

Control y Prevención del Biodeterioro del Papel Utilizando Extractos Naturales

Sandra Gómez de Saravia, José de la Paz, Paola Lavin, Patricia Battistoni y Patricia Guiamet

Resumen

*El biodeterioro del papel es un fenómeno complejo que implica alteraciones de las propiedades físico-químicas y mecánicas por acción de organismos biológicos. Esto causa generalmente pérdida de las propiedades estéticas y degradación irreversible de los documentos. La intensidad del biodeterioro está en función de la composición química del soporte, de las condiciones ambientales y el organismo asociado. Tradicionalmente se han utilizado sustancias químicas para la prevención rutinaria del biodeterioro y en respuesta a la infestación observada. Sin embargo no siempre estos químicos lo previenen y su aplicación no corrige el daño ya ocasionado. En la actualidad los químicos son cada vez menos usados por el riesgo que éstos representan sobre la salud del personal que los aplica, el material y el daño al medioambiente que pueden provocar. Por consiguiente, la elección de un producto para el control y prevención del biodeterioro está cada vez más restringida. El objetivo de este trabajo fue estudiar el control y la prevención del biodeterioro del papel utilizando extractos etanólicos obtenidos de *Eucalyptus citriodora* Hook y *Pinus caribaea* Morelet. Para las experiencias se utilizaron papeles envejecidos impregnados con los diferentes extractos. Estos se ensayaron en presencia de un cultivo de *Bacillus* sp, el cual fue aislado de material de archivo. Luego de 5, 24 y 48 horas los papeles se observaron en el microscopio electrónico de barrido (MEB) con el fin de evaluar el efecto de los extractos sobre la contaminación bacteriana. Paralelamente, se valoró el efecto de los extractos sobre la acidez del papel. Las variables evaluadas fueron reserva alcalina y pH, antes y después del envejecimiento artificial por calor seco. Los extractos obtenidos no modificaron la acidez de los papeles sometidos a envejecimiento artificial bajo nuestras condiciones experimentales. Se observó una disminución de la adherencia bacteriana en los papeles tratados con los extractos. Estos estudios indican que es favorable el uso de los extractos naturales en el control del biodeterioro del papel.*

Patrimonio Cultural

Palabras clave: *Bacillus* sp. - Biodeterioro - Envejecimiento artificial - Extractos naturales - Permanencia del papel.

Introducción

El acervo documental considerado de interés nacional, custodiado en archivos o museos, está expuesto permanentemente a sufrir alteraciones físicas, químicas y/o biológicas. Los deterioros biológicos, causados por los microorganismos como consecuencia de colonizaciones puntuales y de la utilización del papel como fuente de carbono y energía, ocasionan cambios no deseados en las propiedades del material. En la colonización y degradación del soporte papel, interactúan diferentes poblaciones microbianas, bacterias, hongos y actinomicetes. El papel compuesto de fibras vegetales, aditivos funcionales (encolantes, carga, abrillantadores ópticos, agentes consolidantes) y tintas con aglutinantes orgánicos, es vulnerable a factores abióticos y bióticos. Los microorganismos, principales agentes bióticos utilizan el papel como fuente nutricional, haciendo uso de sus complejos sistemas enzimáticos (glucanasas y proteasas), ayudados por las condiciones micro y macroclimáticas del ambiente ^[1].

Bacillus sp., puede atacar la celulosa, el pergamino y las colas provocando el deterioro de los documentos debido a la producción de metabolitos tales como amilasas, celulasas, N-acetil B-glucosaminidasa, ácido láctico y fosfatasa ácida, que causan descenso de pH y origina manchas violáceas o rojizas y quebrantes del papel ^[2, 3]. Tradicionalmente se han utilizado sustancias químicas para la prevención rutinaria del biodeterioro del papel y como respuesta a la infestación observada. Sin embargo no siempre estas sustancias químicas lo previenen y su aplicación no corrige el daño ya ocasionado. En la actualidad los químicos son cada vez menos usados por el riesgo que éstos representan sobre la salud del personal que los aplica, el material y porque pueden contaminar el medioambiente. Por consiguiente, la elección de un producto para el control y prevención del biodeterioro está cada vez más restringida debido a los rigurosos requerimientos de las agencias de control y preservación ^[4,5,6]. Muchos extractos aislados de plantas, pueden actuar como antimicrobianos funcionando como reguladores del metabolismo intermediario, activando o bloqueando reacciones enzimáticas, afectando directamente una síntesis enzimática o alterando estructuras de membranas ^[7]. El objetivo de este trabajo fue estudiar el control y la prevención del biodeterioro del papel utilizando extracto fluido obtenido de *Eucalyptus citriodora* Hook y tintura de *Pinus caribaea* Morelet. Paralelamente, se valoró el efecto perjudicial de los extractos sobre la permanencia del papel. Las variables evaluadas fueron reserva alcalina y pH, antes y después del envejecimiento artificial por calor seco.

Materiales y métodos

Material vegetal y obtención de extractos

Se emplearon hojas adultas de dos especies de plantas medicinales que crecen en la provincia de La Habana, Cuba, *Eucalyptus citriodora* Hook y *Pinus caribaea* Morelet. Para la obtención de los extractos y tinturas se siguió la metodología establecida por el Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba para productos naturales ^[8,9]. Primero fueron filtrados por gasa doble para eliminar partículas gruesas y posteriormente a través de papel de filtro Whatman No. 1 (Whatman, Inglaterra). Finalmente, fueron esterilizados por filtración utilizando membrana Millipore de 0.22 µm. ^[10].

Toma de muestras, aislamiento e identificación de los microorganismos

Las muestras se tomaron con hisopos estériles de las superficies de papel fotográfico del Archivo Histórico del Museo de La Plata, Argentina. Posteriormente, fueron homogeneizadas en 10 mL de solución salina fisiológica estéril, y se sembraron en cápsulas de Petri a través de la técnica de recuento en placa con diferentes medios de cultivo ^[11, 12]. Se aislaron diferentes especies de bacteria y hongos. En este trabajo *Bacillus* sp. fue empleado en los diferentes ensayos.

Ensayos de adherencia de *Bacillus sp.* sobre papel

Se utilizaron papeles envejecidos impregnados con extracto fluido de *Eucalyptus citriodora* Hook, tintura de *Pinus caribaea* Morelet y papel sin impregnar (control).

Se utilizó un inóculo que correspondió al tubo 3 de la escala de Mc Farland (1×10^6 UFC/mL), y se sembró 1 mL de esta suspensión en una placa de Petri. Luego de 24 hs. se colocaron los papeles de 0,5 x 0,5 cm en las placas. Los papeles (2) colocados en cada placa se retiraron a diferentes tiempos: 5hs, 24 hs y 48 hs. Uno de ellos fue destinado para recuento de bacterias y el otro se utilizó para su observación en el microscopía electrónico de barrido. Previamente se enjuagaron con agua destilada, para quitar el excedente de agar y las bacterias no adheridas al papel. El papel que fue observado en el MEB se dejó secar a temperatura ambiente y el papel destinado para recuento se sumergió en solución fisiológica, se agitó levemente y se hicieron diluciones 1:10 que se sembraron en placas de Petri con agar nutritivo para su recuento. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

Estudio de acidez de papel

Las variables predictivas usadas fueron: contenido mínimo de carbonato cálcico que neutraliza la acción de los ácidos, medida según la reserva alcalina ^[13] y el pH. Este último se midió con un electrodo de membrana plana acoplado a un pH-Metro de precisión (Metrohm 780, Suecia). Ambas determinaciones se realizaron antes y después del envejecimiento acelerado.

El método de envejecimiento acelerado empleado fue el descrito por Browning, 1969 ^[14] que utiliza el calor seco a 100°C durante 72 horas para predecir efectos en aproximadamente 25 años a temperatura ambiente y se apoya en la ecuación de Arrhenius.

Los extractos se aplicaron con la ayuda de una pipeta automática Eppendorf, hasta la saturación de las tiras de papel de 2 cm² (Papel Archive Text. Ref. 678-70A4). Un control con agua destilada y otro con solución de etanol al 70% fueron incluidos. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

Análisis estadístico

Para detectar diferencias significativas entre los valores antes y después del proceso de envejecimiento se utilizó el Test t de Student. El nivel de significación se fijó en una p menor o igual que 0.05.

Resultados y discusión

El daño del material documental puede ser el resultado de una sucesión ecológica de microorganismos que en conjunto, biofilms o consorcios, potencian el deterioro de la documentación. La participación de los microorganismos en los procesos de biodeterioro del papel está dada en función de la composición química del material (fibroso y no fibroso), de los sistemas multienzimáticos eficientes del microorganismo para utilizar las diferentes fuentes nutricionales y de las condiciones ambientales. El género *Bacillus sp.* presentó el mayor recuento en el papel control. *Bacillus sp.* podría participar en el deterioro del papel, por la acción de sus enzimas celulasas y xilanasas hidrolizando el almidón, el cual es utilizado como encolante en la fabricación del papel, produciendo ácidos, los cuales con el tiempo aceleran el deterioro de la fibra celulósica ^[15]. Se observó una buena correspondencia entre los recuentos de *Bacillus sp.* y las fotos obtenidas en el MEB luego de la exposición por 48 hs de los papeles impregnados con extracto fluido de *Eucalyptus citriodora* Hook y tintura de *Pinus caribaea* Morelet.

Los recuentos fueron los siguientes:

- √ papel control: 220×10^3 UFC/cm²
- √ papel impregnado con *Eucalyptus citriodora* Hook: 170×10^3 UFC/cm² y
- √ papel impregnado con *Pinus caribaea*: 25×10^3 UFC/cm². Esta disminución en el número de bacterias también se observó en las fotos del MEB, donde podemos apreciar una menor adherencia bacteriana (Figura 1).

Patrimonio Cultural

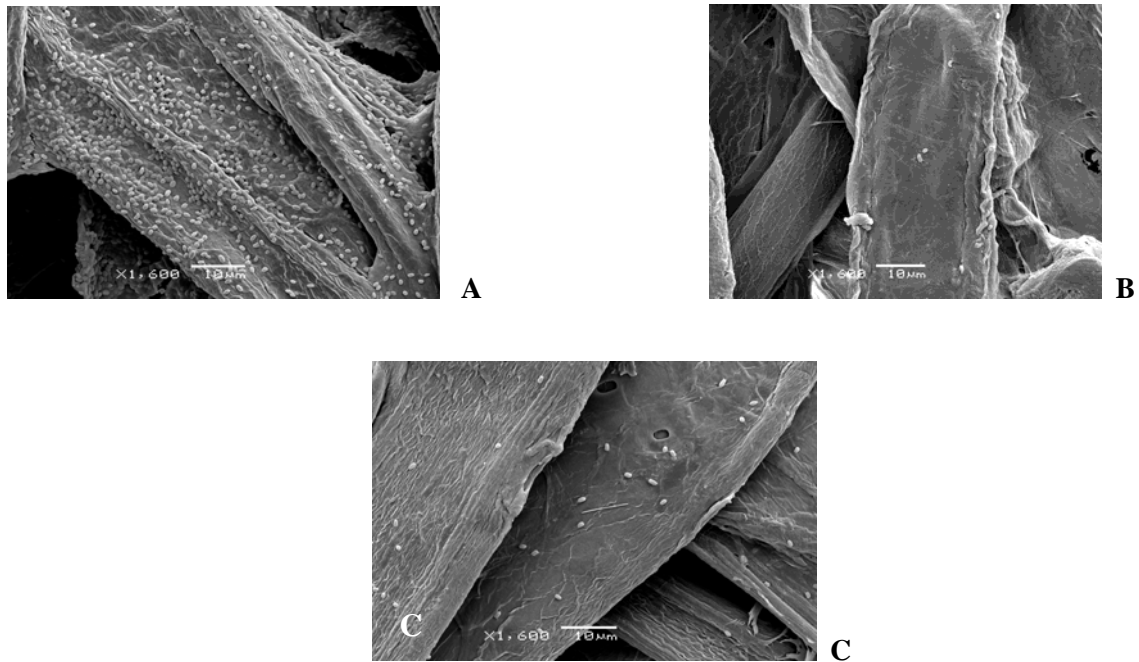


Figura 1. Fotografías de MEB: A papel control; B- papel envejecido impregnado con *Eucalyptus citriodora* Hook; C papel envejecido impregnado con *Pinus caribaea* Morelet

La acidez es una de las causas que más influyen en el deterioro del papel, tanto que existen normas basadas casi exclusivamente en la determinación de la acidez para predecir la permanencia. 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 hidroxilos negativa.

Por su parte, el contenido de carbonato cálcico en el papel, es esencial para neutralizar la acidez generada como resultado del envejecimiento natural o de la contaminación atmosférica. La *mínima reserva alcalina* permitida para considerar permanente a un papel es la equivalente a un 2% de carbonato cálcico de su peso en seco (mínimo de 0.4 moles de ácido por kilogramo) [16]. En este estudio, la reserva alcalina del papel empleado estuvo casi 100 veces por debajo del mínimo considerado. Lo que ponía a éste al desamparo en caso de generarse un fenómeno de acidificación provocado por los extractos aplicados. Sin embargo, según los resultados obtenidos, ni el pH ni la reserva alcalina variaron en grado estadísticamente significativo al realizar las comparaciones antes *vs.* después de someterse el papel, tratado con los diferentes extractos, al proceso de envejecimiento artificial (Tabla 1).

Tratamiento	Significación Estadística $p \leq 0.05$	
	Reserva Alcalina	pH
Agua destilada	0,725	0,475
Solución de etanol al 70%	0,822	0,725
Extracto fluido de <i>Eucalyptus citriodora</i> Hook	0,707	0,296
Tintura de <i>Pinus caribaea</i> Morelet	0,808	0,873

Tabla 1. Valores de significación estadística obtenidos según variable evaluada según el Test t para muestras pareadas

Un estudio similar con aceites esenciales obtenido de flores de *Lavandula angustifolia* fue desarrollado por Rakotonirainy y Lavédrine, 2005^[17]. En esta investigación las variables predictivas de daño empleadas fueron: pH (extracción en frío); factor de difusión de refractancia (brillo), y grado de polimerización viscosimétrica, y se midieron, igualmente, antes y después de un proceso de envejecimiento acelerado (temperatura 80°C y humedad relativa 65% por 21 días). Los resultados revelaron una reducción del pH de más de una unidad, pero no alteraron el brillo y grado de polimerización.

Conclusiones

Los extractos obtenidos de *Eucalyptus citriodora* Hook y *Pinus caribaea* Morelet, no modificaron la acidez en papeles sometidos a envejecimiento artificial bajo nuestras condiciones experimentales. El pH se mantuvo invariable y la escasa cantidad de reserva alcalina que tenía el papel empleado en el estudio no fue consumida. Este fenómeno debería haber ocurrido en el caso que se generara acidez como mecanismo compensatorio.

Se observó una disminución de la adherencia bacteriana en los papeles tratados con los extractos.

Este trabajo demuestra que el empleo de los extractos naturales en el control del biodeterioro del papel abre una opción promisoriosa y un campo de investigación en esta dirección.

Agradecimientos

Por el financiamiento recibido para la ejecución de esta investigación el autor cubano agradece al Programa de Ayuda al Desarrollo de Archivos de Ibero América (ADAI 105/2005 y ADAI 090E/2006); las autoras argentinas a la UNLP (11 N578 y 11X 560), CONICET (PIP 6075/05) y CICBA (578/08), y, autores cubano y argentinas, al Proyecto de colaboración CITMA – SECYT (CU/PA05-EX/025).

Referencias

Villalba, L.S. *et al.*

2004 Actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimática de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental del Archivo General de Colombia NOVA 2 (2): 50-57. [1]

Kraemer, G.

1973 Tratado de la previsión del papel y de la conservación de bibliotecas y archivos. Dirección General de Archivos y Bibliotecas: Madrid. 1001 – 1022. [2]

Vaillant, M. *et al.*

2003 Una mirada hacia la conservación preventiva del patrimonio cultural. Universidad Politécnica de Valencia: España. [3]

Arenas, P.M. *et al.*

2007 “Plantas con actividad biocida de aplicación en el control del biodeterioro que afecta al patrimonio cultural”, BL:ACPMA 6: 323 – 324. [4]

de la Paz, J. *et al.*

2006 “Control of biodeterioration using a fraction isolated from leaves of *Ricinus communis* Linn”, Pharmacologyonline, 3: 462 – 466. [5]

2007 “Biocidas naturales en el control del microbiodeterioro en archivos”. Taller sobre la Conservación del Patrimonio Documental y la Prevención contra Catástrofes en Países de Clima Tropical (Archivo Nacional de la República de Cuba). [6]

Patrimonio Cultural

Singh, K.V. *et al.*

1984 Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. *Fitoterapia.*; 55: 313-315. [7]

Norma Ramal N° 311.

1992 Extractos fluidos y tinturas. Procesos tecnológicos, MINSAP. Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba. 1992. [8]

Norma Ramal No. 312.

1992 Extractos y tinturas. Métodos de ensayo, MINSAP. Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba., 1992. [9]

Corral, A. *et al.*

1997 "Tamizaje, tecnología, control de calidad y farmacología del extracto fluido de *Bougainvillea spectabilis* Willd". *Rev Cubana Plant Med*, 2 (2-3): 19-25. [10]

Madigan, M.T. *et al.*

2004 Brock A. *Biología de los microorganismos*. 10ª edición. Pearson Educación, S.A., Madrid. [11]

Guiamet, P. *et al.*

2008 Differential sensitivity of *Bacillus* sp. isolated from archive materials to plant extracts. *Pharmacologyonline* 3: 649-658. [12]

Norma Española

1993 Papel y cartón. Determinación de la reserva alcalina. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). UNE 57-174-94 equivalente a ISO/ DIS 10716:1993. [13]

Browning, B.L.

1969 Analysis of paper, Chapter 24. New York: Marcel Dekker, INC. 314-317. [14]

Singh, A. *et al.*

1995 Microbial cellulases: protein architecture, molecular properties, and biosynthesis. *Advances in Applied Microbiology* 40: 1-44. [15]

Ivar, A.L.H.

1998 "Las normas para papel permanente". 64th IFLA General Conference. Ámsterdam. [16]

Rakotonirainy, M.S. *et al.*

2005 Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives stores areas. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55: 141-147. [17]

Sandra Gómez de Saravia^{1a}, José de la Paz², Paola Lavin^{1b}, Patricia Battistoni^{1b} y Patricia Guiamet^{1b}

¹Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA),

²Museo Ernest Hemingway. Finca Vigía. San Miguel del Padrón. Ciudad de La Habana Cuba. ^aComisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA). ^bConsejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

sgomez@inifta.unlp.edu.ar, delapazjn@yahoo.es, poli_lavin@yahoo.com.ar, pguiamet@inifta.unlp.edu.ar, patriciabattistoni@yahoo.com.ar