

EXTRACTOS VEGETALES PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y SU APLICACIÓN EN PINTURAS COMO ADITIVOS ANTIFÚNGICOS

Deyá Cecilia, Bellotti Natalia

Investigadoras CONICET, Docentes UNLP

CIDEPINT (Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas)- CIC- CONICET. 52 e/121 y 122, 1900 La Plata- pinturashigienicas@cidepint.gov.ar.

Palabras clave: nanopartículas, aditivos antifúngicos, pinturas

RESUMEN

Las construcciones con valor histórico y cultural están expuestas al deterioro producto de las condiciones ambientales y la actividad de diversos organismos en especial aquellos del orden microscópico entre los que se destacan los hongos entre los más deteriorantes. Los recubrimientos antimicrobianos como las pinturas higiénicas tienen el objetivo principal de prevenir el biodeterioro mediante la incorporación de aditivos antimicrobianos también llamados biocidas. Entre estos biocidas se encuentran las isotiazolonas, benzoisotiazolonas, cloramidas, cloruros de alquilo o arilo, compuestos efectivos, pero tóxicos para el ser humano. En tal sentido, se están desarrollando nuevos biocidas, amigables con el ambiente como las sales de amonio cuaternario y derivados de productos naturales entre otros. A su vez, existen nanopartículas metálicas como las de plata que han mostrado ser activas frente a distintas especies de microorganismos, especialmente bacterias (según datos bibliográficos) y que resultan promisorias para la aplicación en la formulación de recubrimientos antimicrobianos.

Por el amplio campo de aplicación de las nanopartículas existe un creciente interés en desarrollar procesos de síntesis amigables con el ambiente que eviten el uso de productos químicos tóxicos. Los extractos vegetales acuosos resultan una opción promisoriosa dado que contienen entre sus componentes agentes reductores aptos para la síntesis de las nanopartículas.

El presente trabajo tuvo como objetivo el uso de extractos vegetales acuosos de *Aloysia triphylla* (cedrón), *Laurelia sempervirens* (laurel) y *Ruta chalepensis* (ruda) para la obtención de nanopartículas de plata. Luego, se procedió con la selección de los productos más eficientes para integrar una formulación de pintura de interior que prevenga el biodeterioro fúngico. Las nanopartículas obtenidas mediante el extracto de laurel mostraron ser las más apropiadas en tal sentido.

Se realizaron ensayos en placa con aislamientos fúngicos, *Chaetomium globosum* y *Alternaria alternata*, obtenidos en un trabajo previo a partir de películas de pintura acrílicas de interior biodeterioradas.

INTRODUCCIÓN

Las estructuras afectadas por el deterioro asociado con microorganismos, mayormente hongos y bacterias, generan un serio problema, en especial, cuando se trata de construcciones de importancia patrimonial, cuya intervención y recuperación requiere de un abordaje multidisciplinario y altos costos. Por lo tanto, en relación a la conservación de tales estructuras la prevención debe desempeñar un papel cada vez más relevante. Una de las posibles estrategias para la prevención del biodeterioro es el desarrollo de recubrimientos antimicrobianos. Estos recubrimientos contienen aditivos que previenen el desarrollo de biopelículas sobre su superficie una vez aplicados.

Entre los microorganismos considerados más deteriorantes se encuentran los hongos que, por su forma de nutrición, liberan gran cantidad de ácidos y enzimas que pueden degradar las pinturas y por otro lado, al extender su micelio provocan la ruptura de los sustratos sobre los que crecen [1,2]. También, son conocidos por contribuir con la formación de bioaerosoles que afectan negativamente la salud humana. Es por ello que, en general se le agregan a las pinturas agentes biocidas como isotiazolonas, benzoisotiazolonas, cloraminas, cloruros de alquilo o arilo, piritiona de cinc, entre los tradicionales. Estos compuestos son cuestionados en relación a su toxicidad y, por lo tanto, la obtención de nuevos aditivos antifúngicos más eficientes y amigables con el ambiente resulta indispensable para el desarrollo de nuevas formulaciones de recubrimientos protectores. Entre las líneas de investigación se encuentran las de las sales de amonio cuaternario y las nanopartículas metálicas, estas últimas, de las más promisorias, por su amplio campo de aplicación, en productos como: indumentaria, detergentes, cosméticos y farmacéuticos [3]. Las nanopartículas (Nps) se caracterizan por contar con propiedades dependientes del tamaño y la forma, a su vez, estas son afectadas por el método y las condiciones de síntesis [4]. La metodología más frecuentemente de síntesis utiliza reductores como el borohidruro de sodio, hidrógeno, citratos y solventes como el agua u orgánicos como el tetrahidrofurano y el N,N-dimetilformamida [5]. El uso de extractos vegetales acuosos en la síntesis de las nanopartículas resulta una opción eficiente de bajo costo y amigable con el medio ambiente que se enmarca en la denominada *química verde* [6]. Este método de síntesis ofrece vastas posibilidades teniendo en cuenta la gran diversidad de plantas con amplio rango de metabolitos que incluye agentes reductores y estabilizantes en su composición [3]. Los extractos contienen alcaloides, proteínas, enzimas, aminoácidos, alcoholes, terpenoides, flavonoides, polifenoles y glúcidos que se cree serían responsables de la reducción de los iones presentes en la solución; esto sigue siendo materia de estudio [6].

En relación a lo expuesto, el presente trabajo tuvo como objetivo el uso de extractos vegetales acuosos de: *Aloysia triphylla* (cedrón), *Laurelia sempervirens* (laurel) y *Ruta chalepensis* (ruda) para la síntesis de Nps de plata. Las plantas fueron seleccionadas teniendo en cuenta la abundancia en la región y datos bibliográficos [7]. Luego de la síntesis se procedió con la caracterización de las partículas obtenidas y la evaluación de la bioactividad frente a los aislados fúngicos de interés, *Chaetomium globosum* y *Alternaria alternata*, obtenidos en un trabajo previo a partir de películas de pintura acrílicas de interior biodeterioradas [8].

La caracterización se llevó a cabo mediante: espectroscopía UV-Vi, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y distribución de tamaño por dispersión de luz dinámica (DLS). Las Nps obtenidas mediante el extracto de laurel fueron seleccionadas para la evaluación de la actividad antifúngica por presentar menor tamaño y mayor estabilidad en el tiempo según los resultados de caracterización obtenidos. En una siguiente etapa se formularon y elaboraron pinturas acrílicas de base acuosa integrando las Nps seleccionadas. Por último, se procedió con la evaluación de la resistencia al crecimiento de los aislados fúngicos de interés sobre las películas de pintura obtenidas, en ensayos en placa, siguiendo un procedimiento similar al presentado por la norma ASTM D5590-00 [8].

MATERIALES Y METODOLOGIA

Obtención de los extractos vegetales

En base a datos bibliográficos y teniendo en cuenta el fácil acceso a los mismos se seleccionaron los siguientes especímenes vegetales:

- *Aloysia triphylla* (cedrón): arbusto que alcanza 5 metros de uso popular a cuyas infusiones obtenidas a partir de las hojas se le atribuyen propiedades digestivas, carminativas, analgésicas y antiespasmódicas entre otras. Los componentes mayoritarios de su aceite esencial fueron identificados como citral, verbenona (1 a 5%) metil heptenona, d-citronelol, geraniol, l-limoneno y cariofileno [7].
- *Laurelia sempervirens* (laurel): árbol de hasta 40 metros, según el uso popular cuentan con propiedades medicinales las hojas, flores y cortezas para diversas dolencias como resfriados y enfermedades venéreas. Según bibliografía la destilación de las hojas en corriente de vapor de agua y posterior análisis del extracto por cromatografía gaseosa (columna no polar), resonancia magnética nuclear y espectro de masa, permitieron identificar como componentes mayoritarios: safrol y eugenol [7].
- *Ruta chalepensis* (ruda): arbusto que puede alcanzar los 6 metros, ha sido apreciada popularmente por su gusto amargo y aroma por lo cual se ha usado para aromatizar bebidas alcohólicas, además, es conocida por su efecto contraceptivo. Según datos bibliográficos su aceite esencial posee alcoholes y aldehídos alifáticos, no terpénicos, por ejemplo, n-octanol, n-nonanol, n-nonanal, n-decanal y el α -sinensal, que contribuyen al aroma fresco y agradable típico de los cítricos [7].

Se recolectaron las hojas de las especies antes mencionadas se les efectuó tres lavados con agua destilada y se las secó a 45°C. Como se dijo anteriormente, los vegetales cuentan con una gran variedad de metabolitos aprovechables en la síntesis de nanopartículas. Por tal motivo, se procedió con la extracción de los mismos mediante una metodología tradicional denominada infusión que consiste en una simple extracción sólido-líquido. Se tomaron 20g del material vegetal molido y se pusieron en contacto con 200mL de agua destilada (AD) a 80°C durante 3 minutos, luego se procedió con el filtrado con papel de poro fino. Por último, se preservó cada uno de los extractos en frascos de color caramelo en heladera hasta su uso [9].

Síntesis de las nanopartículas

Los extractos obtenidos se utilizaron para sintetizar las nanopartículas partiendo de una solución acuosa 10^{-3} M de AgNO_3 [9]. La síntesis se realizó mezclando 20mL del extracto y 180 mL de la solución de AgNO_3 en un recipiente con agitación constante. Se trabajó a temperatura ambiente (26°C) y a temperatura regulada en 60°C. Se reguló el pH a un valor de 8 empleando solución de NH_4OH y los productos obtenidos fueron conservados en heladera hasta su utilización.

Caracterización de las nanopartículas

Espectroscopía UV-Vis

En primer lugar las Nps fueron caracterizadas mediante espectrofotometría UV-Vis, técnica que ha probado ser muy útil para el análisis rápido de las soluciones coloidales de las Nps. Se basa en que la reducción de los iones metálicos produce soluciones que en el caso de la plata tienen un color amarillento con una banda intensa entre 400-450 nm

atribuida a la excitación colectiva de los electrones en la superficie de las partículas (absorción plasmónica superficial) [6]. Por tal motivo, se realizaron los espectros entre 350-600 nm de cada uno de los productos obtenidos, para determinar la estabilidad de los mismos se repitieron a lo largo del tiempo.

Distribución de tamaño

Se determinó la distribución de tamaño por dispersión de luz dinámica y las mediciones fueron realizadas mediante un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS que cuenta con un laser He-Ne operado a una longitud de onda de 633 nm y un ángulo de detección de 90°.

Evaluación de la actividad antifúngica

Se evaluó la actividad antifúngica de los productos obtenidos que reunían las propiedades requeridas (banda de absorción entre 400-450nm, estable en el tiempo). Se determinó el porcentaje de inhibición en placa de cultivos de *C. globosum* y *A. alternata* en distintas diluciones de las Nps en el medio de cultivo (MC) de composición: 2,0g de agar, 1,0g de dextrosa, 0,5g de proteasa peptona, 0,1g de KH_2PO_4 , 0,05g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y agua destilada hasta 100 mL. Las placas fueron inoculadas en el centro con 20 μL de una suspensión de esporas obtenidas a partir de cultivos de las especies fúngicas de interés. La concentración de las suspensiones (10^6 esporas/mL) fue ajustada mediante una cámara de Neubauer. Se prepararon placas con 15 mL de MC con dos concentraciones de Nps de 1,1 ppm y 2,2 ppm con la intención de evaluar en forma rápida y con bajas concentraciones cual de los productos era el más activo. Los controles correspondientes sólo contenían el MC. Las placas fueron incubadas a 28°C por siete días al término del cual se midió el crecimiento fúngico como el diámetro promedio de su micelio en cada caso. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición (%) [10]. El diámetro de crecimiento se obtuvo por el promedio de tres medidas independientes. 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.

Microscopía electrónica de transmisión

Para un estudio más detallado en relación a la forma se procedió a la observación mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las Nps seleccionadas. La suspensión fue dispuesta en un porta muestra de cobre (formvar-coated copper grid). El equipo utilizado fue un JEOL JEM-1230 a un voltaje de aceleración de 100 kV.

Formulación y elaboración de las pinturas

Las Nps seleccionadas se utilizaron en la formulación de una pintura acrílica de base acuosa según una composición presentada en la Tabla 1 que responde a aquella empleada como control, sin biocida. La formulación, en especial, resulta compatible para la aplicación en cielo raso, por su elevada concentración de pigmento en volumen (PVC). Las pinturas fueron elaboradas en una dispersora de alta velocidad y las Nps fueron incorporadas como parte de la suspensión acuosa producto de la síntesis reemplazando el agua de la composición presentada en la Tabla 1. Esto representa una gran ventaja dado que la síntesis propuesta y la posterior elaboración de las pinturas no presenta productos de desecho lo cual también se enmarca en los lineamientos de la *química verde* [11]. Se elaboraron dos pinturas de distinta concentración: 3,6 mg y 5,4 mg por cada 100g de pintura denominadas N1 y N2 respectivamente. Las concentraciones en la pintura fueron seleccionadas teniendo en cuenta datos bibliográficos [10].

Tabla 1: Composición de la pintura en % en volumen

TiO ₂	CaCO ₃ (natural)	CaCO ₃ (precipitado)	Resina acrílica (1:1)	Aditivos	Agua
5,3	17,3	1,4	8,1	4,7	63,2

Evaluación de la bio-resistencia de las pinturas en placa

Las pinturas obtenidas se aplicaron sobre portaobjetos de vidrio con pincel y se dejaron curar por 15 días antes de realizar el ensayo de bio-resistencia con las especies *C. globosum* y *A. alternata*. Los portaobjetos fueron cortados en piezas de 2,5 x 2,5 cm² e irradiados con una lámpara germicida UV Philips de 20 Watts, durante 40 minutos de cada lado. Las piezas de vidrio pintadas y sus respectivos controles, sin biocida, fueron dispuestas en placas con medio mineral mínimo agarizado (5g de NaCl, 1g de HK₂PO₄, 1g de (NH₄)H₂PO₄, 1g de (NH₄)₂SO₄, 0,2g de MgSO₄, 3g de KNO₃, 20g de agar y 1000 mL agua destilada) (referencia 2013). Las placas fueron incubadas por un mes a 28°C. Al término del periodo de incubación se evaluó el grado de crecimiento de la biopelícula fúngica sobre las películas de pintura utilizando la escala de referencia de la norma ASTM D5590-00. Según la norma se establece en relación al crecimiento superficial la siguiente escala: nulo, escaso (<10%), leve (10–30%), moderado (30–60%), abundante (60–100%) con una calificación de 0, 1, 2, 3 y 4 respectivamente [8].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las nanopartículas

Los espectros UV-Vis realizados con las soluciones obtenidas muestran como varían, según el extracto utilizado para la síntesis, las propiedades espectroscópicas de los productos obtenidos. En la Figura 1 se muestran los espectros de las Nps obtenidas con los extractos de cedrón y de ruda a pH = 8 y 60°C. En el primer caso, puede observarse que el espectro casi no se modifica con el tiempo y que la banda es ancha, con un máximo de absorción a 400nm. El ancho de las bandas indica una amplia distribución de tamaño de partículas. En el caso de las Nps obtenidas con el extracto de ruda, puede observarse un espectro similar al anterior, sin embargo luego de 57 días las partículas precipitan indicando un aumento de tamaño o aglomeración de las mismas con lo cual no se obtuvo el espectro.

Los espectros de las nanopartículas obtenidas con extracto de cedrón a 26°C fueron similares a los obtenidos a 60°C mientras que debido a los resultados obtenidos empleando ruda no se obtuvieron Nps a 26°C.

En el caso de las partículas obtenidas con extracto de laurel (Figura 2) se observaron los resultados más promisorios con bandas de absorción dentro del intervalo esperado para las NPs de plata entre 400-450nm, confirmándose la obtención de las mismas [12]. En el caso de las Nps sintetizadas a 60°C, la banda mostró ser más estable en el tiempo como puede verse en la Figura 3 presentando, incluso, un aumento en la absorbancia luego de 125 días.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se seleccionaron las Nps sintetizadas a partir del extracto de laurel para continuar con la caracterización y evaluar la actividad antifúngica en un ensayo de dilución en placa.

En la Figura 3 a. se destaca la distribución de tamaño de las Nps de Ag sintetizadas con el extracto de laurel a 60°C, con un tamaño promedio de 59,6 nm, determinado por DLS. La Figura 3 b. corresponde con las imágenes de TEM de las mismas partículas; en esta imagen se observa su morfología cuasi esférica rodeadas de restos de probable extracto vegetal.

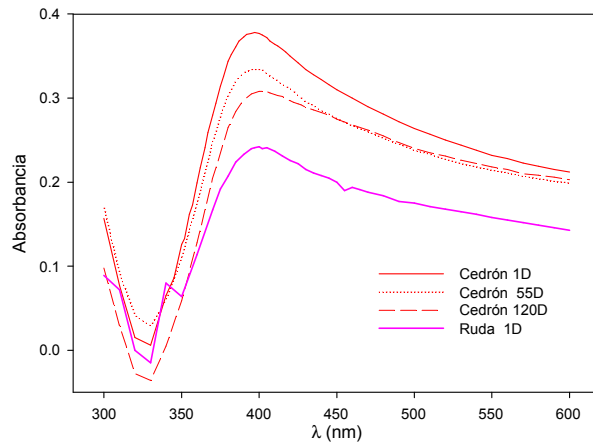


Figura 1: Espectros UV-Vis obtenidos con el extracto de cedrón y ruda

Nanopartículas de Ag obtenidas con extracto acuoso de laurel con regulación de pH

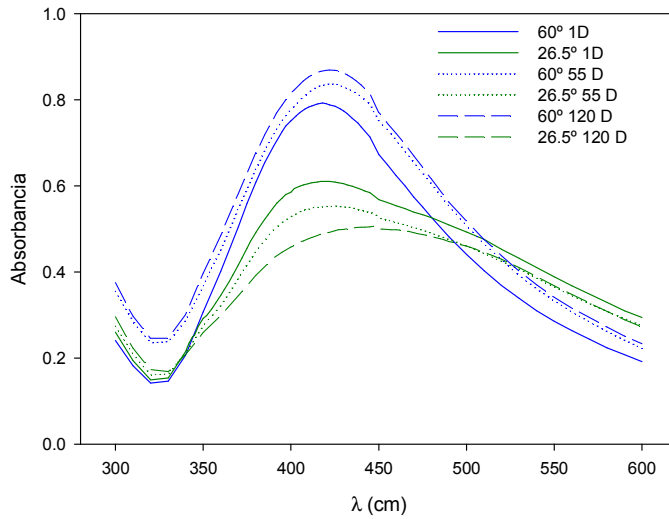
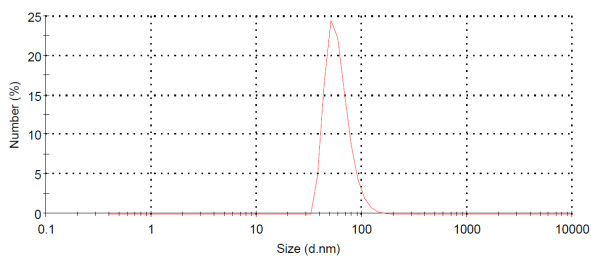
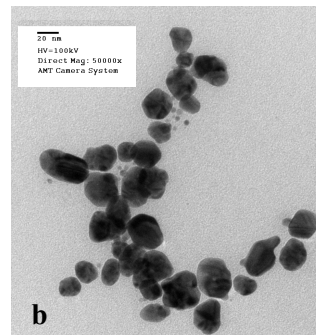


Figura 2: Espectros UV-Vis obtenidos con el extracto de laurel a temperatura ambiente (26,5°C) y 60°C.



a



b

Figura 3: Nps de Ag sintetizadas a partir de extracto de laurel a 60° a: Distribución de tamaño b: Imágenes TEM

La morfología de las Nps obtenidas a temperatura ambiente, también fue cuasi esférica aunque algunas presentaban forma triangular. El tamaño promedio de las partículas determinado por DLS fue de 7,9 nm.

En la Tabla 2 se observan los resultados de porcentaje de inhibición obtenidos.

Tabla 2: Porcentaje de inhibición (%) del crecimiento fúngico en placa

Productos evaluados	Concentración de plata ppm	<i>C. globosum</i>	<i>A. alternata</i>
Nps de Ag Temp. ambiente	1	NI	7,7
	2	8,6	19,2
Nps de Ag 60°C	1	6,7	25,1
	2	20,2	28,6
Sc. de AgNO ₃	1	NI	NI
	2	12	NI

Las Nps de plata obtenidas a 60°C con el extracto de laurel mostraron un mayor grado de inhibición en comparación a las sintetizadas a temperatura ambiente y a los controles con la sal de plata en solución, frente a las dos especies fúngicas utilizadas en el ensayo. Por lo tanto, fueron seleccionadas para proseguir con las siguientes etapas del presente trabajo.

Evaluación de la bio-resistencia de las pinturas en placa

A partir de las observaciones realizadas a las muestras expuestas al desarrollo de las biopelículas fúngicas por un mes a 28°C, se evaluó el grado de crecimiento sobre las películas de pintura utilizando la escala de referencia de la norma ASTM D5590-00 referida previamente. Las calificaciones asignadas se presentan en la Tabla 3 donde N1 y N2 se refieren a las pinturas con Nps de Ag (sintetizadas a partir del extracto de laurel a 60°C) en la concentración de 3,6 mg y 5,4 mg por cada 100g de pintura respectivamente.

Tabla 3: Evaluación de la bio-resistencia de las pinturas

Pinturas	<i>C. globosum</i>	<i>A. alternata</i>
Control (sin biocida)	3-4	4
N1	1-2	2-3
N2	1	2

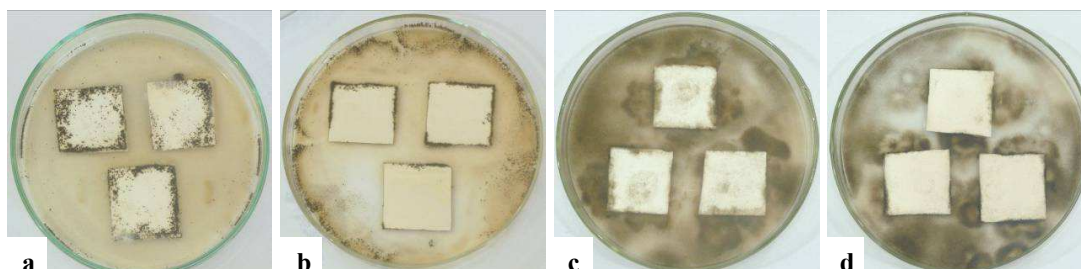


Figura 5: Ensayo de bio-resistencia con a, b : *Chaetomium globosum* y c, d: *Alternaria alternata*, cuarta semana con N2.

Se puede observar según los resultados de la Tabla 4 que un aumento en la concentración de Nps condujo a una mayor actividad inhibitoria de las películas de pintura en relación al desarrollo fúngico con ambos hongos en comparación a los controles, aunque

la inhibición no fue total. En la figura 5 se resaltan los resultados obtenidos con la pintura con mayor concentración de Nps de plata N2.

CONCLUSIONES

Fue posible sintetizar Nps de plata estables a partir de extractos vegetales e integrarlas en una formulación de pintura de interior acrílica de base acuosa. El extracto de laurel resultó el más eficiente dado que se obtuvieron partículas con las propiedades requeridas para ser consideradas nanopartículas y estables en el tiempo. El procedimiento fue monitoreado en forma rápida y eficiente mediante la realización de los espectros UV-Vis. Además, de presentar mejores propiedades en cuanto al tamaño y estabilidad, las nanopartículas de plata obtenidas a partir del extracto de laurel a 60°C mostraron ser más activas frente a las especies fúngicas utilizadas al evaluar la bioactividad en los ensayos en placa.

Las pinturas también resultaron efectivas en la inhibición del crecimiento de biopelículas fúngicas en relación a los controles aunque el crecimiento no fue nulo. Por lo tanto sería interesante en una siguiente etapa evaluar una concentración de solución de AgNO₃ mayor en la síntesis a fin de lograr una mayor concentración de nanopartículas en la suspensión a ser incorporadas a las pinturas y por este medio obtener una mayor concentración de Ag en la formulación.

REFERENCIAS

- [1] Yang C., Li D. (2007), "Ecology of fungi in the indoor environment". En: Sampling and Analysis of Indoor microorganisms, ed. John Wiley & Sons, pp 191-214.
- [2] Tang J.W. (2009), "The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents", Journal of the Royal Society Interface. pp S737-S746.
- [3] Roy N., Gaur A., Jain A., Bhattacharya S., Rani V. (2013), "Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity", Environ Toxicol Phar, pp 807-812.
- [4] Mittal A., Chisti Y., Banerjee U. (2013), "Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts", Biotechnol Adv, pp 346–356.
- [5] Moritz M., Geszke-Moritz M. (2013), "The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles, Chem Eng J, pp 596-613.
- [6] Sharma V., Yngard R., Lin Y. (2009), "Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities", Adv Colloid Interfac, pp 83–96.
- [7] Bandoni A.L. (2003) "Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores". En: Ciencia y tecnología para el desarrollo (CYTED).
- [8] 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 Surf B, pp 140-144.
- [9] Arunachalam R., Dhanasingh S., Kalimuthu B., Uthirappan M., Rose C., Mandal A. (2012), "Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Coccinia grandis* leaf extract and its application in the photocatalytic degradation". Colloids Surf B. pp 226-230.
- [10] Bellotti N., Romagnoli R., Quintero C., Domínguez-Wong C., Ruiz F., Deyá C., (2015), "Nanoparticles as antifungal additives for indoor water borne paints", Progress in Organic Coatings. pp 33–40
- [11] Anastas P.T., Warner J.C. (1998), "Green Chemistry: Theory and Practice", Oxford University Press.
- [12] Shrivastava S., Bera T., Roy A., Singh G., Ramachandrarao P., Dash D. (2007), "Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles", Nanotechnology. pp 1-9.