tectona grandis</i> (Miranda y Quiñones, 2018).	17
Tabla 2. Clasificación de la toxicidad de acuerdo a la actividad antifúngica (AFA).	33
Tabla 3. Peso obtenido en las diferentes partes de la rodaja.	37
Tabla 4. Descripción de las características físicas de los extractos obtenidos con cada solvente del duramen en ambas rodajas de teca.	38
Tabla 5. Cantidades obtenidas de extracto crudo (gramos) obtenido por solvente proveniente del duramen en la rodaja uno y dos	38
Tabla 6. Descripción general de los aislados fúngicos.	40
Tabla 7 Porcentajes de inhibición de los micelios sometidos a tratamientos con los extractivos.	46

Tabla 8. Resultados de CL₅₀ y CL₉₀ (reportados en µg/ml) de los extractos crudos obtenidos con los cuatro solventes. 46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la región donde se ubica la plantación de teca en el Rancho Guadalupe, el punto rojo señala el sitio de recolección del árbol seleccionado utilizado para este trabajo.	22
Figura 2. Árbol de teca seleccionado.	23
Figura 3. En el inciso (A) muestra el proceso de astillado y en el inciso (B) ilustra la exposición al aire libre para la pérdida de humedad de las astillas y después ser llevadas a molienda.	24
Figura 4. Esta imagen muestra el equipo utilizado para la molienda, en la parte superior se encuentra las astillas de la teca y debajo de la plataforma del aparato fue colocada una bolsa para recolectar la madera hecha harina.	25
Figura 5. El Proceso de tamizado (A) se realizó por zonas de cada rodaja, de igual modo cada zona hecha harina ya tamizada (B), se guardaron en bolsas herméticas separadas por zona y por tamaño de astilla (tamizada por la medida de cada malla).	26
Figura 6. Diagrama de bloques desde la astilla de nuestras muestras (las dos rodajas), obtención de harina tamizada, procedimiento del método Soxhlet para obtener los extractos crudos con los cuatro solventes empleados (Madera libre de extraíbles, ASTM D1105-56).	27
Figura 7. proceso de extracción Soxhlet (A) y uso de rotavapor (B).	28
Figura 8. Sitios donde se realizó la colecta de los aislados fúngicos, región de lago de Pátzcuaro (A), comunidad de Quinceo en Morelia (B) y laguna larga en Ciudad Hidalgo (C).	29
Figura 9. Cepas de <i>Trametes versicolor</i> causante de pudrición blanca (A) y <i>Gloeophyllum trabeum</i> pudrición café (B), cultivados en agar dextrosa Sabouraud.	30

Figura 10. <i>A. salina</i> en fase de Nauplio, observado bajo una lupa estereoscópica en objetivo 4x.	35
Figura 11. Descripción de rodaja 1, vista frontal (A) y vista lateral (B).	36
Figura 12. Descripción de rodaja 2, vista frontal (A) y vista lateral (B).	37
Figura 13. Extractos crudos del duramen de <i>Tectona grandis</i> . Obtenidos con hexano (A), diclorometano (B), Tetrahidrofurano (C) y acetona (D).	38
Figura 14. Hongos de campo en los sustratos antes de ser recolectados, se añadió su clave de diferenciación para realizar las secuencias de identificación.	39
Figura 15. Fragmentos de los arboles filogenéticos de las secuencias de los aislados fúngicos.	41
Figura 16. Fotografías representativas del ensayo microbiológico de los extraíbles crudos sobre los micelios de <i>Trametes versicolor</i> (T. v.) y <i>Gloeophyllum trabeum</i> (G. t.).	42
Figura 17. Imágenes representativas del ensayo microbiológico de los extraíbles crudos sobre los micelios UM-2, UM- 2(7) y UM-E2.	43
Figura 18. Imágenes representativas del ensayo microbiológico de los extraíbles crudos sobre los micelios UM-G1, UM- A4 y UM-4(9).	44
Figura 19. Imágenes representativas del ensayo microbiológico de los extraíbles crudos sobre los micelios UM-D1, UM- A5 y UM-C3.	45

1 RESUMEN

La madera es considerada un material de gran importancia en la historia del hombre debido a su versátil utilización, además, por su naturaleza orgánica es vulnerable a una serie de diversos factores entre ellos los hongos involucrados en su deterioro. Por su parte, se tiene madera de importante resistencia ambiental, e.g. el duramen de *Tectona grandis* se encuentran componentes capaces de generar resistencia frente a estos patógenos, que ofrece nuevas alternativas de preservantes de madera que no causen riesgos al ecosistema y a la salud humana. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de compuestos extractos crudos provenientes del duramen de *T. grandis* sobre diversos aislados fúngicos. Para cumplir con el propósito, se siguió la estrategia experimental que consintió en: los extractos crudos fueron obtenidos por el método Soxhlet con solventes orgánicos por polaridad creciente, hexano, diclorometano, tetrahidrofurano y acetona. Para ser ensayados frente diversos hongos como *T. versicolor*, *G. trabeum* y otros recolectados en campo, que posteriormente fueron identificados taxonómicamente. Finalmente, los extractos crudos también se evaluaron sobre el modelo biológico de *Artemia salina* (BSLT) con la finalidad de determinar su actividad citotóxica. Los resultados mostraron que los extractivos diclorometánicos mostraron mayor actividad biológica que el resto de los extractos obtenidos. En los ensayos antimicrobianos, se encontró una diferencia significativa frente a UM-2(7) con un 41%, *G. trabeum*; 35% y UM-4(9); 33% de inhibición, por su parte, y en el ensayo BSLT se obtuvo una CL₅₀ a una concentración de 37 µg/mL. observándose también que, los extractos provenientes del duramen de *T. grandis* presentan una importante actividad biológica y puede ser una nueva alternativa al uso de compuestos preservantes de madera.

Palabras clave: Hongos xilófagos, extractos crudos, actividad antifúngica, duramen, *Tectona grandis*.

ABSTRACT

The wood is considered a material of great importance in human history due to its versatile use, in addition, due to its organic nature it is vulnerable to a series of various factors, including the fungi involved in its deterioration. For its part, there is wood of significant environmental resistance, *e.g.*, the heartwood of *Tectona grandis* contains components capable of generating resistance against these pathogens, which offers new alternatives for wood preservatives that do not cause risks to the ecosystem and human health. The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of crude extracts from the heartwood of *T. grandis* on various fungal isolates. To fulfill the purpose, the experimental strategy that allowed in was followed: the crude extracts were obtained by the Soxhlet method with organic solvents by increasing polarity, hexane, dichloromethane, tetrahydrofuran and acetone. To be tested against various fungi such as *T. versicolor*, *G. trabeum* and others collected in the field, which were later taxonomically identified. Finally, the crude extracts were also evaluated on the biological model of *Artemia salina* (BSLT) in order to determine their cytotoxic activity. The results showed that the dichloromethane extractives showed greater biological activity than the rest of the extracts obtained. In antimicrobial trials, a significant difference was found against UM-2 (7) with 41%, *G. trabeum*; 35% and UM-4 (9); 33% inhibition, on the other hand, and in the BSLT test an LC₅₀ was obtained at a concentration of 37 µg / mL. It is also observed that the extracts from the heartwood of *T. grandis* present an important biological activity and may be a new alternative to the use of wood preservative compounds.

Key words: Xylophagous fungi, crude extracts, antifungal activity, heartwood, *Tectona grandis*.

2 INTRODUCCIÓN

La madera es un material de origen orgánico y está expuesta a una serie de ataques causados por diversos organismos fúngicos, insectos, bacterias, perforadores marinos e incluso animales superiores o también, factores abióticos como el fuego, desgaste mecánico y acción de la intemperie. La madera está constituida principalmente por tres macromoléculas (celulosa, lignina y hemicelulosa), estas representan una fuente de carbono ideal para los hongos xilófagos.

El reino fúngico es muy diverso, en él se encuentran hongos filamentosos patógenos en plantas, que pueden adaptarse fácilmente a cualquier tipo de ecosistema que, por consecuencia, estos organismos pueden degradar la madera por ser una fuente de sustratos rica en hidratos de carbono. La madera es degradada por la actividad enzimática, excretada por estos organismos, a estos últimos, se les conoce como hongos xilófagos.

Existen tres tipos de pudrición, la blanca; según Guzmán (2017) algunos hongos causantes de esta pudrición son *Ganoderma applanatum*, *Xyloria hypoxylon*, *Eutypa flavovirescens*, *Schizophyllum commune* y *Polystictus versicolor*. Pudrición parda o marrón; algunos ejemplos de acuerdo a Guzmán (2017) son *Poria monticola*, *Coniophora cerebella*, *Lencites betulina* y el recién nombrado *Merulius lacrymans*. Pudrición blanda; el hongo más importante causante de esta pudrición es *Chaetomium globosum* (Remacha, 2004). La especie *Ursulina deusta* es una de las más comunes que causan la pudrición blanda en árboles urbanos vivos (Zanni, 2004).

El deterioro de la madera es perjudicial, genera fuertes daños a nivel mecánico y físico, y representa un factor de riesgo en zonas urbanas al perjudicar construcciones y estructuras hechas a base de madera. Para proteger la madera del deterioro, se han fabricado numerosos productos, sin embargo, algunos se han prohibido debido a problemas de toxicidad ambiental y salud humana. Por ejemplo, el uso de preservantes como el arseniato de cobre cromatado (CCA), El pentaclorofenol (PCP) y 2-(tiocianometiltio) benzotiazol (TCMTB) han representado grandes riesgos ambientales. El aumento del interés por el desarrollo de nuevos compuestos no tóxicos y biodegradables, cuya finalidad de ser utilizados en la preservación de la madera y

también, contribuir con el cuidado del medio ambiente y la salud humana, se ha incrementado en los últimos años.

Dentro de las diversas especies de madera, han mostrado tener diferente grado de durabilidad frente a agentes del deterioro. Algunas especies maderables producen metabolitos secundarios llamados extractivos, que le confieren un nivel de resistencia frente a hongos e insectos y generalmente, estos suelen ser aceites esenciales, resinas, taninos, compuestos fenólicos que se encuentran principalmente en el duramen.

La especie arbórea *Tectona grandis* o también conocida como “Teca” tiene su origen al sureste de Asia, y a través del tiempo ha sido propagada a diversas regiones del mundo, como México y algunos otros lugares de América. Esta especie se ha destacado por su belleza como material y alta resistencia a plagas y enfermedades, que suelen afectar a diversas especies arbóreas, y por esta razón, se ha dado lugar a investigaciones orientadas a determinar y evaluar su composición química (Miranda y Quiñonez, 2018).

Además, *T. grandis* es valorada por su comercialización y sus diversos usos en la industria maderera. De acuerdo con Velázquez et al., 2018, la madera de *Pinus caribea* tratada con los extractos obtenidos del duramen de la teca (*Tectona grandis*) y otras dos especies arbóreas (*Handroanthus serratifolius*, *Centrolobium paraense*) frente a *G. trabeum* y *T. versicolor*, se observó al comparar los extractos obtenidos de *H. serratifolius* resultó ser el más efectivo en reducir el deterioro de la madera de *P. caribaea*, seguido del extracto de *C. paraense* y, con efectos más sutiles pero eficiente, el extracto de *T. grandis*. Este último a pesar de mostrar un efecto antifúngico moderado con respecto a los extractos provenientes de las otras dos especies, es eficaz sobre *G. trabeum* y *T. versicolor*, por tanto, concluyeron que los extractivos de origen natural son una alternativa como preservantes.

La mayoría de estos trabajos anteriores están enfocados en obtener extractivos de la Teca con diversos solventes, analizar los componentes presentes en cada solvente y evaluarlos en una corta gama de organismos patógenos. En este trabajo, los extraíbles provenientes del duramen de teca no solo se evaluaron frente a *T. versicolor* y *G. trabeum*, sino también, sobre otros nueve aislados fúngicos que fueron colectados en

campo e identificados taxonómicamente, algunos de estos géneros y especies no han sido reportados en ensayos de susceptibilidad frente a estos extractos.

Debido a la creciente problemática y rechazo a nivel mundial del uso de preservantes tradicionales que representan una fuente de contaminación, el propósito de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de compuestos extraíbles crudos provenientes del duramen de *Tectona grandis* sobre las cepas de *Gloeophyllum trabeum*, *Trametes versicolor* y diversos aislados fúngicos, aportando alternativas y conocimiento sobre esta línea de investigación.

3 ANTECEDENTES

La madera es un material común para la elaboración de muebles, productos derivados y construcción, tanto en regiones con grandes superficies de bosques como en las regiones con menos árboles. Sin embargo, existe una desventaja para su uso, debido a su durabilidad (Encinas, 2004). La madera como todo material orgánico, está expuesta a la descomposición y deterioro provocada por diversos agentes (biológicos, físicos, mecánicos y químicos).

Los agentes biológicos son los más peligrosos en la destrucción de los tejidos leñosos (Santini, 1988; citado por Gómez et al., 2011). Los más importantes organismos de la degradación de la madera son los hongos de pudrición blanca, marrón, blanda (Castro, 2000).

El ataque biológico sucede en distintas partes de la pared celular, depende del tipo de organismo y características metabólicas. La actividad biológica de especies fúngicas y bacterianas se favorece por distintos factores, por ejemplo, la humedad, la temperatura, luz, nutrientes, mecanismo de adsorción-desorción de la humedad en la madera, pH, flujo de aire ambiental y grado de penetración, concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono en la atmósfera (Brock, 2009; Schwarze, 2007).

La madera es un material vulnerable al deterioro y su protección con agentes químicos es óptima (Mai et al., 2004). Sin embargo, producen efectos adversos al ecosistema y salud humana, por consiguiente, nuevas alternativas ecológicas se buscan para el control

biológico sobre la protección de la madera. La protección química de la madera contra hongos xilófagos consiste en una serie de acciones con el fin de reducir y/o eliminar el deterioro (Mai et al., 2004), con la aplicación de sustancias químicas, se debe tomar en cuenta el principio activo con el fin de prolongar la vida útil de la madera (Cruz de León, 2010).

3.1 Composición y estructura química de la madera

La madera es un material complejo estructurado principalmente por celulosa, hemicelulosas y lignina (componentes principales) además contiene sustancias orgánicas e inorgánicas (componentes secundarios) y una cantidad variable de agua (Ávila et al., 2012). La proporción de estos componentes varía con la especie, entre la madera de árboles de misma especie y en diferentes partes del mismo árbol, en la albura y duramen, en dirección radial y longitudinal (Fengel y Wegener 1984).

3.1.1 Celulosa

La celulosa ((C₆H₁₀O₅)_n) se forma por regiones amorfas y cristalinas, la región amorfa es constituida por cadenas de celulosa más reducida, por tanto, es más susceptible al daño enzimático. La región cristalina, forma agregados extensos denominados microfibrillas, estabilizadas por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, esto le confiere más alta estabilidad química. La celulosa está polarizada (Martínez et al., 2005).

La celulosa es el principal componente de la madera, es un polímero lineal de alto peso molecular, compuesto por unidades de anhidro-D-glucopiranosas unidas con enlaces β-1-4 glucosídicos, constituye las paredes celulares de la planta leñosa, la celulosa es el polímero orgánico más abundante en el mundo. (Browning, 1967; Rinaldi, 2009; Ávila et al., 2012).

3.1.2 Lignina

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de las mismas en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono. En caso de la madera, los rangos más comúnmente encontrados son: Celulosa: 38-50%; Hemicelulosa: 23-32% y Lignina: 15-25% (Chávez-Sifontes y Domine, 2013). Es

un polímero tridimensional amorfo, constituido a partir de unidades de fenilpropano (Nogués, 2010).

3.1.3 Hemicelulosas

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante de la biomasa terrestre, después de la celulosa. Generalmente la hemicelulosa puede contener de dos a cuatro residuos de azúcares, estas pueden ser hexosa (D-manosa, D-glucosa y D-galactosa), pentosas (D-xilosa y D-arabinosa) o sus ácidos urónicos. El nombre dependerá de la composición en azúcares, por ejemplo: xilano, manano, galactano o arabinano (Cooper, 2013 citado por Oyola 2017). El xilano constituye el 70% de la hemicelulosa, es su principal componente (Dashtban *et al.*, 2009).

También llamadas poliosas, son polímeros de unidades de monosacáridos, el principal constituyente son las hexosas (glucosa ($C_6H_{12}O_6$), manosa y galactosa), y las pentosas (xilosa ($C_5H_{10}O_5$) y arabinosa) (Prinsen, 2010; Ávila *et al.*, 2012). Su papel es suministrar la unión entre lignina y celulosa para proporcionar rigidez a la pared celular y son insolubles en agua.

3.2 Agentes Biológicos

Los agentes biológicos o bióticos que degradan la madera son hongos, bacterias e insectos.

3.3.1 Agentes fúngicos

La pudrición de la madera una de las patologías muy común en arboles de zonas urbanas (Luley, 2015), la degradación fúngica implica la descomposición de celulosa, lignina y hemicelulosa. Los hongos son organismos saprofitos, necesitan una humedad entre el 30 y 50% en el sustrato, la mayoría requieren una temperatura entre 20 y 30 °C (Stokland *et al.*, 2012; Sjöström, 1993). Se estima que existen más 1.5 millones de especies de hongos y se dividen en cinco filos; *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascoimycota*, *Basidiomycota* y *Deutioromycota* (Hawksworth, 2001; García *et al.*, 2014). En el filo *Basidiomycota* se encuentran la mayoría de hongos causantes de la degradación de la madera (Encinas 2004; Encinas y Mora 2016).

Los hongos excretan enzimas extracelulares que degradan el sustrato, en los organismos xilófagos, sus enzimas degradan la pared celular (Blanchette, 1998). tales como la celulasa, proteasas y también ácidos orgánicos, por ejemplo; ácido oxálico ($C_2H_2O_4$), fumárico ($C_4H_4O_4$), acético (CH_3COOH), láctico ($C_3H_6O_3$), glucónico ($HOCH_2(CHOH)_4COOH$; $C_6H_{12}O_7$), glucurónico ($C_6H_{10}O_7$), etc., estos se depositan sobre el sustrato, y modifican sus propiedades químicas (Zabel y Morrell, 1992; Singh et al., 1992).

3.3.2 Hongos cromógenos

Los hongos cromógenos atacan el contenido celular de la madera produciendo coloraciones en la misma, debido a sus hifas pigmentadas (Ávila et al., 2012), puede ser causada por aproximadamente 100 a 250 especies de hongos pertenecientes a los ascomicetos y deuteromicetes (Käärik, 1980; Seifert, 1999).

La mancha azul (o mancha de la savia) es la pigmentación de la madera que se presenta en la albura como un rayado azul, gris o negro, aunque también genera otros colores amarillo-anaranjado o verdes (Ávila et al., 2012), los hongos cromógenos al igual que los mohos, se alimentan del lumen y tampoco producen degradaciones de la pared celular y se caracterizan por producir coloraciones como el azulado (Gonzales, 2012). La mancha azul ocurre en las coníferas, particularmente en el pino, pero también en abeto (*Abies alba*), picea (*Picea abies*) y alerce (*Fitzroya cupressoides*), o en maderas duras, como el haya (*Fagus sylvatica*) y abedul (*Betula pendula*) y en bosques tropicales (Schmidt, 2006).

3.3.3 Hongos xilófagos

Los hongos xilófagos o de pudrición son organismos eucariotas heterótrofos, y obtienen su alimento de forma directa e indirecta por absorción de los productos generados por exoenzimas (Campbell y Reece, 2007). Jiménez (2006) menciona tres tipos de pudrición, blanca, café y blanda. (Worrall et al., 1997; Kim y Singh, 2000; Lee, 2000; Schwarze, 2007). Son responsables de la pudrición de los materiales lignocelulósicos, y modifican sus propiedades físicas, químicas y mecánicas (Zanni, 2004). Cada pudrición afecta de manera diferente los componentes químicos de la madera (Prado, 2016). Son capaces

de utilizar la madera como alimento, degradan con enzimas la lignina y celulosa de la pared celular. Entre ellos, son los *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Zanni, 2008).

El hongo utiliza un complejo enzimático con actividad de oxidasas y peroxidasas para la degradación. (Quintero Díaz, 2011; García Ortiz et al., 2017). La lacasa (EC 1.10.3.2) es otra enzima en hongos de pudrición blanca (Orozco-Mosqueda et al., 2015).

3.4 Pudrición blanda

La pudrición blanda es causada por géneros correspondientes a la división *Ascomycota* y *Fungi Imperfecti* (hongos imperfectos), se caracteriza como “madera podrida en contacto con humedad excesiva”, sin embargo, puede ocurrir en ambientes secos (Saparrat et al., 2002; Schwarze y Fink, 1998). También es causada por hongos pertenecientes a los *Deuteromycota* que degradan la madera superficialmente (Saldarriaga, 2001).

Los Ascomicetes de mayor importancia causantes de la pudrición blanda son *Chaetomium globosum*, *Monodictys putredinis*. Y los *Sordariomycetes* son *Hypocrea muroiana*, *Cryphonectria parasitica* y *Fusarium oxysporum* (Kirk et al., 2001; Patel et al., 2013).

3.5 Pudrición blanca

La pudrición blanca es causada por hongos pertenecientes a los *Basidiomycota*, degradan la lignina rápidamente. El color blanquecino ocurre por oxidación y pérdida de la lignina. Algunos ejemplos son; *Trametes versicolor*, *Phanaerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* (Martínez et al., 2005), *Trametes hirsuta*, *Schizophyllum commune* (Orozco-Mosqueda et al., 2015).

Trametes versicolor o *Coriolus versicolor*, se encuentra en madera descompuesta, posee una trama de aspecto poroso y variados colores por lo que es llamado “cola de pavo”. Provoca podredumbre sobre madera de árboles planifolios, coníferas e incluso árboles frutales, es muy frecuente y por lo regular crece en cualquier época del año (Calvo, 2010; citado por Macas y Méndez, 2013).

T. versicolor se encuentra en zonas templadas de bosques subtropicales, degradada madera en árboles caídos y también en arboles vivos, causa la deslignificación de los

polímeros de la madera, es un basidiomiceto causal de podredumbre blanca, produce de lacasa (Macas y Méndez, 2013).

3.6 Pudrición café o marrón

También conocida como parda o marrón, es causada por hongos pertenecientes a los *Basidiomycota*, son hongos que degradan la hemicelulosa y celulosa (Gonzales, 2012).

Estos se desarrollan sobre madera de coníferas y representan sólo el 7 % de los basidiomicetes degradadores de madera. Modifican parcialmente la lignina, la cual torna un color pardo (lignina oxidada). La celulosa es rápidamente despolimerizada incluso en las primeras etapas de descomposición (Saparrat et al., 2002).

Algunos ejemplos de *Agaricomycetes* causantes son; *Serpula lacrymans*, *Coniophora puteana*, *Antrodia vaillantii*, *Lentinus lepideus*, (Orozco-Mosqueda et al., 2015).

El basidiomiceto *Gloeophyllum trabeum* es un representante de los hongos de la pudrición parda, oxida los componentes de la pared celular de la madera, y provoca una rápida pérdida de resistencia de la madera (Goodell, 2003).

G. trabeum, su capacidad hidrolítica se ve apoyada por reacciones de tipo Fenton, en las que radicales libres producidos por reacciones químicas oxidan la celulosa (Dimarogona et al., 2013; Kenneth et al., 2001; Yakovlev et al., 2012).

Produce 2,5-dimetoxihidroquinona (2,5-DMHQ) extracelular, que reduce el Fe³⁺. Está implícito que esta reacción también produce el radical semiquinona 2,5-DMHQ, que reacciona reversiblemente con O₂ para producir 2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona (2,5-DMBQ) y el radical perhidroxilo (-OOH). (Halliwell y Gutteridge. 1999).

G. trabeum produce no solo 2,5-DMHQ sino también otra hidroquinona, 4,5-dimetoxicatecol (4,5-DMC), capaz de reducir una variedad de quinonas (Paszczynski et al., 1999).

En segundo lugar, *G. trabeum* produce ácido oxálico extracelular (Espejo y Agosin, 1991). El oxalato quela fuertemente el Fe³⁺ (Park et al., 1997; Smith et al., 1998).

3.7 Lacasa (Lac)

La lacasa (EC 1.10.3.2) es una fenoloxidasa, enzima que cataliza la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua (Gianfreda y Bollag, 1999). A través de la utilización de ciertos compuestos rédox puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina (Cambria et al., 2008). Contienen átomos de cobre y se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias (Galhaup y Haltrich, 2001).

La lacasa ataca principalmente los sustratos fenólicos en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (1-HBT), 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) o ácido violúrico, actúan como co-oxidantes, y la habilitan para atacar los sustratos más difícilmente oxidables, como los de tipo no fenólico (Papinutti et al., 2003).

3.8 Monooxigenasas Líticas de Polisacáridos (LPMO)

El primer mecanismo supone que la oxidación ocurre en el carbono 1 de la glucopiranososa, esta oxidación llevaría a una desestabilización del enlace glicosídico producción de un ácido aldónico y no liberaría extremos reductores desde la celulosa. El segundo mecanismo, el carbono oxidado es el 4. El posterior quiebre del enlace glicosídico produciría un extremo reductor y la formación de una 4-cetoaldosa en las hebras resultantes. La actividad de las LPMOs requiere de la presencia en el medio de ion cobre (II) y de un agente reductor (Westereng et al., 2011).

Sin embargo, se ha postulado que *in vivo*, este donador de electrones podría tratarse de otra enzima actuando sinérgicamente con las LPMOs. La enzima que se ha propuesto para cumplir este rol es la celobiosa deshidrogenasa (CDH). Esta enzima, único flavocitocromo producido por hongos, tendría la capacidad de entregar los electrones necesarios para la actividad de las LPMOs a través de la oxidación de celobiosas (Langston et al., 2011).

3.9 Bacterias

Las bacterias segregan pectinasas que disuelvan las membranas de las punteaduras del parénquima, que son de naturaleza péctica. Destruyen las punteaduras areoladas, aumentan la permeabilidad de la madera y facilita el ataque posterior de otros organismos principalmente el de hongos (Alfieri, 2018).

3.10 Insectos

Los insectos que atacan la madera son termitas pertenecientes al orden Isóptera; familias *Kalotermitidae*, *Termopsidae* y *Rhinotermitida* y los coleópteros del orden Coleóptera; familias *Anobiidae*, *Lyctidae*, *Curculionidae*, *Cerambycidae* y *Bostrichidae* (Alfieri, 2018). Los que provocan los mayores daños se encuentran: Carcomas (*Anobiidae*); Lícidos o polillas de madera (*Lyctidae*); Escolitidos (*Curculionidae*); Taladro (*Cerambycidae*); Escarabajo (*Bostrichidae*), (Alfieri, 2018).

3.11 Agentes abióticos

Los agentes abióticos o no biológicos, representan factores como la humedad, fuego, acción climática, desgaste mecánico y radiación solar.

3.11.1 Humedad

La humedad es un agente degradante significativo para la madera ya que produce su degradación ya sea por pérdida de estabilidad dimensional o por el crecimiento de agentes microbianos degradantes (Stamm, 1959 citado por Alfieri, 2018).

A medida que se añade agua a la pared celular, el volumen de madera aumenta proporcionalmente al volumen de agua añadida. Provoca que la madera se hinche hasta que la pared celular es saturada. A esto se le conoce como punto de saturación de la fibra, varía de 20 a 50 por ciento en ganancia de peso (Khazaei, 2008).

La celulosa y hemicelulosa son más higroscópicas que la lignina y, por tanto, son las principales responsables de la absorción de humedad. Esta interacción hace que la madera sea un material higroscópico, la madera tiene como función el transporte de agua de la raíz hasta las hojas (Yang et al., 2006; Winandy, 2001).

3.11.2 Fuego

La descomposición es a menudo considerada como la superposición de los mecanismos de descomposición de cada uno de los componentes individuales: la hemicelulosa es el primer polímero que se descompone (180 a 350 °C), seguido de la celulosa (275 a 350 °C) y lignina (250 a 500 °C). La estabilidad térmica de la lignina se considera que es debido a su gran estructura reticulada y de alto peso molecular (Bland, 1991; Reszka, 2008).

3.11.3 Acción climática y desgaste mecánico

El clima influye en la durabilidad de las maderas no tratadas; el tiempo húmedo y cálido favorece la pudrición de la madera expuesta a la intemperie en mayor medida que el tiempo seco y frío. Toda madera que está expuesta a condiciones de movimiento, sufre un deterioro por desgaste, producto del roce. La fricción rompe las fibras disminuyendo sus propiedades fisicomecánicas (Alfieri, 2018).

3.11.4 Radiación solar

La radiación solar está constituida por un amplio rango de longitudes de onda entre los cuales se encuentra la luz ultravioleta (295 a 400 nm) que posee gran cantidad de energía y por lo tanto genera deterioros significativos, aunque solo constituye el 5% de la luz solar; la luz visible (400 a 700 nm) la cual si bien no tiene energía suficiente para romper uniones químicas, causa variaciones en el color de la madera, en este caso constituye el 45% de la luz solar y por último, la luz infrarroja (700 a 2500 nm) la cual produce calor y por ende acelera los procesos de degradación, esta constituye el 50% de la luz solar. Cuando la madera se expone a la luz solar cambia de color. Si es clara, torna a oscuro y si es oscura vira a clara; luego, todas las maderas se tornan grises produciéndose además una fotodegradación física y química de las células superficiales de la madera. Los aspectos más importantes de la degradación química son la formación la generación de radicales libres, oxidación por acción de la fracción UV de la luz solar en presencia de oxígeno, y la producción de un efecto post-radiación que se comprueba por la formación de dióxido de carbono, hidrógeno, agua, metanol, formaldehído y ácidos orgánicos; la reducción de la cantidad de lignina y aumento de la acidez y por la formación de productos volátiles (Alfieri, 2018).

3.12 Ejemplos de maderas de alta durabilidad

La madera de especies como *Tectona grandis*, *Chamaecyparis nootkatensis*, *Thuja plicata*, presentan una alta resistencia al deterioro causado por insectos y hongos; debido a la presencia de compuestos químicos como las tectoquinonas y quinonas (Haupt et al., 2003; Taylor et al., 2006; Thulasidas y Bhat, 2007).

Por otro lado, Paes et al., (2016) realizaron una evaluación comparativa entre *Acacia mangium*, *Casuarina sp*, *Cloeziaria eucalypto*, *torelliana Corymbia* y *Tectona grandis*, estas cinco especies demostraron una mayor resistencia que también puede tener la Teca (*T. grandis*) al ataque de las termitas (*Nasutitermes corniger*).

3.13 *Tectona grandis* L.f. (Teca)

La Teca es un árbol caducifolio de gran tamaño, alcanza 45 m de altura. Es originario del sudeste de Asia de ambiente tropical, tiene gran valor económico, es plantada extensamente para la producción de madera para la construcción naviera, muebles y carpintería en general (Weaver, 2000). La Teca es muy antigua y fue plantada aproximadamente 100 años en América; este árbol está distribuido en casi todas las áreas tropicales del planeta. Es capaz de persistir, dominar y regenerarse naturalmente (Nieto, 2011). Es una madera muy valiosa debido a su durabilidad, color, fuerza, no se deteriora al contacto con el agua y metales; gracias a su buen contenido de aceites y resinas naturales (Pérez, 2015).

En México, *Tectona grandis*, se ha adaptado bien en regiones de los estados de Campeche, Chiapas, Tabasco, Veracruz, Michoacán y Nayarit (CONAFOR, 2013).

3.13.1 Usos de la Teca

En medicina tradicional, la madera hecha en polvo se utiliza para combatir la dermatitis, mientras sus flores se emplean como diuréticas y su leño es sudorífico (Rojas y Rodríguez, 2008).

La Teca tiene alborno claro y de color marrón vivo y brillante, es utilizada para la fabricación de muebles, laminación, compensados, leña y carbón (Paes et al., 2016). También es usada como primera opción para la construcción de puentes y muelles (por

su excelente resistencia al agua), vagones y durmientes de ferrocarril, carpintería y barcos (Telles et al., 2017).

Los residuos que genera la industria maderera, son utilizados actualmente para la producción de pellets o briquetas, que son biocombustibles (Tenorio et al., 2016)

La Teca es muy apreciada a nivel mundial para diferentes aplicaciones, por las características específicas atribuidas en parte a sus aceites naturales, como por ejemplo su olor distintivo similar al del cuero, al ser seccionada, o su gran resistencia al fuego como a la descomposición (Armijos, 2014).

3.13.2 Taxonomía y botánica de *Tectona grandis* L.f.

Es un árbol con corteza áspera y fisulada de 1,2 m de espesor, color café claro que desfolia en placas grandes y delgadas, los árboles ordinariamente presentan dominancia apical (Landeta, 2009), la **tabla 1** describe su clasificación taxonómica.

Las hojas son opuestas firmes, miden alrededor de 11 a 85 cm de largo y entre 6 a 50 cm de ancho, presenta peciolo gruesos (González, 2007).

Flores de cáliz campanulado, color blanco, borde dentado, los pétalos forman un tubo corto, 5 o 6 estambres impregnados debajo del tubo de la corola, anteras amarillas, ovadas y oblonga, estigma blanco amarillento bífido, ovario ovado, densamente pubescente, con cuatro celdas (Landeta, 2009).

El fruto es una drupa, globosa y dura, su cuerpo consta de cuatro cámaras que contienen generalmente 1 o 2 semillas de 5 mm de largo su tamaño varía entre 5 a 20mm (Landeta, 2009). La semilla es redonda, aproximadamente de 6mm x 4mm, sobrevive a períodos de deshidratación, el 40% de los frutos de Teca contienen una semilla, mientras que un 16% contiene dos semillas (Monge, 2011).

Tabla 1. Taxonomía y botánica de *Tectona grandis* (Miranda y Quiñones, 2018).

Reino	Plantae
División	<i>Angiosperma</i>
Clase	<i>Dicotyledonae</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Verbenaceae</i>
Genero	<i>Tectona L. f.</i>
Especie	<i>Tectona grandis L.f</i>

3.13.3 Composición química de la Teca

La madera Teca contiene 50% de Carbono, 6% de Hidrógeno, 44% de Oxígeno y pequeñas cantidades de compuestos inorgánicos. También celulosa y hemicelulosa están presentes entre un 65 a 75%, y en conjunto de estos la lignina entre un 18 a 35% (Pardo, 2013).

3.13.4 Durabilidad de Teca

Remacha (2004) definió la durabilidad natural como la resistencia intrínseca de la madera frente a degradaciones que pueden producir los agentes destructores de esta misma.

Berrocal y Rojas (2006) argumentó que la durabilidad depende de distintos factores, entre ellos su proceso de duraminización, y poseen propiedades inhibitoras para el crecimiento de patógenos, sustancias como; aceites esenciales, compuestos fenólicos e hidrosolubles, taninos, gomas, resinas y todas estas en alta toxicidad.

Thulasidas y Bhat (2007) sugirieron que la durabilidad del duramen de Teca, es conferida por la tectoquinona y naftoquinona, compuestos aromáticos del grupo de las antroquinonas o quinonas naturales. La naftoquinona es el compuesto que muestra mayor resistencia a la descomposición de la madera contra hongos de putrefacción. *Tectona grandis* ha demostrado una alta resistencia al ataque de las termitas (Paes et al., 2016).

3.14 Preservantes

Son productos empleados para proteger la madera contra algún agente degradador específico. Un preservante debe reunir aspectos tales como ser tóxico sólo para los

agentes degradadores, no ser combustible, tener buena penetración, ser estable, no descomponerse, no ser soluble en agua y tener buena permanencia. Ningún producto en el mercado reúne todos los requisitos deseados (Canadian Wood Council, 1995; Majada et al., 2013; Mohebbly y Militz, 2002).

Los conservantes generalmente se basan en biocidas como sulfato de cobre, óxido de cobre, arsénico, naftenato de cobre, cobre-8-hidroxiquinolinato, 2-fenilfenol, pentaclorofenol y otros compuestos fenólicos, carboxamidas, compuestos de tributilestaño, isotiazolonas, compuestos de amonio cuaternario o tiazoles azaconazol, propiconazol, tebuconazol (Ávila, 2008; Cruz de León 2010; González et al., 2015), éstos compuestos químicos para la protección de la madera son eficientes, pero son nocivos para el ecosistema y para la salud (Crawford et al., 2000; Peylo y Willeitner 2001; Humphrey, 2002).

Por tanto, se buscan alternativas de tratamiento como el control biológico que es el uso de organismos y/o de metabolitos o subproductos que son antagonistas naturales de una plaga o patógeno, con el fin de eliminar efectos dañinos en las plantas. (Susi et al., 2011). Los fungicidas sintéticos como las sales a base de cobre-cromo-arsénico (CCA), cobre-cromo-boro (CCB) y cobre-amonio cuaternario (ACQ), entre otros. Son efectivos en proteger la madera, en cambio generan problemas toxicológicos en la salud humana y daño ecológico (Peredo, 1993; Schultz y Nicholas, 2002; Antwi y Damoah, 2010; Singh y Singh, 2012).

El arseniato de cobre cromatado (CCA) es un compuesto hidrosoluble ampliamente utilizado a escala mundial y nivel industrial por su alta efectividad como antifúngico e insecticida y buena capacidad de fijación, brindando protección a la madera a largo plazo. Aun teniendo buena fijación, con el paso del tiempo y en particular en ambientes ácidos puede ocurrir la lixiviación de sus componentes, entre ellos, el arsénico inorgánico, muy peligroso para la salud. Como ejemplos de compuestos orgánicos óleo-solubles de alta toxicidad y gran poder de penetración se encuentran el pentaclorofenol (PCP) y 2-(tiocianometiltio) benzotiazol (TCMTB); en el caso del PCP, su fabricación, uso y/o comercialización ha sido prohibido por su elevada peligrosidad para la salud y el ambiente. Si bien muchos países han reemplazado productos por alternativos

considerados “menos dañinos”, en ocasiones éstos resultan más costosos y se posee escaso conocimiento respecto a su comportamiento e impacto ambiental. Como ejemplo, se pueden mencionar el compuesto cúprico de amonio cuaternario (ACQ) y el óxido de cromo, cobre y boro (CCB) como reemplazos alternativos del CCA. A raíz de esto, en los últimos años ha ido creciendo el interés por el desarrollo de nuevos compuestos no tóxicos y biodegradables que puedan ser utilizado en la preservación de la madera (Keil, 2004; Murguía, 2012).

4 JUSTIFICACIÓN

Debido a la creciente petición de madera a nivel mundial, y que estén acompañadas de tecnología limpia que atienda la demanda de organismos encargados del cuidado ambiental y salud humana, una nueva oportunidad académica, biotecnológica y comercial se propicia para el diseño de preservantes para su aplicación en madera de baja durabilidad. Por lo anteriormente dicho, el propósito de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de extractos crudos provenientes de *T. grandis* sobre el crecimiento de diversos hongos causantes del deterioro de la madera.

5 HIPOTÉISIS

Los extractos crudos obtenidos del duramen de Teca ejercen un efecto inhibitorio sobre diversos hongos relacionados con el daño en madera.

6 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica de extractos crudos provenientes de *T. grandis* sobre el crecimiento de diversos hongos causantes del deterioro de la madera.

6.1 Objetivos específicos

- 1- Obtener los extractos provenientes del duramen de *Tectona grandis* L. f.
- 2- Evaluar los extractos con actividad biológica antifúngica provenientes del duramen de *Tectona grandis* L. f.
- 3- Analizar la actividad citotóxica de los extractos de duramen derivados de *Tectona grandis* L. f.
- 4- Escrudiñar la actividad inhibitoria de los extractos crudos obtenidos del duramen sobre diferentes aislados fúngicos.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de la madera de *Tectona grandis* L. F.

La madera de *Tectona grandis* se recolectó en la plantación forestal del rancho Guadalupe, ubicado en el municipio de Nuevo Urecho, Michoacán (**Figura 1**), el árbol seleccionado tenía una edad aproximada de 14 años.

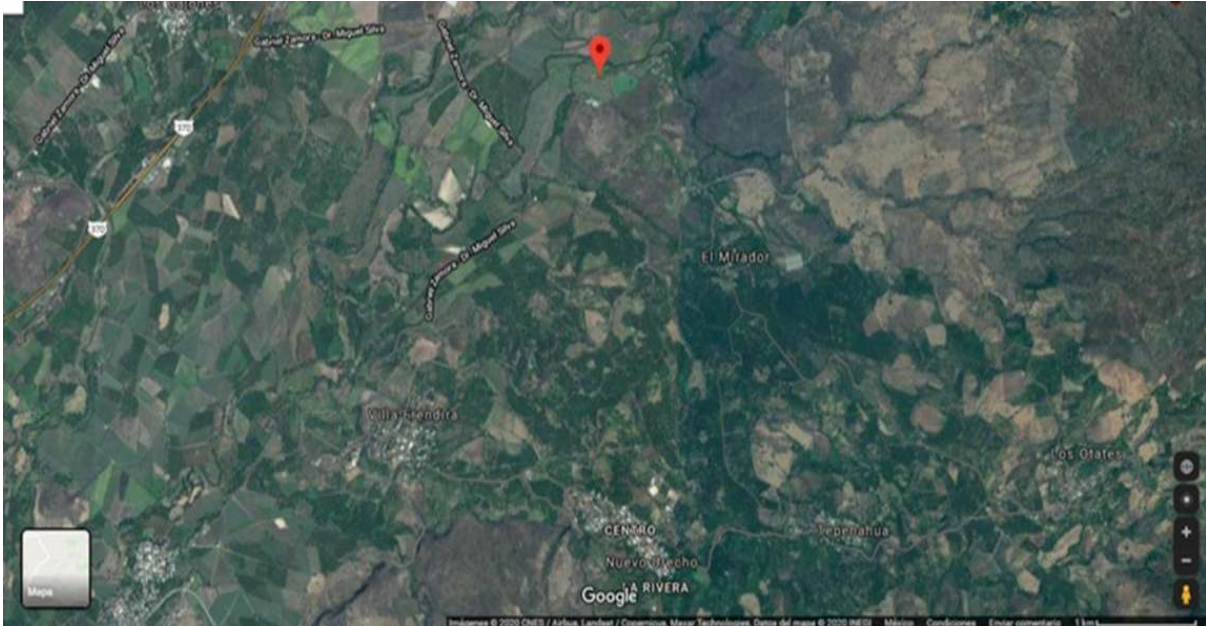


Figura 1. Mapa de la región donde se ubica la plantación de teca en el Rancho Guadalupe, el punto rojo señala el sitio de recolección del árbol seleccionado utilizado para este trabajo.

Todas las coordenadas de este trabajo se registraron con la ayuda de la página <https://www.google.com.mx/maps> a través del dispositivo móvil Huawei Y9 2019, la ubicación exacta del sitio donde se encontraba el árbol seleccionado y las coordenadas capturadas fueron las siguientes; 19°12'10.4"N 101°52'22.1"W (19.202874, -101.872814).



Figura 2. Árbol de teca seleccionado.

La **figura 2** muestra el árbol seleccionado, donde se obtuvieron dos rodajas a una altura aproximada de 1.30 m o conocido como altura de pecho, este dato se midió con ayuda de cinta métrica. A continuación, se describirán los procesos para obtención de harina tamizada de ambas rodajas seleccionadas.

7.1.1 Astillado de la muestra

En este proceso se separaron cada zona (corteza, albura y duramen) de ambas rodajas, el duramen y la corteza de ambas rodajas se astillaron con formón y martillo, cuando estas zonas estaban astilladas, fueron expuestas al aire libre para pérdida de humedad como se muestra en **figura 3**.

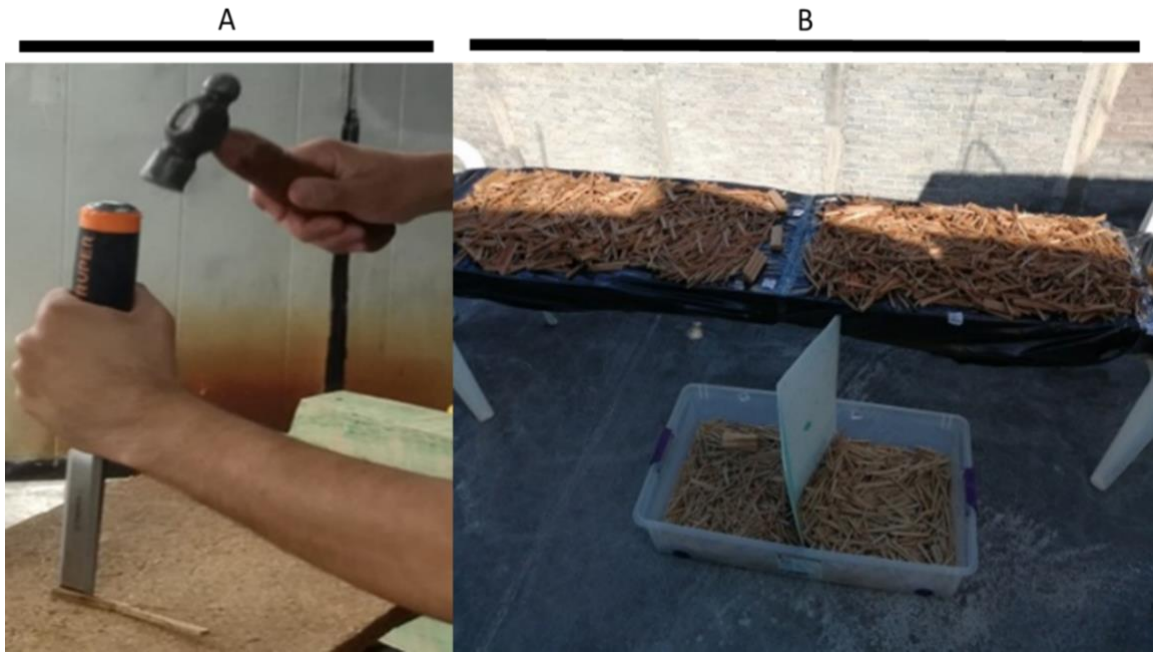


Figura 3. En el inciso (A) muestra el proceso de astillado y en el inciso (B) ilustra la exposición al aire libre para la pérdida de humedad de las astillas y después ser llevadas a molienda.

7.1.2 Molienda de la muestra

Las astillas de teca fueron llevadas a un molino de la marca MICRON modelo K2OF para obtener la madera en forma de harina, mostrado en **figura 4**.



Figura 4. Esta imagen muestra el equipo utilizado para la molienda, en la parte superior se encuentra las astillas de la teca y debajo de la plataforma del aparato fue colocada una bolsa para recolectar la madera hecha harina.

7.1.3 Tamizado de muestras

Las muestras de harina de madera se tamizaron en el equipo marca TYLER, modelo RX-29 con las mallas de la 20 (850 μm) hasta la 60 (250 μm) hasta obtener finas partículas de harina, la **figura 5** lo ejemplifica, también muestra el peso calculado.



Figura 5. El Proceso de tamizado (A) se realizó por zonas de cada rodaja, de igual modo cada zona hecha harina ya tamizada (B), se guardaron en bolsas herméticas separadas por zona y por tamaño de astilla (tamizada por la medida de cada malla).

7.2 Obtención de extractos crudos por la técnica Soxhlet

La harina de madera obtenida con anterioridad y tamizada con malla 40 (425 μm) se utilizó para las extracciones por técnica Soxhlet, técnica desarrollada en 1897 y una de las más utilizadas para la obtención de extractos a partir de especies vegetales (Fidalgo-Used et al., 2007). La harina de duren fue preparada para de las extracciones Soxhlet de la siguiente manera (**Figura 6**), se pesaron 12 g de harina de cada rodaja, después se colocaron en “cartuchos o dedales” (Extraction thimble, marca Whatman GE Healthcare) para eventualmente introducirlas al interior de los equipos Soxhlet (marca KIMAX 24/40), fue tratada por 5 horas a reflujo con los siguientes solventes (tratados por polaridad creciente): hexano (CAS 110-54-3), diclorometano (CAS 75-09-2), tetrahidrofurano (CAS 109-99-9) y acetona (CAS 67-64-1). Los matraces de marca KIMAX con capacidad de 250 mL 24/40, que contenían las muestras tratadas fueron llevadas a rotavapor (marca BUCHII) para obtención de extracto crudo. La **figura 6** muestra las etapas para la extracción Soxhlet de los extractos crudos, y en la **figura 7** muestra el equipo montado y en uso para la obtención de extractivos provenientes de duramen.

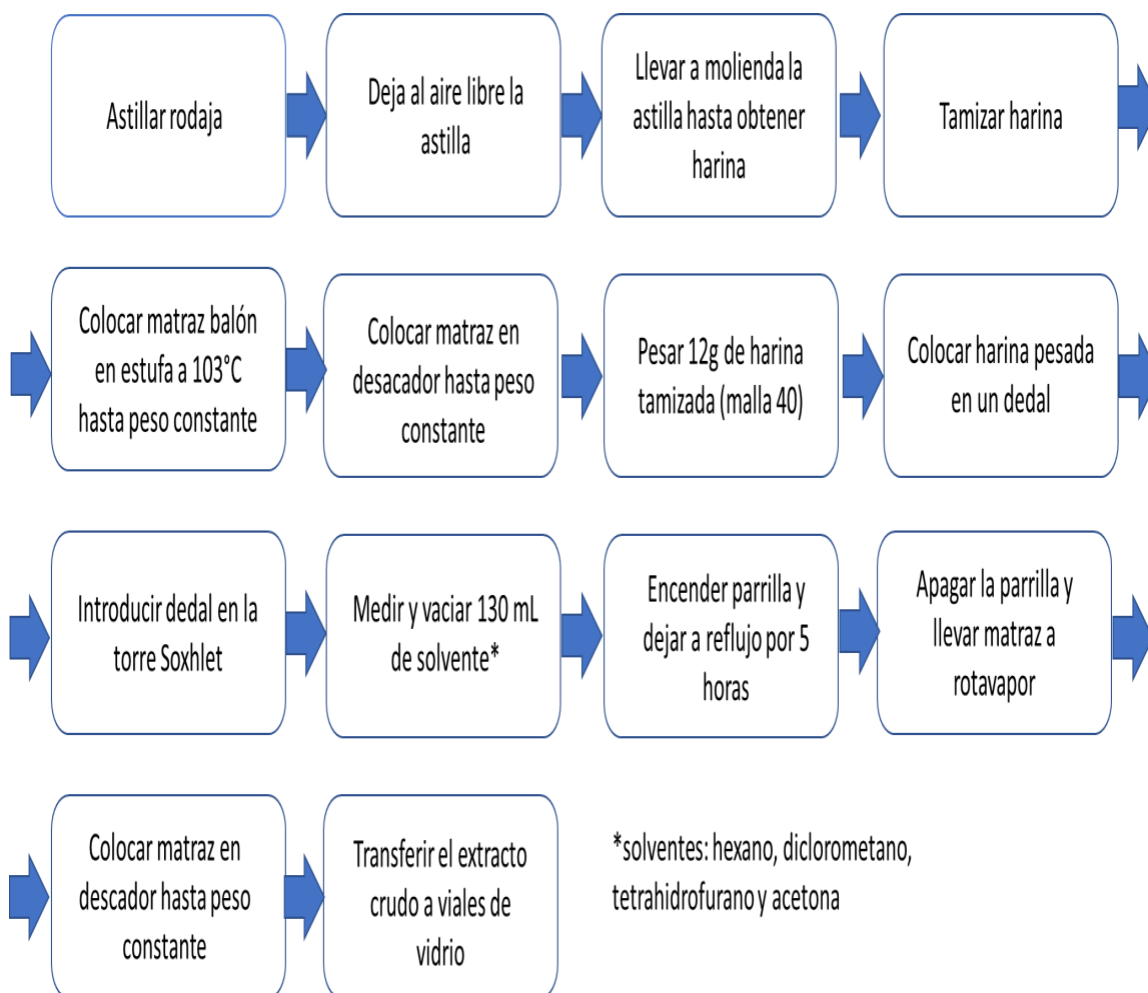


Figura 6. Diagrama de bloques desde la astilla de nuestras muestreas (las dos rodajas), obtención de harina tamizada, procedimiento del método Soxhlet para obtener los extractos crudos con los cuatro solventes empleados (Madera libre de extraíbles, ASTM D1105-56).

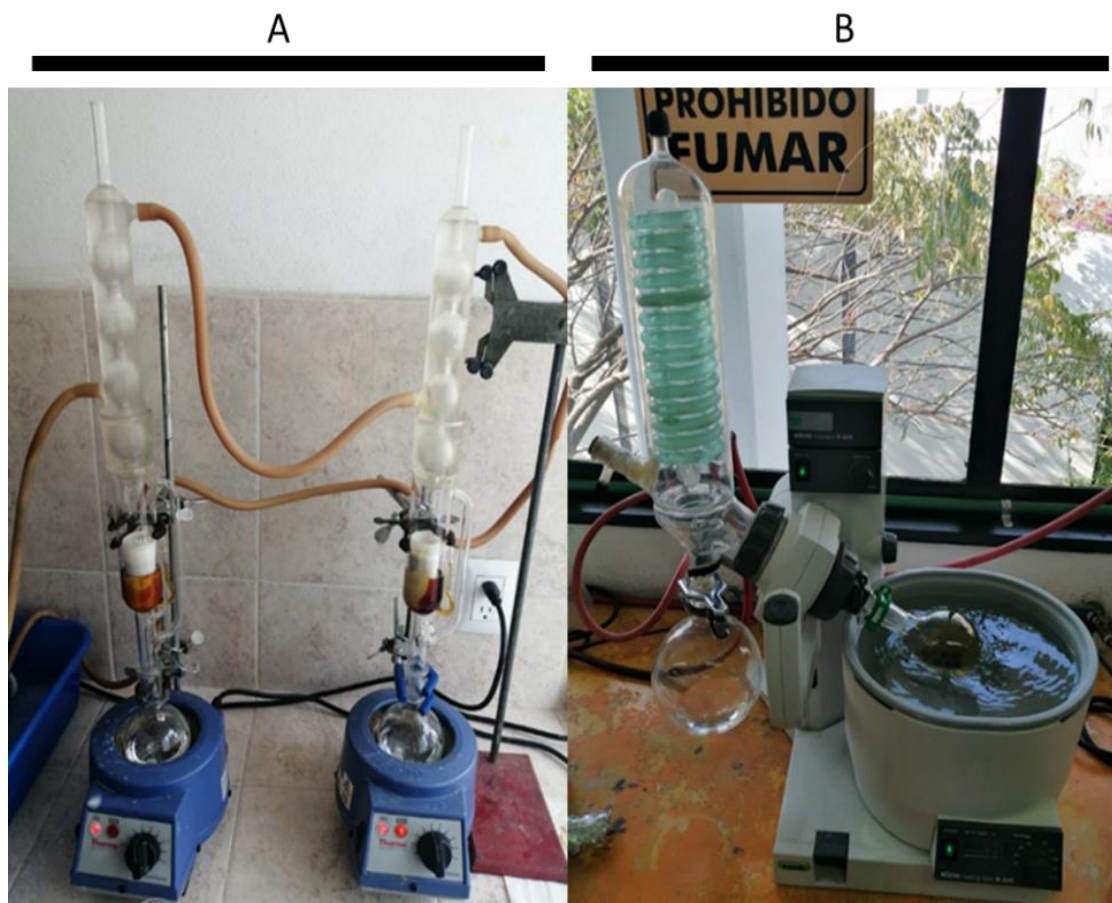


Figura 7. proceso de extracción Soxhlet (A) y uso de rotavapor (B).

La ilustración muestra un color café oscuro del solvente empleado dentro de la torre Soxhlet, dentro del Thimble se encuentra la harina del duramen de teca, esto indica que hay mayor concentración de metabolitos secundarios (A). El matraz se llevó a rotavapor para remover el exceso de solvente utilizado y dejar solamente el extraíble crudo (B).

7.3 Cultivo de *Trametes versicolor*, *Gloeophyllum trabeum* y colecta de hongos provenientes de campo

Las cepas para este estudio fueron *Trametes versicolor* CTB-863A y *Gloeophyllum trabeum* BAM Ebw 109, donados por los laboratorios del departamento de madera celulosa y papel de la Universidad de Guadalajara y su página web; <http://diving.cucei.udg.mx/laboratorios-del-departamento-de-madera-celulosa-y-papel>. Además se realizó una colecta de hongos encontrados en tocones y madera derribada en zonas boscosas ubicadas en las regiones contiguas a la ciudad de Pátzcuaro, en laguna

larga de ciudad hidalgo (19°47'53.9"N 100°40'58.5"W; 19.798297, -100.682916) y en arboledas a faldas del cerro de Quinceo (19°44'02.9"N 101°13'49.0"W; 19.734127, -101.230289) en Morelia, gracias a las condiciones ecológicas y climatológicas en estas localidades favorecen al desarrollo de una gran diversidad de especies de hongos en particular los xilófagos. Se tomaron los carpóforos de los hongos presentes en madera derribada en contacto con el tronco con ayuda de una navaja de montaña, fueron etiquetados (Baltazar y Buendía, 1986), (Tinoco, 1990). Las muestras fueron guardadas en bolsas herméticas para su traslado al laboratorio de microbiología de la FITECMA para sembrarse junto con los dos primeros hongos que fueron donados. Los hongos colectados se lavaron con agua destilada estéril, con el fin de limpiar los hongos y se realizaron subcultivos hasta obtener cultivos axénicos es decir, colonias puras, se sembró un trozo de cada carpóforo, después se sembraron por 7 días hasta que el micelio cubra toda la superficie de la placa, bajo las siguientes condiciones: a una temperatura de 28 °C +/-2, en la incubadora marca Autonics, modelo TZ4ST, cultivados en agar dextrosa Sabouraud marca BD BIOXON, con la siguiente composición química de gramos/litro: dextrosa 40.0 g, peptona de carne 5.0 g, peptona de caseína 5.0g y agar 15.0 g, con un pH final de 5.6 +/- 0.2, esterilizado por 15 min a 121°C/15 lb de presión, se resembran cada tres semanas hasta la aplicación de las extracciones.

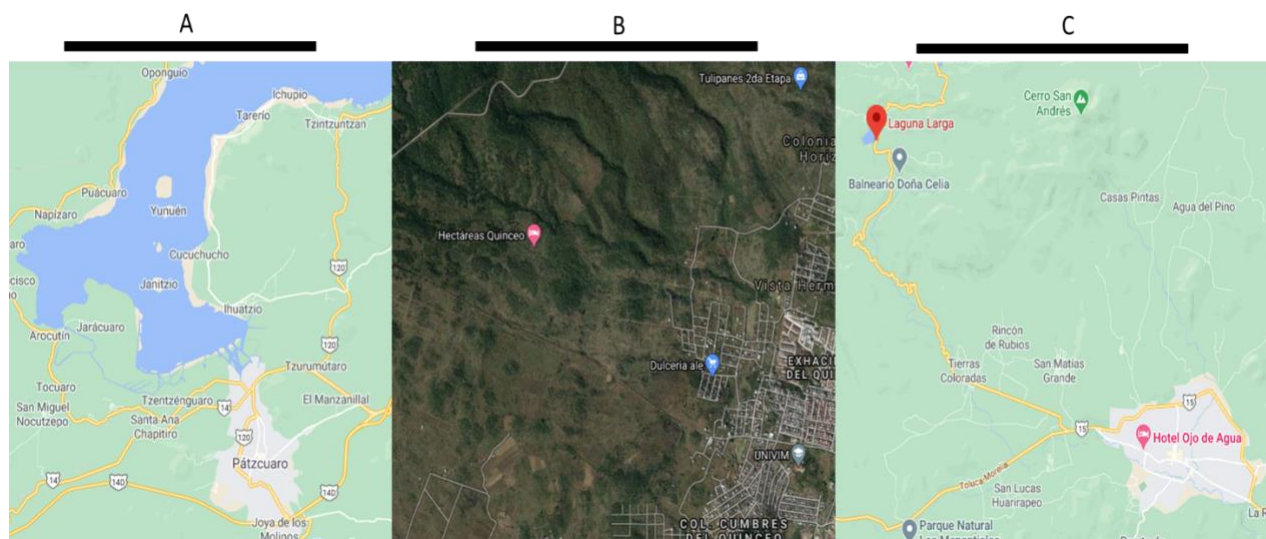


Figura 8. Sitios donde se realizó la colecta de los aislados fúngicos, región de lago de Pátzcuaro (A), comunidad de Quinceo en Morelia (B) y laguna larga en Ciudad Hidalgo (C).

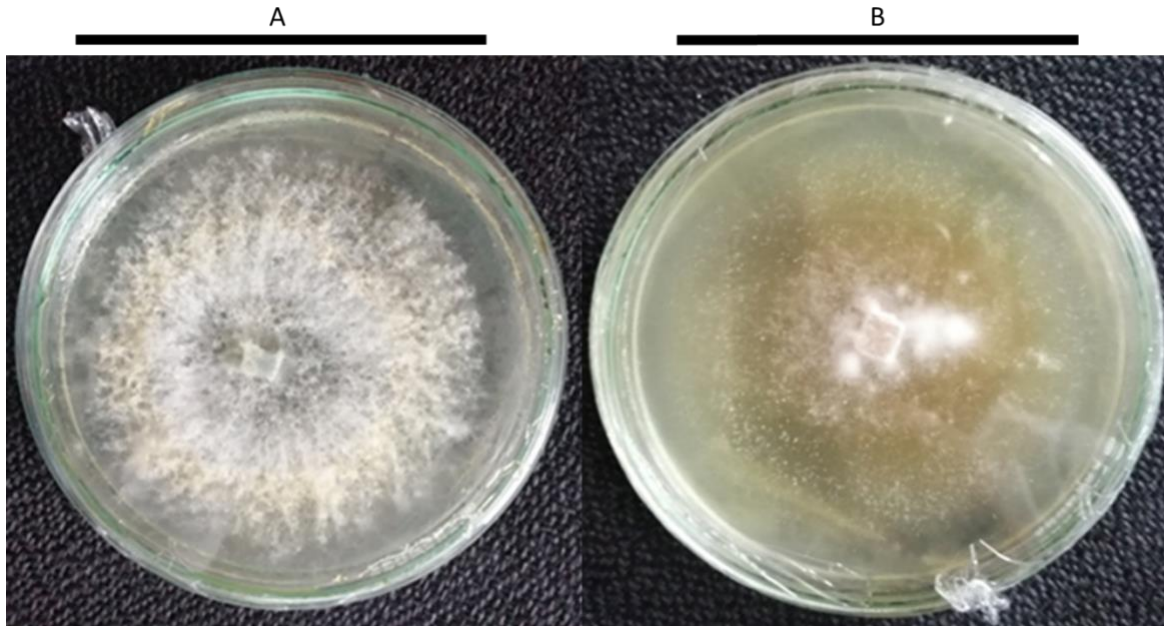


Figura 9. Cepas de *Trametes versicolor* causante de pudrición blanca (A) y *Gloeophyllum trabeum* pudrición café (B), cultivados en agar dextrosa Sabouraud.

7.4 Identificación molecular de aislados fúngicos.

Los aislados fúngicos se llevaron al Laboratorio de Ecología Microbiana y Biología del Desarrollo Vegetal, que pertenece al Instituto de Químico Biológicas de la UMSNH, para extraer y amplificar su ADN genómico de cada microorganismo por el método PCR y eventualmente realizar las secuenciaciones para la identificación por método de Neighbor-Joining (NJ) o vecino más cercano.

7.4.1 Extracción de DNA de asilados fúngicos por método PCR.

La biología molecular ofrece herramientas para complementar los inconvenientes que genera el estudio morfológico descriptivo de los hongos entre la cual destaca la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Rodríguez et al., 2004).

Se extrajo el ADN genómico de los aislados fúngicos recolectados de acuerdo a la metodología descrita por Raeder y Broda (1985):

Se pesaron 100 mg de micelio y se colocó en un tubo de 1.5 mL, se agregó 0.4 g de perlas de vidrio, 200 μ L de buffer de lisis (0.2 M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.01 M

EDTA, 1 % de SDS) y 200 μ L de fenol: cloroformo: isoamímilo (25:24:1). El contenido fue mezclado en vórtex durante 6 min.

Se adicionó 300 μ l de fenol: cloroformo:isoamílico y 300 μ l de buffer de lisis. Las muestras fueron mezcladas en vórtex durante 30 s y se centrifugaron a 14 000 r.p.m. durante 30 s.

La fase superficial fue transferida a un tubo de 1.5 mL y se agregó 300 μ L de cloroformo: isoamílico (24:1). Luego fue agitado en vórtex durante 10 s. Nuevamente las muestras se centrifugaron a 14 000 r.p.m. durante 30 s. La primera fase fue transferida a un tubo limpio de 1.5 mL y se agregó 2.5 volúmenes de isopropanol. Las muestras se mantuvieron en un congelador a -20 °C durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 14 000 r.p.m. durante 5 min. El sobrenadante se decantó y la pastilla se lavó con 500 μ L de etanol al 70% y se centrifugó durante 3 min a 14 000 r.p.m. El etanol se decantó y la pastilla fue secada en campana de flujo laminar Las muestras fueron resuspendidas en 30 μ L de agua desionizada estéril.

El ADN genómico fue visualizado en gel de agarosa (1 %) mediante electroforesis, con el fin de corroborar su integridad. Después las muestras serán cuantificadas en NANODROP 2000c (Termo Scientific®).

Para la identificación de los aislados fúngicos se llevó a cabo mediante PCR del gen ribosomal 18S, se usaron los oligonucleótidos NS1 Y NS6 (White et al., 1990). La reacción PCR se hizo a un volumen final de 50 μ L: 20 ng de ADN (2 μ L), 3 μ L de NS1 (10 μ M), 3 μ L de NS6 (10 μ M), 25 μ L de PCR Master Mix 2x (Promega®) y 17 μ L de agua libre de nucleasas. El siguiente programa se usó de amplificación, 35 ciclos de amplificación con 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 a 72 °C durante 3 min. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa (1 %) mediante electroforesis, con el fin de corroborar la amplificación y el tamaño de la banda esperado (~1 400 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 su Biodiversidad (Langebio, www.langebio.cinvestav.mx). Las secuencias obtenidas se

ensamblaron con el software CodonCodeAligner (CodonCodecorp., www.codoncode.com/aligner). Una vez ensambladas, las secuencias fueron comparadas con secuencias depositadas en la base de datos del GenBank, por medio de la herramienta básica de búsqueda de alimentos locales (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), con el fin de encontrar las secuencias homologas más cercanas, los grupos taxonómicos fueron ampliados descargando secuencias pertenecientes a cada grupo de hongos.

Todas las secuencias requieren ser cargadas al software MEGA7 (www.megasoftware.net), también alineadas usando ClustalW. Una vez obtenido el alineamiento, procederá a la generación de un árbol filogenético, utilizando el método de máxima parsimonia y una prueba de soporte de la tipología de 1000 seudorréplicas (bootstrap), esto con el fin de asignar las secuencias a grupos taxonómicos específicos.

7.4.2 Método de Neighbor-Joining (NJ) o vecino más cercano

El método NJ es frecuentemente usado en estudios de “código de barras molecular” (DNA barcoding) (Hebert et al. 2004, 2010), el cual consiste en utilizar un segmento de 648 bases nitrogenadas del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI) como identificador único para cada especie del reino animal (Hebert et al. 2003).

El objetivo fundamental de este método es poder identificar individuos cuando se desconoce la especie a la que pertenecen. Además, existe la posibilidad de descubrir especies crípticas en grupos de morfología compleja o inaccesible (Hebert et al. 2003, Silva-Brandão et al. 2009). Esto es factible ya que la variabilidad intra-específica de esta secuencia es menor que la variación existente entre especies diferentes. Luego de secuenciar el fragmento del COI para grupos de individuos, especies de un mismo género, o incluso especies pertenecientes a diferentes filos (Hebert et al., 2003), dependiendo del nivel taxonómico que se quiera estudiar, es necesario analizar las secuencias.

El algoritmo NJ fue creado por Saitou y Nei, (1987) y consiste en generar un único “árbol filogenético” final, el cual, no necesariamente será el “árbol verdadero”. En el paso inicial, se unen los dos neighbors (secuencias) que tengan la menor distancia genética. Luego, este par inicial se considera como una sola entidad, y se busca el siguiente terminal que

tenga la menor distancia genética con este. El procedimiento continúa hasta unir todos los terminales al “árbol filogenético” (Saitou y Nei, 1987). En el caso de secuencias de ADN, la distancia genética entre dos terminales se calcula en base al número total de sustituciones de bases nitrogenadas (Saitou y Nei, 1987).

7.5 PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

7.5.1 Pruebas de inhibición en placa

El medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud se preparó en cajas Petri, se esterilizó en autoclave marca AESA, modelo CV 300, a 121°C/15min/15 lb presión, al término de este proceso se impregnaron los extractos crudos obtenidos con cada uno de los cuatro solventes sobre papel filtro de 2.5 cm x 1.3 cm a una concentración de 1.2 mg/mL de cada uno. Una vez solidificado el agar se inoculó con el micelio de los hongos en campana de flujo marca Novatech modelo CFLH-120E, se incubó por 7 días a 28 ±2°C (Rutiaga, 2001; Martínez, 2011). De igual manera se preparó un control el cual consistió en medio de cultivo y un papel filtro sin extractos con las mismas dimensiones anteriormente mencionadas. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió el crecimiento del hongo sobre en medio de cultivo y se determinó el porcentaje de inhibición que presentaron los extractos el cual fue dado por la siguiente formula.

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

De acuerdo a Rutiaga-Quiñones (1999), la actividad antifúngica o inhibitoria de los extractos o metabolitos secundarios se clasifican de la siguiente manera.

Tabla 2. Clasificación de la toxicidad de acuerdo a la actividad antifúngica (AFA).

Clasificación de toxicidad	Porcentaje de actividad antifúngica (AFA)
Altamente tóxico	75-100
Tóxico	50-75
Moderadamente tóxico	25-50
Poco tóxico	Menor a 25
No tóxico	0
Promotor de crecimiento	Negativo

7.6 Efecto tóxico de los extractos crudos obtenidos del duramen de *Tectona grandis* por medio del cálculo de la concentración letal 50 *Artemia salina*.

Las pruebas citotóxicas generalmente son costosas, requieren disciplina, equipo sofisticado, obtención de sangre y personal de tiempo completo, esto conlleva a buscar nuevos métodos que sean igual de sensibles, pero reduzcan tiempo, costos y cantidad de muestra requerida. BSLT, por sus siglas en inglés (Brine shrimp lethality test) o ensayo de letalidad en *Artemia* es una óptima alternativa para este trabajo. Esta prueba usualmente es utilizada para detección y evaluación tóxica de compuestos bioactivos provenientes de extractos de plantas, determinación de pesticidas, metales pesados, aditivos para alimentos o algunas drogas. El uso de BSLT aumenta debido a los bajos costos, alta sensibilidad para la detección de compuestos citotóxicos y el uso de cantidades menores de muestras en comparación con otros métodos, además las larvas de *Artemia salina* empleadas para este ensayo son muy semejantes a una célula de mamífero, es rápido, simple y barato, debido al uso de mínimas cantidades de material para cada prueba (Mirzaei, et al., 2013).

7.6.1 Crecimiento de *Artemia salina*

Este ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Vegetal que pertenece al CIDAM (Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentaria de Michoacán, A.C.) y su página web <https://www.cidam.org/>. Se prepararon dos litros y medio de agua de mar o salada (al 3% de sal de mar san-Halita “Instant ocean”, especial para acuarios) en una pecera (4 L de capacidad), con un termostato, el agua se mantuvo a una temperatura de 25°C para ser expuesta a una fuente de iluminación (aproximadamente 2000 lux) en la superficie del agua y aireación constante que mantuvo niveles de oxígeno superior a 2 mg/L (Sorgeloos, et al., 1986). Los quistes de *A. salina* fueron colocados, se dejaron eclosionar hasta llegar a la fase de nauplio (figura 10), después de 72 horas, el cultivo de *Artemia* se encontró en el estadio mencionado anteriormente, las cuales fueron utilizadas para este ensayo.



Figura 10. *A. salina* en fase de Nauplio, observado bajo una lupa estereoscópica en objetivo 4x.

7.6.2 Determinación de la concentración de los extractos crudos para BSLT

Los extractos crudos provenientes del duramen de ambas rodajas obtenidos con los cuatro solventes (hexano, diclorometano, tetrahidrofurano y acetona), se usaron para estas pruebas, se preparó una solución stock de 3mg/mL de extracto disuelto en DMSO (dimetil sulfoxido; CAS 67-68-5), para así, a partir de esta, trabajar con siete concentraciones distintas, en un intervalo de 7.5 hasta 120 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados significativos se obtuvieron a concentraciones de 60, 90 y 120 $\mu\text{g/mL}$ en un lapso de tiempo entre 12 y 24 horas.

7.6.3 Determinación de CL_{50}

La concentración letal 50 (CL_{50}) se determinó con los nauplios de *Artemia salina*. Las larvas fueron colocadas en placas multipozos marca "Costar" de 96 pocillos, 6 larvas fueron colocadas en cada pozo, para cada extracto se utilizaron siete concentraciones (7.5, 15, 22.5, 30, 60, 90 y 120 $\mu\text{g/mL}$). El agua salada absoluta (192 μL) y otro con un volumen (8 μL) de DMSO fueron usados como controles, con la intención de descartar que el DMSO tuviera un efecto sobre el cálculo de la CL_{50} . La muerte de las larvas se determinó cada 12 horas por un período máximo de 24 horas, los nauplios fueron

observados con un estereoscopio marca “Celestron Labs” a través del objetivo 4x, a las 24 horas fueron contadas las larvas muertas en cada pocillo.

La CL_{50} se calculó por el método de regresión lineal elaborado a partir de datos de mortalidad cuidando que los valores fueran de 0 a 100% y que mostraran un valor de R^2 mayor o igual a 0.75, cumplidos estos criterios se obtuvo la ecuación de la recta para el cálculo de la CL_{50} .

8 RESULTADOS

8.1 Características del tejido leñoso de *Tectona grandis*

8.1.1 Descripción de rodajas

Las dos rodajas pesaron 5.4 kilos cada una, El diámetro de la primera rodaja fue de 26.95 cm y ancho de 11 cm. Por su parte, la segunda rodaja presentó diferencia de +/- 1cm en diámetro y ancho, aproximadamente, con respecto a la rodaja 1.



Figura 11. Descripción de rodaja 1, vista frontal (A) y vista lateral (B).

La **figura 11** describe la primera rodaja obtenida de la teca, el duramen midió 19.9 cm de diámetro, presentó un color mostaza, la albura midió 2.2 cm de grosor aproximadamente con un color café claro y la corteza midió 1.05 cm de grosor, de color café oscuro y con una textura similar a la de un corcho.

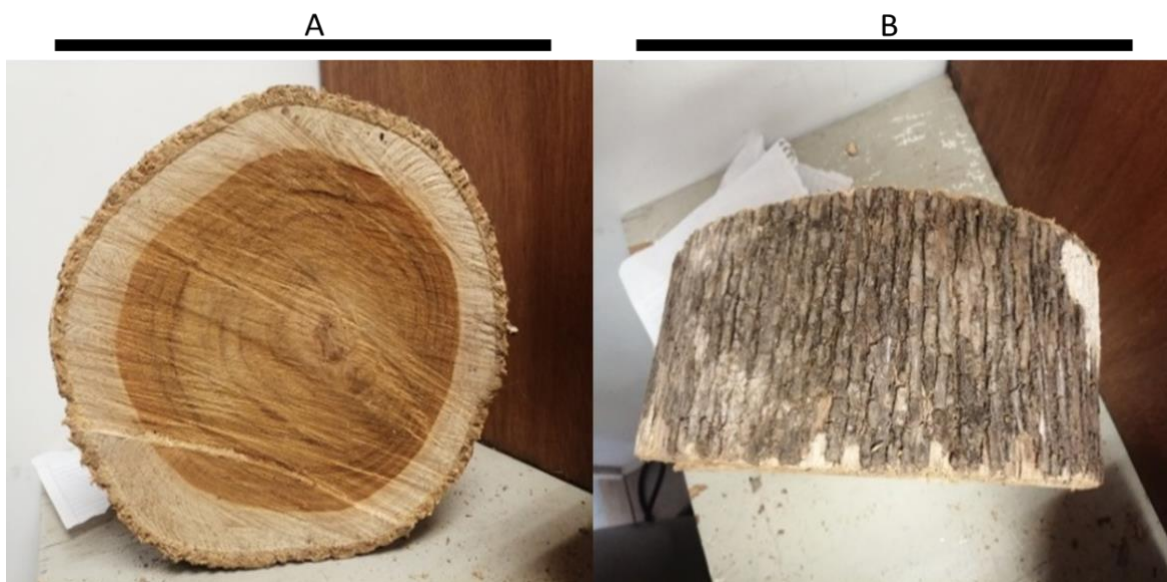


Figura 12. Descripción de rodaja 2, vista frontal (A) y vista lateral (B).

La **figura 12** describe la segunda rodaja obtenida de la madera de teca, esta presentó una mínima diferencia de dimensiones con respecto a la primera rodaja.

La **tabla 3** muestra el peso por zona de cada rodaja (harina), estas son menores con respecto a las rodajas completas (tal y como fueron tomadas del fuste del árbol) hay una diferencia de peso debido a la pérdida de humedad.

Tabla 3. Peso obtenido en las diferentes partes de la rodaja.

Zonas de rodaja 1	Peso (gramos)	Zonas de rodaja 2	Peso (gramos)
Corteza	300.4	Corteza	278.9
Albura	862	Albura	806
Duramen	1450	Duramen	1128
Total	2612.4	Total	2212.9

8.2 Obtención de extractos del duramen

La **figura 13** nos muestra que no hay diferencias en sus aspectos físicos entre los extractos obtenidos de la rodaja uno y dos (izquierda y derecha, respectivamente) con cada solvente. Además, esta ilustra el aspecto y color de los extraíbles obtenidos del

duramen, en la **tabla 4** describe sus características físicas, y en la **tabla 5** están las medias (promedios) de las cantidades en gramos obtenidas de extractos crudos provenientes del duramen de teca.

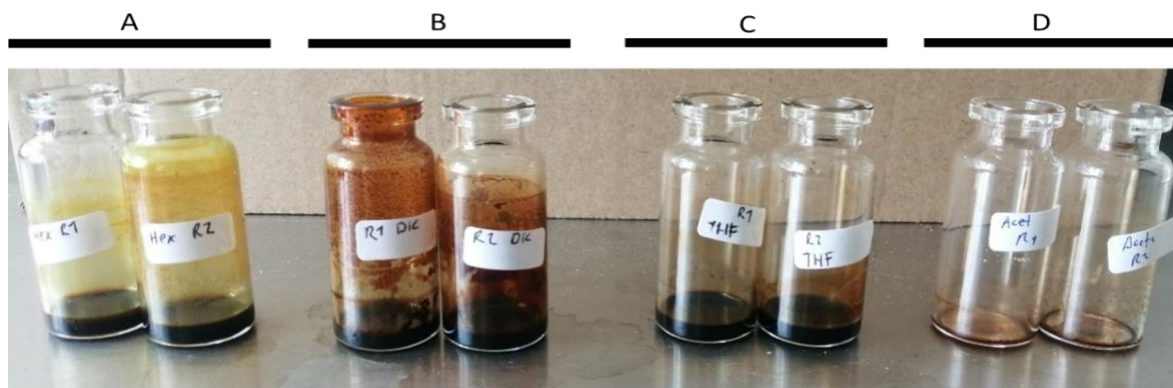


Figura 13. Extractos crudos del duramen de *Tectona grandis*. Obtenidos con hexano (A), diclorometano (B), Tetrahidrofurano (C) y acetona (D).

Tabla 4. Descripción de las características físicas de los extractos obtenidos con cada solvente del duramen en ambas rodajas de teca.

Solvente	Aspecto	Color
Hexano	Pastoso	Amarillo ámbar
Diclorometano	Semisólido/seco	Marrón
Tetrahidrofurano	Pastoso	Café oscuro
Acetona	Sólido/seco	Café

Tabla 5. Cantidades obtenidas de extracto crudo (gramos) obtenido por solvente proveniente del duramen en la rodaja uno y dos

Obtención por rodaja	Solventes utilizados			
	Hexano	Diclorometano	Tetrahidrofurano	Acetona
Rodaja 1 (gramos)	0.9507	0.3309	0.376	0.1526
Rodaja 2 (gramos)	0.9432	0.3487	0.4467	0.0948

8.3 Organismos fúngicos colectados en campo

En total se asilaron 9 hongos, a partir de del gen ribosomal 18S, se usaron los oligonucleótidos NS1 Y NS6, se identificaron solamente ocho, de los cuales predomina el género *Aspergillus* (UM-2(7), UM-G1, UM-A4, UM-4(9) Y UM-A5), también del género *Macrophomina* (UM-E2), género *Marasmius* (UM-D1) y otro del género *Umbilicaria* (UM-C3). Solamente una cepa (UM-2) no se logró identificar. La **figura 14** muestra los sustratos de los aislados que se lograron identificar.



Figura 14. Hongos de campo en los sustratos antes de ser recolectados, se añadió su clave de diferenciación para realizar las secuencias de identificación.

La **tabla 6** muestra las claves asignadas para los aislados fúngicos, también está escrita la ubicación, es decir, la zona geográfica de donde fue recolectada (localidad), el sustrato donde se encontraba el cuerpo del hongo, sus características en campo y en cultivo, por último, su identificación y secuencias por el método de NJ.

Tabla 6. Descripción general de los aislados fúngicos.

CLAVE	LOCALIDAD	SUSTRATO	DESCRIPCION EN CAMPO	DESCRIPCION EN CULTIVO	IDENTIFICACION
UM-2	CD Hidalgo	Tocón	Color anaranjado	Colonia de color gris blanquecino	No identificado
UM-2(7)	Pátzcuaro	Tocón	Color café	Colonias de color negro; micelio blanco; reverso incoloro; textura granular a flocosa ¹	<i>Aspergillus niger</i>
UM-E2	Morelia	Madera derribada	Esclerocios de forma esférica a irregular, negros, lisos ²	Colonia de color gris aspecto vellosos ² , oscurece el medio de cultivo ³	<i>Macrophomina phaseolina</i>
UM-G1	Morelia	Madera derribada	Color crema	Colonias de color negro; micelio blanco; reverso incoloro; textura granular a flocosa ¹	<i>Aspergillus niger</i>
UM-A4	Morelia	Rama	Color café	Colonias de color anaranjado pálido o color carne; micelio blanco; reverso en tonos amarillentos; textura granular o algo flocosa ¹	<i>Aspergillus terreus</i>
UM-4(9)	Pátzcuaro	Tocón	Color crema	Colonias de color negro; micelio blanco; reverso incoloro; textura granular a flocosa ¹	<i>Aspergillus awamori</i>
UM-D1	Morelia	Madera derribada	Color pardo, cutícula arrugada, con estrías. Láminas libres ⁴	Colonia color gris, aspecto aterciopelado	<i>Marasmius alliaceus</i>
UM-A5	Morelia	Rama	Color marrón	Colonias de color anaranjado pálido o color carne; micelio blanco; reverso en tonos amarillentos; textura granular o algo flocosa ¹	<i>Aspergillus terreus</i>
UM-C3	Morelia	Madera derribada	Talo monófilo cara superior ligeramente pardusca, agrietada ⁵	Colonia color blanca, aspecto aterciopelado	<i>Umbilicaria freyi</i>

1. Abarca, M. L. (2000), 2. Leyva-Mir et al., (2015), 3. Mmbaga et al., (2018), 4. <https://www.fichasmicologicas.com> y 5. Barreno y Pérez-Ortega (2003).

8.4 Identidad taxonómica de los aislados fúngicos

La **figura 15** muestra un fragmento de cada de los arboles filogenéticos de los ocho aislados fúngicos que se lograron identificar, su homología para identificación por el método de neighbor-joining (el vecino más cercano).

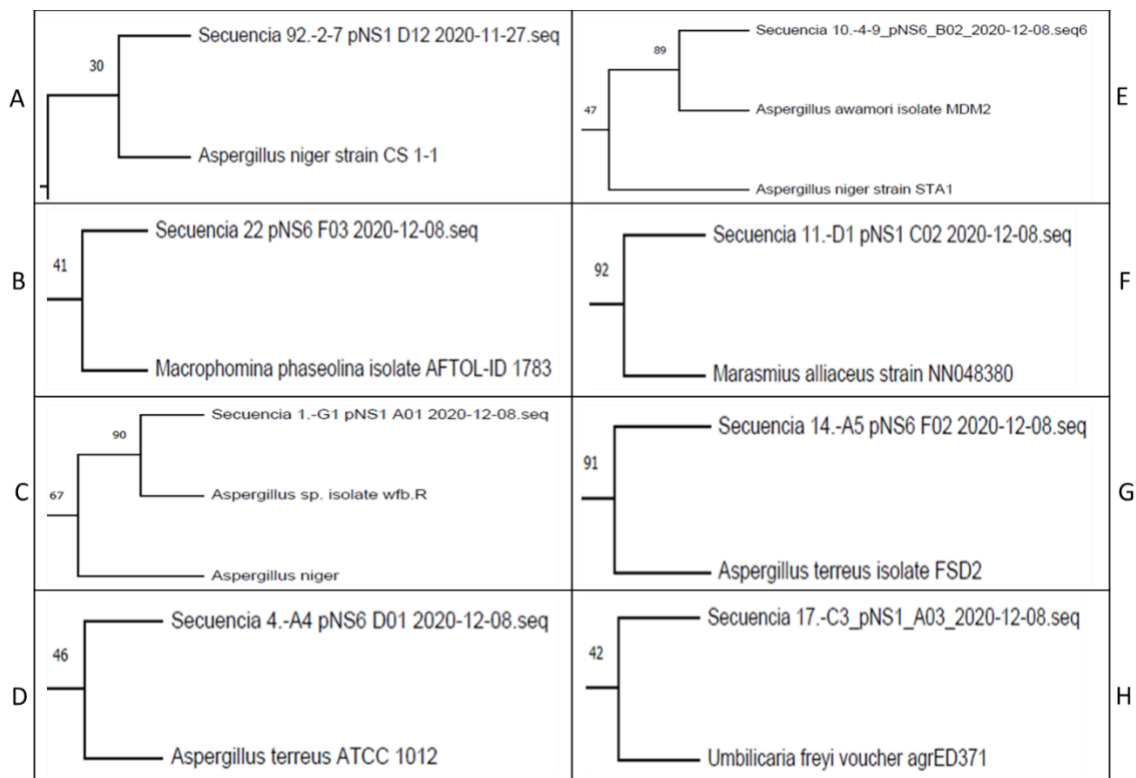


Figura 15. Fragmentos de los arboles filogenéticos de las secuencias de los aislados fúngicos.

La secuencia 92 de la cepa UM-2(7) corresponde a *Aspergillus niger* strain CS 1-1 (A), secuencia 22 de UM-E2 corresponde a *Macrophomina phaseolina* isolate AFTOL-ID 1783 (B), secuencia 1 de UM-G1 corresponde a *Aspergillus sp.* (C). las secuencias 4 y 14 de UM-A4 y UM-A5 corresponden a *Aspergillus terreus* ATCC 1012 y isolate FSD2 (D y G) respectivamente, la secuencia 10 de la cepa UM-4(9) corresponde a *Aspergillus awamori* isolate MDM2 (E), secuencia 11 de UM-D1 corresponde a *Marasmius alliaceus* strain NN048380 (F), y, por último, secuencia 17 de UM-C3 corresponde a *Umbilicaria freyi* voucher agrED371 (H).

8.5 Ensayos de inhibición del crecimiento fúngico por extractos de *Tectona grandis*

Actividad inhibitoria contra hongos del deterioro de la madera

La **figura 16** muestra la actividad antifúngica de los extraíbles crudos del duramen de teca obtenidos con los cuatro solventes empleados (1.2 mg/mL) con los cuatro solventes empleados sobre los micelios de *Trametes versicolor* (*T. v.*) y *Gloeophyllum trabeum* (*G. t.*) en agar dextrosa Sabouraud, extractos hexánicos (A), diclorometánicos (B), tetrahidrofuránicos (C) y acetónicos (D), en el caso de *T. versicolor*, los extractos tetrahidrofuránicos tuvieron un mayor efecto inhibitorio sobre el micelio con un 25% de inhibición, y para *G. trabeum*, los extractos diclorometánicos ejercieron una mayor inhibición de 35% para este último.

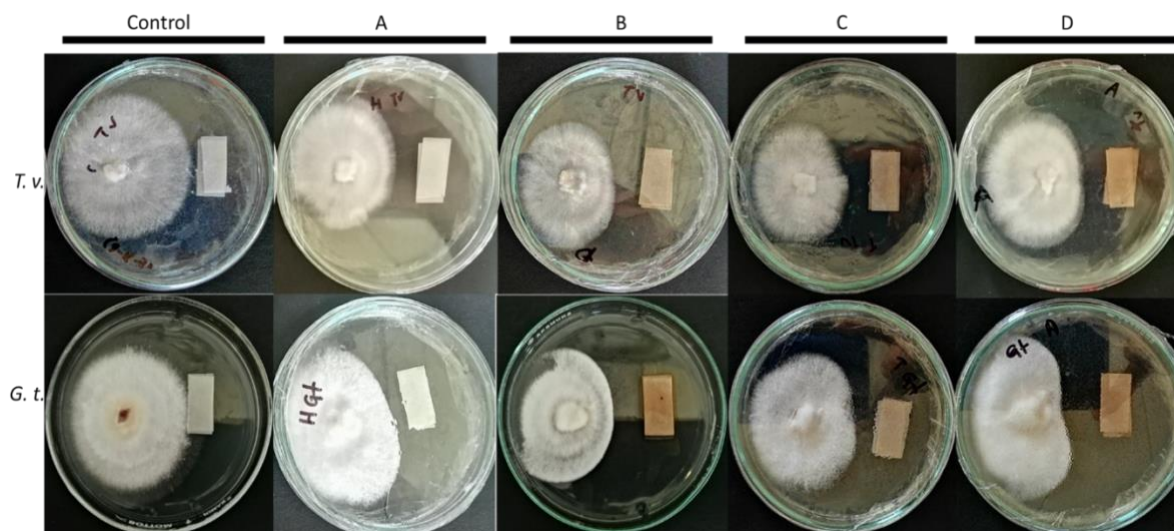


Figura 16. Fotografías representativas del ensayo microbiológico de los extraíbles crudos sobre los micelios de *Trametes versicolor* (*T. v.*) y *Gloeophyllum trabeum* (*G. t.*).

La **figura 17** muestra las placas con los extraíbles crudos obtenidos (1.2 mg/mL) con los cuatro solventes empleados sobre los micelios UM-2, UM- 2(7) y UM-E2 en agar dextrosa Sabouraud, extractos hexánicos (A), diclorometánicos (B), tetrahidrofuránicos (C) y acetónicos (D), esta ilustra una mayor inhibición con los extraíbles diclorometánicos sobre UM-2 y UM-2-7, con un porcentaje de inhibición entre 17-24%, y un significativo 41% respectivamente para cada aislado fúngico. Por otro lado, también se muestra el ensayo sobre la sepa UM-E2, este caso, los extraíbles hexánicos tuvieron mayor efecto inhibitorio sobre de este, como observación, esta cepa formó pequeños halos de inhibición

alrededor del papel filtro impregnado con cada uno de los extractos obtenidos con los cuatro distintos solventes empleados.

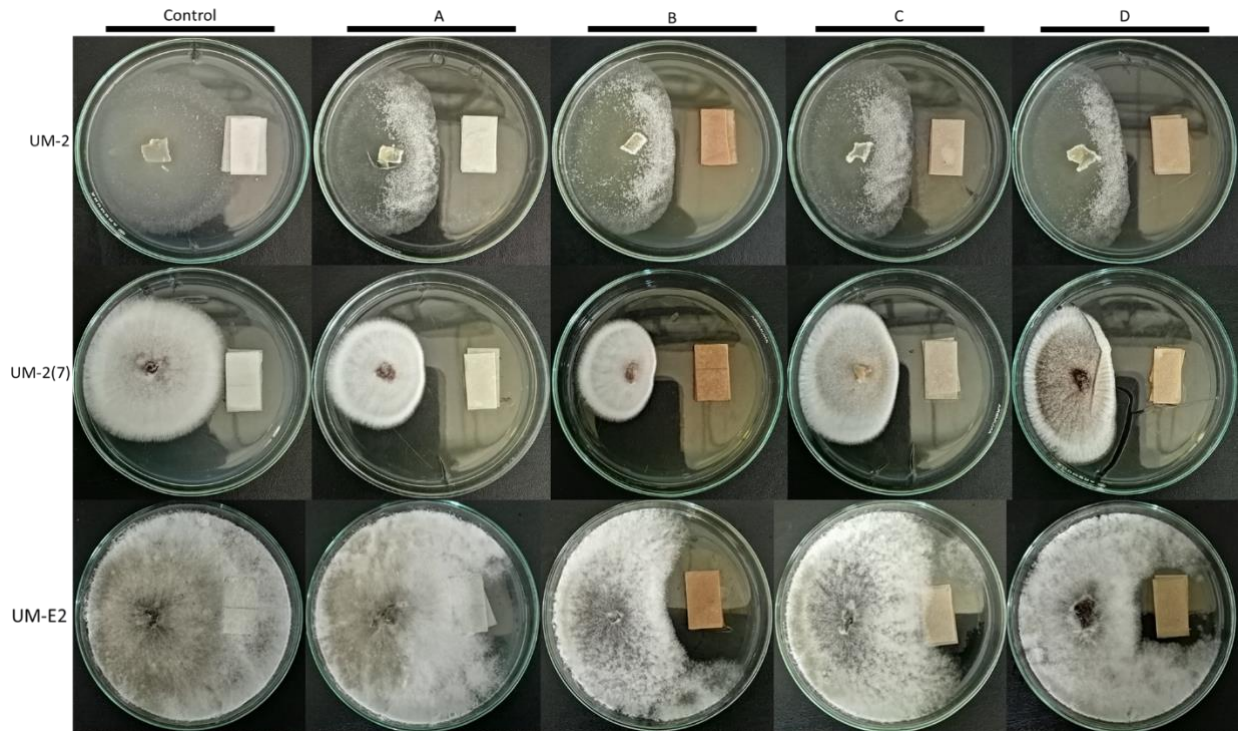


Figura 17. Imágenes representativas del ensayo microbiológico de los extraíbles crudos sobre los micelios UM-2, UM- 2(7) y UM-E2.

La **figura 18** muestra los extraíbles crudos obtenidos (1.2 mg/mL) con los cuatro solventes empleados sobre los micelios UM-G1, UM- A4 y UM-4(9) en agar dextrosa Sabouraud, extractos hexánicos (A), diclorometánicos (B), tetrahidrofuránicos (C) y acetónicos (D). El efecto inhibitorio de los extractos diclorometánicos y acetónicos crudos del duramen de teca sobre la cepa UM-G1 ejercieron el mayor efecto inhibitorio con un 23%, la cepa UM-A4, en este, los extractos acetónicos mostraron un mayor efecto inhibitorio sobre el micelio, y en este mismo, el tamaño de micelio bajo los tratamientos hexánicos y diclorometánicos, se observó un crecimiento superior que el micelio control, esto sugiere que los extraíbles no causaron daño alguno sobre de ellos, para la cepa UM-4(9), los extractivos hexánicos ejercieron un mayor efecto sobre ella con un significativo 38%.

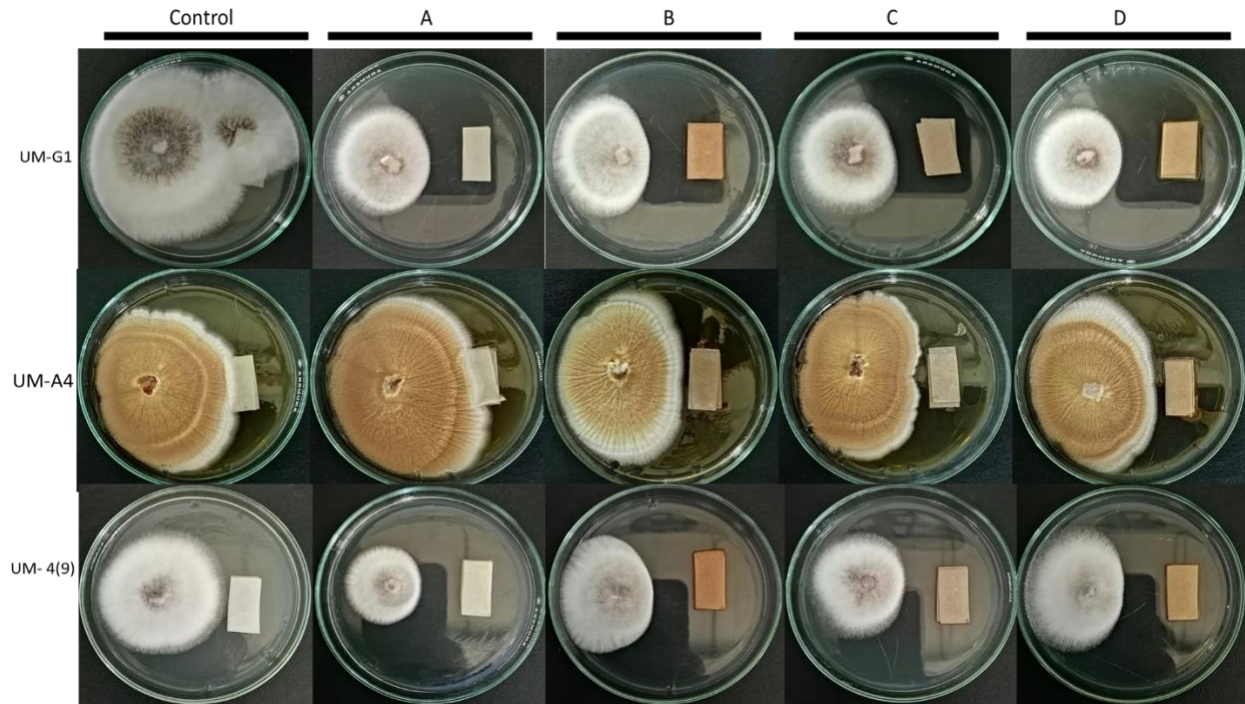


Figura 18. Imágenes representativas del ensayo microbiológico de los extraíbles crudos sobre los micelios UM-G1, UM- A4 y UM-4(9).

Finalmente, la **figura 19** ilustra el ensayo microbiológico de los extraíbles crudos obtenidos (1.2 mg/mL) con los cuatro solventes empleados sobre los micelios UM-D1, UM- A5 y UM-C3 en agar dextrosa Sabouraud, extractos hexánicos (A), diclorometánicos (B), tetrahidrofuránicos (C) y acetónicos (D). Los aislados fúngicos fueron susceptibles a los tratamientos, con una inhibición entre 1-16%, los extractos tetrahidrofuránicos no ejercieron inhibición de similar manera al resto de los extraíbles sobre la cepa UM-D1, los extractos diclorometánicos no tuvieron efecto similar al resto de los demás extractivos sobre la cepa UM-A5, por último, en el caso de la cepa UM-C3, los extractos acetónicos ejercieron mayor inhibición.

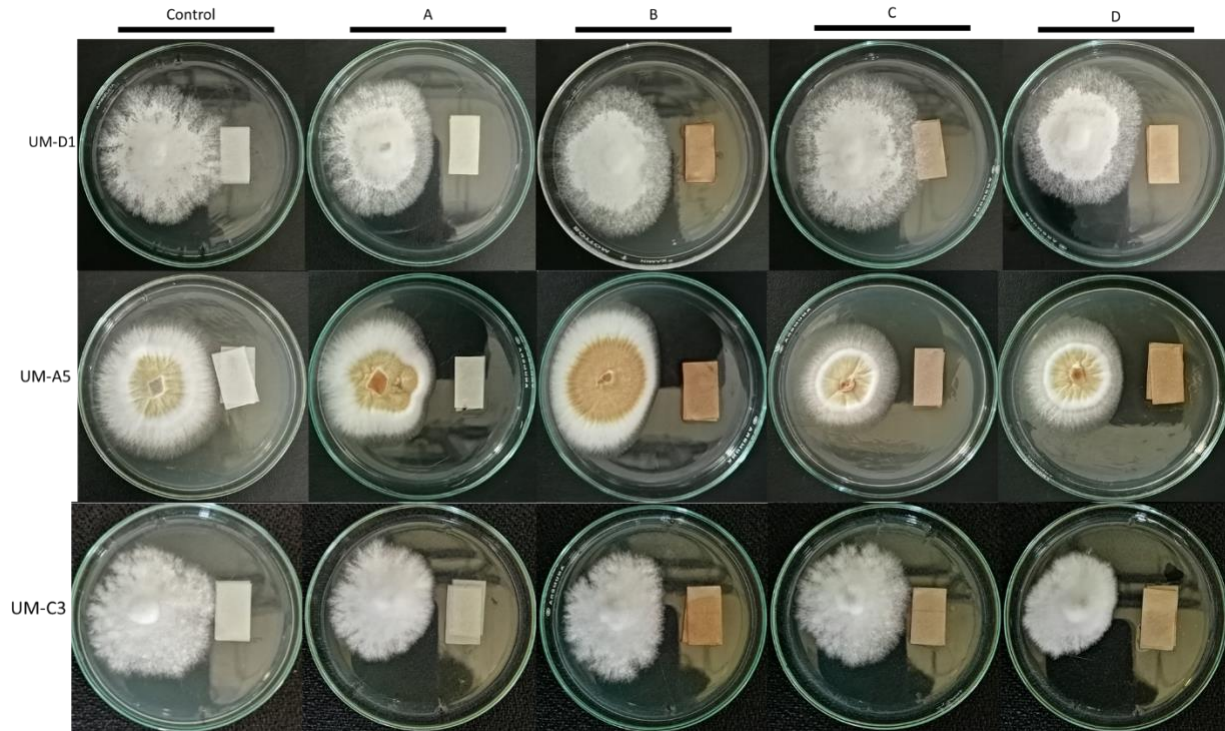


Figura 19. Imágenes representativas del ensayo microbiológico de los extraíbles crudos sobre los micelios UM-D1, UM- A5 y UM-C3.

A continuación, la **tabla 7** muestra los porcentajes de inhibición, según Rutiaga-Quiñones (1999), de cada cepa utilizada en este ensayo, y además señala con letras las diferencias significativas entre tratamientos hexánicos (EXTR HEX), diclorometánicos (EXTR DIC), tetrahidrofuránicos (EXTR THF) y acetónicos (EXTR ACE), sobre cada aislado fúngico, este análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos variables y para diferenciación el análisis estadístico DUNCAN determinado con el programa STATISTICA 7.0. Las letras (A, B y C) fueron asignadas para mostrar la diferencia estadística entre los tratamientos aplicados a cada aislado fúngico.

Tabla 7. Porcentajes de inhibición de los micelios sometidos a tratamientos con los extractivos.

Cepa	CONTROL	EXTR HEX	EXTR DIC	EXTR THF	EXTR ACE
<i>Trametes versicolor</i>	0A	13.4B	19.4B	25.4B	22.4B
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0A	15.8B	35.5C	18.4B	18.4B
UM-2	0A	21.0B	24.7B	17.3B	22.2B
UM-2(7)	0A	25.0B	41.2C	27.9B	16.2B
UM-E2	0A	4.4B	2.2AB	1.1A	0.0A
UM-G1	0A	19.4A	23.9A	11.9A	23.9A
UM-A4	0A	0.0A	0.0A	2.9A	8.6B
UM-4(9)	0A	38.1B	33.3B	23.8AB	12.7AB
UM-D1	0A	9.1 ^a	9.1A	1.5A	9.1A
UM-A5	0A	12.1A	7.6A	12.1A	16.7A
UM-C3	0A	4.9 ^a	9.8A	3.3A	16.4A

8.6 Toxicidad de los extractos crudos de duramen de *Tectona grandis* sobre el crecimiento de *Artemia salina*

8.6.1 Determinación de CL₅₀

La tabla 8 muestra las concentraciones de la CL₅₀ requerida de cada tratamiento de extraíbles crudos obtenidos del duramen de teca sobre los nauplios de *A. salina*, las concentraciones reportadas fueron las requeridas para contabilizar el 50% de mortalidad de los nauplios dentro de un periodo de 12 a 24 horas.

Tabla 8. Resultados de CL₅₀ y CL₉₀ (reportados en µg/ml) de los extractos crudos obtenidos con los cuatro solventes.

Tratamientos con extractos crudos obtenidos	Concentraciones CL ₅₀ (µg/mL)	Concentraciones CL ₉₀ (µg/mL)
Extractos Hexánicos	102.4	124.5
Extractos Diclorometánicos	37.6	92.3
Extractos Tetrahidrofuránicos	56.0	103.8
Extractos Acetónicos	113.1	241.4

Los extractos crudos obtenidos con el diclorometano fueron los más citotóxicos para *A. salina*, los nauplios bajo este tratamiento obtuvieron un 50% de mortalidad a una concentración de 37.6 µg/mL. Por consiguiente, los nauplios tratados con los extraíbles diclorometánicos mostraron una mortalidad más alta a muy bajas concentraciones. Los nauplios bajo los tratamientos con los extraíbles obtenidos con tetrahidrofurano mostraron un 50% de mortalidad a 56.0 µg/mL.

Los extractos obtenidos con hexano, los nauplios obtuvieron un 50% de mortalidad a 102.4 µg/mL y por último extraíbles acetónicos mostraron una mortalidad del 50% a una concentración de 113.1 µg/mL.

Con estos resultados observamos que los extractos más citotóxicos para el modelo de *Artemia salina* son los obtenidos con el solvente diclorometano, seguidos del solvente tetrahidrofurano, después, con respecto a los dos primeros tratamientos mencionados, los extraíbles acetónicos mostraron una menor citotoxicidad moderada, de manera muy similar a los extractos obtenidos con hexano.

9 DISCUSIÓN

La madera de *Tectona grandis* (Teca) es considerada una madera altamente cotizada debido a su durabilidad y belleza, a partir de una edad de 12 años, la madera de teca es susceptible a su utilización como material para la construcción, artesanías, muebles y más. El árbol seleccionado en este trabajo presentaba una edad de al menos 14 años, en donde el conteo de anillos señaló su edad. Debido a esto, la literatura reporta que los durámenes de los árboles de teca acumulan una gran concentración de metabolitos secundarios. Este fenómeno explica en parte el comportamiento de los resultados en los ensayos de inhibición y las pruebas de citotoxicidad. Algunos estudios sugieren que, en árboles de teca de plantación forestal orientada a un rápido crecimiento, la formación del duramen comienza cuando el árbol tiene entre 4-6 años (Solorzano et al., 2012). Estudios en madera proveniente de árboles mayores a 20 años (Moya et al., 2014) concluyeron que la composición de Teca ha sido estudiada mostrando una alta presencia de compuestos extraíbles relacionados con actividad antimicrobiana.

De acuerdo a Thulasidas y Bhat (2007) la durabilidad del duramen de teca, es debida principalmente a los compuestos químicos como la tectoquinona y naftoquinona, ambos compuestos aromáticos del grupo de las antraquinonas o quinonas naturales y, además, en el duramen están presentes sustancias como aceites esenciales, compuestos fenólicos e hidrosolubles, taninos, gomas, resinas y todas estas en alta toxicidad microbiana (Berrocal y Rojas., 2006 citado por Miranda y Quiñonez., 2018).

En este trabajo se observó, que los ensayos de inhibición y pruebas de concentración letal media (CL₅₀) en *A. salina*, que los extractos diclorometánicos ejercieron mayor efecto biológico sobre el modelo, también, mayor efecto inhibitorio y efecto citotóxico, respectivamente, autores como Bhat y Khalil (2010), describieron que el extracto diclorometánico proveniente de teca, tuvo mayor efecto actividad antifúngica, además, se encontraron diferentes quinonas en extractos obtenidos de duramen de *T. grandis*, evidencia apoyada por estudios cromatográficos como GCMS y HPLC.

Asimismo, los resultados mostraron la importancia de la composición de los extractos contra los hongos de la pudrición blanca, particularmente 1,4-Napthoquinona se encontró como compuesto bioactivo para la inhibición del hongo *Phanerochaete chrysosporium*.

Esto puede dar explicación o fundamento del porque estos extractivos diclorometánicos fueron los de mayor efecto biológico sobre los ensayos realizados, tomando en cuenta que, en este trabajo no se planteó como meta el realizar algún análisis para identificar y cuantificar que componentes se encuentran en los extractos crudos, ya que en la actualidad se encuentran bien identificados en la literatura, y gracias a ello, podemos inferir que compuestos están presentes de acuerdo al solvente utilizado.

Por otra parte, también se debe señalar que la acumulación de compuestos involucrados en la actividad antimicrobiana no es homogéneo en el tejido vegetal, es decir, Lukmandaru (2015) concluyó que la edad y posición radial del árbol afecta el contenido de extractivos, además los solventes utilizados en la extracción también influyen, ya que la polaridad del solvente tendrá un efecto de afinidad y acumulación sobre el mismo, es decir, al utilizar hexano para la extracción se obtiene mayor cantidad de quinonas, también se ha demostrado que madera joven de teca ya presenta una interesante acumulación de compuestos como tectoquinona, desoxilapachol e isodesoxilapachol.

Lukmandaru (2015) sugiere que la mezcla entre acetona y metanol, además, del método de baño en frío empelado por los citados, es más preciso que la extracción Soxhlet para la obtención de desoxilapakol, lapakol y tektokinona. Sumthong et al., (2008) con un sonicador aislaron desoxilapacol, tectoquinona, 2 hidroximetilantraquinona, 3 -OH-desoxiisolapacol, hemitectol y tectol se aislaron del extracto de CHCl₃-MeOH (1:1) de aserrín de *Tectona grandis*. Viana et al., (2003) obtuvieron lapachol proveniente de *Tabebuia avellanedae* con un procedimiento de extracción con CO₂ supercrítico (SFE). Qadariyah et al., (2019) sugieren como solvente ideal el etanol para la obtención de extractos derivados de *Lawsonia Inermis* L. (lawsona) con el método EAU. De acuerdo a Dulo et al., (2021) las mezclas alcohólicas son los disolventes sugeridos para la obtención de antraquinonas y naftoquinonas, además refieren que el método idóneo para la extracción de estos compuestos es la extracción Soxhlet, incluso otros autores señalan lo último mencionado. En este trabajo no se utilizaron mezclas alcohólicas como solventes, y solo un método de extracción (Soxhlet), a pesar de ello, obtuvimos resultados esperados como el mayor porcentaje de inhibición sobre *G. trabeum* con los extractos obtenidos con el diclorometano. Debido a que algunos compuestos obtenidos en estos extraíbles tengan una ligera afinidad por el solvente empleado.

El xilófago *G. trabeum* mostró uno de los mayores porcentajes de inhibición bajo los extractos diclorometánicos. Autores como Sumthong et al., (2008), aislaron los compuestos desoxilapacol, tectoquinona, 2-hidroximetilantraquinona, 3-OH-desoxiisolapachol, hemitectol y tectol, obtenidos de madera de aserrín de *Tectona grandis*, asimismo, encontraron que el compuesto deoxylapachol inhibió hongos de pudrición parda *G. sepiarium* CBS 353.74 y *G. trabeum* CBS 318.50. También se encontró que la 1,4-naftoquinona y 1,4-naftohidroquinona impidieron el crecimiento de los mismos hongos de la pudrición. Sin embargo, compuestos como la antraquinona aislada no mostraron inhibir el crecimiento de los organismos ensayados. Demostrando que los extractos diclorometanos contienen los compuestos con mayor actividad inhibitoria del crecimiento fúngico. Las naftoquinonas, se caracterizan, como todas las quinonas por presentar una elevada reactividad de los grupos carbonilos, lo que facilita reacciones de tipo Redox aceptando uno o dos electrones, a partir de lo cual se generan

radicales libres aniónicos (semiquinona) o dianiónico, lo que explicaría su alta actividad biológica (Leyva y Loredó 2015).

Las quinonas son compuestos orgánicos cuyas propiedades químicas les permiten interactuar con dianas biológicas, mediante la formación de enlaces covalentes y actuando como agente transferente de electrones en reacciones de óxido-reducción (Chinchilla et al., 2017). En la mayoría de los casos, la actividad biológica de las naftoquinonas se ha relacionado con sus propiedades de oxidación-reducción y ácido-base (Macías et al., 2013).

Las quinonas se oxidan a semiquinona, luego forman un intermediario radical que al reaccionar con oxígeno molecular puede generar el anión superóxido, que a su vez pueden producir peróxido de hidrógeno, en el proceso generan especies reactivas de oxígeno que son las que causarían estrés oxidativo en el organismo (Rojas, 2015). También, a partir del anión radical superóxido, ya sea por catálisis con metales de transición o reacción con H_2O_2 se generan radicales hidroxilos, los cuales son extremadamente tóxicos a los que se les atribuye la toxicidad de las quinonas. El H_2O_2 no es un radical libre, pero es una sustancia bastante reactiva por lo cual puede promover la oxidación de algunas moléculas, de esta manera el O_2 y H_2O_2 se consideran las ROS (Valavanidis et al., 2009). El desbalance entre la formación y remoción de ROS causa daño celular en ácidos nucleicos, proteínas y membranas (Oliveira et al., 2017).

Las naftoquinonas son conocidas por alterar la función mitocondrial e inhibición de la respiración mediante la interferencia con el complejo citocromo bc1, además de promover la generación de ROS (Oliveira et al., 2012). La estimulación de estrés oxidativo es causada por un desequilibrio entre la formación de especies reactivas de oxígeno, como anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, además la capacidad del sistema biológico de reaccionar frente a estos agentes, que pueden causar incluso la muerte celular. Los radicales de oxígeno pueden actuar con macromoléculas generando peroxidación de lípidos y desintegración membranal, inactivación de enzimas, degradación de ADN y mutagénesis. Estos argumentos pueden explicar del porqué de la actividad biológica sobre los aislados fúngicos y los nauplios de *A. salina*, ya que se observó una interesante actividad biológica en estos ensayos biológicos.

En este trabajo, no es posible identificar el grado de toxicidad de los extractos obtenidos, solo se consideran tóxicos para el modelo *A. salina*, ya que es necesario ensayos con población mayor e incluso la utilización de otros modelos biológicos para determinación citotóxica, no obstante, los ensayos realizados sobre *Artemia salina* también son base para futuras investigaciones y trabajos en búsqueda de compuestos anticancerígenos y antitumorales, autores como Khan y Mlungwana (1999) aislaron 5-hidroxilapachol junto con los constituyentes conocidos lapachol, dehidro-alfa-lapachona, metilquinizarina y escualeno, en donde se encontró que eran citotóxicos para *Artemia salina*, con una CL_{50} de 5 ppm, sin embargo en este trabajo la CL_{50} más baja fue de 37.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (que esto es igual a 37.6 ppm) con los extractos diclorometánicos, esto sugiere que dichos extraíbles son menos citotóxicos en comparación a los autores anteriormente mencionados, además estos concluyeron que los compuestos aislados son buenos candidatos para investigaciones posteriores con el propósito anteriormente mencionado. A diferencia de los preservantes a base de metales pesados y/o inorgánicos, su toxicidad es conocida y difiere a estas nuevas alternativas, también se sabe que son cancerígenos, contrario a los extractos de origen vegetal que se sabe que son anti-cancerígenos.

Por otra parte, es necesario comentar que la identificación taxonómica empleada en este trabajo no es de carácter definitivo, se sabe que tiene fuertes limitantes debido a la estrategia metodológica, es decir, el uso de oligonucleótidos a pesar que es la indicada, también resulta insuficiente debido a pequeña fracción de pares de bases que utiliza (menor a 350). Además, hacen falta una mayor cantidad de trabajos de los organismos estudiados que enriquezcan la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para que las homologías sean más certeras. A pesar de ello, se identificó que la homología de los aislados UM-2(7), UM-G1, UM-4(9), UM-A4, y UM-A5 corresponden al género *Aspergillus*. La mayoría de las especies del género *Aspergillus* son hongos filamentosos saprófitos que desempeñan un papel esencial en la degradación de la materia orgánica, su hábitat natural es el suelo donde sobreviven y se desarrollan sobre materia en descomposición (Klich, 2002). Este argumento refuerza el resultado de las secuencias, estos aislados fueron tomados en campo, es decir en el medio ambiente reportado.

Específicamente, organismos como *A. niger* y *A. terreus* se sabe pueden causar aspergilosis en humanos inmunocomprometidos (Kriengkauykiat et al., 2011; Latgé, 2001 citados por Frías de León et al., 2014). Según Perrone et al., (2011) *Aspergillus niger* también es causante de la pudrición negra en uva y producir toxinas provenientes de granos de café. El estado de *A. awamori* se ha revisado varias veces con varios sinónimos, es decir, *A. pseudoniger* o *A. pseudocitricus* (Mosseray 1934), *A. usarii* (Sakaguci et al., 1951) y *A. niger* var. *awamori* (Al-Musallam 1980) también ha sido tratado como sinónimo de *A. niger* por Samson et al., (2004). En este trabajo, la homología de la cepa UM-4(9) corresponde ha *A. awamori*, estos antecedentes asociados a características morfológicas de crecimiento en el cultivo del asilado, corresponde a esta variación o sinonimia.

Otros autores como Díaz et al., (2020) menciona que la cepa *Aspergillus niger* LBM 134 aislada de madera en putrefacción de bosque lluvioso, es considerada un hongo de pudrición blanda, responsable de la formación de cavidades (pudrición blanda tipo I) y la erosión (tipo II) y también detectada en madera arqueológica, especialmente de ambientes terrestres (Blanchette, 2000; Susi et al., 2011; Hamed, 2013, citados por Goffredo et al., 2017). También, Hammed (2013) concluyó que los hongos de pudrición blanda (*A. niger* y *P. chrysogenum*) pueden descomponer la madera del suelo en condiciones de laboratorio. La madera enterrada en suelo es rápidamente degradada por microorganismos, ya que organismos de pudrición blanda toleran un bajo contenido de humedad y pueden causar severo daño a muestras de madera.

Por su lado, se encontró que el aislado UM-E2 (*Macrophomina*) de acuerdo a Muñoz-Cabañas (2004) es un patógeno distribuido mundialmente que tiene como hospedantes a más de 500 especies de plantas y pertenece a la clase Deuteromycetes. *M. phaseolina* ataca al frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y ocasiona la enfermedad conocida como “pudrición carbonosa”. En México, el hongo se ha detectado en regiones áridas, subtropicales y tropicales (Mayek-Pérez et al., 2001), es un hongo que muestra amplia variabilidad morfológica, fisiológica, patogénica y genética.

El aislado UM-E2, su morfología y características macroscópicas son similares a lo reportado por Mmbaga et al., (2018), este microorganismo aislado de la corona y raíces

del árbol *Cornus florida* L. También evaluaron la patogenicidad en este árbol, *M. phaseolina* causo daño necrótico en todas las plántulas de esta especie, incluso demostraron que puede causar crancos o lesiones en los tallos que aumenta la vulnerabilidad de que insectos ataquen esta especie. En medio nutritivo PDA presenta características como ser de color marrón y liberar metabolitos que oscurecen el medio de cultivo. Esta información corresponde a lo visto en nuestro laboratorio, lo cual fortalece la idea que se trate del mismo organismo, ya que también Singh (2008) evaluó la actividad antagonista de *Bacillus sibtillis* BN1 sobre *M. phaseolina*, concluyo que aislado BN1 exhibió buena actividad inhibitoria el crecimiento de *M. phaseolina*. En este trabajo, el aislado UM-E2 fue encontrado de árboles derribados, aunado a los antecedentes y las características morfológicas, refuerzan la homología de la secuenciación (Younas et al., 2018).

Por otro lado, las características y condiciones de recolección de la cepa UM-D1 son similares a las que describe Zaremski et al., (2014), en su trabajo aislaron e identificaron *Marasmius alliaceus*, y realizaron una colecta de 101 cuerpos fructíferos de hongos en el sitio del bosque de Paracou en la Guayana Francesa. De esos 101 hongos, 72 fueron identificados por BLASTn. Los hongos se eligieron frescos y buen estado en madera muerta (alrededor de 43), en árboles en pie (alrededor de 15) o en las hojas de los árboles (alrededor de 15). Los cuerpos fructíferos se recolectaron del sitio del bosque de Paracou durante la estación húmeda caracterizada por los frecuentes y fuertes lluvias. La humedad relativa promedio fue superior al 90% y la temperatura del aire alrededor de 28°C, con el propósito de mejorar la clasificación mediante la integración de nuevos datos que resaltarían la importancia de ciertos rasgos de estos hongos y proporcionar una comprensión más clara de cómo se organiza la biodiversidad de los hongos de los ecosistemas forestales de la Guayana Francesa, en particular los que causan pudrición de la madera por podredumbre blanca, parda o blanda. De igual manera, Konuk et al., (2005) afirma que *Marasmius alliaceus* fue recuperada sobre ramas muertas de *Fagus*, también reportó 80 especies de hongos en descomposición de madera. De estos, 25 se recuperaron de árboles coníferos, 51 de latifoliadas y 3 de latifoliadas o coníferos y uno de hojarasca. Este organismo podría catalogarse como un hongo saprofito, ya que ha sido recolectado también de madera derribada. En este estudio fue descrito el sitio de

colecta y, además, fue parte de nuestra gama de cepas sometidas a ensayos de inhibición, estos resultados pueden ser bases para nuevas investigaciones sobre este género y especie, si realmente es un hongo involucrado en el deterioro de la madera o solo se trata de un microorganismo en búsqueda de sustratos de materia en descomposición. En el caso de *Umbilicaria freyi*, Sancho et al., (1991), argumentaron que este género es puntual en zonas montañosas, de forma similar en este trabajo, este organismo aislado proviene de las faldas del cerro del Quinceo, no obstante, la información sobre estos dos últimos géneros y especies es escasa, esto sugiere a realizar más indagaciones sobre estos organismos y su relación con la madera.

Sin duda alguna, con el desarrollo de esta investigación nos damos cuenta que existe poca información acerca de los organismos fúngicos que habitan nuestro entorno (principalmente el estado de Michoacán y país), sobre aspectos básicos ecológicos, hábitat, interacciones e inclusive una clasificación taxonómica elemental. Por esta razón debemos insistir en profundizar y ampliar el desarrollo de investigaciones en esta línea del conocimiento.

10 CONCLUSIONES

- En efecto, el duramen es rico en metabolitos secundarios o llamados extractivos.
- Los extractos tienen un efecto sobre el crecimiento sobre los aislados fúngicos.
- Los porcentajes de inhibición pueden depender de la concentración de extracto sobre cada cepa.
- Las moléculas que se encuentran en los extractos crudos, pueden generar estrés oxidativo, lo cual puede causar alteraciones en el metabolismo.
- Diversos autores mencionan que hay mejores métodos de extracción incluso reportan que solventes como alcoholes son los recomendados para extracciones.
- Los extractos crudos de teca, y de otras especies arbóreas, pueden ser alternativas para control de plagas, como lo son en este trabajo, hongos que no solo promueven la degradación de la madera, por ejemplo, otras especies del género *Aspergillus* y

Macrophomina, que no solo degradan madera, también plantas y cultivos, y sobre todo que puede significar pérdidas económicas y ecológicas, además una nueva alternativa para sustituir fertilizantes de origen no orgánico.

- Los extractos diclorometánicos mostraron mayor actividad biológica sobre las *Artemia salina*, y sobre algunos aislados fúngicos como en el caso de *G. trabeum*.

- Los extractos o en este caso las quinonas en los extractivos crudos, actúan en sinergia y para ellos es necesario una CG-MS para su diferenciación y cuantificación, y además se sugiere una separación de componentes.

- Los extractos diclorometánicos fueron los que mayor efecto citotóxico ejercieron sobre *A. salina*, pero se sugiere realizar más ensayos para determinar su potencial tóxico en otros modelos biológicos, además, esto puede ser base para realizar pruebas de citotoxicidad sobre células cancerígenas.

- El aserrín de teca también se puede extraer los componentes para su estudio, análisis e investigación, para así evitar talar otros árboles.

11 BIBLIOGRAFIA

Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, 17(3), S79-84.

Alfieri, P. V. (2018). Control del deterioro de la madera mediante la acción de nano-impregnantes y recubrimientos sol-gel a base de silanos (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Al-Musallam, A. (1980). Revision of the black *Aspergillus* species. *Revision of the black Aspergillus species*.

Antwi, C. y Damoah, A. (2010). Investigation of synergistic effects of extracts from *Erythrophleum suaveolens*, *Azadirachta indica*, and *Chromolaena odorata* on the durability of *Antiaris toxicaria*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(2), 97-103.

- Armijos, L. (july de 2014). Modelo de negocios y fuente de financiamiento a través de un fideicomiso de inversión en el cultivo de teca (*Tectona grandis*). *Qualitas*, 7, 4-29.
- Ávila C. L. E. A. (2008). Técnicas de determinación de retención y penetración en la Madera, notas. Facultad de Ingeniería en Tecnología.
- Ávila, Calderón, Luz Elena A., Herrera, Ferreyra, Marco Antonio, Raya, González, David. (2012). Preservación de la madera en México. UMSNH. México.
- BALTAZAR C. y BUENDIA C., 1986. "Identificación Preliminar de los Hongos Lignícolas de la Estación Experimental Agropecuaria de la UNCP-Satipo". Tesis para optar el grado de Ing. Forestal de la FCFA-UNCP. Huancayo, PE. 79 pp.
- Barreno, E., & Pérez-Ortega, S. (2003). Clave para la identificación de los Géneros+ de Fotobiontes (según F. Bungartz, 2002, in Nash III et al., 2002) + de Líquenes (Gelatinosos, Fruticulosos, Foliáceos, Crustáceos, Escuamulosos, Dimórficos, Talos Leprarioides o Estériles) + Especies.
- Berrocal-Jiménez, A., & Rojas-Acuña, L. V. (2006). Resistencia de la madera de teca (*Tectona grandis* Lf) proveniente de plantaciones forestales ante el ataque de termitas de madera seca *Cryptotermes brevis* (Walker). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 4(10), ág-1. Bibliografica. Facultad ciencias quimicas: Universidad de San juan de Potosí.
- Bhat, I. U. H., Khalil, A. U. P. S., Shuib, N. S., & Noor, A. M. (2010). Antifungal activity of heartwood extracts and their constituents from cultivated *Tectona grandis* against *Phanerochaete chrysosporium*. *Wood Res*, 55, 59-66.
- Blanchette, R. A. (2000). A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46(3), 189-204.
- Blanchette, R.A., (1998) A guide to wood deterioration caused by microorganisms and insects, In:

- Bland, K.E. (1991) Behaviour of wood exposed to fire: a review and expert judgement procedure for predicting assembly failure. Dissertation, Worcester Polytechnic Institute
- Brock, T. D. (2009). *Biología de los Microorganismos*, 12^o Edición, Addison-Wesley, 1296 pp.
- Browning, B. L. (1967). *Methods of wood chemistry. Volumes I & II. Methods of wood chemistry. Volumes I & II*.ri
- Cabañas, R. M. M., Delgado, S. H., & Pérez, N. M. (2005). Análisis patogénico y genético de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes hospedantes. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1), 11-18.
- Calvo, J, 2010, "Trametes versicolor"; [Extraído el 9 de abril del 2011], desde <http://www.fungipedia.es/clasificacion-orden/basidiomycota/poriales/357-trametes-versicolor.html>.
- Cambria, M. T., Minniti, Z., Librando, V., & Cambria, A. (2008). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Rigidoporus lignosus* and its laccase in the presence of redox mediators. *Applied biochemistry and biotechnology*, 149(1), 1-8.
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2007). *Biología*. Ed. Médica Panamericana.
- Canadian Wood Council (1995) *Wood Reference Handbook*. Canadian Wood Council, Ottawa, Ontario. 561 p.
- Castro, F. (2000). Evaluación en cajas con suelos no estériles de la durabilidad natural e inducida de las maderas de Pino Caribe (*Pinus caribaea* mor. var. *hondurensis*) y Melina (*Gmelina arborea* Roxb.). Tesis, Magister Scientiae. ULA, Mérida, Venezuela. 100p.
- CONAFOR, Comisión Nacional Forestal (2013) Programa de desarrollo de plantaciones forestales comerciales. A 15 años de su creación. Comisión Nacional Forestal. Zapopan, Jalisco, México. 190 p.

- Cooper, B. L. (2013). Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 16(1), 19-22.
- Crawford, D. M., De Groot, R. C., Watkins, J. B., & Greaves, H. (2000). Treatability of US wood species with pigment-emulsified creosote. *Forest products journal*, 50(1), 29.
- Cruz de León, J. (2010). Manual para la protección contra el deterioro de la madera (No. F/674.386 C7). *Clinical Pharmacy*, 2(4), 163.
- Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46.
- Chinchilla, N., Guerrero-Vásquez, G. A., Varela, R. M., Molinillo, J. M., & Macias, F. A. (2017). Phytotoxic studies of naphthoquinone intermediates from the synthesis of the natural product Naphthotectone. *Research on Chemical Intermediates*, 43(8), 4387-4400. Ciencia e Innovación. España. 96 p. Composite; Rowell, R.M. (ed.), Taylor and Francis, CRC Press, 420 pp.
- Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues;
- de Oliveira, A. S., Brighente, I. M., Lund, R. G., Llanes, L. C., Nunes, R. J., Bretanha, L. C., ... & Ribeiro, J. S. (2017). Antioxidant and antifungal activity of naphthoquinones dimeric derived from lawsone. *Journal of Biosciences and Medicines*, 5(2), 39-48.
- Díaz, G. V., Coniglio, R. O., Chungara, C. I., Zapata, P. D., Villalba, L. L., & Fonseca, M. I. (2021). *Aspergillus niger* LBM 134 isolated from rotten wood and its potential cellulolytic ability. *Mycology*, 12(3), 160-173.
- Dimarogona M, Topakas E, Christakopoulos P. 2013. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:8455–65.

- Dulo, B., Phan, K., Githaiga, J., Raes, K., & De Meester, S. (2021). Natural Quinone Dyes: A Review on Structure, Extraction Techniques, Analysis and Application Potential. *Waste and Biomass Valorization*, 1-36.
- Encinas N, Mora N (2016). patrones de degradación de las maderas de pino caribe, curaire y drago por *Gloeophyllum trabeum*, *Trametes versicolor* y *Pycnoporus sanguineus*. *Revista forestal venezolana*, 44(1), 1-14.
- Encinas, O (2004) Conservación de maderas, Universidad de Los Andes, 22 pp.
- Espejo, E., and E. Agosin. 1991. Production and degradation of oxalic acid by brown rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1980–1986.
- Fengel, D., & Wegener, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, 613, 1960-82.
- Fidalgo-Used, N., Blanco-González, E., & Sanz-Medel, A. (2007). Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples. *Analytica Chimica Acta*, 590(1), 1–16.
- Galhaup, C., & Haltrich, D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1), 225-232.
- García m, Notario A, Quadvlieg j, Cardozo M, Cardenas a. Portal a (2014) Evaluación preliminar de macrohongos en seis áreas con diferente grado de perturbación en madre de dios. *Biodivers. Amazon.* 4, 59-73.
- García Ortiz, V. R., Benitez Rocha, G., Martinez Pacheco, M., Velázquez Becerra, C. (2017). Wood preservatives and microbial exudates with antagonistic activity against biological agents. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 56-79.
- Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J. M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation journal*, 3(1), 1-26.

- Goffredo, G. B., Citterio, B., Biavasco, F., Stazi, F., Barcelli, S., & Munafò, P. (2017). Nanotechnology on wood: The effect of photocatalytic nanocoatings against *Aspergillus niger*. *Journal of Cultural Heritage*, 27, 125-136.
- Gonzales, G. 2012. Patologías Bióticas de la madera. Universidad del Bio Bio-Concepción. Chile
- Gonzalez, B. (2007). Caracterización genética con microsatélites de un ensayo de progenie de Teca (*Tectona grandis* L.f.) en San Mateo de Alajuela.
- González-Laredo, R. F., Rosales-Castro, M., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Moreno-Jiménez, M. R., & Karchesy, J. J. (2015). Wood preservation using natural products. *Madera y Bosques*, 21.
- Goodell, B. (2003). Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view.
- Guzmán Santibáñez, D. I. (2017). Influencia del vaporizado sobre la resistencia a la pudrición de madera de renoval de roble (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst).
- Halliwell, B., and J. M. C. Gutteridge. 1999. Free radicals in biology and medicine, 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Hamed, S. A. M. (2013). In-vitro studies on wood degradation in soil by soft-rot fungi: *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 98-102.
- Haupt, M., Leithoff, H., Meier, D., Puls, J., Richter, HG y Faix, O. (2003). Extractos de duramen y durabilidad natural de la madera de teca cultivada en plantaciones (*Tectona grandis* L.): Un estudio de caso. *Revista europea de madera y productos de madera*, 61 (6), 473-474.
- Hawksworth, DL. (2001) the magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105 (12), p – 1422- 1432.
- Hebert P.D.N., A. Cywinska, S.L Ball. & J.R. DeWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270, 313–21.

- Hebert P.D.N., E.H. Penton, J.M. Burns, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. PNAS, 101, 14812–14817.
- Hebert P.D.N., J.R. Dewaard & J.F. Landry. 2010. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology letters*, 6, 359–62.
- Humphrey, D. G. (2002). The chemistry of chromated copper arsenate wood preservatives. *Reviews in inorganic chemistry*, 22(1), 1-40.
- Jiménez, A. B. (2006). Clasificación de daños producidos por agentes de biodeterioro en la madera. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 4(10), 54-62.
- Käärik, A. (1980) Fungi causing sap stain in wood. *Swed Univ Agric Sci Dept Forest Prod* 114.
- Keil, G. D. (2004). Biodegradación y Preservación de la Madera: Sustancias Preservantes. Curso de Actualización para Graduados, Universidad Nacional del Comahue. 9 pp.
- Kenneth AJ, Houtman CJ, Ryan ZC, et al. 2001. Pathways for Extracellular Fenton Chemistry in the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2705–2711.
- Khan, R. M., & Mlungwana, S. M. (1999). 5-Hydroxylapachol: a cytotoxic agent from *Tectona grandis*. *Phytochemistry*, 50(3), 439-442.
- Khazaei, J. (2008) Water absorption in three wood varieties, *Cercetări Agronomice în Moldova*, XLI, 2 (134) pp. 16.
- Kim, Y. S., & Singh, A. P. (2000). Micromorphological characteristics of wood biodegradation in wet environments: a review. *Iawa Journal*, 21(2), 135-155.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. Editor surrey. En: Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 9th ed. Walling-ford, UK: CABI Bioscience; 2001.

- Klich, M. A. (2002). *Identification of common Aspergillus species*. CBS
- Konuk, M. A study of wood decaying macrofungi of the western Black Sea Region, Turkey.
- Kriengkauykiat, J., Ito, J. I., & Dadwal, S. S. (2011). Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. *Clinical epidemiology*, 3, 175.
- Landeta González, A. D. (2009). Producción de biomasa y fijación de carbono en plantaciones de Teca (*Tectona grandis* Linn. F) en la ESPOL Campus Ing. Gustavo Galindo (Doctoral dissertation, Tesis. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador).
- Langston J a, Shaghasi T, Abbate E, et al. 2011. Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:7007–15.
- Latgé, J. P. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in microbiology*, 9(8), 382-389.
- Lee, Y. S. (2000). Observation of soft-rot wood degradation caused by higher Ascomyceteous fungi. *Mycobiology*, 28(1), 47-50.
- Leyva E, Loredó S. Importancia química y biológica de las naftoquinonas. Revisión Bibliográfica. Facultad ciencias químicas: Universidad de San Juan de Potosí. 2015.
- Leyva, E., Loredó-Carrillo, S. E., López, L. I., Escobedo-Avellaneda, E. G., & Navarro-Tovar, G. (2017). Importancia química y biológica de naftoquinonas. Revisión bibliográfica. *Afinidad*, 74(577).
- Leyva-Mir, S. G., Velázquez-Martínez, G. C., Tlapal-Bolaños, B., Tovar-Pedraza, J. M., Rosas-Saito, G. H., & Alvarado-Gómez, O. G. (2015). Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Macrophomina phaseolina* asociados a caña de azúcar en México. *Revista argentina de microbiología*, 47(2), 143-147.

- López, M. A. M., López, L. I. L., Galindo, A. S., & Silva, S. Y. (2013). Síntesis de Derivados de 1, 4 Síntesis de Derivados de 1, 4-Naftoquinona por Metodologías Verdes y su Naftoquinona por Metodologías Verdes y su Importancia Biológica Importancia Biológica Synthesis of 1, 4 Synthesis of 1, 4-Naphthoquinone Derivatives by Green Methodologies and their Naphthoquinone Derivatives by Green Methodologies and their Biological Biological Importance Importance Importance. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 5(10).
- Lukmandaru, G. (2015). Quinone Contents in Teak Heartwood Isolated by Cold Extraction. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kayu Tropis*, 13(1), 28-38.
- Lukmandaru, G. (2015). Quinones distribution of teak wood grown in community forest. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kayu Tropis*, 13(2), 193-204.
- Luley, C.J. (2005) identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos en arboles urbanos. Wood decay fungi: Comon to tres in Northeastand central united states. Urban forestry LLC, Estados Unidos.
- M. Martínez, A. Gutiérrez & J. del Río. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*8:195-204.
- Macas y Méndez (2013) evaluación de la capacidad biotransformadora de taninos del Guarango (*Caesalpinia spinosa*) a través de *Trametes versicolor* y *Aspergillus niger*.
- Mai, C., Kües, U., & Militz, H. (2004). Biotechnology in the wood industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(5), 477-494.
- Majada, J., et al. (2013) Innovación de procesos y productos en el sector de la madera” In: 6º Congreso Forestal Español 10 al 14 de junio de 2013, Palacio de Congresos y Exposiciones Europa de Vitoria-Gasteiz
- Martínez Sotres, M. (2011). Evaluación de la actividad anti fúngica de diferentes estratos del duramen de *Dalbergia congestiflora* P. y aislamiento e identificación del componente con actividad biológica.

- Meltzer Robert L. 1979. Annual Book of ASTM Standars, (Madera y adhesivos vol 22), United States of america: printed in the United States of America, 1979.
- Miranda Valencia, N. A., & Quiñonez Castro, G. C. (2018). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de los residuos de corteza de la teca (Tectona grandis L. f)* (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas).
- Mirzaei A., Mirzaei N. y Ghavamizadeh M. (2013). Antioxidant Activity and Cytotoxicity of *Dorema aucheri* by *Artemia urmiana*: A Brine Shrimp Lethality Test. Life Science Journal 10(12). pp: 8-12.
- Mmbaga, M. T., Mackasmiel, L. A., & Mrema, F. A. (2018). Flowering dogwood infections with *Macrophomina phaseolina*. *HortScience*, 53(3), 334-336.
- Monge, A. (2011). Tratamientos de temperatura y humedad para incrementar el porcentaje de germinación en semilla de teca (doctoral dissertation, universidad de costa rica).
- Mosseray, R. (1934). *Les Aspergillus de la section" Niger" Thom & Church*. J. van In.
- Moya, R., Bond, B., & Quesada, H. (2014). A review of heartwood properties of *Tectona grandis* trees from fast-growth plantations. *Wood Science and Technology*, 48(2), 411-433.
- Murguía, M. C. (2012). Desarrollo de nuevos productos para la preservación de maderas. Acta de III Congreso Iberoamericano de Protección de la Madera (CIPROMAD). Concepción, Chile. 10 pp.
- Nieto Rodríguez, J. E. (2011). Diversidad genética de ecotipos de teca (*Tectona grandis* L.) del litoral ecuatoriano (Doctoral dissertation, Universidad Internacional de Andalucía).
- Nogués, F. 2010. Energía de la biomasa. Prensas Universitarias de Zaragoza. (1):557p

- Oliveira, R. A., Correia-Oliveira, J., Tang, L. J., & Garcia, R. C. (2012). A proteomic insight into the effects of the immunomodulatory hydroxynaphthoquinone lapachol on activated macrophages. *International immunopharmacology*, 14(1), 54-65.
- Orozco-Mosqueda MC, et al. La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y diversas aminos inhiben el crecimiento in vitro de hongos destructores de madera. *Rev Argent Microbiol*. 2015.
- Oyola Giler, P. D. (2017). Identificación de compuestos inhibidores que se forman en el hidrolizado enzimático de celulosa y hemicelulosa presentes en cáscara de arroz (Bachelor's thesis, Machala: Universidad Técnica de Machala).
- Paes, B., Soares, S., Ferreira, L., Lima, J., & Sao, G. (2016). Efecto del contenido de extractivos en la resistencia natural de cinco maderas al ataque de cupins xilófagos. *Ciencias Florestal*, 26(4). doi:10.5902/1980509825137
- Papinutti VL, Diorio LA, Forchiassin F. Degradación de maderade álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas lig-ninolíticas en aserrín de álamo y cedro. *Rev Iberoam Micol*.2003;20:16---20.
- Pardo Sequeira, T. (2013). Evaluación del efecto de la concentración de anhídrido acético, temperatura y tiempo en la reacción de acetilación para la modificación química de *Tectona grandis* y *Gmelina arborea*.
- Park, J. S. B., P. M. Wood, M. J. Davies, B. C. Gilbert, and A. C. Whitwood. 1997. A kinetic and ESR investigation of iron (II) oxalate oxidation by hydrogen peroxide and dioxygen as a source of hydroxyl radicals. *Free Radic. Res*. 27:447–458.
- Paszczynski, A., R. Crawford, D. Funk, and B. Goodell. 1999. De novo synthesis of 4,5-dimethoxycatechol and 2,5-dimethoxyhydroquinone by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Environ. Microbiol*. 65:674–679.
- Patel N, Oudemans PV, Hillman BI, Kobayashi DY. Use of the tetrazolium salt MTT to measure cell viability effects of the bacterial antagonist *Lysobacter enzymogenes* on the filamentous fungus *Cryphonectria parasitica*. *A Van Leeuw*.2013;103:1271--80.

- Peredo, M. (1993). Preservantes antimancha alternativo al pentaclorofenato de sodio. Chile Forestal. Documento técnico N° 68.
- Pérez Miranda, M. A. (2015). La aplicación de beneficios tributarios en nuevas inversiones en el cantón El Empalme. Caso: Cultivo, industrialización y comercialización de madera de teca (*Tectona grandis* LF) (Master's thesis, Universidad de Guayaquil Facultad de Ciencias Económicas).
- Perrone, G., Stea, G., Epifani, F., Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal biology*, 115(11), 1138-1150.
- Peylo, A., & Willeitner, H. (2001). Assessment of borates as wood preservatives. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 58(6), 476-482.
- Prado, M. (2016). Optimización de la producción de enzimas celulasas obtenidas de hongos xilófagos aislados de madera en descomposición. Valencia: Universidad de Carabobo Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología Departamento de Biología.
- Prinsen, P. (2010). Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. España: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla.
- Qadariyah, L., Azizah, N., Syafa'atullah, A. Q., Bhuana, D. S., & Mahfud, M. (2019, June). The Extraction of Natural Dyes from Henna Leaves (*Lawsonia Inermis* L.) by Ultrasound-assisted Method. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 543, No. 1, p. 012082). IOP Publishing.
- Quintero Díaz, J. C. (2011). Revisión: Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la Pudrición Blanca de la Madera. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín.*, 64, 5867-58882.
- Reader U, Broda P (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1:17-20.

- Remacha, G. (2004). Degradación de la madera por organismos xilófagos vegetales. *Universidad Politécnica de Madrid. España.*
- Reszka, P. (2008) In-depth temperature profiles in pyrolyzing wood. Dissertation. University of Edinburgh, Scotland.
- Rinaldi, R., & Schüth, F. (2009). Acid hydrolysis of cellulose as the entry point into biorefinery schemes. *ChemSusChem*, 2(12), 1096-1107.
- Rodríguez A, Xoconostle B, Váldez M (2004) Ecología Molecular de Hongos Ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 3:267-278.
- Rojas Rosales, M. D. C. (2015). Estudio químico-biológico de derivados de naftoquinonas con potencial actividad tripanocida.
- Rojas, N., & Rodriguez, M. (2008). Actividad antimicrobiana de *Tectona grandis* L. f., *Bursera simaruba* (L.) Sarg. y *Cedrela odorata* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13(4). Recuperado el 08 de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962008000400005
- Rutiaga-Quinones, J. G., Windeisen, E., Schumacher, P., & Wegener, G. (1999). Antifungal Effect of Extracts from *Quercus laurina* Humb. Et Bonpl.". *Curr. Top. Phytochem*, 2, 191-194.
- Rutiaga-Quiñones, J. G. (2001). *Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen.* Buchverl. Gräfelfing.
- Saitou N. & M. Nei. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Sakaguchi, K. (1951). A study on black Aspergilli. *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, 24, 138-142.
- Saldarriaga Osorio, Y., & Pineda Gutiérrez, F. (2001). *Manual de micología aplicada* (No. 589.2

- Samson, R. A., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F., Frank, J. M., & Frisvad, J. C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol*, 50(1), 45-56.
- Sancho, L. G., Ramírez, E. S., Cabeza, R. A., & Reol, E. M. (1991). Química y distribución de *Umbilicaria freyi*, *U. grisea* y *U. hirsuta* en la Península Ibérica. *Acta Botanica Malacitana*, (16), 175-184.
- Santini, E. (1988). Biodeterioração e preservação da madeira. Centro de Pesquisas Florestais de Santa Maria. São Paulo, Brasil. 30pp.
- Saparrat, M.C.N., Guillén F., Arambarri, A.M., Martínez, A.T., Martínez, M.J. (2002) Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriopsis rigida*, *Appl Environ Microbiol*, 68:1534-1540.
- Schmidt, Olaf. (2006). *Wood and Tree Fungi. Biology, Damage, Protection, and Use*. Springer, Germany.
- Schultz, T. y Nicholas, D. (2002). Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. *Phytochemistry*, 61(5), 555-560.
- Schwarze, F. W. (2007). Wood decay under the microscope. *Fungal biology reviews*, 21(4), 133-170.
- Schwarze, F.W.M.R. & Fink, S. (1998) Host and cell type affect the mode of degradation by *Meripilus giganteus*. *New Phytol.* 139, 721–731.
- Seifert KA (1999) Sap brocktain of comercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. In: Wingfield MJ, Seifert KA, Webber JF (eds) *Ceratocystis and Ophiostoma. Taxonomy, ecology, and pathogenicity*, 2nd edn. Am Phytopath Soc Press, St. Paul, Minnesota, pp. 141–151.
- Silva-Brandão K.L., M.L. Lyra & A.V.L. Freitas. 2009. Barcoding Lepidoptera: current situation and perspectives on the usefulness of a contentious technique. *Neotropical entomology*, 38, 441–51.

- Singh, A.P., Hedley, M.E., Page, D.R., Han, C.S. & Atisongkroh, K. (1992) Microbial degradation of CCA-treated cooling tower timbers, *IAWA Bull. n.s.* 13: 215–231
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2008). Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1669-1679.
- Singh, T. y Singh, A. (2012). A review on natural products as wood protectant. *Wood Science and Technology*, 46(5), 851-870.
- Sjöström, E. (1993) *Wood Chemistry. Fundamentals and Applications*, 2nd edition, Academic Press, San Diego, CA, USA, 293 p
- Smith, R. M., A. E. Martell, and R. J. Motekaitis. 1998. NIST critically selected stability constants of metal complexes database (NIST standard reference database 46). National Institute of Standards and Technology, U.S. Department of Commerce, Gaithersburg, Md.
- Solórzano S, Moya R, Chauhan S (2012a) Early genetic evaluation of morphology and some wood properties of *Tectona grandis* L clones. *Silv Genet* 61:58–65
- Solórzano S, Moya R, Murillo O (2012b) Early prediction of basic density, shrinking, presence of growth stress, and dynamic elastic modulus based on the morphological tree parameters of *Tectona grandis*. *J Wood Sci* 58:290–299
- SOLORZANO, Stephie; MOYA, Róger; MURILLO, Olmán. Early prediction of basic density, shrinking, presence of growth stress, and dynamic elastic modulus based on the morphological tree parameters of *Tectona grandis*. *Journal of wood science*, 2012, vol. 58, no 4, p. 290-299.
- Sorgeloos P., Lavens P., Lé P., Tackaert W. y Versichele D. (1986). *Manual para el Cultivo y Uso de Artemia en Acuicultura*. Programa Cooperativo Gubernamental FAO-Italia

- Stamm, A. J. (1959) The dimensional stability of wood, *Forest Products Journal*, 9(10), 375-381.
- Stokland, J.N., Siitonen, J., Jonson, B.G. (2012) *Biodiversity in Dead Wood* Cambridge University Press, 509 pp.
- Sumthong, P., Romero-González, R. R., & Verpoorte, R. (2008). Identification of anti-wood rot compounds in teak (*Tectona grandis* Lf) sawdust extract. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 28(4), 247-260.
- Susi, P., Aktuganov, G., Himanen, J., & Korpela, T. (2011). Biological control of wood decay against fungal infection. *Journal of environmental management*, 92(7), 1681-1689.
- Susi, P., Aktuganov, G., Himanen, J., & Korpela, T. (2011). Biological control of wood decay against fungal infection. *Journal of environmental management*, 92(7), 1681-1689.
- Taylor, A. M., Gartner, B. L., Morrell, J. J., & Tsunoda, K. (2006). Effects of heartwood extractive fractions of *Thuja plicata* and *Chamaecyparis nootkatensis* on wood degradation by termites or fungi. *Journal of Wood Science*, 52(2), 147-153.
- Telles, A., Nájera, J., Alanís, E., O., Jiménez, J., Gómez, M., y Muñoz, H. (2017). Propiedades Físico-mecánicas de la madera *Tectona grandis* L.F. de una plantación comercial en el estado de Michoacán. *Revista Mexicana De Ciencias Forestales*, 8(40), 37-56.
- Tenorio, C., Moya, R., Valaert, J., & Tomazello, M. (2016). Potencial de fabricación de pellets de residuos forestales de *Cupressus lusitanica* y *Tectona grandis* en Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 29(2). doi:10.18845/tm.v29i2.2694
- Thulasidas, P., & Bhat, K. (2007). Chemical extractive compounds determining the brown-rot decay resistance of teak wood. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 65(2), 121-124.
- TINOCO M. 1990., "Identificación de Hongos Xilófagos en el Valle del Mantaro". Tesis para optar el grado de Ing. Forestal de la FCFA-UNCP. Huancayo, PE. 70 pp.

- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. (2009) Airborne Particulate Matter in Urban Areas: A Study of the Role of Reactive Oxygen Species on the Toxic and Carcinogenic Effects and Implications to Human Health [Nova pbls, New York, 2009]. *Journal of Environmental Science and Health*. 2009;; p. 120-139.
- Velásquez, J., Rojas, L., & Encinas, O. (2019). Extractivos del duramen de especies latifoliadas como preservantes en la madera de *Pinus caribaea* Morelet. *Colombia Forestal*, 22(2), 44-54.
- Viana, L. M., Freitas, M. R., Rodrigues, S. V., & Baumann, W. (2003). Extraction of lapachol from *Tabebuia avellanedae* wood with supercritical CO₂: an alternative to Soxhlet extraction. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20(3), 317-325.
- Weaver, P. L. (2000). *Tectona grandis* L. f. Teca. Bioecología de Árboles Nativos y Exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales, 524.
- Westereng B, Ishida T, Vaaje-Kolstad G, et al. 2011. The putative endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose. *PLoS One* 6: e27807.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322
- Winandy, J.E. (2001) Thermal degradation of fire-retardant treated wood: Predicting residual service life, *Forest Products Journal*, 51 (2), pp. 4754.
- Yakovlev I, Vaaje-Kolstad G, Hietala AM, et al. 2012. Substrate-specific transcription of the enigmatic GH61 family of the pathogenic white-rot fungus *Heterobasidion irregulare* during growth on lignocellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95:979–90.
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Zheng, C., Lee, D., Liang, D.T. (2006) In depth investigation of biomass pyrolysis based on three major components: hemicellulose, cellulose and lignin. *Energy Fuels* 20, 388–393.

- Younas, M. T., Gardezi, S. R. A., & Khan, M. T. (2018). Distribution studies on wild mushroom species from district Poonch, Azad Jammu and Kashmir. *Plant Protection*, 2(1), 01-06.
- Zabel, R. A. y Morrell, J.J. (1992) Wood microbiology, Decay and its prevention, Academic Press Inc., pp. 476.
- Zanni E. 2004. Patología de madera. Degradación y Rehabilitación de Estructuras de Madera. Primera Edición. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina. 244p.
- Zanni, E (2008) Patología de la madera, Editorial Brujas, 241 pp.
- Zanni, E. (2004). Patología de la Madera. "Degradación y rehabilitación de estructuras de la madera". Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. 244p.
- Zaremski, A., Gastonguay, L., Zaremski, C., & Beauchêne, J. (2014). Molecular characterization and biodiversity of wood-decaying fungi in French Guiana.

COMENTARIOS