

FUNGO EM PAPÉIS PARA IMPRIMIR E ESCREVER

Maria Luiza Otero D´Almeida, Maria Beatriz Bacellar Monteiro, Patrícia de Souza Medeiros Barbosa
Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, Brasil. + 55 11 3767-4464, malu@ipt.br,
mbbmonte@ipt.br, pbarbosa@ipt.br

RESUMO

Países tropicais, como o Brasil, apresentam condições de temperatura e umidade favoráveis ao desenvolvimento de fungos, sendo o papel um de seus substratos preferenciais. Os fungos podem causar manchas e degradar as fibras celulósicas do papel, vindo a comprometer a permanência de documentos ao longo do tempo. Tanto os papéis ácidos como os alcalinos são passíveis de ataque por fungos. O objetivo deste estudo foi efetuar uma pesquisa exploratória sobre a natureza química das manchas produzidas pelo fungo *Cladosporium* sp, que ocorre com maior frequência em acervos de papel.

PALAVRAS-CHAVE

Papel, *Cladosporium* sp, manchas.

ABSTRACT

Tropical countries, as Brazil has conditions of temperature and humidity favorable to the development of fungus, being paper one of its preferential substratum. The fungus can cause spots on paper and degrade its cellulose fibers, compromising documents permanence. Both, acid and alkaline paper can be attacked by fungus. The objective of this study was an exploratory research of the chemical nature of the spots caused by the *Cladosporium* sp fungus, which is the one more frequently found in paper.

KEYWORDS

Paper, *Cladosporium* sp, spots.

INTRODUÇÃO

A conservação da integridade do papel é especialmente importante no caso de papéis para imprimir e escrever, pois estes são utilizados na geração de documentos que necessitam permanecer ao longo do tempo. Neste aspecto, o século XX foi o que produziu o papel de pior qualidade, principalmente antes do advento da colagem alcalina. De acordo com especialistas europeus, mais de 25% dos livros publicados após 1850, espalhados em doze países da Comunidade Européia, ou seja, por volta de um bilhão de livros estão condenados e progressivamente virando pó em suas estantes (PAISTE, 1982).

A auto destruição do papel tem sido explicada como decorrente da deterioração de suas fibras celulósicas, sendo esta especialmente significativa em papéis com colagem ácida (DIXON,1962 - ROBERSON,1976 - SCLAWY E WILLIAMS, 1981 - LYNE, 1995). No entanto, outros fatores também podem vir a afetar a integridade do papel ao longo do tempo, como gases poluentes (GURNAGUL,1977), a presença de certos metais (MCCRADY, 1996 – ZAPPALA, 1988) e, ainda, em países tropicais, o ataque por microrganismos.

A questão da integridade do papel visando sua permanência ao longo do tempo tem sido largamente estudada, abordando desde a cinética do envelhecimento do papel (ZOU et al., parte I,1996), até o desenvolvimento de métodos destinados a predizer sua permanência (ZOU et al., parte II,1996) ou a classificá-lo como permanente (ARNOLD, 1999). Entretanto, no que diz respeito aos microrganismos que atacam o papel pouca importância tem sido dada aos fungos, talvez porque seus ataques se restrinjam a regiões pontuais e não ao papel como um todo, no entanto, eles ocorrem tanto em papéis ácidos como alcalinos (HIRAYAMA, 1998 - BAYNES, 1976).

A presença de fungos representa freqüentemente uma ameaça à saúde (GAMBALE et al., 1993), além disto, a maioria causa no papel manchas de difícil tratamento, que afetam o visual e, eventualmente, impedem a leitura de documentos. Essas manchas podem ser atribuídas a substâncias químicas formadas durante o processo metabólico dos fungos, que utilizam a celulose como fonte de nutrientes para o seu metabolismo, e também ao próprio corpo colorido do fungo (SZCZEPANOWSKA, LOVETT, 1992 – NIETO-FERNANDEZ et al., 2004).

A deterioração microbiológica da celulose consiste em uma hidrólise enzimática catalisada pelas enzimas celulasas, produzidas por fungos e bactérias (NEVELL, HAIGZERONIAN, 1985).

O objetivo deste trabalho é apresentar um estudo realizado com um fungo específico visando verificar se a natureza química de suas manchas é procedente de uma única substância ou de uma mistura. Para tal, folhas de papel foram inoculadas com o fungo *Cladosporium* sp que é um dos gêneros mais encontrados, tanto em acervos do Brasil (GAMBALE et al., 1993 – PRONIEWICZ et al., 2002) como de outros países (VALENTIN, 1986 – FLORIAN, 1997).

O *Cladosporium* sp, como a maioria dos fungos que ocorrem em papel, tem seu ciclo de vida iniciado com a germinação do conídio (esporo assexuado) na superfície do papel e produção de um estágio germinativo (hifa) (FLORIAN, 1993 - FLORIAN, 1997). Os conídios possuem a função reprodutiva e são os principais veículos de dispersão. As hifas são estruturas multicelulares, cilíndricas e com extremidade ramificada, de onde os conídios são gradualmente liberados. Um conjunto ou colônia de hifas é conhecido como micélio. A estrutura em micélio confere aos fungos uma elevada relação área/volume, facilitando a aquisição de alimento, pois esta estrutura rapidamente se estende em todas as direções sobre o alimento. A forma circular do micélio deve-se ao crescimento concêntrico das hifas a partir de um conídio central. Esse crescimento pode ocorrer na superfície do material ou no seu interior.

EXPERIMENTAL

A metodologia de trabalho consistiu basicamente na formação de folhas de papel, na produção de manchas no papel por inoculação com o *Cladosporium* sp e na análise da natureza química das manchas por espectroscopia no infravermelho e cromatografia gasosa.

Formação de folhas

Folhas de papel de 90 g/m² foram manufaturadas em laboratório no formador TAPPI, a partir de uma pasta celulósica branqueada de eucalipto, procedente de processo industrial, refinada em refinador PFI até um grau de refino de 40°SR. Para o refino e formação de folha foram seguidos os procedimentos descritos nas normas NBR 14347 e NBR 14479, respectivamente.

Produção de manchas no papel

Para produção de manchas foi utilizada uma cepa do fungo *Cladosporium* sp, isolada de um acervo histórico (IPT, 2004). Este fungo foi repicado em placa de Petri contendo como meio de cultura batata, dextrose e ágar (meio BDA) solidificado. A placa foi mantida na incubadora a (27 ± 8)°C e (65 ± 15) % de umidade relativa por 15 dias e o crescimento da colônia foi acompanhado visualmente.

Para a inoculação, foram utilizados corpos-de-prova de papel de 5 x 5 cm extraídos das folhas formadas e esterilizados em autoclave (1,5 kg/m²) durante 20 min. O procedimento de inoculação consistiu na aplicação de um fragmento da colônia do *Cladosporium* sp na extremidade do corpo de prova, esterilizado e contido em uma placa de Petri contendo o meio BDA solidificado.

Após a inoculação, as placas foram transferidas para uma incubadora, a (27 ± 8)°C e (65 ± 15) % de umidade relativa, e o desenvolvimento das colônias sobre os corpos-de-prova foi acompanhado visualmente. O período de incubação foi o suficiente para produzir no papel manchas características da proliferação de fungos.

Depois da incubação, o fungo foi removido mecanicamente do corpo-de-prova por aspiração, utilizando-se um sistema de vácuo adaptado. Este processo é usualmente empregado para remoção de fungos de superfícies. Após a aspiração, os corpos-de-prova foram secos ao ar e em seguida

refrigerados a 5°C, para evitar o desenvolvimento de colônias remanescentes, uma vez que, o método de aspiração mecânica não apresenta eficiência máxima. A **Figura 1** apresenta fotos do fungo *Cladosporium* sp utilizado no estudo.

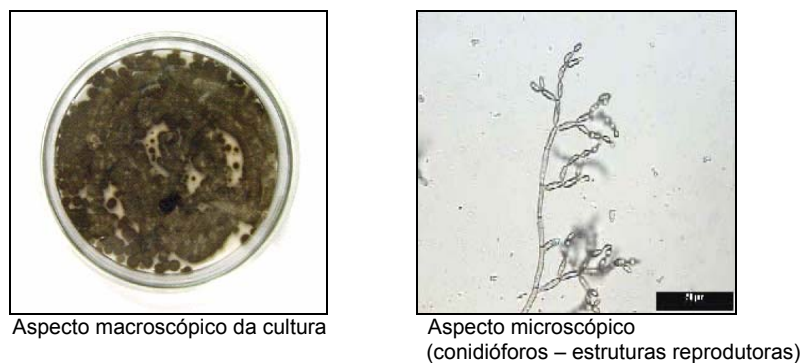


Figura 1 - Foto da estrutura do fungo *Cladosporium* sp.

Análise das manchas

A análise das manchas consistiu em sua caracterização física e na verificação de sua natureza química.

Para a caracterização física foram utilizados as seguintes técnicas e equipamentos: (i) Microscopia óptica, no microscópio marca Leica MZAPO, acoplado a uma câmera digital colorida Samsung SSC-131 e software analysis; (ii) Microscopia eletrônica de varredura, no microscópio Joel, modelo JSM 5200.

Para a verificação da natureza química das manchas foi empregada a espectrofotometria na região do infravermelho, empregando técnica de medição direta e de extração com o solvente acetonitrila, que entre todos testados (etanol, acetona, clorofórmio, éter de petróleo, N,N-dimetilformamida e acetonitrila), foi o único capaz de extrair apenas o material da mancha.

Os testes com os solventes consistiram na exposição de fragmento de papel, com e sem mancha, durante um curto período, à frio e posteriormente à quente em um banho-maria de 100°C. Para o solvente escolhido foi assegurado que seu extrato não contivesse produtos coloridos de degradação da celulose, por meio de provas em branco, utilizando o papel sem mancha e análise por espectrofotometria no infravermelho.

Para a espectrofotometria no infravermelho as técnicas e equipamentos utilizados foram: (i) Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier, pela técnica de refletância total atenuada (ATR) com cristal de ZnSe, espectrofotômetro modelo Protecê 460, marca Nicolet; (ii) Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier, marca Shimadzu, modelo FTIR-8300, acoplado ao microscópio marca Shimadzu, modelo AIM-8800; (iii) Espectrofotometria no infravermelho, com transformada de Fourier, filme sobre cristal KRS-5, espectrofotômetro modelo Protecê 460, marca Nicolet.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização física

O fungo *Cladosporium* sp que cresceu na superfície do papel tem aspecto de bolor e, mesmo após sua aspiração deixa no papel uma mancha de coloração preta, como mostrado nas **Figuras 2 e 3**.

A cor de mancha escura produzida pelo fungo *Cladosporium* sp no papel pode ser devida a presença de melanina. A melanina é um pigmento sintetizado por alguns fungos em resposta à mudanças ambientais, protegendo-os da ação de radiação ultravioleta, temperaturas elevadas, agentes oxidantes e fungicidas (NIETO-FERNANDEZ et al., 2004). Esse pigmento causa manchas de coloração marrom e preta no substrato e sua remoção é difícil e normalmente causa danos no papel. As melaninas são polímeros de alto peso molecular, compostos de vários tipos de monômeros

fenólicos e indólicos. Esses polímeros são encontrados na parede celular do micélio vegetativo e em estruturas reprodutivas como os conídios. No caso do fungo estudado, a melanina é derivada do composto 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN).

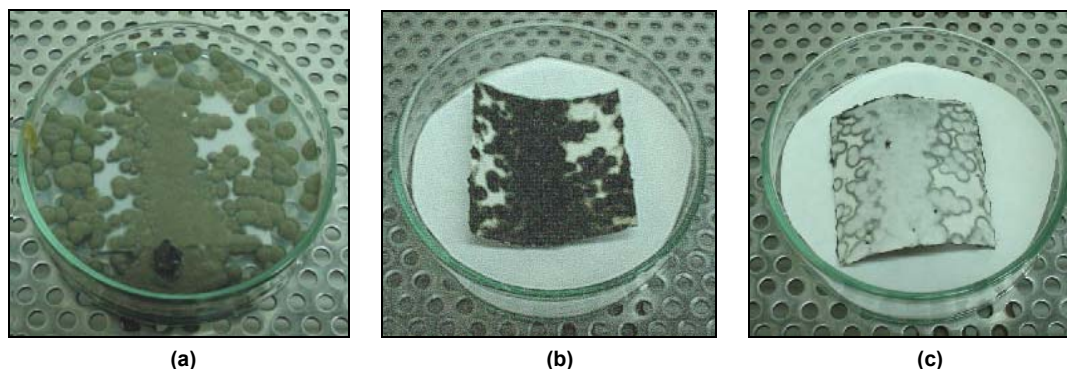


Figura 2 - (a) Placa de Petri contendo meio de cultura, papel e fungo após o desenvolvimento da colônia; (b) papel após aspiração do fungo – lado em contato direto com o fungo e (c) papel após aspiração do fungo– lado não em contato direto com o fungo.

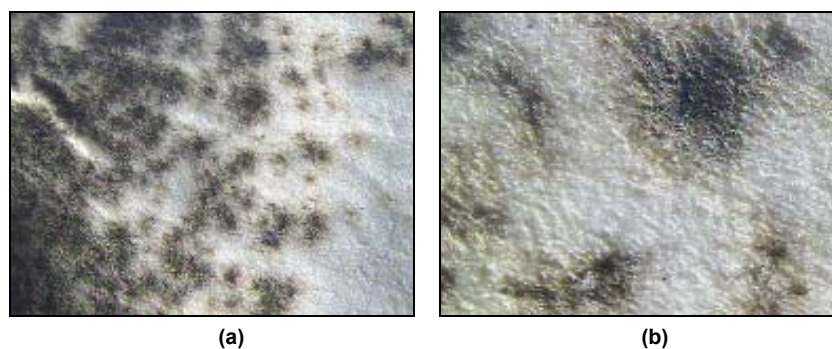


Figura 3 - Imagens de microscopia óptica do papel manchado com aumento de (a) 8X e (b) 32X.

O fungo uma vez instalado no papel não é facilmente removível, pois suas hifas adentram nos interstícios do papel, como evidencia a **Figura 4**, que apresenta fotomicrografias de regiões do papel com e sem mancha, tiradas em microscópio eletrônico. Nas fotomicrografias **4 (c)** e **4 (d)** observa-se filamentos tubulares curtos e não longos, como característicos dos fungos, porque, provavelmente, o processo de aspiração provocou danos estruturais na colônia de fungos.

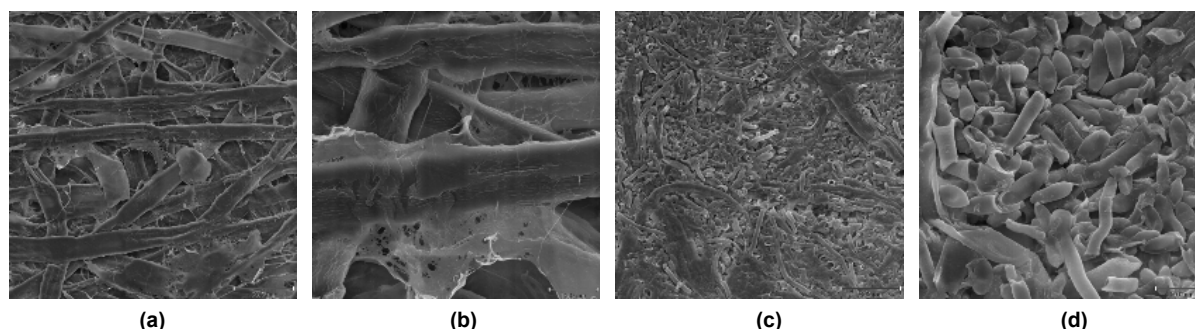


Figura 4 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície sem mancha do papel, com aumento de (a) 500X e (b) 2000X e da superfície manchada e aspirada do papel, com aumento de (c) 500X e (d) 2000X.

Caracterização química

As técnicas de medição direta por espectrofotometria no infravermelho não se mostraram eficientes. Por ATR o que predominava era o espectro de celulose, dificultando qualquer interpretação. Por

microscópio acoplado ao espectrofotômetro não se conseguiu boa definição, talvez devido a baixa resolução do equipamento utilizado aliada a complexidade da amostra.

O papel com e sem mancha e fragmentos da colônia do *Cladosporium* sp, foram, respectivamente, submetidos à extração com acetonitrila, em aparelho Soxhlet durante 12 h. As amostras foram pesadas antes e após a extração para a determinação da eficiência do processo. Aparentemente não ocorreu extração significativa de material do papel sem mancha, por outro lado, a quantidade de material extraída do papel como mancha foi ao redor de 18% e a extraída dos fragmentos de fungo foi ao redor de 51%. Os extratos foram analisados por espectrofotometria no infravermelho e os espectrogramas obtidos são apresentados na **Figura 5**.

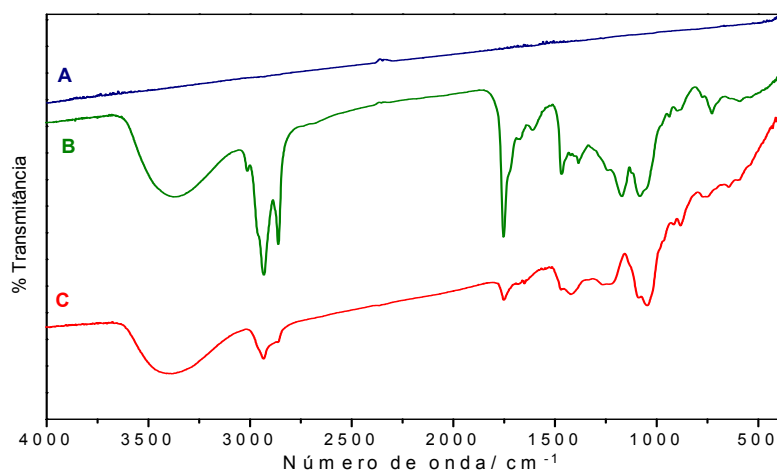


Figura 5 - Espectros FTIR entre 4000-400 cm^{-1} dos extratos das amostras (A) papel sem mancha, (B) colônia do *Cladosporium* sp e (C) papel manchado.

Observando-se a **Figura 5** verifica-se que os espectros do extrato dos fragmentos da colônia de fungo e do papel manchado são semelhantes, sendo, no entanto, as bandas no caso do papel manchado menos intensas. Os espectros **5-B** e **5-C** indicam que nos extratos estão presentes várias substâncias e não uma única, assim, apenas com a técnica por infravermelho é impossível verificar a natureza química dos componentes da mistura. Para tal deve ser empregada a análise por cromatografia. A cromatografia é uma técnica de separação de componentes de uma mistura, que se baseia na diferença de distribuição destes entre duas fases, uma estacionária e outra móvel.

Ao que tudo indica a mancha causada pelo *Cladosporium* sp no papel é devido à presença do próprio corpo do fungo, que fica incrustado no papel e não é removido nem sob extração com solvente, como pode ser observado nas fotomicrografias apresentadas na **Figura 6**, para a superfície do papel manchado após a extração com acetonitrila. Nestas fotos dificilmente se vê as fibras celulósicas, que estão praticamente cobertas pelos filamentos do fungo.

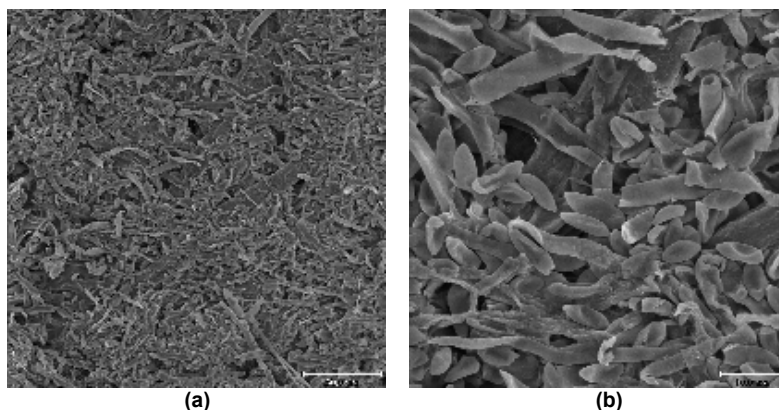


Figura 6 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do papel manchado após tratamento com acetonitrila, com aumento de (a) 500 X e (b) 2000X.

CONCLUSÕES

Manchas causadas pelo *Cladosporium* sp, fungo mais freqüentemente encontrado no papel, são de difícil remoção, quando não impossível, pois estão relacionadas ao próprio corpo do fungo, que fica incrustado no papel. Adiciona-se a isto o fato destas serem compostas por uma mistura de substâncias, o que dificulta a escolha de tratamentos químicos para removê-las.

Existem normas técnicas, como a ISO 9706 e ISO 11108, que apresentam os requisitos necessários para a permanência do papel ao longo do tempo, mas abordam, geralmente, apenas suas características químicas e físicas. Nas questões relacionadas a integridade do papel, visando sua permanência ao longo do tempo, devem ser considerados também os ataques por fungos.

Em países tropicais medidas de prevenção contra o ataque de fungos devem ser redobradas, visto que estes causam danos praticamente irreversíveis no papel.

BIBLIOGRAFIA

ARNOLD, R.B. Update: ASTM/SR paper aging research program. *Alkaline Paper Advocate*. v.9, n.2, July. 1999. Disponível em:< <http://palimpsest.stanford.edu>>. Acesso em 04/05.

BAYNES, B. Some observation on foxing at the British Museum Research Laboratory. *International Biodeterioration Bulletin*, v.12, n.1, p.31-33, 1976.

DIXSON Jr., H.F. An accelerated aging study of several writing papers. *TAPPI*, v.45, n.10, p.753-760, 1962.

FLORIAN, M.L.E. Conidial fungi (mould) activity on artifact materials - A new look at preservation, control, and eradication. *ICOM Committee for Conservation*, v.2, p.868-874, 1993.

FLORIAN, M.L.E.. *Heritage eaters: insects and fungi in heritage collections*. [s.l.] : James and James, 1997. 150p.

GAMBALE, W.; CROCE, J.; COSTA-MANSO, E.; CROCE, M.; SALES, M. Library fungi at the University of São Paulo and their relationship with respiratory allergy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, v.3, n.1, p.45-50, 1993.

GURNAGUL, N.; ZOU, X. The effect of atmospheric pollutants on paper permanence: a literature review. *TAPPI Journal*, v.77, n.7, p.199-204, 1977.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO - IPT. *Fungos no acervo do Arquivo Histórico Municipal Washington Luís*. São Paulo, 2004. 33p. (IPT - Relatório Técnico, 71792).

HIRAYAMA, R.; D'ALMEIDA, M.L.O.; MOKDESSI, F.A. et al. A influência dos banhos de limpeza e da reencolagem nas propriedades do papel. In: CONGRESSO ABRACOR, 9.,1998, Salvador. *Anais...* Salvador : Associação Brasileira de Bens Culturais, 1998.

LYNE, M. B. The effect of pH on the permanence of LEC paper and fine paper made from recycled LWC. *TAPPI Journal*, v.12, n.12, p.138-144, 1995.

MCCRADY, E. Effect of metals on paper: a literature review. *Alkaline Paper Advocate*, v.9, n.1, May 1996. Disponível em:<<http://palimpsest.stanford.edu>>. Acesso em 04/05.

NEVELL, T.P.; HAIGZERONIAN, S. (Eds.). *Cellulose chemistry and its applications*. Chichester, England; New York : E. Horwood : Halsted, 1985. 552p.

NIETO-FERNANDEZ, F. E.; CENTENO, S. A.; WYPYSKI, M. T.; DI BONAVENTURA, M. P.; BALDWIN, A. M.; KOESTLER, R. J. Enzymatic approach to removal of fungal spots from drawings on paper. In: KOESTLER, R.J.; CHAROLA, A.E.; NIETO-FERNANDEZ, F.E. (Eds). *Art, biology and*

conservation: biodeterioration of works of art. New York : The Metropolitan Museum of Art, 2004. p.111-127.

PAISTE, D.F. Consideration for alkaline papermaking. *TAPPI*, New Sizing Methods and Their Effects on Fibers fillers and Dyes. Atlanta, Ga, 1982.

PRONIEWICZ, L.M.; PALUSZKIEWICZ, C.; WESELUCHA-BIRCZYNSKA, A.; BARANSKI, A.; DUTKA, D. FT-IR and FT-Raman study of hydrothermally degraded groundwood containing paper. *Journal of Molecular Structure*, v.614, p.345-353, 2002.

PRONIEWICZ, L.M.; PALUSZKIEWICZ, C.; WESELUCHA-BIRCZYNSKA, A.; MAJCHERCZYK, H.; BARANSKI, A.; KONIECZNA, A. FT-IR and FT-Raman study of hydrothermally degraded cellulose. *Journal of Molecular Structure*, v.596, p.163-169, 2001.

ROBERSON, D.D. The evaluation of paper permanence and durability. *TAPPI*, v. 59, n.12, p.63-69, 1976.

SCLAWY, A. C.; WILLIAMS, J.C. Alkalinity: the key to paper permanence. *TAPPI*, v. 64, n.5, p.49-50, 1981.

SZCZEPANOWSKA, H.; LOVETT, C.M. A study of the removal and preservation of fungal stains on paper. *Journal of the American Institute for Conservation*, v.31, n.2, p.147-160, 1992.

VALENTIN, N. Biodeterioration of library materials disinfection methods and new alternatives. *Journal of the Institute of Paper Conservation*, v.10, p.40-45, 1986.

ZAPPALA, M. Influence of lead contaminants on the life of paper. *Cellulose Carta*, v.39, n.1, p.60-65, Jan/Feb. 1988.

ZOU, X.; UESAKA, T.; GURNAGUL, N. Prediction of paper permanence by accelerated aging I. Kinetic analysis of the aging process. *Cellulose*, v.3, n.4, p.243-267, Dec. 1996.

ZOU, X.; UESAKA, T.; GURNAGUL, N. Prediction of paper permanence by accelerated aging II. Comparison of the predictions with natural aging results. *Cellulose*, v.3, n.4, p.269-279, Dec. 1996.

AGRADECIMENTOS

À Mariza Koga e Vera Donnangelo (Divisão de Produtos Florestais - IPT), Shoko Ota e Dirceu Schaberle Gouveia (Centro de Metrologia Química - IPT); Henrique Toma e Omar El Seoud (Instituto de Química da USP).