



Tópico 3 - Nº 14

EVALUACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS PARA PINTURAS

Natalia Bellotti (1,2); Sofía Bogdan (3); Cecilia Deyá (2,4); Beatriz del Amo (4); Roberto Romagnoli (2,4)

(1)Profesional CONICET, (2)Docente UNLP, (3)Becaria CONICET, (4)Investigador CONICET, CIDEPINT-Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CICPBA-CONICET LA PLATA). Av. 52 s/n entre 121 y 122. C.P. 1900 La Plata, Argentina
E-mail: pinturashigienicas@cidepint.gov.ar

RESUMEN

Los diversos materiales con valor histórico y cultural están expuestos al biodeterioro como consecuencia del ataque microbiológico. Para preservarlos se utilizan, muchas veces, recubrimientos y/o pinturas que contienen agentes activos llamados biocidas cuya finalidad es la de prevenir la colonización por parte de los microorganismos. Entre los microorganismos considerados más deteriorantes se encuentran los hongos que, además de manchar las paredes y degradar los materiales expuestos, afectan también la salud humana. En la actualidad es materia de estudio el reemplazo de los biocidas comerciales por otros que presenten un menor impacto ambiental, particularmente los obtenidos a partir de productos naturales. En tal sentido, en el presente trabajo se evaluó la actividad antifúngica, en forma preliminar, de cinco productos vegetales comerciales: dos taninos extraídos de: tara y quillaja y tres aceites esenciales: de pino, del árbol de té y de romero; con el objetivo de seleccionar los más eficientes para ser utilizados, en una etapa posterior, en la elaboración pinturas protectoras.

La actividad antifúngica se evaluó frente a dos hongos *Alternaria alternata* y *Chaetomium globosum* mediante el ensayo de inhibición en placa. Los hongos aislados fueron obtenidos de películas de pinturas biodeterioradas, según un procedimiento descrito en un trabajo previo.

Palabras-Clave: extractos vegetales, biocidas, pintura

1. INTRODUCCION

La protección del patrimonio histórico y cultural requiere tener en cuenta el biodeterioro ejercido sobre diversos sustratos por microorganismos como hongos, bacterias y algas [1-3]. Algunos materiales utilizados en edificios históricos resultan ser susceptibles a la colonización microbiológica por sus características superficiales como, por ejemplo, una alta porosidad. Para prevenir la colonización microbiológica, entre otras estrategias, se utilizan recubrimientos y/o pinturas de distinto tipo. Entre los recubrimientos existen productos poliméricos de base silíceo y orgánica conocidos también como consolidantes [3]. Las pinturas antimicrobianas son formuladas para evitar la proliferación microbiológica [4,5]. Sin embargo, estos sistemas protectores generalmente contienen polímeros acrílicos, poliuretánicos o epoxídicos que no son resistentes al biodeterioro [3]. Por lo tanto, la incorporación de agentes antimicrobianos (biocidas) es habitual en estas formulaciones a fin de lograr una mayor eficiencia tanto para proteger el sustrato como la película protectora [3,5].

El estudio de nuevos biocidas amigables con el medio ambiente, obtenidos a partir de productos naturales resulta una de las líneas de investigación a seguir. En tal sentido existe bibliografía que muestra el interés en el estudio de ciertos organismos que han desarrollado mediante la evolución natural la habilidad para resistir o prevenir la colonización microbiológica [6]. Uno de los tantos productos naturales estudiados, a modo de ejemplo, lo constituyen los péptidos como el CM15 un



péptido sintético que fue desarrollado en base a uno que aparece comúnmente en las polillas [6,7].

Otros de los productos de origen natural, de especial interés para el presente trabajo, con potenciales propiedades antimicrobianas son los extraídos de vegetales como los polifenoles y los aceites esenciales [8-10]. Algunos de estos productos han encontrado aplicación en varios campos incluyendo el medicinal y el de la industria alimenticia [11].

Los compuestos polifenólicos, componentes mayoritarios de los taninos, se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y pueden llegar a acumularse en grandes cantidades, a menudo más del 10% del peso seco, en distintas partes del vegetal: madera, corteza, raíces, hojas, frutos y agallas [9]. Los compuestos polifenólicos cumplen un rol significativo en la defensa de los vegetales frente al ataque de agentes patógenos [10,12]. Se diferencian de otros compuestos naturales en que se complejan fuertemente con carbohidratos y proteínas; característica que ha sido aprovechada industrialmente en el curtido de cueros [9,12]. Los taninos también son utilizados en la fabricación de plásticos y adhesivos, en la conservación de aparejos de pesca, para clarificar de vinos, como sustituto de la malta y en cosmetología, entre otras aplicaciones [13].

En relación a los aceites esenciales son extraídos comúnmente de algunas familias botánicas como las Pináceas, Verbenáceas, Mirtáceas, Rutáceas, Lauráceas y Piperáceas entre otras [8]. Están compuestos por una combinación de metabolitos que generalmente contienen terpenos, fundamentalmente mono (diez átomos de carbono) y sesquiterpenos (quince átomos de carbono) [8]. Entre las ramas de la industria que más consumen esencias podemos citar la: cosmética (perfumes), alimenticia (saborizantes y aditivos), farmacéutica (antisépticos), limpieza (desinfectantes y desodorantes), etc. [8]. El uso de los extractos vegetales tiene como mayor ventaja el posible efecto sinérgico aportado por la suma de los componentes activos [14].

Teniendo en cuenta lo expuesto precedentemente, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar cinco productos vegetales comerciales como posibles agentes antifúngicos para seleccionar los más apropiados, en una etapa posterior, con el fin de ser parte de la formulación de pinturas. Los productos seleccionados fueron: tanino de tara; tanino de quillaja; aceite de pino; aceite del árbol de té y aceite de romero. En todos los casos se evaluó la actividad antifúngica mediante el ensayo de inhibición en placa [15,16] con distintas concentraciones frente a los hongos *Alternaria alternata* y *Chaetomium globosum*.

Los hongos utilizados en dicha evaluación fueron aislados a partir de muestras tomadas de pinturas biodeterioradas mediante técnicas microbiológicas de rutina según un trabajo previo [17]. Los hongos fueron seleccionados por su capacidad de crecer y deteriorar las películas de pintura, además del efecto negativo que tienen sobre la salud humana [5,18]. La especie *Alternaria* es capaz de producir una variedad de compuestos entre los que se encuentran las micotoxinas que son tóxicas para los mamíferos y las aves [19] y la especie *Chaetomium* es conocida por producir compuestos celulolíticos que originan la degradación especialmente de las pinturas de base acuosa que contienen espesantes celulósicos [19,20].

METODOLOGÍAS

2.1 Materiales

Entre los productos vegetales comerciales, para el presente trabajo se seleccionaron:

- El tanino de quillaja (TQ) obtenido a partir del árbol *Quillaja saponaria* cuya corteza es utilizada desde la antigüedad por los mapuches como analgésico y como detergente [21]. Esta especie es conocida por su contenido de saponinas triterpénicas (8,5 – 16,4%) y es usada en esencias de cosméticos [21].



- El tanino de tara (TT) obtenido de las vainas de *Caesalpinia spinosa*, un pequeño árbol espinoso [12,13]. Las vainas cuentan con una gran concentración de tanino, entre 40 - 60 %. El tanino de tara es principalmente, del tipo hidrolizable y está constituido por unidades fundamentales de ácido gálico y ácido elágico ligadas por uniones éster a la D-glucosa [12,13].
- Aceite de pino (AP) obtenido a partir de la resina de diversas especies de coníferas. Es utilizado en la industria de las pinturas como enmascarador de olor así como en desinfectantes [8]. Está compuesto mayormente por terpenos cíclicos como el α -pineno [11].
- Aceite de árbol de té (AT) obtenido a partir de las hojas y ramas de *Melaleuca alternifolia*, es reconocido por su alto contenido de terpinen-4-ol [22]. Es de uso popular en Australia como antiséptico y en afecciones dérmicas [23].
- Aceite de romero (AR) obtenido comúnmente del *Rosmarinus officinalis*, una especie aromática cultivada en muchas partes del mundo utilizada frecuentemente en la cocina mediterránea y como aditivo [24]. Los componentes mayoritarios son el α -pineno y 1,8-cineol [24,25].

2.2 Cultivos

Los hongos (*C. globosum* y *A. alternata*) aislados en un trabajo previo a partir de películas de pinturas biodeteriorada [17] fueron preservados en heladera en tubos con medio de cultivo agarizado (MCA). El MCA tiene la siguiente composición: 1,5g agar, 1g dextrosa, 0,5g proteasa peptona, 0,1g KH_2PO_4 , 0,05g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y agua destilada hasta 100 mL. A partir de estos cultivos se realizaron subcultivos, con el mismo medio, en placas de Petri. Las placas fueron incubadas en estufa a 25°C por 20-25 días.

2.3 Actividad antifúngica

Para evaluar la actividad antifúngica de los productos vegetales se realizó el ensayo de inhibición del crecimiento de *C. globosum* y *A. alternata* en placa con distintas concentraciones de cada producto a evaluar. A partir de los subcultivos realizados se obtuvieron los inóculos mediante la remoción de las esporas con la ayuda de un ansa y 5 mL de solución 0,85% p/v de NaCl y 0,005% p/v de Tween 20. La concentración de esporas ($0,3-0,5 \cdot 10^6$ esporas/mL) en los inóculos se ajustaron mediante una cámara de Neubauer.

Se prepararon placas con 15 mL de MCA con tres concentraciones distintas (2,5; 5,0 y 10 mg/mL) de cada producto y con los controles correspondientes, sin el agregado de ninguno de los agentes estudiados. En el caso de los aceites AP, AT y AR para mejorar su dispersión en el medio de cultivo fueron disueltos previamente en 300 μL de dimetil sulfóxido (DMSO).

Las placas fueron inoculadas en el centro con 20 μL de la suspensión de esporas e incubadas a 25°C por una semana. Una vez transcurrida la semana se midió el crecimiento fúngico, como el diámetro promedio de la colonia [15]. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición (I) según la siguiente ecuación:

$$I = \frac{C-E}{C} \times 100 \quad (1)$$

Donde C y E corresponden a los diámetros promedio de crecimiento radial de cada hongo en las placas de control y en las placas con los productos evaluados respectivamente. El diámetro de crecimiento se obtuvo por el promedio de tres medidas independientes sobre los mismos.



A partir de los datos obtenidos se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) que es la mínima de las concentraciones ensayadas donde no se observó crecimiento.

3. RESULTADOS

3.1 Actividad antifúngica

A partir de las mediciones efectuadas de los diámetros de crecimiento de cada hongo frente a los agentes evaluados se determinaron según la ecuación (1) los % de inhibición con respecto a cada concentración (2,5, 5,0 y 10 mg/mL), el gráfico obtenido se muestra en la Fig. 1.

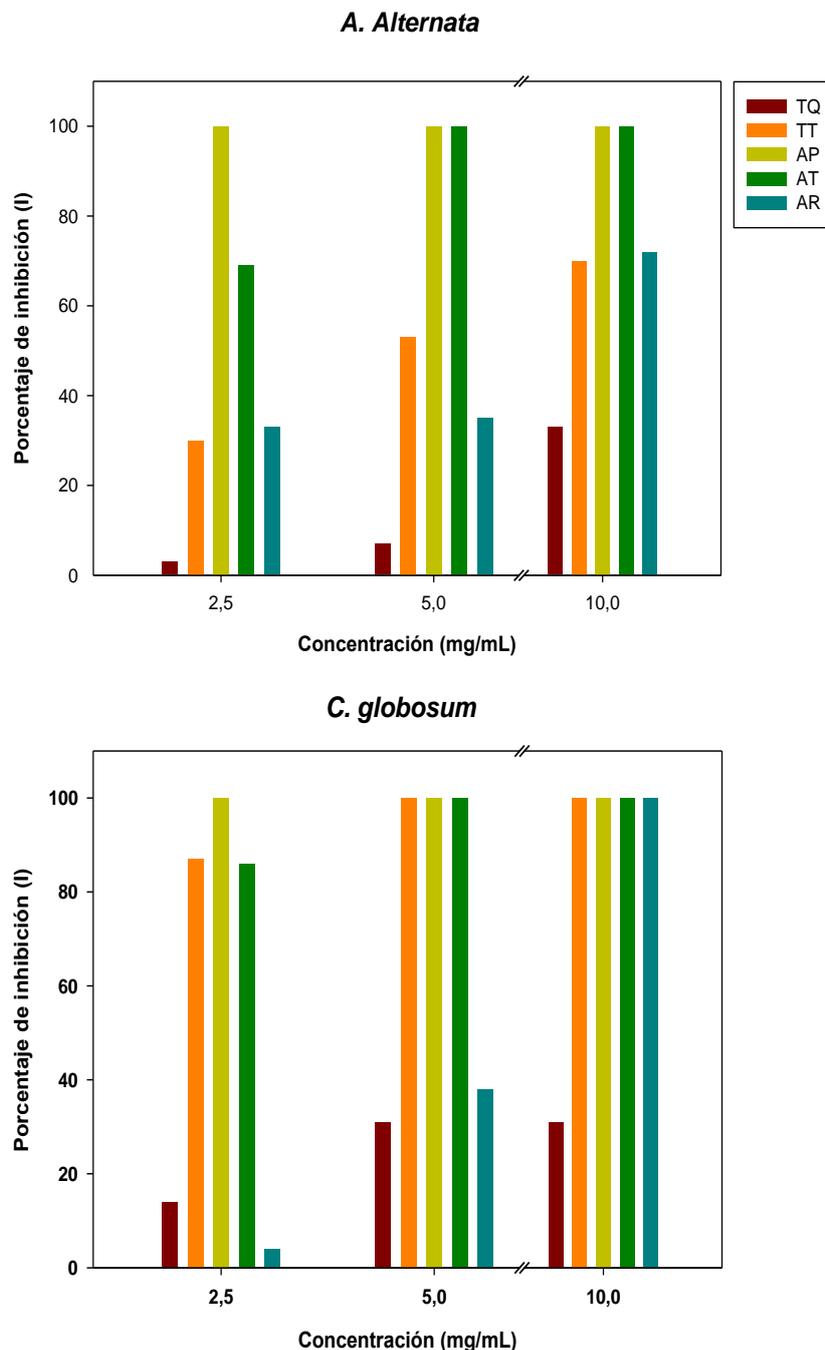


Figura 1 –Porcentaje de inhibición de TQ, TT, AP, AT y AR frente *A. alternata* y *C. globosum*



Los resultados muestran una mayor actividad por parte de TT, AT y AP en forma creciente en relación a ambos hongos como puede observarse en la Fig. 1. Éste efecto se ve incrementado en relación a *C. globosum*.

A partir de los datos obtenidos se determinó la CIM dentro del rango de concentraciones ensayadas, Tabla 1. Se destaca tanto el AP y AT como los dos productos con menores valores de CIM para ambos hongos en relación a los demás productos.

Tabla 1 – Concentración inhibitoria mínima.

Productos vegetales	CIM (mg/mL)	
	<i>A. alternata</i>	<i>C. globosum</i>
TQ	>10	>10
TT	>10	5,0
AP	2,5	2,5
AT	5,0	5,0
AR	10	>10

En la Figs. 2 y 3 se muestran los registros fotográficos de las placas que fueron incubadas por una semana con *A. alternata* y *C. globosum* respectivamente que contenían los agentes en estudio en la concentración de 5mg/mL. La concentración destacada es la menor donde hubo inhibición por parte de un número mayor de productos.

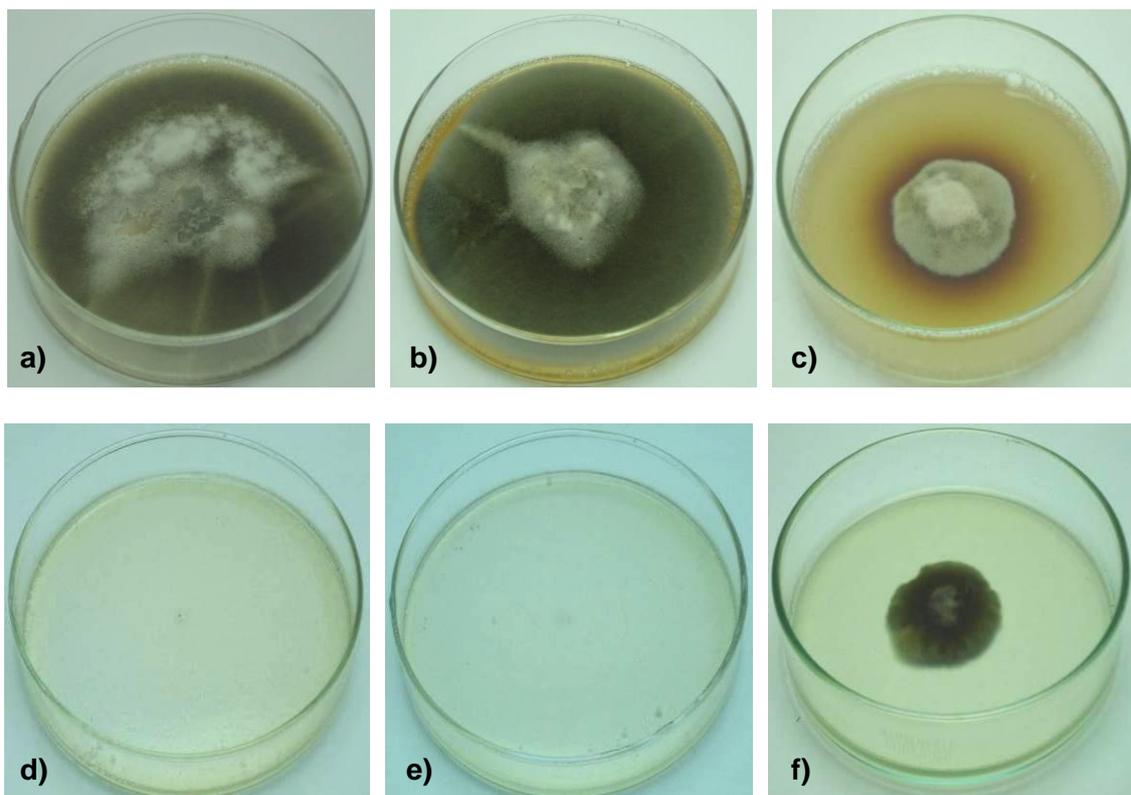


Figura 2 – Cultivos de *A. alternata*: Control (a), TQ (b), TT (c), AP (d), AT (e) y AR (f)

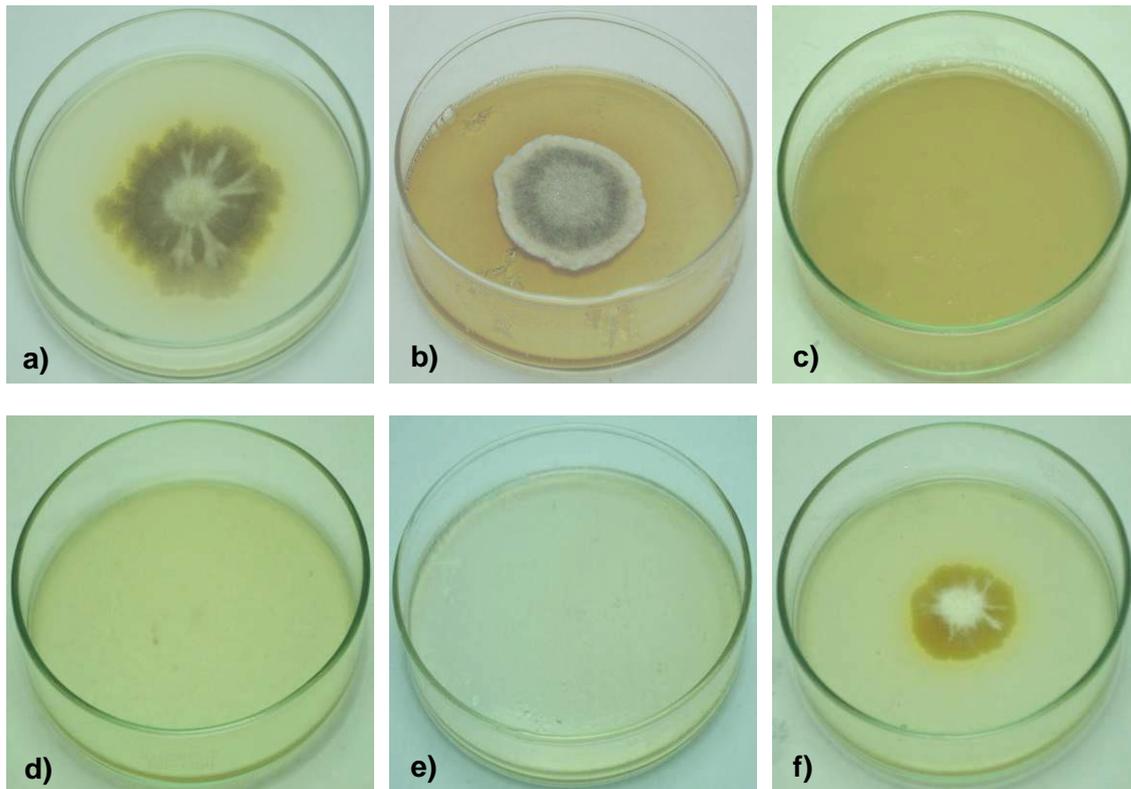


Figura 3 – Cultivos de *C. globosum*: Control (a), TQ (b), TT (c), AP (d), AT (e) y AR (f)

4. CONCLUSIONES

Fue posible evaluar la actividad antifúngica mediante el ensayo de inhibición en placa frente a dos hongos de interés (*A. alternata* y *C. globosum*) y determinar el porcentaje de inhibición en cada caso.

De los productos ensayados el aceite de pino (AP) y el del árbol de Té (AT) mostraron tener una mayor actividad antifúngica por inhibir totalmente el crecimiento de ambos hongos con las menores concentraciones en relación al resto.

La investigación realizada aportó información que es parte de una serie de etapas que, finalmente, llevará a la formulación de un recubrimiento y /o pintura para ser utilizado en la preservación de materiales.

Por lo tanto, la metodología aplicada logró, en forma preliminar, orientar la selección de un biocida ecológico adecuado a partir de una lista de posible agentes antifúngicos. En tal sentido en una fase posterior se formularán y elaborarán recubrimientos o pinturas que incorporen los agentes seleccionados y se procederá con la evaluación de la bio-resistencia de las películas obtenidas.

5. REFERENCIAS

- [1] Gaylarde C.C., Morton L.H.G., Loh K., Shirakawa M.A. (2011), "Biodeterioration of external architectural paint films. A review", Vol. 65, October 2011, pp. 1189-1198.
- [2] Gaylarde C.C., Gaylarde P.M. (2005), "A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America"; International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 55, September 2005, pp. 131-139.



- [3] Gu J.D. (2003), "Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances", Vol. 52, November 2003, pp.69-91.
- [4] Hare C., 2000, "Microbiologically-influenced attack of coatings", JPCL, p. 51-65.
- [5] Johns K. (2003), "Hygienic coatings: the next generation"; Surface Coatings International, Vol. 86, 2003, pp. 101-110.
- [6] Hasan J., Crawford R.J. and Ivanova E.P. (2013), "Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials", Trends in Biotechnology, Vol. 3, May 2013, pp.295-304.
- [7] Onaizi S.A., Leong S.S.J. (2011), "Research review paper: Tethering antimicrobial peptides: Current status and potential challenges", Biotechnology Advances, Vol. 29, 2011, pp. 67–74.
- [8] Bandoni A.L. (2003) "Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores", Ciencia y tecnología para el desarrollo (CYTED), Buenos Aires, 418 pág.
- [9] Scalbert, A. (1991), "Antimicrobial properties of tannins", Phytochemistry, Vol. 30, 1991, pp. 3875-3883.
- [10] Laks, P.E., Flavonoid biocides: phitoalexin analogues from condensed tannins, Phytochemistry, 26 (6) 1617(1987).
- [11] Abi-Ayad M., Abi-Ayad F. Z., Lazzouni H. A., Rebiahi S. A., Ziani-Cherif C., Bessiere (2011) "Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil", Journal of Medicinal Plants Research, Vol. 5, October 2011, pp. 5433-5436.
- [12] Haslam, E. (2007), "Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime", Phytochemistry, Vol. 68, 2007, pp. 2713-2721.
- [13] De la Cruz Lapa P. (2004), "Aprovechamiento integral y racional de la tara, Revista del Instituto de Investigación", FIGMMG, Vol. 7, 2004, pp. 64-73.
- [14] Holm Y. and Hiltunen R.(2002), "Plant-Derived Drugs and Extracts". In: Plant biotechnology and transgenic plants, ed. Kirsi-Marja Oksmah-Caldentey and. Barz W. H, Marcel Dekker, New York, Cap.2.
- [15] Vagui E., Simándi B., Suhajda Á., Héthelyi É. (2005), "Essential oils composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extract obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide". Food research international, Vol. 38, 2005, pp. 51-57.
- [16] Bellotti N., Salvatore L., Deyá C., Del Panno M.T., del Amo B., Romagnoli R. (2013), "The application of bioactive compounds from the food industry to control mould growth in indoor waterborne coatings". Colloids and Surface B: Biointerfaces, Vol.104, February 2013, pp.140-144.
- [17] Salvatore L., Romagnoli R., del Amo B., Bellotti N., Del Panno M. T. (2010), Evaluación de la resistencia de pinturas frente a aislamientos fúngicos", 3er. Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales, SAM – UTN, Concepción del Uruguay.
- [18] Cooley J.D., Wong W.c., Jumper, C.A., Straus, D.C. (2004), "Section I. Fungi and Sick Building Syndrome, Fungi and the Indoor Environment: Their Impact on Human Health". Advances in Applied Microbiology. Vol.55, 2004, pp.3-30.
- [19] Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Área Micología, <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>
- [20] Alexopoulos C.J. (1985), "Introducción a la micología", Ed. OMEGA, Barcelona, 197-305 pág.
- [21] Zúñiga G.E., Junqueira-Goncalves M.P., Pizarro M., Contreras R., Tapia A., Silva S. (2012), "Effect of ionizing energy on extracts of Quillaja saponaria to be used as antimicrobial agent on irradiated edible coating for fresh strawberries", Radiation Physics and Chemistry, Vol. 81, 2012, pp. 64–69.
- [22] Shelton D., Zabarás D., Chohan S., Wyllie S.G., Baverstock P., Leach D., Henry R. (2004), " Isolation and partial characterisation of a putative monoterpene synthase from *Melaleuca alternifolia*" Plant Physiology and Biochemistry, Vol. 42, 2004, pp. 875–882.
- [23] Vila R., Cañigueral S. (2006), "El aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* em el tratamiento de la vulvovaginitis", Revista de Fitoterapia, Vol. 6, 2006, PP. 119-128.
- [24] Jianga Y., Wua N., Fua Y., Wang W., Luoa M., Zhaoa C., Zua Y., Liua X. (2011), "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary", Environmental toxicology and pharmacology, Vol., 32, 2011, pp. 63–68.
- [25] Hosni K, Hassen I., Chaabane H., Jemli M., Dallali S., Sebei H., Casabianca H. (2013), "Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity", Industrial Crops and Products, Vol. 47, 2013, pp. 291– 299.