

The page features a decorative design with several overlapping circles in shades of blue and teal, and thin white lines that create a sense of movement and depth. The circles are arranged in a way that suggests a path or a sequence of steps.

TESIS DE DIPLOMA

Control del biodeterioro fúngico en documentos con soporte de papel

Autora: Jessika Rivero Acosta
Tutora: Dr.C. Daymí I. Carrazana García

2014

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología



TESIS DE DIPLOMA

Control del biodeterioro fúngico en documentos con soporte de papel

Autora: Jessika Rivero Acosta

Tutora: Dr.C. Daymí I. Carrazana García. (Departamento de Farmacia,
Facultad de Química-Farmacia, UCLV. daymic@uclv.edu.cu)

He aceptado los miedos como parte de la vida, especialmente el miedo al cambio... he seguido adelante a pesar de que mi corazón retumbe diciendo:
vuelve atrás.

Erica Jong

Incluso aunque estés en el camino correcto pueden atropellarte si simplemente
te quedas ahí.

Wild Rogers

A mi abuela, a mi mamá, y a mi papá.

Agradecimientos

A mis padres que son mi más valioso tesoro y que siempre me han sabido indicar el camino para triunfar. Sin ellos jamás hubiera podido realizar mi sueño, ser bióloga, tener una carrera profesional.

A mi abuela, a la cual amo con todo mi corazón y siempre ha estado ahí cuando más lo necesito, a ella le debo por siempre, porque se ha sacrificado toda su vida por mí sin miedo a nada, por ser ejemplo de mujer, mamá, abuela.

A mi abuelo Acosta por ser como mi otro papá.

A mis abuelos, Rivero y mima que siempre me inculcaron humildad, respeto y valentía, me siento afortunada por tener conmigo a mis cuatro abuelos.

A mi tutora Daymí por ser ejemplo de profesora, mujer, mamá, no puedo cuantificar todo lo que me ha enseñado. Por ser paciente, humilde, exigente. Por ayudarme tanto y tanto a cumplir mi sueño, si volviera a nacer, volvería a estudiar biología y ya tendría tutora..... Me llevo en mi corazón muy buenos recuerdos y muchas lecciones. Gracias y mil gracias por ser tan dedicada a tu profesión y tus alumnos.

A Jennifer y Edgar, que desde el primer momento fueron incondicionales, por compartir tan buenos y malos momentos juntos, por ser familia. Hace cinco años comencé ansiosa de ganar mi título, hoy me voy con él y dos grandes amigos para toda la vida. A sus padres por ser tan buenas familias.

A Kire por ser tan fiel amiga, por estar en los buenos momentos y los malos, por sus consejos, por ser mi hermana.

A mi hermano Andrés Luis, que amo con mi corazón.

A mi tía Alina por ser tan buena consejera, ser mi amiga y siempre ayudarme en todo. A mi tía Mabel por ser tan maternal, ser ejemplo del éxito, buenos principios y estar siempre pendiente. A mi tía Sandra por ser ejemplo de valentía, estar ahí siempre para mí.

Agradecimientos

A todos mis amigos....

A Cupull, que me ayudó a poder realizar mis experimentos, por brindarme su tan sincera ayuda, a Yeni, a Mikaela que fue de gran ayuda y tan servicial, a todos los trabajadores del Centro de Bioactivos Químicos que de algún modo me ayudaron, me llevo la mejor de las opiniones de ustedes, a Leyanis, a Benancio, a Duniesky, y a todos los profesores del Departamento de Farmacia que aportaron ayuda, por ser tan profesionales, amigables, respetuosos. A los profesores del Laboratorio de Biología y el departamento de Biología, a todos los que me ayudaron de una forma u otra para realizar mi tesis.

El deterioro de los libros a causa de los hongos es un grave problema al que debe enfrentarse el conservador-restaurador de bienes con valor cultural. En Cuba hay poca disponibilidad de productos para el control químico del biodeterioro fúngico en documentos con soportes de papel, por lo que si se demuestra la efectividad de la aplicación de productos químicos contra estos organismos, así como su inocuidad sobre el papel, se poseerán alternativas para el control del biodeterioro por esta causa. Para esto se evaluó el crecimiento fúngico de dos géneros con capacidad celulolítica demostrada sobre papel previamente tratado con dos sales de amonio cuaternario y un extracto vegetal y la eficacia de los productos en el tratamiento del papel contaminado. Se determinó la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) de los productos seleccionados por su efectividad, frente a ambos géneros. Por último se determinó el efecto de los productos en las propiedades del papel mediante el índice de cobre, determinación del pH y el efecto sobre las tintas como elemento sustentado, tanto para papel sin envejecer como para papel envejecido (bond y periódico). El cetrimide al 0,25% y el extracto acuoso de hojas de *Terminalia catappa* L. al 50% no inhiben el crecimiento fúngico de *Aspergillus* sp (L6) y *Penicillium* sp. (L19b) sobre papel previamente tratado; el primer producto al 0,5% es tan efectivo con tal fin como la sustancia de referencia (cloruro de benzalconio al 0,5%). Solamente el cetrimide al 0,5% fue efectivo en el tratamiento del papel contaminado con *Aspergillus* sp (L6); existe una mayor dificultad en el control de *Penicillium* sp. (L19b). Los bajos valores de la MCI (0,2% para el benzalconio y menor que 0,1% para el cetrimide, frente los aislados fúngicos), fundamenta la efectividad de ambos productos en el control de las especies fúngicas. La adición de cetrimide al 0,5% no afecta la calidad del papel bond y periódico envejecido a los 25, 50 y 75 años, atendiendo a: los valores de índice de cobre y pH, ni los sustentados de tintas china y estilográfica. El papel bond se afecta más con la adición de los productos que el papel periódico. La adición de cetrimide (0,5%) es más favorable que la de la (cloruro de benzalconio al 0,5%). Todos los valores de pH del papel se presentan dentro del límite considerado estable o recomendable. Por lo que la adición de los productos no afecta al papel en este aspecto.

Palabras claves: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Terminalia Catappa* L., cetrimide, cloruro de benzalconio.

The deterioration of the books due the mushrooms is a serious problem to which should face the restaurateur. In Cuba there is not available a lot of products for the chemical control of the fungi biodeterioro in documents with paper supports, if demonstrated the effectiveness of the application of chemical products against these organisms, as well as its inocuidad, alternatives will be possessed for the control of the biodeterioro by this cause. For this fungi growth of two strains was evaluated with capacity celulolitic demonstrated on paper previously treaty with two salts of quaternary ammonium and a vegetable extract. The effectiveness of the products in the treatment of the polluted paper was also evaluated. Lastly the effect of the products was determined in the properties of the paper by means of the copper index, determination of the pH and the effect on the inks like sustained element, so much stops paper without aging like it stops aged paper (bond and newspaper). The cetrimide to 0,25% and the watery extract of leaves of *Terminalia cattapa* L. to 50% doesn't inhibit the growth fúngico of *Aspergillus* sp (L6) and *Penicillium* sp. (L19b) it has more than enough paper previously treaty; the first product to 0,5% is as effective with such an end as the reference substance (benzalconio chloride to 0,5%). Only the cetrimide to 0,5% was effective in the treatment of the polluted paper with *Aspergillus* sp (L6); a bigger difficulty exists in the control of *Penicillium* sp. (L19b). The first floor values of the Minimum Concentration Inhibitoria bases the effectiveness of the benzalconio chloride and the cetrimide in the control of the species fúngicas biodeteriorantes study object. The cetrimide addition to 0,5% doesn't affect the quality of the paper bond and aged newspaper to the 25, 50 and 75 years of aging, assisting to: the values of copper index and pH, neither those sustained of Chinese inks and stylographic. The paper bond is of better quality that the newspaper, although there are not big differences among these. The aging process didn't affect to the paper. The paper bond is affected more with the addition of the products that the periodic paper. The cetrimide addition (0,5%) it is more favorable than that of the reference substance (benzalconio chloride to 0,5%). All the pH values are presented inside the stable and advisable considered limit. For that that neither the quick aging neither the addition of the products affect to the paper in this aspect.

Key words: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Terminalia Catappa* L., Made up of quaternary ammonium

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Deterioro microbiológico del papel	3
2.2	Uso de desinfectantes para la eliminación de microorganismos en documentos con soporte de papel	7
2.2.1	Modo de acción de los agentes antimicrobianos	8
2.2.2	Métodos de control con productos tóxicos habitualmente aplicados a objetos históricos	9
2.2.3	Métodos de control con productos no tóxicos	11
2.2.4	Desinfectantes evaluados en el estudio	13
2.2.4.1	Cloruro de benzalconio	14
2.2.4.2	Cetrimide	14
2.2.4.3	Extracto vegetal de <i>Terminalia catappa</i> L.	15
2.3	Papeles y tintas empleados en el estudio	16
2.3.1	Papel bond	16
2.3.2	Papel periódico	16
2.3.3	Tintas	16
3	MATERIALES Y MÉTODOS	18

3.1	Pruebas microbiológicas	18
3.1.1	Evaluación del crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con los productos	18
3.1.2	Evaluación de la eficacia de los productos en el tratamiento del papel contaminado	21
3.1.3	Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria	22
3.2	Pruebas fisicoquímicas para el soporte	24
3.2.1	Determinación del índice de cobre	25
3.2.2	Evaluación de la reducción del pH del papel	27
3.2.3	Efecto sobre las tintas	27
4	RESULTADOS	28
4.1	Pruebas microbiológicas	28
4.1.1	Evaluación del crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con los productos	28
4.1.2	Evaluación de la eficacia de los productos en el tratamiento del papel contaminado	29
4.1.3	Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria	30
4.2	Pruebas físico-químicas para el soporte	30

4.2.1	Determinación del índice de cobre	30
4.2.2	Evaluación de la reducción del pH del papel	32
4.2.3	Efecto sobre las tintas	33
5	DISCUSIÓN	36
5.1	Pruebas microbiológicas	36
5.1.1	Evaluación del crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con los productos	36
5.1.2	Evaluación de la eficacia de los productos en el tratamiento del papel contaminado	38
5.1.3	Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria	39
5.2	Pruebas físico-químicas para el soporte	40
5.2.1	Determinación del índice de cobre	40
5.2.2	Evaluación de la reducción del pH del papel	42
6	CONCLUSIONES	45
7	RECOMENDACIONES	46
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
	ANEXOS	

1. Introducción

Una de las causas de degradación e incluso destrucción de libros en Bibliotecas y Archivos es la acción de los agentes bióticos, entendiéndose como a tales a los microorganismos (hongos filamentosos, levaduras y bacterias), insectos y roedores. Las alteraciones ocasionadas por los factores biológicos se conoce con el nombre de biodeterioro. La intensidad del deterioro está en función de la composición del material, de las condiciones ambientales y el microorganismo asociado (Capitelli y Sorlini, 2010).

El deterioro de los libros a causa de los hongos es un grave problema al que debe enfrentarse el conservador-restaurador (Vergara, 2002). Afecta no sólo la estética de los bienes patrimoniales, sino también puede producir la degradación de los mismos, lo que provoca pérdidas materiales y económicas insalvables (Capitelli y Sorlini 2010).

Los trabajadores de las Bibliotecas y Archivos poseen la responsabilidad de salvaguardar para las generaciones futuras, la memoria gráfica de la nación, de allí la importancia de su protección y preservación (Capitelli y Sorlini 2010).

Por otra parte muchos microorganismos que causan biodeterioro en documentos de papel causan daños a la salud humana. *Aspergillus* spp., es uno de los hongos de mayor interés clínico pues posee especies que son capaces de provocar una gran cantidad de afectaciones a las personas tales como alergias de Tipo I (hipersensibilidad inmediata o rinitis alérgica seguida de ataques de asma), sinusitis, otitis, keratitis y pueden ocasionar hasta aspergilosis severas (Flórez y Russi, 2000).

Las sustancias químicas que tradicionalmente se han utilizado como antimicrobianos para la prevención del biodeterioro en el patrimonio cultural, son en general tóxicas para el medioambiente y la salud humana y provocan cambios en el material en que se las aplican (Flórez y Russi, 2000).

En Cuba, muchas Bibliotecas y Archivos cuentan solamente con etanol y en muchas ocasiones este resulta inefectivo.

Los compuestos de amonio cuaternario (QAS) representan una familia de compuestos antimicrobianos, considerados como agentes activos catiónicos

potentes por su actividad desinfectante, ya que son activos frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos y virus (Buffet-Bataillon *et al.*; 2011). Tienen como estructura básica al ión amonio (NH₄), la cual al ser modificada, su acción es atribuida a la inactivación de enzimas, desnaturalización de proteínas esenciales y la rotura de la membrana celular.

La aplicación de productos obtenidos de plantas (extractos vegetales) y productos químicos de baja toxicidad (compuestos de amonio cuaternario) en el control de microorganismos que participan en el biodeterioro del patrimonio cultural, se presenta como una solución viable que muestra ventajas desde el punto de vista económico y medioambiental y resulta ser una salida ecológica que propicia la disminución del uso de sustancias químicas tóxicas y contaminantes para el medioambiente.

En Cuba hay poca disponibilidad de productos para el control químico del biodeterioro fúngico en documentos con soportes de papel, por lo que si se demuestra la efectividad de la aplicación de productos químicos contra estos organismos, así como su inocuidad, se poseerán alternativas de control químico del biodeterioro por esta causa.

El objetivo general de este trabajo es evaluar alternativas para el control químico del biodeterioro fúngico en documentos con soporte de papel.

Para lograrlo se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con una sal de amonio cuaternario y un extracto vegetal.
2. Evaluar la eficacia de los productos en el tratamiento del papel contaminado.
3. Determinar el efecto de los productos en las propiedades del papel.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Deterioro microbiológico del papel

Cuando el biodeterioro es provocado por microorganismos se denomina microbiodeterioro (Borrego, 2009b; Villalba y Malagón, 2011).

El medio ambiente juega un papel decisivo en el tipo y la extensión del deterioro de los materiales estructurales. La polución natural y antropogénica son muchas veces coadyuvantes de los procesos de biodeterioro, lo que crea condiciones propicias para que los microorganismos logren colonizar los soportes y de este modo empezar a tomar como fuente de alimento los componentes básicos del papel, ya que por ser orgánicos, le pueden brindar todos los nutrientes necesarios como fuente de carbono para que proliferen y alteren la documentación (CYTED, 2002).

Los daños ocasionados por una infección fúngica son casi siempre irreversibles y sólo se puede conseguir detener su acción y paliar algunos de sus efectos.

Los hongos producen tres tipos de alteraciones en los soportes celulósicos: químicos, mecánicos y cromáticos.

Las alteraciones químicas se deben a que los microorganismos liberan sustancias capaces de alterar químicamente la celulosa, transformándola y degradándola, modificando de esta manera las propiedades del papel. Estas se subdividen en asimiladoras y desasimiladoras (Ciferri, 1999; Martínez, 2003; Borrego *et al.*, 2011). La primera consiste en la utilización de los materiales de las obras como fuente de carbono o de energía y la segunda ocurre por excreción o secreción de productos de desecho del metabolismo, entre los que se encuentran ácidos orgánicos como ácido cítrico, ácido fumárico, ácido láctico, etc., que bajan el pH de los soportes considerablemente acidificándolos (Martínez, 2003).

Los procesos químicos que producen deterioro son: descomposición por sustancias ácidas, por sustancias básicas, degradación por enzimas y emisión de pigmentos, los que provocan cambio de coloración y un aspecto poroso y fragmentado del papel (Ciferri, 1999; Martínez, 2003; Borrego *et al.*, 2011).

Entre las sustancias que los producen podemos destacar enzimas glucosídicas y ácidos orgánicos. Los hongos celulósicos, mediante enzimas glucosídicas,

destruyen los puentes de oxígeno que unen las moléculas que forman la cadena de celulosa llegando a formar celobiosa (polisacárido formado por dos moléculas de glucosa). Este compuesto es degradado, a su vez, por otras enzimas glucosídicas que separan las moléculas de glucosa consiguiendo así el principal nutriente de los hongos (Capitelli y Sorlini 2010).

Estas enzimas y otras producidas por las especies fúngicas que han sido aisladas de documentos (glucanasas, lacasas, fenolasas, queratinasas, mono-oxigenasas etc.), así como los ácidos excretados por los hongos filamentosos (oxálico, fumárico, succínico, acético etc.) y compuestos orgánicos volátiles, pueden ocasionar alteraciones del soporte. Entre estas las más frecuentes son: manchas de diferentes colores y tonalidades, decoloración, acidificación y degradación física. Además los hongos pueden producir pigmentos que también modifican las características químicas y físicas del papel (Cappitelli *et al.* 2010; Sterflinger 2010).

Las alteraciones mecánicas se producen en el papel cuando el micelio de los hongos se introduce entre las fibras celulósicas. Este puede llegar a expandirse por el soporte celulósico hasta destruirlo en su totalidad, rompiendo todas las fibras. El resultado es un papel frágil, debilitado y de aspecto algodonoso. Las especies implicadas principalmente en modificar las propiedades mecánicas del papel, pertenecen a los géneros *Chaetomium*, *Trichoderma* y *Stachybotrys* (Caneva, 1991).

Por último la degradación más visible del papel atacado por hongos se constata por la formación de manchas de diversos colores (rojo, violeta, amarillo-marrón, negro, etc.) que pueden observarse en el soporte. Una alteración cromática particular es el llamado Foxing, que tiene como característica la formación de manchas rojizas y oscuras, de dimensiones variables, que se desarrollan en ciertos papeles de una forma muy localizada. El color de las manchas en el soporte celulósico provocadas por microorganismos no permite identificar qué tipo de hongo lo provoca. Esto es debido a que el pigmento de cada especie fúngica toma una coloración y una intensidad diferente dependiendo de las particularidades del papel que alteren. Entre las propiedades del soporte

celulósico que intervienen en las distintas tonalidades está el pH, la presencia de colas (almidón o gelatinas), existencia de metales, etc. Asimismo influye, el tiempo de persistencia de la infección fúngica y la coexistencia de varios microorganismos (Gallo, 1985). El proceso que provoca dichas alteraciones cromáticas se relaciona con la presencia de hongos con micelio pigmentado y con la liberación de pigmentos sobre el sustratos, fundamentalmente (Caneva, 1991). La coloración de las manchas producidas por los hongos también depende de las materias primas utilizadas en la manufactura del papel. Entre éstas encontramos impurezas metálicas de la pasta, aditivos como colas, almidón o gelatinas y fijadores, un pH de la pasta entre 4,8-5,6 (pH óptimo para el desarrollo fúngico).

Estas sustancias pueden haberse introducido en la pasta de papel en el momento de su fabricación o posteriormente, al realizarse un reapresto. Por otro lado, el proceso químico utilizado en la manufactura del papel y las condiciones medioambientales en las que se ha producido la infección pueden provocar ciertas pigmentaciones en el soporte celulósico (Maynor, 1998).

Cuando los hongos se establecen sobre un papel, se inician una serie de etapas en las que los microorganismos degradan el soporte celulósico. Esta serie de fases empiezan con la constatación de unas simples manchas de humedad en el papel. La manifestación visible del crecimiento de los hongos sobre el papel es la aparición de manchas las cuales por lo general exceden el diámetro de la colonia del hongo. También pueden aparecer áreas de enmohecido sin manchas, y en ocasiones solamente manchas perceptibles a la vista. Con el tiempo, el papel se vuelve débil y se perfora, de igual manera, se generan cambios de color y de resistencia mecánica (Maynor, 1998).

El desarrollo inicial de un microorganismo en un documento depende de las condiciones de higroscopicidad del material, de las características de la superficie y de las condiciones ambientales (Bach, 1998). La temperatura favorable para la mayor parte de las especies microbianas que atacan los materiales de archivo está comprendida entre los 20 y los 30°C (Lin y Li, 2000), aunque es oportuno decir que existen organismos que pueden soportar temperaturas superiores a los 30°C e inferiores a 0°C (Florian, 2004).

Los microorganismos que conforman la microbiota habitual del patrimonio documental necesitan para su desarrollo valores de humedad relativa superiores al 65% y un contenido de agua en los materiales entre 8-10% por encima de los valores normales (Florian, 2004; Karbowska-Berent, 2011). El contenido de humedad en un material es uno de los factores más importantes en el crecimiento microbiano que entre otros fenómenos determina la cantidad de agua presente para la germinación de las esporas microbianas. Muchas especies de hongos y bacterias comienzan su desarrollo en función del contenido de humedad sobre la superficie de un objeto. Asimismo, ha de tenerse en cuenta que los microorganismos durante su desarrollo producen agua metabólica, la cual incrementa el contenido en humedad de un material, favoreciendo a su vez la multiplicación celular (Vaillant *et al.*, 2004).

La contaminación antropogénica también induce procesos deteriorantes (Someillán *et al.*, 2006).

La luz en muchas especies es necesaria para la formación de las esporas y los conidióforos que son fototrópicos positivos (Conservaplan, 1998).

Los hongos que afectan al papel poseen esporas resistentes al calor y el desecamiento, por lo que se mantienen en estado de reposo hasta encontrar medios favorables para la germinación (Olivero, 2004).

Los hongos más comunes en ambientes interiores son los que se encuentran agrupados dentro de los géneros *Penicillium*, *Rhizopus* y *Cladosporium*. Los hongos patógenos como *Stachybotrys* se aíslan con menor frecuencia de los ambientes interiores (Kuhn, 2003). Se han reportado además otros géneros que aparecen con relativa frecuencias en ambientes interiores como: *Curvularia*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Mucor*, *Chrysonilia* (Gorny, 2004; Albuquerque *et al.*, 2006; Karbowska-Berent *et al.*, 2011), *Circinella* y *Geotrichum* (Medina, 2008).

Estos en su actividad contaminante ejercen un doble efecto negativo ya que por un lado producen daños al soporte documental y por otro afectan a la salud del personal que está en contacto con las colecciones (Gallup, 2006; Nevalainen y Morawska, 2009; Rojas *et al.*, 2002; Florian 2004; Borrego *et al.*, 2008, 2010).

2.2 Uso de desinfectantes para la eliminación de microorganismos en documentos con soporte de papel

Aunque se conocen muchas definiciones, la más acertada es la que expone la asociación Suiza de Microbiología que señala: “Desinfección es la adecuada eliminación de determinados microorganismos nocivos mediante actuación sobre su estructura o metabolismo, independientemente del estado funcional, con objeto de impedir su desarrollo” (Wildbrett, 2000).

El objetivo de la desinfección se logra con el uso de desinfectantes, que son productos biocidas (también conocidos como agentes antimicrobianos) que al contacto destruyen o inactivan microorganismos patógenos (Peña y Zambrano, 2003).

Un agente antimicrobiano es aquel que mata o inhibe el crecimiento de microorganismos. Este puede ser sintético o natural, los agentes que matan a los microorganismos suelen denominarse agentes microbicidas, con prefijo que indica el tipo de microorganismo que mata (Flórez y Russi, 2000).

En otra definición, los agentes antimicrobianos son sustancias capaces de inhibir la capacidad de multiplicación de los microorganismos (Aldana y Sarassa, 1999).

Las sustancias biocidas empleadas para la eliminación de microorganismos deben tener los siguientes requisitos: amplio espectro, rápida acción, ausencia de interferencia con el material constitutivo, baja toxicidad para la salud humana, bajo riesgo de contaminación ambiental, fácil de usar y debe ser un material estable (Flórez y Russi, 2000).

Para su uso en documentación de carácter histórico, debe tenerse en cuenta que muchos de los soportes por su constitución física y química pueden verse afectados en el momento de la aplicación de los desinfectantes. Un desinfectante ideal no debe dejar residuos nocivos en los objetos, no puede provocar afectaciones en las propiedades de los materiales constituyentes, ni acelerar las reacciones de la degradación con el tiempo, debe ser de rápida acción, de forma tal que en un tiempo breve la contaminación pueda ser eliminada; tener un elevado poder de penetración de manera que pueda llegar al interior del volumen del objeto, no provocar transformaciones en los materiales; no dejar remanentes

tóxicos y ser altamente económico (Peña y Zambrano, 2003; Flórez y Russi, 2000).

2.2.1 Modo de acción de los agentes antimicrobianos

Para la deseada reacción entre el agente antimicrobiano (desinfectante) y los microorganismos a combatir constituye un importante requisito el contacto entre ambos en el que se dé lugar al proceso de destrucción (Wildbrett, 2000).

Los agentes antimicrobianos pueden afectar las células en forma muy diversa. A concentraciones altas, algunos pueden precipitar proteínas, pueden romper la membrana celular o causar antagonismo químico al interferir con las reacciones enzimáticas o remover su grupo surfhidrilo libre (Aldana y Sarassa, 1999; Merlano y Rincón, 1999). Se encuentran como mecanismos de acción:

- Daño al ADN: cierto número de agentes antimicrobianos actúan dañando el ADN, entre éstos se incluyen las radiaciones ionizantes, la luz UV y los compuestos químicos que reaccionan con éste ácido, en la última categoría están los agentes alquilantes. Las lesiones al ADN son la destrucción de la célula por interferir en la replicación del ADN (Koneman, 2001).
- Desnaturalización de proteínas: se presenta cuando hay fragmentación de la estructura terciaria de la proteína efecto que puede ser producido por factores físicos o químicos (Aldana y Sarassa, 1999).
- Rompimiento de la membrana: o en su caso de la pared celular, la membrana celular actúa como una barrera selectiva, dejando pasar algunos solutos a través de ella y excluyendo otros, de tal forma que algunas sustancias que se encuentran en su superficie pueden alterar las propiedades físicas y químicas de la membrana impidiendo su función normal, matando e inhibiendo en esta forma la célula. La pared celular actúa como una estructura de sujeción, protegiendo a la célula de lisis osmótica. Así los agentes que destruyen la pared (lisozima) o impiden su síntesis normal, pueden traer consigo la lisis de la célula (Aldana y sarassa, 1999; Flórez y Russi, 2000; Wildbrett, 2000).

- Eliminación de grupos surfhidrilo libres: algunos agentes oxidantes interfieren en el metabolismo ligando grupos sulfhidrilos vecinos para dar uniones disulfuro, existen en las células muchas enzimas que contienen grupos sulfhidrilo, por consiguiente, los agentes oxidantes causan daño considerable (Wildbrett, 2000).

2.2.2 Métodos de control con productos tóxicos habitualmente aplicados a objetos históricos

Dentro de los métodos de desinfección y desinsectación de bienes culturales, se han venido aplicando numerosos procedimientos. El más común de ellos ha sido la fumigación en cámaras con óxido de etileno. Este producto, puede provocar reacciones químicas que inducen deterioros significativos. Puede reaccionar con los grupos sulfhidrilos, de las proteínas, y con los carbonilos e hidroxilos de las celulosas, ocasionando alteraciones de las estructuras de los polímeros. También reacciona con compuestos metálicos, especialmente con el cobre. Todo ello produce cambios en las propiedades físicas y químicas de los soportes tratados. Además, es un producto altamente tóxico. El timol es un producto más accesible que se ha venido utilizando habitualmente en forma cristalina como sólido sublimable. Varios estudios indican que no elimina las esporas de hongos ni las células bacterianas. Puede ocasionar alergias e irritación en las vías respiratorias. Se le atribuyen efectos cancerígenos (Valentín, 2003).

Otros químicos como el ortofenilfenol (OFF), tienen un amplio espectro como fungicida y bactericida. El OFF se ha utilizado ampliamente como biocida aplicado a bienes culturales. También se ha incorporado a productos de restauración, adhesivos sintéticos y colas animales. Puede despolimerizar algunos adhesivos. Deteriora los textiles y el papel produciendo cambios de color y envejecimiento de los materiales. No obstante, su toxicidad es menor que la de otros fungicidas incluyendo el pentaclorofenol. Es soluble en etanol. La sal sódica del ortofenilfenol es soluble en agua y presenta mayor grado de toxicidad que el ortofenilfenol (Valentín, 2003).

El formaldehído, se ha aplicado frecuentemente por nebulización, tiene un poder de penetración escaso. Tiene un efecto fungicida limitado y no tiene eficacia como insecticida. Es un buen fijativo del material celular, por ello se considera muy tóxico. Tiene efectos cancerígenos. Los tratamientos con formaldehído se aplican a alta humedad relativa para impedir que se polimerice y que pueda precipitar sobre los materiales tratados formando un depósito blanco. Un producto similar, el paraformaldhehido es un sólido sublimable utilizado como desinfectante. Se comercializa en pastillas de 1 gramo y se utilizan 3-5 g·m⁻³ aplicados en bolsas de plástico herméticamente cerradas y expuestas a una temperatura de 25°C aproximadamente. Con ello se favorece la sublimación. Tiene un factor de riesgo de toxicidad similar que el formaldehído. Los materiales proteicos tratados con formaldehído pierden flexibilidad. Por ello, nunca deben emplearse como desinfectante de pergaminos, cueros, pieles y sedas. Incrementa el proceso de corrosión de las tintas ferrogálicas. Es un corrosivo enérgico de los metales y de los vidrios (Valentín, 2003).

El pentaclorofenol, ha sido muy utilizado como fungicida de libros, textiles madera etc. Se ha comprobado que ataca los metales y consecuentemente los pigmentos. Degrada la celulosa del papel y de la madera. Es altamente tóxico por inhalación y por contacto con la piel, por lo que no está registrado como fungicida en muchos países. Se ha comprobado que una disolución de etanol-agua al 70% actúa como fungicida de muchos hongos celulósicos y proteicos (Valentín, 2003).

El etanol elimina los mohos por deshidratación. El carácter fungicida del producto es menor cuando se aplica etanol absoluto al 100%. Su efecto como bactericida no es muy amplio, por ello para aumentar su eficacia como microbicida y en caso de soportes muy contaminados, suele recomendarse preparar una disolución de etanol al 70% a la que se le incorpora 0,1% de ortofenilfenol. Este preparado se aplica por imprimación, pulverización o baño. Posiblemente sea el tratamiento más efectivo y menos tóxico de los químicos expuestos (Valentín, 2003).

Existen tratamientos de desinfección que utilizan antibióticos (penicilina, estreptomycin, actinomicina etc) y/o enzimas (lisozima, tripsina, etc.). Su mayor ventaja es que no son tóxicos. Su mayor inconveniente es que tienen un espectro

de acción muy pequeño, por lo que existen numerosas especies microbianas que no son eliminadas por estos productos (Valentín, 2003).

La fumigación se ha usado ampliamente en la erradicación de los hongos. De las cámaras de fumigación que se usan comúnmente, las más efectivas en la eliminación de los hongos son aquellas que poseen vacío, el vacío permite una mayor penetración del fumigante, por otra parte, es posible que tenga efectos adversos en las estructuras del hongo, al remover el oxígeno que el hongo requiere para su crecimiento y posiblemente produciendo una ruptura de las esporas. Sin embargo, las cámaras de vacío y su instalación son extremadamente caras. Los productos que se utilizan en la fumigación son altamente tóxicos (Forsythe y Hayes, 2002).

El óxido de etileno se desarrolló en 1859. A finales de la década de los treinta, el mismo se usaba comúnmente como producto de fumigación para los granos, y durante la década de los setenta se usaba ampliamente en museos, bibliotecas y archivos. Ballard y Baer desarrollaron un excelente estudio sobre la historia, uso, efectividad y peligros del óxido de etileno (Ballard y Baer, 1986). Algunos estudios sugieren que la fumigación con EtO altera la celulosa y la hace más propensa al crecimiento de hongos. Su uso se redujo mucho con las estrictas reglas de la EPA sobre la emisión de gases tóxicos. Además, se han documentado muchos estudios sobre la subsistencia del EtO en una gran variedad de materiales proteicos y plásticos por meses (KN). El EtO que retienen los tejidos grasos es muy tóxico para los humanos. Los museos de los Estados Unidos ha abandonado virtualmente su uso (Forsythe y Hayes, 2002).

2.2.3 Métodos de control con productos no tóxicos

Los compuestos de amonio cuaternario, conocidos como “cuaternarios”, “quats” y “QAC” con esencialmente sales de amonio con algunos o con todos los átomos de ión $(\text{NH}_4)^+$ sustituidos por grupos alquilo o arilo, el anión generalmente es un cloruro o bromuro (Forsythe y Hayes, 2002).

Las sales de amonio cuaternario se obtienen ordinariamente por alquilación de las aminas terciarias.

A partir del año 1935 se empezaron a realizar investigaciones sobre gran número de sales de amonio cuaternario respecto a sus propiedades germicidas y fungicidas. Entre éstas figuran gran variedad de compuestos alifáticos, aromáticos y heterocíclicos, todos estos tienen actividad de superficie (Kirk & Othmer, 1998).

La mayor parte de los compuestos de clase germicida, llamada detergentes catiónicos, son sales de amonio cuaternario. Su poder bactericida es alto contra bacterias Gram positivas e incluso muy fuerte con los microorganismos Gram negativos (Forsythe y Hayes, 2002). Los compuestos cuaternarios han demostrado ser efectivos como fungicidas y se les reconoce su poder contra algunos protozoos patógenos, los que mayor interés han despertado en los últimos años son los cloruros de benzalconio por su potencial poder antimicrobiano (Kirk & Othmer, 1998; Flórez y Russi, 2000).

Los QAC son caros, esto se debe a que cuentan con propiedades tales como: son poco afectados por la presencia de restos orgánicos, no son corrosivos, no son irritantes de la piel, salvo a grandes concentraciones. Además los QAC mantienen su actividad en un amplio rango de pH, aunque son más activos en condiciones alcalinas débiles, cayendo rápidamente su poder cuando el pH es menor a 5 (Forsythe y Hayes, 2002).

La combinación de propiedades como la actividad germicida, baja toxicidad, solubilidad, no corrosivo y la estabilidad, han dado a los compuestos cuaternarios muchas aplicaciones prácticas para el saneamiento y desinfección (Flórez y Russi, 2000; Peña y Zambrano, 2003).

La tecnología CSC Book Saver® permite el tratamiento (simultáneo de desacidificación y desinfección) de libros y documentos sin desencuadernar a un bajo coste de manera eficaz y sencilla en cualquier Archivo o Biblioteca con una capacidad superior a 250.000 libros al año (Mendo, 2001).

El proceso Book Saver® utiliza una máquina, donde se introducen los libros y documentos sin desencuadernar, y un reactivo, que neutraliza la acidez sin atacar las tintas (Mendo, 2001).

El Biocida CSC Book Saver® ha demostrado un amplio espectro antimicrobiano frente a bacterias y hongos que degradan el papel. En su composición se utilizan

exclusivamente productos de eficacia probada y utilizados habitualmente en el campo de la farmacia y de la cosmética, por su ausencia de toxicidad y su bajo impacto ambiental (Mendo, 2001). El proceso de desacidificación en masa CSC Book Saver® tiene un efecto desinfectante ya que durante el tratamiento se crea vacío en la cámara donde se tratan los libros para introducir posteriormente el agente vehiculante HFC 227. Este agente actúa también como desinfectante porque se deja actuar durante un periodo de tiempo suficiente para eliminar las larvas e insectos por falta de oxígeno (Mendo, 2001).

Una de las principales ventajas del proceso desinfectante de CSC Book Saver® es que durante el proceso se deja una dosis de biocida que evitará que en el futuro aparezcan nuevas infecciones (Mendo, 2001).

Desde la antigüedad se conoce la actividad antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales de plantas y en los últimos años, se ha renovado el interés de los científicos por el uso de estas sustancias naturales. Sin embargo, entre los muchos estudios realizados, sólo unos pocos mencionan su uso en el campo de la conservación de los bienes culturales (Chingduang *et al.*, 1995; Dhawan, 1995; Cheng *et al.*, 2003; Gatenaby y Townley, 2003; Rakotonirainy y Lavédrine, 2005; Guiamet *et al.*, 2006, 2008a, 2009, 2010; Stampella *et al.*, 2010).

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales se debe a la presencia de compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehidos, cetonas, etc. (Heisey y Gorman, 1992; Daferera *et al.*, 2000; Marriott *et al.*, 2001; Sartoratto *et al.*, 2004). Pueden actuar como reguladores del metabolismo intermedio, activar o bloquear reacciones enzimáticas, afectar directamente una síntesis enzimática o alterar estructuras de membranas (Singh & Shunkla, 1984).

2.2.4 Desinfectantes evaluados en el estudio

Para seleccionar el producto que se va a aplicar, es necesario conocer las fichas técnicas de las sustancias utilizadas para higienizar, ya que permiten conocer las características generales, las propiedades, el modo de acción, la clasificación toxicológica, las condiciones de uso, la concentración del producto, y su poder residual (Guerrero, 2003).

2.2.4.1 Cloruro de benzalconio

De acuerdo a la ficha técnica (ICSC: 1584, 2006), el cloruro de alquildimetilbencilamonio ($C_6H_5CH_2(CH_3)_2RCl$) es un desinfectante con base en sales de amonio cuaternario, agente activo catiónico de superficie, es rápido agente antiinfeccioso, la duración de su acción es moderadamente larga. Es activo contra bacterias, algunos virus, hongos y protozoos. A la dosis de empleo es incoloro e inodoro, es fácilmente soluble en agua, etanol y acetona, dando soluciones estables ante la luz, temperatura o largo tiempo de almacenamiento. Aumenta su actividad si se utiliza en un ambiente alcalino y con el incremento de la temperatura, por lo que se aconseja su empleo en caliente o nebulizado en vapor de agua.

Es un agente tensioactivo y emulsionante, propiedades muy importantes para acción desinfectante. Sus soluciones agitadas dan lugar a la formación de espuma, tendiendo el producto a ser fuertemente absorbido y a distribuirse sobre la superficie donde se aplica. Esta propiedad es muy útil en algunas aplicaciones, ya que forma en la superficie tratada una pátina de antiséptico que protege durante largo tiempo.

Aunque se desconoce con exactitud su acción microbicida, esta pudiera deberse a que provoca alteración enzimática o que, al desnaturalizar las proteínas de los microorganismos, cambia su estructura química. Abate la tensión superficial e incrementa la permeabilidad celular y produce lisis del contenido celular, además interfiere en los procesos metabólicos de las células.

2.2.4.2 Cetrimide

El bromuro de cetil-trimetil amonio ($(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br$) o cetrimide es un surfactante catiónico derivado del amonio cuaternario cuya actividad bactericida se ha demostrado frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como antifúngicas.

Se encuentra en forma natural como polvo cristalino y blanco.

Como cualquier otro surfactante forma micelas en solución acuosa. A 30 °C forma micelas con un número de agregación de 75-120 (según el método de determinación, normalmente con una media de ~95) y un grado de ionización α (carga fraccional) de 0,2 - 0,1 (de baja a alta concentración).

Otros compuestos relacionados químicamente son cloruro de cetil trimetil amonio y el estearato de cetil trimetil amonio.

Tiene la propiedad de precipitar ácidos y polisacáridos ácidos en soluciones de baja concentración iónica. Bajo estas condiciones las proteínas y los polisacáridos neutros permanecen en solución. En soluciones de alta concentración iónica el forma complejos con las proteínas y polisacáridos pero no precipita ácidos nucleicos. Por esta razón es especialmente útil para precipitar ADN genómico de organismos que producen grandes cantidades de polisacáridos como las plantas y algunas bacterias Gram negativas (incluyendo algunas cepas de *E. coli*).

2.2.4.3 Extracto vegetal de *Terminalia catappa* L.

El Almendro de la India (*Terminalia catappa* L.) posee un gran valor paisajístico, además, a partir de sus frutos se extraen algunos aceites de importancia en la cosmetología. Esta planta ha demostrado tener un potencial biológico valioso, sus hojas y corteza son ricas en taninos hidrolizables (Punicalina y Punicalagina) que tienen propiedades fungicidas y bactericidas importantes (Hernandez *et al.*, 2003), puede inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y controlan el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Babayi *et al.*, 2004). Por otro lado, fue reportado el extracto de la planta como inocuo a bajas concentraciones para *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* (Espinosa, 2004), sin embargo, este posee actividad inhibitoria sobre los antagonistas *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria basiana* y *Verticillium lecanii* (Akira *et al.*, 2006).

Este extracto provoca daños en las mitocondrias, debido a los flavonoides y taninos (Espinosa, 2012).

Los flavonoides se encuentran en el material vegetal en un 9,6% (en base a quercetina), los taninos están en mayor proporción en comparación con los

anteriores (13,9 %de ácido tánico) y provocaron inhibiciones elevadas sobre el desarrollo micelial de hongos fitopatógenos (Espinosa, 2012).

2.3 Papeles y tintas empleados en el estudio

2.3.1 Papel bond

Es el papel que normalmente se utiliza para mecanografiar, confeccionar cuadernos, libretas, blocks, papel tapiz, etc. Se fabrica en gramaje de $60 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, en blanco y colores amarillo, azul, verde y rosado, y en gramajes de $75 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ y $90 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ en blanco. Está constituido por diversas clases de celulosa, excluyendo la pasta mecánica, o exclusivamente con pastas blanqueadas o bien con mezclas de éstas. Su calidad va en aumento con el contenido de celulosa blanqueada (Alcalde, 1980; Peña y Zambrano, 2003).

2.3.2 Papel periódico

La composición del papel periódico se basa en pulpa química kraft semi-blanqueada, pulpa mecánica y sulfato de aluminio cuya proporción es de 16,84 y 1.5% respectivamente. Otros de sus componentes son lino (3%), bagazo de caña (17%), confiera (40%) y pino (40%), (Peña y Zambrano, 2003).

2.3.3 Tintas

La tinta es el elemento sustentado en un soporte, que sirve para trazar caracteres, signos, grafía o dibujos, en general es toda sustancia apta para escribir, imprimir o colorear según técnicas e instrumentos apropiados (Massy, 2000).

Casi todas las sustancias de escritura pueden dañar el papel sufriendo una coloración amarillenta, debido a la producción de ácido (hidrólisis) que ocurre tanto en medio ácido como en medio alcalino, producto de ello es el rompimiento de las cadenas de celulosa (Massy, 2000).

La hidrólisis alcalina toma lugar a una alta temperatura y con álcalis concentrados, pero si la molécula tiene grupos oxidados, la hidrólisis alcalina ocurre a bajas temperaturas, aún con álcalis diluidos. Otro factor importante es el deterioro

químico (Oxidación), puesto que al haber presencia de metales como hierro, cobre y cationes metálicos, se presenta degradación de la celulosa (Massy, 2000).

Además microorganismos como *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* pueden alterar las tintas decolorándolas debido a la acción de las enzimas producidas en su metabolismo (Martínez, 1999).

La tinta china se caracteriza por contener partes colorantes insolubles, con la particularidad que han sido agregados en un medio de solución, para evitar la precipitación del pigmento colorante y asegurar su fijación al papel (AIC, 1994).

Se puede aplicar normalmente sobre papel o seda, debido a que ambos tienen las cualidades requeridas para un secado fácil y una fijación normal. Es elaborado a partir de carbón vegetal, y entre más añeja mejor permite observar la variedad de matices (Beck, 1992).

Las tintas estilográficas son especialmente preparadas para usar en los lapiceros frecuentemente, se fabrican bajo distintas fórmulas, son tintas cuyo lubricante está compuesto de base de aceite, y son muy solubles en alcohol, que es un factor que puede usarse para atenuar o corregir pequeños errores (AIC, 1994).

3. Materiales y Métodos

3.1 Pruebas microbiológicas

3.1.1 Evaluación del crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con los productos

Para la realización de este experimento se utilizaron los resultados de una investigación previamente realizada, en la cual se evaluó la actividad deteriorante de ocho cepas de hongos filamentosos aisladas de alteraciones observadas en documentos con soporte de papel; específicamente dos libros clasificados como raros con valor patrimonial¹, pertenecientes a la colección de Fondos Raros y Valiosos de la Biblioteca Provincial “Martí” de Villa Clara, Cuba.

De estos aislados fúngicos se seleccionaron los que mostraron mayor capacidad celulolítica y esporulación: *Aspergillus* sp. (L6) y *Penicillium* sp. (L19b) (Fig1).

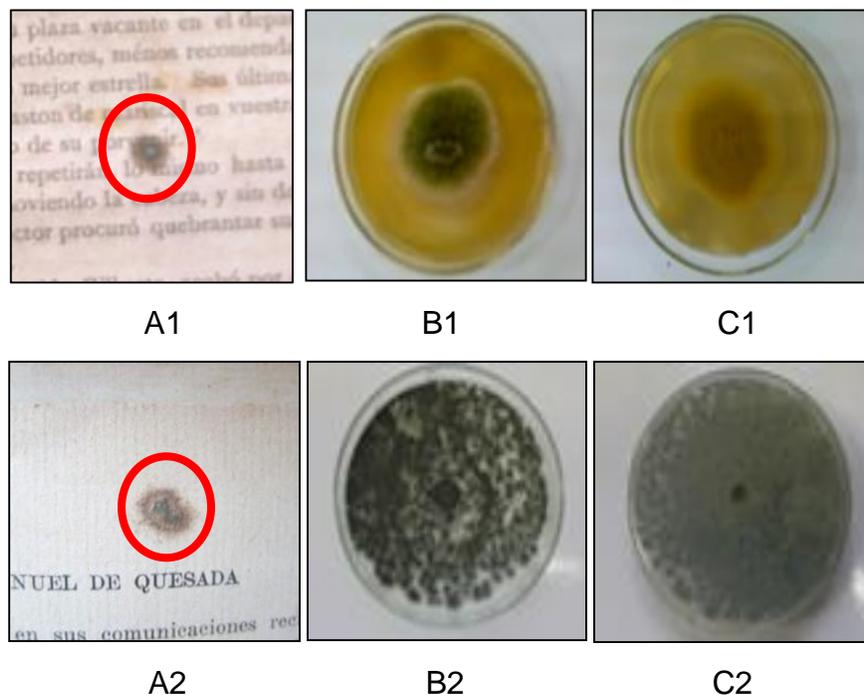


Figura1. Aislados de hongos filamentosos empleados. A: Alteración sobre papel de donde se aislaron; B: Anverso; C: Reverso.

¹ 1: Curso de Economía Rural Española, Tomo 2. Establecimiento Tipográfico de Eduardo Cuesta, Madrid, 1865. Alteración: mancha con micelio en la página 241.

2: Apuntes históricos. Trujillo, E. Tipografía "El Porvenir", Nueva York, 1896. Alteración: mancha con micelio en la página 47.

Con el objetivo de evaluar el crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con los productos objeto de estudio se utilizaron discos de papel Wahtman N°1 de 4,5 cm, los que fueron impregnados en 1 mL de solución de cetrimide al 0,25% y 0,5%, así como un extracto acuoso obtenido por maceración de hojas de almendra de la india (*Terminalia catappa* L.) al 50%. Esta droga vegetal se utilizó por su efectividad en el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc., hongos fitopatógenos del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Espinosa, 2012). El material sólido pulverulento fue suministrado por este autor. El cloruro de benzalconio al 0,5% se utilizó como tratamiento control de referencia (Fig 2).



Figura 2. Aplicación de los productos a los discos de papel.

Para la preparación del extracto vegetal se pesaron en balanza analítica (Explorer Pro) 2 gramos del sólido pulverulento de las hojas y se diluyeron en 40 mL de agua destilada estéril, agitándose en zaranda orbital (Gerhardt) a velocidad de agitación de 125 rpm durante 24h a 28 ± 1 °C. Posteriormente el macerado y se ultrafiltró utilizando un filtro de membranas (Millipore) de $2\mu\text{m}$ de diámetro de poro (Fig 3).



Figura 3. Preparación del extracto vegetal.

Una vez impregnados en cada producto y secados los discos dentro de la cabina de flujo laminar, estos fueron colocados por triplicado en placas de Petri conteniendo PDA, e inoculados con 0,5 μ L del inóculo de cada aislado fúngico. Se inocularon tres discos de papel sin tratar con cada género fúngico como control positivo de crecimiento y tres sin producto y sin hongo como control negativo (Fig 4). Todo el proceso experimental se realizó en el Flujo Laminar (Faster), para mantener las condiciones de asepsia.

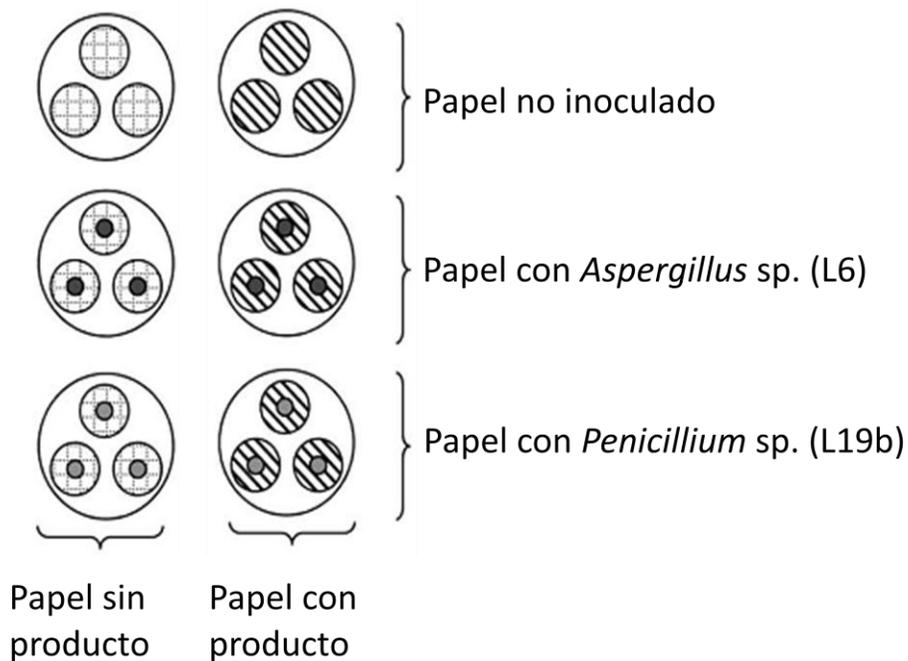


Figura 4. Esquema de trabajo seguido en la evaluación del crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con los productos.

Las placas fueron selladas con parafilm e incubadas a 28 ± 1 °C por treinta días. El desarrollo fúngico fue determinado diariamente por examen visual, y el diámetro del crecimiento de cada colonia fue medido (cm) con una regla graduada. En el caso de las cepas que colonizaron la totalidad de los discos de papel antes de los treinta días se dejó de medir su crecimiento y se mantuvieron en incubación el

resto de las placas de Petri que no presentaron crecimiento fúngico por la totalidad de los días para afirmar la eficacia de los productos.

El porcentaje de inhibición del crecimiento (%) fue calculado por la siguiente fórmula adaptada por Ansari y colaboradores, 1990. Para su cálculo se empleó el valor medio de las tres réplicas.

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(D_c - D_t)}{D_c} \cdot 100$$

Dónde:

D_c = media de los resultados del crecimiento fúngico diamétrico en el control (cm).

D_t = media de los resultados del crecimiento fúngico diamétrico en el tratamiento (cm).

Se utilizó el papel de filtro Whatman N°1 por su alto contenido de celulosa (98% w/w) y porque se conocen sus características físicas, químicas y estructurales. Además este es libre de aditivos y es ampliamente utilizado por otros investigadores. (Adamo et al., 1998, 2003; Canhoto et al., 2004; Vives et al., 2004).

Para la preparación del inóculo a cada uno de los tubos con cuñas de PDA que contenían a los hongos filamentosos incubados previamente a 28±1 °C por siete días, se les adicionó 5 mL de agua destilada estéril. Con la ayuda de un asa microbiológica se desprendió la biomasa, para obtener una suspensión concentrada, luego se añadió 1 mL de dicha suspensión en 0,9 mL de agua y se realizó el recuento de los conidios en cámara de recuento celular (Neubauer), ajustándose el inóculo al orden de 10⁶ UFC·mL⁻¹.

3.1.2 Evaluación de la eficacia de los productos en el tratamiento del papel contaminado

El primer paso para la realización de este experimento fue el desarrollo de los hongos en el papel Whatman N°1. Los discos papel fueron esterilizados y después inoculados con 100 µL del inóculo de cada cepa fúngica, preparado de igual modo que en acápite anterior. Este volumen es suficiente para cubrir toda la superficie

del disco. Posteriormente estos se colocaron en placas de Petri estériles y se incubaron a 28 ± 1 °C por tres días. Se utilizaron en total tres placas de Petri conteniendo cada una tres discos de papel contaminado con cada cepa fúngica. Luego los discos de papel contaminado se sumergieron en una solución de cetrimide al 0,5% (teniendo en cuenta los resultados del experimento anterior) y cloruro de benzalconio al 0,5%, tras lo cual fueron colocados en placas de Petri conteniendo PDA. Se utilizaron discos de papel contaminado sin tratamiento como control positivo de crecimiento. En la Figura 5 se muestra el esquema de trabajo seguido. Todas las placas fueron incubadas a 28 ± 1 °C por 15 días, después se observó el desarrollo de los hongos.

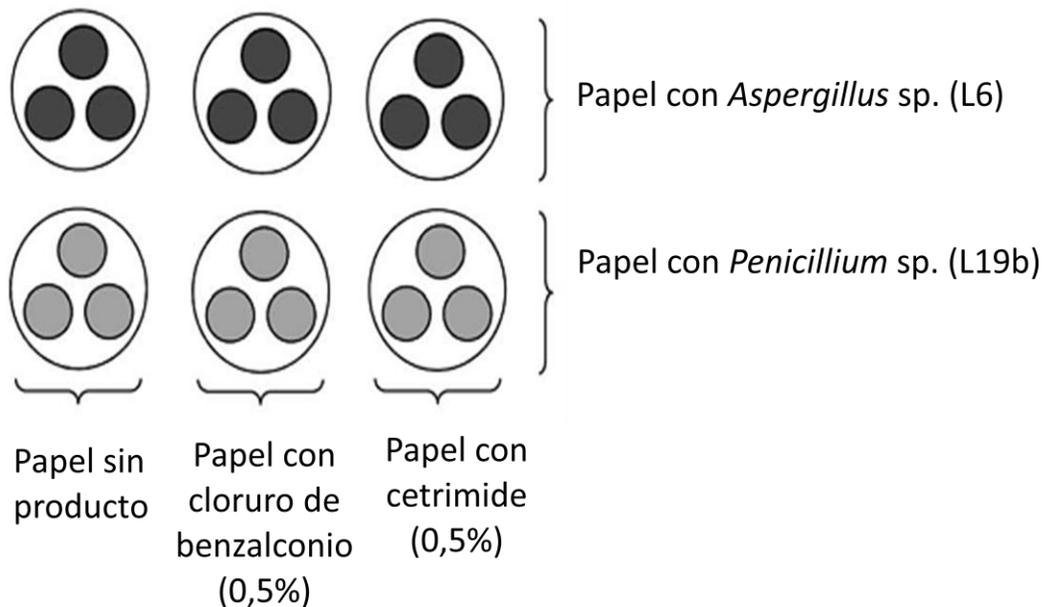


Figura 5. Esquema de trabajo seguido en la evaluación de la eficacia de los productos en el tratamiento del papel contaminado con los aislados de hongos filamentosos.

3.1.3 Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria

Para la determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria de cada producto sobre cada una de las cepas objeto de estudio, se siguieron las orientaciones dadas en la Norma NCCLS M38-A (2002).

Inicialmente se prepararon soluciones madre de cloruro de benzalconio y cetrimide a la concentración de $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A partir de estas se obtuvieron las soluciones trabajo (conteniendo medio de cultivo caldo Sabouraud y producto) a siete concentraciones, siendo la mayor 0,7% y la menor concentración 0,1% (Fig. 6 A).

Posteriormente se depositaron $100 \mu\text{L}$ de la solución a cada concentración en una placa de microdilución de 96 pocillos (Fig 6 B) y se añadieron $100 \mu\text{L}$ de una suspensión de conidios del orden de titulación de $10^4 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. No se usaron los pozos de los extremos derechos e izquierdos, ni inferior. En el último se ubicó la menor concentración dado que es la más susceptible a contaminación, y además para evitar resultados falseados por desecación, contaminación, etc. Se montó un control positivo de crecimiento, un control negativo de medio de cultivo y un control negativo de disolvente.

Todas las placas de microdilución fueron incubadas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 72h. A cada una se le asignó un mapa en el cual se indicó el producto y el género fúngico evaluados, el número de concentraciones probadas, los controles y la fecha de inicio del experimento (Fig 6 C).

Para la lectura de los resultados se tuvo en cuenta que la Mínima Concentración Inhibitoria de un agente antifúngico es aquella que inhibe substancialmente el crecimiento del organismo visualmente detectado. Cada pozo recibe una categoría de la siguiente manera: 4 = ninguna reducción del crecimiento; 3 = ligera reducción del crecimiento o aproximadamente 75% en crecimiento en control; 2 = prominente reducción del crecimiento o aproximadamente 50% en crecimiento en el control; 1 = ligero crecimiento o aproximadamente 25% en crecimiento en el control y 0 = ópticamente claro o ausencia de crecimiento.

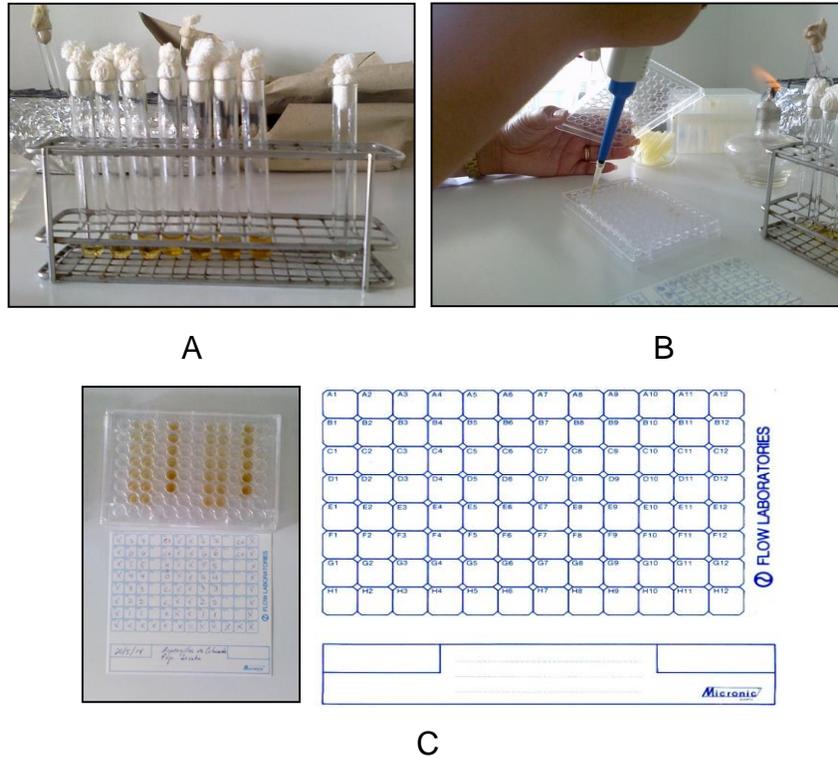


Figura 6. Prueba de microdilución para la determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria. A: Preparación de las diluciones a probar de los productos; B: Aplicación de las diluciones en los pozos; C: Placa de microdilución al concluir el montaje de la técnica y esquema de los mapas de las placas de microcultivo.

3.2 Pruebas físico-químicas para el soporte

Con el objetivo de determinar el efecto a largo plazo que los productos evaluados produjeron a la estructura física del papel y sobre los componentes químicos de las fibras de este, se realizaron las siguientes pruebas: Determinación del índice de cobre y reducción del pH del papel. Además se evaluó el efecto de los productos sobre las tintas en el papel.

El papel bond empleado en este estudio se compone 100% de fibras de eucalipto (marca Report calidad premium) mientras que la composición del papel periódico

se basa en pulpa química Kraft semi-blanqueada, pulpa mecánica y sulfato de aluminio (Peña y Zambrano, 2003). Este último fue obtenido en la Imprenta del periódico “Vanguardia”, publicación periódica de mayor tirada a nivel provincial.

Todas las pruebas se realizaron por triplicado, utilizando muestras de papel bond y periódico. El papel se sometió a envejecimiento acelerado, empleando en todos los casos papel sin envejecer como patrón y envejecido sin producto como control. Para el presente estudio se determinó la estabilidad relativa del papel por calentamiento según la norma TAPPI T-453, que consiste en utilizar un horno en el cual el papel se mantiene a 105°C, cuidando que los ejemplares del estudio se protejan de la radiación directa de los elementos de calentamiento. El estimativo de la esperanza de vida del papel se calcula teniendo en cuenta que el envejecimiento por calentamiento durante 72 horas a 105°C equivale a 25 años de envejecimiento natural (Villamizar, 1996). La prueba se realizó durante 72, 144 y 216 horas, las cuales equivalen a 25, 50 y 75 años respectivamente (Hernández, 2001). En la Figura 7 se observan las muestras de papel durante el envejecimiento.



Figura 7. Muestras de papel en placas de Petri en el horno durante el envejecimiento.

3.2.1 Determinación del índice de cobre

Según la norma estándar TAPPI T-430 el poder de reducción puede ser determinado por un proceso que determina la reducción de las sales de cobre (II) en solución alcalina. El índice de cobre es definido como los gramos de reducción de cobre bajo condiciones específicas, del estado de cobre II a cobre I. Un número

elevado puede mostrar la presencia de celulosa oxidada e indica deterioro del papel (Smith, 1991).

Se pesaron en una balanza analítica (Explorer Pro) $0,075 \pm 0,004$ g de cada muestra de papel (papel bond y periódico envejecidos y sin envejecer). Este estudio se realizó por triplicado, sumergiendo los papeles en cetrimide al 0,5%, cloruro de benzalconio al 0,5%, este último como producto de referencia. Además se realizó el estudio al papel sin producto.

La descripción del procedimiento de preparación de las soluciones se muestra en el Anexo I.

Las muestras de papel se colocaron en tubos de ensayo de 16x150mm y se les adicionaron 5,0 mL de solución de CuSO_4 con carbonato-bicarbonato (hasta $\text{pH}=9$), equivalente a 3,5 mL de esta última). Los tubos de ensayo conteniendo la mezcla más el papel se mantuvieron en calentamiento en baño de María a temperatura cercana a ebullición durante tres horas. Transcurrido este tiempo se filtró con bomba de vacío.

El filtrado se desechó y se recogieron las fibras de la muestra junto con el papel de filtro, para luego de apartar este último adicionarle 1,25mL de solución molibdofosfórica. Posteriormente se transfirió este material para el lavado de las fibras de papel con agua destilada hirviendo, con el fin de desaparecer el color azul que presenta la reacción. Seguidamente se tomó el filtrado y se le realizó una titulación con KMnO_4 , hasta que se produzca el cambio a rosado.

La cantidad de mililitros que se requirieron para el viraje se emplean en el cálculo del índice de cobre.

El cálculo para determinar el índice de cobre se realizaron de acuerdo con la siguiente fórmula (Browning, 1969).

$$\text{Índice de cobre} = \frac{6,36 \times V \times N}{\text{Peso muestra}}$$

Donde:

6,36 = es una constante de equivalencia de unidades

V = mililitros de permanganato de potasio para la titulación

N = normalidad de la solución del permanganato de potasio, 0,05N

Peso muestra= gramos de cada uno de los soportes de papel bond y periódico

La prueba se ejecutó por triplicado. Se comprobó la normalidad y heterogeneidad de varianza de la distribución de los datos empleando las pruebas Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Posteriormente para la comparación de rangos se usaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney y Friedman. El procesamiento estadístico se realizó con el programa SPSS Statistics versión 21 para Sistema Operativo Windows.

3.2.2 Evaluación de la reducción del pH del papel

Se midió el valor de pH de las muestras de papel bond y periódico sin envejecer% y envejecido (equivalente a 25, 50 y 75 años) y tratados con cloruro de benzalconio al 0,5% y cetrimide al 0,5. Como controles absoluto se usaron papel sin envejecer sin tratar y tratado con ambos productos.

Para medir el pH se siguió el protocolo establecido en la norma UNE 57-032-91, en la que se describe el procedimiento para la medición del pH de un extracto acuoso de pastas, papel o cartón. Para esto se pesan 2 g de la muestra de papel en 100 mL de agua destilada, y luego de transcurrida 1 h se mide el pH. Las medidas de pH se realizaron con un pHmetro HANNA instruments.

3.2.3 Efecto sobre las tintas

Para este experimento a tiras de 10x1,5 cm de papel (bond y periódico, envejecido y sin envejecer) se les trazaron tres líneas con tintas china y estilográfica. Luego de que las tintas se secan a temperatura ambiente, las tiras de papel fueron sumergidas en las soluciones de prueba (cloruro de benzalconio al 0,5% y cetrimide al 0,5%). Se utilizaron como control tiras de cada tipo de papel con trazos de tintas que no fueron sumergidos en los productos. Se realizó una evaluación cualitativa por observación visual del papel luego de secarse a temperatura ambiente, determinándose el corrimiento de las tintas (solubilización), cambio de coloración y desprendimiento del soporte.

4. Resultados

4.1 Pruebas microbiológicas

4.1.1 Evaluación del crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con los productos

En la Tabla 1 se muestran los resultados del crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con los productos objeto de estudio.

Tabla 1. Desarrollo de los aislados fúngicos en los discos de papel previamente tratados con productos.

Días	Papel sin tratar		Papel tratado b 0,5%				Papel tratado c 0,25%				Papel tratado c 0,5%				Papel tratado EV 50%					
	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P				
1	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
2	0,6	+/-	0,8	+/-	0	-	0	-	0	-	0,5	+/-	0	-	0	-	0,7	+/-	0,4	+/-
3	1,2	+	1,5	+	0	-	0	-	0	-	1,0	+	0	-	0	-	1,4	+	1,1	+
4	1,6	+	1,5	+	0	-	0	-	0,5	+/-	1,2	+	0	-	0	-	1,7	+	1,4	+
5	1,9	+	1,6	+	0	-	0	-	0,7	+/-	1,4	+	0	-	0	-	2,0	+	1,7	+
6	2,8	+	2,3	+	0	-	0	-	1,2	+	2,2	+	0	-	0	-	2,9	+	2,5	+
7	≥4,5	++	≥4,5	++	0	-	0	-	≥4,5	++	≥4,5	++	0	-	0	-	≥4,5	++	≥4,5	++

D: media del crecimiento diamétrico de la colonia (cm) de las tres réplicas sobre papel Whatman N°1 (0 = sin desarrollo y ≥4,5 = diámetro igual o superior que el disco de papel).

C: crecimiento del hongo (-, sin ningún desarrollo; +/-, desarrollo de hifas; +, desarrollo de hifas y conidios; ++, colonia ≥ 2 cm).

b: cloruro de benzalconio c: cetrimide EV: extracto vegetal

A: *Aspergillus* sp (L6) P: *Penicillium* sp. (L19b)

Tanto el cloruro de benzalconio como el cetrimide al 0,5%, inhibieron el 100% del crecimiento de ambos aislados fúngicos. Por esto permanecieron en incubación hasta los 30 días para evaluar su efectividad (Ver Fig 8).

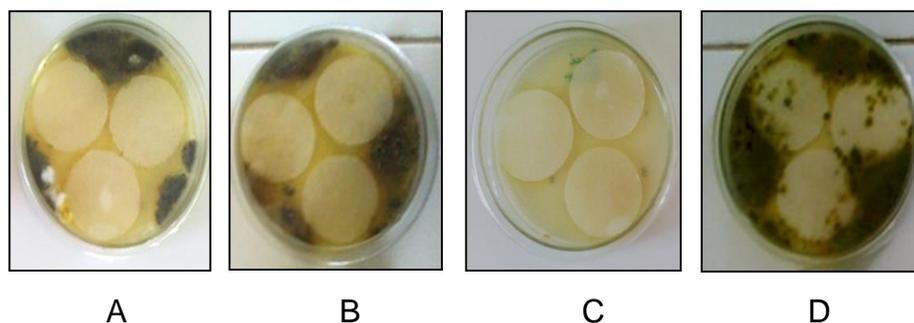


Figura 8. Eficacia de los productos en el tratamiento de papel contaminado a los 30 días de incubación.

A: Papel con *Aspergillus* sp (L6) y cloruro de benzalconio (0,5%)

B: Papel con *Aspergillus* sp (L6) y ceftriamide (0,5%)

C: Papel con *Penicillium* sp. (L19b) y cloruro de benzalconio (0,5%)

D: Papel con *Penicillium* sp. (L19b) y ceftriamide (0,5%)

En la Tabla 2 se muestran los porcentajes de inhibición del crecimiento radial de las dos cepas en presencia de ceftriamide (0,25%) y el extracto vegetal.

Tabla 2. Eficacia de los productos en el tratamiento de papel contaminado.

Días	Papel tratado c 0,25%		Papel tratado EV 50%	
	PIC (%)			
	A	P	A	P
2	100	37,5	-16,7	50
3	100	33,3	-16,7	26,6
4	68,8	20,0	-6,25	6,7
5	63,2	4,3	-5,3	-6,25
6	57,1	4,3	-3,6	-8,7

PIC: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento

c: ceftriamide EV: extracto vegetal

Signo negativo y letras rojas significan estimulación del crecimiento fúngico

4.1.2 Evaluación de la eficacia de los productos en el tratamiento del papel contaminado

En la Figura 9 se observa el resultado de la segunda prueba microbiológica.

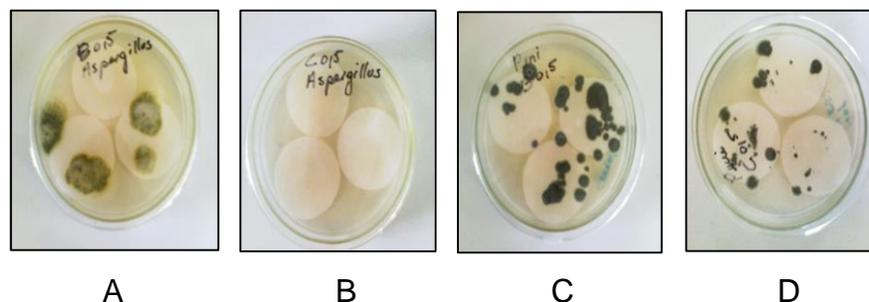


Figura 9. Evaluación de la eficacia de los productos en el tratamiento del papel contaminado con los aislados de hongos filamentosos a los 15 días incubación.

- A: Papel con *Aspergillus* sp (L6) y cloruro de benzalconio (0,5%)
 B: Papel con *Aspergillus* sp (L6) y cetrímide (0,5%)
 C: Papel con *Penicillium* sp. (L19b) y cloruro de benzalconio (0,5%)
 D: Papel con *Penicillium* sp. (L19b) y cetrímide (0,5%)

4.1.3 Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria

Se obtuvieron los siguientes resultados en la determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI):

- MCI (cloruro de benzalconio vs *Aspergillus* (L6))= $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} = 0,2\%$
- MCI (cloruro de benzalconio vs *Penicillium* (L19b))= $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} = 0,2\%$
- MCI (cetrímide vs *Aspergillus* (L6)) $< 1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} < 0,1\%$
- MCI (cetrímide vs *Penicillium* (L19b)) $< 1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} < 0,1\%$

En todos los casos la observación fue ópticamente clara, demostrando ausencia de crecimiento fúngico.

4.2 Pruebas físico-químicas para el soporte

4.2.1 Determinación del índice de cobre

En las Figuras 10, 11, 12 y 13 se muestran los resultados de la determinación del índice de cobre de papel bond y periódico sin envejecer y envejecido y sin tratar y tratado con cloruro de benzalconio (0,5%) y cetrímide (0,5%).

Los datos no cumplen distribución Normal, por lo que se emplearon las pruebas no paramétricas. Los resultados de estas se discuten en el próximo acápite.

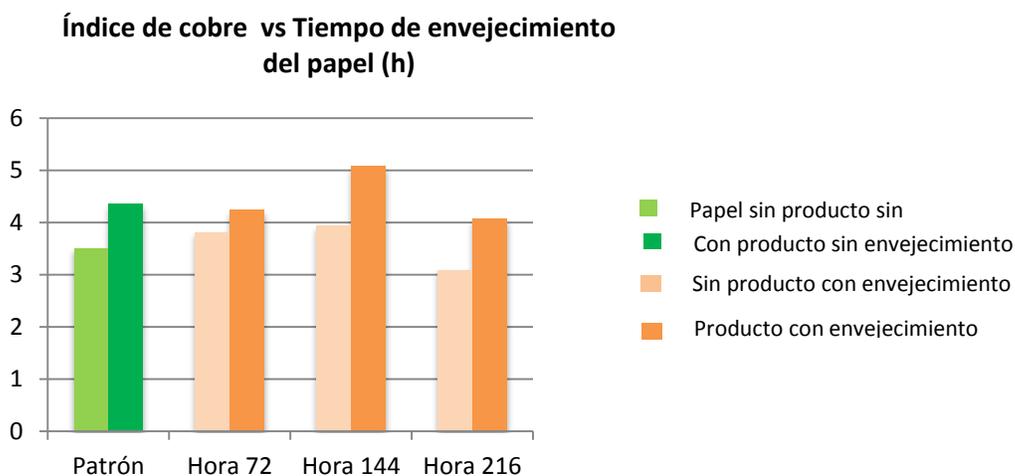


Figura 10. Índice de cobre de papel bond tratado con cloruro de benzalconio (0,5%).

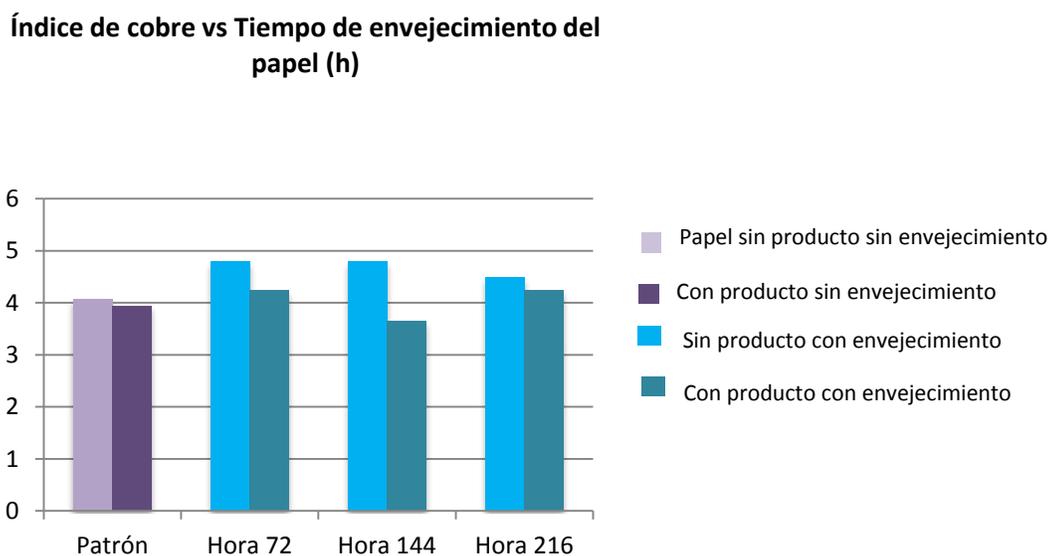


Figura 11. Índice de cobre de papel periódico tratado con cloruro de benzalconio (0,5%).

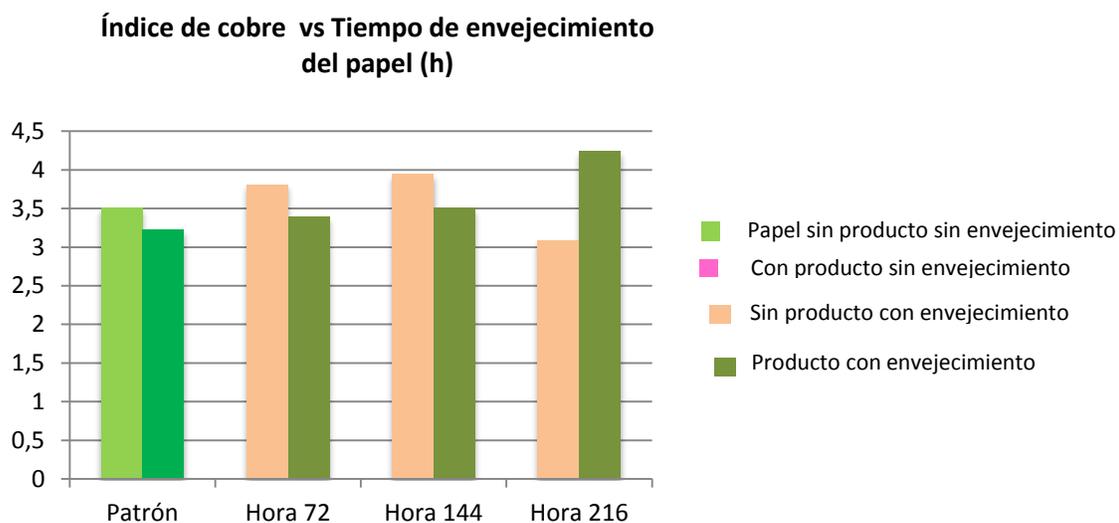


Figura 12. Índice de cobre de papel bond tratado con cetrimide (0,5%).

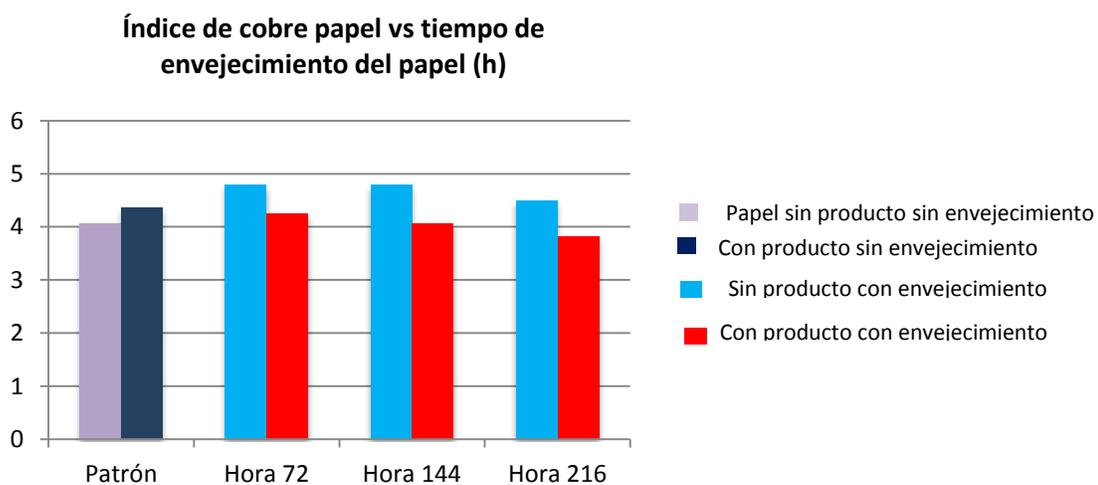


Figura 13. Índice de cobre de papel periódico tratado con cetrimide (0,5%).

4.2.2 Evaluación de la reducción del pH del papel

En la Tabla 3 se muestran los valores de pH del papel tratado y sin tratar, sin envejecer y a distintos tiempos de envejecimiento.

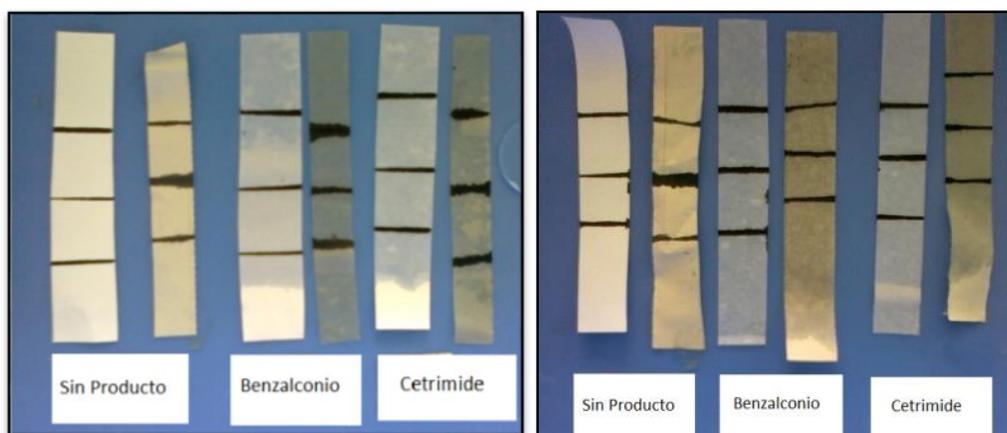
Tabla 3. Modificación del pH luego del tratamiento del papel bond y periódico a diferentes tiempos de envejecimiento con los productos.

Tiempo de envejecimiento (h)	pH					
	Papel bond			Papel periódico		
	sp	b	c	sp	b	c
0	5,84	6,36	7,85	5,20	7,63	6,79
72	6,01	7,74	8,21	5,03	8,09	7,15
144	6,01	8,27	7,87	5,84	7,40	6,42
216	5,63	7,30	7,39	5,39	7,89	6,70

sp: sin producto b: con cloruro de benzalconio (0,5%) c: con cetrimide (0,5%)

4.2.3 Efecto sobre las tintas

No se observó solubilización de las tintas china y estilográfica sobre los soportes probados (papel bond y periódico) y tratados con cloruro de benzalconio (0,5%) y cetrimide (0,5%). Tampoco se observó desprendimiento, decoloración ni pigmentación de las tintas (Ver Figs 14y 15).



A

B

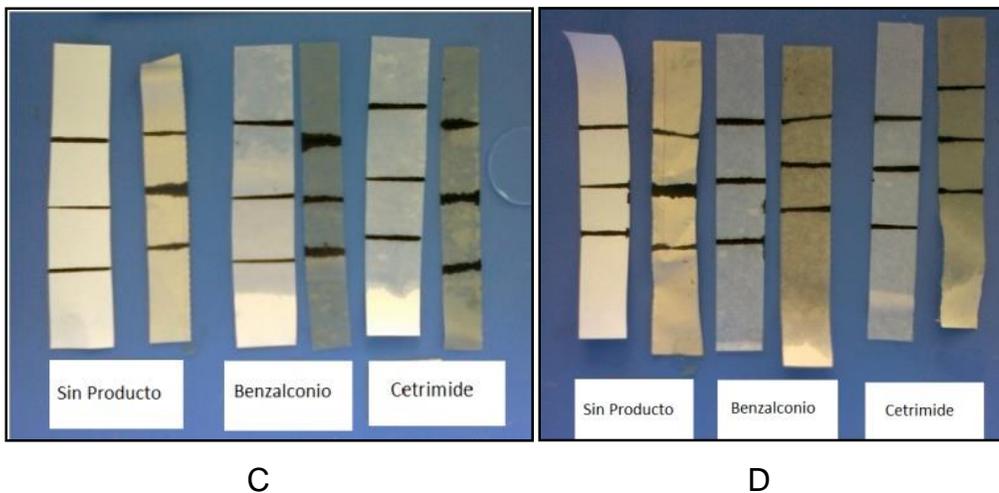


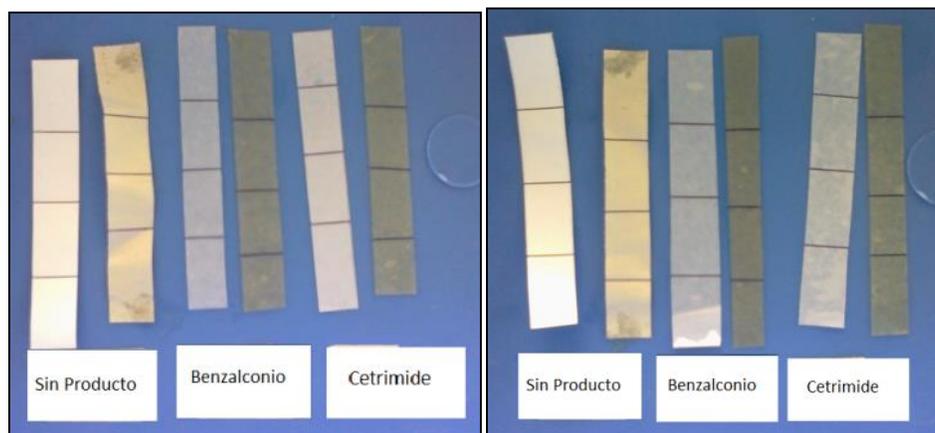
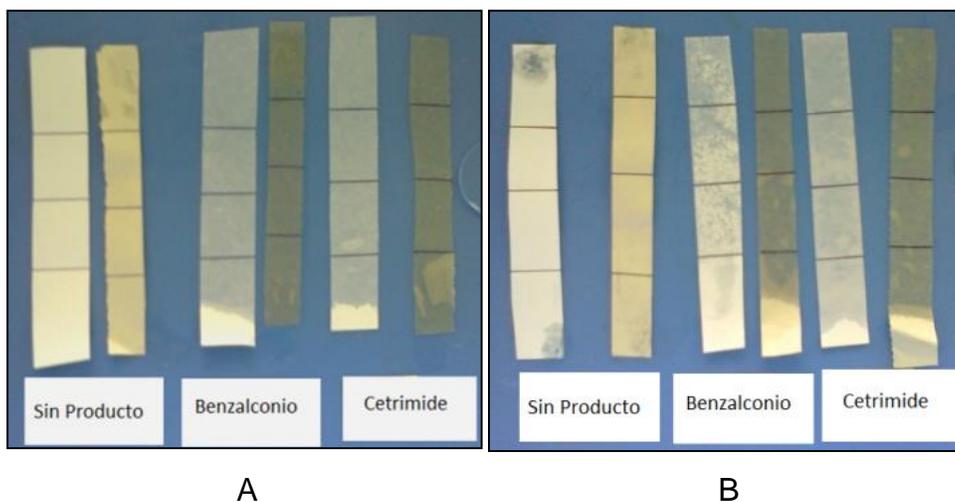
Figura 14. Efecto de los productos sobre la tinta china. Izq. Papel bond; Der. Papel periódico.

A: Papel sin envejecer.

C: Papel envejecido 144h (50 años).

B: Papel envejecido 72h (25 años).

D: Papel envejecido 216h (75 años).



C

D

Figura 15. Efecto de los productos sobre la tinta estilográfica. Izq. Papel bond; Der. Papel periódico.

A: Papel sin envejecer.

C: Papel envejecido 144h (50 años).

B: Papel envejecido 72h (25 años).

D: Papel envejecido 216h (75 años).

Se observó corrimiento de la tinta china en algunas líneas del papel periódico desde el momento de su trazado, antes de sumergirlas en los productos en estudio.

5. Discusión

5.1 Pruebas microbiológicas

5.1.1 Evaluación del crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con los productos

A las 24h no se había observado desarrollo fúngico en ninguno de los tratamientos. Se hizo visible la presencia del micelio y luego de conidios de *Penicillium* sp. (L19b) en papeles impregnados con cetrimide (0,25%) y con extracto acuoso de hojas de *T. cattapa* al mismo tiempo de incubación que el observado en papel sin tratar; sin embargo el primero de estos productos controló el desarrollo de *Aspergillus* sp (L6) durante las primeras 72h, y a partir del 6to día el hongo formó estructuras reproductivas. Se decidió no continuar evaluando estos tratamientos dado su ineffectividad.

Si bien Espinosa (2012) encontró una potente actividad fungicida de extractos acuosos de hojas de *T. cattapa* a partir de el mismo material vegetal empleado en la presente investigación, habiendo detectado a flavonoides y taninos causantes de tal efecto, es posible que tal actividad haya disminuido debido al tiempo de almacenamiento del producto, a pesar de que este presentaba las mismas propiedades organolépticas descritas por el autor, y su almacenamiento fue realizado en condiciones de sequedad y temperatura adecuadas.

Además este es uno de los casos donde los metabolitos poseen un límite inferior de actividad, pues en experimentos anteriores realizados bajo las mismas condiciones a los referidos por el suministrador del producto, no se apreciaron inhibiciones en el crecimiento micelial de *R. solani* y *S. rolfsii* por debajo del 50% (Jiménez 2004; Robaina 2004). Siendo esta concentración límite la evaluada en la presente investigación, cuya selección se hizo en busca de un procedimiento sencillo, al alcance de las Bibliotecas y Archivos, donde no existen recursos tecnológicos para obtener extractos de mayor concentración.

No poseyendo este producto natural actividad contra los hongos filamentosos evaluados, cabe la posibilidad de que el extracto contenga otros metabolitos que sirvan de nutrientes a estos organismos, lo que explicaría la estimulación del crecimiento fúngico.

No debe descartarse el ensayo de productos naturales dado sus potencialidades en el control del biodeterioro en bienes patrimoniales Saravia y colaboradores (2012) y Arenas y colaboradores (2007) demostraron un efecto biocida en la mayoría de los aceites esenciales ensayados frente a cepas de bacterias y hongos aisladas de documentos pertenecientes al patrimonio documental argentino y cubano; por lo que comentan el uso prometedor de estos productos ambientalmente amigables obtenidos de plantas en el control de microorganismos asociados al biodeterioro del patrimonio cultural.

Por otro lado la sustancia de referencia (cloruro de benzalconio) al 0,5% y el cetrimide al 0,5% resultaron ser efectivos en el control de estas cepas biodeteriorantes de papel, según los resultados de este experimento.

Sin embargo a los 30 días de incubación se observaban pequeñas colonias de *Penicillium* sp. (L19b) procedentes del medio de cultivo invadiendo al papel tratado con el último producto (Fig 9).

Lo anterior demuestra que esta especie de *Penicillium* es más difícil de controlar dado su elevada esporulación y capacidad de los conidios de dispersarse. Esto se manifiesta al observarse las características del cultivo en placas de Petri con PDA (Fig 8). Además aunque ambos aislados fúngicos tienen igual capacidad deteriorante celulolítica (crecimiento abundante con papel de filtro y moderada con celulosa cristalina como fuente de carbono) (Ramos, 2014), la cuantificación de la actividad enzimática celulasa resultó ser mayor para *Penicillium* sp. (L19b) que para *Aspergillus* sp (L6) (resultados sin publicar).

El cloruro de benzalconio en productos comerciales donde se encuentra sin aditivos o en formulados en los que es el único ingrediente activo, pero a los que se les agrega otros productos, es ampliamente utilizado como fungicida.

El Timsem (nombre comercial) posee además de cloruro de benzalconio, urea al 60%, cuya función es proteger al producto y la acción de éste de condiciones adversas como valores de pH entre 1 y 3, materia orgánica y aguas duras (Alvarado et al., 2010).

Mateus y colaboradores (2004) encontraron que este producto a la concentración de 4000 ppm (1,6 g de principio activo) fue muy efectivo en la inhibición del

crecimiento de un aislado de *Aspergillus niger* y otro de *Penicillium* sp. obtenidos documentos en soporte de papel, requiriendo menores tiempos de contacto hongo-desinfectante que en el caso anterior (Vargas-Angel, 2011). También determinó que este producto a las concentraciones de 0,1; 1 y 2 g·L⁻¹ fue efectivo frente a una cepa de *Aspergillus* y otra de *Penicillium*.

Otras formulaciones comerciales (SaniT-10 (8% PA) y C.L.Z. (50%)) que contienen al principio activo referido, han mostrado ser igualmente efectivas en el control de especies de estos géneros (Cuenca-Osorio, 2006). También esta autora encontró cierta resistencia de la especie de *Penicillium* evaluada a los desinfectantes evaluados.

Los resultados obtenidos por estos autores y los presentados en esta investigación demuestran que esta sal de amonio cuaternaria sigue siendo una buena alternativa para el control de hongos filamentosos sobre papel, siempre y cuando no exista un uso continuado del producto que haya propiciado el desarrollo de cepas resistentes.

5.1.2 Evaluación de la eficacia de los productos en el tratamiento del papel contaminado

En esta prueba sólo el cetrimide al 0,5% fue efectivo frente a *Aspergillus* sp. (L6) a los 15 días de incubación. Estos resultados confirman la mayor dificultad en el control de *Penicillium* sp. (L19b).

Hay que tener en cuenta que a diferencia de la metodología usada en el experimento anterior, en esta prueba los discos de papel fueron previamente inoculados con 100 µL de la suspensión de conidios de cada género fúngico y se incubaron por 72 horas antes de ponerlos en contacto por un tiempo mínimo con los productos en evaluación; mientras que en la primera alternativa de control, los discos de papel ya impregnados en los productos se inocularon con sólo 0,05 µL de la suspensión de conidios de cada género fúngico. O sea, que la presión de inóculo es mayor que la segunda variante.

Dado el pequeño tamaño de los conidios de los géneros fúngicos estudiados, estos pudieron insertarse entre las fibras de papel y estando el papel humedecido

y a temperatura favorable, germinar durante la incubación. Para ilustrar lo antes dicho en la Figura 15 se observan las fibras de papel y los conidios en un fragmento de un documento biodeteriorado.



Figura 15. Análisis mediante Microscopía electrónica (SEM) de un fragmento de un libro biodeteriorado. Se observan las fibras de papel y los conidios fúngicos. Tomado de Pinzari y colaboradores, 2010.

En general, si las esporas fúngicas escapan a la acción inmediata de los productos debido a que estos aun o han difundido al medio de cultivo, estas pueden germinar.

Esto justificaría impregnar no solo la mancha micelial y/o conidial de estos productos, sino el área inmediata a su alrededor. Esto si se demostrara la inocuidad de estas sustancias sobre el papel.

5.1.3 Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria

Los bajos resultados de la Mínima Concentración Inhibitoria fundamentan la efectividad de estos productos.

Vargas-Angel (2011) determinó la concentración microbicida de cada agente químico evaluado en su estudio para cada microorganismo, registrando la concentración más baja del producto que cumplió con un $\text{Log R} = 4$ en el caso de actividad fungicida. Esta autora demostró que la MIC del Timsen frente a los hongos evaluados era igual a $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (0,05%), mostrando una concentración efectiva más baja aunque la encontrada en la presente investigación.

Cuenca-Osorio (2004) demostró una reducción de las células vegetativas entre el 75% y el 100% con concentraciones bajas de las sales de amonio cuaternario tipo cloruro de benzalconio (0,0625% y 0,1%).

5.2 Pruebas físico-químicas para el soporte

El procedimiento de envejecimiento acelerado trata de simular en un período corto de tiempo los efectos del envejecimiento natural, con el fin de reducir el tiempo de estudio. Este envejecimiento artificial consiste en la exposición del papel a uno o varios factores perjudiciales como calor, luz, humedad, etc. Las reacciones que pueden ocurrir bajo envejecimiento natural y acelerado son: la hidrólisis, la oxidación, el entrecruzamiento de las cadenas celulósicas y la degradación térmica (Flórez y Russi, 2000).

5.2.1 Determinación del índice de cobre

El índice de cobre es una medida del poder reductor de la celulosa, en la cual el único grupo funcional importante, causante de la reducción es la unidad de glucosa terminal de la cadena. Un papel compuesto 100% por celulosa tiene un índice de cobre relativamente bajo, este valor se incrementa cuando aumentan los grupos carbonilo producidos por oxidación e hidrólisis (Smith, 1991).

Según la primera prueba estadística ninguno de los tratamientos afectaron la calidad del papel. Este resultado no es lógico, al menos en relación con la calidad del papel dependiendo de su tipo (mayor para el papel bond respecto al papel periódico) ni con el paso del tiempo (envejecimiento del papel). Un valor de $\alpha = 0,058$, que supera el límite de la prueba para establecer un criterio, en el orden de la milésima indica que de existir las diferencias esperadas como ya se explicó, estas son muy pequeñas.

Luego nuevamente se obtiene que el proceso de envejecimiento del papel no lo afecta ($\alpha = 0,71$) y sí que existen diferencias en cuanto a la calidad del papel ($\alpha = 0,01$), conservándose en mayor medida la estructura de la celulosa en el papel bond.

Una vez más los resultados indican que el envejecimiento, en esta ocasión de los controles (papeles a los que no se les adicionó ninguno de los productos) no los afecta, independientemente del tipo de papel (para el papel bond $\alpha = 0,07$ y para el periódico $\alpha = 0,52$).

La incorporación del cloruro de benzalconio (0,5%) altera la calidad del papel para ambos tipos ($\alpha = 0,03$); sin embargo esto ocurre de forma opuesta. Este producto parece haber empeorado la del papel bond y sorprendentemente mejorado la del periódico. Sin embargo la incorporación de cetrimide (0,5%) parece no alterar a ninguno de los tipos de papel (para el papel bond 0,056 (valor al límite del criterio de decisión) y para el periódico $\alpha = 0,38$).

Luego cuando se fija la atención en el tiempo de envejecimiento del papel se obtienen los siguientes resultados:

En el caso de los papeles bond sin envejecer tratados con los diferentes productos sí ocurre una alteración desfavorable ($\alpha = 0,03$). No manifestándose éste cambio en los soportes tipo periódico ($\alpha = 0,40$).

Tanto los papeles bond y periódico envejecidos 25 años y tratados con ambos productos no presentan modificaciones desfavorables en su calidad ($\alpha = 0,05$ y $\alpha = 0,30$) respectivamente.

En ambos soportes envejecidos 50 años y con todos los tratamientos se obtuvo que sí ocurre un cambio desfavorable ($\alpha = 0,03$ y $\alpha = 0,04$) respectivamente. Esta vez favoreciendo la calidad del papel la adición de cetrimide (0,5%) y empeorándola, en el caso del papel bond, la incorporación de cloruro de benzalconio.

Con respecto al papel bond envejecido 75 años sí existen cambios no deseados con la adición de ambos productos ($\alpha = 0,03$). No sucediendo lo mismo en soportes periódico ($\alpha = 0,11$).

En resumen:

- El papel bond es de mejor calidad que el periódico, aunque no hay grandes diferencias entre estos.
- El proceso de envejecimiento no afectó al papel.

- El papel bond se afecta más con la adición de los productos que el papel periódico.
- La adición de cetrimide (0,5%) es más favorable que la de la sustancia de referencia (cloruro de benzalconio al 0,5%).

Los resultados de la investigación que se presenta se discutirán con los obtenidos por Cuenca-Osorio (2006), quien evaluó el índice de cobre de papel bond y periódico tratados con SaniT-10 (2500 ppm=0,25%) y C.L.Z. (0,1%). Esta autora solamente muestra sus resultados en gráficos de barras, sin hacer análisis estadísticos.

Los valores de índice de cobre para el papel bond, tanto tratado como sin tratar y envejecido o sin envejecer, resultaron similares a los obtenidos en esta investigación; no siendo así para el papel periódico, pues esta autora informa valores entre 15 y 20, muy superiores a los acá presentados. Esto indica una muy elevada calidad del papel empleado en Cuba para este tipo de publicación.

Según se refiere proceso de envejecimiento acelerado tampoco afectó a ambos tipos de papel. En general, la adición de ambos productos mejoró la calidad del papel bond y afectó ligeramente la del periódico.

Los resultados obtenidos demuestran que el cetrimide (0,5%) no solo no afecta a los papeles, sino que favorece su calidad.

5.2.2 Evaluación de la reducción del pH del papel

Todos los valores de pH del papel se presentan dentro del límite considerado estable y recomendable. Por lo que ni el envejecimiento acelerado ni la adición de los productos afectan al papel en este aspecto. Por el contrario, la incorporación de cloruro de benzalconio al 0,5% y cetrimide al 0,5% propician favorablemente el paso de los papeles de la primera condición a la segunda (Ver Fig 16).

El problema de la hidrólisis ácida es el principal responsable de la alteración de documentos (Sánchez, 1999). En presencia de un ácido y agua, la celulosa se descompone por hidrólisis. Los ácidos provocan la separación de las uniones entre las moléculas de glucosa que forman una larga cadena, este proceso es especialmente importante en las zonas amorfas. La concentración de protones en

una solución acuosa puede ser cuantificada usando una escala numérica (0-14) llamada pH. Un valor bajo de pH indica una alta concentración de iones hidronio, o sea, una alta concentración de ácido, y cuanto más elevado sea partiendo de 7, más alcalino.

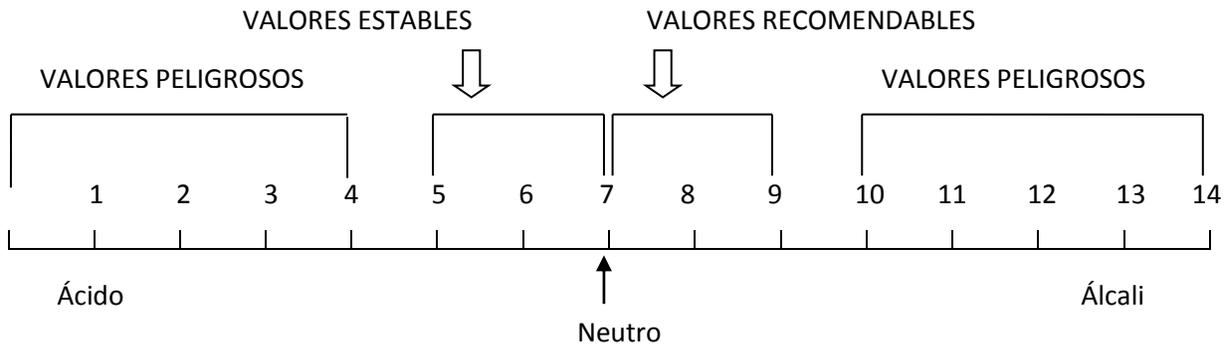


Figura 16. Escala numérica de valores de pH asociados a documentos con soporte de papel. Tomado de Henk y Porck (2000).

Un pH ácido favorece el desarrollo de los hongos y un pH básico favorece el crecimiento de bacterias. Entre las características de los papeles durables están: ser de celulosa pura, pH neutro, fibras largas libres de lignina y azufre, cargas químicamente estables e inalterables (Henk y Porck, 2000).

Uno de los métodos más fiables es la determinación del pH, debido a la conductividad que se genera en presencia de humedad, porque los iones hidrógeno tienen carga positiva y los grupos hidroxilo negativa. La medición del pH de un papel se puede realizar directamente en la superficie, al aplicar el electrodo sobre una zona humedecida (pH por contacto) o mediante métodos de extracción, en los que una cantidad determinada de la muestra se deja reposar en agua destilada fría (extracción acuosa en frío) o se hierve (extracción acuosa en caliente) (Henk y Porck, 2000).

5.2.3 Efecto sobre las tintas

Las tintas son un componente esencial en la elaboración de documentos, siendo de gran importancia la determinación del efecto de cualquier producto que se adicione durante la restauración.

Se observa un corrimiento de la tinta china al ser aplicada en el papel periódico, pero esto se debe a la propia textura del soporte, lo que se aprecia en la Figura 17.

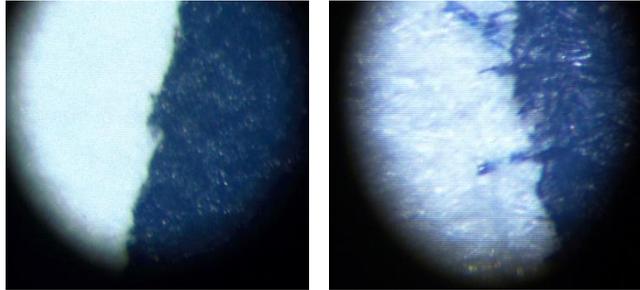


Figura 17. Apariencia en estereomicroscopio (40x) de del papel bond (A) y el papel periódico (B) sin tratar y sin envejecer con un trazo de tinta china.

Los resultados obtenidos son favorables al uso de los productos en estudio, pues no afectaron las características del papel con trazos de tinta china y estilográfica. Estos últimos resultados no coinciden con los del estudio de Cuenca-Osorio (2006), al haber observado decoloración de la tinta luego de la aplicación de los productos de amonio cuaternario a diferentes concentraciones.

Sin embargo en la presente investigación no se evaluó el efecto de los productos sobre la tinta de impresión, pues se disponía de un producto en polvo que no se logró solubilizar adecuadamente en etanol de modo que quedara más o menos uniformemente distribuido durante su aplicación al papel. No obstante teniendo en cuenta los resultados de Osorio (2006) esta no debe ser afectada.

6. Conclusiones

1. El cetrimide al 0,25% y el extracto acuoso de hojas de *Terminalia cattapa* al 50% no inhiben el crecimiento fúngico de *Aspergillus* sp (L6) y *Penicillium* sp. (L19b) sobre papel previamente tratado; el primer producto al 0,5% es tan efectivo con tal fin como la sustancia de referencia (cloruro de benzalconio al 0,5%).
2. Solamente el cetrimide al 0,5% fue efectivo en el tratamiento del papel contaminado con *Aspergillus* sp (L6); existe una mayor dificultad en el control de *Penicillium* sp. (L19b).
3. Los bajos valores de la Mínima Concentración Inhibitoria fundamentan la efectividad del cloruro de benzalconio y el cetrimide en el control de las especies fúngicas biodeteriorantes objeto de estudio.
4. La adición de cetrimide al 0,5% no afecta la calidad del papel bond y periódico no envejecido y a los 25, 50 y 75 años de envejecimiento, atendiendo a: los valores de índice de cobre y pH, ni los sustentados de tintas china y estilográfica.
5. El cloruro de benzalconio al 0,5% es una alternativa aun viable para el control del biodeterioro fúngico sobre papel.

7. Recomendaciones

1. Determinar si el efecto del cetrimide sobre los aislados fúngicos estudiados es fungicida o fungistático.
2. Evaluar el efecto del producto al 0,5% sobre tinta de impresión como sustentado.
3. Si se llegara a implementar su uso impregnar no solo la mancha micelilar y/o conidial de este producto, sino el área inmediata a su alrededor.

8. Referencias Bibliográficas

- Adamo, A., Giovannotti, M., Magaudda, G., Plossi, M., Rocchetti, F., Rossi, G., 1998. Effect of gamma rays on pure cellulose paper – as a model for the study of a treatment of “biological recovery” of biodeteriorated books. *Restaurator* 19, 41–59.
- AIC. 1994. Paper Conservation Catalog The American Institute for Conservation of Historic and Artistic Work. Book and Paper Group. 9ª Edición. USA.
aire en dos depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 39: 63-69.
- Akira, M.; Ishida, H.; Kubo, K.; Furukawa, I.; Ikeda, Y. 2006. Suppressive Effects of Okinawan Food Items on Free radical generation from Stimulated Leukocytes. *Asian Pasific J Cancer Prev.* **vol. 6**: 437 - 448.
- Albuquerque, E., Coutinho, A., Afranio F. 2006. Fungos anemófilos na sala de periódicos da biblioteca de ciencias da saúde da Universidade Federal do Ceará. *RBAC*, 38: 155-158.
- Alcalde, J. 1980. Propiedades físico- mecánicas de dos papeles producidos con distinta proporción de pulpa química y mecánica. Memoria para optar el título de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Departamento de Ciencia y Tecnología de la madera. Universidad de Chile. Santiago de Chile. 102p.
- Aldana, L. F y Sarassa, S. P. 1999. Efecto de desinfectantes y antimicrobianos naturales frente a cepas de *Listeria monocytogenes*. Tesis de Pregrado. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Carrera de Microbiología industrial. Bogotá D. C.
- Alvarado, G.; Sosa, A.; Florez, F.; De la Garza, M. 2010. Determinación de la efectividad del Timsen, Hipoclorito de sodio al 2.6% e hidróxido de sodio

Referencias Bibliográficas

- al 0.1N en la limpieza de conductos radiculares. *Revista Odontológica Latinoamericana*.2 (1): 19-23.
- and dust borne microorganisms in selected Polish libraries and archives. *Building and Environment*, 46:1872-1879.
- and meteorological factors. . *Aerosol Science and technology*, 32, 59-68.
- Ansari, N., Khan, M., Muheet, A., 1990. Evaluation of some fungicides for seed treatments and foliar application in management of damping-off seedlings and blight of rapeseed caused by *Alternaria brassicae*. *Mycopathologia* 110, 163–167.
 - Aspergillus species in cultural institutions at Havana University. *Grana*, 41: 190e-193e.
 - Babayi, H.; Kolo, J.; Okogun, I.; Ijah, J. 2004. The Antimicrobial Activities of Metanolic Extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* Against Some Pathogenic Microorganisms. *BIOKEMESTRY*. **vol. 16**(2): 106 - 111.
 - Ballard, Mary W. y Norbert S.Baer. 2001 .Ethylene Oxide Fumigation : Results and Risk Assessment ., *Restaurator* 7 (1986): 143-168.
 - Beck, I. 1992. Manual de Conservación de documentos. Archivo General de la Nación. México D. F. México. 97p.
 - Borrego, S. 2009b. Factores externos que influyen en el deterioro del patrimonio documental. En: *Conservación preventiva en archivos y bibliotecas*. Bergaglio C., Pené M. (eds). 1ra. Ed. La Plata: Instituto Cultural de la Provincia de Buenos Aires, pp. 67-124.
 - Borrego, S., García, M. 2011. Comportamiento de la concentración microbiana aérea en la Fototeca del Archivo Nacional de Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42: 61-67.
 - Borrego, S., Guiamet, P., Gómez de Saravia, S., Battistoni, P., García, M.,
 - Borrego, S., Perdomo I., Guiamet P., Gómez S. 2010 b: Study of the microbial concentration in the air in repositories of the National Archive of Cuba. *AUGMDOMUS*, 1:114-133.

Referencias Bibliográficas

- Borrego, S., Pons, V., Perdomo, I. 2008. La contaminación microbiana del
- Browning, B. 1969. Analysis of paper. 1ª Edición. Marcel cade, INC. New cad. Estados Unidos. 80p.
- Buffet-Bataillon, S.; Branger, B.; Cormier, M.; Bonnaure-Mallet, M.; Jolivet-Gougeon, A 2011. Effect of higher minimum inhibitory concentrations of quaternary ammonium compounds in clinical E. coli isolates on antibiotic susceptibilities and clinical outcomes. *Journal of Hospital Infection.*, 79 (2): 141-146.
- Caneva, G. et al.1991. Biology in the conservation of Works of art. ICCROM: Internacional Centre for the study of the Preservation and Restoration of Cultural Property. Roma, Italy.
- Canhoto, O., Pinzari, F., Fanelli, C., Magan, N., 2004. Application of electronic nose technology for the detection of fungal contamination in library paper. *International Biodeterioration y Biodegradation* 54, 303–309.
- Cappitelli F, Pasquariello G, Tarsitani G, Sorlini C. 2010. Scripta manent? Assessing microbial risk to paper heritage. *Trends in Microbiology* 18(12)538-542.
- Cappitelli F, Sorlini C. 2010. Paper and Manuscripts. In: Cultural Heritage Microbiology: Fundamental Studies in Conservation Science. Mitchell R, McNamara CJ (eds). ASM Press, Washington, USA, pp 45-59
- Chingduang S, Siriacha P y Saito M. 1995. Effect of some plants and spices on growth of fungi. P143-153. En: Chiraporn Aranyanak, Chalit Singhasiri (Eds.) *Proceeding of the Third International Conference on Biodeterioration of Cultural Property, Bangkok, Thailand*. Office of Archeology and National Museums, Conservation Science Division, Bangkok: 718 p.
- Ciferri, O. 1999. Microbial degradation of paintings. *Applied and Environmental Microbiology.*, 879-885.
- Conservaplan 1998. Documentos para conservar. *Catalogo de Conservación del papel de American Institute Conservation. Biblioteca*

Referencias Bibliográficas

- Nacional de Venezuela*. Caracas.Venezuela: Instituto Autónomo Biblioteca Nacional.
- CONSERVAPLAN, 1998. Documentos para conservar. Catálogo de conservación de papel del American Institute Conservation. Biblioteca Nacional de Venezuela. Instituto Autónomo Biblioteca Nacional. Caracas, Venezuela. Fascículo 2 Número 14.
 - contaminantes en bienes culturales. Boletín Patrimonio y Desarrollo, 9: 3-4.
 - Cuenca, 2006. Evaluación de tres materiales químicos como fungicidas y su efecto sobre algunos papeles y tintas. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial.
 - Cuenca-Osorio, 2006. Evaluación de tres materiales químicos como fungicidas y su efecto sobre algunos papeles y tintas. Tesis de Pregrado. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Carrera de Microbiología industrial. Bogotá D. C.
 - CYTED, 2002. Jornadas sobre prevención y protección del patrimonio cultural iberoamericano de los efectos del biodeterioro ambiental. Editora H. A. Videla. Buro Grafik. Argentina.
 - CYTED, 2002. Prevención y protección del patrimonio cultural iberoamericano de los efectos del biodeterioro ambiental. Editores H. A. Videla y L. K. Herrera. Medellín, Colombia.
 - Daferera DJ, Ziogas BN y Polissiou MG. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants. and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chemistry*, 48: 2576-2581.
 - de hongos en bibliotecas de la Universidad de Carabobo, Valencia.
 - Dhawan S. 1995. Essential oil for preservation of mould growth on palm leaf manuscripts. P 272-282. En: Aranyanak C., Singhasiri C. (Eds.) *Proceeding of the Third International Conference on Biodeterioration of Cultural Property, Bangkok, Thailand*. Office of Archaeology and National Museums, Conservation Science Division, Bangkok: 718 p.
 - EMLab. A technical Newsletter for IAQ Professionals.

Referencias Bibliográficas

- Environments. Assessment of Health Risks. Work conducted by a WHO
- Espinosa, R. 2004. Respuesta in vitro de los hongos *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* frente a extractos naturales. Tesis de Diploma. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas Santa Clara.
 - Espinosa, R. 2012. Efecto alelopático de *Terminalia catappa* L. sobre los hongos fitopatógenos del suelo *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.
- Expert Group between 2000-2003.
http://www.ilaqh.qut.edu.au/Misc/BIOLOGICAL_AGENTS_2009.pdf.
- Fichas Internacionales de Seguridad Química, ICSC: 1584, CLORURO DE BENZALCONIO, 2006.
 - Flórez, C y Russi, A. 2000. Evaluación de agentes antimicrobianos sobre microorganismos aislados a partir de documentos de carácter histórico. Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá D. C.
 - Florian, M.L.E. 2004. Fungal facts. Solving fungal problems in heritage collections. Archetype Publications Ltd., London, UK.
 - Forsythe, S. J y Hayes, P. R. 2002. Higiene de los Alimentos, Microbiología y HACCP. 2ª Edición. Editorial Acribia S. A. Zaragoza España. 489p.
 - Gallo, F. 1985. Biological factors in deterioration of paper. Facteurs biologiques de deterioration du papier. Roma ICCROM: Sintesi Grafica s.r.l., p. 129-143.
 - Gallup D. 2006. (Chairman). Fungal library. The Environmental Reporter
 - Garcés, J. A. Y Urbina, P. A 2001. Aislamiento y caracterización de hongos causantes de biodeterioro en libros encuadernados a partir de cuero y

Referencias Bibliográficas

pergamino de patrimonio documental procedente del Archivo General de la Nación. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología industrial.

- Górný, R.L. 2004. Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air: A review. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 11: 185–197.
- Guerrero, M. 2003. Conservación de Archivos: Recomendaciones que se deben tener en cuenta para la higienización de depósitos de Archivo. (en línea): Archivo de Bogotá. Bogotá. D. C. – Colombia. <http://www.alcadiadogota.gov.co/archivo/HTML/conservacionarchivos.htm>. (Consulta: 1 de Febrero de 2006).
- Guíamet PS, Gómez de Saravia S, Arenas P, Pérez ML, de la Paz J y Borrego SF. 2006. Natural products isolated from plants used in biodeterioration control. *Pharmacologyonline*, 3: 534-544.
- Heisey RM y Gorman BK. 1992. Antimicrobial effects of plant extracts on *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* and other microorganisms. *Letters in Applied Microbiology*, 14: 136-139.
- Hernández, J. 2001. Identificación de hongos causantes de deterioro en documentos históricos, depósitos de almacenamiento y posibles estrategias para su control, en Archivo General de la Nación. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Hernández, M.; García, L.; Rojo, D. 2003. Alemendro de la India: potencial biológico valioso. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* vol. 22(1): 15 -19. <http://servicio.cid.uc.edu.ve/fcs/vol3n1/3estu.pdf>. <http://www.emlab.com/app/fungi/Fungi.po>
- J. Henk, J. Porck. 2000. "Rate of paper degradation. The predictive value of artificial aging tests". European Commission on Preservation and Access, Amsterdam.
- Jimenez, Y. 2004. Respuesta de los hongos fitopatógenos del suelo *Phytophthora nicotianae var parasitica* Water y *Rhizoctonia solani* Kühn

Referencias Bibliográficas

- ante la aplicación de diferentes extractos naturales de origen vegetal. Tesis de Diploma. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara.
- Kagan, B. M. 1984. Tratamientos con antimicrobianos. 3ª Edición. Nueva Editorial Interamericana. México D. F. México. 490p.
 - Karbowska-Berent, J., Górný R.I., Strzelczyk A.B., Wlazło A. 2011. Airborne
 - Kirk, R. E y Othmer, D. F. 1998. Enciclopedia de Tecnología Química. Primera edición en Español Tomo II: Alizarina – Azufre. Unión Tipográfica Editorial Hispano- Americana. México D.F., México. 1027p.
 - Koneman, E. 2001. Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas de color. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1432p.
 - Kuhn, D. M., M. A. Ghannoum. 2003. Indoor mold, toxigenic fungi, and Lavín, P., Perdomo, I. 2010 a. The quality of air at archives and the biodeterioration of photographs. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64: 139-145.
 - Lin, W. H. y Li, C. S. 2000. Associations of of fungal aerosols, air pollutants
 - Marriot PJ, Shellie R y Cornwell Ch. 2001. Gas Chromatographic technologies for the essential oils. *Journal of Chromatography A*, 936: 1-22.
 - Martínez, P. 2003. Determinación de la acidez producida por hongos
 - Martínez, P. y Mansur, A. 1999. Revista Contacto. AGN. N8. Colombia.
 - Massy, V. 2000. Estudio y evaluación de tintas aplicadas en la conservación del Papel. Tesis de Pregrado. Universidad Externado de Colombia. Facultad de Restauración de Bienes Inmuebles. Bogotá D. C.
 - Mateus y colaboradores 2004. Seguimiento y Control de Biodeterioro Microbiológico en Documentos de Interés Histórico en el Archivo general de la Nación. Pontifica Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
 - Maynor, C. 1998. Catálogo de conservación de papel del American Institute Conservation. EX LIBRIS. Caracas. P 20, 47.
 - Medina, L., Tuozoo, A., Herrera, J., Perozo, Y., Gonzáles, L. 2008. Estudio

Referencias Bibliográficas

- Merlano, A. M y Rincón, M. C. 1999. Evaluación del efecto fungicida de tres compuestos químicos frente a hongos aislados e identificados en una planta procesadora de productos congelados. Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Carrera de Bacteriología. Bogotá, D.C.
 - NCCLS M38-A, Método de Referencia para Pruebas de Dilución en Caldo para la Determinación de la Sensibilidad de Hongos Filamentosos en la Terapia Antifúngica.
 - Nevalainen, A., Morawska, L. (eds). 2009. Biological Agents in Indoor
 - NORMA TAPPI. T430 om-52. 1952. Copper Number of paper and paperboard.
 - NORMA TAPPI. T453 om-89. 1989. Effect of fry heat on properties of paper.
 - Olivero, A. I. 2004. *Clases magistrales de Microbiología Industrial para VIII*
 - P. M. Arenas, S. G. Gómez de Saravia, P. Guiamet, J. de la Paz, S. Borrego. "Plantas con actividad biocida de aplicación en el control del biodeterioro que afecta al patrimonio cultural", Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas, vol. 6, pp. 323 – 324. 2007.
- parque arqueológico de San Agustín-Huila. Colombia. Revista Geconservación, 2: 65-80.
- Peña, G y Zambrano, S.A. 2003. Evaluación de tratamientos de desinfección aplicados mediante procesos de nebulización y aspersion sobre soportes de papel afectados por hongos. Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá D. C.
 - Pinzari F, Montanari M, Michaelsen A, Piñar G. 2010. Analytical protocols for the assessment of biological damage in historical documents, COALITION No. 19, 6-13, Vargas-Angel, CA. 2011. Evaluación y selección de productos para el control del biodeterioro en los fondos históricos de la biblioteca nacional de colombia. Conservamos. Guía Técnica de Preservación de Bibliotecas. 6 (6):1-52.

Referencias Bibliográficas

- Rakotonirainy MS y Lavédrine B. 2005. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55: 141-147.
- Ramos, J. 2014. Diagnóstico del biodeterioro por insectos y hongos de documentos patrimoniales de la Biblioteca Provincial Martí de Villa clara, Cuba
- Robaina, M. 2004. Respuesta de los hongos fitopatógenos del suelo *Sclerotium rolfsii* Sacc.y *Fusarium oxysporum* Slecht. ante la aplicación de diferentes extractos naturales de origen vegetal. Tesis de Diploma. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara.
- Rodríguez Jimenez , J. 1970. Los Controles en la Fabricación del papel, Broma, Madris.359p.
- Rojas, T.I., Martínez, E., Gómez, Y., Alvarado, Y. 2002. Airborne spores of
- Sánchez Hernamperez, A. Políticas de conservación en bibliotecas. Madrid: Arco libros S.L., 1999. ISBN: 84-7635-393-6.
- Saravia, S., Sofía Borrego, Paola Lavin , Oderlaise Valdés, Isbel Vivar, Patricia Battistoni, Patricia Guiamet (productos ambientalmente amigables de origen vegetal empleados en el control de microorganismos intervinientes en el biodeterioro del patrimonio cultural vii Congreso de Medio Ambiente /AUGM. Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM 22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata. Argentina.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT y Rehder VLG. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 275-280.
Semestre., Pontificia Universidad Javeriana.
- Singh KV y Shukla NP. 1984. Activity on Multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. *Fitoterapia*, 55:313-315.

Referencias Bibliográficas

- Smith, A. 1991. Cellulose in paper and textiles: The common ground. The Scottish society for conservation and restoration (SSCR). Edimburgo, Escocia. 98p.
- Someillán, M., Gómez, A. y González, G. 2006. Aspectos teóricos y conceptuales útiles para el diseño e implementación de una política de conservación preventiva. . *Acimed.*, 14, 6-12.
Stachybotrys chartarum: infectious disease perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 144-172.
- Stampella P, Arenas PM, López A, Borrego S, Vivar I y Cabrera N. 2010. Plantas útiles en el control de insectos bibliófagos. P 416-420. En: Pochettino ML, Ladio A, Arenas PM (Eds.), *Tradiciones y transformaciones en etnobotánica*. CYTED Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, SS de Jujuy, Argentina, 561 p.
- Sterflinger K. 2010. Fungi. Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews* 24:47-55. Combined deacidification and biocide mass treatments: new prospects. - J.R.Mendo. Enbotraîne Conference. Gante (Bélgica).
- Sykes, G. 1978. Disinfection and Sterilization. Editorial Chapman. London, England. 486p.
- Vaillant, M., Doménech, M.T.; Valentín, N. 2004. Una mirada hacia la conservación preventiva del patrimonio cultural. Ed. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. pp.322.
- Valentín, N. 2003. "Biodeterioro. Infestaciones y su erradicación" En Retablos. Bienes Culturales. Ed. IPHE. Nº 2: 175-186.
- Valls I Subirá, O. 1986. La Conservación del papel. Barcelona: Imprenta Juvenil, S.A.
- Vergara, J. 2002. Conservación y Restauración de material cultural en Archivos y Bibliotecas.
- Villalba, L.S., Malagón, A. 2011. Biodeterioro de la fuente de Lavapatás,

Referencias Bibliográficas

- Villamizar, M. 1996. Estudio de envejecimiento acelerado en pulpas encoladas. Tesis de Pregrado. UIS. Facultad de Ciencias Físico-químicas. Carrera de Ingeniería Agrónoma. Bucaramanga.
- Vives, J., Monmany, J., Guerra, R., 2004. Non-destructive method for alkaline reserve determination in paper – diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy. *Restaurator* 25, 47–67.
- Wildbrett, G. 2000. Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 349p.

ANEXOS

Anexo I. Preparación de las soluciones de los desinfectantes para la evaluación del crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con diferentes mezclas y evaluación de la eficacia de las mezclas en el tratamiento del papel contaminado.

- **Solución de Benzalconio al 0.5%**

Benzalconio	1.05 mL
-------------	---------

H ₂ O	20 mL
------------------	-------

- **Solución de Cetrimide al 0.5%**

Cetrimide	0.5 g
-----------	-------

H ₂ O	100 mL
------------------	--------

- **Solución de Cetrimide al 0.25%**

Cetrimide 0.5%	10 mL
----------------	-------

H ₂ O	10 mL
------------------	-------

Anexo II. Soluciones para el índice de cobre

- **Solución molibdofosfórica:**

Molibdato de amonio	2.5 gramos
---------------------	------------

H ₃ PO ₄	1.8 mL
--------------------------------	--------

H ₂ SO ₄	6.8 mL
--------------------------------	--------

H ₂ O	43.75 mL
------------------	----------

- **Solución de sulfato de cobre:**

CuSO ₄	10 gramos
Agua destilada	100 mL

- **Solución de bicarbonato/carbonato:**

Na ₂ CO ₃	25.8 gramos
NaHCO ₃	10 gramos
Llevar a	200 mL

- **Solución de carbonato:**

NaHCO ₃	10 gramos
Agua destilada	200 mL

- **Solución de permanganato de potasio:**

KMnO ₄	0.07895 gramos
Agua destilada	500 mL

Anexo III. Prueba Determinación del índice de cobre

Tabla 4. Tabla de prueba de normalidad para el índice de cobre

	Pruebas de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Cobre	,213	72	,000	,922	72	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

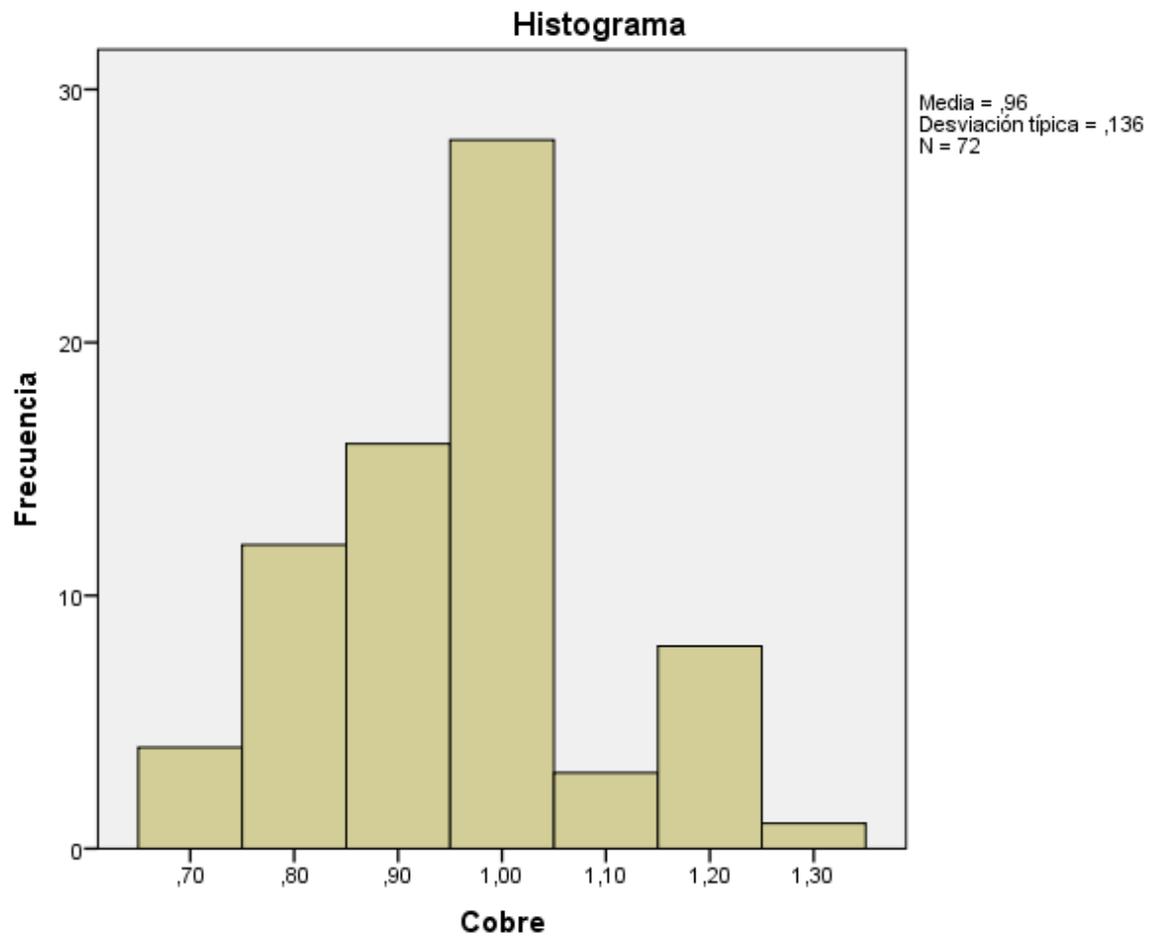


Figura 17. Histograma de prueba de la normalidad

Tabla 5. Prueba de Kruskal-Wallis para el índice de cobre teniendo en cuenta los años, tipo de soporte y tratamiento.

Estadísticos de contraste ^{a,b}			
Años	Papel		Cobre
Sin envejecimiento	Bond	Chi-cuadrado	6,557
		gl	2
		Sig. asintót.	,038
	Periódico	Chi-cuadrado	1,810
		gl	2
		Sig. asintót.	,405
25 años	Bond	Chi-cuadrado	6,000
		gl	2
		Sig. asintót.	,050
	Periódico	Chi-cuadrado	2,373
		gl	2
		Sig. asintót.	,305
50 años	Bond	Chi-cuadrado	6,742
		gl	2
		Sig. asintót.	,034
	Periódico	Chi-cuadrado	6,150
		gl	2
		Sig. asintót.	,046
75 años	Bond	Chi-cuadrado	6,788
		gl	2
		Sig. asintót.	,034
	Periódico	Chi-cuadrado	4,361
		gl	2
		Sig. asintót.	,113

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Tratamiento

Tabla 6. Prueba de Kruskal-Wallis para el índice de cobre teniendo en cuenta el tipo de soporte

Estadísticos de contraste ^{a,b}		
Papel		Cobre
Bond	Chi-cuadrado	16,846
	gl	2
	Sig. asintót.	,000
Periódico	Chi-cuadrado	5,935
	gl	2
	Sig. asintót.	,051

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Tratamiento

Tabla 7. Prueba de de Mann-Whitney para el índice de cobre teniendo en cuenta el los soportes sin tratar y

los tratados con cloruro de benzalconio

Estadísticos de contraste ^a		
Papel		Cobre
Bond	U de Mann-Whitney	11,000
	W de Wilcoxon	89,000
	Z	-3,647
	Sig. asintót. (bilateral)	,000
	Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,000 ^b
	U de Mann-Whitney	34,500
Periódico	W de Wilcoxon	112,500
	Z	-2,294
	Sig. asintót. (bilateral)	,022
	Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,028 ^b

a. Variable de agrupación: Tratamiento

b. No corregidos para los empates.

Tabla 8. Prueba de de Mann-Whitney para el índice de cobre teniendo en cuenta los soportes sin tratar y los soportes tratados con cetrimide

Estadísticos de contraste ^a		Cobre
Papel		
Bond	U de Mann-Whitney	71,000
	W de Wilcoxon	149,000
	Z	-,060
	Sig. asintót. (bilateral)	,952
	Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,977 ^b
Periódico	U de Mann-Whitney	42,000
	W de Wilcoxon	120,000
	Z	-1,796
	Sig. asintót. (bilateral)	,072
	Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,089 ^b

a. Variable de agrupación: Tratamiento

b. No corregidos para los empates.

Tabla 9. Prueba de de Mann-Whitney para el índice de cobre teniendo en cuenta los soportes tratados con cloruro de benzalconio y con cetrimide

Estadísticos de contraste ^a		Cobre
Papel		
Bond	U de Mann-Whitney	14,500
	W de Wilcoxon	92,500
	Z	-3,469
	Sig. asintót. (bilateral)	,001
	Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,000 ^b
	U de Mann-Whitney	65,000
Periódico	W de Wilcoxon	143,000
	Z	-,441
	Sig. asintót. (bilateral)	,659
	Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,713 ^b

a. Variable de agrupación: Tratamiento

b. No corregidos para los empates.