

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS A PARTIR DE LA CORTEZA DE PINO CARIBE (*PINUS CARIBAEA MORELET VAR. HONDURENSIS*)

Dra. Marta Alessandrini Díaz¹ y Dr. Julio Orlando Vargas Muñoz²

¹ Universidad de Pinar del Río. Avenida Martí 270 Final, Pinar del Río

² Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia

RESUMEN

Este artículo tiene como objetivo analizar la influencia de ocho disolventes en la obtención de extractos bioactivos con actividad antifúngica a partir de la corteza de Pinus caribaea Morelet var. hondurensis Barret & Golfari, procedente de las plantaciones forestales del oriente venezolano. El extracto metanólico resultó adecuado en el control del crecimiento de dos especies de hongos xilófagos: Gloeophyllum trabeum y Trametes versicolor. El porcentaje de inhibición para el control del crecimiento de Gloeophyllum trabeum fue del 51,90%, mientras que para Trametes versicolor fue del 21,49%, lo que pone de manifiesto el potencial fungistático de ese extracto.

Palabras clave: corteza, pino, extractos, antifúngico, hongos xilófagos

ABSTRACT

This paper has an objective to analyze the influence of eight solvents for obtaining bioactive extracts with antifungal activity from the bark of Pinus caribaea Morelet var. hondurensis Barret & Golfari, from the forest plantations of the Venezuelan east. The methanolic extract was sufficient for the control of growth two species of wood-decay fungi: Gloeophyllum trabeum and Trametes versicolor. The percent of inhibition for the control of growth Gloeophyllum trabeum was 51,90% ; while for the case Trametes versicolor was 21,49%. This result obtained revealed the fungistatic potential of this extract.

Key words: bark, pine, extracts, antiungical activity, wood-decay fungi

INTRODUCCIÓN

En el campo científico-técnico, debido a la creciente preocupación ambiental por minimizar los efectos negativos de los productos sintéticos

utilizados en la conservación de la madera, se observa una tendencia cada vez mayor a la aplicación de extractos bioactivos de la corteza de

diversas especies para la preservación de este material, con una visión ecológica que implica el desarrollo y la aplicación de lo que se ha denominado *protección natural*, a través de investigaciones de nuevos preservantes de madera selectivos solamente para aquellos organismos que la destruyen y que a su vez, sean biodegradables [Barnes, 1992].

La corteza es un material más rico y variado que la madera desde el punto de vista de su composición química. Entre sus constituyentes se encuentran los extractivos, conocidos por *metabolitos secundarios*, biosintetizados para desempeñar diferentes funciones como retardar y prevenir la invasión de patógenos, servir como sustancias de reserva, o finalmente como hormonas vegetales. Por ello la corteza de pino pudiera ser utilizada al separarla desde el punto de vista fitoquímico en sus más valiosos componentes, y orientada a la obtención de extractos bioactivos con actividad antifúngica y actividad atrapadora de radicales libres.

A partir de lo expresado anteriormente es posible formular el siguiente problema científico: la generación de daños ambientales, económicos y sociales se origina por el inexistente aprovechamiento de la corteza de pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari), por lo que el objetivo del trabajo consistió en obtener extractos naturales con actividad antifúngica a partir de la corteza del pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari) para el control del crecimiento de hongos xilófagos a escala de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

La corteza de pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari), necesaria para llevar adelante la investigación, procede del aserradero Andino, ubicado en las plantaciones forestales desarrolladas por la Corporación Venezolana de Guyana, en su programa forestal (CVG-PROFORCA), en la región oriental del país.

Las reservas forestales de la región representan aproximadamente el 75% de las áreas boscosas del país, y se cuenta con aproximadamente 13 millones de hectáreas de bosques naturales para la producción forestal. Las plantaciones de pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari) localizadas al sur de estados Monagas y Anzoátegui cubren en la actualidad una extensión superior a las 600 000 ha.

Toma de muestras

El método de toma de muestras de corteza se subdividió en dos etapas. La primera para la obtención de las muestras de corteza interna y externa de las probetas destinadas a la descripción anatómica, donde se tomaron cinco trozas (Asociación Internacional de Anatomistas de la Madera, AIWA) de 3,6 m de largo. De ellas se obtuvieron tocones basales de 30 cm de largo que fueron transportados al Laboratorio Nacional de Productos Forestales de Mérida. La porción de las trozas remanentes pasaron por la descortezadora y se recuperó toda la corteza.

La segunda etapa se realizó en forma aleatoria, directamente de las

pilas de deposición de corteza en el patio de la industria, a diferentes profundidades, permitidas por un barrero de recolección de suelos, siguiendo orientaciones norte-sur y este-oeste, según el método utilizado por Álvarez (1999), por la influencia que se podría tener en cuenta a la pérdida de sustancias extractivas debidas al tiempo y condiciones de deposición.

Las cortezas de ambas muestras fueron mezcladas y transportadas al Laboratorio Nacional de Productos Forestales. Para el cálculo del volumen de corteza se trabajó basado en los datos levantados por Arellano (1977), y se comprobó el tamaño de la muestra según la expresión:

$$n = \frac{T^2 CV^2}{E^2}$$

donde:

T: t de student para 95% de confianza
CV: Coeficiente de variación (%).

E: Error de muestreo

El número total de muestras levantadas alcanzó 936 trozas.

Preparación de la corteza

Se almacenó la corteza durante quince días, necesarios para que alcance un contenido de humedad seco al aire aproximado al 18%, y controlado por medio de xilohigrómetro de resistencia eléctrica. Asimismo se procedió a realizar una clasificación visual y una reducción del tamaño de las piezas de corteza, y aprovechó para realizar una separación de elementos extraños a ella.

Pequeñas astillas de corteza fueron trituradas en un molino de cuchillas marca Willey, tamizadas hasta disponer de un tamaño adecuado para el proceso de extracción, 40-60 mesh, basado en la norma Tappi 257 cm-85 [Tappi, 1998].

Caracterización físico-química de la corteza de pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari)

Se seleccionaron 20 piezas de corteza de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari procedentes del aserradero Andino. Los ensayos se hicieron en el Laboratorio Nacional de Productos Forestales, Sección de Ensayos de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Las propiedades físicas evaluadas fueron:

- Contenido de humedad en la condición verde.
- Contenido de humedad en la condición seca al aire.
- Densidad en la condición verde.
- Densidad en la condición seca al aire.

Los ensayos físicos de la corteza de pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari) se realizaron siguiendo las estipulaciones de Hoheisel (1972).

Composición química de la corteza

No existen métodos normalizados para determinar la composición química de la corteza, por lo que deben aplicarse los utilizados en el análisis de madera.

La determinación de la composición química estuvo encaminada a cuantificar los principales componentes de la pared celular (celulosa y lignina, sustancias extractivas con ocho disolventes y las cenizas).

Celulosa (%): Se determinó mediante el procedimiento descrito por Browning (1967). Este método permite precisar el contenido de celulosa en cualquier tipo de bagazo o pulpa. En este caso se trabajó sobre muestras de corteza libre de extraíbles.

Lignina insoluble en ácido (%): Se utilizó la norma Tappi T om-98 [Tappi, 1998], con el empleo de corteza libre de extraíbles.

Cenizas (%): Se determinó según la norma Tappi T 211 om-93 [Tappi, 1998], después de la incineración completa de la muestra en crisoles de porcelana y someterlas a $525 \pm 25^\circ\text{C}$.

Sustancias extractivas en ocho disolventes (%): Se determinó el contenido de sustancias extractivas en ocho disolventes mediante extracción continua en equipo Soxhlet de 30 g de muestra, colocadas en un dedal de celulosa durante 5 h de reflujo. Se utilizó la norma Tappi T 204 cm-97 [Tappi, 1998] como referencia.

Determinación de la actividad antifúngica del extracto crudo metanólico a partir de la corteza de pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari)

La actividad antifúngica fue evaluada frente a los hongos de la pudrición parda (*Gloeophyllum trabeum* (Fr.) Murr. (mad-617-R) y pudrición blanca (*Trametes versicolor* (L:Fr) Pilát (FP-

133255-R). Se utilizó el método de dilución en gel con inoculación superficial en placa [Jansser, 1987; García, 1995; Ajaiyeoba, 1998], lo que nos permite obtener datos respecto a esa actividad antifúngica.

El porcentaje de inhibición fue expresado en función del crecimiento total del control, calculado de acuerdo con la ecuación desarrollada por Gopalakrishnam (1997):

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Tabla 1* se observa que el contenido de humedad de la corteza seca al horno se sitúa en un 15,48%, la densidad aparente verde tiene un valor de $0,60 \text{ g/cm}^3$, la densidad aparente seca al aire es $0,51 \text{ g/cm}^3$ y la densidad aparente seca al horno presenta un resultado de $0,47 \text{ g/cm}^3$. De esta forma se demuestra la importancia de la humedad de la corteza desde el punto de vista del aumento de masa por unidad de volumen, y muy importante cuando se planifica el transporte de este material con vistas a la industria.

La *Tabla 2* muestra los resultados del estudio de la caracterización química de los principales componentes de la pared celular de la corteza de pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari) en árboles de quince años de edad provenientes del oriente de Venezuela.

En la *Tabla 2* se observa que la celulosa alcanza un rendimiento de 43,9%, lo que se corresponde con lo reportado

para cortezas de coníferas por Einsparh & Harder (1976). Es necesario señalar que para obtener la corteza libre de extractivos –intentando minimizar el efecto de las sustancias llamadas por Segal y Purves según Laver (1991) *extractivos* (compuestos de ligninas, suberinas, taninos y otros numerosos compuestos)– se realizaron extraccio-

nes sucesivas en ocho disolventes de diversa polaridad. Es así que se pasó la muestra por tolueno, éter de petróleo, benceno, éter dietílico, acetona, etanol, metanol y agua caliente. En estudios hechos por este autor se obtuvieron valores de 38,1% de celulosa de corteza libre de extraíbles de *Pinus contorta* Dougl. Ex loud.

TABLA 1
Valores promedio de las propiedades físicas de la corteza

Estadígrafo	D.V. (g/cm ³)	D.S.A. (g/cm ³)	C.H.S.H. (%)	D.S.H. (g/cm ³)
X=	0,6030	0,5085	15,4776	0,4718
D.S.M.=	0,1296	0,0841	2,0816	0,0807
CV(%)=	21,4939	16,5441	13,4493	17,1059
N=	18	18	18	18
Máx=	0,8218	0,6374	22,9508	0,6145
Mín=	0,3463	0,3100	12,7907	0,2888

D.V.: Densidad verde.

D.S.A.: Densidad seca al aire.

D.S.H.: Densidad seca al horno.

C.H.S.H.: Contenido de humedad seca al horno.

TABLA 2
Caracterización química de la corteza de pino caribe
(*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari)

Compuesto	Celulosa (%)	Lignina (%)	Cenizas (%)	Extractivos totales (%)
X	43,90 ± 1,23	32,72 ± 0,408	8,52 ± 0,486	13,05 ± 0,047
Cv (%)	4,85	2,16	9,88	0,81

La lignina de la corteza en la actualidad no ha sido completamente investigada, en lo fundamental por la inexistencia de interés sobre este compuesto, ya que es muy poco comercializado debido a la gran oferta de ligninas derivadas de los procesos de pulpeo de la madera. Segall & Purves, según Laver (1991), reportaron que los valores de lignina se sitúan del 9,4%

al 53,7%, dependiendo de la fracción de la corteza analizada, el método de análisis y la especie. En este estudio el porcentaje de lignina insoluble en ácido obtenida se encuentra en el rango determinado por estos autores, además de ser coincidente con los valores de la lignina de la corteza de coníferas reportado por Einsparh & Harder (1976), con un valor promedio del 32,72%.

Las sustancias minerales traducidas en la determinación de las cenizas presentaron un valor del 8,52%, en general muy altos al ser comparados con los valores para madera, pero bajos con los valores reportados por Einsparh & Harder (1976) para cortezas de diferentes pinos.

Las sustancias solubles en ocho disolventes de polaridad creciente (éter de

petróleo, tolueno, benceno, éter dietílico, acetona, etanol, metanol y agua) alcanza un valor del 13,05% de rendimiento, y se encuentran entre los valores reportados por Einsparh & Harder (1976), de 0,2-25,0% para cortezas de diferentes pinos.

En la *Tabla 3* se muestran los resultados para las sustancias extraíbles (%) en diferentes disolventes estudiados.

TABLA 3
Influencia del disolvente en el contenido de sustancias extraíbles de la corteza de pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari)

<i>Disolvente</i>	<i>Rendimiento promedio (%)</i>	<i>Cv (%)</i>
Tolueno	3,746 ± 0,151 (a)	6,96
Éter de petróleo	2,411 ± 0,125 (b)	8,95
Benceno	3,848 ± 0,146 (a)	6,57
Éter dietílico	4,452 ± 0,302 (a)	11,74
Acetona	7,104 ± 0,042 (c)	1,01
Etanol	8,314 ± 0,096 (d)	1,99
Metanol	8,282 ± 0,037(d)	0,78
Agua	6,296 ± 0,474(c)	13,02

Letras diferentes expresan diferencias significativas para 5% de probabilidad según método de Student-Newman-Keuls (SNK).

Los valores de contenido de extraíbles en los diferentes disolventes utilizados permitieron obtener rendimientos que varían entre 2,4 y 8,3% (base seca). Estos resultados son el promedio de tres extracciones sobre la base seca de corteza, en todos los casos bajo condiciones optimizadas. Los mayores rendimientos se consiguen empleando como disolventes metanol y etanol, que producen más del 8,0% de extraíbles (base seca), sin diferencias estadísticas significativas entre ellos. Los extractos obtenidos con agua y

acetona presentan rendimientos de 6,296 y 7,104%, respectivamente. Los disolventes medianamente polares y los apolares ostentan rendimientos menores, y se sitúan en un máximo de 4,452%. Esta variación es resultante de la naturaleza química de la amplia gama de compuestos que forman parte de la corteza, donde la polaridad del disolvente influye de manera decisiva en su rendimiento de extracción, siendo mayoritarios los compuestos de naturaleza fenólica que aquellos compuestos de mayor peso molecular.

Determinación de la actividad antifúngica de algunos extractos de pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari).

Los porcentajes de inhibición para el hongo de pudrición parda fueron del

66,12% para el caso de los extractos en tolueno, 55,32% para los extractos en acetona, 51,9% para los extractos en metanol, 47,5% para los etanólicos y 45,55% para los extractos en benceno (Tabla 4).

TABLA 4
Porcentajes de inhibición del crecimiento de *Gloeophyllum trabeum* y *Trametes versicolor*

Disolvente	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	<i>Trametes versicolor</i> .
Benceno	45,55 (d)	35,71 (a)
Metanol	51,90 (bc)	21,49 (b)
Etanol	47,5 (cd)	25,72 (b)
Acetona	55,32 (b)	29,51 (ab)
Tolueno	66,12 (a)	6,04 (c)

Debido a sus razonables niveles de actividad, costo, facilidad de manejo, además de otros factores, los extractos metanólicos son los seleccionados para continuar los estudios relacionados con actividad biológica.

Para el caso de pudrición blanca se observa un 21,49% de inhibición del crecimiento del hongo para el extracto metanólico, mientras que en el caso de la pudrición parda este mismo extracto alcanza un porcentaje de inhibición del 51,90%.

Aunque el tolueno presenta las mayores actividades antifúngicas contra el hongo de pudrición parda o marrón, y el benceno y la acetona contra el hongo de pudrición blanca, el metanol fue seleccionado como disolvente de trabajo por su bajo costo en Venezuela y tratarse de un derivado del fraccionamiento del petróleo, con precios más bajos comparados con el alcohol de caña (etanol).

A su vez, Eloff (1998) afirmó que el metanol es un compuesto tóxico sobre diversos microorganismos de ensayo y manejo biológico, y se hace necesario establecer la concentración mínima inhibitoria, que en nuestras condiciones de trabajo fue del 0,5% para ambos microorganismos estudiados.

CONCLUSIONES

- El estudio de las propiedades físicas y la composición química de la corteza de pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari) permite inferir que se trata de un material lignocelulósico con perspectivas de aprovechamiento para la obtención de extractos naturales bioactivos.
- Los contenidos de sustancias extractivas en la corteza de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* oscilaron entre un 3,74; 2,41; 3,84;

4,45; 7,10; 8,31; 8,28 y 6,29% para los disolventes tolueno, éter de petróleo, benceno, éter dietílico, acetona, etanol, metanol y agua caliente, respectivamente. El contenido de extractivos totales de la corteza de esta especie para extracción sucesiva de ocho disolventes fue del 13,05%.

- La influencia del tipo de disolvente sobre el porcentaje de inhibición del hongo de la pudrición parda es en el orden tolueno > acetona > metanol > etanol > benceno, mientras que para el crecimiento diametral del hongo de pudrición blanca, el orden del disolvente fue benceno > acetona > etanol > metanol > tolueno.
- El metanol resultó un disolvente adecuado para la obtención de extracto crudo con actividad antifúngica a partir de la corteza de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*, con una concentración mínima inhibitoria del 0,5% para *Gloeophyllum trabeum* y *Trametes versicolor*.
- La utilización del extracto metanólico de la corteza de pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari) para aumentar la durabilidad natural de la madera de pino permite afirmar que ese material contiene compuestos biológicamente activos contra microorganismos causantes del deterioro de la madera.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ, E.: «Perspectivas de aprovechamiento del aserrín mediante su transformación hidrolítica y como fuente de biomasa para diversos fines». Resumen de tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Forestales, 1999.
- AJAIYEGBA, E.; A. RAHMAN; L. CHOUDHARY: «Preliminary Antifungal and Cytotoxicity Studies of Extracts of *Ritchiea capparoides* var. *longipedicellata* 0187», *Journal of Ethnopharmacology* 62, no.3, 1998.
- ARELLANO, C. G.: «Estudio de las características de la materia prima en el aserradero Venwood CA». Informe de Pasantía para optar por el título de Ingeniero Forestal, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes, 1977.
- BARNES, H. M.: «Wood Protecting Chemicals for the 21st. Century». The International Research Group on Wood Preservation, Document no. IRG/ WP/ 30018, 1992.
- BROWNING, B.: «Methods of Wood Chemistry», vol. I, Interscience Publisher. Wisconsin, E.U., 1967.
- EINSPAHR, D. & M. Harder: «Softwood Bark Properties Important to the Manufacture of Fibre Products», *Forest Products Journal* 26(6):28-31, 1976.
- ELOFF, J.: Which Extract Should Be Used for the Screening and Isolation of Antimicrobial Components from Plants?, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 60, no. 1, 1998.
- GARCÍA, C.; E. Correa; N. Rojas: «Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antimicrobiana de algunas plantas superiores colombianas», *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 23-42-48, 1995.
- GOPALAKRISHNAN, G.; B. BANUMATHI; G. SURESH: Evaluation of the Antifungal Activity of Natural Xanthones from *Garcinia mangostana* and Their Synthetic Derivates», *Journal of Natural Products* 60-519-524, 1997.
- HOHEISEL, H.: «Projected Standars for the Evaluation of Tests of the Physical Properties of wood», *Revista Facultad de Agronomía*, Medellín, vol.27, no. 1, 1972, pp. 60-66.
- JANSSER, A.; J. SENEFIEF; A. BAERHERM: «Antimicrobial Activity of Esencial Oils: A 1976-1986 Literature Review. Aspects of the Test Methods», *Planta Médica*, 1987.
- LAVER, M.: *Bark Wood Structure and Composition*, vol. 11, Ed. Menachen & Goldstein, 1991, pp. 409-434.
- Tappi (Technical Association of the Pulp and Paper Industry): «Test Methods. Monograph», 1998.