



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

**Desarrollo de aditivos antimicrobianos basados en nanopartículas  
metálicas obtenidas por síntesis verde para su aplicación en  
recubrimientos**

---

**Tesista: Lic. Leyanet Barberia Roque**

**Director/a: Dra. Marisa R. Viera**

**Codirector/a: Dra. Natalia Bellotti**

**Año: 2022**



El presente trabajo para optar al grado de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata ha sido desarrollado en:

**Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas  
CIDEPINT (CICPBA-CONICET-UNLP)**

*A July, Lianys, Mimi, Magaly y Tatón*

## Agradecimientos

A Dra. Natalia Bellotti por su dirección, dedicación y confianza. Por su trabajo y su ejemplo.

A Dra. Marisa Viera por la dirección de esta tesis, el apoyo y los incontables aportes realizados.

A Dra. Cecilia Deyá por su apoyo en todo momento.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar mi estudio de postgrado mediante el otorgamiento de la beca doctoral.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT) y mis compañeros de trabajo por ofrecerme el lugar de trabajo para la realización del doctorado.

A Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva por el financiamiento otorgado.

A los Miembros del Jurado por acceder a leer, evaluar y contribuir con la mejora de este documento.

A mi familia, por estar y haber estado siempre para mí.

A mis amigos, hoy desperdigados por el mundo, gracias a todos por todo.



## Indice

Capítulo 1	- Introducción.....	14
1.1	Biodeterioro: generalidades .....	15
1.2	Pinturas .....	20
1.2.1	Solventes.....	21
1.2.2	Ligantes.....	23
1.2.3	Pigmentos .....	24
1.2.4	Aditivos.....	26
1.2.5	Aditivos antimicrobianos: biocidas .....	27
1.3	Química verde .....	31
1.4	Nanopartículas de plata.....	32
1.4.1	Síntesis verde de AgNPs a partir de extractos vegetales.....	34
1.4.2	Métodos de caracterización .....	36
1.4.3	Actividad antimicrobiana de las AgNPs.....	37
1.5	Pinturas antimicrobianas aditivadas con nanopartículas de plata .....	41
	.....	46
Capítulo 2	- Materiales y métodos .....	46
2.1	Síntesis de nanopartículas .....	47
2.1.1	Material Vegetal.....	47
2.2	Obtención de los extractos .....	51
2.2.1	Caracterización de los extractos .....	51
2.3	Síntesis de nanopartículas en solución acuosa .....	53
2.3.1	Determinación de las condiciones de síntesis.....	53
2.4	Caracterización de las nanopartículas .....	53
2.4.1	Purificación de las nanopartículas .....	53
2.4.2	Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis) .....	54

2.4.3	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	54
2.4.4	Difracción de rayos X (DRX).....	55
2.4.5	Microscopía electrónica de transmisión (MET) .....	55
2.4.6	Microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	56
2.4.7	Espectrometría de dispersión de energía mediante rayos X (EDS) .....	56
2.5	Evaluación de la actividad antimicrobiana .....	56
2.5.1	Selección de Cepas.....	57
2.5.2	Medios de Cultivo .....	60
2.5.3	Ensayo de difusión de en agar con bacterias .....	61
2.5.4	Ensayo de difusión de en agar con hongos .....	61
2.5.5	Ensayo de microdilución.....	62
2.5.6	Determinación de las concentraciones fungicidas y bactericida mínimas ...	63
2.6	Evaluación de potencialidades antimicrobianas en películas de pintura .....	64
2.6.1	Formulación de pinturas .....	64
2.6.2	Ensayo normalizado de potencialidades antifúngicas de las pinturas .....	65
2.6.3	Ensayo de resistencia al desarrollo de biopelículas bacterianas.....	66
2.6.4	Observación al microscopio de las biopelículas.....	66
2.7	Caracterización de las tierras de diatomeas .....	67
2.8	Funcionalización de las TDs .....	69
2.8.1	Activación de las TDs .....	69
2.8.2	Determinación de la adsorción de iones $Ag^+$ por parte de las TDs.....	69
2.8.3	Incorporación de solución amoniacal en el proceso de síntesis.....	70
2.8.4	Reducción de los iones $Ag^+$ adsorbidos.....	70
2.9	Caracterización de las TDNF .....	71
2.10	Exploración de las potencialidades antimicrobianas las TDNF .....	71
2.11	Formulación de pinturas .....	71

2.12	Determinación de las características de las pinturas .....	72
2.12.1	Contenido de pigmento.....	72
2.13	Ensayos normalizados específicos para las pinturas .....	73
2.13.1	Ensayos no específicos .....	73
2.14	Envejecimiento de las pinturas .....	74
2.15	Características de las películas de pintura.....	74
2.15.1	MEB .....	74
2.15.2	FTIR .....	74
2.15.3	Medición de color .....	74
2.16	Ensayos antimicrobianos.....	75
2.17	Evaluación de pinturas líquidas y estudio de biodeterioro asociado.....	76
2.17.1	Observaciones a ojo desnudo .....	77
2.17.2	Evaluación de la estabilidad de las pinturas .....	77
2.18	Obtención de los aislados bacterianos.....	78
2.18.1	Aislamiento .....	78
2.18.2	Pruebas bioquímicas y culturales .....	78
2.18.3	Análisis por técnicas moleculares .....	79
2.18.4	Observaciones por microscopía electrónica de barrido.....	80
2.18.5	Conservación.....	80
2.18.6	Aplicación de la norma ASTM D2574 para la evaluación de la eficiencia de productos antimicrobianos .....	81
2.18.7	Cepas Bacterianas .....	82
2.18.8	Subcultivo en pintura control.....	82
2.18.9	Precultivos.....	82
2.18.10	Ensayo en placa de 24 pocillos .....	82
2.19	Evaluación de TDNF como antimicrobianos para pintura líquida .....	83

2.19.1	Selección de pinturas y microorganismos .....	83
2.19.2	Procedimiento.....	83
2.19.3	Lectura, procesamiento e interpretación de los resultados .....	83
Capítulo 3	– Síntesis verde de nanopartículas de plata .....	85
3.1	Material vegetal y caracterización de los extractos .....	86
3.1.1	Componentes fitoquímicos, cuantificación de polifenoles totales y FTIR ....	86
3.2	Síntesis de las nanopartículas .....	90
3.3	Caracterización de las nanopartículas .....	92
3.4	Evaluación de la actividad antimicrobiana .....	101
3.5	Evaluación de potencialidades antimicrobianas en películas de pintura .....	107
Capítulo 4	- Funcionalización de tierra de diatomeas con nanopartículas de plata ....	113
4.1	Estructura y composición de las TDs.....	114
x3000	.....	114
10 µm	.....	114
4.2	Funcionalización de las TDs.....	118
4.3	Caracterización de TD2A5E, TD2A5N, TD2NA5E y TD2NA5N .....	123
4.4	Potencialidades antimicrobianas .....	134
Capítulo 5	– Evaluación de la actividad antimicrobiana en película .....	136
5.1	Formulación y preparación de las pinturas .....	137
5.2	Características de las películas de pintura.....	138
5.3	MEB de las películas de pintura.....	141
5.4	FTIR de las películas de pintura .....	145
5.5	Cambio de color en las películas de pintura.....	147
5.6	Actividad antimicrobiana de las películas de pintura .....	150
Capítulo 6	- Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas como conservantes	162

6.1	Evaluación de la calidad de las pinturas en el envase .....	163
6.1.1	Aislamiento, caracterización e identificación de contaminantes microbianos a partir de PSW1 .....	165
6.2	Características de <i>Bacillus horneckiae</i> .....	171
6.3	Comparación de <i>B. horneckiae</i> y <i>P. aeruginosa</i> como indicadores de biodeterioro.....	172
6.4	Evaluación de la actividad antimicrobiana en el envase .....	173
6.5	Evaluación de TD2NA5E y TD2NA5N como antimicrobianos para pintura líquida mediante la norma ASTM D2574 .....	174
Capítulo 7	- Discusión general.....	179
Capítulo 8	- Conclusiones.....	185
Bibliografía.....		189

## **Abreviaturas y acrónimos**

AMH: Agar Müller Hinton

AEM: Agar Extracto de Malta

CBM: Concentración bactericida mínima

CIM: Concentración inhibitoria mínima

FTIR: Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

IR: Infrarrojo

DRX: Difracción de rayos X

LB: Medio de cultivo Luria-Bertani

MEB: Microscopía electrónica de barrido

MET: Microscopía electrónica de transmisión

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Buffer fosfato salino

UFC: Unidades formadoras de colonias

## **Glosario**

**Antimicrobiano:** agente que mata microorganismos o detiene su crecimiento.

**Biocida:** sustancia química sintética o de origen natural destinada a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o, ejercer un control de otro tipo, sobre cualquier organismo. En la industria de los recubrimientos se usa el término biocida o microbiocida para denominar en forma genérica a los aditivos con probada actividad antimicrobiana que forman parte de la composición de las pinturas. Esta terminología está comprendida en un lenguaje aplicado por los formuladores que no siempre coincidirá con una actividad biocida real en el producto final.

**Biodeterioro:** fenómeno complejo que implica alteraciones de las propiedades físico--químicas y mecánicas del material por acción o presencia de organismos biológicos y sus productos. A ello hay que añadir las modificaciones del aspecto estético que se producen en los materiales afectados.

**Biopelícula:** ecosistema microbiano organizado, conformado por una o varias especies de microorganismos asociados irreversiblemente a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas.

**Materiales estructurales:** materiales linealmente elásticos, el acero, el hormigón, la mampostería, la madera, las membranas textiles y el aluminio utilizados en la construcción.

**Nanomateriales:** materiales con propiedades morfológicas en el orden nanométrico en al menos una dimensión.

**Nanopartícula:** partícula que posee las tres dimensiones menores que 100 nm.

**Potencialmente patógeno:** Son agentes infecciosos que pueden, bajo condiciones de inoculación y ambientales determinadas, provocar enfermedades a su huésped.

**Recubrimiento:** cualquier material (usualmente líquido) que pueda ser aplicado como una capa delgada y continua sobre una superficie (sustrato). Frecuentemente buscan mejorar algunas propiedades o cualidades de la superficie a proteger, tales como aspecto, adhesión, mojado, resistencia a la corrosión, resistencia al desgaste, resistencia al crecimiento de microorganismos y, resistencia a las rayaduras, entre otras.

Pintura: sistema disperso específico constituido por pigmentos, ligante (resina o polímero), solventes y aditivos. Estos sistemas pigmentados están diseñados para ser aplicados en capa delgada sobre el sustrato convirtiéndose en una película sólida opaca luego de la aplicación.

Síntesis Verde: síntesis de sustancias químicas utilizando de manera eficiente las materias primas, eliminando la generación de residuos y evitando el uso de reactivos y solventes tóxicos y/o peligrosos.



## Resumen

La preocupación creciente por el control de la colonización y crecimiento de hongos y bacterias en los interiores edilicios ha impulsado distintas líneas investigativas que comprenden el desarrollo de nuevas pinturas y recubrimientos con propiedades antimicrobianas que eviten el asentamiento de los microorganismos. Estas formulaciones contienen uno o más aditivos antimicrobianos llamados biocidas. Entre los productos investigados se destacan las nanopartículas de ciertos materiales metálicos (plata, cobre, selenio y oro) que han mostrado algún grado de bioactividad. Las nanopartículas se caracterizan por contar con propiedades dependientes del tamaño y la forma, a su vez, éstas son afectadas por el método y las condiciones de síntesis. Existe un creciente interés en desarrollar procesos de obtención de nanopartículas que sean amigables con el ambiente, es decir que eviten el uso de productos químicos cuestionados desde el punto de vista de su toxicidad. Esta tendencia enmarcada en la denominada química verde tiene como objetivos principales reducir los desechos, minimizar el uso de productos no seguros y beneficiar el uso de solventes y reactivos amigables con el ambiente. La síntesis verde de nanopartículas basada en el uso de extractos vegetales acuosos resulta promisoria por ser accesible, efectiva, segura, de bajo costo, no contaminante y por ofrecer vastas posibilidades. El objetivo de esta investigación fue desarrollar nuevos aditivos antimicrobianos de base nanotecnológica obtenidos por síntesis verde, aplicables en forma eficiente en la formulación de pinturas antimicrobianas que prevengan el biodeterioro. Para lograr este objetivo se trabajó en primer lugar en la obtención, caracterización y selección de las nanopartículas con mayor actividad tanto antibacteriana como antifúngica. En una siguiente etapa, se formularon y prepararon pinturas con los aditivos antimicrobianos desarrollados reemplazando los biocidas tradicionales que se usan en las pinturas comerciales fuertemente cuestionados desde el punto de vista de la salud y el impacto ambiental.

# Capítulo 1 - Introducción

## **1.1 Biodeterioro: generalidades**

En esta época de industrialización y comercialización globalizada la fabricación y comercialización de todo tipo de productos con el potencial de llegar a todos los rincones del mundo, abre una vía para la posible propagación de microorganismos a través de bienes, productos y de las personas que se desplazan consecuentemente. Por lo tanto, es de suma importancia frenar, si no eliminar, la propagación y el crecimiento de microorganismos en determinadas instalaciones.

El crecimiento microorganismos en interiores edificios no solo trae problemas sanitarios en los centros urbanos, sino que, también favorece el deterioro de los materiales expuestos. Los efectos causados por la conformación de comunidades microbianas en las superficies de: paredes, techos, muebles, telas, etc. se hacen notar frecuentemente en la modificación del aspecto exhibido por estos materiales. Se denomina biodeterioro a todo cambio indeseable experimentado en un material producto de la actividad vital de un organismo (Allsopp et al., 2004).

La colonización microbiológica de los materiales depende de distintos factores como la humedad, la temperatura, las propiedades superficiales y el tipo de material correspondiente y la cantidad de agua disponible (Adan and Samson, 2011). El crecimiento de microorganismos sobre los materiales estructurales ocurre en forma de biopelículas. Las biopelículas modifican el entorno en donde se desarrollan debido al impacto de los microorganismos y los productos extracelulares que las componen.

Los hongos filamentosos son considerados los más deteriorantes entre los microorganismos que colonizan los materiales estructurales, por sus características fisiológicas (Allsopp et al., 2004; Adan and Samson, 2011). Las esporas, que son los orgánulos de reproducción de estos hongos, germinan cuando se encuentran en un medio apropiado, lo que implica, que exista humedad disponible. Luego de la activación del metabolismo, seguido por un abultamiento de la espora de la cual se origina un pequeño tubo germinativo. El tubo se alarga hasta convertirse en una hifa que ramifica y continúa. Después de la adhesión irreversible de las esporas, estos hongos desarrollan un crecimiento apical característico a través de filamentos denominados hifas que crean una red compleja (micelio) (Harding et al., 2009). El micelio fúngico se extiende sobre el material, lo degrada, como consecuencia de su actividad metabólica y, además, a diferencia de las bacterias logra invadir la línea superficial debido al crecimiento invasivo que muestran sus

hifas (Adan and Samson, 2011). Los hongos son heterótrofos y obtienen sus nutrientes por ósmosis. Utilizan como fuente de carbono: carbohidratos simples, como la glucosa, sacarosa y maltosa; y también, compuestos más complejos como almidón, lignina y celulosa. Tienen la capacidad de utilizar nitrógeno orgánico, aunque algunas especies pueden usar nitrógeno inorgánico tal como sales de amonio. Pueden degradar y asimilar compuestos elaborando gran cantidad de enzimas hidrolíticas, como lipasas, pectinasas y proteinasas (Harding et al., 2009). Algunos hongos de las especies correspondientes a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, crecen rápidamente en presencia de azúcares simples, por otro lado, especies de los géneros *Stachybotrys*, *Trichoderma* y *Chaetomium* son celulolíticos y por lo tanto secretan celulasas para descomponer la celulosa en azúcares simples (Adan and Samson, 2011).

En cuanto al requerimiento de agua necesitan menos humedad para crecer que las bacterias. Por esta razón, muchos hongos pueden crecer en medios con baja actividad acuosa como libros, ropa, zapatos, paredes, así como también en alimentos (cereales, granos y harinas) donde la mayoría de las bacterias no podrían proliferar

Las bacterias son organismos unicelulares procariotas que presentan generalmente un tamaño que oscila entre 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de diámetro (Bender et al., 2016). Algunas bacterias utilizan  $\text{CO}_2$  como única fuente de carbono (autótrofos) y otras requieren de compuestos orgánicos como su fuente de carbono (heterótrofas). Asimismo, dependen de otros elementos indispensables en menores concentraciones, micronutrientes que son parte de los componentes celulares, como: el nitrógeno, el oxígeno, el azufre y el fósforo y elementos traza como el manganeso. Estos son obtenidos, dependiendo de la especie bacteriana, de diversas fuentes, que van desde compuestos inorgánicos muy simples, hasta otros compuestos orgánicos más complejos (Elbourne et al., 2017). Se ha demostrado que este grupo de microorganismos tienen impacto negativo en ciertos materiales, ya que por ejemplo tienen la capacidad de potenciar la precipitación de carbonato de calcio (Wu et al., 2021).

Las biopelículas una vez establecidas en los materiales son extremadamente difíciles de eliminar y muestran una gran resistencia a todo tipo de agentes antimicrobianos. Por lo tanto, para su erradicación es más factible impedir la formación de estas comunidades en sus inicios cuando los microorganismos son menos tolerantes al estrés químico y físico (Adan y Samson, 2011). Al comienzo las células planctónicas vivas del entorno se

aproximan al material y si la interacción con éste resulta favorable se adsorben para luego adherirse en forma irreversible (Harding, 2009).

El fenómeno del deterioro de materiales estructurales por la formación de biopelículas microbianas preocupa en forma creciente debido no sólo a las pérdidas económicas que ocasiona, sino también, a los problemas de salud que afecta a la población expuesta en el interior de sus hogares o edificios públicos, donde hongos y bacterias potencialmente patógenos, resultan más frecuentes. La exposición a los bioaerosoles que se generan en los interiores edilicios y la aparición de distintos síntomas que comprenden irritación de las membranas mucosas, dolor de cabeza, fatiga, además de, asma, alergias e infecciones han sido reportados como parte del Síndrome del Edificio Enfermo<sup>1</sup> (WHO, 2009;). La mayoría de los patógenos de interés sanitario pueden permanecer en las superficies por días, semanas o incluso hasta meses (dependiendo del tipo de material) aumentando las probabilidades de contaminación cruzada, y la transmisión de infecciones sobre todo en ambientes de alto contenido de inoculantes microbianos como cocinas, baños e instalaciones del servicio de salud, entre otros (Leyanet Barberia-Roque et al., 2019). En tal sentido, la Organización Mundial de la Salud, se ha pronunciado al respecto indicando que el crecimiento microbiológico debe ser eliminado o minimizado en ambientes de interior (WHO, 2009). A lo largo de los años se han desarrollado varias estrategias para conseguirlo, entre ellas, el uso de métodos con desinfectantes químicos y físicos una vez formadas las biopelículas, los cuales no logran mantener sus resultados a largo plazo. El control de los microorganismos en materiales estructurales suele abordarse mediante la limpieza periódica con estos desinfectantes sobre superficies y también regulando las condiciones interiores que favorecen la proliferación de microorganismos como la temperatura, humedad, la radiación y los flujos de aire (Adan and Samson, 2011; Gaylarde y Little, 2022). No obstante, un abordaje integral que contemple el uso de métodos de

---

<sup>1</sup> El Síndrome del Edificio Enfermo : *SBS por sus siglas en inglés comprende* un conjunto de molestias y enfermedades originadas en la mala ventilación, la descompensación de temperaturas, las partículas en suspensión, la mala iluminación, los gases y vapores de origen químico y los bioaerosoles, entre otros agentes causales identificados. La Organización Mundial de la Salud lo ha definido como un conjunto de enfermedades originadas o estimuladas por la contaminación del aire en estos espacios cerrados.<sup>1</sup>

prevención como el de los recubrimientos funcionales diseñados para evitar el establecimiento de biopelículas en su superficie se perfila como muy conveniente teniendo en cuenta la relación costo/beneficio.

Esto ha impulsado distintas líneas de investigación que comprenden el desarrollo de nuevas formulaciones de pinturas y recubrimientos con propiedades antimicrobianas. En algunos casos buscan modificar las propiedades superficiales de los materiales para evitar las adherencias de las células sin el uso de biocidas. Entre ellas destacan, los recubrimientos funcionales de baja energía superficial, el diseño nanoestructurado de superficies y la introducción de propiedades fotocatalíticas o superhidrofóbicas para la obtención de superficies autolimpiantes (self-cleaning) (Ruffolo et al., 2010). Otra de las estrategias es la de formular recubrimientos con el agregado de uno o más aditivos con actividad antimicrobiana también conocidos en la industria de las pinturas como biocidas o microbiocidas. Las pinturas antimicrobianas o higiénicas, resultantes, son beneficiosas para el control ambiental especialmente en el interior de viviendas y hospitales (Morales-Rabanales et al., 2022).

Las pinturas y otros recubrimientos ofrecen dos propiedades importantes sobre una estructura, protección y decoración, pero no están exentas de la colonización microbiana. Por lo tanto, requieren el empleo de mezclas de biocidas que mitiguen la colonización microbiológica de sí mismas, en sus distintos estados, además de, la del material al que protegen.

Las pinturas acrílicas (cuyo material formador de película es una resina acrílica) en base acuosa son particularmente propensas a la descomposición por parte de microorganismos (Gillatt et al., 2015). Durante los procesos de preparación, almacenamiento, posterior aplicación sobre una superficie y en servicio, las pinturas pueden ser atacadas por microorganismos contaminantes y sufrir importantes pérdidas de calidad. Esto ocurre debido a que muchos de los componentes de la formulación pueden ser utilizados como fuente de carbono por parte de los microorganismos, tanto en el envase como después de aplicadas en la película. Estos procesos de degradación se ejemplifican en más detalle en el esquema que se presenta en la Figura 1.1-1.

El biodeterioro conduce a la degradación del recubrimiento y el descascarado, en el caso de las películas. Además, se han descrito fenómenos como el evidenciado por el grupo de trabajo en el CIDEPINT y que se muestra en la Figura 1.1-2, donde el hongo logra extraer

el titanio a partir del dióxido de titanio (pigmento utilizado generalmente en este tipo de pinturas) de la película provocando su degradación (Beech et al., 2018).

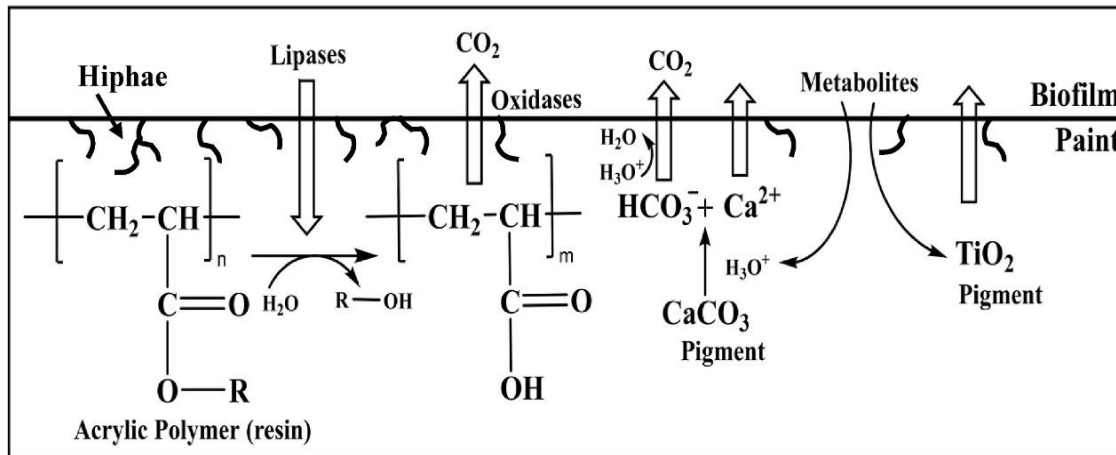


Figura 1.1-1 Esquema de alguno de los compuestos involucrados en el biodeterioro fúngico, tomado de (Gámez-Espinosa et al., 2022)

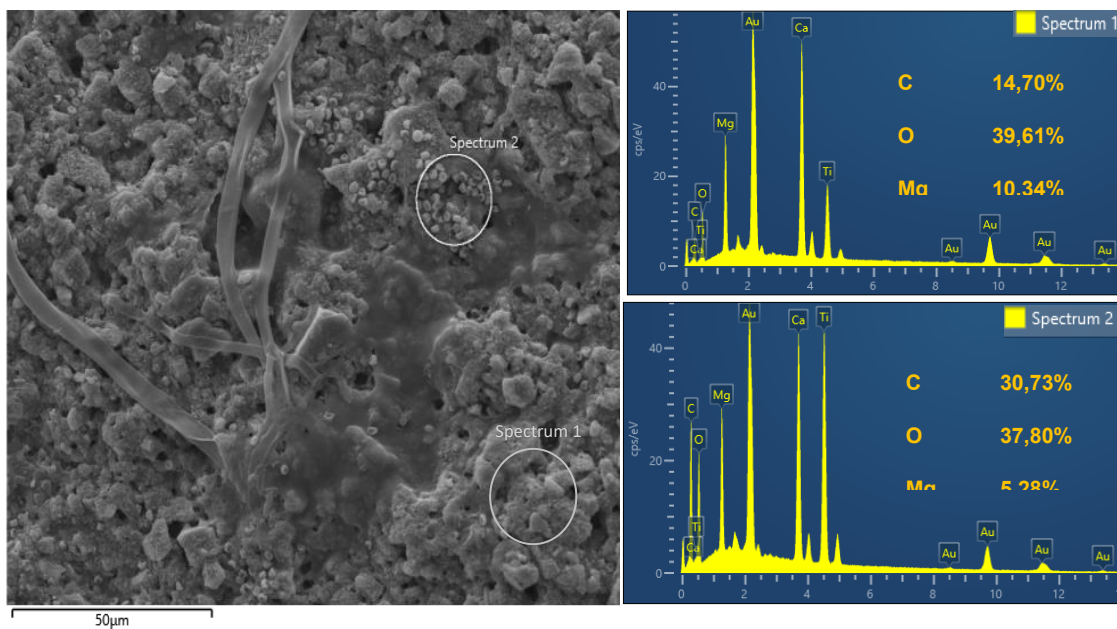


Figura 1.1-1.1-1 Micrografía MEB y análisis EDS de una película de pintura con *Aspergillus fumigatus* donde se observa el aumento de la concentración de titanio sobre la biopelícula (spectrum 2) al comparar con la presencia del mismo elemento en la zona sin crecimiento (spectrum 1). En la zona con crecimiento (spectrum 2) se observan gran cantidad de conidios.

Para la protección de las pinturas en el envase cuando se encuentran en forma líquida se agregan en la formulación biocidas especialmente diseñados para esa función, además de, reducir las posibilidades de transmisión de inóculo microbiano una vez aplicada. Cuando la pintura se encuentra en forma líquida las bacterias son los agentes biodeteriorantes microbianos más frecuentes (Gaylarde and Little, 2022).

## **1.2 Pinturas**

Si bien “pintura” es un término usado frecuentemente y su uso está muy extendido, los términos pinturas y recubrimientos a menudo se emplean de manera indistinta (Bellotti and Deyá, 2020). Recubrimiento es la descripción más general de cualquier material que puede ser aplicado como una capa delgada continua a una superficie para formar una película. Por otro lado, el término pintura fue tradicionalmente usado para describir materiales pigmentados a diferencia de las películas transparentes a las que se denominan lacas o barnices. Por lo tanto, podemos definir en forma más específica a las pinturas como: sistemas heterogéneos constituidos por una o más fases sólidas finamente divididas (pigmentos) dispersas en un medio fluido, denominado vehículo (ligante y solventes) y por otros constituyentes que se agregan en bajas proporciones (aditivos) (Caprari, 2003). Las características y propiedades de las pinturas están determinadas por el tipo y contenido de cada componente (Malshe, 2019).

Las variables de formulación son determinantes en las propiedades finales de una pintura o recubrimiento. Por ello al momento de la formulación, se deben determinar los parámetros que permiten lograr una composición equilibrada y a la vez adoptar criterios adecuados para que, a partir de la formulación elegida (propiedades y proporción de los componentes a utilizar), pueda realizarse una exitosa preparación de la pintura, con la subsiguiente aplicación y secado, dando como resultado final un comportamiento satisfactorio en servicio, durante largo tiempo.

Una vez que se seleccionan adecuadamente las materias primas a utilizar en la preparación de la pintura, se debe definir la relación cuantitativa entre los diferentes componentes del producto, los cuales determinan las propiedades de la película (Caprari 2003). Con las pinturas se pueden utilizar fórmulas referidas en peso o en volumen. Las composiciones que están referidas en peso ya están predeterminadas para la fabricación de las pinturas en el laboratorio y la industria; y también se utilizan para el control de propiedades de la



pintura líquida, por ejemplo; viscosidad, grado de molienda, comportamiento de sedimentación, nivelación y secado, entre otras (Bellotti et al., 2015).

Cuando las pinturas se aplican en forma de capas delgadas menores a 75  $\mu\text{m}$ , se obtiene, por secado o curado, una película sólida seca, que consta solamente de los componentes no volátiles de la fórmula. Para la película de pintura sólida se aplica un perfil de propiedades diferentes, por ejemplo, propiedades mecánicas y propiedades ópticas como el poder cubriente, el brillo y el color (Auger and McLoughlin, 2017).

La formulación de la pintura se debe realizar teniendo en cuenta cuales son los requerimientos o especificaciones para el producto. Para ello debe efectuarse una elección acertada del solvente, la mezcla de pigmentos (activos y extendedores o cargas) y aditivos específicos, todo esto depende de la función que debe cumplir la pintura en servicio.

### **1.2.1 Solventes**

Los solventes son los componentes mayoritarios de las pinturas, y son utilizados primariamente para facilitar la fabricación y aplicación. Frecuentemente, se utilizan mezclas de solventes (Bellotti and Deyá, 2020). En el caso de las pinturas que utilizan solventes orgánicos en su composición, uno de estos debe solubilizar a la resina. En este tipo de pinturas, también, se suma el diluyente que, además de diluir el producto, permiten reducir costos de fabricación y facilitar la aplicación (Caprari 2003). La elección de la mezcla solvente es importante ya que debe mantener la resina solubilizada hasta que se haya evaporado toda la mezcla (He et al., 2022). Si el disolvente se evapora muy rápidamente, se establece una diferencia de condensación de este entre la parte superior (más externo) y la parte inferior del *film*. Esto puede ser suficiente para producir un efecto de ampollamiento cuando el disolvente retenido en el interior se evapora (Aburto-Medina et al., 2021). Los solventes, además, posibilitan el procesamiento en la preparación de la pintura y posteriormente su aplicación y la formación de la película correspondiente. Este componente determina las propiedades de aplicación y apariencia del recubrimiento, incluida la estabilidad de la dispersión, la viscosidad al momento de la aplicación, el tiempo de secado y la nivelación de la película, de ahí su importancia (Machotová et al., 2020).

Entre los solventes más empleados en la formulación de pinturas se encuentran los compuestos orgánicos volátiles (VOCs por sus siglas en inglés) Los VOCs incluyen: hidrocarburos alifáticos, aromáticos, alcoholes, cetonas, ésteres, éteres, glicoles, etc. (Liu et al., 2022). El solvente alifático más usado es el aguarrás mineral, una mezcla de

destilados del petróleo usado fundamentalmente con resinas alquídicas; los aromáticos más utilizados son el xileno y tolueno, productos con bajo costo y aptos para su empleo con resinas como las epoxídicas. La toxicidad de los VOCs ha dado lugar a la imposición de restricciones a su uso en todo el mundo por lo que están siendo reemplazadas por agua (Halios et al., 2022).

El empleo de agua como solvente requiere el diseño de nuevos polímeros y demanda innovación en la tecnología de elaboración de las pinturas, ya que solubiliza pocas resinas debido a sus características polares (Malshe, 2019). A pesar de esto, ya existen en el mercado resinas que pueden ser utilizadas en pinturas acuosas y tienen buena aceptación y rendimiento (Lendvay-Gyorik et al., 2007). Otro aspecto que dificulta la sustitución de VOCs por agua, es que la velocidad de evaporación del agua está afectada por la humedad relativa que existe en el ambiente durante la aplicación, por la difusión del aire a través de la película y por la temperatura.

En el caso de los recubrimientos definidos de base acuosa usan como solvente mayoritario el agua incluso hasta en un 80% del total de solvente (Malshe, 2019). Los alcoholes solubles en agua pueden estar presentes, en cantidades menores, para mejorar la humectación del sustrato, el flujo de la pintura y la nivelación. Una vez aplicada la pintura el solvente comienza a evaporarse lo cual permite que las partículas dispersas se acerquen y formen una película sólida continua

Las pinturas empleadas frecuentemente en la protección de paredes y cielorrasos en hogares y edificios usan como solvente el agua evitando de esta forma los efectos adversos en la salud humana de la exposición a solventes orgánicos (Machotová et al., 2020). El agua, no solo es preferible como solvente porque posee las ventajas obvias de no ser combustible y no ser toxica, minimizando el impacto ambiental al disminuir la emisión de VOCs, (Halios et al., 2022) este tipo de pinturas también tiene la ventaja de ser de fácil limpieza, no inflamables y resistentes a la luz solar. Por lo tanto, para la obtención de pinturas antimicrobianas, se puede considerar el tipo de formulación base empleada en los ambientes y superficies a proteger con el agregado de uno o más componentes con actividad antimicrobiana y el uso como solvente del agua.

Las pinturas arquitectónicas con agua como solvente principal se denominan pinturas en emulsión debido a que su ligante o resina se fabrica a partir de una polimerización que inicia

la reacción en estado de emulsión, por lo tanto, el producto final se encuentra en dispersión acuosa.

En sus principios, en la década de 1950, las pinturas de base acuosa solo representaban una pequeña porción de la producción total de recubrimientos y pinturas, siendo principalmente usadas para fines decorativos y menos usadas para fines industriales. En las últimas décadas fueron ganando terreno en el sector industrial y actualmente tienen un espectro mucho más amplio de aplicaciones, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías de pinturas, siendo los sectores más importantes el arquitectónico, automotriz, equipamientos industriales llegando a maquinarias y piezas de plástico. Entre algunas de las razones por las cuales ocurrió el aumento en el uso industrial se encuentran sus ventajas económicas y, la posibilidad de reducir las emisiones de disolvente durante su aplicación, y de esta manera cumplir con los requisitos legales.

### **1.2.2 Ligantes**

Entre los componentes de la formulación el ligante es el material que permite una vez aplicado el recubrimiento formar una película continua, por lo tanto, se lo conoce como el material formador de película. Son responsables de mantener en íntima unión a los pigmentos dentro de la película seca y de permitir la adhesión de esta al sustrato y entre capas de pintura. En general, determinan la mayoría de las propiedades físicas y químicas de la pintura, así como también sus características de aplicación y prestaciones posteriores. Se los puede clasificar en tres grandes grupos:

- ✓ Ligantes naturales: aceites vegetales, aceites derivados del exudado de árboles y aceites derivados del petróleo
- ✓ Resinas sintéticas: vinílicas, acrílicas, celulósicas, alquídicas, fenólicas, epoxídicas.
- ✓ Resinas para pinturas en base acuosa: emulsiones, dispersiones y sistemas reducibles.

El polímero o resina establece la mayoría de las propiedades químicas y físicas de la pintura, como la adhesión, la dureza mecánica, la resistencia a factores ambientales, lavabilidad y resistencia al rayado. Las dispersiones de resinas acrílicas o emulsiones acuosas (látex) son las más utilizadas para pinturas arquitectónicas (Zhao et al., 2016).

### 1.2.3 Pigmentos

Los pigmentos son generalmente compuestos inorgánicos, tales como óxidos o silicatos. Se definen como cualquier material particulado que es insoluble y no se ve afectado por el vehículo (conformado por solventes y resina) Los pigmentos varían en tamaño, forma, humectabilidad, reactividad química y absorción de UV, entre otras cosas. Dentro de las propiedades de los pigmentos se destacan: la opacidad y el poder cubritivo. El poder cubritivo es la propiedad por la cual una película enmascara u oculta la base de la superficie que recubre y depende de la diferencia entre los índices de refracción del pigmento y del medio aglomerante. Los pigmentos de índice de refracción elevado imparten opacidad a la película (pigmentos activos o cubrientes), mientras que los de índice de refracción bajo (similar al de la resina) dan películas transparentes. La composición química, la forma y las características de los pigmentos es muy amplia, por este motivo existen diversas formas de clasificarlos según su origen (naturales y artificiales), su naturaleza (minerales u orgánicos), su función (anticorrosivos), entre otros (*Pigment handbook*, 1973).

En base al valor de su índice de refracción, los pigmentos pueden ser:

- ✓ Opacos: imparten en la película el poder cubritivo y, en algunos casos, alta resistencia a los factores climáticos, en especial a la fracción UV de la radiación solar. Los más importantes son el dióxido de titanio, el óxido de antimonio, el sulfuro de cinc y el óxido de cinc (Mahlitig, 2017).
- ✓ Extendedores: son pigmentos de menor poder cubritivo que los pigmentos opacos. No tienen influencia en la opacidad de la película, pero acompañado por otros pigmentos con alto poder cubritivo pueden disminuir tanto el contenido de estos últimos, así como el costo de la pintura. Dentro de este tipo de pigmentos se encuentran el carbonato de calcio precipitado, la barita, la mica, la bentonita, y el silicato de calcio precipitado. Otros extensores de uso frecuente son el óxido de hierro en sus varios colores y el talco. El dióxido de silicio es usado en forma de tierra de diatomeas. El material se compone de residuos silíceos de organismos marinos. Tiene un elevado índice de absorción de aceite (100-150), además de un alto efecto mate, espesante y anti-sedimentación, sin un gran incremento de la pigmentación total (Fardi et al., 2018).

Cargas: índice de refracción es igual o levemente inferior al de las resinas formadoras de película. No contribuyen a aumentar la opacidad ni, en general, aportan características especiales a la película; en las proporciones adecuadas no influyen sobre la calidad de la pintura o de la película formada (*Pigment handbook*, 1973).

Uno de los pigmentos más usados a nivel mundial es el óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ). El  $\text{TiO}_2$  es un óxido metálico con aplicaciones como pigmento en recubrimiento antimicrobiano y antiincrustante debido a una combinación de su estabilidad química, densidad relativamente baja en comparación con otros metales, alto índice de refracción, alta relación peso / resistencia a la corrosión (Mondal et al., 2021). El  $\text{TiO}_2$  es usualmente utilizado en pinturas arquitectónicas como pigmento principal u opacante por su índice de refracción elevado ( $>1,7$ ) (Caprari, 2003). Además del  $\text{TiO}_2$  otros que pueden ser utilizados son: negro de humo,  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZnS}$  y  $\text{ZnO}$  (Fardi et al., 2018).

El  $\text{TiO}_2$  es uno de los pigmentos más caros en la composición de la pintura (Chen et al., 2022), lo cual, ha llevado a su incorporación en combinación con otros pigmentos de menor costo, como el carbonato de calcio precipitado  $\text{CaCO}_3$  u otros extendedores, con el fin de mantener el nivel de opacidad sin modificar la concentración de pigmento en volumen de la pintura (Karakas et al., 2015). Los pigmentos extendedores y/o cargas también pueden impartir propiedades específicas deseables como control del nivel de brillo y resistencia a la abrasión y pueden contribuir a mejorar las propiedades mecánicas y de barrera de las pinturas (Karakas and Çelik, 2018). Algunos de los más frecuentemente utilizados son:  $\text{CaCO}_3$ , tierra de diatomeas,  $\text{BaSO}_4$ , diferentes óxidos de hierro y talco con un índice de refracción entre 1,5 y 2,0 (*Pigment handbook*, 1973).

Según el Servicio Geológico de Estados Unidos<sup>2</sup> la tierra de diatomeas es una roca sedimentaria silíceas de grano muy fino, suave, friable, terrosa, similar a la tiza, generalmente de color claro (blanca si es pura, comúnmente de color beige a gris in situ y rara vez negra). Es muy finamente porosa, de muy baja densidad (flota en el agua hasta

---

<sup>2</sup> El servicio geológico de Estados Unidos, USGS por sus siglas en inglés (es una agencia científica del gobierno federal de Estados Unidos. Los científicos de este ente estudian el terreno, los recursos naturales, y los peligros naturales que los amenazan. Cada año el USGS emite un comunicado en este sentido <https://www.usa.gov>

que se satura) y es químicamente inerte en la mayoría de los líquidos y gases. También, tiene baja conductividad térmica y elevado punto de fusión (Crangle, 2021). Los pigmentos de tierra de diatomeas son polímeros de base silíceas livianos y esponjosos, cuyo índice de refracción, por lo general, se encuentra entre 1,4 y 1,5. Son productos mates que se usan para reducir el brillo en pinturas blancas o no pigmentadas. También pueden controlar la permeabilidad al vapor, aumentando la posibilidad de evaporación del solvente, lo que disminuye el tiempo de secado. Además, en relación con el tamaño de partícula, reduce la tendencia a la descamación y mejora la adhesión de las capas posteriores de pintura (*Pigment handbook*, 1973).

#### **1.2.4 Aditivos**

Se denomina aditivo, a toda sustancia que, agregada en cantidades limitadas (menor al 5%) a las formulaciones, tienen la finalidad de mejorar o modificar ciertas propiedades durante la fabricación, almacenamiento, transporte, aplicación del producto terminado y/o en condiciones de servicio para las cuales el producto fue diseñado. Los aditivos también pueden modificar las propiedades de los tres componentes principales de las pinturas (ligante, pigmentos y/o solventes). Los aditivos más relevantes utilizados en formulaciones acrílicas de base acuosa son (Caprari, 2003):

- ✓ Secantes y coalescentes, destinados a acelerar el proceso de secado o curado.
- ✓ Plastificantes, mejoran la flexibilidad, resistencia y elasticidad de la película.
- ✓ Antiespuma, buscan evitar la inclusión de espuma o la incorporación de pequeñas burbujas de aire durante la fabricación de un producto, en el llenado de los envases y durante la aplicación de este.
- ✓ Humectantes y dispersantes, mejoran la dispersión de los pigmentos en la fase líquida.
- ✓ Protectores de radiación UV, mejoran la resistencia a la luz solar.
- ✓ Espesantes, aumentan la viscosidad y, se dividen en agentes tixotrópicos orgánicos e inorgánicos.
- ✓ Preservantes (biocidas, bactericidas, alguicidas, fungicidas), para prevenir el ataque de la pintura por microorganismos, principalmente en sistemas de base acuosa.

### 1.2.5 Aditivos antimicrobianos: biocidas

Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA)<sup>3</sup>, los antimicrobianos son sustancias o mezclas de sustancias que sirven para destruir o suprimir la propagación de bacterias, virus y hongos sobre objetos y superficies inanimados. Algunos ejemplos son los desinfectantes, conservantes, pesticidas, herbicidas, fungicidas, insecticidas y los llamados aditivos antimicrobianos o biocidas. Se definen como biocidas aquellas sustancias o agentes activos destinados a prevenir o impedir la colonización microbiológica (Ganguli and Chaudhuri, 2020). En general, el término biocida se refiere conjuntamente a sustancias específicas para controlar el crecimiento de hongos (fungicidas), de algas (alguicidas) y/o bacterias (bactericidas) (Ganguli and Chaudhuri, 2020).

En la industria de los recubrimientos se usa el término biocida para denominar en forma genérica a los aditivos con probada actividad antimicrobiana que forman parte de la composición de las pinturas. Esta terminología está comprendida en un lenguaje aplicado por los formuladores que no siempre coincidirá con una actividad biocida real en el producto final. En tal sentido, se define un biocida como un agente químico utilizado para prevenir, inhibir o impedir el crecimiento de microorganismos (*Databook of Biocides*, 2015). La bioactividad del aditivo dependerá de factores como la concentración factible de utilizar en el sistema estudiado y la disponibilidad de este en la película para un desempeño eficiente, entre otros factores para tener en cuenta. Por lo tanto, en el presente texto el término biocida es utilizado en el sentido antes descrito que se aplica en tecnología de recubrimientos (Bellotti and Deyá, 2019).

Los agentes antimicrobianos se incorporan típicamente en la mayoría de los agentes de limpieza y productos para el hogar. Estos agentes son altamente efectivos y pueden inhibir hasta el 99.9% de los microorganismos tras la aplicación. Sin embargo, la acción antimicrobiana tiene una vida útil relativamente corta, ya que los microorganismos vuelven a las superficies tratadas de inmediato. Por lo general, se requiere constantemente de nuevas aplicaciones para mantener la desinfección. Esto puede ser engorroso, costoso y, a veces, logísticamente ineficiente. Del mismo modo, la eficiencia de estos agentes se limita a qué tan bien y durante cuánto tiempo se aplican.

---

<sup>3</sup>La Agencia de Protección Ambiental (EPA) es una agencia ejecutiva independiente del gobierno federal de los Estados Unidos encargada de asuntos de protección ambiental <https://www.epa.gov>

Por lo tanto, para superficies que requieren una inhibición constante de los microorganismos, tales como dispositivos médicos (Chaloupka et al., 2010), paredes (Arreche et al., 2015b), superficies de contacto con alimentos (Morales-Rabanales et al., 2022), etc., se requiere un tratamiento permanente que implique nuevos enfoques.

Los recubrimientos antimicrobianos son importantes para inhibir el crecimiento de agregados de microorganismos (biopelículas) en las superficies expuestas, minimizando así el biodeterioro, los problemas de salud y ambientales. Como se indicó antes una de las estrategias empleadas para combatir los problemas creados por los microorganismos es recubrir superficies o sustratos que tienen potencial de exposición microbiana, como paredes, textiles, dispositivos médicos, cosméticos, ropa o productos de cuidado personal con nanomateriales con actividad antimicrobiana.

En las últimas décadas, la preocupación por el impacto ambiental de los biocidas ha dado lugar a nuevas legislaciones con restricciones al uso de compuestos tales como derivados aromáticos y halogenados, un ejemplo de esto es un compuesto muy utilizado como el triclosán (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol) (European Commission, 2013). Otros compuestos como los fenilmercuriales, muy usados en el pasado y cuestionados por su toxicidad ya no están permitidos. Esto ha dado lugar a la obtención de combinaciones más eficientes, de biocidas aun permitidos y nuevos, con el objetivo de lograr un rango más amplio de actividad para las formulaciones. Un ejemplo es la combinación (3:1) de clorometilisotiazolinona (CMI) y de metilisotiazolinona (MI) muy utilizada desde la década del ochenta (*Databook of Biocides*, 2015).

Los requisitos generales para los biocidas tanto funcionales en película (*in-film*) como en la pintura líquida (*in-can*) son similares: amplio espectro de actividad; rentabilidad; estabilidad en las condiciones de pH; compatible con los otros componentes; actividad duradera y amigable con el ambiente (Gaylarde and Little, 2022). Pero algunos de los requisitos específicos son diferentes, con respecto a los biocidas de película: la solubilidad en agua, la lixiviabilidad y la volatilidad deben ser bajas, mientras que, se requiere un alto coeficiente de partición entre los materiales orgánicos y el agua (Lindner, 2004). Los biocidas en general se agregan en un nivel inferior a 5% y, por lo tanto, son considerados como aditivos. Otros autores más conservadores plantean minimizar el uso de los biocidas en pinturas de manera tal de que se utilicen concentraciones no mayores al 2,5% en peso, sumando aquellos efectivos en pintura líquida y en película (Lendvay-Gyorik et al., 2007; L. Barberia-Roque et al., 2019c). A diferencia de los biocidas utilizados en el envase como conservantes



para pinturas de emulsión, que deben ser altamente solubles, los utilizados para la protección de la película deben ser casi insolubles ya que, en caso contrario, son lixiviados rápidamente de la película y pierden la efectividad cuando se produce condensación de agua en la superficie.

Los biocidas más utilizados en recubrimientos pueden clasificarse según sus mecanismos de actividad, resumidos en dos grandes grupos (Chapman, 2003):

- ✓ **Electrófilos:** son aditivos que contienen grupos funcionales reactivos frente a grupos nucleofílicos ( $-NH_2$  y/o  $-SH$ ) que forman parte de biomoléculas, como proteínas y ácidos nucleicos, en células microbianas (Paulus, 2004). Algunos de los más utilizados comercialmente son: formaldehídos, liberadores de formaldehído, isotiazolinonas, carbamatos y sales metálicas de plata y cobre (Falkiewicz-Dulik et al., 2015a). Entre los electrófilos, los oxidantes como el hipoclorito de sodio (lejía) se han utilizado durante mucho tiempo debido a su bajo costo y alta eficacia (Pereira et al., 2015). Este tipo de compuestos oxidan la materia orgánica en general, pero su uso está siendo cuestionado y limitado debido a su toxicidad.
  
- ✓ **Activos sobre membrana:** estos aditivos antimicrobianos interactúan con las membranas celulares, lo cual, aumenta la permeabilidad y conduce a la ruptura de estas con la pérdida del material citoplasmático correspondiente. Entre estos se destacan: alcoholes, derivados fenólicos y sales de amonio cuaternario. En este grupo se puede incluir a aquellos modificadores de pH como son los ácidos orgánicos (ác. benzoico, ácido sórbico y ácido láctico) y sus sales (Bellotti et al., 2013).

Las isotiazolinonas como cloro metilisotiazilina (CIT) y metilisotiazolinona (MIT) son los biocidas de uso más frecuente en las pinturas junto con derivados de carbamatos. Estudios realizados mediante el uso de técnicas cromatográficas tanto en Estados Unidos y Europa muestran que, más del 90% de los biocidas detectados luego de la aplicación de las pinturas en el interior de las viviendas resultaron isotiazolinonas. Estos trabajos señalan que la liberación de los biocidas mencionados al ambiente y, por lo tanto, la exposición crónica pueden ser importantes causantes de dermatitis o alergias registradas en la práctica clínica en pintores y consumidores.

### 1.2.5.1 Biocidas en el mercado

El Informe Global Biocidas<sup>4</sup> elaborado por Markets and Markets™ en 2021 estableció que el consumo mundial de biocidas se estima en \$ 6,6 mil millones a nivel de fabricación activa y \$ 11,8 mil millones a nivel de producto mezclado y formulado. Los principales factores que afectan a la industria de los biocidas son: un mayor crecimiento de la construcción, la industrialización en los mercados emergentes, la reducción de los VOCs en los productos finales y la creciente conciencia de la higiene y el cuidado de la salud en la población de los países industrializados.

Las aplicaciones biocidas como conservantes lideran la demanda del mercado y representan su mayor consumo tanto en términos de volumen como de valor. Las aplicaciones de preservación de los biocidas son seguidas por aplicaciones de higiene debido a la rápida tasa de urbanización, así como la creciente conciencia sobre la importancia de desinfectantes efectivos, en combinación con el aumento de los ingresos disponibles que contribuyen al crecimiento del consumo en aplicaciones de higiene. Las aplicaciones de higiene son la segunda industria de uso final más grande. La industria del tratamiento de agua también será testigo de un crecimiento económico saludable debido al creciente número de nuevas plantas de energía, el aumento del precio del petróleo y las industrias pesadas.

La adición de biocidas a superficies y recubrimientos para prevenir el deterioro es un tema muy estudiado en los últimos años. Entre ellos el uso de nanopartículas metálicas, de plata es uno de los temas más explorados debido a las características particulares de las mismas.

---

<sup>4</sup> Es un informe elaborado a partir de más de 300 entrevistas en profundidad con usuarios finales, proveedores y formuladores, así como información mensual biocidas y asociaciones industriales tiene como objetivos proporcionar datos de marketing sobre biocidas, principales aplicaciones proveedores y clientes. Además, analiza las tendencias que se están produciendo en la industria de los biocidas proporcionando información detallada sobre aplicaciones, nuevos biocidas, clientes, proveedores y regulaciones.

### 1.3 Química verde

En 1998, el profesor James Clark, en su conferencia inaugural en la Universidad de York, propuso los principios de la química verde (Clark, 1999). Hizo hincapié en la necesidad de medidas para luchar contra los desafíos que enfrentan los dominios de la industria, la educación y la investigación. Este enfoque sustentable de la química es la opción deseable y está siendo bien aceptado y cada vez más adoptado por los gobiernos, la industria y el público a nivel mundial para lograr objetivos sociales, económicos y ambientales.

La revolución de la química verde está brindando una enorme cantidad de desafíos a quienes practican la química en la industria, la educación y la investigación. Sin embargo, con estos desafíos, hay un número igual de oportunidades para descubrir y aplicar los nuevos lineamientos, para mejorar la economía de la fabricación de productos químicos y la imagen cuestionada de los procesos químicos (Anoushka Raj 2022). La química verde, hoy en día, consta de 12 principios (Tomaso Fantoni 2022):

- I. Prevención: es mejor evitar la formación de residuos que tratarlos o limpiarlos después de que se hayan formado.
- II. Economía de átomos: los métodos de síntesis deberían diseñarse para maximizar la incorporación de todos los materiales utilizados en el producto final.
- III. Productos químicos intermedios menos tóxicos: siempre que sea posible, las metodologías sintéticas deberían diseñarse para usar y generar sustancias con poca o ninguna toxicidad para la salud humana y el medio ambiente.
- IV. Productos finales más seguros: los productos químicos deberían diseñarse para mantener la eficacia de su función, a la vez que reducen su toxicidad.
- V. Reducción del uso de sustancias auxiliares: el empleo de sustancias auxiliares (como disolventes, agentes de separación, etc.) debería evitarse en lo posible, y ser inocuo cuando se empleen.
- VI. Reducción del consumo energético: el impacto medioambiental y económico de los requerimientos energéticos debe ser reconocido y minimizado. Los métodos sintéticos deberían aplicarse a presión y temperatura ambiente.

- VII. Uso de materias primas renovables: deben utilizarse materias primas renovables siempre que sea técnica y económicamente viable
- VIII. Reducción de la derivatización innecesaria: la derivatización innecesaria (grupos bloqueadores, etapas de protección/desprotección, modificaciones temporales) debe evitarse en la medida de lo posible.
- IX. Uso de catalizadores: los reactivos catalíticos (tan selectivos como sea posible) son superiores a los reactivos estequiométricos.
- X. Diseño para la degradación: los productos químicos deben diseñarse de forma que al final de su función no persistan en el entorno y se degraden en productos inocuos.
- XI. Desarrollo de tecnologías analíticas para la monitorización en tiempo real: deben desarrollarse metodologías analíticas que permitan el seguimiento y control de procesos en tiempo real, antes de que se formen sustancias peligrosas.

#### **1.4 Nanopartículas de plata**

Las nanopartículas de plata (AgNPs) ocupan una posición muy importante en nanotecnología debido a su naturaleza versátil (Bapat et al., 2018). Tienen una variedad de propiedades superiores, como una alta conductividad eléctrica, óptica y térmica, que las hacen útiles para una variedad de propósitos, como catálisis, imágenes, electrónica y optoelectrónica (Panáček et al., 2013; El-Zahry et al., 2015; Arreche et al., 2019).

Existen tres métodos fundamentales a través de los cuales se pueden sintetizar nanopartículas (Vishwanath and Negi, 2021):

- ✓ Físicos: la evaporación-condensación y la ablación con láser son los métodos principales. En el método de evaporación-condensación, la síntesis se realiza con la ayuda de un horno tubular a presión atmosférica. A pesar de dar un rendimiento considerable de nanopartículas, este método tiene una serie de desventajas. El horno tubular ocupa mucho espacio, el proceso consume enormes cantidades de energía y esto aumenta la temperatura del entorno. Por último, la reacción es lenta ya que no se alcanza fácilmente el equilibrio térmico y es difícil llegar a la temperatura óptima.
- ✓ Químicos: son los más comunes, por su eficacia, pero son los más contaminantes. Entre ellos destacan el depósito químico en fase vapor; que consiste en la

descomposición de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío (reactor), en o cerca de la superficie de un sólido para dar lugar a la formación de un material en forma de capa delgada o de nanopartículas. La preparación de *clusters* gaseosos; que utiliza un láser pulsado de alta potencia para producir vapores atómicos metálicos que son acarreados en un gas inerte y posteriormente son depositados en un óxido monocristalino u otro sustrato, bajo condiciones de ultra-alto vacío. La síntesis de nanopartículas en medio líquido mediante el uso de reductores y estabilizantes adecuados. Por lo general, este método emplea solventes y reactivos cuestionados en el marco de los preceptos de la química verde.

- ✓ Biológicos: últimamente se han utilizado plantas, bacterias, hongos y algas y sus productos para producir metales y óxidos metálicos en forma de nanopartículas como método alternativo. Esto también es conocido como biosíntesis de nanopartículas (Ijaz et al., 2022).

En el método de ablación con láser, no se utiliza ningún reactivo químico y se ha considerado eficiente. La ausencia de solventes químicos en este proceso lo hace razonablemente amigable con el medio ambiente y se adhiere al quinto principio de la química verde que habla de reacciones sin solventes. Además, también es posible controlar el tamaño de partícula ajustando el número de pulsos de láser. La pureza de las nanopartículas de plata resultantes también es excepcionalmente alta cuando se sintetizan mediante este método. De hecho, en el campo de los antimicrobianos, se considera que las nanopartículas sintetizadas mediante ablación con láser muestran una mayor reactividad y acción antimicrobiana que sus contrapartes sintetizadas químicamente. Por lo tanto, estos hechos hacen que parezca que la metodología de ablación con láser es excelente y extremadamente respetuosa con el medio ambiente. Si bien esto es cierto para la mayor parte del proceso, se requieren temperaturas muy altas y se procede con el consumo de grandes cantidades de energía y, por lo tanto, en la actualidad, este proceso tiene un costo elevado (Fernández-Arias et al., 2019).

Una alternativa adecuada y ecológica a los métodos químicos y físicos de síntesis son los métodos biológicos (Vishwanath and Negi, 2021; Ijaz et al., 2022). Los organismos vivos, como plantas, algas, microorganismos y hongos, e incluso los animales, desempeñan un papel vital en la síntesis de nanopartículas debido a algunas biomoléculas constituyentes,

incluidas algunas enzimas, que se pueden extraer de ellas y ayudar en la reducción in situ de iones  $\text{Ag}^+$  para formar nanopartículas de plata (Ijaz et al., 2022).

El principal beneficio de la síntesis biológica es la seguridad asociada con el proceso y la pureza de las nanopartículas resultantes. Dado que solo se utilizan agentes limpios para facilitar la producción de nanopartículas de plata con este método, podemos estar seguros de que el producto formado estará libre de contaminación. Esto da como resultado un impacto mínimo en la salud humana, especialmente porque estas nanopartículas se suelen utilizar entre otras cosas para una variedad de propósitos médicos. Además de esto, los métodos biológicos también dan como resultado un alto rendimiento de nanopartículas, que tienen una forma bien definida y un tamaño uniforme, a veces incluso igual que las técnicas físicas o químicas (Vishwanath and Negi, 2021). Estos aspectos de la síntesis biológica sostienen varios de los doce principios fundamentales de la química verde y, por lo tanto, el método de biosíntesis se considera verde.

Además, con este método se potencia la acción microbiana de las nanopartículas sintetizadas mediante métodos biológicos, ya que los agentes de protección y estabilización utilizados son todos biomoléculas. Esto mejoraría la tendencia de las nanopartículas de plata a entrar en contacto con los microorganismos (Mittal et al., 2013).

#### **1.4.1 Síntesis verde de AgNPs a partir de extractos vegetales**

Las biomoléculas presentes en los extractos de plantas se emplean para la síntesis de nanopartículas, resulta un método de bajo costo con posibilidad de escalado para fines industriales. Los extractos se preparan a partir de hojas, raíces o tallos, después de lo cual se agrega una solución acuosa de una sal de plata (Mittal et al., 2013).

Por lo general, se utiliza una solución acuosa de nitrato de plata y la reducción se produce con la ayuda de biomoléculas que están presentes en el extracto. Por lo tanto, el proceso general se parece mucho a los métodos químicos, pero los reactivos utilizados no son tóxicos y se derivan de plantas. El número total de reactivos utilizados en este tipo de síntesis también es menor, ya que los extractos vegetales cumplen una doble función como reductores y estabilizantes. La reacción a menudo procede a través de un solo paso; es muy eficiente y rápida. De hecho, el proceso de generación de nanopartículas de plata es rápido, el 90% de los iones  $\text{Ag}^+$  se convierte en  $\text{Ag}^0$  en aproximadamente 11 min, a una temperatura de  $95^\circ\text{C}$  según datos bibliográficos (Barberia-roque et al., 2018). También se descubrió que el tamaño de las nanopartículas de plata resultantes podía regularse de

manera efectiva variando la temperatura, la concentración de nitrato de plata y la concentración del extracto vegetal. La facilidad de regular varias propiedades, como la forma y el tamaño de las nanopartículas resultantes, es un gran beneficio para generar nanopartículas con alta actividad antimicrobiana. También, se ha visto que las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extractos de plantas tienen una mayor actividad antioxidante. Los antioxidantes juegan un papel vital en la erradicación de los radicales libres no deseados producidos en el cuerpo, que causan problemas de salud graves, incluido se lo asocia con el cáncer. La causa de su propiedad antioxidante se debe a que están asociados con la forma oxidada de los grupos funcionales presentes en los compuestos derivados del extracto de la planta.

La reducción de nanopartículas se ve facilitada por la presencia de agentes conocidos como biorreductores que incluyen enzimas, proteínas, flavonoides y terpenoides. La estabilidad de las nanopartículas garantiza la conservación de varias propiedades, como la composición, cristalinidad, forma, tamaño y la química superficial. Cada una de estas propiedades, especialmente la composición, el tamaño y la forma, tiene un fuerte impacto en la actividad microbiana de las nanopartículas. Por lo tanto, el último paso (estabilización) es crítico, particularmente cuando las nanopartículas sintetizadas se van a utilizar por su actividad antimicrobiana (Phan and Haes, 2019).

También se ha probado la fabricación de nanopartículas de plata utilizando extractos de algas. Se ha descubierto que las algas marinas contienen una gran cantidad de nutrientes, incluidas proteínas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. Estas biomoléculas se pueden extraer y utilizar para la reducción y formación de nanopartículas de plata. Un artículo de Rajeshkumar y colaboradores, corrobora estos hallazgos e indica que las nanopartículas de plata sintetizadas a través de extractos de algas pardas tienen una excelente actividad antifúngica (Rajeshkumar et al., 2014).

La síntesis verde de nanopartículas tiene como objetivo minimizar los residuos generados durante la reacción. La reacción transcurre sin la formación de subproductos significativos. Además, no se requieren condiciones de reacción drásticas. Por lo tanto, la energía total consumida durante el curso de la reacción se mantiene al mínimo. No se utilizan productos químicos tóxicos y todos los agentes reductores utilizados son biomoléculas. Estos agentes biorreductores se pueden reciclar y regenerar, y no aumentan los residuos netos en el medio ambiente. El producto final de las nanopartículas de plata también tiende a ser más puro. Esto se debe a que el riesgo de contaminación en caso de biosíntesis es relativamente

bajo. Esto implica que las nanopartículas sintetizadas por este método son inherentemente más seguras y puras que las sintetizadas por métodos físicos o químicos. Por lo tanto, la síntesis biológica de nanopartículas de plata encarna un aspecto muy importante de la química verde que es el de una "química inherentemente más segura" (Jalab et al., 2021). Además, una ventaja significativa de la síntesis biológica es que utiliza recursos renovables para la fabricación de nanopartículas. Por lo tanto, el impacto sobre el medio ambiente es mínimo. Esta es una ventaja importante de la síntesis biológica en la era del calentamiento global, especialmente si la industria farmacéutica las termina por comercializar (Vishwanath and Negi, 2021).

#### **1.4.2 Métodos de caracterización**

Después de la síntesis, un paso imperativo es la caracterización de las nanopartículas. La caracterización implica la medición de las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas. Este es un paso crítico cuando las nanopartículas se van a utilizar para aplicaciones como aditivos antimicrobianos, por ejemplo. La caracterización es crucial para garantizar la seguridad y eficacia de las nanopartículas de plata. Incluso pequeños cambios en las propiedades deseadas podrían influir drásticamente en sus efectos.

Los métodos más comunes son:

- ✓ Microscopía electrónica de transmisión (MET): es la técnica más elegida por varios autores, ya que brinda información sobre las propiedades físicas (como la forma y el tamaño) y también sobre las propiedades químicas (Mast et al., 2020). En esta técnica se emplea un haz de electrones para la caracterización. Se permite que el haz de electrones atraviese la muestra de nanopartículas de plata y los electrones interactúan con las nanopartículas. La interacción de los electrones se traduce en una imagen, que luego se estudia, y de ella se extrae información sobre sus características.
- ✓ Espectroscopía UV-Vis: es una manera rápida, fácil y eficiente de caracterizar las nanopartículas. Las nanopartículas de plata muestran el fenómeno de resonancia de plasmón superficial (SPR). Es decir que, al absorber energía luminosa, los electrones resuenan entre las bandas de valencia y la de conducción en los átomos de plata dando lugar a la SPR. El máximo de absorbancia obtenido en el espectro UV-visible depende de una variedad de parámetros que incluyen la forma y el tamaño de las nanopartículas (Zhang et al., 2016). Al comparar el valor máximo de



absorbancia obtenido con el disponible en la literatura, se puede realizar la caracterización efectiva de las nanopartículas sintetizadas.

Otros métodos de caracterización son la difracción de rayos X, FTIR, técnicas de RMN la espectroscopia de rayos X de dispersión de energía, BET, método de dispersión de rayos X de ángulo pequeño, espectroscopia de fotones de rayos X y difracción de área seleccionada (Zhang et al., 2016).

### **1.4.3 Actividad antimicrobiana de las AgNPs**

Estas nanopartículas también se han convertido en una herramienta esencial para combatir la creciente resistencia a los medicamentos en los microorganismos, especialmente frente a las bacterias. Se considera que la alta relación superficie/volumen de las nanopartículas y las propiedades físicas y químicas distintivas son la razón de la eficacia contra las cepas resistentes. Se supone que los microorganismos tendrán menos tendencia a desarrollar resistencia contra las nanopartículas metálicas y, por lo tanto, las nanopartículas de plata pueden ser útiles incluso a largo plazo (Ogunsona et al., 2020). Algunos estudios incluso postulan que las nanopartículas de plata causan la eliminación de los microorganismos a través de la formación de radicales libres que, en última instancia, dan como resultado el deterioro de la membrana microbiana (Sardella et al., 2019).

En el caso de la actividad antifúngica de las nanopartículas de plata, la literatura indica que estas interfieren con el ciclo celular fúngico, provocando así la desintegración de las hifas. Al igual que en las bacterias, las nanopartículas también provocan la ruptura de las membranas celulares de los hongos al alterar el potencial de la membrana y, por lo tanto, romper las barreras, exacerbando la permeabilidad de la membrana hasta niveles incompatibles con el equilibrio y, por tanto, con la vida (Bellotti et al., 2015).

Las AgNPs podrían incluso funcionar de manera efectiva contra las bacterias resistentes a múltiples fármacos. Varios trabajos de investigación han demostrado que el uso cooperativo de AgNPs con antibióticos mejora su actividad contra las bacterias resistentes a múltiples fármacos. La acción sinérgica de las AgNPs y los antibióticos conduce a una variedad de ataques a las bacterias resistentes a múltiples fármacos, que lleva a la muerte celular (Jayaprakash et al., 2021).

Algunos trabajos de investigación también han demostrado que incluso cuando no se usan en combinación con antibióticos, las AgNPs pueden funcionar por sí solas de manera efectiva contra las bacterias resistentes a múltiples fármacos. Se cree que esto se debe a

la facilidad con la que las AgNPs pueden ser internalizadas por la célula bacteriana. Por lo tanto, hay suficiente evidencia preliminar para demostrar que las AgNPs representan una promesa de superar el problema de la resistencia bacteriana a los medicamentos (Yonathan et al., 2022).

Dado que los diferentes métodos de síntesis producen nanopartículas con propiedades físicas ligeramente diferentes, como forma, tamaño y uniformidad de distribución, es vital comprender las propiedades que afectan la acción antimicrobiana de las nanopartículas de plata antes de estudiar los diversos métodos de síntesis (Arreche et al., 2017). En general, la citotoxicidad de las nanopartículas de plata depende de una variedad de propiedades que incluyen el tamaño, la forma, la composición de las partículas, el tipo de célula y el tipo de agentes reductores que se han utilizado durante el proceso. Por lo tanto, es imperativo el estudio de las propiedades de las nanopartículas de plata sintetizadas fundamentalmente en cuatro parámetros: tamaño, forma, morfología y funcionalidad.

En cuanto al tamaño, se ha encontrado que las nanopartículas más pequeñas son más estables y muestran una mayor actividad antimicrobiana. La relación entre el tamaño y la actividad antimicrobiana ha sido comprobada y encontraron que la nanopartícula más chicas, 5 nm, mostraron la máxima actividad biológica (Ginjupalli et al., 2018). Esta relación ha sido corroborada además por varios estudios disponibles en la literatura (Y. Wang et al., 2013; L. Barberia-Roque et al., 2019a; Ogunsona et al., 2020).

También se ha establecido que, si bien todas las AgNPs muestran una excelente actividad antimicrobiana, la citotoxicidad aumenta aún más si se utiliza una alta concentración de nanopartículas de plata de pequeño tamaño (Ginjupalli et al., 2018). La relación tamaño-actividad biológica se ha atribuido al hecho de que las nanopartículas más pequeñas tienen un área de superficie más grande, lo que permite una interacción más significativa entre la nanopartícula y el microorganismo. Las nanopartículas más pequeñas penetran a través de las paredes celulares del microorganismo de manera efectiva, causando daño a la membrana y aumentando la permeabilidad, lo que finalmente conduce a la lisis celular. Las nanopartículas más pequeñas también aseguran una mayor disponibilidad intracelular, aumentando así la citotoxicidad.

La forma de la nanopartícula también influye en su biodisponibilidad y actividad antimicrobiana. Las nanopartículas existen en una variedad de formas, incluyendo esféricas, triangulares y hexagonales. Se han encontrado evidencias sólidas de la toxicidad

de las nanopartículas hexagonales La dependencia de la toxicidad de la forma se ha relacionado con la diferencia en el área superficial (El-Zahry et al., 2015).

Es evidente que el tamaño y la forma de la nanopartícula tienen un alto impacto en su citotoxicidad (Ginjupalli et al., 2018) y actividad como agente antimicrobiano. Por lo tanto, el método elegido de síntesis de nanopartículas debe producir un alto rendimiento del tamaño y la forma correctos de AgNPs para garantizar su eficacia como agente antimicrobiano.

La oxidación de las AgNPs, también se ha relacionado de su acción antimicrobiana. Cuando las AgNPs se suministran como antimicrobianos, se oxidan y liberan iones  $Ag^+$  también, responsables por la muerte de los microrganismos (Bellotti et al., 2015). Se han planteado varias teorías, incluida la forma en que los iones  $Ag^+$  liberados de las nanopartículas interactúan con las membranas celulares para interferir con la actividad del microorganismo, lo que eventualmente conduce a la lisis celular Algunos informes también muestran que, en presencia de iones  $Ag^+$ , la célula microbiana sufre lisis a medida que su ADN pierde la capacidad de replicarse. Los iones  $Ag^+$  también está asociado con la degradación de ciertas enzimas y proteínas requeridas para la generación de ATP, la moneda energética de la célula

Los mecanismos por los cuales las nanopartículas desarrollan su actividad antimicrobiana son complejos y se encuentran en constante estudio. Algunos de los más estudiados se encuentran esquematizados en la Figura 1.4.1 y son:

- ✓ Efectos antimicrobianos por la generación de especies reactivas de oxígeno: se producen en la célula después de la exposición a nanomateriales como las NP de óxidos metálicos. Pueden inducir la peroxidación de los fosfolípidos poliinsaturados en las células bacterianas para dañar el ADN y, posteriormente, la muerte celular. Los ejemplos más comunes son los aniones superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno.
- ✓ Efectos antimicrobianos por daño físico: las membranas bacterianas de la pared celular pueden dañarse al interactuar con algunos bordes afilados del material nanoestructurado. Este método aplica mejor para explicar la actividad de las nanopartículas no esféricas.

- ✓ Efectos antimicrobianos por la interacción con la pared celular: los materiales de unión en la pared celular bacteriana pueden causar la pérdida de la integridad de la membrana celular y el flujo de salida de los materiales citoplasmáticos.
- ✓ Efectos antimicrobianos por la liberación de iones metálicos: iones metálicos liberados de los nanomateriales en los medios de cultivo pueden inhibir la producción de ATP y la replicación del ADN para destruir las células (Wyszogrodzka et al., 2016).

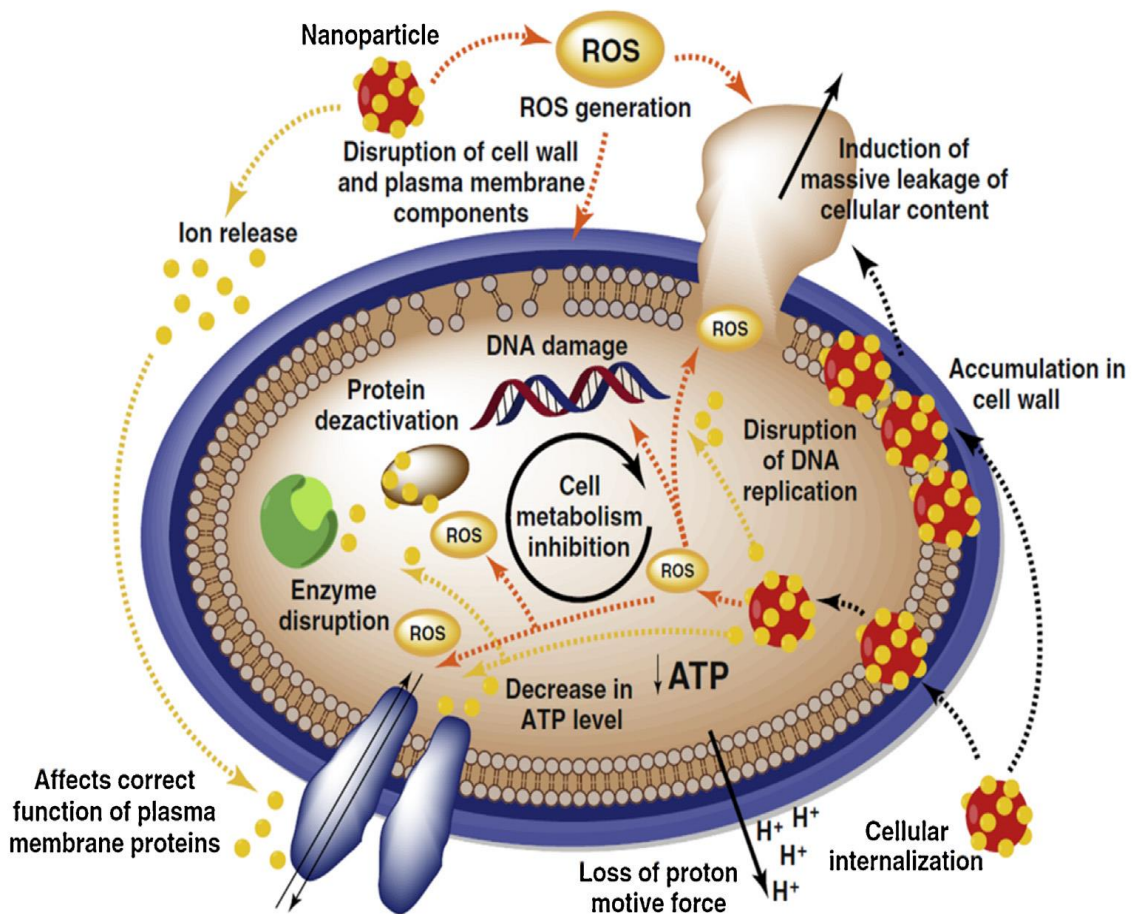
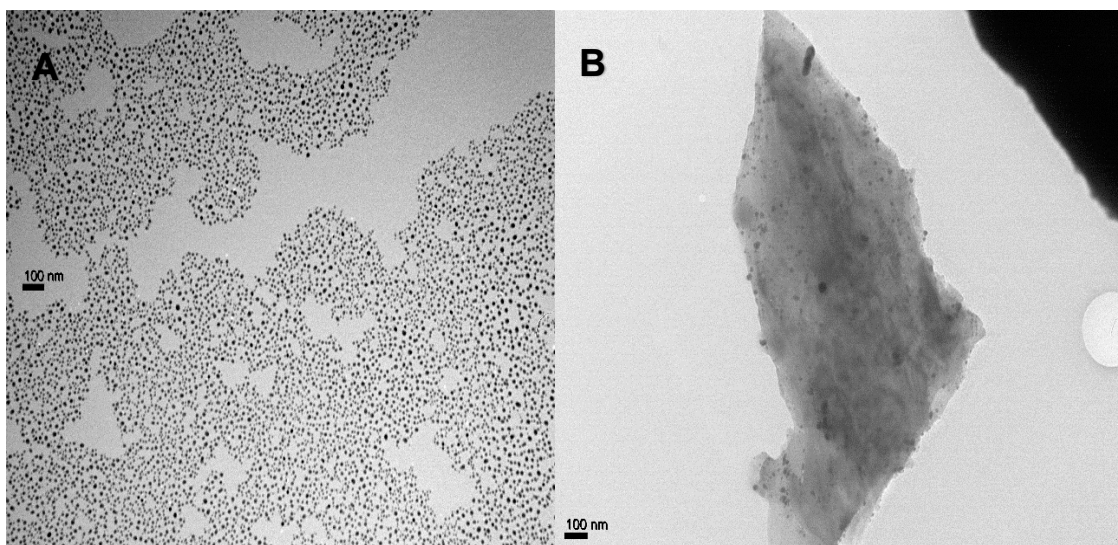


Figura 1.4-1 Representación esquemática de los mecanismos de acción atribuidos a las nanopartículas tomado y modificado de Wyszogrodzka et al. 2016 Elsevier copyright ©(Wyszogrodzka et al., 2016)

## 1.5 Pinturas antimicrobianas aditivadas con nanopartículas de plata

La nanotecnología se ha desarrollado como uno de los campos científicos más innovadores de las últimas décadas, ya que aprovecha la mayor reactividad de los materiales a escala nanométrica. En la actualidad, la mayoría de los científicos creen que los nanomateriales son uno de los pilares del desarrollo de la ciencia y la tecnología en el siglo XXI. Se calcula que el mercado mundial de la nanotecnología alcanzará unos 131.000 millones de dólares en 2026, con respecto a los 58.000 millones de dólares en 2020 (Al-Sakkaf and Onaizi, 2022) La nanotecnología aplicada en el diseño de superficies antimicrobianas busca eliminar patógenos en las proximidades de la superficie, evitando la formación de biopelículas (Ganguli and Chaudhuri, 2021).

El mecanismo biocida de estos materiales es complejo y depende tanto del microorganismo como del nanomaterial utilizado. Para el control del biodeterioro de materiales se han estudiado pinturas y recubrimientos aditivados con NPs antimicrobianas (Kumar et al., 2008; Zielecka et al., 2011; Holtz et al., 2012; Dominguez-Wong et al., 2014; Barberia-Roque et al., 2019b; Gámez-Espinosa et al., 2020). Estos autores plantean que hay dos formas posibles de incorporar las NPs en una formulación de pintura: libres (Figura 1.5-1 A) o asociadas a otro material (Figura 1.5-1 B).



*Figura 1.5-1 Micrografías MET 80 000x, de nanopartículas de plata obtenidas mediante síntesis verde a partir de extractos vegetales A (nanopartículas libres): B (Nanopartículas sintetizadas sobre un soporte silíceo)*

El uso directo de AgNPs, así como, otras partículas metálicas (Cu y ZnO) en pinturas en base acuosa (tipo látex) puede resultar en la disminución de su actividad antimicrobiana debido a la reactividad de estas con otros componentes presentes en la formulación o su aglomeración (Zielecka et al., 2011; Bellotti et al., 2015; Arreche et al., 2017). Teniendo en cuenta esto, hay varios trabajos realizados que mostraron la incorporación eficiente de nanoaditivos bioactivos (asociados o inmovilizados) en otros materiales para ser aplicados en pinturas (Arreche et al., 2019).

En el caso específico de las pinturas, se han reportado componentes nanofuncionalizados comúnmente utilizados, como resinas, pigmentos y aditivos (Fernández and Bellotti, 2017; Machado et al., 2019). En este sentido, los pigmentos convencionales como  $\text{TiO}_2$  y  $\text{CaCO}_3$  se han modificado a nivel de nanoescala para ganar funcionalidad antimicrobiana (Ferreira et al., 2013; Dominguez-Wong et al., 2014). Otro ejemplo de un componente nanofuncionalizado en pintura es la resina acrílica asociada a ZnONPs que tienen funcionalidades tanto antielectrostáticas como antimicrobiana en una concentración  $\sim 5\%$  (wt) (Xu and Xie, 2003). También, se ha probado el empleo de matrices silíceas en recubrimientos mediante la aplicación de arcillas naturales como los nanotubos de halloysita. Otros aluminosilicatos estudiados son las zeolitas, que se asociaron con Ag y Zn para incorporar en formulaciones acrílicas y se probó que son eficientes en el control del crecimiento de hongos (Pereyra et al., 2014; Machado et al., 2019).

Las estrategias de inhibición del crecimiento microbiano mediante estos recubrimientos se clasifican en función de los mecanismos y momentos de acción. Una estrategia implica la incorporación de compuestos antimicrobianos mediante la mezcla en una matriz polimérica (Lokhande and Jagtap, 2016) y en otros casos se basan en la modificación de las superficies a nivel nanométrico (Arreche et al., 2015a; Aburto-Medina et al., 2021; Mondal et al., 2021). La incorporación directa de aditivos antimicrobianos en los recubrimientos si bien tiene la ventaja de un menor costo económico. Enfrenta el problema del agotamiento a largo plazo ya que el agente biocida suele caer por debajo de la concentración inhibitoria mínima en caso de lixiviar a partir de la película o por participar en reacciones con resina, pigmento y aditivos; o su degradación por factores ambientales; incompatibilidad entre biocidas dentro de la pintura. Esto conduce a una mayor resistencia microbiana, a la acumulación de bacterias muertas en la superficie, y termina promoviendo la formación de biopelículas (Gámez-Espinosa et al., 2022).

Otra estrategia empleada son las superficies modificadas para evitar la adhesión y, por lo tanto, la acumulación de microorganismos vivos y muertos sobre los materiales, evitando así la formación de biopelículas a través del recubrimiento (Elbourne et al., 2017). Con estos fines se emplean polímeros hidrofílicos o polímeros zwitteriónicos. Aunque este recubrimiento antiincrustante puede inhibir la adhesión a las superficies. Un ejemplo de esto son los recubrimientos antiincrustantes (Bellotti et al., 2012) que no son letales, puesto que se emplean en superficies sumergidas como barcos y se trata de evitar la afectación a la biodiversidad, pero esto mantiene el potencial de colonización microbiana y bioincrustación (Romani et al., 2022). Algunos investigadores han integrado materiales antimicrobianos y antiincrustantes en recubrimientos para lograr simultáneamente actividades antimicrobianas y antiadhesión, extendiendo así la eficacia la vida útil de la actividad antimicrobiana.

En resumen, el interés de la comunidad científica internacional en el uso materiales como las nanopartículas, proviene de sus propiedades morfológicas y fisicoquímicas, como la alta relación superficie/volumen, propiedades físicas y químicas que se han utilizado con éxito en otras aplicaciones la respuesta de disociación estimulada por diferentes entornos a lo largo del tiempo y potencialidades de actividad frente un amplio espectro de patógenos. Además, la carga superficial en estas nanopartículas puede facilitar la interacción con las membranas de los microorganismos que presentan carga superficial opuesta. Asimismo, el tiempo de vida media y la durabilidad de estas nanopartículas cuando se utilizan en aplicaciones antimicrobianas son prometedoras debido a su insolubilidad, así como a la estrecha interacción con las membranas microbianas. A todo esto, se suma la ventaja de no propiciar el desarrollo de cepas resistentes. En la actualidad los esfuerzos, en esta área están orientados a mejorarlas como ingredientes bioactivos utilizados en la formulación de las pinturas higiénicas, prolongar su vida útil, para reemplazar eficientemente a los tóxicos convencionales, disminuir las concentraciones utilizadas y evitar su pérdida del recubrimiento. En este contexto, se abre un amplio campo de estudio para nuevos recubrimientos funcionales con cada vez menos aditivos y fórmulas más simples y ambiental y económicamente más sustentables. Aunque algunas estrategias aún se basan en encontrar nanopartículas libres con actividad antimicrobiana, otras, las más modernas y exitosas, consisten en asociar compuestos antimicrobianos a nanomateriales para protegerlos y controlar e incluso administrar su liberación (Dileep et al., 2020; Ganguli and Chaudhuri, 2021). Estos recubrimientos antimicrobianos se pueden aplicar a superficies

(paredes, mostradores, dispositivos médicos, manijas de puertas), tuberías enterradas, purificadores de agua y textiles. A la vez, pueden formularse proteger contra la corrosión, la biodegradación prematura y la pérdida de integridad de las pinturas, además de las de las actividades microbianas, complejizándose cada día más y acercándose a mitigar el biodeterioro de los materiales estructurales y el propio. Teniendo en cuenta todo lo antes expuesto, en el presente trabajo de tesis se han planteado las hipótesis y objetivos que se detallan a continuación.



**Hipótesis:**

- ✓ Las nanopartículas metálicas en especial de plata pueden ser obtenidas por síntesis verde mediante el uso de extractos vegetales acuosos obtenidos a partir de distintas especies de plantas.
- ✓ Estas nanopartículas poseen actividad biocida y pueden ser utilizadas en formulaciones de recubrimientos para evitar la formación de biopelículas bacterianas y/o fúngicos sobre distintas superficies.

**Objetivo General:**

- ✓ Desarrollar nuevos aditivos antimicrobianos de base nanotecnológica obtenidos por síntesis verde, aplicables en la formulación de recubrimientos protectores que prevengan el biodeterioro de materiales estructurales

**Objetivos específicos:**

1. Sintetizar nanopartículas metálicas utilizando extractos vegetales acuosos y sales metálicas
2. Caracterizar las nanopartículas obtenidas
3. Seleccionar de las nanopartículas de mayor actividad inhibitoria frente a las especies bacterianas y fúngicas de interés.
4. Formular y elaborar de recubrimientos eficientes aditivados las nanopartículas seleccionadas.

## **Capítulo 2 - Materiales y métodos**

## 2.1 Síntesis de nanopartículas

La síntesis de nanopartículas se realizó mediante un método de síntesis verde que contempla la reducción de los iones  $Ag^+$ , presentes en una solución acuosa de nitrato de plata, a  $Ag^0$ . Para ello se usaron soluciones de  $AgNO_3$  y extractos vegetales acuosos. Los mismos actuarían como agentes reductores en el proceso de síntesis y como estabilizantes al finalizar el mismo. En presente trabajo de tesis se sintetizaron nanopartículas libres en solución acuosa y, por otro lado, asociadas a tierra de diatomeas. Para ello se utilizó, el método de síntesis verde a partir del material vegetal recolectado que se describe a continuación.

### 2.1.1 Material Vegetal

Las plantas fueron seleccionadas teniendo en cuenta su abundancia en la región, disponibilidad, datos bibliográficos<sup>5</sup> y funciones popularmente asociadas (Zuloaga et al., 2019) se seleccionaron las especies que se listan en la Tabla 2.1-1.

El material vegetal fue provisto por el vivero "Aula Viva" de la "Facultad de Ciencias Naturales y Museo-Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina" a excepción de *Senna occidentalis* que fue proporcionada por la Dra. Olayide Folashade Obidi de la Universidad de Lagos, Nigeria e *Ilex paraguariensis* que es yerba mate comercial de Rosamente®, Misiones, Argentina.

A continuación, en la Figura 0-1 se muestran imágenes del follaje de cada una de las plantas utilizadas en el presente trabajo.

---

<sup>5</sup>. El Catálogo del Cono Sur fue publicado en 2008, mientras que la Flora Argentina se encuentra en plena ejecución, habiéndose publicado hasta el momento, un 40% de las plantas descritas en ese país. A través de este sitio se puede acceder a información sobre las familias, géneros y especies que integran la Flora Argentina y el denominado "Cono Sur" de Sudamérica (Argentina, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay), mediante la base de datos Documenta Florae Australis© (DFA), desarrollada durante más de 20 años en el Instituto de Botánica Darwinion, y poseen versiones impresas <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina>

Tabla 0-1 Plantas usadas para la obtención de extractos vegetales, los nombres comunes corresponden a los usados en Argentina. Los rótulos son los designados a los extractos obtenidos en este trabajo y las referencias bibliográficas recogen trabajos donde se estudió la actividad biológica de las plantas usadas.

<b>Nombre científico</b>	<b>Nombres comunes</b>	<b>Rótulo</b>	<b>Referencia</b>
<i>Schinus molle</i>	anacahuita	A	(Garzoli et al., 2019; Morales-Rabanales et al., 2022)
<i>Cecropia pachystachya</i>	ambay	B	(Maquiaveli et al., 2014)
<i>Equisetum giganteum</i> L	cola de caballo	E	(De Oliveira et al., 2014) Churqui et al., 2018)
<i>Cassia angustifolia</i>	hojas de sen	H	(Albrahim et al., 2021)
<i>Senna occidentalis</i>	brusca	N	(Lum Nde et al., 2022)
<i>Ilex paraguariensis</i>	yerba mate	Y	(Panzl et al., 2022)



Figura 0-2 *Schinus molle* (a), *Cecropia pachystachya* Trécul (b), *Equisetum giganteum* L. (c), *Cassia angustifolia* (d), *Senna occidentalis* (e) y *Ilex paraguariensis* (f).

**Schinus molle**: Conocida comúnmente como anacahuita, suele ser un árbol de hasta 15 metros de alto y 30 centímetros de diámetro. Posee hojas alternas, siempre verdes. Pertenece a la familia *Anacardiaceae*, originaria del sur de Brasil, Uruguay, y la Mesopotamia argentina. Es una especie tolerante a la sequía y a las altas temperaturas, longeva, resistente y perenne, sin embargo, no resiste heladas fuertes. Se trata de una planta ampliamente utilizada por la medicina tradicional. Sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antitumorales, antifúngicas, antivirales, antibacterianas e insecticidas han sido investigadas (Garzoli et al., 2019).

**Cecropia pachystachya Trécul**: Comúnmente conocida como ambay, es un árbol perteneciente a la familia botánica de las *Cecropiaceae*. Puede medir hasta 15 metros de altura y su tronco tiene un diámetro de entre 20 y 30 centímetros. Es una especie que habita lugares abiertos, en zonas silvestres, como márgenes de arroyos, bordes de senderos, canaletas, tejados e incluso sobre otras especies vegetales. Las hojas y la corteza se describen en la medicina popular como poseedores de efectos antitusivos, expectorantes, antiasmáticos e hipoglucémicos. El extracto de hexano de las hojas exhibió un efecto

antiinflamatorio significativo destacando, en la misma investigación, el compuesto sistosterol por su elevada actividad antiinflamatoria (De Oliveira Aragão et al., 2013).

**Equisetum giganteum L.**: También conocida como cola de caballo, es una planta perteneciente a la familia *Esquicetaceae* que puede llegar a medir hasta 2-5 m de altura. Sus tallos son los más corpulentos de la familia, midiendo 1-2 cm de diámetro (y más de 3,5 cm en algunas poblaciones). Tiene rizomas largos, y en apariencia carece de hojas puesto que las forman vainas cilíndricas desde los nudos de tallos, y comprenden muchas hojuelas lineales. De algunos de los nudos salen ramas, con las mismas características de los tallos principales; en sus extremos aparecen órganos reproductivos con forma de espiga cilíndrica oval, en cuyo eje hay en círculos horizontales, diminutas hojitas modificadas, hexagonales: los esporófilos, y en su lado interno varios esporangios (Holland et al., 2020). Esta especie se utiliza en medicina tradicional en México, Guatemala, Venezuela, Argentina y otros países, principalmente por sus propiedades diuréticas, astringentes, hemostáticas y remineralizantes (De Oliveira et al., 2014).

**Cassia angustifolia**: Es un arbusto de la familia de las leguminosas entre sus nombres comunes se encuentra árbol u hojas de sen. Mide entre 0,5 y 1 metro de altura formado por hojas compuestas de 5 a 8 pares de folíolos ovales. Es una planta pantropical, con amplia presencia en África, Asia y América. Es rica en senósidos y antraquinonas los cuales han sido relacionados con el aumento del peristaltismo intestinal, así como de la secreción del agua y electrolitos por lo que se le atribuye efecto laxante (Albrahim et al., 2021).

**Senna occidentalis**: Es un subarbusto, perteneciente a la familia *Leguminaceae* que alcanzan un tamaño de 0,4–1,2 m de alto sus hojas mayormente poseen entre 11 y 25 cm de largo. Varios de sus componentes químicos han sido identificados, entre ellos, glucósidos de antraquinona, aceites grasos, glucósidos flavonoide galactomanano, polisacáridos y varios taninos. Aunque se considera autóctona de Brasil, es una planta naturalizada en Nigeria donde está muy extendida y crece profusamente (Lum Nde et al., 2022). Se emplea en medicina tradicional en la región tropical del mundo, destacándose su asociación a las funciones diurética y antifebril. También se ha informado sobre su posible actividad antiinflamatoria y antihepatotóxica (Lum Nde et al., 2022). En cuanto a su actividad biológica, se ha informado su actividad antiplasmodial y ha sido descrito como antibacteriano en diferentes trabajos de investigación (Chomnawang et al., 2009).

***Ilex paraquariensis***: Conocida como yerba mate, es una planta arbórea neotropical originaria de las cuencas del Alto Paraná y algunos afluentes del Río Paraguay. Posee hojas perennes y alcanza hasta 15 m de altura en estado salvaje. De las hojas y ramas, secas y molidas de esta aquifoliácea se prepara el mate, una infusión originaria de su zona de crecimiento natural (la selva paranaense) y común en la gastronomía de Paraguay, el Sur de Brasil, Argentina, sur y este de Bolivia, Uruguay y ciertas regiones del sur de Chile, por lo que es ampliamente cultivada en Argentina, Brasil y Paraguay. Popularmente se le asocian propiedades estimulantes asociada a la presencia de alcaloides como la cafeína (Mesquita et al., 2021) y se han descrito potencialidades antimicrobianas (El-Sawalhi et al., 2021).

## **2.2 Obtención de los extractos**

Las plantas se sumergieron en una solución al 2% v/v de NaClO en agua, para su descontaminación y se lavaron 4 veces con agua destilada, para eliminar restos de la solución de lavado. Posteriormente, las hojas se secaron a 60°C hasta peso constante. Por último, se trituraron en mortero de porcelana y se almacenaron en bolsas de plástico con cierres herméticos y/o en tarros de conservas con tapa, en un lugar fresco, seco y alejado de la luz.

Los extractos acuosos se obtuvieron mediante el método de infusión. De esta manera, se dejaron reposar durante 3 minutos, las hojas trituradas de cada planta con agua Milli-Q a 80°C, en una relación del 10% (p/v) (Deyá and Bellotti, 2017). Las infusiones obtenidas se filtraron con papel de filtro. Se conservaron los extractos acuosos vegetales y se desecharon los restos de material vegetal. Los extractos vegetales se conservaron en frascos herméticos color caramelo 4°C hasta por 24 h o se fraccionaron y congelaron a -18° C para usar en períodos más largos de tiempo.

### **2.2.1 Caracterización de los extractos**

El extracto de cada planta se evaluó para detectar la presencia de fitoquímicos con antecedentes de bioactividad como alcaloides, fitoesteroles, flavonoides, glúcidos, polifenoles y proteínas. Así como su composición de grupos funcionales entre otros aspectos, todos tendientes a describir y evaluar su aporte a la reducción, estabilización y potencialidades antimicrobianas de las nanopartículas que se sintetizarían a partir de ellos.

### 2.2.1.1 Determinación de la presencia de componentes fitoquímicos

En todos los casos se usó agua Mili-Q como control negativo y se trabajó sobre extracto sin diluir a menos que estuviese especificado en la técnica. El estudio se llevó a cabo utilizando los siguientes procedimientos:

**Alcaloides:** El extracto crudo (3 mL) se mezcló con HCl al 1% (2 mL) y luego se calentó durante 20 minutos en un baño de vapor. La mezcla se filtró después de enfriar. Se agregaron unas gotas del reactivo de Mayer y Wagner que se basa la acidez de los alcaloides en su forma de sales (Clorhidratos) debido a que en medios básicos no precipita. La presencia de alcaloides quedaría evidenciada por la turbidez del líquido resultante debida a la formación de precipitado.

**Fitoesteroles:** La prueba se realizó mezclando cloroformo (2 mL) con extracto crudo (2 mL), y luego se vertieron 2 mL de igual volumen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y ácido acético al mezclar por separado. La coloración verde confirmaría la presencia de esteroides.

**Flavonoides:** A 2 mL de extracto se le añadieron 2 mL de solución de NaOH al 2%. Coloración amarillenta profunda que se vuelve incolora cuando se añadieron unas gotas de ácido diluido indican la presencia de flavonoides.

**Glúcidos:** El reactivo de Molisch se mezcló con extracto crudo (2 mL) y se agitó vigorosamente. Luego se añadió cuidadosamente H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (2 mL) a lo largo del costado del tubo de ensayo. Anillo morado en la interfase de la probeta confirmó la presencia de glúcidos (test de Molisch).

### 2.2.1.2 Cuantificación de polifenoles totales

El principal componente del Reactivo Folin Denis es el ácido fosfotungstico y el ácido fosfomolibdico, de color amarillo. Este reactivo puede ser reducido por grupos fenólicos a pH básico, dando lugar una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente. Se pusieron en contacto 10 mL de extracto con el reactivo preparado previamente y se midió la absorbancia a 765 nm (Someya et al., 2002). Los cálculos se realizaron a partir de la comparación con una curva patrón de ácido tánico.

### 2.2.1.3 Espectroscopía infrarroja

Las muestras fueron obtenidas a partir de 10 mL de cada uno de los extractos vegetales acuosos eliminando el agua en estufa a baja temperatura (30°C) hasta peso constante. Posteriormente, con una espátula se recolectó el contenido y se analizó mediante



espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. Las técnicas se describen más adelante en la sección 2.3.3.

Además, se realizó espectroscopía ultravioleta-visible de los extractos. Para ello se realizó una dilución 1/10 y se usó agua Mili-Q como blanco. Esto se corresponde con lo descrito en la sección 2.3.2.

## **2.3 Síntesis de nanopartículas en solución acuosa**

Se adicionaron en constante agitación 10 mL del extracto vegetal a 90mL de una solución de  $\text{AgNO}_3$  manteniendo la temperatura de  $60^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, según lo descrito por Deya y Bellotti, 2017. Las partículas en suspensión se mantuvieron refrigeradas a  $4^\circ\text{C}$  en frasco color caramelo. Todas las soluciones se prepararon con agua Milli-Q.

### **2.3.1 Determinación de las condiciones de síntesis**

Las condiciones de síntesis fueron exploradas con todos los extractos. Se repitió el protocolo descrito en el inciso anterior con distintas concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  M con el fin de determinar la mayor concentración a la que se obtuviesen nanopartículas estables en solución. También se probaron alternativas al pH de la solución, la primera fue no modificar el pH de la mezcla al finalizar el goteo del extracto y la segunda fue ajustar a  $\text{pH} = 7$ .

## **2.4 Caracterización de las nanopartículas**

Pasadas 24 de la síntesis, se observaron los sistemas obtenidos y aquellos que exhibían formación de precipitado fueron descartados por resultar inestables. A partir de esta observación se pudieron determinar las condiciones adecuadas de síntesis. Posteriormente se realizaron varios procedimientos para la caracterización de las partículas en suspensión.

### **2.4.1 Purificación de las nanopartículas**

Algunas de las técnicas de caracterización requieren de la previa purificación de las nanopartículas ya sea porque no admiten agua en las muestras, así como por verse interferidas por la presencia de materia orgánica. Se centrifugaron 2 mL de cada suspensión de nanopartículas a 10000 rpm durante 20 minutos manteniendo una temperatura de  $20^\circ\text{C}$ . Posteriormente se desechó el sobrenadante y se agregaron 1.5 mL más de las nanopartículas sobre el sedimento. La operación fue repetida en forma sucesiva 3 veces

más con agua Mili-Q. Finalmente, luego del centrifugado y descarte del sobrenadante el sedimento obtenido se dejó secar durante 72 horas a 28°C en la oscuridad.

#### **2.4.2 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis)**

Con el fin de constatar la presencia de las nanopartículas en los sistemas en suspensión que se obtuvieron se realizaron espectros UV-vis. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Spectrum (SP 2000 UV) con ranura espectral de 5 nm y cubetas de cuarzo. Se midió en longitudes de onda entre 300 y 600 nm (Espinosa-Cristóbal et al., 2009; Bellotti et al., 2015). Como referencia se utilizó una dilución 1/10 de cada extracto en agua, respetándose las condiciones originales de síntesis. En todos los casos fue necesario hacer diluciones tanto de las muestras como del patrón puesto que las absorbancias originales superaban el rango de fiabilidad establecido en valores entre 0 y 1. Se esperaba observar para verificar la formación de AgNPs una banda intensa entre 400-450 nm, atribuida a la excitación colectiva de los electrones de la superficie (absorción plasmónica superficial) (Mondal et al., 2021).

La UV-vis se realizó en varias ocasiones durante un año para determinar la duración de la estabilidad de las nanopartículas y su comportamiento y agregación en el tiempo. Todas las veces la operación de medida se realizó "punto por punto", manualmente.

#### **2.4.3 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

Teniendo en cuenta que en esta técnica las radiaciones penetran en una muestra sólida, las nanopartículas fueron purificadas y separadas del medio acuoso siguiendo el procedimiento que se escribe en el inciso 2.4.1.

El principio de funcionamiento de esta espectroscopía se basa en la excitación de los modos de vibración y rotación de los enlaces entre los átomos al ser irradiados con un haz de luz infrarroja. Cada molécula, según las características de sus enlaces absorberá radiación de una o varias longitudes de onda específicas por lo que podrá ser identificada. Además, se conoce que los óxidos absorben señales debajo de 1000  $\text{cm}^{-1}$  interfiriendo con las señales superficiales. Por estas razones se usó el método de identificación por similitud de bandas que permite verificar la pureza de los compuestos y evaluar en los sólidos la influencia de las modificaciones que se realizaron, para determinar los efectos de las interacciones observables en el espectro IR (Hosseini and Jafari, 2020).

Los espectros FTIR se determinaron por transmitancia. Para ello, se obtuvo un disco de bromuro de potasio. Se midió en la región comprendida entre 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  donde ocurren las resonancias para las frecuencias de vibración molecular. Se trabajó en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum One.

#### **2.4.4 Difracción de rayos X (DRX)**

La DRX proporciona un medio adecuado y práctico para la identificación cualitativa de compuestos cristalinos y sobre el ordenamiento y espaciado de los átomos en materiales cristalinos. Este es el único método analítico no destructivo, capaz de suministrar información cualitativa y cuantitativa sobre los compuestos cristalinos presentes en un sólido, basándose en el hecho de que cada uno presenta un diagrama de difracción único. Así, puede compararse el diagrama de una muestra desconocida y el de una muestra patrón y determinar su identidad y composición química. Para ello se utilizó el patrón JCPDS file No. 04-0783 (Rambhade et al., 2010)

Por los requerimientos de la técnica, se realizó la misma preparación previa descrita en la sección 2.4.1. La muestra purificada fue colocada en el portamuestras de vidrio de manera horizontal, cubriendo un área de aproximadamente 0,5 cm x 0,5 cm. El procedimiento se realizó sin la mediación de fijadores u otros compuestos. Se realizó, también, un difractograma del portamuestras para usarlo como referencia. Las mediciones se realizaron con geometría Bragg-Bentano con ánodo de Cu a una longitud de onda de 1,5406 Å y un monocromador "*curved single cristal*" y ranuras: 1,0 DS- 1,0 SS- 0,6 mm- 0,8 mm. El procedimiento se realizó en un Difractómetro con Goniómetro Vertical, Theta-Theta, modelo D/Max-C de la marca RIGAKU.

#### **2.4.5 Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Para determinar la distribución de formas y tamaños de las nanopartículas obtenidas, se observaron mediante MET. Esta técnica es ampliamente elegida para la caracterización estructural y química de materiales, pudiéndose obtener información sobre morfología, tamaño e incluso composición química, acoplando los programas y equipamientos necesarios en cada caso. Su uso está muy difundido en la caracterización de nanopartículas metálicas como las obtenidas en este trabajo (P. Wang et al., 2013; Asoro et al., 2014) sobre todo por los aumentos alcanzados, gracias a los cuales se puede observar estructuras con dimensiones de hasta  $\sim 0,1$  nm y el acoplamiento a software que permiten la medición de varias dimensiones de las entidades nanométricas.

Se tomaron micrografías de las suspensiones de AgNPs mediante un equipo Gatan Erlangshen CCD modelo 785 ES1000W acoplado al Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL modelo 100 CX II. El programa utilizado en el procesamiento de imágenes fue el Gatan Digital Micrograph.

#### 2.4.5.1 Determinación de la distribución de tamaños

En la determinación del tamaño de las nanopartículas, se eligió el diámetro mayor, según su forma, como medida representativa. Los datos obtenidos a partir de las imágenes digitalizadas se procesaron estadísticamente y se dividieron en clases para obtener la distribución estadística de tamaños de cada una de las soluciones de AgNPs estudiadas.

### 2.4.6 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La MEB es una técnica ampliamente utilizada para el análisis de características microestructurales de sólidos y proporciona información morfológica y topográfica de la superficie de las muestras. El fundamento de la MEB radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío de alrededor de  $10^{-7}$  Torr (P. Wang et al., 2013).

Esta técnica se utilizó con el fin de obtener una visión panorámica de las nanopartículas a nivel superficial. Las muestras de NPs purificadas fueron depositadas sobre una cinta de carbono y fueron observadas bajo la modalidad de bajo vacío mediante un microscopio electrónico Philips FEI Quanta 200.

### 2.4.7 Espectrometría de dispersión de energía mediante rayos X (EDS)

Una capacidad adicional de estos microscopios electrónicos es el análisis de EDS. Esta técnica se realizó para obtener información semicuantitativa de los elementos presentes en la muestra y su cantidad relativa. Además, se realizó un mapeo de los distintos elementos.

## 2.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana

En este trabajo, la evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó en cuatro instancias diferentes. Se seleccionó la técnica de difusión en agar para realizar una primera evaluación de todas las nanopartículas obtenidas, así como de los extractos y las soluciones de  $\text{AgNO}_3$ . Posteriormente, se determinó: la concentración inhibitoria mínima (CIM) y las concentraciones bactericidas y fungicidas mínimas (CBM y CFM) de las partículas en suspensión que mostraron potencialidades tras el primer ensayo frente a las cepas

seleccionadas. Luego se evaluaron las potencialidades de las nanopartículas seleccionadas por presentar mejores resultados como antimicrobianos (menor CIM, CBM y CFM) como inhibidoras del crecimiento microbiano en películas de pinturas al agua. Finalmente se seleccionaron las mejores nanopartículas según los criterios trazados para este trabajo para probarlas como potenciales biocidas en lata.

### 2.5.1 Selección de Cepas

Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron frente a cuatro cepas, dos fúngicas y dos bacterianas que se detallan en la Tabla 2.5-1, registros de micrográficas MEB se muestran en la Figura 2.5-1.

Tabla 2.5-1 Cepas microbianas

Nombre científico	Abreviatura	Referencia
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach (ATCC® 6538)	<i>S. aureus</i>	(American Type Culture Collection, 2021a)
<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 11229)	<i>E. coli</i>	(American Type Culture Collection, 2021)
<i>Alternaria alternata</i> (KU936229)	<i>A. alternata</i>	(Deyá and Bellotti, 2017)
<i>Chaetomium globosum</i> (KU936228)	<i>C. globosum</i>	(Deyá and Bellotti, 2017)

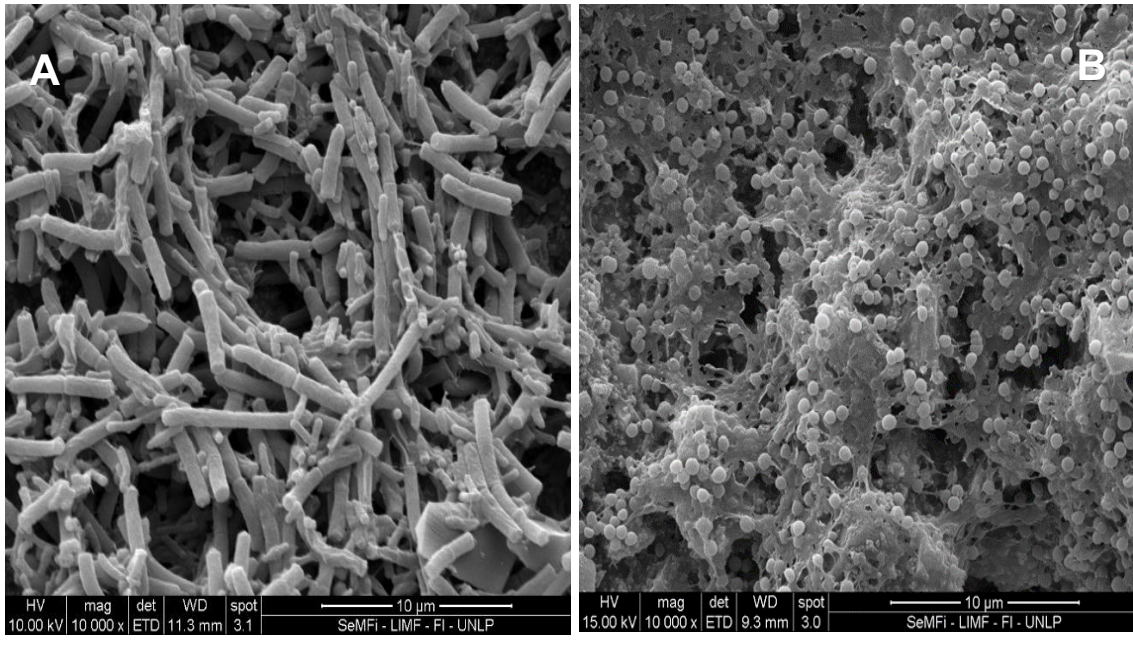


Figura 2.5-1 Micrografías de MEB A: *E. coli* y B: *S.aureus*

***Escherichia coli* (ATCC® 11229™)** Es una bacteria gram negativa no formadora de endospora pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (Murray et al., 2005). El género forma parte de la microbiota normal del tracto intestinal de humanos y otros mamíferos. Su sobrepoblación, puede afectar el funcionamiento de este, por lo que se les considera patógenos oportunistas. Es recomendada por ATCC<sup>6</sup> para ensayos de biorresistencia de pinturas. También, se usa en pruebas de calidad de filtros de membrana y otros materiales, así como formulaciones antimicrobianas para el lavado de manos y otros desinfectantes. Además, es una cepa bacteriana aerobia de crecimiento abundante en medios nutritivos, aunque su temperatura óptima de crecimiento son 37°C, puede crecer a 30° C, temperatura elegida para la realización de los ensayos con fines ambientales. Por el bajo riesgo, está catalogada para su uso en laboratorios de Nivel 2 de bioseguridad.

---

<sup>6</sup> La Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC por sus siglas en inglés, es una organización que recolecta, almacena y distribuye proporciona las colecciones más grandes y diversas de materiales biológicos, microorganismos de referencia estándar, líneas celulares y otros materiales para investigación y desarrollo. Su alcance llega a más de 150 países, ofreciendo estándares y productos de alta calidad citados por agencias de todo el mundo. [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

**Staphylococcus aureus subsp. Aureus (ATCC® 6538™) (S.aureus):** *S. aureus* es un agente potencialmente patógeno ubicuo parte de la microbiota normal de humanos, se encuentra en la piel de individuos sanos, pero en individuos inmunocomprometidos y con mucosas expuestas aumentan las probabilidades de causar enfermedad (Murray et al., 2005). Es una cepa comúnmente utilizada para realizar pruebas de estabilidad en medios de cultivo y ensayos en la certificación de la calidad de desinfectantes, conservantes y otras sustancias esencialmente antimicrobianas. Además, se emplea en ensayos de bioresistencia de alfombras y materiales textiles. Es una bacteria gram positiva anaeroba facultativa cuyo crecimiento óptimo ocurre a 37°C, pero se adapta a crecer a 30°C en medios ricos. No tiene requerimientos nutricionales relacionados con la mixotrofia y está clasificada como apta para trabajar en laboratorios con nivel 2 de bioseguridad por su bajo riesgo para operadores calificados y sanos.

**Alternaria alternata (KU936229):** es un hongo filamentosos que crece en una amplia variedad de sustratos que incluyen materiales estructurales y pinturas. Su rango óptimo de crecimiento está entre a 25-29 °C de temperatura, con un pH entre 4,0 y 5,4, los requisitos mínimos de agua disponible oscilan entre 0,85 y 0,88 cm<sup>3</sup>. Cuando se cultivan en agar con extracto de malta (MEA) alrededor de 25 °C las colonias alcanzan un diámetro de 6 cm en 7 días, siendo negras o grisáceas (Adan y Samson, 2011).

**Chaetomium globosum (KU936228):** es un hongo filamentosos saprofitico que coloniza principalmente plantas, tierra, paja y estiércol, así como también, materiales estructurales con alto contenido de celulosa como papeles y maderas. Son patógenos oportunistas en humanos. Se caracteriza por secretar enzimas celulolíticas y, por lo tanto, las pinturas de base acuosa son blanco habitual para esta especie debido a que contienen espesantes celulósicos en su composición (Adan y Samson, 2011).

Micrografías de las cepas fúngicas utilizadas se muestran en el Figura 2.5-2.

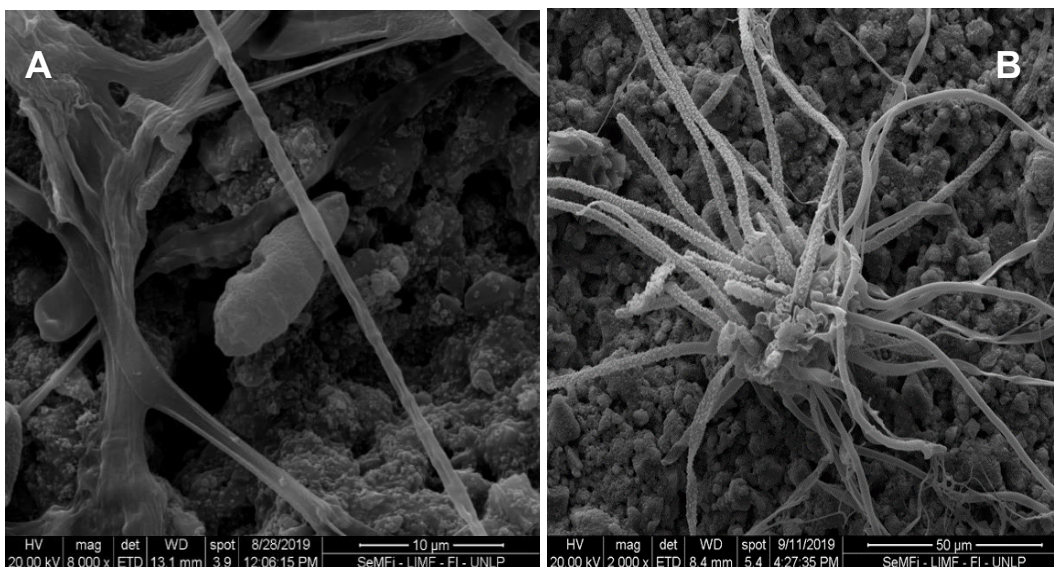


Figura 2.5-2 Micrografías electrónicas A: *Alternaria alternata* y B: *Chaetomium globosum*.

### 2.5.2 Medios de Cultivo

Para los ensayos con bacterias se usó el medio de cultivo Müller Hinton (Britania) cuya formulación contiene 300 g de infusión de carne, 17,5 g de peptona ácida de caseína, y 1,5 g de almidón en 1000 mL de agua destilada (AD). El medio se prepara a  $\text{pH} = 7,3 \pm 0,1$  final. Este medio es universalmente recomendado para la realización de la prueba de sensibilidad a los compuestos antimicrobianos.

Además, se usó medio Luria Bertani (LB) cuya formulación contiene 5 g de extracto de levaduras, 10 g de peptona y 5 g cloruro de sodio en 1000 mL de AD. El medio se prepara a  $\text{pH} = 7,2 \pm 0,2$  final.

Para los ensayos con hongos se usó el medio Extracto de Malta preparado en el laboratorio obedeciendo a la formulación general: 30 g de extracto de malta, 5 g de peptona, 10 g de glucosa por cada 1000 mL de AD. En caso de ser requerido el medio se suplementó con 1g de sales de  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . El medio se prepara a  $\text{pH} = 5,6 \pm 0,2$  final. Este medio se recomienda para el aislamiento, cultivo y enumeración de levaduras y hongos filamentosos.

En los casos en que fue necesario se suplementaron las fórmulas con agar-agar testado por la ausencia de agentes inhibidores (Britania) a razón de 15g/L para obtener medios de cultivo sólido, conocidos como Agar Müller Hinton (AMH), LB sólido y Agar Extracto de Malta (MEA por sus siglas en inglés).



### **2.5.3 Ensayo de difusión de en agar con bacterias**

El ensayo de difusión se basa en la solubilidad o capacidad de migración del material a probar, en el medio de cultivo por lo que, a mayores halos de inhibición, no implican únicamente mayor actividad si no mayor difusión en el medio.

Para preparar los inóculos bacterianos, se cultivaron en Caldo Mueller Hinton (CMH), las cepas de *S. aureus* y *E. coli* a 37°C durante 24 horas. El inóculo se ajustó utilizando PBS por espectrofotometría a 620nm a una DO de 0,1 que corresponden a 10<sup>7</sup> UFC/ mL. Posteriormente, se esparcieron uniformemente en las placas individuales con AMH empleando espátula de Drigalsky. Luego, se depositaron, sobre el medio sólido inoculado, discos de papel de 6 mm de diámetro, embebidos con 6 µl de las suspensiones de nanopartículas. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h.

### **2.5.4 Ensayo de difusión de en agar con hongos**

Se prepararon suspensiones de esporas de cultivos de *C. globosum* y *A. alternata* a partir de cultivos fúngicos en AEM de entre 25 y 30 días de incubación a 28°C. La concentración de inóculo se ajustó a 10<sup>5</sup> esporas /ml empleando una cámara Neubauer para realizar el conteo. Se prepararon placas con 15 mL de AEM inoculadas con 200 µl de suspensión de esporas. Sobre el medio inoculado se colocaron los discos embebidos en las suspensiones de nanopartículas a evaluar. Finalmente, las placas se incubaron durante 48 h a 28°C (Fernández y Bellotti, 2017).

En ambas pruebas, antibacterianas y antifúngicas, se usó AD estéril como control negativo y se utilizó una amina cuaternaria de actividad antibacteriana y antifúngica conocida como control positivo. La actividad antimicrobiana de extractos vegetales puros y del AgNO<sub>3</sub> también fue evaluada.

Tras 24h de la incubación en el caso de las bacterias y 48h para los hongos, se examinaron las placas para detectar zonas de inhibición (z), que se midieron considerando  $z \leq 6$  mm sin actividad antibacteriana, y  $z > 6$  mm, con actividad antibacteriana. En el caso de la actividad antifúngica teniendo en cuenta el crecimiento aéreo de ambas cepas en las condiciones de cultivo elegidas, se determinó que  $z \geq 6$  mm con actividad antifúngica y  $z < 6$  sin actividad antifúngica.

### 2.5.5 Ensayo de microdilución

El método de microdilución realizado con bacterias y hongos estuvo basado en la normalización del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) <sup>7</sup> y se llevó a cabo con las suspensiones que mostraron actividad antibacteriana y antifúngica. Esta prueba se desarrolló en placas multipocillos (48) para determinar la CIM como se muestra en el esquema de la Figura 2.5-3. Por medio de esta metodología fue posible comparar entre los distintos productos obtenidos la actividad antimicrobiana y seleccionar los más eficientes para ser utilizados en la siguiente etapa del estudio.

Las suspensiones de NPs se usaron íntegramente, por tanto, la concentración de Ag en las suspensiones preparadas es equivalente a la concentración proveniente de la sal de Ag utilizada, siendo 1080 µg/ml en el caso de usar la solución 10<sup>-2</sup> M. En una primera instancia, las suspensiones se diluyeron en una progresión geométrica de 54 a 1,7 µg / mL para la prueba de microdilución; comenzando con suspensiones diluidas (1:20) con medio de cultivo líquido. En caso de no encontrar la CIM en las condiciones exploradas anteriormente se apeló a una segunda instancia en la cual la dilución inicial fue de (1: 4) y el rango de la progresión fue de 270 a 8,4 µg /mL. En caso de ser necesario la progresión continuaría en una dirección tendiente a aumentar cada vez más la concentración hasta que el sistema diseñado lo permitiese.

Los medios líquidos de cultivo utilizados fueron Müller Hinton para bacterias y Extracto de Malta para hongos. Los inóculos de bacterias y hongos se obtuvieron utilizando los mismos protocolos que se describieron en la prueba de difusión. Se usaron mezclas 1:1 de las suspensiones y el medio de cultivo sin inocular como control negativo de crecimiento y como control positivo de crecimiento una mezcla 1:1 de AD estéril y medio de cultivo inoculado. La concentración final de inóculo de bacterias y hongos, en cada pocillo, fue de 10<sup>6</sup> UFC / mL y 10<sup>5</sup> esporas/mL, respectivamente. Los ensayos se realizaron por triplicado.

---

<sup>7</sup> El Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio CLSI, por sus siglas en inglés es una organización sin fines de lucro que desarrolla estándares de laboratorio en todo el mundo. Nuestros estándares son reconocidos por laboratorios, acreditadores y agencias gubernamentales: Si bien está orientado a los protocolos médicos, sus normas son aplicadas también en trabajos de microbiología ambiental. <https://clsi.org>

Las placas se incubaron a 30°C, durante 24 h en el caso de las bacterias y 48 h los hongos. Pasado el periodo de incubación se determinó la CIM mediante observaciones a ojo desnudo de la turbidez en cada uno de los pocillos.

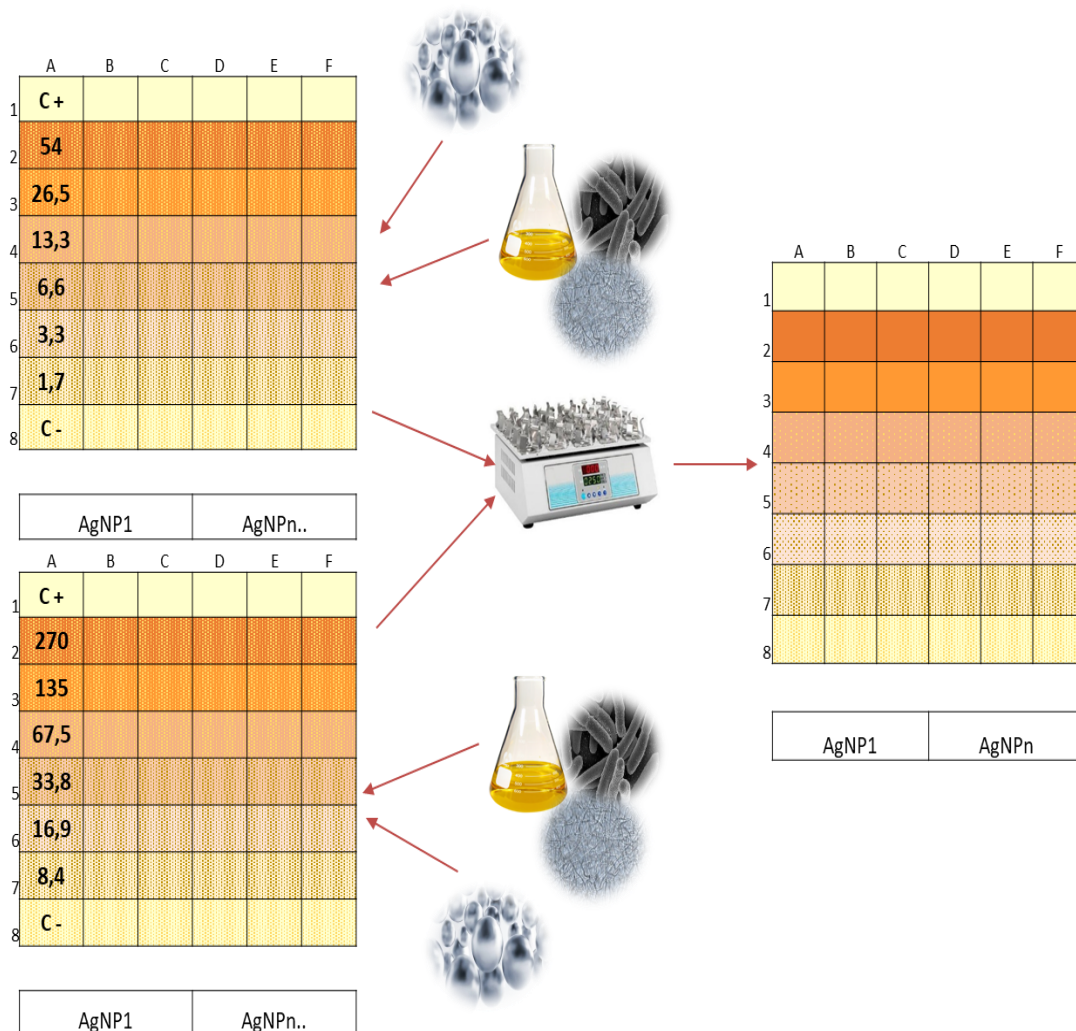


Figura 2.5-3 Representación esquemática del ensayo de microdilucion en placas multipocillos.

### 2.5.6 Determinación de las concentraciones fungicidas y bactericida mínimas

Pasado el período de incubación se inocularon 20 µL del contenido de cada uno de los pocillos en MEA para determinar la concentración mínima fungicida (CMF). Para determinar la concentración mínima bactericida (CMB), se siguió el mismo procedimiento, esta vez

inoculando el contenido de los pocillos con bacterias en medio LB sólido. Se sembraron los controles correspondientes incluidos en el procedimiento previo. De esta forma, se perseguía contrastar los datos obtenidos previamente y discriminar la actividad antimicrobiana de la biocida. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. Las placas se incubaron durante 48 y 24 horas respectivamente.

El crecimiento en medio sólido correspondiente a pocillos donde no se observaba turbidez, se relaciona con concentración inhibitoria pero no letal, la ausencia de crecimiento se relaciona con una concentración letal para hongos o bacterias.

## **2.6 Evaluación de potencialidades antimicrobianas en películas de pintura**

Una vez seleccionadas las nanopartículas más activas y estables en el tiempo, se realizó su evaluación como potenciales biocidas en pinturas acrílicas en base acuosa. En esta instancia se evaluó la actividad en películas de pintura, sobre el establecimiento de biopelículas tanto fúngicas como bacterianas. El método de adición del antimicrobiano elegido, en este caso, fue el de sustituir el agua de la formulación por la suspensión con NPs.

### **2.6.1 Formulación de pinturas**

Se utilizó una formulación de pintura acrílica para interior convencional que sirvió como base para todas las formulaciones desarrolladas en el presente trabajo (Deyá y Bellotti 2017). La composición de la pintura fue la siguiente: 6,3% de resina acrílica, 13,6% de  $\text{TiO}_2$ , 25,9% de  $\text{CaCO}_3$  (natural), 2,0% de  $\text{CaCO}_3$  (precipitado), 3,6% de aditivos (antiespumante, espesante celulósico, dispersantes y tensioactivos) y 48,6% (% en masa) de agua destilada (DW).

Se prepararon las pinturas usando una dispersora de alta velocidad (SEMCO) sustituyendo parte del agua de la formulación original por la suspensión con NPs. Las nuevas pinturas obtenidas contenían 0, 10, 15 y 25 mg de plata por 100 g de pintura, etiquetadas como PC, P10, P15 y P25, respectivamente. Para seleccionar el rango de las concentraciones correspondientes, se tomaron en cuenta los datos bibliográficos y estudios previos realizados por Bellotti *et al.* 2015.

Con las pinturas obtenidas se pintaron portaobjetos de vidrio (Sail Brand), siguiendo un esquema de pintado de tres capas perpendiculares entre sí. Posteriormente se dejaron

curar durante 15 días y se cortaron para ser utilizadas en los distintos bioensayos frente a las cepas fúngicas y bacterianas. Antes de los ensayos microbiológicos se efectuó una descontaminación durante 30 minutos por cada lado mediante irradiación con una lámpara de germicida UV (Philips, 20 W).

### **2.6.2 Ensayo normalizado de potencialidades antifúngicas de las pinturas**

Teniendo en cuenta que los hongos son descriptos como los organismos más biodeteriorantes de películas de pintura, se aplicó el “Método de prueba estándar para determinar la resistencia de películas de pintura y recubrimientos relacionados al deterioro fúngico mediante un ensayo acelerado en placa de agar de cuatro semanas” (ASTM<sup>8</sup> D 5990) cuya versión más actual data de 2021. En tal sentido, el procedimiento busca determinar la capacidad de las películas obtenidas en este trabajo para resistir el crecimiento fúngico.

Las muestras de pintura de 2,5 cm de lado se colocaron en placas (tres por cada una) en el medio de cultivo Mínimo Mineral cuya composición es: 5 g de NaCl, 1g de  $\text{HK}_2\text{PO}_4$ , 1g de  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ , 1g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2g de  $\text{MgSO}_4$ , 3 g de  $\text{KNO}_3$  y 20 g de agar en 1000 mL de AD. Las muestras se inocularon con 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de esporas ( $10^5$  esporas/mL) de *A. alternata* y *C. globosum* y se incubaron a 28°C durante 4 semanas.

El crecimiento fúngico se evaluó de acuerdo con la especificación ASTM D5590 a simple vista y utilizando estereoscopio (Leica) con cámara acoplada. En consecuencia, el crecimiento observado en las muestras se clasificó estableciendo el porcentaje de área cubierta por el crecimiento fúngico que se corresponde con un número de evaluación como se muestra en la Tabla 2.6-1.

---

<sup>8</sup> La Sociedad Americana para Pruebas y Materiales ASTM por sus siglas en inglés, es una organización internacional de estándares que desarrolla y publica estándares técnicos de consenso voluntario para una amplia gama de materiales, productos, sistemas y servicios. a ASTM está entre los mayores contribuyentes técnicos del ISO y mantiene un sólido liderazgo en la definición de los materiales y métodos de prueba en casi todas las industrias.

Tabla 2.6-1 Clave de clasificación para el crecimiento fúngico ASTM D5590

<b>Crecimiento</b>	<b>Área cubierta (%)</b>	<b>Clasificación</b>
Sin crecimiento	0	0
Rastro de crecimiento	<10	1
<i>Crecimiento ligero</i>	10-30	2
<i>Crecimiento moderado</i>	30-60	3
<i>Crecimiento intenso</i>	60-100	4

### 2.6.3 Ensayo de resistencia al desarrollo de biopelículas bacterianas

En este trabajo desarrollamos un método para el análisis de la resistencia de películas de pinturas al desarrollo de biopelículas bacterianas, para ello se subcultivaron *E. coli* y *S. aureus*, en caldo LB en un agitador rotatorio a 125 rpm durante 18 h. A partir de estos cultivos puros frescos, se obtuvieron suspensiones bacterianas ( $10^6$  UFC/mL). Las muestras de pintura de 3,5 cm × 2,5 cm de lado se introdujeron verticalmente en tubos estériles, completamente cubiertos con 50 mL de LB y se incubaron durante 5 días a 30° C. Se reemplazó el medio de cultivo, todos los días después de las primeras 48 h, homologando un sistema de biorreactor de simple etapa con alimentación estéril.

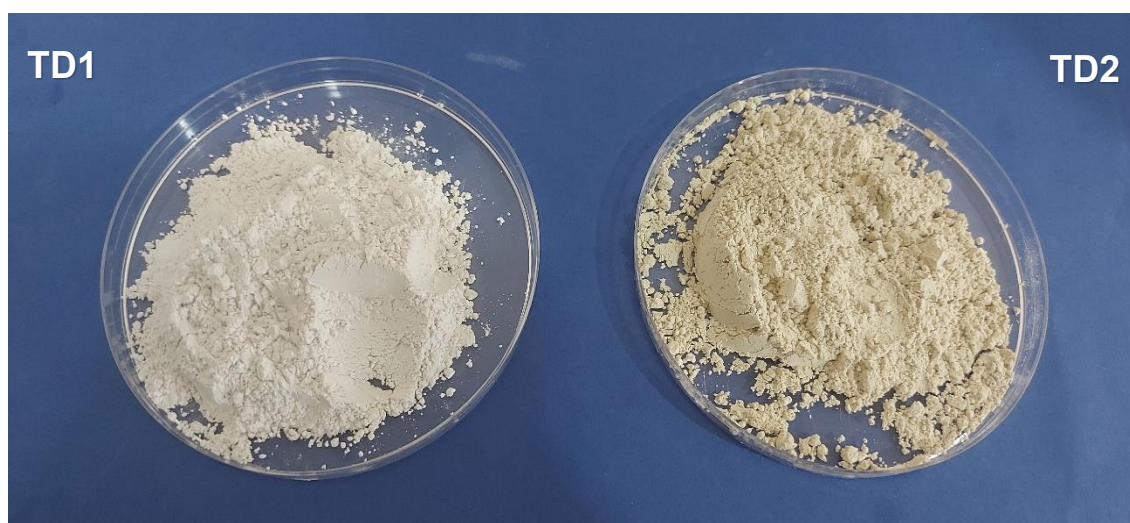
### 2.6.4 Observación al microscopio de las biopelículas

Las muestras se extrajeron de los sistemas de cultivo y se lavaron, tres veces, con solución de tampón fosfato (PBS). Posteriormente, se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2% v/v en PBS y se secaron en un gradiente de etanol. Finalmente, se realizó una pulverización catódica con oro. Las muestras bacterianas fueron observadas mediante MEB Philips FEI Quanta 200 en la modalidad de alto vacío.

Las muestras fúngicas se observaron en la modalidad de bajo vacío. Al mismo tiempo, en ambos casos, se realizó un análisis químico semicuantitativo mediante EDS acoplado al MEB.

## 2.7 Caracterización de las tierras de diatomeas

La segunda alternativa explorada en este trabajo consistió en sintetizar las nanopartículas asociadas a un soporte. En el presente trabajo se utilizaron dos tierras de diatomeas (TDs) como material de soporte experimental. La primera, TD1 obtenida del depósito de materiales del CIDEPINT. La segunda, TD2 fue adquirida en forma comercial, “DiatomiD”, que se promociona como fertilizante e insecticida natural basado en un 100% de TDs. Este es un producto certificado por el Servicio Nacional de Salud y Calidad Agroalimentaria (SENASA).<sup>9</sup> En la Figura 2.7-1 se muestran registros fotográficos de ambas TDs.



*Figura 2.7-1 Imagen de 10 gramos de TD1 y TD2. Obsérvese la diferencia de tonalidad y granulometría detectable a simple vista.*

Para determinar las características estructurales y la composición química de las tierras de diatomeas que, según la bibliografía, podrían incidir en el proceso de funcionalización de estas es que se caracterizaron (Aw et al., 2011; Cabrera et al., 2018). Además, se analizó el grado de conservación de las estructuras originales de las diatomeas (Y. Wang et al.,

---

<sup>9</sup> El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) es un organismo descentralizado, con autarquía económico-financiera y técnico-administrativa y dotado de personería jurídica propia, dependiente del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, encargado de ejecutar las políticas nacionales en materia de sanidad y calidad animal y vegetal e inocuidad de los alimentos de su competencia, así como de verificar el cumplimiento de la normativa vigente en la materia. <https://www.argentina.gob.ar/senasa>

2013; ElSayed, 2018). Por lo tanto, con la finalidad de caracterizar las TDs se llevaron a cabo las técnicas que se describen a continuación.

#### 2.7.1.1 DRX

Se realizó difracción de rayos X a partir de las TDs para determinar la composición de las fases cristalinas. La muestra se molió hasta conseguir homogeneidad en la granulometría obteniéndose un polvo. Se usó un portamuestras de silicona evitando la orientación preferencial. Los difractogramas de rayos X se obtuvieron en un difractor Philips 3020 equipado con un tubo de cobre, utilizando radiación  $K\alpha$  y con un filtro de Níquel con una potencia de 35 kV y 40 mA. El barrido se realizó entre  $3^\circ$  y  $70^\circ 2\theta$ , con un paso de  $0,04^\circ$  y un tiempo de conteo de 2 seg/paso. Las aberturas de las ranuras de divergencia, recepción y dispersión fueron de  $1^\circ$ ,  $0^\circ$ ,  $2^\circ$  y  $1^\circ$  respectivamente y no se utilizó monocromador. La identificación de las fases minerales en roca total se realizó con el programa X'Pert High Score. La cuantificación se basó en el método de Rietveld de refinamiento estructural (Xiong et al., 2012).

#### 2.7.1.2 MEB

Con el fin de observar el grado de conservación de las estructuras de las diatomeas, las muestras, sin preparación previa se observaron con el microscopio electrónico de barrido (MEB) JCM-6000, en condiciones de bajo vacío a diferentes aumentos.

#### 2.7.1.3 MET

Para observar la estructura, la distribución física y realizar el análisis semicuantitativo superficial de las TDs se utilizó MET, para ello, se utilizaron: el microscopio Talos F200x de la marca FEI que se encuentra en YPF Tecnología (Y-TEC Berisso) y el JEM 1200EX II de la marca Jeol de la Facultad de Veterinaria de la UNLP. Para ello, las muestras se prepararon previamente, con el fin de reducir los compuestos orgánicos que desfavorecen la aplicación de esta técnica fueron lavadas con AD. Finalmente fueron suspendidas en AD y sonicadas previamente a la colocación sobre una grilla (mesh 400 con soporte formvar/carbon) especial para la observación de muestras mediante MET.

#### 2.7.1.4 FTIR

Se realizó espectroscopía de FTIR por reflectancia total atenuada sobre ventana universal de ZnSe-Diamante (U-ATR), de todas las muestras. Se realizó el procesamiento para obtener las derivadas segundas utilizando el software Spectrum. Los espectros FTIR se



obtuvieron con un soporte de pastillas KBr en el rango espectral de  $4000\text{--}500\text{cm}^{-1}$ . Para cada muestra, se grabó una exploración por muestra en modo de transmisión con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$

## **2.8 Funcionalización de las TDs**

El protocolo de síntesis verde descrito en la sección 2.2, se repitió con el fin de obtener nanopartículas de plata similares a las anteriores, esta vez asociadas a las TDs.

### **2.8.1 Activación de las TDs**

Se activaron las TD1 y TD2 con el objetivo de aumentar la carga negativa al desprotonar los grupos oxidrilos superficiales del material silíceo, esto mejoraría la asociación con los iones  $\text{Ag}^+$  en primer lugar y finalmente con las AgNPs. Para ello, las TDs se llevaron a ebullición, durante 2 horas, en solución acuosa de hidróxido de sodio 2,2 M (50 gramos de TD por cada litro de solución) manteniendo el volumen constante (Fernández and Bellotti, 2017). Se dejó enfriar y decantar, durante 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se separó el sólido desechando la fase líquida. Al finalizar el proceso de activación, el pH de la solución desechada se encontraba entre 13 y 14.

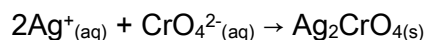
Se realizaron lavados sucesivos con agua destilada y al final de cada lavado se separó la TD por centrifugación a 10.000 rpm en una centrífuga (Rolco). Antes de desechar el agua de cada lavado, se midió el pH. El procedimiento se repitió hasta obtener un pH  $\sim 8$ , que es el pH habitual del tipo de pinturas estudiadas. La TD húmeda se puso a secar a  $80^\circ\text{C}$  en estufa (San Jor) hasta peso constante. Las TDs activadas fueron rotuladas como TD1\* y TD2\*.

### **2.8.2 Determinación de la adsorción de iones $\text{Ag}^+$ por parte de las TDs**

Para determinar la capacidad de adsorción de iones  $\text{Ag}^+$  por parte de las TDs se pusieron en contacto con un mismo volumen de solución de  $\text{AgNO}_3$   $10^{-2}$  M distintas cantidades de la TDs, entre 2,5 y 25 g, en recipientes de 100 mL de capacidad. Las mezclas se agitaron vigorosamente en oscuridad durante 24 horas. Posteriormente se centrifugaron a 10.000 rpm y se determinó la concentración de iones  $\text{Ag}^+$  mediante titulación en el sobrenadante. A partir de esto se pudo determinar la cantidad de iones  $\text{Ag}^+$  adsorbidos en las TDs mediante determinando, en primer lugar, la concentración de iones  $\text{Ag}^+$  en el sobrenadante mediante titulación aplicando el método de Mōhr. A partir de estos datos se calculó la menor masa de TD que lograba adsorber la mayor cantidad de iones de plata presentes en la

solución, a fin de seguir el principio de la química verde de minimizar la generación de desechos.

Además, se realizó una variación del método de Möhr (Skoog et al., 2015) mediante el cual una solución de  $K_2CrO_4$  (amarillo), a pH neutro, reacciona con los iones  $Ag^+$  del sobrenadante produciendo cromato de plata (precipitado rojo), como se muestra en la siguiente ecuación:



Se realizó la reacción con cada uno de los sobrenadantes con el fin de determinar en cuál de las mezclas se había adsorbido la mayor cantidad de iones  $Ag^+$ . Finalmente, se graficaron los resultados y se seleccionó la cantidad considerada óptima de las TDs activadas en relación con la adsorción de iones  $Ag^+$  del sistema.

### **2.8.3 Incorporación de solución amoniacal en el proceso de síntesis**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el inciso anterior se realizó el procedimiento para adsorber la plata con ambas TDs. Puesto que, en este punto, la capacidad de adsorción de plata ya no dependía de la cantidad de TD en la mezcla, se diseñó una nueva estrategia para optimizar el proceso. Para ello, a la solución de  $AgNO_3$   $10^{-2}M$ , previo mezclado con las TDs activadas, se le adicionó, por goteo, en constante agitación, solución acuosa de  $NH_3$  al 50% hasta observar la desaparición del precipitado por la formación del complejo  $Ag(NH_3)_2^+$ . Mediante esta reacción se busca preservar la presencia de los iones  $Ag^+$  en el sistema previniendo la formación de óxido de plata.

### **2.8.4 Reducción de los iones $Ag^+$ adsorbidos**

Con el fin de reducir los iones  $Ag^+$  adsorbidos en TD1\*A, TD2\*A, TD1\*NA y TD2\*NA, y obtener finalmente las TDs nano-funcionalizadas (TDNF), estos productos intermedios fueron sometidos a un proceso de síntesis verde similar al estudiado en la sección 2.2. El sistema de síntesis se dejó en agitación constante por 24 h en la oscuridad.

Los extractos vegetales acuosos empleados, fueron obtenidos por infusión a  $80^\circ C$  a partir de las hojas secas y las plantas fueron seleccionadas debido a su eficacia como reductores y estabilizantes en la síntesis verde de AgNPs de menor tamaño y mayor actividad antimicrobiana, explorados en la etapa previa.

Los productos obtenidos fueron sometidos a lavados con AD, centrifugados y secados a 50°C hasta peso constante.

## **2.9 Caracterización de las TDNF**

La caracterización de las TDNF se realizó aplicando metodologías y técnicas similares a las descritas en la sección 2.6 para la caracterización de las TDs. En este sentido se realizaron observaciones mediante MEB y MET. Se obtuvieron los análisis semicuantitativos superficiales y los mapeos correspondientes mediante EDS. Además, se realizaron los espectros FTIR.

## **2.10 Exploración de las potencialidades antimicrobianas las TDNF**

Teniendo en cuenta que el fin último de las TDNF es ser utilizada como material bioactivo en reemplazo de los biocidas tradicionalmente usados en las pinturas, se realizó una versión del ensayo de difusión en agar, que se usa habitualmente para la evaluación y comparación de agentes antimicrobianos, para evaluar las potencialidades antimicrobianas de las mismas. Para ello se emplearon las 4 cepas descritas anteriormente, las bacterianas: *E.coli* y *S. aureus*, y las dos fúngicas: *A. alternata* y *C. globosum*.

El ensayo se realizó en medio LB sólido en el caso de las bacterias y MEA en el caso de los hongos. Los inóculos bacterianos constaban de 10<sup>6</sup> UFC por mL y los inóculos fúngicos 10<sup>5</sup> esporas por mL. En todos los casos se realizó una siembra en sábana usando la espátula de Drigalsky, se hicieron hoyos de 7 mm de diámetro con un sacabocado estéril dentro del cual se depositaron 25 mg, de las TDNF en cuestión. Las TD\* se incorporaron en el ensayo también. En todos los casos el ensayo se realizó por triplicado. Posteriormente se incubaron las placas 24 h a 30°C en el caso de las bacterias y 48h a 28°C en el caso de los hongos. Luego se midieron los halos de inhibición. Los resultados fueron tabulados y analizados estadísticamente en el programa Infostat.

## **2.11 Formulación de pinturas**

Se prepararon pinturas con las TDNF siguiendo la formulación presentada en la sección 2.5.1. Las TDNF se agregaron durante el proceso de preparación de las pinturas en reemplazo de parte del pigmento carga (CaCO<sub>3</sub>) de manera tal de llegar a la concentración de Ag requerida teniendo en cuenta los resultados preliminares obtenidos. Los pigmentos, resina, aditivos y solvente acuoso fueron mezclados en una dispersora y guardados en

frascos de vidrio. Estos aditivos de base nanotecnológica se incluyeron en las pinturas a dos concentraciones diferentes 1,6 y 3,3 g de TDNF / 100 g de pintura, coincidiendo con lo estipulado para las concentraciones de biocidas en las pinturas de base acuosa.

## **2.12 Determinación de las características de las pinturas**

En cuanto a uniformidad y asentamiento, la pintura, sin diluir, se evaluó en 2 momentos, luego de la dispersión, al terminar la preparación, y a los 14 días de estacionamiento. En el momento de la recepción se espera que la pintura se diluya fácilmente con agua sin formar agregados. No debe tener costra ni grumos. Si hubiera sedimento debe ser blando y pastoso y, fácilmente reincorporable por agitación simple con espátula, si hubiera separación de vehículo, debe ser como máximo de 5% de la altura total de la pintura contenida en el envase y fácilmente reincorporable por agitación con espátula. Luego de 14 días si se hubiese formado algún sedimento este debe ser fácilmente reincorporable por agitación con espátula por un tiempo máximo de 2 horas (IRAM<sup>10</sup> 1109-A1). El aspecto de la película en húmedo no debe presentar grumos. El tiempo de secado al tacto debe ser de un máximo de 1 hora y el tiempo de secado total o secado duro debe ser de 4h como máximo (IRAM 1109-B1).

No se deben detectar olores a putrefacción, los cuales serían indicativos de contaminación y por consiguiente cambios en las propiedades de las pinturas. Tampoco se deben detectar olores irritantes o intensos tales como amoníaco, fenoles, cloro o compuestos de azufre.

La aplicabilidad se establece en función del instrumento con que se aplique ya sea pincel, rodillo o soplete sin aire que son los recomendados para este tipo de pinturas, se exige que la aplicabilidad sea “Buena” como mínimo (IRAM 1109-A X). En cuando al resultado luego de la aplicación se exige en todos los casos que el aspecto sea “Bueno” que se corresponde con una superficie uniforme (IRAM 1109-B XVIII).

### **2.12.1 Contenido de pigmento**

El contenido de dióxido de titanio se evalúa sobre el total de pintura, en pinturas blancas el contenido debe ser como mínimo de 7g/100g de pintura. Esta consideración válida tanto

---

<sup>10</sup> El Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM), una asociación civil privada sin fines de lucro con más de 85 años de trayectoria y único representante de ISO en la Argentina. <https://www.iram.org.ar>.

para pintura blanca como para otros colores mate, se tuvo en cuenta al momento de la formulación. Los contenidos de cromo, plomo y mercurio están regulados y su máximo aceptable es menor al 0,06% en masa: 0,06g/100g en el caso del plomo (IRAM 1109-A17) y 0,025% (ASTM D 3718) para el cromo y 0,005 % para el mercurio (ASTM D 3624). Los materiales no volátiles deben coincidir con la formulación con una tolerancia de 1g/100g (IRAM 1109-A8). No debe observarse el desarrollo de colonias de hongos (IRAM 1109-B25), ni contaminación por algas a simple vista en el envase (IRAM 1109-A27).

## **2.13 Ensayos normalizados específicos para las pinturas**

Existen diversos métodos de ensayos y normas específicas para caracterizar recubrimientos tanto en forma líquida o en película. Siguiendo la norma IRAM 1109, se evaluó el grado de dispersión de las muestras de pintura líquida teniendo en cuenta la finura de molienda o la presencia de partículas de mayor tamaño o aglomerados en el proceso de dispersión. Esto se midió con un grindómetro Hegman (Neurtek).

El peso específico también se determinó sobre la base de lo expresado en la norma IRAM 1109. Además, se determinó la capacidad de la pintura para ocultar, por su opacidad, el color o las diferencias de color en el fondo sobre el cual es aplicada una vez seca, esta propiedad se conoce como poder cubritivo mediante la técnica que emplea un papel dámetro.

La viscosidad fue determinada cuyos parámetros a conseguir se encuentra detallados en la norma (IRAM 1109 A13), se determinó siguiendo los lineamientos de la norma ASTM D562 mediante el uso de un viscosímetro Stormer. Además, se determinaron otros parámetros como la absorción de agua (%p/p) (IRAM 1800) y el peso específico (g/cm<sup>3</sup>) (IRAM 1109 A2).

### **2.13.1 Ensayos no específicos**

En esta norma se encuentran contemplados otros aspectos. En cuanto a criterios de estabilidad, no deben observarse agregados u otra alteración ni emanar olores irritantes o desagradables. El contenido de partículas gruesas y materia extraña aceptable es de 0,5g / 100g. Para pinturas blancas, la resistencia al amarilleo en la oscuridad también está normalizada, para pinturas blancas y colores claros se admite un máximo de 0,8 y 2 de cambio de color tras 100 h de exposición, respectivamente.

## **2.14 Envejecimiento de las pinturas**

Se siguió el mismo esquema de pintado de tres capas descrito anteriormente seguido del curado. Posteriormente se sometieron las muestras de pintura a 6 meses de envejecimiento natural. Esto consistió en una exposición a un ambiente de laboratorio con exposición con los ciclos naturales de luz (filtrada por una ventana) y oscuridad a una temperatura de 25°C.

## **2.15 Características de las películas de pintura**

En esta instancia se evaluaron las películas de pintura recién aplicadas, secadas solo durante 24 horas (nuevas) a fin de mostrar las características iniciales de las películas y ponerlas en contraste con las pinturas envejecidas, definiendo así los efectos del envejecimiento natural sobre las mismas. Se determinaron los parámetros más afectados por el proceso de envejecimiento natural y la influencia de este sobre la actividad antimicrobiana.

### **2.15.1 MEB**

Muestras de pinturas con y sin envejecimiento se observaron mediante MEB. Las películas de pintura fueron puestas sobre una cinta de carbón para su observación en condiciones de bajo vacío. Se realizaron los análisis semicuantitativos a nivel superficial mediante EDS acoplado al microscopio electrónico de barrido y se detectaron los elementos principales presentes en las pinturas.

### **2.15.2 FTIR**

Con el fin de evaluar los cambios provocados por el envejecimiento en la estructura química de los componentes de las pinturas se realizó los espectros FTIR tanto de las muestras envejecidas como las no envejecidas. Los vidrios pintados, con cada una de las muestras, se rasparon con bisturí estéril y limpio, obteniéndose fragmentos de la película. Luego, se realizó espectroscopía de FTIR por reflectancia total atenuada sobre ventana universal de ZnSe-Diamante (U-ATR), de todas las muestras. Para cada muestra, se grabó una exploración por muestra en modo de transmisión con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>. Se realizó el procesamiento para obtener las derivadas segundas utilizando el software Spectrum.

### **2.15.3 Medición de color**

Los parámetros de color de CIElab se evaluaron en pinturas secas durante su exposición a la luz solar a través de una ventana. El diagrama CIElab representa el área donde se

colocan todos los colores reales, de acuerdo con la transformación CIElab. En el centro, se coloca la luminosidad del color y el eje vertical, L, varía de 0 a 100 (blanco). Los otros dos ejes ortogonales forman el plano de cromaticidad, representado por a y b. La variación magenta-azul verde (a) y amarillo-azul (b).

$\Delta E$ , el cambio de color se calculó como:

$$\Delta E = [(L - L_s)^2 + (a - a_s)^2 + (b - b_s)^2]^{1/2}$$

siendo L, a y b los parámetros CIElab para la pintura de control y  $L_s$ ,  $a_s$  y  $b_s$ , los correspondientes para las pinturas problema.

La clasificación del cambio de color se llevó a cabo siguiendo la clave que se describe en la Tabla 2.15-1 (Deyá y Bellotti, 2017).

*Tabla 2.15-1 Clave para la clasificación de los cambios de color de películas de pintura*

<b>Cambio de color</b>	<b><math>\Delta E</math></b>
No visible	< 0,2
Muy leve	0,2-0,5
Leve	0,5-1,5
Evidente	1,5-3
Muy Evidente	3-6
Grande	6-12
Muy grande	>12

## **2.16 Ensayos antimicrobianos**

Los portaobjetos pintados fueron cortadas en cuadrados de 2.5 cm × 2.5 cm e irradiadas bajo luz germicida Philips UV (20 W), durante 30 minutos a cada lado para descontaminar la superficie antes de la prueba y evitar el crecimiento de otros microorganismos. Previamente, los vidrios que habían sido sometidos al envejecimiento natural se limpiaron con un removedor de partículas de aire comprimido para superficies sensibles (Compitt OR Delta). Luego, los vidrios pintados se colocaron en medio mínimo mineral en placas de Petri

y se inocularon con 50 µL de una suspensión de esporas ( $10^5$  esporas / mL) de cada especie fúngica, y finalmente, esta suspensión se distribuyó homogéneamente por toda la superficie pintada. Después de 1 mes, las muestras incubadas a 28 °C se evaluaron de acuerdo con la especificación estándar ASTM 1109. En esta instancia se agregó una nueva cepa fúngica *Aspergillus fumigatus* (KU936230), que puede observarse en la Figura 2.16-1, para robustecer la evaluación de las potencialidades antimicrobianas.

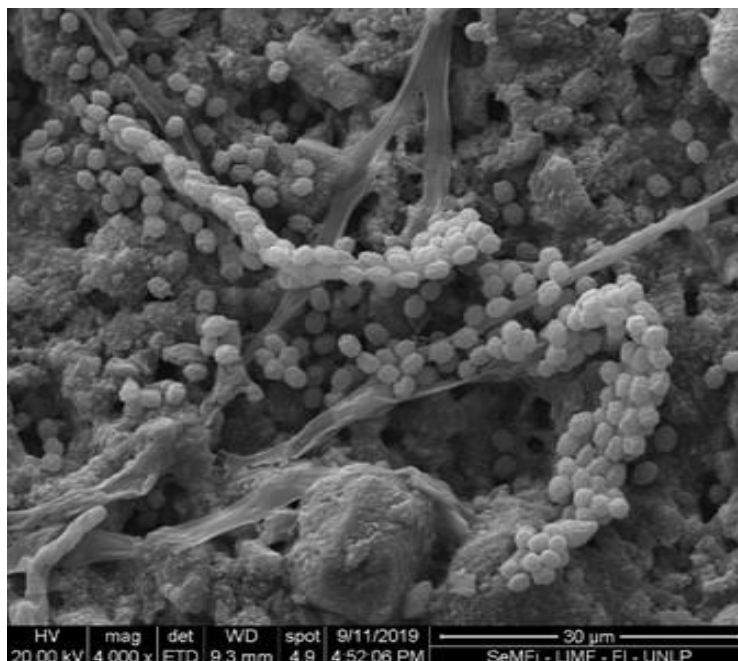


Figura 2.16-1 Micrografía electrónica de *Aspergillus fumigatus*

## 2.17 Evaluación de pinturas líquidas y estudio de biodeterioro asociado

En una primera etapa con el objetivo de aislar bacterias deteriorantes de pinturas en las condiciones de envasado se obtuvieron pinturas de interior para la evaluación de la calidad según los estándares correspondientes. Una de las pinturas utilizadas, desechada por el área de “Asesoría técnica y evaluación de pinturas y recubrimientos” del CIDEPINT, era comercial de la subsidiaria argentina de una marca internacional con signos visibles de deterioro identificada como mate lavable para interiores (PSW1) y con la etiqueta “antihongos”. Otra de las muestras de pintura utilizada en la presente investigación pertenecía a la misma marca (PSW2) y no presentaba signos visibles de deterioro. También se usó una pintura basada en (PC), pero sin el agregado de BP15 que actuaba como biocida



en lata, esta pintura control, por tanto, no contenía ningún biocida. La PC, fue inoculada con *Pseudomonas aeruginosa* donada por la cátedra de microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, con un inóculo de  $10^9$  UFC aproximadamente, e incubada a  $30^\circ\text{C}$  durante 30 días, con el fin de propiciar el biodeterioro. Para comprobar el crecimiento de la cepa en la pintura, pasados 7 días se inoculó una asada en forma de estría en medio TSA

### **2.17.1 Observaciones a ojo desnudo**

Se tomaron muestras de las pinturas y se realizaron varias observaciones en busca de indicadores de pérdida de calidad, coincidentes con signos de biodeterioro como crecimiento microbiano en forma de *biofilm*, acumulación de gases, olores putrefactos, decoloración y cambios visibles en la viscosidad de las pinturas, según lo especificado por el libro "*Industrial Biocides Selection and Application*" publicado por "*Royal Society of Chemistry*" en 2002.

Se midió el pH del vehículo de las pinturas PSW1, PSW2 y PC, con el fin de determinar cambios significativos mayores a 1 punto de pH. Para ello se usaron cintas indicadoras MColorHast (Merck), tras 48 h y 14 días de estacionamiento. La operación se realizó por duplicado.

### **2.17.2 Evaluación de la estabilidad de las pinturas**

Se midió la separación de los componentes de la pintura y se clasificó la estabilidad de la pintura siguiendo los criterios de la norma IRAM 1109. Para ello se pusieron 40 mL de las muestras PSW1, PSW2 y PC (inoculada con *P. aeruginosa*), en tubos (Cornin) de 50 mL. Luego de 48 horas en condiciones de Temperatura y Presión Estándar Ambiente (TPEA) según lo definido por la Agencia de Protección Ambiental<sup>11</sup> (EPA) y pasados 14 días se evaluó la separación del vehículo, la misma se midió con la graduación de los propios tubos. Según la norma, en una pintura que cumple con los estándares de calidad, la separación debe ser como máximo de 5% de la altura total de la pintura contenida en el envase.

---

<sup>11</sup> La Agencia de Protección Ambiental (EPA) es una agencia ejecutiva independiente del gobierno Federal de los Estados Unidos encargada de asuntos de protección ambiental. En este trabajo ante la falta de consenso en este sentido, adoptamos las condiciones de TPEA como  $25^\circ\text{C}$  de temperatura y 1 atm de presión.

## **2.18 Obtención de los aislados bacterianos**

### **2.18.1 Aislamiento**

Para realizar el aislamiento se usó el medio de cultivo deshidratado, Tripteína Soya Caldo (TSC) comercializado por la empresa Britania para uso profesional. Los ingredientes para 1000 mL son: tripteína 17 g, peptona de soya 3 g, NaCl 5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g y glucosa 2,5 g, suplementado con agar bacteriológico (TSA). Se preparó un segundo medio de cultivo, TSA suplementado con Cetrimida (Anedra) a razón de 0,3 g por cada 1000 mL y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, siguiendo lo recomendado por ATCC para el cultivo de varias cepas de *Pseudomona aeruginosa*. Los medios de cultivo se prepararon a 25°C y pH=7,3 ± 0,2 y se esterilizaron a 121°C por 15 minutos siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para el aislamiento se emplearon dos estrategias diferentes de siembra. En la primera se mezclaron 5 mL de pintura con 10 mL de cada uno de los medios a 40°C y se vertieron directamente en las placas de Petri de 9 cm (Massobact). En la segunda, se realizaron estrías sobre los medios vertidos en las placas y solidificados previamente. Todas las placas se incubaron a 30°C en una estufa de precisión (SAN JOR) donde se realizaron todas las incubaciones de este capítulo, por periodos desde 48 horas hasta 7 días. Todos los procedimientos se realizaron por triplicado.

Se describieron las colonias y se identificaron los diferentes aislados teniendo en cuenta las características culturales y las diferencias y similitudes encontradas en este aspecto. Pasado el periodo de incubación definido, se procedió al aislamiento de las más importantes teniendo en cuenta su presencia relativa de aparición. Las colonias con mayor frecuencia de aparición se inocularon en los medios de cultivo mediante siembra por agotamiento, luego se incubaron durante 24 horas a 30°C.

### **2.18.2 Pruebas bioquímicas y culturales**

Los aislados se incubaron en estufa en medio TSC a 30°C grados durante 24 horas. A partir de esto se procedió a su identificación según lo sugerido en el Manual de Bergey de Sistemática Bacteriana. Para ello se realizó la tinción de Gram usando el Kit para Gram (Britania). Se prepararon extendidos sobre portaobjetos de vidrio y se cubrieron con solución de cristal violeta dejando actuar 20 segundos. Se lavó con agua y se cubrió con lugol dejando actuar durante 30 segundos. Tras un nuevo lavado se aplicó decolorante durante 10 segundos y se cubrió con safranina, la cual se retiró por lavado pasados los 30 segundos. Para finalizar se dejó secar el extendido teñido a temperatura ambiente y

posteriormente se observó al en microscopio óptico (Dialux 20 Leitz) con un aumento de 1000x con aceite de inmersión. Al observarse células bacterianas teñidas de violeta, se consideran microorganismos Gram positivos y si la coloración es cercana al color rosa se consideran Gram negativos.

Se realizó la tinción de Schaeffer-Fulton utilizando verde de malaquita (Cicarelli) como colorante para las endosporas y safranina (Britania) como colorante de contraste para las bacterias. Se hizo un extendido que se fijó con calor a la llama del mechero, posteriormente se cubrió con papel de filtro y se calentó en baño de agua a 80°C. Mientras se aplicó por goteo solución de verde de malaquita. Pasados 8 minutos se retiró el portaobjetos y el papel de filtro, se enjuagó con abundante agua y se escurrió. Una vez seco se tiñó con safranina durante 1 minuto. Para finalizar se dejó secar el extendido teñido a temperatura ambiente. Posteriormente se observó al microscopio con un aumento de 1000x con aceite de inmersión. Las endosporas bacterianas se observarán como estructuras teñidas de verde, más pequeñas que los bacilos teñidos de rosa, ya sea dentro o fuera de estos.

Paralelamente se realizó la prueba de la oxidasa usando discos para Oxidasa (Britania) impregnados con el sustrato Oxalato de dimetil-para-fenilendiamina. Se obtuvo un inóculo en agua destilada estéril de  $10^7$  UFC aproximadamente a partir de un cultivo puro del microorganismo y se embebieron los discos correspondientes. Se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente se leyeron los resultados, la observación de color rosado a fucsia en el disco y/o solución indica que el microorganismo presenta la enzima oxidasa activa y si el disco no exhibe cambios de coloración se considera oxidasa negativa.

### **2.18.3 Análisis por técnicas moleculares**

Se realizó la secuenciación del segmento de ADN que codifica para la región 16S del ARNr bacteriano mediante secuenciación de Sanger a través de la Empresa Macrogen Argentina. Para ello se realizó la contratación del servicio de "16S *rRNA sequencing*". Se extrajo el gDNA se amplificó la secuencia específica de interés y se realizó la secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el buscador Blast usando la base de datos del GenBank<sup>12</sup> para aproximar la identificación a los análogos más cercanos

---

<sup>12</sup> GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)) es una colección de todas las secuencias de ADN disponibles públicamente. Está diseñada para proporcionar y fomentar el acceso dentro de la comunidad científica a la información de secuencias de ADN más actualizada y completa. GenBank

(Vaishampayan et al., 2010). Los análisis evolutivos se realizaron mediante el programa MEGA X 11.0.10®. El cual consiste en un árbol filogenético, comparando las secuencias encontradas en este trabajo con la de otras 10 cepas que se describen en la tabla 2.17-1 cuya información genética fue extraídas de la base de datos de libre acceso de Gen Bank.

#### **2.18.4 Observaciones por microscopía electrónica de barrido**

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la morfología bacteriana luego del aislamiento se realizaron observaciones mediante MEB. Además, se exploró la capacidad de crecimiento y formación de biopelícula sobre una película de pintura. Se pintaron portaobjetos con PC y se dejaron curar durante dos semanas. Se cortaron muestras de 1cm de lado. Después de eso, se descontaminaron durante 30 minutos en cada lado mediante irradiación con una lámpara UVC germicida (Philips, 20 W). Se introdujeron las muestras en forma verticalmente en placas multipocillos. Estas placas para cultivo de 24 pocillos (Ultra Cruz) fueron inoculadas con 1,5 mL de una suspensión bacteriana e incubadas durante 8 horas a 37°C sin agitación.

El medio utilizado fue LB y la suspensión bacteriana se obtuvo a partir de un cultivo de 24 horas, de una densidad óptica igual a 0,1 a 600 nm. Luego de esta etapa de incubación, se retiró cuidadosamente la suspensión de bacterias y se agregó medio fresco, comenzando la incubación en agitación moderada (125 rpm), durante 96 h, pasadas las primeras 48 h, el medio de cultivo fue removido y reemplazado por medio fresco periódicamente cada 24 h Finalmente, las muestras se retiraron y lavaron, tres veces, con solución tampón de fosfato (PBS) para separar las células no adheridas. Se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2,5% v/v en PBS y se secaron en un gradiente de etanol. Finalmente, se realizó la pulverización catódica con oro y las muestras se observaron en MEB, esta vez en modo de alto vacío.

#### **2.18.5 Conservación**

La conservación de las cepas se realizó por el método de congelación empleando glicerol al 20% como agente crío-preservante. En primer lugar, el inóculo se llevó a un tubo que

---

es parte de la Colaboración Internacional de Bases de Datos de Secuencias de Nucleótidos , que comprende el Banco de datos de ADN de Japón (DDBJ), el Archivo europeo de nucleótidos (ENA) y GenBank del Centro Nacional para la Información en biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés).

contenía 15 mL de TSC y se incubó durante un periodo de 18h a 30°C y luego se añadió el glicerol. Este procedimiento se realizó por triplicado y los tubos se almacenaron en freezer a -18°C. Se evaluó el porcentaje de sobrevivencia pasados los 90 días.

### **2.18.6 Aplicación de la norma ASTM D2574 para la evaluación de la eficiencia de productos antimicrobianos**

#### 2.18.6.1 Selección de pinturas

Con el objetivo de evaluar la eficiencia como antimicrobiano de los nanomateriales obtenidos en la etapa previa, en primer lugar, se realizó la puesta a punto de la norma ASTM D2574 con las cepas con las que se contaba y las pinturas seleccionadas. Para realizar este procedimiento contó con cinco pinturas: PSW2, PST1, PTD2, PTDNF y PC. Las primeras dos eran comerciales y las últimas tres fueron preparadas en el CIDEPINT a partir de la composición base PC.

- ✓ PSW2, es una pintura látex comercial cuya ficha técnica le atribuye alta calidad, es especialmente formulada para cielorrasos, usada en el presente estudio. La misma se caracteriza por contener resinas en dispersión acuosa y pigmentos seleccionados para lograr un acabado de impecable blancura y excelente adherencia. Sus aditivos de alta efectividad les confieren una gran resistencia a los hongos, según las especificaciones del fabricante.
- ✓ PST1, es un látex mate comercial de uso interior al cual se le atribuye en su ficha técnica un alto poder cubritivo, fácil aplicación y mínimo salpicado.
- ✓ P1,6TD2, esta pintura fue preparada según la composición presentada en este Capítulo con el agregado de TD2 y sin ningún preservante (1,6% g/100g de pintura) como control.
- ✓ P1,6TD2NA5E, fue preparada con la formulación de base mencionada antes, pero en este caso con el agregado de la TDNF. La pintura llevaba 2 años envasada en oscuridad antes del ensayo y contiene BP15 como preservante (1,6% g/100g de pintura).
- ✓ PC, similar a las anteriores, pero sin agregado de TDs que contenía elevada concentración de amina cuaternaria como único biocida con acción en envase, prevista como control positivo de actividad.

Las pinturas preparadas en el CIDEPINT habían permanecido un período prolongado (30 meses) en envases de vidrio en condiciones TPEA, protegidas de la luz. También contenían un aditivo orgánico preservante comercial para el envase BP15.

#### **2.18.7 Cepas Bacterianas**

Las cepas seleccionadas fueron, un aislado obtenido como parte del presente trabajo de tesis y la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* donada por la cátedra de microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas para la realización de este trabajo. Cabe destacar que la *P. aeruginosa* es una especie bacteriana recomendada por la norma ASTM D2574 para la evaluación de la resistencia antimicrobiana de pintura líquida.

#### **2.18.8 Subcultivo en pintura control**

Previa a la aplicación de la norma (ASTM D 2574) se debía constatar el adecuado crecimiento de las cepas que se utilizarían como indicadores de biodeterioro en una pintura similar a las incluidas en el ensayo, por lo tanto, se prepararon subcultivos con la pintura PC sin ningún tipo de biocida inoculados con una dilución 1/10 de una suspensión de DO (600nm) = 0,1 de las cepas correspondientes en tubos (Corning) de 50 ml. Se incubaron a 30°C con el fin de adaptar las bacterias a la base de las pinturas y determinar el porcentaje de supervivencia en este medio. El mismo se calculó a tiempos de incubación de 7 días y 14 días teniendo en cuenta la duración del ensayo descrito por la norma.

#### **2.18.9 Precultivos**

Ambas cepas bacterianas se incubaron durante 24 horas a 30°C en medio TSC. Pasado este tiempo se midió la DO (600) y se llevó a 0,1 diluyendo con medio de cultivo en los casos que fue necesario. La concentración fue evaluada por el método de recuento en placa.

#### **2.18.10 Ensayo en placa de 24 pocillos**

El ensayo se realizó en placas de cultivo estériles de 24 pocillos con fondo plano (EmbioTec). En cada pocillo se introdujeron 200 µL de inóculo en 2 g de pintura, para lograr aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/g de concentración final.

Pasado el período de incubación, se hicieron estrías en placas de Petri con medio TSA y se sembraron también 100 µL de cada pintura con espátula de Drigalski, en ambos casos por triplicado. Todas las placas se incubaron durante 48 horas a 30°C. Pasado este tiempo se contaron las colonias en placas y se tabularon los resultados. En los casos en que no

fue posible contar con las colonias (UFC>300) se hicieron diluciones seriadas de las pinturas en cuestión y se calcularon las concentraciones iniciales a partir de los valores obtenidos.

Para poner a prueba la eficacia de las pinturas, que aun mostraban resistencia al crecimiento microbiano, se prepararon nuevamente ambos inóculos bacterianos y se repitió la inoculación teniendo en cuenta los nuevos volúmenes, producto de las extracciones anteriores. Se repitió el período de incubación por 7 días y posteriormente se repitieron las siembras tal y como se mencionó antes.

## **2.19 Evaluación de TDNF como antimicrobianos para pintura líquida**

### **2.19.1 Selección de pinturas y microorganismos**

En esta instancia, se trabajó solo con un aislado propio obtenido a partir del procedimiento descrito en el inciso 2.17, con el fin de demostrar la eficacia de las TD como únicos agregados antimicrobianos para prevenir el biodeterioro de la pintura en el envase. Para ello se prepararon las pinturas con 1,6% g de TDNF / 100g de pintura sin otro antimicrobiano en la formulación. Posteriormente se aplicó la norma ASTM D 2574 siguiendo el procedimiento detallado previamente.

### **2.19.2 Procedimiento**

El ensayo se realizó en frascos ámbar de vidrio de 15 mL estériles, con el objetivo de poder aumentar la cantidad de muestra de pintura a evaluar. Se repartieron las pinturas en cada uno de estos frascos ocupando 4 frascos por cada pintura. Las muestras fueron inoculadas con el aislado obtenido hasta alcanzar una concentración final de  $10^6$  UFC/mL, según lo sugerido por la norma. El contenido de los frascos se mezcló por agitación con vórtex y los mismos se incubaron durante 7 días a 30°C.

### **2.19.3 Lectura, procesamiento e interpretación de los resultados**

Se realizaron dos tipos de lectura de los datos. En el primero, el sistema de evaluación se basa en el número de colonias observado en la estría, realizada en la placa, que es el recomendado por la norma. Los grados de biodeterioro de las pinturas, se clasifican en una escala del 0 al 4 donde 0 es una pintura sin crecimiento microbiológico y 4 se considera una pintura con un alto grado de crecimiento bacteriano y, por lo tanto, biodeteriorada. El grado de contaminación se clasificó según la clave de la norma ASTM D2574-00 como se muestra en la Tabla 2.19-1. Los casos en que se observa crecimiento continuo de

microorganismos sobre la estría donde no logran distinguirse las colonias, se consideran de contaminación abundante (D2574-00 ASTM, 2020)

*Tabla 2.19-1 Grados de contaminación bacteriana en pinturas*

<b>Crecimiento bacteriano</b>	<b>Colonias</b>	<b>Clave numérica</b>
No contaminada	0	0
Con restos de contaminación	1-3	1
Contaminación ligera	4-10	2
Contaminación moderada	>10	3
Contaminación abundante	Incontable	4

Por otro lado, se tuvieron en cuenta los resultados del recuento en placa para determinar los porcentajes de inhibición y para comparar la eficiencia antibacteriana que presentaban las pinturas con las distintas TDNF.



## **Capítulo 3 – Síntesis verde de nanopartículas de plata**

### 3.1 Material vegetal y caracterización de los extractos

Las muestras de cada uno de los especímenes seleccionados luego del proceso de secado pueden observarse en la Figura 3.1-1. Cada espécimen fue rotulado con una letra como se muestra en el pie de cada imagen: *Schinus molle* (A), *Cecropia pachystachya* Trécul (B), *Equisetum giganteum* L. (E), *Cassia angustifolia* (H), *Senna occidentalis* (N) y *Ilex paraguariensis* (Y). El mismo rotulado fue utilizado para los extractos acuosos obtenidos a partir las muestras vegetales correspondientes.



Figura 3.1-1 Muestras de las especies vegetales, oobservese al pie el rotulado correspondiente: *Schinus molle* (A), *Cecropia pachystachya* Trécul (B), *Equisetum giganteum* L. (E), *Cassia angustifolia* (H), *Senna occidentalis* (N) y *Ilex paraguariensis* (Y).

#### 3.1.1 Componentes fitoquímicos, cuantificación de polifenoles totales y FTIR

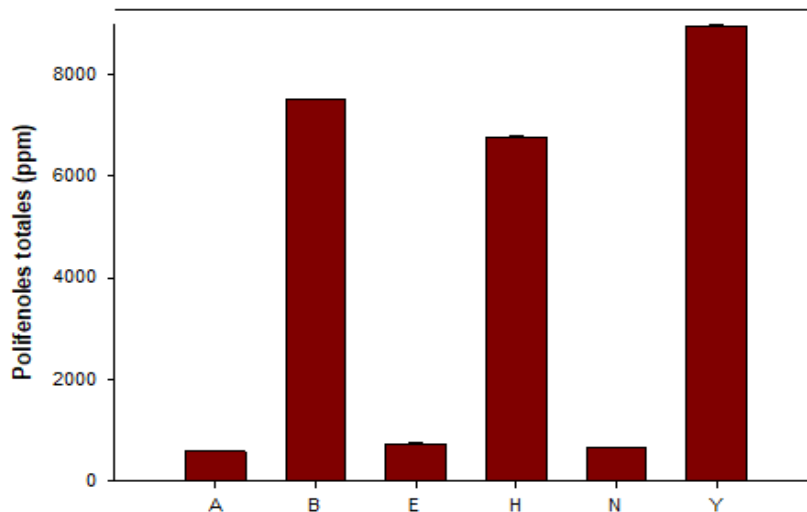
La Tabla 3.1-1 muestra los resultados obtenidos a partir de los ensayos cualitativos para detectar la presencia de los componentes fitoquímicos frecuentes que pueden estar

relacionados con los procesos de síntesis y estabilización de las nanopartículas. El signo + representa la presencia del compuesto evaluado en cada extracto.

*Tabla 3.1-1 Compuestos fitoquímicos presentes en cada extracto.*

Extracto	A	B	E	H	N	Y
Alcaloides	+	+	+	+	+	+
Fitosteroles	+	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+
Glúcidos	+	+	+	+	+	+
Polifenoles	+	+	+	+	+	+
Proteínas	+	+	+	+	+	+

Se logró determinar la presencia de cada uno de los componentes evaluados en todos los extractos vegetales usados en este trabajo. Además, se determinó la cantidad de polifenoles totales (PT) presentes en cada extracto vegetal mediante espectroscopía UV-vis utilizando el reactivo de Folin-Denis. Las concentraciones de PT correspondientes se muestran en el gráfico de barras de la Figura 3.1-2, representadas en partes por millón (ppm).



*Figura 3.1-2 Polifenoles totales determinados en los extractos vegetales acuosos (A, B, E, H, N y Y).*

Como puede observarse los extractos A, E y N presentaron una marcada diferencia en relación con B, H y Y, siendo los tres últimos los que presentaron concentraciones de pt 10 veces mayores en comparación a los tres primeros. Se destaca el extracto de Yerba mate (Y) por poseer la mayor cantidad de PT (8970 ppm) y, con menores cantidades lo siguen, B y H con 7502 y 6779 ppm, respectivamente. Los tres extractos con menor contenido de PT fueron A, N y E en orden ascendente con 584, 654 y 733 ppm, respectivamente.

A partir del contenido sólido de los extractos puros, se realizó la espectroscopía FTIR cuyos resultados se muestran en la Figura 3.1-3.

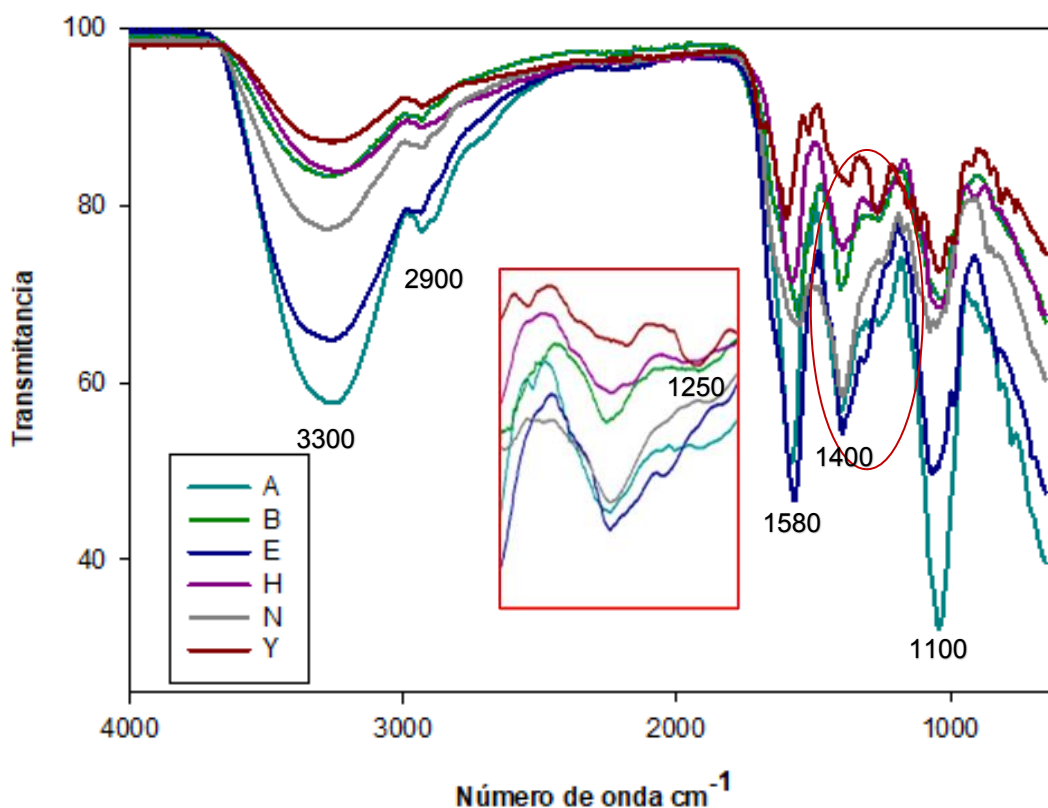


Figura 3.1-3 Espectrometría FTIR del contenido sólido de los extractos vegetales. El recuadro muestra la región entre 2500-1250  $\text{cm}^{-1}$  con mayor resolución haciendo énfasis en A2Y.

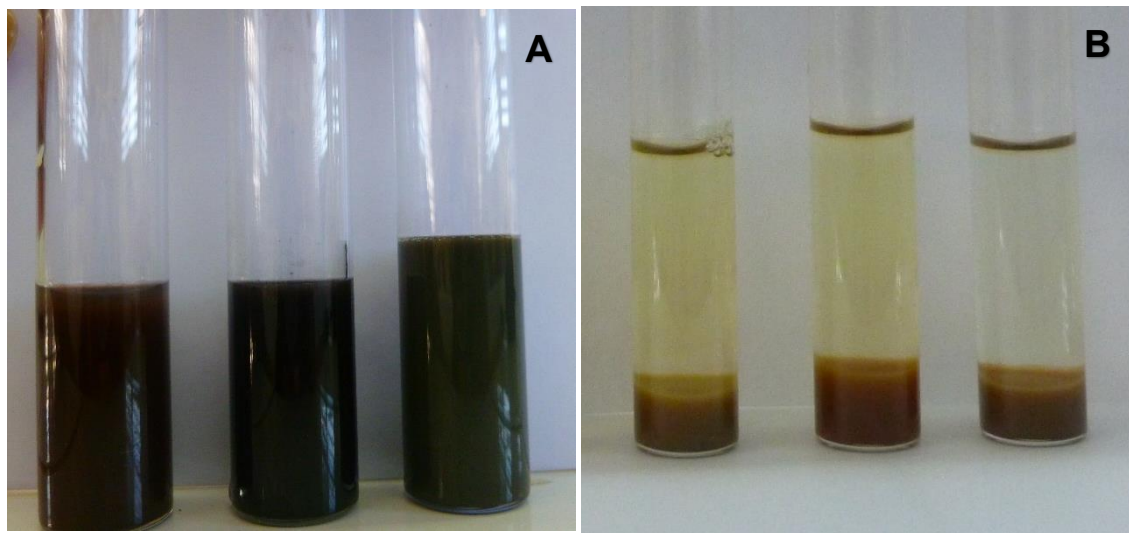
En los espectros correspondientes se observan 5 picos comunes a todos los extractos. El primero se presenta alrededor de 1100  $\text{cm}^{-1}$ , es pronunciado y resuelto en todos los extractos sobre todo en A y E y puede corresponderse con alcoholes secundarios o terciarios (Cooper, 1982). El segundo pico marcado se encuentra sobre los 1400  $\text{cm}^{-1}$ , en esta región todos los picos están muy bien definidos y coincidentes y, se pueden corresponder con vibraciones de grupos  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ , mostrando una mayor intensidad en el caso de A, E y N. La tercera región del espectro común a todos los extractos se encuentra en 1580  $\text{cm}^{-1}$  y puede vincularse con los grupos carbonilos presentes en ésteres, amidas y ácidos, en este caso también se destacan A y E por la alta intensidad y resolución de los picos. El cuarto pico es muy pequeño, pero se encuentra presente en todos los extractos, este se localiza sobre los 2900  $\text{cm}^{-1}$  de número de onda y puede corresponder a los estiramientos simétricos del  $-\text{CH}_2-$ . Por último, se encuentra el más amplio de todos correspondiente a la banda de estiramiento del grupo O-H, todos los extractos lo presentan

entre los 3000 y 3600  $\text{cm}^{-1}$ , siendo más intensa sobre los 3300  $\text{cm}^{-1}$  (L. Barberia-Roque et al., 2019a). Cabe destacar que el extracto de yerba mate mostró diferencias con el resto. En tal sentido, muestra un pico definido que se señala en el detalle de la Figura 3.1-3, en 1250  $\text{cm}^{-1}$ , el cual puede estar vinculado con aminas aromáticas (Cooper, 1982). Es el único de todos los extractos que muestra este comportamiento, además se destaca la menor transmitancia, en todas las regiones de frecuencias destacadas descritas anteriormente.

### **3.2 Síntesis de las nanopartículas**

Durante el proceso de síntesis se estudió la incidencia de algunos factores para determinar las condiciones óptimas para la síntesis de las nanopartículas. Uno de ellos fue el pH. Los extractos vegetales, al momento de la síntesis tenían un pH ácido de entre 4 y 5, una de las dos alternativas probadas fue realizar la síntesis poniendo en contacto la solución acuosa del  $\text{AgNO}_3$  con los extractos sin regular el pH en ningún momento y la otra probar alcalinizar el medio para llegar a un el pH final igual a 7, utilizando solución de hidróxido de sodio (0,01% p/v). Por otro lado, teniendo en cuenta que el fin último de las nanopartículas sintetizadas en este trabajo, es ser utilizadas como potenciales biocidas para la formulación de pinturas en base acuosa, se trató de obtener una suspensión acuosa de nanopartículas estables lo más concentrada posible. Para ello se probarían 3 concentraciones de nitrato de plata al momento de las síntesis:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  M, todas las partículas obtenidas a partir de  $10^{-1}$  precipitaron en menos de 24 horas después de la síntesis. Al probar con la solución de  $10^{-2}$  M se obtuvo la estabilidad deseada, por lo que no resultó necesario probar con la concentración de orden menor.

Los intentos de síntesis sin la regulación del pH, así como también, con la concentración más elevada de la sal de plata se muestran en la Figura 3.2 1. En ambos casos los sistemas obtenidos resultaron inestables en las primeras 24 horas luego de la síntesis.



*Figura 3.2-1 Sistemas inestables obtenidos luego de la síntesis. A: sintetizadas sin regular el pH y B: partículas precipitadas al utilizar la concentración  $10^{-1}M$  de  $AgNO_3$ .*

A partir de estos resultados, se seleccionaron las condiciones de síntesis que incluían  $pH=7$  y concentración de  $AgNO_3$   $10^{-2} M$ , para la síntesis con cada uno de los extractos vegetales. El tiempo de síntesis se había establecido en 30 minutos con una temperatura de  $60^{\circ}C$ , basados en trabajos previos (Bellotti et al., 2015; Deyá and Bellotti, 2017).

En esta instancia se estableció, la siguiente nomenclatura para las nanopartículas: la primera letra corresponde a A proveniente del símbolo del elemento plata (Ag) el segundo término, el número 2 hace alusión a la concentración de nitrato de plata empleada en la síntesis y el tercer término es una letra que hace alusión al nombre del extracto de origen. Por ejemplo, las nanopartículas obtenidas a partir de  $AgNO_3$   $10^{-2} M$  y el extracto de yerba mate se pasaron a nombrar como A2Y. Registros fotográficos de las suspensiones obtenidas bajo estas condiciones, así como, la nomenclatura establecida se presenta en la Figura 3.2-2. En esta Figura se puede observar la apariencia típica presentada por suspensiones de nanopartículas de plata obtenidas a partir de extractos vegetales y descrita previamente por otros autores (Bharathi et al., 2018; Jalab et al., 2021).



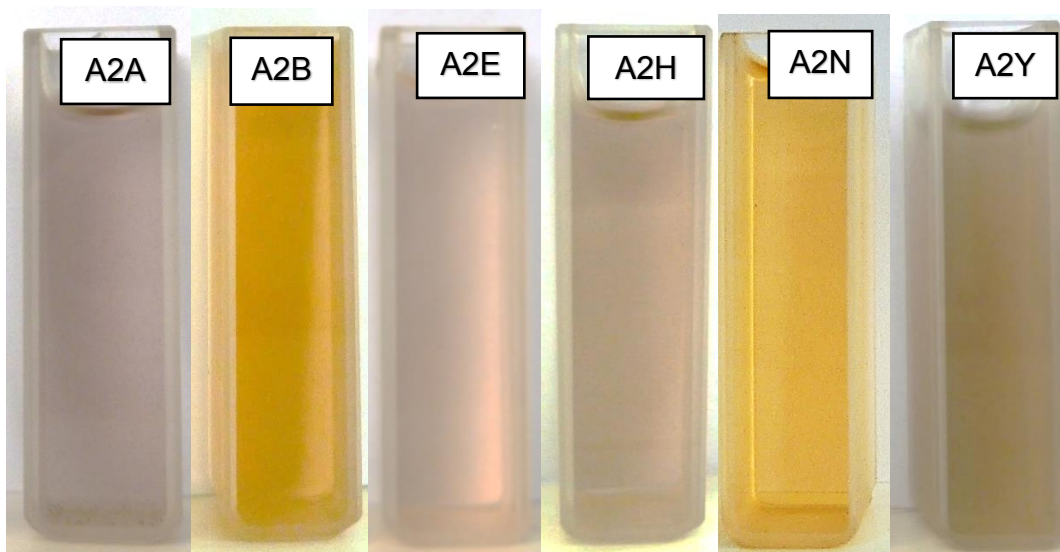


Figura 3.2-2 Suspensiones obtenidas a partir de la síntesis con solución  $10^{-2}M$  de  $AgNO_3$  (A2) y los extractos vegetales correspondientes: *Schinus molle* (A), *Cecropia pachystachya* Trécul (B), *Equisetum giganteum* L. (E), *Cassia angustifolia* (H), *Senna occidentalis* (N) y *Ilex paraguariensis* (Y).

Obsérvese en la Figura 3.2-2, el aspecto homogéneo sin formación de precipitado que indica la estabilidad del sistema con partículas de menor tamaño, así como, el color ambar en distintas tonalidades muy frecuente en este tipo de sistemas.

### 3.3 Caracterización de las nanopartículas

Para confirmar la obtención de las nanopartículas, se utilizó en primer lugar espectrofotometría UV visible pasadas las 24 h de síntesis. En caso de estar en presencia de las nanopartículas de Ag se evidencia la aparición de una banda en el UV-vis característica (banda plasmónica) con un máximo de absorción entre 400 y 450 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.3-1. Además, mediante este método se realizó un seguimiento de la estabilidad de las nanopartículas en suspensión en el tiempo durante 6 meses, estos datos posteriormente aportarían a la determinación del momento óptimo para su uso. En todos los espectros obtenidos se detectó la banda plasmónica correspondiente con la presencia de las nanopartículas de Ag. Con el tiempo, las nanopartículas en suspensión tienden a agregarse, dando lugar a partículas de mayor tamaño ensanchando la banda de absorción. Este comportamiento se observó mayormente a partir de los 120 días. En el caso de A2Y luego de los 90 días el sistema resultó inestable,



debido a esto la medición a los 120 días no se pudo realizar puesto que las partículas se habían agregado y precipitado tal como se muestra en la Figura 3.3-2.

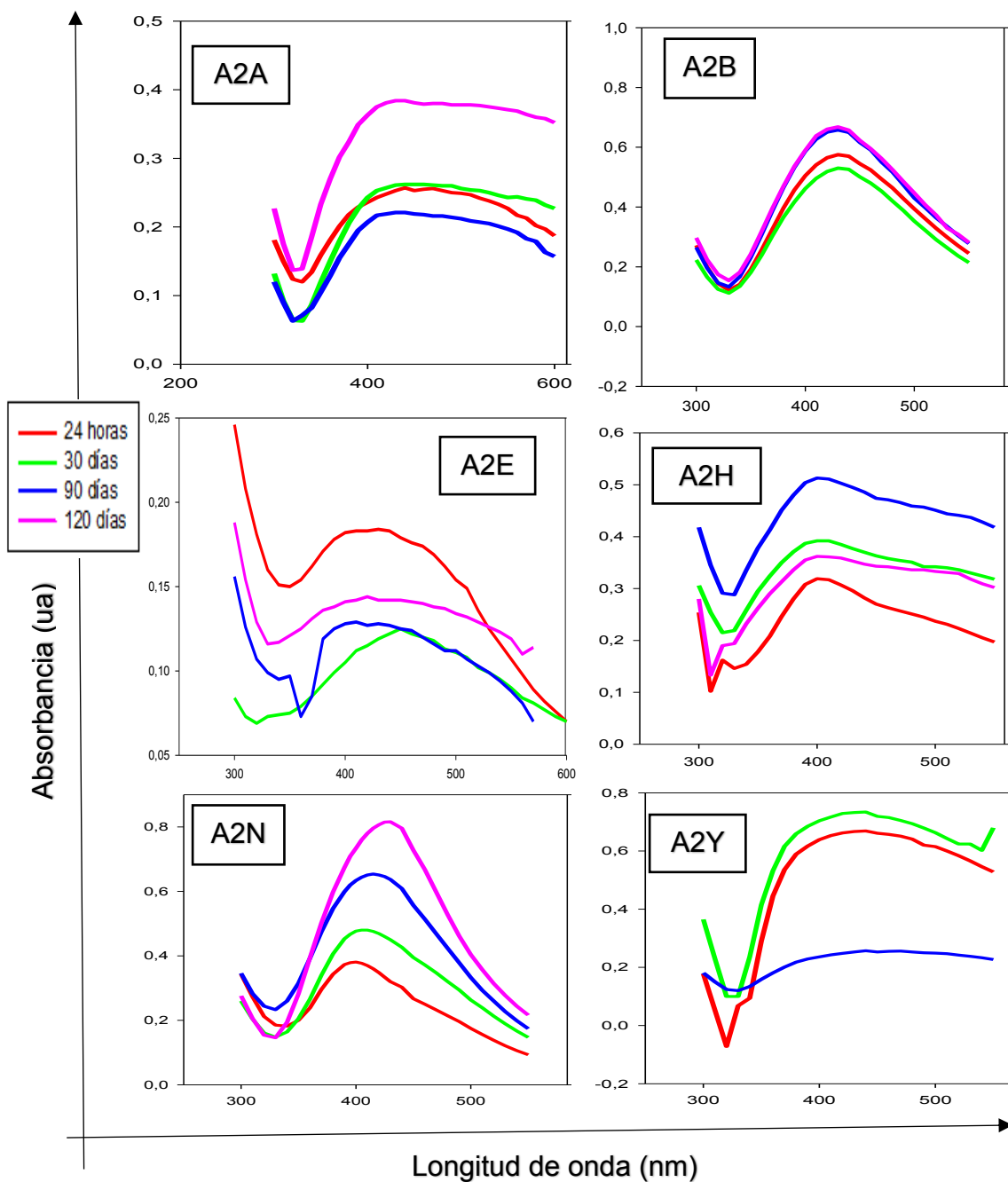
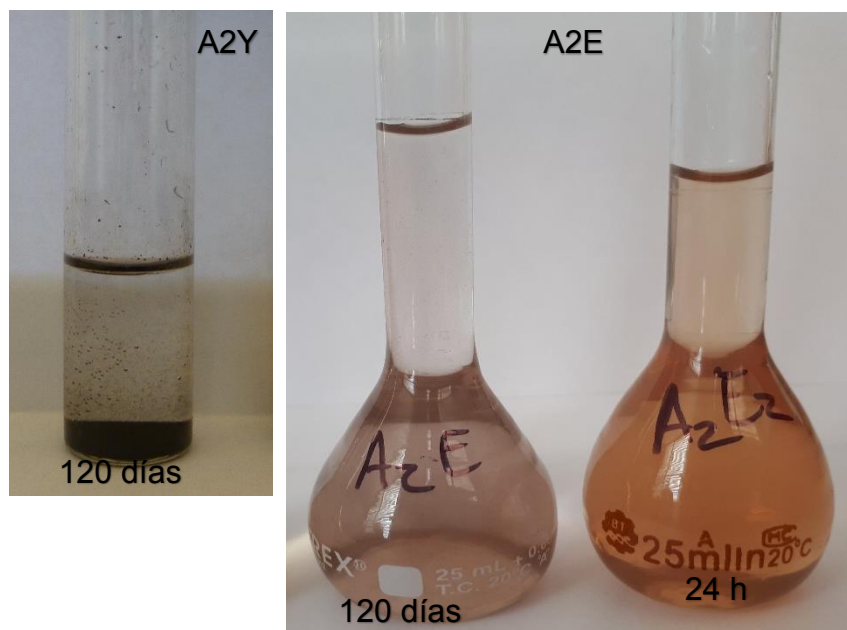


Figura 3.3-1 Espectros UV visibles de las soluciones de nanopartículas obtenidas. Seguimiento realizado durante 6 meses.

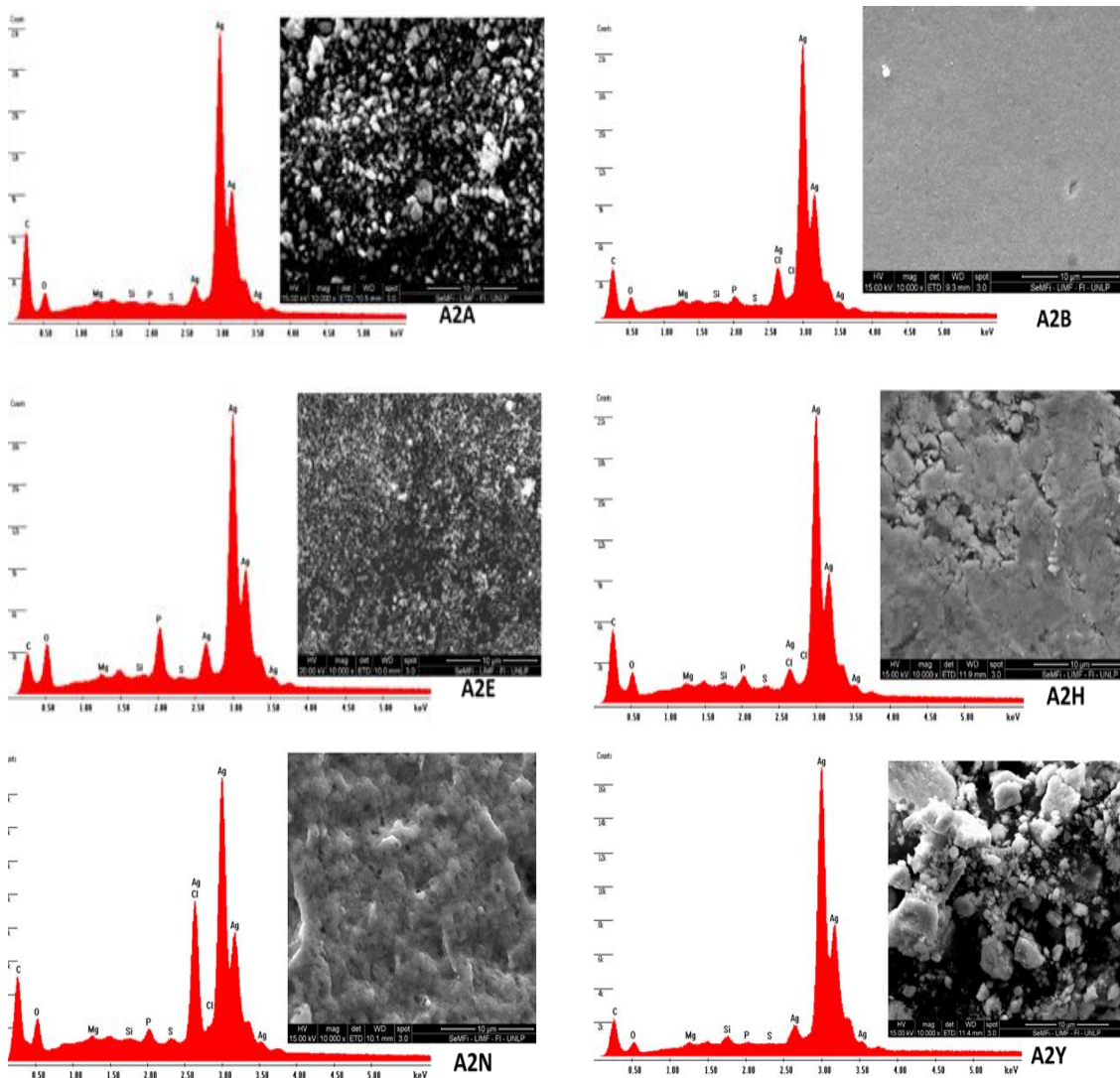
En la Figura 3.3-2 también se observa un cambio de color presumiblemente asociado a la oxidación de las partículas de plata. También en la misma Figura se muestra el aspecto de la suspensión de A2E a las 24 y 120 horas con un leve cambio en la tonalidad de esta, resultado similares presentaron el resto de las suspensiones A2A, A2B, A2H y A2N.



*Figura 3.3-2 Imágenes de las soluciones de nanopartículas A2Y a los 120 días de síntesis, nótese la formación de precipitado, y A2E pasados 120 días y 24 horas.*

Si bien las bandas en el espectro UV-vis brindan evidencias en relación con la presencia de las nanopartículas de plata, esta evidencia fue ampliada mediante observaciones por MEB de las partículas una vez purificadas, que se muestran en las Figuras 3.3-3. Además, se realizó un análisis superficial mediante EDS que se muestra junto a cada micrografía. En todos los casos se evidenció una fuerte señal correspondiente a la plata. Con el método empleado, no se lograron establecer diferencias entre estas señales procedentes de cada una de las nanopartículas. En el caso de la muestra A2Y se puede observar la heterogeneidad de partículas obtenidas a partir de yerba mate, seguidas por A2A, donde también se observó mayor heterogeneidad, en contraste con el resto, las cuales se muestran relativamente homogéneas. En este sentido, destacan A2B y A2N, seguidas de A2E y A2H.

Como es conocido tanto la forma como el tamaño inciden sobre sus potencialidades antimicrobianas de las nanopartículas (Ginjupalli et al., 2018).

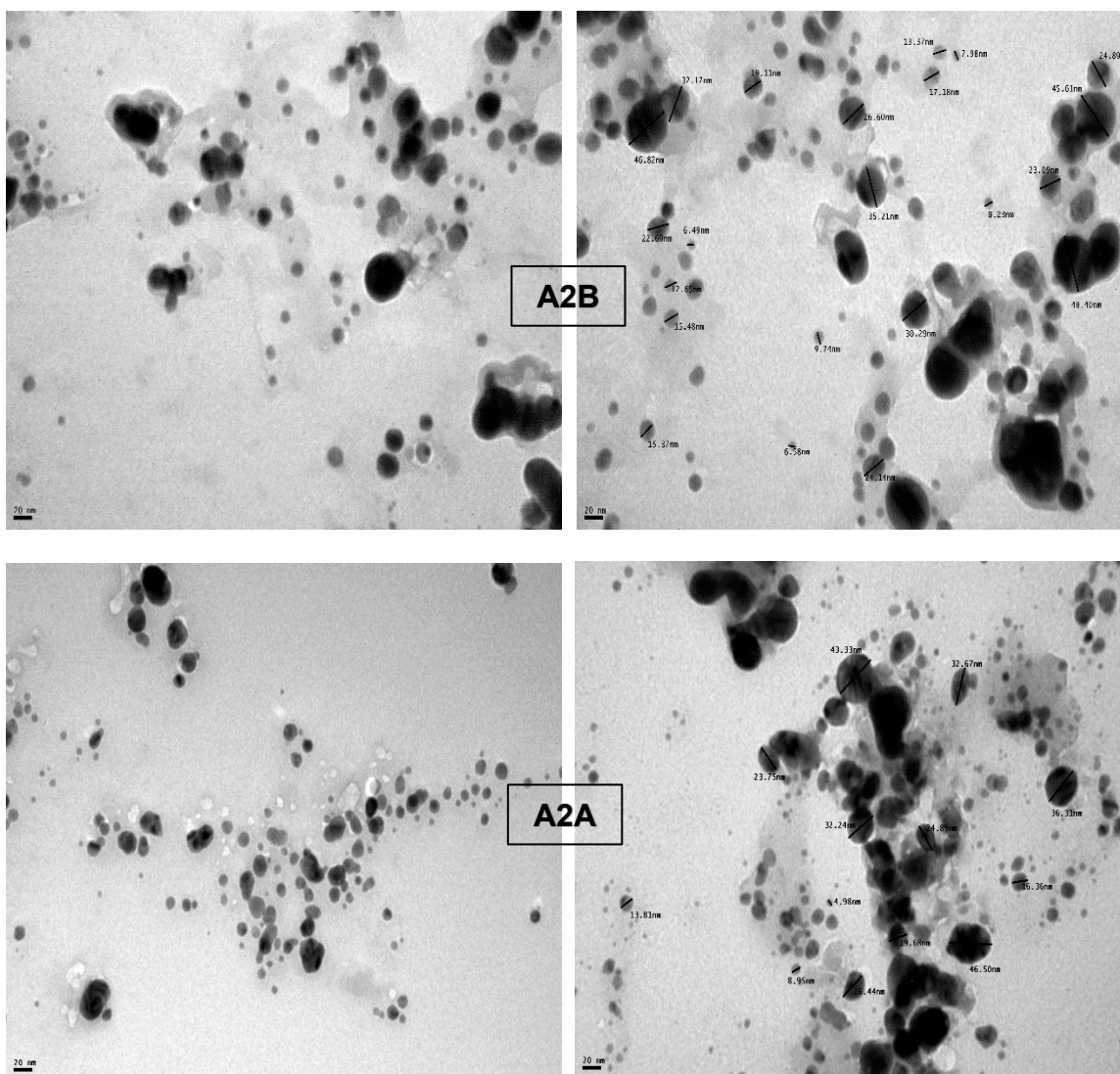


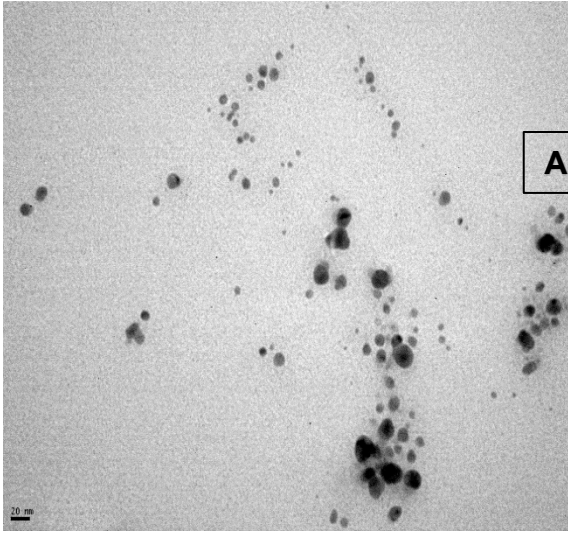
*Figura 3.3-3 Microfotografías MEB y espectros EDS de: A2A, A2B, A2E, A2H, A2N y A2Y.*

Para analizar la forma y los tamaños de las nanopartículas sintetizadas, se obtuvieron imágenes de MET, de cada una de ellas como las que se muestran en la Figura 3.3-4. A partir de lo observado en las micrografías se pudo determinar que las nanopartículas obtenidas generalmente presentaban forma cuasi esférica. Solo en las nanopartículas obtenidas a partir de A2Y se pueden observar formas cilíndricas y algunos artefactos con

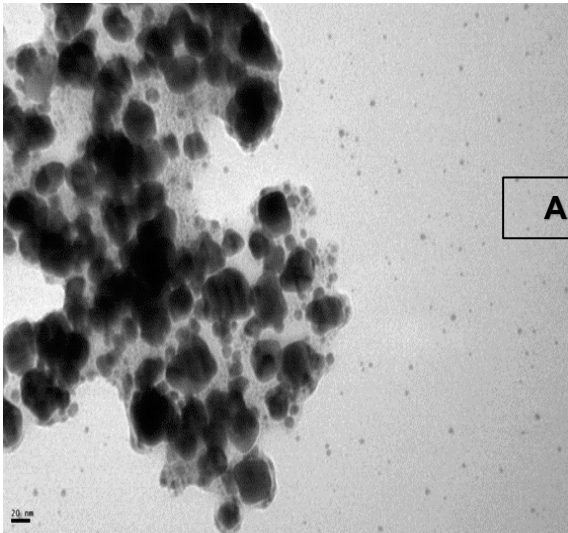
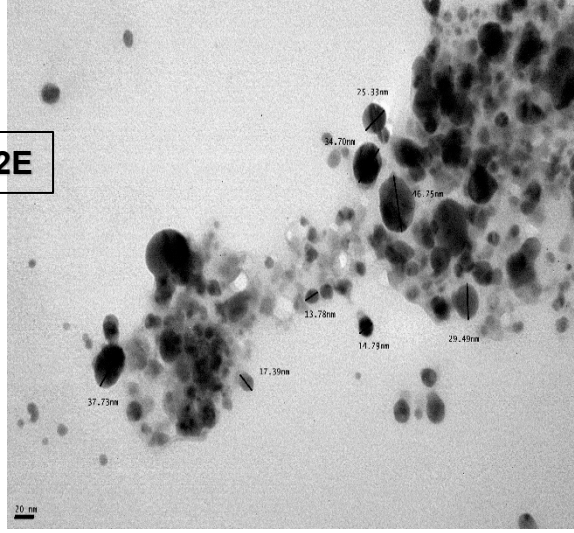
otras formas. A simple vista quedó evidenciado que A2Y también presentaba, las partículas de mayor tamaño.

Los resultados de las mediciones de las nanopartículas se muestran en la Tabla 3.3-1. En general se realizaron más de 100 mediciones en diferentes campos de todas las nanopartículas sintetizadas, el tamaño medio de las nanopartículas estuvo por debajo de los 20 nm, el tamaño mínimo fue de entre 3 y 3,78 nm y el tamaño máximo estuvo entre 31 y 56 nm con excepción de A2Y cuyo tamaño medio fue de 40,77 nm. Las nanopartículas más pequeñas fueron A2N con un tamaño promedio de 15,17nm. Cuando se observan todos los datos, destaca A2Y por ser las partículas más grandes, en promedio y además cuenta con las nanopartículas de tamaño máximo (99,38 nm) registradas.

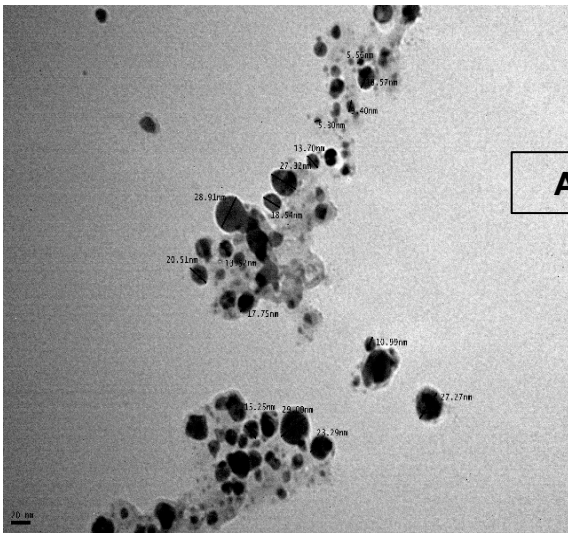
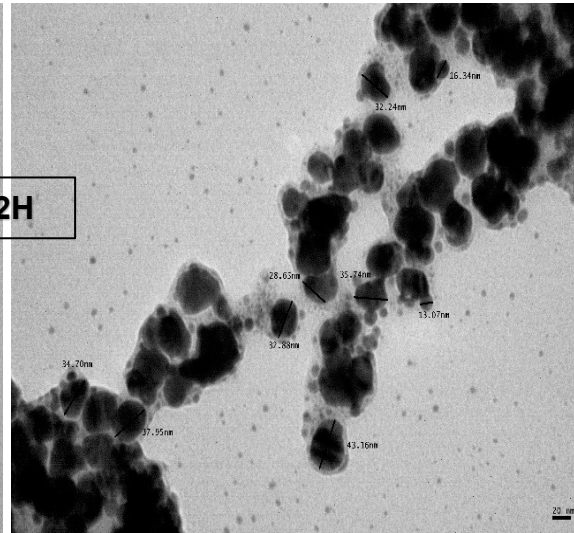




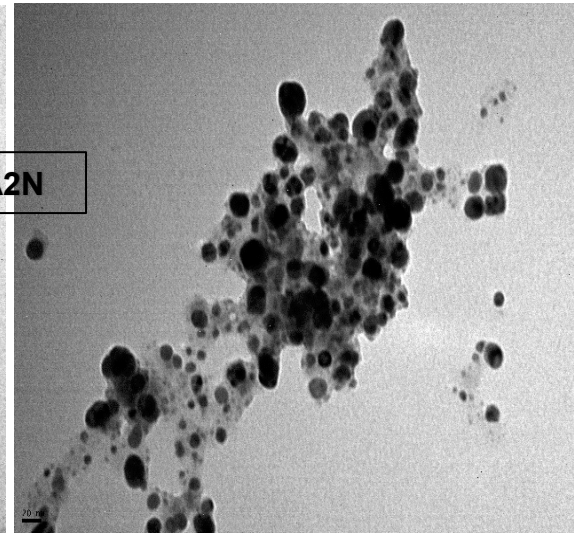
A2E



A2H



A2N





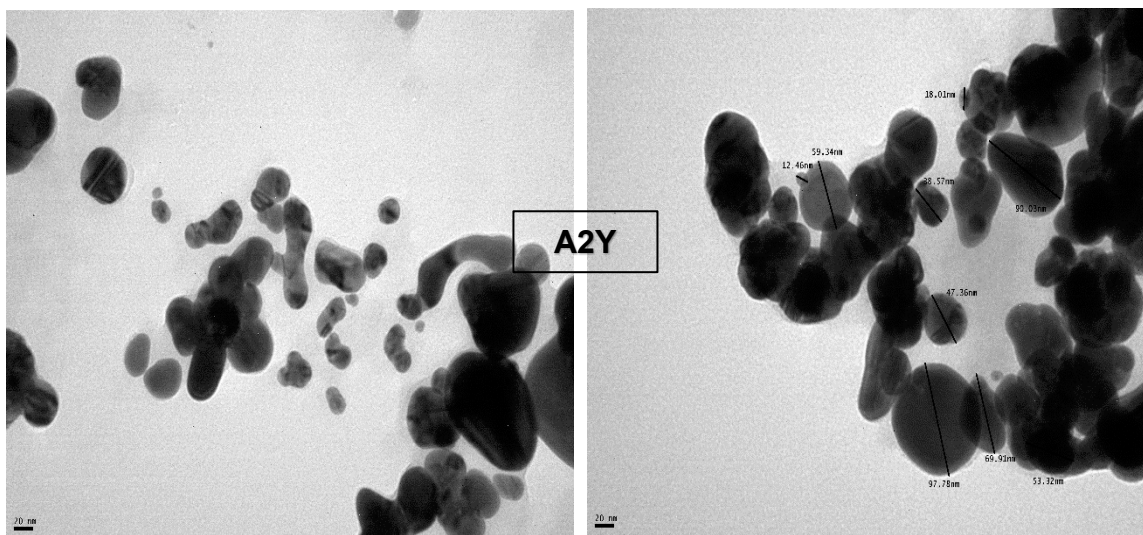


Figura 3.3-4 Micrografías electrónicas MET de las nanopartículas, se incluyen las medidas de lo diámetros y la frecuencia relativa de aparición de cada tamaño graficado con la marca de clase.

Tabla 3.3-1 Total de mediciones y determinación de los tamaños medio, mínimo, máximo y (nm) de las nanopartículas obtenidas con cada extracto.

Muestra	Medio	Mínimo	Máximo	Mediciones
A2A	16,01	3,61	31,31	125
A2B	17,13	3,78	50,14	126
A2E	19,79	3,64	55,41	117
A2H	19,86	3,04	51,28	127
A2N	15,17	3	38,93	104
A2Y	40,77	8,42	99,38	91

Para determinar cuál fue el tamaño predominante en cada una de las suspensiones de nanopartículas obtenidas, se agruparon por clases los diámetros medidos, como se

muestra en la Tabla 3.3-2. Como puede observarse en la tabla, la mayor frecuencia en el tamaño de partícula se presenta con valores menores a los 20 nm con excepción de A2Y. En tal sentido, A2A es la que presenta mayor cantidad de nanopartículas con tamaños menores a 10nm. Las mediciones de tamaños más recurrentes se encuentran entre 10 y 20nm en la mayoría de los casos, por lo que esta constituye la clase modal de todo el conjunto de datos. Aun A2Y muestra una fuerte representación en esta clase a pesar de mostrar las partículas más grandes y su clase modal se encuentra entre 30 y 40nm.

*Tabla 3.3-2 Frecuencia absoluta de tamaños de nanopartículas medidas a partir de MET organizadas por clases.*

Tamaño (nm)	A2A	A2B	A2E	A2H	A2N	A2Y
[0-10)	63	32	33	36	29	1
[10-20)	46	57	39	39	50	15
[20-30)	13	23	19	15	21	14
[30-40)	3	6	17	31	4	24
[40-50)	0	7	6	5	0	11
[50-60)	0	1	3	1	0	9
[60-70)	0	0	0	0	0	6
[70-80)	0	0	0	0	0	6
[80-90)	0	0	0	0	0	1
[90-100)	0	0	0	0	0	4

En la Figura 3.3-5 se muestran los patrones de DRX obtenidos a partir de cada una de las nanopartículas sintetizadas y purificadas.

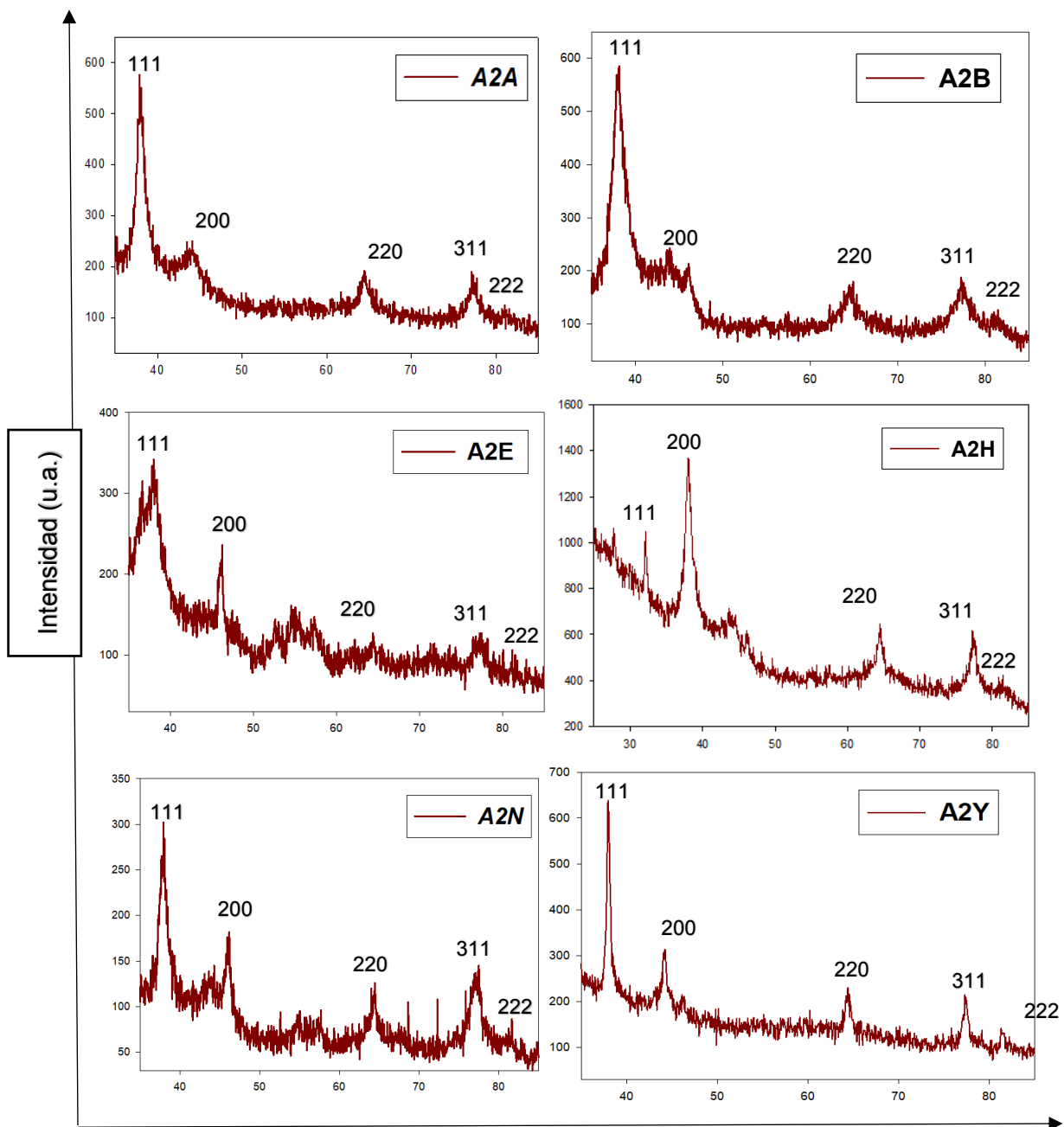


Figura 3.3-2 Gráficos de DRX de las nanopartículas sintetizadas con los extractos: A2A, A2B, A2E, A2H, A2N y A2Y.



Los difractogramas se analizaron e interpretaron utilizando datos estándar. Los picos principales se encuentran ubicados en  $2\Theta \approx 38^\circ, 44^\circ, 65^\circ, 78^\circ$  y  $82^\circ$ , que corresponden con las reflexiones de los planos (111), (200), (220), (311) y (222), respectivamente, y confirman el estado de fase cristalina de las partículas de plata. El tipo de espectrograma obtenido es coincidente con datos bibliográficos para este tipo de síntesis verde (Lakhan et al., 2020).

### **3.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana**

Las potencialidades antimicrobianas de las nanopartículas obtenidas se evaluaron mediante el método de difusión en agar. Asumiendo que los coeficientes de difusión de las nanopartículas obtenidas son similares, la aparición de un halo de inhibición durante las primeras horas de crecimiento indicaría su actividad antimicrobiana frente a la cepa evaluada.

En la Figura 3.4 1 se puede observar que en el caso de A2Y, no se evidenció la aparición de halos de inhibición, frente a ninguno de los microorganismos probados. Las cepas fúngicas resultaron menos sensibles que las cepas bacterianas, *S. aureus* fue el microorganismo más sensible y *C. globosum* el más resistente. Las nanopartículas que presentaron mejores potencialidades según este método fueron A2B, A2E y A2N. Empleando este método, también se estudiaron las potencialidades antimicrobianas de los extractos acuosos y en ningún caso se observó la formación de halos de inhibición frente a ninguna de las cepas testeadas. Por lo tanto, se determinó que los extractos vegetales acuosos obtenidos por infusión en este trabajo no poseen por sí mismos actividad antimicrobiana frente a los microorganismos evaluados.

Además, se evaluó la actividad antimicrobiana de la solución de nitrato de plata utilizada para la síntesis, representada como SA2 y, se evidenció que, si bien la solución tiene actividad por sí misma, los halos de inhibición de las AgNps en varias ocasiones superaron el diámetro de los de la SA2.

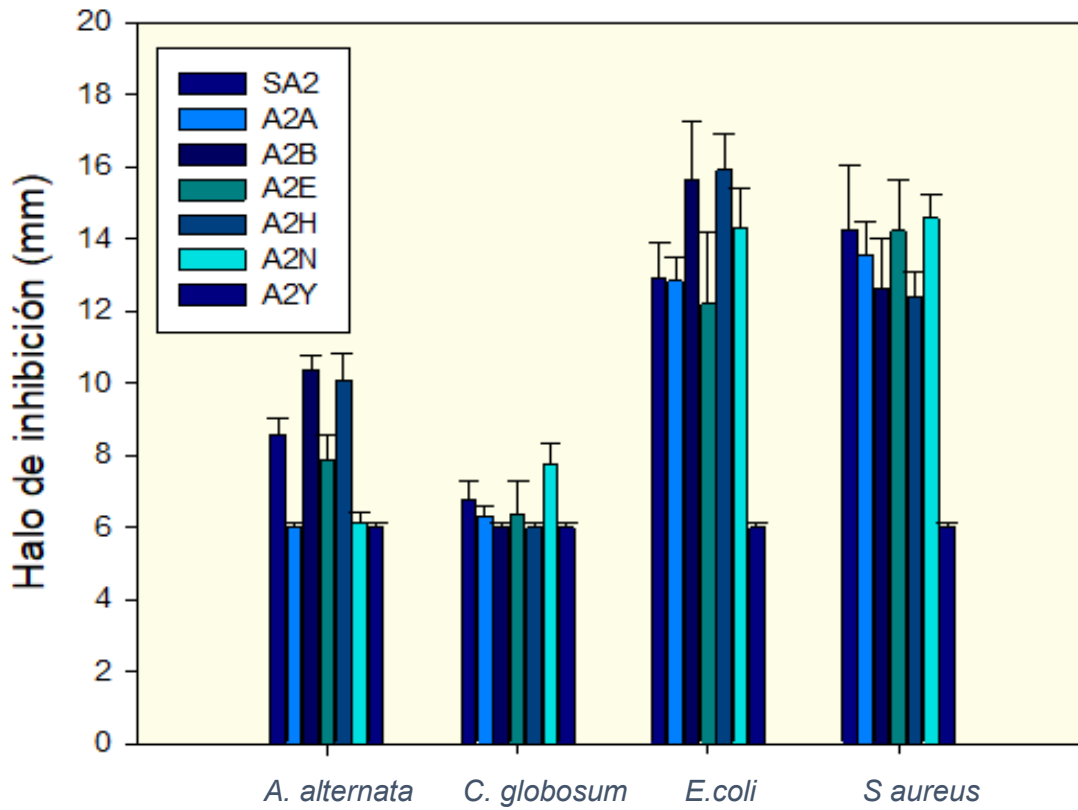


Figura 3.4-1 Gráfico de barras que representa el análisis comparativo de las medidas de los diámetros de los halos de inhibición de los microorganismos: *A. alternata*, *C. globosum*, *E. coli* y *S. aureus* frente a las soluciones de nanopartículas: A2A, A2B, A2E, A2H, A2N y A2Y.

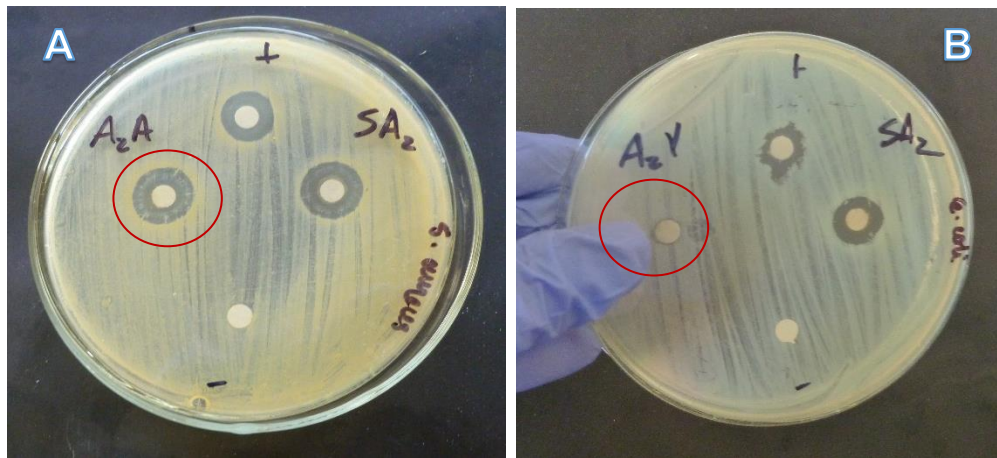


Figura 3.4-2 Ensayo de difusión en agar: imágenes de placas con algunas de la pruebas realizadas frente a las cepas bacterianas *S. aureus*, se resalta halo de inhibición causado por A2A y B: *E. coli*, se resalta la ausencia de halo frente a A2Y.

En la Figura 3.4-2 se observan halos de inhibición producidos por SA2 y A2A, frente a las cepas bacterianas, mientras que en el caso de A2Y no se observa la formación de un halo de inhibición exactamente como en el control negativo que es de AD. A partir de estos resultados y teniendo en cuenta también su inestabilidad en el tiempo y el tamaño medio mayor de 40 nm, así como las formas disímiles de las nanopartículas obtenidas, se descartó el estudio de A2Y durante la siguiente etapa de este trabajo.

Para continuar con el estudio de las potencialidades antimicrobianas se procedió a determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada una de las nanopartículas (A2A, A2B, A2E, A2H y A2N) para comparar sus potencialidades teniendo en cuenta su posterior aplicación en la formulación de una pintura antimicrobiana. En tal sentido, se realizó el ensayo de microdilución cuyos resultados se muestran en la Figura 3.4-3.

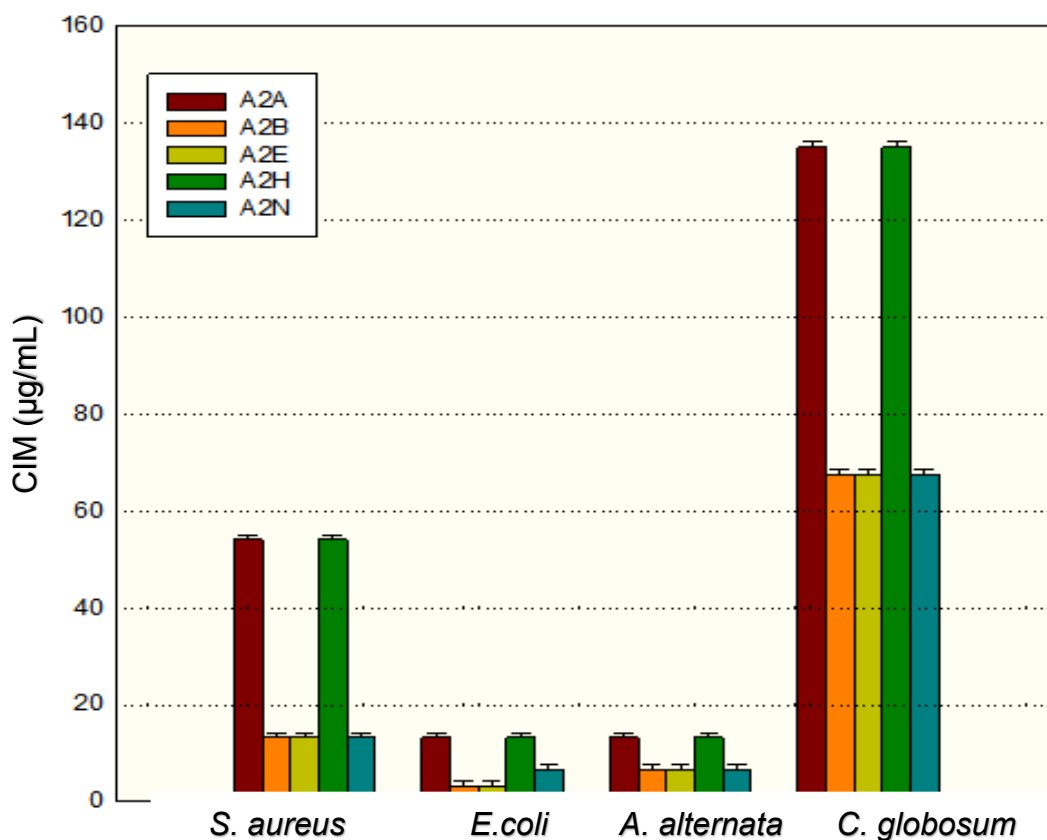


Figura 3.4-3 Gráfico de barras que representa el análisis comparativo de la CIM observada a ojo desnudo de las suspensiones de nanopartículas A2A, A2B, A2E, A2H y A2N frente a los microorganismos *A. alternata*, *C. globosum*, *E. coli* y *S. aureus*.

En general, y en contraste con lo obtenido mediante el método de difusión en agar, *C. globosum* fue el microorganismo más resistente frente a todas las nanopartículas probadas. La resistencia a la inhibición, en el resto de los microorganismos, no presentó diferencias estadísticamente significativas al realizarse el ANOVA y la prueba de Tukey para comparación de medias de cada grupo microbiano, a excepción *S. aureus* que mostró ser el más resistente, luego de *C. globosum*.

Según las CIMs presentadas en la Figura 3.4-3 y tomando en cuenta los factores: microorganismos y nanopartículas para la comparación de medias por la prueba de Tukey, se requirió significativamente mayor concentración de A2A y A2H que de todas las otras

para lograr la inhibición, mostrando diferencias significativas en todos los casos con A2B, A2E y A2N. Estas últimas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí. En esta instancia se seleccionaron A2B, A2E y A2N y se realizó la resiembra en medio sólido para determinar las concentraciones fungicidas y bactericidas y diferenciarlas de las bacteriostáticas y la fungistáticas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.4-1.

*Tabla 3.4-1 Concentraciones Mínimas Fungicidas y Bactericidas de A2B, A2E y A2N frente a A. alternata, C. globosum, E. coli y S.aureus.*

Concentración (µg/mL)	<i>A. alternata</i>	<i>C. globosum</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
A2B	13,3	>270	13,3	26
A2E	3,3	>270	3,3	13
A2N	6	>270	3,3	13

Según la información obtenida con la resiembra, se logró determinar las concentraciones bactericidas mínimas de A2B, A2E y A2N requeridas para inhibir el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, las dos bacterias incluidas en el ensayo. En el caso de *E. coli* se ratificó como la cepa bacteriana más sensible.

El caso de los hongos fue diferente puesto que se comprobó que las concentraciones encontradas anteriormente para *C. globosum* solo eran inhibitorias, a pesar de que el estudio se extendió a concentraciones más elevadas como 270 µg/mL, no se logró inhibir totalmente el crecimiento con ninguna de las concentraciones incluidas en el ensayo.

En cuanto a las nanopartículas, A2E tuvo el mejor desempeño como antimicrobiano, si bien con *C. globosum* no hubo diferencias con A2B y A2N, se demostró que con el uso de solo 3,3 µg/mL es suficiente para lograr eliminar a *E. coli* y *A. alternata*, mientras que con 13 µg/mL se eliminaron todas las UFC de *S.aureus* contenidas inicialmente en la muestra. En la Figura 3.4-4 se muestran placas de resiembra correspondiente a A2E, donde cada

pocillo resembrado se representa con un número o símbolo, el símbolo + representa el control positivo de crecimiento y el símbolo – representa el control negativo. En el caso de *A. alternata*, *E.coli* y *S.aureus* el 6 representa la concentración más baja (1,7 µg/mL) evaluada frente a estos microorganismos y 1 la más elevada, siendo 6 (1,7 µg/mL), 5 (3,3 µg/mL), 4 (6,6 µg/mL) continuando la progresión geométrica. En el caso de *C. globosum* 6 (270 µg/mL) y el resto de los números representan concentraciones más bajas, siguiendo la misma progresión geométrica.

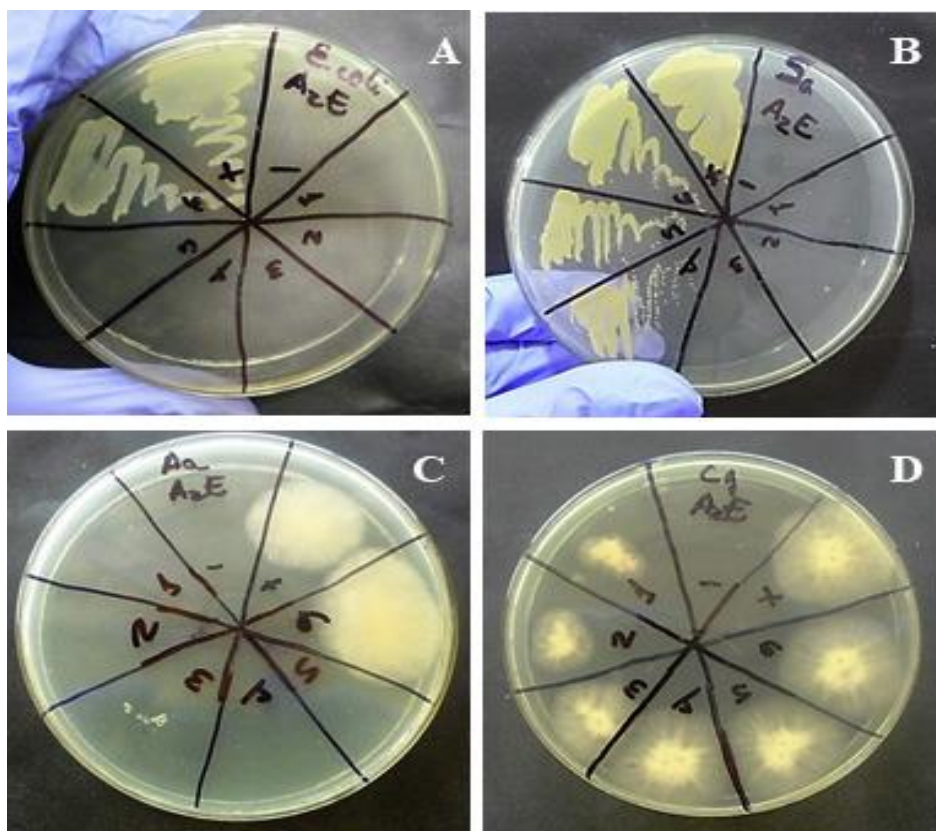


Figura 3.4-4 Placas con la resiembra de todos los pocillos correspondientes a A2E frente a, A: *E. coli*, B: *S. aureus*, C: *A. alternata* y D: *C. globosum*. La numeración, 1 a 6, corresponde a los pocillos con concentraciones decrecientes de A2E.

Este mismo ensayo de microdilución, se usó para determinar si estas las suspensiones con las nanopartículas mantenían su actividad luego de los 120 días. Los resultados obtenidos mostraron que luego de 120 días de almacenadas se siguió manteniendo la misma

actividad inhibitoria de A2B, A2E y A2N, no obstante, se observó una disminución de la actividad tanto fungicida como bactericida.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento se seleccionaron las suspensiones de nanopartículas A2E y A2N para continuar con el trabajo. A2N presentó una adecuada estabilidad en el tiempo, con nanopartículas con mayor representación entre 10 y 20 nm, muy homogéneas en comparación con el resto de las nanopartículas obtenidas, solamente superada como antimicrobiano por A2E. Esta última, por otra parte, es la de mayores potencialidades antimicrobianas, también posee una distribución de tamaños homogénea con partículas entre los 10 y 20 nm y con un porcentaje apreciable de partículas menores de 10 nm.

Por otro lado, los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antimicrobiana fueron usados como indicio para la formulación de las pinturas antimicrobianas en la siguiente etapa.

### **3.5 Evaluación de potencialidades antimicrobianas en películas de pintura**

Teniendo en cuenta los resultados de las potencialidades antimicrobianas estudiadas, trabajos previos realizados por el grupo de trabajo e información bibliográfica se prepararon pinturas con distintas concentraciones de nanopartículas reemplazando el agua de la formulación de las pinturas (detallada en el Capítulo 2) por las suspensiones acuosas obtenidas de A2E y A2N. En la Figura 3.5-1, se observan las películas de pintura obtenidas, tras 15 días de curado. Nótese un cambio de color producido al aumentar la concentración de nanopartículas en cada pintura, con respecto a la pintura control (PC).

La PC que se muestra en la Figura 3.5-1 A es la película obtenida a partir de la pintura control. La nomenclatura del resto de las pinturas PA2E10, PA2E15, PA2E25, PA2N10, PA2N15 y PA2N25 corresponde a las muestras preparadas con distintas concentraciones A2E (Figura 3.5-1 B) y A2N (Figura 3.5-1 C) 10, 15 y 25 mg por cada 100 g de pintura que refiere a la cantidad de plata en las suspensiones de nanopartículas, respectivamente.

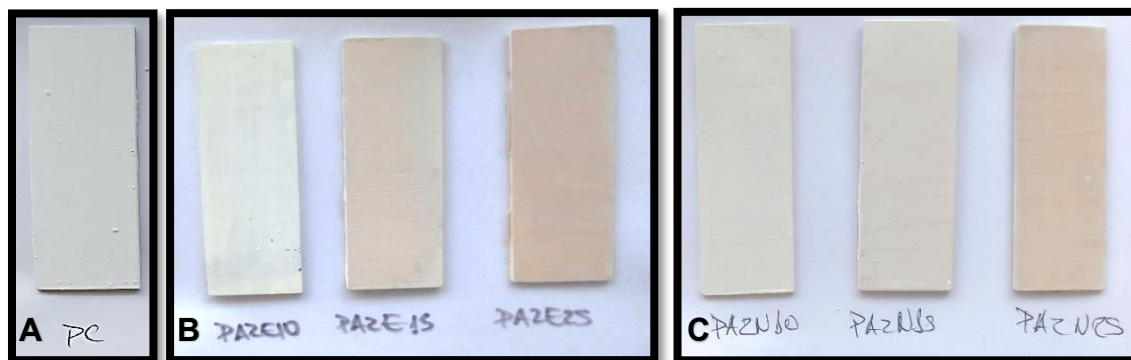


Figura 3.5-1 Películas de pintura sobre portaobjetos de vidrio, A: PC (pintura control), B y C: Pinturas con distintas concentraciones de A2E y A2N, respectivamente.

Considerando que los hongos son el grupo microbiano con mayor repercusión sobre el biodeterioro de este tipo de pinturas diseñadas para ambientes de interior y con el fin de evaluar la eficacia de las nanopartículas como potenciales biocidas en película, se utilizó la norma ASTM 5590. Los resultados de la evaluación de la resistencia al crecimiento fúngico de las películas de pintura se presentan en la Tabla 3.5-2.

Tabla 3.5-1 Resultados de la resistencia al crecimiento fúngico de las películas de pintura

	<i>A. alternata</i>	<i>C. globosum</i>
PC	(4, 3, 4) (4, 4, 4)	(3, 3, 2) (3, 3, 4)
PA2E10	(3, 4, 3) (3, 2, 3)	(2, 2, 2) (2, 1, 2)
PA2E15	(2, 2, 2) (3, 2, 2)	(1, 2, 1) (0, 0, 1)
PA2E25	(1, 0, 0) (0, 0, 0)	(0, 0, 0) (0, 0, 0)
PA2N10	(3, 2, 2) (2, 2, 2)	(2, 1, 1) (1, 1, 1)
PA2N15	(1, 0, 1) (1, 0, 1)	(1, 1, 0) (0, 0, 0)
PA2N25	(0, 0, 0) (0, 0, 0)	(0, 0, 0) (0, 0, 0)



En la tabla se especifican las calificaciones asignadas a cada muestra de película de pintura frente al crecimiento fúngico siguiendo el criterio de referencia de la norma ASTM 5590. Las muestras de la PC frente a *A. alternata* registró un crecimiento abundante y *C. globosum* creció generalmente de forma moderada. Frente a las pinturas con las nanopartículas, no se observaron diferencias en el crecimiento de los hongos frente cada una de ellas. En el caso de ambos hongos, se pudo observar una disminución del crecimiento a medida que aumentaba la concentración de nanopartículas obteniéndose para ambos hongos la inhibición total del crecimiento en las pinturas con las concentraciones más elevadas.

En el caso de *C. globosum*, destaca su menor crecimiento aun en el control. Ya estaba descrito en la literatura que si bien este hongo es resistente a los biocidas en medio líquido, en las películas de pintura suele ser más sensible (L. Barberia-Roque et al., 2019b). No obstante es un hongo muy importante en este tipo de ensayos por sus elevada actividad celulolítica.

Registros fotográficos e imágenes obtenidas por microscopía óptica y electrónica de barrido de las muestras de P2N15 y P2N25 se muestran en la Figura 3.5-2. Registros similares se obtuvieron a partir de las muestras de pintura con A2E. Las muestras de PC (serie A) presentaron abundante crecimiento de *A. alternata* incluso con la aparición de nuevas esporas que se pueden observar en detalle tanto con el microscopio estereoscópico como con las micrografías MEB. En el caso de las muestras de PA2N15 (serie B) y PA2N25 (serie C) evidencian una disminución marcada del crecimiento fúngico con respecto a la PC, a simple vista y con 80 x podrían clasificarse como, “sin crecimiento” en ambos casos. Fue solo mediante MEB que se logró observar rastros de crecimiento en PA2N15. En el caso de PA2N25 se pudo determinar que aún con mayor aumento mediante MEB no había crecimiento, véase Figura 3.5-2C.

A partir de estos resultados se concluye que 25 mg de plata por cada 100 g de pintura es la concentración indicada para inhibir completamente el crecimiento fúngico de estas cepas sobre las películas de la pintura formulada.

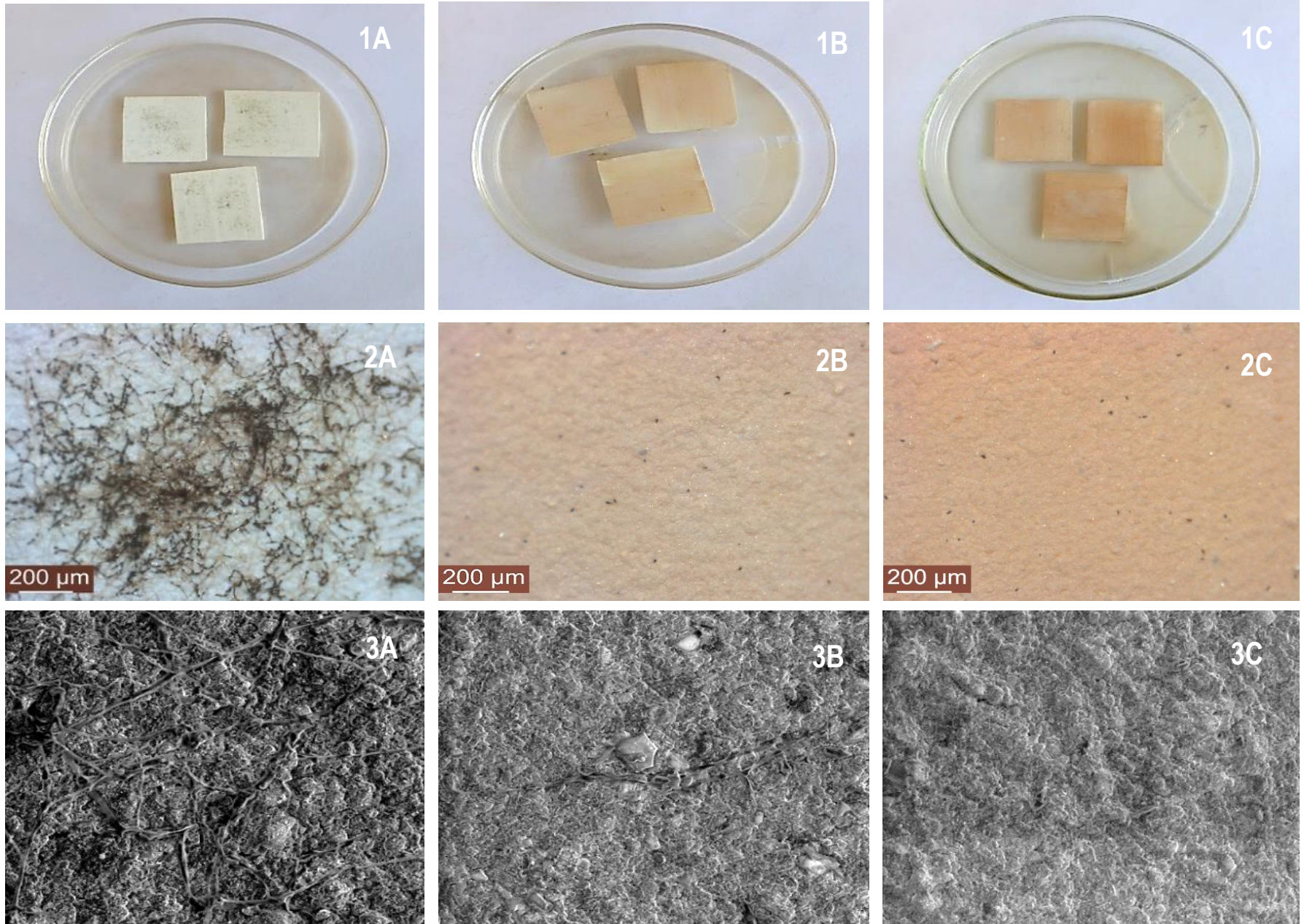


Figura 3.5-2 Ensayo de resistencia al crecimiento fúngico (ASTM 5590). PC (serie A) PA2N15 (serie B) y PA2N25 (serie C) frente a *A. alternata*, registros fotográficos (serie1), microscopio estereoscópico aumento de 80x (serie2) y con MEB aumento de 1500X (serie 3).



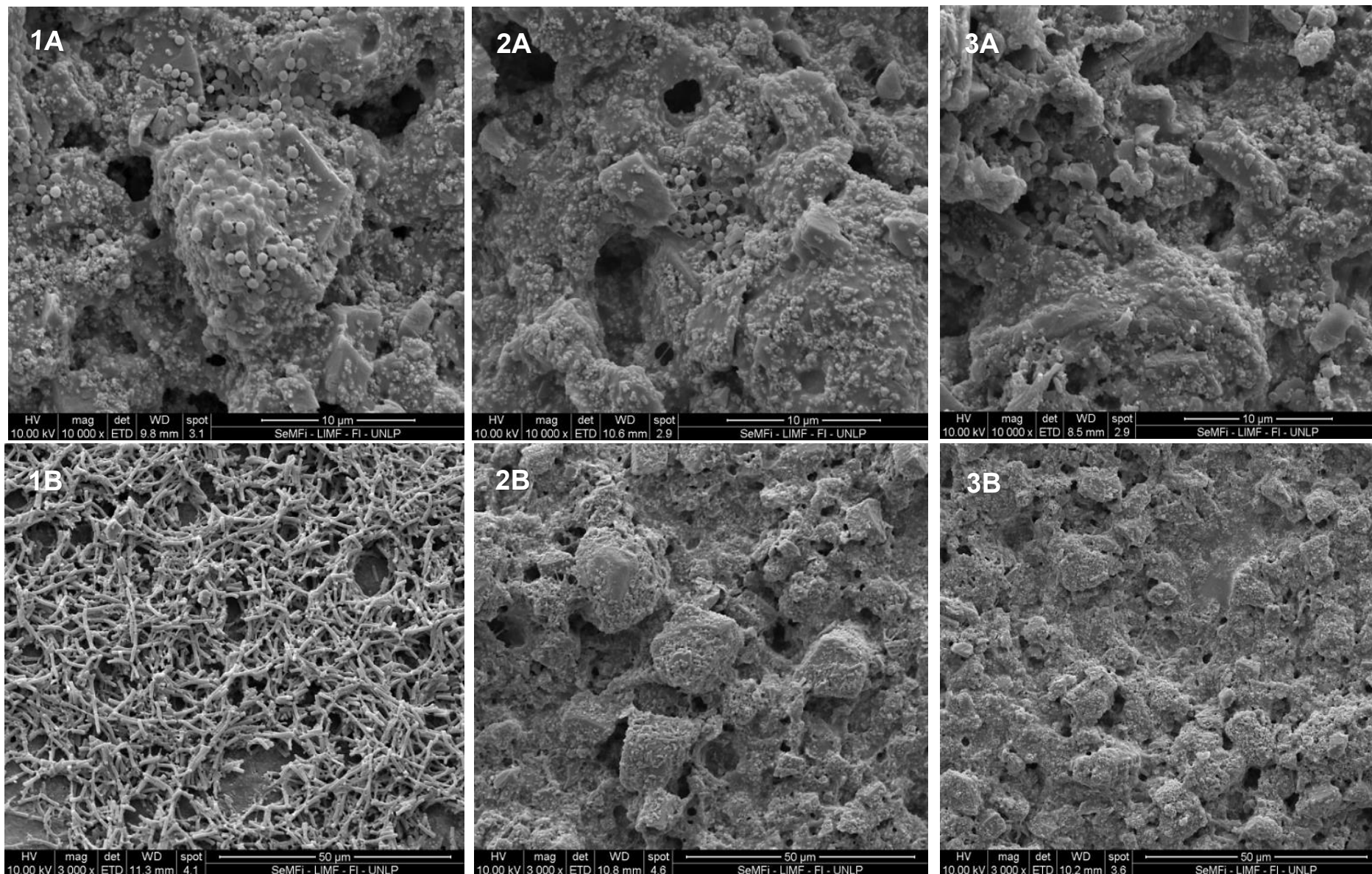


Figura 3.5-3 Micrografías MEB, ensayo de resistencia a la formación de biopelículas bacterianas sobre: PC (serie 1), PA2N15 (serie 2) Y PA2N25 (serie 3) inoculadas con *S. aureus* (serie A) y *E. coli* (serie B)

Si bien, las bacterias revisten mayor importancia en el biodeterioro de las pinturas al momento de su almacenaje cuando se encuentran en forma líquida por la mayor disponibilidad acuosa, también poseen la capacidad de formar biopelículas sobre las pinturas y contribuir al biodeterioro. En este trabajo, se evaluó también, la resistencia de las películas de pintura obtenidas frente al desarrollo de biopelículas bacterianas. El ensayo se realizó con las cepas de *E. coli* y *S. aureus* utilizadas en la etapa previa. A diferencia de los hongos estos resultados solo son visibles mediante MEB y las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 3.5-3. Se puede observar que ambas bacterias logran formar una biopelícula sobre la PC. En la serie de PA2N15 se evidencian los mismos resultados que con los hongos, una elevada inhibición en el crecimiento, con algunos microorganismos aislados que no lograron formar biopelículas. Las imágenes correspondientes a PA2N25 frente a las dos bacterias coinciden en que no hay rastros de crecimiento bacteriano, ni siquiera se observa la adhesión de bacterias aisladas. Estos resultados se repitieron al evaluar el crecimiento de las biopelículas bacterianas frente a A2E.

La información obtenida hasta el momento permitió definir que 25 mg de plata por cada 100 g de pintura es la concentración más eficiente para tener en cuenta en las siguientes evaluaciones. Además, no se observaron diferencias en la bioactividad de A2E y A2N como aditivos antimicrobianos, que puedan sugerir la superioridad en el desempeño de uno sobre otro, por tanto, se decidió continuar trabajando con ambas suspensiones de nanopartículas en la siguiente etapa.

# **Capítulo 4 - Funcionalización de tierra de diatomeas con nanopartículas de plata**



En el presente Capítulo se describen los resultados de funcionalizar tierra de diatomeas (TDs) con nanopartículas, adaptando el método de síntesis verde descrito en la sección 2.1 de Materiales y Métodos. Los resultados presentados en el Capítulo 3 en relación con la síntesis, caracterización y selección de las nanopartículas más eficientes (A2E y A2N) tienen continuación en este capítulo.

#### 4.1 Estructura y composición de las TDs

En el presente trabajo se utilizaron dos TDs autóctonas como material de soporte experimental, denominadas TD1 y TD2, descritas en el Capítulo 2. Las TDs fueron caracterizadas para determinar su estructura y composición química. En la Figura 4.1-1 se presentan micrografías MEB que muestran en distintos campos las estructuras frecuentes observadas en las muestras.

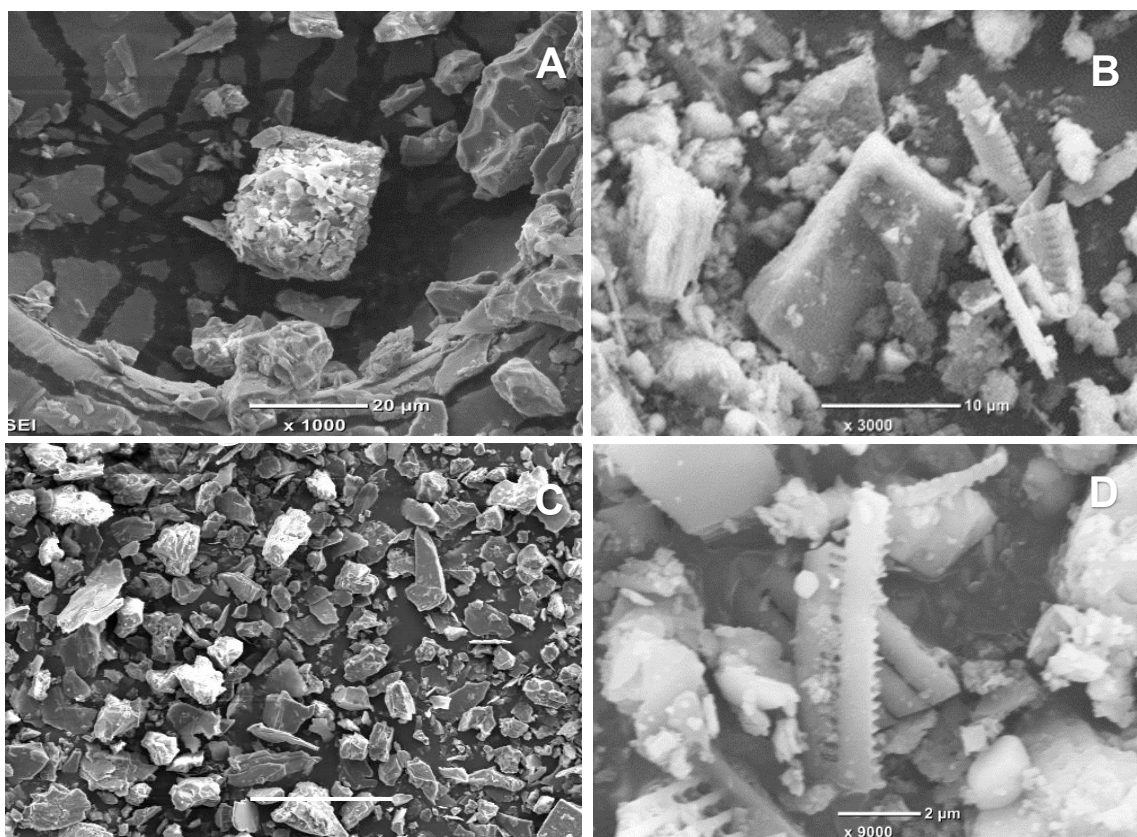


Figura 0-1 Micrografía MEB de las TDs. TD1: A y C, TD2: B y D. Aumentos: A 1000x; B y C: 3000x; D :9000.

En la Figura 0-1 A, se puede observar una teca de diatomea conservada, mientras que en la Figura 0-1 C, más representativa en la muestra de TD1, se observan restos de material de menor tamaño. Las micrografías correspondientes con las Figuras 0-1 B y D son representativas del grado de conservación y de las diversas estructuras relacionadas con las diatomeas que se encontraron durante la observación de la TD2. A partir de las observaciones de diferentes muestras y varios campos de cada una de las tierras se pudo determinar que ambas contienen residuos de TDs por no presentar estructuras completas de diatomeas conservadas. No obstante, TD2 presenta restos más completos de estas estructuras, que pudieron encontrarse en todos los campos observados, mientras que para TD1 solo hubo hallazgos esporádicos de las mismas.

*Tabla 4.1-1 Composición de las tierras de diatomeas*

		Composición	%
TD1	Cuarzo	SiO <sub>2</sub>	55
	Pirofilita	Al <sub>2</sub> Si <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub>	36
	Caolinita	K AlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	5
	Illita	(K)(Al,Mg,Fe) <sub>2</sub> (Si, Al) <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)	4
TD2	Calcita	CaCO <sub>3</sub>	38
	Plagioclasa	(Na Ca) (Si,Al) <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	23
	Cuarzo	SiO <sub>2</sub>	11
	Feldespato Potásico	K AlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	7
	Clinoptilolita	(Ca,K,Na) <sub>6</sub> (Si <sub>30</sub> Al <sub>6</sub> )O <sub>72</sub> .20H <sub>2</sub> O	7
	Yeso	CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5
	Cristobalita	SiO <sub>2</sub>	2
	Arcilla	-	7

En esta instancia se realizó un análisis mediante DRX de TD1 y TD2 cuyos resultados se muestran en la Figura 4.1- 2. A partir de los difractogramas obtenidos se pudo analizar la composición de las TDs que se detalla en la Tabla 4.1-1.

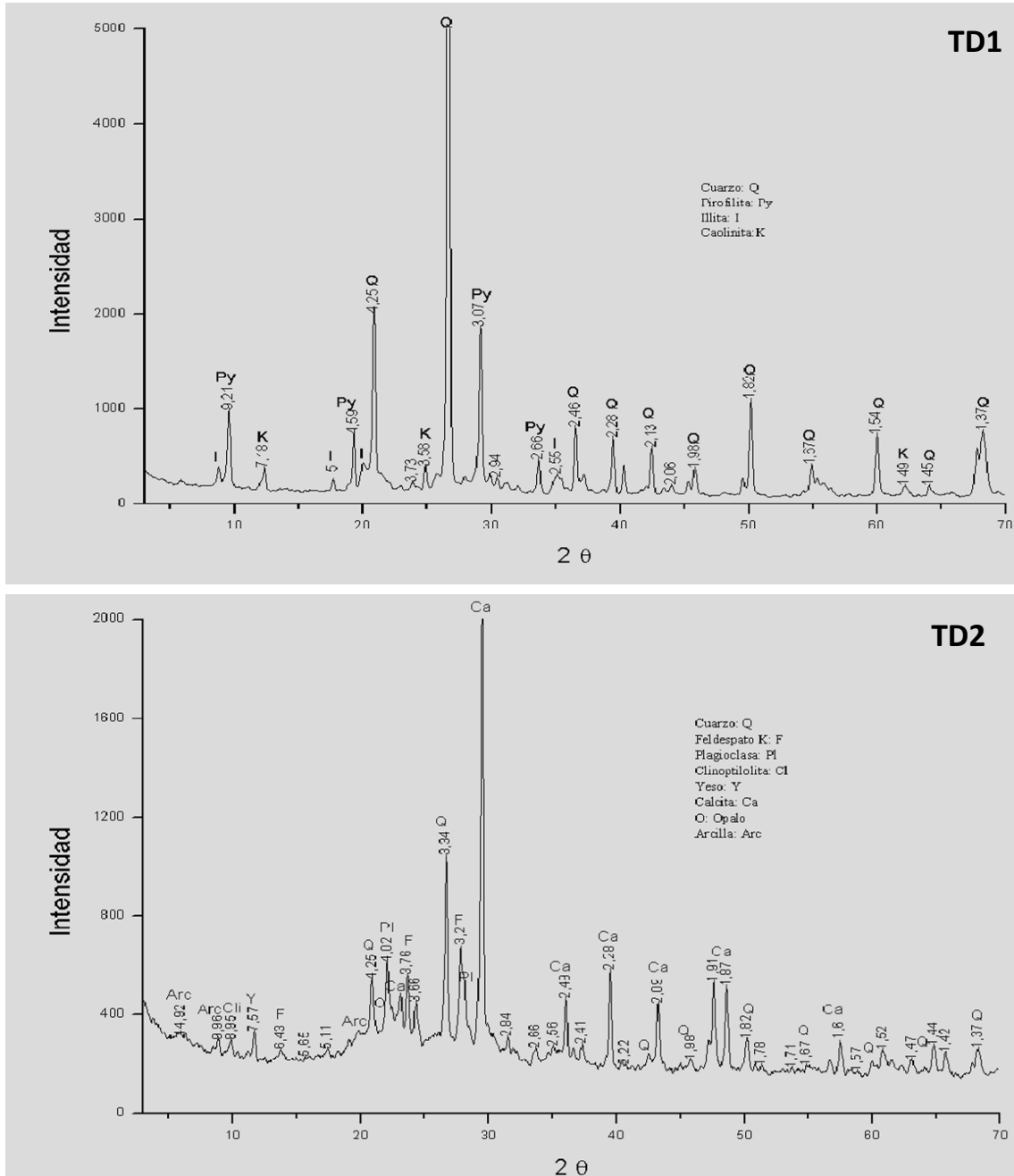


Figura 0-2 Difractogramas de DRX de TD1 y TD2. Las leyendas expresan los minerales encontrados en la composición de cada una de las TDs.



Ambas TDs exhiben una composición similar a la que se describe en la bibliografía (Fernández and Bellotti, 2017; ElSayed, 2018) con distintas formas de sílice como componente mayoritario. En el caso de la TD1 está compuesta mayoritariamente en un 55% por cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) y un 36% de pirofilita  $\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ . En el caso de la TD2 los componentes encontrados fueron calcita  $\text{CaCO}_3$  (38 %), plagioclasa (Na Ca)  $(\text{Si,Al})_4\text{O}_8$  (23%), cuarzo en menor cantidad (11%) y, además, se encontró arcilla (7%) lo cual puede incidir en su color.

Otros elementos comunes en ambas son el aluminio, como parte de alúmino silicatos y, el potasio, mientras que, como elementos diferenciales en la TD1 se encontraron hierro y magnesio. En la TD2, se encontraron sodio y calcio formando parte de más de uno de los minerales presentes. Esto corresponde con lo descrito en la bibliografía (ElSayed, 2018; Crangle, 2021).

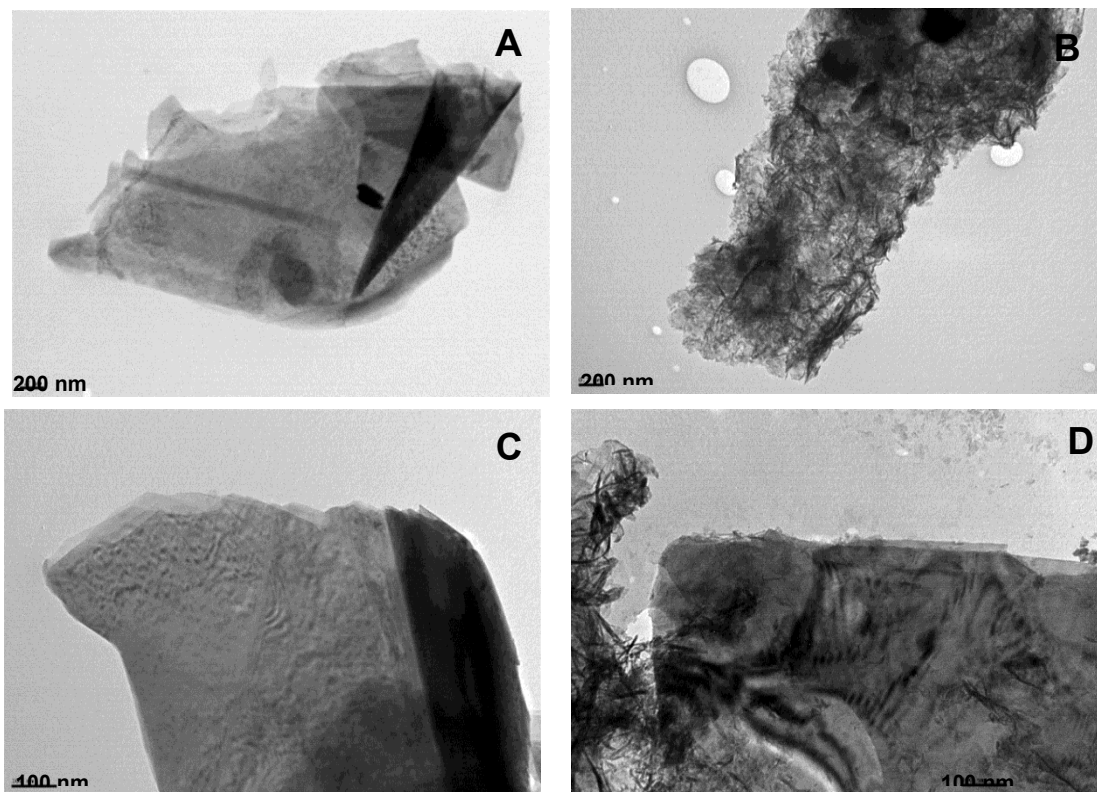


Figura 0-3 Micrografías MET de TD1 (A y C) y de TD2 (B y D). Aumentos 40000x (A y B), 80000x (B y D).

Por otro lado, las micrografías MET en la Figura 4.1-3 muestran el aspecto de las TDs evidenciando diferencias apreciables a nivel estructural. Los bordes definidos y geométricos caracterizan a las muestras observadas de TD1 mientras que los bordes poco definidos, con aspecto rugoso y mayor heterogeneidad son representativos de las muestras de TD2. La presencia arcilla en estos minerales se asocia a los bordes más difusos y con tamaños de poros más grandes (Van Garderen et al., 2011; Yeom et al., 2016). Estos aspectos no cambian en los diferentes aumentos explorados.

## **4.2 Funcionalización de las TDs**

En una primera etapa las TDs fueron activadas mediante el procedimiento descrito en la sección 2.7.1 del Capítulo 2. En la Figura 4.2-1 A y B se muestran los espectros FTIR de TD1 y TD2 sin activar y activadas (TD1\* y TD2\*).

La activación de la TD1 no provocó cambios en los picos observados, por lo que se infiere que este proceso no afectó significativamente las estructuras funcionales presentes inicialmente en la TD1, Figura 4.2-1 A. Mientras que en la Figura 4.2-1 B se observa que en la TD2 el pico  $1000\text{ cm}^{-1}$  atribuido a la sílice (Si-O) presenta un corrimiento a  $900\text{ cm}^{-1}$  una vez activada la tierra correspondiente. Este fenómeno ha sido descrito en la bibliografía (Tsai et al., 2004; Fernández and Bellotti, 2017). Todos los espectros presentan una banda entre  $3000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  debida al estiramiento del enlace O-H que resulta más ancha en el caso de la TD2, Figura 4.2-1 B.

Una vez obtenidas las TDs activadas se procedió a determinar la capacidad de adsorción de iones  $\text{Ag}^+$  por parte de estas en presencia de solución de  $\text{AgNO}_3$   $10^{-2}\text{ M}$ .

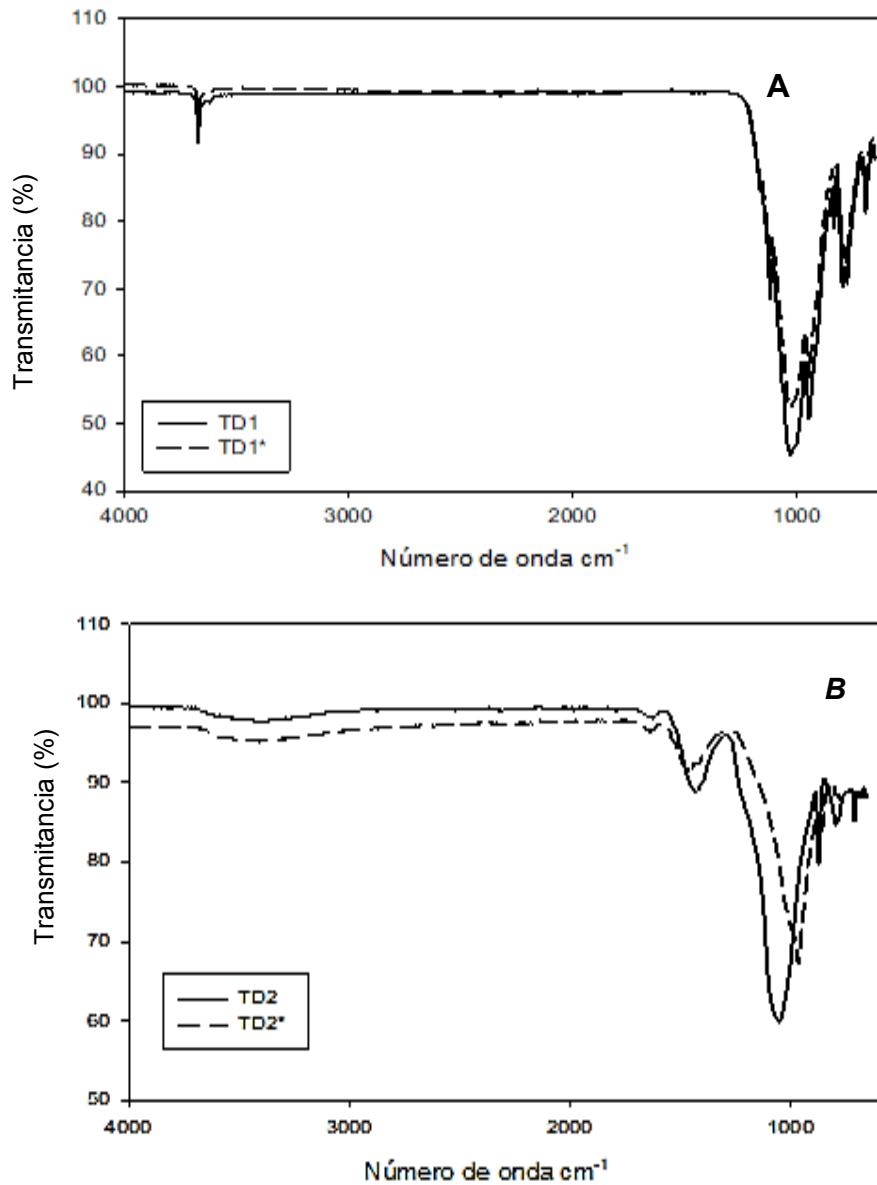


Figura 0-1 Espectros FTIR correspondientes a las: TD1 y TD1\*(A); TD2 y TD2\* (B).

En la Figura 4.2-2 se observan los resultados obtenidos a partir de la adsorción de iones  $\text{Ag}^+$  por parte de las TDs.

En el gráfico de la Figura 4.2-2A se presentan las concentraciones de iones  $\text{Ag}^+$  (M) en el sobrenadante, obtenidas por titulación, en relación con la cantidad de TD1\* y TD2\* utilizada en cada uno de los sistemas estudiados.

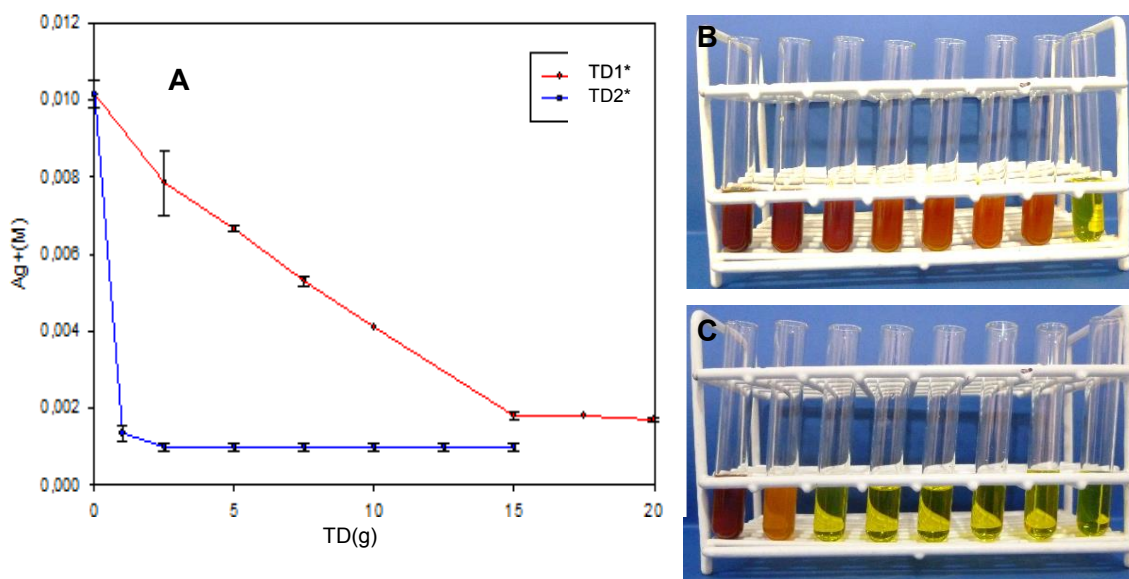


Figura 02-2 Gráfico de concentración de iones  $Ag^+$  en el sobrenadante en función de las distintas cantidades agregadas de las TD1\* Y TD2\* (A). Registros fotográficos de la aplicación del método de Möhr en el sobrenadante de: B: (0; 2,5; 5; 10; 15; 17,5; 20) g de TD1\* y C (0; 1; 2,5; 5; 10; 12,5; 15) g de TD2\*: El último tubo en las imágenes B y C corresponde a un control con agua.

En la Figura 4.2-2 B y C se observan los registros fotográficos de los resultados obtenidos por el método de Möhr al mezclar un volumen de cada sobrenadante con una solución de cromato de potasio de color amarillo. La aparición del correspondiente precipitado rojo de cromato de plata evidenció la presencia de iones  $Ag^+$  en los sobrenadantes. TD2\* resultó ser la de mayor afinidad por los iones  $Ag^+$  siendo suficiente con valores de entre 2,5 y 5 g para adsorber todos los iones  $Ag^+$  presente en el sistema. Mientras que en el caso de los sistemas con la TD1\* la presencia de iones  $Ag^+$  en el sobrenadante fue detectable en todos los casos, aunque disminuyó al aumentar la cantidad de TD1\* y permaneció constante a partir de 15 g.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se seleccionaron las cantidades más adecuadas para la adsorción de los iones  $Ag^+$  en cada sistema en estudio: 15g de TD1\* y 5g de TD2\* denominados TD1A15 y TD2A5, respectivamente. A partir de las determinaciones realizadas se logró calcular la cantidad de plata adsorbida en TD1A15 y TD2A5 que resultó de 4,0 y 14,8 mg por cada gramo de TD, respectivamente. En la Figura

4.2.3 puede observarse el aspecto de las TD1 y TD2 una vez activadas (TD1\* y TD2\*) y luego de la adsorción de iones  $Ag^+$  (TD1A15 y TD2A5).



*Figura 0-3 Registros fotográficos de TD1 y TD2 antes y después de la activación (TD1\* y TD2\*) y luego de la adsorción de iones  $Ag^+$  (TD1A15 y TD2A5).*

En la Figura 02-3 puede observarse como el proceso de activación de ambas tierras aclaró el color de la misma lo cuál podría explicarse por la eliminación a través de los lavados de impurezas y restos de compuestos orgánicos. El proceso de adsorción de iones  $Ag^+$  en ambos casos provocó un oscurecimiento de las mismas.

Con el objetivo de explorar otra variante en el proceso de funcionalización se introdujo el uso de una solución amoniacal como fue descrito en el inciso 2.7.3, a partir de esto se obtuvieron las muestras TD1NA15 y TD2NA5. En la Figura 4.2-4 se pueden observar micrografías MET, espectros y mapeos EDS obtenidos a partir de TD1 y TD1NA15.

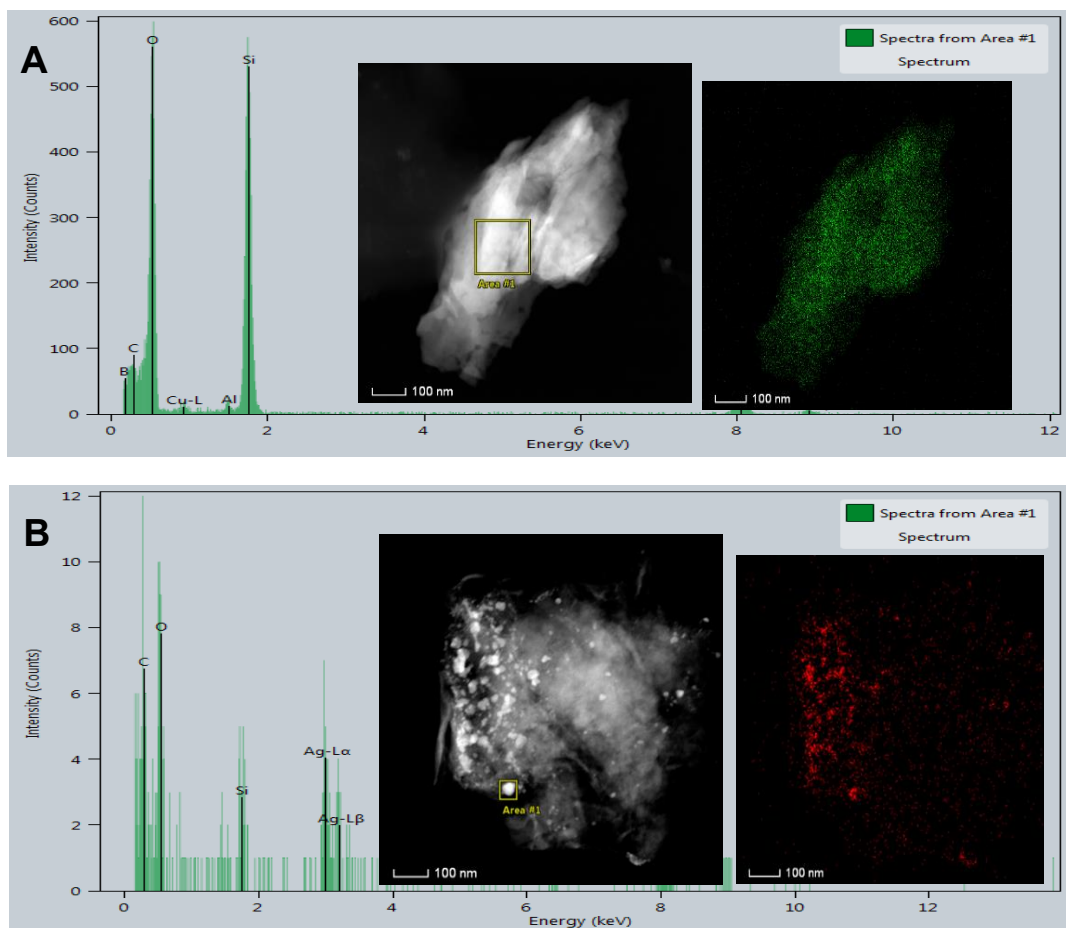


Figura 02-4 Micrografías MET: (A) TD1, espectro EDS del área señalada en amarillo y mapeo de Si en verde; (B) TD1NA15, espectro EDS del área señalada en amarillo y mapeo de Ag en rojo. Aumento 80000x (A y B).

En la Figura 4.2-4 A se muestra el espectro EDS de TD1 sin funcionalizar con la aparición de una señal muy intensa correspondiente al Si (en el mapeo en verde). Una vez concluida la adsorción de los iones  $\text{Ag}^+$  en medio amoniacal, en el análisis EDS quedó evidenciada la retención de estos en la TD tanto por la señal correspondiente que aparece en el espectro como por el mapeo (resaltada en color rojo) Figura 4.2-4 B.

El último paso en la funcionalización consistió en el agregado de los extractos vegetales seleccionados en la etapa previa *Equisetum giganteum* (E) y *Senna occidentalis* (N) como agentes reductores de los iones  $\text{Ag}^+$  asociados al soporte silíceo.

Teniendo en cuenta la mayor eficiencia exhibida por TD2 en la adsorción de iones  $\text{Ag}^+$  en comparación con TD1, evidenciada en la retención de aproximadamente 3 veces más plata

por gramo de TD, es que fue seleccionada para concluir con el proceso de funcionalización y aplicación posterior en la formulación de pinturas.

La mayor eficiencia de TD2 puede estar relacionada con las características observadas como: una mejor conservación de las estructuras de las diatomeas originales, una mayor presencia de grupos oxidrilos, así como también, un efecto más importante a nivel estructural de la activación alcalina estas dos últimas evidenciadas luego del análisis de los espectros FTIR.

Una vez concluida la funcionalización con el agregado de los extractos vegetales E y N se obtuvieron las TDs funcionalizadas: sin el agregado de solución de  $\text{NH}_3$  (TD2A5E y TD2A5N) y en medio amoniacal (TD2NA5E y TD2NA5N). En la Figura 4.2-5 se muestra se esquematiza el proceso de funcionalización realizado para ambos extractos tomando como ejemplo al extracto E

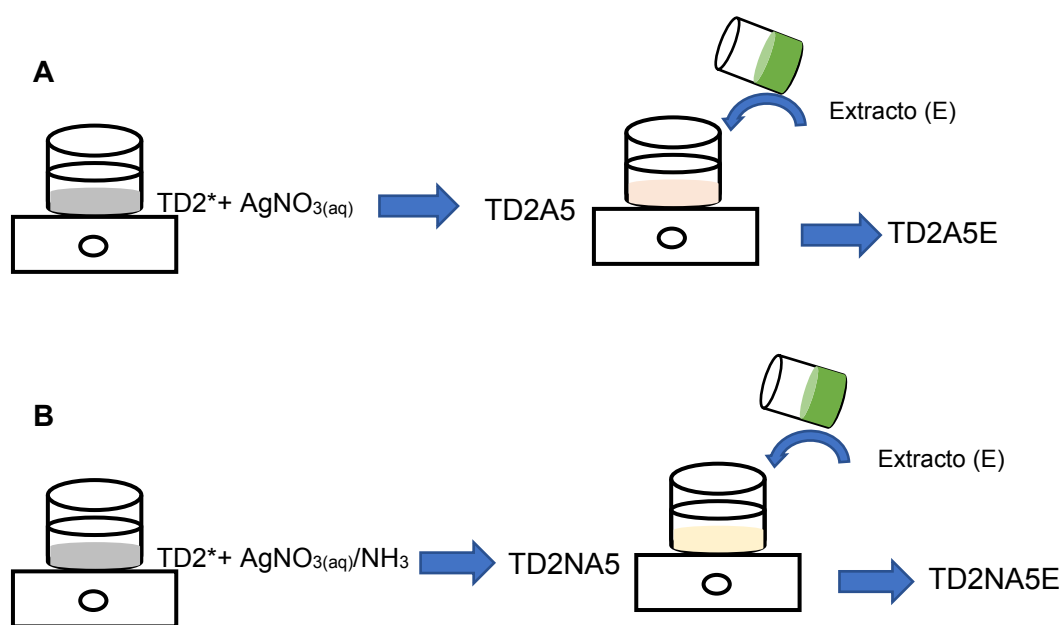


Figura 0-5 Esquema simplificado de la funcionalización de TD2\* con el extracto de *E. giganteum* (E) sin (A) y con el uso del medio amoniacal (B).

### 4.3 Caracterización de TD2A5E, TD2A5N, TD2NA5E y TD2NA5N

En la Figura 4.3-1 se muestran registros fotográficos de las TDs funcionalizadas obtenidas a partir de TD2. El aspecto de las TDs muestra que al agregar los extractos vegetales se



produce un cambio en la tonalidad del material tendiendo a una coloración ocre en ambos casos tanto con el agregado del medio amoniacal como sin este.



*Figura 4.3-1 Registros fotográficos de TD2 funcionalizada a partir de solución de Ag y los extractos vegetales E y N: sin agregado de  $\text{NH}_3$  (TD2A5, TD2A5E y TD2A5N) y con agregado de  $\text{NH}_3$  (TD2NA5, TD2NA5E y TD2NA5N).*

En la Figura 0-2 se muestran los espectros FTIR de los extractos vegetales (N y E), las nanopartículas obtenidas previamente y las TDNF. Como puede verse alguno de los picos presentes en los extractos ( $1100$ ,  $1400$ ,  $1580$  y  $3300 \text{ cm}^{-1}$ ) correspondientes con grupos -OH,  $-\text{CH}_3$  y  $\text{C}=\text{O}$  (presentes en ésteres, amidas y ácidos) coinciden con los de las nanopartículas libres, lo cual evidencia la fuerte asociación de algunos de los componentes de los extractos vegetales con el proceso de reducción y estabilización de las nanopartículas. En cambio, esto no se observa tan claramente con las nanopartículas asociadas a la tierra de diatomeas, TD2A5E, TD2A5N, TD2NA5E y TD2NA5N donde predominan los picos característicos de la TD2 estudiados previamente en el presente



Capítulo. Esto puede deberse a la fuerte asociación establecida entre las nanopartículas y el soporte silíceo y la eliminación de los fitoquímicos utilizados en el proceso de funcionalización.

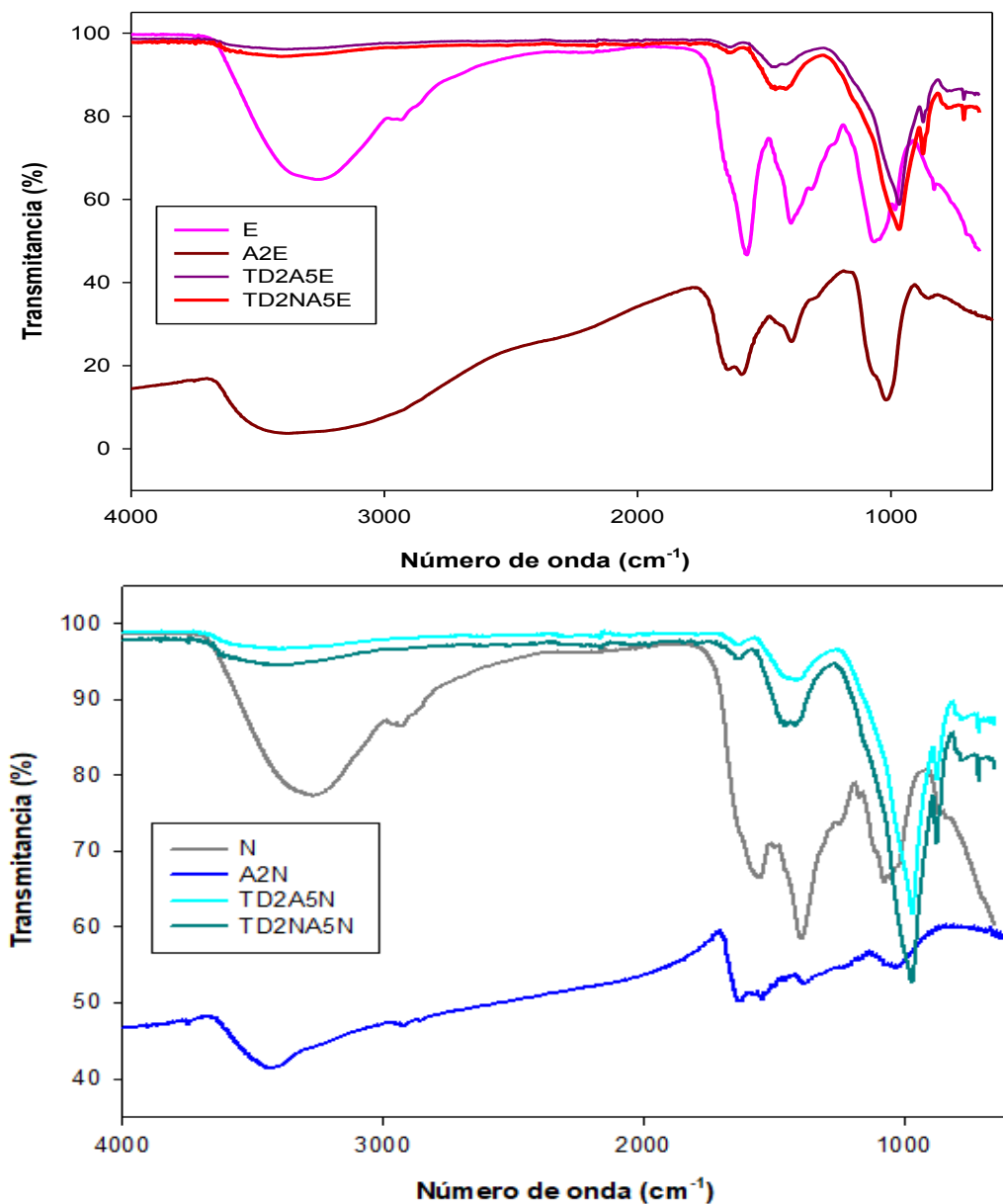


Figura 0-2 Espectros FTIR de A: E, A2E, TD2A5E, TD2NA5 y B: N, A2N, TD2A5N, TD2NA5N.

También a partir de las muestras obtenidas se realizaron observaciones mediante MEB, análisis semicuantitativos y mapeos por EDS acoplado. En la Figura 4.3-3, se puede ver la distribución elemental semicuantitativa de TD2 original, sin transformaciones previas, donde predominan los elementos oxígeno y carbono, este último también presente en el portamuestra, seguidos por silicio y aluminio en concordancia con lo que se encontró en el análisis por DRX. Además, se observan gránulos de tamaños diversos, menores a los 120  $\mu\text{m}$  con bordes irregulares.

Al realizar la misma evaluación sobre TD2A5E y TD2A5N, si bien los elementos mayoritarios continúan siendo los mismos, aparecen, además, calcio, aluminio y hierro como en la muestra original. En las Figuras 4.3-4 y 4.3-5 se puede confirmar la presencia de la plata añadida como uno de los elementos presentes. Además, se puede observar que la plata se encuentra distribuida uniformemente en la muestra. Este comportamiento se evidenció en varios campos distintos observados en todas las muestras que contenían plata. Las imágenes evidencian una mejor distribución superficial de la plata en las TDNF que tienen como reductor a E.

En las muestras obtenidas mediante el uso del extracto E el análisis a nivel superficial mostró un mayor contenido de Ag (1,4 % p/p) en comparación con las de N (0,9 % p/p) como puede verse en el resultado del análisis semicuantitativo de las Figuras 4.3-4 y 4.3-5. Esta tendencia se mantuvo cuando en el proceso se sumó el uso de la solución amoniacal como puede verse en la Figura 4.3-6.

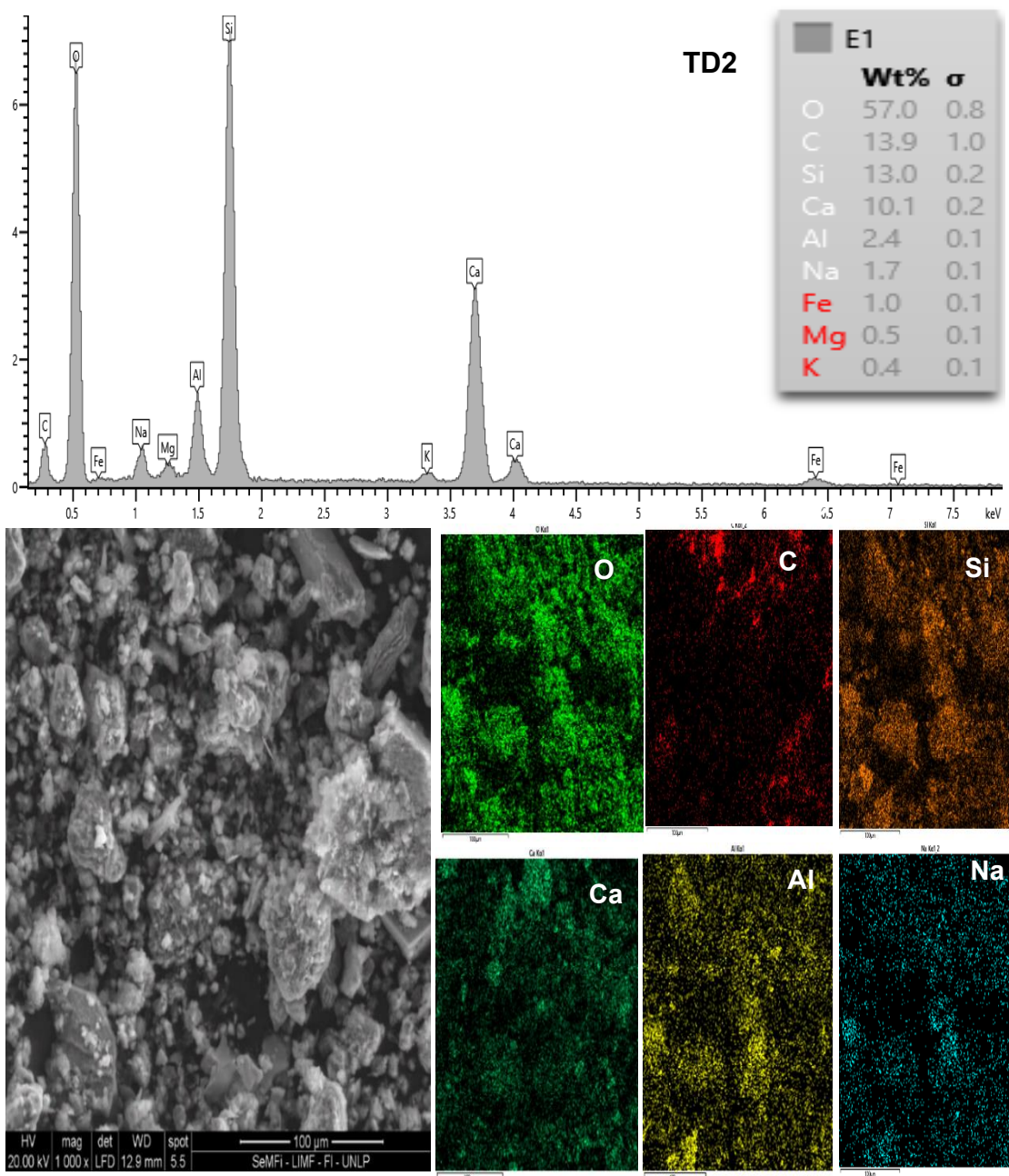
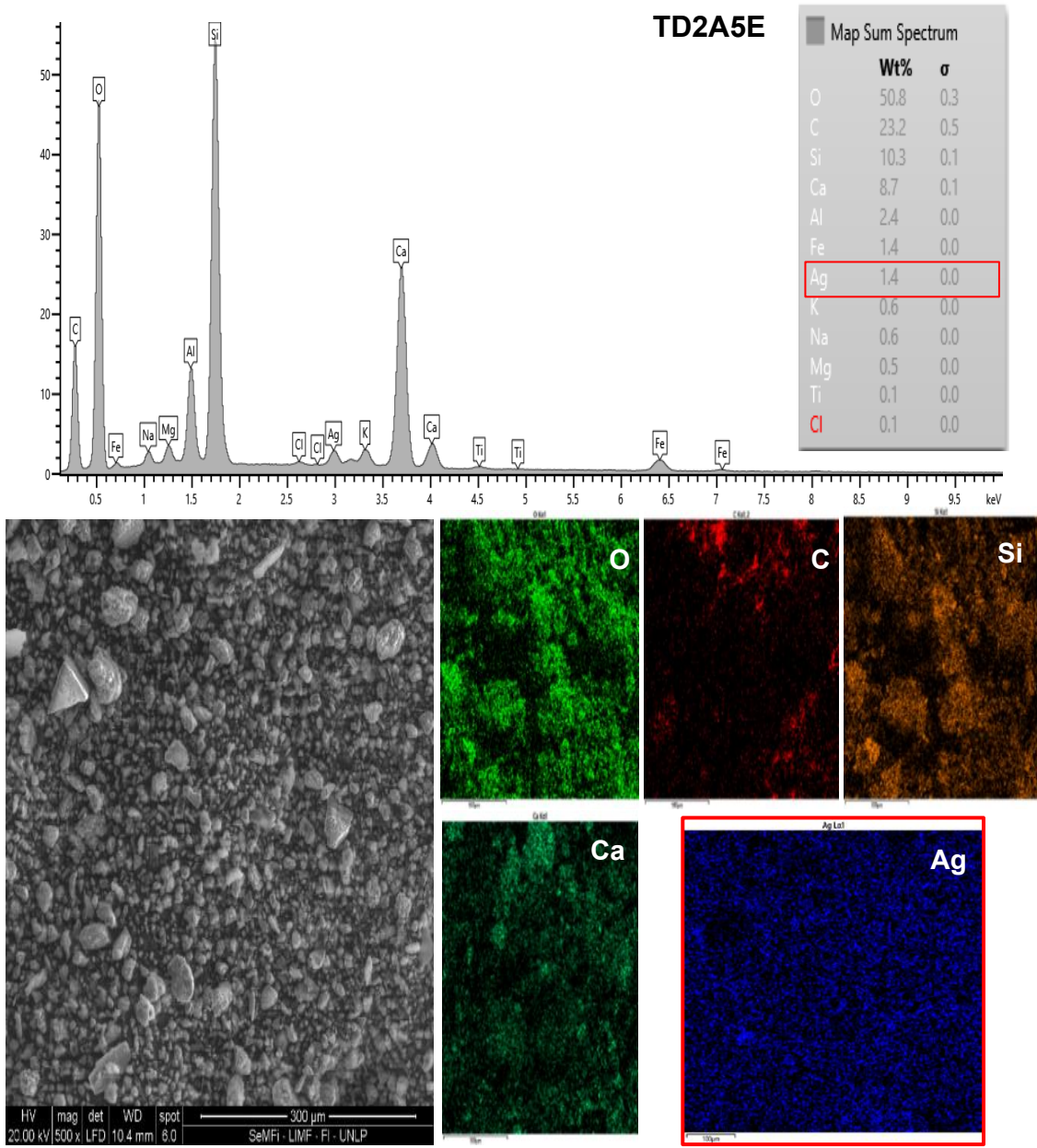
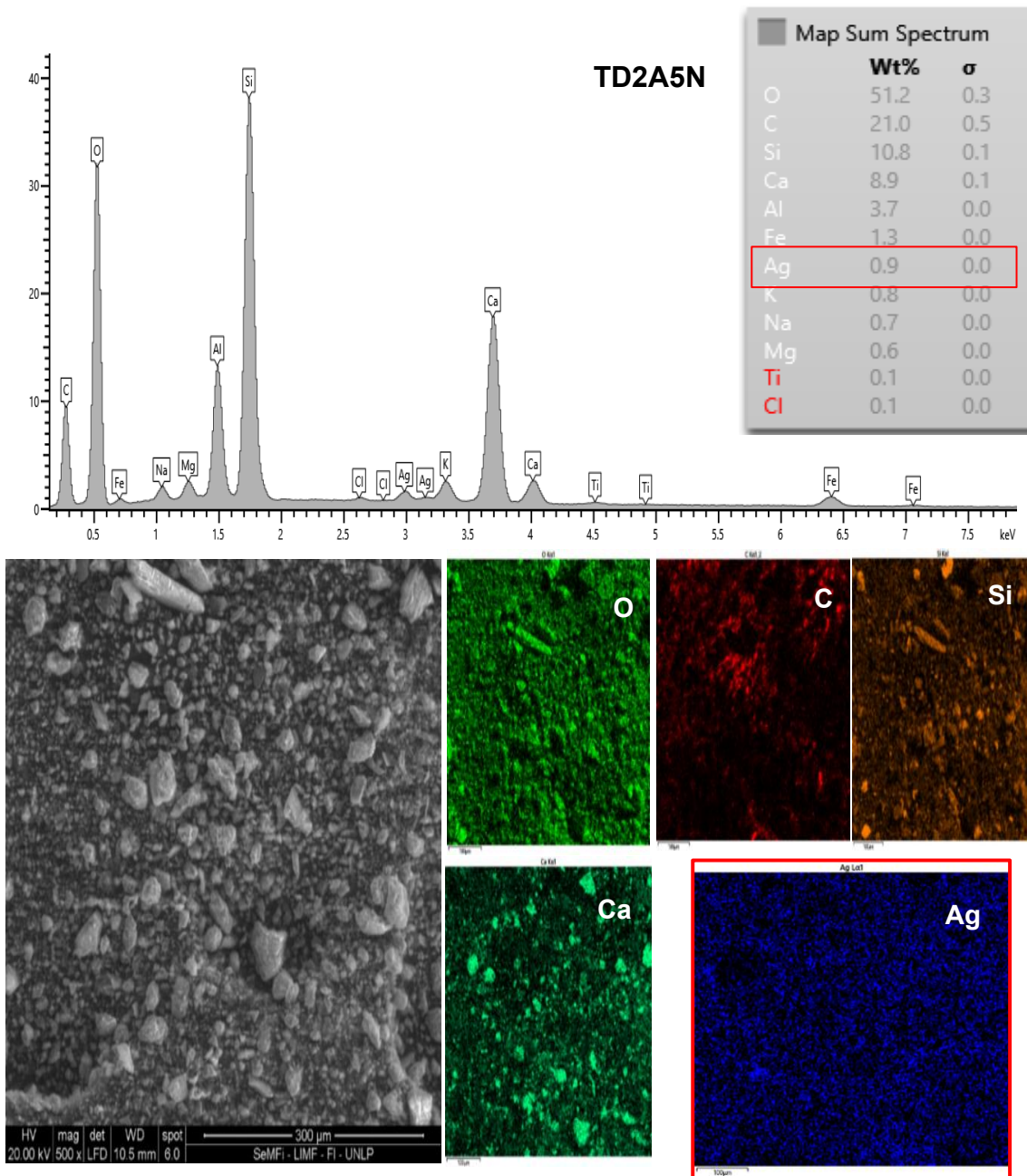


Figura 4.3-3 Micrografía MEB de TD2. Se muestra el mapeo de los elementos químicos mayoritarios señalizados por sus símbolos químicos. En la parte superior se muestra la información semicuantitativa de estos elementos.



*Figura 0-4 Micrografías MEB de TD2A5E. Se muestra el mapeo de los elementos químicos mayoritarios señalizados por sus símbolos químicos. En la parte superior se muestra la información semicuantitativa de estos elementos.*



*Figura 4.3-5 Micrografía MEB de TD2A5N. Se muestra el mapeo de los elementos químicos mayoritarios señalizados por sus símbolos químicos. En la parte superior se muestra la información semicuantitativa de estos elementos*



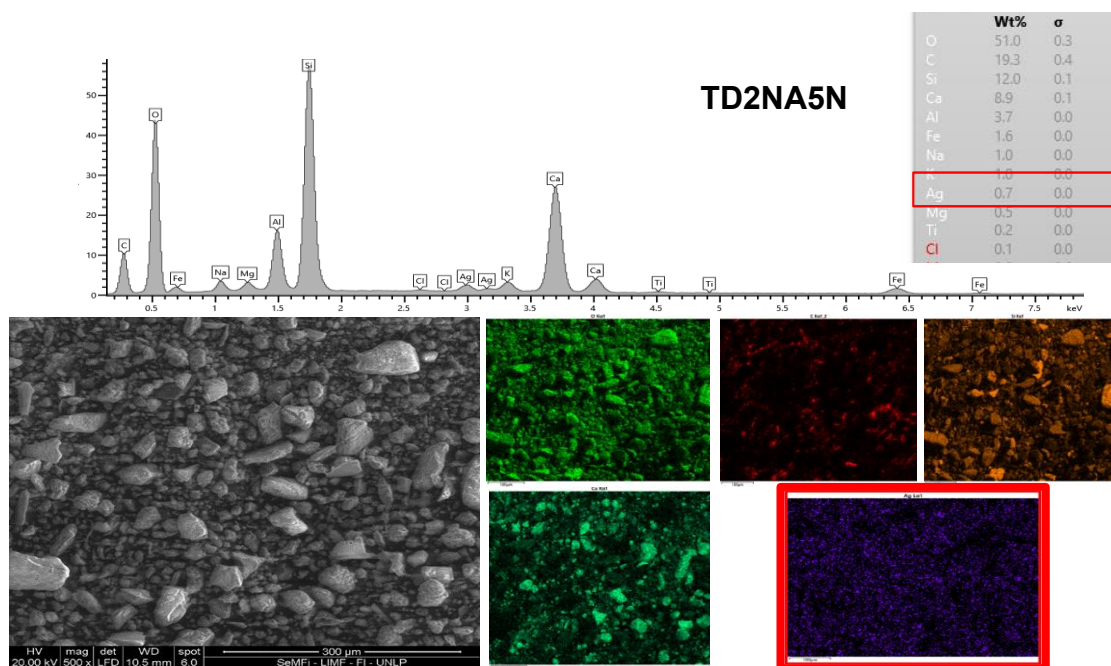
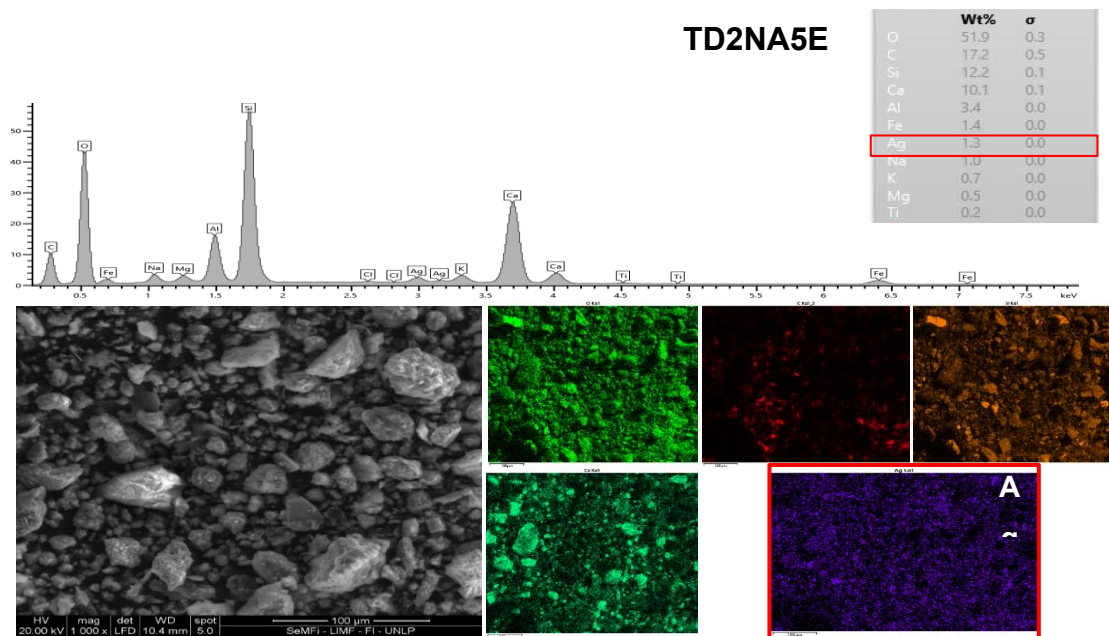


Figura 4.3-6 Fotografía electrónica MEB 270000x de la TD2A5N y TD2A5E. Se muestra el mapeo de los elementos químicos mayoritarios señalizados en las fotografías por sus símbolos químicos. En la parte superior se muestra la información semicuantitativa de estos elementos

En la Figura 0-7, se muestran las micrografías electrónicas obtenidas mediante MET de TD2A5E y TD2NA5E. Puede observarse la plata en forma de nanopartículas cuasi-esféricas asociadas a la tierra de diatomeas. En el caso de TD2A5E se pueden observar los poros conservados en la TD en forma de círculos más claros que la imagen y las nanopartículas como formas esféricas más oscuras que el resto de la imagen. En TD2NA5E se observan además muchas nanopartículas muy pequeñas entre 1 y 5nm de diámetro.

A partir de un estudio más profundo mediante el empleo de un MET que con sonda EDS acoplada, se pudieron realizar mapeos y el análisis superficial correspondiente como se muestra en la Figura 0-8. El mapeo y el espectro EDS corroboró la presencia de plata en las nanopartículas asociadas a la TDNF. En las micrografías analizadas se confirma la distribución homogénea de las nanopartículas de tamaños pequeños, generalmente menores a los 30 nm. En el mapeo de los elementos presentes en TD2NA5E, resaltan las nanopartículas en color rojo por la Ag y amarillo el Si.

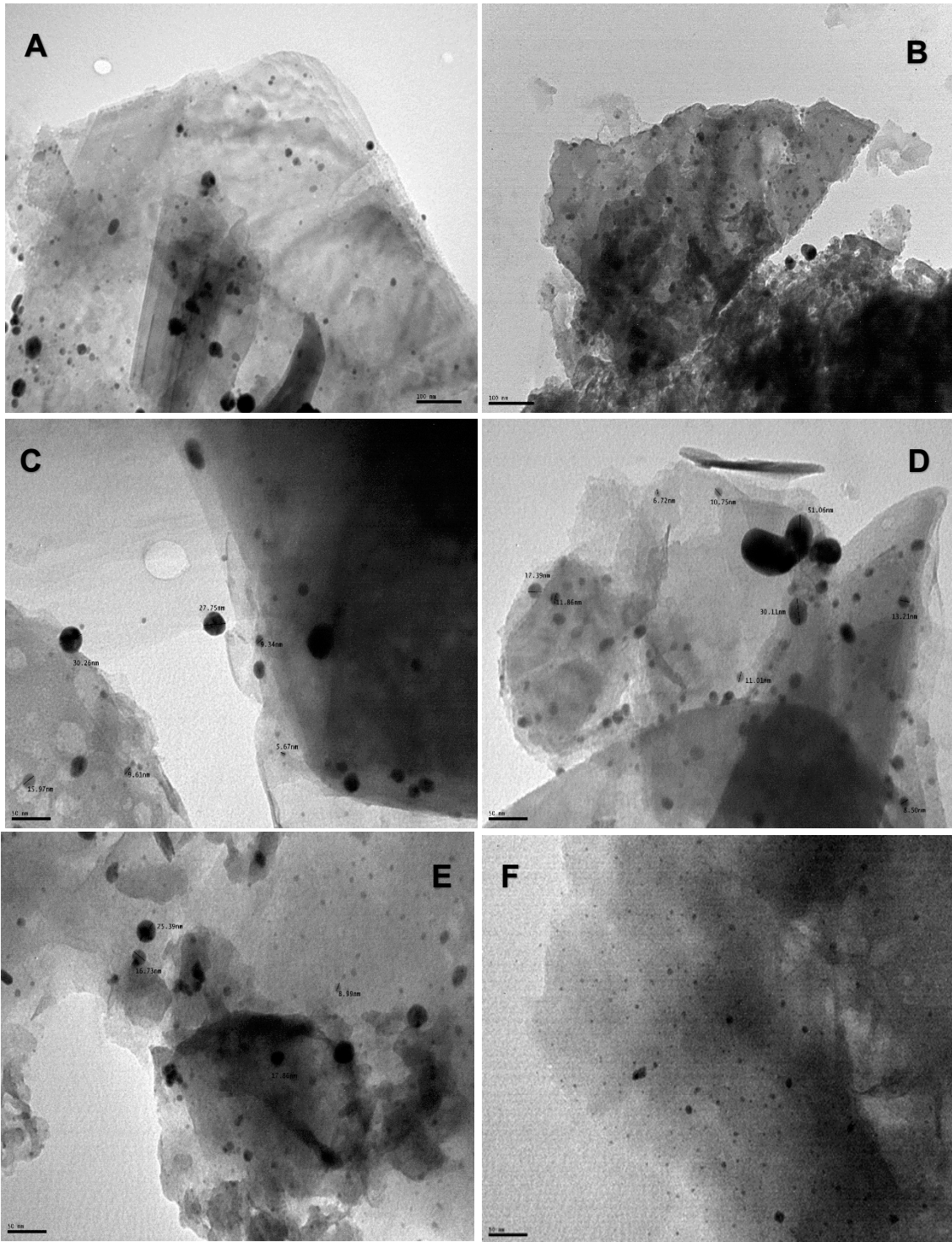


Figura 03-7 Imágenes de MET correspondientes a TD2A5E (A, C, E) y TD2NA5E(B, D y F). Aumentos 80000x (A y B) y 270000x B, C, D y E).



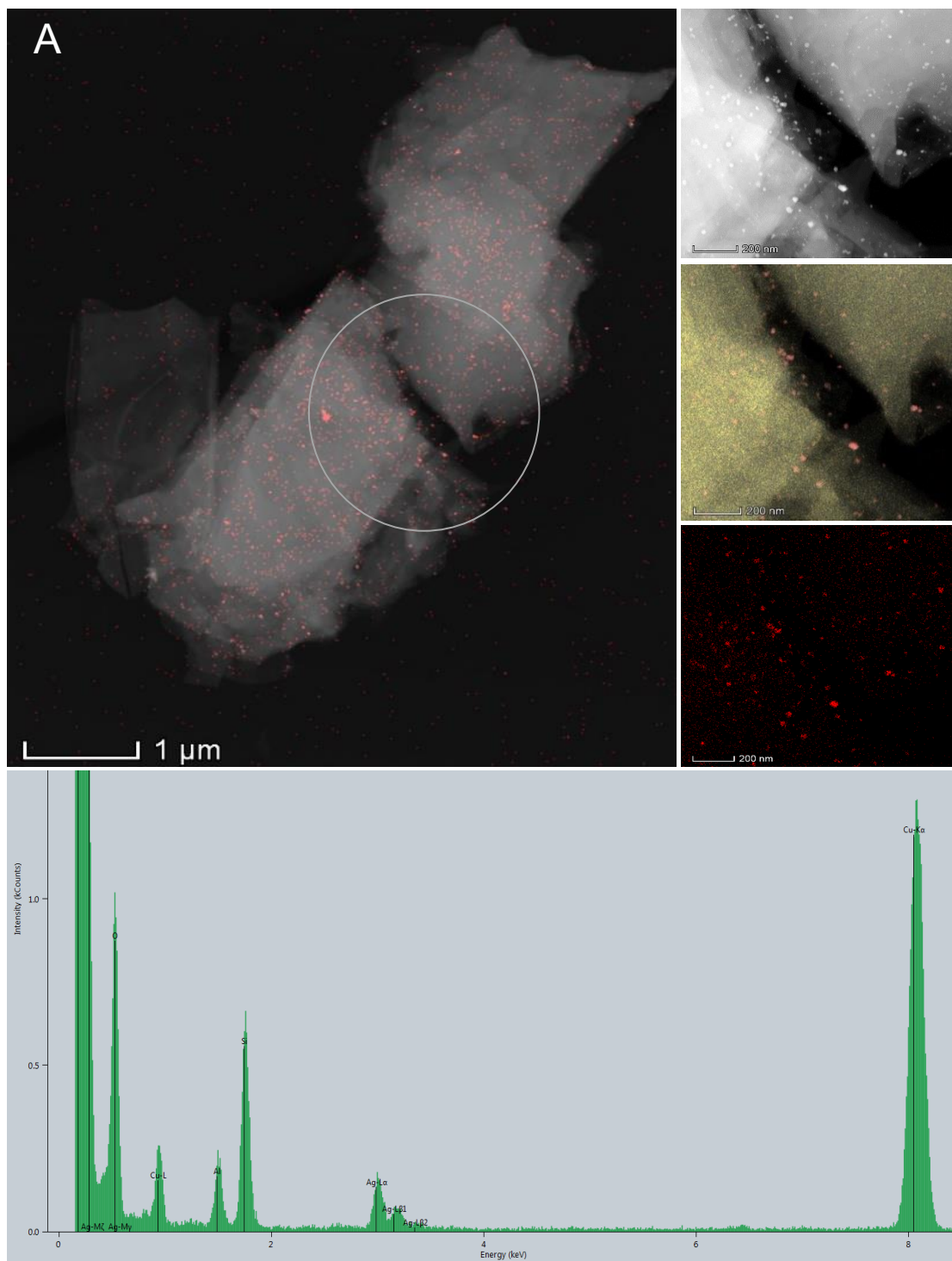


Figura 03-8 Micrografías MET con mapeo de TD2NA5E. A es un gránulo de TD2 donde las nanopartículas de plata se observan mapeadas como puntos rojos con aumento 10000x. al lado derecho se observa un acercamiento con aumentos de 40000x de la zona señalada. El segundo de ellos se mapea la plata(rojo) y el silicio(amarillo) y en el último, plata resaltada en color rojo.

#### 4.4 Potencialidades antimicrobianas

Una vez obtenidas las TD funcionalizadas se procedió con la evaluación de la actividad antimicrobiana de estas; con la finalidad de corroborar que la actividad presentada por las nanopartículas en suspensión se hubiera mantenido al estar asociadas a las tierras de diatomeas. A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir del ensayo de difusión en agar con todas las cepas evaluadas. Las medidas de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento para cada cepa se muestran en la Figura 4.4-1.

Los resultados que se muestran en la Figura 4.4-1 coinciden con los resultados obtenidos en el Capítulo 3 para las nanopartículas libres en suspensión frente a las mismas cepas. En el caso de los hongos *C. globosum* resultó ser el microorganismo más resistente mostrando crecimiento sobre los polvos en el caso de los controles TD2 y TD2\* e inhibición parcial del crecimiento, en comparación con lo anterior, frente al resto de las TDNF a pesar de no evidenciarse la presencia halos con una inhibición total del crecimiento. *A. alternata* mostró halos de inhibición con una media cercana a los 9 mm, siendo en general los hongos, los más resistentes a estos nuevos antimicrobianos.

En el caso de las bacterias, *S. aureus* se presenta como las más sensible, no obstante, los resultados del ANOVA con comparación de medias por la Prueba de Tukey mostraron que las diferencias observadas no se consideran estadísticamente significativas. No obstante, las bacterias fueron el grupo más sensible detectado por este ensayo. En cuanto a las TDs funcionalizadas se encontró actividad antimicrobiana tanto en los intermediarios como en las que ya contenían las nanopartículas reducidas.

Con estos resultados no se pudo determinar cuál de todas las nanopartículas sintetizadas era la más activa, puesto que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad. Por lo que se decidió continuar en la siguiente etapa de este trabajo probando la eficacia como biocidas en películas de pintura de las cuatro TDs nanofuncionalizadas: TD2A5E, TD2NA5E, TD2A5N y TD2NA5N.

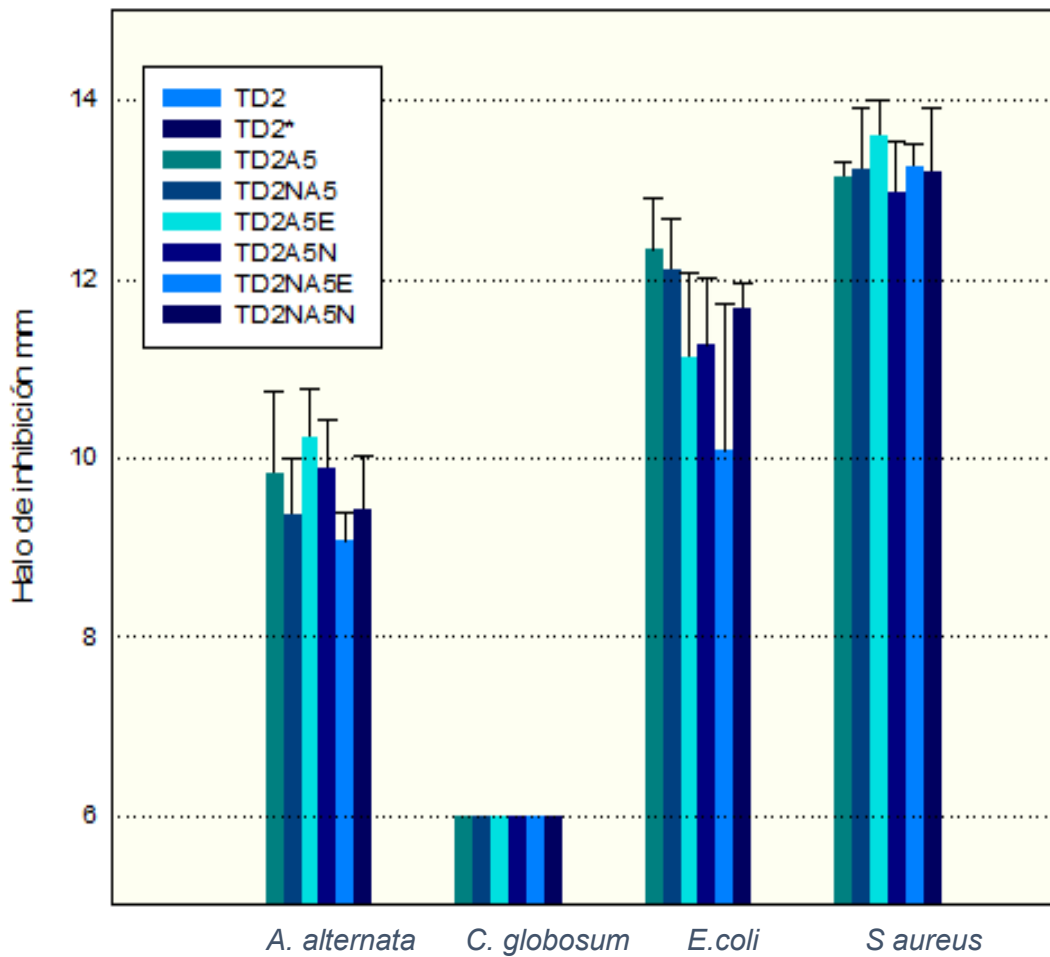


Figura 04-1 Gráfico de longitud de halo de inhibición. Obsérvese que *C. globosum* resultó más resistente que el resto de las especies probadas y *S. aureus* el más sensible.

# **Capítulo 5 – Evaluación de la actividad antimicrobiana en película**

## 5.1 Formulación y preparación de las pinturas

En esta instancia se formularon y prepararon pinturas basadas en la composición presentada en el inciso 2.5 del Capítulo 2 empleando como aditivos con acción en película (*in-film*) las nanopartículas obtenidas hasta el momento. Entre las pinturas se incluyó nuevamente la pintura control (PC) y sus variantes aditivadas con nanopartículas libres PA2E25 y PA2N25 (25 mg de Ag por cada 100 g de pintura) que resultaron más eficientes según lo estudiado en el Capítulo 3. Además, se prepararon pinturas con las TDNF seleccionadas en el Capítulo 4: TD2A5E, TD2NA5E, TD2A5N y TD2NA5N. Se substituyó una fracción del pigmento carga, carbonato de calcio, por las distintas TDNF. Entonces, se formularon pinturas con 1,67 g de TDNF por cada 100 gramos de pintura. Esta cantidad se calculó teniendo en cuenta los resultados obtenidos y, presentados en el inciso 4.2 del Capítulo 4, para homologar 25 mg de Ag por cada 100 g de pintura que habían sido exitosos en la mitigación del crecimiento microbiano de todas las cepas probadas. En tal sentido, las pinturas fueron rotuladas como P1,6TD2A5E, P1,6TD2NA5E, P1,6TD2A5N y P1,6TD2NA5N. Además, se preparó otra tanda de pinturas donde se duplicaba la concentración de las TDNF y, por tanto, la concentración de plata en las pinturas. Estas pinturas fueron rotuladas como P3,3TD2A5E, P3,3TD2NA5E, P3,3TD2A5N y P3,3TD2NA5N. También se prepararon dos pinturas que contenían las mismas cantidades de TD2 sin funcionalizar como controles, rotuladas como P1,6TD2 y P3,3TD2.

Durante la formulación y preparación de las pinturas, quedó en evidencia una de las ventajas de utilizar cargas funcionalizadas que es ampliar el rango de concentración del antimicrobiano en la pintura. Al usar las suspensiones obtenidas, la cantidad factible de nanopartículas a integrar se encuentra limitada por el agua que se puede substituir en la formulación que es menor que la de carbonato de calcio, lo cual hace este método más promisorio.

El efecto que tuvo sobre los parámetros normalizados de la pintura acuosa, la substitución de agua o carbonato de calcio, se muestran en la Tabla 5.1-1. En todos los casos se observa disminución de la viscosidad y la cantidad de agua absorbida con respecto a PC, mientras que el poder cubritivo aumentó al duplicar la cantidad de TD. En tal sentido, en el caso de P3,3TD2, se determinó que solo eran necesarias 2 capas de pintura de 75  $\mu\text{m}$  para lograr un poder cubritivo óptimo en contraste con las tres capas que se requiere del resto de las pinturas. El peso específico no mostró cambios significativos con ninguno de los

agregados. La permeabilidad al agua mostró una marcada disminución, sobre todo, pasadas 72 h, tanto en el caso de PA2N25, P1,6TD2 y P3,3TD2 en relación con la PC, esto podría propiciar una mejora de la actividad antimicrobiana, pues permite que el agua absorbida se evapore rápidamente y no quede retenida entre el recubrimiento y la pared propiciando el crecimiento de los hongos. El grado de molienda, es menor en el caso de P3,3TD2, esto podría deberse a la mayor cantidad de TD2 que contiene esta pintura. No obstante, los parámetros se encuentran dentro de lo sugerido por la norma IRAM 119.

*Tabla 5.1-1 Resultados de los ensayos específicos para pinturas.*

	PC	PA2N25	P1,6TD2	P3,3TD2
Viscosidad de Stormer UK	88,4	77,6	82,5	84,3
Absorción de Agua (%p/p)	10,05	8,7	7,8	10,5
Poder cubritivo satisfactorio (cantidad de capas de 75 $\mu\text{m}$ )	3	3	3	2
Peso específico	1,41	1,40	1,39	1,39
Permeabilidad al agua 24h ( $\text{g.cm}^{-2}$ )	0,182	0,105	0,150	0,129
Permeabilidad al agua 48h ( $\text{g.cm}^{-2}$ )	0,364	0,160	0,322	0,258
Permeabilidad al agua 72h ( $\text{g.cm}^{-2}$ )	0,605	0,221	0,483	0,397
Grado de molienda ( $\mu\text{m}$ )	70-80	70-80	70-80	60-70

## 5.2 Características de las películas de pintura

Las pinturas fueron aplicadas sobre portaobjetos de vidrio en un esquema de 3 capas, en las Tablas 5.2-1 y 5.2-2 se muestran registros fotográficos de las pinturas luego de 24 h y 180 días, respectivamente. La primera corresponde a los controles y pinturas con TD2 sin funcionalizar, mientras que, en la segunda, se muestran las pinturas con las TDNF. En la

primera fila de cada tabla se encuentran las pinturas con el aspecto que tenían luego de 24 horas de aplicada la tercera capa y en la segunda fila, pasados los 180 días.

En la Tabla 5.2-2, se observa en la primera columna las pinturas PA2E25 y PA2N25 estas son las pinturas que fueron aditivadas con las nanopartículas libres. En la segunda columna se encuentran las pinturas aditivadas con 1,6 g de TD2A5E y TD2A5N y en la tercera, las aditivadas con TD2NA5E y TD2NA5N, cada 100 gramos de pintura. En la cuarta y quinta columna se repite el mismo orden que en la segunda y tercera pero aditivadas con 3,3 g. En la primera y segunda fila de cada tabla se encuentran las pinturas con el aspecto que tenían pasadas las 24 horas de curado desde la tercera capa y en la tercera y cuarta fila, pasados los 180 días. Como puede verse en la Tabla 5.2-2 pasados los 180 días de exposición o envejecimiento la tonalidad de las pinturas que contenían nanopartículas de plata se modificaba en forma apreciable.

*Tabla 5.2-1 Muestras de películas de pintura control con y sin TD2 sin funcionalizar luego de  $t_0$ : 24 horas y  $t_6$ : 6 meses de aplicadas.*




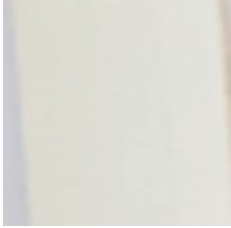

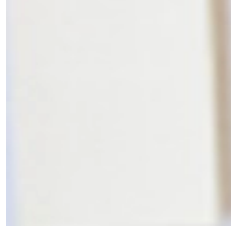

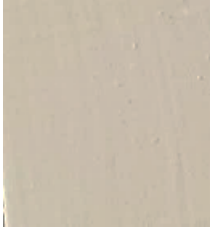


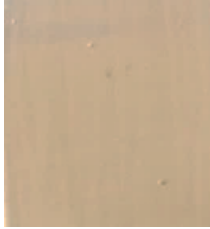
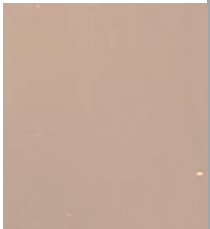













$t_0$	 PC	 P1,6TD2	 P3,3TD2
$t_6$	 PC	 P1,6TD2	 P3,3TD2

Tabla 5.2-1 Muestras de películas de pintura aditivadas con nanopartículas libres y TDNF luego de  $t_0$ : 24 horas y  $t_6$ : 6 meses de aplicadas.

		Concentración 1,6		Concentración 3,3	
$t_0$					
	PA2E25	P1,6TD2A5E	P1,6TD2NA5E	P3,3TD2A5E	P3,3TD2NA5E
$t_0$					
	PA2N25	P1,6TD2A5N	P1,6TD2NA5N	P3,3TD2A5N	P3,3TD2NA5N
$t_6$					
	PA2E25	P1,6TD2A5E	P1,6TD2NA5E	P3,3TD2A5E	P3,3TD2NA5E
$t_6$					
	PA2N25	P1,6TD2A5N	P1,6TD2NA5N	P3,3TD2A5N	P3,3TD2NA5N
AgNPs		TDNF			



### **5.3 MEB de las películas de pintura**

Las muestras fueron observadas y analizadas mediante MEB y EDS con el objetivo de estudiar las características superficiales en mayor profundidad. Las imágenes de MEB se obtuvieron con muestras sin envejecimiento (15 días de curado) y envejecidas (180 días de aplicadas). Las condiciones de envejecimiento natural fueron detalladas en el inciso 2.13 del Capítulo 2.

No se observan diferencias apreciables en la apariencia de las películas entre sí con un mismo grado de exposición, como queda evidenciado en las micrografías presentadas en las Figuras 5.3-1, 5.3-2 y 5.3-3. Se hizo mapeo y el análisis semicuantitativo de los elementos mediante EDS y en ninguno de los campos observados de ninguna de las pinturas se pudo detectar la plata agregada, siendo que el equipo detecta hasta el 0,3% en masa de los elementos superficiales. Los principales elementos detectados en todas las películas fueron oxígeno, carbono y calcio, además de magnesio y titanio en concordancia con su formulación. El silicio superó el 1% solamente en las películas que contenían las TDNF, en el resto se encontraron trazas de silicio aproximadamente del 0,3%.

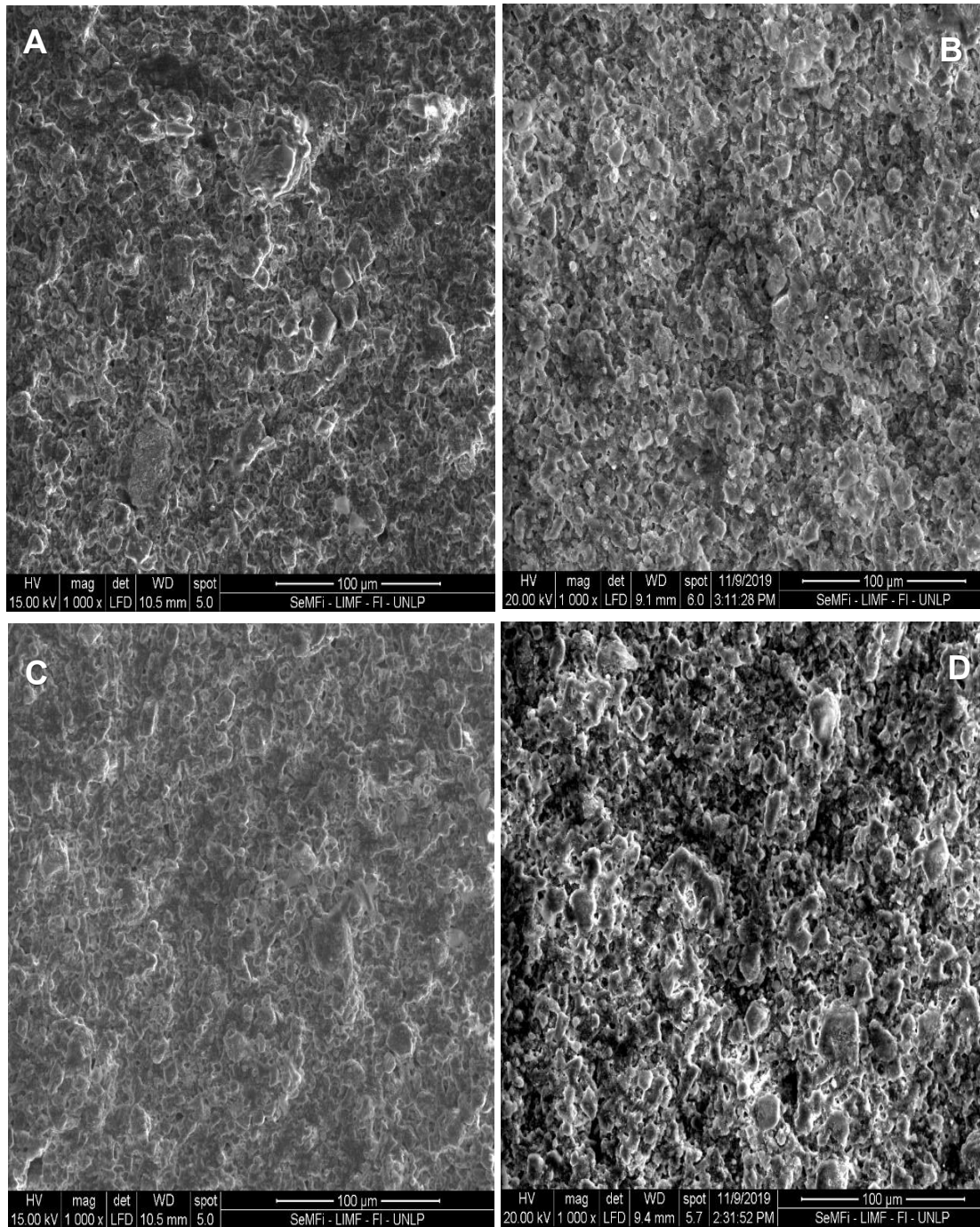


Figura 5.3-1 Micrografías MEB: PC (A,B) y P1,6TD2 (C,D) sin (izquierda) y con envejecimiento (derecha).



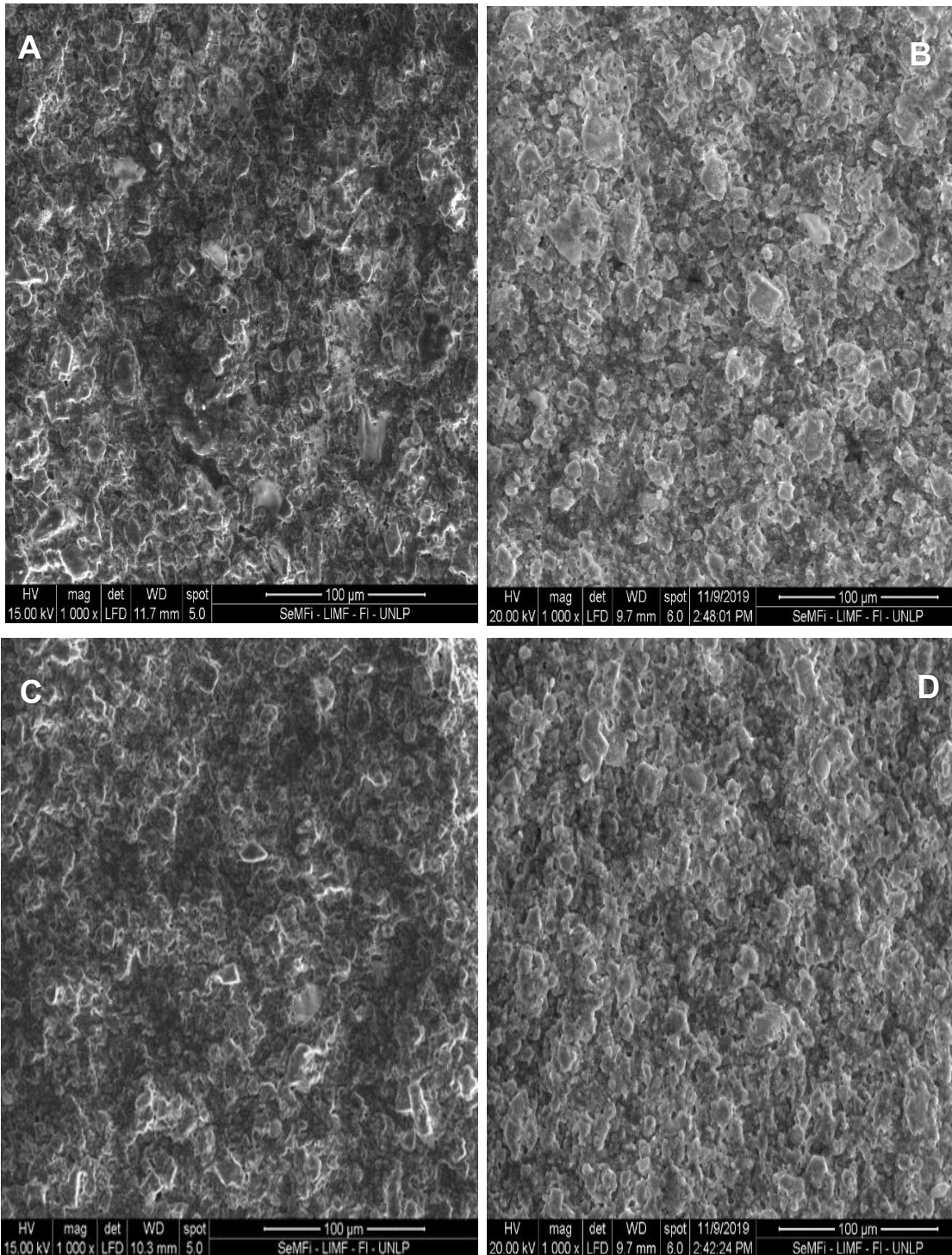


Figura 5.3-2 Micrografías MEB: PA2E25 (A,B) y PA2N25 (C,D) sin (izquierda) y con envejecimiento (derecha).

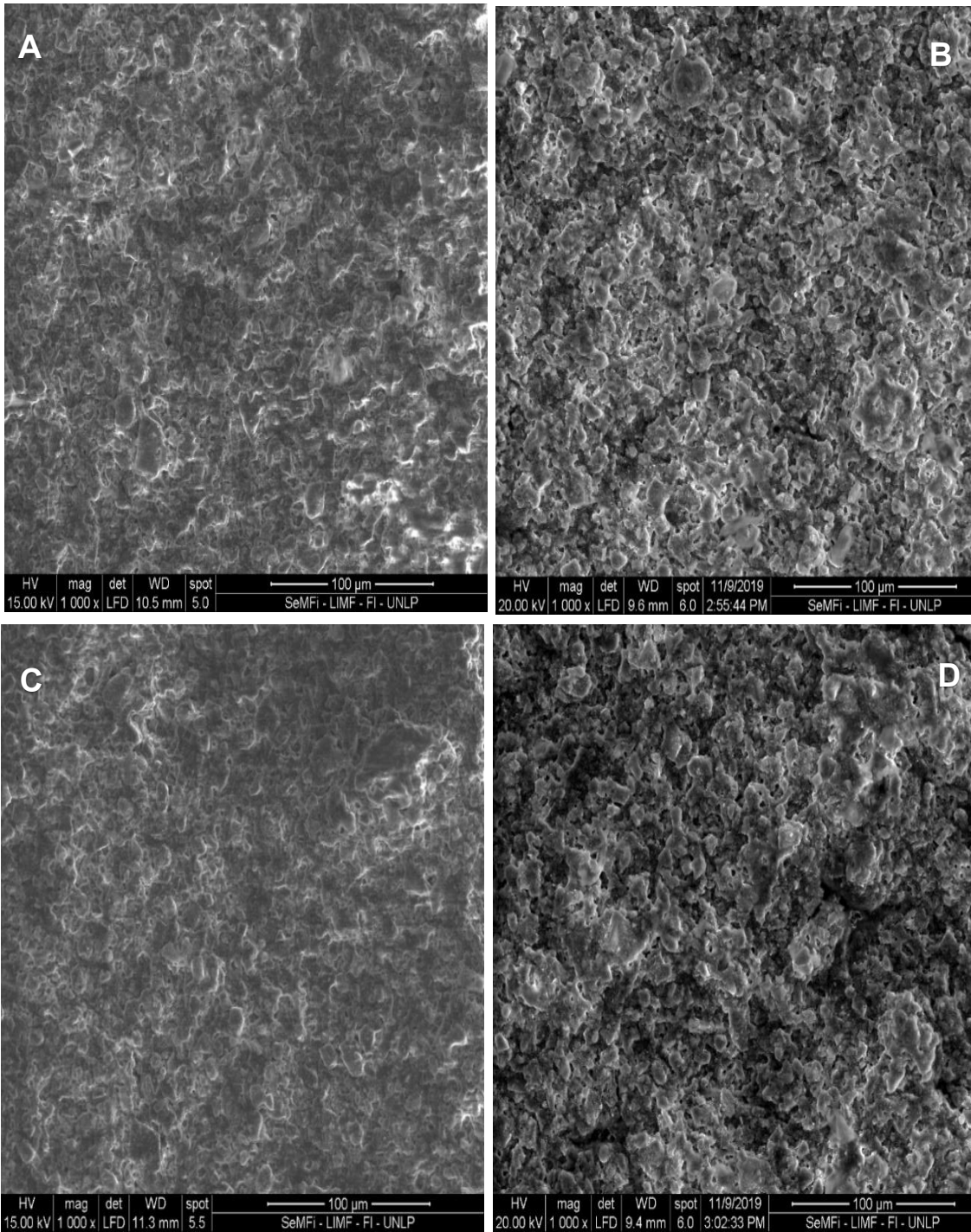


Figura 5.3-3 Micrografías MEB: P1,6TD2NA5E (A,B) y P3,3TD2NA5E (C,D) sin (izquierda) y con envejecimiento (derecha).



## 5.4 FTIR de las películas de pintura

Los espectros de FTIR de las películas de pintura con y sin envejecimiento se muestran en la Figura 5.4-1. En todos aparecen bandas y picos fundamentales propios de los grupos funcionales presentes en los componentes de las pinturas. Los picos  $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$  se relaciona con los enlaces C-H presentes en los componentes orgánicos de la formulación (resina y aditivos).

El pico  $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo (C=O) que se encuentra en la resina acrílica se puede ver en todos los casos al igual que aquellos correspondientes al carbonato en  $1442$ ,  $880$  y  $730\text{ cm}^{-1}$ . Se observa generalmente que la intensidad de los picos correspondientes a los grupos oxigenados, C=O y COO<sup>-</sup>, aumenta ante el agregado de nanopartículas libres y TDNF en las muestras sin envejecimiento como puede verse en la Figura 5.4-1 A, B y C. Este efecto se revierte con el envejecimiento al ver los espectros de la PC y las muestras con nanopartículas libres, Figura 5.4-1 D, lo cual puede atribuirse a un mayor grado de oxidación en el caso de la PC. En tal sentido, en el caso de las pinturas con la TDNF se observa menor variación entre ellas luego del envejecimiento, Figura 5.4-1 E y F.

Por otro lado, en los espectros aparecen otros dos picos en  $1064$  y  $962\text{ cm}^{-1}$  que pueden relacionarse con el enlace N-C presente en uno de los aditivos utilizados cuya función es la de regular el pH del sistema disperso.

La aparición de una banda en la región de  $3600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$  se asocia con grupos OH. Esta se observa con mayor intensidad en las pinturas sin envejecimiento y en todos los casos disminuye luego del envejecimiento lo cual puede estar relacionado con una menor cantidad de agua asociada a los recubrimientos luego de la exposición en un ambiente de interior en las condiciones normales.

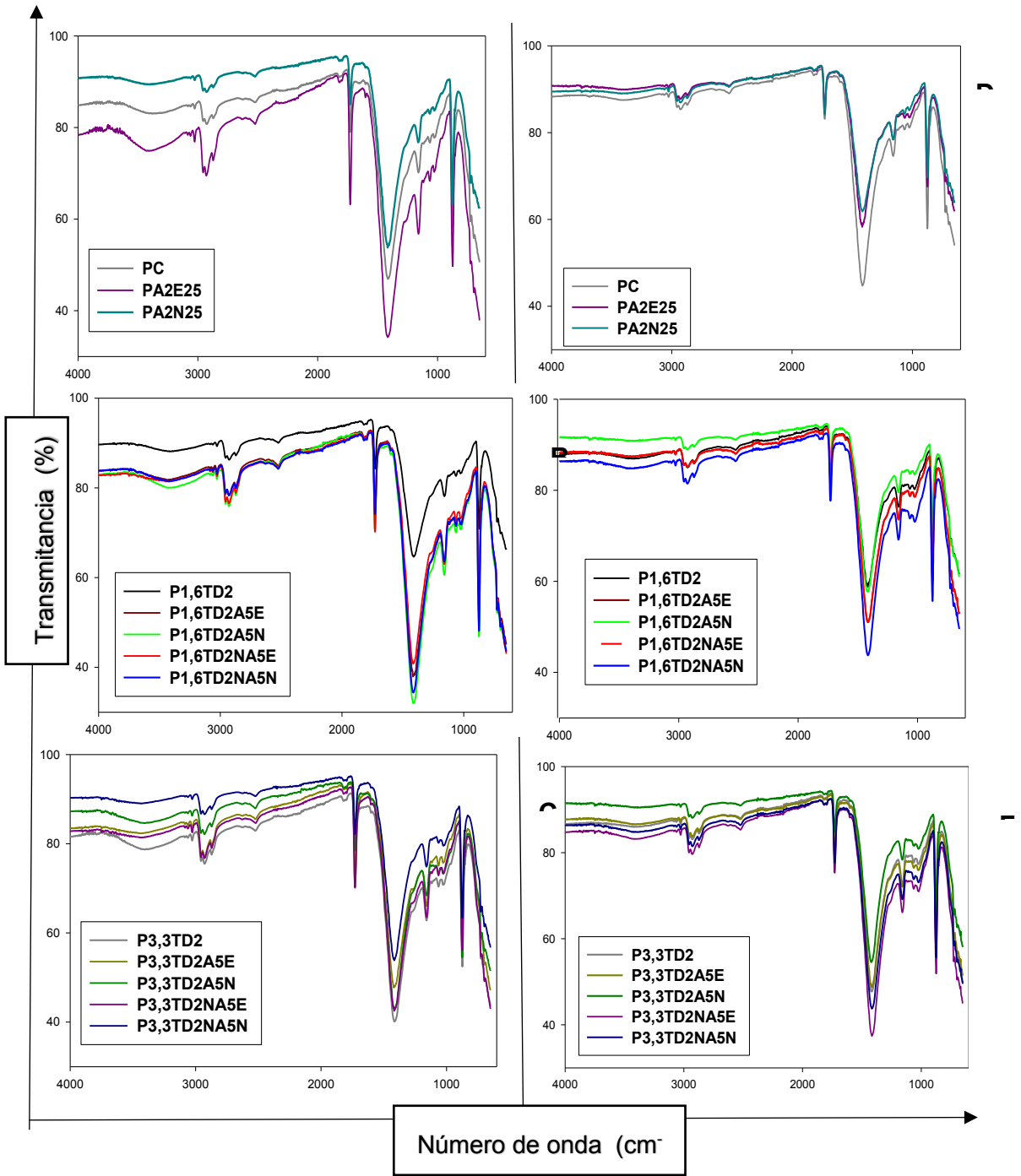


Figura 5.4-1 Espectros FTIR correspondientes a las películas de pintura de todas las muestras estudiadas: A, B y C sin envejecimiento; D, E y F envejecidas.

## 5.5 Cambio de color en las películas de pintura

Para continuar con los estudios de los efectos del envejecimiento sobre las películas de pintura con los aditivos en estudio se realizó la determinación de los cambios de color ( $\Delta E$ ) según el procedimiento detallado en el inciso 2.14.3 del Capítulo 2. Los resultados se muestran a continuación en las Figuras 5.5-1 y 5.5-2.

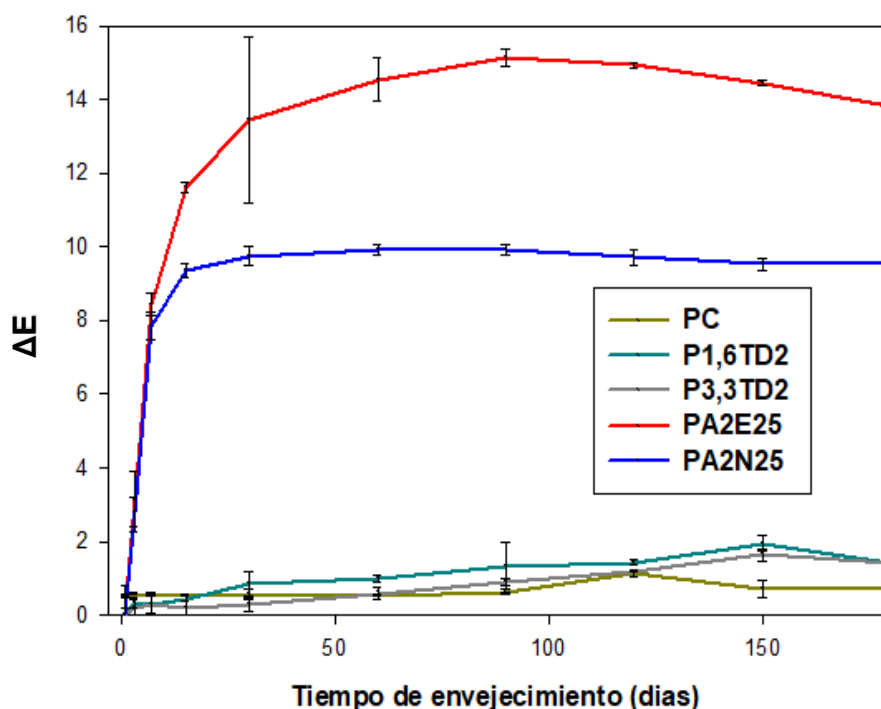


Figura 5.5-1 Cambio de color ( $\Delta E$ ) en función del tiempo de las películas de pintura: PC, P1,6TD2, P3,3TD2, PA2E25 y PA2N25.

Teniendo en cuenta la clasificación del cambio de color que se muestra en el Capítulo 2, la PC transcurridos los 6 meses de envejecimiento experimentó un cambio de color clasificado como “leve”. Como puede verse en la Figura 5.5-1 los controles con tierra de diatomeas (P1,6TD2 y P3,3TD2) mostraron un comportamiento similar al de la PC con un cambio de color entre “muy leve” y “leve”. En cambio, el agregado de las nanopartículas de plata produjo cambios significativos. PA2N25 registró un cambio “grande” mientras que el cambio de color en PA2E25 fue “muy grande” según el criterio de clasificación utilizado. En estos dos últimos casos, la pendiente más abrupta, se observa en el gráfico en el tramo correspondiente a los primeros 15 días de envejecimiento, sugiriendo que en esta etapa ocurre el mayor cambio de color en las películas de pintura. Se observa además que la adición de A2E (nanopartículas obtenidas a partir de extracto de *Equisetum giganteum* L.)

produjo un cambio de color mayor que la adición de las nanopartículas A2N obtenidas a partir de extracto de *Senna occidentalis*.

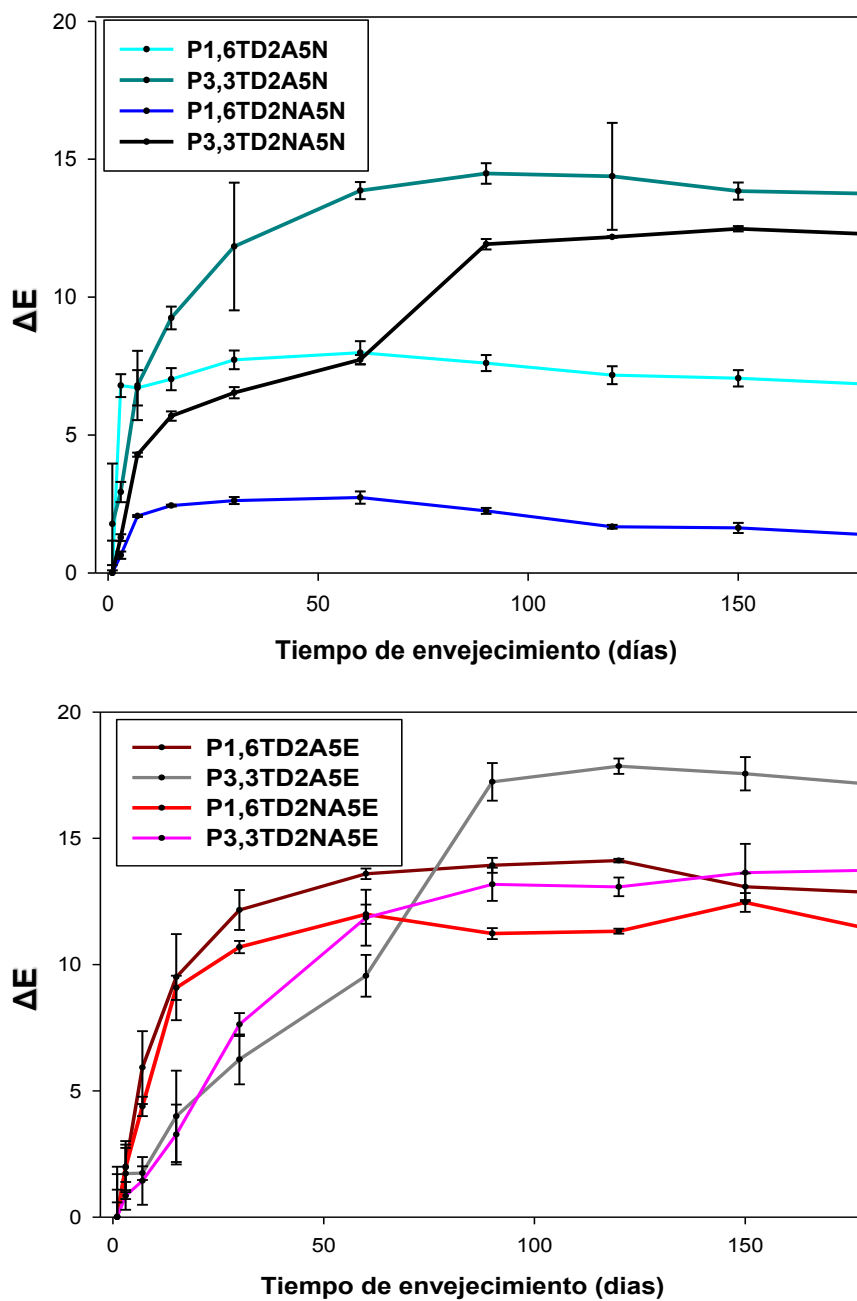


Figura 5.5-2 Cambio de color ( $\Delta E$ ) en función del tiempo de las películas de pintura: P1,6TD2A5E, P3,3TD2A5E, P1,6TD2NA5E, P3,3TD2NA5E, P1,6TD2A5N, P3,3TD2A5N, P1,6TD2NA5N y P3,3TD2NA5N.



En el caso de las pinturas aditivadas con TDNF donde el agente reductor es *Senna occidentalis* (N) los resultados se presentan en la Figura 5.5-2 A y se confirma que el cambio de color es menor que el obtenido con la pintura con nanopartículas libres (PA2N25) cuyo  $\Delta E$  final es de 9,58. En tal sentido, P1,6TD2A5N exhibe un  $\Delta E$  final de 6,85 por lo que su variación de color según los cálculos estadísticos es significativamente menor que PA2N25. Sin embargo, el  $\Delta E$  de P1,6TD2NA5N (pintura con la TDNF cuyo proceso de síntesis se daba en medio amoniacal) exhibe una disminución estadísticamente significativa en comparación con los dos anteriores y la clasificación es de un cambio de color “muy leve”  $\Delta E$  final menor a 0,5, esta clasificación es la misma en las que entran las películas que no fueron aditivadas con nanopartículas, graficadas en la Figura 5.5-1.

Al duplicar el contenido de la TDNF, P3,3TD2A5N y P3,3TD2NA5N los  $\Delta E$  finales aumentan significativamente a 13,75 y 12,28, respectivamente ( $\Delta E$  clasificado como “muy grande”) superando a las pinturas con menor contenido de plata (PA2N25, P1,6TD2A5N y P1,6TD2NA5N). No obstante, se mantiene la tendencia en relación con que las pinturas aditivadas con TD2NA5N, experimentan un menor cambio de color que aquellas que contienen los aditivos sin el tratamiento en medio amoniacal.

En el caso de las pinturas aditivadas con la TDNF donde el agente reductor es *Equisetum giganteum* L. cuyos resultados se muestran en la Figura 5.5-2 B observamos una marcada disminución en la pendiente experimentada por el cambio de color en los primeros 60 días de exposición al comparar entre la pintura con las nanopartículas libres, PA2E25, y la pintura con TD2A5E (P1,6TD2A5E). PA2E25 presentó un  $\Delta E$  final igual a 13,82 mientras que para P1,6TD2A5E fue de 12,82 (clasificado como “muy grande”) por lo cual la variación de color final entre ambas según los cálculos estadísticos no exhibe diferencias significativas. Sin embargo, el  $\Delta E$  de P1,6TD2NA5E cuyo valor es 11,39 exhibe una disminución estadísticamente significativa en comparación con los anteriores mostrando una tendencia similar a la mencionada previamente en cuanto a la síntesis con el agregado del medio amoniacal.

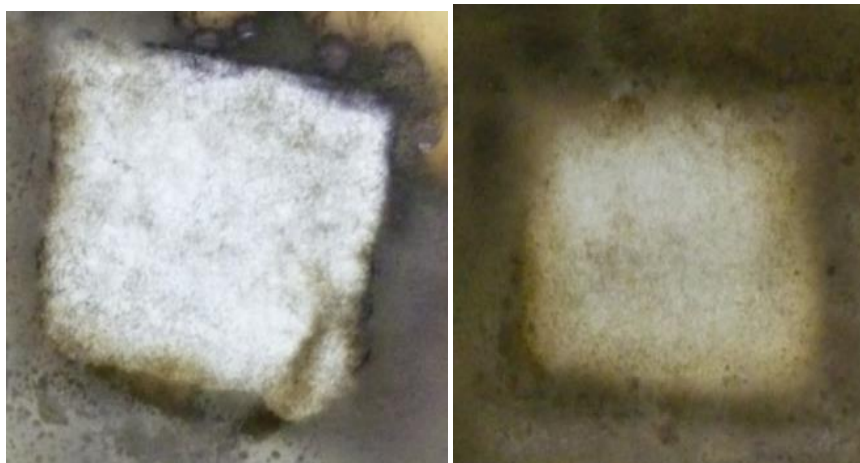
En los casos de P3,3TD2A5E y P3,3TD2NA5E cuyos  $\Delta E$  finales corresponden a 17,14 y 13,73, respectivamente. El cambio de color final es clasificado como “muy grande”, en ambos casos, no obstante, la diferencia que establecen indica que P3,3TD2NA5E cambia menos su color original en el tiempo que P3,3TD2A5E, lo cual resultó estadísticamente

significativa. Además, se mantiene el hecho de que las pinturas aditivadas con TD2NA5E (síntesis con agregado del medio amoniacal) experimentan un menor cambio de color.

Por lo tanto, según lo presentado en las Figuras 5.5-1 y 5.5-2 se concluye que en general las pinturas aditivadas con TD2A5, con cualquiera de los dos reductores, son las que experimentan menores cambios en el color original en comparación a las que contienen las nanopartículas libres teniendo en cuenta concentraciones de plata. Además, se pudo determinar que el uso en la síntesis del medio amoniacal disminuye en gran medida los cambios de color en ambas concentraciones y con ambos extractos. Por otro lado, los cambios más significativos ocurren por lo general durante las primeras semanas de exposición, teniendo en cuenta concentraciones menores de plata, dado que por ejemplo en el caso de P3,3TD2A5E, la pendiente de la curva sugiere cambios importantes hasta pasados los dos meses de exposición.

### **5.6 Actividad antimicrobiana de las películas de pintura**

En esta instancia se estudiaron las potencialidades antimicrobianas de las muestras de películas de cada una de las pinturas con y sin envejecimiento. Para ello se aplicó nuevamente la norma ASTM D-5590 frente a *A. alternata* y *C. globosum*, además se incorporó a la evaluación la cepa *A. fumigatus*. Los resultados mostraron una disminución del crecimiento fúngico en todas las pinturas que contenían los aditivos obtenidos en los capítulos anteriores. Las únicas películas que mostraron crecimiento abundante fueron los controles. El criterio de evaluación seguido fue el propuesto por la mencionada norma. Registros fotográficos y las calificaciones promedio de las muestras se presentan en las Figuras 5.6-1, 5.6-2, 5.6-3, 5.6-4, 5.6-5 y 5.6-6.



*Figura 5.6-1 Registros fotográficos de muestras de la PC expuestas al crecimiento de *A. alternata* sin envejecimiento (izquierda) y con envejecimiento previo(derecha). En ambos casos calificadas con 4.*

La Figura 5.6-1, muestra el crecimiento de *A. alternata* sobre muestras PC sin envejecimiento y con envejecimiento al finalizar el ensayo de un mes en placa. El crecimiento registrado en estas muestras control fue abundante (calificado como 4) con la cobertura del 100% de la superficie en ambos casos. En las muestras envejecidas se observó un crecimiento aún más invasivo sobre el material que puede estar relacionado con la previa exposición de las de las películas de pintura. Los resultados obtenidos con los controles con TD2 sin funcionalizar fueron similares.

En la Figura 5.6-2 se muestran los registros fotográficos de todas las muestras de pinturas estudiadas expuestas al crecimiento de *A. alternata* junto con la clasificación correspondiente en base a la norma ASTM D-5590. La Figura 5.6-2 muestra que, en general, se evidenció la disminución del crecimiento de *A. alternaria* al comparar las pinturas con los antimicrobianos en estudio y los controles y, en algunos casos el efecto inhibitor se mantuvo luego del envejecimiento.


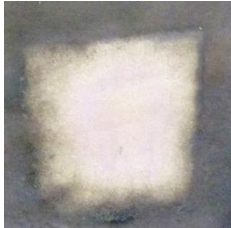
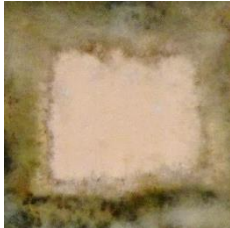
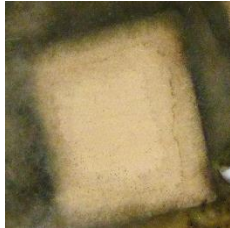


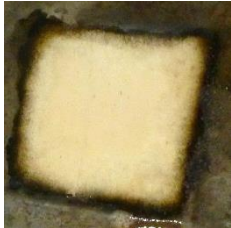
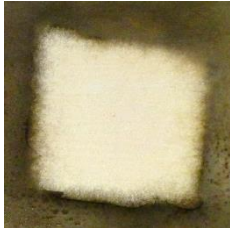
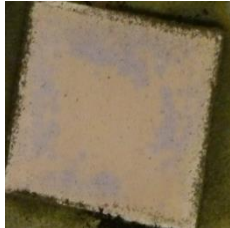

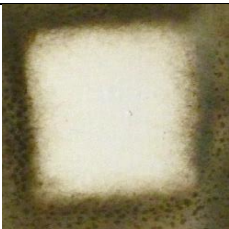
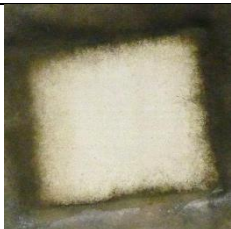








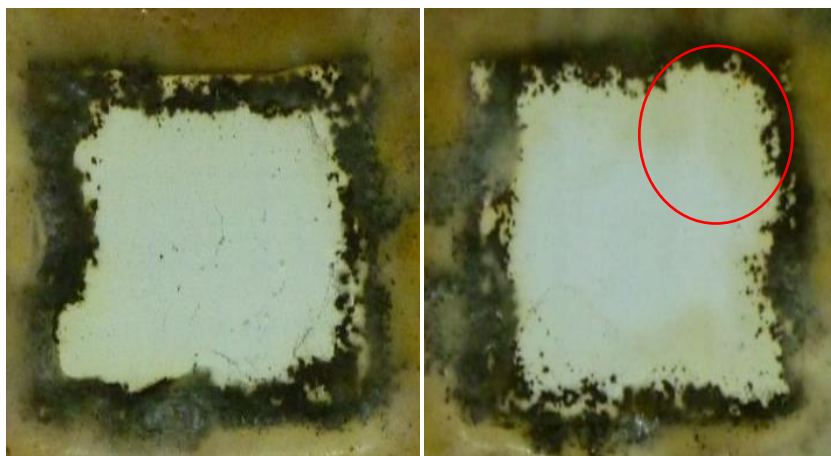
		Concentración 1,6%p/p			Concentración 3,3%p/p	
Aa	$t_0$	 PA2E25 [2]	 P1,6TD2A5E [2]	 P1,6TD2NA5E [2]	 P3,3TD2A5E [2]	 P3,3TD2NA5E [2-3]
	$t_6$	 PA2N25 [2]	 P1,6TD2A5N [1-2]	 P1,6TD2NA5N [1-2]	 P3,3TD2A5N [2]	 P3,3TD2NA5N [2-3]
Aa	$t_6$	 PA2E25 [2]	 P1,6TD2A5E [2]	 P1,6TD2NA5E [2]	 P3,3TD2A5E [3]	 P3,3TD2NA5E [2-3]
	$t_6$	 PA2N25 [2-3]	 P1,6TD2A5N [2]	 P1,6TD2NA5N [1-2]	 P3,3TD2A5N [3]	 P3,3TD2NA5N [2-3]

Figura 5.6-2 Registros fotográficos de muestras expuestas al crecimiento de *A. alternata* con ( $t_6$ ) y sin ( $t_0$ ) envejecimiento. Entre corchetes: calificación promedio de las muestras evaluadas.

Entre los registros obtenidos se constató la inhibición del crecimiento fúngico por parte de las muestras que contenían las TDNF: P1,6TD2A5E, P1,6TD2A5N, P1,6TD2NA5N y P1,6TD2NA5E, obteniendo calificaciones ~ 2. Entre estas P1,6TD2NA5N se destacó con una calificación de 1-2. Mayormente el grado de inhibición se mantuvo para estas muestras luego del envejecimiento, a diferencia de lo que ocurrió con las muestras de pinturas con las nanopartículas libres obtenidas a partir de *Senna occidentalis*, PA2N25, las cuales mostraron una disminución en la eficiencia antifúngica (calificación 2-3). Esto muestra otra ventaja de incorporar las nanopartículas asociadas a un soporte adecuado para mantener la actividad antimicrobiana en el tiempo.

A diferencia de lo esperado, el aumento de la cantidad de TDNF en las pinturas, no aumentó la actividad antifúngica de estas como puede verse en los resultados mostrados en la Figura 5.6-2.



*Figura 5.6-3 Registros fotográficos de muestras de la PC expuestas al crecimiento de C. globosum sin envejecimiento (izquierda) y con envejecimiento previo (derecha), calificadas con 3 y 4, respectivamente. En el círculo rojo se destaca el cambio de color de la pintura a partir del crecimiento fúngico.*

La Figura 5.6-3, muestra el crecimiento de *C. globosum* sobre las películas de PC con y sin envejecimiento. El crecimiento se puede clasificar entre moderado y abundante (3-4).



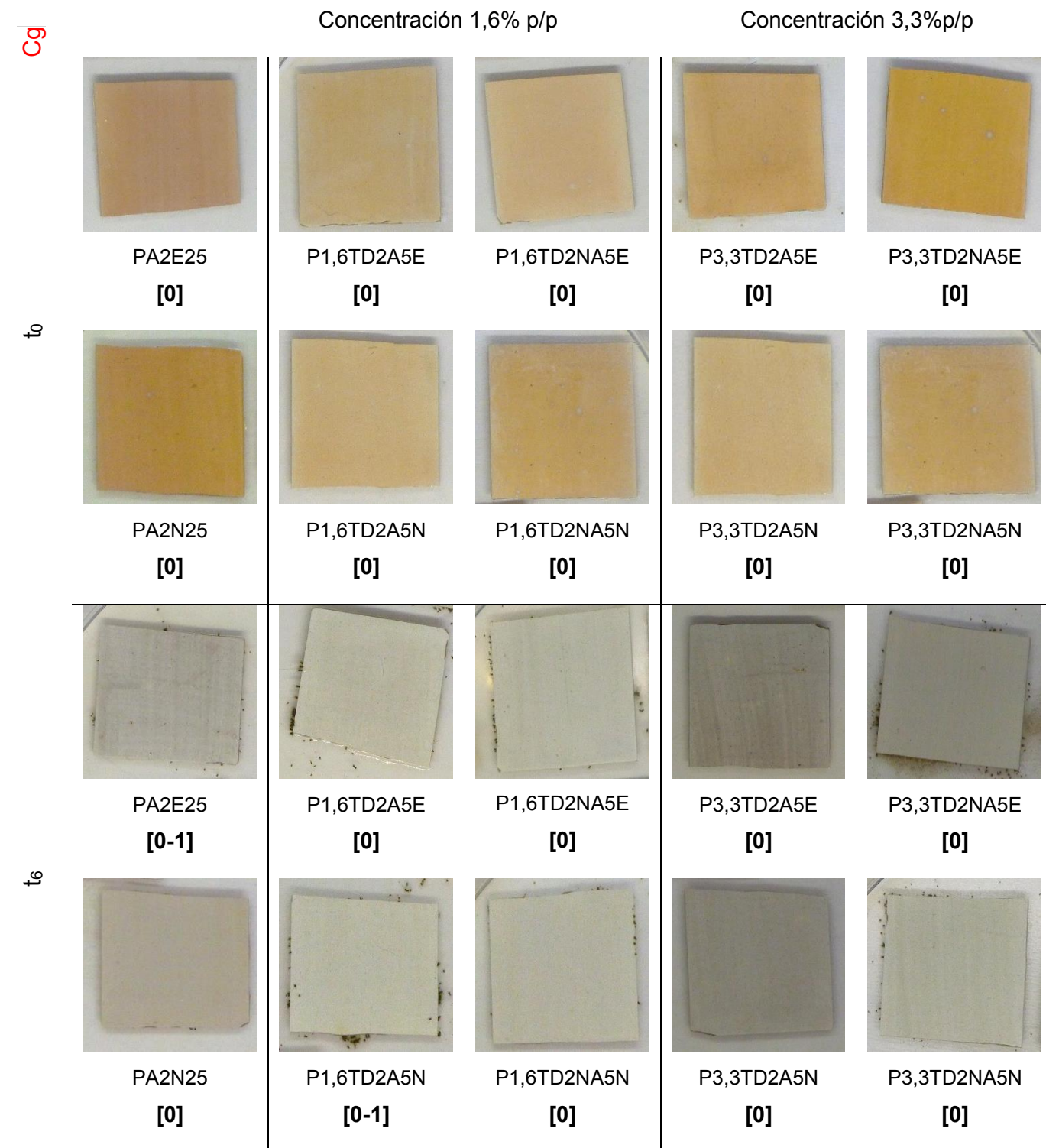
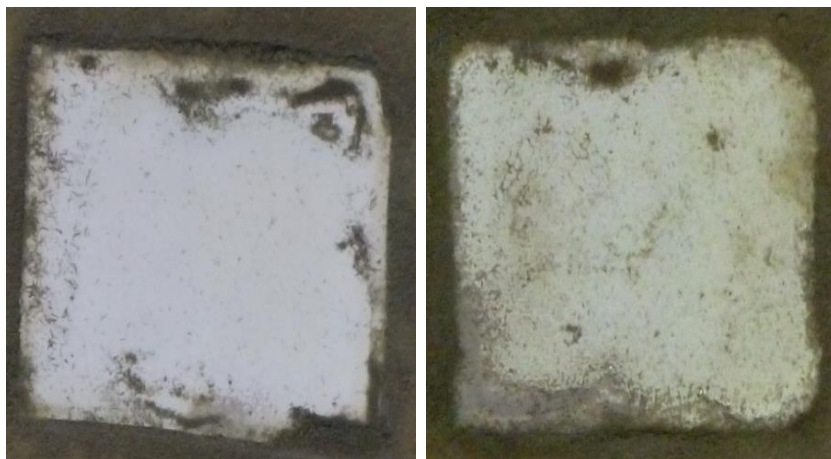


Figura 5.6-4 Registros fotográficos de muestras expuestas al crecimiento de *C. globosum* con (t<sub>6</sub>) y sin (t<sub>0</sub>) envejecimiento. Entre corchetes: calificación promedio de las muestras evaluadas.

El grado de desarrollo se intensificó en los bordes con notable esporulación y avanzando sobre el material, lo cual, queda evidenciado por el cambio de color que se observa en la muestra (destacado en círculo rojo) envejecida presentando mayores signos de biodeterioro.

La Figura 5.6-4, presenta registros fotográficos y las calificaciones de todas las muestras aditivadas enfrentadas al crecimiento de *C. globosum*. Esta figura muestra que en general se registró una inhibición total del crecimiento (calificado como 0) al agregar los biocidas en estudio. Este comportamiento se mantuvo luego del envejecimiento de las muestras. Una vez envejecidas se registró crecimiento en zonas marginales de los bordes de las muestras muy alejado del comportamiento observado en las muestras control. Este crecimiento marginal registrado mayormente en las muestras con TDNF se da en la interfaz entre el material y el medio mineral, lo cual resulta auspicioso dado que muestra que las nanopartículas de plata no se están lixiviando a partir del material. La capacidad de retención en la película de las nanopartículas es otra de las ventajas buscadas con la estrategia de funcionalización de soportes.



*Figura 5.6-5 Registros fotográficos de muestras de la PC expuestas al crecimiento de A. fumigatus sin envejecimiento (izquierda) y con envejecimiento previo (derecha), calificadas con 3 y 4, respectivamente.*

La Figura 5.6-5, se presentan registros fotográficos de las muestras control enfrentadas al crecimiento de *A. fumigatus*. El crecimiento está entre moderado y abundante (3-4), al envejecer la película, el crecimiento aumentó en forma evidente invadiendo el material con un grado de desarrollo avanzado evidenciado por una mayor esporulación.

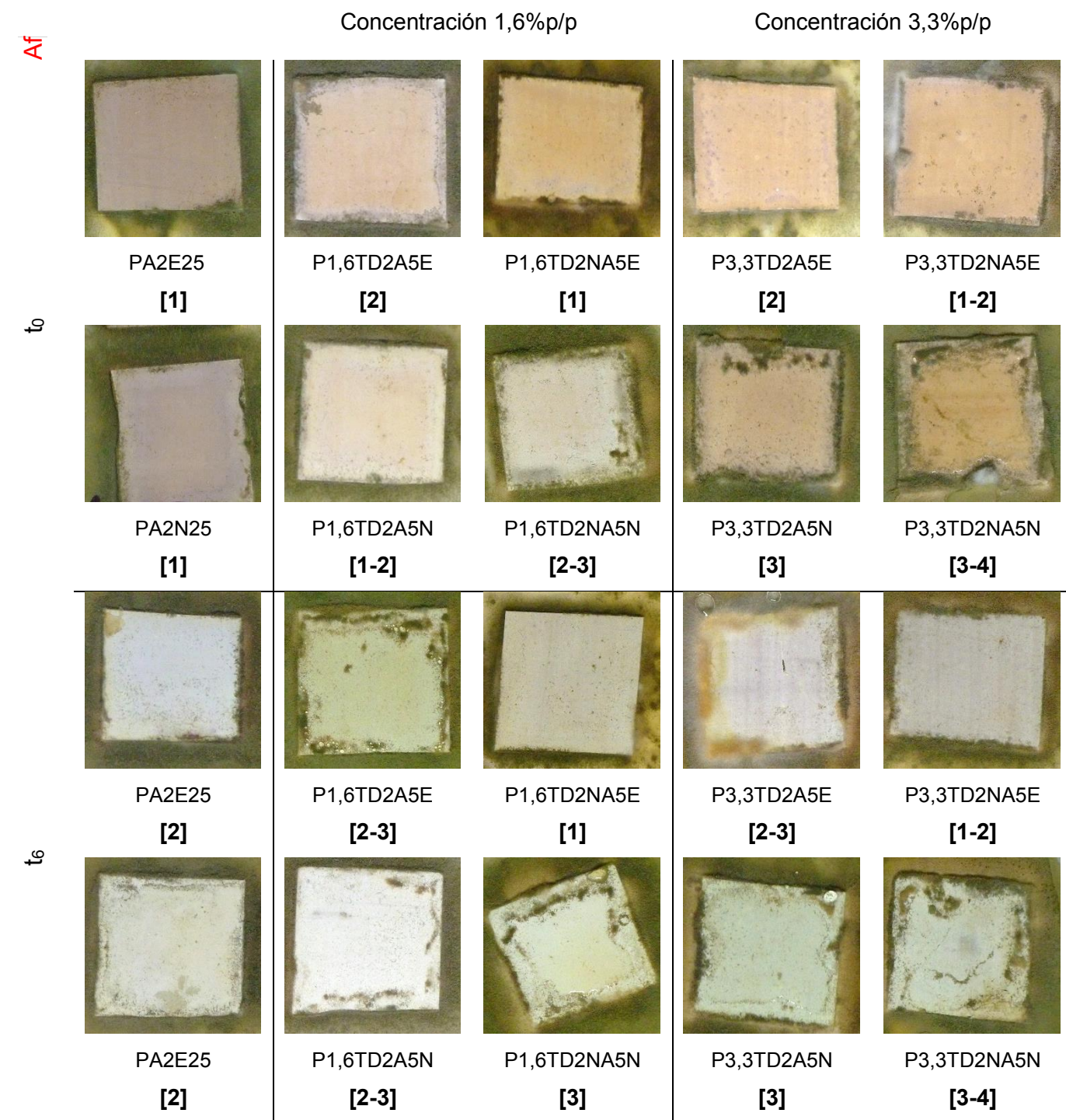


Figura 5.6-6 Registros fotográficos de muestras expuestas al crecimiento de *A. fumigatus* con (t<sub>6</sub>) y sin (t<sub>0</sub>) envejecimiento. Entre corchetes: calificación promedio de las muestras evaluadas.



Esta Figura 5.6-6 se presentan registros fotográficos y las calificaciones de las muestras de pinturas en estudio luego del ensayo de resistencia fúngica frente *A. fumigatus*. En general, se registró una disminución del crecimiento del hongo al agregar los biocidas en estudio, en especial en las condiciones iniciales ( $t_0$ ). La eficiencia resultó menor en aquellas películas que contenían las TDNF obtenidas utilizando el extracto de *Senna occidentalis*. En el caso de las películas sin envejecimiento se destaca la actividad de PA2E25 y PA2N25 que presentan una inhibición elevada del crecimiento fúngico (calificado con 1). No obstante, la eficiencia de las pinturas con las nanopartículas libres baja luego del envejecimiento, donde se hizo evidente el aumento del crecimiento fúngico, aunque mucho menor en comparación con los controles.

Entre las pinturas con TDNF se destaca P1,6TD2NA5E que ha logrado mantener elevados niveles de inhibición luego del proceso de envejecimiento siendo la de calificación más baja registrada (1) entre estas. Frente a esta cepa, como frente al resto, el aumento de la concentración de la TDNF en las pinturas no aumentó la actividad antifúngica. A diferencia de lo que se observa frente a las otras cepas, en este caso se observa una menor actividad antifúngica de las películas que contienen nanopartículas asociadas al soporte y reducidas con *Senna occidentalis*. De los resultados expuestos hasta el momento, se extrae que *C. globosum* fue la especie más sensible, mientras que *A. alternata* y *A. fumigatus* resultaron mucho más resistente. Cabe destacar en este punto el comportamiento de *C. globosum* que resultó opuesto a lo registrado en los ensayos en medio líquido al determinar la concentración inhibitoria mínima (Capítulo 3) donde mostró ser el hongo más resistente en esas condiciones.

Las películas de pintura con las nanopartículas libres no envejecidas son muy activas pero esta actividad generalmente se pierde con el envejecimiento. Las pinturas con las TDNF en algunos casos permitieron sostener la actividad antifúngica luego del envejecimiento frente a las cepas más resistentes. En tal sentido, se destaca P1,6TD2NA5N y P1,6TD2NA5E que resultaron más eficiente frente a las cepas *A. alternata* y *A. fumigatus*, respectivamente. Esto plantea la posibilidad de, eventualmente, de evaluar en forma combinada estos dos aditivos en la formulación de pinturas antimicrobianas.

Por otro lado, quedó en evidencia que el aumento en la cantidad de TDNF no se transfería en forma directa en un aumento de la actividad antifúngica. Esto puede estar relacionado con los resultados de caracterización de las pinturas, Tabla 5.1-1, presentados al comienzo del presente Capítulo. Según estos resultados al duplicar la cantidad de TD2 disminuye el

grado de molienda lo cual genera una mayor rugosidad superficial en la película y, además, aumenta la absorción de agua en relación con la que contenía menos cantidad de TD2. En las Figuras 5.6-7, 5.6-8 y 5.6-9 se muestran micrografías MEB de algunas de las muestras luego de ser expuestas al crecimiento fúngico. En las Figuras 5.6-7 se pueden observar en las imágenes A y D, el crecimiento de *A. alternaria* que cubre completamente la película, en varios campos se logró observar incluso la aparición de nuevas esporas evidenciado el grado de desarrollo alcanzado por el hongo a partir de su crecimiento sobre la película de la PC. En la muestra envejecida en la Figura 5.6-7 D puede apreciarse el aumento en el entramado del micelio con un grado mayor de desarrollo. Este comportamiento de la PC se repite con *C. globosum*, lo cual puede observarse en las micrografías A y D de la Figura 5.5-8 y frente a *A. fumigatus* en la Figura 5.5-9. Con esta última cepa es notable la abundancia de conidios sobre la superficie tanto en las micrografías A y D.

En las micrografías B y E de las Figuras 5.6-7, 5.6-8 y 5.6-9 se pueden ver micrografías IMÁGENES correspondientes a las muestras de pintura con nanopartículas libres, PA2E25, expuestas al crecimiento de las tres cepas. Tanto *A. alternata* como *C. globosum* exhiben una inhibición total de su crecimiento frente a las muestras no envejecidas, mientras que luego del envejecimiento se observan algunos signos de crecimiento, si bien este se encuentra con un alto grado de inhibición en comparación con la PC. Esto corrobora el comportamiento observado en la observación directa. En el caso del ensayo frente a *A. fumigatus*, tanto en las muestras con y sin envejecimiento se observan signos de crecimiento fúngico, aunque inhibido con respecto a lo observado en los controles. El crecimiento se hace más notable luego del envejecimiento mostrando la pérdida de eficiencia de las muestras con las nanopartículas libres en relación con el tiempo transcurrido. En las micrografías C y F de las Figuras 5.6-7, 5.6-8 y 5.6-9 corresponden a las muestras de pintura con TDNF empleando medio amoniacal y extracto acuoso de *Equisetum giganteum*, P1,6TD2NA5E, expuestas al crecimiento de las tres cepas. Las muestras expuestas a *A. alternata* muestran inhibición total del crecimiento, tanto en las películas con y sin envejecimiento. Sobre la superficie se observan algunas esporas dispersas sin germinar, posiblemente las que fueron inoculadas al comienzo del ensayo (Figuras 5.6-7 C y F). El mismo comportamiento se observa en las micrografías provenientes del ensayo frente a *C. globosum* (Figuras 5.6-8 C y F). En el caso de *A. fumigatus* una vez que la pintura envejece se evidencian rastros de crecimiento, pero con un alto grado de inhibición comparado con las muestras de la PC (Figura 5.6-9 C y F).

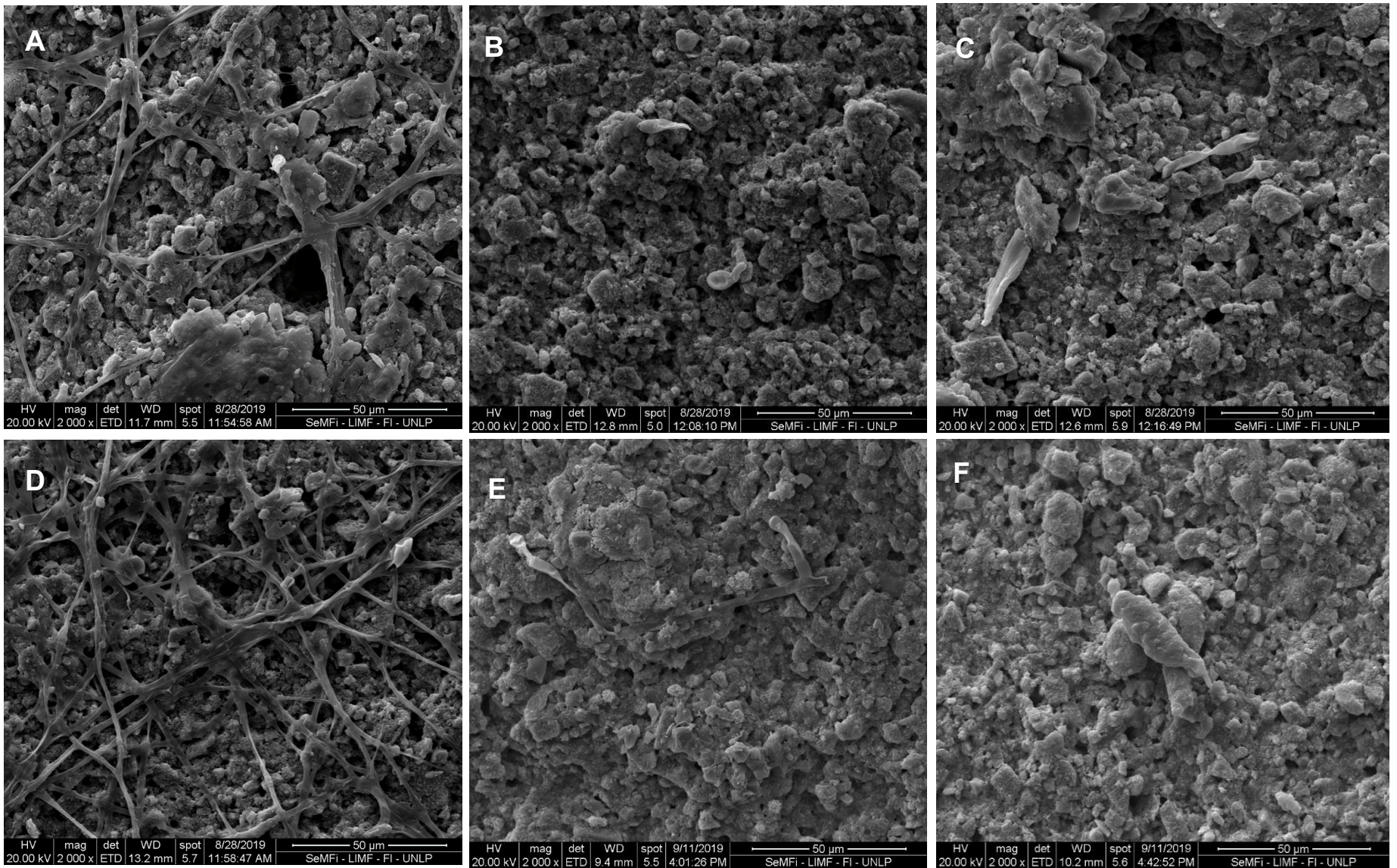


Figura 5.6-7 Micrografías MEB del centro de las películas de pintura: PC, PA2E25 y P1,6NA5E sin envejecer (A, B y C) y envejecidas (D,E y F) inoculadas con *A. alternata*. Magnificación 2000x.



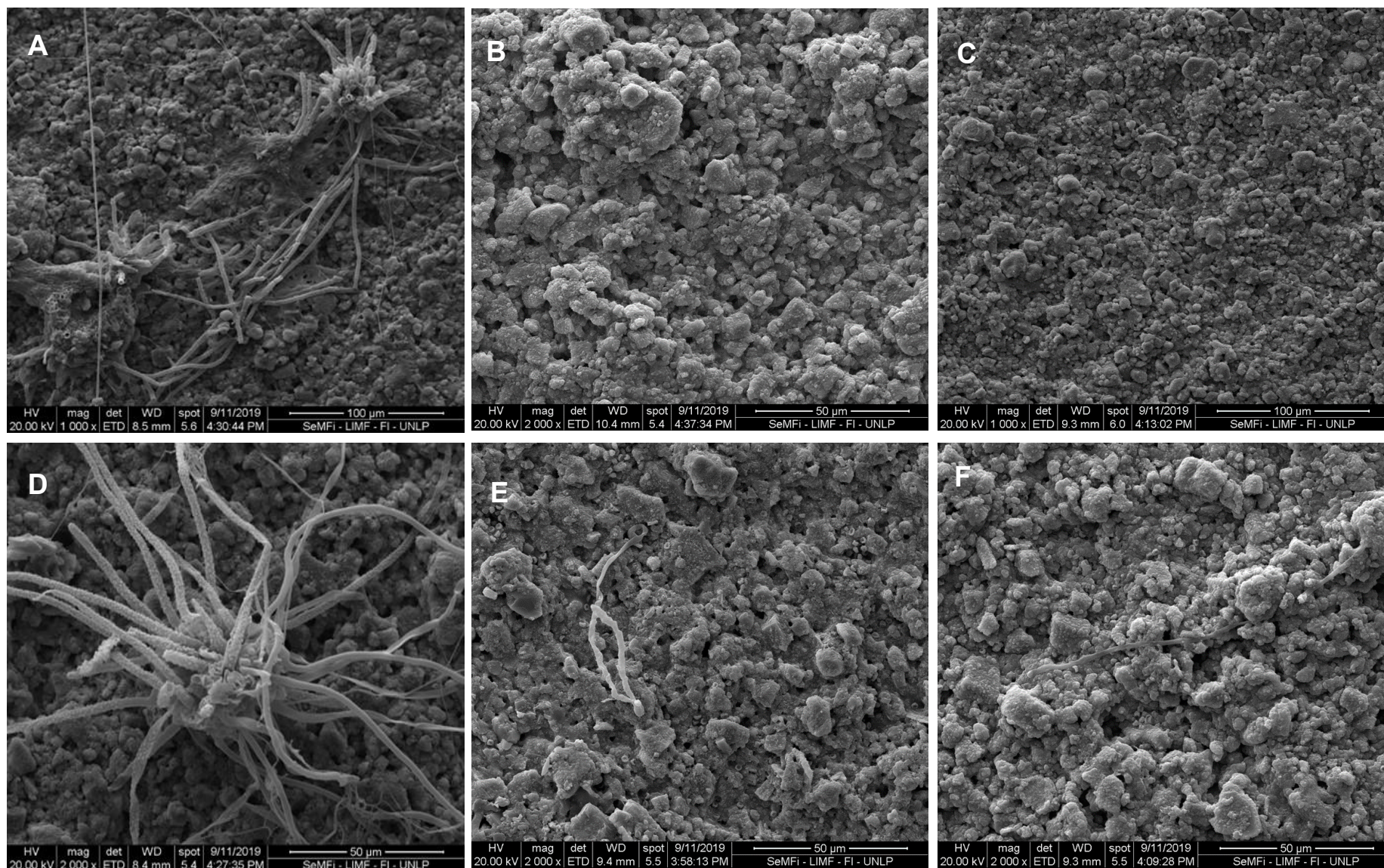


Figura 5.6-8 Micrografías MEB del centro de las películas de pintura PC, PA2E25 y P1,6NA5E nuevas (A, B y C) y envejecidas (D,E y F) inoculadas con *C.globosum*, resultantes de la aplicación de la ASTM D-5590. Magnificación 1000x y 2000x.



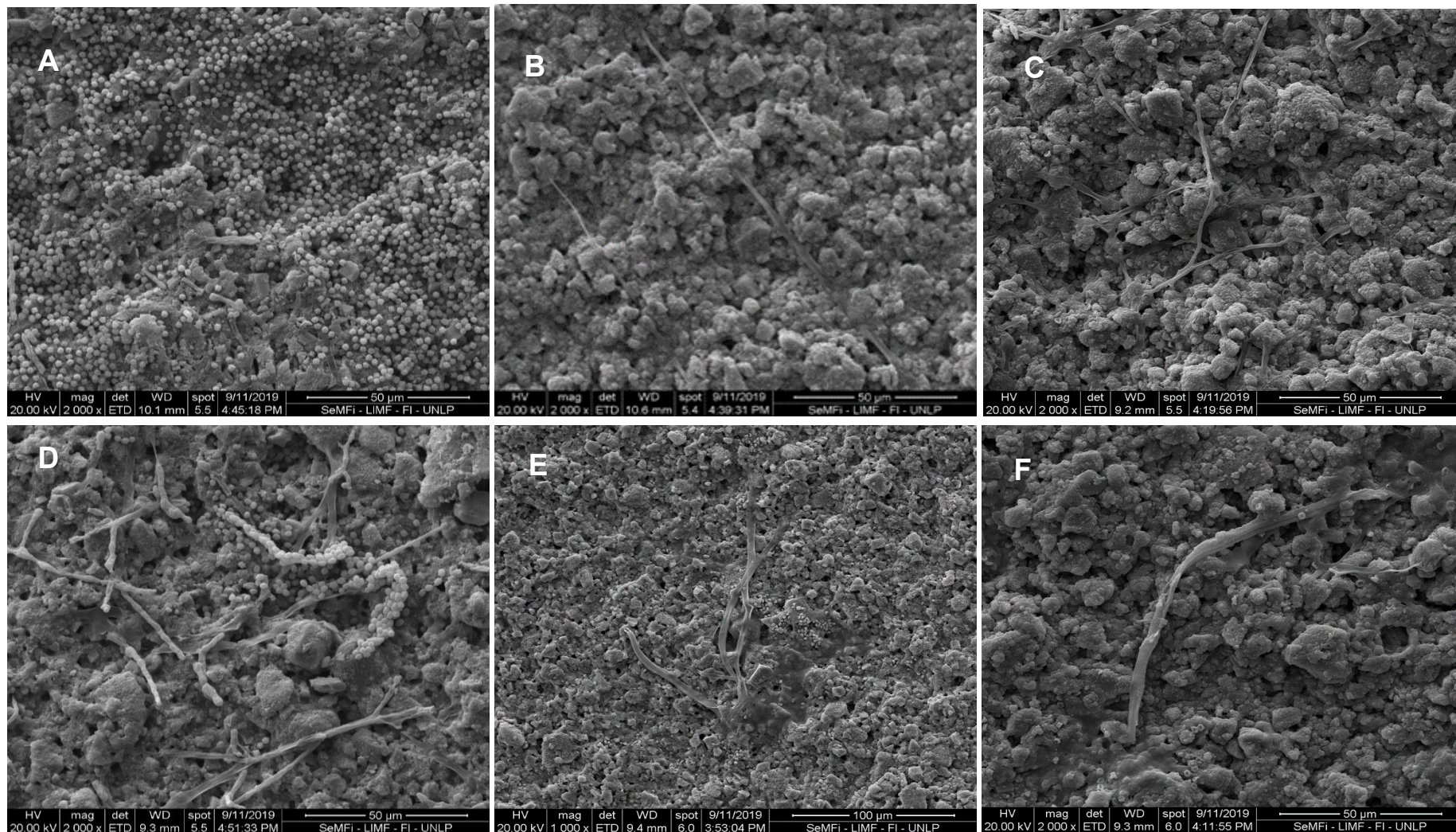


Figura 5.6-9 Micrografías MEB del centro de las películas de pintura PC, PA2E25 y P1,6NA5E nuevas (A, B y C) y envejecidas (D,E y F) inoculadas con *A. fumigatus*, resultantes de la aplicación de la ASTM D-5590. Magnificación de 2000x.

# **Capítulo 6 - Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas como conservantes**

## 6.1 Evaluación de la calidad de las pinturas en el envase

Con el objetivo de aislar bacterias deteriorantes de pinturas en las condiciones de envasado, se obtuvieron pinturas de interior para la evaluación de la calidad según los estándares correspondientes. El procedimiento seguido se detalla a partir del inciso 2.17 del Capítulo 2. Una de las pinturas utilizadas, era comercial con signos visibles de deterioro (PSW1). Otra de las muestras de pintura utilizada en la presente investigación pertenecía a la misma marca (PSW2) pero no presentaba signos visibles de deterioro. También se usó la PC de similar formulación a la utilizada en los Capítulos 3 y 5, pero sin el agregado de BP15 (biocida comercial) con acción durante el almacenaje (en lata)

Se caracterizaron las pinturas comerciales, en busca de signos de contaminación microbiana. Se determinó que PSW1 no cumplía con los estándares detallados en la norma IRAM 1109. Emanaba olores putrefactos y su integridad física estaba comprometida por la presencia de grumos como se observa en la Figura 6.1-1A. Además, se observó una coloración no uniforme con zonas tendientes al amarillo y otras al blanco.

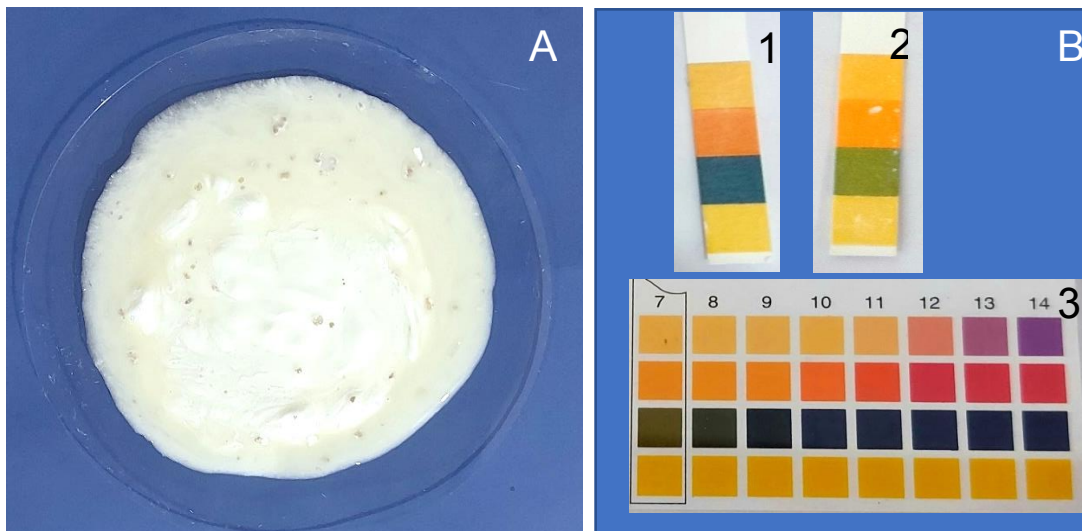


Figura 6.1-1 Pintura deteriorada con alteraciones en el pH. A: imagen de la pintura con grumos PSW1 sobre vidrio reloj. B: tira indicadora de pH de PSW1 (1), PSW2 (2), escala indicadora Merck (3).

Por otra parte, la estimación del pH del vehículo de las pinturas en fase líquida luego de 48 horas de estacionamiento mostró ser aproximadamente 9 para PSW1. Por otro lado, el pH estimado de



PSW2 que fue aproximadamente 7. Los resultados pueden observarse en la figura 6.1-1B. El pH de la pintura PC resultó similar al de PSW2. La medición del pH coincide con los registros de la literatura donde se aclara que las pinturas en base acuosa son ligeramente básicas, lo cual se debe a sus elevadas concentraciones de carbonato y otros iones que alcalinizan el medio. El pH alcalino de PSW1 en comparación a PSW2 podría estar vinculado al biodeterioro exhibido por esta pintura como señala la bibliografía (Samyn et al., 2022).

La bibliografía describe el cambio de pH como uno de los principales indicadores del biodeterioro causado por bacterias en las pinturas en el envase (Gillatt et al., 2015). La mayoría de las menciones en la bibliografía, hacen referencia a una posible acidificación del medio, debido a la degradación de las cadenas carbonadas de compuestos orgánicos, como la celulosa contenida en los espesantes por las principales bacterias contaminantes heterótrofos y aerobios o anaerobios facultativos capaces de llevar a cabo esta degradación y, además, de crecer aceleradamente en este ambiente cuyo pH no favorece precisamente el desarrollo de otros microorganismos. La acidificación unida a la degradación parcial de los compuestos orgánicos entonces favorecería la proliferación de otros microorganismos que no podrían desarrollarse en las condiciones alcalinas iniciales de la pintura (Gillatt et al., 2015). Por lo tanto, estos ecosistemas con activo crecimiento de colonizadores primarios facilitan el crecimiento de otros microorganismos que enriquecerían las comunidades microbianas, nuevas especies y con ellas enzimas y rutas metabólicas que contribuirían a afectar la calidad, integridad, aspecto y, finalmente, el valor de uso de la pintura.

Por otro lado, siguiendo los lineamientos de la norma IRAM 1109 se evaluó la estabilidad de las pinturas comerciales y, además, con el objetivo de estudiar en mayor profundidad el biodeterioro es que se incluyó en el estudio una muestra de la PC inoculada previamente con *P. aeruginosa*. En la Figura 6.1-2 A se observan las pinturas luego de 48 horas de estacionamiento para la evaluación de la estabilidad. PSW1, presentó una separación del vehículo aproximadamente 5 mL para un volumen total de 40 ml, lo cual corresponde con un 12,5% de separación y supera ampliamente el 5% establecido para considerar que la pintura mantiene los estándares de calidad. En contraste, PSW2 no muestra separación y PC inoculada con *P. aeruginosa* presenta una separación de aproximadamente 1mL. Como resultado del estriado en placas con muestras de la pintura inoculada se observó crecimiento bacteriano continuo sobre las estrías de pintura por lo que se considera que estas muestras estaban altamente biodeterioradas luego de 7 días posinoculación.



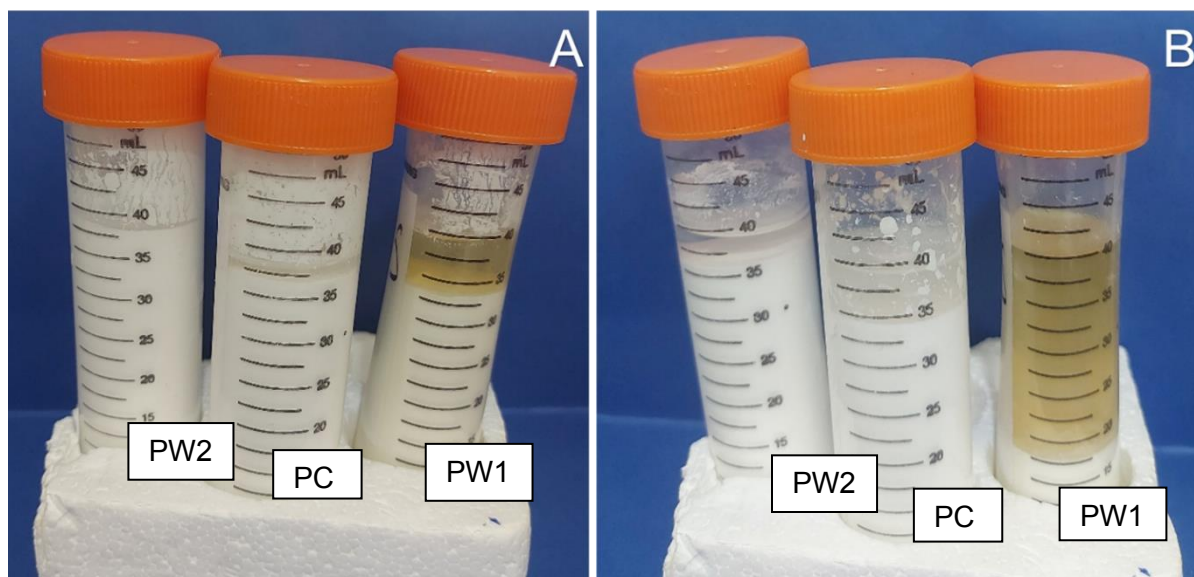


Figura 6.1-2 Estacionamiento de pinturas PSW2, PC inoculada con *P. aeruginosa* y PSW1 (de izquierda a derecha) 48 horas de estacionamiento (A) y 14 días de estacionamiento (B).

Pasados 14 días (Figura 6.1-2 B) se observó, un mayor grado de separación del vehículo. En el caso de PSW1 se acentuó la separación, exhibiendo esta vez una columna de líquido de más de 20ml lo que evidencia una separación de más del 50%. En el caso de PC inoculada se observó un aumento significativo de la separación, la columna de líquido fue aproximadamente 5 mL, lo cual evidencia el biodeterioro de la pintura. Mientras que PSW2 exhibió una separación de aproximadamente 2mL lo cual se encuentra dentro de los parámetros normales.

Dadas las evidencias encontradas hasta el momento, se puede concluir que PSW1 presentaba varios de los signos de deterioro que podrían estar siendo causados por la presencia de microorganismos.

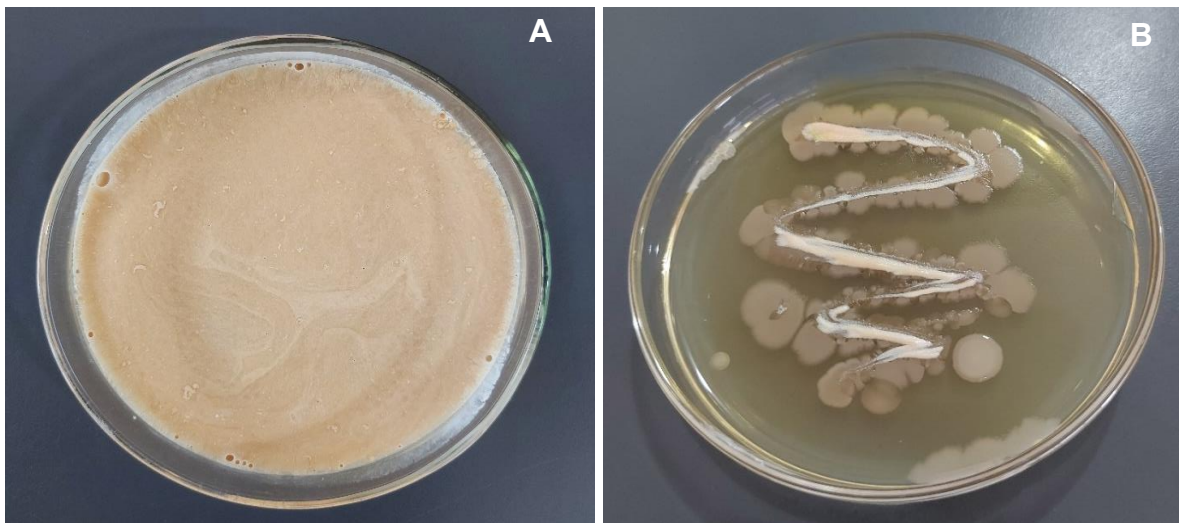
### 6.1.1 Aislamiento, caracterización e identificación de contaminantes microbianos a partir de PSW1

El medio TSA fue elegido para el aislamiento de bacterias a partir de la pintura teniendo en cuenta que es un medio rico recomendado para el cultivo de bacterias con propósitos generales. Favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de estos microorganismos tanto anaerobios estrictos como facultativos y aerobios, siendo estos dos últimos grupos los de nuestro mayor interés. Además, es el medio más recomendado en los últimos 20 años por la norma

ASTM D 2574 para la evaluación de la resistencia de las pinturas en el envase al deterioro microbiológico.

A partir de la siembra por mezcla con medio tibio, se obtuvo un crecimiento homogéneo en sábana en el medio TSA sin suplementar, de lo que parecía ser un solo microorganismo, puesto que la coloración y el crecimiento en la placa eran muy homogéneos, Figura 6.1-3 A.

En el caso de la siembra en estría de PSW1, se observó crecimiento microbiano correspondiente con una pintura con contaminación abundante, según la clasificación sugerida en la norma ASTM D 2574. Como puede verse en la Figura 6.1-3 B, el crecimiento es uniforme en toda la estría, aunque aún pueden distinguirse colonias individuales. En todas las placas en las que se llevó a cabo la siembra por agotamiento en estrías se observaron colonias aisladas con el mismo aspecto que se observa en la Figura 6.1-3 B, es decir, colonias medianas color crema, con margen entero, superficie lisa y viscosa, sin elevaciones ni depresiones. Para comprobar si este microorganismo es aeróbico se realizó la prueba bioquímica de oxidación obteniéndose color azul lo que indica respuesta positiva o sea que se trata de una bacteria aeróbica.



*Figura 6.1-3 Cultivos a partir de muestras de PSW1. A: Crecimiento obtenido a partir de siembra directa de la pintura en TSA. B: Estría con PSW1 en TSA sin suplementar. A Y B fueron encubadas por 48 horas*

En el medio TSA suplementado con bromuro de Cetil-trimetil-amonio (cetrimida) no se observó crecimiento. Este comportamiento se repitió en todas las réplicas, tanto a las 48 h de incubación como pasados los 7 días. La cetrimida es un derivado de amonio cuaternario que constituye un

desinfectante de amplio espectro por lo que se suele usar para inhibir el crecimiento de cepas bacterianas. Es un detergente catiónico que libera el nitrógeno y el fósforo de las células de varios representantes de la microbiota acompañante de *Pseudomonas* spp incluso de algunas especies de *Pseudomonas* permitiendo el crecimiento selectivo de *P. aeruginosa*. En las placas con el TSA suplementado con  $K_2HPO_4$  tampoco se observó crecimiento, aún pasados 7 días. Por lo que, podemos concluir que todos los microorganismos presentes en la pintura son sensibles a ceftrimida y a  $K_2HPO_4$  los cuales actúan como agentes inhibidores, en las condiciones ensayadas.

Por lo tanto, los aislados presentaron similitudes en la morfología de las colonias y las correspondientes células observadas mediante microscopía óptica, así como la respuesta a la tinción de Gram y la sensibilidad a los agentes selectivos probados.

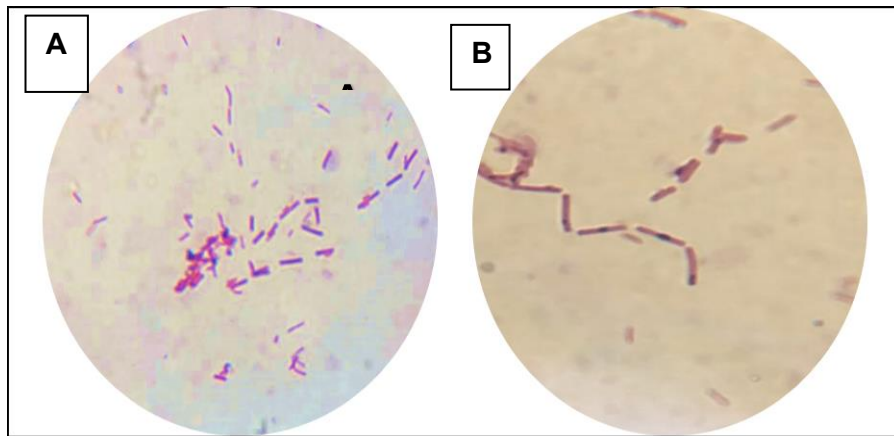


Figura 6.1-4 Imágenes de microscopía óptica, A: Bacilos Gram positivo B: Bacilo rosas teñidos de safranina con endospora bacteriana teñidas con verde de malaquita, objetivo de inmersión 100x

La tinción de Gram permitió la observación al microscopio óptico de diferentes campos de la preparación con el objetivo de inmersión de 100X, donde se evidenció homogeneidad en la morfología, confirmando de esta forma, la pureza del cultivo. La respuesta a la tinción de Gram mostró bacterias Gram positivas de morfología bacilar, Figura 6.11-4 A.

La tinción de endosporas mostró la presencia de estas estructuras como se puede observar en la Figura 6.1-4 B, respectivamente. Estos datos unidos con el crecimiento aerobio constituyen caracteres diagnósticos suficientes, según la sección Firmicutes del Manual de Bergey, para afirmar que el aislado es una bacteria perteneciente al género *Bacillus* spp.

Se logró conservar la cepa aislada en stock de glicerol con un 96% de sobrevivencia tras 90 días en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se mantiene con más de 90% de sobrevivencia luego de 180 días en las mismas condiciones.

La evaluación de la capacidad formadora de *biofilm* de este microorganismo aislado sobre películas de pinturas (PC) se puede observar en las micrografías obtenidas mediante MEB que se muestran en la Figura 6.1-5. puede observarse que esta bacteria forma un copioso biofilm continuo sobre la película de pintura, no pudiendo identificarse en esta etapa del crecimiento colonias individuales Figura 6.1-5B.

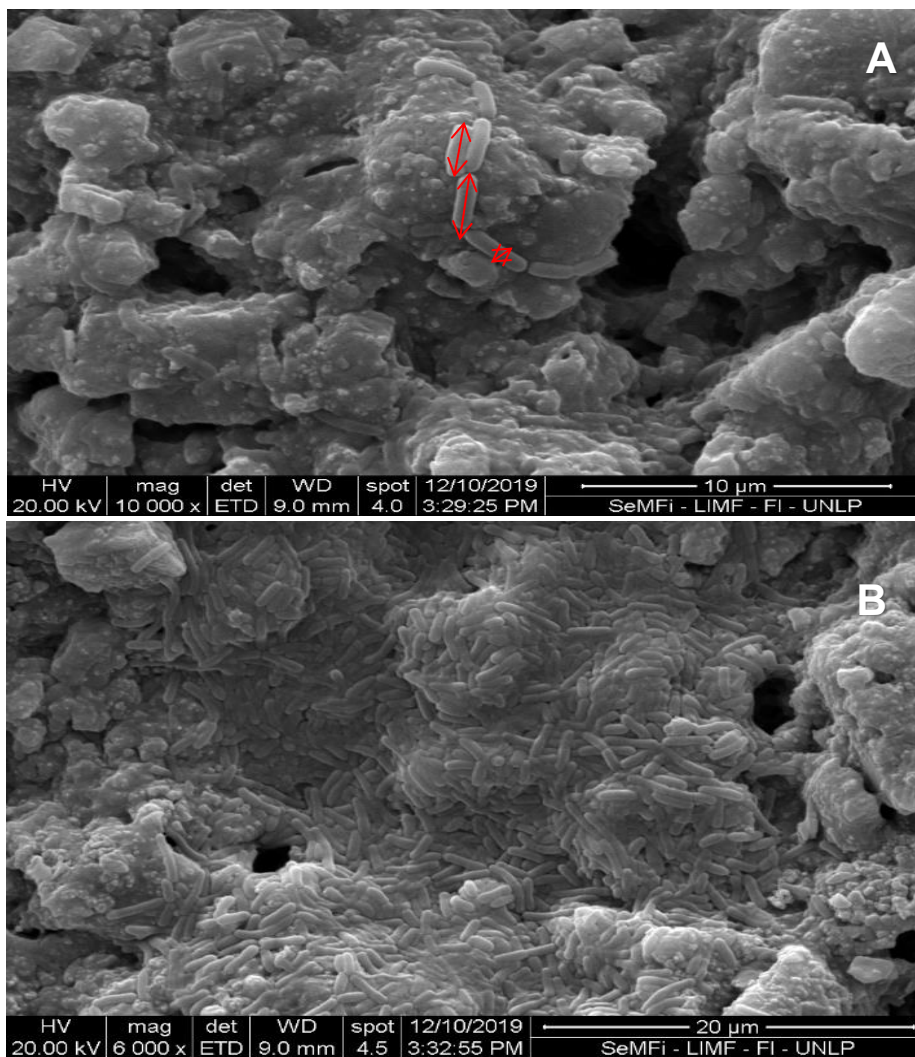


Figura 6.11-5 Micrografías MEB del aislado creciendo sobre muestras de películas de pintura: A) con A2E (10.000x) en forma aislada y B) la PC (6 000x) constituyendo un biofilm abundante.

Para complementar y profundizar la identificación del aislado obtenido, se realizó el análisis de la secuencia de ADN que codifica para el segmento 16s del ARNr. El resultado de este estudio permitió confirmar la pertenencia al género *Bacillus* e identificar con un 99% de homología a *Bacillus horneckiae*. La secuencia de nucleótidos fue depositada en GenBank bajo el código SUB6223917 190822-025\_A19\_F1\_907R.ab1 MN381947.

El análisis filogenético de fragmentos de secuencias de la región 16s del ARNr y la comparación de la cepa aislada en este trabajo con otros aislados de la misma especie, de distintas fuentes y varios países (Tabla 6.1.1), se muestra en forma de árbol filogenético en la Figura 6.1.6. A partir de este análisis realizado por el método de Neighbour-Joining se pudo determinar que comparte un ancestro común con el aislado *Bacillus horneckiae* MN542875 procedente de aguas residuales de una refinería de crudo aislado por investigadores de la Universidad de Tartu en Estonia. Esto se puede afirmar a partir de su posición en la rama y del *bootstrap* 72%. Además, está más alejado de los aislados de Brasil y Eslovenia.

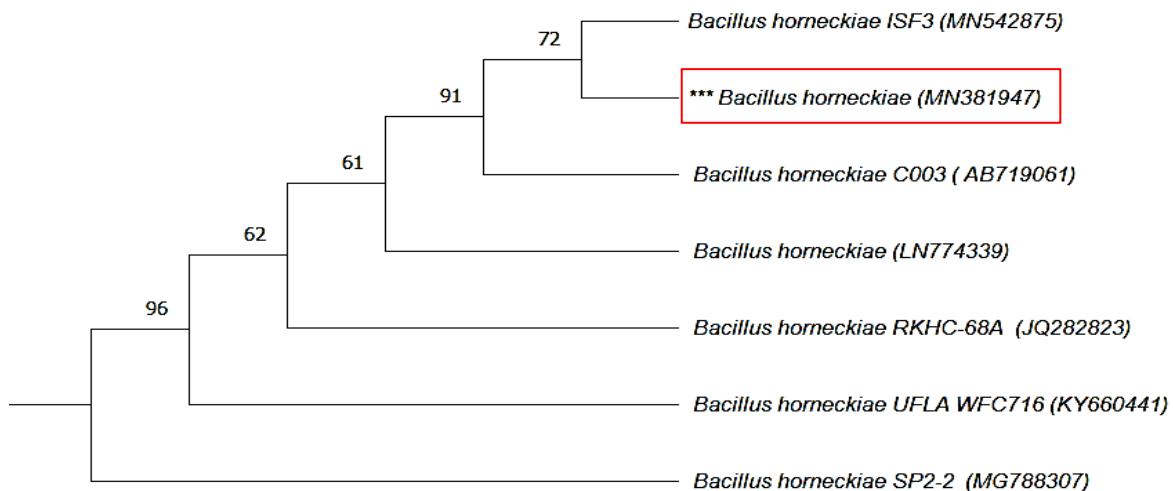


Figura 6.1-6 Arbol filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S de algunos aislados de *B. horneckiae*, construido por el algoritmo de Neighbour-Joining. En los nodos se indica el valor de *bootstrap* mayores que 50% (1000 replicados).



Tabla 6.1-1 Especies empleadas para el análisis filogenético. Descripción de aislados, descriptor, fuente de aislamiento, país y año.

Aislado	Descriptor	Aislamiento	Año	País
MG788307	Kvasnova,S., Kiskova,J., Chronakova,A. y Pristas,P.	Depósito de eliminación de residuos industriales	2018	Eslovaquia
KY660441	Ribeiro,L.S.	Café procesado por fermentación húmeda	2017	Brasil
MN542875	Viggor,S., Joesaar, Soares-Castro,P., Ilmjarv,T., Leito,I.,Santos,P.M	Aguas residuales planta de tratamiento de refinería de crudo	2019	Estonia
MN381947	Kapley,A. y Kivisaar,M. Barberia-Roque,L. y Bellotti,N.	Contenedor de pintura biodeteriorada	2019	Argentina
AB719061	Zhang,X., Nakahara,T., Miyazaki,M., Nogi,Y., Taniyama,S., Arakawa,O., Inoue,T. and Kudo,T.	Instestino de pepino de mar: <i>Holothuria</i> <i>leucospilota</i>	2012	Japón
JQ282823	Correa, H., Haltli,B., Duque,C. y Kerr,R.	Comunidades bacterianas de la gorgonia Octocoral Pseudopterogorgia	2011	Colombia
LN774339	Dominguez-Monino,I.	Cueva turística	2014	España

## 6.2 Características de *Bacillus horneckiae*

*Bacillus horneckiae* debe su nombre a la Dra. Gerda Horneck, una microbióloga espacial alemana que llevó a cabo el trabajo de exponer las esporas de este microorganismo a varios ambientes, sobre todo a radiación bajo diferentes condiciones (Vaishampayan et al., 2010). Según su descripción, las células vegetativas tienen forma de bastón, de 1 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 4-6  $\mu\text{m}$  de largo son Gram positiva y forman endospora. Son aerobias estrictas. Las colonias formadas en TSA a 30 °C, tras 24 horas de incubación, son amarillentas, lisas.

En el año 2020 la revista *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*<sup>13</sup> publicó un nuevo marco filogenómico y genómico comparativo para resolver la polifilia del género *Bacillus* donde se propusieron seis nuevos géneros para contener especies que hasta el momento se clasificaban dentro del género *Bacillus*. Entre ellos el género *Cytobacillus*. Por lo cual, en dependencia de las fechas de publicación de los trabajos, distintas cepas de la bacteria que fue identificada en este trabajo pueden encontrarse como *Cytobacillus horneckiae* o *Bacillus horneckiae*.

Los miembros de *Cytobacillus* pueden ser aeróbicos o facultativamente anaeróbicos. Se ha observado que todas las especies estudiadas de este género producen endosporas en condiciones ambientales o nutricionales adversas. *Cytobacillus* se puede aislar y encontrar en una amplia gama de ubicaciones, que van desde naturales (suelo, sedimentos marinos), organismos vivos (intestino humano, lombrices de tierra) hasta sitios de producción farmacéutica. La mayoría de las especies son móviles y algunas pueden tolerar condiciones salinas moderadas y ambientes de alta alcalinidad. Las especies de *Cytobacillus* pueden crecer en un rango de temperaturas que oscilan entre 10 y 45 °C (Vaishampayan et al., 2010).

---

<sup>13</sup> Anteriormente conocida como *International Journal of Systematic Bacteriology* es la revista de registro para la publicación de nuevos taxones microbianos y la publicación oficial del Comité Internacional de Sistemática de Procariotas y la División de Bacteriología y Microbiología Aplicada de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología.



### 6.3 Comparación de *B. horneckiae* y *P. aeruginosa* como indicadores de biodeterioro

Para evaluar el desempeño de la *B. horneckiae* como indicador de actividad antimicrobiana de varias formulaciones diferentes, se siguió un procedimiento basado en la norma ASTM D2574. El ensayo fue realizado con las siguientes pinturas: PSW2, PST1, P1,6TD2, PTD2NA5E y PC. Se comparó el desempeño del aislado con *P. aeruginosa* que es una de las especies recomendadas por la norma para este tipo de evaluaciones. Registros fotográficos obtenidos a partir de este ensayo se muestran en la Figura 6.3-1.

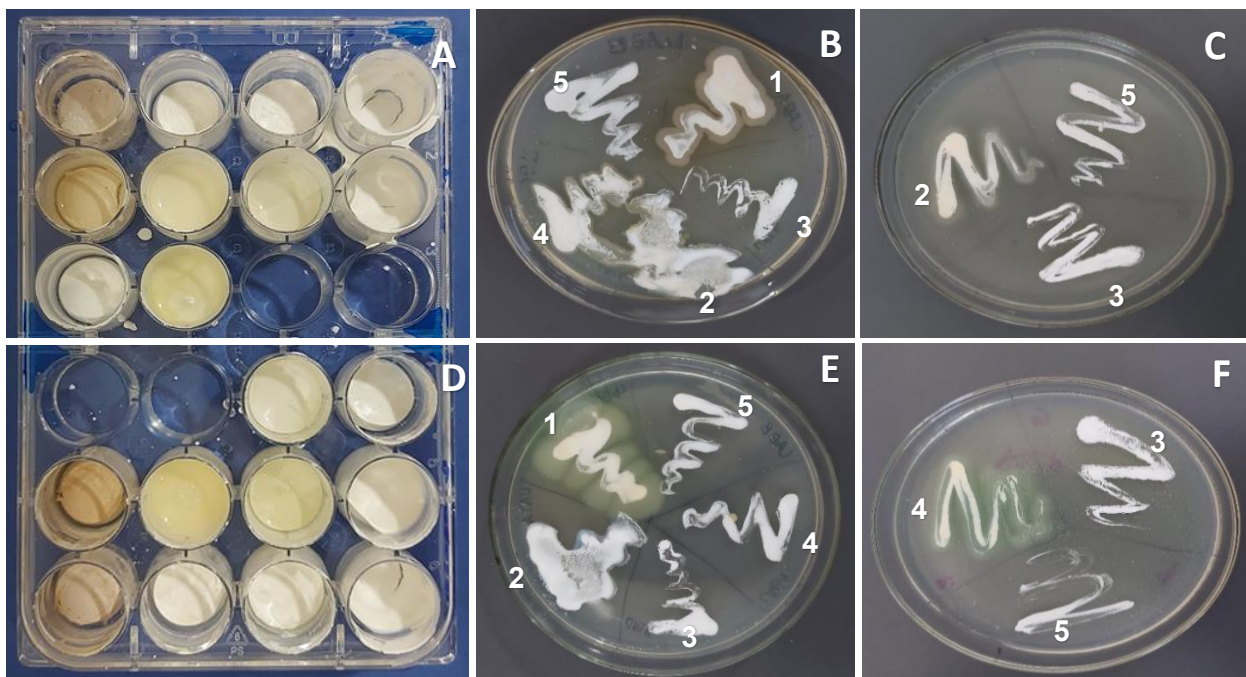


Figura 6.3-1 Registros fotográficos obtenidos del ensayo según la norma ASTM D2574: A, B y C corresponden a pinturas inoculadas con *B. horneckiae* mientras que D, E y F corresponden a *P. aeruginosa*. A y D corresponden a la fase de incubación de pinturas inoculadas en placas multipocillos, B y E muestran estriados de la primera inoculación del contenido de los pocillos, C y F estriados tras la segunda inoculación de las pinturas que no mostraron crecimiento microbiano en la primera inoculación. Las pinturas usadas son: 1 es P1,6TD2; 2 es PST1; 3 es PSW2, 4 es PC y 5 es P1,6TD2NA5E. PSW2 y PST1 son comerciales y el resto preparadas en el CIDEPINT.

Los resultados mostraron que ambas cepas bacterianas fueron capaces de crecer en los sistemas en estudio y, además, demostraron ser sensibles a la incorporación o no de biocidas. En tal

sentido, la P1,6TD2 (1) control sin ningún preservante o biocida con acción en envase, permitió el crecimiento de ambas cepas al formar una película continua sobre la estría de pintura luego de la primera inoculación, como puede apreciarse en la Figura 6.3-1 B y E. En el caso de la PC que contenía un preservante para lata (BP15) el crecimiento se reportó en las primeras 48h para el caso del aislado (*B. horneckiae*) mientras que con *P. aeruginosa* luego de la reinoculación a la semana de incubación.

En el caso de la pintura comercial PST1 (3) y la experimental P1,6TD2NA5E (5), lograron inhibir ambas cepas completamente aún luego de una segunda inoculación (Figura 6.3-1 C y F) mientras que la pintura comercial PSW2 (2) resultó menos eficiente logrando inhibir en la primera inoculación solo a *B. horneckiae*. En este caso la actividad de PSW2 no se mantuvo luego de la segunda inoculación.

Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados *B. horneckiae* se presenta como una cepa factible de ser utilizada como bioindicador para la evaluación de pinturas y biocidas activos en el envase.

#### **6.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana en el envase**

En esta instancia se probaron las potencialidades antimicrobianas de TD2NA5E y TD2NA5N (estudiadas en los Capítulos 4 y 5) frente a *B. horneckiae*, MEDIANTE UN ENSAYO DE DIFUSION EN AGAR. Registros fotográficos al concluir el ensayo se muestran en la Figura 6.4-1.

El control negativo (AD estéril) muestra ausencia total de halo DE INHIBICION. En el caso de BP15 (biocida comercial para envase) el halo ocupa toda la placa (10 cm), inhibiendo completamente el crecimiento de la cepa bacteriana. En el caso de TD2NA5E y TD2NA5N, mostraron halos de inhibición menores TD2NA5E (14 mm) mientras que TD2NA5N provocó una zona de inhibición de 12 mm en promedio.

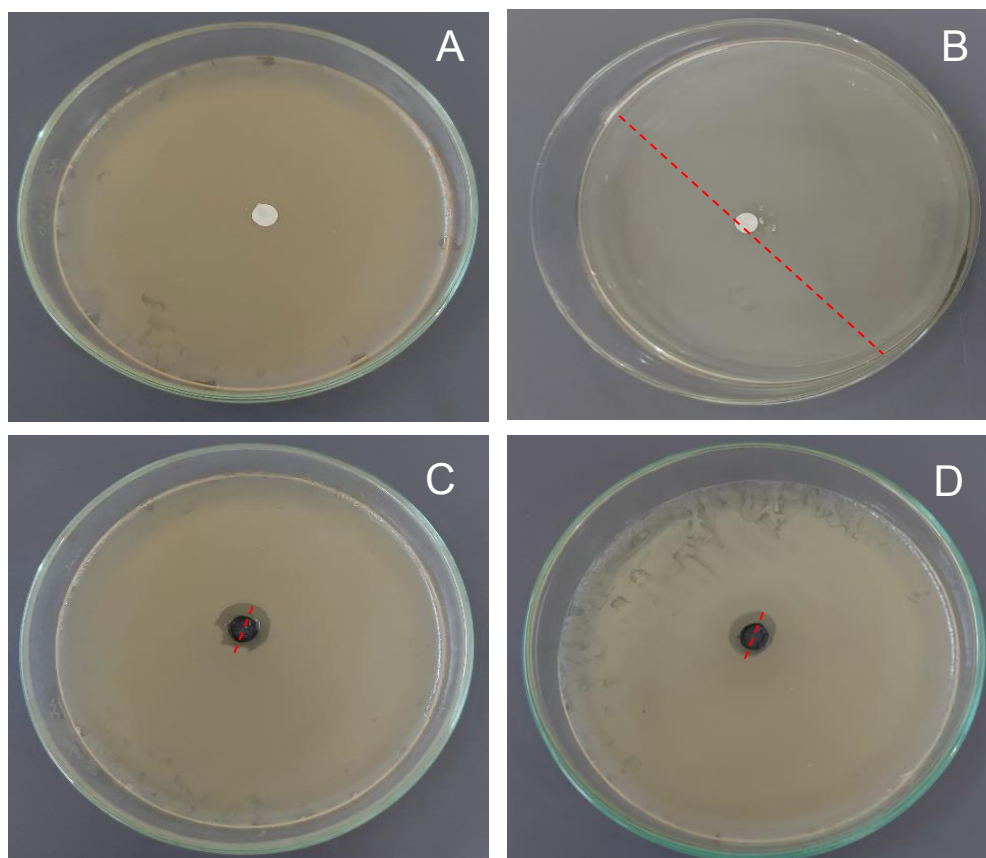
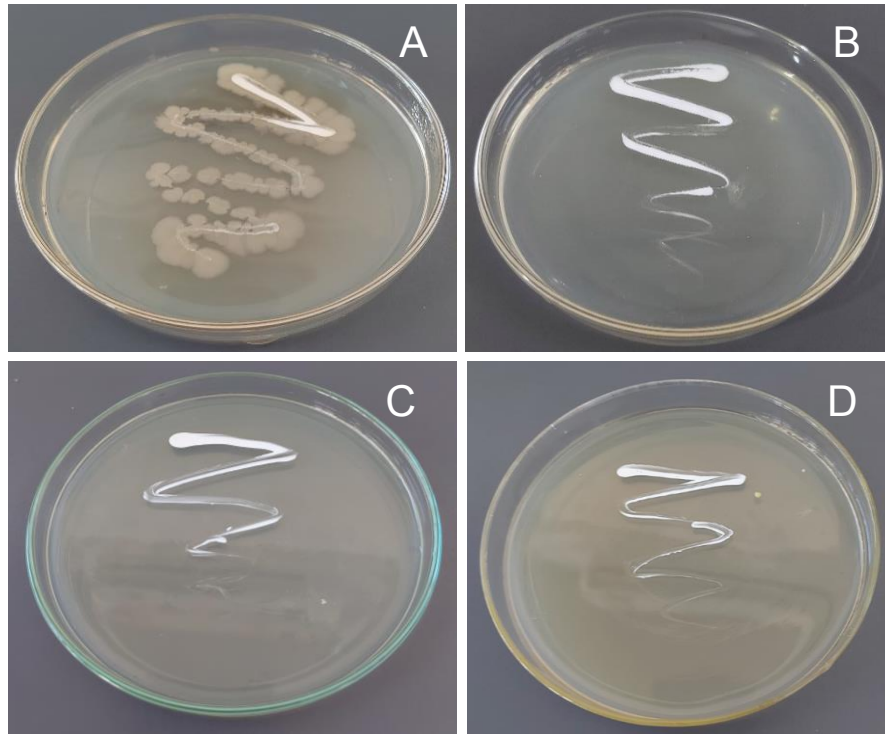


Figura 6.4-1 Ensayo de difusión en agar A: control (AD estéril), B: BP15 (biocida comercial para envase), C: TD2NA5E y D: TD2NA5N frente a *B. horneckiae*.

### 6.5 Evaluación de TD2NA5E y TD2NA5N como antimicrobianos para pintura líquida mediante la norma ASTM D2574

Con el objetivo de comparar el desempeño de ambas tierras de diatomeas funcionalizadas (TD2NA5E y TD2NA5N) y teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento se procedió a realizar un ensayo de resistencia al crecimiento bacteriano en el envase. Se utilizó una PC que estuvo en el envase por 2 años que llamamos PCE y se formularon 2 pinturas P1,6TD2NA5E y P1,6TD2NA5N que contenían únicamente cada uno de los biocidas experimentales (TD2NA5E y TD2NA5N). Los resultados de la inoculación de las pinturas con *B. horneckiae* se muestran en la Figura 6.5-1. Nótese que PCE inoculada (Figura 6.5-1 A) muestra una proliferación microbiana consistente con una contaminación moderada según la norma ASTM D2574. En el caso de la PCE sin inocular no se observó crecimiento en la estría como puede verse en la Figura 6.5-2 B calificada como pintura no contaminada por la norma. Este resultado

se repitió en los casos de P1,6TD2NA5E y P1,6TD2NA5N, registros fotográficos de las placas correspondientes se muestran en la Figura 6.5-1 C y D, sugiriendo que se ha alcanzado 100% de inhibición.



*Figura 6.5-1 Ensayo de resistencia antibacteriana, estriados de A: PCE, B: PCE sin inocular, C: P1,6TD2NA5E y D: P1,6TD2NA5N, frente a B. horneckiae*

Para corroborar los resultados obtenidos hasta el momento y desafiar aún más la funcionalidad de los biocidas obtenidos en este trabajo, se realizó una nueva fase de inoculación sobre las mismas pinturas. Posteriormente se contaron el número de bacterias sobrevivientes, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.5-2.



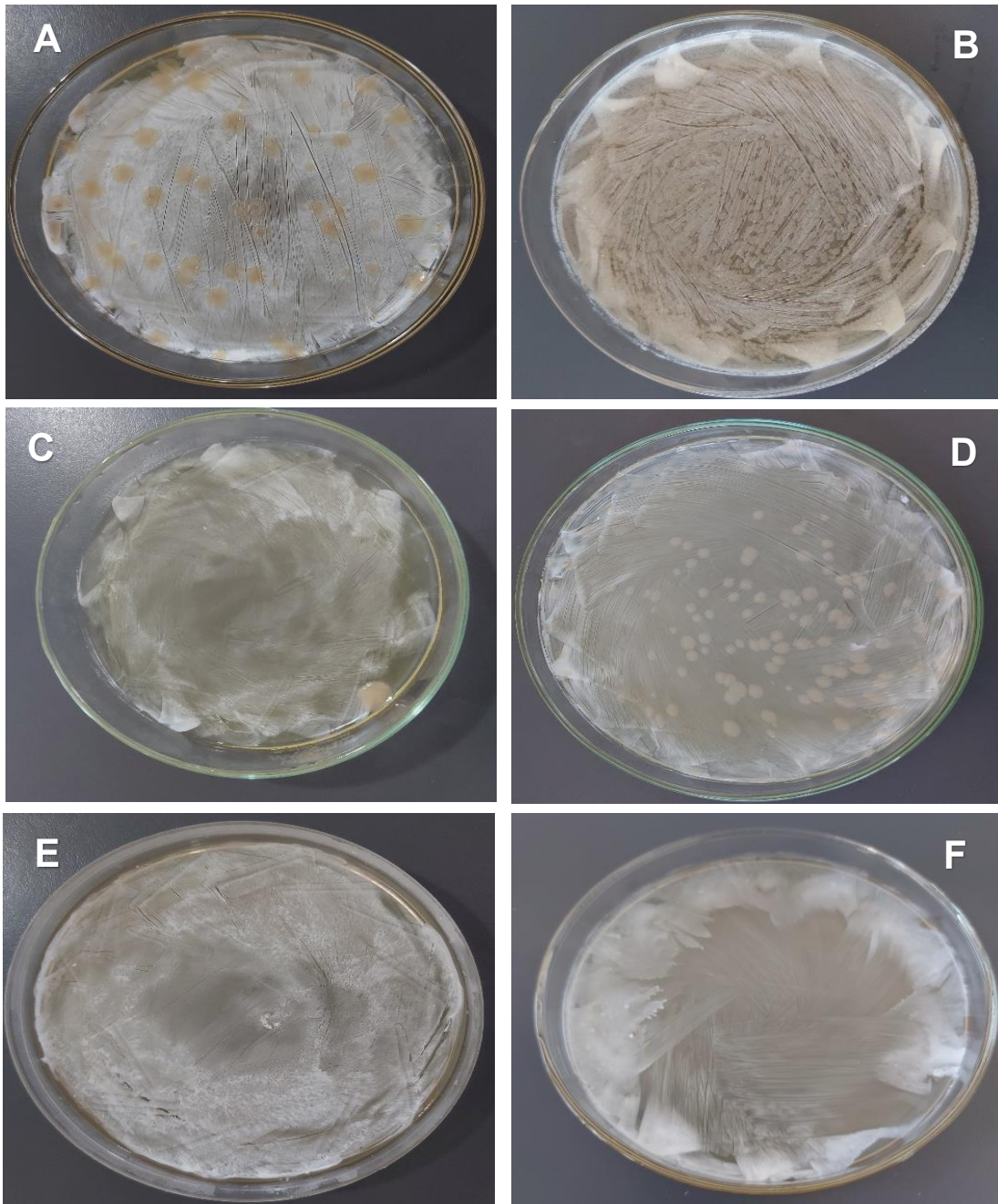


Figura 6.5-2 Conteo de colonias luego del ensayo de resistencia antibacteriana de: A y B) PCE; C y D) P1,6TD2NA5N; E y F: P1,6TD2NA5E. A, C y E luego de la 1er inoculación y B, D y F luego de la 2da inoculación de *B. horneckiae*.

En las imágenes de la Figura 6.5-2 A, C y E se muestran las placas con las UFC que se obtuvieron a partir de la resiembra de las pinturas inoculadas una sola vez (1er inoculación). En el caso de la PCE que no contenía biocidas, se observó la aparición de varias colonias en las placas como puede verse Figura 6.5-2 A. En el caso de la P1,6TD2NA5N, se registró una elevada inhibición observándose la aparición de alguna colonia aislada como puede verse en la Figura 6.5-2 C mientras que en el caso de P1,6TD2NA5E no se observó crecimiento en ninguno de los casos, Figura 6.5-2 D.

En las imágenes de la Figura 6.5-2 B, D y F se muestran las placas con las colonias que se obtuvieron a partir de la resiembra de las pinturas reinoculadas (2da inoculación). En el caso de la PCE que no contenía biocidas, se observó la aparición de un mayor número de colonias en comparación con la primera inoculación, encontrándose en el orden de  $10^3$  colonias como se puede apreciar en la Figura 6.5-2 B. En el caso de la P1,6TD2NA5N, se observó la aparición de colonias en el orden de  $10^2$ , como puede verse en la Figura 6.5-2 D, resultando en una inhibición superior al 92%. Por otro lado, P1,6TD2NA5E, siguió reportando una inhibición total (100%) del crecimiento bacteriano la cual se mantuvo luego de la 2da inoculación.

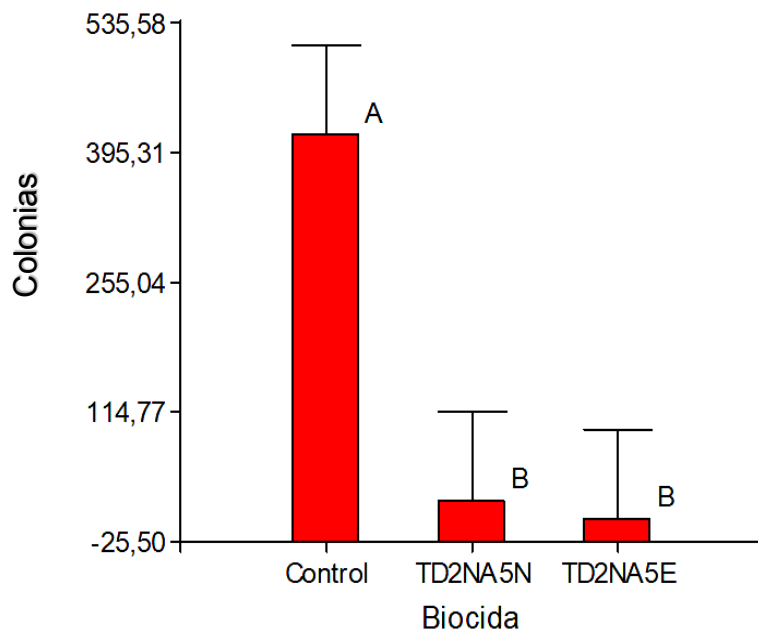


Figura 6.5-2 Gráfico de UFC frente a biocidas experimentales en las pinturas (PCE: control) inoculadas con *B. horneckiae* (luego de la 2da inoculación). Datos de comparación de medias.

En la Figura 6.5-2 se muestra el gráfico obtenido a partir de los resultados reportados de UFC en función de los biocidas ensayados. Los resultados de la prueba de comparación de medias de Tukey dentro del análisis de varianzas mostraron que, las medias de las UFC obtenidas en la pintura control, muestran diferencias estadísticamente significativas con las medias obtenidas con ambas pinturas aditivadas con TD2NA5E y TD2NA5N en estudio.



## **Capítulo 7 - Discusión general**

En este trabajo se obtuvieron nanopartículas de plata mediante síntesis verde a partir de varios extractos de vegetales, los cuales fueron caracterizados detectando la presencia de componentes fotoquímicos activos, la cuantificación de los polifenoles totales y el análisis mediante FTIR. La abundancia de polifenoles es un denominador común entre los extractos vegetales (Bellotti and Deyá, 2019).

Algunos autores han publicado estudios cromatográficos sobre la composición química de estas plantas. Por ejemplo, los derivados de kaempferol glucosilados son flavonoides muy abundantes en *E. giganteum* (Vieira et al., 2020). Se encontró en *E. giganteum* la equisetumpirona como uno de los principales componentes, junto con otros di- O- hexósido estirilpirona, en las partes aéreas, así como derivados fenólicos como kaempferol, quercetina y ácido cafeico glucosilados (Holland et al., 2020). En *Schinus molle* abundan compuestos como: beudesmol, limoneno, a-felandreno, mirceno, elemol y cariofilenol. En esta planta los valores más altos de contenido fenólico se han encontrado en la fracción de extracto soluble en agua, en comparación con otras fracciones de la misma planta (Garzoli et al., 2019). El extracto acuoso de *Ilex paraguayensis* mostró ácido clorogénico como compuestos mayoritarios, cafeína y teobromina (Panzl et al., 2022). Cabe destacar que varios autores describen un alto contenido de compuestos fenólicos en la yerba mate, relacionados con su actividad antioxidante (Kungel et al., 2018; Hegel et al., 2021). Por lo tanto, la eficiencia en la síntesis de las nanopartículas de plata podría estar ligada a varios de los fitoquímicos presentes en los extractos que al combinar su acción generan partículas en suspensión con diferentes grados de actividad antimicrobiana.

Las suspensiones de nanopartículas a partir de los distintos extractos contenían partículas de forma esférica y tamaños siempre nanométricos, lo cual nos permite relacionar el método de síntesis verde y los extractos usados con estas formas y tamaños. Cabe destacar que la síntesis de nanopartículas más estables y de menor tamaño no tuvo una relación directa con la concentración de polifenoles, dado que dos de los extractos que resultaron más eficientes al respecto (provenientes de *Equisetum giganteum* y *Senna occidentalis*) no contaban con la mayor concentración de polifenoles totales en coincidencia con lo descrito recientemente por E. Gámez y colaboradores (Gámez-Espinosa et al., 2021).

Las AgNPs obtenidas a partir de los extractos acuosos de *Senna occidentalis* (A2N) y *Equisetum giganteum* (A2E) resultaron las más activas frente a los microorganismos probados, así como fueron las más estables homogéneas en tamaño y forma al momento de la síntesis. No obstante, las nanopartículas libres, en solución acuosa son proclives a la agregación, la oxidación y por

consiguiente a la pérdida de propiedades. Debido a que este trabajo se realiza para la obtención de un biocida que según sus características de uso debe permanecer sin cambios al ser almacenado, preferentemente a temperatura ambiente debido a las características de los depósitos, el fenómeno de agregación es indeseable por ello, se recurrió a sintetizar las nanopartículas asociadas a tierras de diatomeas, teniendo en cuenta antecedentes del uso de esta técnica, estas puesto que en 2017 en el Laboratorio de Recubrimientos Antimicrobianos, del CIDEPINT, se desarrolló un trabajo donde se usó TD como soporte para la síntesis de un compuesto híbrido bioactivo basado en amonio cuaternario (Fernández and Bellotti, 2017).

Según el Servicio Geológico de Estados Unidos en 2021, la producción mundial de TDs se estimó en 830.000 toneladas con un valor procesado estimado de \$274 millones de dólares. Según datos del USGS, en Estados Unidos el 55% se usó en productos de filtración y el 45% restante en absorbentes, rellenos, agregados livianos y otras aplicaciones. Una pequeña cantidad, menos del 1%, se utiliza para fines biomédicos y farmacéuticos especializados. El valor unitario de la TD varió ampliamente entre 2020 y 2021, desde aproximadamente U\$10 por tonelada cuando se usa como un agregado liviano hasta más de U\$1,000 por tonelada para mercados especializados limitados, que incluyen materiales de arte, cosméticos y extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Crangle, 2021).

Estados Unidos es el país que más produce y usa TD en el mundo. Cerca del 4% de la TD usada en ese país proviene de Argentina, que constituye uno de los 10 productores más importantes. En tal sentido, resultan promisorios los esfuerzos en aumentar el valor agregado de este recurso natural abundante en nuestro país.

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata ha sido ampliamente estudiada y varias evidencias se encuentran documentadas en la literatura, si bien la plata, ha sido conocida desde mucho tiempo atrás por la actividad antimicrobiana en sus distintas formas iónica, metálica y/o en materiales compuestos (Ogunsona et al., 2020). En el pasado, la plata se usaba con éxito para vendajes de heridas, suturas e incluso gotas para los ojos. Sin embargo, la evolución de las cepas microbianas hacia la resistencia a los medicamentos y antibióticos ha llevado a la necesidad del desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos. Se sabe que las nanopartículas de plata con una elevada área superficial y relación de superficie/ volumen muestran una mayor actividad frente a un amplio espectro de hongos, virus y bacterias resistentes a los productos más tradicionales (Zhang et al., 2020).

Varias investigaciones, desarrollos y comparativos han reflejado la eficacia de su incorporación a los recubrimientos. Por ejemplo, Naik y Ratna en 2015, sintetizaron nanocompuestos para añadir a un recubrimiento alquídico, la resina contenía nanopartículas de plata generadas a partir de benzoato de plata. El recubrimiento exhibió inhibición completa frente *S. marcescens* a una concentración de plata de 0,5% en peso. Chen y sus colaboradores en 2012, ya habían producido nanopartículas reduciendo los iones de plata en soluciones acuosas e incorporándolos uniformemente. Los recubrimientos de Ag-LDH se depositaron sobre un sustrato de vidrio y se probaron frente a bacterias gramnegativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) y grampositivas (*B. subtilis* y *S. aureus*). La eficiencia antimicrobiana investigada resultó en una tasa de mortalidad de bacterias del 100% en 3 h. Se llevaron a cabo ciclos de reciclaje para dilucidar la estabilidad del recubrimiento Ag-LDH. Después de cuatro ciclos de reciclaje consecutivos, la eficacia antimicrobiana frente a todas las bacterias probadas fue de un mínimo de 97% de mortalidad, con un 74% de plata restante en el recubrimiento.

En los estudios realizados por Lateef y sus colaboradores en 2016, se observó la destrucción de células de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. niger*, *A. fumigatus* y *A. flavus*, cuando se puso en contacto con una pintura tratada con AgNP confirmando la efectividad de los AgNP frente a estas bacterias y hongos patógenos. Tornero y colaboradores investigaron el efecto antimicrobiano sinérgico de ZnO parcialmente recubierto con AgNP incorporado en pinturas en base acuosa contra el crecimiento de bacterias y de hongos. Los resultados del estudio revelaron una inhibición del 100% frente a *E. coli*, *S. aureus* y *A. niger* en una concentración del 0,15% (Tornero et al., 2018). Si bien la propiedad antifúngica a largo plazo (seis meses) de este material sinérgico se mantuvo, el efecto antibacteriano se redujo sustancialmente. En el estudio, esta disminución se atribuyó a la lixiviación del biocida en muestras durante el ensayo frente a las bacterias. Además, se observó oxidación de iones de plata, lo cual se atribuyó a que podrían formar complejos solubles con moléculas orgánicas libres. Estos complejos pueden enmascarar la plata o filtrarse cuando entran en contacto con el agua, reduciendo así la actividad antimicrobiana de las pinturas con AgNP. Por otro lado, el ZnO mantuvo su actividad antifúngica debido a su escasa solubilidad en agua.

Bellotti y colaboradores en 2015 estudiaron las propiedades antifúngicas de NPs de plata, cobre y óxido de zinc, obtenidas por síntesis química, en pinturas al agua frente a *C. globosum* y *A. alternata*. También, se estudió el efecto comparativo impartido por cada nanomaterial en concentraciones variadas. Los resultados revelaron una excelente inhibición del crecimiento

fúngico en una concentración de 5,8 mg / 100 g en el caso de las AgNPs con un efecto decreciente a medida que se reduce la concentración (Bellotti et al., 2015).

Estudios como estos demuestran la factibilidad de incorporar nanopartículas de plata en recubrimiento antimicrobianos. Por otro lado, luego del relevamiento bibliográfico queda claro que generalmente los estudios se concentran en la evaluación de los materiales sin envejecimiento tanto del tipo natural o acelerado. En tal sentido, el presente trabajo de tesis buscó llevar el estudio de las pinturas obtenidas más allá de la instancia de aplicación para profundizar en la eficiencia del material sometido al envejecimiento natural. Al establecer distintas estrategias para la incorporación de las AgNPs en las pinturas (libres y asociadas a un soporte natural) y evaluar la eficiencia luego de la exposición al ambiente se logró establecer una metodología integral con la intención de un mayor conocimiento de los sistemas en estudio.

Luego del relevamiento bibliográfico también se pudo observar diversidad de métodos de evaluación para el estudio de las bacterias como agentes biodeteriorantes en películas de pintura, puesto que no existe una norma de consenso general como es en el caso de los hongos (ASTM 5590). Si bien las bacterias no poseen todos los atributos deteriorantes de los hongos, su importancia sobre todo clínica en el interior de instalaciones edilicias hace pertinente su evaluación en este sentido. A diferencia de lo que ocurre con las películas de pintura, en los envases, es donde las bacterias adquieren relevancia como el principal grupo de microorganismos biodeteriorantes superando a los hongos (Samyn et al., 2021).

Se encuentran disponibles varios métodos publicados para evaluar la resistencia al crecimiento microbiano mientras las pinturas se encuentran en contenidas en el envase, donde las bacterias son muy relevantes (Samyn et al., 2022) en estado líquido. En estos ensayos, los microorganismos indicadores son una o varias especies que se originan en colecciones de cultivos o materiales deteriorados, identificadas o no, que pueden cultivarse en el medio de prueba antes de la inoculación. No obstante, hay acuerdo en el inóculo inicial y en los números de bacterias presentes en la muestra para determinar los grados de contaminación. Desde la década del 80 del siglo XX se plantearon por primera vez varios de estos protocolos como el de W.R. Springle publicado en 1983, en la revista *Industrial and Engineering Chemist Product Research and Development*, luego se sumó el del Buró Sudafricano de Estándares: SABS, por sus siglas en inglés, publicado por primera vez en 1984 y por último la norma de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales: ASTM D2574 (Gillatt, 1991). Esta última ha sido

actualizada en varias ocasiones y fue publicada por primera vez en 1986 cuya última actualización data de agosto de 2020 y se encuentra vigente al momento de la redacción de este documento.

La norma ASTM D2574, en sus diferentes actualizaciones, ha recomendado el uso de bacterias de los géneros *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.* y de *Pseudomonas sp.* como indicadores de la resistencia de la pintura al biodeterioro. De esta última especie, cepas como *P. aeruginosa (Schroeter) Migula (ATCC 15442)* y *P. aeruginosa (Schroeter) Migula (ATCC 10145)* son comercializadas específicamente para la realización de ensayos ASTM relacionados a la actividad de conservantes antimicrobianos en emulsiones, pruebas de nuevos biocidas y ensayos con pinturas. No obstante, este procedimiento también recomienda el uso de microorganismos aislados de pinturas biodeterioradas en ambientes similares a los que requiere el ensayo. En esto estuvo fundamentada la selección del aislado *B. horneckiae* para la realización de este ensayo. Como mostraron los resultados obtenidos, de la evaluación de las pinturas frente a *P. aeruginosa* y el microorganismo aislado en este trabajo de tesis, son equivalentes como testigo, para este ensayo lo que convierte a *B. horneckiae* candidato idóneo para este tipo de evaluación, en las condiciones ambientales locales.

De nuestro conocimiento, no hay referencias bibliográficas sobre compuestos de este tipo que sean eficientes tanto como preservantes en el envase, como antimicrobianos en película, debido a las diferencias que estos medios presentan, por lo que continuaremos reuniendo evidencias del funcionamiento de los aditivos antimicrobianos obtenidos en este trabajo.

## Capítulo 8 - Conclusiones



El presente trabajo de tesis doctoral se desarrolló sobre dos ejes fundamentales, el primero es la obtención de nanopartículas metálicas mediante síntesis verde, empleando extractos vegetales acuosos y sales metálicas de plata y, el segundo, la formulación y obtención de los recubrimientos que portarían a esas nanopartículas como agentes antimicrobianos. Este diseño de la investigación permitió que, desde los inicios (la selección de las especies vegetales) se tuviera en cuenta las potencialidades antimicrobianas dado que esta propiedad sería el fin último de las nanopartículas obtenidas. En este sentido, la primera hipótesis formulada fue:

- Las nanopartículas metálicas en especial de plata, pueden ser obtenidas por síntesis verde mediante el uso de extractos vegetales acuosos obtenidos a partir de distintas especies vegetales.

En este trabajo se logró establecer una metodología de síntesis verde, en la que se fijaron parámetros de: pH, temperatura, tiempo de extracción, concentración de sales según el metal y posterior almacenamiento, que fue aplicada en la síntesis con los diferentes extractos. En todos los casos se obtuvieron nanopartículas metálicas de forma cuasi esférica.

La primera estrategia abordada fue obtener nanopartículas libres en solución acuosa lo cual permitiría, sustituir el agua de la formulación de la pintura por la solución acuosa de nanopartículas, sin hacer mayores cambios en la formulación original y por tanto manteniendo las propiedades de esta, sumadas a las que conferirían las nanopartículas. Esta estrategia fue el primer acercamiento y en ella se fijaron los parámetros antes mencionados. Al obtenerse nanopartículas en solución acuosa se pudo comprobar la síntesis, en primera instancia, y la estabilidad en el tiempo de los sistemas obtenidos mediante espectrofotometría UV-Vis. Se evaluó las potencialidades antimicrobianas de las suspensiones de nanopartículas obtenidas y, además, se determinó la concentración inhibitoria mínima de cada una de ellas frente a cuatro cepas en total, dos bacterianas y dos fúngicas.

La segunda estrategia abordada fue la síntesis de las nanopartículas asociadas a tierra de diatomeas, que es un recurso natural seleccionado también por su abundancia en el territorio argentino y el auge a nivel mundial de la exploración de este para diferentes fines cada vez más vinculados a procesos tecnológicos. Esta segunda estrategia de síntesis buscó mejorar la eficiencia al integrar las nanopartículas en las pinturas, preservando su actividad antimicrobiana en el tiempo previniendo la reactividad o agregación de las nanopartículas gracias a su inmovilización en el material de soporte. Además, de facilitar las condiciones de almacenamiento.

En este caso, la estrategia consistió en sustituir uno de los pigmentos por tierra de diatomeas nanofuncionalizada, esto, también permitió aumentar la concentración de plata en la pintura final.

En esta instancia se puso en cuestión la segunda hipótesis:

- Estas nanopartículas poseen actividad biocida y pueden ser utilizadas en formulaciones de revestimientos para evitar la formación de biopelículas bacterianas y/o fúngicos sobre distintas superficies.

Al explorar las potencialidades antimicrobianas se comprobó que no todas las nanopartículas obtenidas poseían esta cualidad dado que las obtenidas a partir de *Ilex paraguariensis* (yerba mate) resultaron no activas. Luego, al determinar la concentración inhibitoria mínima tres de las nanopartículas que resultaron más inhibitorias (obtenidas a partir de *Cecropia pachystachya*, *Equisetum giganteum* y *Senna occidentalis*) se las evaluó en mayor profundidad determinándose la concentración bactericida y fungicida mínima, esta última pudo ser determinada frente a la cepa *A. alternata*. En el caso de la otra cepa fúngica, *C. globosum*, aún las concentraciones más altas de nanopartículas provocaron la inhibición del crecimiento.

Por lo tanto, no todas las nanopartículas tuvieron actividad antimicrobiana y las que la presentaron actuaron como biocida frente a tres de los microorganismos evaluados en el rango de concentraciones en estudio y en las condiciones de cultivo. No obstante, la evaluación de la actividad antimicrobiana en película que era el fin último de las nanopartículas sintetizadas arrojó que en esas condiciones *C. globosum* resultó más sensible que las otras cepas fúngicas probadas frente a la acción de las nanopartículas que integraban la película. Esto estaría relacionado con las características de *C. globosum* en cuanto a la actividad acuosa que requiere al momento del crecimiento sobre un material.

Entonces, los resultados obtenidos constituyen evidencia suficiente para rechazar la segunda hipótesis. No obstante, las nanopartículas obtenidas pudieron ser incorporadas en pinturas confiriéndole a estas su función antimicrobiana. La evaluación de la inhibición del establecimiento de películas microbianas, no se realizó únicamente a simple vista si no que se utilizaron técnicas de microscopía que permitieron evidenciar, en el caso de los hongos, la pérdida de viabilidad de las esporas inoculadas sobre las películas y se logró establecer una relación de proporcionalidad indirecta entre la concentración de nanopartículas añadidas a las pinturas y el crecimiento microbiano.

Las nanopartículas asociadas a tierras de diatomeas, TD2NA5N y TD2NA5E, mostraron impartir su bioactividad en las películas de pintura manteniéndola luego del envejecimiento frente a las cepas más resistentes *A. alternata* y *A. fumigatus*. En este trabajo, se comprobó que las nanopartículas no actúan como agentes antimicrobianos solamente en película, sino que lo hacen también en el recipiente al momento del almacenaje. Este constituye uno de los aportes más relevantes de la investigación, puesto que ambos tipos de aditivos antimicrobianos (para película y para envase) suelen ser químicamente diferentes y cada formulación suele incluir al menos uno de cada uno en la pintura. La información aportada por este trabajo de tesis, en este sentido, da lugar a formulaciones con menos aditivos y con agentes antimicrobianos amigables con el medio ambiente.

Este trabajo fue desarrollado en el CIDEPINT que, si bien es un centro de investigación único de su tipo en la región, tiene un fuerte componente de servicios al sector productivo. En este sentido se identifican aportes de la investigación realizada para enriquecer la nómina de servicios ofertados al sector productivo y al público y privado de investigación por el área de Recubrimientos Antimicrobianos:, además del impacto y potencialidades de transferencia de la presente investigación.

- ✓ La metodología utilizada, desde la selección de las materias primas hasta la obtención de los recubrimientos finales, queda establecida a partir de este trabajo, en el mismo ha sido repetida en varias ocasiones, si bien existe la posibilidad de mejora y optimización de cada uno de los pasos de la metodología, se considera uno de los valores principales de este trabajo, la obtención de varios productos finales, los cuales se encuentran listos para ser escalados y probados “in vivo” en futuras investigaciones y desarrollos.
- ✓ Otro de los aportes de este trabajo ha sido el aislamiento, identificación y registro de un aislado bacteriano autóctono, que es útil para la realización de ensayos normalizados sobre biocidas que actúan en pinturas en el envase. Estos ensayos no se llevan a cabo con frecuencia y es la primera vez que se implementan en nuestro laboratorio con resultados satisfactorios.

**En el presente trabajo se desarrollaron nuevos aditivos antimicrobianos de base nanotecnológica obtenidos por síntesis verde, aplicables en la formulación de recubrimientos protectores. Además, se demostró “in vitro” que varios de ellos tienen la capacidad de prevenir el biodeterioro de las pinturas de las que forman parte. Se cumple, por tanto, el objetivo general planteado.**

## Bibliografía

- Aburto-Medina, A., Le, P.H., MacLaughlin, S., Ivanova, E., 2021. Diversity of experimental designs for the fabrication of antifungal surfaces for the built environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 2663–2674. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11214-0>
- Adan and Samson, 2011. Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living, *Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living*. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-722-6>
- Al-Sakkaf, M.K., Onaizi, S.A., 2022. Rheology, characteristics, stability, and pH-responsiveness of biosurfactant-stabilized crude oil/water nanoemulsions. *Fuel* 307, 121845. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121845>
- Albrahim, J.S., Alosaimi, J.S., Altaher, A.M., Almulyfi, R.N., Alharbi, N.F., 2021. Employment of *Cassia angustifolia* leaf extract for zinc nanoparticles fabrication and their antibacterial and cytotoxicity. *Saudi J. Biol. Sci.* 28, 3303–3308. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.02.075>
- Allsopp, D., Seal, K.J., Gaylarde, C.C., 2004. *Introduction to Biodeterioration*. Cambridge University Press.
- American Type Culture Collection ATCC, 2021a. *Staphylococcus aureus* subsp . *aureus* Rosenbach 1–2.
- American Type Culture Collection ATCC, 2021b. *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers 4157 1–8.
- Arreche, R., Bellotti, N., Blanco, M., Vázquez, P., 2015a. Synthesis and Characterization of Zirconium Oxides for Use as Antimicrobial Additives in Paints. *Procedia Mater. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2015.05.039>
- Arreche, R., Bellotti, N., Deyá, C., Vázquez, P., 2017. Assessment of waterborne coatings formulated with sol-gel/Ag related to fungal growth resistance. *Prog. Org. Coatings* 108, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.04.007>
- Arreche, R., Igal, K., Bellotti, N., Vázquez, P., 2015b. Microbiological Prevention Using Functionalized Materials as Ecological Additives in Hygienic Paints. *Procedia Mater. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2015.05.040>
- Arreche, R.A., Igal, K., Bellotti, N., Deyá, C., Vázquez, P.G., 2019. Functionalized zirconia

- compounds as antifungal additives for hygienic waterborne coatings. *Prog. Org. Coatings* 128, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.12.004>
- Asoro, M.A., Ferreira, P.J., Kovar, D., 2014. In situ transmission electron microscopy and scanning transmission electron microscopy studies of sintering of Ag and Pt nanoparticles. *Acta Mater.* 81, 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2014.08.028>
- Auger, J.C., McLoughlin, D., 2017. Experimental and theoretical studies of perceptible color fading of decorative paints consisting of mixed pigments. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2016.10.012>
- Aw, M.S., Simovic, S., Addai-Mensah, J., Losic, D., 2011. Silica microcapsules from diatoms as new carrier for delivery of therapeutics. *Nanomedicine* 6, 1159–1173. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.29>
- Bapat, R.A., Chaubal, T. V., Joshi, C.P., Bapat, P.R., Choudhury, H., Pandey, M., Gorain, B., Kesharwani, P., 2018. An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Mater. Sci. Eng. C.* <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.069>
- Barberia-roque, L., Gámez-espinoza, E., Viera, M., Bellotti, N., 2018. International Biodeterioration & Biodegradation Assessment of three plant extracts to obtain silver nanoparticles as alternative additives to control biodeterioration of coatings. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.06.011>
- Barberia-Roque, L., Gámez-Espinoza, E., Viera, M., Bellotti, N., 2019a. Assessment of three plant extracts to obtain silver nanoparticles as alternative additives to control biodeterioration of coatings. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 141. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.06.011>
- Barberia-Roque, L., Gámez-Espinoza, E., Viera, M., Bellotti, N., 2019b. Assessment of three plant extracts to obtain silver nanoparticles as alternative additives to control biodeterioration of coatings. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 141, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.06.011>
- Barberia-Roque, Leyanet, Obidi, O.F., Gámez-Espinoza, E., Viera, M., Bellotti, N., 2019. Hygienic coatings with bioactive nano-additives from *Senna occidentalis*-mediated green synthesis. *NanoImpact* 16, 100184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100184>
- Barberia-Roque, L., Obidi, O.F., Gámez-Espinoza, E., Viera, M., Bellotti, N., 2019c. Hygienic coatings with bioactive nano-additives from *Senna occidentalis*-mediated green synthesis. *NanoImpact* 16. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100184>

- Beech, I., Otlewska, A., Skóra, J., Gutarowska, B., Gaylarde, C., 2018. Interactions of fungi with titanium dioxide from paint coating. *Indoor Built Environ.* 27, 263–269. <https://doi.org/10.1177/1420326X16670716>
- Bellotti, N., Del Amo, B., Romagnoli, R., 2012. Tara tannin a natural product with antifouling coating application. *Prog. Org. Coatings* 74, 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2011.11.014>
- Bellotti, N., Deyá, C., 2020. Waterborne functional paints to control biodeterioration. *Handb. Waterborne Coatings* 155–179. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814201-1.00007-x>
- Bellotti, N., Deyá, C., 2019. Chapter 14 - Natural Products Applied to Antimicrobial Coatings, in: Atta-ur-Rahman, B.T.-S. in N.P.C. (Ed.), . Elsevier, pp. 485–508. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64181-6.00014-0>
- Bellotti, N., Romagnoli, R., Quintero, C., Domínguez-Wong, C., Ruiz, F., Deyá, C., 2015. Nanoparticles as antifungal additives for indoor water borne paints. *Prog. Org. Coatings* 86, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.03.006>
- Bender, M. •, Buckley, •, Sattley, •, Stahl, •, n.d. Brock Biology of Microorganisms FIFTEENTH EDITION.
- Bharathi, D., Vasantharaj, S., Bhuvaneshwari, V., 2018. Green synthesis of silver nanoparticles using *Cordia dichotoma* fruit extract and its enhanced antibacterial, anti-biofilm and photo catalytic activity. *Mater. Res. Express* 5. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aac2ef>
- Cabrera, M.P., Fonseca, T.F. da, Souza, R.V.B. de, Assis, C.R.D. de, Quispe Marcatoma, J., Maciel, J. da C., Neri, D.F.M., Soria, F., Carvalho, L.B. de, 2018. Polyaniline-coated magnetic diatomite nanoparticles as a matrix for immobilizing enzymes. *Appl. Surf. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.06.238>
- Chaloupka, K., Malam, Y., Seifalian, A.M., 2010. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 28, 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.006>
- Chen, M.C., Koh, P.W., Ponnusamy, V.K., Lee, S.L., 2022. Titanium dioxide and other nanomaterials based antimicrobial additives in functional paints and coatings: Review. *Prog. Org. Coatings* 163, 106660. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2021.106660>

- Chomnawang, M.T., Surassmo, S., Wongsariya, K., Bunyaphatsara, N., 2009. Antibacterial Activity of Thai Medicinal Plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* 80, 102–104. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.10.007>
- Churqui, M.P., Lind, L., Thörn, K., Svensson, A., Savolainen, O., Aranda, K.T., Eriksson, K., 2018. Extracts of *Equisetum giganteum* L and *Copaifera reticulata* Ducke show strong antiviral activity against the sexually transmitted pathogen herpes simplex virus type 2. *J. Ethnopharmacol.* 210, 192–197. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2017.08.010>
- Commission, T.E., 2013. Legislation 10.1. <https://doi.org/10.1016/B978-1-895198-87-4.50014-1>
- Crangle, R.D., 2021. Diatomite Statistics and Information. *Nuevos Sist. Comun. e Inf.* 2013–2015.
- D2574-00 ASTM, 2020. Standard Test Method for Resistance of Emulsion Paints in the Container to Attack by, Biodegradation.
- Databook of Biocides, 2015. . Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-01348-2>
- De Oliveira Aragão, D.M., De Assis Lima, I.V., Da Silva, J.M., Bellozi, P.M.Q., De Carvalho Da Costa, J., Cardoso, G.M.M., De Souza-Fagundes, E.M., Scio, E., 2013. Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. *Phyther. Res.* 27, 926–930. <https://doi.org/10.1002/ptr.4811>
- DE OLIVEIRA, F.A., DE OLIVEIRA, F.A., DA SILVA ALAVARCE, R.A., BOSQUEIRO, A.L.D., LARA, V.S., 2014. Antimicrobial Activity of *Equisetum Giganteum* Extract Against Clinical Strains of *Candida Albicans*, *Escherichia Coli*, And Standard Strain of *Staphylococcus Aureus*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 117, e198. <https://doi.org/10.1016/J.OOOO.2013.12.254>
- Deyá, C., Bellotti, N., 2017. Biosynthesized silver nanoparticles to control fungal infections in indoor environments. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 8. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aa6880>
- El-Sawalhi, S., Fayad, E., Porras, G., Fayad, A.A., Abdel-Massih, R.M., 2021. The antibacterial activity of Libanstin from *Ilex paraguariensis* (Yerba Mate). *Fitoterapia* 153, 104962. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2021.104962>
- El-Zahry, M.R., Mahmoud, A., Refaat, I.H., Mohamed, H.A., Bohlmann, H., Lendl, B., 2015. Antibacterial effect of various shapes of silver nanoparticles monitored by SERS. *Talanta*



138, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.022>

Elbourne, A., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2017. Nano-structured antimicrobial surfaces: From nature to synthetic analogues. *J. Colloid Interface Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.07.021>

ElSayed, E.E., 2018. Natural diatomite as an effective adsorbent for heavy metals in water and wastewater treatment (a batch study). *Water Sci.* 32, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.wsj.2018.02.001>

Espinosa-Cristóbal, L.F., Martínez-Castañón, G.A., Martínez-Martínez, R.E., Loyola-Rodríguez, J.P., N. Patiño-Marín, Reyes-Macías, J.F., Ruiz, F., 2009. Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Mater. Lett.* 63, 2603–2606. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.09.018>

Fardi, T., Pintus, V., Kampasakali, E., Pavlidou, E., Schreiner, M., Kyriacou, G., 2018. Analytical characterization of artist's paint systems based on emulsion polymers and synthetic organic pigments. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 135, 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.09.001>

Fernández-Arias, M., Boutinguiza, M., del Val, J., Medina, E., Rodríguez, D., Riveiro, A., Comesaña, R., Lusquiños, F., Gil, F.J., Pou, J., 2019. RE-irradiation of silver nanoparticles obtained by laser ablation in water and assessment of their antibacterial effect. *Appl. Surf. Sci.* 473, 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.12.182>

Fernández, M.A., Bellotti, N., 2017. Silica-based bioactive solids obtained from modified diatomaceous earth to be used as antimicrobial filler material. *Mater. Lett.* 194. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.01.144>

Gámez-Espinosa, E., Deyá, C., Cabello, M., Bellotti, N., 2021. Tannin from *Schinopsis balansae* applied to the nanofunctionalization of protective antifungal coatings. *Nano-Structures and Nano-Objects* 27, 100770. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2021.100770>

Gámez-Espinosa, E., Deyá, C., Ruiz, F., Bellotti, N., 2022. LONG-TERM field study of a Waterborne paint with a nano-additive for biodeterioration control. *J. Build. Eng.* 50. <https://doi.org/10.1016/j.jobbe.2022.104148>

Ganguli, P., Chaudhuri, S., 2020. Nanomaterials in antimicrobial paints and coatings to prevent biodegradation of man-made surfaces: A review. *Mater. Today Proc.* 45, 3769–3777. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.275>

- Garzoli, S., Laghezza Masci, V., Turchetti, G., Pesci, L., Tiezzi, A., Ovidi, E., 2019. Chemical investigations of male and female leaf extracts from *Schinus molle* L. *Nat. Prod. Res.* 33, 1980–1983. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1480624>
- Gaylarde, C., Little, B., 2022. Biodeterioration of stone and metal — Fundamental microbial cycling processes with spatial and temporal scale differences. *Sci. Total Environ.* 823, 153193. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153193>
- Gillatt, J., 1991. Methods for the efficacy testing of industrial biocides - 1. Evaluation of wet-state preservatives. *Int. Biodeterior.* 27, 383–394. [https://doi.org/10.1016/0265-3036\(91\)90065-Y](https://doi.org/10.1016/0265-3036(91)90065-Y)
- Gillatt, J., Julian, K., Brett, K., Goldbach, M., Grohmann, J., Heer, B., Nichols, K., Roden, K., Rook, T., Schubert, T., Stephan, I., 2015. The microbial resistance of polymer dispersions and the efficacy of polymer dispersion biocides - A statistically validated method. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 104, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.028>
- Ginjunpalli, K., Shaw, T., Tellapragada, C., Alla, R., Gupta, L., Perampalli, N.U., 2018. Does the size matter? Evaluation of effect of incorporation of silver nanoparticles of varying particle size on the antimicrobial activity and properties of irreversible hydrocolloid impression material. *Dent. Mater.* 34, e158–e165. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.016>
- Halios, C.H., Landeg-Cox, C., Lowther, S.D., Middleton, A., Marczyklo, T., Dimitroulopoulou, S., 2022. Chemicals in European residences – Part I: A review of emissions, concentrations and health effects of volatile organic compounds (VOCs). *Sci. Total Environ.* 839, 156201. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156201>
- Harding, M.W., Marques, L.L.R., Howard, R.J., Olson, M.E., 2009. Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol.* 17, 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.007>
- He, D.C., Li, F.H., Wu, M., Luo, H.L., Qiu, L.Q., Ma, X.R., Lu, J.W., Liu, W.R., Ying, G.G., 2022. Emission of volatile organic compounds (VOCs) from application of commercial pesticides in China. *J. Environ. Manage.* 314, 115069. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115069>
- Hegel, P., Granone, L.I., Hrnčič, M.K., Pereda, S., Kotnik, P., Knez, Z., 2021. Alkaloid-rich vs. antioxidant-rich yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts: Exploiting the selectivity of supercritical CO<sub>2</sub> using hydrated ethanol as co-solvent. *J. Supercrit. Fluids* 172, 105200. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105200>
- Holland, C., Simmons, T.J., Meulewaeter, F., Hudson, A., Fry, S.C., 2020. Three highly acidic

- Equisetum XTHs differ from hetero-trans- $\beta$ -glucanase in donor substrate specificity and are predominantly xyloglucan homo-transglucosylases. *J. Plant Physiol.* 251, 153210. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153210>
- Hosseini, H., Jafari, S.M., 2020. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of nanoencapsulated food ingredients. *Charact. Nanoencapsulated Food Ingredients* 347–410. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815667-4.00011-0>
- Ijaz, I., Bukhari, A., Gilani, E., Nazir, A., Zain, H., Saeed, R., Hussain, S., Hussain, T., Bukhari, A., Naseer, Yasra, Aftab, R., 2022. Green synthesis of silver nanoparticles using different plants parts and biological organisms, characterization and antibacterial activity. *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.* 18, 100704. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100704>
- Jalab, J., Abdelwahed, W., Kitaz, A., Al-Kayali, R., 2021. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Acacia cyanophylla* and its antibacterial activity. *Heliyon* 7, e08033. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E08033>
- Jayaprakash, J., Sankari, D., Johnthomas, P., Johnmilton, D., Swaminathan, C., Sathish, M., Ganesh, M., 2021. Antibacterial and anti bio film activities of novel antibiotic conjugated silver nanoparticles. *Mater. Today Proc.* 49, 2836–2841. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.10.068>
- Karakaş, F., Çelik, M.S., 2018. Stabilization mechanism of main paint pigments. *Prog. Org. Coatings* 123, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.07.019>
- Karakaş, F., Vaziri Hassas, B., Çelik, M.S., 2015. Effect of precipitated calcium carbonate additions on waterborne paints at different pigment volume concentrations. *Prog. Org. Coatings* 83, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.02.003>
- Kungel, P.T.A.N., Correa, V.G., Corrêa, R.C.G., Peralta, R.A., Soković, M., Calhelha, R.C., Bracht, A., Ferreira, I.C.F.R., Peralta, R.M., 2018. Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Int. J. Biol. Macromol.* 114, 1161–1167. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.020>
- Lendvay-Gyorik, G., Pajkossy, T., Lengyel, B., 2007. Water uptake of water-borne paint resin films as studied by impedance spectroscopy and gravimetry. *Prog. Org. Coatings* 59, 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2007.01.015>
- Liu, Z., Huang, Z., Yan, Y., Liu, T., Lv, T., Chen, Y., Yang, J., Die, Q., Zhao, Y., Huang, Q., 2022.

- Characterizing the emission behaviors of cumulative VOCs from automotive solvent-based paint sludge. *J. Environ. Manage.* 317, 115369. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115369>
- Lokhande, G.P., Jagtap, R.N., 2016. Modified poly(butyl methacrylate-b-glycidyl methacrylate) dispersant for solvent-based paint by Reverse Atom Transfer Radical Polymerization. *Prog. Org. Coatings* 90, 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.06.025>
- Lum Nde, A., Chukwuma, C.I., Erukainure, O.L., Chukwuma, M.S., Matsabisa, M.G., 2022. Ethnobotanical, phytochemical, toxicology and anti-diabetic potential of *Senna occidentalis* (L.) link; A review. *J. Ethnopharmacol.* 283, 114663. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2021.114663>
- Machotová, J., Kalendová, A., Voleská, M., Steinerová, D., Pejchalová, M., Knotek, P., Zárbynická, L., 2020. Waterborne hygienic coatings based on self-crosslinking acrylic latex with embedded inorganic nanoparticles: a comparison of nanostructured ZnO and MgO as antibacterial additives. *Prog. Org. Coatings* 147. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.105704>
- Mahltig, B., 2017. Metal Pigments as Antimicrobial Agent and Coating Additives, in: *Handbook of Antimicrobial Coatings*. Elsevier, pp. 283–299. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811982-2.00014-7>
- Malshe, V.C., 2019. *Paints: Water-Based*, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14375-6>
- Maquiaveli, C.C., Da Silva, E.R., Rosa, L.C., Francescato, H.D.C., Lucon Júnior, J.F., Silva, C.G.A., Casarini, D.E., Ronchi, F.A., Coimbra, T.M., 2014. *Cecropia pachystachya* extract attenuated the renal lesion in 5/6 nephrectomized rats by reducing inflammation and renal arginase activity. *J. Ethnopharmacol.* 158, 49–57. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2014.09.042>
- Mast, J., Verleysen, E., Hodoroaba, V.-D., Kaegi, R., 2020. Characterization of nanomaterials by transmission electron microscopy: Measurement procedures, in: *Characterization of Nanoparticles*. Elsevier, pp. 29–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00004-3>
- Mesquita, M., Santos, E., Kassuya, C.A., Salvador, M.J., 2021. Chimarrão, terere and mate-tea in legitimate technology modes of preparation and consume: A comparative study of

- chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-anxiety properties of the mostly consumed beverages of *Ilex paraguariensis* St. H. J. Ethnopharmacol. 279, 114401. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114401>
- Mittal, A.K., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. Biotechnol. Adv. 31, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
- Mondal, S., Ghosh, C., Dhar Dwivedi, S.M.M., Ghosh, A., Sushama, S., Chakrabarti, S., Mondal, A., 2021. An experimental and theoretical understanding of a UV photodetector based on Ag nanoparticles decorated Er-doped TiO<sub>2</sub> thin film. Ceram. Int. 47, 14879–14891. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.07.311>
- Morales-Rabanales, Q.N., Coyotl-Pérez, W.A., Rubio-Rosas, E., Cortes-Ramírez, G.S., Sánchez Ramírez, J.F., Villa-Ruano, N., 2022. Antifungal properties of hybrid films containing the essential oil of *Schinus molle*: Protective effect against postharvest rot of tomato. Food Control 134, 108766. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108766>
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A., 2005. Medical microbiology. Elsevier Mosby.
- Ogunsona, E.O., Muthuraj, R., Ojogbo, E., Valerio, O., Mekonnen, T.H., 2020. Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: A review. Appl. Mater. Today 18, 100473. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.100473>
- Panáček, A., Balzerová, A., Pucek, R., Ranc, V., Večeřová, R., Husičková, V., Pechoušek, J., Filip, J., Zbořil, R., Kvítek, L., 2013. Preparation, characterization and antimicrobial efficiency of Ag/PDDA-diatomite nanocomposite. Colloids Surfaces B Biointerfaces 110, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.04.031>
- Panzl, M.V., Almeida, J.M.S., Pedrozo-Peñafiel, M., Menchaca, D., Aucélio, R.Q., Rodríguez-Haralambides, A., 2022. Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Dried Leaves of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and Their Extraction into Infusions. Polycycl. Aromat. Compd. 1–7. <https://doi.org/10.1080/10406638.2022.2030770>
- Phan, H.T., Haes, A.J., 2019. What Does Nanoparticle Stability Mean? J. Phys. Chem. C 123, 16495–16507. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b00913>
- Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Paulkumar, K., Vanaja, M., Gnanajobitha, G., Annadurai, G., 2014. Algae Mediated Green Fabrication of Silver Nanoparticles and Examination of Its Antifungal Activity against Clinical Pathogens. Int. J. Met. 2014, 1–8.

<https://doi.org/10.1155/2014/692643>

Rambhade, S., Chakraborty, A., Patil, U., Rambhade, A., 2010. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research preparations. J. Chem. Pharm. Res. 2, 7–25.

Romani, M., Warscheid, T., Nicole, L., Marcon, L., Di Martino, P., Suzuki, M.T., Lebaron, P., Lami, R., 2022. Current and future chemical treatments to fight biodeterioration of outdoor building materials and associated biofilms: Moving away from ecotoxic and towards efficient, sustainable solutions. Sci. Total Environ. 802, 149846. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149846>

Ruffolo, S.A., La Russa, M.F., Malagodi, M., Oliviero Rossi, C., Palermo, A.M., Crisci, G.M., 2010. ZnO and ZnTiO<sub>3</sub> nanopowders for antimicrobial stone coating. Appl. Phys. A Mater. Sci. Process. <https://doi.org/10.1007/s00339-010-5658-4>

Samyn, P., Bosmans, J., Cosemans, P., 2022. Current Alternatives for In-Can Preservation of Aqueous Paints: A Review 18. <https://doi.org/10.3390/iocps2021-11245>

Sardella, D., Gatt, R., Valdramidis, V.P., 2019. Metal nanoparticles for controlling fungal proliferation: quantitative analysis and applications. Curr. Opin. Food Sci. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.12.001>

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, J., Crouch, S.R., 2015. Preparación de disoluciones estándar básicas, Fundamentos de química analítica.

Someya, S., Yoshiki, Y., Okubo, K., 2002. Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). Food Chem. 79, 351–354. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00186-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00186-3)

Tornero, A.C.F., Blasco, M.G., Azqueta, M.C., Acevedo, C.F., Castro, C.S., López, S.J.R., 2018. Antimicrobial ecological waterborne paint based on novel hybrid nanoparticles of zinc oxide partially coated with silver. Prog. Org. Coatings 121, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.04.018>

Vaishampayan, P., Probst, A., Krishnamurthi, S., Ghosh, S., Osman, S., McDowall, A., Ruckmani, A., Mayilraj, S., Venkateswaran, K., 2010. *Bacillus horneckiae* sp. nov., isolated from a spacecraft-assembly clean room. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 1031–1037. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.008979-0>

Van Garderen, N., Clemens, F.J., Mezzomo, M., Bergmann, C.P., Graule, T., 2011. Investigation

- of clay content and sintering temperature on attrition resistance of highly porous diatomite based material. *Appl. Clay Sci.* 52, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2011.02.008>
- Vieira, G.T., de Oliveira, T.T., Carneiro, M.A.A., Cangussu, S.D., Humberto, G.A.P., Taylor, J.G., Humberto, J.L., 2020. Antidiabetic effect of *Equisetum giganteum* L. extract on alloxan-diabetic rabbit. *J. Ethnopharmacol.* 260, 112898. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112898>
- Vishwanath, R., Negi, B., 2021. Conventional and green methods of synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties. *Curr. Res. Green Sustain. Chem.* 4, 100205. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100205>
- W, C.J., 1982. Spectroscopic Techniques for Organic Chemists (Cooper, James W.). *J. Chem. Educ.* 59, A105. <https://doi.org/10.1021/ed059pa105.2>
- Wang, P., Zhu, H., Bao, S., Du, M., Zhang, M., 2013. AgNPs/PVA and AgNPs/(PVA/PEI) hybrids: Preparation, morphology and antibacterial activity. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 46. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/34/345303>
- Wang, Y., Cai, J., Jiang, Y., Jiang, X., Zhang, D., 2013. Preparation of biosilica structures from frustules of diatoms and their applications: Current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4568-0>
- Wu, F., Zhang, Y., He, D., Gu, J.-D., Guo, Q., Liu, X., Duan, Y., Zhao, J., Wang, W., Feng, H., 2021. Community structures of bacteria and archaea associated with the biodeterioration of sandstone sculptures at the Beishiku Temple. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 164, 105290. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105290>
- Wyszogrodzka, G., Marszałek, B., Gil, B., Dorozyński, P., 2016. Metal-organic frameworks: Mechanisms of antibacterial action and potential applications. *Drug Discov. Today* 21, 1009–1018. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.009>
- Xiong, W., Peng, J., Hu, Y., 2012. Use of X-ray absorption near edge structure (XANES) to identify physisorption and chemisorption of phosphate onto ferrihydrite-modified diatomite. *J. Colloid Interface Sci.* 368, 528–532. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.11.041>
- Yeom, H.J., Kim, S.C., Kim, Y.W., Song, I.H., 2016. Processing of alumina-coated clay-diatomite composite membranes for oily wastewater treatment. *Ceram. Int.* 42, 5024–5035. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.11.177>



- Yonathan, K., Mann, R., Mahbub, K.R., Gunawan, C., 2022. The impact of silver nanoparticles on microbial communities and antibiotic resistance determinants in the environment. *Environ. Pollut.* 293, 118506. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118506>
- Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., Gurunathan, S., 2016. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>
- Zuloaga, F.O., Belgrano, M.J., Zanotti, C.A., 2019. An update of the catalogue of the vascular plants of the Southern cone. *Darwiniana* 7, 208–278. <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2019.72.861>