

ACTIVIDAD ANTIFOULING DE COMPUESTOS DERIVADOS DE ACEITES ESENCIALES

Miriam Pérez^{a,b}, Mónica García^a, Guillermo Blustein^{a,c,*}

^aCentro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT)
Avenida 52 e/ 121 y 122 La Plata (1900), Argentina

^bFacultad de Ciencias Naturales y Museo – Universidad Nacional de La Plata
Avenida 122 e/ 60 y 61 La Plata (1900), Argentina

^cFacultad de Ciencias Agrarias y Forestales – Universidad Nacional de La Plata
Avenida 60 y 119 La Plata (1900), Argentina

*antifouling@cidepint.gov.ar

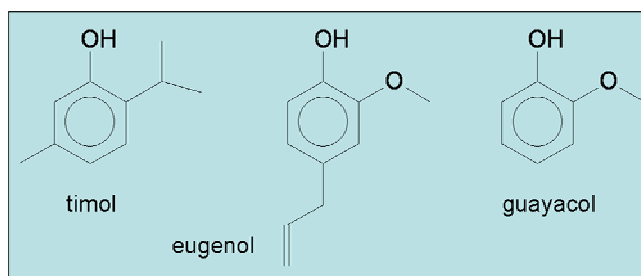
INTRODUCCIÓN

Se conoce como *biofouling* a la fijación y crecimiento de micro y/o macroorganismos sobre cualquier sustrato duro sumergido natural o artificial. El *biofouling* marino afecta seriamente las estructuras sumergidas causando grandes pérdidas económicas. La aplicación de pinturas antiincrustantes es el método más empleado para su control aunque en su mayoría contienen sustancias tóxicas tales como TBT y óxido cuproso que son altamente contaminantes del agua, los sedimentos y la biota. Si bien el uso del TBT ha sido prohibido debido al daño que ocasiona en el ecosistema marino [1], no ha sucedido lo mismo con el óxido cuproso. En este contexto se buscan productos de origen natural que permitan reducir el contenido de cobre de las formulaciones y de este modo disminuir su aporte al medio ambiente.

Los aceites esenciales extraídos de plantas tienen aplicaciones en la medicina étnica y preservación de alimentos así como en la industria cosmética y farmacéutica [2-5]. Si bien estos compuestos son de origen natural, muchos de ellos se obtienen por síntesis en laboratorio lo que representa una ventaja desde el punto de vista de su disponibilidad en el mercado. En este sentido se eligió al timol, al eugenol y al guayacol a fin de evaluar su comportamiento en laboratorio y en el mar. La hipótesis que se plantea es que podrían actuar inhibiendo el proceso inicial de asentamiento del *biofouling* marino y, consecuentemente, evitar la fijación posterior del macrofouling.

El timol (Fig. 1) se aísla de los aceites esenciales de numerosas plantas como el tomillo y el orégano y ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antimicrobianas [6].

Figura 1. Estructuras químicas



El eugenol (Fig. 1) predomina en los aceites esenciales del clavo de olor, la nuez moscada y la canela y es usado como saborizante, antiséptico, anestésico local en

odontología, agente antimicrobiano y en perfumería [4]. Por su parte, el guayacol (Fig. 1) es un compuesto fenólico natural que se aísla de la resina del guayacán y puede obtenerse industrialmente por síntesis orgánica a partir del catecol. Este compuesto se utiliza en clínica como expectorante, antiséptico y anestésico local entre otras aplicaciones.

Además, es importante destacar que todos los compuestos elegidos son biodegradables [7-9].

Los objetivos de este trabajo son, por un lado, evaluar la potencial actividad antifouling de los derivados de aceites esenciales en el laboratorio y por otro reducir el contenido de cobre en las pinturas antiincrustantes usándolo como aditivo.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Bioensayos

Los ensayos se realizaron sobre larvas nauplii y cypris de *Balanus amphitrite*. La forma adulta de esta especie posee un exoesqueleto calcáreo, se asienta sobre sustratos duros y es considerado entre los más perjudiciales dentro de la comunidad incrustante. Para los bioensayos se expusieron 30 nauplii II de *Balanus amphitrite* a distintas concentraciones de timol, eugenol y guaiacol durante 24 horas a fin de determinar la concentración necesaria para inhibir el 50% de la población (LC₅₀). Los parámetros estudiados para evaluar el efecto del compuesto fueron los movimientos de natación y el fototactismo.

Por otra parte se realizaron tests de asentamiento utilizando 20 larvas cypris que fueron mantenidas a 6°C durante 4 días previo al ensayo [10]. Las concentraciones para cada compuesto fueron las mismas del ensayo anterior. Se determinó la concentración efectiva para inhibir el asentamiento del 50% de la población (EC₅₀). En estos ensayos las larvas no nadadoras, con apéndices extendidos o con sus valvas cerradas fueron consideradas como inactivas. La observación se realizó bajo estereomicroscopio y se registraron los porcentajes de larvas nadadoras, inactivas y fijadas; los valores de LC₅₀ y EC₅₀ fueron determinados por análisis Probit.

En todos los casos para completar los estudios se llevaron a cabo pruebas de recuperación trasladando los organismos a agua de mar limpia. Las experiencias se realizaron a 22 ± 2°C, por triplicado con sus respectivos controles; se aplicaron tests estadísticos evaluándose los resultados con ANOVA y test de contraste Tukey.

Ensayos con pinturas en el mar

Se prepararon cuatro pinturas antifouling (Tabla 1). El vehículo de la pintura (resina + solvente) se preparó en una dispersora de alta velocidad agregando lentamente la resina colofonia a la mezcla de solventes. Luego, las pinturas se prepararon en un molino de bolas de 1L de capacidad dispersando los pigmentos y los demás componentes en el vehículo durante 24 horas.

Las pinturas fueron aplicadas con pincel hasta un espesor final de película seca de 100±5µm, sobre paneles de acrílico (8 cm x 12 cm) previamente arenados y desengrasados con tolueno. Los paneles pintados y los controles sin pintura se expusieron en el Club de Motonáutica del puerto de Mar del Plata (38° 08' S – 57° 31' W) a 50 cm por debajo de la superficie del agua.

Luego de 6 meses de inmersión los paneles se retiraron y se evaluó la actividad antiincrustante de las pinturas por medio de la estimación de los porcentajes de cobertura total de cada una de las especies fijadas. Los paneles se observaron en el laboratorio bajo lupa binocular y microscopio óptico. Las experiencias se realizaron por triplicado y se aplicaron test estadísticos evaluándose los resultados con ANOVA y test de contraste Tukey.

Tabla 1 – Composición de las pinturas (% volumen)

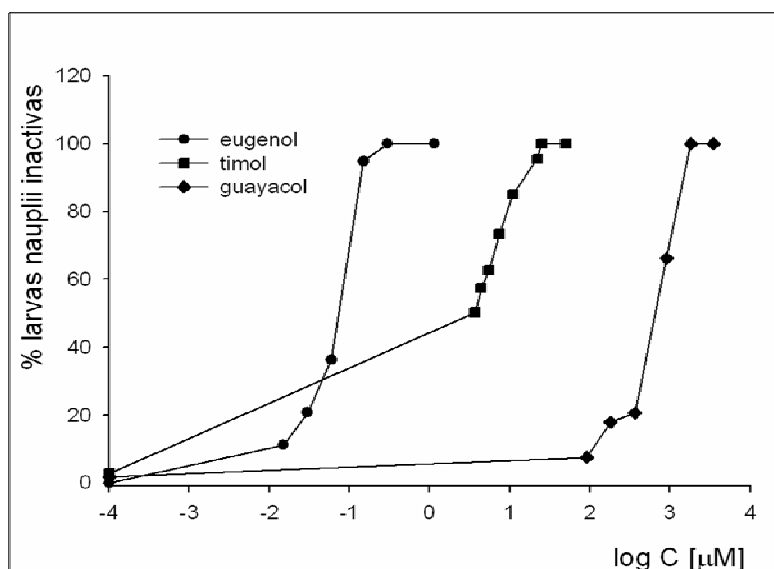
Componentes	PCI	PCII	Cu+timol	Cu+eugenol	Cu+guayacol
Óxido cuproso	16,0	1,6	1,6	1,6	1,6
Tiza	11,0	25,4	23,4	23,4	23,4
Timol	----	----	2,0	----	----
Eugenol	----	----	----	2,0	----
Guayacol	----	----	----	----	2,0
Colofonia	27,0		27,0	27,0	27,0
Ácido oleico	6,0		6,0	6,0	6,0
xileno/aguarrás mineral	40,0		40,0	40,0	40,0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayos

Los ensayos de toxicidad de 24 horas, realizados con larvas nauplii de *Balanus amphitrite*, demostraron un marcado efecto inhibitorio del timol, eugenol y guayacol con valores de LC_{50} de $4,41\mu M$, $0,059\mu M$ y $0,53\text{ mM}$ respectivamente (Fig. 2). Todos los organismos expuestos a las distintas concentraciones de los tres compuestos ensayados recuperaron su actividad normal cuando fueron transferidos a agua limpia, por lo que se infiere que su efecto inhibitor es temporal.

Figura 2 - Ensayo de toxicidad de 24 horas

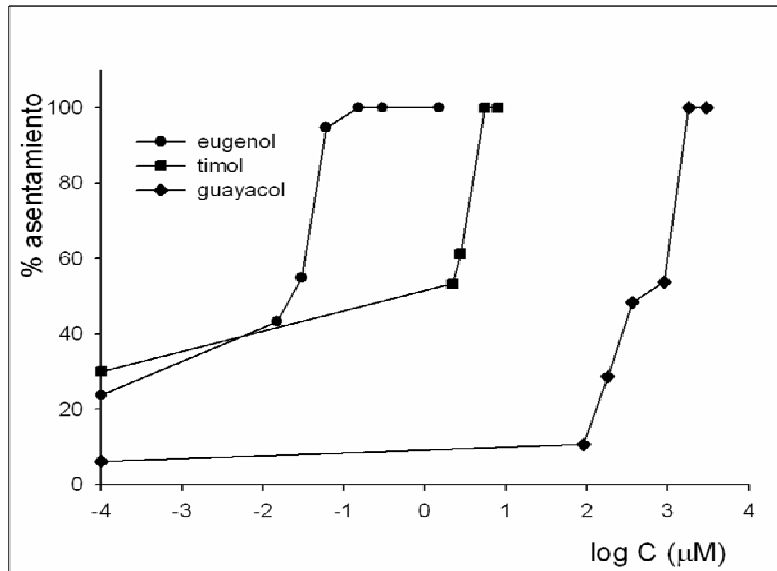


En cuanto al test de asentamiento, el análisis ANOVA indica que hay diferencias significativas en los porcentajes de fijación de las cypris frente a las distintas concentraciones ensayadas de los distintos compuestos respecto de los controles ($p < 0,05$). Por otra parte, la concentración inhibitoria para el 50% de la población de cypris (EC_{50}) fue de $2,26\mu M$, $0,024\mu M$ y $0,419\text{ mM}$ para el timol, eugenol y guayacol, respectivamente (Fig. 3).

El índice terapéutico [11] es una medida que expresa la efectividad de un compuesto en relación a su toxicidad y se calcula como LC_{50}/EC_{50} . Para los experimentos con timol fue de 1,95, con eugenol de 2,46 y para el guayacol de 1,26. Dado que estos

valores son mayores que 1, se concluye que estos compuestos actúan por un mecanismo de acción no tóxico, como puede corroborarse con las pruebas de recuperación.

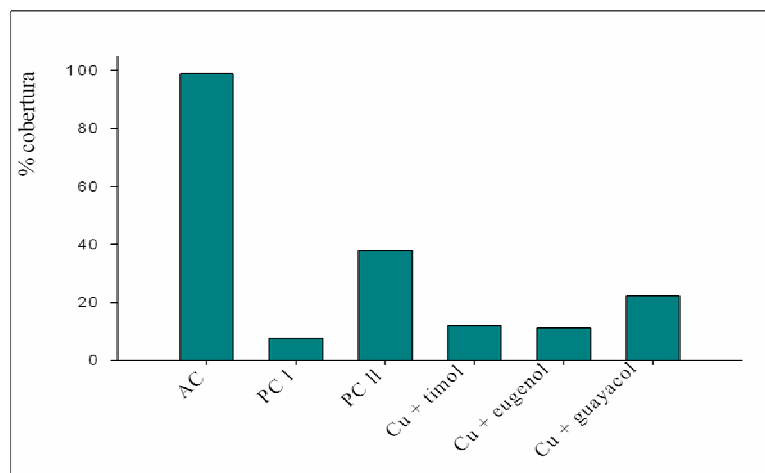
Figura 3 - Test de asentamiento de 24 horas



Ensayos con pinturas en el mar

Como puede observarse en la Figura 4, luego de 6 meses de exposición en el puerto de Mar del Plata, las pinturas que contienen timol, eugenol y guayacol con 1,6% de cobre fueron tan efectivas como la que contienen cobre al 16% dado que presentaron diferencias significativas en la cobertura total respecto a la pintura de cobre 1,6% (PCII) y a los controles de acrílico ($p < 0.05$). No se registraron diferencias significativas en los porcentajes de cobertura entre las formulaciones que contienen timol, eugenol y guayacol con 1,6% de cobre y la pintura control con cobre 16% (PCI) ($p > 0,05$).

Figura 4 – Porcentaje de cobertura luego de 6 meses de inmersión



CONCLUSIÓN

Los resultados de laboratorio indican que tanto timol, eugenol como guayacol son potentes inhibidores de las larvas nauplii y cypris de *Balanus amphitrite* y actúan a bajas concentraciones a través de un mecanismo no tóxico. La efectividad de las pinturas formuladas con los compuestos seleccionados+1,6% de cobre fue similar a las pinturas que contenían 16% de cobre como pigmento antifouling. Aún presentando una performance equivalente se logró reducir en un 90% el contenido de cobre manteniendo la actividad antifouling.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONICET, CICPBA y Universidad Nacional de La Plata por el apoyo brindado para realizar este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] L. Chambers, K. Stokes, F. Walsh, R. Wood, "Modern approaches to marine antifouling coatings". Surf. Coat. Technol., 201 (2006) 3642-3652.
- [2] M. Pascual, K. Slowing, E. Carretero, D. Sánchez Mata and A. Villar, "*Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review". Journal of Ethnopharmacology, 76 (2001), p. 201–214. (2012), p. 6953-6981.
- [3] S. Burt, "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review"; International Journal of Food Microbiology, 94 (2004), p. 223-253.
- [4] G. Kamatou, I. Vermaak and A. Viljoen, "Eugenol-from the remote Maluku Islands to the International Market Place: a review of a remarkable and versatile molecule"; Molecules, 17 (2012), p. 6953-6981.
- [5] A. Edris, "Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review"; Phytother. Res, 21 (2007), p. 308-323.
- [6] M. Rota, A. Herrera, R. Martínez, J. Sotomayor and M. Jordán. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food Control 19 (2008) 68-687.
- [7] J. Kadakol and C. Kamanavalli, "Biodegradation of eugenol by *Bacillus cereus* Strain PN24"; EJournal of Chemistry, 7 (2010), p. 474-480 (<http://www.e-journals.net>).
- [8] R. Bobadilla, C. Varela, R. Céspedes, B. González. Engineering bacterial strains through the chromosomal insertion of the chlorocatechol catabolism tfdICDEF gene cluster, to improve degradation of typical bleached Kraft pulp mill effluent pollutants. EJB Electronic Journal of Biotechnology, (2002) 5 (2), 162-172.
- [9] E. Chamberlain and S. Dagley. The metabolism of thymol by a *Pseudomonas*. Biochem. J. (1968) 110, 755.
- [10] D. Rittschof, A. Clare, D. Gerhart, M. Avelin and J. Bonaventura, "Barnacle in vitro assays for biologically active substances: toxicity and settlement assays using mass cultured *Balanus amphitrite amphitrite* Darwin"; Biofouling, 6 (1992), p. 115-122.
- [11] D. Rittschof, N. Sasikumar, D. Murlless, A. Clare, C. Gerhart and J. Bonaventura, "Mixture interactions of lactones and furans and a commercial biocide: toxicity and antibarnacle settlement activity". In: Thompson M-F, Nagabhushanam R, Sarojini R, Fingerman M, editors. Recent developments in biofouling control. Rotterdam; Balkema AA. p. 269-274.