

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE VAPORES DE ACEITES ESENCIALES DE NARANJA, LIMÓN Y TORONJA PARA LA PRESERVACIÓN DE DOCUMENTOS

Lisette Estefanía Sarasti Espejo¹

RESUMEN

Se evaluó la actividad antifúngica de tres aceites esenciales comerciales de naranja, limón y toronja a diferentes concentraciones frente a los modelos biológicos de *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Cladosporium* spp. Hongos celulolíticos que se encuentran con mayor frecuencia en documentos resguardados en bibliotecas y archivos.

Durante las pruebas in vitro se pudo verificar que los aceites esenciales de limón y toronja lograron una inhibición de hasta el 70% de crecimiento micelial, a una concentración del 3%. Mientras que el aceite esencial de naranja, a esta misma concentración, inhibió casi por completo el crecimiento de estos hongos, llegando a más del 90% de efectividad, lo que dejó en evidencia un mayor potencial inhibitorio que los aceites antes mencionados. En función de estos resultados se decidió aumentar la concentración del aceite esencial de naranja a 4%, alcanzando una inhibición del 100% en las tres cepas de hongos.

Se utilizó la norma ASTM D2020-92 *Standard Test Methods for Mildew (Fungus) Resistance of Paper and Paperboard*, modificándola para la evaluación de las propiedades antifúngicas del aceite sobre el papel. El ensayo se realizó vaporizando el aceite esencial de naranja en papel de fibra de madera y papel de fibra algodón, para posteriormente colocarlos en un medio inoculado con el hongo correspondiente. Los resultados mostraron que este método de aplicación no funcionó para impedir el crecimiento de los microorganismos seleccionados en papel.

Palabras clave: aceites esenciales, cítricos, actividad antifúngica, hongos celulolíticos, control de microorganismos en papel.

¹ Consultora independiente. Quito, Ecuador. lissetesarasti@gmail.com

EVALUATION OF ANTIFUNGAL EFFECT OF ORANGE, LEMON AND GRAPEFRUIT ESSENTIAL OIL VAPORS FOR DOCUMENT PRESERVATION

ABSTRACT

The antifungal activity of three commercial essential oils –orange, lemon and grapefruit– was evaluated, at different concentrations, against biological agents *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. and *Cladosporium* spp., cellulolytic fungi frequently found in library and archival documents.

During the in vitro tests it was verified that the lemon and grapefruit essential oils achieved up to 70% of inhibition of mycelial growth, at a concentration of 3%. While the orange essential oil, at the same concentration, inhibited almost completely the growth of those fungi reaching more than 90% of effectiveness, showing a bigger inhibitory potential compared to the other oils. According to these results it was decided to increase the concentration of orange essential oil to 4%, resulting in a 100% of inhibition of the three strains of fungi.

The Standard Test ASTM D2020-92, *Methods for Mildew (Fungus) Resistance of Paper and Paperboard*, was modified to evaluate the antifungal properties of oil on paper. This test was carried out by spraying the orange essential oil on wood fiber paper and cotton fiber paper, then placing them in an inoculated Petri with the fungus. Results showed that this method of application does not work to prevent the growth of the selected microorganisms in paper.

Keywords: essential oils, citrus, antifungal activity, cellulolytic fungi, control of microorganisms in paper.

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIFUNGICO DE VAPORES DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE LARANJA, LIMÃO E TORANJA PARA A PRESERVAÇÃO DE DOCUMENTOS

RESUMO

Foi avaliada a atividade antifúngica de três óleos essenciais comerciais de laranja, limão e toranja em diferentes concentrações, contra modelos biológicos de *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Cladosporium* spp., fungos celulolíticos frequentemente encontrados em documentos guardados em bibliotecas e arquivos.

Durante os testes in vitro, verificou-se que os óleos essenciais de limão e toranja atingiram uma inibição de até 70% do crescimento micelial, a uma concentração de 3%. Enquanto o óleo essencial de laranja, na mesma concentração, inibiu quase por completo o crescimento destes fungos, atingindo mais de 90% de eficácia, o que evidenciou um maior potencial inibitório que os óleos supramencionados. De acordo com estes resultados, decidiu-se aumentar a concentração do óleo essencial de laranja a 4%, atingindo uma inibição de 100% nas três cepas de fungos.

Foi adotada a norma ASTM D2020-92, *Standard Test Methods for Mildew (Fungus) Resistance of Paper and Paperboard*, modificada para avaliar as propriedades antifúngicas do óleo sobre o papel. Este teste foi realizado pulverizando o óleo essencial de laranja em papel de fibra de madeira e papel de fibra de algodão e, em seguida, foram colocados num Petri inoculado com o fungo correspondente. Os resultados mostraram que este método de aplicação não funcionou para impedir o crescimento dos microrganismos selecionados em papel.

Palavras chaves: óleos essenciais, cítricos, atividade antifúngica, fungos celulolíticos, controlo de crescimento de microrganismos em papel.

INTRODUCCIÓN

Las condiciones ambientales son factores que influyen de modo directo en el ritmo de desarrollo de los microorganismos que producen múltiples alteraciones en los documentos, modificando su estructura (Copedé 2012).

El papel pierde fuerza, se torna laxo y poroso, a menudo con áreas de pérdida o adelgazamiento que son claramente visibles. Generan manchas de diferentes colores, causadas por procesos metabólicos, sustancias químicas, subproductos excretados y pigmentos presentes en la estructura misma del hongo (Lona 2009).

Estudios microbiológicos realizados en archivos y bibliotecas de Colombia, Cuba, España e Italia identificaron los siguientes géneros de hongos: *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp. (Valentín et al. 1996).

Moctezuma Zárate et al. (2015) aislaron de una biblioteca universitaria un total de 787 colonias, 90,34% de hongos filamentosos y 9,66% de levaduras. Los géneros aislados con mayor frecuencia fueron *Cladosporium* spp. (52,99%) y *Penicillium* spp. (13,34%).

Investigaciones realizadas en el archivo y biblioteca del conjunto conventual San Francisco de Quito (2015) identificaron a los géneros *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Cladosporium* spp. en documentos y libros. Estos datos concuerdan con el catálogo del

American Institute for Conservation (Centro Nacional de Conservación de Papel [CNCP] 1998 [1994]) que determina que entre los géneros más comunes se encuentra el *Penicillium* spp., el *Cladosporium* spp. y el *Aspergillus* spp., como los hongos celulolíticos principales en la degradación del papel.

Por tales razones se ha venido utilizando durante décadas productos de síntesis química, tales como el óxido de etileno, timol, ortofenilfenol o el pentaclorofenol, para detener el deterioro causado por estos microorganismos (Baynes-Cope 1972).

Estos fungicidas con un poder de alcance suficiente para lograr una mortalidad del 99% de los hongos, son también tóxicos para el hombre (Valentín [s.f.], CNCP 1998 [1994]). El Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH) de Estados Unidos los ha catalogado como cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos, causantes de alteraciones en funciones metabólicas y de reproducción, por lo que han sido prohibidos y restringidos en varios países.

El pentaclorofenol, por ejemplo, se encuentra prohibido como plaguicida en todas sus formulaciones y usos en algunos países de Latinoamérica y de Europa (Observatorio Latinoamericano de Conflictos Ambientales [OLCA] 1998, Pesticides Action Network UK [PAN] 2009).

El uso del óxido de etileno se encuentra restringido en la Unión Europea, y en Ecuador y Perú se prohíbe su registro, importación, formulación local,

distribución y comercialización, así como de sus derivados y compuestos que con ellos se pudieran formular (PAN 2009).

Estudios realizados por Valentín et al. (2002) y el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH), han demostrado además que estos productos ocasionan por lo general alteraciones físico-químicas de los materiales en los que son aplicados.

En la última década las investigaciones han puesto en evidencia el poder antimicrobiano de los aceites esenciales, en especial los extraídos de frutas cítricas (Schelz et al. 2006, Dao et al. 2008, Burt 2004). Aunque el mecanismo por el cual actúan no está totalmente determinado, se puede relacionar con la elevada cantidad de terpenos que poseen (Soto 2010) (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes volátiles principales de los aceites esenciales (modificada de Reyes Jurado et al. 2012: 31).

Main volatile components of essential oils (Adapted from Reyes Jurado et al. 2012: 31).
Componentes voláteis principais dos óleos essenciais (Adaptada de Reyes Jurado et al. 2012: 31).

Grupo Químico Funcional	Componentes	Grupo Químico Funcional	Componentes
Fenoles	Carvacrol	Cetonas	Alcanfor
	Eugenol		Carvona
	Timol		Alfa-tujona
Aldehídos	Citral	Ésteres	Acetato de linalilo
	Citronela		Salicilato de metilo
	Benzaldehído		Etil acetato
	Perilaldehído		Anetol
	Cinamaldehído		
Alcoholes	Terpenos	Hidrocarburos	Careno
	Borneol		Beta-cariofileno
	Mentol		Alfa-pineno
	Geraniol		Limoneno
	Linalol		
Alcoholes sesquiterpenos	Famecol	Éteres y óxidos	Metil timol
	Cedrol		Anetol, cineol

Estos compuestos tienen la capacidad de alterar y penetrar en los lípidos de la estructura de la pared celular, modificando la estructura química de los polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y permeabilizando las membranas (Hernández 2011).

Viuda et al. (2008) concluyeron que los aceites esenciales de limón, mandarina, toronja y naranja estudiados son capaces de reducir o inhibir el crecimiento de mohos como: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium verrucosum*. Por su parte, Coronel (2004) demostró que los vapores de aceites de limón y naranja son idóneos para controlar el crecimiento de mohos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*.

López et al. (2005) y Kloucek et al. (2012) señalaron que los mohos son más susceptibles al efecto antimicrobiano de los aceites esenciales en fase de vapor, siendo eficientes en concentraciones altas y tiempos cortos (Dao et al. 2008).

En virtud de lo anterior se propone un método preventivo para controlar la infección por hongos en bienes culturales con soporte de papel, realizando nebulizaciones con aceites esenciales cítricos, con la ventaja de que el producto permanezca más tiempo en el ambiente y penetre en todo el espacio del soporte (Bringas [s.f.], Ramírez 2011).

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Se utilizaron aceites esenciales (en lo sucesivo AE), elaborados comercialmente en Ambato, Ecuador, marca Isabrubotanik S.A., de naranja, limón y toronja contra cepas de *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Cladosporium* spp., las que fueron seleccionadas por ser los géneros que mayor incidencia tienen en la degradación celulolítica del papel.

Las muestras de estas cepas fueron tomadas durante el trabajo de investigación "Identificación microbiológica básica de los hongos presentes en el ambiente y en los bienes documentales del archivo y biblioteca del conjunto conventual de la orden franciscana, Quito" (Aguayo 2016).

Se analizó el tratamiento en dos tipos de papel que por lo general se encuentran en bibliotecas antiguas y archivos conventuales y contemporáneos: a) Papel artesanal de trapos y tejidos: se usó en este caso papel secante de algodón; y b) Papel industrial de pulpa de madera, correspondiente a una hoja de archivo elaborada hacia fines del siglo XIX.

Se utilizó agua destilada y suero fisiológico en los ensayos, además de agar papa dextrosa como medio de cultivo.

Determinación de la concentración inhibitoria

Se aplicó el método de difusión en agar descrito por Reyes Jurado et al. (2014), el cual sirve por lo general para determinar si el AE es letal contra un microorganismo.

En placas de Petri se agregó 20 ml de agar papa dextrosa (PDA), a las que se adicionó el aceite esencial de la siguiente manera: 0% (control), 1%, 2% y 3%, según concentraciones utilizadas en el trabajo de investigación de Alzate et al. (2009). Se mezcló el aceite en el agar hasta que formó una mezcla homogénea. Después de su solidificación los medios de cultivo se inocularon con los tres hongos seleccionados (una sola cepa de cada hongo). Se realizaron dos réplicas por cada tratamiento, obteniéndose un total de 54 ensayos (3 hongos x 3 AE x 3 concentraciones = 27 x 2 réplicas), a los que se suman los ensayos control para cada AE en función de las cepas en estudio (9 ensayos).

Las placas de Petri inoculadas se incubaron durante siete días a 25 °C, condiciones en las que usualmente se desarrollan estos microorganismos.

Cálculo del porcentaje de inhibición

Luego de observar el crecimiento de los modelos biológicos sometidos a las condiciones establecidas, se obtuvieron los diámetros de crecimiento después de siete días de desarrollo y se realizó el cálculo de porcentaje de inhibición de todos los tratamientos, usando la fórmula de Pandey et al. (1982).

$$\% \text{inhibición} = \frac{[\text{diámetro control (cm)} - \text{diámetro con AE (cm)}]}{\text{Diámetro control (cm)} \times 100} \quad [1]$$

Se consideró como variable dependiente del estudio el porcentaje de hongos inhibidos y como variables independientes el tipo de papel, el aceite esencial y la concentración.

Se llevó a cabo un análisis de varianza ANAVA, usando el programa Infostat, y se realizó la comparación entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey al 0,05 de significación.

Evaluación del efecto antifúngico del vapor del aceite esencial en el papel

Ninguna de las normas internacionales de estandarización, establecen métodos para analizar el grado de resistencia del papel a los microorganismos, mediante el uso de fungicidas.

Es por esto que se utilizó la norma ASTM D2020-92 *Standard Test Methods for Mildew (Fungus) Resistance of Paper and Paperboard* (Czichos et al. 2006), la que se modificó adicionando el método de aplicación por vaporización del aceite esencial *Citrus* en el papel, para determinar si los géneros de hongos seleccionados crecen sobre él.

Para el ensayo en papel se aplicó la concentración de AE que resultó más competente, a partir de su determinación inhibitoria.

Vaporización del papel

En un recipiente de vidrio se colocó el AE y en la tapa se colocaron los papeles recortados en forma de tiras de aproximadamente 6 x 8 mm, tamaño basado en las cintas MIC Test Strip² usadas para

cuantificar la concentración mínima inhibitoria en microorganismos.

Se cerró y se cubrió la unión entre la tapa y el recipiente con Parafilm™ para reducir la pérdida de compuestos (vapor) del AE, creando un microclima. Se colocó este recipiente por 30 min a 100 °C. Durante este tiempo el aceite esencial se evaporó casi en su totalidad, dejando en la base una película delgada de compuestos no volátiles. Se mantuvo el papel dentro del contenedor de vidrio, con los vapores del aceite esencial, durante 36 horas más.

Para determinar si este método afectaba las características físicas del papel, a nivel macroscópico, se evaluó el papel sin AE y con AE mediante un examen organoléptico.

Inoculación del medio de cultivo y del papel

Para inocular el medio se extrajo primero una muestra de cada una de las tres cepas de hongo y se colocó en una solución estéril de suero fisiológico en un tubo de ensayo para cada hongo. A partir de esta dilución se tomó 0,1 ml, y se inoculó toda la superficie del agar.

Luego se colocó una tira de cada tipo de papel, con el AE, en cajas de Petri de manera tal que estos tengan el suficiente espacio para ver la cinética de crecimiento de los microorganismos. Se realizó tres réplicas por cada tratamiento.

Se evaluó de la misma manera los papeles que no fueron expuestos al AE para tener una referencia del crecimiento sin el tratamiento, efectuando en cada caso tres réplicas (Tabla 2)

Análisis de la efectividad de los AE en el papel

Este análisis se basa en el diámetro del halo de inhibición formado alrededor de las tiras de papel,

² Tiras de plástico impregnadas con un gradiente de concentración predefinido de un antibiótico.

Tabla 2. Diseño experimental para la evaluación del efecto antifúngico del vapor de aceite esencial en papel.

Experimental design for the evaluation of the antifungal effect of essential oil vapor on paper.

Desenho experimental para avaliação do efeito antifúngico do vapor de óleo essencial sobre papel.

Ensayo	Nomenclatura	Concentración (%)	Papel	Patógeno
1	T1-R1P	1	Artesanal / Industrial	<i>Penicillium</i> spp.
2	T2-R2P	2	Artesanal / Industrial	<i>Penicillium</i> spp.
3	T3-R3P	3	Artesanal / Industrial	<i>Penicillium</i> spp.
4	T4-R1A	1	Artesanal / Industrial	<i>Aspergillus</i> spp.
5	T5-R2A	2	Artesanal / Industrial	<i>Aspergillus</i> spp.
6	T6-R3A	3	Artesanal / Industrial	<i>Aspergillus</i> spp.
7	T7-R1C	1	Artesanal / Industrial	<i>Cladosporium</i> spp.
8	T8-R2C	2	Artesanal / Industrial	<i>Cladosporium</i> spp.
9	T9-R3C	3	Artesanal / Industrial	<i>Cladosporium</i> spp.
10	T10- R1P Control	0	Artesanal / Industrial	<i>Penicillium</i> spp.
11	T11-R2P Control	0	Artesanal / Industrial	<i>Penicillium</i> spp.
12	T12-R3P Control	0	Artesanal / Industrial	<i>Penicillium</i> spp.
13	T13- R1A Control	0	Artesanal / Industrial	<i>Aspergillus</i> spp.
14	T14-R2A Control	0	Artesanal / Industrial	<i>Aspergillus</i> spp.
15	T15-R3A Control	0	Artesanal / Industrial	<i>Aspergillus</i> spp.
16	T16- R1C Control	0	Artesanal / Industrial	<i>Cladosporium</i> spp.
17	T17-R2C Control	0	Artesanal / Industrial	<i>Cladosporium</i> spp.
18	T18-R3C Control	0	Artesanal / Industrial	<i>Cladosporium</i> spp.

es decir, este crecimiento está en relación con el grado de sensibilidad del microorganismo. Así, halos pequeños sugieren que los microorganismos son resistentes al papel con los vapores del AE y halos grandes denotan sensibilidad ante el papel tratado.

RESULTADOS

Concentración inhibitoria

Como se puede apreciar en la Tabla 3, los microorganismos más sensibles frente al AE de naranja fueron los géneros *Penicillium* y *Cladosporium* inhibiéndose alrededor del 93% a la mínima concentración evaluada (1%), mientras que a concentraciones del 2% y 3% llegan a más del 96% de inhibición, actuando casi de la misma manera a las dos concentraciones. El género *Aspergillus* responde mejor a partir del 2%.

La evaluación de la actividad fungicida del aceite esencial de limón sobre los hongos antes mencionados fue menor si se la compara con la mostrada por el AE de naranja. Las tres cepas de hongos se inhiben alrededor del 70% a la concentración más alta evaluada (3%), como se aprecia en la Tabla 4. El género *Cladosporium* y *Penicillium* son menos sensibles al 1% de concentración, mientras que el *Aspergillus* si llega a inhibirse a más del 60%.

En tanto el AE de toronja resultó ser menos eficaz que el aceite de naranja y limón. Si tomamos como referencia al AE de naranja, con una concentración del 1%, podemos ver que no permite un crecimiento mayor del 8% mientras que con el de toronja los microorganismos crecen más del 50%. Por lo tanto no actuó de manera significativa en bajas concentraciones. En la Tabla 5 se muestran los porcentajes de inhibición del AE de toronja en función de cada hongo estudiado.

El análisis de varianza, apreciado en la Tabla 6, demuestra que existen diferencias entre las propiedades fungistáticas de los aceites esenciales evaluados. La relación entre el tratamiento y el porcentaje de inhibición indica que el mejor procedimiento para los tres géneros de hongos es

el AE de naranja a partir del 2% de concentración (Grupo K).

Se puede observar además que el segundo grupo (J), posee una efectividad entre el 93-92% de inhibición, por lo que también puede ser considerado para detener de manera positiva el crecimiento de las cepas evaluadas. El tratamiento menos eficaz de todos fue el AE de limón al 1% sobre *Cladosporium* spp.

Estos resultados estadísticos, diferenciales en la actividad fungistática de los aceites esenciales, indican que existe una relación entre la composición del aceite empleado y la actividad biológica de los microorganismos, ya que el porcentaje de compuestos volátiles puede variar afectando el grado de inhibición.

Dado el rendimiento del aceite de naranja al 2% y 3%, se decidió evaluar su efectividad al 4% bajo las mismas condiciones de los ensayos anteriores, dando como resultado una inhibición del 100% de microorganismos. No hubo crecimiento después de los siete días de incubación.

Inhibición del crecimiento fúngico en el papel con AE de naranja al 4%

El análisis de estos resultados se realizó de manera cualitativa y no cuantitativa como estaba previsto, ya que no se formaron los halos de inhibición que arrojaran un dato cuantificable.

Se observó, después de siete días de incubación, que los papeles tratados y no tratados con el AE de naranja presentaron crecimiento fúngico.

Se analizó el papel con AE por el anverso y reverso de la caja Petri. La cara del papel que estuvo en contacto con el medio (reverso) no evidenció la presencia de hongos, o bien, presentó cierto grado de resistencia al desarrollo de los microorganismos. Por el contrario, la cara del papel del anverso registró mayor crecimiento. El papel control, sin AE, mostró el desarrollo de microorganismos en ambas caras del papel.

Estos resultados indican que hay una leve resistencia al ataque fúngico, pero el método de vaporización

Tabla 3. Porcentaje inhibitorio del aceite esencial de Naranja frente a las cepas evaluadas.

Inhibitory percentage of the Orange essential oil against the evaluated strains.

Percentagem inibitória do óleo essencial de Laranja contra as cepas avaliadas.

Ensayo	Concentración (%)	Hongo	Inhibición (%)
nP-1 r1	1	<i>Penicillium</i> spp.	92,00
nP-1 r2	1	<i>Penicillium</i> spp.	93,00
nP-2 r1	2	<i>Penicillium</i> spp.	97,84
nP-2 r2	2	<i>Penicillium</i> spp.	96,22
nP-3 r1	3	<i>Penicillium</i> spp.	97,97
nP-3 r2	3	<i>Penicillium</i> spp.	97,30
nA-1 r1	1	<i>Aspergillus</i> spp.	86,18
nA-1 r2	1	<i>Aspergillus</i> spp.	87,35
nA-2 r1	2	<i>Aspergillus</i> spp.	91,54
nA-2 r1	2	<i>Aspergillus</i> spp.	97,94
nA-3 r1	3	<i>Aspergillus</i> spp.	94,15
nA-3 r2	3	<i>Aspergillus</i> spp.	92,89
nC-1 r1	1	<i>Cladosporium</i> spp.	95,04
nC-1 r2	1	<i>Cladosporium</i> spp.	92,56
nC-2 r1	2	<i>Cladosporium</i> spp.	94,79
nC-2 r2	2	<i>Cladosporium</i> spp.	95,78
nC-3 r1	3	<i>Cladosporium</i> spp.	95,53
nC-3 r2	3	<i>Cladosporium</i> spp.	94,79

Tabla 4. Porcentaje inhibitorio del aceite esencial de Limón frente a las cepas evaluadas.

Inhibitory percentage of the Lemon essential oil against the evaluated strains.

Porcentagem inibitória do óleo essencial de Limão contra as cepas avaliadas.

Ensayo	Concentración (%)	Hongo	Inhibición (%)
IP-1 r1	1	<i>Penicillium</i> spp.	41,00
IP-1 r2	1	<i>Penicillium</i> spp.	41,22
IP-2 r1	2	<i>Penicillium</i> spp.	55,45
IP-2 r2	2	<i>Penicillium</i> spp.	61,08
IP-3 r1	3	<i>Penicillium</i> spp.	70,27
IP-3 r2	3	<i>Penicillium</i> spp.	69,46
IA-1 r1	1	<i>Aspergillus</i> spp.	70,83
IA-1 r2	1	<i>Aspergillus</i> spp.	68,47
IA-2 r1	2	<i>Aspergillus</i> spp.	71,54
IA-2 r2	2	<i>Aspergillus</i> spp.	63,64
IA-3 r1	3	<i>Aspergillus</i> spp.	75,22
IA-3 r2	3	<i>Aspergillus</i> spp.	78,58
IC-1 r1	1	<i>Cladosporium</i> spp.	13,15
IC-1 r2	1	<i>Cladosporium</i> spp.	13,15
IC-2 r1	2	<i>Cladosporium</i> spp.	43,30
IC-2 r2	2	<i>Cladosporium</i> spp.	52,85
IC-2 r1	3	<i>Cladosporium</i> spp.	72,70
IC-2 r2	3	<i>Cladosporium</i> spp.	66,50

Tabla 5. Porcentaje inhibitorio del aceite esencial de Toronja frente a las cepas evaluadas.

Inhibitory percentage of the Grapefruit essential oil against the evaluated strains.

Percentagem inibitória do óleo essencial de Toranja contra as cepas avaliadas.

Ensayo	Concentración (%)	Hongo	Inhibición (%)
tP-1 r1	1	<i>Penicillium</i> spp.	25,68
tP-1 r2	1	<i>Penicillium</i> spp.	27,03
tP-2 r1	2	<i>Penicillium</i> spp.	81,35
tP-2 r2	2	<i>Penicillium</i> spp.	80,92
tP-3 r1	3	<i>Penicillium</i> spp.	82,16
tP-3 r2	3	<i>Penicillium</i> spp.	80,54
tA-1 r1	1	<i>Aspergillus</i> spp.	60,47
tA-1 r2	1	<i>Aspergillus</i> spp.	62,61
tA-2 r1	2	<i>Aspergillus</i> spp.	71,54
tA-2 r2	2	<i>Aspergillus</i> spp.	65,22
tA-3 r1	3	<i>Aspergillus</i> spp.	78,50
tA-3 r2	3	<i>Aspergillus</i> spp.	77,70
tC-1 r1	1	<i>Cladosporium</i> spp.	31,89
tC-1 r2	1	<i>Cladosporium</i> spp.	32,08
tC-2 r1	2	<i>Cladosporium</i> spp.	71,96
tC-2 r2	2	<i>Cladosporium</i> spp.	67,99
tC-3 r1	3	<i>Cladosporium</i> spp.	58,81
tC-3 r2	3	<i>Cladosporium</i> spp.	57,39

Tabla 6. Análisis de la varianza y prueba de Tukey al 0,05 de significación.*Analysis of variance and Tukey's test at 0,05 significance.**Análise de variância e teste de Tukey com 0,05 de significância.*

Análisis de la varianza					
Variable	N	R	R Aj	CV	
% de inhibición	54	0,99	0,99	3,49	
Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)					
F.V	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo	27010,31	26	1038,86	168,51	<0,0001
Tratamiento	27010,31	26	1038,86	168,51	<0,0001
Error	166,45	27	6,16		
Total	27176,76	53			
Test de Tukey: alfa = 0,05 / DMS = 10,18222					
Ensayo	Medias	n	E.E	Grupos	
CL116	13,15	2	1,76	A	
PT119	26,36	2	1,76	B	
CT125	32,99	2	1,76	B C	
PL110	41,11	2	1,76	C	
CCL217	53,08	2	1,76	D	
CT327	58,10	2	1,76	D E	
PL211	58,27	2	1,76	D E F	
AT122	61,54	2	1,76	D E F G	
AL214	67,59	2	1,76	E F G H	
AT223	68,38	2	1,76	F G H	
CL318	69,60	2	1,76	G H	
AL113	69,65	2	1,76	G H	
PL312	69,87	2	1,76	G H	
CT226	69,98	2	1,76	G H	
AL315	76,90	2	1,76	H I	
AT324	77,69	2	1,76	H I	
PT220	81,14	2	1,76	I	
PT321	81,35	2	1,76	I	
AN14	83,68	2	1,76	I J	
PN11	92,50	2	1,76	J K	
AN36	93,52	2	1,76	J K	
CN17	93,80	2	1,76	J K	
AN25	94,74	2	1,76	K	
CN39	95,16	2	1,76	K	
CN28	95,29	2	1,76	K	
PN22	97,03	2	1,76	K	
PN33	97,64	2	1,76	K	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,5$).

del aceite esencial no actúa de manera eficaz para preservar el papel del ataque de hongos.

Se pudo observar además, mediante un análisis organoléptico, que el uso del AE en fase de vapor no deja manchas en el papel ni lo vuelve quebradizo. El único cambio que se registró fue el olor a naranja, que quedó impregnado en el soporte.

CONCLUSIONES

Se ha confirmado mediante este estudio que los aceites esenciales que se extraen de plantas del género *Citrus* tienen componentes activos antifúngicos. Los hongos presentaron diferente nivel de susceptibilidad, mostrando un efecto dependiente del tipo de aceite esencial y su concentración.

Las concentraciones de ensayo del 1% al 3% con los aceites de limón y toronja a las que se sometieron los microorganismos dieron una respuesta de inhibición menor del 70%.

En tanto el AE de naranja fue el compuesto más efectivo en relación con los demás aceites, teniendo un amplio espectro de actividad fungicida. Este llegó a inhibir hasta el 97% del crecimiento de los hongos filamentosos, evaluados en los modelos de ensayo mediante el método de difusión en agar. Y en una concentración al 4%, el aceite esencial de naranja demostró una capacidad de inhibición del 100%.

Se puede señalar que los aceites cítricos actúan de manera distinta a las mismas concentraciones, cuando son evaluados sobre otras cepas de hongos

o bajo condiciones diferentes, si se efectúa una comparación con el trabajo de Alzate et al. (2009), donde se evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja, *Citrus sinensis* (Rutaceae), sobre el hongo *Trichoderma harzianum*, alcanzándose una inhibición completa al 1,1%.

El crecimiento de los microorganismos fue reduciéndose a mayor concentración de los AE, por lo que se puede estipular que si se sigue aumentando la concentración de los aceites esenciales de limón y toronja, se llegue a inhibir completamente el desarrollo de los hongos estudiados.

En relación con las pruebas realizadas en el papel, los resultados demostraron que el método de vaporización del aceite de naranja al 4% no funciona como tratamiento preventivo para el control de microorganismos. No se conoce con seguridad si los compuestos volátiles que se impregnaron en el papel alcanzaron la concentración adecuada para inhibir su crecimiento.

Ninguno de los dos tipos de papel se vieron afectados en sus características físicas, a nivel macroscópico, por el aceite esencial de naranja, ya que al utilizar el método de vaporización no hay impregnación directa del aceite.

Si bien la actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales en fase vapor y su efectividad contra mohos y levaduras empezó a investigarse recientemente, estos representan una buena alternativa para la búsqueda de nuevas posibilidades en el control de hongos en los bienes culturales.

REFERENCIAS CITADAS

AGUAYO, Y. 2016. *Identificación microbiológica básica de los hongos presentes en el ambiente y en los bienes documentales del archivo y biblioteca del conjunto conventual de la orden franciscana, Quito*. Tesis para optar al grado de Ingeniera Ambiental

y manejo de riesgos naturales, Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito, Ecuador. Disponible en: http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/13897/1/63841_1.pdf

- ALZATE, N., LÓPEZ, V., MARÍN, H. y MURILLO A. 2009. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos. *Revista Tumbaga*, 1(4): 59-71. Disponible en: <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/download/76/76>
- BAYNES-COPE, A. 1972. The Choice of Biocides for Library and Archival Material. *Proceedings of the 2nd International Biodeterioration Symposium "Biodeterioration of materials"*, pp. 381-387. Lunteren, Holanda, 13-18 septiembre 1971.
- BRINGAS, J. [s.f.]. *Primeros auxilios en archivos históricos*. Archivo Histórico de la UNAM, Instituto de Investigaciones sobre la Universidad y la Educación (AHUNAM-IISUE). Disponible en: http://www.agn.gob.mx/menuprincipal/archivistica/reuniones/2011/regional/pdf/m1_01.pdf
- BURT, S. 2004. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods – A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 223-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- CENTRO NACIONAL DE CONSERVACIÓN DE PAPEL (CNCP). 1998 [1994]. Catálogo de conservación de papel del American Institute for Conservation. Fascículo 2, Hongos. *Conservaplan. Documentos para conservar*, 14. Disponible en: <http://www.abinia.org/conser14-2.pdf>
- CORONEL, C.P. 2004. *Vapores de extractos de especias y condimentos como agentes antimicrobianos*. Tesis para optar al grado de Magíster, Universidad de las Américas, Puebla. México.
- COPEDÉ, M. 2012. *Restauración de papel*. San Sebastián, España: Nerea.
- CZICHOS, H., SAITO, T. y SMITH, L. 2006. *Springer Handbook of Materials Measurement Methods*. Berlín, Alemania: Springer Science, Business Media Inc. DOI: 10.1016/j.ejpb.2007.02.003
- DAO, T., BENSOUSSAN, M., GERVAIS, P. y DANTIGNY, P. 2008. Inactivation of *Conidia* of *Penicillium chrysogenum*, *P. digitatum* and *P. italicum* by Ethanol Solutions and Vapours. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2): 68-73. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.054
- HERNANDEZ, P. 2011. *Encapsulación de aceite esencial de clavo para su aplicación en la industria alimentaria*. Tesis de pregrado, Universidad Católica de San Antonio, Murcia, España.
- KLOUCEK, P., SMID, J., FRANKOVA, A., KOKOSKA, L., VALTEROVA, I. y PAVELA, R. 2012. Fast Screening Method for Assessment of Antimicrobial Activity of Essential Oils in Vapor Phase. *Food Research International*, 47(2): 161-165. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.04.044
- LÓPEZ, P., SÁNCHEZ, C., BATTLE, R. y NERÍN, C. 2005. Solid -and Vapor- Phase Antimicrobial Activities of Six Essential Oils: Susceptibility of Selected Foodborne Bacterial and Fungal Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17): 6939-6946. DOI: 10.1021/jf050709v
- LONA, V. 2009. ¿Por qué los microorganismos atacan el papel? En J. Bringas (coord.), *Manual de conservación preventiva*, vol. 2, pp. 11-16. Ciudad de México, México: Centro de Conservación, Restauración y Encuadernación (CCRE), ADABI.
- MOCTEZUMA ZÁRATE, M., ENRÍQUEZ, E., RAMÍREZ, P., ACOSTA, I., CÁRDENAS, J. y FRAGOSO, L. 2015. Aislamiento de hongos alérgenos en una biblioteca universitaria. *Acta Universitaria*, 25(1): 33-38. DOI:10.15174/au.2015.758 Disponible en: http://www.actauniversitaria.ugto.mx/index.php/acta/article/view/758/html_78
- OBSERVATORIO LATINOAMERICANO DE CONFLICTOS AMBIENTALES (OLCA). 1998. *Lista provisoria de plaguicidas registrados en Chile que están prohibidos o severamente restringidos por gobiernos y sus efectos sanitarios ambientales*. Disponible en: <http://www.olca.cl/oca/plag03.htm>
- PANDEY, D., TRIPATHI, D., TRIPATHI, R. y DIXIT, S. 1982. Fungitoxic and Phytotoxic Properties of Essential Oil of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 89(6): 344-349.

PESTICIDES ACTION NETWORK UK (PAN). 2009. *Catálogo de listas de plaguicidas que identifican aquellos asociados con impactos particularmente dañinos para la salud o el medio ambiente* (G. Carbonetto, Trad., 3ª. ed. español). Montevideo, Uruguay: Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAP-AL). Disponible en: http://www.rapaluguay.org/agrotoxicos/Prensa/La_lista_de_listas.pdf

RAMÍREZ, S. 2011. Conservación preventiva en acervos documentales. Biodeterioro y control de plagas en archivos y acervos documentales. *Reunión de Archivos del Gobierno Federal*. Museo Tecnológico de la CFE. México, D.F., 12 diciembre 2011. Disponible en: http://www.agn.gob.mx/menuprincipal/archivistica/reuniones/2011/regional/pdf/m1_03.pdf

REYES JURADO, F., PALOU, E. y LÓPEZ-MALO, A. 2012. Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(1): 29-39. Disponible en: [https://www.udlap.mx/wp/tsia/files/No6-Vol-1/TSIA-6\(1\)-Reyes-Jurado-et-al-2012.pdf](https://www.udlap.mx/wp/tsia/files/No6-Vol-1/TSIA-6(1)-Reyes-Jurado-et-al-2012.pdf)

REYES JURADO, F., PALOU, E. y LÓPEZ-MALO, A. 2014. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(1): 68-78. Disponible en: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-81-Reyes-Jurado-et-al-2014.pdf>

SCHELZ, Z., MOLNAR, J. y HOHMANN, J. 2006. Antimicrobial and Antiplasmodial Activities of Essential Oils. *Fitoterapia*, 77(4): 279-285. DOI: 10.1016/j.fitote.2006.03.013

SOTO L. 2010. *Composición y actividad microbiana del aceite esencial de toronja (Citrus paradisi)*. Tesis para optar al grado de Magíster Scientiarum en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

VALENTÍN, N. [s.f.]. *Biodeterioro de los materiales de archivos y museos. Conservación y prevención*. Recuperado de: <http://www.aecidcf.org.co/documentos/M1%2018.283%20Valentin,%20Nieves.%20Biodeterioro.pdf> [12 junio 2015].

VALENTÍN, N., GUERRERO, H. y VAILLANT, M. 1996. Control integrado de plagas en bienes culturales de países de clima mediterráneo y tropical. *XI Congreso de Conservación y Restauración de Bienes Culturales*. Castellón, España, 3-6 octubre 1996.

VALENTÍN, N., BERGH, J.E., ORTEGA, R., ÅKERLUND, M., HALLSTRÖM, A. y JONSSON, K. 2002. Evaluation of Portable Equipment for Large-scale de-infestation in Museum Collections Using a low-oxygen Environment. *Preprints of the 13th Triennial Meeting ICOM Committee for Conservation*, pp. 96-101. ICOM-CC. Rio de Janeiro, Brasil, 22-27 septiembre 2002.

VIUDA, M., RUIZ, Y., FERNÁNDEZ, J. y PÉREZ, J. 2008. Antifungal Activity of Lemon (*Citrus lemon* L.), Mandarin (*Citrus reticulata* L.), Grapefruit (*Citrus paradise* L.) and Orange (*Citrus sinensis* L.) Essential Oils. *Food Control*, 19(12): 1130-1138. DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.12.003