

2019/
2020

ANTIBACTERIANO

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

Nº Expte: IMDEEA/2019/6

Programa: PROYECTOS DE I+D EN COOPERACIÓN CON EMPRESAS

Breve descripción.

En el presente informe se han recopilado las actividades realizadas y los resultados obtenidos durante el segundo 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



En esta segunda y última anualidad del proyecto ANTIBACTERIANO se han finalizado todos los Paquetes de Trabajo y Tareas del proyecto, tal y como estaba previsto. Se ha finalizado la Tarea 2.3, que empezó en la primera anualidad, así como los Paquetes de Trabajo 3 y 4, correspondientes a la parte técnica y los Paquetes de Trabajo 5, 6 y 7, de Difusión, Transferencia y Coordinación, respectivamente.

A continuación se describen las tareas realizadas.

Paquete de Trabajo 2.- Búsqueda y evaluación de los productos biocidas comerciales de origen natural

Durante la primera anualidad del proyecto, se empezaron y finalizaron las Tareas 2.1 y 2.2 del presente Paquete de Trabajo. Durante estas tareas se realizó una búsqueda bibliográfica de los productos biocidas comerciales de origen natural y se seleccionaron y adquirieron los productos biocidas de origen natural. También se empezó la Tarea 2.3 de caracterización de dichos biocidas, la cual se ha finalizado en esta última anualidad.

Tarea 2.3.- Caracterización de los biocidas adquiridos

Tras la búsqueda bibliográfica de productos comerciales biocidas a base de extractos naturales, se contactó con empresas que pudieran ofrecer productos que formaran un punto de partida en los estudios que se iban a realizar para la aplicación sobre las superficies de materiales de interés para el proyecto. Se adquirieron una serie de productos a base de biocidas naturales de una empresa colaboradora, LAURENTIA TECHNOLOGIES. Entre sus servicios se encuentra la microencapsulación de extractos de plantas locales para su aplicación en distintos materiales. Con estos productos se realizaron los primeros ensayos preliminares para evaluar la capacidad antimicrobiana de estas especies y escoger los productos más apropiados.

Para la caracterización de los biocidas adquiridos, se tuvo en cuenta tanto la naturaleza química del biocida en cuestión, así como el soporte final donde se iban a aplicar, llegando a un compromiso para la evaluación de la sensibilidad de estos biocidas a base de extractos naturales frente a distintos microorganismos.

BIOCIDAS ADQUIRIDOS

Inicialmente, se recibió por parte de la empresa, una primera partida de una serie de productos a base de aceites esenciales de diversos extractos naturales vegetales, realizando un proceso de encapsulamientos para ser comercializados en formato polvo sólido. Tras ensayar estos en el laboratorio de microbiología, se adquirieron nuevos productos, con el objeto de mejorar para cada caso las propiedades antimicrobianas o solventar los problemas que se encontraban en el laboratorio.

- 1) Primera partida: POLVO. Aceites encapsulados en sílice.
 - a) Aceite de eucalipto
 - b) Aceite de cedro
 - c) Aceite de Lavanda

- d) Aceite de Citronela
 - e) Árbol de Té
 - f) Aceite de Tomillo
 - g) Aceite de Romero
- 2) Segunda Partida: polvo. Encapsulados en ciclodextrina
- a) Aceite de Tomillo
 - b) Aceite de Canela
 - c) Aceite de Citrodiol

Además se recibió una emulsión con encapsulado en sílice para diversas aplicaciones:

- d) Mezcla de aceites de tomillo y romero
- 3) Tercera partida: emulsión y polvo de aceite de canela o de aceite de tomillo. Dispersante comercial adecuado para las muestras según recomendaciones de la empresa.

Métodos estandarizados para el estudio de la sensibilidad a antifúngicos

En el proyecto se evaluó especialmente la capacidad antifúngica de los biocidas adquiridos. Por ello, se tomó como referencia lo descrito por la Asociación Española de Micología en el Capítulo 15 de la Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. En ella, se siguen los métodos del CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) y se especifican algunos de los parámetros de los ensayos con hongos para los métodos tanto de difusión así como de dilución.

El CLSI es una organización americana homologada que promueve el desarrollo de estándares, acreditado por el ANSI (American National Standards Institute) para ello. Este comité ha publicado una serie de métodos de ensayo estandarizados, que sirven de guía a nivel mundial para muchos de los ensayos clínicos antibacterianos y antifúngicos. Por otra parte, a nivel europeo, en los 1990 se fundó el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), cuya función principal es el desarrollo de estándares para ensayos in vitro de sensibilidad a antimicrobianos. Este comité recoge tanto las metodologías preexistentes en Europa, así como los procedimientos de otros organismos no europeos como el CLSI. En cuanto a los procedimientos estandarizados de sensibilidad antimicrobiana se refiere, el EUCAST publicó una metodología que modifica lo descrito por el CLSI para automatizar la determinación de los resultados, al sustituir la lectura visual por la espectrofotométrica y reducir el tiempo necesario para la obtención de alguno de los resultados de 48 a 24h (bacterias y levaduras).

En general, el método estandarizado más utilizado es la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC o CMI por sus siglas en inglés), tanto a través de la microdilución así como la macrodilución. Para la determinación de la sensibilidad de levaduras ante antifúngicos se sigue el método M27-A3 y el M38-A para los hongos filamentosos. También se ha estandarizado el método de difusión en disco, que agiliza y facilita la obtención de la sensibilidad a antifúngicos (método M44-A). En este último, se estudia la sensibilidad en función del halo de inhibición producido por la difusión del antimicrobiano en un medio de cultivo sólido. Este procedimiento, también llamado directamente halo de inhibición, es un

método cualitativo pero existe una correlación entre éste y el CMI, obteniéndose resultados S-I-R (Sensible, Intermedio, Resistente al antimicrobiano) para la respuesta de microorganismos a biocidas muy estudiados, como pueden ser las bacterias y levaduras *Candida spp.* A estos valores, se le pueden aplicar un criterio de interpretación o punto de corte según la medida del halo de inhibición:

- Para halos mayores a 20 mm, categoría sensible al agente microbiano. La interpretación del MIC en este rango es que no lleva implícito el éxito terapéutico, pero es un punto de corte por el cual se considera que el agente tiene una actividad antimicrobiana.
- Halos de entre 15 a 19 mm, categoría intermedia. Este rango incluye a aquellas cepas susceptibles a que, en concentraciones algo más elevadas de agente antimicrobiano dosificado, puedan ser inhibidas.
- Menores a 14 mm, categoría resistente. En el MIC, esta categoría se correlaciona con un 60% de fracaso terapéutico. No son inhibidas por la concentración dosificada, o bien generan una resistencia (por ejemplo al antibiótico) y sirve de punto de corte para determinar la concentración del agente biocida por la que no tiene capacidad antimicrobiana.

En el caso del presente estudio, se ha escogido el método del halo de inhibición (M44-A) con algunas de las modificaciones descritas por el EUCAST y lo indicado en el método M27-A3. Con este procedimiento se obtienen resultados cualitativos suficientemente sensibles para el objeto de la evaluación, ya que se van a ensayar biocidas, a base de extractos naturales encapsulados con sustancias mesoporosas que permiten la dosificación gradual de los agentes antimicrobianos, frente a especies microbianas diana de los materiales de estudio (fúngicos, en especial, que proliferan en superficies como encimeras, platos de ducha etc.). Debido a la naturaleza química de las microcápsulas, pueden presentar dificultades a la hora de la micro/macrodilución y sería favorable evaluar la acción biocida que tienen con la ayuda de un soporte (el disco).

En el Entregable 2.1, se detalla dicho método, que es utilizado para antibióticos y biocidas comerciales, siendo estos administrados con una concentración determinada. Esta norma se adecuó a los productos biocidas adquiridos.

Cepas utilizadas y rectas de calibrado de densidad óptica-UFC

Las cepas de hongos utilizadas y preparadas con una concentración de $1 \cdot 10^6$ UFC/ml utilizando la técnica de espectrofotometría se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de los hongos inoculados para la realización de los ensayos microbiológicos

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
<i>Aureobasidium pullulans</i>	CECT 2703

En el documento de referencia (Asociación Española de Micología en el Capítulo 15 de la Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica), se recomienda realizar una recta de calibrado del resultado obtenido por la técnica espectrofotométrica (Densidad óptica) y la UFC para cada especie de hongo (ya que puede variar enormemente de uno a otro). La UFC se realiza obteniendo un recuento en placa de las colonias visualizadas para las diluciones seriadas de la solución de esporas. La densidad óptica es determinada midiendo una cantidad de diluciones seriadas de dicha solución de esporas en el espectrofotómetro disponible en el laboratorio. La curva de calibrado se utiliza a partir de este punto, para determinar la concentración de la solución de esporas de cada especie de hongo a inocular en las placas de ensayo.

A continuación se detalla el protocolo utilizado, de manera general:

- Se prepara el inóculo según lo descrito en el método de microdilución en caldo para hongos filamentosos (M38-A), que se detalla a continuación. Para facilitar la recogida de conidios de las especies filamentosas, se introduce el asa de cultivo en Tween 20 y se pasa por encima de los conidios. Después se resuspende lo recogido en una solución salina (0,85%NaCl) previamente esterilizada. Se agita vigorosamente con la ayuda de un agitador vórtex y se deja sedimentar las partículas durante 5 minutos. Se recoge el sobrenadante y se agita durante 15 segundos comprobando que no se ha arrastrado micelio. En este caso, se recogen aproximadamente 9 ml de la solución de esporas. Por cada especie de hongo, se utiliza una placa de crecimiento.
- Se hacen dos lotes de la misma partida de disolución de esporas ya que se requiere una concentración muy elevada para que la curva de calibrado sea significativa (DO suficiente rango de sensibilidad con el espectrofotómetro) pero muy diluida para poder obtener una UFC lo suficientemente baja para el recuento en placa.
- Para la D.O. se pipetea un volumen adecuado para poder rellenar la cubeta desechable de 1 cm del espectrofotómetro y hacer las diluciones seriadas pertinentes (1, 1/2, 1/4, 1/8, etc. y si fuese preciso 1/100, 1/1000). Se determina la absorbancia a 530 nm en el espectrofotómetro disponible en el laboratorio.
- Para la determinación de la UFC, se pipetea el volumen requerido directamente de la disolución de esporas para preparar en tubos esterilizados diluciones seriadas desde $\cdot 10^{-1}$

hasta $\cdot 10^{-7}$. Se rotulan los tubos y se inoculan las placas Petri con PDA con 0,1 ml de cada disolución. Tras 48 horas se realiza la lectura de las placas, ya que a las 24 horas no se ha alcanzado el crecimiento óptimo. Se realizan los cálculos adecuados con los valores obtenidos en el recuento de placas para determinar las unidades formadoras de colonias presentes en la disolución madre.

- Una vez determinadas la DO y la UFC de cada especie, se correlacionan los dos parámetros utilizando el ratio de dilución realizado, obteniéndose una recta de calibrado en la zona donde el crecimiento aún no es exponencial.

- Con la ecuación de la recta de calibrado, se determina el rango de DO donde la UFC será equivalente a $1-5 \cdot 10^6$ UFC/ml (o lo que es lo mismo, la disolución al 0,5 McFarland).

Estas curvas de calibrado se realizaron para cada cepa de hongo de la Tabla 1. El protocolo específico para cada uno de ellos se detalla en el Entregable 2.1.

Como ejemplo, se muestra la Figura 1, en donde se puede observar la preparación la solución de algunas de las esporas estudiadas.

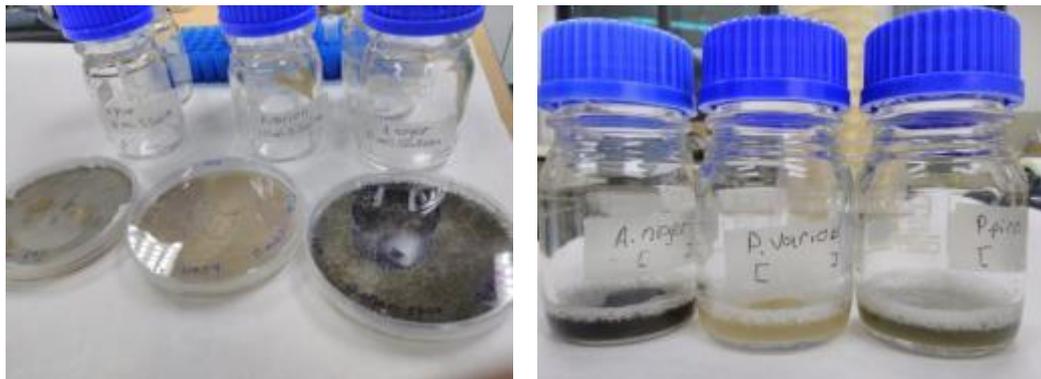


Figura 1. Preparación de la solución de esporas

Así como la Figura 2, que muestra el recuento en placa para la solución de esporas de *Aspergillus niger*, a diluciones seriadas, con el fin de determinar las UFC/ml de disolución y obtener la recta de calibrado representando gráficamente estos valores con los obtenidos a través de la técnica espectrofotométrica.

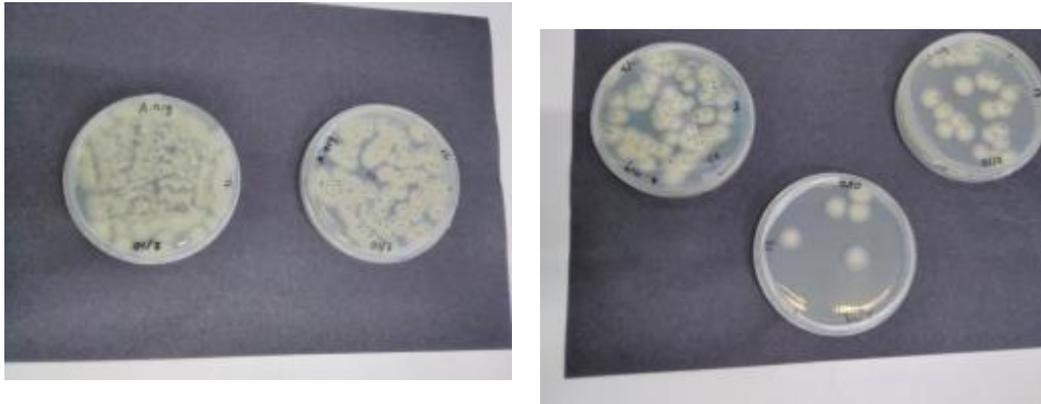


Figura 2. Recuento en placa de la UFC para las diluciones de la solución de esporas de *A. niger*.

La recta de calibrado para el *Aspergillus niger* obtenida se observa en la Figura 3:

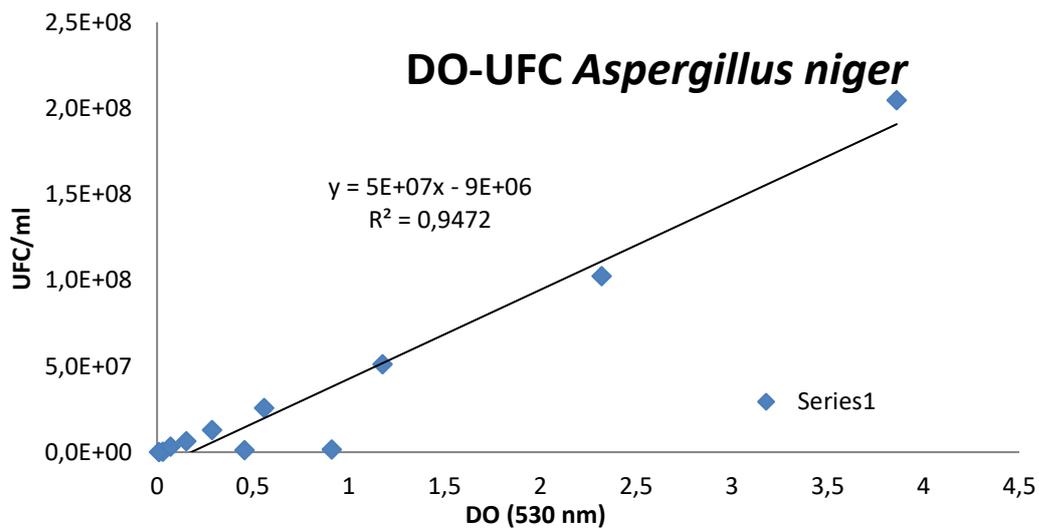


Figura 3. Recta de calibrado para determinar la concentración de la solución de esporas de *Aspergillus niger* por la técnica espectrofotométrica

Finalmente, con la recta de calibrado, se obtiene un rango de densidad óptica para la concentración de esporas deseada para los ensayos (Tabla 2). Además, se compara el valor del laboratorio AIDIMME con el planteado en la Guía de referencia de Micología (106).

Tabla 2. Rango de la Densidad óptica (espectrofotómetro) para la concentración de la solución de esporas de *A. niger* deseada para los ensayos microbiológicos. Incluye el rango que aparece en el documento de referencia

HONGOS	UFC/mL	RANGO DO	REFERENCIA DO
<i>Aspergillus niger</i>	1-5 X 10 ⁶	0,140-0,220	0,1-0,42

Ensayos preliminares

Se realizaron ensayos preliminares utilizando el método de halo de inhibición para 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 y de la citronela. El producto biocida viene distribuido en forma de microcápsulas sólidas, como se observa en la Figura 4.



Figura 4. Microcápsulas (encapsuladas con sílice) sólidas de extractos naturales

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 éstas. Se utilizaron una serie de productos seleccionados de la primera partida de biocidas. Además, la problemática se agravó al realizar el ensayo por el método de inhibición, quedando invalidado el ensayo. Se utilizó inicialmente un dispersante comercial frecuentemente utilizado para la preparación de esporas de muestras de hongos, a bajas concentraciones. Al no obtener resultados (todas las probetas mostraron crecimiento similar al control positivo), y observar que el sólido no se había dispersado en el disco, se dedujo que el problema radicaba en la mala dispersión del biocida en el medio de cultivo. Se buscaron alternativas para mejorar la dispersión y finalmente, se seleccionaron nuevos productos con mejor comportamiento en disolución.

Se adquirió entonces la segunda partida de biocidas de la misma empresa. Se repitieron los ensayos con estos nuevos biocidas y se obtuvieron resultados favorables.

En la Figura 5 se muestra la imagen de las placas Petri de ensayo, tras la inoculación y aplicación del biocida (momento justo anterior a la incubación).

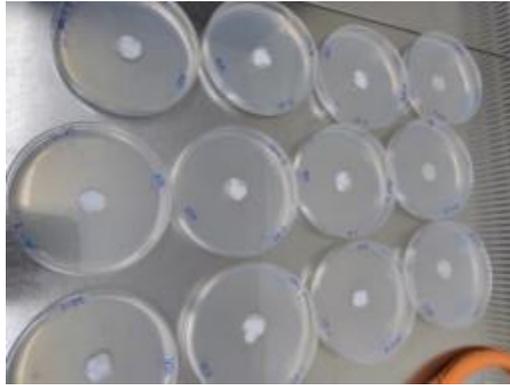


Figura 5. Ensayo actividad antimicrobiano- preliminar frente a *Aspergillus niger*. Biocida: microcápsulas de aceites esenciales de canela, tomillo y citrodiol de β -ciclodextrina y una emulsión tomillo-romero encapsulado en sílice.

En este caso, las muestras proceden de extractos de tomillo, canela y citrodiol encapsuladas con β -ciclodextrina. Además, también se ensaya frente a una emulsión de extractos de tomillo y romero (sílice) en disolventes acordes según la empresa para la aplicación en superficies sólidas como la madera. Las muestras corresponden a la segunda partida de microcápsulas adquiridas.

En los ensayos preliminares se realizaron tres replicas frente a una cepa de hongos (*Aspergillus niger*). En especial, en una de las sustancias, la correspondiente al aceite esencial de canela, 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, en la Figura 6, las imágenes del ensayo favorable del poder biocida de los extractos naturales adquiridos (extracto de canela y de tomillo, ambos con β -ciclodextrina). Se puede observar la ausencia de halo en las muestras donde el agente biocida no ejerce actividad antimicrobiana, frente a la presencia de halo de inhibición indicando cierta acción antifúngica.

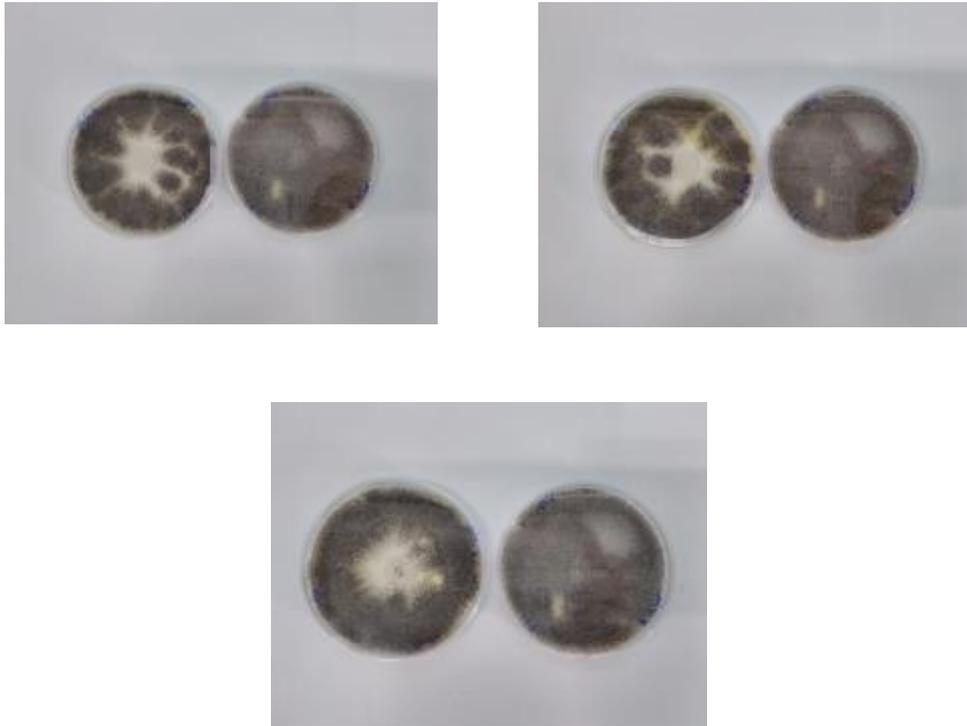


Figura 6. Halo de inhibición frente a *Aspergillus niger*. Ensayos preliminares, distintas concentraciones para canela (izquierda) y tomillo (derecha) microcápsulas con β -ciclodextrina

Después de los ensayos preliminares, se pide la tercera partida de biocidas a base de extractos naturales a la misma empresa, mejorando las características de estos y optimizando los ensayos. Esta tercera partida de productos biocidas se basa especialmente en el aceite de canela (cinamaldehído) y el aceite de tomillo para demostrar su efecto antimicrobiano en un ensayo más extenso con distintas especies de hongo.

Ensayos para los microorganismos diana con distintas microcápsulas

Se seleccionaron en particular las microcápsulas con canela (cinamaldehído) debido a que, en los ensayos preliminares, se obtuvieron con ellas mejores resultados.

Uno de los mayores problemas que se encontraron fue la difusión de las microcápsulas en el agar, probablemente debido a la incompatibilidad del encapsulado inicial de sílice. Por lo que, finalmente, se optó por un encapsulado con α -ciclodextrina. Según recomendación de la empresa proveedora, este tipo de encapsulado, mejora la dispersión en base acuosa. Además, se adquirieron emulsiones de las microcápsulas con una mejor dispersión en agua debido a la acción de un surfactante no iónico comercial (BYK), así como el producto en polvo y con un recubrimiento especial para la aplicación en resinas y disolventes.

Tras valorar los resultados de los ensayos preliminares donde se evaluaron diversos aceites esenciales microencapsulados, se adquirieron los productos detallados en la Tabla 3.

Tabla 3. Productos seleccionados para la comprobación del efecto biocida de las microcápsulas a base de extractos de canela y tomillo.

FORMATO	CANELA-CINAMALDEHÍDO		TOMILLO	
EMULSION (APLICACIÓN DISOLUCIÓN EN AGUA)	Al 2,2% encapsulado en α -ciclodextrina	2-E-CD	Al 3% encapsulado en α -ciclodextrina	1-E-CD
	Al 3% encapsulado en α -ciclodextrina	2-E-CD-3		
SÓLIDO (APLICACIÓN DISOLUCIÓN EN RESINAS Y DISOLVENTES)	Al 2,2% encapsulado en α -ciclodextrina	2-S-CD-SR	Al 4,4% encapsulado en sílice con recubrimiento adicional	1-S-SI-R
	Al 2,2% encapsulado en α -ciclodextrina con recubrimiento adicional	2-S-CD-R		

Para los ensayos de determinación del halo de inhibición en agar de los biocidas adquiridos frente a distintas especies de hongos, se escogió la emulsión de canela (al 2,2%) encapsulado en α -ciclodextrina (15% p/p del sólido), **2-E-CD**, y de tomillo (al 3%) encapsulado en α -ciclodextrina (16,3% p/p del sólido), **1-E-CD**.

La metodología utilizada se basa en lo descrito para la difusión en disco (halo de inhibición) de los ensayos clínicos para la determinación de la sensibilidad a antifúngicos. No obstante, se añadió un apartado al método, debido a que los discos con la solución del biocida no vienen preparados comercialmente.

Por lo demás, se sigue lo detallado previamente en el apartado donde se especifica el método de difusión en agar.

CINAMALDEHÍDO (CANELA)

En primer lugar, y antes de analizar los productos encapsulados 2-E-CD se ensayó su sustancia activa, el cinamaldehído, sin encapsular, la cual fue proporcionada por la empresa de fabricación de las microcápsulas.

Se realizaron tres concentraciones distintas del cinamaldehído, adicionando un 1% (p/p) de Tween 20 en el agua esterilizada utilizada para obtener las diluciones. Se obtuvieron las muestras al 2%, 5% y 10% de cinamaldehído. Para poder conocer el porcentaje de compuesto activo que genera un efecto biocida.

Se realizaron los ensayos de comprobación de la misma manera que se describió para las muestras del biocida microencapsulado. Se ensayaron los cinco hongos por separado, con una réplica cada una, a una concentración de $1 \cdot 10^6$ UFC/ml. Las placas Petri se inocularon con 100 μ l de cada especie de hongo. En un principio se quería adicionar 100 μ l de las muestras de cinamaldehído pero, debido a que la mezcla es muy acuosa, se adicionaron 80 μ l, lo que

permitió que el disco se encontrara completamente empapado sin derramar la muestra fuera de éste.

Los resultados compilados en la Tabla 4, muestran que en todas las concentraciones existe la presencia del halo de inhibición. La lectura de las placas se realiza a las 48 horas ya que a las 24 horas los hongos no se encuentran en un estado de crecimiento maduro.

Tabla 4. Resultados de los ensayos del cinamaldehído a distintas concentraciones.

HONGOS- CANELA		2%	5%	10%
<i>Chaetomium globosum</i>	Ø disco (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)
Réplica 1	18	29,11	40,90	43,20
<i>Trichoderma virens</i>	Ø disco (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)
Réplica 1	18	7,86	19,98	21,57
<i>Aspergillus niger</i>	Ø disco (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)
Réplica 1	18	12,22	19,33	27,10
<i>Penicillium pinophilum</i>	Ø disco (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)
Réplica 1	18	32,03	41,46	45,79
<i>Paecilomyces variotii</i>	Ø disco (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)
Réplica 1	18	33,73	41,22	48,83

Microcápsulas 2-E-CD

En el caso de las microcápsulas 2-E-CD se realizaron tres replicas por cada hongo y concentración.

Según norma UNE EN ISO 20776-1, al menos se ha de valorar tres concentraciones de la solución biocida para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana. Por lo que se ha tomado una concentración inicial y se ha diluido a la mitad cada vez, obteniendo concentraciones de 1, 1/2, 1/4 y de aceite esencial de 2,2%, 1,1% y aproximadamente 0,6% (2-E-CD, 2-E-CD' Y 2-E-CD'')

Las diluciones se han preparado con agua esterilizada y en tubos estériles. Además se realizan controles negativos (sin inoculación) y controles positivos para cada cepa de hongo.

Se comprueba que tras 24 horas de incubación, el crecimiento de los hongos no es lo suficiente maduro como para realizar la lectura. Pero, como se observa en la Figura 7, ya es posible distinguir el halo de inhibición. Por tanto, y según lo recomendado en la Guía de

referencia de Micología (106), se dejan en incubación las placas durante otras 24 horas más. Se realiza la lectura de los resultados del ensayo microbiológico a las 48 horas.

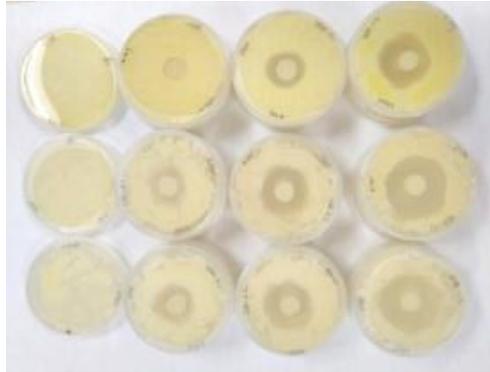


Figura 7. Incubación de las placas a las 24 horas

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos con el producto biocida 2-E-CD a distintas concentraciones. También se observó la evolución del halo a las 72 horas para ver las diferencias. Estos valores no se han incluido ya que no aportan mayor información. Se detectó en alguna de las placas, un efecto fungistático, que no afecta a los valores del halo pero se hace mención de ello con un asterisco.

Tabla 5. Resultados obtenidos de los ensayos realizados para biocida de extracto natural de canela 2-E-CD frente a las distintas especies de hongos. (*) Efecto fungiestático

HONGOS- 2-E-CD		2DE- 1	2DE-2	2DE-3
<i>Chaetomium globosum</i>	Ø disco (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)
Réplica 1	16	16,23(*)	16	3,75
Réplica 2	16	19,83(*)	12,76	6,19
Réplica 3	16	19,27	12,53	7,82
Media	16	18,44	13,66	5,92
<i>Trichoderma virens</i>	Ø disco (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)
Réplica 1	16	8,76	4,77	2,98
Réplica 2	16	12,13	4,31	1,37
Réplica 3	16	11,36	6,27	3,97
Media	16	10,75	5,12	2,77
<i>Aspergillus niger</i>	Ø disco (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)
Réplica 1	14	15,62	12,37	3,9
Réplica 2	14	13,47	5,29	5,2
Réplica 3	14	18,27(*)	10,9	2,8
Media	14	15,79	9,52	3,97
<i>Penicillium pinophilum</i>	Ø disco (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)
Réplica 1	17	29,81	4,01(*)	3,8(*)
Réplica 2	17	37,29	16,53(*)	3,63(*)
Réplica 3	17	34,53	16,47	1,44
Media	17	33,88	12,10	2,96
<i>Paecilomyces variotii</i>	Ø disco (mm)	W (mm)	W (mm)	W (mm)
Réplica 1	17	27,44	18,07(*)	4,85(*)
Réplica 2	17	27,29	7,93(*)	2,7(*)
Réplica 3	17	27,25	10,3	4,02
Media	17	27,33	12,10	3,86

Microcápsulas 1-E-CD

Con las microcápsulas de tomillo 1-E-CD se procedió de manera análoga a lo descrito para las muestras 2-E-CD. Para determinar la actividad antifúngica del biocida, se ensayó la concentración de la muestra directa y se realizaron dos replicas.

Tras 48 horas de incubación, no se observó halo de inhibición, por lo que no se muestra tabla con resultados. A esta concentración ensayada, el biocida de tomillo no tiene la suficiente actividad antifúngica como para frenar el crecimiento de los distintos hongos diana del estudio, por lo que no son lo suficientemente eficaces a concentraciones similares a las del 2-E-CD.

Conclusiones

Las microcápsulas de canela tienen un efecto biocida adecuado frente a los distintos hongos. Según los valores obtenidos en este ensayo, la concentración de 2,2% del cinamaldehído produce una actividad antimicrobiana suficiente. El biocida es capaz de inhibir el crecimiento de los hongos ensayados y además en muchos de los casos se observa un efecto fungistático. Las microcápsulas al 1,1% de agente biocida, según los resultados obtenidos en los ensayos, no ejercen un efecto inhibitorio del crecimiento suficiente como para adicionarlo en aplicaciones antimicrobianas.

En cuanto a las microcápsulas de tomillo, los resultados obtenidos en los ensayos de difusión en agar (halo de inhibición), muestran que no son favorables para su uso como biocida frente a los microorganismos diana del estudio. Es posible que tenga un efecto antibacteriano que podría ser de interés en otros ámbitos de aplicación fuera del alcance de este presente estudio.

Paquete de Trabajo 3.- Desarrollo de procedimientos de aplicación

Superficies de estudio

Las superficies objetivo del presente proyecto son materiales tipo sanitarios tales como platos de ducha, lavabos, así como encimeras etc., donde las propiedades antimicrobianas son de especial interés, debido a su uso y en contacto con humanos y alimentos. Algunos de los materiales comúnmente utilizados en estos casos son los recubrimientos de Gel Coat y Solid Surfaces, que poseen grandes prestaciones, y se utilizan cada vez más en las superficies objeto del proyecto. Es por todo ello, que se eligieron como los recubrimientos a estudiar y caracterizar con los biocidas.

Se utilizaron 5 tipos de recubrimientos: 4 de Gel Coat y 1 Solid Surface, y se intentó encontrar un proceso estándar de aplicación de partida para todos, si bien es necesario realizar ajustes para cada formulación.

Las muestras empleadas para el estudio han sido proporcionadas por las cuatro empresas colaboradoras en el proyecto (Tabla 6).

Tabla 6. Superficies de estudio proporcionadas por cuatro empresas colaboradoras en el proyecto

Muestra	SIGLAS
Gel coat Poliéster empresa 1	GC1-PET
Gel coat Poliuretano empresa 1	GC1-PU
Gel coat Poliéster empresa 2	GC2-PET
Gel coat Poliuretano empresa 3	GC3-PU
Solid surface empresa 4	SS4

En este Paquete de Trabajo, se seleccionaron las mejores formulaciones en cuanto aspecto estético para realizar la caracterización básica de sus propiedades, en el Paquete de Trabajo 4.

Aplicación y curado de las superficies Gel Coat (control-sin biocida)

Para el caso del Gel Coat, existen distintas técnicas. El Gel Coat puede ser aplicado con pistola, rodillo o brocha. Para obtener mejores resultados, se recomienda la aplicación con pistola, ya que permite la laminación de capas de mayor uniformidad y espesor. En nuestro caso se utilizó dos aplicadores manuales ya que la aplicación era a pequeña escala y con necesidad de obtener un espesor uniforme en la aplicación del mismo: un multi-aplicador de 100 mm de ancho de hoja para espesores de 0 – 100 μm y un aplicador manual cilíndrico universal Baker de 0 - 25 mm (Figura 8).



Figura 8. Multi-aplicador de 100 mm de ancho de hoja 0 – 1000 μm (izq.). Aplicador Universal Baker, 0 a 250 μm , ancho 50 mm (dcha.).

Para la aplicación del Gel Coat se utilizó, en general, láminas de teflón. No obstante hubo recubrimientos que resbalaban del teflón secando de forma uniforme y creándose abultamientos, en estos casos, los recubrimientos se aplicaron en placas de vidrio (Figura 9).



Figura 9. Extensión completa del recubrimiento sobre papel de teflón (izq.) y vidrio (dcha.) empleando el aplicador universal Baker.

Muestra GC1-PET

En primer lugar se aplicó un Gel Coat de poliéster (PET). El poliéster necesita parafina para secar, por lo que se añadió un 3% de la misma y un catalizador de peróxido al 2%. Para la aplicación de este recubrimiento se utilizó un aplicador manual de película donde gracias a la regulación de la ranura, se escogió un gramaje de 800 g/m², y se extendió sobre una lámina de teflón y sobre una placa de vidrio. A esta muestra se le denomina GC1-PET.

- Resina poliéster m = 100 g
- Catalizador m = 2 g
- Parafina m = 3 g
- Gramaje m = 800 g/m²
- Tiempo de secado t = 24-48 h.
- Espesor e = 800 μm.

Tras el proceso de aplicación y tratamiento del recubrimiento, la muestra se corta en cuadrados de 4 x 4 cm, de acuerdo a los ensayos de microbiología, ya que es el mayor tamaño en el que se puede trabajar con la instrumentación utilizada (Figura 10). Dichas muestras se despegan de la lámina de teflón con la ayuda de un cúter o un instrumento tipo pala, plano y con puntas.



Figura 10. Aplicación acabado PU sobre lámina de teflón, despegue y corte.

Muestra GC1-PU

Este recubrimiento se trata de un acabado de resina de poliuretano más catalizador al 50%, los cuales fueron pesados por separado y posteriormente se mezclaron y removieron hasta conseguir una mezcla uniforme. Por último, la mezcla fue expandida, tanto sobre una placa de vidrio como en una lámina de teflón, con ayuda del aplicador cilíndrico dado que el gramaje en este caso fue de 250 g/m².

- Resina poliuretano m = 80 g.
- Catalizador m = 40 g.
- Gramaje m = 250 g/m²
- Tiempo de secado t = 24-48 h.
- Espesor e = 250 μm.

Muestra GC2-PET

El siguiente acabado se trataba de otro Gel Coat de una marca diferente a la anterior resina de poliéster, que se preparó en láminas de teflón y de vidrio. En este caso, la proporción del catalizador se trataba de un 2% así que se añadió 100 g del acabado de poliéster y 2 g del catalizador. El gramaje utilizado fue de 800 g/m².

- Resina poliéster m = 100 g
- Catalizador m = 2 g
- Gramaje m = 800 g/m²
- Tiempo de secado t = 24-48 h.
- Espesor: e = 800 μm

Muestra GC3-PU

Por último se aplicó una resina de poliuretano de otra marca con otro catalizador. Las proporciones del catalizador eran al 50 %. Se probó en los dos tipos de superficie pero se observó que al dejar secar el Gel Coat un día, pasaba de una forma lisa a aparecer abultamientos, y se despegaba de la superficie como se puede observar en la Figura 11.

- Resina poliuretano $m = 100 \text{ g.}$
- Catalizador $m = 50 \text{ g.}$
- Gramaje $m = 800 \text{ g/m}^2$
- Tiempo de secado $t = 24\text{-}48 \text{ h.}$
- Espesor $e = 800 \text{ }\mu\text{m.}$



Figura 11. Separación del acabado de la lámina de teflón durante el periodo de secado

Esto puede ser debido a que el espesor aplicado por el rodillo no era el adecuado. El proceso de secado es complejo, y no se produce por las dos caras igual, la parte de arriba está expuesta al aire, y por eso se produce una contracción del Gel Coat hacia arriba. Separación del acabado de la lámina de teflón durante el periodo de secado. Por este motivo se probaron distintos espesores. Cuanto mayor espesor, más reacciones de polimerización se producen y más exotérmico es el proceso, y por tanto peor anclaje a la superficie.

Por tanto se procedió a realizar distintas pruebas con espesores de $250 \text{ }\mu\text{m}$, $300 \text{ }\mu\text{m}$, $450 \text{ }\mu\text{m}$ y $600 \text{ }\mu\text{m}$ sobre placas de vidrio.

En la prueba con un espesor de $250 \text{ }\mu\text{m}$, se pudo observar que no tiene la cantidad suficiente recubrimiento para rellenar toda la superficie y hay partes en las que el Gel Coat no ha llegado con un espesor uniforme al vidrio. Mientras que en las de un espesor de 350 o $400 \text{ }\mu\text{m}$, sí que se consiguió una capa uniforme del Gel Coat. El espesor elegido para los posteriores ensayos fue de $400 \text{ }\mu\text{m}$.

Aplicación y curado de Solid Surface de control

Para la aplicación del Solid Surface a nivel industrial, se emplean moldes con las distintas formas que se quieren obtener y se vierte en ellas las mezclas con la formulación deseada y pesadas. Frecuentemente, se extrae el aire de la matriz y se limpia el recipiente para garantizar la compactación e homogeneidad de la pieza. Se vierten las mezclas en los moldes, utilizándose en ciertos casos desmoldeantes para desensajar las piezas una vez pasado el tiempo de curado. El curado se realiza en hornos de curación a temperaturas alrededor de 80 °C. Y, por último, se realizan los acabados del producto final (lijado, corte, etc.).

La aplicación del Solid Surface se realizó en los laboratorios de AIDIMME según lo indicado y proporcionado por la empresa colaboradora.

Se aplicó la resina con un 0,6% de catalizador en un molde y se curó durante 2 horas a 80 °C o bien durante 4 horas a 60-70 °C.

Se utilizaron unos moldes cilíndricos de un solo uso que facilitan el desmoldeado de las piezas una vez curadas. Se vertió la mezcla homogénea previamente pesada y se repartieron aproximadamente 10 g por molde para alcanzar un espesor menor de 1 cm. Se redujo el espesor de la pieza sobre las indicaciones del fabricante debido a practicidad a la hora de realizar los ensayos microbiológicos. Finalmente, el espesor medio de las muestras fue de 6-8 mm (Figura 12).



Figura 12. Muestras de Solid Surface SS4, espesor aproximado de 6-8 mm.

Ensayos de resistencia microbiológica de probetas Gel Coat sin biocidas

Para poder alcanzar un buen entendimiento de la actividad antimicrobiana de las probetas de ensayo con biocidas de extractos naturales, se ha de establecer el punto inicial desde donde se parte. En este caso, y para validar así los ensayos microbiológicos, se prepararon probetas de todas las muestras sin adicionar biocida que se tomaron como probetas de control.

Se siguió la metodología descrita en UNE EN ISO: 846, MÉTODO A y B. Se hicieron 6 réplicas por cada método y de cada tipo de probeta (GC1-PU, GC1-PET, GC2-PET Y GC3-PU). Además, se realizaron controles de viabilidad y controles negativos. Se incubó durante 4 semanas controlando la humedad de las muestras.

En el caso del método A, las muestras se vieron contaminadas por bacterias no objeto de estudio, quedando el ensayo invalidado. Se repitió este ensayo pero no se obtuvieron suficientes probetas del material GC3 por lo que no se pudo realizar. En el primer ensayo, se observó también la deformación de las probetas por el uso de etanol al 70% y secado a 45°C para la esterilización. Se buscaron maneras alternativas de realizar este proceso.

La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos, en ella se observa que las probetas no muestran resistencia a los hongos ya que a simple vista se puede apreciar la proliferación microbiana, excepto para la muestra GC1-PU. Para esta muestra en concreto y para GC3, se complementa el resultado con el método B para poder concluir

Tabla 7. Resultados de los ensayos de control microbiológico para las distintas superficies de ensayo en el método A.

METODO A MEDIO INCOMPLETO MIX DE HONGOS	GC1-PET	GC1-PU	GC2-PET	GC3-PU (*)
1	3	1C	4	/
2	3	1C	4	/
3	3	1C	3	/
4	4	1C	4	/
5	4	1C	4	/
6	4	1C	3	/

(*) Nota. Ensayo no realizado, resultado observado en probetas contaminadas: 4- no relevante.

El método B, aunque no es necesario, aporta mayor información para determinar la resistencia a los hongos, por lo que se preparó para comprobar los efectos antimicrobianos de las probetas. En este caso, la mayor problemática encontrada fue la deformación de la muestra GC3. Este material, debido seguramente a la mezcla y procedimiento realizado, posee una flexibilidad y deformación de la estructura plana mayor que el resto. Debido a esto, durante la colocación de la probeta en la placa, ésta pudo sufrir alguna rotura previa al inicio de la incubación.

Para realizar una buena interpretación del método A, se complementó con lo observado en el método B. En este último, donde el medio es completo y los hongos se han desarrollado lo suficiente, se observó en algunas probetas cierto efecto fungiestático (GC2-PET-1 y GC2-PET-5). Pero en su mayoría, no se observó resistencia a los hongos, incluso a simple vista, se distinguió en la superficie de las probetas un crecimiento de hongos (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de los ensayos de control microbiológico para las distintas superficies de ensayo en el método B.

METODO B MEDIO COMPLETO MIX DE HONGOS	GC1-PET	GC1-PU	GC2-PET	GC3-PU
1	2	2	1C (HALO)	2
2	3	2	2	2
3	3	2	2	3
4	2	2	2	3
5	2	3	1C (HALO)	3
6	3	3	2	2

Conclusiones

Según la interpretación de los resultados, las probetas no presentan resistencia a los hongos de ensayo. El material ensayado no es resistente al ataque por hongos y contiene sustancias nutritivas que permiten el crecimiento y desarrollo de estos microorganismos. Por ello, es necesaria la utilización de algún agente biocida para asegurar el uso higiénico de estos productos.

Ensayos de resistencia microbiológica de probetas Solid Surface sin biocidas

De manera análoga se realizaron las pruebas de control de las probetas de Solid Surface sin biocida (SS4) para determinar el punto de partida de la actividad antimicrobiana de estas superficies.

Debido a la naturaleza de las piezas en sí mismas, el espesor de dicho sustrato es de mayor grado. Se realizó una adaptación a la norma ISO 846, ya que el espesor medio de las probetas obtenidas en el laboratorio de AIDIMME es de 6-8 mm, quedando esta medida por debajo de las especificaciones de la empresa. La única diferencia en la metodología aplicada es la utilización de placas Petri de mayor espesor ya que la superficie obtenida es de un espesor mayor. Estas placas Petri estériles son de un solo uso igualmente, tienen un diámetro de 140 mm y 20 mm de espesor y se reparte el medio de cultivo a razón de 60 ml por placa.

Debido al aumento de volumen por placa, esto permite introducir dos probetas por placa, y, por tanto, se inocula el doble de volumen de la mezcla de esporas. Se incubó durante 4 semanas a 29 °C y humedad controlada.

En los resultados, tanto del método A como del método B, no se observó crecimiento sobre las probetas de control, ni a simple vista ni bajo visualización en microscopio.

En ambos métodos se observó, pues, una excelente resistencia al ataque microbiológico. El material ensayado no es una fuente de alimento para los hongos. Se considera que el material es inerte o fungistático.

Superficies estudiadas con biocida de extractos naturales

En este apartado se aplicaron en los sustratos estudiados del proyecto los biocidas de extractos naturales seleccionados en el paquete de trabajo anterior (PT 2).

Se estudiaron las diferentes formas de aplicar las sustancias activas sobre los sustratos, teniendo en cuenta que finalmente se trata de un producto sólido en forma de microcápsulas de aceites esenciales embebidos en distintos tipos de Gel Coat de diversas empresas colaboradoras, así como un Solid Surface.

Las técnicas de aplicación fueron pues, las recomendadas por los fabricantes de los productos estudiados.

Biocidas a aplicar

Se seleccionaron en particular las microcápsulas con canela ya que, en los ensayos del Paquete de Trabajo 2), se obtuvieron con ellas mejores resultados.

En la Tabla 9 se muestran las microcápsulas seleccionadas en el PT2. Las microcápsulas en emulsión se prepararon para su aplicación en agua (para, por ejemplo, los ensayos de difusión en agar), mientras que las sólidas (en polvo) se prepararon para su aplicación en resinas y disolventes. Las primeras fueron ensayadas durante la ejecución del PT2, donde se optó finalmente por microcápsulas de α -ciclodextrina que encapsulan el agente antimicrobiano. Además, se mejoró la dispersión en agua utilizando un surfactante no iónico comercial (BYK-111). Las microcápsulas en formato sólido se ensayaron en este Paquete de Trabajo. Además, se adquirieron en dos formatos distintos, con y sin recubrimiento adicional. Este recubrimiento adicional se emplea para garantizar que los disolventes en el proceso de fabricación de las láminas de Gel Coat o Solid Surface, no extraen los compuestos activos de las microcápsulas. La aplicación de esta protección adicional resultó relevante tras las primeras pruebas al mezclar todos los componentes de la formulación, ya que se pudo apreciar, una vez transcurrido el curado de las muestras, cierto amarilleo de las mismas (las superficies de estudio tienen un marcado tono blanco). Finalmente, se mejoró la formulación de éstas, utilizando sílice para el encapsulamiento del aceite esencial de canela, pudiendo obtener hasta un 40% de cinamaldehído en el polvo a aplicar con las superficies de estudio.

Tabla 9. Microcápsulas adquiridas a la empresa para comprobar la acción antimicrobiana de los extractos naturales y su posterior aplicación a las superficies de estudio.

FORMATO	CANELA	TOMILLO
EMULSION (PARA APLICACIÓN EN AGUA)	Al 2,2% encapsulado en α -ciclodextrina	Al 3% encapsulado en α -ciclodextrina
	ACEITE ESENCIAL al 3% encapsulado en α -ciclodextrina	
SÓLIDO (POLVO PARA APLICACIÓN EN RESINAS)	Al 15% encapsulado en α-ciclodextrina (CON Y SIN RECUBRIMIENTO ADICIONAL)	Al 4,4% encapsulado en sílice con recubrimiento adicional
	Al 40%, encapsulado en sílice (CON Y SIN RECUBRIMIENTO ADICIONAL)	

Tras la realización de los ensayos de determinación de la acción antimicrobiana de los biocidas adquiridos frente a distintas especies de hongos con la emulsión de canela (cinamaldehído al 2,2%) encapsulado en α -ciclodextrina (15% en sólido), se escogió esta concentración y compuesto como referencia del efecto antimicrobiano idóneo.

Para ser embebidas en el Gel Coat y Solid Surface, se adquirieron las muestras en polvo (sólido) de estas microcápsulas de canela para aplicación en resinas con y sin recubrimiento adicional con una concentración de aceite esencial del 15%. Esta concentración permite añadir un 15% de microcápsulas a la mezcla total del Gel Coat obteniendo una cantidad de cinamaldehído al 2% aproximadamente.

Se hicieron pruebas para embeber las microcápsulas con el biocida. En una primera toma de contacto, se realizó la mezcla como si de cualquier otro aditivo se tratase.

No se consiguió una dispersión total. Se continuó con agitación manual hasta que se realizó la mezcla con el catalizador para garantizar la resuspensión. Durante la mezcla se siguió agitando para impedir al máximo la deposición de las microcápsulas al fondo. Se distribuyó la mezcla de distintas formas sobre el papel de teflón usado anteriormente, imitando lo máximo posible la forma con la que se ha pintado las muestras anteriormente. Además, se realizaron pruebas de moldeado en vasos para después desenchajar el molde, aplicando sobre un soporte que no será retirado después. Se valoraron las mejoras de la técnica utilizada ya que no fue posible embeber las microcápsulas correctamente en el sustrato.

Se observó la mala dispersión de las microcápsulas en la resina Gel Coat, así como tras la adición del catalizador, que una vez curado formó unas piezas laminadas granuladas. Se formaron dos fases diferenciadas, una capa inferior con la deposición de las microcápsulas y otra superior con Gel Coat, aunque sí que es apreciable que había una cierta capacidad de mezcla. En el formato en molde, además, se observó que no se había curado lo suficiente y

había quedado una textura gelatinosa (como era de esperar ya que el secado se realiza a temperatura ambiente).

Por ello, se pidieron microcápsulas de canela de mayor concentración para así poder añadir menor cantidad de éstas y garantizar una mejor dispersión, así como un cambio de formulación para mejorar el acabado final. Se recibieron dos nuevos lotes de biocida de canela, esta vez encapsulada en sílice con y sin recubrimiento adicional para aplicación en resinas, como se detalla en la Tabla 8. Esta mejora, además de aportar una dispersión adecuada en las aplicaciones de resinas, permitió un aumento del porcentaje del cinamaldehído al 40%. Además, se pidió y recibió un dispersante acorde con las muestras a analizar.

MEJORAS PROPUESTAS:

- Adición de un dispersante comercial – se evidenció la necesidad de incluirlo en la formulación (BYK-111).
- Molienda de las microcápsulas – se necesitó añadir este paso en el proceso para evitar la aglomeración de partículas.
- En mezclado, dosificación paulatina y mayor agitación

Además, se propusieron diversas mejoras a la hora de mezclar los componentes, que se detallan a continuación.

Embeber a través de una mezcla previa las microcápsulas en un dispersante adecuado y el catalizador correspondiente a cada muestra. Esta pasta fue añadida al Gel Coat (la resina) a una concentración apropiada con la acción de un mortero. Una vez homogénea esta nueva mezcla, se aplica en una superficie para su secado. Al contener la porción de resinas diversos aditivos, cargas, pigmentos etc., que pueden repeler las microcápsulas, se propone adicionar las partes de la siguiente manera:

1. Pesar el catalizador Gel Coat.
2. Agregar el dispersante BYK 111 y mezclar.
3. Adicionar las microcápsulas en agitación continua.
4. Agregar esta nueva mezcla a la resina.

En cuanto a las microcápsulas: el problema con el encapsulado de ciclodextrina fue que se dispersa bien en agua o en agar, pero tiende a la aglomeración en forma sólida y en otras emulsiones. La alternativa propuesta también por el fabricante de éstas es la encapsulación del aceite esencial en sílice, y realizando lotes tanto con y sin recubrimiento adicional para disolventes.

Aplicación del biocida en sustratos Gel Coat de estudio

Una vez seleccionado el biocida que mejor funciona (extracto de canela 40% encapsulado en sílice con recubrimiento), se realizaron diferentes pruebas para los sustratos del proyecto.

Según las distintas pruebas, se comprobó que las microcápsulas de canela que resultan tras el curado en una mejor aplicación son las Sílice - Canela 40%. Las cantidades añadidas se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Cantidades añadidas en las muestras de Gel Coat con biocida.

	GC1-PU	GC1-PET	GC2-PET	GC3-PU
Resina	12 g	16 g	16 g	12 g
Catalizador	6 g	0,5 g	0,4 g	6 g
Biocida	1 g	1 g	1 g	1 g
Dispersante	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g

En el caso del GC3-PU no fue posible separar las láminas de la superficie.

Aplicación del biocida en sustratos Solid Surface de estudio

Se evidenció, en los ensayos con las probetas de control, que estas muestras presentan una resistencia a los microorganismos de ensayo. Igualmente, no solo se quiere verificar la actividad fungistática, si no comprobar la acción inhibitoria del crecimiento y biocida al aplicar estos nuevos productos, ofreciendo de esta manera un valor añadido a las superficies de estudio.

Se realizaron las pruebas siguiendo las recomendaciones de la empresa, así como los conocimientos adquiridos en las demás muestras (tanto moldeados como aplicadas en una fina capa).

Para aproximadamente 20 g se pesó:

- o 18 g de Resina
- o 1 g de biocida (5%)
- o 0,11 de catalizador dosificado en 3 gotas pequeñas (0,6%)
- o 1 gota dosificada de dispersante

Envejecimiento de las muestras

A una parte de las probetas aplicadas en el apartado anterior, se le realizaron ensayos de desgaste que simulan el paso del tiempo. El procedimiento escogido fue la realización de lavados simulando condiciones de uso (temperatura, humedad, lixiviación, etc.) y desgaste por ciclos de uso.

Para ello, y basándose en lo descrito en la norma UNE EN 263 para los ensayos de resistencia al mojado y secado para bañeras y recipientes de ducha de uso doméstico, se cubrieron las probetas con agua hirviendo, dejándose enfriar durante 8 horas para después secarlas y colocarlas en estufa a 50°C durante el resto del tiempo, hasta completar las 24h.

Las probetas de Gel Coat sufrieron algún tipo de deformación a lo largo del envejecimiento. Además, GC1-PU adquirió un color amarillo más intenso que al inicio. Las láminas de Gel Coat se separaron de los soportes de vidrio en algunas zonas, provocando cierta deformación durante los ciclos de baño-estufa, que no son propios de las muestras.

Tras una serie de ciclos de mojado-calentamiento, durante dos semanas, las muestras quedaron deformadas por la separación de las láminas del soporte de vidrio de manera espontánea. Se dio por finalizado el envejecimiento, ya que no se quería dañar más las muestras para que no se volvieran quebradizas y poder obtener algunas probetas.

De manera análoga, se realizó el envejecimiento a las probetas de Solid Surface, SS4, con biocida. Seleccionaron 5 probetas para dichos ciclos, no observándose cambios físicos en éstas.

Conclusiones

Se comprobó el efecto biocida de partida de las superficies de estudio. Se realizaron probetas control sin biocida para ello. Se observó la necesidad de agregar biocida en las muestras, ya que no se obtuvo una inhibición del crecimiento de los microorganismos diana.

Se escogieron y probaron los biocidas adquiridos en el PT2 aplicados con las superficies de estudio. Durante las pruebas de aplicación, se descartaron aquellos productos biocidas que demostraron ser incompatibles con las superficies aplicadas (alteraciones en homogeneidad, color, dispersión). Finalmente, se obtuvieron superficies con biocida adecuadas para su uso como probetas en los ensayos de caracterización microbiológica que se realizaron en el PT4. Además, se realizaron los ensayos de envejecimiento que simulan el paso del tiempo en condiciones de uso. Estas superficies con biocida tras sufrir el envejecimiento propuesto fueron ensayadas en el siguiente paquete de trabajo (PT4), para validar la aplicación del biocida y comprobar el anclaje de estos a largo plazo.

Paquete de Trabajo 4.- Caracterización y validación de las superficies aplicadas.

Durante la realización del Paquete de Trabajo 4, se analizaron las probetas tras la aplicación del biocida en las diferentes superficies de estudio que se obtuvieron en el Paquete de Trabajo 3, determinando las propiedades antimicrobianas siguiendo la normativa vigente. De esta manera, se obtuvo información tanto de la eficacia del biocida como de su aplicación en las superficies para su uso en productos como platos de ducha y encimeras. Se caracterizaron las muestras tanto a nivel de resistencia a los microorganismos diana del estudio, así como de las propiedades que suelen determinarse para caracterizar las superficies de las aplicaciones de estudio. Se evaluaron los resultados obtenidos para las distintas muestras realizadas a lo largo del desarrollo del proyecto y se realizó la validación de los biocidas aplicados sobre las superficies, dando lugar al inicio de una futura aplicación en productos reales con salida al mercado.

Superficies de estudio con biocida aplicados

Tras realizar distintas mezclas para aplicar los agentes antimicrobianos a las superficies de estudio, en el PT3, se obtuvieron muestras con una formulación adecuada que permite obtener probetas finales homogéneas. En la Figura 13 y la Figura 14 se muestran las probetas que posteriormente se caracterizaron, tanto a nivel de resistencia química y al vapor de agua, como a nivel microbiológico.

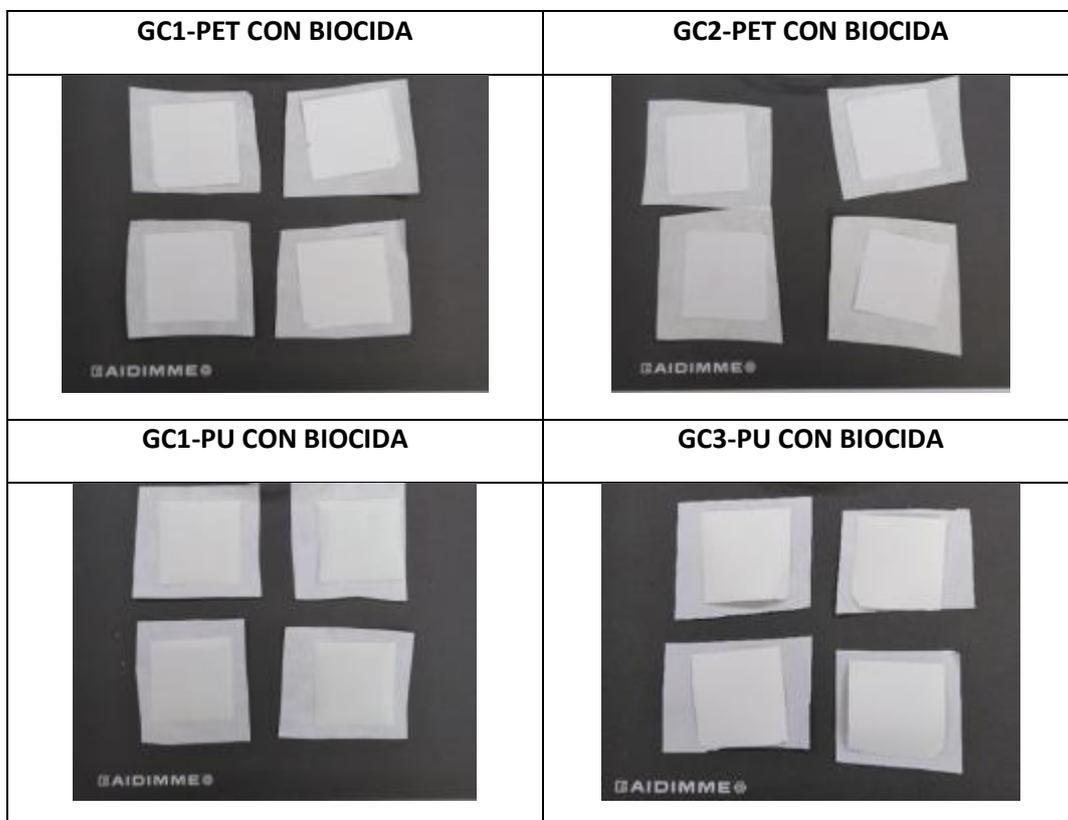


Figura 13. Aspecto de las muestras de los productos de Gel Coat de estudio con la adición de los biocidas (cinamaldehído micro-encapsulado con sílice) empleados para la validación del estudio.



Figura 14. Probetas de Solid Surface SS4 con biocida.

Las muestras empleadas para el estudio fueron proporcionadas por 4 empresas colaboradoras en el proyecto. A continuación, se muestran las muestras en Tabla 11 con la descripción y siglas utilizadas.

Tabla 11. Descripción de las superficies de estudio del proyecto

Muestra	SIGLAS
Gel Coat Poliéster empresa 1	GC1-PET
Gel Coat Poliuretano empresa 1	GC1-PU
Gel Coat Poliéster empresa 2	GC2-PET
Gel Coat Poliuretano empresa 3	GC3-PU
Solid Surface empresa 4	SS4

También se seleccionó el biocida apropiado que permite una homogenización de la superficie, así como una concentración de éste que proporciona un efecto biocida adecuado. Después de realizar las diversas pruebas, se obtuvieron probetas de Gel Coat pre-curado con aproximadamente un 5% (m/m) de la sustancia biocida.

El biocida seleccionado fueron microcápsulas de sílice con un tamaño de 1 μm que permiten albergar mayor contenido de aceite esencial (40% de aceite, muy concentrado). Además, se añadió un recubrimiento adicional para, en principio, proteger el aceite esencial a la hora de ser mezclado con los disolventes propios del Gel Coat, y así garantizar que no exista una extracción prematura de éste. Este recubrimiento está formado por isocianatos que al reaccionar generan una capa superficial de poliuretanos.

Al aplicar el sólido en una matriz a base de resina con cargas y otros aditivos, se agregó un dispersante comercial (BYK) para facilitar la mezcla.

Caracterización de las superficies con biocida

Se han realizado los ensayos de verificación de resistencia a agentes químicos así como al vapor de agua, propias de las superficies estudiadas (platos de ducha).

Resistencia química-ensayos de manchado

Para esta evaluación, se ha seguido lo descrito en la norma UNE EN 14527:2016+A1:2019, Apartado 8.2: Resistencia a los agentes químicos y a las manchas.

Consiste en determinar la resistencia de los acabados a ciertos productos de limpieza y a otros característicos del cuarto de baño.

En la Tabla 12 se muestra un resumen con los resultados finales, de las piezas con y sin biocidas.

Tabla 12. Resultados de las muestras ensayadas para determinar la resistencia a los productos químicos y colorantes, según valoración final

MUESTRA	TRATAMIENTO	Resistencia a productos químicos y colorantes (valoración)
SOLID SURFACE	SIN BIOCIDA	Correcto
	CON BIOCIDA	Correcto
GC2-PET	SIN BIOCIDA	Correcto
	CON BIOCIDA	Correcto
GC1-PET	SIN BIOCIDA	Correcto
	CON BIOCIDA	Correcto
GC1-PU	SIN BIOCIDA	Correcto
	CON BIOCIDA	Correcto
GC3- PU	SIN BIOCIDA	Correcto
	CON BIOCIDA	Correcto Aparición de ampollas durante el proceso de limpieza

Resistencia al vapor de agua

El ensayo tiene por objeto determinar el efecto producido por el vapor de agua en ebullición sobre los recubrimientos de mobiliario de baño, para ello se siguió la metodología según la norma UNE 56867:2002, apartado 5.4.

En la Tabla 13 se muestra un resumen con los resultados del ensayo.

Tabla 13. Resultados obtenidos para las muestras de las superficies de estudio con y sin aplicación del biocida.

MUESTRA	TRATAMIENTO	RESISTENCIA AL VAPOR DE AGUA (VALORACIÓN)
SOLID SURFACE	SIN BIOCIDA	3. Moderado cambio de color
	CON BIOCIDA	3. Moderado cambio de color
GC2 PET	SIN BIOCIDA	3-4. Muy ligero cambio de color
	CON BIOCIDA	3. Moderado cambio de color
GC1 PET	SIN BIOCIDA	3. Moderado cambio de color
	CON BIOCIDA	3. Moderado cambio de color
GC1 PU	SIN BIOCIDA	4. Muy ligero cambio de color
	CON BIOCIDA	3. Moderado cambio de color
GC3 PU	SIN BIOCIDA	5. Sin deterioro
	CON BIOCIDA	3. Moderado cambio de color

En general, la presencia del biocida empeora ligeramente el aspecto por amarilleo superficial del sustrato.

Caracterización microbiológica de Gel Coats

Se realizaron los ensayos microbiológicos descritos, adaptados y desarrollados durante el proyecto, utilizando el método de evaluación de la acción microbiana en probetas (basados en la norma UNE-EN ISO 846:1998, MÉTODO A y B).

Las especies de los hongos de ensayo fueron los que se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Hongos escogidos para la preparación de la suspensión de esporas en los ensayos de la evaluación de la resistencia a hongos de las probetas

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
<i>Aureobasidium pullulans</i>	CECT 2703

MÉTODO A medio incompleto

Tras aproximadamente una semana de incubación, se empezó a distinguir el crecimiento de los hongos en el medio incompleto. Se tomó nota tanto de la evolución del crecimiento a los 9 y 14 días, así como del material gráfico, que se muestra en la Figura 15 en la que se puede observar una de las probetas de cada muestra como ejemplo de los halos de inhibición observados a los 9 días de incubación. En ninguno de los casos se observa crecimiento sobre las probetas ensayadas

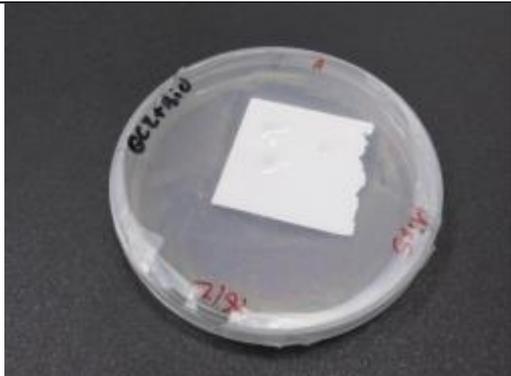
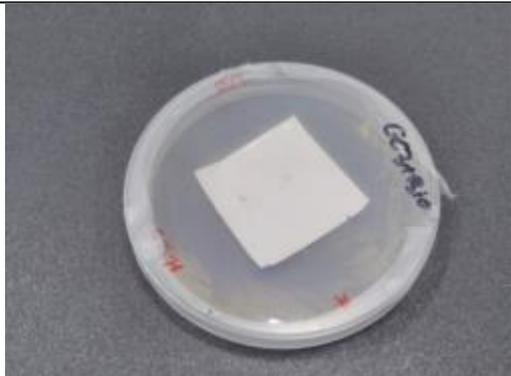
PRESENCIA DE HALO DE INHIBICIÓN EN LAS PROBETAS MÉTODO A (9 DÍAS)	
GC1-PET CON BIOCIDA	GC1-PU CON BIOCIDA
	
GC2-PET CON BIOCIDA	GC3-PU CON BIOCIDA
	

Figura 15. Seguimiento de las probetas de ensayo de Gel Coat con biocida Método A. Presencia de halo de inhibición en todas las muestras a los 9 días.

Se observa la presencia de un halo de inhibición en todas las placas ensayadas a los 9 días, en mayor o menor medida. Las probetas con la aplicación del biocida presentan resistencia al ataque de los hongos e inhiben el crecimiento de éstos. Tras dos semanas de ensayo, estas condiciones no se mantienen para todas las muestras de Gel Coat ensayadas. En el caso de GC1-PU y GC3-PU el halo que presenta es de reducido tamaño, pero aún se observa en la mayoría de probetas. Mientras que para GC1-PET y GC2-PET, no hay presencia del halo de inhibición (Tabla 15).

Tabla 15. Seguimiento de la inhibición del crecimiento observada durante el desarrollo del método A del ensayo de resistencia al ataque microbiológico de las probetas de superficies de estudio

MUESTRAS	Seguimiento método A - 9 días	Seguimiento método A - 14 días
GC1-PET	Presencia de halo de inhibición (de menor tamaño)	No
GC1-PU	Presencia de halo de inhibición	Presencia de halo de inhibición (de menor tamaño)
GC2-PET	Presencia de halo de inhibición (de menor tamaño)	No
GC3-PU	Presencia de halo de inhibición	Presencia de halo de inhibición (de menor tamaño)

MÉTODO B medio completo

Tras tres días de incubación, se observa la presencia de un halo de inhibición en todas las probetas que han sido aplicadas con agente biocida. Especialmente de mención es la inhibición mostrada para el Gel Coat GC1-PU, donde la presencia del halo es prácticamente visualizada en todo el diámetro de la placa Petri. El halo de inhibición en todos los casos se ve reducido a los 6 días, desapareciendo por completo para el caso de las probetas de GC2-PET con biocida. En el caso del GC1-PU comienza a aparecer alguna colonia de hongos dispersa. Tras 9 días de incubación, la inhibición al crecimiento no ha sido resistente. El efecto fungistático evidenciado durante la primera semana de ensayo no se observa a partir de la segunda semana (Tabla 16).

Tabla 16. Seguimiento de la inhibición del crecimiento observada durante el desarrollo del método B del ensayo de resistencia al ataque microbiológico de las probetas de superficies de estudio

MUESTRAS	Seguimiento método B 3 días	Seguimiento Método B - 6 días	Seguimiento Método B - 9 días
GC1-PET	Presencia de halo de inhibición	Presencia de halo de inhibición	No
GC1-PU	Presencia de halo de inhibición	Presencia de halo de inhibición (*)	No
GC2-PET	Presencia de halo de inhibición (de menor tamaño)	No	No
GC3-PU	Presencia de halo de inhibición	Presencia de halo de inhibición (*)	No

Nota (*) ciertos hongos empiezan a desarrollarse

En la Figura 16 se muestran una de las probetas para cada muestra como ejemplo de los halos de inhibición observados tras 3 y 6 días de incubación.

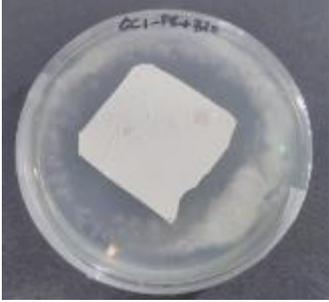
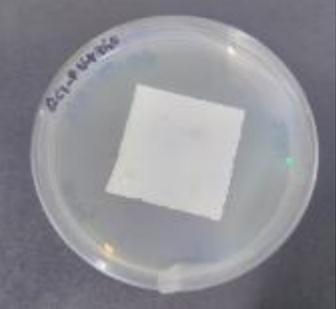
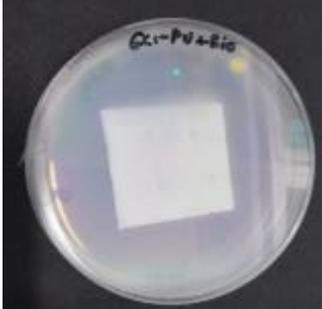
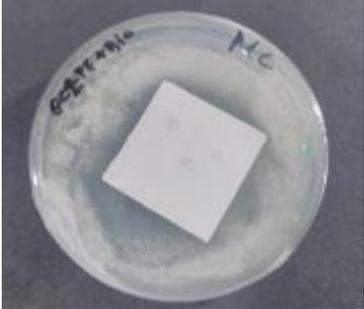
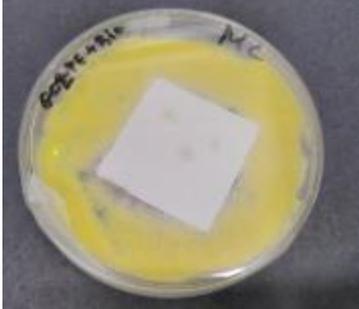
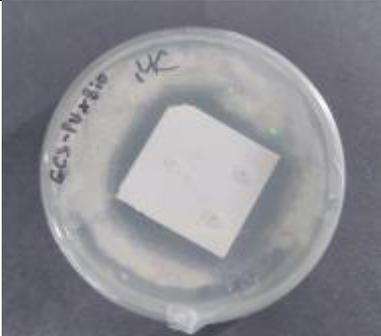
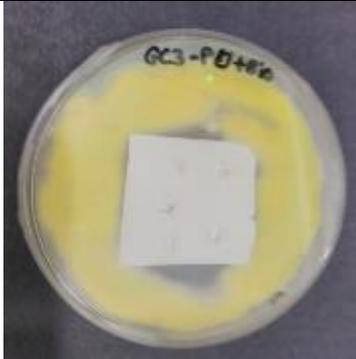
PRESENCIA DE HALO DE INHIBICIÓN EN LAS PROBETAS MÉTODO B	
3 DÍAS	6 DÍAS
	
	
	
	

Figura 16. Seguimiento de las probetas de ensayo de Gel Coat con biocida Método B. Presencia y evolución del de halo de inhibición en todas las muestras a los 3 y 6 días, respectivamente.

Resultados finales MÉTODO A Y B

En ambos métodos se observa resistencia e inhibición al crecimiento de los hongos así como efecto fungistático al inicio del periodo de ensayo. Pero estas condiciones no se mantienen durante el tiempo de ensayo, quedando evidenciada, la pérdida de actividad antimicrobiana de los agentes biocidas.

Método A- RESISTENCIA A HONGOS

Tabla 17. Resultados finales de los ensayos de resistencia al ataque microbiológico método A

METODO A MEDIO INCOMPLETO MIX DE HONGOS	GC1-PET	GC1-PU	GC2-PET	GC3-PU
1	3	1C	3	3
2	3	1C (*)	2 (*)	2
3	2 (*)	1C (*)	3	3
4	2 (*)	1C(*)	2 (*)	4
5	2	1B(*)	2	4(*)
6	3	1A (*)	3	4(*)

(*) Nota. Presencia de cierto halo de inhibición sobre agar.

Según los resultados obtenidos (Tabla 17), las probetas no muestran resistencia a los hongos ya que a simple vista se puede observar la proliferación microbiana, excepto para la muestra GC1-PU. Se complementa el resultado con el método B para poder concluir.

Método B – EFECTO FUNGIESTÁTICO

Para realizar una buena interpretación del método A, se complementa con lo observado en el método B. En este último, donde el medio es completo y los hongos se han desarrollado lo suficiente, se observa cierto efecto fungistático en algunas probetas aisladas (Tabla 18). Pero en su mayoría, no se observa resistencia a los hongos.

Tabla 18. Resultados finales de los ensayos de resistencia al ataque microbiológico método B

METODO B MEDIO COMPLETO MIX DE HONGOS	GC1-PET	GC1-PU	GC2-PET	GC3-PU
1	1B	2	1C	1B
2	2	2	1C	2
3	1A	1C	1A	3
4	2	1C	2	3
5	2	1C	2	3
6	2	2	2	2

Según la interpretación de los resultados, las probetas no presentan resistencia a los hongos de ensayo al finalizar el periodo de incubación que marca la norma. Pero durante las dos primeras semanas se observan tanto resistencia al ataque de hongos, como efecto inhibitor del crecimiento y fungistático. La actividad del agente antimicrobiano de las muestras disminuye drásticamente después de un tiempo de acción. Es posible que esto se deba a la pérdida de la sustancia activa biocida (el cinamaldehído) en el tiempo. Otra posible causa, podría deberse al efecto contrario, es decir, que el recubrimiento de las microcápsulas para proteger el cinamaldehído no permita la dosificación progresiva del agente antimicrobiano, y que el efecto biocida inicial observado, sea debido a la cantidad de cinamaldehído libre residual que no quedó encapsulado durante el proceso industrial.

Por todo ello, se decidió comprobar analíticamente, a través de la determinación del cinamaldehído por cromatografía de gases, la concentración de cinamaldehído (con recta de calibrado y uso de patrón). De esta manera, se comprobó que la materia prima utilizada para la encapsulación del biocida contiene cantidad suficiente de cinamaldehído.

Para ello se cogieron pequeñas muestras de las probetas con biocida del mismo lote que las utilizadas en el ensayo microbiológico para la determinación del cinamaldehído a tiempo inicial. Estas mismas probetas fueron posteriormente incubadas bajo las mismas condiciones que en el ensayo, insertándolas en placas Petri con medio de cultivo pero sin ser inoculadas. Tras cinco días bajo estas condiciones, se sacaron pequeñas muestras de las probetas para su análisis cromatográfico.

Los resultados (Tabla 19) señalan que, tras varios días de incubación (temperatura 29°C y humedad en el medio de cultivo pero sin inoculación de microorganismos), hay una disminución de esta sustancia en comparación con las muestras con biocida previo a la incubación. Todo esto demuestra que es posible que la disminución de las propiedades antimicrobianas de las probetas se deba a una pérdida de las sustancias antimicrobianas en las muestras.

Por otra parte, se ha evidenciado la necesidad de mejora de las microcápsulas, utilizando un sistema de partículas funcionalizadas que permitan una liberación más controlada de la sustancia biocida en las superficies de estudio.

Tabla 19. Resumen de los resultados para la determinación de cinamaldehído presente en las muestras, tanto las superficies de estudio, así como el biocida aplicado y la materia prima de la que parte.

Muestras	Descripción	mg/Kg	%
GC1-PU	CON BIOCIDA	922,158877	0,0922
	5d Incubación	<5	<0,0005
GC1-PET	CON BIOCIDA	56,8471106	0,0057
	5d Incubación	9,25	0,0009
GC2-PET	CON BIOCIDA	126,26312	0,0126
	5d Incubación	5,3	0,0005
GC3-PU	CON BIOCIDA	1851,9	0,18519
	5d Incubación	14,51	0,001451

Caracterización microbiológica de Solid Surfaces

Se ensayaron 8 probetas en total, la mitad con el Método A para verificar la resistencia del material al ataque de los microorganismos, así como la otra mitad con el Método B para comprobar el efecto biocida visto en las probetas de Gel Coat (presencia/ausencia de halo de inhibición en las placas Petri de ensayo).

Los ensayos se realizaron según lo descrito en el Paquete de Trabajo 3 (E3.1). Se aplicó por cada placa Petri de 140 cm, dos probetas con el agente biocida.

Durante todo el desarrollo del ensayo, no se aprecia en ningún momento el halo de inhibición. Visualmente, no se detecta crecimiento en las probetas, ni bajo el microscopio. Por tanto, los resultados del ensayo para este material concluyen en que posee una excelente resistencia a la acción microbiana.

En la Figura 17 se muestran las imágenes tras finalizar la incubación de ambos métodos.

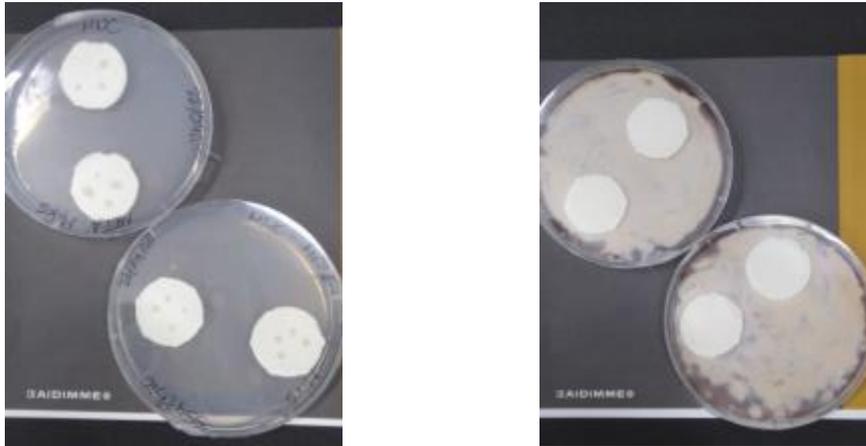


Figura 17. Solid Ensayo de Solid Surface, SS4, muestras con biocida. Probetas en placa Petri para el Método A (izq.) y Método B (dcha.)

Así pues, la adición del biocida no ejerce ninguna mejora en las superficies de Solid Surface ensayadas, ni en un estado inicial ni final de la incubación.

Caracterización de las superficies con biocida tras envejecimiento

Se realizaron ciclos de envejecimiento consecutivos sobre las muestras de Gel Coat y Solid Surface con biocida descritos en el PT3, simulando un desgaste por el uso en condiciones normales para la aplicación de estas superficies (p. ej. platos de ducha). Tras esto, se cortaron las muestras en probetas de 4x4 cm para los ensayos microbiológicos.

Caracterización microbiológica de Gel Coats tras envejecimiento

Se realizaron los ensayos siguiendo la misma metodología para aquellas probetas que habían sido envejecidas por desgaste con ciclos de lavado y calentamiento.

En la Figura 18 se muestra el aspecto de las probetas tras el envejecimiento. Las muestras de GC1-PU sufrieron un deterioro en el color, por lo que terminaron siendo mucho más amarillas. Las muestras de GC3-PU mostraban una mayor rugosidad, menor homogeneidad y cierto amarilleo.



Figura 18. Muestras de Gel Coat tras los ciclos de envejecimiento

MÉTODO A medio incompleto

En la Figura 19 se muestra las probetas tras envejecimiento esterilizadas e insertadas en las placas Petri con medio incompleto (Método A).

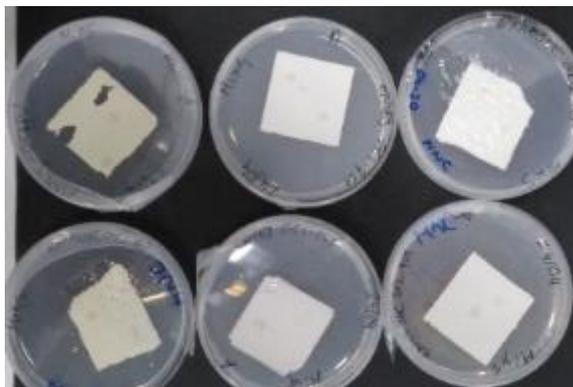


Figura 19. Placas Petri ensayadas Método A, probetas envejecimiento esterilizadas e inoculadas en medio incompleto, antes de su incubación durante 4 semanas. Izquierda GC1-PU, en medio GC1-PET y derecha GC2-PET.

En la Figura 20 se muestran las imágenes de los resultados finales tras las 4 semanas de incubación, para el Método A. Para las muestras de GC1-PU solo se observa crecimiento sobre las probetas a través del microscopio.

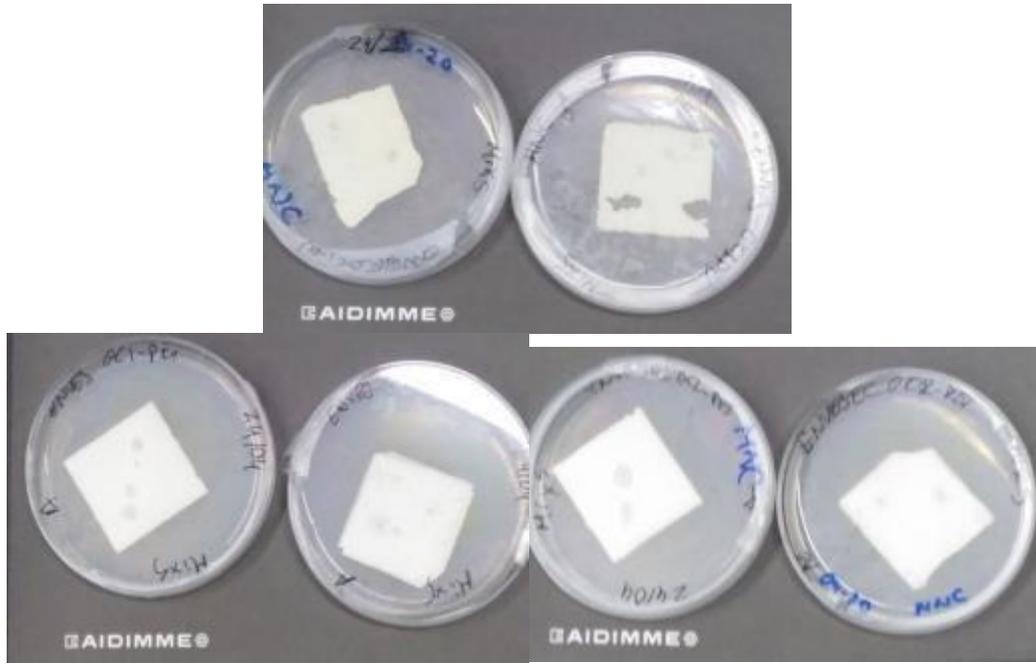


Figura 20. Resultados Método A probetas envejecimiento Arriba, GC1 PET, abajo GC1-PU (izq.) y GC2-PET (dcha.).

En la Tabla 20, se muestran los resultados obtenidos. No se ha realizado el seguimiento del halo de inhibición ya que no se observó su aparición durante los primeros días de incubación, evidenciando otra vez más la pérdida de las propiedades antimicrobianas con el paso del tiempo.

Tabla 20. Resultados de los ensayos de resistencia a los microorganismos de las probetas de Gel Coat tras los ciclos de envejecimiento por el Método A.

METODO A MEDIO INCOMPLETO MIX DE HONGOS	GC1-PET	GC1-PU	GC2-PET	GC3-PU
1	2	1C	1C	/
2	2	1C	2	/

MÉTODO B medio completo

En el Método B (medio completo) el crecimiento sobre la superficie de las probetas fue más visible a simple vista (Figura 21).



Figura 21. Resultados método B probetas envejecimiento Arriba, GC1 PET (izq.) y GC1- PU (dcha.) y abajo GC2-PET (izq.) y GC3-PU (dcha.).

En la Tabla 21, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 21. Resultados de los ensayos de resistencia a los microorganismos de las probetas de Gel Coat tras los ciclos de envejecimiento por el Método B.

METODO B MEDIO COMPLETO MIX DE HONGOS	GC1-PET	GC1-PU	GC2-PET	GC3-PU
1	3	3	2	3
2	3	2	2	3
3	4	3	2	4
4	3	2	2	4
5	3	3	2	3
6	3	3	2	4

En la mayoría de casos, exceptuando el Método A muestras GC1-PU, los resultados de los ensayos indican que el material no presenta resistencia al ataque por hongos. Además, contiene sustancias nutritivas que permiten el crecimiento y desarrollo de estos microorganismos.

Una vez finalizadas estas caracterizaciones, también se comprobó analíticamente la concentración de cinamaldehído de las muestras de Gel Coat por cromatografía de gases, tras el envejecimiento. En la Tabla 22 se muestra un resumen con todos los resultados.

Tabla 22. Resumen de los resultados para la determinación de cinamaldehído presente en las muestras, tanto las superficies de estudio, así como el biocida aplicado y la materia prima de la que parte.

Muestras	Descripción	mg/Kg	%
Materia Prima	Cinamaldehído	700000	70
GC1-PU	CONTROL	ND	ND
	CON BIOCIDA	922,15887	0,0922
	ENVEJECIMIENTO	880	0,088
GC1-PET	CONTROL	ND	ND
	CON BIOCIDA	56,847110	0,0057
	ENVEJECIMIENTO	20	0,002
GC2-PET	CONTROL	ND	ND
	CON BIOCIDA	126,26312	0,0126
	ENVEJECIMIENTO	150 *	0,0150

GC3-PU	CONTROL	ND	ND
	CON BIOCIDA	1851,9	0,18519
	ENVEJECIMIENTO	320	0,032

(*) Este aumento se considera que se debe a la homogeneización irregular del biocida

Se comprobó el contenido de cinamaldehído en la materia prima y la ausencia de éste en las probetas de control. Como cabía de esperar, se detectó la presencia de este compuesto en las probetas con aplicación del biocida. Cabe remarcar que, la cantidad de biocida presente en las muestras queda muy por debajo de los valores deseados. En la gráfica de la Figura 22, se observa la evolución de las muestras con biocida según sean probetas control, con biocida y después del envejecimiento. Los resultados muestran una tendencia a la disminución del compuesto activo tras varios días de incubación.

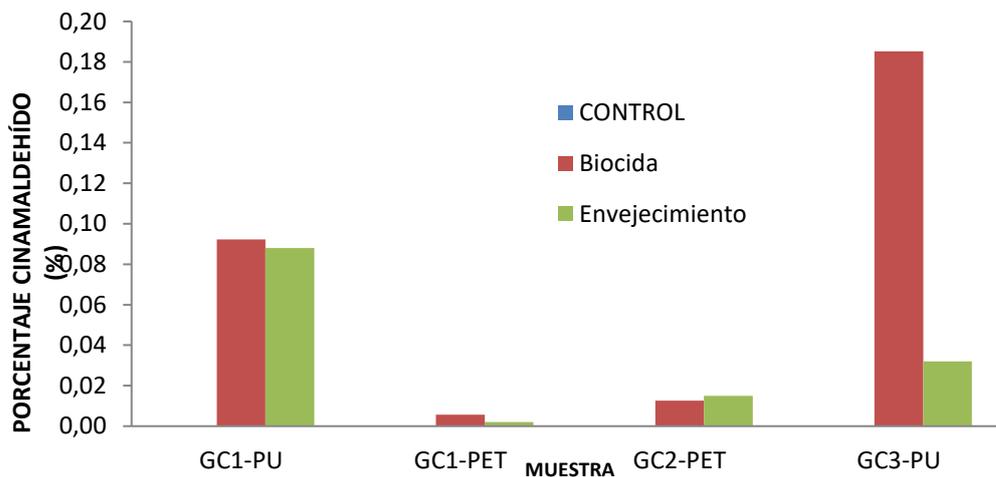


Figura 22. Determinación del cinamaldehído (%) en las muestras ensayadas en distintos estados del ensayo

Caracterización microbiológica de Solid Surface tras envejecimiento

Para estos ensayos de probetas de Solid Surface SS4 con biocida tras envejecimiento se realizó únicamente el método B ya que, en este caso, simplemente se quiere comprobar la presencia/ausencia del halo de inhibición.

Se incubaron, por lo tanto, 4 probetas de SS4 con biocida tras el envejecimiento, en dos placas Petri con medio completo durante 4 semanas (Figura 23).

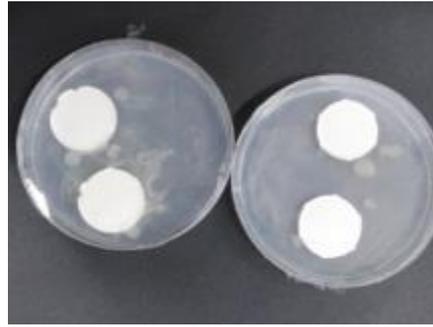


Figura 23. Probetas SS4 con biocida y envejecimiento tras 24 horas de incubación

No se detectó la presencia del halo de inhibición, pero tampoco se distinguió un crecimiento de hongos en la probeta. Por lo tanto, el material es muy resistente al ataque de los microorganismos diana del ensayo.



Figura 24. Probetas de envejecimiento con biocida despues de 4 semanas de incubación

Conclusiones de los resultados obtenidos

Inicialmente, la aplicación de los biocidas a las superficies en estudio mejora las propiedades antimicrobianas de las mismas (sin biocida). Pero, tras finalizar el tiempo de ensayo marcado por la normativa vigente, las características biocidas no se han mantenido, aunque sí las fungistáticas. Por tanto, la aplicación de estas sustancias ejerce parcialmente una mejora a nivel de resistencia microbiológica a largo plazo. Para la aplicación en productos reales con salidas al demandante mercado, cabe la posibilidad de funcionalizar las macropartículas para garantizar la liberación de las sustancias biocidas de manera controlada, por lo que permitiría aumentar la durabilidad del efecto biocida en el tiempo.

Indudablemente, se ha comprobado el potencial biocida de las microcápsulas de cinamaldehído frente a los hongos diana de estudio, pero se ha de continuar en la misma línea de investigación para encontrar la manera de prolongar en el tiempo el efecto antimicrobiano biocida observado.