

# ENSAYOS PRELIMINARES CON SUSTANCIAS DE ORIGEN NATURAL PARA SU INCORPORACIÓN EN PINTURAS ANTIALGAS

Gómez de Saravia Sandra<sup>1,2</sup>, Rastelli Silvia E.<sup>1,2</sup>, Blustein Guillermo<sup>1,3</sup>, Viera Marisa<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones y Desarrollo de Pinturas (CIDEPINT), CICPBA-CCT, La Plata, CONICET, 50 e/ 121 y 122 (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

[sandragomezdesaravia@yahoo.com.ar](mailto:sandragomezdesaravia@yahoo.com.ar)

**Palabras clave:** biopelículas fototróficas, microalgas, pinturas.

## RESUMEN

El crecimiento de microorganismos fototróficos que forman biopelículas sobre paredes exteriores pintadas de edificios puede causar decoloración y deterioro fisicoquímico del sustrato. Las Cyanophyta (algas verde-azules) y Chlorophyta (algas verdes) son los organismos fototróficos más abundantes que colonizan fachadas donde la humedad está presente. Producen manchas verdes, rojas y negras, dependiendo de las especies colonizadoras, que a su vez alteran la estética llegando al deterioro de la pintura. Una vez que estos organismos se establecen formando una biopelícula, contribuyen al establecimiento de otros organismos tales como líquenes, briófitos y plantas vasculares. El objetivo de este trabajo fue: a) identificar los taxones de organismos fototróficos que forman biopelículas sobre paredes pintadas de construcciones urbanas, y b) ensayar el efecto antialgas de productos naturales para ser incorporados en pinturas. Se tomaron muestras de paredes pintadas con signos de deterioro estético. Las biopelículas se desprendieron con bisturí estéril, y se colocaron en solución salina estéril para su traslado al laboratorio. Las biopelículas se cultivaron en caldo BG11 y agar BG11 bajo condiciones de luz, humedad y temperatura controladas: 16/8 (luz/oscuridad), atmósfera saturada de humedad y 25°C. Los organismos fototróficos se identificaron taxonómicamente mediante el uso de microscopio óptico y bibliografía adecuada, las características de la biopelícula se observaron y analizaron con microscopio electrónico de barrido. El efecto antialgas se evaluó mediante la técnica de micro-atmósfera utilizando diferentes concentraciones de eugenol, guayacol, anisol y timol, compuestos de origen natural de reconocida acción antimicrobiana. Si bien estos compuestos son de origen vegetal, también se los puede obtener por síntesis química y son productos comercialmente disponibles en el mercado. A través de las observaciones en microscopio óptico se determinó la presencia de una biopelícula mixta, constituida por algas unicelulares, coloniales y algas filamentosas pertenecientes a las divisiones Cyanophyta, Chlorophyta y Streptophyta. El desarrollo de estas biopelículas afectó negativamente a la estética de la pared produciendo pátinas de color verdoso debido a la naturaleza de los organismos involucrados y a las condiciones ambientales. En cuanto a los compuestos ensayados se obtuvieron resultados positivos de inhibición de crecimiento de los organismos fototróficos con timol en todas las concentraciones empleadas, con guayacol en una concentración de 10 y 100  $\mu\text{moles.cm}^{-2}$  y eugenol 100  $\mu\text{moles.cm}^{-2}$ , los cuales serán empleados en la formulación de pinturas de exterior.

## INTRODUCCIÓN

La formación de biopelículas requiere la presencia de un sustrato y son pocos los sustratos que no se ven afectados por las mismas, ocupando los biofilms subaéreos la mayor parte de la superficie terrestre [1]. Las biopelículas provocan no solo un daño estético derivado de la presencia de pigmentos biológicos [2], sino también problemas de biodeterioro. El desarrollo de biopelículas degrada activamente los materiales al producir condiciones ácidas/alcalinas, retener humedad y absorber el calor de forma diferencial [3] por lo que su desarrollo resulta especialmente dañino al producirse, por ejemplo, sobre superficies valiosas desde el punto de vista artístico e histórico [4]. Los colonizadores primarios de los sustratos son microorganismos fotótrofos como cianobacterias y algas que solo necesitan agua y una mínima cantidad de sales para asentarse y poder desarrollar biopelículas sobre el sustrato [5,6]. La presencia de estos colonizadores pioneros da paso a la formación evolutiva de consorcios más complejos al permitir el asentamiento de otras especies de microorganismos entre los que se incluyen bacterias, hongos y protozoos. Cianobacterias y hongos constituyen la principal biomasa componente de las biopelículas formadas sobre edificios en América Latina [7]. Las cianobacterias son procariotas fotosintéticos que pueden presentar forma filamentosa o cocoide, son particularmente resistentes a la desecación y a elevados niveles de luz ultravioleta [8,9]. La resistencia a la luz UV está asociada con la producción de pigmentos protectivos que son los que causan deterioro estético de las superficies de edificios. Esto les confiere ventaja con respecto a otros microorganismos en la colonización de superficies expuestas. Los organismos fotótrofos forman pátinas coloreadas de gran extensión de color rojizas, verdosas y amarillentas [10]. Uno de los principales métodos de control del crecimiento algal es el uso de pinturas que contengan químicos con función biocida [11]. Biocidas que son óptimos para el control de hongos, pueden no serlo para las algas [12]. Los compuestos de amonio cuaternario son los más utilizados por su eficacia contra las algas verdes [13]. Si bien es conocido el efecto de los productos naturales obtenidos de plantas (extractos naturales y aceites esenciales) de baja o nula toxicidad para el ambiente, sobre bacterias y hongos [14-16]; poco se conoce su empleo como alguicidas. Por tal motivo son de suma importancia los estudios en esta área, con el fin de poder realizar formulación de pinturas con productos químicos ecocompatibles que sean de amplio espectro, efectivos sobre algas. El objetivo de este trabajo fue: a) identificar los taxones de organismos fototróficos que forman biopelículas sobre las paredes pintadas de construcciones urbanas, y b) ensayar el efecto antialgas de productos orgánicos naturales para ser incorporados en pinturas.

## MATERIALES Y METODOLOGIA

### Muestreo

Para la obtención de las muestras se desprendieron pequeños trozos de pintura de la superficie de una pared con signos de deterioro (Figura 1). El material se colectó con bisturí y pinzas estériles y se colocó en solución fisiológica estéril para su mantenimiento y traslado al laboratorio.



Figura 1. Aspecto general de la pared donde fue tomada la muestra de la biopelícula fototrófica.

### **Determinación taxonómica de las algas y caracterización de la biopelícula**

En el laboratorio, uno de los trozos de pintura colectado se raspó con bisturí estéril. Una parte del producto raspado se empleó para la determinación taxonómica de las algas presentes utilizando microscopio óptico (MO) (Arcano) y bibliografía específica [17-19]. Otra parte del producto se transfirió a medio de cultivo líquido (caldo BG11) y sólido (agar BG11) [20] para el mantenimiento, crecimiento y posterior utilización de los organismos fototróficos como inóculo en los ensayos de actividad biocida.

Con la finalidad de caracterizar la biopelícula fototrófica, otro de los trozos de pintura se fijó en glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato salino (PBS) y se metalizó con Au para su posterior observación en el microscopio electrónico de barrido (MEB) (FEI, Quanta 200).

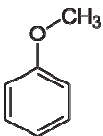
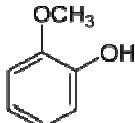
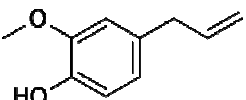
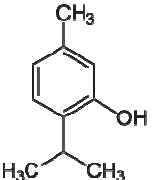
### **Evaluación de la actividad antialgas.**

La actividad antialgas de los compuestos puros se ensayó por el método de micro-atmósfera. Esta técnica consiste en colocar un disco de papel de filtro con el compuesto a ensayar en el centro de la tapa de la cápsula de Petri con medio sólido en la que se ha inoculado el microorganismo a ensayar. Las placas se incuban en posición invertida, el compuesto se evapora en la atmósfera de la cápsula y la fase volátil puede ejercer su efecto inhibitor sobre los microorganismos inoculados [21]

En la Tabla 1 se describen algunas propiedades de los cuatro compuestos puros utilizados durante los ensayos de micro-atmósfera. Los mismos se evaluaron en función de la concentración. Dada la insolubilidad en agua de estos compuestos, se diluyeron en dimetil-sulfóxido (DMSO).

En cada placa de Petri con agar BG11 se inocularon uniformemente 200  $\mu\text{L}$  del cultivo de algas previamente crecido durante 7 días ( $\approx 1,2 \times 10^5$  algas. $\text{ml}^{-1}$ ). Sobre la tapa superior de la placa se colocó el disco de papel de filtro estéril (13mm  $\varnothing$ ). Cada disco se sembró con 50  $\mu\text{L}$  de los distintos compuestos evaluándose las siguientes concentraciones: 1,25; 2,50; 5,0; 10,0 y 100  $\mu\text{moles.cm}^{-2}$ . La placa de Petri se invirtió y se colocó en la tapa superior que contiene el papel de filtro. Las placas se incubaron en condiciones controladas de fotoperíodo (16/8 hs luz/oscuridad), atmósfera saturada de humedad y 25°C, durante 28 días, registrándose resultados parciales semanalmente. Se realizaron placas de control de crecimiento sin papel de filtro así como también con papel de filtro humedecido con DMSO para descartar cualquier inhibición del crecimiento algal debida a este solvente. Todos los ensayos se hicieron por duplicado.

Tabla 1. Compuestos orgánicos utilizados en los ensayos de micro-atmósfera.

Compuesto	Fórmula y estructura química	Detalles de interés
Anisol	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_5$ 	Líquido incoloro, con un olor similar a las semillas de anís. Muchos de sus derivados se encuentran en fragancias naturales y artificiales.
Guayacol	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})(\text{OCH}_3)$ 	Aceite aromático amarillento derivado principalmente del guayaco ( <i>Guaiacum officinale</i> ). Precursor de diversos saborizantes (eugenol, vainillina). Sus derivados se usan con fines medicinales como expectorante, antiséptico, y anestésico local.
Eugenol	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$ 	Derivado del guayacol con una cadena alil sustituida. Líquido oleoso de color amarillo pálido extraído de aceites esenciales, como el clavo de olor, nuez moscada, canela, laurel, albahaca y poleo. Se utiliza en odontología como cemento dental. Sus derivados son usados en perfumería y saborizantes, analgésicos, biocidas, insecticidas, antisépticos, y en estabilizantes y antioxidantes de plásticos y hules.
Timol	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$ 	Sustancia cristalina incolora, con un olor característico. Está presente en la naturaleza en aceites esenciales del tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> ) o del orégano ( <i>Origanum majorana</i> ). Se caracteriza principalmente por su poder desinfectante y fungicida.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación taxonómica de las algas y caracterización de la biopelícula

Al MO pudo observarse que la biopelícula estaba constituida principalmente por microorganismos fototróficos de diversos géneros, aunque también se observaron en menor grado amebas e hifas de hongos. En la Tabla 2 se detallan los taxa de las algas presentes en la biopelícula y en la Figura 2 se observan fotografías de los taxa más frecuentes.

Tabla 2. Taxa determinados en la biopelícula y su frecuencia estimada.

División	Orden	Taxa	Frecuencia
Cyanophyta	Chroococcales	<i>Xenococcaceae</i> spp.	Predominante
		<i>Croococcus</i> aff. <i>varius</i>	Frecuente
		<i>Aphanocapsa</i> sp.	Frecuente
		<i>Aphanothece</i> sp	Común
		<i>Rhabdogloea</i> sp	Común
		<i>Pseudocapsa</i> aff. <i>dubia</i>	Frecuente
	Oscillatoriales	<i>Leptolyngbya</i> aff. <i>compacta</i>	Escasa
Chlorophyta		<i>Chlorococcum</i> sp.	Frecuente
Streptophyta		<i>Klebsormidium</i> aff. <i>fluitans</i>	Predominante



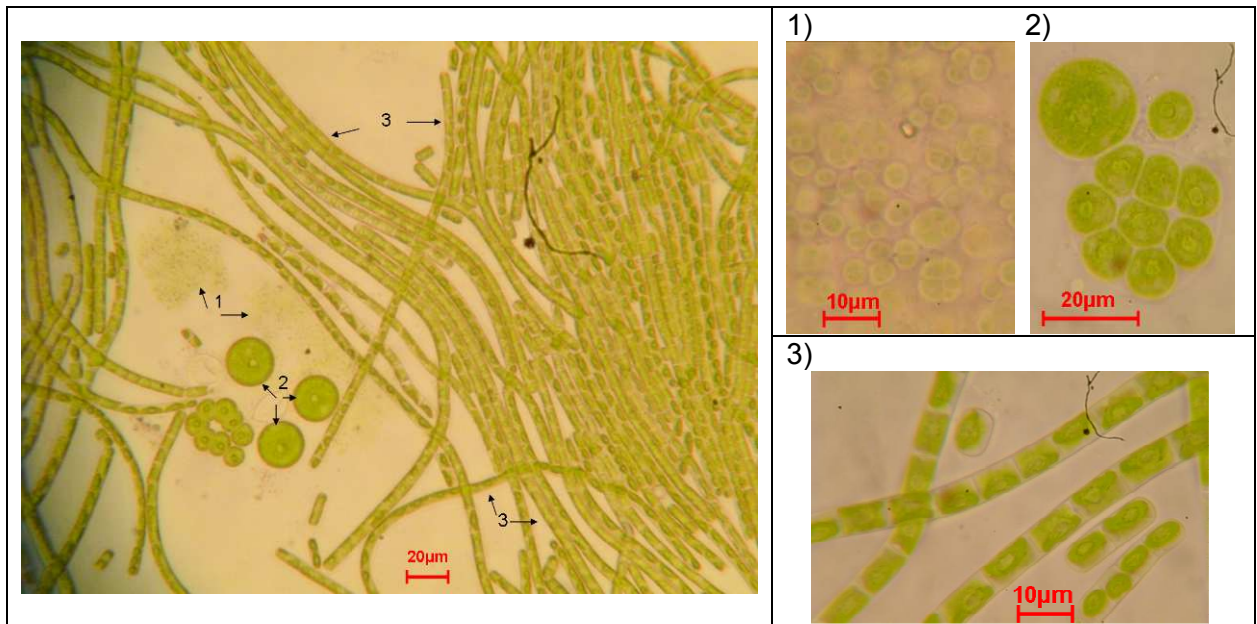


Figura 2. Fotografías de MO. A la derecha se observa una imagen representativa de la biopelícula muestreada; las flechas señalan tres de las algas predominantes, cuyos detalles se observan a la izquierda: 1) *Xenococcaceae* spp; 2) *Chlorococcum* sp; 3) *Klebsormidium* aff. *fluitans*.

Las observaciones de MEB (Figura 3) permitieron corroborar la presencia de las microalgas embebidas en abundante sustancias poliméricas extracelulares constituyendo una biopelícula heterogénea y continua.

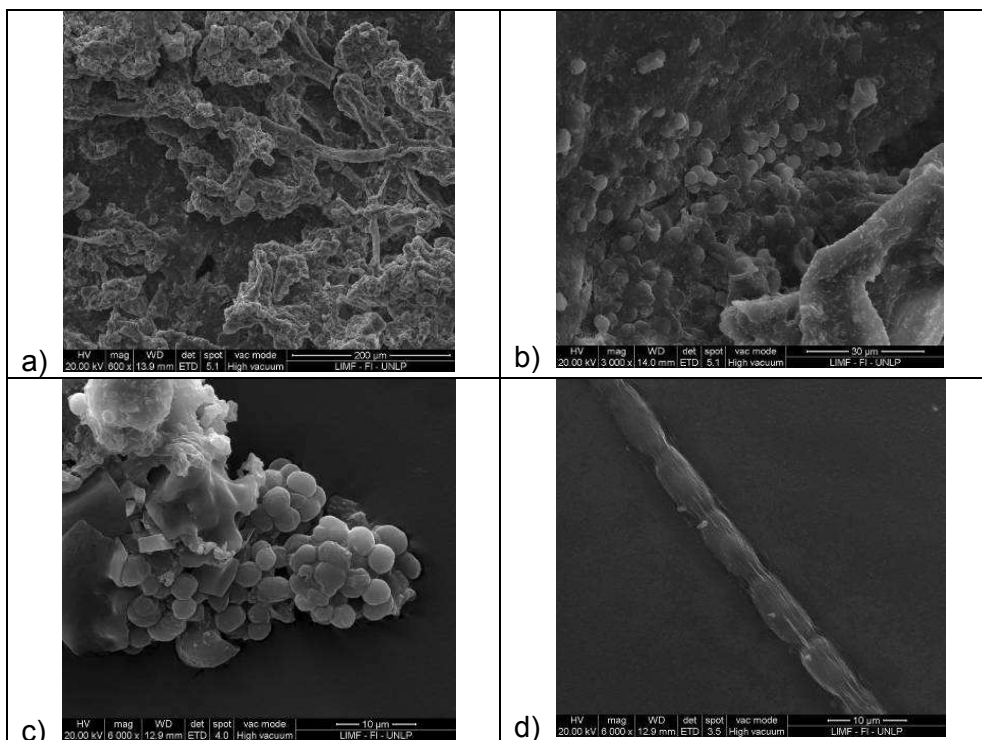
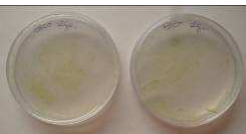
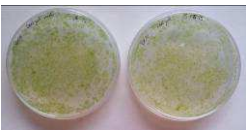

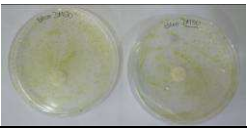



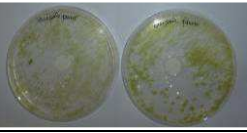

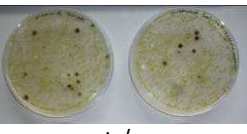
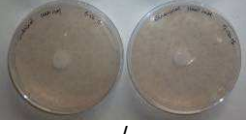
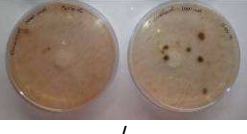



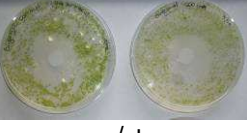

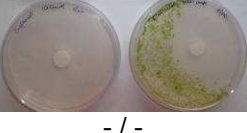


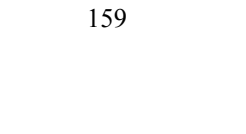





Figura 3: Imágenes de MEB. a) y b) micrografías del aspecto general de la biopelícula sobre la pintura, c) y d) detalles de las microalgas cocoides y filamentosas respectivamente.

## Evaluación de la actividad antialgas

En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos de los ensayos de micro-atmósfera realizados para evaluar el efecto inhibitor del crecimiento de los cuatro compuestos puros sobre el crecimiento algal.

Tabla 3. Resultados obtenidos de los ensayos de micro-atmósfera.

Compuesto / concentración	Crecimiento algal	
	7 días	28 días
Blanco	++ / ++ 	+++ / +++ 
DMSO	++ / ++ 	+++ / +++ 
<b>Anisol</b>	++ / ++ 	+++ / +++ 
5,0 $\mu\text{moles.cm}^{-2}$	+ / - 	+++ / +++ 
100 $\mu\text{moles.cm}^{-2}$		
<b>Guayacol</b>	+ / + 	++ / ++ 
5,0 $\mu\text{moles.cm}^{-2}$	- / - 	+ / - 
10,0 $\mu\text{moles.cm}^{-2}$	- / - 	- / - 
100 $\mu\text{moles.cm}^{-2}$	- / - 	- / - 
<b>Eugenol</b>	- / - 	++ / ++ 
5,0 $\mu\text{moles.cm}^{-2}$	- / apenas + 	- / + 
10,0 $\mu\text{moles.cm}^{-2}$	- / - 	- / - 
100 $\mu\text{moles.cm}^{-2}$	- / - 	- / - 



\* Dado que todos los resultados de crecimiento son negativos solo se muestran fotos de la menor concentración ensayada ( $1,25 \mu\text{moles.cm}^{-2}$ ).

Diversos trabajos citan al timol como un compuesto con efecto inhibitorio y/o biocida sobre un amplio espectro de bacterias, sobre líquenes, hongos, larvas de insectos y ácaros [22,23]. En concordancia con estos estudios el timol resultó ser el más efectivo en todas la concentraciones evaluadas ( $100, 5, 2,50$  y  $1,25 \mu\text{moles.cm}^{-2}$ ) ejerciendo una inhibición total del crecimiento algal. El guayacol ejerció un efecto inhibitor en concentraciones de  $10$  y  $100 \mu\text{moles.cm}^{-2}$ . Con eugenol se obtuvo una inhibición total del crecimiento de las algas en una concentración de  $100 \mu\text{moles.cm}^{-2}$ . Este, es un compuesto de amplio espectro antimicrobiano (principalmente contra bacterias gram-positivas) [24] y antifúngico [25]. Diversos autores han encontrado cambios en la forma y estructura de las esporas de hongos y cambios en forma, tamaño y color de las algas expuestas a diferentes compuestos químicos incluido el eugenol [11,26]. Si bien nuestros resultados indican una disminución del crecimiento algal en la concentración de  $10 \mu\text{moles.cm}^{-2}$  de este compuesto no se observaron cambios en la morfología de las algas ensayadas. En cuanto al anisol se describen resultados variables, es un compuesto que presenta baja o nula actividad antibacteriana [27] pero de una alta efectividad funguicida [25]. En el caso de las algas, el anisol no presentó efecto inhibitor en ninguna de las concentraciones evaluadas (Tabla 3).

Podría concluirse, en función de los resultados obtenidos que guayacol, eugenol y timol son compuestos promisorios, con efecto biocida, a tener en cuenta en la formulación de pinturas de exterior con el fin de evitar su deterioro como consecuencia de la formación de biopelículas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (Res. 833/14) y a la Universidad Nacional de La Plata (Proyecto 11/I201) los subsidios recibidos.

## REFERENCIAS

- [1] Krumbein W.E., Brehm U., Gerdes G., Gorbushina A.A., Levit y G., Palinska, K. (2003) "Biofilm, Biodictyon, and Biomat - Biolaminites, Oolites, Stromatolites - Geophysiology, Global mechanisms and Parahistology". En: Fossil and recent biofilms a natural history of life on Earth. Ed. Krumbein W.E., Paterson D.W., Zavarzin G.A., Kluwer Academic Press Publishers pp.1–28.
- [2] Urzì C., Krumbein W.E. y Warscheid T. (1992) "On the question of biogenic colour changes of mediterranean monuments (coating – crust - microstromatolite - patina - scialbatura - skin – rock varnish)". In: Decrouez, D., Chamay, J., Zezza, F. (Eds.), Proceedings of the 2nd International Symposium on the conservations of the monuments in the Mediterranean Basin, Musée d'Art et d'Histoire Naturelle: Genève, pp. 397–420.
- [3] Warscheid T., Oelting M. y Krumbein W.E. (1991) "Physico-chemical aspects of biodeterioration processes on rocks with special regard to organic pollutants." International Biodeterioration. Vol.28, pp. 37-48.
- [4] Guiamet P., Crespo M., Lavin P., Ponce B., Gaylarde C. y Gómez de Saravia S. (2013). "Biodeterioration of Funeral Sculptures in La Recoleta Cemetery, Buenos Aires, Argentina. Pre and post-intervention studies". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Vol.101, pp. 337-342.
- [5] Gorbushina A.A. y Petersen K. (2000) "Distribution of microorganisms on ancient wall paintings as related to associated faunal elements". International Biodeterioration & Biodegradation, Vol.46, pp. 277-284.

- [6] Keshari N. y Adhikary S.P. (2014) "Diversity of cyanobacteria on stone monuments and building facades of India and their phylogenetic analysis" *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol.90, pp. 45-51.
- [7] Gaylarde P.M. y Gaylarde C.C. (2005), "A comparative study on de major microbial biomass of biofilm on exterior of building in Europa and Latin America". *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol.55, pp. 131-139.
- [8] Chazal N.M. y Smith G.D. (1994) "Characterization of a brown Nostoc species from Java that is resistant to high light intensity and UV". *Microbiology* Vol.140, pp.3183–3189.
- [9] Barberousse H., Lombardo R.J., Tell G. y Couté, A. (2006) "Factors involved in the colonisation of building façades by algae and cyanobacteria in France". *Biofouling*. Vol.22, pp. 69-77.
- [10] Cappitelli F., Salvadori O., Albanese D., Villa F. y Sorlini, C. (2012) "Cyanobacteria cause black staining of the National Museum of the American Indian Building (Washington, DC, USA)". *Biofouling* Vol.28, pp. 257–266.
- [11] Tan K.H, Wee Y.C. y Ho K.K. (1985) "Laboratory evaluation of biocidas for the control of *Trentepohlia odorata*". *International Biodeterioration*. Vol.21, pp. 5-10.
- [12] Skinner C. E. (1972) "The role of algae in the deterioration of decorative and marine paints". *Proceedings of the XI Congress FATIPEC, Paris*. pp.6
- [13] Nugari M.P., Pietrini A.M., Caneva G., Imperi F. y Visca P. (2009). *Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: the Crypt of the Original Sin (Matera, Italy)*." *International Biodeterioration & Biodegradation* Vol.63, pp. 705-711.
- [14] Gómez de Saravia S., Borrego S., Lavin P., Valdés O., Vivar I., Battistoni P. y Guiamet, P. (2013). "Environmentally friendly products from plants in the control of biodeteriogen agents". *Natural Products. An Indian Journal* Vol. 9, pp. 167-174.
- [15] Lee S.J., Han J.I., Lee G.S., Park M.J., Choi I.G., Na K.J. y Jeung E.B. (2007) "Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporum gypseum* in a guinea pig model". *Biological and Pharmaceutical Bulletin* Vol. 30, 184-188.
- [16] Villa F. y Cappitelli F. (2013) "Plant-derived bioactive compounds at sub-lethal concentrations: towards smart biocide-free antibiofilm strategies". *Phytochemistry Reviews*. Vol.12, pp. 245–254.
- [17] Komárek J. y Fott B. (1983), "Chlorophyceae, Ordnung Chlorococcales". En Elster H.-J- y Ohle W (eds.) *Die Binnengewässer*. Band 16, 7 Teil, 1 Hälfte. Stuttgart, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 1044 p.
- [18] Komárek J. y Anagnostidis K. (2000), "Cyanoprokaryota Part 1 Chroococcales". En: Ettl H., Gärtner G., Heynig H. y Mollehauser. (eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1*. G. Fischer. Jena, Stuttgart, Lübeck., Ulm. 548 p.
- [19] Komárek J. y Anagnostidis K. (2005), "Cyanoprokaryota Part 2 Oscillatoriales". En: Büdel B., Krienitz L., Gärtner, G. & Schagerl M. (eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2*. Elsevier, München. 759 p.
- [20] Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M. y Stanier R.Y. (1979) "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria". *Journal of General Microbiology* Vol.111, pp.1–61.
- [21] Lahlou M., (2004) "Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils". *Phytotherapy Research* Vol.18, pp. 435–448.
- [22] Walsh S.E., Maillard J.-Y., Russell A.D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L. y Bartolo R.G. (2003) "Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria". *Journal of Applied Microbiology*. Vol.94, pp. 240–247
- [23] Kordali S., Cakir A., Ozer H., Cakmakci R., Esdek M. y Mete, E. (2008) "Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene". *Bioresource Technology* Vol.99, pp. 8788-8795.
- [24] Nanasombat S. y Lohasupthawee P. (2005) "Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against *Salmonella* and other enterobacteria," *KMITL Science and Technology Journal*. Vol. 5, pp. 527–538.
- [25] Borrego S., Valdés O., Vivar I., Lavin P., Guiamet P., Battistoni P., Gómez de Saravia S. y Borges, P. (2012). "Essential oils of plants as biocides against microorganisms isolated from Cuban and Argentine documentary heritage". *International Scholarly Research Network*. ISRN Microbiology Vol. 2012, Article ID 826786, 7 pp.
- [26] Rana I.S., Rana A.S., Rajak R.C. (2011) "Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol" *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 42, pp.1269-1277.
- [27] Chaudhry N. M. A. y Tariq P. (2006) "Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates". *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 19, pp. 214–218.