

Formulación de una solución antifúngica para la Preservación del Archivo Histórico de la Universidad Central del Ecuador

MARCELO D. CAMPUÉS ORDOÑEZ¹, LILIANA NARANJO¹, JAVIER RODRIGO SANTAMARÍA-AGUIRRE^{1*},
NATASHA SANMARTÍN², TROSKY YANEZ¹, PABLO BONILLA¹

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador, Quito.,

²Área Histórica, Archivo Histórico, Universidad Central del Ecuador, Quito.

*Correspondencia: jsantamaria@uce.edu.ec

Recibido: 2 octubre 2016, Aceptado: 30 agosto 2017

Resumen

La conservación documental en los últimos años cumple un rol importante en la sociedad, debido a que trata de recuperar la memoria histórica y el acervo documental de la misma. Uno de los problemas de mayor incidencia y dificultad es la presencia de hongos y sus productos metabólicos en los documentos, ya que potencialmente ocasionan la pérdida total de la información dificultando de esta forma los procesos de restauración. El presente estudio busca formular una solución para tratar esta contaminación de hongos, con el uso de fluconazol como agente antifúngico. Se inició aislando los hongos presentes en los libros, seguido del uso del Diagrama pseudoternario para la formulación de la solución de Fluconazol, y por último, se evaluó la eficacia de esta formulación por técnicas microbiológicas modificadas, obteniéndose de esta manera, una reducción porcentual de Unidades Formadoras de Colonias de hongos mayor al 90%, mediante la nebulización de una solución de Fluconazol al 24% compuesta por una mezcla de cosolventes: Agua: 20%, Metanol: 50%, Etanol: 30%, con un tiempo de aplicación de 15 minutos.

Palabras clave: Conservación documental, Fluconazol, Solución antifúngica, Nebulización.

Formulation of an antifungal solution for the preservation of the historical archive of the Central Ecuador University

Abstract

The documentary conservation in recent years plays an important role in society, because it tries to recover the historical memory, and the documentary acquires of it. One of the most prevalent and difficult problems is the existence of fungi and its metabolic products in documents, as it potentially causes a total loss of information, hindering the restoring process as well. The study seeks to formulate a solution to treat this fungal contamination, using Fluconazole as an antifungal. We started by isolating fungi found in the books, followed by the use of the pseudo-ternary diagram for the formulation of the solution of Fluconazole, and finally the effectiveness of this formulations was evaluated by using modified microbiological techniques, obtaining a percentage reduction on CFU of 90%, by nebulization a solution of Fluconazole at 24% and co-solvents: Water: 20%, Methanol: 50%, Ethanol: 30%, during 15 minutes.

Keywords: Documentary conservation, Fluconazole, Antifungal solution, Nebulization.

1. Introducción

Los Centros documentarios o reservas históricas vienen cumpliendo un papel fundamental dentro de la sociedad, pues aportan a la comunidad mediante, la gestión de acciones, la educación, el desarrollo cultural, la toma de decisiones, la transparencia en las acciones administrativas, los avances en la educación, la cultura e investigación. A ellos se han venido vinculando profesiones de diferentes campos aportando a la conservación y preservación de los centros documentarios.

En la actualidad se da importancia al rescate de los documentos bibliográficos de las áreas Históricas, y son varios proyectos de conservación documental, que se han visto limitados al tratamiento tradicional de los documentos físicos, sin promover nuevos estudios científicos en este campo. En este contexto es que se han detectado varios problemas, siendo uno de los más importantes los agentes fúngicos que afectan a las fuentes bibliográficas físicas y sus espacios.[1]

El Área Histórica de la Universidad Central del Ecuador cuenta con un acervo documental inmenso, contiene alrededor de 30.000 libros y documentos del fondo antiguo de la Universidad que están comprendidos entre los años 1485 y 1960, abarcado un período de cinco siglos.

Entre los tratamientos tradicionales para la restauración de libros se encuentra el uso de ciertas técnicas para la eliminación de hongos siendo las más predominantes: el uso de atmosferas de dióxido de carbono y el tratamiento por congelación al vacío.

Los hongos son organismos eucariotas típicos que contribuyen a la descomposición de la materia orgánica, participando en los distintos ciclos biológicos. Los hongos presentes en documentos bibliográficos se los encuentra en forma de esporas y eucariotas desarrollados. El tipo y la extensión de estos contaminantes fúngicos depende de las características del libro como de las condiciones ambientales a las que se encuentre el mismo. Entre las condiciones ambientales óptimas para el crecimiento se encuentran: una alta humedad (40%), temperatura ambiental (21 °C), poca cantidad de luz, y baja circulación de aire.[2]

Los antimicóticos son fármacos que tienen la capacidad de evitar el crecimiento de hongos e incluso provocar la muerte de los mismos, por lo que se usan para tratar distintas enfermedades en humanos. El Fluconazol es un agente antimicótico de amplio es-

pectro, comúnmente usado en tratamientos debido a sus excelentes propiedades fisicoquímicas y su escasa toxicidad.[3]. A la fecha no se han encontrado estudios de Fluconazol en superficies inertes.

Una herramienta utilizada para formular soluciones de fármacos por cosolvencia es el diagrama pseudoternario en el que cada uno de los componentes puros están representados en cada vértice y pueden ser expresados mediante % peso/peso o Molaridad. La suma de los tres componentes debe llegar a 100%. [4]

El objetivo principal de esta investigación fue formular una solución anti fúngica capaz de eliminar los hongos presentes en los libros sin alterar sus características físicas, para lo cual en primera instancia se aislaron e identificaron los hongos presentes en los libros del Archivo Histórico de la Universidad Central de Ecuador, para luego formular una solución anti fúngica usando Fluconazol, y al final evaluar la eficacia de estas soluciones formuladas.

2. Parte Experimental

Equipos y Materiales: Para el aislamiento de los hongos se utilizó como medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar, para la identificación de los mismos se observó su estructura y morfología con el uso de un microscopio (Lumin) y las técnicas de tinción Gram para bacterias y el reactivo de Azul de Lactofenol para hongos. La incubadora que se utilizó fue Gemmyco Digital # IN-601. Durante la elaboración de las Formulaciones se utilizó como materia prima Fluconazol, Etanol (96%), Metanol técnico (USP), Agua destilada tipo 2. En la valoración del Fluconazol se utilizó un espectrofotómetro UV -VIS (HACH). Para la esterilización de todo el material se usó un autoclave vertical (BIOBASE), y se trabajó todo el procedimiento microbiológico en un cabina de flujo laminar (Flow 85V). Para la aplicación de las soluciones se utilizó un nebulizador (TF01), con capacidad de 2,2 L y tasa de evaporación 250 mililitros por hora.

Métodos de valoración de la materia prima Fluconazol: Se utilizó el método espectrofotométrico descrito en la Farmacopea Brasileña 2010 [5], la cual brevemente describe que se debe pesar un equivalente a 100 mg de Fluconazol en un matraz 100 mL. Añadir 70 mL de ácido clorhídrico 0,1 M, dejar en ultrasonido durante 10 minutos, aforar con el mismo disolvente, homogenizar y filtrar. Tomar 10 mL de esta solución y diluir con ácido clorhídrico 0,1 M en un matraz aforado de 50 mL hasta alcanzar una concentración de 0,02% (p/v). Leer en el espectrofotómetro a 261 nm. Este procedimiento se realiza para la muestra y estándar.

Análisis microbiológico del aire por sedimentación en placa: Este método se aplica en las áreas de almacenamiento del Área Histórica, donde en primer lugar se evalúa las áreas con mayor riesgo de contaminación a ser evaluadas, luego con las cajas Petri destapadas se colocan boca arriba y se las deja por 3 horas, al cabo de este tiempo se cierran las cajas y se incuban durante 7 días a 37°C. Se cuentan las colonias formadas y se reportan los datos respectivos[6].

Análisis de superficies no planas (libros) por hisopado: Se utilizó la técnica modificada descrita en [6], donde se coloca una plantilla 5x5 sobre la superficie a ser muestreada, con la ayuda de un hisopo estéril se fricciona sobre la superficie del libro en todas las direcciones, se coloca dentro de un tubo estéril que contiene 10 ml de solución salina y se agita enérgicamente por 1 minuto y luego se lo deja reposar 15 minutos, se siembra por extensión 0,1 ml de la solución en cajas Petri, se incuban a 37 °C por 7 días y se cuenta las colonias formadas.

Identificación de hongos por la prueba de azul de Lactofenol: Se toma una fracción de las colonias aisladas a ser identificadas, con la ayuda de una asa microbiológica y cinta adhesiva de 1 cm x 1 cm pegada al extremo del asa, con la superficie adhesiva tocar la parte superior de la colonia, colocar una gota de azul de Lactofenol en el porta objetos y pegar la cinta adhesiva sobre él, colocar una nueva gota sobre la cinta y cubrir con el cubreobjetos, Observar a 40x en el microscopio.[6]

Preparaciones de las soluciones antifungicas: Para la preparación de cada solución, se pesa la cantidad de Fluconazol correspondiente a la proporción

del diagrama pseudoternario, se miden los volúmenes de etanol, metanol y agua de acuerdo al mismo diagrama, con la ayuda de un agitador magnético mezclar el metanol, etanol y agua con agitación constante y a temperatura ambiente, luego con la ayuda de una espátula colocar poco a poco el Fluconazol en la mezcla hasta observar una completa disolución.

Análisis de la eficacia antifúngica de las soluciones de Fluconazol: Esta técnica se realizó mediante el método de muestreo en superficies irregulares con hisopo descrito anteriormente, antes y después de la nebulización de las distintas soluciones. Para lo cual de los libros presuntamente contaminados con hongos: 190 se tomó una muestra representativa con la Tabla Militarizada Estándar en un nivel de inspección N-2 obteniéndose 32 libros elegidos completamente al azar. A continuación sobre las hojas de un libro elegidas aleatoriamente se realiza el muestreo, se aplica la nebulización por el tiempo estimado en el diseño experimental y luego se realiza el muestreo final inmediatamente concluida la nebulización en las mismas hojas, el ensayo se realiza por triplicado, en tres hojas diferentes del mismo libro.

Diseño experimental: El diseño experimental se realizó para la eficacia anti fúngica y consiste en un Diseño Factorial Multivariable Completamente al Azar, con 2 Factores: Soluciones de Fluconazol, con 3 niveles y Tiempo de Aplicación, con dos niveles; con 3 repeticiones por cada ensayo siendo un total de 18 tratamientos realizados, midiendo como variable respuesta la reducción porcentual de UFC de hongos, analizados mediante un análisis de varianza y Optimización de Respuesta.

3. Resultados y Discusión

Microorganismos aislados por muestreo en el aire

Tabla 1. Microorganismos aislados por muestreo de aire.

Área de Riesgo	Promedio de Unidades Formadoras de colonias por caja (UFC/caja)	Identificación
Área Cuarentena	25	<i>Aspergillus sp, Penicillium sp.</i>
Pasillo General del Área Histórica	2	<i>Aspergillus sp.</i>
Sala de Extracción de Aire	15	<i>Aspergillus sp, Penicillium sp.</i>
Archivo Histórico	6	<i>Aspergillus sp, Penicillium sp.</i>

Como se puede observar en la Tabla 1 las familias más predominantes en el aire de la instalación del Área Histórica son dos: *Aspergillus sp* y *Penicillium sp*. Se observa

también que las áreas más contaminadas son La sala de Cuarentena y la de Extracción de Aire, por lo que los libros ubicados en estos sitios son lo más contaminados.

Microorganismos aislados por muestreo en libros contaminados

Tabla 2. Microorganismos aislados por muestreo en libros

Numero de Libros	Año de Publicación	Promedio de Unidades Formadoras de Colonias UFC / cm ²	Identificación
5	1500	25	<i>Aspergillus sp, Penicilliumsp.</i>
11	1600	64	<i>Aspergillus sp, Penicilliumsp.</i>
6	1700	6	<i>Aspergillus sp, Penicilliumsp.</i>
6	1800	12	<i>Aspergillus sp, Penicilliumsp.</i>
4	1900	9	<i>Aspergillus sp, Penicilliumsp.</i>

Como se puede observar en la Tabla 2 las familias más predominantes en las hojas de los libros son dos: *Aspergillus sp*, y *Penicillium sp.*, coincidiendo con los aislados en el aire. El número de hongos aislados es mayor en los siglos 1500 y 1600 debido

probablemente a la elevada cantidad de celulosa que se usaba para realizar libros en esa época. [7]

Las características morfológicas y microscópicas de las dos familias obtenidas son:

Tabla 3. Caracterización de los hongos aislados.

Familia	Descripción	Microscópica
<i>Penicillium</i>	Colonias aterciopeladas elevadas de color verde-gris.	Conidióforos rectos y hialinos, Conidias en cadena, esféricas y hialinas
	Colonias elevadas pulverulentas de color blanco	
<i>Aspergillus</i>	Colonias planas pulverulentas de color verde	Conidioforos hialinos de pared rugosa, Cabezuela radiada, biseriada, Conidias equinuladas, esféricas

Las características descritas en la Tabla 3 coinciden con la bibliografía [8], tanto en observación macroscópica: la forma, el color; la apariencia de los hongos, como en la observación microscópica hifas, conidios, micelios.

Formulación de la solución antifúngica

Una vez que se identificaron las familias de hongos presentes en los libros se seleccionó al Fluconazol como mejor alternativa para el tratamiento de los

mismos, debido a su alta solubilidad, menor grado tóxico y amplio espectro de acción[9]. La comparación de la gran mayoría de agentes anti fúngicos. La solución a ser el vehículo del Fluconazol debía cumplir ciertas condiciones como: no mojar excesivamente las hojas del libro, disolver la mayor cantidad posible de Fluconazol, y tener la capacidad de

nebulizar, seleccionándose así como solventes: Etanol, Metanol y Agua [10]. La proporción adecuada de los solventes se determinó usando un diagrama pseudoternario, en donde se tomaron en una primera etapa 19 puntos y luego en una segunda etapa 10 puntos en la zona con mejores resultados obteniéndose así la Figura 1:

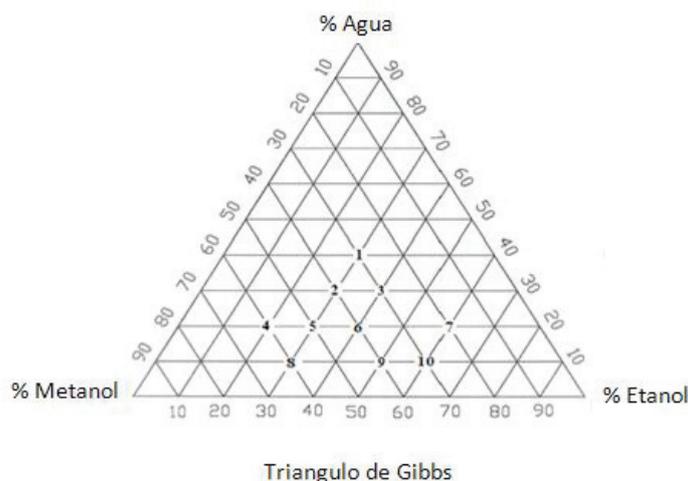


Figura 1. Diagrama pseudoternario con los 10 mejores resultados de % solubilidad, nivel de nebulización y daño físico perceptible

Una vez que se determinó el porcentaje disuelto de Fluconazol de cada una de las combinaciones se obtuvo la siguiente Tabla 4:

Tabla 4. Elección de las proporciones adecuadas de los solventes.

N-	% Agua	% Etanol	% Metanol	% Fluconazol disuelto	Apreciación de las gotículas de Nebulización	Apreciación de la Humedad del libro
1	40	30	30	13	Alta	Poca
2	30	30	40	16	Alta	Poca
3	30	40	30	15	Alta	Poca
4	20	20	60	22	Media	Ninguna
5	20	30	50	24	Media	Ninguna
6	20	40	40	23	Media	Ninguna
7	20	60	20	20	Media	Ninguna
8	10	30	60	24	Baja	Ninguna
9	10	50	40	27	Baja	Ninguna
10	10	60	30	30	Baja	Ninguna

Como puede observarse en la Tabla 4, los puntos 5, 9, y 10 son los que presentan mayor proporción de Fluconazol disuelto, una nebulización aceptable e imperceptible humedad sobre la hoja del libro (Figura 2). A las tres soluciones se evaluó la eficacia antifúngica.

Evaluación de la eficacia de las soluciones antifúngicas

Para cada tipo de formulación y a cada tiempo determinado de acuerdo al diseño, se evaluó la eficacia expresada como reducción porcentual mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ No Reducido} = \frac{\frac{ufc}{cm^2} \text{ final}}{\frac{ufc}{cm^2} \text{ inicial}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Reducido} = 100\% - \% \text{ No reducido} \quad (1)$$



Figura 2. Aplicación de la solución B nebulizada sobre el libro

De esta forma se obtuvieron los siguientes datos (fig 3):

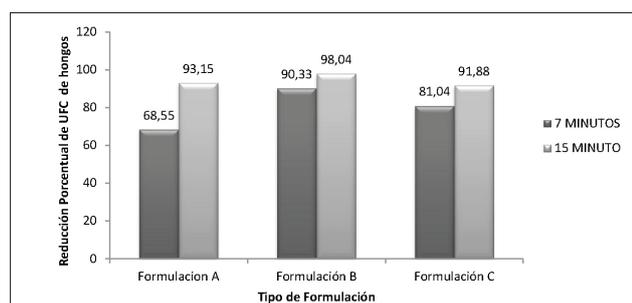


Figura 3. Comparación de la reducción porcentual de UFC de Hongos de las Formulaciones A, B y C a diferente tiempo de aplicación.

Como se puede observar en la Figura 3, la reducción porcentual de UFC de Hongos de la Formulación B (20% Agua: 30% Etanol: 50% Metanol), es mayor que la reducción porcentual de la Formulación A (10% Agua: 50% Etanol: 40% Metanol) y C (10% Agua: 60% Etanol: 30% Metanol) a los dos tiempos de aplicación 7 y 15 minutos, esto quizás se deba a que la Formulación B

tiene más cantidad de agua con lo que la nebulización mejora y hay mayor contacto de la solución con el libro.

Las concentraciones de Fluconazol aumentan cuando existe mayor cantidad de metanol y Etanol (Formulación A y C), pero disminuye el Nivel de Nebulización, esto se ve afectado en la reducción porcentual de UFC de Hongos de los mismos.

También se evaluó el efecto matriz de la mezcla de co-solventes, sin encontrar ningún efecto fungicida sobre los hongos aislados.

Análisis estadístico de la Eficacia de las soluciones de Fluconazol

Optimización de la Respuesta

Esta técnica ayuda a identificar los valores más probables de las variables que, en combinación, optimizaron una Reducción Porcentual de UFC del 100%. Se tomaron las medias de cada repetición de los dos factores resumidos en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos Experimentales para el diseño Factorial

Factor 1	Factor 2 (Tiempo de aplicación)	
	7 minutos	15 minutos
Formulación A	65,57 %	92,69 %
	65,18 %	93,12 %
	74,92 %	93,69 %
Formulación B	90,66 %	98,32%
	89,96 %	98,24%
	90,37 %	97,57%
Formulación C	77,79 %	92,01%
	81,38 %	92,35%
	83,95%	91,29%

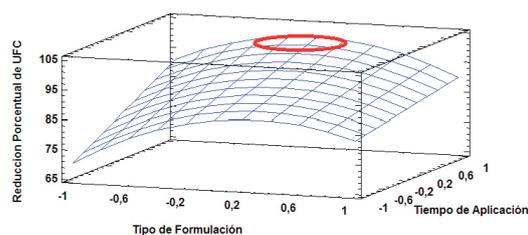


Figura 4. Optimización de Superficie de Respuesta del Tiempo de Aplicación y el Tipo de Formulación.

El círculo que muestra la Figura 4 señala el área con mayor Reducción Porcentual estimada. Con valores que representan las Formulaciones A, B, y C (valores de 1 a -1) y en Tiempo de Aplicación de 7 a 15 minutos, Obteniéndose así una Reducción Porcentual Estimada del 100% con la formulación B y 15 minutos para el tiempo de Aplicación.

4. Conclusiones

Se identificó mediante técnicas de aislamiento microbiológicas (muestreo de aire y muestreo de superficies por hisopado), dos familias principales de hongos presentes en los libros del Área Histórica: *Aspergillus* y *Penicillium*.

Se determinó las proporciones adecuadas de la mezcla de solventes, mediante el diagrama pseudoternario, necesarias para obtener la mayor solubilidad de

principio activo (Fluconazol), una nebulización aceptable, y una eficacia antifúngica adecuada para poder remplazar a los tratamientos comúnmente usados, encontrándose así que la proporción con la que se obtuvo Reducciones Porcentuales de UFC de Hongos mayores al 90% fueron: Agua: 20%: Metanol 50%: Etanol 30%.

Se determinó que existe un efecto estadísticamente significativo del tiempo de aplicación y del tipo de formulación concluyendo que a mayor tiempo de aplicación existe una mayor eficacia de las soluciones y que la composición de las mismas influye directamente en la eficacia de las soluciones.

Se identificó mediante la técnica de Optimización de respuesta que la mejor combinación para obtener Reducciones porcentuales de UFC de hongos de 100% es la Formulación B y el Tiempo de aplicación de 15 minutos.

Referencias

- [1] SanMartín, N. (2015). Proyecto de Recuperación de la Memoria Histórica y Conservación del Acervo, Quito: UCE.
- [2] Aristegui, B. (2002). El reino de los hongos. Revista Iberoamericana de Micología, 2,3.
- [3] Biasoli, M. (05 de 2013). Estructura y actividad de antifungicos. Recuperado el 20 de 07 de 2015, de <http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/4130/course/section/1519/Estructura%20y%20actividad%20de%20los%20antifungicos.pdf>
- [4] Selvaduray, G. (2004). Ternary phase diagrams. California.
- [5] Farmacopea; Brasileña. (2010). Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Obtenido de http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm.
- [6] Teran, R. (2015). Manual de Laboratorio de Micorbiología Farmacéutica. Quito.
- [7] Marcowist, B. (1990). How to prevent and remove mildew. Washington: Government Printing.
- [8] Tangafire, V. (2011). UDEA. Obtenido de: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?inpopup=true&id=100812>
- [9] Avendaño, C. (2001). Introducción a la química farmacéutica (2a. ed.). Madrid, España: McGraw-Hill.
- [10] USP32-NF27. (2009). The United States Pharmacopeial The National Formulary. (32a. ed.).