



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
CENTRO UNIVERSITARIO TACUAREMBÓ**

**EFFECTO DE LOS EXTRACTIVOS SOBRE LA DURABILIDAD NATURAL DE
*Eucalyptus bosistoana***

Por

Manuel RODRÍGUEZ MOLINA

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Grado en Ingeniería Técnica Forestal
y del Medio Natural en la Universidad
Politécnica de Valencia**

**TACUAREMBÓ
URUGUAY
2019**

PAGINA DE APROBACIÓN

Fecha: 31 de enero de 2019

Tribunal:

TUTORA: Claudia Marcela Ibáñez

ALUMNO: Manuel Rodríguez Molina

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está dedicado a todas y cada una de las personas que, aun estando a más de 10.000 km de casa, habéis conseguido que me sintiera en mi propio hogar. De igual manera agradecer a todo el equipo de profesionales del Centro Universitario de Tacuarembó, gracias por haberme hecho sentir parte de esta pequeña gran familia que sois.

Agradecer a mi tutora Marcela, a mi compañera Ximena y sobre todo a mi compañero Michael, gracias por tratarme como a un hermano desde el primer día.

Abrazos entre sonrisas, abrazos entre lágrimas, el abrazo inocente de un niño, un tímido adiós o un simple te echare de menos... El día antes de comenzar mi aventura me enseñasteis una cosa, y es que existen muchas maneras de decir una sola... Sin embargo solo soy capaz de contestaros con una simple frase: Yo también os quiero.

Papa, Mama, me gustaría que supierais que vosotros me habéis enseñado la lección más importante, y es que gracias vosotros aprendí a ser persona. Gracias por confiar en mí y apoyarme siempre.

Gracias Tata, que pensaras en mí cuando te hicieron describir a tu ejemplo a seguir me hizo sentir la persona más afortunada del mundo.

Y como no, dedicar este trabajo a la persona que me hizo sentir capaz de superar este y cualquier otro objetivo que me plantee, sin ti nunca hubiese llegado donde hoy estoy.

Por todo y para todos, MIL GRACIAS.

TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
TABLA DE CONTENIDO	IV
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES, TABLAS Y GRÁFICAS.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. La madera.....	5
2.2. Durabilidad Natural:	8
2.3. Agentes de degradación de la madera	11
2.4. <i>Eucalyptus bosistoana</i>	14
2.5. Ejemplar de estudio	17
2.6. Hipótesis de trabajo.....	18
2.7. Objetivo del estudio	19
2.7.1. Objetivo general.....	19
2.7.2. Objetivos específicos	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Madera a ensayar:.....	20
3.1.1. <i>E. bosistoana</i>	20
3.1.1.1. Características de los árboles	20
3.1.1.2. Corte de probetas.....	21
3.1.1.3. Marcado y toma de medidas	21
3.1.2. Especies de control y de referencia.	23
3.2. Extracciones	23
3.2.1. Extracción en polvo de madera.....	24
3.2.1.1. Rendimiento	25

3.2.1.2.	Análisis.....	26
3.2.1.3.	Taninos	26
3.2.2.	Preparación de las probetas	29
3.2.2.1.	Sin extraer	30
3.2.2.2.	Etanol	30
3.2.2.3.	Etanol+ H2O	30
3.2.2.4.	Hexano	30
3.3.	Ensayo de durabilidad	31
3.3.1.	Preparación y etiquetado de los frascos	32
3.3.2.	Cultivo de los hongos.....	33
3.3.3.	Evaluación final.....	33
3.3.3.1.	Pérdida de masa	34
3.3.3.2.	Microscopía	35
3.4.	Ensayo de inhibición.....	35
3.4.1.	Preparación del medio de cultivo	35
3.4.2.	Ensayo de efectividad fungicida.....	36
3.5.	Análisis estadístico de datos.....	36
4.	RESULTADOS	37
4.1.	Mediciones.....	37
4.2.	Extracciones.....	37
4.2.1.	Extracción en polvo de madera.....	37
4.2.1.1.	Rendimiento.....	37
4.2.1.2.	Análisis FTIR.....	38
4.2.2.	Taninos	40
4.2.2.1.	Polifenoles totales	40
4.2.2.2.	Taninos hidrosolubles	41
4.2.2.3.	Taninos condensados	42
4.2.3.	Ensayo de inhibición	42

4.3.	Ensayo de durabilidad	44
4.3.1.	Pérdida de masa.....	44
4.3.2.	Contenido de humedad	46
4.4.	Microscopía	47
5.	DISCUSIÓN.....	50
6.	CONCLUSIONES	54
7.	RESUMEN.....	55
8.	SUMMARY	56
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	57
10.	ENEXOS	61

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES, TABLAS Y GRÁFICAS

Ilustración 1: Distribución natural de <i>E. bosistoana</i>	16
Ilustración 2: Mapas de situación.....	18
Ilustración 3: Calibre de precisión 0.05 mm y Balanza de precisión 0.0001 g ..	22
Ilustración 4: Sistema Soxhlet.....	24
Ilustración 5: Medidas de los frascos de ensayo (EN113).....	31
Ilustración 6: Formato del etiquetado de frascos. (Imagen de autor).....	32
Ilustración 7: Estructura microscópica de probeta antes del ensayo (imagen de autor)	47
Ilustración 8: Estructura microscópica de probeta	48
Ilustración 9: Estructura microscópica de probeta extraída en	48
Ilustración 10: Estructura microscópica de probeta extraída en	49
Tabla 1: Lista de verificación de la durabilidad natural (Scheffer y Morrell, 1998).	10
Tabla 2: Tiempos de ciclado "Soxhlet".....	25
Tabla 3: Clases de durabilidad natural frente a hongos xilófagos (EN350-1) ...	34
Tabla 4: Cálculo de rendimientos de extracción en porcentaje de extractivos..	38
Tabla 5: Resultado de polifenoles totales expresado en miliequivalentes de ácido gálico por gramo de madera seca.....	40
Tabla 6: Resultado de taninos hidrolizables expresado en miliequivalentes de ácido tánico por gramo de madera seca.....	41
Tabla 7: Resultados de taninos condensados por el método Naima et al (2014).	42

Tabla 8: Resultados de taninos condensados por el método FAO (2000).....	42
Tabla 9: Resultados para la pérdida de masa.	44
Tabla 10: Comparación entre la clase de durabilidad de las diferentes especies.	45
Tabla 11: Comparación entre la clase de durabilidad de las diferentes extracciones.....	45
Tabla 12: Resultados para el contenido de humedad tras el ensayo.....	46
Gráfica 1: Producción industrial de maderas en el 2000.....	6
Gráfica 2: Resultados del análisis FTIR.....	39
Gráfica 3: Curva de calibración de ácido gálico.....	40
Gráfica 4: Curva de calibración de ácido tánico.....	41
Gráfica 5: Velocidad de crecimiento de <i>Coriolus versicolor</i>	43
Gráfica 6: Velocidad de crecimiento de <i>Laetiporus sulphurens</i>	43

1. INTRODUCCIÓN

En el siguiente texto se redacta el Trabajo Final de Grado requerido para culminar la formación como graduado en Ingeniería Técnica Forestal y del Medio Natural por la Universidad Politécnica de Valencia (España). Dicho trabajo ha sido totalmente desarrollado y redactado por el alumno Manuel Rodríguez Molina durante su beca de intercambio Santander Iberoamérica, en el Centro Universitario de Tacuarembó (CUT), de la Universidad de la República (Uruguay). Durante las siguientes páginas se aborda el estudio centrado en la durabilidad natural de la madera de *Eucalyptus bosistoana* revisando y completando un estudio realizado con anterioridad por el mismo Grupo Uruguayo I+D de Deterioro y Protección de Maderas del CUT.

La madera es un material natural y renovable con gran importancia para la sociedad. Desde los inicios de la humanidad, se ha empleado para diversas actividades de gran relevancia en la evolución y desarrollo tanto social como económico. En la actualidad, la madera tiene un amplio abanico de aplicaciones. Es el principal producto para la fabricación de muebles y su uso como material de construcción está en pleno auge debido a sus excelentes propiedades mecánicas, además de tratarse de un material obtenido de manera sostenible. Históricamente ha sido utilizada como una de las principales fuentes energéticas. En la actualidad existe una recuperación de este uso debido al desarrollo de productos de alto valor energético añadido, como el uso de sus derivados en la obtención de biocombustibles, tras ser sometida a diferentes procesos fisicoquímicos, para la producción de pellets y briquetas. También cabe destacar su importante presencia como material en el sector de los embalajes y transporte de mercancías.

Debido a sus usos en muchas ocasiones encontramos madera expuesta a una gran cantidad de factores que producen un deterioro lo cual devalúa sus cualidades en la gran mayoría de los usos nombrados. Estos factores están asociados a diversos tipos de organismos, como: bacterias, hongos, insectos o taladros marinos. A pesar de que ninguna especie maderera es totalmente resistente a estos ataques, existen algunas especies que presentan una alta durabilidad natural. Algunas de estas especies muestran una mayor resistencia, que dependiendo del factor que produzca el ataque, se mantendrán las propiedades de la madera (Ibáñez et al., 2009).

En busca de conocer mejor la durabilidad natural intrínseca de la madera y de los productos madereros, sin la necesidad de aplicar productos químicos, se ha llevado a cabo una serie de investigaciones que buscan conocer y clasificar las especies de madera que poseen una mayor durabilidad natural. Por lo tanto, antes de decidir si es necesario o no la aplicación de productos que mejoran la durabilidad se han considerado dos aspectos importantes. En primer lugar, es importante conocer la durabilidad de nuestra madera frente al ataque de hongos e insectos. En segundo lugar, es necesario conocer la permeabilidad de nuestra madera a los líquidos. El primero de estos factores está estrechamente ligado a la composición química, y estructura del material maderero, entre otros factores, mientras que el segundo depende de la estructura microscópica de la misma.

Se pueden diferenciar dos regiones dentro de un mismo tronco, la albura y el duramen. Es importante conocer la existencia de estas regiones debido a que entre ellas existen grandes diferencias tanto químicas como físicas que afectan a la durabilidad natural y la facilidad de absorción de productos químicos, la impregnabilidad. Por un lado, la albura es más fácilmente atacada por hongos e insectos xilófagos. Debido a sus características físicas, que buscan el transporte de las sustancias en el interior del árbol vivo, la madera

correspondiente a la albura es mucho más fácil de impregnar. Por otro lado, la madera de duramen, a pesar de presentar una difícil impregnación, suele ser mucho más resistente a estos ataques. Por estos mismos motivos se denomina durabilidad natural a la durabilidad que presenta la madera del duramen de forma natural, sin aplicar ningún producto que busque mejorar esta misma.

La durabilidad natural es muy variable dentro de una misma especie dependiendo de las condiciones ambientales en las que creció el ejemplar, la genética, la composición química y una gran variedad de factores. Este estudio se centrará en la madera de *Eucalyptus bosistoana*, ya que a pesar de no existir mucha información sobre la especie, está clasificada como “muy durable” o de “clase 1” (Thornton, et al., citado en Scheffer y Morrell, 1998). Este estudio, basándose en ciertas normas, concluye que el material maderero de *E. bosistoana* posee una alta durabilidad natural. En el presente trabajo buscaremos conocer más sobre esta durabilidad natural y dentro de los factores que podrían considerarse causantes de esta, la relevancia del contenido de extractivos; para ello se utilizarán diferentes técnicas para extraer, analizar y comprender los extractivos de esta especie.

Para el estudio se utilizó la madera de un ejemplar de *E. bosistoana* procedente del departamento de Cerro Largo, en el terreno perteneciente a la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt de la Facultad de Agronomía de la UdelaR (32°21'28"S; 54°26'11"W). El ejemplar objeto de estudio tiene una edad aproximada de unos 56 años y ha crecido en un suelo totalmente natural destinado a un uso agroforestal. Con anterioridad, este mismo centro universitario realizó un estudio similar, con la misma especie pero con edad y condiciones de crecimiento diferente ya que se utilizaron dos ejemplares de *E. bosistoana* de 50 y 22 años de edad, el primero de ellos igualmente procedente de la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt pero esta vez originario de una

zona forestada en los márgenes de un tajamar construido con suelo de la zona (32°20'51"S; 54°26'58"W), por lo que se presupone que las condiciones de crecimiento y por tanto el contenido de extractivos serán diferentes en ambos casos; por otro lado el ejemplar de 22 años pertenecía a la Unidad Experimental de Glencoe (32°01'32,52" S, 57°09'07,54" W, Paysandú, Uruguay), propiedad del INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) crecido en suelo basáltico. Los resultados que se obtuvieron en este estudio previo fueron discordantes con los resultados de la bibliografía de ensayos similares con especies de características semejantes a las de este eucalipto, por lo que se decidió repetir el estudio de forma más completa con ejemplares con un crecimiento más cercano al que se presentaría en una plantación forestal.

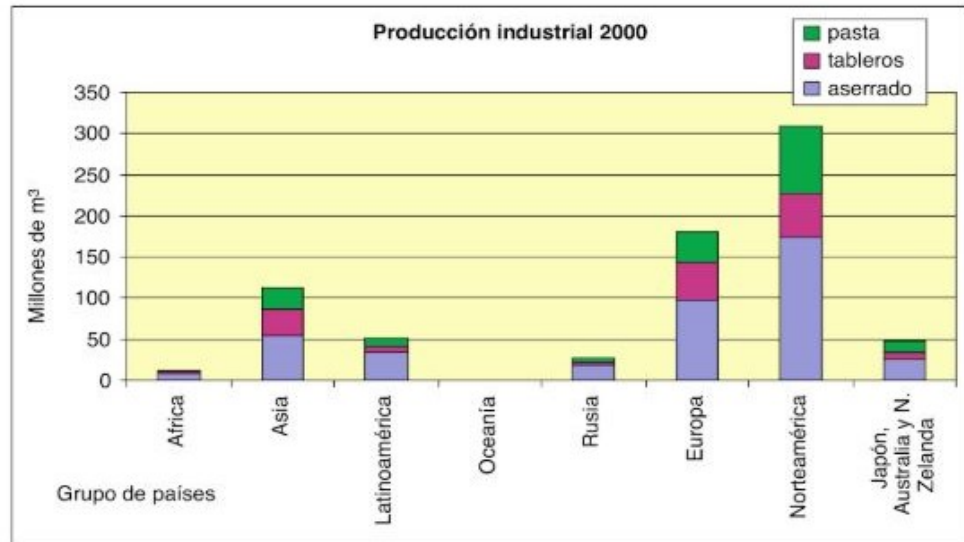
En resumen, este estudio tiene como finalidad conocer la influencia de los extractivos, tanto polares como apolares, en la resistencia a la degradación producida por diferentes hongos de deterioro en la madera de *E. bosistoana*. Así conocer de qué modo intervienen los diferentes compuestos extractivos de esta madera en su alta durabilidad natural.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. La madera

La “madera” fue definida como materia prima durante muchos años (Trendelenburg y Mayer-Wegelin, citado en Schweingruber y Büntgen, 2013), así como una reconocida fuente de energética de gran valor en diferentes aplicaciones (Vorreiter, citado en Schweingruber y Büntgen, 2013). En botánica y anatomía se describe la madera como el producto del crecimiento secundario de la planta, crecimiento radial (Fengel y Wegener, citado en Schweingruber y Büntgen, 2013).

En el año 2000 más de la mitad de la demanda maderera mundial era usada como leña, siendo aproximadamente un 75% en los países en vías de desarrollo. A pesar de estos datos, en los países más desarrollados este uso de la madera no alcanza el 25% cobrando gran importancia la producción industrial de productos con valor añadido como madera aserrada, tableros o pasta de papel. Por lo que se llega a la conclusión que la industrialización de la madera es una realidad para el desarrollo. En la gráfica 1 se refleja la producción industrial de productos madereros de primera transformación según las diferentes zonas geográficas (Vignote y Martínez, 2006). En el 2016 la FAO emitió un artículo en el que se muestra como el consumo de madera industrializada, ha continuado creciendo en regiones como, Europa o Asia. Mientras que el uso de madera como combustible se mantiene constante a nivel mundial (FAO, 2016).



Gráfica 1: Producción industrial de maderas en el 2000
(FAO, citado en Vignote y Martínez, 2006)

Debido al creciente porcentaje de madera procesada industrialmente nace la necesidad de conocerla mejor, así como sus características positivas, negativas y cómo mejorar estas últimas. Las componentes estructurales de la madera son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Estos dos últimos componentes se encuentran formando una matriz que rodea la estructura formada por la celulosa y confieren a la madera unas características propias como material.

La celulosa es el principal componente de la madera, alcanzando valores entre el 40% y el 44% del peso seco de madera, compuesta por unidades de glucosa ($C_6H_{10}O_5$), unidas por enlaces glucosídicos $\beta - 1 - 4$ (dos unidades de glucosa forman un disacárido celobiosa). El grado de polimerización puede llegar hasta los 30.000, equivalente a una masa molecular de orden 2,3 millones. Debido al tipo de enlace que une las moléculas de glucosa, la celulosa, tiene una forma lineal, estabilizada por una gran cantidad de puentes de hidrógeno. Forma

grupos fibrosos de 40-70 moléculas de un espesor entre 3,5 y 7,5 *nm* y una longitud de varios μm . Estas moléculas están orientadas longitudinalmente, de manera que forman un agregado cristalino muy fuerte. Estas agrupaciones de moléculas, no están unidas covalentemente, ya que solo se encuentran unidas por puentes de hidrógeno, que aunque muy débiles individualmente por su elevado número aportan una estructura de gran firmeza a las estructuras de celulosa. La estructura cristalina de la celulosa ha sido estudiada por diferentes técnicas, como difracción de Rayos X y otros métodos basados en la absorción de luz infrarroja polarizada, estos estudios han dado como resultado que la estructura de la celulosa presenta un alto grado de cristalinidad, aunque inferior al 100%, dependiendo del origen. Cuanto mayor es la densidad, mayor es el grado de cristalinidad (Sjöström, 1993).

Las hemicelulosas son polímeros de bajo peso molecular, compuestas principalmente por hexosas pentosas o subunidades de ácido urónico, en proporciones variables dependiendo de la especie. Estos compuestos se encuentran asociados a la celulosa, mediante interacciones polisacárido-polisacárido. El contenido de poliosas varía radialmente en el interior del tronco, presentándose en mayor proporción en la parte central, existiendo una variabilidad en la composición de azúcares. El tipo de hemicelulosas presentes en la madera varía según la especie, edad, parte del árbol, etc. Las hemicelulosas se encuentran a lo largo de toda la pared celular y tienen como principal función ser el intermediario entre la celulosa y la lignina, y posiblemente facilitar la inserción de las microfibrillas. Existe una fuerte adhesión entre la hemicelulosa y la celulosa, fortalecida por los puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals. Estos polímeros son de gran importancia en la fabricación de pulpa, ya que aumenta el rendimiento y la resistencia del papel (Sjöström, 1993).

La lignina es una macromolécula de la madera, formada por la polimerización deshidrogenativa al azar de alcoholes para-hidroxicinámicos, en una reacción catalizada por enzimas vía radicales libres. Forman un polímero aromático, heterogéneo y ramificado. Aproximadamente un cuarto del peso de la madera seca es la parte correspondiente a las ligninas (Rayner y Boddy, citado en Mora y Encinas, 2006).

Dentro de un mismo árbol existen dos regiones muy diferenciadas. En la parte más externa se encuentra la madera de albura, que suele ser más pálida. Mientras que en el interior encontramos la madera de duramen, a menudo más oscura. La albura es la parte del tronco en la que tiene lugar el flujo de savia en el árbol vivo. A medida que el ejemplar crece los anillos más internos se transforman en duramen, mediante el proceso denominado duraminización. El duramen tiene propiedades que pueden influir significativamente en el uso final del producto. Entre ellos, destaca la mayor durabilidad, ya que presenta mejor resistencia al deterioro por insectos, perforadores marinos y microorganismos (Taylor et al., 2002).

2.2. Durabilidad Natural:

Algunas especies vegetales han evolucionado para producir compuestos denominados extractivos, capaces de proteger la madera de agentes bióticos. Estos extractivos son considerados la principal fuente de resistencia a la descomposición de la maderera. Estos compuestos se producen durante la formación del duramen, con la muerte de las células de la zona interior de la albura. Durante este proceso tienen lugar una serie de reacciones en la que los azúcares almacenados y el almidón se transforman en una serie de compuestos con características fungitóxicas que constituyen el nuevo duramen. Sin embargo, la albura de casi todas las especies carece de durabilidad natural (Toole, Eslyn y Highley, citado en Scheffer y Morrell, 1998). La resistencia a la descomposición

varía entre las especies, individuos de una misma especie e incluso en las diferentes partes de un mismo árbol (Scheffer y Cowling, citado en Kirker et al, 2013).

Zabel y Morrell (1992) definen la “durabilidad” de la madera como la capacidad intrínseca del material para resistir el desgaste debido al ataque de los hongos xilófagos, bacterias, insectos y perforadores marinos, así como el producido por causas químicas, mecánicas o por exposición a la intemperie.

En muchos países se ha realizado una clasificación de las diferentes especies de madera teniendo en cuenta su resistencia a la descomposición. En el ya citado *Natural Durability of Wood* de Scheffer y Morrell (1998), se realiza una clasificación de las especies mediante evaluaciones en cultivo puro y pruebas de campo. Las pruebas de campo se realizan bajo condiciones naturales con alta variabilidad, lo cual dificulta en gran medida la comparación entre los diferentes ensayos. Mientras que los resultados obtenidos mediante pruebas en laboratorio son más fáciles de controlar. Aun así, existen variaciones en las cepas de los hongos o las técnicas utilizadas, lo cual puede influir en los resultados.

Tras someter las muestras a los diferentes ensayos los autores evaluaron la pérdida de peso de la madera siguiendo los criterios de la *American Society for Testing and Materials Standard D2107 (American Society for Testing and Materials, 1993)*. Con los resultados obtenidos, se clasifican las distintas especies madereras de acuerdo a una escala de cuatro niveles: 1 = muy resistente, 2 = resistente. 3 = moderadamente resistente y 4 = no resistente o perecedero.

En la publicación se adjunta una tabla en la que se contemplan las categorías en las que se clasifican una gran cantidad de especies de madera. A

continuación, se presenta una extracción de la misma en la que se observa algunos tipos de madera de eucalipto.

ESPDECIES	DECAY	AREA	LAB. TEST	FUENTE
<i>Eucalyptus sp.</i>	4	AS	F	Tewari 1978
<i>E. bosistoana</i>	1	AS	F	Thornton et al. 1993
<i>E. camaldulensis</i>	2	AS	F	Thornton et al. 1993
<i>E. globulus</i>	3-4	AS	F	Chudnoff 1984, Thornton et al. 1993
<i>E. grandis</i>	4	AS	F	Thornton et al. 1993
<i>E. viminalis</i>	4	AS	F	Thornton et al. 1993

Tabla 1: Lista de verificación de la durabilidad natural (Scheffer y Morrell, 1998).

Existe una variación en la resistencia al ataque de hongos entre los diferentes tipos de madera, a pesar de que no existe ninguna madera totalmente inmune a este tipo de ataque. Estas diferencias se deben en gran medida a la variación en el contenido de extractivos con capacidades fungitóxicas. Por lo general un mayor contenido de extractivos conlleva una mayor resistencia (Pometti et al., 2010). Como se ha explicado con anterioridad, estos extractivos tóxicos suelen depositarse en la madera durante el proceso de duraminización, ya que las células parenquimáticas de la albura poseen altos niveles de extractivos en forma de carbohidratos transportados por las células vivas, los cuales se transforman en compuestos fenólicos en la zona de transición albura-duramen. Estos metabolitos tóxicos se acumulan hasta producir la muerte celular, lo que conlleva a la duraminización; estos extractivos se depositan en las paredes celulares de traqueidas, fibras y vasos (Murace y Spavento, 2014).

Esta toxicidad se debe a la capacidad de formación de puentes de hidrogeno con las proteínas bacterianas, lo que las desactiva (Vijayaraghavan y Ramanujan, 1999). Estos autores demostraron un mayor efecto fugitóxico de los

taninos hidrolizables frente a los taninos condensados. Por otro lado, muchos de los hongos patógenos de las plantas segregan enzimas como celulasas y lignasas, capaces de romper los tejidos. En este caso los taninos actúan como inhibidores enzimáticos, complejándose con proteínas para bloquear su acción.

Existen diferentes métodos para la extracción en madera, lo más utilizado son métodos de extracción asistidos por ultrasonido o sistema Soxhlet, la técnica más aceptada. Las técnicas de extracción Soxhlet generalmente están bien establecidas y presentan un rendimiento mayor a otras técnicas de extracción convencionales (Luque de Castro y García-Ayuso, 1998). Otro método de extracción es el que denominaremos extracción en “Baño María”, este método de extracción consiste en la inmersión de las muestras en el disolvente, a una temperatura determinada y manteniendo una agitación constante durante todo el proceso (Santos, 2013).

Los extractivos de la madera están compuestos por diferentes compuestos: terpenoides, esteroides, grasas, ceras, constituyentes fenólicos y componentes inorgánicos. De especial interés para este estudio son los componentes fenólicos, estos se encuentran en mayor cantidad en el duramen, se han identificado miles de compuestos fenólicos siendo los grupos más importantes: estilbenos, lignanos, taninos hidrolizables, flavonoides y taninos condensados. Todos estos poseen propiedades fungicidas que aportan protección ante el ataque de diversos organismos (Sjöström, 1993).

2.3. Agentes de degradación de la madera

Al tratarse de un material orgánico, la madera presenta una alta susceptibilidad a ser degradada por una amplia variedad de agentes biológicos, tales como hongos, bacterias, insectos o perforadores marinos. De estos agentes biodegradantes, los hongos se consideran de mayor interés, ya que son capaces

de degradar enzimáticamente alguno o todos los componentes estructurales de la madera (celulosa, hemicelulosa y lignina). Los diferentes tipos de pudrición son considerados una de las principales causas de biodeterioro, ya sea en madera en contacto con el suelo, expuesta a la intemperie o en condiciones con riesgo de humidificación (Mora y Encinas, 2006).

Los organismos pertenecientes al reino Fungi, hongos, son organismos heterótrofos que no poseen clorofila, por lo que son capaces de vivir en la oscuridad y basan su nutrición en materias orgánicas ya existentes, las cuales son absorbidas por estos mediante hifas del medio en el que crecen (Piché, citado en Mora y Encinas, 2006). Los hongos xilófagos, son los hongos capaces de degradar y nutrirse de la madera, requieren ciertas condiciones como una humedad en la madera entre 18 y 55%, una temperatura ambiente preferentemente entre 18 y 28 °C, extractivos de la madera, radiación lumínica baja y la albura es mucho más susceptible a ser degradada debido a sus características morfológicas (Mora y Encinas, 2006).

La descomposición que producen los hongos en la madera es uno de los factores más importantes en lo referente a la durabilidad de la madera. En algunos casos, la capacidad intrínseca de la madera a resistir la descomposición producida por estos hongos, es considerada sinónimo de la durabilidad de la misma. Existen tres clases de descomposición o podredumbre: blanda, marrón o parda y blanca, siendo las dos últimas las más interesantes para el estudio. Por un lado, en la pudrición parda los hongos consumen principalmente los carbohidratos, mientras que la pudrición blanca descompone principalmente la lignina (Tsoumi, citado en Pometti et al., 2010)

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron cuatro hongos diferentes, dos de ellos causantes de podredumbres blancas y otros dos de podredumbres pardas, buscando someter las muestras de madera a diferentes tipos de ataque.

Pudiendo evaluar así la durabilidad natural de la madera de *E. bosistoana* ante múltiples formas de degradación.

Por un lado, se utilizaron *Coriolus versicolor* y *Pleurotus ostreatus*, dos Basidiomycetes causantes de podredumbre blanca. Esta podredumbre se caracteriza por la degradación casi total de la lignina y la degradación parcial de la celulosa y hemicelulosa. Las hifas de estos hongos crecen en la superficie interna de las paredes celulares, presentando un ataque inicial a través de los radios del parénquima y los diferentes vasos; posteriormente pasan de una célula a las adyacentes a través de las punteaduras. Las hifas se extienden más allá de los lúmenes secretando metabolitos enzimáticos, o no, en busca los nutrientes producidos tras la degradación de la pared. A simple vista, el ataque puede pasar desapercibido en sus primeras fases, posteriormente aparecen cambios en el color y en el peso. A nivel macroscópico la descomposición es progresiva y uniforme, mientras que a nivel microscópico se puede apreciar el afinamiento de la pared de un modo no uniforme. Teóricamente estos hongos son los únicos capaces de producir una degradación completa de la madera, ya que son los únicos capaces de degradar la lignina junto al resto de componentes de la pared celular. Su sistema ligninolítico está constituido por peroxidasa (manganeso y lignino peroxidasa) y fenoloxidasas (lacasas), que juntas son capaces de mineralizar la lignina (Pointing, citado en Ibáñez et al., 2009). La degradación de la lignina permite a estos hongos tener acceso a la celulosa y hemicelulosa, sus verdaderas fuentes de carbono y energía (Ibáñez et al., 2009).

Por otro lado, también se utilizaron los Basidiomycetes *Gloeophyllum trabeum* y *Laetiporus sulphureus*, ambos hongos de pudrición marrón. En este caso se degrada de manera rápida la celulosa y la hemicelulosa, siendo capaces de modificar la lignina sin llegar a producir la mineralización de la misma. La colonización de la madera por parte del hongo se inicia de manera similar a la

producida por los hongos de pudrición blanca, penetrando por las estructuras abiertas y cruzando entre las células a través de las punteaduras, inicialmente las hifas penetran en el sistema celular axial (traqueidas y fibras) y radios. Al avanzar la invasión se segregan una serie de metabolitos enzimáticos y no enzimáticos que comienzan a degradar la pared; estos metabolitos se encuentran en el interior de la vaina hifal. En los estados iniciales la madera se encuentra estructuralmente intacta, pero con el avance del ataque empieza a producirse una disminución volumétrica que conlleva a la aparición de grietas de contracción en dirección a las fibras y los radios leñosos. En los estados más avanzados y al secarse la madera, con la pérdida de carbohidratos aumenta la contracción, perdiendo rápidamente las propiedades mecánicas. Como resultado del ataque queda un residuo en forma de polvo pardo rojizo de una granulometría muy fina, el cual se corresponde a la lignina químicamente modificada que no ha podido ser degradada durante el proceso. A nivel microscópico, el ataque de hongos de pudrición parda en latifoliadas, presenta una destrucción de la pared secundaria, dejando como resultado un material residual sin fuerza para mantener la forma original, debido al afinamiento de la pared (Ibáñez et al., 2009).

2.4. *Eucalyptus bosistoana*

El género *Eucalyptus* es un género de árboles y arbustos de perteneciente a la familia Myrtaceae (Mito), principalmente procede de Australia, aunque podemos encontrar algunas especies nativas de Nueva Guinea, Indonesia y Filipinas. Existen más de setecientas especies pertenecientes a este género. Se trata de un género con una gran importancia industrial debido a sus múltiples usos en la industria maderera, papelera, aceites esenciales y fines decorativos. Existe una amplia variedad en las especies del género, arbóreas o arbustivas, hoja perenne (mayoría) o hoja caduca. Aunque todas tienen características similares como follaje con alto contenido en aceites y capullos

florales con formas cónicas cubiertos por membranas en forma de copa, llamado opérculo o calipto, que cae con el crecimiento de la flor (Salem Press Encyclopedia, 2018).

Mientras que en Australia los eucaliptos ocupan cerca del 75% del territorio; en Asia, Estados Unidos, América del Sur y Europa el eucalipto es utilizado en plantaciones que buscan su aprovechamiento, ya sea para la obtención de madera, aceites esenciales o con fines decorativos. Es de especial interés el uso de este género debido a su rápido crecimiento y capacidad de crecimiento en suelos pobres o erosionados, así como en áreas encharcadas. A pesar de estos aspectos positivos el cultivo de eucalipto se encuentra en una situación controvertida, debido a que en ocasiones puede considerarse como especie invasiva y de especial peligro ante incendios por generar residuos combustibles como restos de corteza, restos de autopoda o aceites esenciales (Salem Press Encyclopedia, 2018).

En concreto este estudio se centrará en la durabilidad natural de la madera de *Eucalyptus bosistoana*. Esta especie se distribuye de forma natural en las regiones centro-este y sur de Australia en zonas costeras desde los 0 a los 300 *m* sobre el nivel del mar. Para su óptimo crecimiento requiere de climas templado-fríos con temperaturas máximas comprendidas entre los 20 y 29 °C y mínimas de entre 1 y 6 °C, tolerando algunas heladas ocasionales; con una precipitación entre 700 y 1200 *mm* al año (FAO, Boland et al., citado en Brussa, 1994).



Ilustración 1: Distribución natural de *E. bosistoana*
(Australasia Virtual Herbarium, 2018)

El *E. bosistoana* presenta preferencia por suelos de buena calidad, suelos limosos profundos sobre piedra caliza, siendo capaz de soportar periodos de anegamiento y sequías. Se suele encontrar en masas multiespecificas junto a otras especies de *Eucalyptus* o formando pequeños bosquetes monoespecíficos. Tiene un buen desarrollo en áreas abiertas o a lo largo de pequeñas planicies de ríos (Boland et al., 2006). Por lo que muestra un buen crecimiento en la zona de origen a pesar de no encontrarse en su óptimo ecológico.

La madera de *E. bosistoana* es considerada como dura, resistente y muy duradera. El duramen de esta especie presenta un color marrón pálido, su textura es fina y uniforme; se trata de una madera muy densa, por lo que es muy difícil de trabajar. Es empleada en trabajos de construcción pesada, postes de madera y durmientes (Wood Solutions, 2018).

2.5. Ejemplar de estudio

En el estudio previo realizado en nuestro laboratorio por el Grupo de Deterioro y Protección de Madera, se evaluó la durabilidad natural de *E. bosistoana* de diferentes edades y procedencias. Por un lado, se trabajó con madera de duramen de árboles procedentes de la Unidad Experimental de Glencoe propiedad del INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) con 22 años de edad crecidos sobre un suelo de basalto, con deficiencias que impidieron un crecimiento de buena calidad. Por otro lado, se utilizó madera de duramen de árboles procedentes de la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt; Facultad Agronomía UdelaR, crecido en los márgenes de un tajamar construido con material del suelo cercano, un suelo arcillo-limoso de buena calidad y condiciones de crecimiento. Luego se quitaron los extractivos de ambas maderas con etanol, y se ensayó su durabilidad natural frente a hongos de pudrición. En ambos casos se obtuvieron resultados contrarios a lo recopilado por la bibliografía, ya que en esta se refleja cómo a mayor presencia de extractivos en la madera mayor será su resistencia frente al ataque de hongos, mientras que los ensayos mostraron un mayor ataque por los hongos en las probetas que no habían sido sometidas a ningún proceso de extracción y por lo tanto todos sus extractivos estaban presentes durante el ensayo.

En el presente ensayo, se utilizó madera de árboles procedentes de la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt de la Facultad de Agronomía de la UdelaR en el departamento de Cerro Largo en las proximidades a la coordenada geográfica (32°21'28"S; 54°26'11"W). Plantados a partir de semillas procedentes de un ensayo de introducción de especies instalado en 1959 a partir de semillas obtenidas en Nueva Gales del Sur (Australia) con una edad aproximada de 56 años en el momento de su corta en agosto de 2018, habiendo crecido en un bosque multiespecífico ubicado en la Estación Experimental Prof. Bernardo

Rosengurtt (Bañados de Medina, Cerro Largo), en suelo y condiciones similares al ejemplar de la misma parcela empleado en el estudio previo.

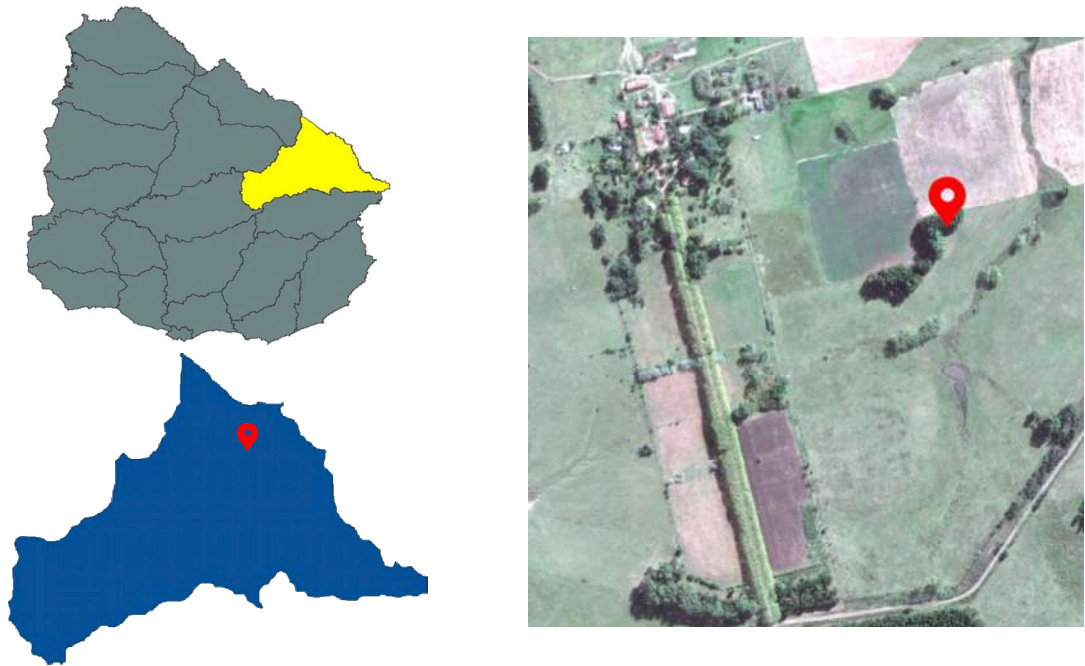


Ilustración 2: Mapas de situación.

2.6. Hipótesis de trabajo.

La durabilidad natural de la madera de una determinada especie depende diversos factores, tales como la relación albura / duramen, composición química, contenido de extractivos, lugar uso final, tipo de organismos atacantes y el contenido en humedad de la madera (Ibáñez et al., 2009). Dentro de estos factores uno de los más importantes, que podrían tener un rol fundamental, son los extractivos fenólicos. Dentro de ellos, los taninos presentes en la madera, que funcionan como defensa del árbol frente al ataque de microorganismos debido a su toxicidad, mantienen esta propiedad de protección en la madera en servicio. Por lo que si son extraídos de la misma, disminuye su durabilidad frente a hongos.

2.7. Objetivo del estudio

2.7.1. Objetivo general

Estudiar la influencia de la actividad funguicida de los extractivos de *Eucalyptus bosistoana* en la durabilidad natural de la madera.

2.7.2. Objetivos específicos

Analizar el efecto de los extractivos presentes en el duramen de *Eucalyptus bosistoana* sobre la alta durabilidad natural de esta especie maderera, frente a hongos descomponedores.

Conocer la capacidad funguicida de los extractivos de *Eucalyptus bosistoana*, sobre hongos descomponedores de madera.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Madera a ensayar:

3.1.1. *E. bosistoana*

3.1.1.1. Características de los árboles

Para este estudio se utilizó madera procedente de los primeros tres metros de fuste, buscando una mayor rectitud y evitando, en la medida de lo posible, la presencia de ramas, consiguiendo una mayor homogeneidad del material maderero. Estos tres metros se seccionaron en trozas de un metro para facilitar su transporte, ya que se trata de una madera de alta densidad y por lo tanto difícil de manipular.

El suelo en el que crecieron los árboles, está clasificado como 6. $\frac{1}{3}$ siguiendo la clasificación de productividad CONEAT. Lo que, según la descripción de estos índices realizada por el Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, equivale a suelos formados por colinas de origen sedimentario sin presencia de rocas, con pendientes comprendidas entre el 10 y el 14%, predominantemente formados Litosoles Subéutricos Melánicos, con una textura franco limosa, color oscuro, con buen drenaje y fertilidad media. Suelen estar asociados a Brunosoles Éutricos Lúvicos, Típicos (Praderas Negras), de profundidad moderada, de características similares, pero más fértiles.

3.1.1.2. Corte de probetas

Las tres trozas de *E. bosistoana* se enviaron al carpintero a quien se le encomendó el trabajo de corte de las probetas siguiendo las restricciones requeridas por las normas utilizadas. A pesar de que en el presente estudio está basado en la norma europea EN113 (1996) que emplea probetas de dimensiones: $(50 \pm 0.5)mm \times (25 \pm 0.5)mm \times (15 \pm 0.5)mm$, se modificaron las dimensiones de las mismas, que se sustituyeron por las empleadas en la norma estadounidense AWWA E10-16 *Laboratory Method for Evaluating the Decay Resistance of Wood-Based Materials Against Pure Basidiomycete Cultures: Soil/Block Test* (American Wood Protection Association, 2016) siendo estas probetas cúbicas de $20 mm \times 20 mm \times 20 mm$, cortadas siguiendo la dirección de los tres planos de la madera (tangencial, radial y transversal). Al disminuir las dimensiones de las probetas manteniendo las direcciones de corte, se espera detectar mejor el daño, para un tiempo de cultivo ligeramente menor al correspondiente a las probetas de mayor tamaño. Dado que se está testando la durabilidad natural de la madera, es fundamental que la madera corresponda a la parte del duramen.

3.1.1.3. Marcado y toma de medidas

Una vez recibidas las probetas se numeran utilizando un marcador indeleble por una de sus caras y un lápiz de grafito en la cara opuesta, previniendo la posibilidad de que se borrarán las marcas. Ya que la madera es un material altamente higroscópico, una vez marcadas se introdujeron en una cámara de acondicionamiento a $25\text{ }^{\circ}C$ y 75% de humedad, buscando mantener un contenido de humedad homogéneo entre las diferentes probetas.

Para la caracterización de las probetas se tomaron las medidas en las tres dimensiones de estas, con un calibre manual "MITUTOYO" con una precisión de 0.05 mm. Luego se procedió al pesado de las probetas mediante el uso de una balanza de precisión "SHIMADZU ATX224", con un error de 0.0001 g. Teniendo en cuenta los datos obtenidos se calculó la densidad de las muestras. Se utilizaron para el ensayo, aquellas probetas que no diferían más de un 15% del valor medio de densidad. Esa densidad corresponde a un contenido de humedad inicial, que fue determinado en paralelo a partir de dos probetas que se retiraron del ensayo y se llevaron a estufa a $100 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$, y se secaron hasta peso constante.



Ilustración 3: Calibre de precisión 0.05 mm y Balanza de precisión 0.0001 g
(Imágenes de autor)

3.1.2. Especies de control y de referencia.

Paralelamente se realizó el mismo procedimiento con probetas de otras dos especies de *Eucalyptus*: *E. camaldulensis* y *E. grandis*. Estas dos especies son utilizadas como referencia y como control del ensayo respectivamente, ya que de ambos se conoce la resistencia frente a los hongos utilizados, al mismo tiempo que en el propio Laboratorio Forestal del CUT se ha trabajado con ellas con anterioridad.

3.2. Extracciones

Se utilizaron dos métodos diferentes para quitar los extractivos de la madera. Por un lado, se realizó una extracción sólido-líquido a partir de polvo de madera en equipo Soxhlet, cuyo extracto se utilizó para cuantificar los polifenoles y taninos, para el análisis por FTIR, y para conocer el porcentaje relativo de los extractivos con base en madera seca, en las especies madereras en estudio. Por otro lado, se realizaron extracciones con diferentes solventes a las probetas que posteriormente se ensayaría la durabilidad natural de la especie, analizando el efecto sobre esta de las extracciones.

3.2.1. Extracción en polvo de madera

Se extrajo sobre polvo de madera, de granulometría muy fina (50 *mesh*), que fue obtenido a partir del lijado de la misma. En este caso se trabajó con madera de *E. camaldulensis* y *E. bosistoana*, siendo el extracto de *E. camaldulensis* el modelo de control para el proceso. Para la extracción se utilizó el sistema "Soxhlet" del fabricante PYREX, el cual consiste en un proceso de lavado mediante sucesivos ciclados al material utilizando un solvente.

Se utilizó como solvente 250 *ml* de etanol (98%, del fabricante Droguería Industrial Uruguay), para la extracción de 4.5 *g* de cada una de las muestras, realizando dos extracciones paralelas en cada una de las especies. Se sometió a extracción un total de 9 *g* de cada una de ellas. El polvo de madera fue colocado en sobres de papel de filtro que se introdujeron en la cámara de extracción del Soxhlet.

Se midió la frecuencia de ciclado en cada uno de los procesos, ambos a la temperatura de ebullición del etanol de manera estable, obteniendo un ciclado medio de 123 ciclos en el caso del *E. bosistoana* que permaneció 24*h*, mientras que el *E. camaldulenses* se extrajo durante 40*h* y se cicló una media de 145 ciclos. Para el cálculo de número de ciclados se realizó una aproximación mediante la toma de diferentes tiempos de ciclado, siendo el promedio de estos el tiempo que permaneció cada una de las muestras en el interior del Soxhlet, estos resultados se representan en la tabla 2.



Ilustración 4:
Sistema Soxhlet

Tiempos de extracción <i>E. bosistoana</i> (minutos)								
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6	Ciclo 7	T. med
Soxhlet 1	8,25	24,75	40,23	55,25	0,00	0,00	0,00	15,67
Soxhlet 2	0,00	10,03	20,37	30,20	39,15	48,00	56,97	10,07
Soxhlet 1	1,28	16,92	27,72	38,18	0,00	0,00	0,00	12,30
Soxhlet 2	0,00	7,40	15,37	23,28	30,52	37,65	0,00	7,76
Nº Ciclos 1	96,20		T1	1218,00		T total	1445,00	
Nº Ciclos 2	150,24		T2	227,00				

Tiempos de extracción <i>E. camaldulensis</i> (minutos)				
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	T. med
Soxhlet 1	7,42	22,53		14,98
Soxhlet 2	0,00	16,95	37,37	18,11
Nº Ciclos 1	159,60		T total	2390,00
Nº Ciclos 2	132,00			

Tabla 2: Tiempos de ciclado "Soxhlet"

3.2.1.1. Rendimiento

Para calcular el rendimiento de la extracción se pesó el material en las diferentes etapas del proceso, así como un cálculo de la humedad inicial de las muestras para corregir los valores obtenidos.

Teniendo en cuenta que la muestra a extraer no podía ser sometida a altas temperaturas para su secado, por el hecho de que de ser así se perdería gran cantidad de los extractivos volátiles, se determinó la humedad inicial de las muestras en una porción de madera molida, separada del total con este fin. Esta pequeña muestra, aproximadamente 1 g, se pesó en húmedo, posteriormente se llevó a estufa a 105 °C durante 24 h y se pesó de nuevo. Con estos datos se aplicó la siguiente fórmula para el cálculo de la humedad:

$$\text{Humedad de la muestra} = \frac{P \text{ húmedo} - P \text{ seco}}{P \text{ seco}} \times 100$$

Con estos datos y los datos obtenidos en los pesajes durante el proceso de extracción, se aplicó la siguiente fórmula para el cálculo del rendimiento total de la extracción:

$$\text{Rendimiento} = \frac{P \text{ inicial seco} - P \text{ tras la extracción}}{P \text{ seco}} \times 100$$

3.2.1.2. Análisis

Para el análisis de la composición química de los extractivos de *E. bosistoana* y *E. camaldulensis* se utilizó la técnica que emplea el uso de un *Fourier transform infrared spectrophotometer* (FTIR). Se empleó un espectrómetro IR Prestige -21 Shimadzu (Japan), con una resolución de 8 cm^{-1} y 32 scans por muestra. Este instrumento es capaz de recoger el espectro infrarrojo de una muestra para la posterior identificación de sus componentes. Esto se debe a que el espectro infrarrojo de cada molécula es único (Salem Press Encyclopedia, 2019).

3.2.1.3. Taninos

A partir del extracto obtenido se realizó la cuantificación de los polifenoles y taninos tomando como referencia las metodologías utilizadas en Naima et al. (2014). Esta metodología permite cuantificar tres tipos de compuestos: polifenoles totales, taninos condensados y taninos hidrolizables.

Para el caso de los taninos condensados también se aplicó el método de análisis adaptado de FAO (2000) "*Quantification of tannins in tree foliage*" ya que mediante la metodología de Naima et al. (2014) los resultados obtenidos carecían de precisión.

I. Polifenoles

El contenido de polifenoles se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, citado en Naima et al. 2014): se adicionaron 2,5 ml de reactivo de Folin (diluido 10 veces) a 0,5 ml de extracto acuoso (diluido 200 veces). Luego se agregaron dos mililitros de carbonato de sodio ($75 \frac{g}{l}$). La mezcla se puso luego en un baño de agua a 50 °C durante 5 minutos antes de que se leyera la absorbancia a 760 nm. Se realizó una curva de calibración con una solución de ácido gálico (80 mg/L). Los resultados se obtuvieron como miligramos de equivalente de ácido gálico (GAE) por gramo de muestra seca (*mg de GAE/g de materia*) y como miligramos de GAE por gramo de extracto seco (*mg de GAE/g ext*) (Naima et al. 2014).

II. Taninos condensados

El contenido de proantocianidina se determinó con una prueba de *ButanolOH/HCl* según lo descrito por Scalbert et al. (1989): se agregaron 0,5 ml de extracto acuoso (diluido 100 veces) a 5 ml de una solución ferrosa ácida (77 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ en 500 ml de *Hcl / ButOH* ($\frac{2}{3}$)). Los tubos se cubrieron y se colocaron en un baño de agua a 95 °C durante 15 min. La absorbancia se leyó a 530 nm, y los resultados se expresaron de la siguiente manera: miligramo de cianidina equivalente (Cya) por gramo de materia seca (*mg de Cya/g de materia*) (Naima et al. 2014).

Para el cálculo del contenido de taninos condensados se aplicó la fórmula:

$$\text{mg CyaE/g} = \frac{(A \times V \times D \times M \times V2)}{(l \times \epsilon \times v \times m)}$$

Donde:

A = absorbancia de la muestra a 530 nm
 V = reacción total volumen (mL)
 D = factor de dilución
 M es el molar de cianidina masa (g mol^{-1})
 V2 = extracto de volumen acuoso mL
 l = la longitud del camino (cm^{-1})
 ϵ = coeficiente de extinción molar ($34.700 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
 v = 0.5 mL
 m = masa en peso seco de la muestra (g).

El otro método empleado fue la determinación de taninos condensados (Proantocianidinas) adaptado de FAO (2000). Este consistió en diluir 0.50 ml del extracto en acetona (70%), en una cantidad de acetona suficiente para evitar que la absorbancia (550 nm) sea superior a 0,6, esta cantidad viene determinada por la cantidad de taninos condensados que presente la muestra analizada. Se añadieron 3,0 ml de reactivo de *ButanolOH/HCl* y 0,1 ml de reactivo férrico en los tubos Vortex. Posteriormente se tapó la boca de los tubos y se calentó a una temperatura de entre 97 y 100 °C durante 60 min. Se enfriaron los tubos y se registró la absorbancia a 550 nm. Paralelamente se realizó todo el proceso en un tubo al que denominamos blanco, el cual contiene el extracto muestra, este blanco se restó a el resultado del ensayo. Los taninos condensados (% en materia seca) como leucocianidina equivalente se calcula por la fórmula:

$$* (A_{550 \text{ nm}} \times 78.26 \times \text{Dilution factor}) / (\% \text{ dry matter})$$

*Esta fórmula supone que $E^{1\%,1 \text{ cm},550 \text{ nm}}$ de leucocianidina es 460.

III. Taninos hidrosolubles

El contenido de taninos hidrolizables se determinó con la prueba de yodato de potasio descrita por Bossu et al. (2006). Se calentaron cinco mililitros de solución acuosa KIO_3 (2.5% v/v) durante 7 minutos a 30 °C, luego se agregó 1 ml de la solución acuosa (diluida 5 veces). La mezcla se colocó luego en un baño de agua a 30 °C durante 2 minutos antes de que se leyera la absorbancia a 550 nm. Se obtuvo una curva de calibración utilizando una solución de ácido tánico (5000 mg/l) preparada por solubilización de 0,25 g de ácido tánico en 50 ml de metanol (80%). Las soluciones analíticas estándar de ácido tánico se prepararon mediante dilución acuosa. Los resultados se expresaron de la siguiente manera: miligramo de ácido tánico equivalente (TAE) por gramo de muestra seca ($mg\ EAT/g\ demateria$) (Naima et al. 2014).

3.2.2. Preparación de las probetas

En segundo lugar, se realizaron las extracciones a las probetas que posteriormente se utilizarían en el ensayo de durabilidad EN113, para así poder evaluar el efecto de estos sobre la durabilidad natural de estas maderas. Debido al gran número de probetas se descartó el método de extracción mediante Soxhlet, por lo que se optó por el método de extracción denominado extracción por infusión, este método consiste en una inmersión de las probetas en los diferentes solventes a una temperatura próxima a su temperatura de ebullición durante 24h en un baño maría. Una vez introducidas las probetas con una proporción de 20 ml de disolvente por cada 1 g de madera a extraer, en vaso de precipitado cubierto con un vidrio de reloj con la intención de evitar pérdidas por evaporación y proporcionar una superficie para la condensación.

A continuación, se detallarán los diferentes solventes y sus efectos sobre los componentes orgánicos de la madera en el proceso de extracción, dependiendo de la polaridad y la hidrosolubilidad de los mismos. Así mismo se ha de destacar que todas las extracciones tuvieron lugar en el interior de una campana de seguridad debido a la posible emisión de gases nocivos.

3.2.2.1. Sin extraer

Las probetas sin extraer, no pasaron por ningún proceso de extracción.

3.2.2.2. Etanol

Al tratarse de un solvente polar, durante la extracción se extrajeron gran parte de las especies polares. Se programó el baño a una temperatura de 60 °C.

3.2.2.3. Etanol+H₂O

En este caso las probetas ya sometidas a la extracción mediante etanol se llevaron a una segunda extracción mediante el empleo de agua destilada, un solvente igualmente polar pero con la capacidad de extraer las especies Hidrosolubles. La temperatura del baño en este caso fue una temperatura de 80°C.

3.2.2.4. Hexano

El hexano es un solvente apolar por lo que mediante su uso se consigue extraer las especies químicas de carácter apolar. En este caso el baño se configuró a una temperatura de 45 °C y se extremaron las medidas de seguridad, mediante el uso de guantes, gafas y mascarilla durante toda su manipulación.

3.3. Ensayo de durabilidad

El ensayo de durabilidad se basó en la norma europea EN113, con algunas modificaciones que no afectan en los resultados finales. Esta norma se utiliza para verificar la resistencia de la madera frente al ataque de Basidiomycetes, mediante la exposición de las muestras madereras al hongo, previamente sembrado en un medio de cultivo. Otra de las modificaciones que se realizaron a la norma original, fue una variación en el tiempo de exposición al hongo, ya que esta indica una exposición de 16 semanas y en este caso, al haber reducido el volumen de las muestras a ensayar se requiere un tiempo de exposición menor, en concreto se ensayó la madera por un total de 14 semanas.

La exposición tiene lugar en frascos donde tras cultivar los diferentes hongos se introducen 3 muestras de la madera a ensayar y una muestra de la madera control. Estos frascos deben tener unas medidas concretas (Imagen 5) y haber sido sometidos a un proceso de esterilización previo a su uso.

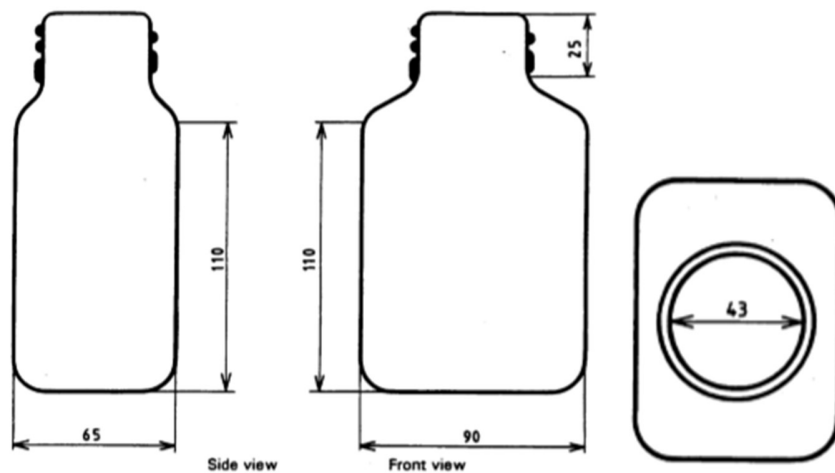


Ilustración 5: Medidas de los frascos de ensayo (EN113)

3.3.1. Preparación y etiquetado de los frascos

Se armaron un total de setenta frascos, quince frascos por cada uno de los hongos utilizados. De estos quince frascos se utilizaron tres para cada grupo de las probetas dependiendo del proceso de extracción al que habían sido sometidos y tres para el ensayo control realizados con *E. camaldulensis*. Los diez frascos restantes se utilizaron como control de los cambios sufridos en la madera debidos a las condiciones de cultivo, conteniendo exclusivamente el medio de cultivo sin hongos.

Cada uno de los frascos fue preparado con el medio de cultivo en el que posteriormente se inocularon los hongos en condiciones asépticas. Este medio consistió en una disolución de 15 g/l de extracto de malta y 20 g/l de agar en agua destilada. Una vez preparada dicha disolución, los frascos se sometieron a un proceso de esterilización mediante autoclave; este proceso consiste en someter los frascos a temperatura de 121 °C en el interior de un autoclave a una presión de 1.1 atm durante un tiempo de 15 minutos. A partir de este momento todo el trabajo con los frascos se realizó en el interior de una campana de seguridad prevista de flujo laminar y luz ultravioleta para evitar en la medida de lo posible contaminaciones indeseadas.

Se llevó a cabo un etiquetado de los diferentes frascos con la información precisada para su posterior armado de forma organizada. En las etiquetas aparecía la información relativa a las probetas, así como las especies y el número de identificación, el número de frasco, especie de hongo y la fecha de armado.

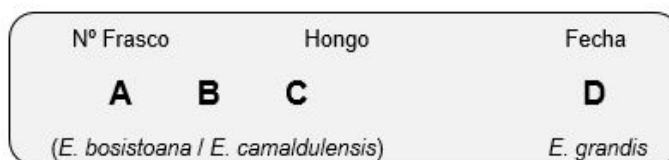


Ilustración 6: Formato del etiquetado de frascos. (Imagen de autor)

3.3.2. Cultivo de los hongos

El cultivo de los hongos de pudrición empleados *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Gloeophyllum trabeum* y *Laetiporus sulphureus* se realizó tomando las medidas de seguridad precisadas para evitar cualquier tipo de contaminación. Este se realizó en el interior de la cámara de seguridad esterilizando todo el material, entre cada cultivo, sometiendo las herramientas de cultivo a la incidencia directa de una llama procedente de un mechero de alcohol que a su vez genera una corriente ascendente entorno a su llama que disminuye el riesgo de contaminación.

Para la inoculación de los hongos en los frascos se utilizaron cultivos puros. Se tomaron pequeñas porciones de hongo y medio de cultivo, de las placas de Petri de origen, mediante el empleo de “tips”, se depositaron tres “tips” en la superficie de cada uno de los frascos, buscando una expansión total y uniforme del hongo en la superficie del medio de cultivo. Una vez inoculados los diferentes hongos, se llevaron los frascos a la cámara de aclimatación a 25°C y 75% de HR.

Cuando el micelio cubrió totalmente la superficie del medio de cultivo se colocaron las probetas de madera, previamente esterilizadas por vapor fluente en tres etapas de 15 minutos cada 24 horas

3.3.3. Evaluación final

Para la evaluación de la durabilidad natural de la madera ensayada se aplicaron dos métodos, el primero de ellos es la determinación de la pérdida de masa de las probetas, requerido por la norma EN113 y un método complementario basado en técnicas de microscopía.

3.3.3.1. Pérdida de masa

Este método se basa en una evaluación de la pérdida de masa de las probetas, para ello se compara el peso inicial, corregido el contenido de humedad, y el peso seco final tras el ataque de los hongos. Debido a que no se podía someter a altas temperaturas para el secado previo de las probetas debido a las posibles alteraciones, como pérdidas de extractivos volátiles, se tomó como coeficiente de corrección la humedad media de probetas tipo.

Las pérdidas de masa de las probetas, se utilizaron para determinar la clase de durabilidad a la que pertenecía cada especie maderera, de acuerdo a la norma EN350-1:1994. Mediante el empleo de la siguiente fórmula se calcula el valor de x y se contrasta con la tabla 3 que aparece en la norma.

$$x = \frac{\text{Pérdida media de masa corregida de las probetas de ensayo}}{\text{Pérdida media de masa de las probetas de referencia}}$$

Clase de durabilidad	Descripción	Valor de x
1	Muy durable	$x \leq 0.15$
2	Durable	$0.15 < x \leq 0.30$
3	Medianamente durable	$0.30 < x \leq 0.60$
4	Poco durable	$0.60 < x \leq 0.9$
5	No durable	$x > 0.90$

Tabla 3: Clases de durabilidad natural frente a hongos xilófagos (EN350-1)

3.3.3.2. Microscopía

Por otro lado se realizó un análisis complementario que consistió en la toma de imágenes, utilizando un microscopio electrónico de barrido (Joel JCM 6000Plus) perteneciente al servicio de microscopia del CUT, de las estructuras celulares de las muestras a nivel superficial para analizar el daño causado por los hongos en las diferentes estructuras. Para obtener los resultados se realizó la toma de imágenes en las probetas que habían sido sometidas al hongo más virulento de los ensayados. Del mismo modo se tomaron las imágenes a probetas correspondientes a cada tipo de extracción, las que presentaban extractos polares y las que poseían los de carácter apolar comparándolas con las probetas sin extraer.

3.4. Ensayo de inhibición

3.4.1. Preparación del medio de cultivo

Se prepararon 3 botellas de 450 *ml*, con una concentración 20 *g/L* de agar y 20 *g/L* de extracto de malta. Las botellas se llevaron a autoclave para esterilizarlas (121 °C por 15 minutos) y cuando alcanzaron una temperatura manipulable, se suplementaron con los extractos obtenidos, de modo que la concentración en cada frasco es 0 *mM*, *mM* y *mM*. Luego el medio de cultivo se repartió en placas de Petri de 8 *cm* de diámetro, 10 placas por hongo. Una vez solidificado y frío el medio, se sembraron los hongos *Laetiporeus sulphureus* y *Coriolus versicolor*, a través del uso de tips con medio de cultivo y micelio.

3.4.2. Ensayo de efectividad funguicida

El crecimiento micelial para cada placa se evaluó a través del cálculo de las áreas de la superficie de las colonias (en mm^2) y las velocidades iniciales de crecimiento al día 5, a las distintas concentraciones de extracto (Hatvani et al., 2003). Se determinó la CIM (concentración inhibitoria mínima) de cada solución (Borokhov et al., 2000).

3.5. Análisis estadístico de datos.

Para conocer la validez de los resultados desde un punto de vista estadístico y así conocer si existen diferencias significativas entre los diferentes ensayos se realizó un análisis de varianza. Utilizando el Test de Fisher para analizar la igualdad entre varianzas y un Test Duncan para la comparación de medias. Para todo esto se implementó la aplicación informática SAS. Estableciendo como criterio un nivel de confianza del 95%.

4. RESULTADOS

4.1. Mediciones.

Las probetas de *E. bosistoana* dieron un volumen medio de 7.9930 cm^3 y un peso medio de 9.0170 g . Teniendo en cuenta estos valores y el valor de la humedad de la muestra se calculó una densidad básica media de $0.8246 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$. Los valores de las medidas y el peso de cada muestra fueron anotados en una planilla de una hoja de cálculo Excel que se encuentra en el anexo 1.

En cuanto a lo referente a las medidas medias de las especies control y referencia, el *E. camaldulensis* presentó un volumen de 7.4682 cm^3 y un peso de 5.1704 g lo que, teniendo en cuenta la humedad, equivale a una densidad básica media de $0.6250 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$. Mientras que el *E. grandis* reflejó un volumen medio de 8.0200 cm^3 y un peso de 4.1600 g , es decir una densidad básica media de $0,4716 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$. Los datos se encuentran en los anexos 2 y 3 (*E. camaldulensis* y *E. grandis*).

4.2. Extracciones.

4.2.1. Extracción en polvo de madera.

4.2.1.1. Rendimiento.

Para el cálculo del rendimiento se pesó la masa inicial del polvo de madera, antes de ser sometida a ningún proceso. Se determinó su humedad a partir de una muestra del material, lo que corresponde a las casillas muestra húmeda y muestra seca de la siguiente tabla, y se calculó la masa inicial seca. Posteriormente, tras la extracción, se sometió a un secado a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta peso constante y se tomó medidas de la masa seca ya extraída (Masa extraída seca).

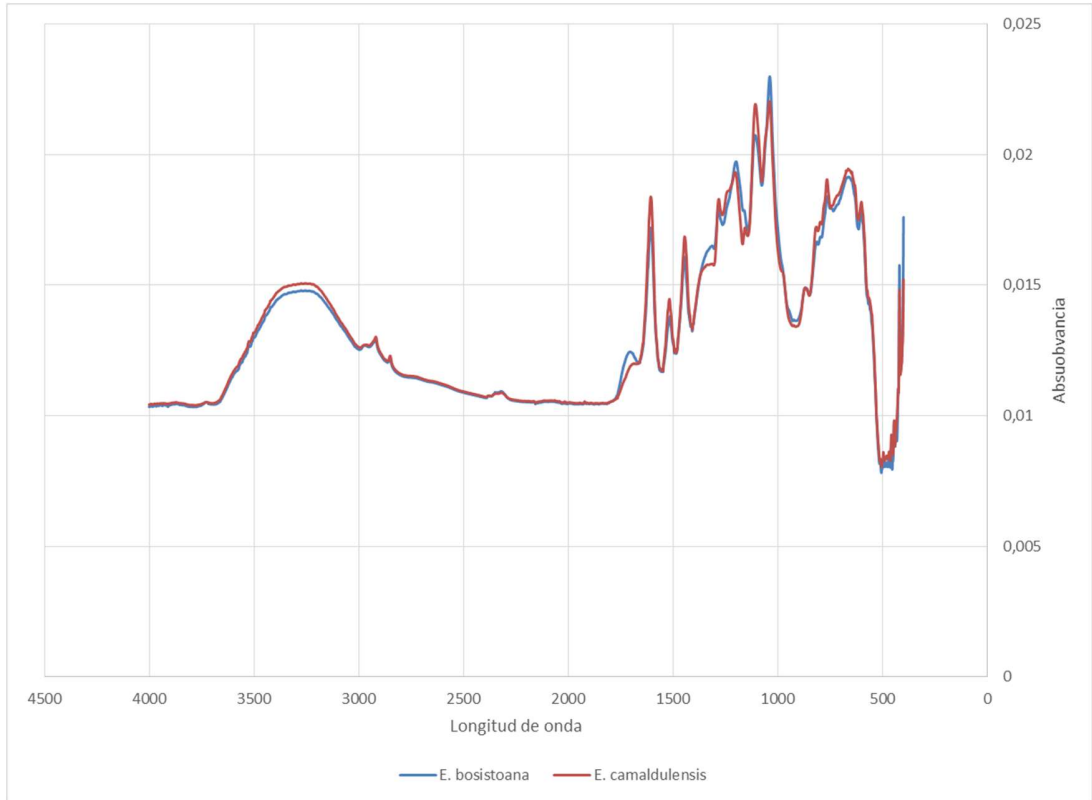
	<i>E. bosistoana</i>	<i>E. camaldulensis</i>
P Vidrio	18,8388	20,2026
Masa inicial húmeda 1	4,5099	4,5114
Masa inicial húmeda 2	4,5194	4,5103
Masa inicial seca 1	4,1520	4,2878
Masa inicial seca 2	4,1607	4,2868
Masa extraída seca 1	3,6140	3,8354
Masa extraída seca 2	3,5105	3,8434
Muestra húmeda	1,4538	0,8534
Muestra seca	1,3469	0,8131
Humedad	7,9367	4,9563
Rendimiento 1	14,89	11,80
Rendimiento 2	18,52	11,54
Rendimiento total	16,70	11,67

Tabla 4: Cálculo de rendimientos de extracción en porcentaje de extractivos por gramo de madera seca.

Se obtuvo un rendimiento de extracción del 16.7% en el caso del *E. bosistoana* y de un 11.7% en el caso del *E. camaldulensis*, expresado en porcentaje de extractivos por gramo de materia seca.

4.2.1.2. Análisis FTIR.

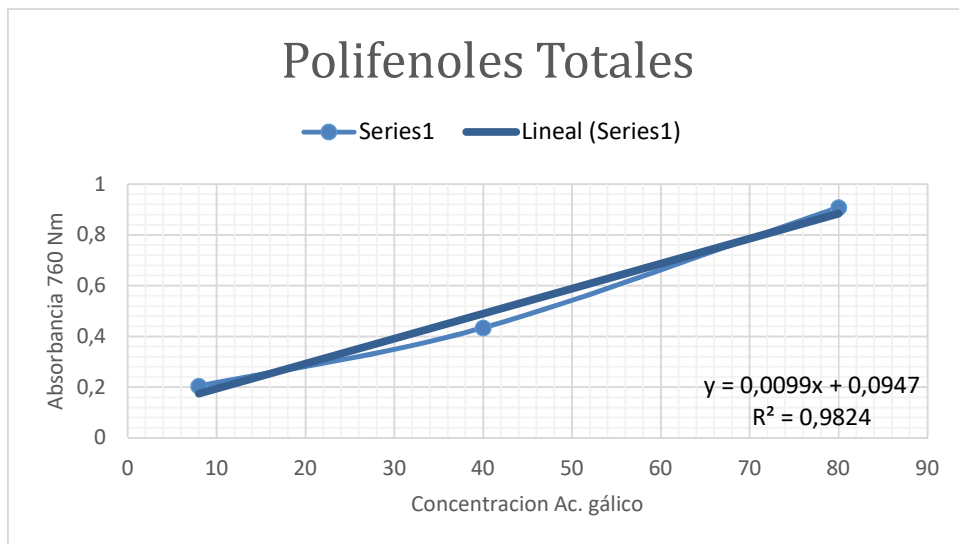
La gráfica 2, muestra los espectros FTIR del duramen de *E. bosistoana* y *E. camaldulensis* correspondientes a los extractos obtenidos en etanol. La espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) es una técnica utilizada para la caracterización química de materiales, se analizaron los grupos característicos presentes en la estructura química de los taninos, basándose en bibliografía.



Gráfica 2: Resultados del análisis FTIR.

4.2.2. Taninos

4.2.2.1. Polifenoles totales

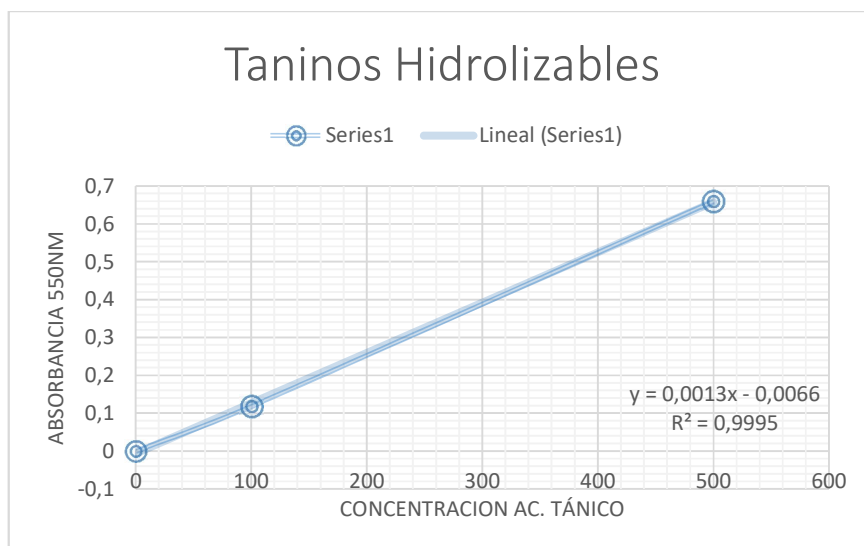


Gráfica 3: Curva de calibración de ácido gálico.

Especie	Absorbancia	Factor dilución	Concentración dilución	Concentración total
E. bos	0,3344	200	24,21	4842,42
E. cam	0,1621	200	6,81	1361,62

Tabla 5: Resultado de polifenoles totales expresado en miliequivalentes de ácido gálico por gramo de madera seca.

4.2.2.2. Taninos hidrosolubles



Gráfica 4: Curva de calibración de ácido tánico.

Especie	Absorbancia	Factor dilución	Concentración dilución	Concentración total
E. bos	0,4558	10	345,54	3455,38
E. cam A	0,1268	10	92,46	924,62
E. cam B	0,1824	5	135,23	676,15

Tabla 6: Resultado de taninos hidrolizables expresado en miliequivalentes de ácido tánico por gramo de madera seca.

4.2.2.3. Taninos condensados

	<i>E. bos</i>	<i>E. cam</i>	Blanco
<i>A: absorbancia de muestra a 530nm</i>	0,0962	0,2094	0,0742
<i>V: volumen total de reacción (ml)</i>		2	ml
<i>D: factor de dilución</i>		100	
<i>M: masa cianidina molar (g/mol)</i>		287,24	g/mol
<i>V₂: volumen de extracto acuoso</i>		40	
<i>l: largo del camino óptico</i>		1	cm
<i>ε: Coef. extracción molar</i>		34700	/mol cm
<i>v:</i>		0,5	ml
<i>m: peso seco madera</i>		30,069	g

Tabla 7: Resultados de taninos condensados por el método Naima et al (2014).

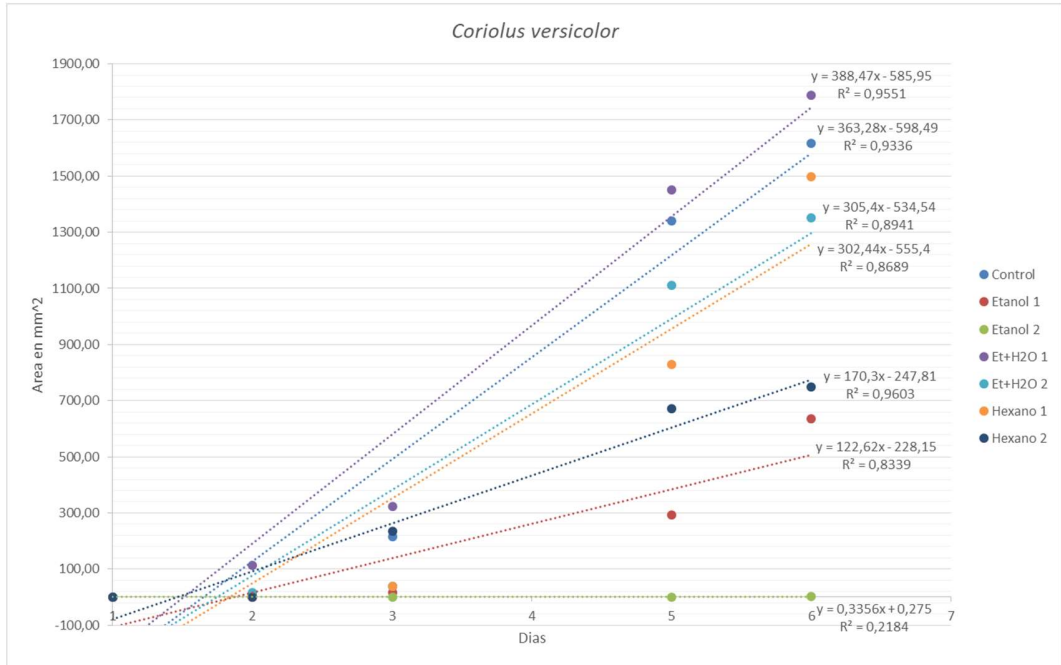
Se descartaron los resultados anteriores al observar una lectura similar en el caso de los extractivos e *E. bosistoana* y el blanco utilizado como control mediante FAO (2000) “*Quantification of tannins in tree foliage*”. Los resultados obtenidos se expresan en la siguiente tabla:

Muestra	Factor dilución	Valor corregido	Unidades
<i>E. bos</i>	5	0,45	Eq g de Leucacialidina/100g materia seca
<i>E. cam</i>	40	4,67	Eq g de Leucacialidina/100g materia seca

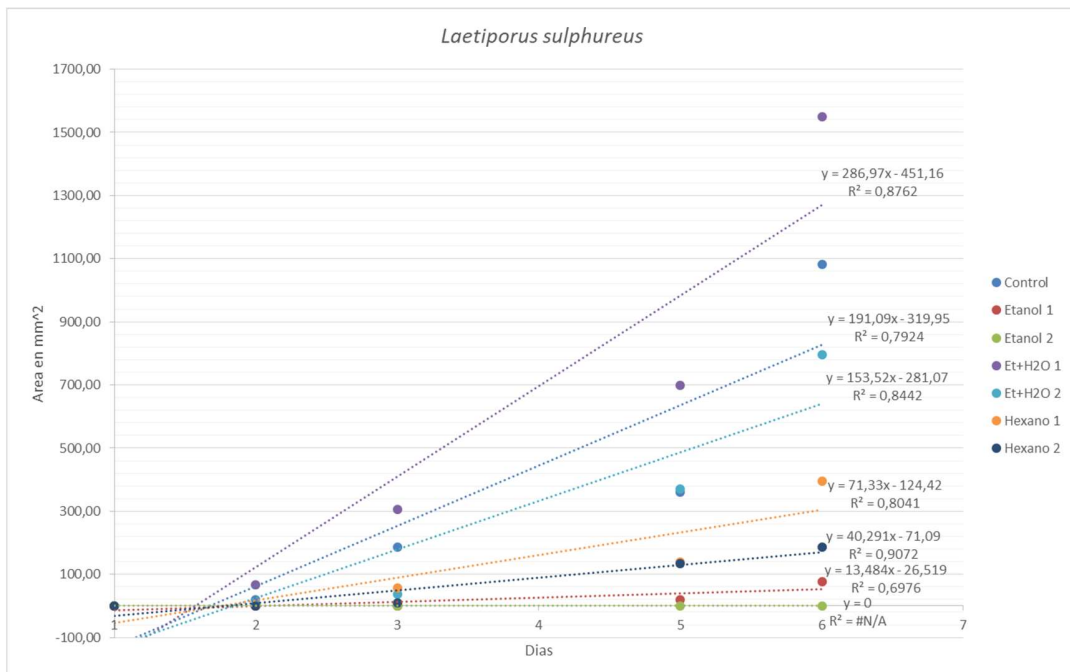
Tabla 8: Resultados de taninos condensados por el método FAO (2000)

4.2.3. Ensayo de inhibición

Para el ensayo de inhibición se tomó la medida media del radio durante los días de ensayo, con lo que se calculó el área en cada día. Estos resultados fueron llevados a una tabla Excel de donde se obtuvieron las siguientes gráficas. Mediante la ecuación de la recta “Línea de Tendencia” se obtuvo la pendiente de la misma, lo que equivale a la velocidad de crecimiento del hongo.



Gráfica 5: Velocidad de crecimiento de *Coriolus versicolor*.



Gráfica 6: Velocidad de crecimiento de *Laetiporus sulphureus*.

4.3. Ensayo de durabilidad

Para expresar los resultados del ensayo de durabilidad se utilizaron los métodos especificados por la norma UNE113, esta norma representa los resultados del ensayo teniendo en cuenta dos variables. Por un lado la pérdida de masa, expresado en %, por otro lado la variación en el contenido de humedad de las probetas al finalizar el ensayo.

4.3.1. Pérdida de masa

		<i>Gloeophyllum trabeum</i>	<i>Coriolus versicolor</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Laetiporus sulphureus</i>	<i>Sin hongo</i>
<i>E. bos</i>	Sin extraer	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
	Etanol	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
	Etanol+H ₂ O	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
	Hexano	2,20 (2,27)	3,61 (3,80)	0,76 (1,45)	3,46 (2,96)	0,00 (0,00)
<i>E. gra</i>		0,00 (0,00)	6,29 (2,83)	2,93 (3,38)	2,65 (3,47)	0,72 (1,61)
<i>E. cam</i>		0,00 (0,00)	0,04 (0,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

Tabla 9: Resultados para la pérdida de masa.

Para las diferentes especies y tratamientos determino la clase de durabilidad natural de acuerdo a la norma EN350-1:1994 tomando como valores las medias de pérdidas de masa ocasionadas por el hongo *Coriolus versicolor* ya que este fue el que tuvo mayores efectos sobre esta variable. Estos resultados se reflejan en las siguientes tablas:

Especie	x	Clase durabilidad	
<i>E. bosistoana</i>	0	1	Muy durable
<i>E. grandis</i>	1	5	No durable
<i>E. camaldulensis</i>	0.01	1	Muy durable

Tabla 10: Comparación entre la clase de durabilidad de las diferentes especies.

Solvente de extracción	x	Clase durabilidad	
Etanol	0	1	Muy durable
Etanol + H₂O	0	1	Muy durable
Hexano	0.57	3	Medianamente durable

Tabla 11: Comparación entre la clase de durabilidad de las diferentes extracciones.

4.3.2. Contenido de humedad

		Gloeophyllum trabeum	Coriolus versicolor	Pleurotus ostreatus	Laetiporus sulphureus	Sin hongo
E. bos	Sin extraer	51,33 (9,78)	19,61 (2,37)	12,37 (1,52)	11,15 (5,05)	18,48 (2,94)
	Etanol	67,78 (6,65)	30,20 (3,29)	22,00 (2,33)	25,70 (3,95)	26,37 (2,43)
	Etanol+H ₂ O	43,17 (4,56)	21,86 (3,07)	22,38 (3,95)	27,18 (2,71)	22,53 (1,69)
	Hexano	45,01 (11,43)	17,02 (4,82)	19,29 (3,99)	11,60 (5,63)	7,83 (2,69)
E. gra		103,97 (17,91)	72,44 (28,25)	40,07 (10,34)	119,82 (23,20)	59,29 (20,97)
E. cam		55,44 (11,82)	29,85 (3,90)	22,80 (3,68)	58,52 (14,39)	38,34 (2,81)

Tabla 12: Resultados para el contenido de humedad tras el ensayo.

4.4. Microscopía

Para la toma de imágenes en microscopía se seleccionaron las probetas con la intención de observar un mayor deterioro, teniendo en cuenta los resultados tras el ensayo de durabilidad. Por ello, se seleccionaron probetas que habían sido afectadas por el hongo *Coriolus versicolor* ya que fue el más virulento de los ensayados. Para tener una visión más amplia del efecto de los diferentes extractivos se tomaron imágenes a cada uno de los diferentes tipos de probetas utilizados.

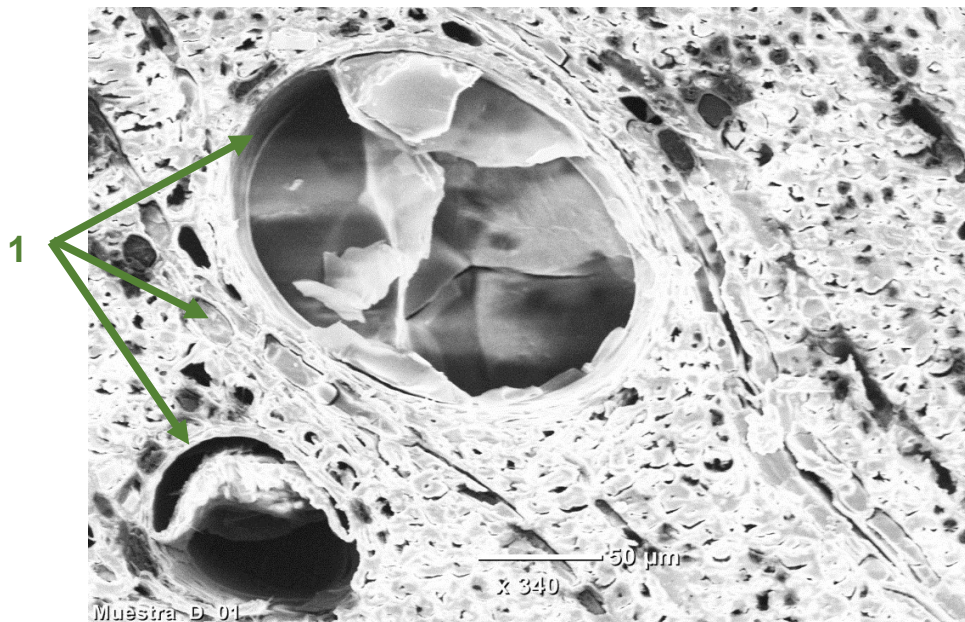


Ilustración 7: Estructura microscópica de probeta antes del ensayo (imagen de autor)

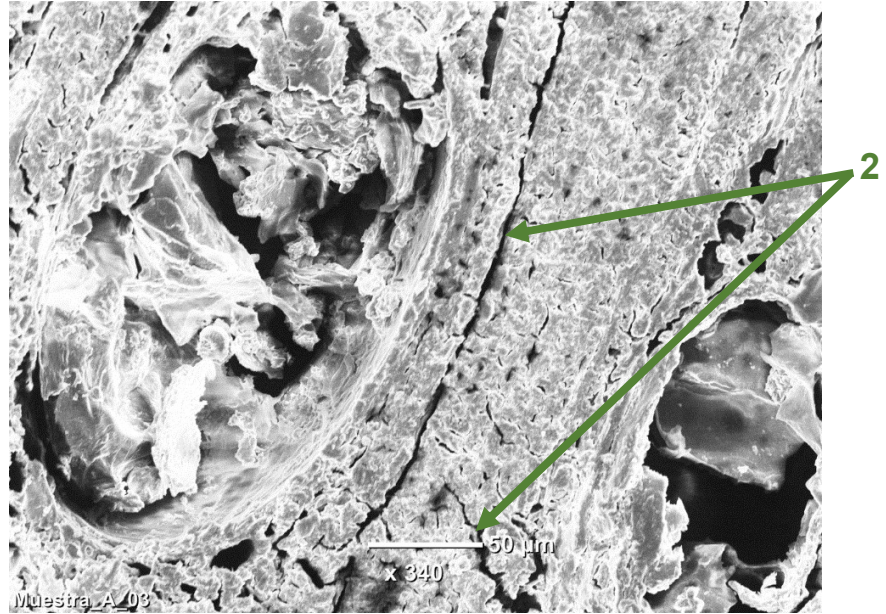


Ilustración 8: Estructura microscópica de probeta Sin extracción tras el ensayo (imagen de autor)

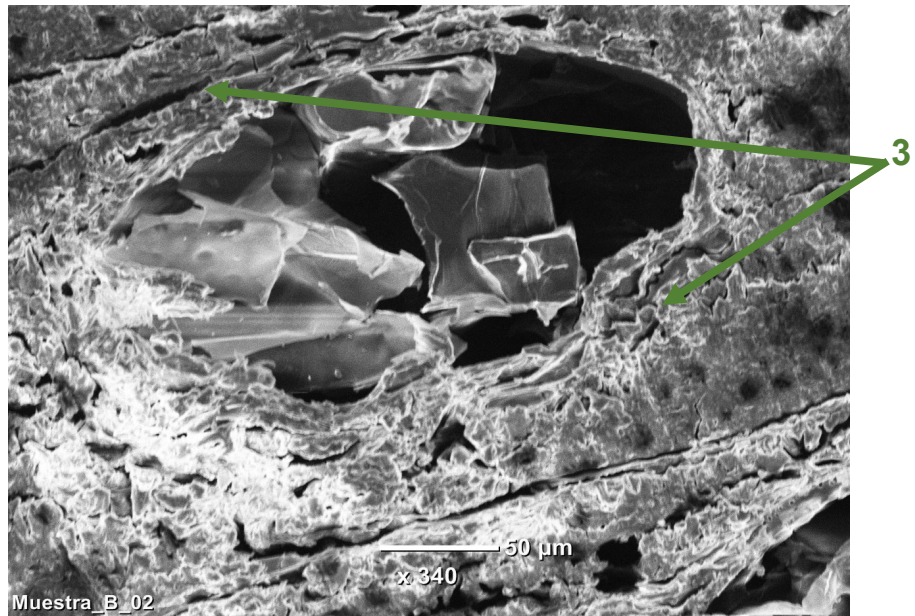


Ilustración 9: Estructura microscópica de probeta extraída en Etanol+H₂O tras el ensayo (imagen de autor)

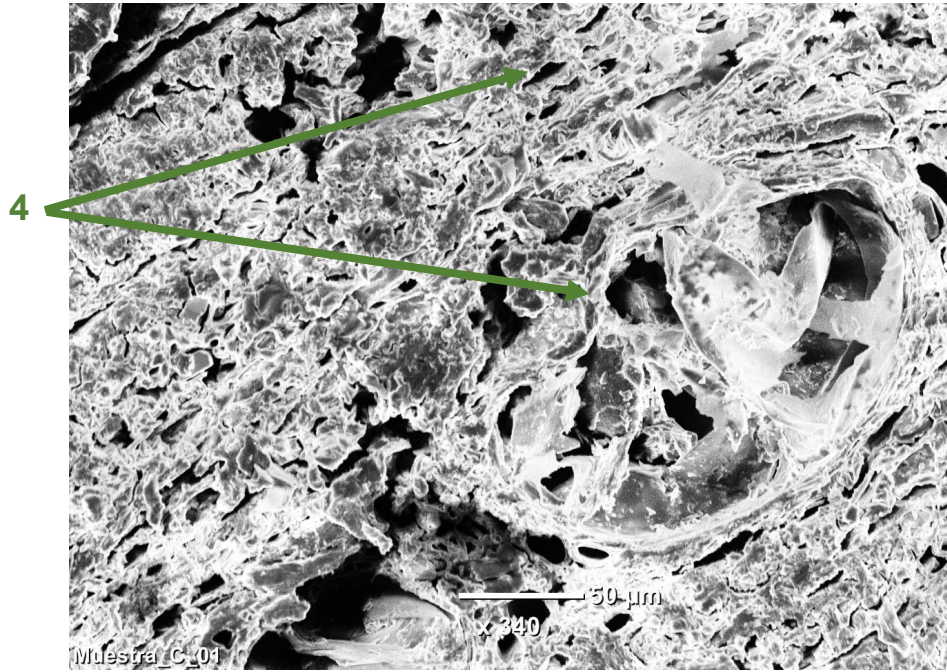


Ilustración 10: Estructura microscópica de probeta extraída en Hexano tras el ensayo (imagen de autor)

5. DISCUSIÓN

Tras haber tomado las diferentes medidas a las probetas, se calcularon las densidades básicas de las maderas a ensayar, obteniendo los valores $0.8246 \frac{g}{cm^3}$, $0.6250 \frac{g}{cm^3}$ y $0,4716 \frac{g}{cm^3}$, para el *E. bosistoana*, *E. camaldulensis* y *E. grandis* respectivamente. Estos valores fueron de especial interés ya que esto influye de manera notable en la estructura macroscópica de las diferentes especies.

Para las extracciones se establecieron los dos métodos explicados en apartado “materiales y métodos”. El método de extracción que se considera de mayor interés para la toma de decisiones es el realizado vía Soxhlet, ya que este presenta unos rendimientos mayores para extracciones del tipo sólido/líquido y por lo tanto una mayor extracción. En nuestro caso se obtuvo unos rendimientos del 16.7% en el caso del *E. bosistoana* y de un 11.7% en el caso del *E. camaldulensis*. Estos resultados se reflejan en porcentaje de contenido de extractivos respecto a la masa de madera seca. Al no haber encontrado antecedentes sobre estos valores se decidió darlos como válidos, ya que se trata de una técnica eficaz respaldada por la bibliografía y teniendo en cuenta las indicaciones de uso.

En este párrafo se hablara sobre el FTIR.

Al analizar los resultados obtenidos para los componentes fenólicos, de los extractivos resultantes de la extracción en polvo de madera, pudimos observar como los valores de concentración de polifenoles totales y los hidrosolubles triplican su presencia en los extractivos de *E. bosistoana* respecto a los de *E. camaldulensis*. Mientras que en el caso de la fracción perteneciente a los taninos condensados se refleja todo lo contrario, cosa que en un principio parecía extraño por lo que se decidió realizar un segundo método, mediante el cual se corroboró

la escasa presencia de estos en el *E. bosistoana*. Hecho que corroboraría la hipótesis inicial del proyecto, ya que como se mencionó con anterioridad y siguiendo la bibliografía, los taninos hidrosolubles son los que presentan una mayor toxicidad para los hongos de pudrición.

Respecto al objetivo principal de este estudio se obtuvieron resultados similares a los reflejados en la bibliografía para las especies de control y referencia, con algunas pequeñas discrepancias. El *E. camaldulensis* presentó una clase de durabilidad natural de 1 (Muy durable) mientras que en la bibliografía utilizada se clasificaba como clase 2 (Durable), esto se puede deber a diferentes factores como la procedencia de las semillas o las condiciones de crecimiento de los ejemplares. Por su parte el *E. bosistoana* se volvió a mostrar como una madera muy durable.

Al extraer los diferentes tipos de extractivos se observó que el comportamiento era diferente dependiendo del tipo de solvente utilizado. Por su parte los solventes polares no provocaron un cambio significativo en la durabilidad natural de la especie *E. bosistoana*. Mientras que el solvente de carácter apolar utilizado, el hexano, produjo un declive de la clase de durabilidad del 1 al 3, haciendo que pasara a ser una madera medianamente durable. Esto quiere decir que los extractos apolares son los que mejoran de mayor manera la durabilidad natural de la especie considerada como muy durable.

En lo que se refiere a la variación del contenido de humedad se observó una estrecha relación con la densidad de las especies. Es probable que esto se deba a la presencia de un mayor volumen de poros, en los cuales pudo depositarse la humedad procedente del medio de cultivo.

Mediante la a toma de imágenes microscópicas se pudo contrastar los resultados obtenidos tras el ensayo EN113 con los daños que se pueden observar en las estructuras microscópicas. Por un lado en la muestra inicial, correspondiente a aquella sin extraer y sin exposición a la actividad fúngica, se observó como todas las estructuras se mantenían en perfecto estado (1 en la ilustración 7). Por otro lado en las probetas sin extraer se mostraron parcialmente conservadas, presentando algunos defectos leves como deformación celular (2 en la ilustración 8), sin ser esto una evidencia de daño causado por el hongo. A su vez, las que fueron sometidas a extracciones presentan daños que se suponen asociados al proceso de extracción, tales como la presencia de espacios intercelulares (3 en la Ilustración 9) originados por el colapso celular durante los cambios continuados de humedad. Por último, en el caso de las extraídas en hexano, las más afectadas, presentando las mayores pérdidas de masa durante el ensayo, se observó un mayor deterioro que en el resto ya que se aprecia un afinamiento de las paredes celulares (4 en la ilustración 10), si atribuidas al daño causado por el hongo, llegando a la rotura de la misma en algunos casos.

En el ensayo de inhibición se ensayaron los hongos *Coriolus versicolor* y *Laetiporus sulphureus*. De estos dos se realizó un control en el que se observó como el, *C. versicolor* presento una velocidad de crecimiento mayor. En este caso obtuvimos las capacidades de inhibición de los diferentes extractivos valorando únicamente su efecto, sin tener en cuenta el resto de factores que determinan la durabilidad natural en la madera. De los resultados obtenidos se desprendió un mayor poder de inhibición en los extractivos de carácter polar no hidrolizables, siendo estos los únicos capaces de conseguir una inhibición completa en los diferentes hongos, alcanzando la concentración inhibitoria mínima en (Concentración). Por su parte, los extractivos hidrolizables en pequeña concentración aumentaron la velocidad de crecimiento para ambos casos. Mientras que por otro lado, los extractivos de carácter apolar presentaron

una disminución de la velocidad de crecimiento desde las concentraciones más bajas. Por lo que en estas magnitudes sería difícil alcanzar la concentración inhibitoria mínima mediante el empleo de los extractivos apolares e imposible mediante el uso de la fracción hidrolizable de los polares.

Se podría afirmar que únicamente los extractivos de carácter apolar son los que influyeron sobre la durabilidad natural de la madera de *E. bosistoana*, lo que no quiere decir, precisamente, que estos presenten una actividad fungicida por sí mismos.

Por último, con la intención de mejorar los resultados de próximos estudios similares a este o abriendo la posibilidad de continuar y contrastar los resultados obtenidos. Se propone el empleo de una especie de virulencia, es decir, una especie menos durable que resulte más afectada por la degradación, por ejemplo, albura de especies tales como pino o álamo.

6. CONCLUSIONES

En conclusión se podría afirmar que los extractos de carácter apolar son aquellos con una mayor influencia en la durabilidad natural del *Eucaiyptus bosistoana*, reduciendo la clase de durabilidad natural de una clase 1 (Muy durable) a una clase 3 (Medianamente durable).

En las condiciones del ensayo los extractos de carácter polar no muestran ninguna influencia sobre la durabilidad natural de la especie.

En las condiciones del estudio concentración ejnskn de etanol resulto ser la concentración inhibitoria mínima para este extracto y estos hongos.

7. RESUMEN

La madera, al ser un material de origen orgánico está sometida a diversos factores que producen un efecto negativo en sus propiedades. Uno de los factores más problemáticos es la degradación por microorganismos, en concreto los hongos y los diferentes tipos de pudrición que producen.

Existen diferentes tipos de madera, dependiendo de la capacidad de estas a resistir el ataque de los hongos, lo que se denomina durabilidad natural. Las especies han desarrollado diversas estrategias para proteger la madera frente a los hongos uno de los más importantes son los extractivos presentes en su interior. La madera del *Eucalyptus bosistoana* está considerada como una especie muy durable. En este trabajo se buscó conocer la influencia de los diferentes tipos de extractivos sobre esta alta resistencia. Así como el efecto fungicida de los mismos.

Los resultados obtenidos muestran como, al extraer los extractivos de carácter apolar, con hexano, la clase durable pasaba a ser de “medianamente durable”, mientras que los polares no producían una variación significativa. Así mismo los extractivos polares presentaron una mayor actividad fungicida.

Palabra clave: *Eucalyptus bosistoana*, durabilidad natural, extractivos, taninos, hongos xilófagos, madera.

8. SUMMARY

Wood, being a material of organic origin, is made up of several factors that produce a negative effect on its properties. One of the most problematic factors is the degradation by microorganisms, specifically fungi and the different types of decay they produce.

There are different types of wood, depending on the ability of these to resist the attack of fungi, which is called natural durability. The species have developed different strategies to protect the wood against fungi. One of the most important are the extractive materials present inside. The wood of *Eucalyptus bosistoana* is considered a very durable species. In this work, we sought to know the influence of the different types of extractives on this high resistance. As well as the fungicidal effect of them.

The obtained results show how, when extracting extractive of apolar character, with hexane, the durable class happened to be of "moderately durable", while the polar ones did not produce a significant variation. Likewise, the polar extractives showed a higher fungicidal activity.

Keyword: *Eucalyptus bosistoana*, natural durability, extractives, tannins, wood-borne fungi, wood.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Australasia Virtual Herbarium. 2018. Mapa de localización. (en línea). Consultado 27 nov 2018. Disponible en https://avh.ala.org.au/occurrences/search?taxa=bosistoana#tab_mapView
- Boland, D.; Brooker, M.; Chippendale, G.; Hall, N.; Hyland, B.; Johnston, R.; Kleinig, D.; McDonald, M.; Turner, J. 2006. Forest trees of Australia. 5a. ed. Collingwood, Australia, CSIRO. 736 p
- Borokhov, O.; Rothenburger, S. 2000. Rapid Dye Decolorization Method for Screening Potencial Wood Preservatives. Appl. Environ. Microb. 66: 5457- 5459.
- Brussa, C. Eucalyptus: especies de cultivo más frecuente en Uruguay y regiones de clima templado. Montevideo, Uruguay, Hemisferio Sur, 1994. 328 p.
- FAO/IAEA. 2000. Quantification of tannins in tree foliage. (en línea). Consultado 30 ene 2019. Disponible en <http://www.naweb.iaea.org/nafa/aph/public/pubd31022manual-tanin.pdf>
- FAO. 2016. Datos y cifras globales de productos forestales. (en línea). Consultado 28 ene 2018. Disponible en <http://www.fao.org/3/I7034ES/i7034es.pdf>
- Hatvani N.; Mécs I. 2003. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization and enzyme activity of *Lentinula edodes*. Ecotoxicology and Environmental Safety 55: 199-203.
- Ibañez, C.M.; Mantero, C.; Bianchi, M.; Kartal, N. 2009. Madera, biodeterioro y preservantes. Montevideo, Hemisferio Sur. 138 p.

- Santos, J. 2013. Formulación y caracterización de adhesivos para tableros de madera empleando taninos de la cáscara de castaña y de la corteza de eucalipto. Tesis doctoral. Santiago de Compostela, España. Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Enxeñería Química. 216 p.
- Kirker, G.; Blodgett, A.; Arango, R.; Lebow, P.; Clausen, C. 2013. The role of extractives in naturally durable wood species. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 82: 53-58.
- Luque de Castro, M.; García-Ayuso, L. 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*. 369: 1-10
- Mora, N.; Encinas, O. 2006. Biodegradación de maderas. Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes, Grupo de Investigación en Conservación de la Madera. 111 p.
- Murace, M.; Spavento, E. 2014. Durabilidad de las maderas. (en línea). La Plata, Argentina, UNLP. Consultado: 27 nov. 2018. Disponible en http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/19634/mod_resource/content/2/Apunte%20Durabilidad%202014.pdf.
- Naima, R.; Oumama, M.; Hannachea, H.; Sesboue, A.; Charrier, B.; Pizzi, A.; Charrier, F. 2014. Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. *Industrial Crops and Products*, 70: 245–252
- Pometti, C.; Palanti, S.; Pizzo, B.; Charpentier, J.; Boizot, N.; Resio, C.; Saidman, B. 2010. Durability of five native Argentine wood species of the genera *Prosopis* and *Acacia* decayed by rot fungi and its relationship with extractive content. *Biodegradation*, 21(5): 753-760

- Santos Ucha J. 2013; Formulación y caracterización de adhesivos para tableros de madera empleando taninos de la cascara de castaña y de la corteza de eucalipto; Santiago de Compostela, España
- Salem Press Encyclopedia. 2018. Eucalyptus. (en línea). Consultado 27 nov 2018. Disponible en <http://eds.b.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=1&sid=cbbb23d9-0179-475c-9c32-7989f003c6bd%40sessionmgr102&bdata=Jmxhbmc9ZXMmc2l0ZT1lZHMtbGl2ZQ%3d%3d#AN=129814496&db=ers>
- Salem Press Encyclopedia. 2019. Fourier transform infrared spectrophotometer (FTIR) (en línea). Consultado 21 ene 2019. Disponible en <http://eds.a.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=4&sid=a2e3c9be-eed7-46d4-ad27-f33607f9b22a%40sessionmgr4010&bdata=Jmxhbmc9ZXMmc2l0ZT1lZHMtbGl2ZQ%3d%3d#AN=89312187&db=ers>
- Scheffer, T.; Morrell, J. 1998. Natural durability of wood: a worldwide checklist of species. Oregon, Forest Research Laboratory of Oregon State University. 58 p.
- Schweingruber, F.; Büntgen, U. 2013. What is wood: an anatomical re-definition. *Dendrochronologia*. 31(3): 187-191.
- Sjöström, E. 1993. Wood chemistry fundamentals and applications. 2a. ed. San Diego, Academic Press. 223 p.
- Taylor, A.; Gartner, B.; Morrell, J. 2002. Heartwood formation and natural durability a review. *Wood and fiber science*. 34(4): 587-611
- UNE-EN 113. 1996. Protectores de la madera. Métodos de ensayo para la determinación de la eficacia preventiva contra los Basidiomicetos

destructores de la madera. Determinación de los valores tóxicos (Ratificada por AENOR en diciembre de 1996). Madrid, España, AENOR. 32 p.

EN350-1. 1994. Durabilidad de la madera y de los materiales derivados de la madera. Durabilidad natural de madera maciza. Parte 1: guía para los principios de ensayo y clasificación de la durabilidad natural de la madera. Ratificada por AENOR en mayo de 1995). Madrid, España, AENOR. 19 p.

Vignote, S.; Martínez, I. 2006. Tecnología de la madera. 3a. ed. Madrid, Mundi-Prensa. 685 p.

Vijayaraghavan, K.; Ramanujam, T. 1999. Effect of chloride and condensable tannin in anaerobic degradation of tannery wastewaters. *Bioprocess Engineering*. 20(6): 499-503

Wood Solutions. 2018. Box, Coast Grey. (en línea). Consultado 27 nov 2018. Disponible en <http://www.woodsolutions.com.au/wood-species/box-coast-grey>

Zabel, R.; Morrell, J. 1992. *Wood Microbiology: Decay and Its Prevention*. San Diego, USA. Elsevier. 476 p.

10. ENEXOS