

2018/
2019

ANTIBACTERIANO

Desarrollo de superficies con propiedades antimicrobianas mediante la aplicación de acabados con propiedades biocidas de origen natural y medioambientalmente sostenibles

Nº Expte: IMDEEA/2018/61

Programa: PROYECTOS DE I+D EN COOPERACIÓN CON EMPRESAS

Breve descripción

Se ha recopilado en el presente informe las actividades realizadas y los resultados obtenidos durante el primer año de desarrollo del proyecto ANTIBACTERIANO con el fin de informar a todos los medios posibles y a las empresas.

Realizado por:
AIDIMME



GENERALITAT
VALENCIANA

iVACE
INSTITUTO VALENCIANO DE
COMPETITIVIDAD EMPRESARIAL



UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo de
Desarrollo Regional

Una manera de hacer Europa

AIDIMME
2018/2019



ANTIBACTERIANO

Durante la primera anualidad del proyecto se ha iniciado y finalizado el paquete de trabajo 1 (tareas 1.1 y 1.2), además de las tareas 2.1 y 2.2 del paquete de trabajo 2. Asimismo, ha sido iniciado el paquete de trabajo 3 con sus correspondientes tareas (3.1, 3.2, 3.3), y la tarea 2.3, que, según lo previsto, continúan en ejecución. A continuación se describen las tareas realizadas.



ANTIBACTERIANO

PAQUETE DE TRABAJO 1.- ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES ACTUALMENTE DISPONIBLES

En este paquete de trabajo se ha identificado el punto de partida y bases del estudio para proporcionar las superficies, sustratos o tratamientos antimicrobianos existentes y aplicables con la intención de solventar la problemática en materiales de diferentes ámbitos ante la proliferación de microorganismos indeseables, causantes de infecciones y problemas toxicológicos.

A la luz de la búsqueda bibliográfica y comercial, se han seleccionado aquellas superficies con acción biocida más adecuadas a los propósitos y aplicaciones del proyecto. Estos productos han sido evaluados, desde el punto de vista de sus propiedades antimicrobianas, con la finalidad de caracterizar los materiales disponibles, conocer la naturaleza química del biocida y evaluar su efectividad.

Tarea 1.1.- Búsqueda bibliográfica de las superficies antimicrobianas actualmente disponibles.

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica sobre superficies antimicrobianas existentes o emergentes en el mercado y en el ámbito de la investigación, con el objeto de reunir y seleccionar las características apropiadas para su aplicación en los sectores de interés del proyecto. Se ha enfocado el estado del arte en superficies cerámicas, de madera, de metal, de resinas y poliméricas para su uso en diferentes ámbitos como pueden ser viviendas, hospitales, restauración, etc. Además, se reúne una lista de productos comerciales disponibles que son calificados por los fabricantes como superficies/acabados antimicrobianos. Por último, de entre estos materiales, se adquieren una serie de productos que son ensayados en el laboratorio AIDIMME para evaluar sus propiedades antimicrobianas.

Es cierto que la terminología antimicrobiana suscita un uso a veces inadecuado. En general, existen dos grandes estrategias para alcanzar una resistencia microbiana en las superficies de productos acabados:

- Liberar sustancias biocidas, o bien que por contacto con sustancias, maten las bacterias y las elimina de la superficie
- Inhibir el crecimiento de las bacterias para prevenir su adhesión a la superficie

La proliferación de microorganismos en las superficies, llamada biofilm, es un problema que puede llegar a afectar a la durabilidad de los materiales y puede aumentar las infecciones toxicológicas. Se define como biofilm a la estructura colectiva de microorganismos adheridos a superficies, tanto vivas como inertes, revestidas por una capa protectora polimérica segregada por los propios microorganismos, o un conjunto de células microbianas asociadas a una superficie envueltos en una matriz de un material polisacárido primario. Las bacterias que confieren un biofilm son más resistentes a biocidas y soportan mayores cargas de productos antimicrobianos.

ANTIBACTERIANO

Las sustancias biocidas, según la directiva europea 98/8/CE de comercialización de biocidas, pueden ser compuestos químicos y microorganismos, destinados a eliminar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos.

Los agentes antimicrobianos son sustancias de origen natural, semisintético o sintético que en concentraciones in vivo mata microorganismos o inhibe su crecimiento al interactuar con un objeto específico. Los antimicrobianos con actividad antibacteriana se denominan agentes antibacterianos.

Según estos conceptos se pueden distinguir las superficies según los tratamientos que tienen como objeto eliminar los microorganismos patógenos o bien exclusivamente inhibir su crecimiento mediante el denominado biofilm. De ahí que las superficies se traten con agentes antimicrobianos, donde cabe destacar los recubrimientos metálicos (plata, cobre etc.), recubrimientos por biocidas sintéticos (triclosan, amonio cuaternario etc.), y como métodos alternativos se encuentran los extractos naturales, la alteración de la topografía o el uso de nanopartículas y TiO_2 activado con luz UV.

Como se ha visto, la adherencia de las bacterias y su proliferación en superficies de distintos materiales, depende de diversos factores, donde se puede distinguir:

- Las condiciones ambientales (pH, sales minerales, presencia de proteínas, biocidas...)
- Las características del material (rugosidad, hidrofobicidad, agentes funcionales en la superficie)
- Los microorganismos que intervienen en la adhesión y supervivencia.

En especial, el uso de sustancias activas biocidas es el más estudiado y evaluado. Dentro de estas se encuentran las especies reactivas basadas en Oxígeno (ROS) que poseen una gran capacidad oxidante, atacan con virulencia las enzimas y proteínas citoplasmáticas, que provocan daños en el ADN de la bacteria. Dentro de estas especies se incluyen los óxidos metálicos, o metales como la plata y el cobre.

SUPERFICIES ANTIBACTERIANAS EN MADERA

De entre las superficies antibacterianas en madera que se encuentran descritas en bibliografía se puede encontrar los recubrimientos con metales y óxidos de metales.

En este tipo de recubrimiento se encuentra la **plata** como metal más utilizado para combatir las infecciones bacterianas, con mayor efectividad y su uso ya está comercializado.

Muestra de ello sería National Furniture, una empresa que fabrica muebles utilizando la tecnología de AgION technologies. En sus líneas de muebles las superficies son capaces de liberar iones plata para inhibir el crecimiento de moho, hongos y bacterias que pueden causar malos olores y manchas. También se ha evaluado con éxito la capacidad bactericida de una suspensión coloidal de plata sobre microorganismos encontrados en los muebles de museos y archivos, que son los responsables del deterioro de las piezas encontradas en estos lugares.

ANTIBACTERIANO

Por otra parte, el **cobre** también es utilizado como agente antibacteriano y se ha demostrado científicamente que bacterias muy resistentes, no han sobrevivido a su contacto. Hay diversas teorías sobre su mecanismo de acción. En el caso de nanopartículas de óxido de cobre CuO, una posible explicación a la inhibición bacteriana podría ser la interacción directa que se estaría dando con la superficie de la membrana externa de la bacteria. En este contexto, estudios realizados con óxidos metálicos sugieren que la actividad antimicrobiana estaría dándose por las especies reactivas del oxígeno producidas por la presencia de estos óxidos. Allí, las especies de oxígeno estarían interactuando con la membrana celular de la bacteria y permitiendo el ingreso de las nanopartículas a la célula. Otros estudios realizados observaron que el efecto antimicrobiano de estas nanopartículas aumenta con la concentración utilizada, por lo que probablemente esta inhibición se deba al aumento de interrupciones generadas por las nanopartículas de CuO en la superficie de la membrana de la célula generando así, un mal funcionamiento de los componentes de la célula tales como el ADN, lípidos, peptidoglicanos y proteínas (Malecki *et al.*, 2014 y Azam *et al.* 2012).

En la figura se puede observar un pequeño esquema de como actuaría los grupos radicales para la disrupción de la pared celular, inhibir la replicación del ADN, la desnaturalización de la proteína, interrumpiría el transporte de electrones y provocaría la muerte de la bacteria. El mecanismo genérico, tanto para óxidos metálicos así como para iones metálicos, se plantea a continuación.

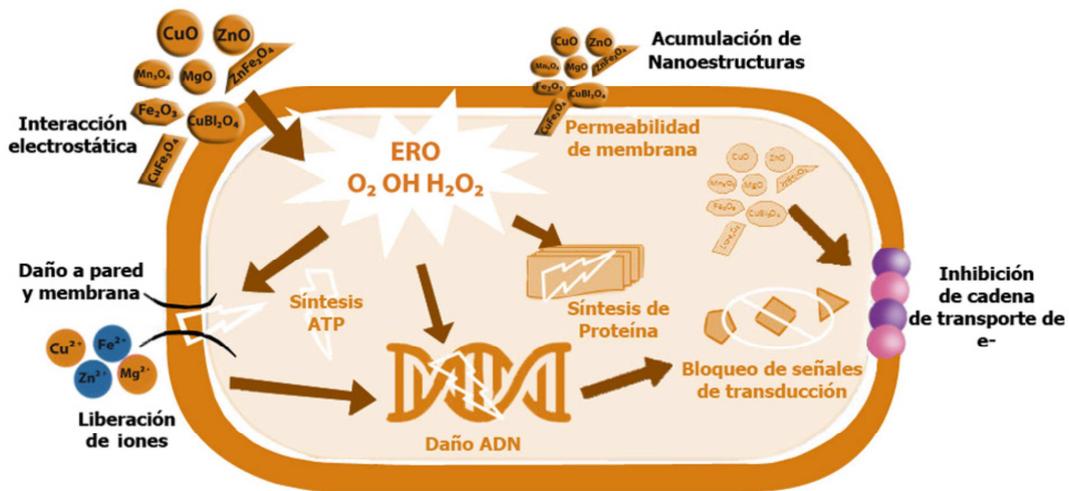


Figura 1. Mecanismo de actuación de las nanopartículas de óxidos metálicos con respecto al efecto antibacteriano. Fuente: Vázquez-Olmos, América & Vega-Jiménez, Alejandro & Paz-Díaz, Blanca. (2018). *Mechanosynthesis and antimicrobial effect of nanostructured metal oxides. Mundo Nano.*

Muchos investigadores afirman que el mecanismo esencial para la citotoxicidad que generan las nanopartículas es la liberación de iones Cu²⁺ que reaccionan con los grupos tiol (SH) de las proteínas presentes en la superficie de la membrana de la célula bacteriana. Estas proteínas sobresalen de la membrana celular, permitiendo el transporte de nutrientes a través de la pared celular. Las nanopartículas estarían inactivando estas proteínas, reduciendo la permeabilidad de la membrana y llevando a la célula a la muerte.

ANTIBACTERIANO

Además, el cobre puede ser micronizado por dispersión y molienda de los compuestos de cobre usando un molino o cualquier otro producto químico, medios físicos o mecánicos, estando disponible comercialmente. Estos productos, que generalmente necesita ser previamente aún más molido, pueden ser útiles para protección de la madera. Al ser dispersados en agua, con o sin adición de un aditivo reológico (tal como un derivado de celulosa), para formar una suspensión, se pueden adicionar con un biocida para formar un sistema de protección (siendo adecuada para tratar y proteger la madera de agentes causantes de la degradación).

El uso de los micronizados de cobre ha generado cierta controversia por cuestiones de salud y seguridad, por ello han salido alternativas en el mercado, que plantean nuevas ventajas que emplean el Cobre Micronizado Cuaternario, MCQ, y Azoles de Cobre Micronizado, MCA, quedando totalmente retirado los tratamientos con CCA arseniato de cobre cromado de los mercados,

Asimismo, existe un amplio rango de **extractos naturales** provenientes de plantas, como aceites esenciales, compuestos fenólicos e isotiocianatos que poseen un efecto antibacteriano considerable que es objeto de estudio en la actualidad. Sin embargo hay un importante escollo que salvar y es la estabilidad de estos extractos en la superficie como es la madera. El principal problema es que no están químicamente unidos a la superficie y se lixivian desde las capas externas de la madera. A pesar de ello hay métodos físicos y químicos para el tratamiento de la madera, como el *grafting* enzimático (Schubert *et al.*, 2012), que representa una alternativa sostenible con el medio ambiente y permite un enlace covalente creando radicales reactivos en la superficie.

En la literatura el *biografting* por medio de lacas de compuestos fenólicos esta postulado como un método eficiente para evitar la lixiviación de los compuestos fenólicos y unirlos con los sustratos lignocelulosicos sin perder su eficacia (Elegir *et al.*, 2008)

Tanto los compuestos fenólicos como la lignocelulosa producirían radicales libres en contacto con el oxígeno atmosférico y se unirían mediante un enlace covalente.

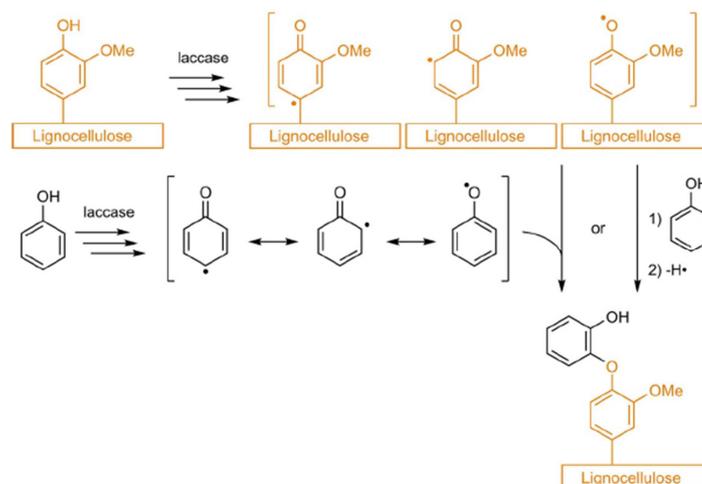


Figura 2 –Interacción de un compuesto fenólico con la lignocelulosa. Imagen obtenida de Slagman *et a* 2018./

ANTIBACTERIANO

Como se puede observar la ligninocelulosa perdería un hidrogeno y se formaría un radical, esta reacción es llevada a cabo con lacasa como el catalizador y la ligninocelulosa obtendrá distintas estructuras de resonancia al igual que el compuesto fenólico, que más tarde reaccionará con la ligninocelulosa para formar el enlace covalente.

Otras estrategias dentro de las sustancias activas biocidas incluyen aquellas que inhiben el ácido nucleico y la síntesis de proteínas. Estas sustancias pueden anclarse a las moléculas de ADN y ARN inhibiendo los procesos de síntesis enzimática. Por ejemplo, la indolicidina, o la polihexametilenbiguanida (PHMB). Para el caso de la PHMB se ha encontrado un artículo en el que se aplican para laminados HPL que fue incorporada en la matriz de una resina melanina-formaldehído en la capa exterior del laminado para proveerla de propiedades antimicrobianas. Los tests de evaluación antimicrobiana fueron llevados a cabo en los laminados de HPL correspondientes dopados con PHMB contra la bacteria gram-positiva *Listeria innocua* y la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*. Los resultados revelaron que los laminados preparados con un 1 % en peso de PHMB en la resina de formaldehído eran bacteriostáticos, mientras que los que se prepararon con un 2,4 % en PHMB en la resina de melanina-formaldehído exhibieron actividad bactericida.

Otro método ha sido la utilización de **óxidos de amina** como surfactantes los cuales tienen un gran potencial como conservante para la protección de la madera. Tienen una gran ventaja y es que son solubles en agua, y forman complejos en los lugares ácidos de la madera para fijarse y eso debería dar una buena estabilidad. Además al ser surfactante pueden utilizarse para desarrollar emulsiones de agua y aceite para la formulación de biocidas orgánicos.

Busan 30 ((2-tiocianometiltio) benzotiazol TCMTB) es un biocida orgánico con un amplio rango de actividad para el decaimiento de hongos e insectos en la madera, y es fácilmente soluble en disolventes hidrocarbonados y posee resistencia a la lixiviación.

El **clorotanilil** (2,4,5,6-tetracloroisofaltonitrilo) es un biocida orgánico con una muy baja toxicidad para los mamíferos, y una amplia actividad de decaimiento para hongos e insectos, relativamente bajo coste, y una buena estabilidad y resistencia a la lixiviación en la madera.

La primera generación de conservantes de la madera fueron los **creosotados** (aceite espeso, viscoso y cáustico que se obtiene por destilación de la madera, el alquitrán, etc., y se emplearon como antisépticos, para preservar de la putrefacción, para proteger la madera y en procesos metalúrgicos) y después vino el **pentaclorofenol**. Estos dos sistemas dejan a la madera tratada con un olor a aceite y un residuo visible superficial que es aceptable para aplicaciones industriales exteriores y de hecho es esencialmente su único mercado, y el petróleo transportado para el pentaclorofenol provee protección adicional contra los organismos que destruyen la madera.

SUPERFICIES ANTIBACTERIANAS METÁLICAS

Las superficies metálicas inmersas en la naturaleza o en aguas industriales se someten a un cambio en la secuencia biológica e inorgánica que puede acabar en biocorrosión debido a la formación del biofilm.

ANTIBACTERIANO

Según la búsqueda bibliográfica, los tratamientos antimicrobianos más usados en superficies metálicas son la impregnación de biocidas tradicionales como puede ser el glutaraldehído o más recientemente las sales de amonio cuaternario.

El **glutaraldehído** provee de una gran eficacia, es fácilmente biodegradable y libre de formaldehído, no es cancerígeno, no persiste y no es bioacumulativo, el cual se distingue de otros biocidas. Esta versatilidad microbiocida ofrece toda una serie de ventajas para el control microbiano.

El glutaraldehído es eficaz en un amplio rango de microbios, incluidas en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, *Legionella* spp., bacterias sulfato-reductoras, levaduras y mohos, virus y esporas. Es una molécula con 5 carbonos con dos grupos aldehídos funcionales que son altamente reactivas hacia las aminas, oxidándolas con la correspondiente pérdida de hidrógenos. Las aminas comúnmente se pueden encontrar en las superficies de las proteínas y células de los microbios. Cuando el glutaraldehído entra en contacto con estas entidades biológicas, químicamente modifica o se produce un entrecruzamiento. Esto inactiva las proteínas e inmoviliza las células, y como resultado se produce la muerte del microbio.

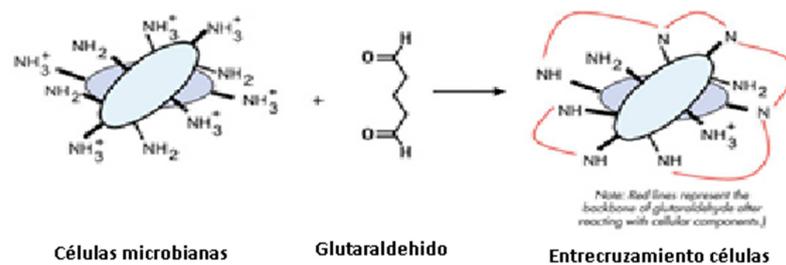


Figura 3 – Entrecruzamiento del Glutaraldehído con el microbio. Fuente ASI Industry.

Las sales de amonio cuaternarias consisten en una parte catiónica con un átomo central que es el nitrógeno, con cuatro enlaces C-N, y esto nos da una gran versatilidad de productos. La parte aniónica que es usualmente una clorina o una bromina está enlazada con el nitrógeno para formar una sal de amonio cuaternaria. Las sales de amonio cuaternarias se clasifican en la naturaleza de los grupos alquilo, los cuales incluyen el número de átomos de nitrógeno, derivados de la cadena del carbono, y la presencia de grupos aromáticos. Estas variaciones pueden afectar a la actividad antimicrobiana de la sal en términos de dosis y acción frente a diferentes grupos de microorganismos. La longitud de las cadenas puede afectar considerablemente la actividad antimicrobiana. Los grupos metilo de una longitud de entre 12 y 16 carbonos usualmente muestran la mayor actividad antimicrobiana (Gerba *et al.*, 2015)

Las sales cuaternarias de amonio son agentes de membrana activos que interactúan con la membrana citoplasmática de la bacteria y con la membrana de plasma de la levadura. Su actividad hidrofóbica hace también que sea efectiva contra los lípidos que contienen virus.

La parte hidrofoba penetra en las membranas, mientras que el grupo polar catiónico se asocia con los fosfatos de los fosfolípidos, provocando alteraciones en dichas membranas, reflejadas en la pérdida de su semipermeabilidad, con salida de metabolitos de N y P desde el citosol. Es entonces cuando el surfactante puede entrar al interior celular, y produce como efecto secundario la desnaturalización de las proteínas. Su actividad se mejora a pH alcalino.

ANTIBACTERIANO

McDonnell *et al.* (2007) propuso una secuencia de eventos en la acción de los compuestos de amonio cuaternario frente a los microorganismos:

- 1.- Adsorción y penetración hacia la pared celular.
- 2.- Reacción de la membrana citoplasmática lipídica o proteica, seguida de una desorganización de la membrana.
- 3.- Fuga del material intracelular de menor masa.
- 4.- Degradación de las proteínas y ácidos nucleicos y
- 5.- Rotura de la pared celular causada por enzimas autolíticos.

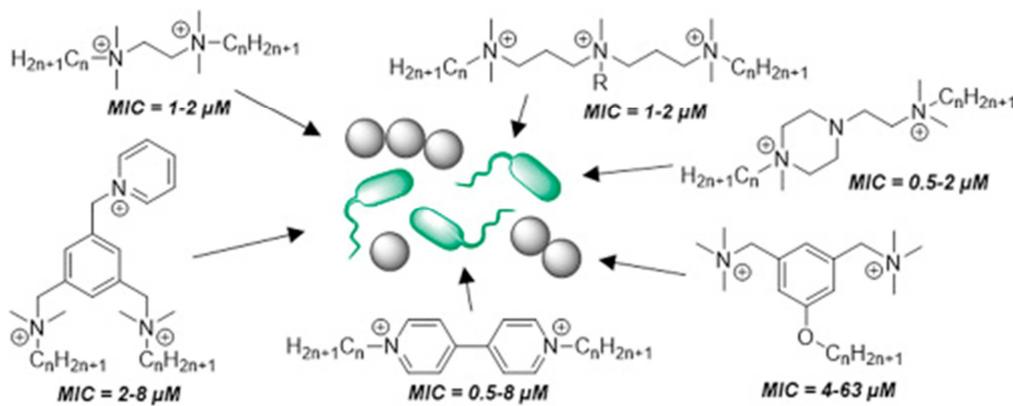


Figura 4 – Ejemplos de sales cuaternarias de amonio que actúan sobre las bacterias.

En el artículo Thebault *et al.* (2009) utilizaron partículas de amonio cuaternario para obtener una superficie metálica antimicrobiana. Esta estrategia se puede resumir en la figura que aparece a continuación. Primero y más importante fue necesario demostrar que las moléculas que poseen una función tiol en una posición terminal o un grupo disulfuro en su estructura y un grupo de amonio cuaternario en el otro extremo son capaces de graftear en una superficie metálica y darle una buena calidad a la superficie autoensamblada.

En un trabajo reciente, mostraron que los tioles y los disulfuros que poseen amonio cuaternario en su estructura pueden absorber en la superficie de oro limpio y formar capas de autoensamblado proveyendo de que el espacio del hidrocarburo en el nitrógeno cargado y el átomo de sulfuro cargado es lo suficientemente largo para minimizar las interacciones repulsivas entre los grupos cargados cuando la estructura esta ya grafteada.

ANTIBACTERIANO

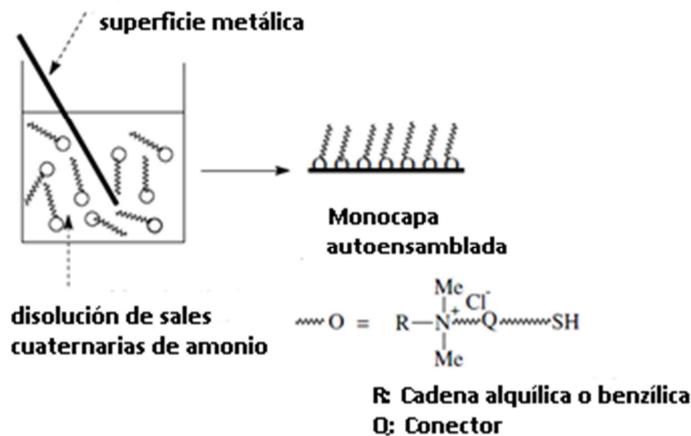


Figura 5 –Esquema de la formación de una superficie metálica auto bactericida por medio de la formación de sales cuaternarias de amonio con tioles funcionalizados, Thebault *et al.*, 2009.

SUPERFICIES ANTIBACTERIANAS CERAMICAS Y DE PORCELANA

En el proceso de fabricación de superficies cerámicas/porcelana, se incluyen una serie de aditivos, según búsqueda bibliográfica, que le confieren al producto final acabado unas propiedades antimicrobianas. Debido a la técnica de producción de azulejos tanto de porcelana como cerámicos, en el que intervienen temperaturas muy elevadas, el método para crear una última capa resistente a los microorganismos es a través del uso de aditivos, compatibles con el esmaltado, que liberen agentes antimicrobianos. De entre estos, los más relevantes son el uso de TiO₂ fotocatalíticamente activado, los iones de plata y otros óxidos metálicos que interfieren en las paredes celulares de los microorganismos

El TiO₂ en forma cristalina tiene propiedades fotocatalítica, de los cuales existen tres tipos. De estos, la anatasa y rutilo tienen una estructura tetragonal y son más comunes y estudiados, mientras que la brookita es ortorrómbica. Las propiedades fotocatalítica y desinfectantes del TiO₂ para recubrimientos de superficie son ampliamente conocidas. El dióxido de titanio ha sido aplicado en materiales de construcción y pinturas para eliminar las bacterias ambientales y otros compuestos nocivos en el aire y agua, ya que puede ser activado fotocatalíticamente a través de la luz ultravioleta solar o eléctrica. Pero su actividad se ve influenciada por diversos factores como la estructura cristalina (rutilo/anatasa), el área superficial, la distribución de las nanopartículas, la porosidad y el número y densidad de grupos hidroxilos en la superficie del TiO₂.

A continuación se detalla el mecanismo de la actividad fotocatalítica y antimicrobiana del TiO₂, ampliamente estudiada, Betancur *et al.* (2016) con el apoyo de la figura.

La actividad fotocatalítica se inicia con la excitación de una partícula semiconductor por rayos UV (paso 1), una vez llegado a este punto se crean los pares electrón-hueco cuyo promedio de vida está en el rango de los picosegundos (paso 2). En este lapso de tiempo las partículas deben migrar a la superficie y generar radicales libres muy reactivos que reaccionan con las especies de alrededor mediante procesos de oxidación-reducción (paso 3), rompiéndose

ANTIBACTERIANO

algunos enlaces moleculares y reduciéndolas u oxidándolas hasta convertirlas en especies menos complejas. Los pares electrón hueco que no alcanzan a separarse y a reaccionar con especies en la superficie se recombinan y la energía se disipa.

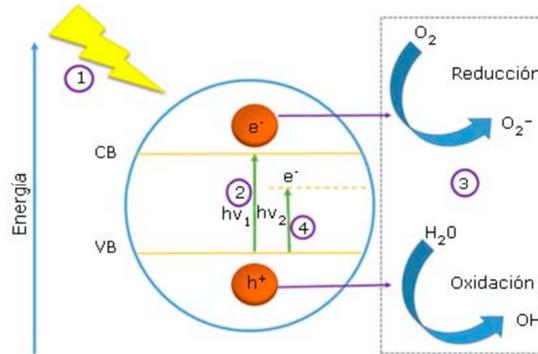


Figura 6 – Actividad fotocatalítica de TiO₂, Betancur *et al.*, 2016.

Estudios recientes se basan en que las especies potenciales reactivas de oxígeno (ROS) que se generan en la superficie del TiO₂ durante su actividad fotocatalítica, al estar próximas a las células bacterianas las destruye fácilmente, pues el TiO₂ es capaz de causar peroxidación de los fosfolípidos de la membrana de las células, e interrumpe así su respiración celular.

En la figura siguiente se puede observar el ataque prolongado de las especies reactivas del oxígeno ocasiona el daño de la pared celular, posteriormente de la membrana citoplasmática y finaliza con el ataque directo de los componentes intracelulares. Dado la complejidad de los microorganismos los mecanismos por los cuales el TiO₂ produce la muerte de la bacteria no están claros pero sí que se ha llegado al consenso de lo observado en la siguiente figura.

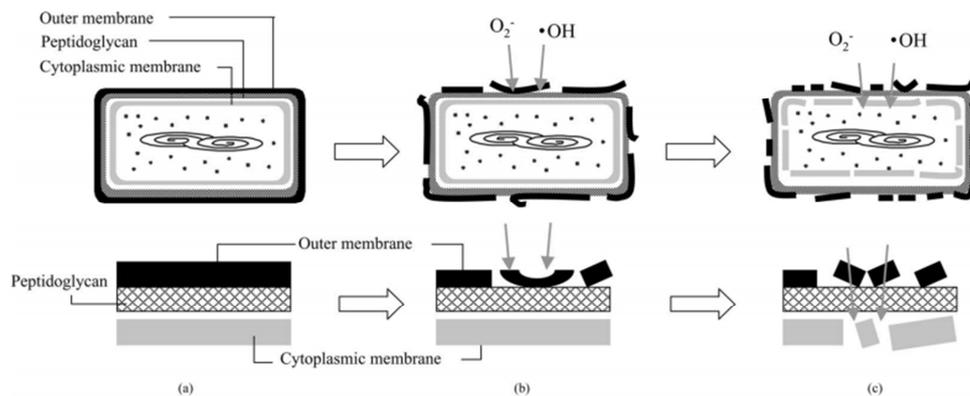


Figura 7 – Actuación de las especies reactivas de oxígeno, Sunada *et al.*, 2002.

Debido al gran potencial de esta sustancia, su aplicación en cerámicas y otros esmaltados ha sido ampliamente investigada. En la publicación de Hasmaliza *et al.* (2016) se ha estudiado dos métodos para obtener una superficie multifuncional de azulejos cerámicos utilizando dióxido de titanio con las tecnologías tanto de solución salina como sol-gel. En este estudio se ha utilizado la anatasa como agente con la capacidad denominada “auto-limpieza” en azulejos de porcelana. En particular se ha utilizado nanopartículas de TiO₂ para aumentar el área superficial de contacto a distintas concentraciones y tamaño de partícula. Los experimentos

ANTIBACTERIANO

constituyeron en adicionar anatasa mezclada en el esmaltado y aplicado en la cerámica por el método de revestimiento por inmersión. Se utilizó polvo de anatasa en escala de dimensiones micrométrica (5%, 10% y 15%) y 10% de nanomaterial. Se caracterizaron las muestras por apariencia física, SEM análisis y test antibacteriano. Se realiza el análisis antimicrobiano con el método de recuento de colonias *E. coli*. Las investigaciones apuntan a que las propiedades antibacterianas mejoran al aplicar TiO₂.

Por otra parte, la adición de sustancias que contienen **plata** junta a otras refractarias formadas por arcillas ha sido ampliamente estudiada en el proceso de fabricación de superficies cerámicas., por ejemplo en la patente que presentan los inventores japoneses Oku *et al.* (1995). En la ponencia de Noguera *et al.* (2010) donde se discute la utilización tanto de nanopartícula de plata y una proteína actuando de estabilizante, así como Ag⁺ en un soporte de caolín. La aplicación se realiza en una o dos capas uniformes en la superficie de un esmaltado previo antes de introducirlo a la cocción final.

Por otra parte, en la publicación de Yoshida *et al.* (2010) se estudia también las actividades antimicrobianas de los esmaltados de porcelana con agentes antimicrobianos de arcillas (montmorillonita) intercalados con quelatos de plata y el efecto de estos aditivos en dichas actividades. Se adiciona 10% en masa de los agentes antimicrobianos. El azulejo esmaltado con un agente microbiano dopado de Zirconia favoreció el comportamiento sinérgico, incluso a las más bajas concentraciones de adición de plata.

El mecanismo del proceso biocida de estos productos se base en la liberación paulatina de los iones de plata en las superficies cerámicas/porcelana y su interacción en las paredes celulares de las bacterias (descrito arriba).

Por último, también se investiga el uso de otros óxidos metálicos como puede ser el ZnO, Al₂O₃ y el pigmento negro cerámico (Fe₂O₃-Cr₂O₃). Estos son pulverizados por *jet-spraying* y se utilizan unas temperaturas de cocción por debajo de lo usual.

SUPERFICIES ANTIBACTERIANAS EN RESINAS Y POLIMÉRICOS

Una de las formas más comunes de obtener superficies antimicrobianas en resinas y poliméricos es la adición de conocidos **biocidas** en la fabricación del producto. Esta tecnología incluye los biocidas tradicionales como pueden ser la plata (Ag⁺), el Triclosan y el amonio cuaternario. Marcas registradas como Biocote y Microban ya comercializan estos productos como aditivos para cualquier superficie y sus métodos están patentados.

Además, se ha abierto un gran campo de investigación donde se utilizan recubrimientos poliméricos que, de manera gradual, van liberando antibióticos y antisépticos en distintas superficies. En el caso de los composites dentales, por ejemplo, se utiliza en resinas acrílicas la clorhexidina (antiséptico oral). Otro de los métodos es utilizando una película de sol-gel que se degrada muy poco a poco y que con ello deja escapar las sustancias biocidas, Pusateri *et al.* (2009).

Una de las posibles técnicas de aplicación para los recubrimientos antimicrobianos de superficies es el uso de **nanopartículas de diversos óxidos metálicos**. Entre ellos se encuentra el TiO₂ con actividad fotocatalítica así como el ZnO o el CuO. En artículo de Yemmireddy *et al.*

ANTIBACTERIANO

(2017), se presenta las maneras de obtener recubrimientos a base de estas nanopartículas capaces de anclarse en las superficies de distintos materiales para ser liberados gradualmente. En general, los métodos utilizados son físicos (sputtering, deposición por plasma), químicos (sol-gel, aditivación en la mezcla) y electroquímicas (deposición electroforética, etc.).

Recientemente, **los cationes poliméricos** han sido caso de estudio como sustancias antimicrobiana ya que son químicamente estable, no volátiles y no penetran en la piel animal, pero son capaces de enlazar con las proteínas en las membranas de las células de microorganismos. Pueden ser de origen natural o sintético como se va a detallar en los siguientes apartados:

- La polietilenimina, PEI, se ha utilizado debido a su disponibilidad comercial pero su viabilidad clínica es baja ya que tiene poca biocompatibilidad, no es biodegradable. Se modifica con diversos agentes que mejoran su capacidad antibacteriana (inmovilización hidrofóbica del PEI) en superficies vítreas o de PE sumergida en solución PEI-modificada, (Schaer *et al.* 2012).
- El poliuretano se ha combinado con amonio cuaternario para evaluar las propiedades antibacterianas de las resinas y los resultados son prometedores. Además del uso de las siliconas, las resinas basadas en polímeros acrílicos con poliacrilamidas y enlaces amidic acrilicamyda se ha utilizado como recubrimiento para superficies, (Cringus-Fundeanu *et al.*, 2007)
- Se adiciona el polímero PTBAEMA (Poly (2-tert-butylaminoethyl) methacrylate), un polímero policatiónicos, a la resina acrílica dental. Este compuesto, que tiene grupos amino que actúan como eficaces biocidas de contacto, tiene una baja solubilidad en agua por lo que es especialmente interesante para su aplicación en superficies que van a estar en contacto con agua.
- Zhao J. *et al.* (2016), desarrollaron polímeros catiónicos acrílicos como el poli-DMAEMA (N,N- dimetilaminoetil metacrilato) para comprobar la eficiencia biocida en recubrimientos de superficies, sintetizando PDAEMA cuaternario con PEG dimetracrilato
- Como catión polimérico de origen natural se plantea el uso del quitosán (recurso frecuente en envases alimenticios biodegradables debido a que se puede aplicar como una fina capa superficial). El quitosán es un polisacárido derivado de recursos naturales renovables y compostados. Forma hidrogeles o se mezcla con polímeros, sus propiedades antimicrobianas se deben a sus grupos amina cargados positivamente, (Entsar *et al.*, 2003), ya que desplaza el Ca^{++} de las zonas iónicas de la membrana, resultando en la destrucción de la misma, además de poseer un potente efecto antiplaca en patógenos bucales (Husain *et al.*, 2003). Además, el quitosán ha sido modificado incorporando amonio cuaternario o por grafting para hacerlo aún más efectivo desde el punto de vista antimicrobiano (Mourya *et al.*, 2009). Se puede funcionalizar químicamente usando los siguientes compuestos que se muestran en la imagen: cuaternizarlo N, N, N trimetil quitosán (A), uniones PEG solubles en agua (B), con glicol que contienen grupos cortos de etilen glicol(C), quitosán reticulado obtenido por grafting de ácido metacrílico y ácido láctico (D), modificarlo con cloruro de amonio trimetil glicidil (E) según lo propuesto en Husain *et al.* (2003).

OTRAS TÉCNICAS DE ALTERACIÓN DE SUPERFICIES CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS

La acción de las superficies antibacterianas se puede agrupar en tres categorías distintas:

- Superficies resistentes al anclaje de bacterias (repelentes, antiadherentes, antibiofilm)
- Superficies tratadas que liberan agentes antibacterianos (suministro de biocidas)
- Superficies que, en contacto con estas, matan a las bacterias (biocida por contacto)

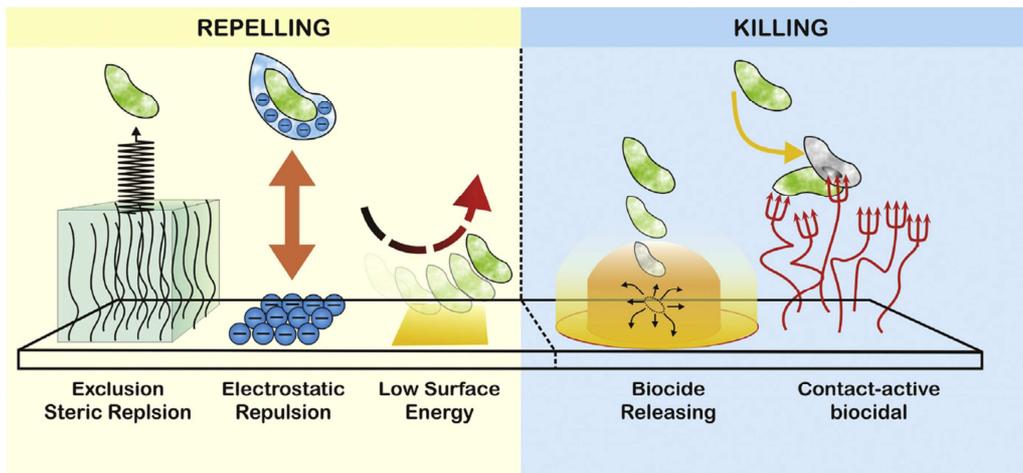


Figura 8. Efecto de las superficies resistentes a la adherencia y crecimiento de microorganismos. Fuente: Tiwari, Handbook of antimicrobial Coatings, 2017.

Una de las estrategias que se está persiguiendo es que antes de que se forme el biofilm, crear una superficie que haga prácticamente imposible la adhesión bacteriana, ya que existe el riesgo de que se produzca la resistencia bacteriana provocada por antibióticos o desinfectantes una vez se haya formado el biofilm.

Dentro de las diferentes estrategias se puede diferenciar en tres tipos:

1. Inhibición de la adhesión bacteriana a la superficie y la colonización.
2. Interferencia de las señales de las moléculas entre sí para que no formen el biofilm.
3. Y por último, la desagregación del biofilm.

La topografía alterada estaría en el primer tipo y es muy importante el estudio de cuáles son las características idóneas del material, para que las bacterias tengan una mayor dificultad a la hora de adherirse a la superficie.

Los factores de la superficie que pueden afectar la adhesión bacteriana pueden ser: la energía libre superficial, la superhidrofobicidad, la carga electrostática y la rugosidad

Para lograr una superficie anti-adhesiva se ha de atender a las siguientes técnicas de alteración de superficies, así como la adición de agentes modificantes de las superficies, como pueden ser el uso de PDMS (polidimetilsiloxano) y fluorocarbonos, para obtener superficies superhidrofóbicas.

ANTIBACTERIANO

En la figura se muestra una lista con las técnicas disponibles y aplicables a superficies para obtener propiedades antibacterianas.

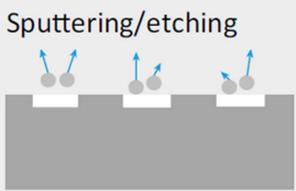
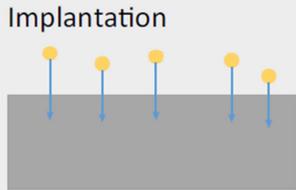
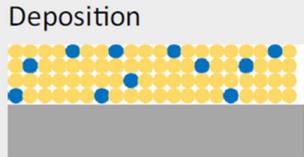
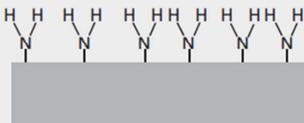
Plasma Processes	Uses for Antibacterial Surfaces
<p>Sputtering/etching</p> 	<p>Surface cleaning Adhesion optimization Nanopatterning Nanostructuring</p>
<p>Implantation</p> 	<p>Introduction of different elements into the materials, providing control over:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bioactive properties • Corrosion resistance • Mechanical properties <p>Crosslinking and densification of polymers</p>
<p>Deposition</p> 	<p>Thin-film coatings with AB properties Reservoir or platform for AB compounds Diffusion barrier coatings</p>
<p>Functionalization</p> 	<p>Surface activation Surface amination Formation of polar groups Immobilization of molecules</p>

Figura 9. Distintas técnicas de modificación que intervienen al proceso con plasma para obtener superficies antimicrobianas, Cloutier *et al.*, 2015.

Tarea 1.2.- Selección y adquisición de superficies antimicrobianas actualmente disponibles

Algunas de las superficies antimicrobianas disponibles comercialmente se muestran a continuación:

A. TAPAS Y ASIENTOS DE INODORO

- Tapa y asiento para inodoro, de la marca: ROCA. La marca Roca posee diversas tapas y asientos para inodoros en las que aseguran que están realizadas con material antibacteriano.
- Tapa y asiento para inodoro, de la marca: TATAY. La marca Tatay también dispone de tapas y asientos para inodoros fabricados con polipropileno y con tratamiento antibacteriano.

ANTIBACTERIANO

B. PRODUCTOS DE GEL COAT

- Fregadero encastrable Zafiro, de la marca: POALGI. Se trata de un fregadero de gel-coat fabricado con resinas y cargas minerales, con recubrimiento gel-coat, en el que aseguran que también cuenta con un tratamiento antibacteriano.
- Plato de ducha, de la marca: ZENON, del grupo CIFRE TM. Se trata de un plato de carga mineral con recubrimiento de gel coat antibacteriano y superficie antideslizante.
- Plato de ducha, de la marca: TORVISCO. Se trata de un plato compuesto de una mezcla de resina de poliéster y cargas minerales dolomitas impermeables, que permite que sea muy liso y antideslizante. También aseguran que dispone de recubrimiento con protección antibacteriana.
- Plato de ducha, AKVO de la empresa IBERDAYA. Son platos de ducha ultraligeros y de alta resistencia, según el fabricante, que además poseen una superficie de gel coat con un tratamiento antibacteriano y antideslizamientos.
- Plato de ducha, de la marca: NUDESPOL. Esta marca asegura poseer unos platos de ducha compuestos por Gelcoats con acabado Antibacteriano. Según la empresa, sus platos se han sometido a ensayos según test JIS Z 2801:2000 Y SN 195 920, y sus gelcoat antibacterianos frente a los microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352. Y aseguran que después de tiempo de contacto variable los resultados son muy buenos.

C. PRODUCTOS DE RESINAS CON CARGAS MINERALES

- Platos de ducha, de la marca PROFILTEK. Esta empresa fabrica platos de ducha extraplano y más ligeros, a base de resinas con cargas minerales. Aseguran disponer, en sus seis series de platos de ducha (Gotham, Zenda, Lotus, Daray, Matis y Rodik), de una tecnología antibacteriana y fácil de limpiar.
- Plato de ducha Marmek, de la marca Hidrobox del grupo Absara. Los productos fabricados a base de este compuesto contienen un material compacto de resinas y cargas minerales derivadas del mármol. Según la empresa, el producto posee altas prestaciones antibacterianas. Entre los productos fabricados con Marmek se encuentra el plato de ducha NEO.
- Platos de ducha de resina y cargas minerales, de la marca NUOVVO. La empresa sostiene que todos sus platos de ducha están fabricados con un GelCoat sanitario imposibilita la proliferación microbiana.

D. TABLEROS

- Paneles Luxe, Classic y Avangarde, de la marca: ALVIC. La empresa ALVIC afirma que ha empezado a aplicar a sus productos un tratamiento antibacteriano, que recomiendan utilizar en superficies de mobiliario de cocinas y baños.

En este caso especifican que han demostrado la eficacia de este tratamiento antibacteriano, en el que se detecta una reducción y un control del crecimiento de microorganismos debido a los principios activos de su composición, así como el efecto inhibitorio en el crecimiento de las bacterias gram positivo y gram negativo especificadas en la normativa Europea EN1327.

ANTIBACTERIANO

- Panel de pared, de la marca: FINSA. La empresa FINSA también asegura fabricar tableros con tratamiento antibacteriano, que también poseen mejoras térmicas y acústicas y no se decoloran. Dentro de la empresa FINSA encontramos el producto Superpan® TOP que consta de un decorativo diseño en la parte de arriba protegida con un film especial, y con una superficie aislante en el extremo superior y en el borde posterior que está hecho de MDF. Al soporte de madera MDF, se le añade un aglomerado, una capa de papel barrera y finalmente un papel decorativo con acabado de melamina que incorpora la impregnación antibacteriana.
- Polyform®, de la marca: POLYREY. Según la empresa, realizan unos tableros de HPL adecuados para su uso como encimera, que tienen propiedades hidrófugas y altamente resistentes a los golpes y rayas. La encimera Polyform® aseguran que tiene un tratamiento antibacteriano innovador a base de iones de plata, que garantiza que el producto sea sano y apto para el contacto con los alimentos.

E. SOLID SURFACE

- KRION®, de la marca: SYSTEMPOOL empresa del grupo de PORCELANOSA. La empresa afirma que sus solid surfaces son resistentes a hongos y bacterias, y no permiten su proliferación. Además tienen muy baja volatilidad de componentes orgánicos (VOCs), son asépticos y aptos para instalar en quirófanos.
- Smart Solid Surface, de la marca ZENON. Esta marca también realiza productos de Solid Surface. Afirman que es un material naturalmente antibacteriano, por lo que no existe la necesidad de aplicar ningún aditivo químico, asegurando que el tiempo no hará que pierda esta cualidad. Según la empresa, son materiales adecuados para su uso alimentario, y se puede utilizar en cocinas, espacios públicos, clínicos y sanitarios.

F. CERÁMICA

- Active Plus Natural, de marca: GRESMANC. Esta empresa cerámica ha desarrollado productos con propiedades antimicrobianas que se activan con la luz o sin luz. Para el listado, se ha escogido la serie Active Plus Natural, que no necesita luz. Según la empresa, utilizan la nanotecnología para destruir el metabolismo de las bacterias impidiendo su reproducción y, por tanto, la aparición de nuevas bacterias inmunes a su efecto. Afirman que la propiedad antibacteriana de Active Plus Natural no se agota, se mantiene activa durante toda la vida útil de la cerámica ya que se incorpora a nivel nanométrico y no necesita de luz, ni ningún otro factor externo, para su funcionamiento.
- BIOSTOP, de la marca: ROSA GRES. La empresa anuncia que las propiedades bactericidas de Biostop se deben a la utilización de nano-partículas de plata integradas en el proceso productivo del gres porcelánico antes de la cocción. La combinación de nano-partículas de plata y humedad libera iones de plata. Los iones de plata impiden el metabolismo microbiano y en un tiempo reducido las bacterias desaparecen totalmente. Se compone de 4 elementos dotados de una potente acción bactericida: pavimento + zócalo higiénico + revestimiento + junta de colocación. La innovación Biostop consiste en que actúa en toda la superficie cerámica incluida la junta de colocación que también es bactericida.

ANTIBACTERIANO

- Protect, de la marca: PANARIA, con tecnología Microban. Los productos Protect utilizan una tecnología con la marca registrada Microban 3G Silver™. La empresa afirma que, con esta protección antibacteriana del producto en las líneas principales de pisos cerámicos y revestimientos en gres y gres laminado, se elimina hasta el 99.9% de las bacterias de la superficie de las baldosas, lo que garantizan la belleza y durabilidad: higiene y seguridad antibacteriana para los entornos de vida, ocio y trabajo.

G. PIEDRA NATURAL

- Naturamia®, de la marca: LEVANTINA Y ASOCIADOS DE MINERALES, S. A. Naturamia® es una línea de encimeras de granito y de cuarcita que son resistentes a las altas temperaturas, y que incorporan un tratamiento antimanchas y están provistas de un tratamiento antibacteriano que evita el desarrollo de bacterias y garantiza una superficie higiénica, según el fabricante.
- Encimeras de cuarzo, de la marca: ABELLÓ. La marca Abelló garantiza que todas sus encimeras de cuarzo tienen un tratamiento antibacteriano que garantiza la salubridad de la cocina.

H. MASILLAS, SILICONAS Y SELLANTE

- Masilla de silicona Antimoho especial sanitaria, de la marca: SIKA. Según la marca, se trata de un sellador adecuado para aplicaciones en interior y exterior, utilizándose para sellado de sanitarios y zonas donde se requieran resistencias a la formación de moho. Aseguran que posee resistencia a largo plazo a los mohos y hongos, así como un excelente comportamiento a los UV y a la intemperie, y está libre de disolventes (conforme la regulación de EU)
- Pattex No más moho, de la marca: PATTEX. Según la empresa es una silicona antimoho, de larga duración e impermeable, adecuada para la realización de acabados y sellados de juntas en cuartos de baño. Aseguran que se caracteriza por soportar el contacto con el agua después de tan solo 1 hora desde su aplicación.
- Cinta selladora Sella, de la marca: CEYS. Es una cinta selladora autoadhesiva que, aseguran, sella cualquier tipo de junta rápida y cómodamente. La empresa garantiza que es antimoho.

I. PINTURAS Y ADITIVOS PARA PINTURAS ANTIMICROBIANAS

- Aguastop hidrofugante con antimoho, de la marca: CEYS. Es un impermeabilizante rápido de alta resistencia que previene y repara filtraciones. Aseguran que es idóneo para la reparación de fugas, uniones, juntas y para la impermeabilización de puntos singulares. Afirman que tiene una tecnología, que le permite una alta resistencia a los rayos UV, a las inclemencias meteorológicas y al moho.

ANTIBACTERIANO

- Antimoho para imprimación, de la marca: MEM. Se recomienda para superficies de hormigón, mortero, yeso, fibra de madera y de placas de yeso, y superficies que tengan humedad, ya que lleva un tratamiento antimoho.
- Aditivo Antimoho para pintura fórmula concentrada, de la marca: FUZE. Se trata de un aditivo antimoho, el cual aseguran es muy efectivo y evita el crecimiento moho, humedad y hongos en cualquier habitación.
- Pintura antibacteriana y antimoho BIOTEM, de la marca: BLATEM. Es una pintura plástica al agua, en la que se asegura que inhibe y previene el crecimiento de las bacterias, sobre la película de pintura. Aseguran que este efecto es inalterable en el tiempo, incluso después de repetidos ciclos de limpieza.
- Pintura vinílica con conservante Antimoho, de la marca: BLATEM. Es una pintura plástica vinílica cubriente con efecto antimoho sobre la pintura.
- Pintura Indiana Antimoho profesional, de la marca: BLATEM. Es una pintura plástica mate para interiores y exteriores formulada en base a copolímeros vinílicos especiales y con aditivos antimoho.
- Protector antimoho, de la marca: XYLAZEL. Es un líquido transparente para eliminar los mohos y algas en las paredes, impidiendo que se reproduzcan. La empresa asegura que penetra en profundidad en las superficies, las limpia y previene el crecimiento de nuevos hongos y algas.
- Pintura para pared y techo Antimoho, de la marca: BRUGUER. Se trata de una pintura plástica con conservante antimoho para uso en superficies sometidas a ambientes húmedos o condensaciones. La empresa afirma que tiene un gran poder cubriente y también tapa las manchas ya existentes (verdosas o negruzcas).
- Aditivo antimoho conservante Expresa, de la marca: MONTÓ. Es un limpiador higienizante para eliminar el moho de las paredes y techos. Según la empresa, desinfecta y limpia sin esfuerzo y tiene un efecto de larga duración y elevado rendimiento.
- Pintura plástica Antimoho Expresa, de la marca: MONTÓ. Es una pintura plástica al agua con conservante antimoho, para aplicar sobre soportes ya afectados (previo lavado) o como medida preventiva en estancias mal ventiladas. Aseguran que posee una alta cubrición, duración y lavabilidad.

SELECCIÓN DE PRODUCTOS Y ENSAYOS REALIZADOS EN LABORATORIO AIDIMME

De los productos encontrados, se ha seleccionado aquellos materiales más acordes con los sectores del proyecto. Se han adquirido diversos productos de antimicrobianos, como son las pinturas y aditivos para pinturas con acción antimicrobiana (antimoho, antibacteriana), así como sellantes y siliconas antimicrobianos. Además se han escogido piezas de materiales con actividad antimicrobiana en madera, metal, cerámica, Solid Surface y acabados en gel coat. En este último caso, las empresas colaboradoras en el proyecto han aportado platos de ducha con acabados en gel coat.

ANTIBACTERIANO

Tarea 1.3.- Caracterización de las superficies antimicrobianas adquiridas

Se realizan ensayos con los diferentes materiales para la caracterización de sus capacidades antimicrobianas, por estar aditivados con biocidas o por su propia naturaleza. Se ensayan los productos que han sido seleccionados del listado comercial descrito en el apartado anterior, que se caracterizan por ser de carácter antimicrobiano, además de los productos acabados proporcionados por diversas empresas.

Así pues, se ensayan tanto las superficies sólidas (platos de ducha, tableros, piezas cerámicas y metálicas, entre otros), así como materiales que, por su contenido en sustancias biocidas, protegen y convierten superficies inertes en superficies con propiedades antimicrobianas (acabados, pinturas y/o aditivos). Por interés y compatibilidad con los materiales empleados para superficies se toman en consideración sellantes y/o siliconas que en muchos casos se comercializan con propiedades antimoho debido a su frecuente contacto con el agua. De esta forma se recoge un amplio abanico de lo que son todos los materiales que pueden considerarse como parte de las superficies con las que habitualmente entramos en contacto.

La composición de los materiales ensayados no ha sido comprobada por no ser objeto de este estudio, siendo únicamente de interés las propiedades antimicrobianas.

Cabe anotar que aunque mayoritariamente los ensayos de eficacia antimicrobianas se realizan frente a hongos, debido a las características que oferta el fabricante, existen casos en los que los ensayos se realizan frente a bacterias. Ello se debe a que su composición final es destinada para usos en los que puede existir un riesgo bacteriológico, además de que el fabricante atribuye a sus productos características antibacterianas como tal.

RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS ENSAYOS DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA

a) Madera

Se ensayan dos superficies lacadas sobre un tablero de fibras, como material derivado de la madera. Las superficies están tratadas con dos tipos de biocidas. Al tratarse de una superficie no porosa y estar tratada con un producto antibacteriano, se procede a su ensayo a través de la metodología que describe la norma ASTM E2180-07, con el fin de averiguar cuantitativamente si se consigue una reducción significativa de las bacterias de ensayo.

La descripción de las muestras se muestra a continuación:

Muestra A: Una muestra de tablero de fibras, con un lacado con barniz transparente de acabado supermate sin adición de sustancia activa biocida.

Muestra B: Una pieza de tablero de fibras con acabado antibacteriano y una pieza de tablero de fibras acabada sin producto antibacteriano como control negativo.

ANTIBACTERIANO

El método de ensayo realizado se adapta con lo indicado en la siguiente norma debido a la naturaleza del producto de ensayo:

► ASTM E2180-07 “Standard test method for determining the activity of incorporated antimicrobial agent(s) in polymeric or hydrophobic materials”

También se toma como referencia la norma JIS Z 2801:2006 “Antimicrobial products. Test for antimicrobial activity and efficacy”.

La adaptación de la norma se basa en que no se compara con un control negativo, ya que la muestra A es la pieza de la que se desea conocer su poder antimicrobiano.

Este procedimiento de ensayo se lleva a cabo para evaluar la actividad de los agentes antimicrobianos incorporados a materiales poliméricos o hidrófobos. El método se basa en la inoculación de determinados microorganismos mediante agar blando sobre la superficie de ensayo. La determinación de la actividad antimicrobiana se lleva a cabo mediante la determinación de la reducción logarítmica de una suspensión microbiológica puesta en contacto sobre la superficie de ensayo, tomando como referencia el mismo soporte sin agentes antimicrobianos tras un determinado tiempo de incubación.

Las cepas de ensayo empleadas en este ensayo fueron las siguientes:

Tabla 1. Cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas empleadas en los ensayos

Microorganismo	Cepa	Código colección	Características
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus Rosenbach 1884	ATCC 6538P	CECT 240	Bacteria Gram positiva Tª crecimiento: 37 °C Tiempo incubación: 24h Bacteria aeróbica Grupo de riesgo: 2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter 1872) Migula 1900	LMG 10268	CECT 4628	Bacteria Gram negativa Tª crecimiento: 37 °C Tiempo incubación: 24h Bacteria aeróbica Grupo de riesgo: 2

Estas cepas fueron adquiridas de la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo).

Obtención de resultados

Los resultados de expresan a través de las siguientes ecuaciones:

- Media geométrica= (Log R1 + Log R2 + Log R3) / 3

ANTIBACTERIANO

R: ufc recuperadas tras el período de incubación

$$R (\%) = [(Nu - Na) / Nu] \times 100$$

Nu: antilogaritmo de la media geométrica de los microorganismos recuperados tras el período de incubación en las muestras no tratadas (control negativo)

Na: antilogaritmo de la media geométrica de los microorganismos recuperados tras el período de incubación en las muestras tratadas

$$R = [\log (B/A) - \log (C/A)]$$

R: valor actividad antimicrobiana

A: media del número de ufc inmediatamente después (t=0h) de la inoculación de las muestras control negativo

B: media del número de ufc de las muestras control negativo tras 24 h incubación

C: media del número de ufc de las muestras de ensayo tras 24 h incubación

Se considera que un valor de $R \geq 2$ demuestra una correcta actividad antimicrobiana

Resultados

Muestra A: Se observa que las muestras de ensayo (sin biocida) presentan una reducción del crecimiento de la bacteria *S. aureus* tras el período de incubación de 24 h. Sin embargo, el crecimiento de la bacteria *Ps. aeruginosa* no disminuye tras este período de incubación. A través de controles negativos internos se comprueba la correcta viabilidad de las dos especies bacterianas tras el período de incubación.

Tabla 2. Resultados de los ensayos realizados para la muestra A de madera frente a la bacteria *S.aureus*

<i>S. aureus</i>	t (h)	Media ufc/ml	Media geométrica ufc/ml	% Reducción
Muestra A	0	2,00E+07	7,23	99,2
	24	1,53E+05	5,17	

Tabla 3. Resultados de los ensayos realizados para la muestra A de madera frente a la bacteria *Ps. aeruginosa*

<i>Ps. aeruginosa</i>	t (h)	Media ufc/ml	Media geométrica ufc/ml	% Reducción
Muestra A	0	2,50E+07	7,39	0
	24	2,12E+08	8,32	

Muestra B: Se observa que, tanto las muestras de control negativo, como las muestras de ensayo, no presentan crecimiento bacteriano tras el período de incubación de 24 h. A través de controles negativos internos se comprueba la correcta viabilidad de las dos especies bacterianas tras el período de incubación.

ANTIBACTERIANO

Tabla 4. Resultados de los ensayos realizados para la muestra B de madera frente a la bacteria *S.aureus*

<i>S. aureus</i>	t (h)	Media ufc/ml	Media geométrica ufc/ml	% Reducción
Control negativo	0	2,73E+05	5,32	100
	24	0	-	
Antibacteriano	0	1,29E+05	5,03	
	24	0	-	

Tabla 5. Resultados de los ensayos realizados para la muestra B de madera frente a la bacteria *Ps. aeruginosa*

<i>Ps. aeruginosa</i>	t (h)	Media ufc/ml	Media geométrica ufc/ml	% Reducción
Control negativo	0	3,75E+06	6,47	100
	24	0	-	
Antibacteriano	0	5,40E+06	6,73	
	24	0	-	

Desviación de la norma: debido a que con los controles negativos, es decir, el análisis con la muestra sin tratar con el producto antibacteriano, no se obtuvo crecimiento bacteriano tras las 24 h de incubación, no es posible determinar la reducción del efecto bactericida de la muestra de ensayo como establece la norma, como tampoco calcular el valor de actividad antimicrobiana R. Por ello la capacidad de la reducción de la viabilidad bacteriana se ha evaluado comparando la recuperación de la carga bacteriana a partir de la muestra de ensayo a t=0 h con la recuperación bacteriana a partir de la muestra de ensayo tras el t=24 h.

Conclusiones

- Muestra A: El tablero de ensayo de fibras muestra actividad antibacteriana tras 24 h de tiempo de contacto frente a la especie bacteriana Gram-positiva *Staphylococcus aureus* pero no frente a la Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, pues no se observa una reducción de la viabilidad microbiana.
- Muestra B: El tablero de fibras con acabado antibacteriano proporcionado por el cliente, muestra actividad antibacteriana tras 24 h de tiempo de contacto frente a las especies bacterianas Gram-positiva *Staphylococcus aureus* y Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, pues la reducción de la viabilidad microbiana es del 100%.

ANTIBACTERIANO

b) Metal

Como material metálico que actúe como superficie, se eligen los perfiles metálicos habitualmente empleados para cubrir juntas y aristas de tanto en recintos de cocina como de baño. Estos materiales no presentan un componente biocida añadido, por lo que en este ensayo se determina la capacidad antimicrobiana del propio material.

Así pues son objeto de ensayo muestras de perfiles de aluminio y acero para uso vertical, definidos como:

- LISTELO DE ALUMINIO
- LISTELO DE ACERO

El método de ensayo realizado coincide con lo indicado en las siguientes normas:

- ▶ EN ISO 846: 1997 (Method A)
- ▶ ASTM G22 (Procedure B)

Resistencia frente a hongos

El listado de hongos de ensayo sería el siguiente: *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium funiculosum*, *Paecilomyces variotii*, *Trichoderma virens*, *Fusarium fujikuroi*, *Aureobasidium pullulans*, *Coniophora puteana*, *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum* (siendo estos tres últimos destinados a los ensayos con madera). Los hongos *Fusarium fujikuroi*, *Coniophora puteana*, *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum* presentaban problemas de esporulación, aunque bajo ciertas condiciones (fotoperiodo de 12h de luz a 25°C y 12h de oscuridad a 18°C en medio SNA-nº 323 de la CECT) se consiguió que *Fusarium fujikuroi* pudiera llegar al estado de esporulado, y por ello fue empleado en algunos de los ensayos de resistencia de los materiales frente a hongos.

Evaluación de resultados

Se realiza un examen visual de las probetas de ensayo una vez finalizado el período de incubación, determinando la intensidad del crecimiento de los hongos a través de la siguiente tabla de evaluación:

ANTIBACTERIANO

Tabla 6. Tabla con la evaluación de los resultados según el Método A de la norma EN ISO 846:1997

Intensidad del crecimiento	Evaluación
0	No se observa crecimiento aparente a través del microscopio
1	No se observa crecimiento aparente a nivel visual, pero sí bajo el microscopio
2	Crecimiento visible, el micelio cubre el 25% de la superficie de la probeta de ensayo
3	Crecimiento visible, el micelio cubre el 50% de la superficie de la probeta de ensayo
4	Crecimiento visible considerable, el micelio cubre más del 50% de la superficie de la probeta de ensayo
5	El micelio cubre la totalidad de la superficie de la probeta de ensayo.

Interpretación de los resultados

Tras la evaluación visual de las probetas de ensayo, se lleva a cabo la interpretación de los resultados obtenidos según la tabla:

Tabla 7. Tabla con la valoración de los resultados según el Método A de la norma EN ISO 846:1997

Intensidad del crecimiento	Valoración de resultados
0	Excelente resistencia. El material ensayado no es una fuente de alimento para los hongos. Se considera que el material es inerte o fungistático.
1	Buena resistencia. El material ensayado contiene sustancias nutritivas, o está contaminado por trazas de estas sustancias, que permiten un ligero crecimiento de los hongos.
2 a 5	No resistente. El material ensayado no es resistente al ataque por hongos y contiene sustancias nutritivas que permiten el crecimiento y desarrollo de estos microorganismos.

Resultados

Sobre las probetas de aluminio y acero no se observa crecimiento (nivel 0) de los hongos inoculados tras cuatro semanas de incubación.

ANTIBACTERIANO

Los controles de viabilidad de las esporas se comportan de forma adecuada, debido a su correcto crecimiento. Los controles positivo y negativo presentan presencia y ausencia de crecimiento de los hongos sobre su superficie, respectivamente.

Tabla 8. Resultados de los ensayos realizados para superficies metálicas de resistencia frente a hongos

Resistencia frente a hongos		
Material	Réplica	Evaluación
Aluminio	1	0
	2	0
	3	0
	4	0
	5	0
	6	0
	7	0
	8	0
	9	0
	10	0
Acero	1	0
	2	0
	3	0
	4	0
	5	0
	6	0
	7	0
	8	0
	9	0
	10	0

c) Cerámica

Se ensayan dos muestras de pavimento cerámico con acabados biocidas. En los ensayos se emplea una muestra de pavimento cerámico sin biocida como control.

- Muestra de pavimento cerámico con Biocida A
- Muestra de pavimento cerámico con Biocida B
- Control negativo (pavimento cerámico sin biocida)

El método de ensayo realizado se adapta con lo indicado en la siguiente norma debido a la naturaleza del producto de ensayo:

ANTIBACTERIANO

► ASTM E2180-07 “Standard test method for determining the activity of incorporated antimicrobial agent(s) in polymeric or hydrophobic materials”

También se toma como referencia la norma JIS Z 2801:2006 “Antimicrobial products. Test for antimicrobial activity and efficacy”.

Resultados

Pavimento cerámico con Biocida A

Tabla 9. Resultados de los ensayos realizados para la muestra pavimento cerámico con Biocida A frente a *Ps. aeruginosa*

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
Muestra	t (h)	Promedio ufc/probeta	Lmax	Lmin	Media geométrica	Validación *	R	% Reducción
Control	0	4,10E+06	6,71	6,40	6,59	0	≥2	100
	24	2,03E+08	8,41	8,15	8,29	0		
Biocida A	24	0,00E+00	-	-	-	0		

*Parámetro de validación del ensayo. Queda validado cuando el valor resultante es ≤ 2

Tabla 10. Resultados de los ensayos realizados para la muestra pavimento cerámico con Biocida A frente a *S.aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>								
Muestra	t (h)	Promedio ufc/probeta	Lmax	Lmin	Media geométrica	Validación *	R	% Reducción
Control	0	6,01E+06	6,91	6,46	6,74	0,1	≥2	100
	24	9,17E+06	7,00	6,93	6,96	0		
Biocida A	24	0,00E+00	-	-	-	0		

*Parámetro de validación del ensayo. Queda validado cuando el valor resultante es ≤ 2

Pavimento cerámico con Biocida B

Tabla 11. Resultados de los ensayos para la muestra pavimento cerámico con Biocida B frente a *Ps. aeruginosa*

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
Muestra	t (h)	Promedio ufc/probeta	Lmax	Lmin	Media geométrica	Validación *	R	% Reducción
Control	0	4,10E+06	6,71	6,40	6,59	0	0	0
	24	4,00E+08	8,60	8,60	8,60	0		
Biocida B	24	2,52E+08	8,64	8,10	8,34	0,1		

*Parámetro de validación del ensayo. Queda validado cuando el valor resultante es ≤ 2

ANTIBACTERIANO

Tabla 12. Resultados de los ensayos realizados para la muestra pavimento cerámico con Biocida B frente a *S.aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>								
Muestra	t (h)	Promedio ufc/probeta	Lmax	Lmin	Media geométrica	Validación *	R	% Reducción
Control	0	6,01E+06	6,91	6,46	6,74	0,1	0,2	40
	24	9,17E+06	7,00	6,93	6,96	0		
Biocida B	24	5,50E+06	6,90	6,30	6,67	0,1		

*Parámetro de validación del ensayo. Queda validado cuando el valor resultante es ≤ 2

Se observa que las muestras de pavimento cerámico tratadas con el biocida A reducen al 100% la carga bacteriana ensayada tras 24h de incubación, con respecto a las muestras control sin biocida, presentando un valor $R \geq 2$. En el caso de las muestras tratadas con el biocida B se observa que no reduce el crecimiento de la bacteria *Ps. aeruginosa*. En el caso de la bacteria *S. aureus* se reduce en un 40% su carga, sin embargo al presentar un valor $R < 2$ no se considera que el biocida B presente una correcta actividad antimicrobiana.

Conclusiones

Únicamente las muestras de pavimento cerámico con el biocida A presentan una correcta actividad antibacteriana tras 24 h de incubación frente a las especies bacterianas Gram-positiva *Staphylococcus aureus* y Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*.

d) Solid Surface

El material denominado como solid surface se trata de un compacto mineral, compuesto por dos terceras partes de minerales naturales y un bajo porcentaje en resinas. Destaca su maleabilidad con la que se consiguen nuevas formas y diseños.

El método de ensayo realizado coincide con lo indicado en la norma siguiente:

- ▶ EN ISO 846: 1997 (Method A and C)

No se observa crecimiento de los hongos de ensayo, ni a simple vista, ni bajo el microscopio estereoscópico, en todo el perfil de cada una de las probetas de *solid surface*.

Los controles de viabilidad de la mezcla de esporas de los hongos de ensayo se comportan de forma adecuada, debido a su correcto crecimiento. La suspensión de esporas preparadas de cada uno de las especies de hongos también se desarrolla de forma adecuada. Los controles

ANTIBACTERIANO

positivo y negativo presentan presencia y ausencia de crecimiento de los hongos de ensayo sobre su superficie, respectivamente.

Tabla 13. Resultados de los ensayos realizados para Solid Surface de resistencia frente a hongos (mezcla)

Resistencia frente a hongos	
Réplicas	Evaluación
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0
11	0
12	0
13	0
14	0

e) Gel Coat

Se ensayan tres tipos de muestras de plato de ducha, identificados por las tres empresas colaboradoras en el proyecto que han facilitado las piezas como:

- con acabado acrílico
- con poliuretanos
- con acabado gel coat habituales o poliésteres

Cada pieza (de grandes dimensiones) ha sido cortada en múltiples probetas para ajustar su tamaño a las especificaciones de los ensayos (4 x 4 cm).

Muestra G1: una pieza de plato de ducha con acabado en poliuretano (capa superficial a ensayar).

Muestra G2: una pieza de plato de ducha con acabado en Gel coat o poliéster (capa superficial a ensayar).

ANTIBACTERIANO

Muestra G3: una pieza de plato de ducha con acabado en resina acrílica (capa superficial a ensayar).

Se preparan diversas probetas de ensayo para ser inoculadas con una mezcla de esporas de hongos, siendo estas previamente esterilizadas con el uso de autoclave.

El método de ensayo realizado coincide con lo indicado en la norma siguiente:

- ▶ EN ISO 846: 1997 (Method A and C).

Para la inoculación de las probetas de ensayo, se prepara una mezcla de hongos que consta de un cierto volumen de cada una de las suspensiones de esporas ya preparados de: *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, *Paecilomyces variotii*, *Chaetomium globosum*, *Trichoderma virens* y *Aureobasidium pullulans*.

Resultados

A continuación, se detallan los resultados de la intensidad de crecimiento de la mezcla de los hongos tras su incubación, durante varias semanas, para las tres muestras y las diversas réplicas del ensayo. Asimismo, se muestran las imágenes fotográficas de los resultados.

Tabla 14. Resultados de los ensayos realizados para superficies con acabado Gel-Coat frente a hongos (mezcla)

Resistencia frente a hongos		
Material	Réplicas	Evaluación
G1- superficie con acabado poliuretano	1	5
	2	4
	3	5
	4	5
	5	4
	6	4
	7	5
	8	5
	9	4
	10	5
	11	5
	12	5
	13	5
	14	5

ANTIBACTERIANO

G2- acabado Gel Coat	1	0
	2	0
	3	0
	4	0
	5	0
	6	0
	7	0
G3- acabado resina acrílica	1	2
	2	2
	3	3
	4	3
	5	3
	6	2
	7	2
	8	2

Conclusiones

- Tras la evaluación de los resultados de las probetas con ACABADO EN POLIURETANO, se observa que presenta un nivel medio 5 de crecimiento de hongos en su superficie según el Método A de la norma EN ISO 846:1997.

Por ello se concluye que las muestras ensayadas con ACABADO EN POLIURETANO, presentan una muy baja resistencia al ataque de hongos, pues actúa como fuente de alimento para los hongos. Se considera que el material tiene una fuerte intensidad de crecimiento.
- Tras la evaluación de los resultados de las probetas con ACABADO EN GEL COAT POLIESTER, se observa que presenta un nivel medio 0 de crecimiento de hongos según el Método A de la norma EN ISO 846:1997.

Por ello se concluye que las muestras ensayadas con ACABADO EN GEL COAT POLIESTER presenta una excelente resistencia al ataque de hongos, pues no actúa como fuente de alimento para los hongos. Se considera que el material es inerte o fungistático.
- Tras la evaluación de los resultados de las probetas con ACABADO ACRÍLICO, se observa que presentan un nivel medio 2-3 de crecimiento por hongos en su superficie, según el Método A de la norma EN ISO 846:1997.

Por ello se concluye que las muestras con ACABADO ACRÍLICO, no son resistentes al ataque por hongos y contiene sustancias nutritivas que permiten el crecimiento y desarrollo de estos microorganismos.

f) Aditivos de pinturas

Se han adquirido cinco aditivos comerciales para pinturas y un recubrimiento de acabado para aplicar encima de la pintura.

ANTIBACTERIANO

Muestra A1: BIROX, aditivo para pintura.

Sustancias activas (biocidas): Piritionato de zinc (CAS 13463-41-7, incluido como TP 2, 6, 7, 9, 10 y 21).

Muestra A2: FUZE Anti-Mould aditivo PINTURA. Aditivo para pintura.

No se menciona la sustancia activa en el etiquetado (reino unido).

Muestra A3: MONTÓ, aditivo para pintura, Aditivo antiverdín, pinturas resistentes al agua.

Sustancias activas (biocidas): OIT, también llamada Octilinona, CAS 26530-20-1, 2-octil-2H-isotiazol-3-ona) (TP 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 13); DCMU, también llamada Diuron CAS: 330-54-1, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (TP 7 y 10); Piritionato de Zinc

Muestra A4: MEM PFELEGEN. Aditivo para pintura, MEM antimoho para de imprimación
1 L Sustancia active: CMIT/MIT (3:1), 5-chloro-2-methyl-2H- isothiazol-3-one (EINECS 247-500-7) y 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (EINECS 220-239-6).

Muestra A5. XYLAZEL: aditivo para pintura, PROTECTOR ANTIMOHO 500ml

Sustancia activa (biocida): OIT, también llamada Octilinona, (CAS 26530-20-1, 2-octil-2H-isotiazol-3-ona)

Muestra A6: CEYS Acabado tras pintura, AGUASTOP HIDROFUGANTE CON ANTIMOHO 5L.

Sustancia activa: OIT, también llamada Octilinona, (CAS 26530-20-1, 2-octil-2H-isotiazol-3-ona)

Se han realizado ensayos de eficacia antimicrobiana –tanto frente hongos como a bacterias- para comprobar la capacidad de inhibición de las muestras de cinco aditivos y un acabado de pintura.

Se ha llevado a cabo el método del halo de inhibición para evaluar la capacidad antimicrobiana de los productos aditivos biocidas. El crecimiento se realiza en placa Petri en presencia de un disco de celulosa con la muestra a ensayar en un medio de cultivo completo apropiado, PDA (Patata Dextrosa Agar) en el caso de los hongos y TSA (Triptófano Soja Agar) para bacterias.

Las especies de los hongos de ensayo han sido los siguientes:

Tabla 15. Hongos escogidos para la preparación de la suspensión de esporas en los ensayos del halo de inhibición

Microorganismo	Código colección
<i>Chaetomium globosum</i>	CECT 2701
<i>Trichoderma virens</i>	CECT 2460
<i>Aspergillus niger</i>	CECT 2700
<i>Penicillium pinophilum</i>	CECT 2911
<i>Paecilomyces variotii</i>	CECT 20213

ANTIBACTERIANO

Evaluación de resultados

Cuando el período de incubación finaliza, se miden los valores T y D que se toman del halo de inhibición que se crea alrededor de la probeta de ensayo. Se obtiene el valor W que permite la comparación entre muestras biocidas.

- W: ancho del halo (mm)
- T: suma de la longitud de la probeta y del ancho del halo (mm)
- D: Longitud de la probeta de ensayo (mm)
- $W = (T - D) / 2$

La evaluación de la presencia de halos alrededor de las probetas de ensayo se llevan a cabo cuando el ancho del halo > 0. En el caso de que el ancho del halo equivalga a cero, queda validada la ausencia del halo e inexistencia de la inhibición en la muestra ensayada.

Resultados

A continuación, se muestran las tablas y figuras con los resultados de cada tipo de ensayo y muestra.

Tabla 16. Resultados obtenidos de los ensayos realizados para aditivos biocidas para pinturas frente a hongos

HONGOS		A1	A2	A3	A4	A5	A6
<i>Chaetomium globosum</i>	Ø disco (mm)	W (mm)					
Réplica 1	18,5	27,77	27,15	19,54	0	16,82	23,99
Réplica 2	18,5	24,72	32,90	23,19	0	18,10	22,54
Réplica 3	18,5	26,24	30,14	25,33	0	14,71	27,82
Media	18,5	26,24	30,06	22,69	0	16,54	24,78
<i>Trichoderma virens</i>	Ø disco (mm)	W (mm)					
Réplica 1	18,5	21,38	10,59	7,24	0	9,10	9,66
Réplica 2	18,5	24,02	14,83	13,55	0	8,55	7,42
Réplica 3	18,5	16,51	15,66	11,20	0	11,35	5,00
Media	18,5	20,63	13,69	10,66	0	9,67	7,36
<i>Aspergillus niger</i>	Ø disco (mm)	W (mm)					
Réplica 1	18,5	16,52	3,11	8,35	0	1,95	8,91
Réplica 2	18,5	20,35	2,77	7,90	0	3,12	5,49
Réplica 3	18,5	17,54	1,19	15,50	0	0,55	5,46
Media	18,5	18,13	2,35	10,58	0	1,87	6,62
<i>Penicillium pinophilum</i>	Ø disco (mm)	W (mm)					
Réplica 1	18,5	18,25	10,43	12,61	0	10,45	6,90
Réplica 2	18,5	8,78	9,86	11,35	0	7,93	0,00
Réplica 3	18,5	7,90	11,18	12,54	0	9,31	5,37
Media	18,5	11,64	10,49	12,16	0	9,23	6,14

ANTIBACTERIANO

<i>Paecilomyces variotii</i>	Ø disco (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)
Réplica 1	18,5	15,39	15,20	/	0	10,92	10,45
Réplica 2	18,5	19,61	18,65	1,51	0	12,17	10,32
Réplica 3	18,5	14,52	17,52	9,10	0	12,36	12,00
Réplica 4	18,5	19,23	16,00	8,90	0	10,96	10,63
Réplica 5	18,5	/	16,11	7,77	0	10,84	6,17
Media	18,5	13,75	16,69	6,82	0	11,45	9,91

Tabla 17. Resultados obtenidos de los ensayos realizados para aditivos biocidas para pinturas frente a bacterias

BACTERIAS		A1	A2	A3	A4	A5	A6
<i>Bacillus subtilis</i>	Ø disco (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)
Réplica 1	18,5	19,00	17,04	18,15	0	11,57	2,89
Réplica 2	18,5	18,14	19,16	18,41	0	11,96	4,29
Media	18,5	18,57	18,10	18,28	0	11,76	3,59

Conclusiones

Todos los aditivos adquiridos, a excepción del A4, poseen una capacidad biocida, tanto frente a los hongos ensayados como a la bacteria *Bacillus subtilis*.

El aditivo A4 estudiado muestra una ausencia de halo de inhibición en todos los ensayos realizados. Por lo que, la muestra no presenta carácter biocida frente a hongos y bacterias.

El resto de muestras presentan eficacia biocida frente a los distintos microorganismos ensayados. Tomados en conjunto todos los resultados, aparentemente, las muestras A1, A2 y A3 presentan un mayor poder biocida frente a las distintas especies ensayadas. La especie de hongo con mayor susceptibilidad es *Chaetomium globosum* mientras que las muestras presentan menor resistencia frente a *Aspergillus niger*.

g) Pinturas

Se han adquirido cinco pinturas ANTIMOHO de tres fabricantes distintos.

Muestra P1: BRUGUER- Pintura para pared y techo Antimoho (Blanco, 15 l, Mate).

Las sustancias activas son: DCMU, también llamada Diuron CAS: 330-54-1, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; Piritionato de zinc (CAS 13463-41-7, incluido como TP 6 al TP 10) y OIT, también llamada Octilina, CAS 26530-20-1, 2-octil-2H-isotiazol-3-ona).

Muestra P2 : BLATEM VISON CON CONSERVANTE ANTIMOHO 15 L

ANTIBACTERIANO

Con Conservante para el control del crecimiento de mohos y deterioro microbiano: DCOIT, 4,5-dichloro-2-octyl-2H-isothiazol-3-one (CAS 64359-81-5, TP 7 al 11 y TP21); IPBC, 3-iodo-2-propynyl butylcarbamate (CAS 55406-53-6, TP 6 a TP10 y TP13). Contiene también CMIT/MIT (CAS: 55965-84-9 y TP2, 4, 6, 11, 12, 13), BIT (CAS: 2634-33-5 y TP: 2, 6, 9, 10, 11, 12, 13).

Muestra P3: BLATEM - Biotem- Ag Btm1 15L. Pintura plástica mate al agua.

Con Conservante para el control del crecimiento de mohos y deterioro microbiano: PLATA (CAS 7440-22-4 y TP: 9, 11); DCOIT, 4,5-dichloro-2-octyl-2H-isothiazol-3-one (CAS 64359-81-5, TP 7 al 11 y TP21); IPBC, 3-iodo-2-propynyl butylcarbamate (CAS 55406-53-6, TP 6 a TP10 y TP13). Contiene también CMIT/MIT (CAS: 55965-84-9 y TP: 2, 4, 6, 11, 12, 13), BIT (CAS: 2634-33-5 y TP: 2, 6, 9, 10, 11, 12, 13).

Muestra P4: BLATEM INDIANA ANTIMOHO PROFESIONAL PLASTICA VINILICA BLANCO MATE

Con Conservante para el control del crecimiento de mohos y deterioro microbiano: DCOIT, 4,5-dichloro-2-octyl-2H-isothiazol-3-one (CAS 64359-81-5); IPBC, 3-iodo-2-propynyl butylcarbamate (CAS 55406-53-6). Contiene también CMIT/MIT (CAS: 55965-84-9), BIT (CAS: 2634-33-5).

Muestra P5: MONTÓ Pintura plástica Antimoho Expresa (Blanco, 4 l, Mate)

Conservante OIT, también llamada Octilinona, CAS 26530-20-1, 2-octil-2H-isotiazol-3-ona.

Se han realizado ensayos de eficacia antimicrobiana –tanto frente hongos como a bacterias– para comprobar la capacidad de inhibición de las muestras de las cinco pinturas.

Se ha llevado a cabo el método del halo de inhibición para evaluar la capacidad antimicrobiana de los productos de pintura biocida. El crecimiento se realiza en placa Petri en presencia de un disco de celulosa con la muestra a ensayar en un medio de cultivo completo apropiado, PDA (Patata Dextrosa Agar) en el caso de los hongos y TSA (Tryptona Soja Agar) para bacterias.

Se ha seguido la misma metodología descrita arriba para aditivos de pintura, para la evaluación de la capacidad biocida por el método del halo de inhibición. En este caso, ya que la muestra es una pintura, se ha procedido a la adecuación de la muestra para la aditivación del disco.

Además, las probetas de ensayo son inoculadas con volumen determinado de una mezcla procedente de cada una de la suspensión de esporas preparada para cada uno de los hongos de ensayo. Dicha mezcla de hongos se prepara los siguientes hongos: *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, *Paecilomyces variotii*, *Chaetomium globosum* y *Trichoderma virens*. La viabilidad de la mezcla también se comprueba por incubación de una alícuota en un medio agar completo.

ANTIBACTERIANO

Resultados obtenidos

Tabla 18. Resultados obtenidos de los ensayos realizados para pinturas frente a hongos

HALO INHIBICIÓN HONGOS		P1	P2	P3	P4	P5
Réplicas	∅ disco (mm)	W (mm)				
1	18,5	4,78	5,27	8,33	8,12	5,42
2	18,5	5,42	5,17	13,59	10,52	6,49
3	18,5	5,33	6,01	10,32	12,81	5,24
Media	18,5	5,17	5,48	10,75	10,48	5,71

Tabla 19. Resultados obtenidos de los ensayos realizados para pinturas frente a BACTERIAS

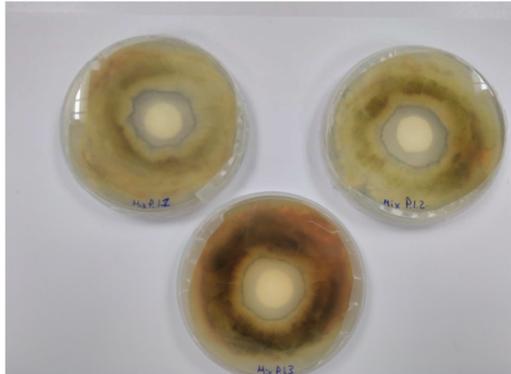
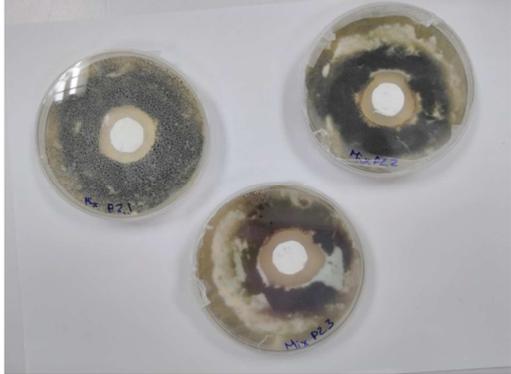
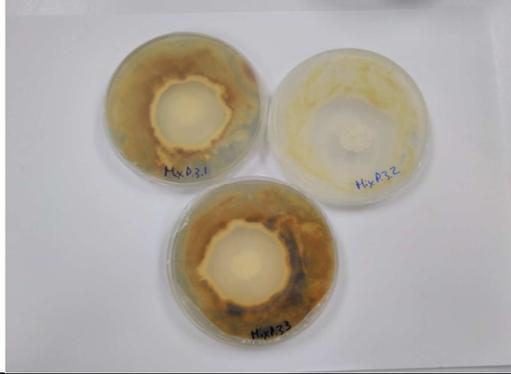
HALO INHIBICIÓN BACTERIAS		P1	P2	P3	P4	P5
Réplicas	∅ disco (mm)	W (mm)				
1	18,5	7,40	3,79	6,66	5,30	5,93
2	18,5	9,55	3,19	8,43	4,84	4,34
3	18,5	7,22	3,36	7,41	3,09	4,88
Media	18,5	8,06	3,44	7,50	4,41	5,05

Tabla 20. Controles negativos de los ensayos realizados por el método del halo de inhibición frente a hongos

CONTROL negativo	Hongos
∅ disco (mm)	W (mm)
18,5	0
CONTROL positivo	B. s
∅ disco (mm)	W (mm)
18,5	0

A continuación se exponen las imágenes fotográficas de los ensayos microbiológicos realizados a las muestras de pintura. Los resultados del halo de inhibición se leen con la vista de la placa del reverso. Además se muestra la vista anverso de la placa ya que es interesante poder observar el crecimiento de los distintos microorganismos.

ANTIBACTERIANO

HONGOS PINTURAS ANTIMOHO	
Vista anverso de la placa	Vista reverso de la placa
	
Muestras Pintura 1	Muestras Pintura 1
	
Muestras Pintura 2	Muestras Pintura 2
	
Muestras Pintura 3	Muestras Pintura 3

ANTIBACTERIANO

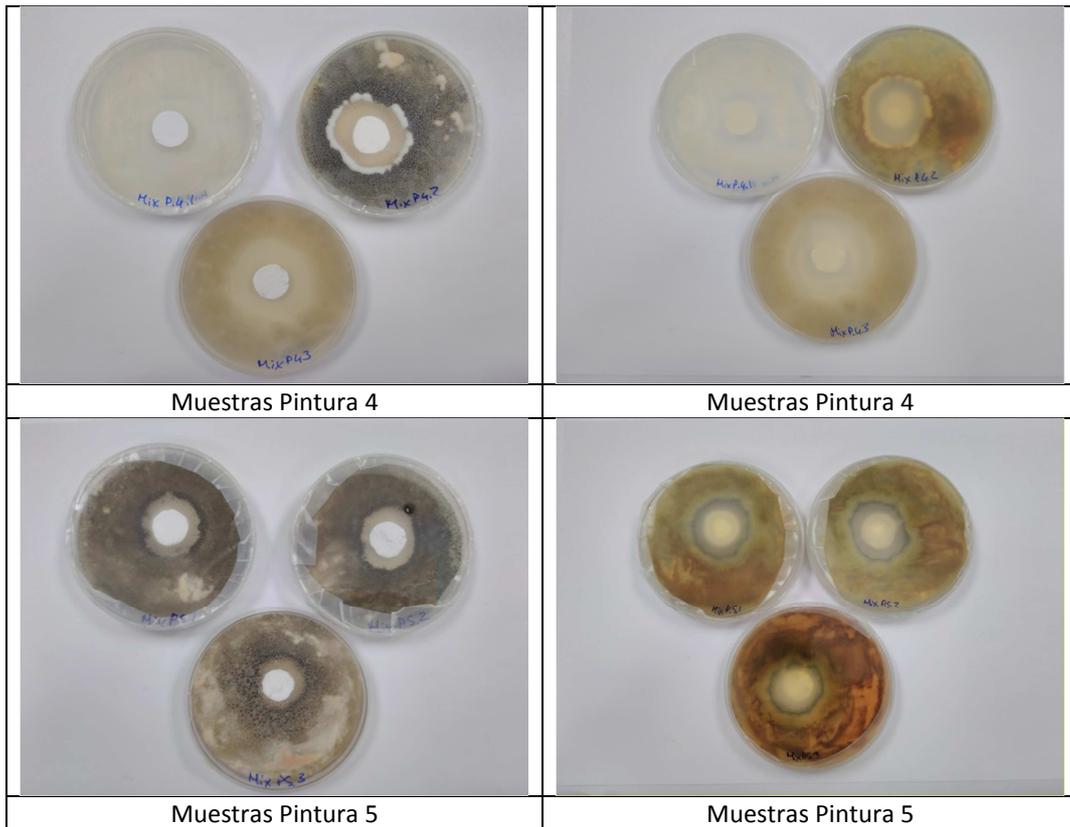


Figura 10. Ensayo Hongos- poder biocida- muestras de pinturas antimicrobianas

ANTIBACTERIANO

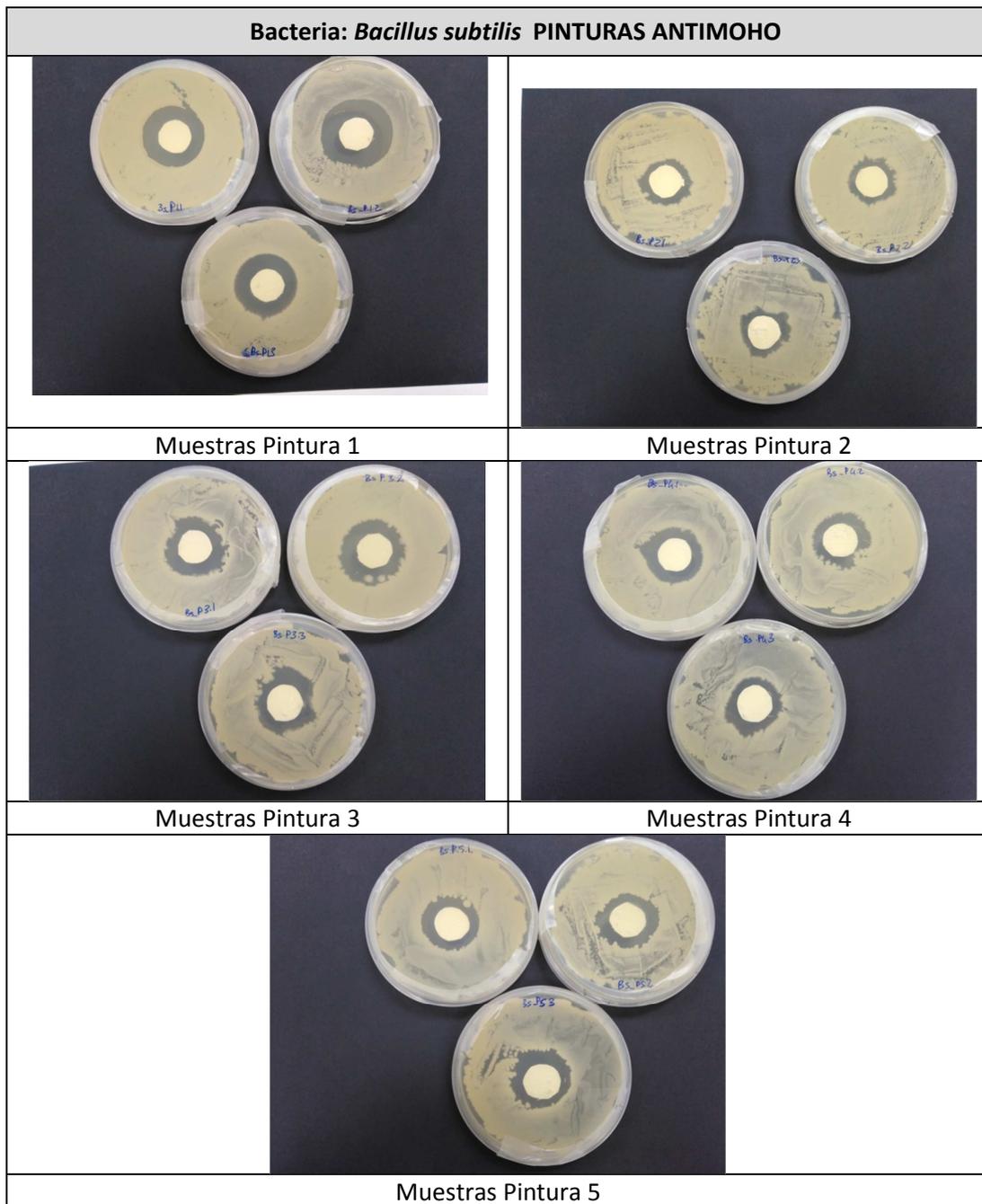


Figura 11. Ensayo Bactericida - poder biocida- muestras de pinturas antimicrobianas

Conclusiones

Todas las muestras adquiridas poseen una capacidad biocida, tanto frente a los hongos ensayados así como a la bacteria Bs.

Las pinturas ensayadas tienen una resistencia microbiana siendo de considera relevancia.

ANTIBACTERIANO

h) Siliconas y sellantes

Se han adquirido tres sellantes de silicona comerciales con su propio aplicador y un cuarto producto en forma de cinta para su aplicación directa.

Muestra S1: Pattex No más moho, silicona antimoho, larga duración impermeable, blanco.

Contiene biocida OIT, también llamada Octilina, CAS 26530-20-1, 2-octil-2H-isotiazol-3-ona.

Muestra S2: Sikaseal Masilla de silicona Antimoho especial sanitaria - 108 – blanco.

Contiene biocida DCOIT, 4,5-dichloro-2-octyl-2H-isothiazol-3-one (CAS 64359-81-5, TP 7 al 11).

Muestra S3: Ceys CEY400505540 Silicona Secado Xpress Stop Moho Blanca.

Contiene dos biocidas: OIT, también llamada Octilina (CAS 26530-20-1, 2-octil-2H-isotiazol-3-ona) y DCOIT, 4,5-dichloro-2-octyl-2H-isothiazol-3-one (CAS 64359-81-5, TP 7 al 11). Además dice utilizar una tecnología TLC que previene del crecimiento microbiano.

Muestra S4: Ceys 505570 Cinta selladora, Blanco.

En su etiquetado no se menciona el uso de biocidas.

Se han seguido las normas UNE EN 15651-3:2017 apartado 4.3.3 y EN ISO 846:1997.

Resultados

Tabla 21. Resultados de los ensayos realizados para sellantes y siliconas de resistencia frente a hongos

Resistencia frente a hongos		
Material	Réplicas	Evaluación
SELLANTE 1	1	1
	2	2
	3	2
	4	1
	5	2
	6	2
	7	2
	8	2
SELLANTE 2	1	1
	2	1
	3	2
	4	2
	5	2
	6	2
	7	1
	8	1

ANTIBACTERIANO

SELLANTE 3	1	1
	2	1
	3	1
	4	1
	5	1
	6	2
	7	1
	8	1
SELLANTE 4	1	X
	2	2
	3	2
	4	2
	5	2
	6	2
	7	2
	8	2

Conclusiones

Ninguno de los productos adquiridos ha evidenciado tener una resistencia al crecimiento frente a los hongos ensayados. La intensidad de crecimiento es relativamente baja pero no se detecta una correcta capacidad biocida.

CONCLUSIONES FINALES

De todos los materiales caracterizados en el presente proyecto, los metálicos son los que mejores prestaciones presentan frente a la contaminación microbiológica. Sin embargo, los materiales derivados de la madera, como son los tableros de fibras, así como los cerámicos y las resinas empleadas en la fabricación de superficies de carga mineral son susceptibles al crecimiento de bacterias y hongos. A no ser que el fabricante añada algún tipo de biocida que mejore claramente las prestaciones higiénicas del material.

En cuanto a los aditivos y pinturas con marcado carácter antimicrobiano, los conservantes químicos y biocidas que mayoritariamente se emplean en los productos ensayados han sido los DCOIT, 4,5-dichloro-2-octyl-2H-isothiazol-3-one (CAS 64359-81-5), IPBC, 3-iodo-2-propynyl butylcarbamate (CAS 55406-53-6), CMIT/MIT (CAS: 55965-84-9), BIT (CAS: 2634-33-5), DCMU, también llamado Diuron (CAS : 330-54-1), piritionato de zinc (CAS 13463-41-7), octilina (CAS 26530-20-1) y la plata (CAS 7440-22-4). Todos ellos, en mayor o menor medida presentan un buen espectro antimicrobiano como conservantes registrados, aunque según los resultados obtenidos destaca el efecto biocida del piritionato de zinc y la plata.

Los sellantes con capacidad biocida ensayados ninguno de ellos presenta una clara resistencia frente al crecimiento de hongos y mohos, ya que se observa un crecimiento visible del micelio sobre la superficie de la probeta de ensayo. Prácticamente, la totalidad de los sellantes empleados presentan en su composición octilina y DCOIT como fungicidas habituales, puede que su concentración o su estabilidad pueda estar relacionada con la efectividad antimicrobiana, variando entre diferentes formulaciones.

ANTIBACTERIANO

PAQUETE DE TRABAJO 2.- BÚSQUEDA Y EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS BIOCIDAS COMERCIALES DE ORIGEN NATURAL

Desde hace unos años, está aumentando la cantidad de empresas que se dedican a la extracción de productos naturales activos para comercializarlos con diferentes fines. En este paquete de trabajo se pretende estudiar la oferta de productos naturales con actividad de biocida, con el fin de adquirir los más interesantes para el desarrollo del proyecto.

Se ha realizado una búsqueda de los estudios realizados hasta la fecha de los extractos naturales con propiedades biocidas existentes en el mercado para poder adquirir los productos biocidas de origen natural (principalmente vegetales) con el perfil que mejor se adapte a los sustratos que van a ser evaluados en el presente proyecto y evaluar las propiedades antimicrobianas siguiendo la normativa vigente.

Tarea 2.1.- Búsqueda bibliográfica de los productos biocidas comerciales de origen natural

En esta tarea, se ha realizado una búsqueda bibliográfica para conocer la situación del mercado en cuanto a productos biocidas comerciales de origen natural se refiere. Para ello se ha realizado una recopilación de la bibliografía de interés sobre los productos de interés que se podrá utilizar para la realización del proyecto. De esta forma se ha generado una base de datos de artículos de interés científico, en la que se recopila la información de una forma sistemática, se ha empleado un gestor de citas bibliográficas conocido como MENDELEY (www.mendeley.com), que permite disponer de una forma directa de toda la bibliografía encontrada y estudiada por los diferentes participantes en esta tarea del proyecto.

Del estudio de todos los artículos científicos y publicaciones encontradas se puede concluir que actualmente en el mercado se encuentran una serie de insecticidas de origen vegetal como los fabricados en base de neem, semillas de toronja y ajo, entre otros; además de otras copias sintéticas como los neonicotinoides donde destaca el Imidacloprid.

Un buen biocida debe reunir varias condiciones importantes de las cuales destacan:

- Amplio espectro de actividad, es decir debe cubrir una amplia gama de microorganismos para el caso de un microbicida o de insectos para el caso de un insecticida.
- Efectivo a bajas concentraciones y en un amplio rango de pH.
- Solubles en agua.
- Poseer alta persistencia (ser efectivo a través del tiempo).
- Tener baja toxicidad humana (no debe ser perjudicial en su manipulación y resultar seguro para el operador).
- Baja toxicidad al medio ambiente.
- Bajo costo.

ANTIBACTERIANO

Productos naturales protectores para la madera

En la actualidad, debido a la creciente preocupación medioambiental, existe una tendencia al uso y aplicación de productos naturales basados en materias activas procedentes de la naturaleza, sin modificación química artificial. Estos productos tienen una buena imagen por su propio carácter natural, pero todavía no se dispone de una correcta información sobre su eficacia y viabilidad; de aquí que surja el interés de este proyecto.

Los procedimientos habituales para la protección de la madera, emplean sustancias químicas, como arseniato de cobre cromado (CCA) que se consideran tóxicas y pueden ser perjudiciales tanto para la salud humana como para el medio ambiente. Como consecuencia de problemas como estos existen productos naturales en el mercado para proteger la madera. Por ejemplo, una de las empresas encontradas que utiliza una ecología consecuente, empieza en la selección y obtención de las materias primas empleando aproximadamente 150 sustancias diferentes: materias primas renovables procedentes de cultivos ecológicos o sin restos de productos fitosanitarios, como aceites y resinas vegetales, ceras y plantas tintoreras; y materias primas procedentes de procesos de reciclaje, como pigmentos de óxidos de hierro.

Una de las limitaciones que impide el desarrollo de tecnologías que permitan extender el uso de los productos naturales para la protección de la madera es la retención de biocidas orgánicos dentro de los tejidos de madera impregnados y su susceptibilidad a la biodegradación por esto el proceso de investigación es lento. Varios estudios afirman que la adición de ciertos aditivos, como por ejemplo impregnantes, en combinación con biocidas orgánicos mejora la eficacia de los biocidas y su retención dentro de la madera, por lo que se han adoptado varios enfoques respecto a esto.

La impregnación con repelentes de agua también puede ser un medio eficaz para mantener la humedad fuera de la madera tratada con un biocida orgánico y así protegerla. Hay varios repelentes del agua como por ejemplo, formulaciones a base de cera, formulaciones a base de sílice a base de agua y a base de aceite, y ácidos de resina, que se han probado con resultados alentadores y algunos ya están disponibles comercialmente.

Extractos vegetales, aceites esenciales y otros derivados

Las plantas producen una serie de compuestos aromáticos y no aromáticos, algunos de los cuales son considerados agentes antimicrobianos que se han utilizado durante años para mejorar el aspecto y prolongar la vida útil de los productos de madera. Sin embargo, el uso de productos derivados de plantas disminuyó cuando se introdujeron compuestos sintéticos e inorgánicos, ya que demostraron ser más efectivos contra organismos que deterioran la madera. Pero ahora existe una necesidad apremiante de reemplazar los compuestos sintéticos e inorgánicos con biocidas orgánicos debido a su toxicidad.

La fracción principal de los aceites esenciales está constituida por compuestos **terpénicos**

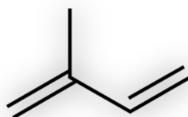


Figura 12. Estructura Terpenos

ANTIBACTERIANO

Existe una abundante literatura referida a la actividad biocida de los aceites esenciales y sus componentes individuales. Por ejemplo, los extractos de hojas de canela han mostrado ser efectivos contra los hongos y las termitas de descomposición de la madera y potencialmente pueden convertirse en excelentes conservantes orgánicos.

Tarea 2.2.- Selección y adquisición de productos biocidas comerciales de origen natural

Tras la búsqueda bibliográfica de productos comerciales biocidas a base de extractos naturales, se ha contactado con empresas que puedan ofrecer productos que formen un punto de partida en los estudios que se van a realizar para la aplicación sobre las superficies de materiales de interés para el proyecto. Se han adquirido una serie de productos a base de biocidas naturales de una empresa colaboradora que proporciona extractos de plantas locales en el territorio valenciano para su aplicación. Con estos productos se ha realizado los primeros ensayos preliminares para evaluar la capacidad antimicrobiana de estas especies y escoger los productos más apropiados.

Se han realizado los ensayos preliminares utilizando el método de halo de inhibición ya que se quiere comprobar la acción biocida de los productos adquiridos. Los extractos naturales provienen de plantas tales como el tomillo, el romero, la lavanda, el eucalipto, el árbol de té, el cedro, la citronela y de la canela. El producto biocida viene distribuido en forma de microcápsulas sólidas.

En los primeros ensayos, se pudo observar una gran dificultad para preparar las muestras y ser dosificadas ya que no se obtuvo una dispersión homogénea de estas. Además, la problemática se agravó al realizar el ensayo por el método de inhibición, quedando inhabilitado el ensayo. Se buscaron alternativas para mejorar la dispersión y finalmente, se seleccionaron nuevos productos con mejor comportamiento en disolución. Se repitieron los ensayos con estos nuevos biocidas y se obtuvieron resultados favorables.

Los ensayos preliminares se realizaron frente a una cepa de hongos (*A. niger*). En especial, en una de las sustancias, se pudo observar un halo de inhibición considerable, lo cual indica su poder biocida. Estos resultados son alentadores y marcan el inicio de las investigaciones.

Se muestra, a continuación, las imágenes del ensayo favorable del poder biocida de los extractos naturales adquiridos frente a un ensayo sin actividad antimicrobiana. Se realizaron tres replicas frente a *A. niger*.

ANTIBACTERIANO

PAQUETE DE TRABAJO 3.- BÚSQUEDA, EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS BIOCIDAS DE ORIGEN NATURAL

Tarea 3.1. Búsqueda bibliográfica de extractos naturales adecuados, Tarea 3.2. Selección y extracción de los extractos naturales y Tarea 3.3.

En este paquete de trabajo se prestó atención a los distintos extractos biocidas de origen natural haciendo especial hincapié en aquellas plantas que se puedan recolectar en la Comunidad Valenciana. También se atendió al posible mecanismo de acción hacia las bacterias. Se hizo una pequeña introducción a los distintos mecanismos de la propia bacteria cuando lleva a cabo la formación del biofilm y qué posibles soluciones nos dan estos extractos para interrumpir esa formación. Una vez estudiados, se propusieron distintos métodos de extracción para poder obtener una mayor cantidad del compuesto deseado en la planta, ya que eligiendo un método u otro, obtendremos distintos compuestos ya que hay componentes de la matriz que interaccionan con el eluyente. Por último se hizo una pequeña introducción a las distintas vías de posible incorporación a la superficie en cuestión ya sea mobiliario de cocina, plato de ducha, baños y puertas de hospitales, etc. que posean un cierto riesgo a la proliferación bacteriana.

La idea inicial de este entregable fue el hecho de seleccionar extractos naturales y recopilar información de las diferentes técnicas de extracción que anteriormente se habían utilizado para esos extractos que posean carácter antibacteriano. Se realizó una búsqueda de las técnicas más comunes y también de las más novedosas. De entre todas ellas, se valoraron la **metodología Soxhlet**, ya que se disponía del material en AIDIMME y es una técnica muy frecuente en la extracción de aceites esenciales y la extracción con **fluidos supercríticos con CO₂**, debido a que en este tipo de extracciones se obtiene un mayor rendimiento y es mucho mejor porque no se utilizan compuestos medioambientalmente dañinos como hexano o ester de petróleo, en la separación de los compuestos de la matriz vegetal.

Posteriormente se ha profundizado en temas como las etapas previas a la formación de un biofilm, la interacción que los extractos naturales tienen cuando se aproximan a una superficie colonizada, o que va a ser colonizada por las bacterias, y la posibilidad de añadir una sustancia encapsulante, ya que una incorporación directa del extracto natural a la superficie conduce a un poca durabilidad del mismo en la superficie, ya que la ventaja que nos proporciona la micro encapsulación es que el extracto queda atrapado en el interior de la microcápsula y proporciona una liberación controlada.

Lo primero que se realizó fue una búsqueda de los diferentes procesos que sufre un material, hasta que la bacteria colonice su superficie. Se ahondo en los procesos de formación de biofilm y posteriormente en los diferentes tipos de motilidad bacteriana, que se clasifican en 6 tipos. Apareció el término quorum sensing, percepción del cuórum, que es el que hace posible que una vez se colonice una parte de la superficie, las bacterias puedan ir a colonizar una mayor parte de la superficie. Este trabajo es clave para poder entender cómo actúan los diferentes extractos naturales, ya que intervienen en los procesos de formación del biofilm, que hacen posible que no se lleven a cabo.

ANTIBACTERIANO

Una vez hecho esto, se hizo un listado de los diferentes extractos naturales, y los dividimos en 4 tipos. **Los aceites esenciales, los compuestos fenólicos, isotiocianatos y las lectinas.** Aunque en este entregable se centre más en los aceites esenciales.

De entre los diferentes aceites esenciales, se está testeando su carácter antibacteriano con diferentes extractos naturales ya microencapsulados en fase de prueba como son **la lavanda, el tomillo, el romero, el cedro, la canela, el eucalipto, la citronella y el citrodiol.**

También se ha valorado la posibilidad de probar con **la granada**, ya que es conocido su carácter antibacteriano, y una planta de la comunidad valenciana como es la ***Melia azedarach***.

Con todo esto se ha reunido la suficiente información para poder decir que los extractos naturales son una verdadera fuente antibacteriana y que se deberían llevar a cabo posteriores proyectos, en los que el principal objetivo será el de utilizar las técnicas de micro encapsulación, y los materiales encapsulantes adecuados, para que estos extractos perduren en la superficie y no pierdan eficacia. Es por ello que en este entregable se ha elaborado una pequeña introducción de las diferentes técnicas de micro encapsulación disponibles y así en un futuro proyecto elegir alguna de estas técnicas.