

Microesferas de sílica mesoporosa como soportes de biocida natural en pinturas antifúngicas

Sofía Bogdan^{1,a}, Mariana V. Revuelta^{2,b}, José F. Bengoa^{3,c}, Cecilia Deyá^{4,d} y Roberto Romagnoli^{5,e}

^{1,2,4 y 5} CIDEPINT (Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas) (CONICET-CICPBA), Av. 52 entre 121y 122 (B1900AYB), La Plata, Argentina.

³ CINDECA (Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas) (CONICET-CICPBA), Calle 47 N° 257 (B1900AJK), La Plata, Argentina.

^as.bogdan@cidepint.gov.ar, ^bm.revuelta@cidepint.gov.ar, ^cbengoajf@gmail.com, ^dc.deya@cidepint.gov.ar, ^eromaroberto53@gmail.com

Palabras clave: sílica mesoporosa, biocidas naturales, pinturas antifúngicas

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar el empleo de microesferas de sílice mesoporosa MCM-41 como soporte del carvacrol para el desarrollo de pinturas antifúngicas de base agua.

Las MCM-41 se sintetizaron mediante la técnica de Liu et al., fundada en el uso de ligandos de silicatos como precursores inorgánicos hidrolíticos y tensioactivos como especies porógenas. La carga del carvacrol en MCM-41 se realizó por impregnación y posterior adsorción de vapor en un vial herméticamente cerrado incubado a 40 ° C durante 24 horas.

Se formularon y prepararon pinturas base acuosa en las que se incorporó como aditivo, 2% p/p, microesferas impregnadas con carvacrol (Pintura A), una pintura con microesferas sin impregnar (Pintura B), una pintura con carvacrol 2% p/p en forma libre (Pintura C) y otra pintura control sin microesferas y sin carvacrol (Pintura D). Se pintaron paneles de yeso y se realizaron ensayos de bioresistencia de la película seca frente al hongo *Aspergillus sp.* Al finalizar el ensayo se realizó una inspección visual y observaciones mediante microscopia electrónica de barrido (MEB).

Los resultados mostraron que los paneles con la Pintura C y D se encontraban cubiertos con crecimiento fúngico. El porcentaje de cobertura fue alrededor de un 30 a 70% para la pintura C y un porcentaje mayor a 70% para la pintura D. Las pinturas A y B no presentaron crecimiento a simple vista. Las observaciones en MEB mostraron diferencias entre estas dos últimas, exponiendo crecimiento en el caso de la Pintura B. Estos resultados indican que la incorporación de las microesferas de por sí tienen un efecto biocida, debido muy probablemente al tensioactivo utilizado para su síntesis. A su vez, las micrografías MEB revelan que la impregnación del carvacrol en la sílice mejora aún más el efecto biocida de las microesferas. Este estudio demuestra que las microesferas de sílica mesoporosa MCM-41 podrían ser una alternativa como soporte para la carga del carvacrol en pinturas con actividad antifúngica.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la preservación del medio ambiente es un tema que a nivel mundial está impulsando cada vez más la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías y avances para obtener procesos industriales más amigables con el medio ambiente.

El biodeterioro constituye un conjunto de procesos físicos y químicos que generan alteraciones en diversos materiales. La prevención del crecimiento de hongos, así como el desarrollo de medidas de tratamiento apropiadas para objetos contaminados, son un desafío permanente.

El uso de biocidas tales como aceites esenciales (AE) y extractos vegetales con propiedades bactericidas y fungicidas ha cobrado mayor importancia en el último tiempo. La actividad antifúngica de los AE se ha atribuido a la presencia de compuestos aromáticos y grupos fenólicos. Un ejemplo de ellos es el carvacrol, 5-isopropil-2-metilfenol, el cual es un componente mayoritario de varios aceites esenciales, principalmente del orégano, tomillo y ajedrea [1-3]. Generalmente, los AE son sustancias volátiles sensibles al oxígeno, luz, humedad y calor, caracterizadas por un fuerte aroma. Estas características especiales podrían perjudicar su aplicabilidad. En este sentido, la tecnología de recubrimiento basada en la incorporación de microcontenedores ha surgido como una estrategia en el avance de materiales protectores y funcionales. La microencapsulación protege al biocida de la degradación y permite el control adecuado del proceso de liberación, prolongando así la duración del efecto biocida y reduciendo el residuo del mismo.

Desde hace una década las microesferas de sílica mesoporosa han atraído la atención de la comunidad científica. Este hecho es debido a sus excepcionales propiedades físico-químicas como son su resistencia mecánica, estabilidad química, biocompatibilidad y versatilidad sintética [4,5]. Las posibilidades que abren estas propiedades las hacen idóneas para ser utilizadas en un amplio campo de aplicaciones que van desde la biotecnología hasta la ciencia de los materiales. Uno de los materiales mesoporosos más descrito es el MCM-41. Estos compuestos se caracterizan por ser materiales que poseen canales unidimensionales y por tener una composición química modificable mediante la adición de cationes metálicos o variaciones en las condiciones de síntesis. Las MCM-41 resultan entonces materiales ideales para los procesos de absorción de moléculas bioactivas.

Las pinturas de base acuosa son aquellas en las que el vehículo es una emulsión de la resina en agua. Al ser aplicadas, la emulsión se rompe al eliminarse el agua durante el secado, obteniéndose así una fase oleosa continua. En las formulaciones de este tipo de pinturas se han eliminado los solventes orgánicos, reduciéndose así la emisión de estos compuestos y, por ende, la contaminación ambiental. La desventaja de estas pinturas es el gran contenido de aditivos que requieren para su formulación: espesantes (en su mayoría a base de celulosa), emulsionantes, plastificantes, etc.. Todos los aditivos son susceptibles de biodeterioro [6-8]. Además, los aditivos convencionales utilizados como biocidas en pinturas y recubrimientos suelen ser tóxicos, produciendo contaminación ambiental y problemas en la salud [9,10]. Una alternativa “ecoamigable” para su reemplazo podría ser la utilización de productos naturales como por ejemplo los aceites esenciales.

Estudios previos del grupo de investigación realizados en pinturas acuosas conteniendo al carvacrol en forma libre han sido pocos satisfactorios. Estos, han demostrado la inactividad del compuesto fenólico frente al crecimiento del *Aspergillus sp.* Este resultado podría deberse a que el carvacrol no fue eficientemente incorporado a la pintura ya que posee una alta volatilidad expuesto al aire.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el empleo de microesferas de sílica mesoporosa MCM-41 como soporte del carvacrol para el desarrollo de pinturas antifúngicas de base agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El Tetra Etil Orto Silicato 98% (TEOS) se adquirió en Sigma-Aldrich, Argentina. El bromuro de Hexadeciltrimetil Amonio (BrCTMA) fue adquirido en ICN biomedical Inc, EEUU. Se empleó NH₃ (25%) marca Ensure y etanol comercial.

El 5-isopropil-2-metilfenol (Carvacrol) se compró en (Sigma, Argentina). El agar-agar fue suministrado por Parafarm (Argentina) y la peptona proteosa fue comprada a Oxoid (Tecnolab, Argentina). Se utilizaron todos los materiales tal como se recibieron, sin purificación adicional.

Preparación de las microesferas de sílice mesoporosas cargadas con carvacrol

Se sintetizaron las microesferas mesoporosas MCM-41 siguiendo la metodología propuesta por Liu et al [11], fundada en el uso de ligandos de silicatos como precursores inorgánicos hidrolíticos y tensioactivos como especies porógenas.

Sobre 161 mL de H₂O destilada se agregaron 117 mL de NH₃ (25 %), mezclándose a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 10,94 g de BrCTMA. La mezcla fue calentada suavemente a 37 °C hasta la completa disolución del surfactante. Una vez disuelto se agregaron 260 mL de etanol comercial. Luego se incorporó a la mezcla los 22,30 mL de TEOS, manteniendo 2 horas en agitación a temperatura ambiente. El precipitado blanco obtenido se recolectó por filtración y fue lavado con 2,5 litros de agua destilada. El producto así obtenido fue secado en estufa a 35 °C durante 24 h.

La carga del carvacrol en MCM-41 se realizó mediante impregnación y posterior adsorción de vapor en un vial herméticamente cerrado e incubado a 40 °C durante 24 horas en continua agitación.

Aislamiento fúngico y medios de cultivo

El aislamiento fúngico utilizado fue *Aspergillus sp.*, la elección de este hongo se debe principalmente a que es uno de los colonizadores primarios de superficies pintadas, ya que presenta bajos requerimientos de actividad de agua sobre los sustratos, rápido crecimiento, fácil visualización y mayor resistencia a los biocidas [12,13]. Se cultivó en medio de cultivo agarizado (MCA) de la siguiente composición: 1,5 g agar-agar, 1,0 g dextrosa, 0,5 g proteasa peptona, 0,1 g KH₂PO₄, 0,05 g MgSO₄, H₂O destilada hasta completar 100 mL. Se incubó en estufa a 28 °C durante 7 días. La suspensión de esporas de *Aspergillus sp.*, para realizar los ensayos sobre sustratos pintados, fue preparada a partir de un cultivo en MCA, en las condiciones antes mencionadas. Las esporas fueron removidas de las placas y depositadas en frascos con 5 mL de una solución de NaCl 0,85 % p/v y Tween-20 0,00 5% p/v. La concentración de esporas fue ajustada a 10⁶ esporas/mL utilizando una cámara de Neubauer.

Formulación y elaboración de las pinturas

Se formuló una pintura acrílica al agua, sin agregado de biocida, cuya composición se presenta en la Tabla 1. Se elaboró en una dispersora de alta velocidad. Una vez finalizada, se fraccionó en partes. A la primer fracción, (Pintura A), se le incorporó microesferas impregnadas con carvacrol a un 2 % (p/p) en peso de la composición total de pintura. A la segunda fracción, (pintura B), se le añadió microesferas sin impregnar. A la tercera fracción, (Pintura C), se le agregó el carvacrol al 2 % (p/p) en forma libre. Por último, como control se utilizó una cuarta fracción, (Pintura D), sin agregado de microesferas ni del compuesto fenólico. Se conservaron en frascos cerrados a temperatura ambiente hasta su uso.

Tabla 1: Composición de la pintura

Componente	% (p/p)
Agua (solvente)	25,2
Antiespuma	0,3
Espesante (celulósico)	0,5
Dispersantes	0,45
Humectante	0,15
TiO ₂ (Pigmento opacante)	19,0
CaCO ₃ natural (Pigmento carga)	41,6
CaCO ₃ precipitado (Pigmento extendedor)	3,7
Resina acrílica estirenada	7,2
Aguarrás (Coalescente insoluble)	1,3
Butilglicol (Coalescente soluble)	0,6

Ensayo de bioresistencia al ataque fúngico sobre película seca de pintura

Se aplicaron dos manos de pintura sobre paneles de yeso de 2,5 cm x 2,5 cm y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 15 días (curado). Pasado ese tiempo, se esterilizaron con luz UV durante 20 minutos y, luego, se colocaron en placas de Petri conteniendo papel de filtro con 1 mL de agua estéril, para generar una atmósfera húmeda. Se inoculó cada panel con 100 µL de la suspensión de esporas de *Aspergillus sp.* y se incubaron en atmósfera controlada con 86 % HR durante 30 días. Se ensayaron los paneles por cuadruplicado. Los paneles se evaluaron según la especificación estándar ASTM D5590 [14] en la que el crecimiento fúngico se estima como porcentaje de cobertura sobre la superficie.

Observación de la película de pintura por Microscopio Electrónico de Barrido

Adicionalmente se realizaron observaciones de los paneles en microscopio electrónico de barrido (MEB). Para ello se fijaron las muestras con glutaraldehído al 2,5 % v/v (24 h) y se deshidrataron con soluciones graduales de etanol desde 20 % v/v a 100 % v/v (30 min cada una). Posteriormente se les efectuó secado por punto crítico y finalmente metalizado con oro. Se realizaron las observaciones en un microscopio electrónico FEI, modelo Quanta 200 en modo de alto vacío entre 5-12,5 kV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para los ensayos de bioresistencia al ataque fúngico sobre película seca de pintura fueron satisfactorios; dado que a simple vista el agregado de microesferas de sílica mesoporosa cargadas con carvacrol o sin cargar (pinturas A y B) ejerce un efecto inhibitorio ya que no se observa crecimiento fúngico. Sin embargo, la pintura C que contiene el carvacrol en forma libre presenta un grado de cobertura de la superficie pintada entre un 30 a 70%. Mientras que el porcentaje de la pintura D, que no tiene agregado de microesferas ni del compuesto fenólico, es mayor del 70 %.

La Fig. 1 muestra las micrografías de los paneles pintados obtenidas por MEB con un aumento de 800 X. Se observaron diferencias importantes entre las pinturas A y B, que a simple vista no se percibían. La pintura A (Fig 1-1) no revela crecimiento alguno del hongo sembrado mientras que la pintura B (Fig. 1-2) muestra un desarrollo ligero de hifas, que se extienden por toda la superficie de la pintura sin observar la presencia de esporas. También estas micrografías corroboran las diferencias entre las Pinturas A y B con la pintura C que es aquella que contiene al carvacrol libre (Fig. 1-3). En la misma se puede observar un

moderado crecimiento fúngico con presencia considerable de hifas y esporas. En la imagen de la Pintura D (Fig. 1-4) se observa claramente la colonización fúngica, incluso se dificulta la visualización de la superficie de base (pintura) por el abundante desarrollo del micelio.

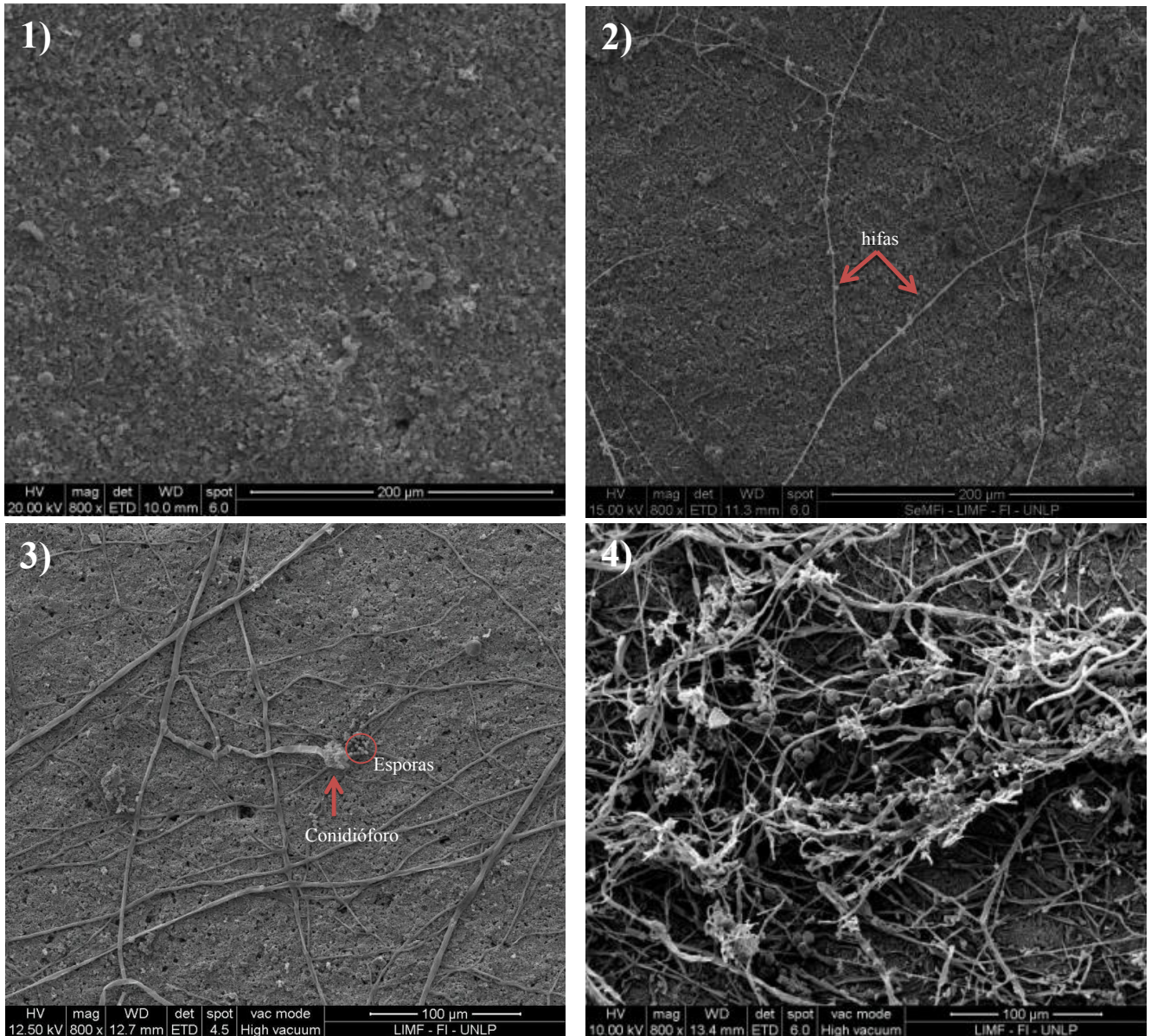


Figura 1. Imágenes correspondientes a los paneles pintados obtenidas por MEB con un aumento de 800 X. 1) Pintura A, conteniendo microesferas cargadas con carvacrol 2) Pintura B, conteniendo microesferas, 3) Pintura C, conteniendo carvacrol en forma libre y 4) Pintura C, control sin microesferas ni carvacrol. Las barras indican la escala.

Estos resultados sugieren los siguientes análisis:

El carvacrol en forma encapsulada presenta una actividad antifúngica sobre la película de pintura, a diferencia de la pintura que lo contiene en forma libre que no manifiesta la inhibición de crecimiento. Este resultado corroboraría la protección del microcontenedor sobre el compuesto fenólico logrando así el adecuado control del proceso de liberación y a su vez, prolongar la duración del efecto biocida.

Por otra parte, las microesferas de sílica presentan cierta actividad antifúngica que puede atribuirse muy probablemente al tensioactivo que forma parte de la síntesis y que queda retenido en su interior. Por lo tanto, es importante destacar un efecto sinergista entre las microesferas de sílica mesoporosa y el carvacrol lo que permite la inhibición total del crecimiento del *Aspergillus sp.* y el aumento de la efectividad de la pintura con propiedad antifúngica.

CONCLUSIONES

En este estudio se revela que la pintura que contiene carvacrol en forma libre no muestra actividad frente al crecimiento del hongo *Aspergillus sp.* A su vez, la pintura con microesferas presenta un efecto biocida propio, debido muy probablemente al tensioactivo utilizado para su síntesis. La pintura que contiene carvacrol impregnado en la sílica mesoporosa fue capaz de mantener su bioactividad e inhibir el crecimiento fúngico luego de los 30 días de ensayo. En este sentido se podría destacar un efecto sinérgico entre el carvacrol y las MCM-41 logrando así una pintura antifúngica con mayor efectividad.

Por lo tanto se demuestra que las microesferas de sílica mesoporosa MCM-41 podría ser una alternativa eficiente como soporte para incorporar el carvacrol en una pintura de base acuosa con actividad antifúngica.

En una siguiente etapa se eliminará el tensioactivo contenido en las microesferas mediante calcinación. Posteriormente se repetirán los ensayos de bioresistencia al ataque fúngico sobre película seca de pintura y se evaluará el comportamiento antifúngico de las pinturas formuladas con carvacrol en forma libre y encapsulada en microesferas de sílica mesoporosa MCM-41 calcinadas.

REFERENCIAS

- [1] S. Abbaszadeh , A. Sharifzadeh , H. Shokri , A.R. Khosravi , A. Abbaszadeh. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Médicale*, 24, pp 51-56.
- [2] Sequeira S., Cabrita E. J., Macedo M. F.. (2012). Antifungals on paper conservation: An overview, *International Biodeterioration & Biodegradation* 74, pp 67-86.
- [3] Xu J., Zhou F., Ji B.-P., Pei R.-S., Xu N., (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*, *Letters in Applied Microbiology* 47, pp 174–179.
- [4] Mamaeva, V., Sahlgren, C., Linden, M. (2013) *Adv. Drug Deliv.Rev.*, 65, pp 689-702,.
- [5] Slowing, I. I., Vivero-Escoto, J. L., Trewyn, B. G., Lin, V. S. -Y.: (2010). *J. Mater. Chem.*, 20, pp 7924-7937
- [6] Guimet P.S., Videla H.A., (1996). Microbiological spoilage of aqueous based surface coatings, *Corrosion Reviews* 14, p. 47-58
- [7] Rhoades A. M., Douglas A. W., Bruhaspathy M., Williamson J.. (2007). Interactions of an antimicrobial peptide (Ac-RRWRF-NH₂) and surfactants: Towards antimicrobial peptide additives for coatings applications, *Progress in Organic Coatigs* 58, pp 209-216.
- [8] Bravery A. F. (1988), "Biodeterioration of Paint-a State-of-the-Art Comment", En: D. R. Houghton, R. N. Smith, H. O. W. Eiggins (Eds.): *Biodeterioration* 7, pp 466-485.
- [9] Hare C., (2000). Microbiologically-influenced attack of coatings, *JPCL*, p.51-65.
- [10] Johns K., (2003). Hygienic coatings: the next generation, *Surface Coatings International*, 86 pp 101-110.
- [11] Liu S., Collart P.C.O., Van Der Voort P., Etienne F. Vansant, O.I., Van Tendeloo L., and Jiang M.. (2003). The Influence of the Alcohol Concentration on the Structural Ordering of Mesoporous Silica: Cosurfactant versus Cosolvent *J. Phys. Chem. B*, 107, pp 10405-10411.
- [12] Li D., Yang C.S.(2004). Fungal contamination as a major contributor to sick building syndrome. *Adv. Applied Microb.*, 55 pp 31-96.
- [13] Nielsen K.F., (2002). Mould growth on building materials. Secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers, PhD. Thesis
- [14] ASTM D5590-00. (2010). Standard Test Method for Determining the Resistance of Paint films and Related Coatings to Fungal Defacement by Accelerated Four-Week Agar Plate Assay.