

Evaluación fungicida y antitérmica preliminar del líquido piroleñoso

Sayra Navas

Resumen

Este estudio tiene el propósito de obtener parte de la información necesaria para evaluar el uso potencial del líquido piroleñoso, que se produce como subproducto de la carbonización en la madera, en el campo de la preservación de la madera. Para ello, se evaluaron propiedades fungicidas y antitérmicas del líquido piroleñoso.

Con respecto a las propiedades fungicidas, pruebas micológicas *in vitro* parecen indicar un nivel de toxicidad adecuado del líquido piroleñoso frente a hongos pudridores de madera, similar al encontrado en informes de la literatura. A pesar de que también se realizaron pruebas *in vivo*, para evaluar la eficiencia fungicida del líquido piroleñoso, un problema de contaminación impidió sacar conclusiones sobre su nivel de toxicidad.

En relación con las propiedades antitérmicas del líquido piroleñoso, se demostró que las muestras de madera preservada con ese líquido mediante el método de baño caliente y frío, tuvieron una regular protección ante el ataque de insectos.

Introducción

Pudrición de la madera

El ataque de hongos e insectos en el bosque y en los patios de madera, produce gran destrucción en ésta. Las diferentes especies de madera exhiben una amplia variación en su resistencia al ataque. Aunque ninguna madera nativa es inmune, algunas poseen durabilidad superior. Bajo condiciones favorables para el ataque, la albura de todas las especies nativas es susceptible, pero el duramen lo es en menor grado, principalmente debido a la presencia de los extractivos sustanciales como aceites esenciales, terpenos y compuestos fenólicos. Otros factores que contribuyen a la durabilidad del duramen pueden ser: menor contenido de humedad, pobre permeabilidad y bloqueo de las cavidades celulares por gomas y resinas.

Hongos

Los hongos que se encuentran en la madera se dividen en dos grupos.

destructores de madera, que atacan y desintegran la pared celular para alimentarse, y las manchas de madera o mohos, que utilizan materiales alimenticios almacenados en las cavidades celulares y tienen muy poco efecto desintegrante.

Hongos destructores de la madera

Aunque existe una amplia variedad de hongos capaces de producir podredumbre, ésta es principalmente de dos clases: pudrición blanca y pudrición café, que se diferencian por el color y la naturaleza del ataque durante las etapas iniciales e intermedias del proceso. En la pudrición café, los carbohidratos son atacados preferentemente y la lignina es poco afectada. La pudrición blanca o "corrosiva" consume a los carbohidratos y a la lignina (1).

Carranza y Sáenz (2) reportan al menos ciento setenta y nueve especies de hongos que atacan la madera en Costa Rica. La selección de los hongos que se emplearon en este estudio se hizo con base en la recomendación de la Dra. Julieta Carranza, de la Universidad de Costa Rica, de que quedaran representados estos tipos de pudrición. Así los hongos *Earliella scabrosa*, *Hexagonia hydroides* y *Trametes versicolor* producen pudrición blanca, y el *Phellinus gilvus*, pudrición café (Julieta Carranza, comunicación personal).

Insectos

Además de los defoliadores: gorgojos, escarabajos y otros insectos que depredan los árboles, existen muchos insectos barrenadores que causan grandes pérdidas. Algunos de estos infectan tanto al árbol vivo como a los árboles muertos y también dañan trozas de madera, madera aserrada, madera en servicio, etc. La albura y el dura-

men son igualmente susceptibles, lo mismo que las especies coníferas y latifoleadas. El daño principal consiste en agujeros pequeños profundos producidos por el barrenado de las larvas. Las termitas pueden ser problema en los patios de madera y en los edificios u otras estructuras debido a que usan la madera como refugio y fuente de alimentación (1).

Barrenadores marinos

Los barrenadores marinos son moluscos y crustáceos de agua salada que producen gran daño en estructuras de madera sumergida, o bien en partes de madera expuestas a ambientes salinos. Algunas maderas tropicales tienen durámenes que son especialmente resistentes al ataque de barrenadores marinos (1).

Preservación de la madera

La madera puede ser protegida del ataque de hongos pudridores, de insectos dañinos, o de barrenadores marinos, si se le aplican ciertos productos químicos como preservantes. El grado de protección obtenido depende de la clase de producto empleado y de que se alcancen los grados de penetración y retención adecuados. Algunos son más efectivos que otros, y se adaptan mejor a ciertos requerimientos de uso. La madera puede ser bien protegida, sólo cuando las sustancias la penetran y algunos métodos de tratamiento aseguran una mejor penetración que otros. También existe diferencia en las diversas especies de maderas en cuanto a la capacidad de ser tratadas particularmente en su duramen, que generalmente es más difícil de tratar que la albura.

Los buenos preservantes, aplicados con retenciones estándar y con niveles

lavas

ctos en el
dera, pro-
a. Las di-
a exhibe
resistencia
madera na-
oseen una
ndiciones
albura de
suscepti-
n general
ente debi-
tractivos
ciales, to-
os. Otros
durabili-
más bajo
e penetra-
dades co-

ran en la
upos: los

satisfactorios de penetración, aumentan significativamente la vida de las estructuras de madera, frecuentemente unas cinco o más veces. Sobre esta base, el costo anual de la madera tratada en servicio es mucho más bajo que el de la madera similar sin tratamiento (3).

Taylor (4) señala que, prácticamente en todos los países de Latinoamérica, existe interés en la preservación de la madera, y que la mayoría de las plantas de tratamiento son pequeñas; establecidas para servir mercados de madera aserrada o bien de postes para tendido eléctrico o telefónico.

Tipos de preservantes de madera

Los preservantes de madera se clasifican en dos grandes categorías, los oleosolubles (aceites como la cerosota, disoluciones de pentaclorofenol en aceites como el diesel y alquitrán de madera) y los acuosolubles (sales solubles en agua que se aplican como disoluciones acuosas) (3).

Alquitrán de madera como preservante

La destilación destructiva de la madera o carbonización produce gran variedad de sustancias químicas, entre ellas ácido acético, alcohol de madera, etc. El alquitrán de coníferas ha sido usado extensivamente para la preservación de cuerdas y velas de barcos y también para tratar heridas de árboles. Desde hace mucho tiempo se sabe que es fuertemente antiséptico y en los países desarrollados se han usado pequeñas cantidades para preservar maderas, algunas veces mezcladas con alquitrán de carbón mineral y cerosota.

En Estados Unidos la industria de preservación es de gran escala. Gjovik y

Micklewright reportan que por los mercados para más de 500 millones de pies cúbicos de madera, la cual en su mayoría proviene de árboles de baja calidad, trozas que no son adecuadas para usos de mayor valor, de especies que no tendrían otra utilidad sino para ser quemadas (5). En este caso las cantidades de alquitrán de madera han sido suficientes para desarrollar su uso a gran escala (6).

En aquellos países donde la cerosota es barata y abundante, es poco probable que el alquitrán de madera sea usado para preservar madera; sin embargo, en países como Costa Rica, donde la cerosota debe ser importada, el alquitrán de madera podría ser utilizado como preservante (6,7,8).

Schwartz y Deon (7) estudiaron el potencial, en el campo de la preservación de maderas, de alquitranes provenientes de la carbonización de residuos de palmera y de madera. Evaluaron las propiedades fungicidas y antibacterianas y encontraron que estos subproductos pueden dar una protección medianamente buena a la madera. Fraylay (6) concluyó que los alquitranes de madera son altamente tóxicos para los hongos destructores de madera, que algunos de ellos, aproximadamente igual de efectivos que la cerosota en este respecto. Por lo tanto, se puede considerar oportuno investigar las posibilidades de valorización y utilización de los asfaltos o alquitranes piroleñosos (subproductos de la carbonización de la madera) en el campo de preservación de maderas, ya sea como sustitutos totales o parciales de los preservantes oleosolubles sintéticos.

Líquido piroleñoso

El líquido piroleñoso es una mezcla compleja, líquida a temperatura ambiente y poco estable en el tiempo. Generalmente está constituida por una

ses, una acuosa y una orgánica, que se satura una en la otra formando una mezcla líquida heterogénea.

Este líquido es la materia prima más conocida por la alquimia artesanal, por lo que muchos investigadores se han interesado en conocer en detalle su composición. Recientemente ha sido posible describir mejor su compleja composición. Así, diferentes autores, trabajando especialmente con maderas de zonas templadas, han demostrado que la composición de los "líquidos" piroleñosos, varía con la materia prima y con el modo de carbonización. Los productos descritos en la literatura pertenecen a los siguientes tipos de compuestos: alcoholes, cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, compuestos aromáticos y compuestos heterocíclicos (9,10,11,12).

Vergnet y Villeneuve (12) mencionan diversos estudios que describen en detalle la composición de diferentes líquidos piroleñosos obtenidos en condiciones particulares.

Los productos identificados pueden ser económicamente interesantes de acuerdo con su proporción relativa, o

al contrario, en términos de lo poco comunes que sean.

Es posible obtener del líquido piroleñoso, ácido acético y metanol en cantidades no despreciables, el ácido fórmico presente también puede ser de interés. Estos productos son extraídos por destilación del líquido; sin embargo, industrialmente son preferibles los productos de síntesis química debido al alto costo energético de la destilación del líquido piroleñoso y de la rentabilidad marginal en países desarrollados.

En los últimos años, se han realizado proyectos que tienen como objetivo utilizar el metanol y el etanol recuperados, como aditivos de carburantes; sin embargo, las técnicas recomendadas para su obtención son por vía pirólisis.

Actualmente, una de las formas de valorización más rentable, es la de recuperar compuestos complejos que, en su mayoría, tienen uso en medicina veterinaria y como aditivos en la industria alimenticia (12).

El siguiente cuadro resume los constituyentes mayoritarios presentes en el

Cuadro 1			
Constituyentes mayoritarios del líquido piroleñoso (7)			
LÍQUIDO PIROLEÑOSO (40-60%)			
ACIDO PIROLEÑOSO (35-45%)		ASFALTOS (5-20%)	
Componente	%	Componente	%
Acetona	0,1 -0,15	Monofenoles	0,2 -1
Acetato de metilo	0,1 -0,3	Guayacol	0,1 -1
Acetato de etilo	0,1	Cresol	0,4 -1
Metanol	0,5 -1	Brea	4 -9
Etanol	<0,5	Resina (pinos resinosos)	20 -6
Ácido acético	1 -5		
Ácido propiónico	<0,1		
Ácido fórmico	<0,1		
Ácidos superiores	<0,2		

(Todos los valores en % de madera seca)

líquido piroleñoso, y su proporción, de acuerdo con el reporte de Vergnet y Villeneuve (12).

Es importante destacar que, sea cual sea la madera o mezcla de maderas empleadas en la pirólisis, la composición cualitativa del líquido piroleñoso es la misma, o sea, se encuentran los mismos constituyentes. El análisis cuantitativo, sin embargo, revela algunas diferencias puesto que los rendimientos totales en piroleñosos no son idénticos para todas las especies (11).

Petroff y Doat (10) concluyeron que la cantidad de ácido acético y de acetato de metilo aumentan, cuando la madera carbonizada tiene un alto contenido de pentosanas, mientras que las maderas ricas en lignina producirán menos ácido acético y las maderas ricas en extracto alcohol-benceno darán menos metanol. Aparentemente las maderas con alto contenido de lignina producirán un rendimiento máximo de guaya-col, fenol y cresoles.

Además de la utilización de los químicos presentes en el líquido piroleñoso, existen reportes de posibles utilidades menos sofisticadas del mismo, como por ejemplo: (12,13)

- En la producción industrial de asfalto, los asfaltos pueden ser reutilizados en el circuito de pirólisis.
- En la producción artesanal de asfalto, la combustión directa de los quitrans decantados.
- En la preservación de madera por el cubrimiento de las piezas por ejemplo con una mezcla asfalto-asfalto quemado.

Estas opciones parecen ser las más viables para un país como Costa Rica ya que implican el uso, casi inmediato, del líquido piroleñoso. Los estudios sobre utilidades menos sofisticadas de este líquido parecen ser una aproximación más adecuada al problema del uso de los subproductos de la carbonización.

Definición del problema

De acuerdo con la Memoria Estadística del Sector Energía (14) la producción y consumo de carbón vegetal en Costa Rica, así como su equivalente en toneladas métricas, durante los años 84, 85, 86, y 87 aparecen en el cuadro 2.

Cuadro 2
Producción y consumo de carbón vegetal

AÑO	PRODUCCIÓN		CONSUMO	
	TJ	TM	TJ	TM
1984	470	17.273	311	11.430
1985	418	15.362	391	14.870
1986	358	13.157	358	13.157
1987	384	13.745	374	13.745

Nota: Los datos de toneladas métricas se calcularon empleando el valor equivalente de 1 TJ/1.000 Tm (14)

La producción total de energía para 1987 fue de 69.245 terajoules, de lo cual se deriva que la contribución porcentual de carbón vegetal (0,5%) fue poco significativa. Sin embargo, considerando las políticas del Plan Nacional de Energía, de impulsar y desarrollar las tecnologías de producción de carbón vegetal, se perfila como una actividad de regular importancia en Costa Rica en la que participan diferentes empresas públicas y privadas, entre ellas, Coopeindio, Corporación de Desarrollo Forestal (CODEFORSA), Corporación Forestal Sarapiquí S.A. (COFORSA), Centro Agrícola Cantonal de Hojancha (CACH), Lachner y Sáenz, etc.

De modo que existe, al menos potencialmente, una fuente importante de líquido piroleñoso, rico en compuestos químicos, cuya utilización en la actualidad es prácticamente nula.

Considerando la dificultad de separar los compuestos químicos presentes en el líquido piroleñoso, el alto costo de los preservantes sintéticos oleosolubles, y dado que existen informes en la literatura sobre el uso de la fracción orgánica del líquido piroleñoso (aceite piroleñoso) como agente preservante (1,6,8,15) se considera oportuno evaluar las características preservantes y la estabilidad del aceite piroleñoso obtenido por pirólisis de madera.

Por lo anterior, en este estudio se evaluaron en forma preliminar la eficiencia fungicida y la eficiencia antitermítica del aceite piroleñoso.

Materiales y métodos

Materiales

Los materiales empleados en este estudio incluyen:

2.1.1. El líquido piroleñoso, cuya eficiencia fungicida antitermítica, fue evaluada.

2.1.2. Los hongos pudridores de madera que se usaron en experimentos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la eficiencia fungicida del líquido piroleñoso.

2.1.3. Las maderas de prueba que se emplearon en los experimentos *in vivo* de eficiencia fungicida.

2.1.4. Las termitas que se utilizaron en las pruebas de eficiencia antitermítica del líquido piroleñoso.

Líquido piroleñoso

El líquido piroleñoso empleado en este estudio, es un producto comercial que se vende como preservante y proviene de la carbonización en hornos de colmena de 13 metros cúbicos de capacidad, de especies de la zona norte de Costa Rica como: pilón, siete cueros, yema de huevo y laurel. Este líquido tuvo un período de almacenamiento de al menos dieciocho meses.

En contraste con informes de la literatura que describen la separación, por centrifugación de la fracción orgánica y del agua del líquido piroleñoso, en este estudio se empleó el líquido piroleñoso tal como se obtiene de la carbonización y tal como se vende, que es una emulsión de los componentes orgánicos y del agua.

Hongos pudridores de madera

Carranza y Sáenz (16) mencionan que en la literatura se ha informado sobre ciento setenta y nueve especies de hongos que atacan la madera en Costa Rica. De esas especies, ciento ocho pertenecen a la familia *Polyporaceae*, sobre la cual se han realizado muy pocos estudios.

Colecta de hongos

Basándose en la recomendación original de la Dra. Julieta Carranza, de la Universidad de Costa Rica, sobre la selección de hongos, se trató de coleccionar muestras de los siguientes cuatro: *Earliela scabrosa*, *Hexagonia hydnoides*, *Trametes versicolor* y *Phellinus gilvus*, pero sólo dos de esos hongos fueron colectados: *Hexagonia hydnoides* y *Phellinus gilvus*. Además se recogieron otras especies importantes de hongos destructores de madera. Ver cuadro 4 en la sección de Métodos.

Dadas las dificultades de coleccionar y aislar los hongos originalmente planeados, se decidió, con la asesoría de la Dra. Carranza, trabajar con los siguientes hongos, que sí se pudieron coleccionar y aislar: *Corioloopsis polizona*, *Fomitella supina*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes villosa*, *Laetiporus sulphureus*.

Las maderas de prueba para evaluar la eficiencia fungicida del líquido piroleñoso

Con el propósito de cubrir un ámbito de maderas que fuera desde poco resistentes hasta muy resistentes al ataque de hongos pudridores, se emplearon muestras de las siguientes especies (ver cuadro 3):

Considerando la diferencia en resistencia entre la albura y el duramen que exhiben las especies de resistentes muy resistentes (17), en los casos de teca y laurel se evaluaron la albura y el duramen separadamente. El jaúl y la ceiba se evaluaron sin diferenciar.

Termitas empleadas en las pruebas de eficiencia antitermítica del líquido piroleñoso

Las termitas fueron coleccionadas en zonas de madera en servicio de la zona de Turrialba, incluyendo obreros y soldados. Desafortunadamente los soldados no sobrevivieron a las condiciones del laboratorio.

Métodos

Los métodos empleados en este estudio incluyen:

- 2.2.1. Métodos de colecta, identificación y aislamiento de los hongos pudridores de madera.
- 2.2.2. Métodos para evaluar la eficiencia fungicida del líquido piroleñoso.
- 2.2.3. Método para evaluar la eficiencia antitermítica del líquido piroleñoso.

Cuadro 3
Nombre científico y común de las especies de madera empleadas

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	CATEGORÍA
<i>Tectona grandis</i>	Teca	Muy resistente
<i>Cordia alliodora</i>	Laurel	Resistente
<i>Alnus acuminata</i>	Jaúl	Poco resistente
<i>Ceiba pentandra</i>	Ceiba	Muy poco resistente

Métodos de colecta, identificación y aislamiento de los hongos pudridores de madera

Colecta de los hongos

Los sitios de colecta generalmente se ubicaron dentro del cantón de Turrialba, que fue una de las zonas recomendadas por la Dra. Carranza.

Para realizar la colecta se realizó una inspección general del sitio, para observar el espécimen, tomando en cuenta su abundancia y el sustrato donde se encontraba, ya fuera un árbol vivo, o un tronco o ramas en descomposición. Más tarde, con una cuchilla se cortaba el hongo de manera que trajera consigo un trozo de sustrato y se colocaba en una bolsa de papel identificada con

Cuadro 4

Resumen de los datos de los hongos colectados según su número de colecta, fecha, sustrato y localidad

HONGO	# COLECTA	FECHA	SUSTRATO	LOCALIDAD
<i>Coniopsis</i>	1-89	7-10-89	Sobre "chancho colorado en descomposición	Turrialba, Centro
<i>Trametes</i>	2-89	21-10-89	Sobre angiosperma en descomposición	Cafetales La Margot, Turrialba
<i>Trichaptum</i>	3-89	21-10-89	Sobre angiosperma en descomposición	Cafetales La Margot, Turrialba
<i>Coniopsis</i>	4-89	21-10-89	Sobre angiosperma en descomposición	Hacienda Azul, Turrialba
<i>Pycnoporus</i>	5-89	21-10-89	Sobre angiosperma en descomposición	Hacienda Azul, Turrialba
<i>Hexagonia</i>	6-89	27-10-89	Sobre angiosperma en descomposición	Distrito Santa Teresita, Turrialba
<i>Pycnoporus</i>	7-89	8-11-89	Sobre angiosperma en descomposición	Hacienda El Torito, Turrialba
<i>Fomitella</i>	8-89	8-11-89	Sobre eucalipto vivo y troncos muertos	Hacienda El Torito, Turrialba
<i>Coniopsis</i>	11-90	25-2-90	Sobre angiosperma en descomposición	Localidad de Guayabo, Turrialba
<i>Trametes</i>	12-90	25-2-90	Sobre angiosperma en descomposición	Localidad de Guayabo, Turrialba
<i>Pycnoporus*</i>	191-86	19-8-86	Creciendo sobre eucalipto vivo	Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San Pedro

Este hongo debió ser tomado del laboratorio de Micología de la Universidad de Costa Rica. La muestra es propiedad del Herbario de la Escuela de Biología y fue cedida amablemente por la Dra. Carranza debido a que fue totalmente imposible colectar un hongo que produjera "podredumbre café"; todos los hongos colectados producían "podredumbre blanca". La muestra de este hongo (191-86) fue cedida sin costo, es decir, se debió trabajar con él, al igual que se trabajó con las demás muestras.

un número de muestra y con la fecha de colecta. En todos los casos se anotaron las siguientes características: tipo de sustrato, sitio donde se realizó la colecta, fecha y el número establecido de muestra. Las muestras en bolsas de papel se colocaron en una bolsa de plástico grande, y posteriormente fueron trasladadas al laboratorio para identificarlas. La identificación fue realizada por la Dra. Carranza.

En el cuadro 4 aparecen los hongos colectados, su número de colecta (número de muestra y colecta), fecha, tipo de sustrato y sitio donde fue colectado.

Aislamiento de los hongos pudridores de la madera

Preparación de medios de cultivo

La preparación de los medios de cultivo es estándar e incluye cuatro etapas:

- Determinación de la masa de los componentes del medio de cultivo.
- Disolución en la cantidad requerida de agua destilada.
- Distribución del medio en cajas de petri o tubos de ensayo.
- Esterilización.

Debido a que los medios se preparan para el crecimiento de hongos en cultivos puros, todos los microorganismos, excepto el que va a crecer, se deben excluir. Para esto es necesario esterilizar el medio en una autoclave por 15 ó 20 minutos a 125°C y 103 kilopascales de presión. Toda la cristalería, incluyendo las cajas de petri, debe esterilizarse en un autoclave. El llenado (chorreado) de las cajas de petri debe llevarse a cabo en condiciones estrictas de limpieza. Se colocan las cajas de petri en la mesa, luego se toma el erlemeyer u otro recipiente que contiene el medio de cultivo, se le quita el algodón (tapón), se pasa la abertura del erlemeyer por la

llama de un mechero o lámpara de alcohol; se levanta un lado de la caja de petri justamente lo necesario para insertar la apertura del recipiente y vaciar el medio en la caja, se tapa inmediatamente y se mueve para que el agar cubra todo el fondo. Antes de usar las cajas de petri se dejan enfriar hasta que el medio endurezca.

Medios de cultivo utilizados

Para el aislamiento de los hongos se utilizaron dos tipos de medio de cultivo. Inicialmente se preparó el siguiente:

- Agar 15 g
- Malta 30 g
- Agua destilada 1.000 ml
- Benomil 5 mg
- Cefalexina 1 capsula

Este medio contiene la cefalexina como antibiótico de amplio espectro para evitar el desarrollo de bacterias, y benomil como fungicida para evitar el crecimiento de hongos imperfectos que inhiben a los basidiomycos (hongos de podredumbre).

Durante el segundo mes, fue necesario cambiar el antibiótico a ampicilina, ya que hubo una proliferación de bacterias. Los antibióticos además de bactericidas, poseen un amplio espectro antifúngico (17). A pesar de esa gran cantidad de bacterias y de las características antifúngicas de los antibióticos, uno de los hongos, el *Trametes hlosa* (2-89), logró desarrollarse satisfactoriamente, quizá debido a su resistencia frente al antibiótico.

En este caso se preparó medio con las mismas cantidades antes mencionadas, pero se agregó este otro tipo de antibiótico, ya que la mayoría de hongos resultaron muy susceptibles al primero, lo cual inhibió el crecimiento de al menos seis de ellos.

La ampicilina es un producto bactericida de amplio espectro que funciona para bacterias Gram Negativas y Gram Positivas. Con esta sustancia y con el fungicida benomil, se logró aislar el hongo *Fomitella supina*; todos los demás hongos se inhibieron totalmente y en su lugar surgieron agentes contaminantes. Se continuaron sembrando los hongos en este medio, pero ninguno dio resultados positivos. Una posible explicación a lo anterior es que el antibiótico o el fungicida de alguna forma estaban influyendo fuertemente en el desarrollo de los basidiomycetes, es decir, estarían causando cierta inhibición, que permitía el desarrollo de otros hongos imperfectos y bacterias.

Tomando como base de posible explicación lo anterior, se procedió a probar el medio de cultivo llamado malta-agar, sin antibiótico ni fungicida.

El medio malta-agar contiene:

-Extracto de malta	20 g
-Agar	15 g
-Agua destilada	1.000 ml

Las pruebas con este medio fueron bastante satisfactorias, ya que permitió el crecimiento de tres hongos más: *Corioloopsis polyzona*, *Pycnoporus sanguineus* y *Laetiporus sulphureus*.

En resumen, el medio que dio mejores resultados fue el malta-agar, aunque los dos son bastante utilizados.

El malta-agar fue mejor en este caso particular, tal vez porque no contenía sustancias que de una u otra forma pudieran inhibir el desarrollo de un basidiomycetes.

Cultivo de los hongos aislados

Para llevar a cabo la siembra de cada hongo, se coge una navajilla y se corta un trozo del cuerpo fructífero

que posee esporas, además se corta un pequeño trozo del sustrato donde se halla el hongo ya que éste posee micelio, que puede extenderse sobre el medio de cultivo. Con unas pinzas de punta fina previamente esterilizadas se toman los trocitos del hongo y del sustrato y se colocan en el medio de cultivo. Se siembran dos cajas de petri por cada hongo.

Esto se hizo aproximadamente cada cuatro días, cuando no se observó crecimiento micelial sino que únicamente se hallaban organismos contaminantes. Las cajas de petri se guardaron en bolsas plásticas y se colocaron en la incubadora, aproximadamente a 24°C.

Observación al microscopio

En general la presencia de fíbulas o hifas muy visibles es una característica de los basidiomycetes (hongos pudridores) y sirve para identificar a los miembros de la subdivisión Basidiomycotina.

Para tener plena seguridad al desechar una caja de petri con medio de cultivo, ésta debe ser observada exhaustivamente. Si no se está seguro, se toma micelio, sea de un organismo contaminante o no, y se monta sobre un portaobjetos, se le agrega una disolución de hidróxido de potasio al 3% para dilatar las hifas y hacerlas más visibles; se coloca un cubreobjetos y se observa al microscopio. El anterior procedimiento al microscopio, se debe realizar diariamente y varias veces dentro de una misma caja de petri; esto, para asegurarse de que no presente crecimiento micelial, antes de desecharla.

Identificación de los hongos en el laboratorio

Las muestras colectadas en el campo descritas en el cuadro 4, se llevaron al

laboratorio de Micología de la Universidad de Costa Rica donde los hongos fueron identificados con la asesoría de la Dra. Carranza. Los nombres científicos se anotaron junto con el número de colecta de hongo. Luego los hongos fueron sembrados en cajas de petri con un medio de cultivo adecuado para su aislamiento.

Medida del crecimiento micelial

Los hongos aislados se sembraron sobre un medio de malta-agar en cajas de petri, en cuyo envés fue marcado un punto en el centro, a partir del cual se midió el crecimiento radial del hongo. Se inocularon dos cajas de petri por cada hongo; el inóculo se colocó en el centro de la caja de manera que coincidiera con el punto marcado en el envés de las cajas. Las mediciones se realizaron diariamente por quince días, utilizando una regla calibrada en milímetros. El cuadro 5 presenta los resultados obtenidos cada dos días.

Métodos para evaluar la eficiencia fungicida del líquido piroleñoso

La eficiencia fungicida, o capacidad para inhibir el desarrollo de hongos pudridores de madera, es muy importante en la evaluación de las propiedades preservantes de una sustancia. En este estudio fue evaluada por medio de los tipos de experimentos.

Experimentos en cajas de petri o pruebas *in vitro*

Experimentos con madera o pruebas *in vivo*

Experimentos en cajas de petri o pruebas *in vitro*

La toxicidad del líquido piroleñoso a hongos pudridores de maderas fue evaluada por medio de la prueba del agar en la cual, pequeñas cantidades del líquido piroleñoso se agregaron a un medio nutritivo de malta-agar y se determinó la cantidad mínima necesaria para inhibir el crecimiento de los hongos.

Cuadro 5
Crecimiento micelial promedio en milímetros cada dos días, de cinco hongos que crecen sobre malta-agar

HONGOS	CRECIMIENTO MICELIAL PROMEDIO EN MM CADA DOS DÍAS						
	2	4	6	8	10	12	14
<i>Trametes villosa</i>	2,0	7,0	12,0	18,5	24,0	31,0	44,5
<i>Coriolopsis polyzona</i>	1,0	5,5	10,5	16,0	21,0	29,0	41,0
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	2,0	7,0	13,0	19,5	24,5	32,5	43,5
<i>Fomitella supina</i>	1,0	6,0	9,5	15,5	21,5	28,0	40,5
<i>Laetiporus sulphureus</i>	1,5	5,5	9,5	16,5	23,5	30,0	39,5

Nota: Los datos de este cuadro describen el patrón de crecimiento de cada uno de los hongos aislados sin ninguna inhibición. De modo que su importancia radica en el hecho de que permite establecer, por comparación de crecimiento, el grado de inhibición causada por cualquier sustancia.

Se emplearon los hongos pudridores de madera: *Corioloopsis polizona*, *Fomitella supina*, *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes villosa*, todos de pudrición blanca. El hongo *Laetiporus sulphureus*, de pudrición café, no se incluyó, pues se contaminó seriamente y, a pesar de los esfuerzos realizados, no fue posible purificarlo.

Además, como sistema de comparación, se empleó el preservante comercial cerosota.

Experimentos con madera o pruebas *in vivo*

Las pruebas fungicidas en madera se realizaron sometiendo pequeños bloques de madera (2,5 cm x 2,5 cm x 2,5 cm) impregnados con el líquido piroleñoso (método de baño caliente y frío), secos y de masa conocida, al ataque de hongos pudridores de madera, que crecen activamente en frascos de vidrio de boca ancha en un medio de malta-agar. Después de un período de exposición de 16 semanas, bajo condiciones controladas, se esperaba examinar los bloques y determinar el grado de ataque de los hongos por medio de la pérdida de peso seco.

Se emplearon frascos de vidrio esterilizados de boca ancha (5 cm) y rectangular (6 cm x 6 cm x 15 cm), con tapas de metal sin empaque de cartón. Se les agregó el medio de cultivo de malta-agar, preparado y esterilizado, como se describió en la sección de aislamiento de los hongos (2.2.1.2). La cantidad agregada es la necesaria para que, cuando el frasco se coloca acostado e inclinado, se cubra la mayor superficie posible en la botella. Los frascos inclinados se dejan reposar por dos horas, se colocan en grupos de tres en bolsas plásticas y se guardan en la refrigeradora hasta el momento de la inoculación.

Luego se toma el inóculo que consiste de trozos de malta-agar con micelio del hongo, procedente de cajas de petri que contienen los hongos aislados y con una asa estéril se inocula cada una de las botellas.

Los frascos ya inoculados y con sus tapas flojas a un cuarto de vuelta, se colocaron en una incubadora a 28°C, hasta que el hongo creciera. Finalmente se colocaron los bloques de madera que se iban a probar.

Al igual que en el caso de las pruebas *in vitro*, en estas pruebas *in vivo*, se utilizó también el preservante comercial creosota, como sistema de comparación.

Se realizaron pruebas por triplicado para muestras diferenciadas de albura y duramen de teca y laurel, y para muestras no diferenciadas de jaúl y ceiba.

Como muestras testigo o blanco, se expusieron bloques de madera sin ningún tratamiento y sin ningún hongo, a las condiciones generales de la prueba, para observar la variación que sufre la madera en forma natural. En este caso, se coloca un portaobjetos esterilizado sobre el medio de malta-agar y, con pinzas esterilizadas, se introducen los bloques de madera al frasco de vidrio. En cada uno de los tres frascos se colocaron dos bloques diferenciados de albura y duramen de teca y laurel. En el caso de jaúl y ceiba, en cada uno de los frascos, se colocaron dos bloques de madera sin diferenciar.

Preservación de las muestras de madera (18)

La preservación de las muestras de madera se realizó sumergiendo los bloques de ese material en medio del líquido piroleñoso a una temperatura de 80°C durante seis horas, luego se dejaron enfriar en ese medio sin calentar, durante doce horas.

Durante el período inicial de seis horas, el aire contenido en las células de la madera se dilata bajo la acción del calor y es parcialmente expulsado. En el lapso de enfriamiento, el aire de las células se contrae, generando así una succión suplementaria de producto hacia el interior de la madera.

Método para evaluar la eficiencia antitermítica del líquido piroleñoso

Se evaluó la eficiencia antitermítica del líquido piroleñoso frente a termitas colectadas en la zona de Turrialba, de acuerdo con el estándar IPT 1157 Parte D D2 (IPT) (19).

Se expusieron pares de probetas de madera de jaúl (2,3 cm x 0,6 cm x 7,0 cm) preservada con líquido piroleñoso y sin preservar, a la acción de cuarenta termitas obreros. El estándar establecía treinta y ocho obreros y dos soldados; sin embargo, las termitas soldados colectadas no sobrevivieron en el laboratorio.

Las probetas se unieron entre sí en pares por las aristas de 7,0 cm y sobre ellas, en la parte central, se fijaron mangas de vidrio (frascos de vidrio invertido), dentro de las cuales se colocaron las termitas.

Se montaron seis de esos conjuntos en cada uno de los casos: madera preservada y sin preservar.

De acuerdo con el estándar, la exposición de los conjuntos a las termitas, debe ser de cuarenta y cinco días a 27°C. En este caso, el período de exposición se modificó a cuarenta días también a 27°C.

Preservación de las muestras de madera

Al igual que en el caso de las pruebas *in vitro* anteriores, se empleó el méto-

do de baño caliente y frío para impregnar las probetas. No fue posible obtener una impregnación totalmente homogénea de las probetas.

Resultados y discusión

Resultados y discusión de las pruebas de eficiencia fungicida del líquido piroleñoso

Como se mencionó, el líquido piroleñoso está constituido por dos fases: una acuosa, que la literatura describe como de ningún interés en el campo de la preservación; y una orgánica constituida por asfaltos y una fase cerosa que se considera la responsable de la acción preservante.

Si bien es cierto que originalmente se planeó separar estas dos fases, la posibilidad práctica de separar la emulsión en el líquido piroleñoso no fue estudiado, así como el hecho de que en Costa Rica se usa el líquido piroleñoso para preservar, nos condujo a realizar la evaluación del líquido piroleñoso sin separar.

Este aspecto constituye una diferencia significativa entre este estudio y los encontrados en la literatura.

Resultados y discusión de los experimentos en cajas de pruebas *in vitro*

Con el propósito de determinar el límite de toxicidad del líquido piroleñoso, se probaron concentraciones de 10 y 15 por ciento en volumen por volumen de líquido piroleñoso en el medio de cultivo de malta-agar. Las concentraciones no permitieron el crecimiento de los hongos *Coryphospora polizona*, *Fomitella supina*, *Fyco-*

rus sanguineus y *Trametes villosa*. A estas altas concentraciones se observó una contaminación excesiva de los medios de cultivo. Además, posiblemente por lo significativo del factor de dilución, no fue posible que el medio solidificara.

Luego se ensayaron concentraciones de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 por ciento volumen por volumen de líquido piroleñoso, las cuales permitieron el crecimiento vigoroso de los hongos de prueba. También se observó contaminación de los cultivos, pero en mucho menor grado que en el caso anterior.

Habiéndose probado concentraciones muy altas y muy bajas, se procedió finalmente a probar concentraciones de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 por ciento volumen por volumen de líquido piroleñoso y se observó que los hongos *Coriopsis polizona* y *Fomitella supina* no crecieron en las concentraciones probadas, mientras que los hongos *Pyconoporus sanguineus* y *Trametes villosa* se desarrollaron débilmente a concentraciones de 3,5 por ciento pero ya no cre-

cieron a concentraciones de 4 por ciento.

El cuadro 6 resume los resultados obtenidos:

El desarrollo de los hongos fue evaluado por una estimación diaria de la medida de crecimiento del micelio en el medio de cultivo con líquido piroleñoso, en comparación con valores de referencia de la medida del crecimiento del micelio (cuadro 5, Sección 2.2.1.3.1).

Como sistema de comparación, se hicieron ensayos paralelos empleando creosota comercial, un preservante con una eficiencia fungicida comparable con la de la fracción orgánica del líquido piroleñoso, de acuerdo con la literatura (6). Se encontró que en la proporción de 0,1 por ciento volumen de creosota por volumen de medio de cultivo, todos los hongos crecieron lentamente al principio, pero semanas después su crecimiento fue normal. En estas pruebas los hongos permanecieron expuestos también por seis semanas.

Cuadro 6
Desarrollo de cuatro hongos pudridores de madera en cajas de petri utilizando diferentes concentraciones de líquido piroleñoso por seis semanas

HONGO	CONCENTRACIÓN DEL LÍQUIDO PIROLEÑOSO (%v/v)											
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	0,0	15,0
<i>Coriopsis polizona</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fomitella supina</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pyconoporus sanguineus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Trametes villosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Hubo crecimiento del hongo a partir de la segunda o tercera semana aproximadamente después de sembrado.
No hubo crecimiento del hongo al cabo de seis semanas.

Esta comparación con creosota, debe considerarse con reserva debido a que:

- A pesar de que se utilizó aceite mineral como disolvente de incorporación al medio de cultivo, la distribución de la creosota no fue uniforme, sino que se concentró en ciertas zonas de las cajas de petri.
- Se duda de la calidad de la creosota empleada, que fue comprada a un proveedor en Costa Rica, porque según informes de la literatura, la verdadera creosota, aun a niveles de concentración tan bajos como el empleado (0,1 por ciento), es altamente tóxica a los hongos pudridores de madera.

Los valores de concentración del líquido piroleñoso con respecto al medio de cultivo, corresponden a los mililitros del líquido piroleñoso total incluyendo la fase orgánica: asfaltos y fase acídica y fase acuosa. De manera que, para poder comparar estos valores con los que aparecen en la literatura, que emplean exclusivamente la fase orgánica para realizar los experimentos *in vitro*, es necesario convertir los valores de porcentaje del líquido piroleñoso total en valores de porcentaje de la fracción orgánica. Suponiendo un ámbito de concentración del 40 al 65%

para la fracción orgánica de acuerdo con la literatura (6,7,9,10), y considerando los límites de toxicidad del 4% logrados en el cuadro 6, es posible obtener el cuadro 7, que describe los ámbitos de valores de toxicidad de la fracción orgánica del líquido piroleñoso frente a varios hongos pudridores de la madera.

Los valores de toxicidad en este estudio se realizaron en términos de mililitros del piroleñoso total, que se convierte en mililitros de fracción orgánica, por mililitros de medio. Los valores que aparecen en la literatura están expresados así: 0,08, 0,16% gramos de fase orgánica por 100 mililitros de medio (0,1-0,75% gramos de fase orgánica por 100 gramos de medio (7)).

Comparando directamente los resultados arriba mencionados, tal y como lo hacen otros autores, es posible afirmar con base en estos experimentos *in vitro*, que el líquido piroleñoso empleado en este estudio presenta un nivel de toxicidad adecuado frente a los hongos de prueba.

Obviamente, después de esta prueba preliminar, deben realizarse experimentos *in vivo*, dado que, como se verá en la sección siguiente, no es posible en este estudio obtener resultados

Cuadro 7
Valores tóxicos del líquido piroleñoso calculados como mililitros de la fracción orgánica por 100 ml del medio de cultivo

PRESERVANTES	VALORES DE TOXICIDAD FRENTE AL HONGO (%)		
	<i>Cariolopsis Polizona</i>	<i>Fomitella supina</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
Fraccción orgánica del líquido piroleñoso (40-65% del L.P.T.)	0,01-0,02	0,01-0,02	0,02-0,03

L.P.T. = líquido piroleñoso total.

... aceptables. Además, es necesario realizar experimentos del tipo censo de estacas, que permitan corroborar esta toxicidad preliminar encontrada.

Por otro lado, deben realizarse estudios de capacidad de impregnación de diferentes maderas, con el propósito de determinar si absorberán de un 3 a un 4% de líquido piroleñoso total.

Resultados y discusión de los experimentos con maderas o pruebas *in vivo*

Como se mencionó en la sección de métodos 2.2.2.2, el período de exposición de los bloques de madera a los hongos pudridores originalmente planeado era de dieciséis semanas. Sin embargo, a la altura de la sexta semana se presentó un problema de contaminación total en los frascos de vidrio de los bloques de prueba, que desembocó en la pérdida de gran cantidad de frascos.

Específicamente los frascos que contenían madera tratada con líquido piroleñoso y expuestos a los hongos *Trametes villosa* y *Pycnoporus sanguineus* por un período de diez semanas, debieron ser descartados ya que hubo una contaminación excesiva causada por otros hongos y bacterias que eliminaron al hongo en estudio. Además, se descartaron todas las botellas que contenían maderas no tratadas y tratadas con líquido piroleñoso y con creosota (que se empleó también como sistema de conservación), expuestas al hongo *Coriophorus polizona*. Lo anterior debido a que a la altura de la cuarta semana de exposición, los organismos contaminantes eran abundantes y se cree que las bacterias eliminaron al *Coriophorus polizona*.

Debido a problemas de contaminación del hongo *Trametes villosa* y a pesar de que se inocularon al menos cincuenta frascos, fue prácticamente imposible obtener frascos inoculados sin contaminación, por lo que este hongo no se incluyó en los experimentos *in vivo*. Tampoco se incluyó el *Laetiporus sulphureus*, pues no fue posible obtenerlo puro después de su contaminación.

Después de la contaminación generalizada de los hongos aislados en este estudio, se hizo un intento más de aislarlos, llevándolos de nuevo a la Universidad de Costa Rica, esta vez al laboratorio de Microbiología. Después de múltiples pruebas con diferentes metodologías de purificación, no fue posible purificarlos. En este punto procedía o bien iniciar el proceso total de colecta, identificación y aislamiento de los hongos, lo cual no era factible, o bien obtener los hongos de algún centro internacional especializado y reconocido. Se realizaron gestiones en ese sentido; sin embargo, tanto los costos como el tiempo necesario para traer los hongos, hicieron imposible tal opción.

Cuando estos hongos fueron llevados de nuevo a la Universidad de Costa Rica para su purificación, ya se disponía de una retorta de laboratorio que permitió obtener líquido piroleñoso fresco a partir de la carbonización de roble. Se realizaron entonces pruebas preliminares de cultivos *in vitro* para evaluar la eficiencia fungicida del líquido piroleñoso fresco. Estas pruebas no cuantificaron los niveles de toxicidad y, además, los hongos nunca estuvieron completamente puros; sin embargo, parecen indicar un mayor nivel de toxicidad del líquido piroleñoso fresco.

Resultados y discusión de la evaluación de la eficiencia antitermítica del líquido piroleñoso

De acuerdo con la literatura (7,20) y con el estándar empleado (21), la eficiencia antitermítica o termicida fue evaluada con un sistema cualitativo (EN 118) que emplea el siguiente sistema de clasificación:

0: no hay ataque. Ningún desgaste

1: Intento de ataque. Desgaste superficial

2: Ataque ligero. Desgaste moderado

3: Ataque medio. Desgaste acentuado

4: Ataque fuerte. Desgaste profundo

En el cuadro 8 se describe cualitativamente el ataque observado en la madera sin preservar y preservada, para cada una de las seis muestras empleadas en cada caso. Además, se clasifica cada una de las muestras, de acuerdo con la escala anterior.

Además, al final del experimento se determinó el número de termitas muertas en cada sistema, y se obtuvo un promedio del 59,2% en el caso de madera preservada con líquido piroleñoso y un 42,3% en el caso de madera sin preservar. De acuerdo con el ASTM (19) un ámbito del 34 al 66% de individuos muertos corresponde a un nivel de ataque moderado.

Los túneles o agujeros que penetran las piezas de madera indican vigor de los insectos. Estos túneles se presentaron en mayor grado en la madera sin tratar y en menor grado en la madera tratada con líquido piroleñoso, especialmente en las zonas de baja pene-

tración del preservante. A este caso se le denomina "posición mayoritaria de las termitas", y sugiere una respuesta de los insectos a un efecto anagónico, como por ejemplo la repelencia a un preservante (19).

Conclusiones

Con respecto a la eficiencia fungicida del líquido piroleñoso, las pruebas microbiológicas en cajas de petri o experimentos *in vitro*, demostraron su toxicidad frente a los hongos pudridores de madera *Corioloopsis polizona*, *Fomitella supina*, *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes villosa*.

Los valores límites de toxicidad fueron del 3% volumen de preservante en líquido piroleñoso por volumen de medio, frente a los hongos *Corioloopsis polizona* y *Fomitella supina*; y fueron del 4% volumen de preservante en líquido piroleñoso, por volumen de medio frente a los hongos *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes villosa*. Estos valores de toxicidad una vez convertidos en su equivalente de contenido de fracción orgánica, coinciden con valores de toxicidad adecuada, encontrados en la literatura.

Desafortunadamente la toxicidad contradicha por medio de las pruebas *in vitro*, no pudo ser corroborada por medio de experimentos con madera en pruebas *in vivo*, debido a un serio problema de contaminación que no se pudo resolver.

Respecto de la eficiencia antitermítica, los experimentos realizados demostraron que el líquido piroleñoso protege la madera del ataque de termitas en forma regular.

Cuadro 8.
Descripción cualitativa y clasificación cuantitativa del ataque por termitas en madera sin preservar y en madera preservada con líquido pireleñoso

MUESTRA	DAÑO SUPERFICIAL	DAÑO INTERNO	VALOR ESTIMADO DEL ATAQUE (EN-18)
1	Se observa el inicio de un canal que no llega a ser profundo	Presenta ataque severo con un agujero mediano que no atraviesa la probeta	3,5
2	Severo. Se observa una superficie áspera y agujeros pequeños, que no llegan a ser profundos. Lo anterior aparece en las dos probetas.	Se presenta el mismo patrón del daño superficial, con asperezas y canales medianos, que no atraviesan la probeta	3,5
3	Severo. Agujeros alargados longitudinales, medianos y superficie áspera en una probeta. En la otra probeta el ataque es leve y solo hay dos agujeros muy pequeños.	Se presenta el mismo patrón del daño superficial, con asperezas y canales medianos, que no atraviesan la probeta	3,5
4	Severo. Ataque concentrado en una de las probetas. Superficie bastante áspera e irregular, presenta dos agujeros pequeños.	Debajo de los agujeros, aparecen agujeros medianos y pequeños, en general hay un deterioro intermedio de la probeta.	3,5
6	Severo. Especialmente en una de las probetas, presenta dos agujeros pequeños y dos canales superficiales medianos, uno de los agujeros atraviesa la probeta.	Presenta dos agujeros pequeños y un canal mediano que se inicia en uno de los agujeros pequeños, pero el ataque no es severo	3,5
8	Severo. Ataque en ambas probetas, superficie irregular. Una de las probetas presenta un agujero pequeño pero que atraviesa la probeta. La otra probeta tiene dos agujeros pequeños, uno profundo y el otro superficial.	No se presenta daño severo, con excepción de un agujero mediano producido bajo el agujero superficial	3,5
7	Desgaste concentrado a lo largo del eje longitudinal. No hay desgaste superficial áspero. Presencia de agujero grande.	Formación de cuatro agujeros pequeños y medianos concentrados en la zona de baja absorción del preservante. El ataque atraviesa la probeta.	2,5
8	Ataque concentrado en una de las probetas con dos agujeros superficiales medianos en ella.	A lo largo de los anteriores agujeros se observan grandes canales longitudinales	3,0
9	Se presenta mayor ataque en una de las probetas, hay un agujero grande y profundo y dos pequeños. El agujero grande no atraviesa la probeta, uno de los pequeños sí la atraviesa, el otro no.	El agujero grande provocó canales internos longitudinalmente grandes y el ataque es mayor donde hay escasa penetración del preservante. Bajo el agujero pequeño que atraviesa la probeta existe daño severo	2,5
10	Únicamente en una de las probetas existe un agujero ancho, grande y profundo, pero no alcanza a atravesar la probeta totalmente.	Se observan dos agujeros pequeños por debajo del agujero grande superficial. Además, se originan cuatro agujeros que no atraviesan la probeta, van longitudinalmente	3,0
11	Se concentra en una de las probetas. Hay dos agujeros, uno mediano y ancho. No atraviesan la probeta.	Por debajo del agujero ancho se producen tres agujeros acanalados en dirección longitudinal, donde casi no se absorbió preservante	2,5
12	En una de las probetas hay un agujero acanalado longitudinal y mediano. En la otra probeta hay un agujero muy pequeño.	En la probeta con el agujero mediano se observa internamente un agujero acanalado longitudinalmente grande, en la zona donde hubo poca penetración del preservante. En la probeta con el agujero pequeño se produce un agujero grande en la misma zona de baja penetración	2,5

Las muestras 1-6 corresponden a madera sin preservar y 7-12 corresponden a muestras preservadas con el líquido pireleñoso.

Bibliografía

1. "The Chemistry of Wood". Edited by Browning, B.L. Interscience Publishers, 1963.
2. Carranza, J.; Sáenz, J.A. Wood Decay Fungi of Costa Rica. "Mycotaxon" 19, 1984.
3. Wood Handbook: Wood as an Engineering Material. "Wood Preservation" USDA Agriculture Handbook N° 72, 1974.
4. Taylor, J.A. "Wood Preservation in Latin America". American Wood Preservers Association, 1977.
5. Gjovik, L.R.; Micklewright, J.T. "Wood Preservation: How important is the Wood Treating Industry". Southern Lumberman, December 1982.
6. Findlay, W.P.K. "Wood Tar as a Preservative for Timber". Empire Forestry Journal 22, pp. 151-153, 1943.
7. Schwartz, R.; Deon, G. "The Use of the By-Products of Wood Pyrolysis in Wood Preservation". International Symposium on Wood and Pulping chemistry, Paris 1987.
8. Villeneuve, F.; Huard, T.; Essayegh, M.; Desbene, P.L. "Stabilisation et Utilisation des Huiles Pyrolytiques". 4th European Conference Biomass for Energy and Industry, Orleans (France), 1987.
9. Santona, M.C., Assumpção, R.M.V. "Pirolise de Madeiras Matérias Primas, Productos, Aplicações". IPT, Publicação 940. São Paulo. 1971.
10. Doat, J.; Petroff, G. "La Carbonisation des Bois Tropicaux: Essais de laboratoire et Perspectives Industrielles". Revue Bois et forêts des Tropiques, N° 159. Janvier-Fevrier, 1975.
11. Petroff, G.; Doat, J. "Pyrolyse des Bois Tropicaux. Influence de la composition chimique des Bois sur les Produits de Distillation". Revue Bois et Forêts Tropiques, N° 177, Janvier-Fevrier, 1978.
12. Vergnet, A.M.; Villeneuve, F. "Techniques Analytiques Applicables aux Liquides et Gaz de Pyrolyse de la Biomasse Tropicale". Revue Bois et Forêts Tropiques, N° 205, 3 trimestre, 1984.
13. De Castro, P.F.; Petrocchi Correia, L.D.; Da Silva Franco, W. "Obtenção do Açúcar Vegetal em Fornos de Aquecimento e sua Utilização como Combustível". ABM-Río de Janeiro, Vol. 2. 1982.
15. Nobles, K.M. "Studies in Forest Pathology IV. Identification of Cultures of Wood-Rotting Fungi". Canadian Journal of Botany 26:281-431, 1945.
16. Stalpers, J.A. "Identification of Wood Inhabiting Aphylophorales in Pure Cultures". Studies in Mycology, Central Bureau. Ver Schimmelcultuur Baarn Orlando. 248 pp. 1978.
17. Gilbertson, R.L. y Ryvarden, L. "North American Polypores". Fungi Flora 2. Wrightoporia. Gronlands Gravel A/S. Oslo, Norway. 438-885 p. 1987.
18. Tsao, P.H. "Selective media for Isolation of Pathogenic Fungi". Ann. Phytopathol. 8:157-159. 1970.
19. Instituto de Pesquisas Tecnológicas "Ensayo Acelerado de la Resistencia Natural de Madera Preservada al Ataque de Termitas del Género *Cryptotermes* (FAM KALOTERMIDAE) (método desarrollado y utilizado por la división de maderas del IPT)". Publicación 1157 Parte D D2.19.
20. Russell, P. "A Selective Medium for Isolation of Basidiomycetes". New Phytologist 177:1038-1039. 1956.
21. Schwartz, R.; Wone, S.N. "Les Goudrons Pyrolytiques Dans la Préservation du Bois". Revue Bois et Forêts Tropiques, N° 212, 2° trimestre, 1978.