2020/
2021

# FUNGISTOP

## Desarrollo de pinturas con propiedades antifúngicas mediante la adición de biocidas de origen natural

Nº Expte: IMDEEA/2020/25
Programa: PROYECTO DE I + D EN COOPERACION CON EMPRESAS

Memoria resumen de los resultados obtenidos.

**Realizado por:**
**AIDIMME**

GENERALITAT VALENCIANA
IVACE INSTITUTO VALENCIANO DE COMPETITIVIDAD EMPRESARIAL
UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo de Desarrollo Regional
*Una manera de hacer Europa*

# Contenido

*INTRODUCCIÓN* ..... *3*

*DESARROLLO DEL PROYECTO* ..... *3*

*1 OBJETIVO* ..... *3*

*2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS* ..... *3*

*3 RESULTADOS* ..... *4*

3.1 SELECCIÓN DE LOS ANTIFÚNGICOS EN BASE A ACEITES ESENCIALES ..... 4

3.2 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A LOS compuestos ANTIFÚNGICOS ..... 7

3.2.1 MÉTODO ESTANDARIZADO M44-A ..... 7

3.2.2 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS PRELIMINARES ..... 9

3.2.3 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS CON ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO ..... 12

3.3 EVALUACIÓN DEL AGENTE DE TOMILLO (PLT) COMO AGENTE BIOCIDA EN PINTURAS ..... 20

3.3.1 APLICACIÓN DE LAS PINTURAS Y ADITIVACIÓN DEL BIOCIDA ..... 21

3.3.2 MÉTODO SEGÚN UNE-EN 15457:2014. PINTURAS Y BARNICES ..... 27

3.4 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD FUNGICIDA/FUNGIESTÁTICA 31

3.5 ENVEJECIMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EVALUAR SU ACTIVIDAD FUNGICIDA/FUNGISTÁTICA ..... 47

3.5.1 PROCESO DE ENVEJECIMIENTO ..... 47

3.5.2 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS ..... 50

*CONCLUSIONES. RESUMEN* ..... *56*



"Proyecto cofinanciado por los Fondos FEDER, dentro del Programa Operativo FEDER de la Comunitat Valenciana 2014 - 2020"

## *INTRODUCCIÓN*

Desde hace décadas, la preocupación por mantener nuestros entornos limpios e higiénicos se ha convertido en numerosas ocasiones en una obsesión, y más en la actual situación de pandemia. De hecho, la desinfección es imprescindible en espacios públicos como los hospitales, donde bacterias y hongos pueden ocasionar graves problemas de salud. Una realidad que acumula una prevalencia del 21% en UCI's por contagio intrahospitalario, por ejemplo con los hongos del género *Aspergillus*, con tasas de mortalidad que superan el 40%.

La proliferación de microorganismos en ambientes interiores húmedos es la principal razón del deterioro de la calidad del aire. La degradación de la calidad del aire provocada por hongos es causada por sus desechos, esporas y micotoxinas, los cuales se mezclan con el aire y son transportados en el mismo, pudiendo causar serios problemas de salud debido a la exposición de las vías respiratorias en ambientes interiores contaminados.

Enfermedades como las alergias, micosis broncopulmonar alérgica, sinusitis y asma alérgica se producen por la inhalación, ingesta o contacto con esporas fúngicas. Debido a su capacidad para colonizar el cuerpo humano, éstas pueden causar aún más daño en el sistema inmunológico que el polen u otras fuentes alergénicas. La exposición a la humedad intradomiciliaria y a la contaminación por hongos es un problema de salud pública que aumenta el riesgo de enfermedades alérgicas, afectando a casi un tercio de la población europea

## *DESARROLLO DEL PROYECTO*

### 1 OBJETIVO

El principal objetivo de este proyecto es el desarrollo de pinturas que se caractericen por mantener ambientes de interior higiénicos, mediante la aplicación de biocidas que limiten el desarrollo de hongos. Los biocidas empleados serán de origen natural con el fin de preservar el medioambiente, desde dos puntos de vista. En primer lugar, por la biodegradabilidad de los biocidas naturales empleados. Y en segundo lugar, anclando mediante enlaces covalentes los principios biocidas naturales a soportes inertes, con el fin de evitar su liberación total a corto plazo y así aumentar su vida útil, disminuyendo la generación de residuos y el uso de recursos.

### 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos del proyecto son:

- Estudiar y seleccionar biocidas de origen natural modificados mediante la unión covalente del principio activo a soportes inertes.
- Evaluar la actividad fungicida/fungiestática de estos nuevos biocidas seleccionados.

- Comparar la actividad fungicida/fungiestática de estos nuevos biocidas con la obtenida en las microcápsulas de aceites esenciales con actividad demostrada en el proyecto ANTIBACTERIANO.
- Desarrollar y optimizar procedimientos de incorporación y aplicación de estos nuevos biocidas a pinturas.
- Evaluar la actividad fungicida/fungiestática de las pinturas con los nuevos biocidas antes y después del envejecimiento.
- Comparar la actividad fungicida/fungiestática de estos nuevos biocidas en las pinturas, con la obtenida en las microcápsulas de aceites esenciales antes y después del envejecimiento.

# 3 RESULTADOS

## 3.1 SELECCIÓN DE LOS ANTIFÚNGICOS EN BASE A ACEITES ESENCIALES

Se adquirieron una serie de agentes biocidas funcionalizados de la empresa Laurentia S.L., todos ellos en base a aceites esenciales, partiendo de los favorables resultados del cinamaldehído obtenidos en el proyecto ANTIBACTERIANO. Se han seleccionado la nueva línea de biocidas funcionalizados creados por la empresa Laurentia S.L., debido a que en este caso se caracterizan por mejorar su inmovilización de las partículas de sílice, impidiendo el agotamiento del efecto biocida ocasionado por la alta volatilidad de los aceites esenciales. En el proceso de inmovilización se basa en enlazar los aceites esenciales biocidas al soporte de sílice amorfa (porosos, no porosos y microparticulados) a través de enlaces covalentes en superficie. Se escogen los productos en base a aceites esenciales de comprobado efecto antimicrobiano como son el cinamaldehído, la vainillina y el tomillo.

Por lo general, el producto viene en forma sólida, aunque también se recibe en diluciones ya dispersas en agua, siempre en un recipiente herméticamente cerrado. Si viene en formato sólido, para averiguar sus propiedades antifúngicas, se realiza una emulsión en agua (destilada y previamente esterilizada) con la ayuda de un dispersante comercial aproximadamente al 1% (bien en líquido BYK 111 o en polvo). En algún caso para prevenir la aglomeración del sólido, se ha molido el producto después de su pesada para posteriormente ser incorporado a la disolución.

**CINAMALDEHÍDO**

- SI-CIN-2: cinamaldehído (26%) con enlaces covalentes en el soporte de sílice. Se realiza la emulsión para obtener un 2% y 4% de cinamaldehído. Se toma como referencia esta concentración al haber comprobado la eficacia fungicida del producto biocida similar en el proyecto anterior ANTIBACTERIANO. La mezcla, de un color ligeramente más amarillo claro, se separa en dos fases con relativa rapidez.

- SI-CIN-3: cinamaldehído (20%) con enlaces covalentes en el soporte de sílice. Se realiza la emulsión para obtener un 2% y 4% de cinamaldehído. Se toma como referencia esta

concentración al haber comprobado la eficacia fungicida del producto biocida similar en el proyecto anterior ANTIBACTERIANO. La mezcla, de un color ligeramente más amarillo claro, se separa en dos fases con relativa rapidez.

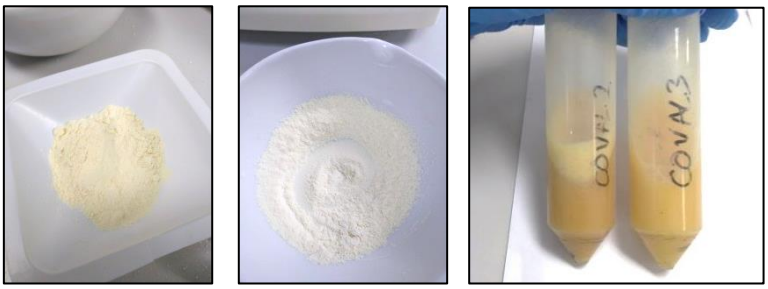



**Figura 1. Producto funcionalizado SI-CIN-3 antes y después de la molienda. Emulsión de los dos productos Si-Cin-2 y Si-Cin 3**

- SI-CIN-1: recibido en emulsión Si-Cin-4 al 8% de cinamaldehido y Si-Cin-5 al 20% de cinamaldehido.

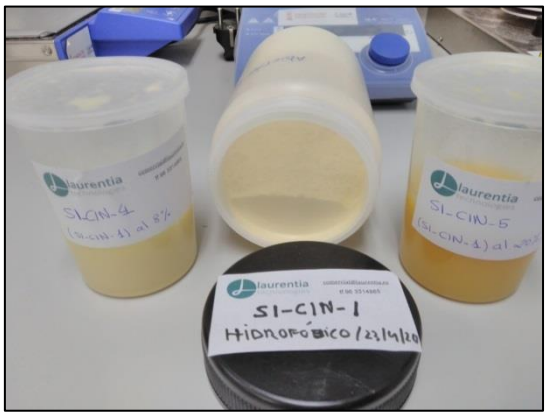



**Figura 2. SI-CIN-1 sólido y emulsiones SI-CIN-4 y SI-CIN-5**

**VAINILLINA**

- VAI síntesis I y II (funcionalizada): mismo producto sintetizado por la empresa de dos maneras distintas, ya que se cree que en un proceso más húmedo se podrá dispersar mejor en agua. Se trabaja con éstas de manera análoga a Si-Cin-2 y -3 ya que es un soporte de sílice con vainillina. Se realiza la emulsión con un 10% del sólido para comprobar la resistencia antifúngica comparando frente el cinamaldehido funcionalizado.

Figura 3. Producto a base de sílice-vainilla funcionalizada

- NP-VAI-1: vainillina al 25% encapsulado en sílice y funcionalizada con uniones covalentes. Se prepara una emulsión muy concentrada de estas (50% de sólido).

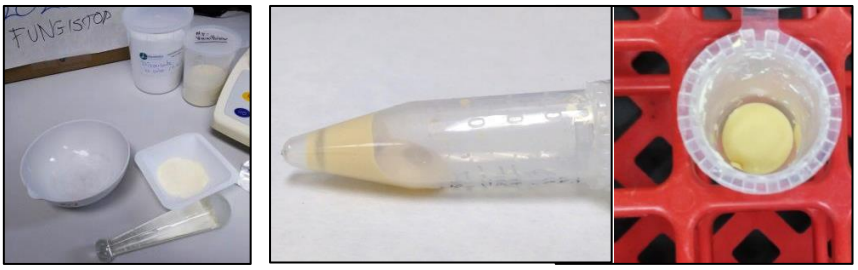



Figura 4. Molienda de las cápsulas de vainillina funcionalizadas (izq.) y obtención de la emulsión al 50%

**TOMILLO**

- PLT-30: emulsión del aceite esencial de tomillo al 32% con sílice, producto funcionalizado.
- PLT-40: emulsión del aceite esencial de tomillo al 39% con sílice, producto funcionalizado.

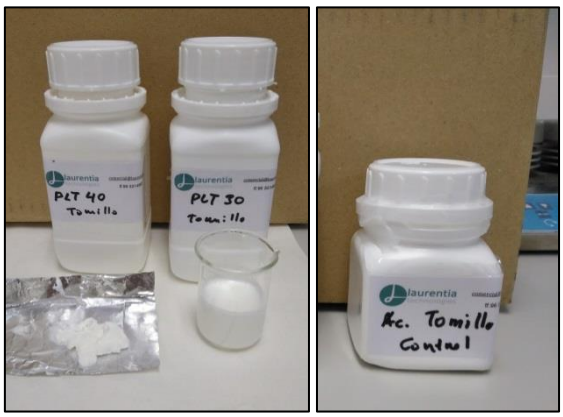



Figura 5. Producto en base a tomillo funcionalizado, emulsiones PLT 30 y 40 (izquierda) a base del aceite de tomillo control (dcha)

## 3.2 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A LOS COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS

Se ha seguido el método del halo de inhibición M44-A (método de difusión en disco) para hongos, con algunas de las modificaciones descritas por el EUCAST (sustituir la lectura visual por la espectrofotométrica) y lo indicado en el método M38-A3 (macrodilución para hongos filamentosos). Con este procedimiento se obtienen resultados cualitativos suficientemente sensibles para el objeto de la evaluación, ya que se van a ensayar antifúngicos, en base a extractos naturales en forma de sólidos funcionalizados, que permiten la dosificación gradual de los agentes antimicrobianos, frente a especies de hongos diana de los materiales de estudio (de proliferación en pinturas y otros recubrimientos). Debido a la naturaleza química del sólido, 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).

### 3.2.1 MÉTODO ESTANDARIZADO M44-A

Este método es similar al de las bacterias (con algunas modificaciones) y está basado en el estudio de la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos en función del halo de inhibición producido por la difusión del antimicrobiano en un medio de cultivo sólido. La lectura, aunque hay poca diferencia entre 24 y 48 horas, se recomienda realizarla a las 24h, siempre y cuando el crecimiento en la placa sea suficiente. En este caso, el crecimiento fúngico es relevante a partir del segundo día por lo que se realiza la lectura a las 72 horas.

Preparación de las placas Petri

Una vez preparado el medio de cultivo de patata dextrosa agar (PDA) siguiendo las indicaciones del fabricante, se esteriliza en autoclave (120 ºC, 20 minutos) y se deja enfriar a 45-50ºC para verter en placas Petri de 9 cm de diámetro a razón de aproximadamente 28 ml de medio. Una vez enfriadas las placas a temperatura ambiente, se guardan en nevera.

Preparación del inóculo

Según método M27-A3 para levaduras, se prepara el inóculo tocando con el asa de siembra las colonias crecidas en la placa y se resuspenden en un tubo de solución salina (0,85% NaCl). En el método de microdilución en caldo para hongos filamentosos (M38-A) se detalla otro procedimiento para facilitar la recogida de conidios. En este, se utiliza el asa de siembra introduciéndola previamente en un surfactante (Tween 20) y pasando entonces el asa por encima de los conidios en la placa de crecimiento (en PDA). Se resuspende en tubos estériles con solución salina estéril al 0,85% de NaCl y se agita con la ayuda de un agitador vórtex. Después de 5 minutos de reposo, se recolecta el sobrenadante, asegurándose de que no se arrastra el micelio, que podría dificultar la determinación de la concentración de esporas en la solución. Ésta se ajusta a una densidad óptica de 0,5 McFarland con la ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda 530 nm), que equivale aproximada a $1\text{-}5\cdot10^6$ UFC/ml. En muchos de los casos, debido a que el tamaño de los conidios es distinto para cada especie, la densidad óptica (DO) variará mucho entre especie y especie. Por lo que, en estos casos, resulta

más preciso la realización de una curva de calibrado para determinar la UFC según la densidad óptica de cada hongo en particular.

Inoculación de las placas- método interno

Dado que es un método usual y muy validado internamente, se pipetean 100 µl de solución a la concentración adecuada de conidios y se reparten homogéneamente por toda la placa con el asa Digralski previamente esterilizado.

Tras esto, se aplican los discos impregnados en el agente antimicrobiano. Cuando el disco impregnado se pone en contacto con el agar, el agente antimicrobiano se difunde y, dependiendo de su capacidad biocida, se evalúa la inhibición.

Incubación

La incubación se realiza a 35ºC durante 24h dependiendo de si hay suficiente crecimiento. Estos parámetros varían mucho dependiendo de las especies de hongos, por lo que, para las utilizadas en el estudio, se requieren de una menor temperatura (25 ºC) y 72 horas. Se mide el halo donde se produce una reducción importante del crecimiento. La lectura es subjetiva y se requiere de experiencia para dar medidas exactas. Se utiliza un pie de rey para proporcionar medidas más precisas y adaptarse a las geometrías de cada halo.

### 3.2.2 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS PRELIMINARES

Para el cinamaldehido frente a *A. niger*, no se observa sensibilidad al agente funcionalizado aunque sí al aceite esencial no microparticulado.

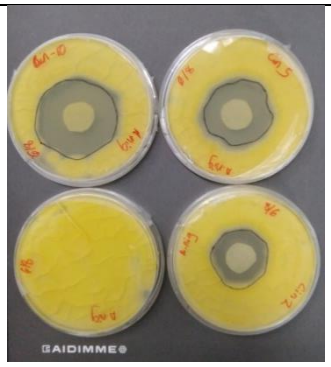
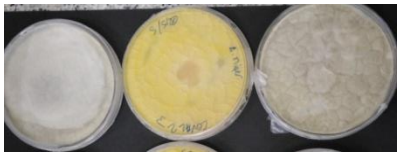
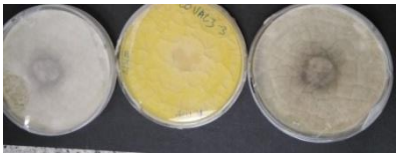
<table>
<tr><td>CIN 0%, 2%, 5% y 10%<br><br>Aceite esencial-control</td><td colspan="2">  </td></tr>
<tr><td>Si-CIN 2 al 2% y al 4%</td><td>  </td><td> </td></tr>
<tr><td>Si-CIN 3 al 2% y 4%</td><td>  </td><td> </td></tr>
<tr><td>Si-CIN 1 al 8 y 20%</td><td> </td><td> </td></tr>
</table>

**Figura 6. Crecimiento del *A.niger* frente a distintos productos biocidas en base a cinamaldehído**

Para la vainillina frente a *A. niger*, no se observa sensibilidad al agente funcionalizado, aunque sí para el aceite esencial pero a elevadas concentraciones (50-100%).

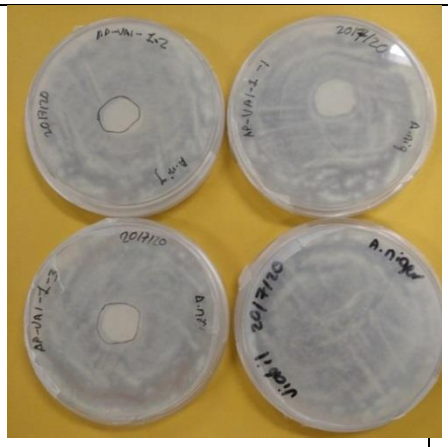
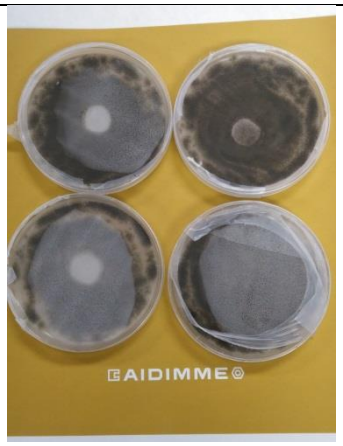
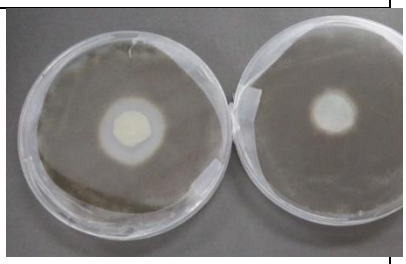
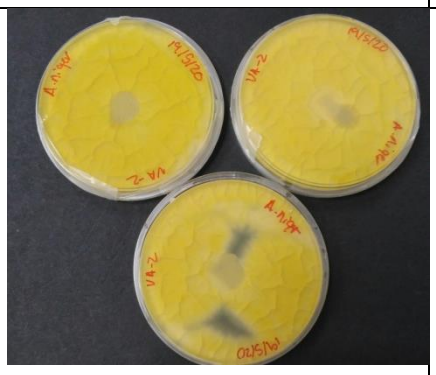
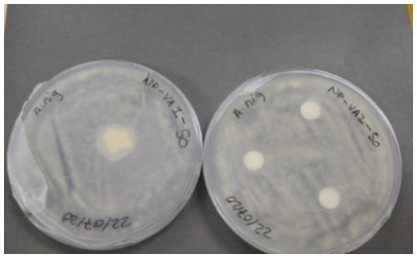
| | | |
|---|---|---|
| VAI - control<br>0%,<br>2%,<br>5%<br>10% |  |  |
| VAI - Control<br>50% y 100% | |  |
| VAI SINTESIS I Y II<br>(Emulsión con sólido al 10%) |  | |
| NP VAI 1 al 12<br>Emulsión con sólido al 50% |  | |

**Figura 7. Crecimiento del *A. niger* frente a distintos productos biocidas en base a Vainillina**

Finalmente, para las muestras de tomillo frente al hongo representativo A. niger, se observa una inhibición del crecimiento, que se muestran en las imágenes a continuación.

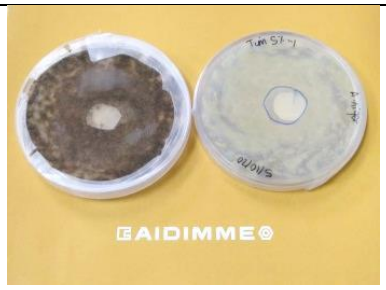
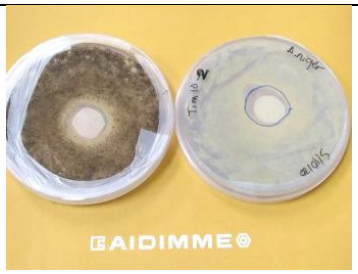
| | | |
|---|---|---|
| T - control<br>5%<br>10% |  |  |
| T - control<br>20%<br>30% | | |
| PLT-30<br>8%<br>16% | | |
| PLT-40<br>10% | | |

**Figura 8. Crecimiento del *A. niger* frente a distintos productos biocidas a base de Tomillo**

### 3.2.3 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS CON ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO

Tras los buenos resultados obtenidos con las partículas funcionalizadas de tomillo, se decide profundizar en el estudio de este aceite esencial. Así pues, los hongos de estudio que se han seleccionado han sido aquellas especies de interés en el ámbito de las pinturas según las directrices de la norma UNE EN 15457 *Pinturas y barnices*. Además se trata de cepas de hongos críticas en personas alérgicas y/o asmáticas, así como inmunodeprimidos.

Los hongos seleccionados se detallan en la siguiente lista, procediendo estos de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) e incluyéndose su código identificativo.

- Exterior:
  - *Aureobasidium pullulans* CECT 2703
  - *Cladosporium cladosporioides* CECT 20805
  - *Alternaria alternata* CECT 20560
- Interior
  - *Aspergillus niger* CECT 2807/CECT 2700
  - *Aspergillus versicolor* CECT 2814
  - *Penicilium purpurogenum* CECT 20441
  - *Stachybotrys chartarum* CECT 2804

Se realizan diluciones del aceite de tomillo al 5%, 10%, 20% y 30% con agua destilada y esterilizada (0,5% de Tween 20) para los hongos *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* y *Aureobasidium pullulans* (algunos de los hongos de interés del estudio, incluidos en la norma UNE EN 15457 para pinturas y barnices).

La sensibilidad del *Aspergillus niger* al aceite esencial de tomillo no parece ser tan elevada como para el cinamaldehido ya estudiado, pero presenta un pronunciado halo de inhibición, como se muestra en la tabla resumen con los resultados obtenidos. En cambio, los demás hongos son muy sensibles a este producto.

**Tabla 1. Resultados obtenidos en los ensayos de sensibilidad microbiana frente al agente antifúngico de tomillo (aceite de control). (W) Medida en mm del halo de inhibición**

| HONGOS- TOMILLO | | 5% | 10% | 20% | 30% |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Aspergillus niger*** | **Ø disco (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** |
| Réplica 1 | 17 | 2,97 | 5,56 | 5,78 | 11,5 |
| Réplica 2 | 17 | 2,33 | 4,38 | 6,45 | 8,76 |
| **MEDIA** | **17** | **2,65** | **4,97** | **6,12** | **10,13** |
| ***Aspergillus versicolor*** | **Ø disco (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** |
| Réplica 1 | 17 | 9,83 | 11,42 | 19,56 | 39,40 |
| Réplica 2 | 17 | 7,42 | 16,49 | 21,15 | 41,21 |
| **MEDIA** | **17** | **8,63** | **13,96** | **20,36** | **40,31** |
| ***Aureobasidium pullulans*** | **Ø disco (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** |
| Réplica 1 | 17 | 4,19 | 9,01 | 21,73 | 32,17 |
| Réplica 2 | 17 | 5,73 | 8,61 | 10,04 | 34,66 |
| **MEDIA** | **17** | **4,96** | **8,81** | **15,90** | **33,42** |

Se observa que a partir del 20% de concentración del aceite de tomillo, las diferentes especies de hongos muestran una gran sensibilidad a este producto. Cabe anotar que el comportamiento de *A. versicolor*, para una concentración de tomillo del 30%, muestra apenas crecimiento en la placa Petri de cultivo. Se toma como MIC (concentración mínima inhibitoria) el rango de concentraciones de entre 10-20% del aceite esencial de tomillo. Tomando este porcentaje como referencia, se van a elaborar las diluciones de las cápsulas de este producto.

Las imágenes que se muestran a continuación reflejan el poder biocida del aceite esencial de tomillo frente a algunos de los hongos de interés, mostrándose de nuevo los resultados para *A. niger*, para poder comparar. Es posible apreciar la actividad fúngica en las concentraciones más elevadas, impidiendo el desarrollo completo de las especies de *Aspergillus*. Las imágenes fueron tomadas entre 4-7 días del inicio del ensayo, posterior a la lectura de las placas y determinación del halo de inhibición ya que su crecimiento fue más lento. Como se observa en la imagen del *A. versicolor* al 30%, el halo de inhibición se expande casi por la totalidad del diámetro de la placa Petri inoculada con 100 µl de la solución de esporas del hongo.

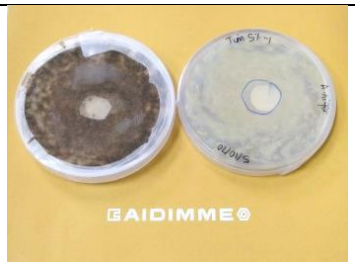
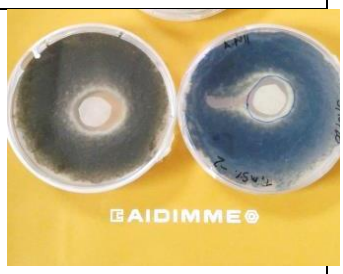
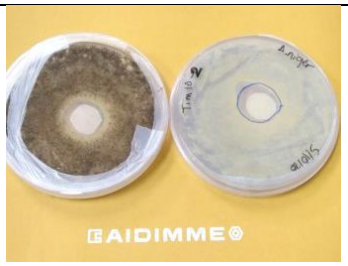
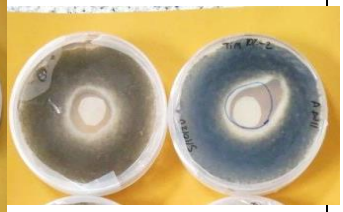
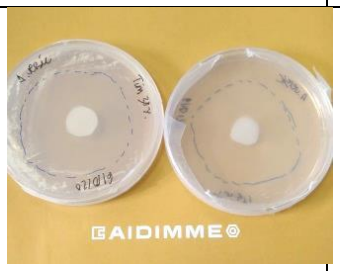
| Conc. | *Aspergillus niger* | *Aspergillus versicolor* | *Aureobasidium pullulans* |
|---|---|---|---|
| 5% |  | |  |
| 10% |  | |  |
| 20% | | | |
| 30% | |  | |

**Figura 9. Halo de inhibición para los hongos de ensayo frente al aceite de tomillo control a distintas concentraciones**

Tras la selección de los biocidas de origen natural modificados mediante la unión covalente del principio activo a soportes inertes, donde los ensayos preliminares facilitaron un avance de la sensibilidad de los microrganismos de estudio a los mismos, se realizan ensayos para la evaluación de la actividad fungicida o, en su defecto, fungistática de aquellos productos que obtuvieron mejores resultados.

Para dichas determinaciones, se utilizaron unos discos específicos para ensayos antibióticos, de 9 mm de diámetro. Se reparten 3 discos de manera equidistante en las placas con el medio de cultivo ya inoculado. Inicialmente, se pipetearon 100 µl de las emulsiones de las cápsulas a distintas concentraciones. Dado que a concentraciones más bajas el disco se desbordaba de

diluyente y generaba complicaciones a la hora de valorar los resultados, se decidió adicionar menor volumen de muestras por cada disco, 50 µl de muestra.

Las cápsulas funcionalizadas fueron adquiridas en formato líquido, obteniéndose una emulsión con la ayuda del surfactante Tween 20. Los resultados obtenidos fueron muy alentadores, pudiéndose observar el halo de inhibición incluso a bajas concentraciones. A continuación, se detallan los valores resultantes de los ensayos para los hongos con mayor facilidad de crecimiento en interior *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* y *Stachybrotis chartarum* para las cápsulas de tomillo con el aceite esencial al 8, 10, 16 y 20%.

En la tabla resumen para las cápsulas de tomillo, se muestran los valores del halo de inhibición para los hongos de ensayo. Es cierto que para las concentraciones más elevadas de tomillo (16 y 20%) frente a *Aspergillus versicolor* el halo observado es tal que no se observa crecimiento en la placa inoculada, por lo que los valores son orientativos. Para *St. chartarum,* se ha observado que tras más de 7 días de ensayo no hay crecimiento, incluso a la menor concentración de biocida. El tomillo posee una actividad fungicida frente a esta especie.

En el ensayo del *Aspergillus niger* frente a las cápsulas de tomillo de concentración del 20%, las muestras sufrieron un proceso de contaminación, por lo que en este caso el resultado no queda validado.

**Tabla 2. Resultados obtenidos en los ensayos de difusión en disco del agente antifúngicos de tomillo microencapsulados para tres hongos de ensayo (*A. niger*, *A. versicolor* y *St. chartarum*)**

| **CÁPSULAS TOMILLO PLT** | | **8%** | **10%** | **16%** | **20%** |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Aspergillus niger*** | | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** |
| Réplica 1 *DISCO* Ø 9 mm | Disco 1 | 3,51 | 7,36 | 18,74 | - |
| | Disco 2 | 6,02 | 6,89 | 16,34 | - |
| | Disco 3 | 5,6 | 7,62 | 18,31 | - |
| Réplica 2 *DISCO* Ø 9 mm | Disco 1 | 4,37 | 6,65 | 20,17 | - |
| | Disco 2 | 5,01 | 8,12 | 13,15 | - |
| | Disco 3 | 8,65 | 7,28 | 12,17 | - |
| **MEDIA** | | **5,53** | **7, 32** | **17,30** | **-** |
| ***Aspergillus versicolor*** | | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** |
| Réplica 1 *DISCO* Ø 9 mm | Disco 1 | 9,7 | 12,08 | 21 | 26 |
| | Disco 2 | 7,6 | 9,09 | 21 | 26 |
| | Disco 3 | 6,35 | 16,87 | 21 | 26 |
| Réplica 2 *DISCO* Ø 9 mm | Disco 1 | 10,05 | 11,7 | 21 | 26 |
| | Disco 2 | 14,45 | 15,47 | 21 | 26 |
| | Disco 3 | 15,28 | 12,07 | 21 | 26 |
| **MEDIA** | | **10,57** | **12,88** | **21** | **26** |
| ***Stachybotrys chartarum*** | | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** |
| Réplica 1 *DISCO* Ø 9 mm | | Discos 1, 2 y 3 | >26 | >26 | >26 |
| Réplica 2 *DISCO* Ø 9 mm | | Discos 1, 2 y 3 | >26 | >26 | >26 |
| **MEDIA** | | **>26** | **>26** | **>26** | **>26** |

A continuación, se observan las imágenes del halo de inhibición del crecimiento para las diferentes cepas de hongos de interior, a diferentes concentraciones de cápsulas de tomillo:

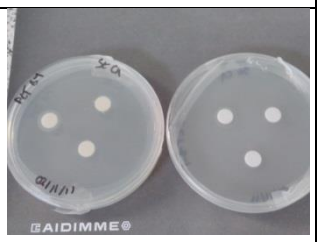
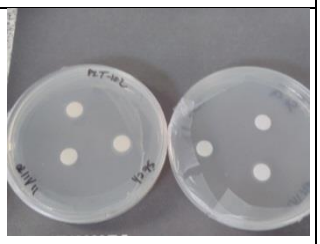
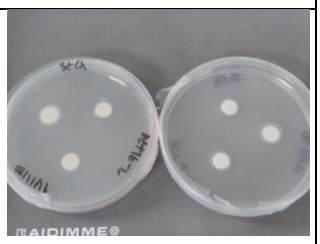
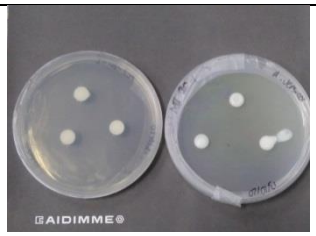
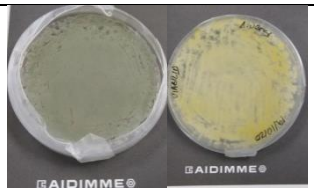
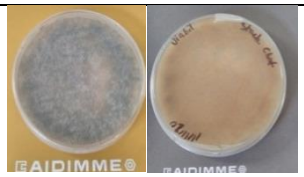
| **CÁPSULAS TOMILLO- SENSIBILIDAD DE LOS HONGOS (de interior)** | | | |
|---|---|---|---|
| TOMILLO | *Aspergillus niger* | *Aspergillus* versicolor | *Stachybotris chartarum* |
| 8% | | |  |
| 10% | | |  |
| 16% | | |  |
| 20% | - |  | |
| VIABILIDAD | |  |  |

**Figura 10. Sensibilidad de tres hongos de interior (*A. niger*, *A.versicolor* y *St. chartarum*) de ensayo al agente antifúngico microencapsulado y funcionalizado**

Para las cepas de hongos de exterior, la evaluación de la actividad fungicida o fungistática se muestra a continuación. Tanto para *A. alternata* como para *A. pullulans*, se demuestra que a concentraciones de tomillo equivalentes o inferiores al 10%, existe una inhibición del crecimiento.

En algunos de los casos se observa un exceso de desbordamiento del agente antifúngico en el disco (por falta de absorción del mismo), por lo que algunos de los halos podrían haber aparecido con valores por encima de lo nominal, como es el caso de uno de los discos con biocida al 8% para *A. alternata* (Tabla 12). Estos valores han sido descartados.

**Tabla 3. Resultados obtenidos en los ensayos de difusión en disco del agente antifúngico de tomillo microencapsulado para los hongos de ensayo *A. alternata* y *A. pullulans*.**

| **CÁPSULAS TOMILLO PLT** | | **8%** | **10%** | **16%** | **20%** |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Alternaria alternata*** | | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** |
| Réplica 1 *DISCO* Ø 9 mm | Disco 1 | - | 5,59 | 25,39 | 19,02 |
| | Disco 2 | - | 5,38 | 27,29 | 19,93 |
| | Disco 3 | - | 4,64 | 19,46 | 16,44 |
| Réplica 2 *DISCO* Ø 9 mm | Disco 1 | 5,09 | 7,52 | 24,52 | 11,94 |
| | Disco 2 | 5,18 | 7,75 | 22,7 | 15,01 |
| | Disco 3 | 9,9 | 6,97 | 21,11 | 15,65 |
| **MEDIA** | | **6,72** | **6,31** | **23,41** | **16,33** |
| ***Aureobasidium pullulans*** | | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** | **W (mm)** |
| Réplica 1 *DISCO* Ø 9 mm | Disco 1 | 5,25 | 5,34 | 6,85 | 18,78 |
| | Disco 2 | 6,16 | 8,42 | 7,22 | 14,49 |
| | Disco 3 | 6,78 | 8,29 | 9,29 | 16,88 |
| Réplica 2 *DISCO* Ø 9 mm | Disco 1 | - | 4,02 | 16,99 | 13,96 |
| | Disco 2 | 4,25 | 7,37 | 6,88 | 14,7 |
| | Disco 3 | 5,24 | 5,5 | 7,96 | 19,53 |
| **MEDIA** | | **5,54** | **6,49** | **9,20** | **16,39** |

(-) Valores no contemplados por falta de absorción del disco

Se muestran las imágenes tras varios días después de la lectura del ensayo, debido a que inicialmente a las 48 horas, los hongos aún no se habían desarrollado por completo.

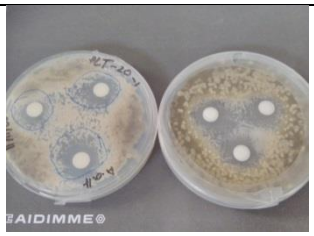
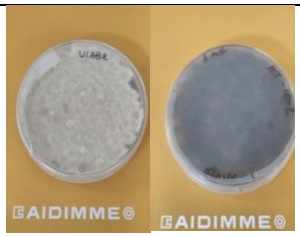
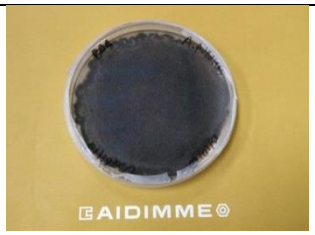
| CÁPSULAS TOMILLO- SENSIBILIDAD DE LOS HONGOS (de exterior) | | |
|---|---|---|
| TOMILLO | *Alternaria alternata* | *Aureobasidium pullulans* |
| 8% | | |
| 10% | | |
| 16% | | |
| 20% |  | |
| VIABILIDAD |  |  |

**Figura 11. Sensibilidad de dos de los hongos de exterior exterior (*A. alternata* y *A. pullulans*) de ensayo al agente antifúngico funcionalizado**

Para el producto funcionalizado en base a aceite de tomillo, se ha comprobado que, para concentraciones entre 8- 10%, los hongos de ensayo (de la norma UNE-EN 15457:2014) tienen sensibilidad frente a este agente. En alguno de los casos, la actividad antifúngica es tan elevada

que incluso a bajas concentraciones ejerce un poder biocida (*St. chartarum*) e inhibitorio completo del crecimiento (*A. versicolor* y *A. alternata*). En todos los casos se ha observado el efecto antimicrobiano deseado. Por lo tanto, al validar su efecto antifúngico, se ha determinado la concentración adecuada para ser adicionada a los productos de las empresas colaboradoras del presente proyecto.

## 3.3 EVALUACIÓN DEL AGENTE DE TOMILLO (PLT) COMO AGENTE BIOCIDA EN PINTURAS

Las pinturas utilizadas en el proyecto, tanto procedentes de las empresas colaboradoras del proyecto, así como de empresas comerciales, son de color blanco y en base agua, excepto para uno de los recubrimientos que deja un acabado transparente (P2-E).

Se han recibido cinco pinturas distintas, dos para paredes de interior y tres para acabados de mobiliario. En la siguiente tabla se muestran las características de cada uno de los productos, clasificados según las distintas empresas.

**Tabla 4. Productos suministrados por las empresas colaboradoras así como seleccionados dentro del mercado comercial**

| **Fabricante** | **Producto: recubrimiento al agua** | **Características: rendimiento, secado** |
|---|---|---|
| Empresa colaboradora 1 | **P1**: Esmalte acrílico blanco, muebles interior | Pistola, 8-10 $m^2$/l, 1 capa, densidad 1,2 kg/l, 10-15% diluir |
| Empresa colaboradora 2 | **P2-I**: pintura color blanco muebles interior<br>**P2-E**: recubrimiento translúcido, muebles interior | Pistola húmeda, 100 µ, 1 capa, 10% diluir |
| Empresa comercial 1 | **P3**: pintura acrílica mate, paredes interior/exterior | Brocha, 6-8 $m^2$/l, 2 capas, 4 horas secado, 10% diluir |
| Empresa comercial 2 | **P4**: pintura plástica mate, paredes interior/exterior | Brocha, 8 $m^2$/l, 2 capas, 4-5 horas secado, 10% diluir |

Se adquiere, además, un producto biocida modificado por la misma empresa Laurentia S.L., este es el PLT-T al 30% (PLT-30-T) de agente biocida en base a timol, que pretende mejorar sus prestaciones (aditivado con una parte de timol sintético).

Figura 12. Producto modificado biocida, PLT-T al 30% solución acuosa

Este producto PLT-30-T, así como los productos de tomillo ya mencionados PLT 30 y PLT 40, han sido diluidos a las concentraciones adecuadas para mezclarlas con las pinturas y realizar el ensayo de eficacia de los agentes antimicrobianos. Las concentraciones escogidas se han basado en la eficacia del biocida (PLT 30), demostrada anteriormente mediante el método de difusión en placa (medida del halo de inhibición), donde se observó la existencia de la inhibición del crecimiento de los hongos alrededor del 10%. Las probetas para el ensayo con concentraciones al 3, 5 y 10% (p/p) del agente de tomillo en la pintura se obtuvieron con el producto mejorado PLT-30-T, mientras que el producto PLT 30 se utilizó para el ensayo a concentraciones bajas (0,3% 1 y 3%). El producto PLT 40, al ser una pasta con mayor dificultad de dilución, se utilizó para las mezclas al 20%.

### 3.3.1 APLICACIÓN DE LAS PINTURAS Y ADITIVACIÓN DEL BIOCIDA

El proceso de aplicación se adapta de la norma UNE-EN 15457:2014.

Se aplican las pinturas según las especificaciones de cada fabricante sobre un soporte de papel de filtro (filtro en forma de disco o bien papel de filtro) sin efecto biocida. Las pinturas P1 y P2 han sido aplicadas por pistola aerográfica, mientras que las P3 y P4 se aplican con pincel (a brocha). Se pintan los filtros de papel cada una de las pinturas con el biocida a las concentraciones requeridas y, además, se obtienen muestras pintadas únicamente con la pintura a modo de control. Finalmente, también se cortan probetas del papel de filtro utilizado como soporte (sin recubrir) para ver el comportamiento del soporte. Después de mantener las probetas bajo condiciones de acondicionamiento al menos durante 5 días, se esterilizan por autoclave, previniéndolas del contacto directo con el agua.

**PINTURA 1**

Es un esmalte blanco acrílico monocomponente en base acuosa para decoración del mueble. Se recomienda aplicar con pistola aerográfica para un mejor acabado, pero es posible pintar con brocha o rodillo. El rendimiento es de 8-10 $m^2/l$ y un espesor de capa de 120-140 $g/m^2$ (densidad 120 g/cm). Se diluye entre un 10-15 % para ajustar la viscosidad para la aplicación

en pistola para una presión de entre 2,5 y 3,5 bares y boquilla de 1,8-2 mm. Según las especificaciones del fabricante, se pinta en 1-2 manos, dejando secar entre 16-24 horas en el caso de repintar. La pintura se seca al tacto tras 90 minutos, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad en el momento de la aplicación, y el tiempo de secado total equivale a 48-72 horas.

Figura 13 – Pintura 1, acrílica blanco esmalte al agua para muebles de madera de interior.

La aplicación en el laboratorio de AIDIMME se realiza en la cabina pertinente, a una sola capa de espesor 130 g/m$^2$. Se sujetan los filtros a ser pintados en un soporte rectangular que se va a utilizar para facilitar la aplicación, permitiéndose así que las muestras no se arruguen.

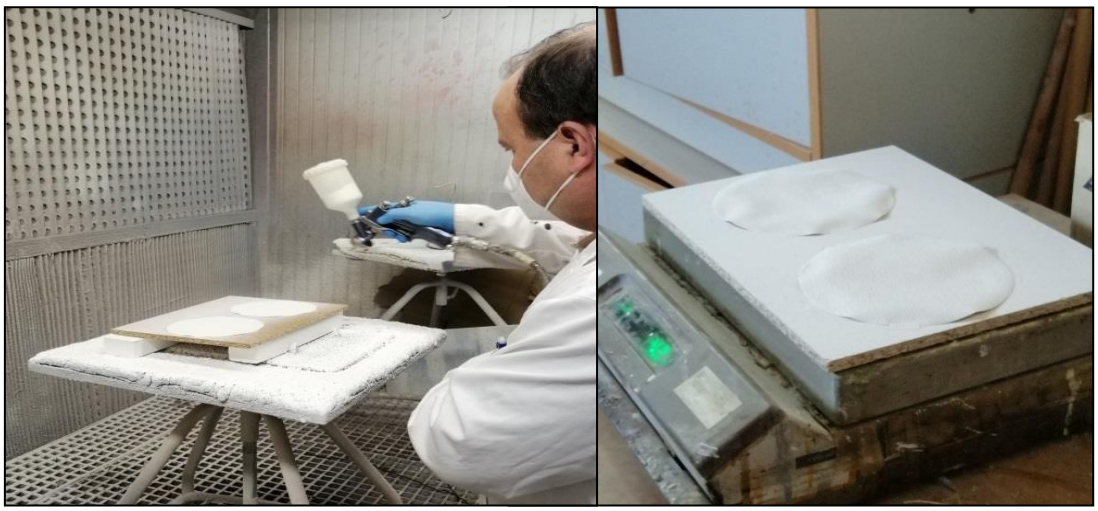


Figura 14. Aplicación de la pintura P1 por pistola aerográfica

**PINTURA 2- Blanco Interior y transparente Exterior**

Son dos recubrimientos al agua adecuadas para su aplicación en mobiliario, siendo P2-I de interior y P2-E, además, adecuado para exterior. Es posible utilizarlo tanto en uno como dos componentes pero la empresa colaboradora indica una aplicación en un componente, con pistola húmeda para un espesor máximo de 100 µ y un tiempo de curado total de un día antes de cualquier ensayo. P2-I, es una pintura de acabado color blanco, mientras que P2-E tiene un acabado transparente.

**Figura 15. Dos recubrimientos al agua distintas de la empresa colaboradora 2, para mobiliario acabado blanco (I) y transparente (E)**

Se aplican con pistola, de manera análoga para la pintura P1 y, tras un día de secado, el acabado queda de la siguiente manera, como se muestra en la imagen, acabado blanco a la izquierda y transparente a la derecha.

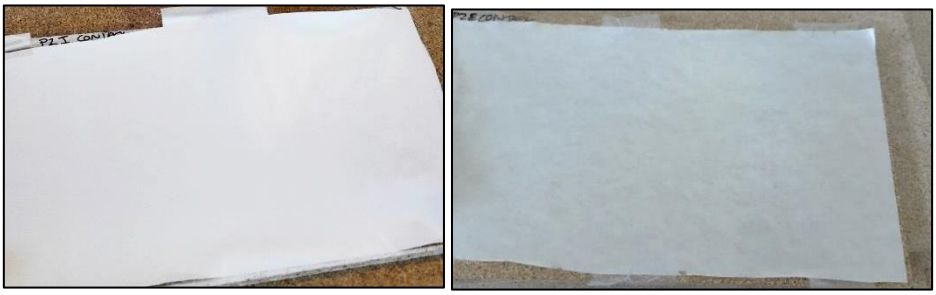


**Figura 16. Aspecto del papel de filtro tras la aplicación de las muestras, P2-I (izq.) y P2-E (dcha)**

La mezcla de las pinturas con el agente biocida se realiza pesando las cantidades adecuadas de las dos partes además de adicionando un 10% de agua destilada.

**Figura 17. Mezclas preparadas de P2I con y sin biocida (izq.), mezcla de P2-E con biocida vista desde arriba (centro) y aplicación de la misma, quedando el soporte transparente (dcha)**

## PINTURA 3

Pintura plástica mate blanca en base agua para paredes de interior, 15 litros. Tiene un rendimiento de entre 6-8 $m^2$/l, se aconseja diluir con un 10% de agua para pintar sobre soportes porosos. Para un buen acabado se aconseja aplicar dos capas, con un tiempo de secado ente capa y capa de 4 horas. La densidad es mayor a 1 kg/l.

Figura 18. Pintura 3, blanco mate acrílica al agua para paredes de interior

Se aplica con brocha fina sobre los papeles de filtro en forma de disco de 15 cm de diámetro (área 0,0176 $m^2$). Para ello, primero se pesan 3 gramos de pintura por disco y se diluye con un 10% de agua destilada. Se pinta toda la superficie por igual y se deja secar 4 horas. Transcurrido este tiempo, se pasa una segunda capa de la misma manera. Tras el secado inicial de al menos 30 minutos de la última capa aplicada, se colocan las muestras en la cámara de aclimatación según las especificaciones de la norma UNE EN 15457, al menos durante cinco días (23 ºC, 50% humedad). Las mezclas con el biocida se realizan pesando la cantidad de biocida y pintura necesarias y adicionando agua destilada. En la imagen se muestra el proceso.

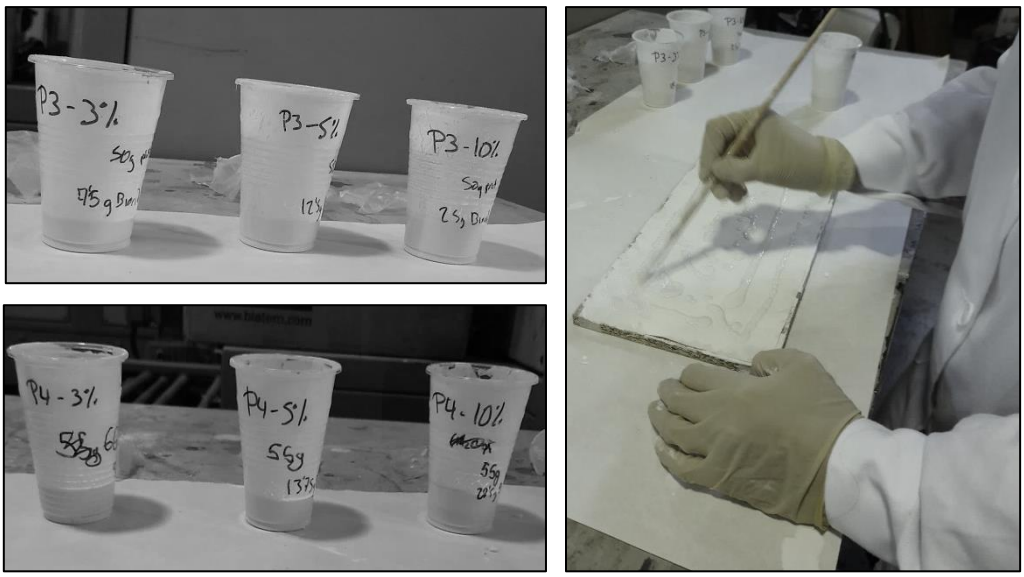



Figura 19. Aplicación de P3 y P4 con biocidas

De cada filtro pintado con la muestra, se obtienen una serie de probetas evitando los bordes. Se envuelven con papel de aluminio y se esterilizan en autoclave. Se secan a una temperatura ambiente y se almacenan hasta ser ensayadas.

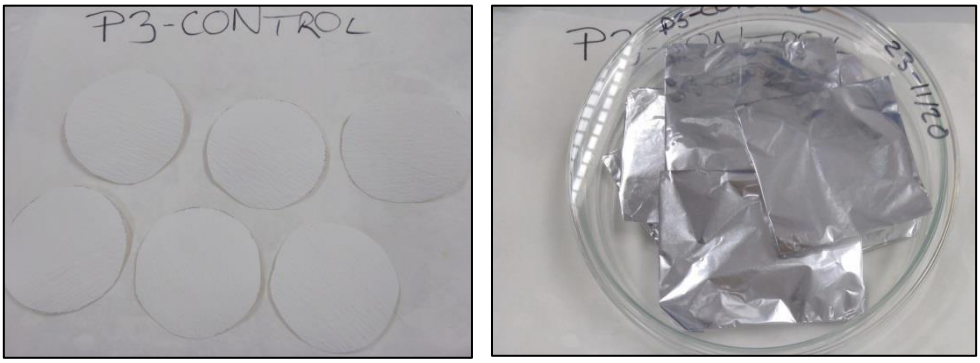



**Figura 20. Probetas de la pintura 3 para el ensayo según la norma EN15457 tras su acondicionamiento (izq) y tras el proceso de esterilización en autoclave.**

**PINTURA 4**

Pintura plástica blanca en base agua para paredes de interior, 4 litros. Tiene un rendimiento de 8 $m^2$/l, se aconseja diluir con un 10% de agua para pintar sobre soportes porosos. Para un buen acabado se aconseja aplicar dos capas, con un tiempo de secado ente capa y capa de 4-5 horas. La densidad es mayor a 1 kg/l.

**Figura 21. Pintura 4, blanco mate plástica al agua para paredes de interior**

Se aplica con brocha fina sobre dos papeles de filtro en forma de disco de 15 cm de diámetro (área 0,0176 $m^2$). Para ello, primero se pesan 3 g de pintura por disco y se diluye con un 10% de agua destilada. Se pinta toda la superficie por igual y se deja secar 4 horas. Transcurrido

este tiempo, se pasa una segunda capa de la misma manera. Tras el secado inicial de al menos 30 minutos de la última capa aplicada, se colocan las muestras en la cámara de aclimatación según las especificaciones de la norma UNE EN 15457, al menos durante cinco días (23 ºC, 50% humedad).

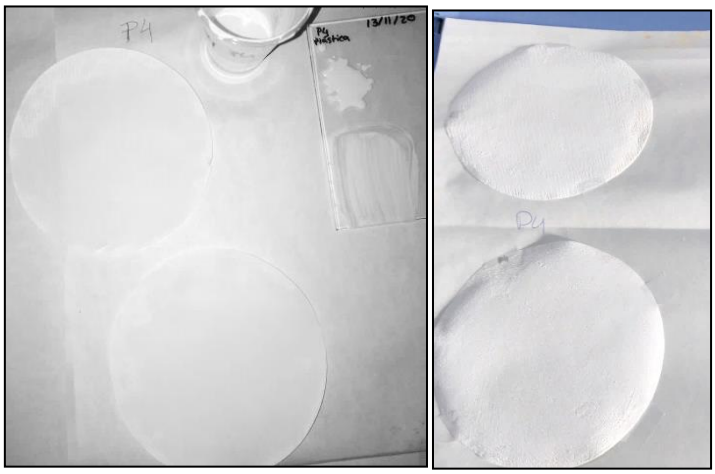


Figura 22. Aplicación de la pintura 4, a borcha (izquierda), muestra seca tras el acondicionamiento (dcha)

Se realiza el mismo procedimiento para obtener las probetas sin y con biocida a distintas concentraciones para el resto de pinturas.

### 3.3.2 MÉTODO SEGÚN UNE-EN 15457:2014. PINTURAS Y BARNICES

El método de laboratorio para el ensayo de la eficacia de los conservantes de la película de un recubrimiento frente a los hongos según la norma UNE-EN 15457:2014, se muestra en el siguiente esquema:

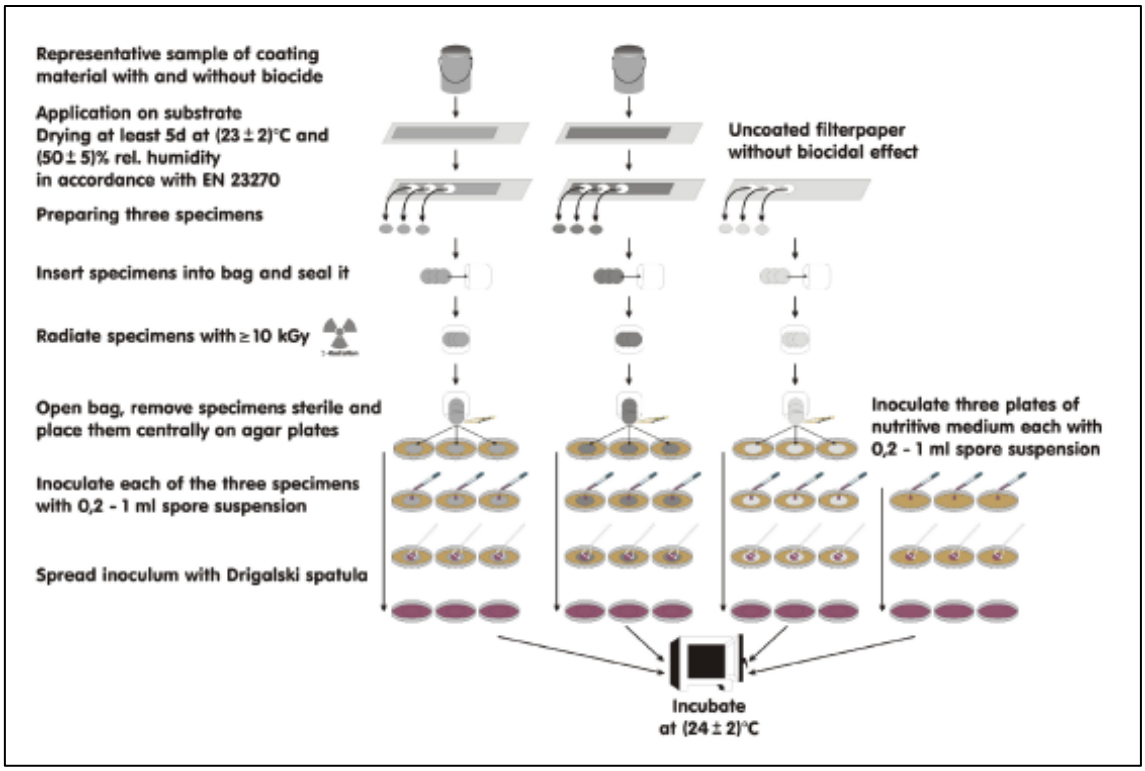



Figura 23. Procedimiento de la UNE EN 15457:2014

Preparación de muestras

Se toma una muestra representativa de la pintura que se va a ensayar y se pinta una tira de papel de filtro (sin efecto biocida) con este. El rendimiento de aplicación es el recomendado por cada fabricante del recubrimiento para el modo de empleo normal. Se pintan tantas concentraciones de biocida en cada pintura como sean necesarias.

Acondicionamiento de las muestras

Las muestras de ensayo son acondicionadas en posición horizontal una vez pintadas durante al menos 5 días a 23ºC y humedad relativa de 50%. El tiempo de acondicionamiento puede ser diferente dependiendo del material de recubrimiento y del uso final que corresponda según información facilitada por el fabricante.

Preparación y número de probetas

Tras el acondicionamiento, se preparan al menos tres probetas de un diámetro de 55 mm de las muestra para el ensayo. Para cada serie de ensayo se realizan tres probetas pintadas con el material de recubrimiento que contiene el conservante de película (biocida), tres probetas pintadas con el mismo material pero sin el biocida y tres probetas del sustrato sin pintar (filtro de papel).

Para la esterilización, se realiza en el laboratorio de AIDIMME para las pinturas al agua llevándolas a 115ºC durante 15 minutos en el autoclave y dejando después secar a 39ºC.

Preparación del medio de cultivo

Se esteriliza en autoclave (120ºC, 20 minutos) un medio de agar (1,5%)- malta (3%). Tras enfriar el medio a 55ºC, se llenan en condiciones asépticas las placas Petri esterilizadas a razón de 20 ml.

Preparación de los cultivos y subcultivos

Se obtienen subcultivos mediante la inoculación de la solución de esporas de un cultivo base a un medio de cultivo recién preparado de gel de agar, que se usara para preparar la suspensión de esporas. De este subcultivo es posible obtener un número suficiente de subcultivos para los ensayos. Después de esto, los subcultivos se incuban a 24ºC hasta que se obtiene una buena esporulación (entre 3-7 días). Los subcultivos pueden ser almacenados bajo refrigeración entre 3-7ºC hasta 3 meses.

Preparación de la suspensión de esporas

Se utiliza un subcultivo correctamente esporulado y se le añade 5 ml de agua destilada esterilizada, con la ayuda si fuese necesario de un surfactante (Tween 20 en este caso). Después de realizar la siembra en placas Petri de cultivo con el medio adecuado, se recogen las esporas con el asa de cultivo (con la ayuda de Tween 20) y se resuspende en un frasco con agua destilada esterilizada. Se agita vigorosamente y se filtra la solución de esporas con embudo y un filtro Miracloth esterilizados previamente, recogiéndose en un frasco esterilizado.

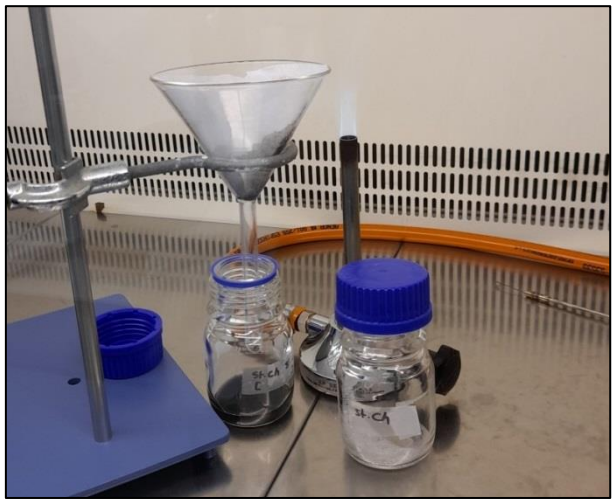


Figura 24. Filtrado de la solución de esporas de un hongo con la ayuda de "Miracloth"

Se contabiliza la concentración de esporas mediante una cámara contadora (o bien por espectrofotómetro) y se diluye hasta alcanzar una concentración de $10^6$-$10^7$, debiéndose mezclar a partes iguales todas las suspensiones de esporas destinadas al ensayo. La mezcla de suspensión de esporas debe contener dos tipos de hongos seleccionados con mayor facilidad de crecimiento en el exterior y otros dos de interior.

Inoculación e incubación

Se inoculan tres placas Petri que contengan únicamente el medio nutriente de agar, además de las tres placas Petri con las probetas pintadas y no pintadas así como el filtro de papel.

Primero, se colocan las probetas esterilizadas en el centro de la superficie del medio de cultivo utilizando las pinzas esterilizadas. La superficie pintada de la probeta debe de estar hacia arriba y debe existir un contacto completo sin burbujas de aire entre las probetas y la superficie.

Cada probeta se inocula de manera uniforma con 0,2 ml de la mezcla de suspensiones de esporas mediante una micro pipeta, en condiciones asépticas en la vitrina de seguridad y se extiende sobre la placa de agar. Para poder realizar esto, es posible adicionar hasta 0,8 ml de agua esterilizada por cada pobreta. Durante el uso de la espátula, la superficie de la probeta debe permanecer exenta de medio de agar.

Se incuban las placas a 24ºC durante el tiempo determinado de ensayo (7,14 y 21 días).

**Evaluación del ensayo**

Se evalúa de manera visual (macroscópicamente) el crecimiento de los hongos a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación, mediante la escala de la siguiente tabla. La eficacia de los conservantes de película queda demostrada si el valor del resultado final queda por debajo del grado 4.

El ensayo puede ser finalizado antes del transcurso de los 21 días en el caso de que se haya superado el grado 4. Para excluir contaminación es posible la evaluación microscópica, ya que esta invalidaría el ensayo.

Tabla 5. Evaluación de los resultados obtenido en función del grado, según la norme UNE 15457

| Grados | Evaluación |
|---|---|
| 0 | Sin micelio en la superficie de la probeta |
| 1 | Hasta el 10% de crecimiento en la superficie de la probeta |
| 2 | Entre 10% y 30% de crecimiento en la superficie de la probeta |
| 3 | Entre 30% y 50% de crecimiento en la superficie de la probeta |
| 4 | Entre 50% y 100% de crecimiento en la superficie de la probeta |

## 3.4 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD FUNGICIDA/FUNGIESTÁTICA

Se realiza el ensayo según lo descrito en la norma UNE 15457. Los hongos de ensayo se han adquirido de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y su crecimiento se muestra a continuación:

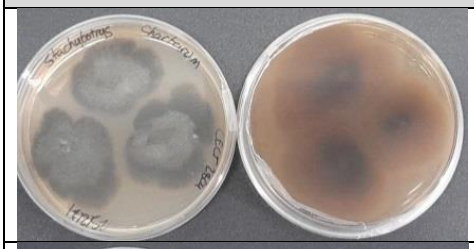
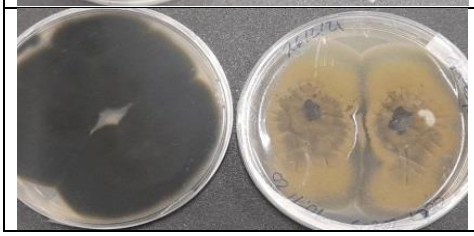
| Crecimiento esporas de cultivo | |
|---|---|
|  | *Stachybotris chartarum, interior* |
| | *Aspergillus versicolor, interior* |
| | *Alternaria alternata, exterior* |
| | *Aureobasidium pullulans, exterior* |
|  | *Cladosporium cladosporioides*, exterior |

**Figura 25. Placas de cultivo (reverso y anverso) mostrando el correcto crecimiento en el laboratorio de AIDIMME de las esporas de cada hongo de ensayo**

A modo de verificación interna para cada ensayo, se preparan 3 placas Petri de viabilidad con la mezcla de solución de esporas, así como 2 placas con la solución de esporas individual de cada hongo en el mismo medio de cultivo, como se muestra a continuación:

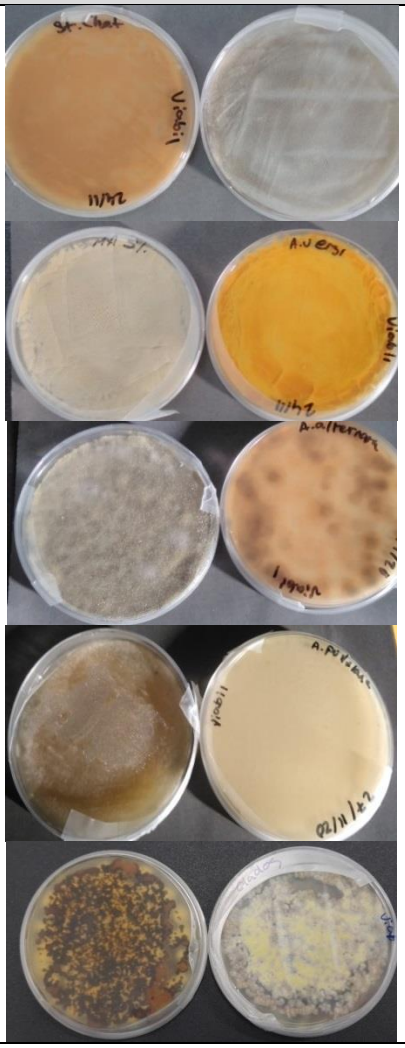
| Viabilidad esporas inoculadas | Evaluación |
|---|---|
|  | Correcto crecimiento de la suspensión de esporas de cada uno de los hongos de ensayo:<br>*Stachybotris chartarum*<br>*Aspergillus versicolor*<br>*Alternaria Alternata*<br>*Aureobasidium pullulans*<br>*Cladosporium cladosporioides* |

**Figura 26. Crecimiento correcto de cada uno de los hongos por separado en el medio de cultivo del ensayo**

| Viabilidad mezcla esporas en malta agar | Evaluación |
|---|---|
| | Correcto crecimiento de la suspensión de mezclas de esporas de ensayo (4 hongos, 2 de interior y 2 de exterior) |

Figura 27. Validación del correcto crecimiento de las mezcla de esporas en el medio de cultivo del ensayo

Para la evaluación control de las **muestras de pintura sin biocida**, se obtienen 5 probetas para cada pintura (P1, P2-I, P2-E P3 y P4) que, tras su esterilización, son depositadas bajo condiciones asépticas, en placas Petri con medio de cultivo de malta (3%) agar. Se inoculan las probetas y la placa con 200 µL de la mezcla de esporas preparadas y se le añade un volumen de entre 200 a 600 µL agua destilada esterilizada, dependiendo del tipo de pintura, con el fin de repartir por toda la placa las esporas. Se observa que para las muestras de la empresa colaboradora 2, P2-I y P2-E, no es necesario adicionar agua debido a la naturaleza de las mismas, ya que, con el asa Digralsky, es posible repartir la mezcla de esporas. En cambio, para las muestras P3 y P4 es necesario adicionar mayor volumen para un reparto más homogéneo. Siguiendo las especificaciones de la norma, se inoculan además, 3 probetas sin aplicar pintura ni biocida, como control negativo.

En los resultados de las pinturas de control, se observa que, tras 7 días de incubación, las muestras de P1, P3 y P4, el crecimiento de los hongos se extiende a la totalidad de la superficie de la probeta. Esto supone la máxima área de degradación (grado 4), por lo que el ensayo podría quedar como finalizado. Sin embargo para las pinturas de la empresa colaboradora 2, muestras P2-E y P2-I, la evolución del crecimiento fúngico es muy distinta. En la muestra de color transparente (P2-E), no existe crecimiento a lo largo del ensayo, lo que indica un efecto antimicrobiano. Para P2-I, a los 7 días de incubación sí se observa un 20% de crecimiento (grado 2). Por ello, se continuó bajo incubación hasta completar los 21 días de ensayo, obteniendo el resultado final de grado 4.

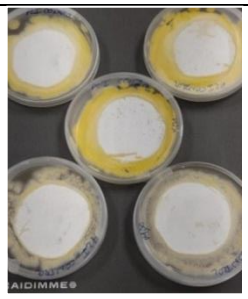
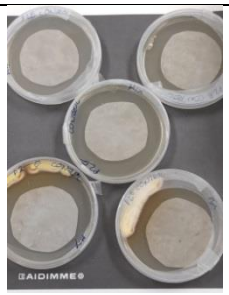
| MUESTRAS | 7 DÍAS | 14 DÍAS | 21 DÍAS |
|---|---|---|---|
| P1 SIN BIOCIDA | | | |
| P2I SIN BIOCIDA |  | | |
| P2E SIN BIOCIDA | |  | |
| P3 SIN BIOCIDA | | | |
| P4 SIN BIOCIDA | | | |

**Figura 28. Seguimiento de la incubación de las probetas de control para las pinturas (sin biocida)**

Para las **muestras de pintura con biocida** a una serie de concentraciones, se preparan las probetas con distintos productos en base atomillo. La serie de concentraciones bajas (0,3%, 1 y 3%) se prepara con PLT-30, mientras que las altas concentraciones se prepara con el PLT-30-T modificado y mejorado.

Además, para entender el comportamiento de cada especie de hongo sobre la superficie de las probetas con biocida pintadas con cada una de las muestras, se realizan una prueba con el agente de tomillo al 3%.

Tras 7 días de incubación de las probetas con los hongos por separado, se llega a las siguientes conclusiones, incluyendo el material gráfico que lo corrobora, de arriba abajo de izquierda a derecha:

- *A. versicolor* + P1 con 3% biocida: el crecimiento en el medio es correcto aunque en estado inicial y se puede identificar un halo de inhibición. Además, sobre la superficie de la probeta se puede distinguir un pequeño cambio de color naranja/rosado, pero aparentemente sin crecimiento. Se observa cierta sensibilidad del hongo a esta muestra
- *A. alternata* + P4 con 3% de biocida: el crecimiento en esta probeta es de la totalidad de la superficie de ésta, de igual manera que en el medio de cultivo. Este hongo no ejerce resistencia frente a la muestra.
- *Cladosporium* +P2-E con 3% de biocida: no hay crecimiento aparente, la sensibilidad del hongo a esta muestra es muy alta, si bien es cierto que, como se ha visto en las probetas de control, ninguno de los hongos ha crecido en éstas.
- *St. chartarum* +P2-I con 3% biocida: el crecimiento en el medio de cultivo es correcto aunque en estado inicial, pero, indudablemente, sobre la superficie de la probeta, únicamente se distingue crecimiento en algunas pequeñas zonas. Se observa una gran sensibilidad del hongo a esta muestra.

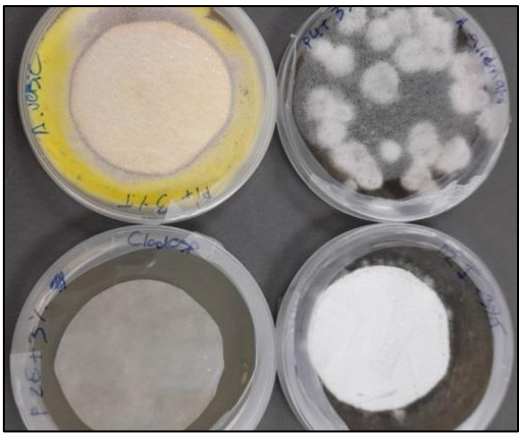


Figura 29. Probetas con biocida PLT-30 al 3% y una especie de hongo por separado

Para baja concentración, los valores se muestran a continuación, así como las imágenes de cada una de ellas.

**Tabla 6. Seguimiento y resultados del ensayo realizado para probetas de baja concentración de biocida PLT-30**

| | BIOCIDA (%) | 7 DÍAS | 14 DÍAS | 21 DÍAS | GRADO FINAL |
|---|---|---|---|---|---|
| **P1** | 0,3 | Halo parcial + ligero crecimiento en superficie | 60% | 75% | 4 |
| | 1 | Halo parcial + ligero crecimiento en superficie | 60% | 75% | 4 |
| | 3 | Halo parcial + ligero crecimiento | Menos del 50% | 75% | 4 |
| **P2-I** | 0,3 | 20% de superficie | Mayor al 50% | 75% | 4 |
| | 1 | 20% de superficie | Mayor al 50% | 75% | 4 |
| | 3 | 10% de superficie | 30% | Más del 50% | 4 |
| **P3** | 0,3 | 50% de superficie | 70% | 100% | 4 |
| | 1 | 40% de superficie | 70% | 100% | 4 |
| | 3 | 20% de superficie | Menos del 50% | Más del 50% | 4 |
| **P4** | 0,3 | 50% de superficie | 100% | 100% | 4 |
| | 1 | 50% de superficie | 100% | 100% | 4 |
| | 3 | 40% de superficie | 70% | 100% | 4 |

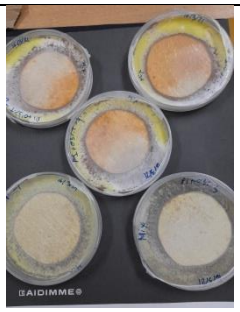
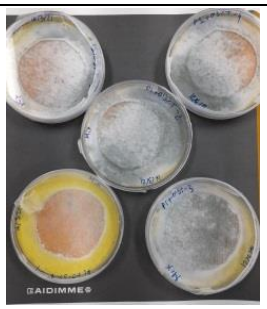
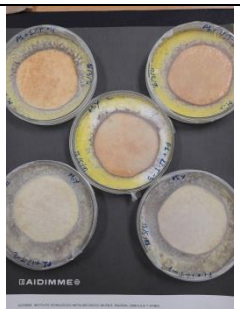
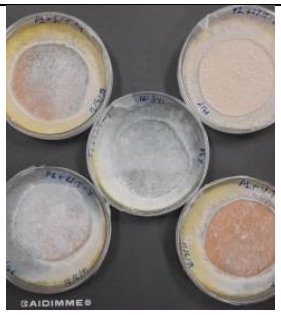
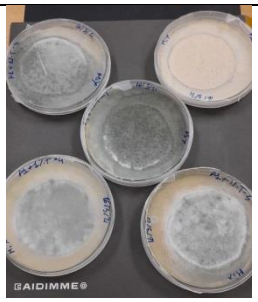
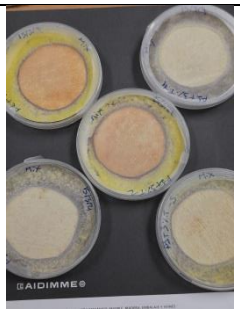
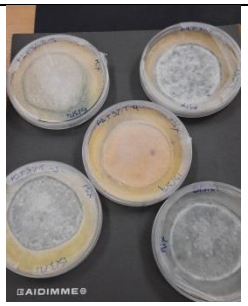
| **MUESTRA** | 7 días | 14 días | 21 días |
|---|---|---|---|
| P1<br>0,3 % |  |  | |
| P1<br>1 % |  |  |  |
| P1<br>3 % |  | |  |

**Figura 30. Ensayo de sensibilidad frente a los hongos evaluados de las probetas con distintas concentraciones de biocida para la muestra P1**

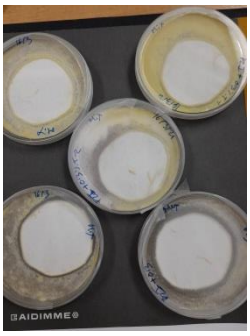
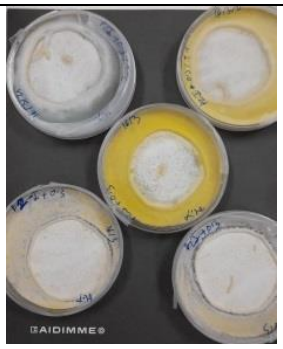
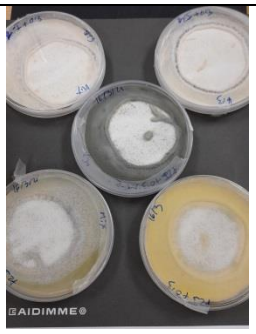
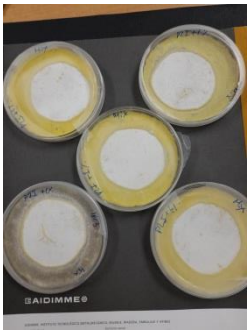
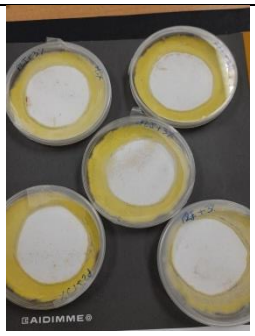
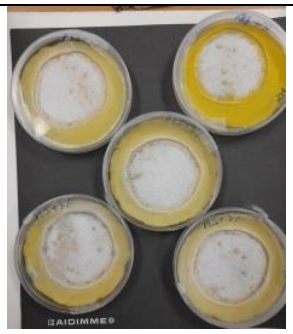
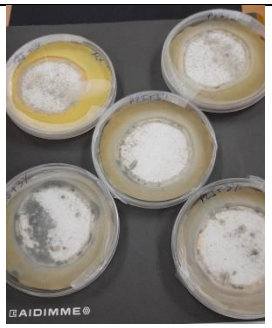
| **MUESTRA** | 7 días | 14 días | 21 días |
|---|---|---|---|
| P2I 0,3 % |  |  |  |
| P2I 1 % |  | | |
| P2I 3 % |  |  |  |

**Figura 31. Ensayo de sensibilidad frente a los hongos evaluados de las probetas con distintas concentraciones de biocida para la muestra P2-i**

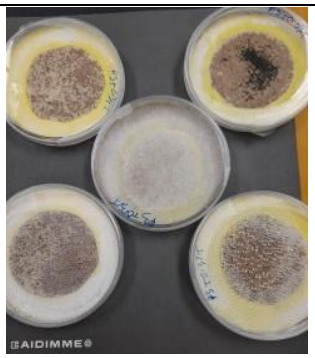
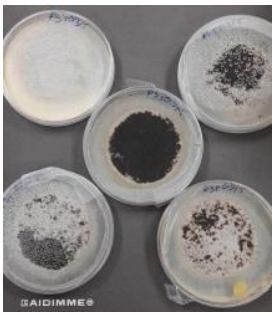
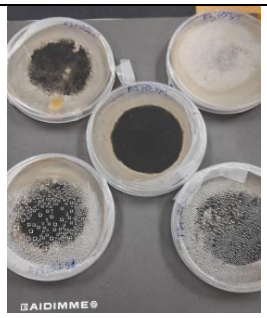
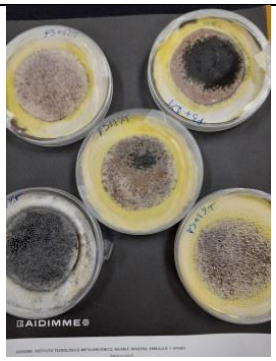
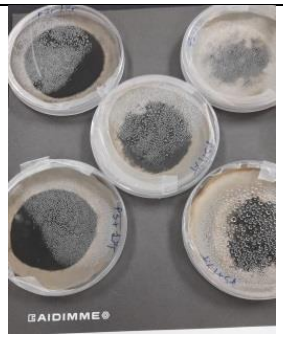
| **MUESTRA** | 7 días | 14 días | 21 días |
|---|---|---|---|
| P3<br>0,3 % |  |  |  |
| P3<br>1 % |  | |  |
| P3<br>3 % | | | |

**Figura 32. Ensayo de sensibilidad frente a los hongos evaluados de las probetas con distintas concentraciones de biocida para la muestra P3**

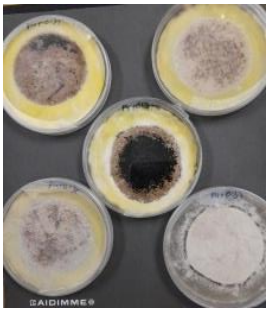
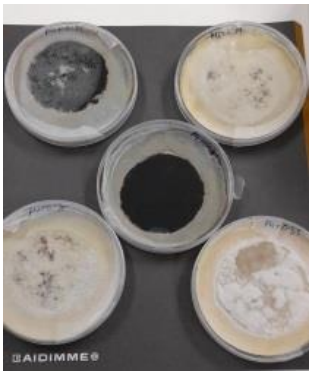
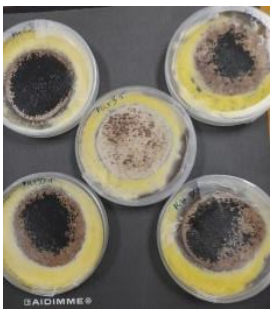
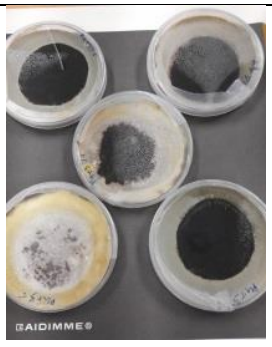
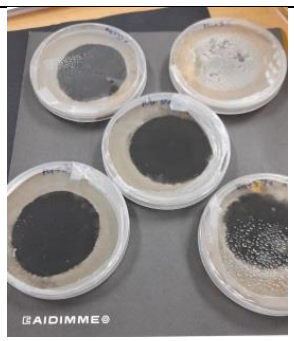
| **MUESTRA** | 7 días | 14 días | 21 días |
|---|---|---|---|
| P4<br>0,3 % |  |  | |
| P4<br>1 % | | | |
| P4<br>3 % |  |  |  |

**Figura 33. Ensayo de sensibilidad frente a los hongos evaluados de las probetas con distintas concentraciones de biocida para la muestra P4**

Con los resultados obtenidos se muestra una clara inhibición del crecimiento durante los primeros 7 días del ensayo para todas las pinturas. El efecto fungistático va disminuyendo con el paso del tiempo, llegando el crecimiento a cubrir gran parte de la superficie de la probeta al cabo de los 21 días. Además, parece ser clara la diferencia de crecimiento de los hongos según la naturaleza de la propia pintura. Se ve la tendencia de la especie de *Aspergillus* a crecer en un entorno preferiblemente con las pinturas de muebles de interior (P1 y P2), frente a aquellas de pintura de paredes (P3 y P4) que parece ser la especie de *Alternata* la predominante.

Debido a los resultados obtenidos, se repiten los ensayos a mayores concentraciones (en este caso con PLT-30-T) para mejorar el efecto fungiestático o incluso alcanzar el efecto fungicida, salvo para la muestra P2-E que ha demostrado tener poder biocida incluso en las probetas de control (blanco). Los resultados del ensayo para las distintas muestras de pintura de diversas concentraciones de biocida se muestran a continuación, así como las imágenes de cada una de ellas.

**Tabla 7. Valores de los resultados de la evaluación de la actividad fungicida/fungitática de las pinturas con el biocida**

| MUESTRA | BIOCIDA (%) | 7 DÍAS (%) | 14 DÍAS (%) | 21 DÍAS (%) | **GRADO FINAL** |
|---|---|---|---|---|---|
| **P1** | 0-CONTROL | 40 | 100 | 100 | 4 |
| | 3 | 40 | 60 | 80 | **4** |
| | 5 | 30 | 40 | 50 | **3** |
| | 10 | 10 | 20 | 20 | **2** |
| **P2** | 0-CONTROL | 40 | 100 | 100 | 4 |
| | 3 | 30 | 60 | 90 | **4** |
| | 5 | 20 | 60 | 70 | **4** |
| | 10 | >10 | >10 | >10 | **1** |
| **P3** | 0-CONTROL | 70 | 100 | 100 | 4 |
| | 3 | 30 | 60 | 80 | **4** |
| | 5 | 0 | 20 | 40 | **3** |
| | 10 | 0 | 0 | 20 | **2** |
| **P4** | 0-CONTROL | 70 | 100 | 100 | 4 |
| | 3 | 20 | 40 | >50 | **4** |
| | 5 | 0 | 5 | 20 | **2** |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | **1** |

Según los valores obtenidos, el efecto fungistático de las muestras de pintura con agente antimicrobiano de PLT-30-T al 3% ha sido demostrado, al encontrarse el crecimiento fúngico por debajo del 50% del área de las probetas (< grado 4) durante las primeras semanas del estudio, para finalmente superar este límite al finalizar el ensayo. Esta misma tendencia se ha

visto en la pintura P2 con 5% del biocida. Para esta muestra, el comportamiento del crecimiento fúngico es más lento que en el resto de las muestras de pintura con biocida a la misma concentración (mayor inhibición), teniendo un carácter fungistático más marcado, pero que finalmente se pierde cerca de las dos semanas de ensayo. Esta tendencia también se demuestra con las probetas sin biocida (control), por lo que se cree que es debido a la naturaleza de la pintura en sí misma, que repele el agua cuando entra en contacto con ella, como se ha podido observar durante la realización del ensayo.

Finalmente, **se confirma la eficacia fungicida de todas las pinturas con adición del producto PLT-30-T a una concentración del 10%**, ya que el crecimiento microbiano permanece por debajo del 20% de la superficie de la probeta (grado 2 y 1) durante todo el transcurso del ensayo. Esto también es cierto para todas las concentraciones al 5%, excepto para el ya mencionado caso del P2. En todas estas muestras se mejora las prestaciones al adicionar el agente biocida, pero, de hecho, para el 10%, se encuentra un poder fungicida tan efectivo que apenas existe crecimiento de los hongos.

La tendencia que se ha observado, en cuanto a la resistencia del crecimiento microbiano, es que en las pinturas de pared P3 y P4 con la adición del biocida tienen un comportamiento más favorable que P1 y P2 al finalizar el ensayo a los 21 días. Es decir que, en estas primeras, se ha comprobado el efecto fungicida, mientras que éstas últimas se ha podido observar el efecto mayoritariamente fungistático.

Se muestran las imágenes de las muestras durante los distintos días de seguimiento de los resultados.

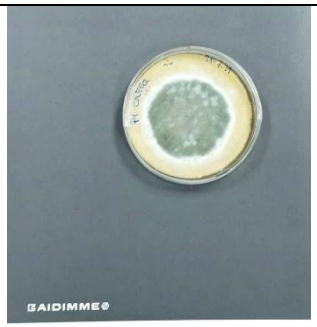
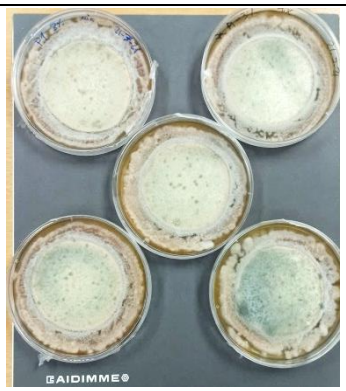
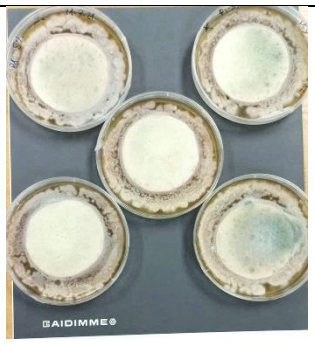
| **MUESTRA** | 7 días | 14 días | 21 días |
|---|---|---|---|
| P1 control | |  | |
| P1 3 % | |  | |
| P1 5 % | |  | |
| P1 10% | | | |

**Figura 34. Ensayo de sensibilidad frente a los hongos evaluados de las probetas con distintas concentraciones de biocida para la muestra P1**

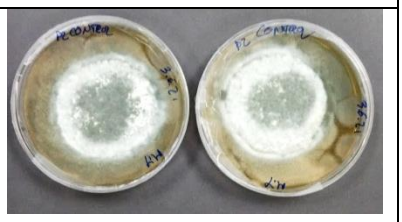
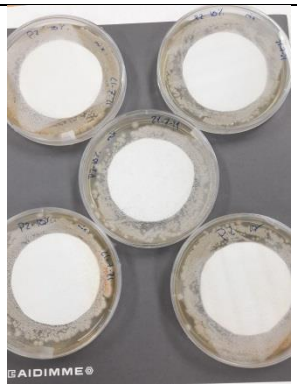
| **MUESTRA** | 7 días | 14 días | 21 días |
|---|---|---|---|
| P2 control | | |  |
| P2 3 % | | | |
| P2 5 % | | | |
| P2 10 % |  | | |

**Figura 35. Ensayo de sensibilidad frente a los hongos evaluados de las probetas con distintas concentraciones de biocida para la muestra P2-I**

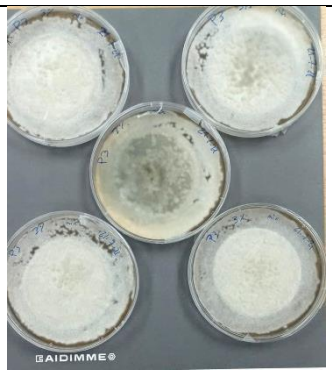
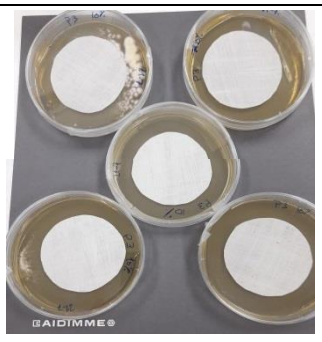
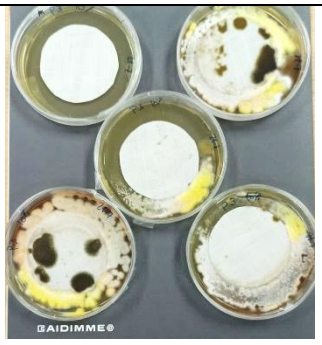
| MUESTRA | 7 días | 14 días | 21 días |
|---|---|---|---|
| P3 control | | | |
| P3 3 % | | |  |
| P3 5 % | | | |
| P3 10 % |  | |  |

**Figura 36. Ensayo de sensibilidad frente a los hongos evaluados de las probetas con distintas concentraciones de biocida para la muestra P3**

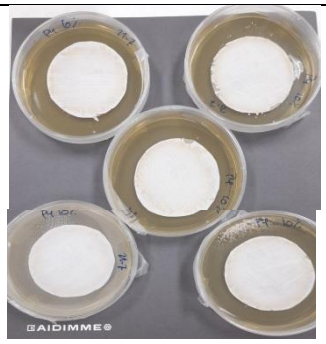
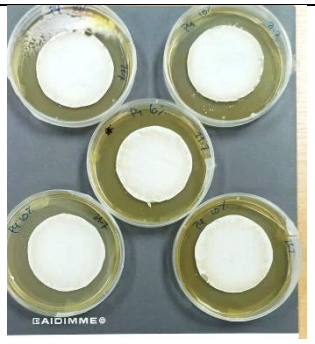
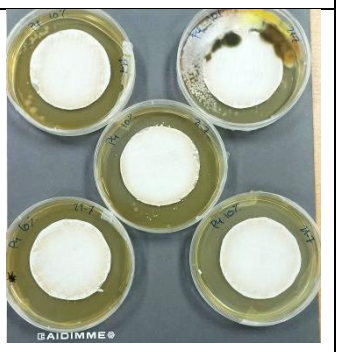
| **MUESTRA** | 7 días | 14 días | 21 días |
|---|---|---|---|
| P4 control | | | |
| P4<br>3 % | | | |
| P4<br>5 % | | | |
| P4<br>10 % |  |  |  |

**Figura 37. Ensayo de sensibilidad frente a los hongos evaluados de las probetas con distintas concentraciones de biocida para la muestra P4**

Se vuelve a observar la tendencia de crecimiento de las especies de hongos en función de la naturaleza de la pintura. El hongo de mayor crecimiento en las pinturas de mueble interior (P1 y P2) parece ser el *A. versicolor*, frente a aquellas pinturas de pared (P3 y P4) donde el crecimiento de *A. alternata* es mayoritario. Por lo que se puede extraer que la actividad fungicida y/o fungiestática no solo depende de la sensibilidad del hongo frente al biocida sino que también interviene la composición y naturaleza de la pintura y la resistencia de los hongos a estas características.

## 3.5 ENVEJECIMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EVALUAR SU ACTIVIDAD FUNGICIDA/FUNGISTÁTICA

### 3.5.1 PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

Con el envejecimiento de las muestras de pintura con biocida se pretende simular la acción del desgaste por el paso del tiempo, por un uso común, donde pueda existir un riesgo real de contaminación por hongos. En este caso, debe de haber una humedad suficiente pero no excesiva (saturación), en espacios interiores con techos, paredes y muebles recubiertos de pintura, como pueden ser baños y lavabos, cocinas con vapor, etc.

Para la preparación de las muestras de pintura, se toma el biocida PLT-30-T modificado a concentraciones 3, 5 y 10% y se aplica de manera análoga a las veces anteriores. Se realiza el envejecimiento de las muestras antes de obtener las probetas para posteriormente, trabajar de igual forma, siguiendo el método descrito en la norma UNE EN 15457:2014.

El método de envejecimiento escogido se adecua a la naturaleza de las muestras para evaluar el desgaste del recubrimiento aplicado sobre el filtro de papel. Se desarrolla una metodología interna, donde se realizan ciclos combinados de calor seco (50ºC) y húmedo (50ºC a 97%), según adaptación de la norma ASTM D 3459 (Recubrimiento aplicado en madera uso interior). La humedad relativa se mantendrá a 90%, el calor se fijará en 50 º C. El papel pintado se sujetará a un tablero de madera, quedando expuesta solamente la cara recubierta del papel. El número de ciclos se determina según la muestra mediante una prueba inicial con las muestras. Para ello se hacen unas primeras pruebas con las pinturas aditivadas con una concentración del 20% de biocida. El hecho de elegir la concentración de biocida más elevada tenía como objetivo el poder ver mejor el efecto del proceso de envejecimiento sobre la pintura.

El envejecimiento se realizó en una cámara climática. Para un ciclo completo, las muestras se sometieron durante 48 horas a 50ºC (seco) y después a condiciones húmedas (90 % humedad relativa) a 50 ºC durante 48 horas. Al finalizar el ciclo, las muestras envejecidas se compraban con las no envejecidas para poder evaluar cualquier cambio visual.

Figura 38. Proceso de envejecimiento a 50ºC de temperatura

El ciclo se repitió hasta observar cambios en las muestras, en este caso fueron necesarios dos ciclos para que todas las pinturas mostraran amarilleo aparente.

Figura 39. Cambios de color de las muestras envejecidas frente a las no envejecidas, de izquierda a derecha P1, P2, P3 y P4

Las muestras de pintura P1, P2, P3 y P4, a concentraciones de 3, 5 y 10% del producto PLT-30-T, se dejan en condiciones de acondicionamiento durante 2 semanas, antes de realizar los ciclos de envejecimiento.

Se llevan las muestras a una estufa a 50ºC durante 48 horas, como se muestra a continuación.

Figura 40. Etapa calor seco del primer ciclo combinado de envejecimiento para las muestras de ensayo microbiológico

Después se llevan a condiciones de alta humedad (90%) durante 48 horas en la cámara climática, como se muestra a continuación.

Figura 41. Etapa de calor húmedo del primer ciclo combinado de envejecimiento para las muestras de ensayo microbiológico

**Figura 42. Etapa de calor húmedo del segundo ciclo combinado de envejecimiento para las muestras de ensayo microbiológico**

Tras finalizar el ciclo combinado, se comparan las muestras ensayadas con las probetas sin envejecer para evaluar los posibles cambios visuales, que en este caso se centran en el cambio de color de la pintura. En las muestras de pintura P1 se observa un ligero pero apreciable amarilleamiento. En las pinturas P2 y P3 se aprecia cierto cambio de color pero no significativo. El color en las muestras de pintura P4 no muestra cambios. Así pues, se repite el ciclo combinado hasta encontrar un amarilleo en todas las muestras y en la mayoría de concentraciones. Se observa que con dos ciclos ya se observan cambios suficientes en el color de la pintura como para cerrar el proceso de envejecimiento.

### 3.5.2 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

Tras los ciclos de envejecimiento las muestras de pintura son sometidas a ensayo microbiológico siguiendo nuevamente las directrices de la norma UNE EN 15457:2014.

Los resultados del ensayo para las distintas muestras con concentraciones bajas de biocida se muestran a continuación, así como las imágenes de cada una de ellas.

**Tabla 8. Seguimiento y resultados del ensayo realizado para probetas de baja concentración de biocida**

| | BIOCIDA (%) | 7 DÍAS | 14 DÍAS | GRADO FINAL |
|---|---|---|---|---|
| **P1** | CONTROL | 100 | 100 | **4** |
| | 3 | 100 | 100 | **4** |
| | 5 | 95 | 100 | **4** |
| | 10 | 80 | 100 | **4** |
| **P2-I** | CONTROL | 60 (*) | 80 | **4** |
| | 3 | 80 | 100 | **4** |
| | 5 | 95 | 100 | **4** |
| | 10 | 90 | 100 | **4** |
| **P3** | CONTROL | 100 | 100 | **4** |
| | 3 | 100 | 100 | **4** |
| | 5 | 100 | 100 | **4** |
| | 10 | 95 | 100 | **4** |
| **P4** | CONTROL | 100 | 100 | **4** |
| | 3 | 100 | 100 | **4** |
| | 5 | 95 | 100 | **4** |
| | 10 | 95 | 100 | **4** |

Tras la primera evaluación, a los 7 días del inicio de la incubación, el crecimiento fúngico de todas las muestras envejecidas es casi del total de la superficie de la probeta. Se mantuvo la prueba hasta alcanzar los 14 días de evaluación y se suspendió el ensayo al haber alcanzado el máximo grado posible. Como se puede observar en las figuras que se muestran a continuación, la predilección de ciertos hongos a crecer mayoritariamente en un tipo de pinturas se ha mantenido. En este sentido, es evidente que las muestras para muebles de interior (P1 y P2) mantienen un crecimiento muy desarrollado del hongo *A. versicolor*, a pesar de estar presente bajo la misma concentración que el resto. En cambio para las muestras de pinturas de pared (P3 yP4), el crecimiento mayoritario corresponde a la especie *A. alternata*.

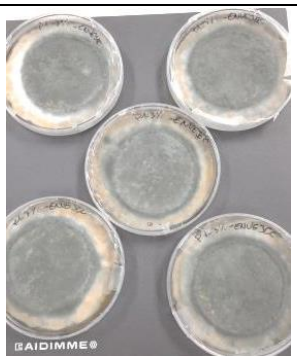
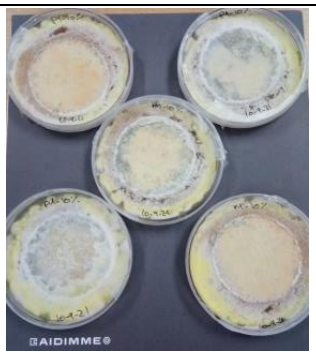
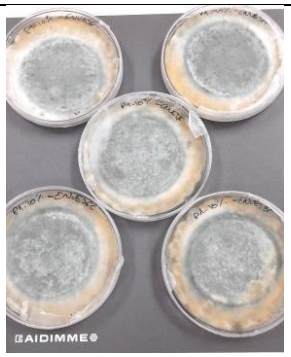
| MUESTRA | 7 días | 14 días |
|---|---|---|
| P1 control | | |
| P1 3% | |  |
| P1 5% | | |
| P1 10% |  |  |

**Figura 43. Ensayo de sensibilidad frente a los hongos evaluados de las probetas con distintas concentraciones de biocida para la muestra P1 después de los ciclos de envejecimiento**

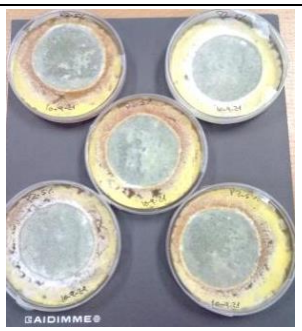
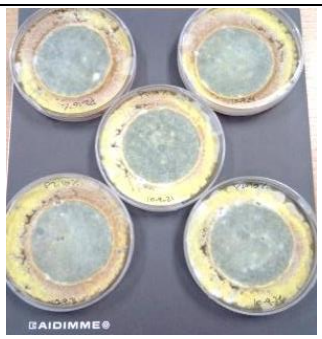
| MUESTRA | 7 días | 14 días |
|---|---|---|
| P2 control | | |
| P2 3% | | |
| P2 5% |  | |
| P2 10% |  | |

**Figura 44. Ensayo de sensibilidad frente a los hongos evaluados de las probetas con distintas concentraciones de biocida para la muestra P2-I después de los ciclos de envejecimiento**

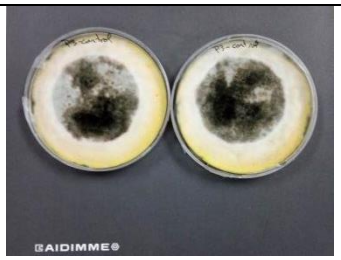
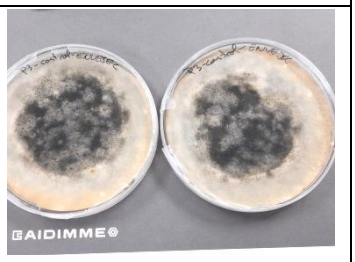
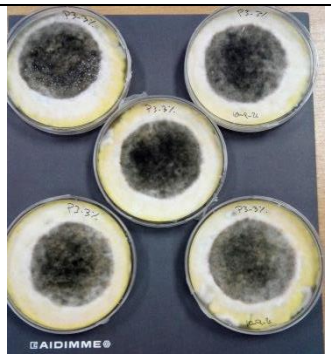
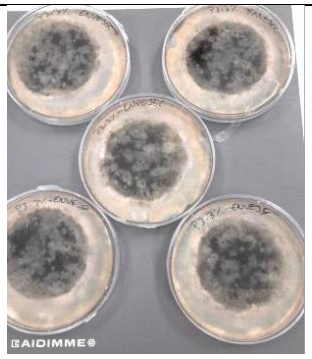
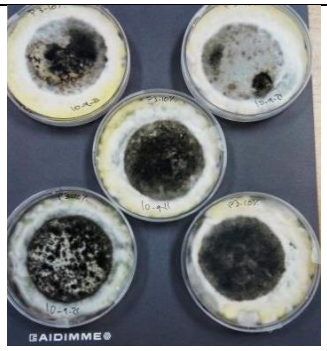
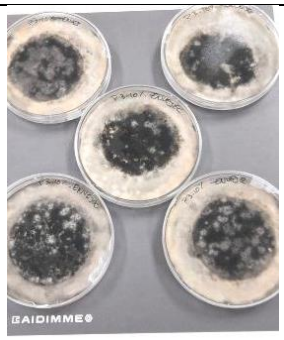
| MUESTRA | 7 días | 14 días |
|---|---|---|
| P3 control |  |  |
| P3 3% |  |  |
| P3 5% | | |
| P3 10% |  |  |

**Figura 45. Ensayo de sensibilidad frente a los hongos evaluados de las probetas con distintas concentraciones de biocida para la muestra P3 después de los ciclos de envejecimiento**

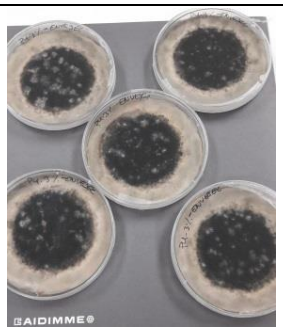
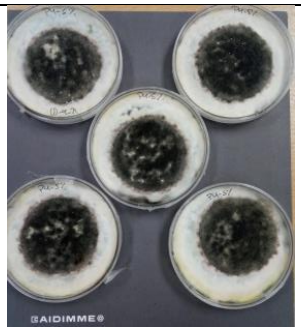
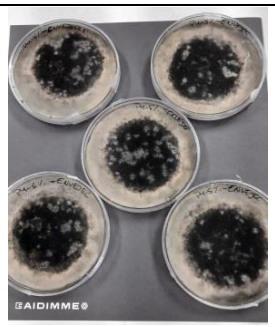
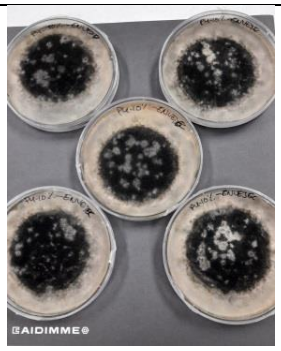
| MUESTRA | 7 días | 14 días |
|---|---|---|
| P4 control | | |
| P4<br>3% | |  |
| P4<br>5% |  |  |
| P4<br>10% | |  |

**Figura 46. Ensayo de sensibilidad frente a los hongos evaluados de las probetas con distintas concentraciones de biocida para la muestra P4 después de los ciclos de envejecimiento**

En comparación con los resultados obtenidos para las probetas que no han sido llevadas por un proceso de envejecimiento, se puede concluir que el efecto biocida se ha visto reducido

considerablemente en las cuatro pinturas de estudio, mermando la capacidad fungicida tal y como se observa tras los 7 días de incubación.

## *CONCLUSIONES. RESUMEN*

El biodeterioro en pinturas y recubrimientos de interior causados por hongos, suele ir acompañado del detrimento de sus propiedades protectoras y decorativas. Pero, también, es una de las principales razones de la merma de la calidad del aire en ambientes de interior, debido a que las esporas y micotoxinas producidas por los hongos, se mezclan con el aire, pudiendo causar serios problemas de salud debido a la exposición de las vías respiratorias.

Por todo ello, desde el sector se ha intentado e intenta combatir, con mayor o menor éxito, las proliferaciones de hongos en pinturas, con la adición de sustancias fungicidas de origen sintético, a pesar de su mayor problemática medioambiental y del incremento de restricciones del reglamento europeo sobre productos biocidas BPR.

Es en este contexto donde surge la necesidad del presente proyecto, con el que se ha hemos conseguido la obtención de pinturas decorativas al agua, resistentes al crecimiento de tanto en ambientes de interior y de exterior, a través de la adición compuestos naturales encapsulados y funcionalizados, que mejoran su durabilidad con el tiempo, y disminuyen los riesgos para la salud y el medioambiente.

Durante la ejecución del proyecto FUNGISTOP se han evaluado la efectividad fungicida de diferentes extractos de aceites esenciales encapsulados en sílice: cinamaldehido (canela), vainillina (vainilla) y timol (tomillo). Los estudios de sensibilidad a estos agentes fungicidas se han adaptado según la norma EN 15457:2014, empleando las cepas de hongos más críticas en personas alérgicas y/o asmáticas, así como inmunodeprimidos, como son:

- *Aspergillus niger*
- *Aspergillus versicolor*
- *Stachybotrys chartarum*
- *Aureobasidium pullulans*
- *Alternaria alternata*

Para que estos extractos naturales aumenten su permanencia se han microencapsulado y funcionalizado mediante enlaces covalentes para aumentar su durabilidad en el tiempo.

Lo estudios han mostrado que los extractos de cinamaldehido y vainillina tienen poca eficacia fungicida frente a los cinco hongos de estudio, sin embargo las cápsulas funcionalizadas de tomillo han mostrado resultados muy prometedores.

En el proyecto se han empleado cuatro pinturas de diferente naturaleza y para distintas aplicaciones, destacando mobiliario, decoración y construcción. Así pues, dos estaban destinadas a recubrimientos decorativos de mobiliario y dos eran pinturas de pared para un uso tanto de interior como de exterior.

Las cuatro pinturas fueron aditivadas con las cápsulas de tomillo funcionalizadas a diferentes concentraciones, aplicadas y ensayadas según la norma EN 15457:2014 frente a una mezcla de esporas de las cinco cepas de hongos de estudio. El ataque de los hongos a las pinturas aditivadas al 10% de PLT-30-T, fue significativamente menor en comparación con las mismas

pinturas sin aditivar, ya que el ataque de los hongos se retrasaba en el tiempo a través de un efecto fungistático, o se formaba un halo de inhibición ejerciendo un efecto fungicida.

Durante el desarrollo del estudio se ha observado cómo la naturaleza química de cada pintura juega un papel fundamental en la eficacia del biocida natural, además también se observa cómo determinadas cepas de hongos son más virulentas a la hora de proliferar sobre la capa que deja la pintura.

En cuanto al proceso de envejecimiento, se detecta la pérdida de eficacia del biocida PLT-30-T en el tiempo. Este resultado nos lleva a pensar en una continuación del estudio para mejorar la persistencia de estos biocidas en el tiempo. De esta forma, aunque se ha mejorado la durabilidad en condiciones de laboratorio, habría que pensar en aumentar su durabilidad en condiciones reales de uso, a través de un envejecimiento artificial como el que se ha llevado a cabo en el presente proyecto, y/o mediante la aplicación sobre superficies en entorno real, bajo un desgaste habitual de limpieza, roces, rayado, etc.