



Recubrimiento de silano con *Ajedrea (Satureja montana)* para la protección del ataque fúngico en pinturas

S. Bogdan

CIDEPINT-Centro de investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas- (CIC-CONICET), La Plata, Argentina

estelectro4@cidepint.gov.ar

Directores: Roberto Romagnoli, Cecilia Deyá

CIDEPINT-Centro de investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas- (CIC-CONICET), La Plata, Argentina

Tópico: Otros materiales

Resumen

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial (AE) de *Ajedrea, Satureja montana* (Sm), para luego incorporarlo en un recubrimiento de silano y evaluar su desempeño protector al ataque fúngico en una pintura para interior.

Mediante ensayos de contacto, se determinó que el aceite esencial de *ajedrea* inhibió completamente el crecimiento de los hongos utilizados, *Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.*, en la concentración ensayada, 1% v/v. En una segunda instancia, se preparó una solución de Aminopropiltriétoxosilano (APTES) a la que se le incorporó como aditivo Sm al 2%v/v. Como blanco se utilizó APTES sin Sm. Se pintaron paneles de yeso con una pintura al látex para interior y se cubrieron con la solución de silano. Para realizar el ensayo de bioresistencia de los recubrimientos; se inocularon los paneles pintados con *Aspergillus sp.* y se incubaron en cámara de humedad controlada (86% HR) durante 1 mes. Finalmente, se realizó una inspección visual del crecimiento fúngico sobre los paneles evaluando su desempeño según el grado de cobertura sobre la superficie, por parte del hongo crecido. Para el recubrimiento utilizado como blanco, el grado de cobertura fue mayor al 90% mientras que el recubrimiento APTES con Sm 2% v/v no mostró desarrollo del hongo sobre la superficie. Adicionalmente se realizaron observaciones mediante microscopía electrónica de barrido donde se corroboraron las observaciones.

Este tipo de recubrimientos presentan un gran potencial, por un lado puesto que los aceites esenciales son un recurso natural renovable y ecoamigable y, por otro, dado que se podrían aplicar sobre otros sustratos como esculturas, murales, para la preservación del patrimonio cultural por ser una cubierta transparente que, a simple vista, no modifica la apariencia de los mismos.

Palabras clave: *ajedrea*, aceite esencial, pintura, recubrimiento, silano

Keywords: savory, essential oil, paint, coating, silane

1. Introducción

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 por secado, obteniéndose así una fase oleosa continua. En las formulaciones de este tipo de pinturas se han quitado 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, todos ellos susceptibles de biodeterioro [1-3]. Entre los organismos más deteriorantes se encuentran los hongos, grupo muy grande, diverso y que se encuentra en prácticamente todos los nichos ecológicos.

La colonización microbiana en el interior de los edificios preocupa en forma creciente desde las últimas décadas, por los deterioros estéticos que pueden ocasionar en los revestimientos y por los problemas de salud que causan los microorganismos en personas con bajas defensas o con problemas respiratorios. Existe mucha bibliografía que relaciona los problemas de salud con la contaminación fúngica

en ambientes cerrados [4,5]. Entre los géneros más comúnmente aislados en el interior de los edificios se encuentran *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Alternaria* [4-7].

Existiendo una creciente necesidad de mantener las condiciones de higiene a nivel de la superficie, la cual se torna muy crítica, por ejemplo en la prevención y control de las infecciones en hospitales, especialmente porque los patógenos son cada vez más resistentes a los agentes antimicrobianos convencionales [6-10].

Los aditivos convencionales utilizados como biocidas en pinturas y recubrimientos suelen ser tóxicos, produciendo contaminación ambiental y problemas en la salud [11,12]. Una alternativa "ecoamigable" para su reemplazo podría ser la utilización de productos naturales, como ser los aceites esenciales.

Los aceites esenciales son una mezcla compleja de compuestos naturales caracterizados por un fuerte aroma, que se acumulan como metabolitos secundarios en las distintas partes de las plantas aromáticas (flores, brotes, hojas, frutos, tallos, ramas, corteza, semillas, madera y raíces) [13]. El porcentaje de los componentes de los aceites varía entre especies, partes de la planta, estación y condiciones

de cosecha, ubicación geográfica, entre otros. Según su estructura química, los componentes de los AE son, principalmente, terpenos y terpenoides, sus derivados oxigenados. Se pueden obtener por extracción, fermentación o expresión, pero la destilación es el método más comúnmente utilizado [14]. Se los ha utilizado desde tiempos antiguos por sus propiedades antisépticas, por su fragancia, para la preservación de los alimentos y como antimicrobiano, analgésico, sedante, anti-inflamatorio, espasmolítico y anestésico local [13]. Es difícil correlacionar la actividad antimicrobiana a compuestos individuales o clases de compuestos, debido a que es posible que los efectos sean el resultado de muchos compuestos que actúan sinérgicamente [15].

Los silanos se conocen como productos químicos derivados del silicio monomérico. Un silano que contiene al menos un enlace silicio-carbono, es un organosilano. La estructura general se puede representar de la siguiente manera: $X_3Si(CH_2)_nY$, donde X representa un grupo hidrolizable, como metoxi o etoxi, que le permite reaccionar con sustratos inorgánicos. Por otra parte, Y representa, generalmente, un grupo terminal funcional no hidrolizable (-SH, -OH, -NH₂), que reacciona con sustratos orgánicos. Esta propiedad especial permite que puedan ser utilizados como "puentes moleculares" entre sustratos orgánicos y materiales inorgánicos, se los denomina comúnmente como agentes de acoplamiento [16,17]. Este tipo de compuestos son muy utilizados para generar capas delgadas de revestimientos, por medio de reacciones sol-gel, ya sea para conferirle una nueva característica a la superficie o para la protección de sustratos [16-20].

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar la actividad antifúngica in vitro del aceite esencial de *Ajedrea*, *Satureja montana* (Sm), para luego incorporarlo en un recubrimiento de silano y evaluar su desempeño protector del ataque fúngico sobre una pintura para interior.

2. Metodología

2.1. Aceite esencial y preparación del silano

El aceite esencial puro (sin ningún tipo de agregado de químicos sintéticos) de *Satureja montana* fue provisto por la Cátedra de Fitoquímica, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata. El aceite se almacenó a 4°C hasta su uso.

Para la preparación del silano, se utilizó el aminopropiltrietoxisilano. La solución de APTES se preparó añadiendo 2% v/v de APTES puro a una solución de agua destilada/isopropanol (0,5/99,5% v/v), a pH 10. Se dejó hidrolizando en agitación constante durante 1h. Luego se lo fraccionó, una parte se dejó para utilizar como control y otra parte se mezcló con Sm al 2% v/v. La solución fue preparada al momento de ser utilizada.

2.2. Aislamientos fúngicos y medios de cultivo

Los aislamientos fúngicos utilizados (*Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Mucor sp.*, *Aspergillus sp.*) fueron previamente obtenidos de películas de pinturas contaminadas.

Los hongos fueron cultivados en medio de cultivo agarizado (MCA) de la siguiente composición: 1,5g agar-agar, 1,0g dextrosa, 0,5 g proteasa peptona, 0,1g KH₂PO₄, 0,05g MgSO₄, H₂O destilada hasta completar 100 ml. Se incubaron en estufa a 28°C, entre 7-13 días, dependiendo de la especie fúngica.

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 0,005% p/v. La concentración de esporas fue ajustada a 10⁶ esporas/ml utilizando una cámara de Neubauer.

2.3. Actividad antifúngica in vitro

Se realizó a través de un ensayo de contacto con los hongos *Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Mucor sp.* y *Aspergillus sp.*. Se autoclavó el medio de cultivo MCA fraccionado, en frascos con 15 ml cada uno, y se colocaron en baño termostático a 60°C. Una vez termostaticado, se le incorporó el aceite esencial de Sm al 1%v/v, se homogenizó y se vertió sobre una placa de Petri. Luego, se inoculó con un "taco" de 7mmx7mm del hongo crecido previamente en medio MCA. Como control se utilizó MCA sin aceite esencial. Finalmente las placas fueron incubadas a 28°C por 7-13 días, dependiendo de la especie. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para calcular el efecto inhibitorio se utilizó la siguiente fórmula:

$$I = [(C-E)/C] \times 100$$

Donde I es el porcentaje de inhibición, C es el diámetro del crecimiento radial del hongo en el control y E es el crecimiento radial del hongo en el medio con aceite esencial. El diámetro de crecimiento se obtuvo como el promedio de tres medidas independientes.

2.4. Ensayo de resistencia al ataque fúngico del recubrimiento de silano

Se utilizaron paneles de yeso de 2,5cmx2,5cm pintados con un látex acrílico para interior, formulado y elaborado en el CIDEPINT. Se sumergió la cara superior de cada uno de los paneles durante 1 min en la solución de silanos. Se utilizó la solución sin ajedrea como control y una la solución APTES con Sm 2% v/v. Se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 días. Pasado ese tiempo, se esterilizaron con luz UV, 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.* Se incubaron en atmósfera controlada con 86%HR durante 1 mes. Se ensayaron los paneles por sextuplicado.

El crecimiento del hongo fue estimado como porcentaje de cobertura sobre la superficie. 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 (24h) y se deshidrataron con soluciones graduales de etanol desde 20% 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 Quanta200, modo Alto vacío, 5-12,5 kV.

3. Resultados

Los resultados obtenidos para los ensayos de actividad antifúngica in vitro fueron muy favorables, dado que el aceite esencial de Sm logró inhibir en un 100% a todos los hongos ensayados (*Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Mucor sp.* y *Aspergillus sp.*).

Así mismo los resultados obtenidos en los ensayos de resistencia al ataque fúngico de los recubrimientos de silano fueron muy satisfactorios. En el recubrimiento control el grado de cobertura de la superficie por parte del hongo fue mayor al 90%, mientras que para la cubierta APTES-Sm 2% el crecimiento fue nulo.

Aspergillus sp. es uno de los hongos más abundantes que generan biodeterioro en pinturas y se encuentran dentro de los colonizadores primarios por sus bajos requerimientos de actividad de agua sobre los sustratos [4].

La Figura 1 muestra las micrografías obtenidas por MEB del recubrimiento control. Allí se observa claramente la colonización fúngica, incluso se dificulta visualizar la superficie de base (pintura+recubrimiento APTES) por el abundante desarrollo del micelio. En la Fig. 1-B se puede observar un conidióforo (hifa especializada que porta esporas) saliendo desde el interior de un poro de la pintura, esto indica que el hongo ha colonizado el interior del poro, incluso pudiendo haber llegado hasta el sustrato (yeso).

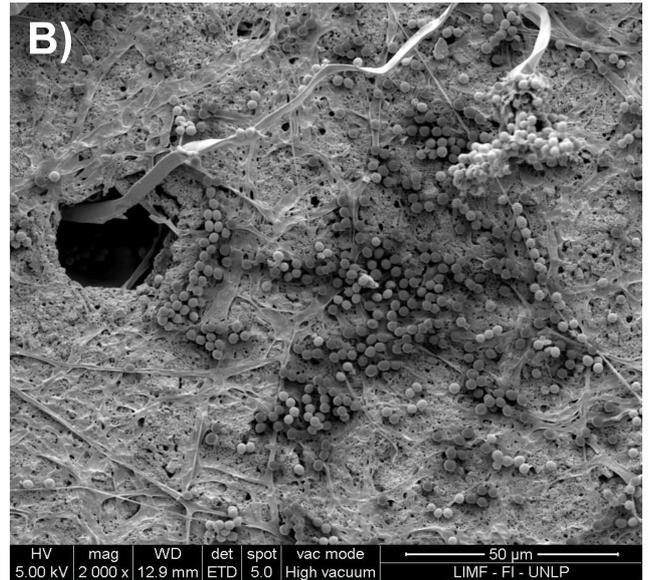
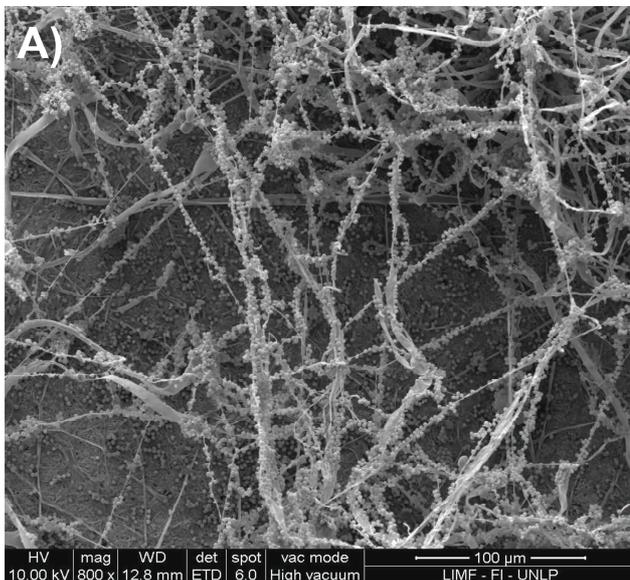


Figura 1. Micrografías panel control, A) a 800X, B) a 2000X.

En la Fig.2, contrariamente, se observa que el hongo no ha logrado proliferar sobre la superficie. Estos resultados sugieren que el silano ha funcionado como soporte para el aceite esencial dejándolo enteramente disponible para su función como biocida sin interferir en las características de la pintura

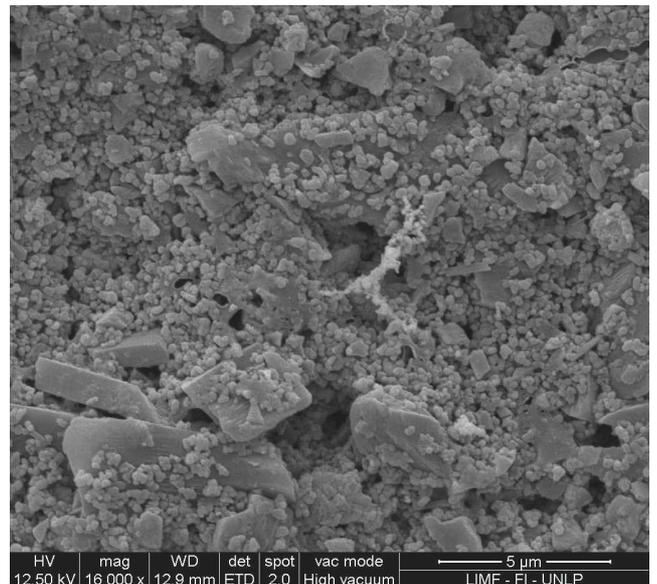


Figura 2. Micrografía panel con AMEO-Sm 2%, a 2000X .

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta investigación son muy promisorios, se ha logrado la inhibición total del ataque fúngico de *Aspergillus sp.* a través de un recubrimiento APTES-Sm 2% v/v.

Este tipo de recubrimientos presentan un gran potencial, por un lado puesto que los aceites esenciales son un recurso natural renovable y ecoamigable. A su vez, el proceso de generación de la capa delgada de recubrimiento de silano es

relativamente simple y no agresivo para el medio ambiente [16,21]. Por otro lado, este tipo de recubrimientos antimicrobianos se podrían aplicar sobre otros sustratos como esculturas, murales, para la preservación del patrimonio cultural por ser una cubierta transparente que, a simple vista, no modifica la apariencia de los sustratos.

Un inconveniente, en este momento, es el costo de las materias primas. Los costos resultan elevados cuando el proceso se considera para la producción en masa, pero podrían ser aceptables si se los considera para aplicaciones especiales o aquellos casos en los que falla la tecnología convencional. Es necesario seguir investigando y trabajar en conjunto con empresas, para hacer viable la selección de ideas, tecnologías y compuestos “ecoamigables” para la generación de productos comerciales.

Agradecimientos

Al CONICET, la CICBA y la UNLP por el apoyo recibido. Al Ing. J. Ringuet por la provisión del aceite esencial. A la empresa Diransa por la provisión de resina y aditivos para la formulación de la pintura. Al LIMF-Facultad de Ingeniería, UNLP, por facilitar el uso del MEB.

Referencias

- [1] P.S. Guimet, H.A. Videla, *Corrosion Reviews* **14** (1996) 47.
- [2] A. M. Rhoades, A. W. Douglas, M. Bruhaspathy, J. Williamson, *Progress in Organic Coatings* **58** (2007) 209.
- [3] D. R. Houghton, R. N. Smith, H. O. W. Eiggins (Eds.), *Biodeterioration 7*, Elsevier Science Publishers LTD (1988).
- [4] Li D., Yang C. S., *Adv. Applied microb.*, **55** (2004), 31-96.
- [5] T. Verdier, M. Coutand, A. Bertron, C. Roques, *Building and Environment* **80** (2014) 136-149
- [6] M. Negrin, M.T. Del Panno, A.E. Ronco, *Aerobiologia* **23** (2007) 249.
- [7] C. J. Alexopoulos, C. W. Mims, M. Blackwell, *Introductory Mycology*, John Wiley and Sons, Inc., 4ta edición (1996).
- [8] J. Maillard, *Therapeutics and Clinical Risk Management* **1(4)** (2005) 307.
- [9] S. J. Dancer, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **30(12)** (2011) 1473
- [10] J. H. Walker, *Decontamination in Hospitals and Healthcare*, Woodhead Publishing (2014).
- [11] Hare C., *JPCL*, **17(9)** (2000) 51-65.
- [12] Johns K., *Surface Coatings int.*, **86** (2003) 101-110.
- [13] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, *Food and Chemical Toxicology* **46** (2008) 446-475.
- [14] F. Solorzano-Santos and M. G. Miranda-Novales, *Current Opinion in Biotechnology*, **23** (2012) 136-141
- [15] W. Feng, X. Zheng, *Food Control*, **18** (2007) 1126-1130
- [16] D. Kregiel, *Food Control* **40** (2014) 32-40
- [17] B. Chico, D. de la Fuente, M. L. Pérez, M. Morcillo, *J. Coat. Technol. Res.*, **9(1)** (2012) 3-13.
- [18] van Ooij, WJ, Zhu, D, Palanivel, V, Lamar, JA, Stacy, M, *Silicon Chem.*, **3 (1)** (2006) 11-30
- [19] F. Cheng, S. M. Sajedin, S. M. Kelly, A. F. Lee, A. Kornherr, *Carbohydrate Polymers* **114** (2014) 246-252
- [20] G. Balasundaram, M. Sato, T. J. Webster, *Biomaterials* **27** (2006) 2798-2805
- [21] W. Kern, J. L. Vossen (Eds), *Thin film processes II*, Academic Press (1991).