

## PREVENCIÓN MICROBIOLÓGICA USANDO SÍNTESIS DE NUEVOS MATERIALES FUNCIONALIZADOS CON HETEROPOLIOXOMETALATOS VIA QUÍMICA VERDE.

Katerine Igal<sup>1</sup>, Natalia Bellotti<sup>2</sup>, Patricia Graciela Vázquez<sup>1</sup>

1 Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas "Dr. J. J. Ronco" (CINDECA), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP- CONICET CCT La Plata, 47 N° 257, La Plata, Argentina.

2 Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnologías de Pinturas (CIDEPINT), CICIPBA – CONICET, Av. 52 e/ 121 y 122, La Plata, Argentina

katyigal\_lp@hotmail.com

### PALABRAS CLAVE

Pinturas higiénicas  
Semillas de girasol  
Fase de Lindqvist  
Actividad antimicrobiana

**RESUMEN:** Uno de los desafíos ambientales en la actualidad es el control microbiológico en ambientes cerrados. Por lo tanto, es de vital importancia contribuir en la prevención y/o limitación de la proliferación microbiológica. En tal sentido es fundamental la evaluación de nuevos agentes antimicrobianos que puedan ser aplicados en diversas áreas de desarrollo de materiales de construcción y de recubrimientos protectores. Los esfuerzos globales de reducir desechos peligrosos y los procesos limpios se están integrando tanto en ciencia como en la industria.

En esta investigación se trabajará con residuos de semillas de girasol funcionalizadas con 3-aminopropiltrietoxisilano, como soporte de aditivos, a los que se les agregará un compuesto de Mo y K, que actuará como antimicrobiano, en pinturas higiénicas. El sólido proveniente de las semillas de girasol será funcionalizado mediante reacciones entre organosilanos y los grupos superficiales del sólido mencionado. La caracterización de los sólidos se realizará mediante SEM-EDS, DRX, FT-IR, propiedades texturales, titulación potenciométrica, entre otras.

Estos sólidos fueron evaluados microbiológicamente frente a hongos y bacterias de interés, dando resultados promisorios para los novedosos aditivos ecológicos para ser utilizados en una siguiente etapa en la formulación de pinturas higiénicas.

### MICROBIOLOGICAL PREVENTION USING SYNTHESIS OF NEW MATERIALS AS FUNCTIONALIZED HETEROPOLYOXOMETALATES VIA GREEN CHEMISTRY.

### KEYWORDS

Hygienic paints  
Sunflower seeds  
Lindqvist phase  
Antimicrobial activity

**ABSTRACT:** At the present time one of the environmental challenges is the microbiological control in the indoor environment. Therefore, it is of vital importance contribute to avoid and/or minimize the microbiological growth in the indoor environments. In such sense the evaluation of new antimicrobial agents is fundamental and can be applied in diverse areas of development of protective coating and construction materials. The global efforts to reduce to dangerous remainders and technologically clean are being integrated as in science as in the industry.

In this investigation will work with remainders of seeds of sunflower functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane, as support of additives, to a compound of Mo and K, that will act as antimicrobial, to be used in hygienic paintings. The originating solid of the sunflower seeds will be functionalized by means of reactions between organosilanes and the superficial groups of the mentioned solid. The characterization of synthesized solids will be made by means of SEM-EDS, DRX, FT-IR, textural properties, potentiometric titration, among others.

These solids were microbiologically evaluated in front of fungi and bacteria, having given promissory results for novel ecological additives in hygienic paints

### INTRODUCCION

El control del crecimiento de microorganismos, tales como bacterias y hongos, en la naturaleza es una de los conceptos fundamentales para la supervivencia de las especies superiores [1]. Los materiales que forman parte de las edificaciones como piedras, ladrillos, maderas entre otros, carecen por completo de defensa contra el crecimiento microbiano. Así, los microorganismos unidos a cualquier superficie artificial en un ambiente húmedo pueden sobrevivir, proliferar y formar complejas comunidades

denominadas biopelículas [2,3]. Las biopelículas consisten en una matriz de polisacáridos con células embebidas, las cuales son hasta 1.000 veces menos susceptibles a la mayoría de antibióticos y otros agentes antimicrobianos [4]. La proliferación microbiológica contribuye, además, con la formación de bioaerosoles al diseminarse parcial o totalmente por el aire [1,5]. La exposición a estos bioaerosoles se vincula con infecciones patógenas y, además, con una serie de afecciones que comprenden irritación de las membranas mucosas (ojos, nariz y garganta), dolor de

cabeza y fatiga [6, 7].

Por otro lado, se debe tener en cuenta la intoxicación por ciertos productos fúngicos como son las micotoxinas, algunas conocidas por ser cancerígenas que provienen de hongos que generalmente pueden encontrarse en los interiores de edificios [5]. Una forma de controlar la formación de biopelículas es mediante la limpieza periódica utilizando desinfectantes, tales como el hipoclorito y peróxido de hidrógeno [8].

En la última década, a causa de los inconvenientes mencionados anteriormente, se ha estudiado el uso y formulación de pinturas higiénicas. Éstas, también llamadas pinturas antimicrobianas, tienen como principal objetivo inhibir la colonización y posterior crecimiento microbiológico mediante la incorporación de agentes activos llamados biocidas [9, 10]. La tendencia actual es sustituir los biocidas tradicionales como isotiazolonas, benzoisotiazolonas, cloraminas, cloruros de alquilo o arilo, piritiona de cinc, por otros más amigables con el medio ambiente [11]. Para ello utilizamos los Principios de la Química Verde o Química Sustentable con el fin de minimizar la contaminación y desarrollar nuevos métodos menos agresivos con el medio ambiente.

Una forma de contribuir a la Química Verde es reutilizar los desechos de materias primas como son las cenizas de semillas de girasol para producir nuevos materiales.

En la última campaña 2012/2013, la Argentina integró el selecto lote de los cuatros principales países productores de semilla de girasol, con una producción, aproximadamente, de 3.100.000 toneladas. Nuestro país, produce cerca del 9% del total mundial, y se encuentra ubicado en el cuarto lugar. La mayor parte de la producción nacional está destinada a la industrialización para la obtención de aceite y harina de girasol, tanto para exportación como para su uso en el mercado doméstico [12]. Los principales macro nutrientes de la semilla de girasol son lípidos, hidratos de carbono y proteínas; en la cáscara existe un alto contenido de lignina y celulosa-hemicelulosa [13]. Para la producción del aceite, las semillas se descascaran mecánicamente. Las cáscaras constituyen un residuo agro-industrial abundante que se ha comercializado para propósitos especiales como fabricación de leña para el hogar, y otros productos altos en fibras, pero estos mercados son limitados. También, se ha intentado usar las cáscaras como material de forraje para rumiantes como vacas y ovejas, pero su alto contenido de lignina no lo hace apto como alimento animal. Además, se ha probado soterrar las cáscaras en el suelo, pero esta práctica es insegura para la sanidad de los campos ya que éstas contienen *Sclerotinia sclerotium*, un hongo patógeno para las plantas. Por lo tanto, la mayoría de las veces las cáscaras se queman en las plantas de procesamiento [13].

En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de las cenizas de cáscaras de semillas de girasol funcionalizadas con diferentes concentraciones de 3-aminopropiltriethoxisilano (APS) y, posteriormente, impregnadas con el polioxometalato tipo Lindqvist  $[V_2Mo_4O_{19}]K_4$  (KMo), para su uso como agentes antimicrobianos o biocidas en pinturas higiénicas. La funcionalización con APS permite inyectar grupos amino generando un sistema químicamente afín con matrices poliméricas tipo poliamidas [14] o sistemas de intercambio iónico [15]. En este caso queremos aumentar la capacidad de atraer el compuesto tipo Lindqvist a través de los electrones del grupo amino que posee este compuesto.

Además, se caracterizaron las muestras a través de técnicas como Espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR), Titulación potenciométrica con *n*-butilamina, Microscopía Electrónica de Barrido (SEM-EDS), Difracción de rayos X (DRX) y propiedades estructurales.

## METODOLOGÍA

i) Lavado de cenizas de cáscara de semillas de girasol

En este trabajo se usó como sólido a funcionalizar y como soporte de la fase tipo Lindqvist,  $[V_2Mo_4O_{19}]K_4$ , ceniza de cáscaras de girasol (CG). Estas fueron lavadas con agua caliente para eliminar los restos de polvo (por ejemplo, tierra), que pudiesen venir mezclados.

ii) Funcionalización de las CG lavadas

El método utilizado para la funcionalización de las CG puras (ya lavadas), consistió en agregarle diferentes concentraciones de 3-aminopropiltriethoxisilano (APS). El sólido obtenido se secó a 100 °C, durante 2 h, obteniendo las siguientes concentraciones finales: 0,5% (p/p), 1,5% (p/p), y 3,0% (p/p) de APS, respectivamente.

iii) Síntesis del compuesto tipo Lindqvist,  $[V_2Mo_4O_{19}]K_4$

Para la obtención del compuesto se utilizaron diferentes reactivos: 3,63g  $MoO_3$ , 50ml de una solución 0,5M K(OH), 5,86g  $NH_4VO_3$ , 12,5ml de una solución 2M HCl y 9,82g acetato de K, respectivamente. La mezcla se agitó a 50 °C, obteniéndose una solución anaranjada, que se filtró en caliente. La solución obtenida se colocó en un cristizador para la formación de los cristales de la fase, en adelante denominada KMo.

iv) Impregnación de los sólidos CG funcionalizados con APS

Las muestras fueron sintetizadas de la siguiente forma (Tabla 1): a 1 g de soporte (CG-0,5APS, CG-1,5APS, CG-3,0APS), se lo contactó con 4 ml de solución del  $[V_2Mo_4O_{19}]K_4$  durante 24 h, para que en el sólido funcionalizado la cantidad fuese de 5 % (p/p) de K. Luego, se dejó evaporar el solvente ( $6,4 \cdot 10^{-3}M$ ).

Tabla 1- Nomenclatura utilizada para las muestras a partir de sus reactivos, siendo la masa inicial de 1g puro de CG.

Muestra	Funcionalizante APS (% (p/p))	Fase KMo (%(p/p)K)
CG		
CG-0,5APS	0,5	
CG-1,5APS	1,5	
CG-3,0APS	3	
CG-0,5APS-KMo	0,5	5
CG-1,5APS-KMo	1,5	5
CG-3,0APS-KMo	3	5

v) Caracterización de las muestras sintetizadas

Se realizó la caracterización de las muestras mediante las siguientes técnicas: Absorción-Desorción de  $N_2$  para determinación de propiedades texturales, Titulación Potenciométrica con *n*-butilamina, Microscopía Electrónica de barrido (SEM-EDS), Difracción de Rayos X (DRX) y

Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR). Las propiedades texturales, como el área superficial de los sólidos ( $S_{BET}$ ), se determinaron mediante un equipo Micromeritics Accusorb 2100, utilizando  $N_2$  como gas adsorbible. La estimación de las propiedades ácidas de los materiales se realizó por medio de titulación potenciométrica con *n*-butilamina. Se llevó a cabo en un medidor de pH/mV/°C basado en un microprocesador Hanna Instruments pH 211, mediante un electrodo de pH combinado. Se calibró con soluciones tampones de pH 7,01 y 4,01. Se agregaron 0,025 ml/min de solución de *n*-butilamina en acetonitrilo (0,05 N) a una cantidad conocida (0,05 g) del sólido de interés previamente suspendido en acetonitrilo (90 ml) y agitado por un período de 3 h. Los DRX se realizaron con un equipo Philips modelo PW-1390 (control de canal) y PW-1394 (control de motor) con registrador gráfico de barrido incorporado. Se usó radiación  $Cu K\alpha$  ( $\alpha=1,5417 \text{ \AA}$ ), filtro de níquel, 20 mA y 40 kV en la fuente de alta tensión, ángulo de barrido ( $2\theta$ ) comprendido entre  $5^\circ$  y  $60^\circ$ , velocidad de barrido de  $2^\circ/\text{minuto}$  y amplitud de la escala vertical 2000 cuentas/segundo. Se realizó SEM-EDS para la obtención de micrografías de los sólidos, empleando un equipo Philips Modelo 505, a un potencial de trabajo de 15 kV, soportando las muestras sobre grafito y metalizándolas con oro. Las imágenes se obtuvieron con un adquisidor ADDAIL, con SoftImaging System.

Los espectros fueron obtenidos empleando un equipo FT-IR Bruker IFS 66 y pastillas de la muestra en BrK. Las medidas se realizaron en un rango comprendido entre  $400$  y  $4000 \text{ cm}^{-1}$ .

#### vi) Actividad antifúngica

Se evaluó la actividad antifúngica de los sólidos mediante una variación del ensayo de difusión en agar o técnica de Kirby y Bauer denominado "cut-plug" [16, 17]. La evaluación de la actividad antimicrobiana mediante este tipo de procedimiento se basa en poner en contacto el sólido evaluado con la superficie inoculada con los microorganismos de interés [18]. El agente estudiado difunde radialmente formando un gradiente de concentración. Al término del período de incubación los sólidos aparecen rodeados por una zona de inhibición. En cada caso, se mide el diámetro de la zona de inhibición, el cual se relaciona con una mayor o menor susceptibilidad de los microorganismos utilizados para el ensayo frente al agente en estudio.

Los hongos *Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium sp.* y *Aspergillus fumigatus*, aislados previamente a partir de sustratos pintados biodeteriorados, fueron utilizados como bioindicadores para determinar la actividad antifúngica de las cenizas de semillas de girasol con APS y APS-KMo. Se realizaron subcultivos de los aislamientos mencionados en placas de Petri. La composición del medio de cultivo agarizado (MCA) utilizado fue: 1,5 g agar, 1 g dextrosa, 0,5 g proteasa peptona, 0,1 g  $KH_2PO_4$ , 0,05 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y agua destilada. Las placas fueron incubadas en estufa a  $25^\circ C$  entre 15-25 días dependiendo de la especie utilizada. Los hongos mencionados fueron utilizados en este trabajo, no sólo por su capacidad de crecer sobre películas de pinturas y deteriorarlas, sino también por los efectos negativos que producen sobre la salud humana [19, 20]. 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, fue ajustada mediante una cámara de

Neubauer. Se prepararon placas con MCA inoculados con  $200 \mu\text{l}$  de la suspensión de esporas. Luego se realizaron hoyos de 7 mm de diámetro, donde se introdujeron 20 mg de cada uno de los sólidos evaluados (CG con APS y APS-KMo), y sus respectivos controles (CG y sin ningún sólido). El procedimiento fue realizado por triplicado para cada sólido. Finalmente, las placas fueron incubadas por 48 h, a  $25^\circ C$ . Al concluir el ensayo se realizó una observación minuciosa de las placas y, en caso de haberlo, se midieron los halos de inhibición producidos por cada sólido y se tomó registro fotográfico del mismo. Se consideró si hubo o no crecimiento sobre el sólido y el grado de inhibición alrededor de éste. Por lo tanto, diámetros mayores a 7 mm indican una mayor sensibilidad del microorganismo frente al producto probado. En tal sentido se tuvo en cuenta si la inhibición era total (sin crecimiento de micelio), o había una disminución en el crecimiento miceliar alrededor de los sólidos estudiados.

#### vii) Actividad antibacteriana

Las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron utilizadas como bioindicadores de la actividad antibacteriana de las CG con APS y APS-KMo con los controles correspondientes. Se realizaron subcultivos en tubos pico de flauta que contenían medio de cultivo agarizado para bacterias (MCAB). La composición del medio de cultivo usado fue: 0,1 g extracto levadura, 0,1 g proteasa peptona, 0,1 g almidón, 0,1 g dextrosa, 0,1 g casamino, 0,05 g ácido pirúvico, 0,06 g  $KH_2PO_4$ , 0,01 g  $MgSO_4$  y 1,5 g agar para 100 ml de solución. Los tubos fueron incubados por 24 h, en estufa a  $37^\circ C$ . La actividad antibacteriana de los sólidos se evaluó por el mismo método detallado previamente, "cut-plug". A partir de cultivos de 24 h, se obtuvieron suspensiones con solución fisiológica ajustando la turbidez a 0,5 de la escala Mc Farland ( $1,5 \cdot 10^8 \text{ Ufc/ml}$ ). Luego se realizó una dilución para obtener una suspensión bacteriana de  $1,5 \cdot 10^6$ . Se prepararon placas con MCAB inoculados con  $500 \mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana. Luego se procedió a realizar tres hoyos donde se agregó 20 mg de cada sólido estudiado con los respectivos controles. Las placas fueron incubadas por 24 h, a  $37^\circ C$ . Al terminar el ensayo se midieron los halos de inhibición y se registró mediante fotografías digitales los resultados obtenidos.

## RESULTADOS Y DISCUSION.

### Caracterización de los sólidos sintetizados

De acuerdo a lo observado en la Figura 1, los cambios en los espectros de FT-IR de las muestras de CG funcionalizadas no son notorios pudiendo deberse esto a dos factores: la poca cantidad de APS para la funcionalización del sólido CG o al posible solapamiento de los grupos provenientes del APS con los de las cenizas.

En la Figura 2, a modo de ejemplo, se comparan los sólidos CG-3,0APS (rojo), CG-3,0APS-KMo (azul), y la fase KMo (negra). Las bandas de un anión Lindqvist,  $[V_2Mo_4O_{19}]K_4$ , son similares a las de un anión Keggin, pero en el anión  $[V_2Mo_4O_{19}]^{4-}$  la distribución de los potenciales electrostáticos para su protonación, o en este caso el reemplazo por cationes  $K^+$ , es necesario dotar al oxígeno de una basicidad mayor para que éste entre en consonancia con la escala de basicidad de este tipo de compuestos. En estos se observa una visible variación en la banda cercana a los  $1500 \text{ cm}^{-1}$ , lo que podría ser atribuible a los grupos que contienen Mo y V, en la fase

KMo. Para los tres sólidos impregnados con diferentes cantidades de APS se observa lo mismo.

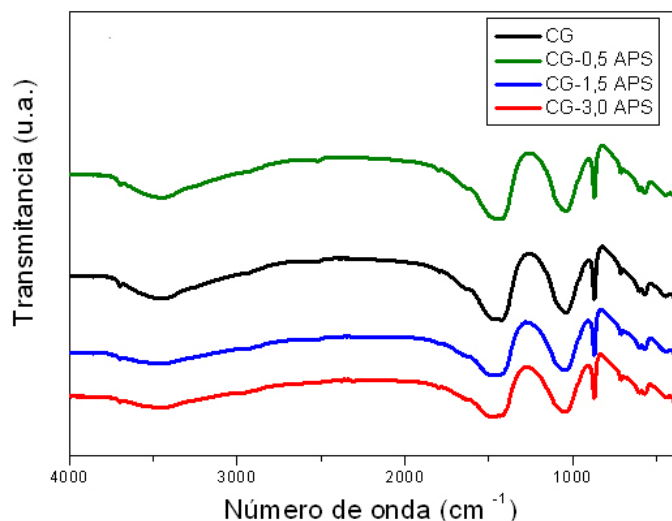


Figura 1. FT-IR de las muestras: CG pura, CG-0,5APS, CG-1,5APS y CG-3,0APS.

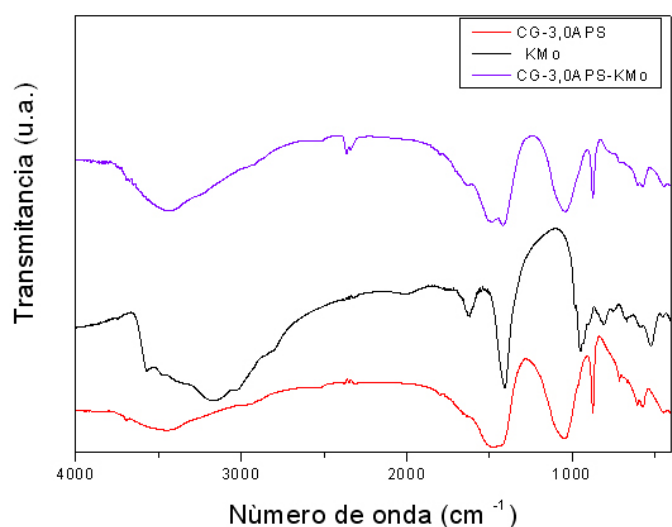


Figura 2. Espectros FT-IR de las muestras CG-3,0APS, CG-3,0APS-KMo y KMo.

Siguiendo con la caracterización de los sólidos obtenidos, se determinó la acidez de los mismos. Como criterio para interpretar los resultados obtenidos sobre acidez superficial por titulación potenciométrica con *n*-butilamina de los materiales sintetizados se sugiere que el potencial inicial del electrodo (mV) indica la máxima fuerza ácida de los sitios superficiales y el rango de meq base/g sólido hasta que se alcanza un plateau indica el número total de sitios ácidos que presenta el sólido titulado. La fuerza de los sitios ácidos puede clasificarse según la escala propuesta por Pecchi [21]:  $E > 100$  mV (sitios muy fuertes);  $0 < E < 100$  mV (sitios fuertes);  $-100 < E < 0$  mV (sitios débiles) y  $E < -100$  mV (sitios muy débiles).

A continuación en la Tabla 2 se presentan los valores de  $E$  (mV), luego se encuentran las curvas potenciométricas de todas las muestras sintetizadas y, finalmente, el análisis de los resultados obtenidos.

Es importante destacar que las cenizas de la cáscara de girasol lavadas con agua dan un valor  $E$  de  $-165,6$  mV. El alto contenido de especies con grupos hidrófobos se hace evidente en la titulación potenciométrica con *n*-butilamina, aún en un solvente con las características del acetonitrilo.

Tabla 2- Valores del  $E$  inicial de cada una de las curvas potenciométricas de los sólidos

Muestra	$E$ inicial (mV)
CG pura	-165,6
CG-0,5APS	59,6
CG-1,5APS	93,4
CG-3,0APS	85,4
CG-0,5APS-KMo	-96,1
CG-1,5APS-KMo	-70,5
CG-3,0APS-KMo	-23
KMo	134,1

Cuando las cenizas son funcionalizadas con APS los valores de  $E$ , para cada contenido del funcionalizante, son 59,6 mV para 0,5; 93,4 mV para 1,5 y, 85,4 para 3,0. Lo interesante de las muestras impregnadas es que en todos los casos el valor de  $E$  disminuye bruscamente en forma contraria a lo que podría pensarse cuando se impregna con la fase KMo, que presenta un  $E$  de 134,1 mV. Es decir, que lo esperable es el aumento de la acidez en los casos de las muestras impregnadas, aunque los valores se acercan al 0 (en mV), cuando aumenta la cantidad de APS, los  $E$  aumentan pero no llegan a ser positivos. Este comportamiento puede deberse a que en el caso de las muestras con APS solo, el grupo amino posee electrones que interactúan con diferentes grupos orgánicos de la superficie de las cenizas en el medio funcionalizante, aumentando la acidez de las muestras. Pero cuando son impregnadas en medio acuoso con la fase KMo, el APS podría difundir sobre la superficie de las cenizas y hacer que la interacción del KMo sea en forma irregular entre el grupo amino del APS y diferentes grupos superficiales de las cenizas. Este comportamiento lleva a que todas las muestras muestren una alta basicidad, propiedad predominante de la fase tipo Lindqvist, en este caso  $[V_2Mo_4O_{19}]K_4$ . Esta propiedad de los sólidos sintetizados es central en el comportamiento que luego presentarán como inhibidores microbianos de hongos y bacterias.

En relación a la caracterización con la técnica SEM-EDS, en la Figura 3 se muestran mayoritariamente los cristales de la fase tipo Lindqvist, allí se observan algunas formas de agujas con diferentes formas, que podrían ser fases intermedias que se formaron durante la síntesis de la misma.

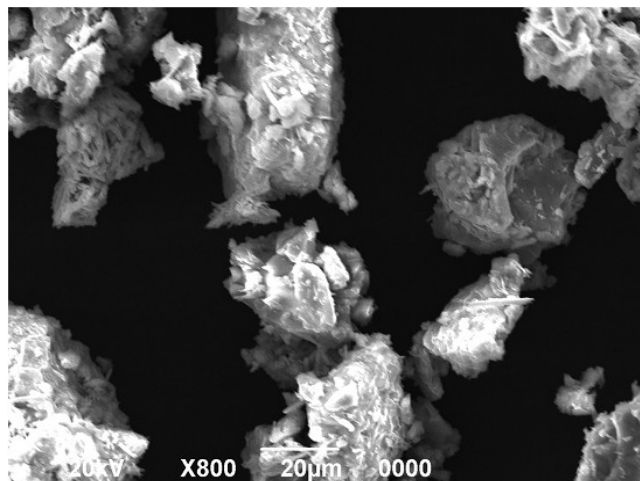


Figura 3. Micrografía SEM de la muestra KMo.

En la Figura 4 se presentan las siguientes muestras: (a) CG, (b) CG-0,5APS, (c) CG-1,5APS y (d) CG-3,0APS, respectivamente, y se observa que la diferencia en relación a la ceniza (CG) es que las CG funcionalizadas presentan como pequeñas gotas de agua que se rompieron, lo que podría deberse a las características orgánicas del APS sobre el sólido. En la Figura 4(a), la ceniza de las cáscaras de girasol lavadas con agua (CG), presentan una granulometría menor en su mayoría a los 2 mm de diámetro, observándose un polvo quasi-uniforme. Es interesante no perder de vista que cuando se aumentan las magnificaciones, en el caso de la muestra que contiene la mayor cantidad de APS (CG-3,0APS), una formación de esferas es visualizada, la que podría ser la base de las cenizas cuando se funcionaliza e interaccionan con otros grupos orgánicos.

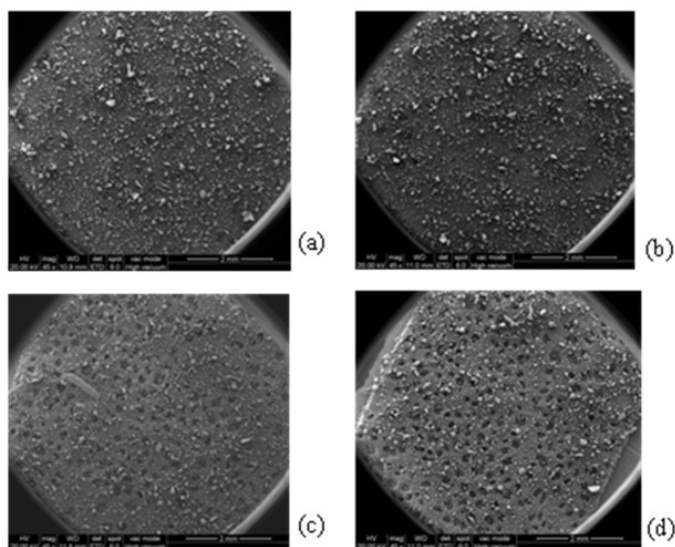


Figura 4. SEM de las muestras: (a) CG, (b) CG-0,5APS, (c) CG-1,5APS y (d) CG-3,0APS.

Esta morfología se mantiene cuando la muestra es impregnada con la fase KMo, al comparar las micrografías (b) y (c) (Figura 5).

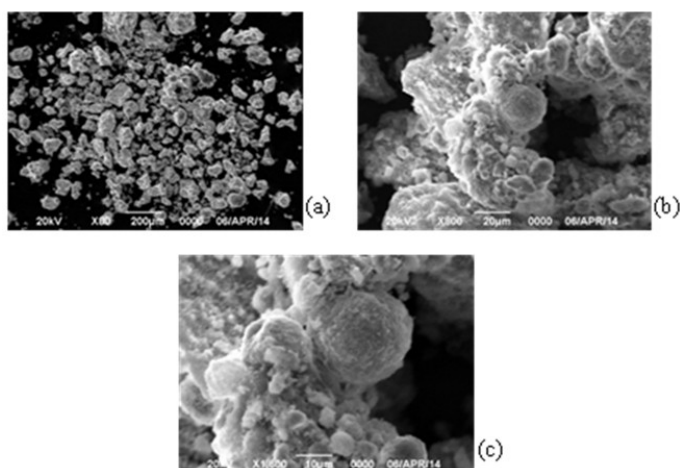


Figura 5. Micrografía SEM de la muestra CG-3,0APS-KMo a diferentes magnificaciones

A continuación (Figura 6) se presenta el mapeo de la muestra CG-3,0APS-KMo, donde vemos los dos elementos fundamentales del compuesto tipo Lindqvist, el O y el K, comparados con la micrografía de la misma muestra. Se observa una distribución homogénea del elemento K en toda la muestra, lo que es indicativo de una buena distribución durante la

impregnación.

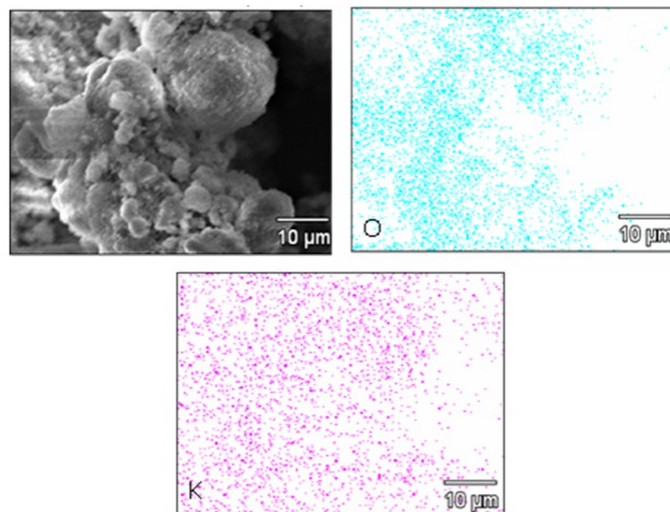


Figura 6. Mapeo de la muestra CG-3,0APS-KMo.

En la Figura 7 se observa el espectro de la muestra CG-3,0APS-KMo. Al realizar un análisis semi-cuantitativo podemos observar que, además, de Mo y V, existen en proporciones importantes numerosos cationes como Mg, Al, Ti, Fe y otros elementos que acompañan a los mismos en los compuestos que intervienen en el análisis como lo son el APS y la superficie de las cenizas de cáscara de girasol. Por ello encontramos para el primero Si y C, fundamentalmente, que también están presentes en el soporte junto al P y al Ca. Para hacer evidente la presencia de algunos cationes, como el Ca se realizó un mapeo (Figura 8) para realizar un comparativo entre ellos.

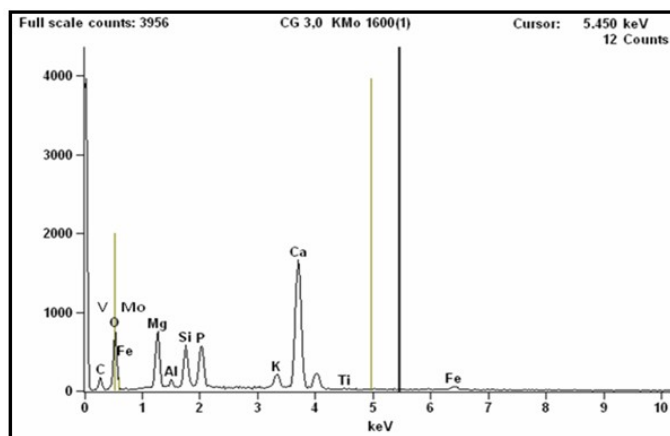


Figura 7. Espectro de EDS de la muestra CG-3,0APS-KMo

Y se puede concluir, que la baja acidez, o alta basicidad que presentan las muestras, se debe en parte a la presencia de estos cationes en superficie, en contacto con el APS y en los poros del sólido, las cenizas.

Con relación a la técnica de Rayos X, se observa la presencia de la fase KMo de acuerdo a la señal en 28,2 2 theta. Las cenizas de girasol tienen una señal característica a 30 2 theta (no se muestra el difractograma).

En la Tabla 3 se presenta un resumen de los valores de las propiedades texturales de las muestras sintetizadas.

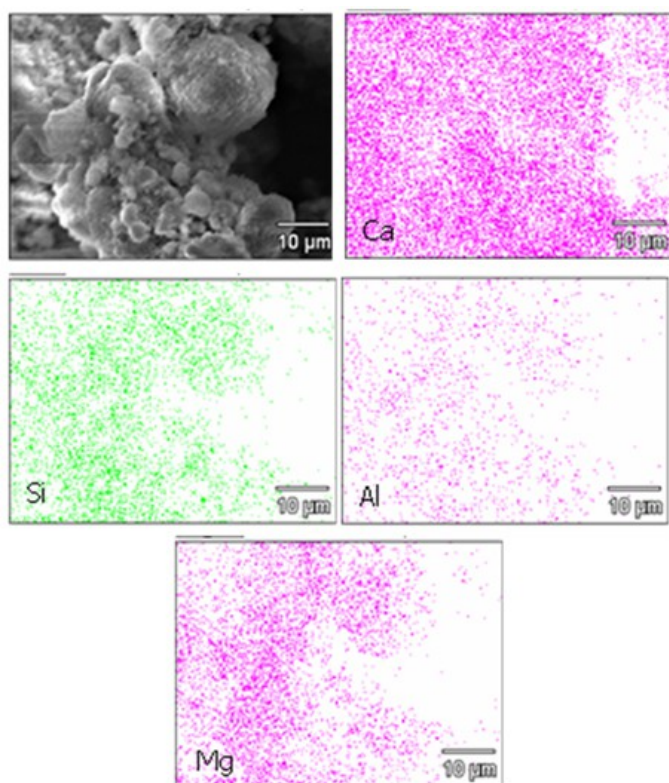


Figura 8. Mapeo de cationes encontrados en la muestra CG-3,0APS-KMo.

Tabla 3- Propiedades texturales de los sólidos sintetizados.

Muestra	$S_{Bet}$	Volumen de poros ( $cm^3/g$ )	Volumen de microporos ( $cm^3/g$ )	Tamaño de poro
	( $m^2/g$ )			( $\text{Å}$ )
CG	12,5	0,0	0,0	133,6
CG-0,5APS	13,2	0,0	0,0	124,6
CG-1,5APS	9,2	0,0	0,0	163,2
CG-3,0APS	7,3	0,0	0,0	153,7
CG-0,5APS-KMo	29,5	0,0	0,0	71,3
CG-1,5APS-KMo	29,9	0,0	0,0	76,7
CG-3,0APS-KMo	30,2	0,0	0,0	70,1
KMo	1,1	-	-	136,0

Es muy difícil poder sacar conclusiones en relación a las áreas superficiales cuando son tan bajas y algunas están dentro del error experimental del equipo, por ejemplo, la del compuesto de Lindqvist. Entonces suponemos que esta fase cubre el soporte, y aumenta el área de las muestras que contienen KMo, como se ilustra en la Tabla 3. Si tomamos como referencia las cenizas de las cáscaras de girasol que tienen un área de  $12,5 m^2/g$ , podemos decir que a medida que la cantidad de

funcionalizante aumenta, el área disminuye. Y esto podría considerarse suponiendo que el APS comienza a cubrir mayormente la superficie de las cenizas, hasta obtener un valor de  $7,3 m^2/g$  para la muestra CG-3,0APS. Lo interesante es que cuando se realiza la impregnación las áreas superficiales tienen el mismo valor, cercano a  $30 m^2/g$ , en los tres casos. Esto podría deberse a la difusión y movilidad del APS sobre la superficie de las cenizas cuando se pone en contacto con el agua, aumentando la superficie de contacto entre el soporte y el APS. Además, de acuerdo a las micrografías existen bocas de poros de las cenizas que pueden incorporar a la fase KMo en el interior del sólido. Cabe destacar que el área tan baja en todas las muestras será un escollo en el momento de poner en contacto estos sólidos con el medio de cultivo para medir la actividad antimicrobiana de los sólidos sintetizados.

#### Actividad antifúngica

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos a partir del ensayo de difusión en agar con los sólidos ensayados y los controles correspondientes. El criterio establecido de que diámetros mayores a 7 mm tienen mayor sensibilidad se debe a que el hoyo es de ese tamaño. Por lo tanto, cuando el medio de cultivo inoculado difunde sobre el sólido, si este tiene actividad antifúngica impide el crecimiento observándose un halo más claro. Se debe tener en cuenta que los halos de inhibición que no tienen asterisco indican que en la zona referida no se observó crecimiento de micelio y los que presentan asterisco (\*) refieren a un menor desarrollo del micelio. Se pudo observar actividad antifúngica en los cultivos de *Chaetomium globosum* (Figura 9) y *Aspergillus fumigatus* (Figura 10), mostrando el primero una mayor susceptibilidad frente al sólido CG-3,0APS-KMo dado que presentó un halo de inhibición total sin crecimiento de micelio. Cabe destacar que de entre las especies utilizadas para la realización del ensayo *Chaetomium globosum* es la que requiere mayor contenido acuoso para que sus esporas germinen y su micelio pueda desarrollarse [22].

Tabla 4. Evaluación de la actividad antifúngica mediante el ensayo de difusión en agar

Muestras	Diámetro de halo de inhibición (mm) después de 48 h <sup>a</sup>			
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Control	--	--	--	--
CG	--	23,1* ± 3,1	--	17* ± 1,2
CG-0,5APS	--	23,4* ± 2,3	--	24,5* ± 1,3
CG-1,5APS	--	24,4* ± 1,7	--	20* ± 3,3
CG-3,0APS	--	23,3* ± 1,4	--	22,0* ± 3,0
CG-0,5APS-KMo	--	27,3* ± 0,3	--	30,3* ± 2,0
CG-1,5APS-KMo	--	32,2* ± 0,5	--	29,7* ± 1,7
CG-3,0APS-KMo	--	8,9 ± 0,8	--	27,9* ± 1,5

<sup>a</sup> Datos promedios a partir de triplicados.

\* Indica un menor crecimiento alrededor del sólido. -- Sin inhibición

Por lo tanto una mayor hidrofobicidad del agente en estudio podría afectar en mayor medida su normal desarrollo.

Con respecto al cultivo de *Aspergillus fumigatus* que se muestra en la Figura 10, se puede decir que hay menor crecimiento de micelio con los

sólidos CG-3,0APS-KMo y CG-1,5APS-KMo con respecto al control CG, ya que no se observa la tonalidad verdosa característica al producirse gran cantidad de conidios.

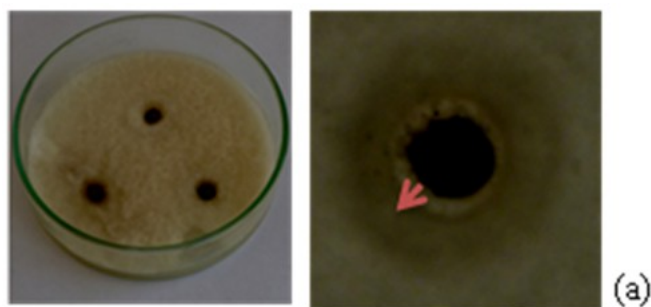


Figura 9. Fotografías del cultivo fúngico de *C. globosum* con los sólidos (a) CG-3,0APS-KMo y (b) CG, representando la flecha el halo de inhibición.

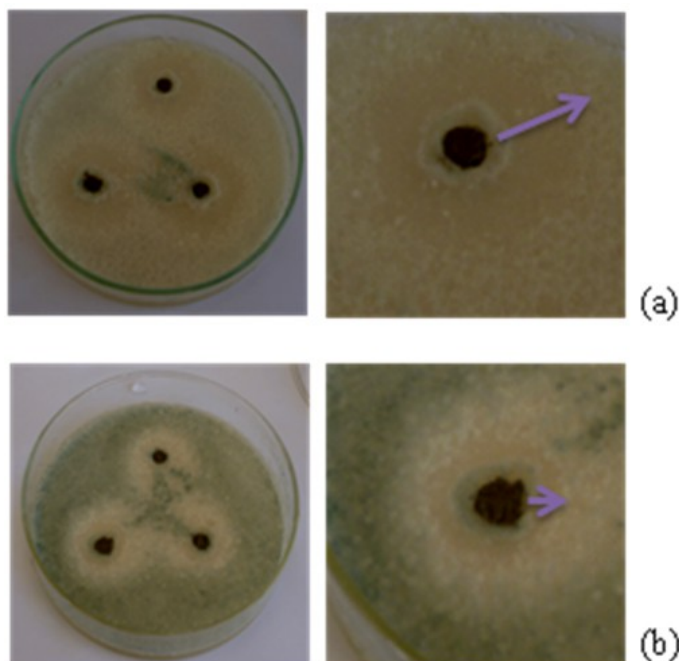


Figura 10. Fotografía del cultivo fúngico de *A. fumigatus* con los sólidos (a) CG-3,0APS-KMo y (b) CG. La flecha representa el halo de menor crecimiento.

En los cultivos de *Alternaria alternata* y *Penicillium sp.* no hubo crecimiento sobre los sólidos pero no se observó ningún cambio con respecto al control (Figura 11 y 12).

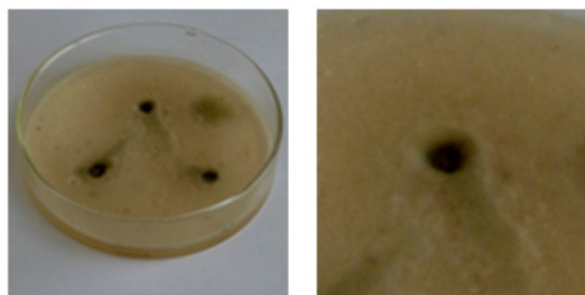


Figura 11. Fotografía del cultivo fúngico de *A. alternata* con el sólido CG.

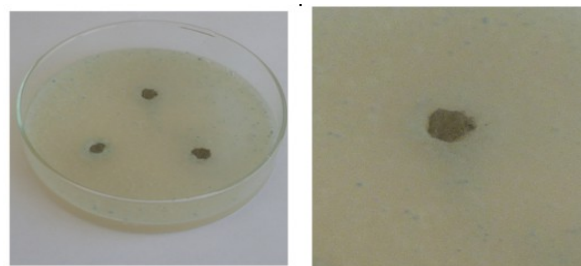


Figura 12. Fotografía del cultivo fúngico de *Penicillium sp.* con el sólido CG.

#### Actividad antibacteriana

Los resultados de la evaluación antibacteriana obtenidos a partir del método de difusión en agar fueron expuestos en la Tabla 5. El criterio establecido de que diámetros mayores a 7 mm tienen mayor sensibilidad se debe a que el hoyo donde se introduce el sólido es de ese tamaño. En este caso, cuando hubo actividad antibacteriana del sólido se observó un halo donde no crecían las colonias. Se debe tener en consideración que los resultados que se marcan con -- significan que no hubo inhibición.

Tabla 5- Evaluación de la actividad antibacteriana mediante el ensayo de difusión en agar

Muestras	Diámetro de halo de inhibición (mm) después de 24 h <sup>a</sup>	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Control	--	--
CG	--	--
CG-0,5APS	--	7,9 ± 0,2
CG-1,5APS	--	10,7 ± 1,5
CG-3,0APS	--	10,7 ± 1
CG-0,5APS-KMo	--	--
CG-1,5APS-KMo	--	--
CG-3,0APS-KMo	--	9,8 ± 0,7

<sup>a</sup> Datos promedios a partir de triplicados  
-- Sin inhibición

Los resultados obtenidos muestran una mayor susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* frente a los sólidos CG-3,0APS y CG-3,0APS-KMo con halos de inhibición apreciables en relación a los controles con el sólido soporte solo (Figura 13). En el caso de *Escherichia coli* los resultados obtenidos con los sólidos funcionalizados no mostraron diferencias con los controles (Figura 14).

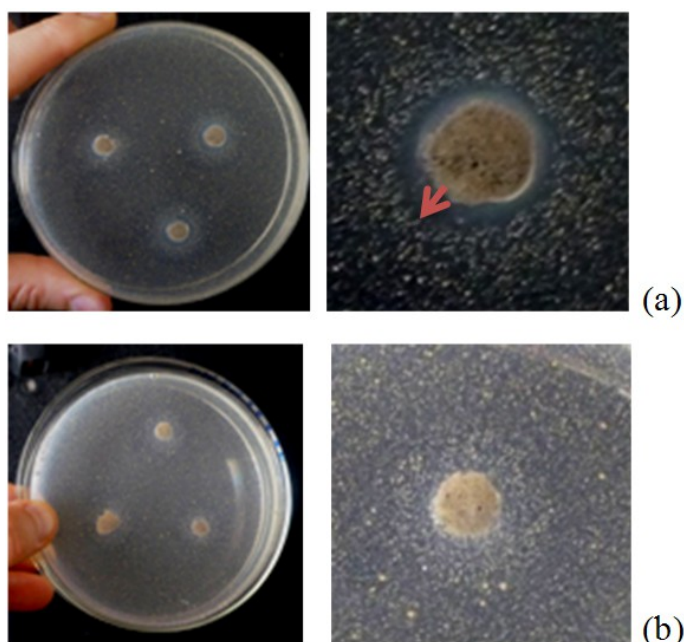


Figura 13. Fotografías del cultivo bacteriano *S. aureus* con los sólidos (a) CG 3,0 APS-KMo y (b) CG, representando la flecha el halo de inhibición.

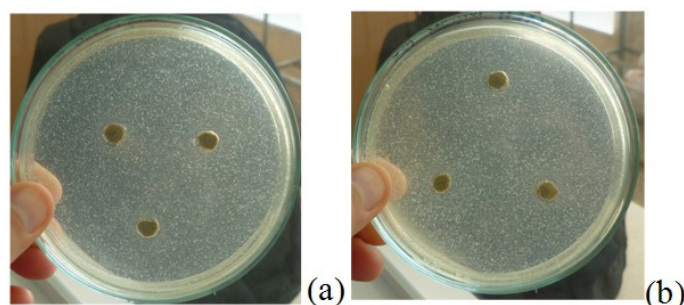


Figura 14. Fotografías del cultivo bacteriano *E. coli* con los sólidos (a) CG 3,0 APS-KMo y (b) CG.

La diferencia en los resultados obtenidos frente a las dos cepas bacterianas estaría relacionada en la susceptibilidad diferenciada que presentan las bacterias Gram positivas en comparación a las Gram negativas frente a los biocidas en general [23]. Para una mejor comprensión se debe tener en cuenta que un efecto antibacteriano surge en última instancia de la interacción exitosa del biocida con su objetivo u objetivos. Al avanzar, un biocida se encontrará con estructuras intermediarias que representan, en diversos grados, las diferentes sensibilidades de las especies bacterianas individuales. Por lo tanto, las células gram negativas ofrecen una barrera suplementaria, la capa de lipopolisacárido (LPS), a la penetración del biocida, que las células Gram-positivas no poseen [24]. Se cree que esta estructura afecta la introducción de moléculas tanto hidrófilas como hidrófobas, en tal sentido se establece un peso molecular de corte (c. 600Da) para el paso de las primeras a través de los poros llenos de agua (porinas) y en relación a las segundas requieren propiedades lipófilas óptimas para el ingreso [25].

#### CONCLUSIONES.

Fue posible obtener cenizas de cáscaras de semillas de girasol funcionalizadas con diferentes concentraciones de 3-aminopropiltrióxosilano (APS) y, posteriormente, impregnadas con el

polioxometalato tipo Lindqvist  $[V_2Mo_4O_{19}]K$  (KMo) y caracterizarlas a partir de las técnicas Espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR), Titulación potenciométrica con n-butilamina, Microscopía Electrónica de Barrido- Espectroscopia de rayos X de Energía dispersiva (SEM-EDS), Difracción de rayos X (DRX) y propiedades estructurales ( $S_{BET}$ ) en forma satisfactoria.

Los hongos *Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium sp.* y *Aspergillus fumigatus*, resultaron útiles como bioindicadores para la evaluación de la actividad antifúngica de los sólidos en estudio. También fue posible determinar en forma preliminar la actividad antibacteriana con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En ambos casos el ensayo de difusión en agar mostró ser rápido y efectivo para evaluar la bioactividad de los sólidos en cuestión.

De los sólidos ensayados CG-3,0APS-KMo fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana ante quien debido a que resultó efectivo frente a un mayor número de aislados fúngicos y también al inhibir el crecimiento de una de las cepas bacterianas utilizadas. Estos resultados preliminares permiten pensar en una siguiente etapa donde se podría evaluar la eficiencia de los sólidos más bioactivos integrados a una formulación de pintura con carácter higiénico. Debe continuarse con pruebas de nuevos compuestos relacionados a residuos reciclables, dando origen a aditivos ecocompatibles.

#### REFERENCIAS.

- [1] Nicolas, P.; Mor, A. "Peptides as Weapons against Microorganisms in the Chemical Defense System of Vertebrates". *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, 49, 277-304.
- [2] Gonzales, F.P.; Maisch, T. "XF Drugs: A New Family of Antibacterials". *Drug News Perspect.* **2010**, 23, 167-174.
- [3] Gaylarde C.C., Morton L.H.G., Loh K., Shirakawa M.A., "Biodeterioration of external architectural paint films. A review", Vol. 65, **2011**, pp. 1189-1198.
- [4] Gaylarde C.C., Gaylarde P.M. "A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America"; *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 55, **2005**, pp. 131-139.
- [5] Mah, T.-F.; Pitts, B.; Pellock, B.; Walker, G.C.; Stewart, P.S.; O'Toole, G.A. "A genetic Basis for Pseudomonas Aeruginosa Biofilm Antibiotic Resistance". *Nature* **2003**, 426, 306-310.
- [6] Lode, H.M. "Clinical Impact of Antibiotic-Resistant Gram-Positive Pathogens". *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, 15, 212-217.
- [7] Gonzales, F.P.; Maisch, T. "XF Drugs: A New Family of Antibacterials". *Drug News Perspect.* **2010**, 23, 167-174.
- [8] Z.Cao Sun Y., "Polymeric N-halamine latex emulsions for use in antimicrobial paints". *ACS App. Mat. Int.* **2009**, (1) 494.
- [9] K. Johns. *Int. PB: Coat. Trans.* **2003**, 86, 101-110.
- [10] D. Vaughan-Lee. *Polymer Paint Colour J.* **2002**, 24-26.
- [11] Lindner W., "Surface coatings, in: Directory of Microbicides for the Protection of Materials" Handbook, Wilfried Paulus **2004**(eds.), Ed. Kluwer Academic Publishers, 347.



- [12] J. Calzada, *Argentina entre los 4 principales productores de semilla de girasol* [online] Mitre y el campo, 8 de enero 2014, Disponible en <http://secciones.cienradios.com.ar/radiomitre/2014/01/08/argentina-entre-los-4-principales-productores-de-semilla-de-girasol/>.
- [13] Curvetto, N.R., Figlas D., R. González Matute, S Delmastro, Cultivo de Shiitake en Bolsas (pp. 127-133), Shiitake**2005**.
- [14] Li, Y., Yu, J., Guo, Z., "The Influence of Silane Treatment on Nylon 6/nano-SiO<sub>2</sub> In Situ Polymerization," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 84, pp. 827-834, **2002**.
- [15] Kovalchuk, T., Sfihi, H., Kostenko, L., Zaitsev, V., Fraissard, J. "Preparation, structure and thermal stability of onium- and amino-functionalized silicas for the use as catalysts supports," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 302, pp. 214-229, June. **2006**.
- [16] El-Refaie Kenawy, F. Imam Abdel-Hay, Ahmed Abou El-Magd, Yehia Mahmoud, *Reactive & Functional Polymers***2006**, 419.
- [17] Abdullah Alamri, Mohamed H El-Newehy, Salem S Al-Deyab, *Chemistry Central Journal*, 6 ,**2012**, 111.
- [18] Morello, J.A., Granato, P.A, Mizer, H.E, *Laboratory manual and workbook* (pp. 95-105) Ed. McGraw-Hill **2003**.
- [19] 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.
- [20] Cooley J.D., Wong W.c., Jumper, C.A., Straus, D.C., "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
- [21] G. Pecchi, Tesis Doctoral, Universidad de Concepción, Chile, **1980**
- [22] Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Área Micología, <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>, visitado en diciembre de 2014.
- [23] Hiroshi Nikaido\* and Marti Vaara "Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability", *Microbiological Reviews*, 49, **1985**, 1-32.
- [24] A.D. Russell & G.W. Gould "Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and Disinfectants", *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 65, **1988**, 167-195.
- [25] S. P. Denyer, "Mechanisms of Action of Antibacterial Biocides", *International Biodeterioration & Biodegradation*, **1995**, 221-245.