

PRODUCTOS NATURALES CON CAPACIDAD BACTERICIDA Y ALGUICIDA INCORPORADOS EN PINTURAS DE EXTERIOR

Gómez de Saravia, Sandra G.^{1,2}, Blustein, Guillermo^{1,3}, Rastelli, Silvia E.^{1,2}, Viera, Marisa^{1,4}

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas- CIDEPINT, (CONICET-CICPBA- FI, UNLP), ²Fac. de Cs. Naturales y Museo (UNLP), ³Fac. de Cs. Agrarias y Forestales (UNLP), ⁴Fac. Cs. Exactas (UNLP), Email: m.viera@cidepint.ing.unlp.edu.ar

Introducción

Las pinturas de exterior se utilizan principalmente para proteger materiales estructurales del deterioro y la degradación. Muchas veces las pinturas pueden sufrir decoloración causada por la presencia de microorganismos tales como bacterias y microalgas y, si el crecimiento de estos no se controla, pueden ocurrir diversas patologías como agrietamiento, descamación y penetración de agua en el material subyacente [1-3]. La decoloración causada por el crecimiento de microorganismos es uno de los principales problemas para los fabricantes de pinturas, que incluyen biocidas químicos en sus formulaciones para evitar este fenómeno [4-7]. Los biocidas químicos muchas veces se vuelven ineficaces después de unos años de tratamiento, seguido de la recolonización por nuevos microorganismos y suelen ser contaminantes para el ambiente y el personal que los aplica [8]. Una alternativa a los químicos es utilizar como antimicrobianos y alguicidas metabolitos secundarios producidos por las plantas tales como ácidos fenólicos, flavonoides, terpenoides o alcaloides [9] de comprobada eficacia bactericida y alguicida [10-12]. Desde hace un tiempo en el laboratorio de Biofilms y Biorrosión del CIDEPINT estudiamos la capacidad bactericida y alguicida de compuestos de origen vegetal y su incorporación en pinturas y revestimientos con el propósito de evitar el desarrollo de biopelículas y el consecuente biodeterioro de materiales estructurales. El objetivo de este trabajo es presentar los resultados hallados en nuestro laboratorio sobre la actividad bactericida y alguicida de diferentes compuestos orgánicos presentes en plantas: timol, carvacrol, eugenol, isoeugenol, guayacol, anisol y ácido vainillínico, para su posterior incorporación en pinturas de exterior.

Experimental

Compuestos orgánicos naturales.

Se evaluaron siete compuestos (Sigma-Aldrich, USA) presentes en plantas: isoeugenol, carvacrol, timol, eugenol, guayacol, anisol y ácido vainillínico.

Actividad antimicrobiana de los compuestos naturales.

La actividad antimicrobiana de los compuestos naturales se evaluó utilizando el método de difusión en agar (método de Kirby-Bauer) [13] contra bacterias Grampositivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus* sp. y *Kocuria rhizophila*) y Gramnegativas (*Pseudomonas aeruginosa*) Los inóculos se prepararon en caldo Muller-Hinton con una $DO_{(600nm)} \approx 0.1$ ($\approx 10^8$ UFC ml^{-1}), luego se inocularon placas de agar Muller-Hinton con hisopo estéril. En cada placa se colocaron discos de papel filtro estériles de 6 mm de diámetro. En el papel filtro se colocaron 8 μl de una solución 4 M de cada compuesto. Las placas se incubaron 18-20 h a 30 ± 2 °C. Las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano se midieron considerando: ≤ 6 mm nula actividad antibacteriana, 7-10 mm actividad antibacteriana moderada y ≥ 11 mm actividad antibacteriana alta [13]. Asimismo, se testearon como controles dimetil sulfóxido (DMSO) (utilizado como solvente para diluir los compuestos ensayados), agua destilada y

estreptomycin (antibiótico de reconocida actividad) a una concentración de 40 mg ml⁻¹. El ensayo se realizó por triplicado.

Actividad alguicida de los compuestos naturales

Las algas utilizadas para la evaluación de la actividad alguicida se obtuvieron raspando con bisturí estéril una pared exterior pintada que mostraba signos de colonización biológica y biodeterioro [14]. La muestra fue transportada al laboratorio en condiciones estériles y se colocó en caldo BG11 para su crecimiento y mantenimiento. La actividad alguicida se evaluó mediante el ensayo de microatmósfera [15]. Para ello, 200 µl de un cultivo de algas de 7 días con aprox. 3. 10⁵ ml⁻¹ de algas se inoculó uniformemente en una placa de Petri con agar BG11. En el centro de la tapa de la placa de Petri invertida, se colocó un disco de papel de filtro estéril de 13 mm de diámetro y sobre el que vertieron 50 µl del compuesto puro o diluido en DMSO (125 mM a 1000 mM, equivalente a 5-40 µmol.cm⁻²). Las placas se incubaron bajo condiciones controladas de fotoperíodo (16/8 h luz/oscuridad) y de temperatura (25 °C) durante 28 días. Como control de crecimiento algal se emplearon placas con agar BG11 sin papel filtro y placas con papel filtro humedecido con DMSO. Todas las pruebas se realizaron por duplicado. La actividad inhibidora de los compuestos en la comunidad de algas se evaluó mediante el cálculo del porcentaje de cobertura empleando el software Image J y clasificado según Walentowska *et al.* (2015) [16].

Formulación y elaboración de la pintura

La pintura utilizada fue un látex de exterior de base acuosa formulada (**Tabla 1**) y elaborada en el CIDEPINT.

Tabla 1: Formulación de la pintura de exterior

COMPONENTES		% p/p
<i>Resinas</i>	Emulsión acrílica (Thyosil E190/E195 10:1)	40,7
<i>Pigmentos</i>	Carbonato de calcio	21,6
	Dióxido de titanio	6,1
<i>Solventes</i>	Agua	27,2
	Aguarrás mineral	2,2
	Butilglicol	0,9
<i>Aditivos</i>	Antiespumante (Thyosil Q202)	0,2
	Espesante celulósico (Cellosize 52000)	0,5
	Dispersante (Polacril D40)	0,3
	AMP-95 (aditivo multifunción)	0,1
	Surfactante (TRITON CF-10)	0,1
	Hexametáfosfato de sodio	0,1

Se utilizó un dispersor de alta velocidad y luego se filtró con malla de lycra (500-600 μm) para eliminar las partículas de mayor tamaño (aglomerados). Una porción de la pintura se utilizó como pintura control “libre de biocidas”, y el resto de la pintura se dividió en porciones a las que se le adicionaron, separadamente, los compuestos (al 2% m/m) que exhibieron actividad alguicida en los ensayos de microatmósfera. Sobre muestras de papel de filtro de 2,8 cm de lado se aplicaron, con pincel, tres manos de pintura en distintos sentidos y se dejaron secar durante 7 días a temperatura y humedad ambiente.

Actividad alguicida de pinturas al agua con compuestos naturales

El crecimiento de las algas en los papeles de filtro pintados se evaluó mediante la prueba de biorresistencia, según norma ASTM D5589-97 especificación estándar [17], en la que el valor nominal es asociado con el porcentaje de cobertura de crecimiento en la superficie. Los papeles de filtro pintados se inocularon en forma de aerosol con el inóculo algal ($1,4 \cdot 10^5$ algas. ml^{-1}). Se colocaron en placas de Petri con agar BG11 y se incubaron en condiciones controladas de fotoperíodo y temperatura (16/8 h luz/oscuridad, 25 °C) durante 28 días. El ensayo se realizó por duplicado.

Resultados y discusión

La **Figura 1** muestra la actividad bactericida de los compuestos ensayados. Los compuestos ejercieron una actividad de moderada a alta siendo el carvacrol el más eficaz, seguido del isoeugenol y el menos eficaz fue el ácido vainillínico. El mecanismo de acción del carvacrol ha sido uno de los más estudiado entre los agentes antimicrobianos naturales. El carvacrol afecta la permeabilidad de las células bacterianas al interactuar con componentes de la membrana celular [18]. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad de los compuestos y entre esta y la actividad de la estreptomycin. Cabe señalar que *Pseudomonas aeruginosa* solo fue sensible a la estreptomycin. Por el contrario, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus sp.* y *Kocuria rhizophila* fueron más susceptibles al carvacrol que a la estreptomycin.

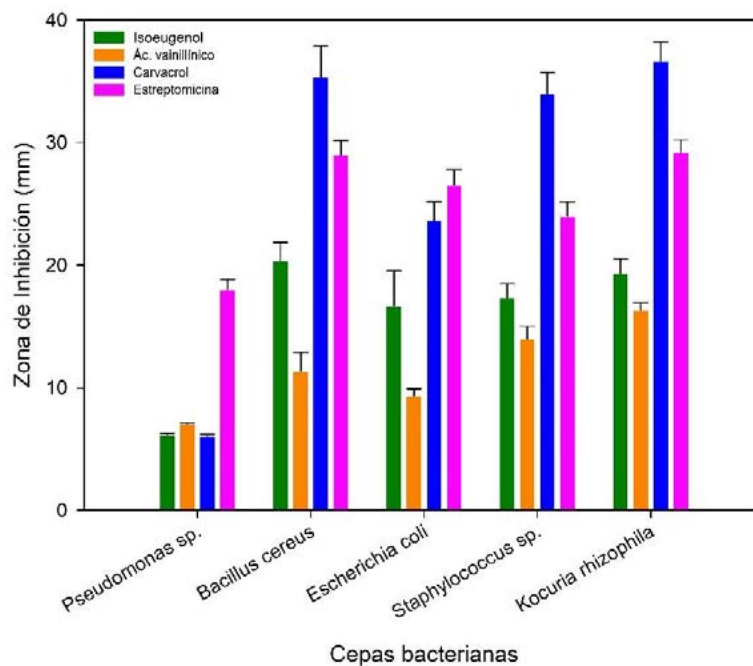


Figura 1. Zona de inhibición de crecimiento (en mm) ejercida por los compuestos naturales y el antibiótico de referencia sobre las cepas bacterianas ensayas.

Los ensayos de microatmósfera mostraron variados resultados del efecto alguicida de los diferentes compuestos y en sus diferentes concentraciones. En la **Figura 2** se presentan solo algunos resultados a modo de ejemplo. De acuerdo con este ensayo, timol, carvacrol, eugenol, isoeugenol y guayacol fueron seleccionados para ser incorporados en la formulación de la pintura. La actividad alguicida de algunos de estos compuestos no es sorprendente dada la gran similitud estructural que existe entre ellos. Estos compuestos son isómeros estructurales (carvacrol-timol por un lado y eugenol-isoeugenol por el otro). De hecho, los cuatro compuestos presentan un anillo fenólico, que tal vez sea el responsable de su bioactividad [19].

Tratamiento

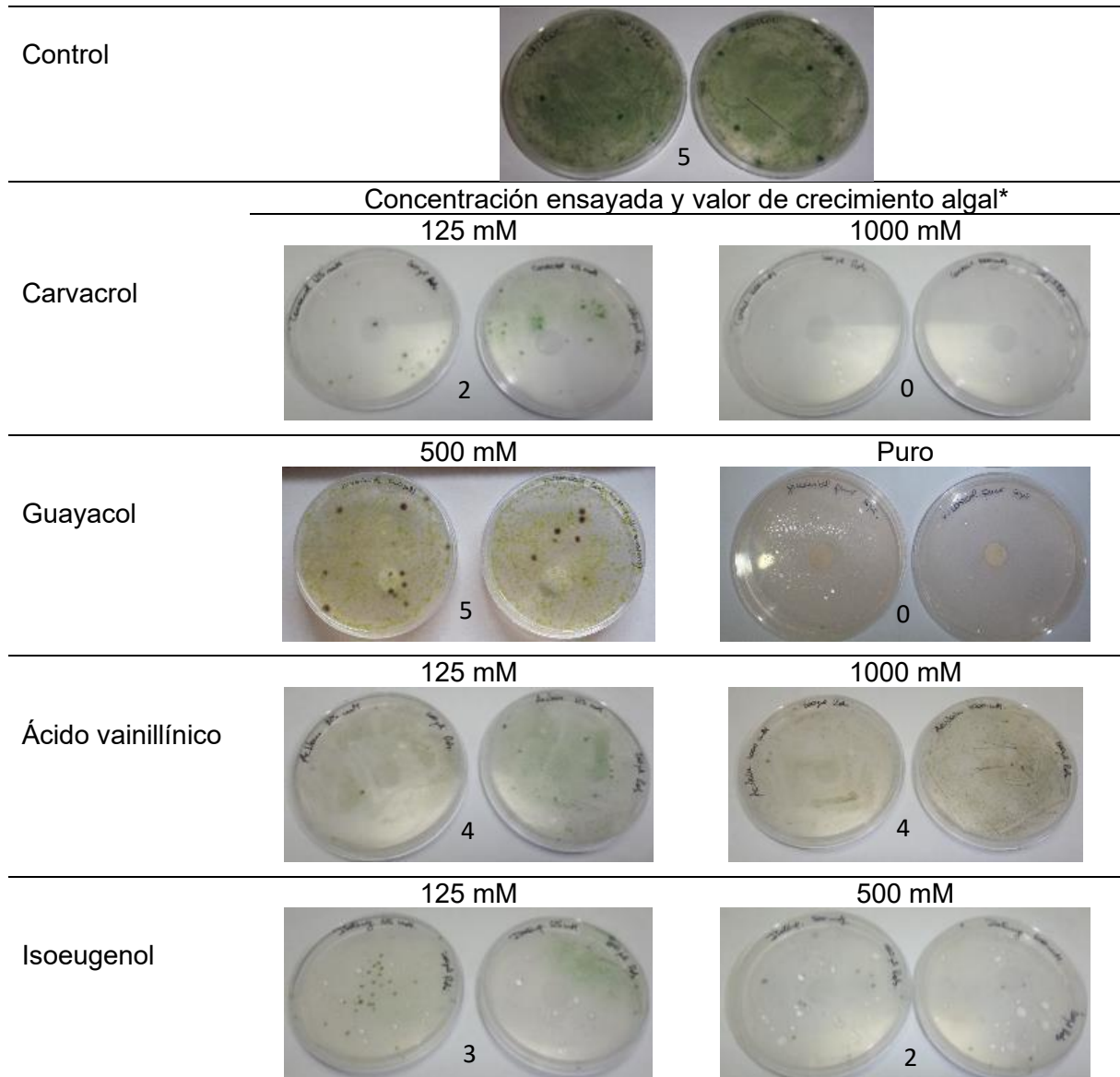


Figura 2. Algunos de los resultados obtenidos para el ensayo de microatmósfera. * El valor del crecimiento algal se basa en la siguiente escala: 0: sin crecimiento visible evaluado microscópicamente, 1: sin crecimiento visible a simple vista (visible al microscopio); 2: crecimiento visible a simple vista, hasta el 25% de la superficie; 3: crecimiento visible a simple vista, hasta el 50% de la superficie; 4: crecimiento mayor al 50% de la superficie; 5: crecimiento muy intenso, cubriendo toda la superficie [15].

Los resultados del ensayo de resistencia al crecimiento de las algas de las pinturas con los compuestos incorporados se muestran en la **Figura 3**. Puede notarse el efecto de inhibición total del crecimiento algal de todos los compuestos empleados.

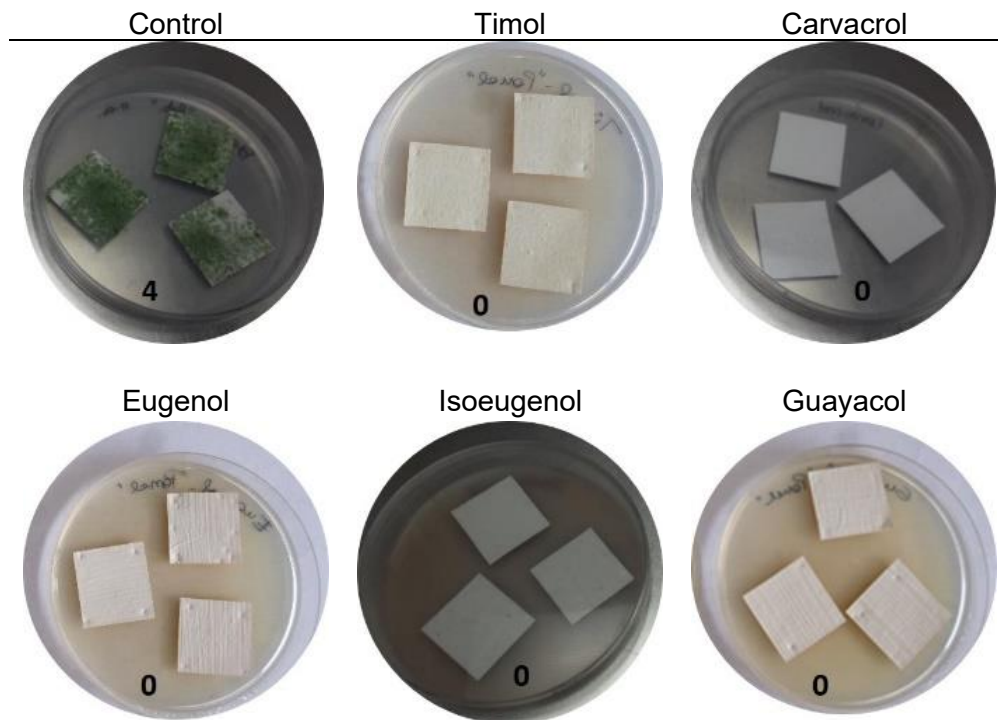


Figura 3. Ensayo de crecimiento algal sobre muestras pintadas. Los números indican la valoración del porcentaje de cobertura según Norma ASTM D5589-97: 4 = cobertura > 60% = crecimiento elevado; 0 = sin crecimiento.

Conclusiones

- El isoeugenol, el carvacrol y el ácido vainillínico exhibieron propiedades antibacterianas contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas.
- Eugenol, timol, guayacol, carvacrol e isoeugenol ejercieron en mayor o menor medida una inhibición del crecimiento algal en las concentraciones ensayadas.
- Anisol y ácido vainillínico no mostraron ningún efecto alguicida aún en su estado puro.
- En todos los casos, las pinturas formuladas con los compuestos bioactivos incorporados inhibieron la colonización algal.
- Estos compuestos, por lo tanto, podrían incorporarse como potenciales biocidas en formulaciones de pintura de exterior con el objeto de evitar el biodeterioro de las superficies pintadas.

Bibliografía

- [1] Mulec J., Kosi G. (2009). Lampenflora algae and methods of growth control. *J. Cave Karst Stud.* 71; 109–115.
- [2] Borderie F., Denis M., Barani A., Alaoui-Sosse B., Aleya L. (2016). Microbial composition and ecological features of phototrophic biofilms proliferating in the Moidons Caves (France): investigation at the single-cell level. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23; 12039–12049.

- [3] Mihajlovski A., Seyer A., Benamara D., Bousta H., Martino F., Di P. (2014). An overview of techniques for the characterization and quantification of microbial colonization on stone monuments. *Microbiol.* 531; 289–303.
- [4] Shirakawa, M.A., Tavares, R.G., Gaylarde, C.C., Taqueda, M.E.S., Loh, K., John, V.M. (2010). Climate as the most important factor determining anti-fungal biocide performance in paint films. *Sci Total Environ.* 408; 5878-5886.
- [5] Souza de, A., Gaylarde, C.C. (2002). Biodeterioration of varnished wood with and without biocide: implications for standard test methods. *Int Biodeter Biodegr.* 49; 21-25.
- [6] Gaylarde, P.M., Shirakawa, M.A., John, V., Gambale, W., Gaylarde, C.C. (2004). Statistical analysis of fungicide activity in paint films on two buildings. *Surf. Coat. Int Part B: Coatings Transactions.* 87; 261-264.
- [7] Crispim, C.A., Gaylarde, C.C. (2005). Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: a review. *Microb. Ecol.* 49; 1-9.
- [8] Gaylarde C.C., Morton L.H.G., Loh K., Shirakawa M.A. (2011). Biodeterioration of external architectural paint films – a review, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65; 1189–1198.
- [9] Fistarol G.O., Legrand C., Selander E., Hummert C., Stolte W., Graneli E. (2004). Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquat. Microb. Ecol.* 35; 45–56.
- [10] Svetaz L., Derita M., Rodríguez M.V., Postigo A., Butassi E., Castelli M.V., Sortino M., Petenatti E., Zacchino S. (2013). Antifungal compounds from Latin American plants, in: *Antifungal Metabolites from Plants*, Springer, Berlin Heidelberg, 3–26.
- [11] Lee K.M., Lim J., Nam S., Yoon M.Y., Kwon Y.-K., Jung B.Y., Park Y.J., Park S., Yoon S.S. (2011). Inhibitory effects of broccoli extract on *Escherichia coli* O157:H7 quorum sensing and in vivo virulence. *FEMS Microbiology Letters*, 321; 67–74.
- [12] Hidalgo G., Chan M., Tufenkji N. (2011). Inhibition of *Escherichia coli* CFT073 *fliC* expression and motility by cranberry materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 77; 6852–6857.
- [13] Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45; 493–496.
- [14] Gomez de Saravia, S.G., Rastelli S. E., Blustein, G., Viera, M. (2021). Antibacterial and algaecide activity of three natural compounds: Lab-test approaches on their potential use in paint formulations *J. Build. Eng.* 43,10256.
- [15] Delespaul Q., de Billerbeck V.G., Roques C.G., Michel G., Marquier-Viñuales C., Bessièrre J.M. (2000). The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *J. Essent. Oil Res.* 12; 256–266.
- [16] Walentowska J., Foksowicz-Flaczyk J., Przybylak M., Maciejewski H. (2015). Studies on biocidal properties of textile materials modified by organosilicone compounds, in: A. Méndez Vilas (Ed.) *Multidisciplinary Approaches for Studying and Combating Microbial Pathogens*, Brown Walker Press, Boca Ratón, Florida USA, 127–130.
- [17] ASTM D5589-97 (2002). Standard Test Method for Determining the Resistance of Paint Films and Related Coatings to Algal Defacement
- [18] Lambert R.J., Skandamis P.N., Coote P.J, Nychas G.J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91; 453–462.
- [19] Bouarab-Chibane L., Forquet V., Lantéri P., Clément Y., Léonard-Akkari L., Oulahal N., Degraeve P., Bordes C. (2019). Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (quantitative structure–activity relationship) models. *Front. Microbiol.* 10; 829–851.