

Actividad antifúngica del aceite esencial de clavo de olor en el control del biodeterioro fúngico de documentos.

Oderlaise Valdés-Pérez, Sofía Borrego-Alonso, Isbel Vivar-González, Matilde Anaya-Villalpanda*, Alian Molina-Veloso.

Departamento de Conservación Preventiva, Archivo Nacional de la República de Cuba. Compostela # 906 esq. San Isidro, Habana Vieja, La Habana, Cuba. CP: 10100.odette2005@arnac.cu.
Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria. km 3 ½ Carretera al Guatao, La Lisa, La Habana, Cuba. CP: 19200

Recibido: 8 de enero de 2016.

Aceptado: 29 de marzo de 2016.

Palabras clave: actividad antifúngica, biodeterioro, aceites esenciales, aceite de clavo de olor.

Key words: Antifungal activity, biodeterioration, essential oil, clove oil.

RESUMEN. Los documentos en soporte papel son susceptibles al biodeterioro causado por microorganismos. En países tropicales predomina la colonización fúngica, favorecida por los altos valores de humedad relativa y temperatura. Actualmente, los productos empleados en su control son sustancias químicas que causan daños a la salud humana, al soporte y al medio ambiente. Es por esto que los investigadores evalúan nuevos productos menos nocivos y ecológicos, entre los que destacan los de origen vegetal. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial (AE) de clavo de olor frente a tres cepas fúngicas predominantes en aislamientos del ambiente de depósitos y documentos dañados del Archivo Nacional de la República de Cuba; así como el efecto sobre el soporte. Para ello se empleó el método de los pocillos, se midieron los halos de inhibición total del crecimiento y de inhibición parcial de la esporulación. El efecto producido sobre el papel se evaluó antes y después de un envejecimiento acelerado mediante Microscopía Electrónica de Barrido, la determinación del pH, índice de cobre y la aparición de manchas. Se observó que el AE de clavo de olor presentó actividad fungicida hasta la concentración del 25 % (v/v), además de afectar la esporulación fúngica. A esta concentración, el producto no provocó daños de gran magnitud sobre el papel.

ABSTRACT. The paper documents are susceptible to deterioration caused by microorganisms. In tropical countries predominates fungal colonization, favored by high humidity and temperature values. Currently, the products used in their control are chemicals which cause damage to human health, the support and the environment. For these reasons the researchers will evaluate new less harmful and organic products, among which are those of vegetable origin. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of the clove essential oil (EO) against three fungal strains prevailing on environmental isolates of deposits and damaged documents from the National Archive of the Republic of Cuba; and the effect on paper. By observing through Scanning Electron Microscope, determination of pH, copper index and stains before and after accelerated aging, the effect of this product on the paper was studied. It is noted that clove EO exhibits fungicidal activity until the concentration of 25 % (v/v), besides affecting fungal sporulation. At this concentration, the product didn't cause important damages on the paper.

INTRODUCCIÓN

El patrimonio cultural está expuesto constantemente a la influencia del ambiente.¹⁻³ Factores físicos, químicos y biológicos interactúan con los materiales promoviendo cambios en su estructura y composición. Las alteraciones ocasionadas por los agentes biológicos se conocen como biodeterioro.⁴ La intensidad del deterioro está en función de la composición del material, de las condiciones ambientales y del organismo asociado al mismo. El biodeterioro no solo afecta la estética de los bienes patrimoniales sino también puede producir la degradación de los mismos, lo que provoca pérdidas materiales y económicas insalvables.⁵

Los bienes culturales de naturaleza orgánica son particularmente vulnerables a las oscilaciones de los parámetros ambientales y al desarrollo de agentes biológicos, los cuales alcanzan una particular relevancia en países de clima húmedo y tropical. Los microorganismos y los insectos son los agentes que afectan con mayor frecuencia a las colecciones de valor patrimonial. Su erradicación y prevención debe abordarse desde un punto de vista global que incluya tanto a los objetos, de tipología muy diversa, como al edificio y al mobiliario que los alberga. Las

características arquitectónicas de los inmuebles, las condiciones ambientales y en especial su mantenimiento, determinan el riesgo de infestación en los bienes culturales.⁶

El control del biodeterioro debe realizarse de forma específica, en función de un diagnóstico previo de las alteraciones. De ser posible se reducirá al mínimo la manipulación de los objetos y el uso de productos tóxicos para la salud humana, y nocivos para el medio ambiente.

Las sustancias químicas que tradicionalmente se han utilizado como antimicrobianos para la prevención del biodeterioro en el patrimonio cultural, son en general sustancias tóxicas para el medioambiente y la salud humana, y también pueden provocar cambios en los materiales a los que se les aplican.^{7,8} Incluso muchos de ellos no son biocidas potentes y algunos autores plantean que tienen acción fungistática, tal es el caso de timol y el ortofenilfenol.⁹ La aplicación de productos obtenidos de plantas en el control de microorganismos que provocan biodeterioro en el patrimonio cultural, constituye una solución viable que muestra ventajas desde el punto de vista económico y medioambiental.^{7,8,10} La actividad antimicrobiana de estos productos se debe a la presencia de compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, etc.^{5,11}

Desde la antigüedad se conoce la actividad antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales de plantas¹² 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.^{5-7,13-19}

El Archivo Nacional de la República de Cuba es el centro que atesora la mayor cantidad de documentos patrimoniales de la nación, la mayoría de ellos en soporte papel. Desde hace algunos años, sus especialistas vienen realizando investigaciones relacionadas con el uso de productos naturales provenientes de plantas como biocidas en el control del biodeterioro. De ahí que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de clavo de olor puro y disuelto en etanol al 70 % a cuatro concentraciones frente a tres cepas fúngicas aisladas del ambiente de los depósitos que preservan a este valioso legado y de documentos afectados, así como el efecto de este aceite sobre el papel.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó aceite esencial (AE) de clavo de olor (*Syzygium aromaticum* L.) que fue donado por el Instituto de Investigaciones de la Industria Alimentaria. Este aceite se obtuvo por hidrodestilación por medio de un destilador Clevenger durante 3 h a partir de material seco.

Preparación del inóculo de las cepas fúngicas a evaluar

Se emplearon tres cepas fúngicas (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium aurantiogriseum*) aisladas del aire de los depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba (ARNAC) y de documentos dañados.¹⁸ Cada cepa se hizo crecer en cuñas de Agar Extracto de Malta (AEM) que se incubaron a 30 °C durante siete días. Luego del crecimiento, se ajustaron las suspensiones de conidios a 10⁵ conidios/mL en una disolución de Tween 80 al 0.1 % (v/v), mediante conteo en cámara de Neubauer.²⁰

Preparación del producto a evaluar y sus concentraciones

Se evaluó el aceite esencial de clavo de olor puro y a diferentes concentraciones (75, 50, 25 y 12,5 %, v/v) disuelto en etanol al 70 %. Como controles positivos se emplearon disolución de timol al 5 % (g/v) en etanol al 70 %, empleado como biocida en la conservación y restauración de documentos^{8,20,21} y una disolución acuosa de cloruro de benzalconio al 10 % (v/v) ampliamente usado en tratamientos del patrimonio cultural.^{8,10} Como control negativo se usó etanol al 70 %.

Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de clavo de olor

Para evaluar la actividad antifúngica del AE se empleó el método de difusión en agar mediante la técnica de los pocillos.²² En los pocillos se dispuso 10 µL de cada concentración del AE así como de cada producto control correspondiente. Las placas se incubaron a 30 °C por siete días. Los ensayos se hicieron por triplicado.

Para determinar la susceptibilidad de las cepas al aceite se midieron los halos de inhibición total del crecimiento fúngico (ITCF)⁷ y de inhibición parcial de la esporulación (IPE).

Determinación del grado de afectación del AE sobre el papel

Se tomaron hojas de papel moderno con calidad para impresora láser y fotocopiado y se embebieron con la ayuda de un pincel con cada disolución de AE a dos concentraciones (50 % y 12,5 % (v/v) diluidos en etanol al 70 %) y se dejaron secar al aire. El grado de afectación del producto se estudió antes y después de envejecer artificialmente los papeles bajo condiciones de 105 °C por 72 h lo cual equivale a un tiempo de 25 años.^{23,24} Para evaluar el posible daño de este producto sobre el papel se realizaron las siguientes pruebas:

- Observación de las fibras de papel por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de las muestras de papel con el AE puro y sin él (control), antes y después del envejecimiento acelerado. Los papeles se mantuvieron en etanol absoluto por 24 h y se metalizaron con una mezcla oro/paladio (Au/Pd) previa observación.

- Determinación del número de cobre según Stampella y cols (2010).²⁵
- Medición del pH del papel con electrodo plano de contacto según Tse (2007),²⁶ Manente y cols. (2012).²⁷ Para ello se adiciona una gota de agua destilada sobre el papel, luego se coloca encima de la gota el electrodo plano acoplado a un potenciómetro. Esta determinación se realiza sobre diferentes partes de una misma hoja de papel y se promedian los valores.
- Aparición de manchas en el papel: Se tomaron hojas de papel (igual calidad) y se le adicionó una gota para cada variante de ensayo. Las manchas se determinaron por observación a simple vista pasadas 24 h de la aplicación del producto y después del envejecimiento acelerado.

Análisis estadístico de los resultados

Los resultados fueron procesados empleando el programa STATGRAPHICS Centurion v1 para un 95 % de intervalo de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es conocido que los aceites esenciales de muchas plantas poseen actividad antimicrobiana^{12,28-31} y que muchos de ellos interfieren con algún estadio del ciclo de reproducción asexual en hongos.⁸ Por esta razón, algunos científicos de la conservación han estado evaluando los AE contra microorganismos aislados de documentos dañados y del ambiente de archivos, bibliotecas y museos.^{5-7,15-19,32,33} Sin embargo, los estudios encaminados al uso de los AE para el control del biodeterioro del patrimonio cultural aún son insuficientes¹² y en la actualidad el mundo no dispone de suficientes productos comerciales a base de sustancias vegetales que se puedan utilizar en el tratamiento de colecciones patrimoniales infestadas por hongos. El AE de clavo de olor que fue seleccionado para este estudio ha sido previamente reportado con buena actividad fungicida^{5,7,34,35} por ello se han continuado los estudios con él.

En los resultados obtenidos tanto en la ITCF de las tres cepas fúngicas como IPE (Tabla 1) (fig. 1)

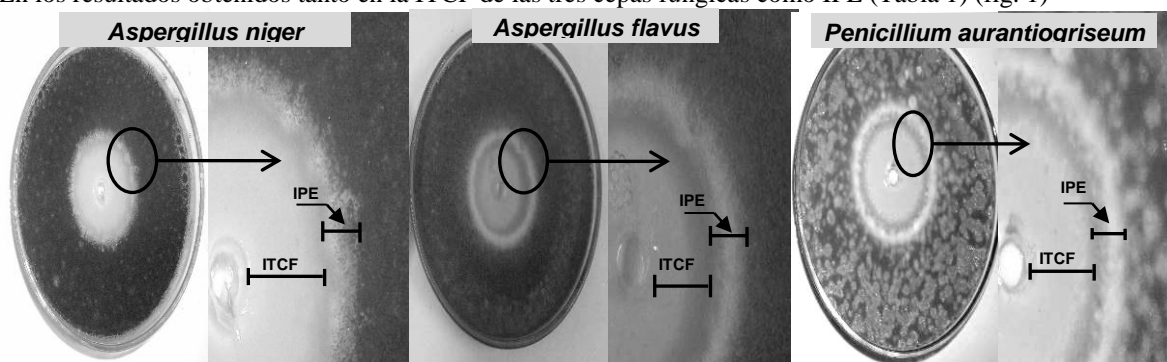


Fig. 1. Halos de inhibición total del crecimiento fúngico (ITCF) e inhibición parcial de la esporulación (IPE) obtenidos para las cepas *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium aurantiogriseum*.

Se obtuvo una ITCF positiva para las tres cepas lo que indica una elevada actividad fungicida hasta una concentración del 50 %, moderada al 25 % para *A. niger* y *A. flavus* y negativa para *Penicillium aurantiogriseum*, en tanto al 12,5 % las cepas no mostraron actividad alguna. Resultados similares fueron obtenidos por varios autores frente a diferentes especies fúngicas que estaban biodeteriorando documentos en papel de archivos, bibliotecas y museos.^{7,15,17} En relación a los controles se evidenció una actividad moderada en el timol al 5 % y negativa para cloruro de benzalconio al 10 % y etanol al 70 %.

De los resultados (tabla 1), se evidencia además una respuesta de ITCF para concentraciones desde el 100 % hasta el 12,5 %, donde la diferencia mayor estuvo entre las concentraciones de 50 y 25 %. Por tanto, en futuros experimentos para determinar la concentración mínima inhibitoria de este producto habrá que realizar experimentos con una concentración inicial del 50 % y a partir de ella analizar otras más bajas.

En cuanto a la IPE del AE de clavo de olor se observó que para *A. flavus* y *P. aurantiogriseum* fue positiva y alta hasta una concentración del 50 %, en tanto para *A. niger* fue negativa a esa misma concentración. Por tanto, la ITCF tuvo un comportamiento dosis dependiente mientras que no ocurrió lo mismo con la IPE.

La IPE (Fig. 1) resulta una respuesta de interés. Si bien diferentes estructuras fúngicas son capaces de propiciar la reproducción de los hongos (fragmentos de micelio, hifas aéreas, conidios (esporas asexuales) y esporas producidas de forma sexual), la germinación de los conidios es la manera más común de reproducción en la mayoría de los hongos y por tanto, la de mayor interés en el área de la conservación de documentos, pues a través de este mecanismo los hongos son capaces de colonizar otras partes del sustrato dañado y alcanzar incluso, otros materiales que se

encuentren distantes ya que los conidios son esparcidos por el aire con mayor facilidad y pueden viajar de esta forma largas distancias.

Tabla 1. Diámetros de los halos de inhibición obtenidos a los 5 días como resultado de la actividad antifúngica del AE de clavo de olor a diferentes concentraciones

Producto	Conc. (%)	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	
		ITCF	IPE	ITCF	IPE	ITCF	IPE
		Diámetro de los halos de inhibición (mm) a los 5 días*					
AE de clavo de olor	100	24	12	23	15	21	14
	75,0	15	7	22	12	20	17
	50,0	14	6	20	12	15	12
	25,0	7	3	10	9	6	6
	12,5	1	2	0	6	4	1
Cloruro de benzalconio	10,0	4	0	6	0	4	0
Timol	5,0	6	0	6	0	5	0
Ethanol	70,0	0	0	0	0	0	0

*. Cada valor es equivalente a la media de tres replicas. ITCF. inhibición total del crecimiento fúngico. IPE. Inhibición parcial de la esporulación. Respuesta de la actividad antifúngica. $d \leq 6$ mm indica una actividad negativa; $d = 7-10$ mm indica una actividad moderada y $d \geq 11$ mm indica una actividad positiva según Borrego y cols. (2012).⁷

Al realizar una preparación microbiológica del área de IPE de las cepas analizadas al microscopio óptico, se observó que existía una notable afectación en la formación de conidios, predominando la ausencia de éstos en los conidióforos que se formaron en dicha zona (Fig. 2).

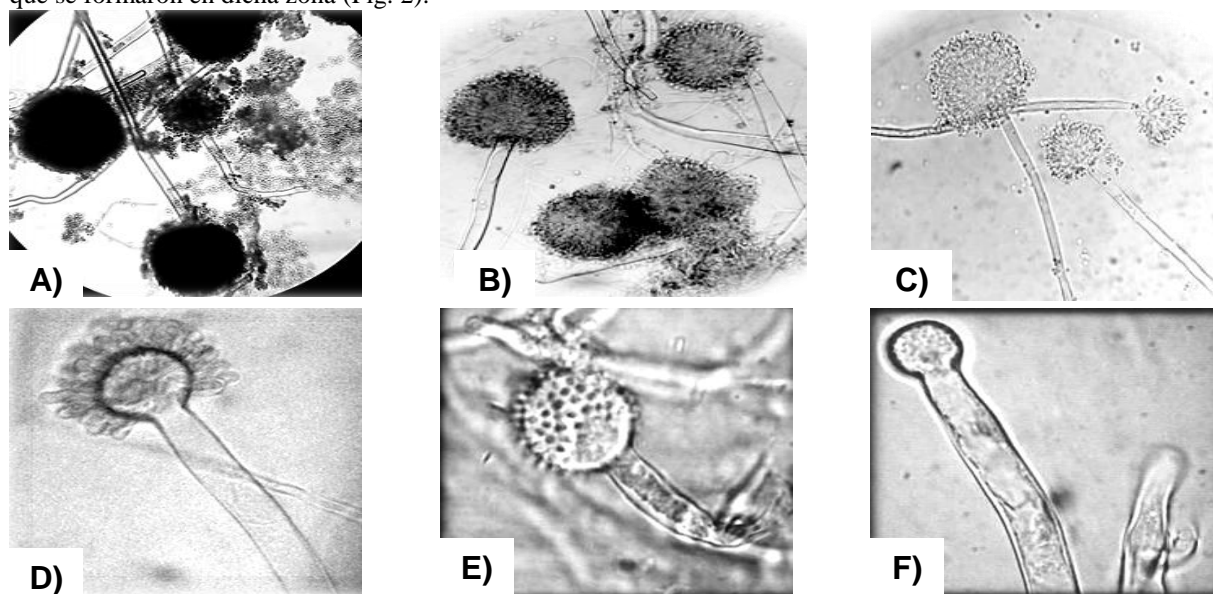


Fig. 2. Comportamiento de las estructuras de reproducción de la cepa *Aspergillus niger* en la zona de inhibición parcial de la esporulación frente al aceite esencial de clavo de olor. A) conidióforos sin afectación por el producto (control); B) y C) conidióforos con afectación en la cantidad y pigmentación de los conidios, nótese en C que la disminución de éstos es marcada, lo que denota una afectación importante de la conidiogénesis; D), E) y F) se observa ausencia total de conidios. Imágenes de microscopio óptico (400X).

La actividad biocida de los productos naturales provenientes de plantas se atribuye a la existencia de metabolitos secundarios en los componentes de la planta que le sirven como defensa contra el ataque de los microorganismos, entre otras funciones.³⁶ Algunos de estos componentes son terpenos, fenoles, aldehídos aromáticos, entre otros^{5,11,37} cuyas actividades antifúngicas fueron evaluadas con anterioridad.¹⁷

En el estudio de la composición química del AE de clavo de olor realizada por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG/EM),⁷ se pudo detectar que el eugenol (2-metoxi-4-allil fenol) fue el componente mayoritario (67 %) y que anetol (5,9 %), metilchavicol (2,5 %), metileugenol (2,4 %) y linalol (2,3 %) también fueron detectados. El eugenol es una sustancia ampliamente empleada en el campo de la medicina por sus propiedades, entre las que destaca la antiséptica, por lo que el efecto observado sobre las cepas fúngicas puede ser atribuido a este componente.^{38,39} Sin embargo, se cree que la efectividad antifúngica de este AE no se debe solamente

al eugenol, sino al efecto sinérgico de éste con el resto de los componentes existentes en menor proporción en el aceite. Pinto y cols. (2009),³⁸ Šegvić Klarić y cols (2007),⁴⁰ así como Bakkali y cols. (2008)⁴¹ reportaron que el AE de clavo y el eugenol en particular, provocan lesiones en las membranas fúngicas y una reducción considerable de la cantidad de ergosterol sintetizado. También, se ha referenciado que el eugenol inhibe las enzimas ATPasa, histidina decarboxilasa, amilasa y proteasa y la inhibición de la ATPasa propicia la muerte celular.⁴² Por otro lado, se ha reportado que este AE y el eugenol también provocan deformaciones/distorsiones en las formas de los conidios y de otras estructuras fúngicas.³⁹ Estos aspectos pudieran estar incidiendo en las cepas y sus efectos podrían estar provocando las afectaciones en la formación de conidios (fig. 2). Es por esto que aun cuando el producto no inhiba totalmente el crecimiento fúngico, el hecho de que impida en cierto grado la formación de sus conidios es una propiedad importante, pues significa que el hongo no será capaz de colonizar más allá de donde se encuentre creciendo activamente y biodeteriorando el sustrato.

Al evaluar el efecto del AE puro sobre el papel, se pudo evidenciar que no lo afectó estructuralmente (Fig. 3).

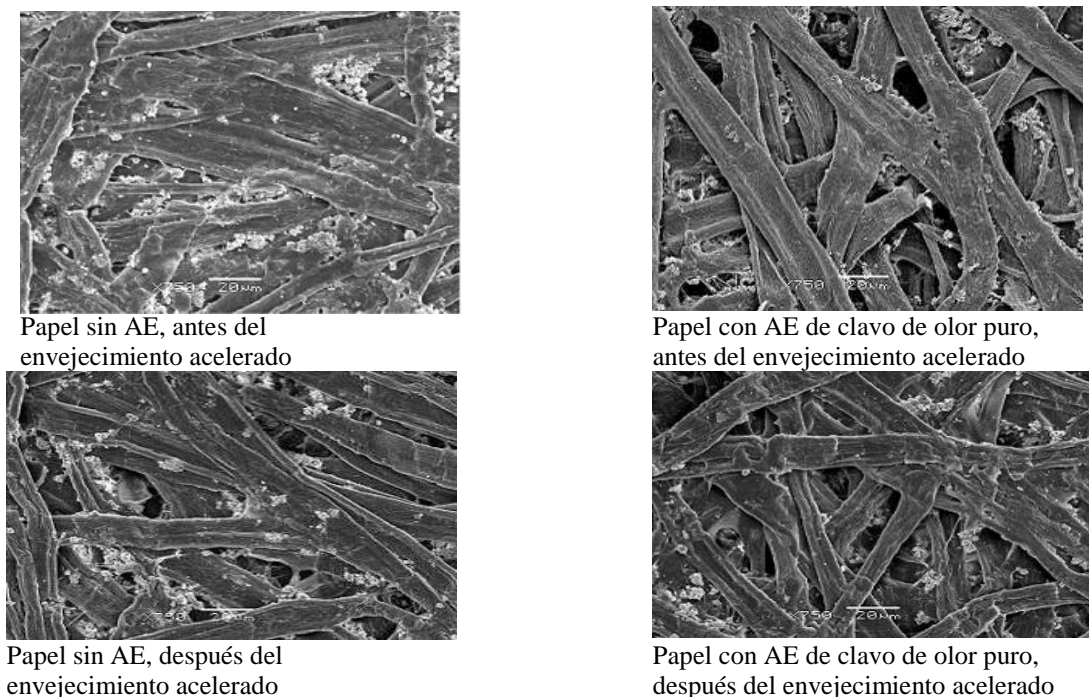


Fig. 3. Imágenes realizadas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) para determinar el posible daño estructural del papel tratado con el AE de clavo de olor puro antes y después de envejecerlo artificialmente lo que es equivalente a un envejecimiento natural de 25 años aproximadamente. Las barras son equivalentes a 20 µm a un aumento de 750X.

Como se observa, las fibras de celulosa mantuvieron su apariencia en presencia del AE, es decir no se rompieron o variaron su grosor aun después del envejecimiento acelerado equivalente a 25 años de envejecimiento natural. El resto de los componentes del papel como aglutinantes, cargas y otros aditivos también estuvieron presentes y no mostraron afectación.

La evaluación del pH y el número de cobre fueron métodos recomendados por varios autores para determinar el grado de envejecimiento o afectación molecular que sufre el papel bajo determinadas condiciones.^{27,43}

La acidez del papel es el resultado de la degradación química que ocurre de forma natural en la celulosa, principal componente del papel,^{24,44} siendo una medida de la afectación de esta molécula. Asimismo, el número de cobre ofrece información relacionada con la degradación química de la celulosa, ya que mide la reducción de los grupos carboxilos de esta molécula. La oxidación aumenta el contenido de estos grupos en la celulosa, lo que se puede determinar mediante la reducción de las sales de Cobre II en soluciones alcalinas. En la celulosa natural el único grupo reductor está en la unidad terminal de la cadena larga, por lo que el número cobre es bajo. Por tanto, a medida que este número aumenta indica una mayor afectación molecular.²⁵

Desde el punto de vista molecular, se observaron diferencias con respecto al control (Tabla 2) ya que se detectaron diferencias significativas en el pH del papel cuando el AE estaba a la concentración del 50 %; sin embargo, a 12,5 % no se detectaron diferencias estadísticas. No obstante, en ninguno de los casos el pH fue ácido, sino que se mantuvo por encima de 7, es decir próximo a la neutralidad, lo que demuestra que el papel no se afectó de forma importante aun después de 25 años de tratado y envejecido (dado por el envejecimiento artificial).

Tabla 2. Comportamiento del pH y del número de cobre de los papeles tratados con dos concentraciones del AE de clavo de olor antes y después del envejecimiento acelerado.

Concentración de AE en Etanol al 70%	pH		Diferencias antes y después del EA	Número de Cu		Diferencias antes y después del EA
	AEA ± DE	DEA ± DE		AEA ± DE	DEA ± DE	
Clavo de olor al 50%	8,01 ± 0,77	7,38 ± 0,22	-0,63*	1,22 ± 0,04	1,31 ± 0,05	0,09
Clavo de olor al 12,5%	7,45 ± 0,18	7,30 ± 0,06	-0,15	0,76 ± 0,06	1,13 ± 0,04	0,37*
Sin AE (control)	7,91 ± 0,21	7,68 ± 0,19	-0,23	0,49 ± 0,04	0,51 ± 0,05	0,03

Con relación al número de cobre, se observó una tendencia a su aumento a mayor concentración del AE; sin embargo, su efecto más significativo fue a la concentración del AE de 12,5 %, pues se evidenció un aumento de este parámetro al realizarse el envejecimiento acelerado, lo que indica una mayor afectación de la molécula de celulosa.

Según Zervos (2010)²⁴ las afectaciones que ocurren en la molécula de celulosa con el tiempo son inevitables ya que tanto en condiciones naturales como bajo un envejecimiento artificial se produce un entrecruzamiento de los grupos libres de esta molécula, y también ocurre un auto-entrecruzamiento entre las diferentes cadenas de celulosa que conforman una fibra, por lo que siempre se va a producir daño molecular aun en ausencia de condiciones desfavorables para el papel. Sin embargo, otras concentraciones de este AE y otras alternativas de tratamiento, podrían provocar un daño menos significativo.

En cuanto a la formación o no de manchas sobre el papel, se observó que hasta la concentración del 50% del AE se formaron manchas amarillas sobre el papel a las 24 h de ser tratado, las cuales se tornaron más oscuras después de ser sometidos los papeles al envejecimiento acelerado. A pesar de esto, se observó que esta característica disminuyó con la concentración más baja del aceite estudiada (12,5 %). Por ello, se sugiere que a concentraciones menores del AE o bajo otros tratamientos, las manchas en el papel deberán ser despreciables.

CONCLUSIONES

El aceite esencial de clavo de olor mostró actividad antifúngica de positiva a moderada hasta la concentración del 25 % para las tres especies fúngicas en estudio. También afectó la formación de conidios en dichas las cepas.

El aceite esencial de clavo de olor puro no afectó al papel estructuralmente, sin embargo, concentraciones de hasta el 12,5 % pudieron dañarlo molecular y estéticamente. Aunque los daños podrían atenuarse en la medida en que se disminuya la concentración del aceite.

Por los resultados obtenidos, el aceite esencial de clavo de olor pudiera ser una alternativa de biocida vegetal para el control del biodeterioro de documentos en soporte papel. Aunque, se deberá continuar profundizando en las investigaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guiamet P, Borrego S, Lavin P, Perdomo I, Gómez de Saravia S. Biofouling and biodeterioration in materials stored at the Historical Archive of the Museum of La Plata, Argentine and at the National Archive of the Republic of Cuba. *Colloid and Surface*. 2011; 85:229-234.
2. Borrego S, Molina A. Behavior of the aeromicrobiote in two repositories of the National Archive of the Republic of Cuba during seven years of study. *AUGMDOMUS*. 2014; 6:1-24.
3. Borrego S. Factores externos del deterioro en el patrimonio documental. Editorial Académica Española, España: 2012: 59 p.
4. Allsopp D. Worldwide wastage: the economics of biodeterioration. *Microbiol Tod*. 2011; 38:150-153.
5. Gómez de Saravia S, Borrego S, Lavin P, Valdés O, Vivar I, Battistoni P, et al Environmentally friendly products from plants in the control of biodeteriogen agents. *Natural Products. An Indian Journal (NPAIJ)*. 2013; 9(5):167-174.
6. Morales R, Blanco P, Lalana P, Pardo de Santayana M, Valentín N. Extractos naturales para la desinfección y desinsectación de bienes culturales. Las plantas medicinales y el patrimonio histórico. En: *La Ciencia y el Arte IV. Ciencias experimentales y conservación del patrimonio*. Edición Secretaría General Técnica. Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, España: 2013: p. 148-162.
7. Borrego S, Valdés O, Vivar I, Lavin P, Guiamet P, Battistoni P et al. Essential oils of plants as biocides against microorganisms isolated from Cuban and Argentine documentary heritage. *ISRN (International Scholarly Research Network) Microbiology, Volume 2012, Article ID 826786, 7 pages, DOI:10.5402/2012/826786*. 2012
8. Stupar M, Grbić ML, Džamić A, Unković N, Ristić M, Jelikić A, Vukojević J. Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. *S African J Bot*. 2014; 93:118-124.
9. Maynor CI. Catálogo de conservación de papel del American Institute Conservation. Fascículo 2. Hongos. *Conservaplan*. 1998; (14):26-27.
10. Ljaljević Grbić M, Stupar M, Vukojević J, Maričić I, Bungur N. Molds in museum environments: biodeterioration of art photographs and wooden sculptures. *Arch Biol Sci*. 2013; 65:955-962.
11. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol*. 2004; 35:275-280.
12. Borrego-Alonso S. Los biocidas vegetales en el control del biodeterioro del patrimonio documental. *Perspectivas e impacto. Rev CENIC Ciencias Biológicas*. 2015; 46(3):259-269.
13. Chingduang S, Siriacha P, Saito M. Effect of some plants and spices on growth of fungi. In: *Proceeding of the Third International Conference on Biodeterioration of Cultural Property, Bangkok, Thailand*. Aranyanak C. et al. (eds.), Bangkok: Office of Archeology and National Museums, Conservation Science Division 1995: pp. 143-153.
14. Dhawan S. Essential oil for preservation of mould growth on palm leaf manuscripts. In: *Proceeding of the Third International Conference on Biodeterioration of Cultural Property, Bangkok, Thailand*. Aranyanak C. et al. (eds.), Bangkok: Office of Archeology and National Museums, Conservation Science Division: 1995: pp. 272-282.
15. Cheng YJ, Lee KS, Han SH. The utilization of fungicide and insecticide from medicinal plants for conservation of cultural properties. 5th Meeting of the Indoor Air Pollution Working Group. University of East Anglia, School of Environmental Sciences Norwich, 2003.
16. Gatenby S, Townley P. 2003. Preliminary research into the use of the essential oil of *Melaleuca arternifolia* (tea tree oil) in museum conservation. *AICCM Bulletin*. 2003; 28:67-70.
17. Rakotonirainy MS, Lavédrine B. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *Int Biodeter Biodegr*. 2005; 55:141-147.
18. Guiamet PS, Gómez de Saravia SG, Arenas P, Pérez ML, de la Paz J, Borrego SF. Natural products isolated from plants used in biodeterioration control. *Pharmacologyonline*. 2006; 3:537-544.
19. Gómez de Saravia SG, de la Paz J, Guiamet P, Arenas P, Borrego SF. Biocide activity of natural extracts against microorganisms affecting archives. *BLACPMA*. 2008; 7:25-29.
20. Araujo R, Rodriguez AG, Pina-Vaz C. A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *J Med Microbiol*. 2004; 53:783-786.
21. Gustafson RA, Modaresi IR, Hampton GV, Chepesiuk RJ, Kelly GA. Fungicidal efficacy of selected chemicals in thymol cabinets. *JAIC*. 1990; 29(2):153-168.
22. Trivedi NA, Hotchandani SC. Study of the antimicrobial activity of oil of *Eucalyptus*. *Indian J Pharmacol*. 2004; 6:93-94.
23. ISO 5630-1:1991. Paper and board – Accelerated ageing – Part 1: Dry heat treatment at 105°C.

24. Zervos S. Natural and accelerated ageing of cellulose and paper: A literature review. In: Cellulose: Structure and properties, derivatives and industrial uses. New York, Nova Publishing. 2010: p.155-203.
25. Stampella P, Arenas PM, López A, Borrego S, Vivar I, Cabrera N. Plantas útiles en el control de insectos bibliófilos. En: Pochettino ML, Ladio AH, Arenas PM, editores. Tradiciones y transformaciones en Etnobotánica. Argentina, (CYTEC):2010: p.423-27.
26. Tse S. Guidelines for pH measurement. Technical Bulletin of the Canadian Conservation Institute. 2007; (28):1-22.
27. Manente S, Micheluz A, Ganzerla R, Ravagnan G, Gambado A. Chemical and biological characterization of paper: A case study using a proposed methodological approach. Int Biodeter Biodegr. 2012; 74:99-108.
28. Lalitha P, Shapiro BL, Srinivasan M, Venkatesh N, Acharya NR, Fothergill AW, et al. Antimicrobial susceptibility of Fusarium, Aspergillus and other filamentous fungi isolated from keratitis. Arch Ophthalmol. 2007; 125:789-793.
29. Villa F, Cappitelli F. Plant-derived bioactive compounds at sub-lethal concentrations: towards smart biocide-free antibiofilm strategies. Phytochem. Rev 2013; 12:245-254.
30. Duarte Y, Pino O, Infante D, Sánchez Y, Travieso MC, Martínez B. Efecto in vitro de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. Rev. Protección Vegetal. 2013; 28(1):54-59.
31. Homa M, Fekete IP, Böszörményi A, Singh YRB, Selvam KP, Shobana CS, et al. Antifungal effect of essential oils against *Fusarium keratitis* isolates. Planta Med. 2015; DOI: 10.1055/s-0035-1546272.
32. Stupar M, Grbić ML, Simić GS, Jelikić A, Vukojević J, Sabovljević M. A sub-aerial biofilms investigation and new approach in biocide application in cultural heritage conservation: Holy Virgin Church (Gradac Monastery, Serbia). Indoor Built. Environ. 2014; 23(4):584-593.
33. Lavin P, Gómez de Saravia S, Guiamet P. *Scopulariopsis* sp. and *Fusarium* sp. in the documentary heritage: Evaluation of their biodeterioration ability and antifungal effect of two essential oils. Microb Ecol. 2015; DOI: 10.1007/s00248-015-0688-2.
34. Hamini-Kadar N, Hamdane F, Boutoutaou R, Kihal M, Henni JE. Antifungal activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil against phytopathogenic fungi of tomato (*Aolanum lycopersicum*) in Algeria. JEBAS (Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences). 2014; 2(5):447-454.
35. Manganyi MC, Regnier T, Oliver EI. Antimicrobial activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* isolates and their biofilms. S African J Bot. 2015; 99:115-121.
36. Montes-Belmont R. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana Micología. 2009; 29:73-82.
37. Sequeira S, Cabrita EJ, Macedo MF. Antifungal on paper conservation: An overview. Int. Biodeter Biodegr. 2012; 74:67-86.
38. Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. 2009. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. J Med. Microbiol. 2009; 58:1454-1462.
39. Rana IS, Rana AS, Rajak RC. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* L. by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. Braz. J Microbiol. 2011; 42:1269-1277.
40. Šegvić Klarić M, Kosalec I, Mastelić J, Piecková E, Pepeljnak S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. Lett. Appl. Microbiol. 2007; 44(1):36-42.
41. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils: A review. Food Chem. Toxicol. 2008; 46:446-475.
42. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Front Microbiol. 2012; 3:12-16.
43. Zervos S, Moropoulou A. Methodology and criteria for the evaluation of paper conservation interventions. Literature review. Restaurator. 2006; 27:219-274.
44. Vaillant M, Valentín N. 1996. Principios básicos de la conservación documental y causas de su deterioro. 1ra edición. Ministerio de Educación: Instituto del Patrimonio Histórico Español:1996:158 p.