



INFORME PERIODO AGOSTO 2011 - AGOSTO 2012

1. APELLIDO..GARCIA.....
Nombre(s)..Mónica Teresita.....
Título(s) Licenciada en Biología (Orientación Zoología).
. Dirección Electrónica.. biofouling@cidepint.gov.ar.....

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría.... Técnico Asistente.....Mes....Octubre.....Año..1993.....
ACTUAL: Categoría..... Profesional Principal.....Mes...Diciembre...Año..2011.....

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

- a) Síntesis y caracterización de formulaciones de pinturas de bajo impacto ambiental (proyecto general del Centro. Subproyecto: Pinturas antiincrustantes de bajo impacto ambiental y estudios de "biofouling".
- b) Pinturas antiincrustantes amigables con el medio ambiente. PIP 2010 2012
- c) Control de las incrustaciones biológicas. PICT 25.321

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s)....DI SARLI, Alejandro Ramón.....
Cargo Institución....Director del CIDEPINT, Investigador Principal CICPBA.....
E-mail ardisarli@ciudad.com.ar

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución.Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT)...
Dependencia...CICPBA-CONICET-La Plata.....
Dirección: Av. 52 entre 121 y 122..... N °...s/n.....
Ciudad....La Plata.....C.P...1900.....Prov..Buenos Aires....Tel. (0221)483 1141/44.

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

Durante el período informado se continuó con el estudio de los métodos de control del “biofouling” marino.

7.1. TAREAS DE RUTINA DEL LABORATORIO

- Se realizaron muestreos en el Club de Motonáutica de la ciudad de Mar del Plata para extraer plancton (con red de plancton de 25 µm), coleccionar adultos de los organismos incrustantes más agresivos y agua de mar natural. En cada muestreo se registraron los parámetros abióticos (pH, temperatura, salinidad). Para mantener los organismos vivos, las muestras fueron enviadas al laboratorio en una conservadora con hielo.

En el laboratorio se llevó a cabo el mantenimiento y cultivo en agua de mar de los adultos de *Balanus amphitrite* (Cirripedia, Balanidae). Los cirripedios coleccionados fueron acondicionados en acuarios con agua de mar natural durante la primera semana y luego se pasaron a agua de mar artificial. Se los alimentó cada dos días con alimento para invertebrados y 150 mL de larvas de *Artemia salina*; una vez por semana se les renovó la mitad del agua y cada 15 días se los lavó con agua corriente y cepillo para eliminar los epibiontes. Los parámetros pH, salinidad, carbonatos, amonio, etc. fueron controlados y ajustados semanalmente. El agua de mar artificial y sus correspondientes soluciones stock fueron preparadas según Norma ASTM D-1141/75 (20-30 litros por semana). Las larvas de *A. salina* se cultivaron a partir de huevos de venta comercial Tetra^R. Periódicamente las masas ovígeras y las larvas liberadas por los cirripedios adultos fueron separadas y colocadas en cristalizadores con agua de mar artificial y alimento. Cuando los huevos alcanzaron la madurez se obtuvieron nauplii que luego de pasar por seis estadios se transformaron en cipris (último estadio larval). Las cipris se fijaron al sustrato y completaron su metamorfosis a juveniles.

A partir de las muestras de plancton se realizaron cultivos larvales separando bajo estereomicroscopio y microscopio óptico las nauplii y cipris de cirripedios y larvas de *Polydora ligni*. Estas larvas fueron controladas diariamente eliminándose las mudas y larvas muertas. Se les adicionó alimento y se renovó el agua de mar.

Tanto las larvas obtenidas a partir de la cría en el laboratorio como aquellas extraídas directamente del plancton fueron mantenidas en cámara de cultivo a temperatura constante y fotoperíodo controlado. De esta forma se dispone de un stock de larvas aclimatadas a las condiciones del laboratorio para ser utilizadas en los bioensayos con pigmentos antiincrustantes y/o pinturas.

- Los materiales empleados en los ensayos de laboratorio fueron esterilizados para evitar distorsiones en los resultados que pueden ser causadas por la presencia de microorganismos contaminantes. Los métodos de esterilización usados fueron: autoclavado a 121°C durante 20 minutos y calor seco en estufa a 160-170°C durante 60-120 minutos. Para el agua de mar artificial se utilizó el método de Tindalización para evitar la precipitación de sales que provoca el autoclavado.
- Se realizó la actualización bibliográfica referida a las temáticas específicas del Área Incrustaciones Biológicas del CIDEPINT: organismos del “fouling”, ecología de las comunidades incrustantes, cultivos, contaminación, estudios sobre sustancias

antiincrustantes alternativas no tóxicas, etc. Todas las publicaciones obtenidas han sido clasificadas y fichadas en el laboratorio.

7.2. BIOENSAYOS

.-Se continuó con la línea de investigación enfocada hacia la utilización de productos de origen natural. Se estudió en el mar la potencial actividad anti-incrustante del extracto etanólico de la esponja marina *Clathria microxa*. Esta especie se seleccionó debido a la ausencia de incrustaciones en la superficie del organismo y la presencia de complejos metabolitos secundarios. También se evaluó la actividad de dos subextractos polares de *Hyalis argentea* y *Nardophyllum bryoides*. La obtención de productos a partir de plantas abundantes en la naturaleza representan una fuente sustentable de nuevas sustancias bioactivas.

Para la preparación de las pinturas antiincrustantes con matriz soluble, la colofonia (resina) y ácido oleico (plastificante) se disolvieron en xileno / aguarrás (1:1% en peso) y se mezcló con una dispersora de alta velocidad. Luego, se cargó un molino de bolas con el vehículo seguido por óxido de zinc y carbonato de calcio que se dispersaron durante 24 h. Los extractos (0,8% v / v), se incorporaron a las pinturas y, a continuación, se dispersaron durante 1 h. Las pinturas se aplicaron con pincel sobre paneles de acrílico arenados de 40 mm x 120 mm previamente desengrasados con tolueno. Se aplicaron tres capas de pintura, dejando secar durante 24 h entre cada aplicación, lo que dio como resultado un espesor final de película seca de $150 \pm 5 \mu\text{m}$. Los paneles fueron colgados en el puerto de Mar del Plata a una profundidad de 50 cm por debajo de la línea de agua. Además, se utilizaron dos controles, uno de ellos con pintura sin extracto y, el segundo, paneles de acrílico arenados sin pintar. Mensualmente se retiraron series de paneles expuestos y se evaluaron en el laboratorio bajo estereomicroscopio y microscopio óptico determinando diversidad específica y porcentajes de cobertura de los organismos fijados.

Los resultados obtenidos después de tres meses de exposición en el mar demostraron que las pinturas a base de productos naturales tienen un marcado efecto inhibitor del "biofouling". Se registró una gran disminución de la densidad y la diversidad del micro y "macrofouling" en relación con los controles ($p < 0,05$, a través de ANOVA y prueba de contraste de Tukey).

.-En el marco del proyecto de cooperación con el INVEMAR (Santa Marta, Colombia), se evaluó el comportamiento de pinturas "antifouling" de matriz soluble a base de extractos de invertebrados marinos del Caribe Colombiano con el objeto de hallar formulaciones amigables con el medio ambiente con potencial aplicación en embarcaciones y otras estructuras sumergidas. Para ello se elaboraron extractos de las esponjas *Agelas tabulata*, *Myrmekioderma gyroderma*, *Oceanapia peltata*, *Aplysina lacunosa* y *Neopetrosia próxima* y del pepino de mar *Holoturia glaberrima*.

La extracción de los metabolitos presentes en los tejidos de los organismos seleccionados se realizó utilizando una mezcla metanol/diclorometano (1:1). Los extractos se fraccionaron usando agua desionizada y diclorometano (1:1), dejando decantar 24 h; para separar la fase inferior (fracción orgánica) y la fase superior (fracción acuosa). Con los extractos crudos, y las dos fracciones obtenidas se realizaron en el laboratorio test de toxicidad y de asentamiento sobre larvas nauplii y cipris de *B. amphitrite* a fin de determinar la dosis letal (Lt_{50}) y la concentración efectiva (Ec_{50}) luego de 24 y 48 h. Para los ensayos en el mar se utilizaron pinturas de matriz soluble a las que se incorporaron las fracciones orgánicas de los extractos. Se prepararon pinturas disolviendo resina colofonia y ácido oleico en una mezcla xileno/aguarrás mineral en una dispersora, se agregaron los pigmentos (óxido de

cinc y tiza) y se dispersaron durante 24 h. La pintura obtenida se filtró y fraccionó en siete porciones, una de ellas se utilizó como control negativo y a las restantes se le agregaron los extractos disueltos en la misma mezcla de solvente utilizada para la pintura. Las pinturas “antifouling” preparadas fueron aplicadas con pincel sobre paneles de acrílico arenados de 120mm x 40mm previamente desengrasados con tolueno. Se aplicaron cuatro capas de pintura con un tiempo de secado de 24 h entre ellas hasta obtener un espesor final de película seca de $75 \pm 5 \mu\text{m}$. Los paneles con cada pintura se dispusieron sobre bastidores de aluminio en series de seis y se sumergieron en los puertos de Mar del Plata y Santa Marta. El comportamiento de cada formulación se evaluó luego de 45 y 90 días. Los paneles se retiraron y observaron en el laboratorio. Se registró la abundancia para cada especie del macro y del “microfouling” y se estimaron porcentajes de cobertura. La fijación de organismos sobre los paneles expuestos en el mar en función del tiempo fue evaluada sobre el panel completo.

Los resultados obtenidos en el puerto de Mar del Plata demostraron que existen diferencias significativas en cuanto al porcentaje de cobertura total entre los paneles pintados y los controles ($p < 0,05$). Las diferencias básicamente se debieron al asentamiento de las algas *Enteromorpha intestinalis* y *Ectocarpus* sp. a las colonias del briozoo *Bugula* sp. y a los tubos arenosos del anfípodo *Corophium* sp. Las pinturas que presentaron mejor comportamiento antiincrustante tanto en Mar del Plata (Argentina) como en Santa Marta (Colombia) fueron las que contenían fracciones orgánicas de *A. tubulata*, *A. lacunosa*, *H. glaberrima*, *N. proxima* y *O. peltata*. Además, en Santa Marta la pintura con fracción orgánica de *Apyisina lacunosa* tuvo buen comportamiento. Por su parte la pintura con extracto de *M. gyroderma* no presentó efecto antifouling ya que la fijación registrada no difirió de los testigos.

Paralelamente se estudió la potencial actividad antiincrustante en ambas áreas de muestreo de tres compuestos sintéticos: eugenol, timol y guayacol.

Se prepararon pinturas con cada uno de los compuestos en estudio, se aplicaron sobre paneles de acrílico arenados y desengrasados de 8 cm x 12 cm hasta obtener un espesor final de película seca de $150 \pm 5 \mu\text{m}$. Luego de seis meses de inmersión en el mar se registraron los porcentajes de cobertura de los paneles para cada especie de micro y “macrofouling”. Para ello se utilizó una grilla seleccionando 25 puntos al azar. Las experiencias se realizaron por triplicado con testigos de acrílico y pintura sin el agregado de compuestos. Se aplicaron tests estadísticos evaluándose los resultados con ANOVA y test de contraste Tukey.

Los resultados obtenidos luego seis meses de inmersión en Mar del Plata demuestran que las pinturas formuladas a base de timol y de guayacol presentaron muy buenos resultados dado que disminuyeron la densidad y diversidad específica del micro y del “macrofouling”. Se observaron diferencias significativas con respecto a los controles en la fijación de ciertas diatomeas como *Achnanthes* sp., *Nitzschia longissima*, *Melosira* sp., *Lycmophora* sp. y algunos macroorganismos como *Enteromorpha intestinalis*, *Ectocarpus* sp., *Bugula* spp., *Ciona intestinalis* y *Botryllus* spp. Es importante destacar la ausencia de organismos con exoesqueleto calcáreo sobre los paneles pintados. Por otra parte, las pinturas conteniendo eugenol como pigmento antiincrustante no pudieron ser evaluadas dado que los bastidores se perdieron durante una tormenta.

En el puerto de Santa Marta los resultados obtenidos demostraron que las pinturas formuladas a base de guayacol y eugenol disminuyeron significativamente la densidad y diversidad específica del micro y del “macrofouling”.

8. OTRAS ACTIVIDADES

8.1.1 PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.

- .- 'Alteraciones en la composición química de pastas de cemento colonizadas por el mejillón dorado'. M. García, M. Pérez, S. Zicarelli, M. Stupak. Actas 2do. Congreso Iberoamericano y X Jornada Técnicas de Restauración y Conservación del Patrimonio. 2011. ISBN 978-987-26159-1-8
- .- 'Aditivo antiincrustante para la protección de hormigones sumergidos'. M. García, M. Stupak, L. Traversa, M. Pérez, G. Blustein. Actas 11º Congreso Binacional de Metalurgia y Materiales SAM/CONAMET, 2011. ISBN 987-27308-0-2
- .- Metabolitos secundarios del alga marina *Dictyota dichotoma* como inhibidores del asentamiento del mejillón de agua dulce *Limnoperna fortunei*'. M. Pérez, M. García, G. Siless, J. Palermo, M. Stupak. Actas XIV Congreso Latino-Americano de Ciencias do Mar (COLACMAR). 2011.
- .- Identificación y evaluación de sustancias de origen natural con potencial uso en pinturas para control de *biofouling*. Código colciencias: 2105-489-25143. Informe Final INVEMAR 1-154. Santa Marta, marzo de 2012.
- .- 'Aplicación de extractos naturales en pinturas antiincrustantes'. M. Pérez, M. García, G. Blustein, J. Palermo, L. Fernández, M. Sánchez, M. Stupak. Actas Tercer Congreso de Química de Productos Naturales Chileno-Argentino-Hispano, 2012.
- .- 'Pinturas antiincrustantes a base de extractos de invertebrados marinos del caribe colombiano'. Santos, J. Gómez León, M. García, M. Pérez, M. Stupak, G. Blustein. M. Pérez, M. García, G. Blustein, J. Palermo, L. Fernández, M. Sánchez, M. Stupak. Actas Tercer Congreso de Química de Productos Naturales Chileno-Argentino-Hispano, 2012.
- .- 'Preliminary results of three natural extracts for antifouling paints'. M. García, M. Pérez, M. Sánchez, G. Blustein, J. Palermo, M. Stupak. Proceedings 16th ICMCF. 2012.
- .- 'Nuevas tendencias para el control del biofouling por medio de alternativas no tóxicas'. M. Pérez, M. García, M. Stupak, G. Blustein, M. Santos, C. Puentes, K. Carreño. Actas Reunión Interdisciplinaria sobre Biofilms de la Provincia de Buenos Aires 2012. ISBN 978-950-34-0572-7

8.1.3 PRESENTACIONES EN CONGRESOS

- .- 2do. Congreso Iberoamericano y X Jornadas Técnicas de Restauración y Conservación del Patrimonio 'Alteraciones en la composición química de pastas de cemento colonizadas por el mejillón dorado'. M. García, M. Pérez, S. Zicarelli, M. Stupak. La Plata, Septiembre 2011.
- .- 11º Congreso Binacional de Metalurgia y Materiales SAM/CONAMET. 'Aditivo antiincrustante para la protección de hormigones sumergidos'. M. García, M. Stupak, L. Traversa, M. Pérez, G. Blustein. Rosario, Santa Fe, Octubre 2011.
- .- XIV Congreso Latino-Americano de Ciencias do Mar (COLACMAR). 'Metabolitos secundarios del alga marina *Dictyota dichotoma* como inhibidores del asentamiento del mejillón de agua dulce *Limnoperna fortunei*'. M. Pérez, M.

- García, G. Siless, J. Palermo, M. Stupak. Camboriú, Brasil, Octubre/Noviembre de 2011.
- .-Tercer Congreso de Química de Productos Naturales Chileno-Argentino-Hispano 'Aplicación de extractos naturales en pinturas antiincrustantes' M. Pérez, M. García, G. Blustein, J. Palermo, L. Fernández, M. Sánchez, M. Stupak. Punta Arenas, Chile, Abril 2012.
 - .-Tercer Congreso de Química de Productos Naturales Chileno-Argentino-Hispano. 'Pinturas antiincrustantes a base de extractos de invertebrados marinos del caribe colombiano'. Santos, J. Gómez León, M. García, M. Pérez, M. Stupak, G. Blustein. Punta Arenas, Chile, Abril 2012.
 - .-16th International Congress on Marine Corrosion and Fouling. 'Preliminary results of three natural extracts for antifouling paints'. M. García, M. Pérez, M. Sánchez, G. Blustein, J. Palermo, M. Stupak. Seattle, Estados Unidos, 24-28 Junio 2012.
 - .-Reunión Interdisciplinaria sobre Biofilms de la Provincia de Buenos Aires 2012. Nuevas tendencias para el control del biofouling por medio de alternativas no tóxicas'. M. Pérez, M. García, M. Stupak, G. Blustein, M. Santos, C. Puentes, K. Carreño. INIFTA, La Plata, Julio de 2012.

8.2 CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.

MUESTREOS

Mar del Plata entre los días:

11 y 12 de Octubre de 2011

12 y 13 de Diciembre de 2011

7 y 8 de Febrero de 2012

17 y 18 de Junio de 2012

Estos muestreos se llevaron a cabo con la finalidad de realizar las siguientes tareas:

- a) Extraer muestras de plancton y adultos de cirripedios en el Club de Motonáutica.
- b) Tomar medidas de pH, temperatura y salinidad.
- c) Sumergir y retirar muestreadores conteniendo pigmentos antifouling no contaminantes.