



Tópico 3 - Nº 15

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE UNA SAL DE AMONIO CUATERNARIO PARA SU APLICACIÓN EN PINTURAS

Natalia Bellotti (1,2); Sofía Bogdan (3); Cecilia Deyá (2,4); Beatriz del Amo (4); Roberto Romagnoli (2,4)

(1) Profesional CONICET, (2) Docente UNLP, (3) Becaria CONICET, (4) Investigador CONICET, CIDEPINT-Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CICPBA-CONICET LA PLATA). Av. 52 s/n entre 121 y 122. C.P. 1900 La Plata, Argentina.
E-mail: pinturashigienicas@cidepint.gov.ar

RESUMEN

Las pinturas antimicrobianas incorporan agentes activos (biocidas) en bajas concentraciones para evitar la proliferación de hongos y bacterias en el interior de edificaciones urbanas. Entre los microorganismos que colonizan las paredes, los hongos son considerados los más deteriorantes. Por lo tanto, el uso de pinturas puede ser de utilidad para la prevención del biodeterioro y la conservación patrimonial. En la actualidad, la tendencia en la formulación de pinturas antimicrobianas es reemplazar los biocidas tradicionales por otros amigables con el medio ambiente. En tal sentido, y teniendo en cuenta el tema ambiental, el uso de sales de amonio cuaternario aplicado a la formulación de pinturas resulta promisorio. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antifúngica del bromuro de cetiltrimetil amonio (BCTA) frente a cuatro aislamientos fúngicos obtenidos de películas de pintura biodeterioradas: *Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium sp.* y *Mucor sp.*

Para el presente trabajo dos los hongos (*Penicillium sp.* y *Mucor sp.*) fueron aislados a partir de muestras tomadas de películas de pintura, siguiendo técnicas microbiológicas de rutina y fueron identificados en base a la observación micro y macro morfológicas.

Palabras-Clave: *amonio cuaternario*, *biocida*, *pintura*

1. INTRODUCCION

Los materiales como Piedras, ladrillos, mapostería, maderas, pinturas etc., que forman parte de las edificaciones urbanas son susceptibles a la colonización microbiológica mayormente por parte de hongos, bacterias y algas [1,2]. La constitución de complejas comunidades de microorganismos, llamadas biopelículas, altera las características superficiales de los materiales cambiando su aspecto externo pero, también, facilitan su deterioro en forma más profunda [3,4]. La biodegradación de los sustratos comienza con la liberación por parte de los microorganismos de productos que reaccionan químicamente con estos, muchas veces rompiendo estructuras complejas para generar moléculas simples, que pueden atravesar las membranas celulares y ser aprovechados por los microorganismos [3].

Los microorganismos que conforman las biopelículas en el interior de las edificaciones también contribuyen a la formación de bioaerosoles al diseminarse parcial o totalmente por el aire [5,6]. Estos bioaerosoles se vinculan con una serie de trastornos de la salud humana que comprende la irritación de las membranas mucosas (ojos, nariz y garganta), dolor de cabeza, fatiga, infecciones, alergias y asma [7-9]. Varios estudios muestran que partículas con diámetros menores a 2,5 µm (la mayoría de las esporas fúngicas presentes en ambientes cerrados) son altamente peligrosas



para la salud humana al ser inhaladas debido a que tienen la habilidad de evadir los numerosos sistemas de defensas del tracto respiratorio [6].

Para prevenir la colonización de los materiales por parte de los microorganismos se utilizan generalmente recubrimientos especiales. Entre los sistemas protectores, las pinturas y barnices, son de los más utilizados y contienen uno o más agentes activos (biocidas) de probada acción antimicrobiana, incorporados en bajas concentraciones en las formulaciones [10]. En la actualidad, por causas medioambientales existe, además, una marcada tendencia a utilizar pinturas de base acuosa que limitan la emisión de compuestos orgánicos volátiles (COV) [1,11]. Este tipo de pinturas son altamente susceptibles al ataque microbiológico dado que contienen componentes que pueden ser aprovechados por los microorganismos para su crecimiento como son los polímeros y espesantes celulósicos entre otros aditivos [11].

Entre los microorganismos que colonizan las paredes pintadas, los hongos son considerados los más deteriorantes y los más abundantes en las biopelículas, en Latinoamérica [1,2]. En tal sentido se puede mencionar que estos microorganismos liberan al entorno productos altamente degradantes como ácidos orgánicos, enzimas y también provocan la ruptura de los materiales por la acción directa del crecimiento de su micelio [4]. Por lo tanto, el uso de pinturas especiales que contengan agentes antimicrobianos es una herramienta importante para la prevención del biodeterioro y la conservación patrimonial. En la actualidad, la tendencia en la formulación de pinturas antimicrobianas es reemplazar los biocidas tradicionales (isotiazolonas, benzoisotiazolonas, cloraminas, cloruros de alquilo o arilo, piritiona de cinc, etc.) por otros amigables con el medio ambiente [11]. Algunos biocidas (cloruro de benzalconio, hipoclorito de sodio, formaldehído, peróxido de hidrógeno, entre otros) se utilizan también como parte de soluciones de lavado, para la limpieza del patrimonio histórico [12].

En tal sentido y teniendo en cuenta el tema ambiental, una de las líneas de investigación planteadas es el uso de sales de amonio cuaternario aplicado a la formulación de pinturas o de soluciones de limpieza. Las sales de amonio cuaternario son surfactantes catiónicos usados en la industria. Además se debe tener en cuenta que la carga positiva de los grupos de amonio cuaternario tiene la capacidad de interactuar con los microorganismos cuya carga superficial es negativa afectándolos a nivel de su membrana [13].

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antifúngica del bromuro de cetiltrimetil amonio (BCTA) frente a cuatro aislamientos fúngicos obtenidos de películas de pintura de interior biodeterioradas situadas en el Gran Buenos Aires. Los hongos utilizados en dicha evaluación fueron aislados mediante técnicas microbiológicas de rutina. De los cultivos obtenidos se seleccionaron los más frecuentes que fueron identificados en base a la observación micro y macro morfológicas [14,15]. De los aislados obtenidos se seleccionaron para el presente trabajo: *Penicillium sp.* y *Mucor sp.*. También se utilizaron dos aislamientos, *Alternaria alternata* y *Chaetomium globosum*, obtenidos siguiendo un procedimiento similar en un trabajo previo [16,17]. En todos los casos los hongos filamentosos fueron seleccionados por su capacidad de crecer sobre las películas de pintura pero además se tuvieron en cuenta datos bibliográficos que los vinculan con el deterioro de los materiales y su efecto negativo sobre la salud humana. En tal sentido podemos referir que los géneros seleccionados presentan las siguientes características:

- *Alternaria* son capaces de producir una variedad de compuestos diferentes, entre las que se encuentran las micotoxinas que son tóxicas para los mamíferos y las aves [15].
- *Chaetomium* conocidos por producir compuestos celulolíticos los cuales degradan, especialmente, las pinturas base acuosa que contienen espesantes celulósicos [15,18].
- *Penicillium* y *Mucor* son importantes desde el punto de vista del biodeterioro debido a su capacidad de producir gran cantidad de ácidos orgánicos [18]. Por otro lado, los conidios de *Penicillium* como las esporas de *Alternaria* representan un serio riesgo para la salud debido a que están vinculados con determinados tipos de asma en individuos sensibles [19].



La evaluación de la actividad antifúngica se realizó utilizando el método de difusión en agar o antibiograma basado en el trabajo de Kirby-Bauer [20]. El método aplicado consiste en depositar, en una placa de Petri previamente inoculada, discos de papel impregnados con el agente estudiado. Al ponerse en contacto el disco con la superficie inoculada el agente estudiado difunde radialmente formando un gradiente de concentración. Al término del período de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. En cada caso, se mide el diámetro de la zona de inhibición, el cual se relaciona con una mayor o menor susceptibilidad de los microorganismos utilizados para el ensayo frente al agente en estudio.

METODOLOGÍAS

2.1 Aislamientos fúngicos

En primer lugar se tomaron muestras de película de pintura biodeteriorada, se realizaron diluciones de las mismas empleando solución fisiológica. Se sembraron 100 μ L de las diluciones en placas con medio de cultivo agarizado (MCA), compuesto por: 1,5g agar, 1g dextrosa, 0,5g proteasa peptona, 0,1g KH_2PO_4 , 0,05g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y agua destilada hasta 100 mL. Además, se agregó al medio de cultivo un antibiótico para impedir el crecimiento bacteriano y una cantidad adecuada de rosa de bengala (RB) para inhibir el crecimiento. Las placas fueron incubadas en estufa a 28°C por 72 h. Luego se procedió al aislamiento de los hongos filamentosos por técnicas microbiológicas convencionales.

En La Fig. 1 se muestra uno de los lugares de donde se obtuvieron muestras para el aislamiento de los hongos.



Figura 1 – Vista de uno de los lugares de toma de muestra

La identificación de los hongos se basó en la observación micro y macro morfológicas usando claves taxonómicas estándar [14,15]. En tal sentido se realizaron microcultivos de los aislados seleccionados según una metodología clásica [21]. El método para los microcultivos consistió en la preparación de placas con portaobjetos estériles donde se depositaron cubos de MCA. Cada trozo de MCA se inoculó con cada una de las cepas estudio, se colocó un cubre objeto en cada caso y se incubó a 28°C. Para mantener la humedad se utilizó, en cada caja de Petri, una pequeña varilla de vidrio doblada como soporte del portaobjeto y un papel de filtro humedecido, ambos estériles.



2.2 Actividad antifúngica

Se evaluó la actividad antifúngica de una sal de amonio cuaternario pro-análisis, bromuro de cetiltrimetil amonio (BCTA), cuya estructura química se muestra en la Fig.2. El método utilizado fue el de difusión en agar o antibiograma de Kirby-Bauer [20]. En primer lugar, a partir de cultivos de *C. globosum*, *A. alternata*, *Penicillium sp.* y *Mucor sp.* (en MCA) incubados a 28°C por espacio de 20-25 días, se obtuvieron los inóculos correspondientes. La concentración de esporas se ajustó mediante el uso de una cámara de Neubauer. El número de esporas por cada mL de suspensión fue de $0,3-0,5 \times 10^6$. La solución utilizada para la remoción de las esporas contenía 0,85% p/v de NaCl y 0,005% p/v de Tween 20.

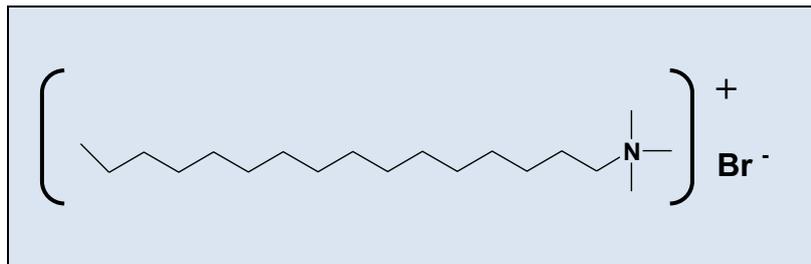


Figura 2 – Estructura química del BCTA

Se realizaron diluciones seriadas del BCTA, partiendo de una concentración inicial de 20,6 mg/mL en agua destilada (AD). Se inocularon placas que contenían MCA con 200 μ L de la suspensión de esporas. Se dispusieron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro sobre las placas inoculadas (6 discos/placa). Luego los discos fueron impregnados con 20 μ L de cada una de las diluciones preparadas. Se dejaron secar las placas por espacio de 30 minutos siempre dentro del flujo laminar como se muestra en la Fig. 3.



Figura 3 – Placas del ensayo de difusión en agar en el flujo laminar

Luego las placas fueron incubadas a 28°C y al cabo de 48 h se midieron los halos de inhibición formados.



3. RESULTADOS

3.1 Aislamientos fúngicos

En la Fig. 4 se presentan dos imágenes obtenidas mediante microscopía óptica de los microcultivos de los hongos aislados para el presente trabajo. El aumento es de 400X en ambos casos. En estas imágenes se pueden observar estructuras reproductoras de ambos hongos lo cual es de mucha importancia para poder determinar los géneros correspondientes.

En la Fig. 4 a se observa un conidióforo cuyas ramificaciones terminan en fiálides que sostienen los conidios de forma esférica. La gran cantidad de conidios que producen son responsables del tono verdoso característico observado en el cultivo de la Fig.5 c.

En la Fig. 4 b se puede observar una estructura de forma esférica denominada esporangio de color oscuro, colmada de esporas, formada en el ápice de un esporangióforo.

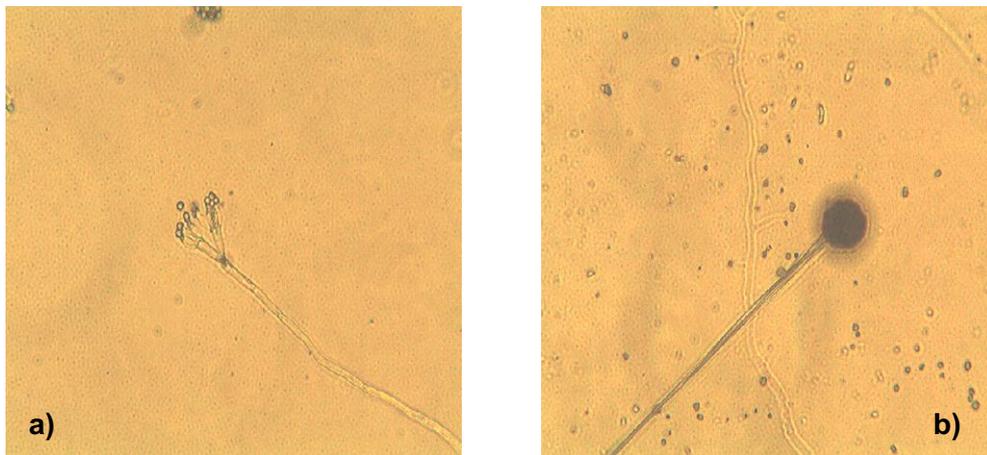


Figura 4 – Microcultivos de: *Penicillium sp.* (a) y *Mucor sp.* (b).

En la Fig. 5 se observan los cultivos en MCA (incubados a 28°C por una semana) de los cuatro aislamientos utilizados para determinar la actividad fúngica reportada en el presente trabajo.

Los hongos de la Fig. 5 a y b, aislados en un trabajo previo realizado en el CIDEPINT [16], fueron obtenidos a partir de cultivos conservados en heladera.

En la Fig. 5 c y d se muestran los hongos aislados para el presente trabajo de los géneros *Penicillium* y *Mucor*, utilizados luego en la evaluación de la actividad antifúngica. En la Fig. 5 c se observa el cultivo de crecimiento rápido, aspecto pulverulento y tono verdoso de *Penicillium*. La Fig. 5 d muestra el micelio extendido y con textura de algodonosa de color amarillento del otro aislamiento, perteneciente al género *Mucor*.

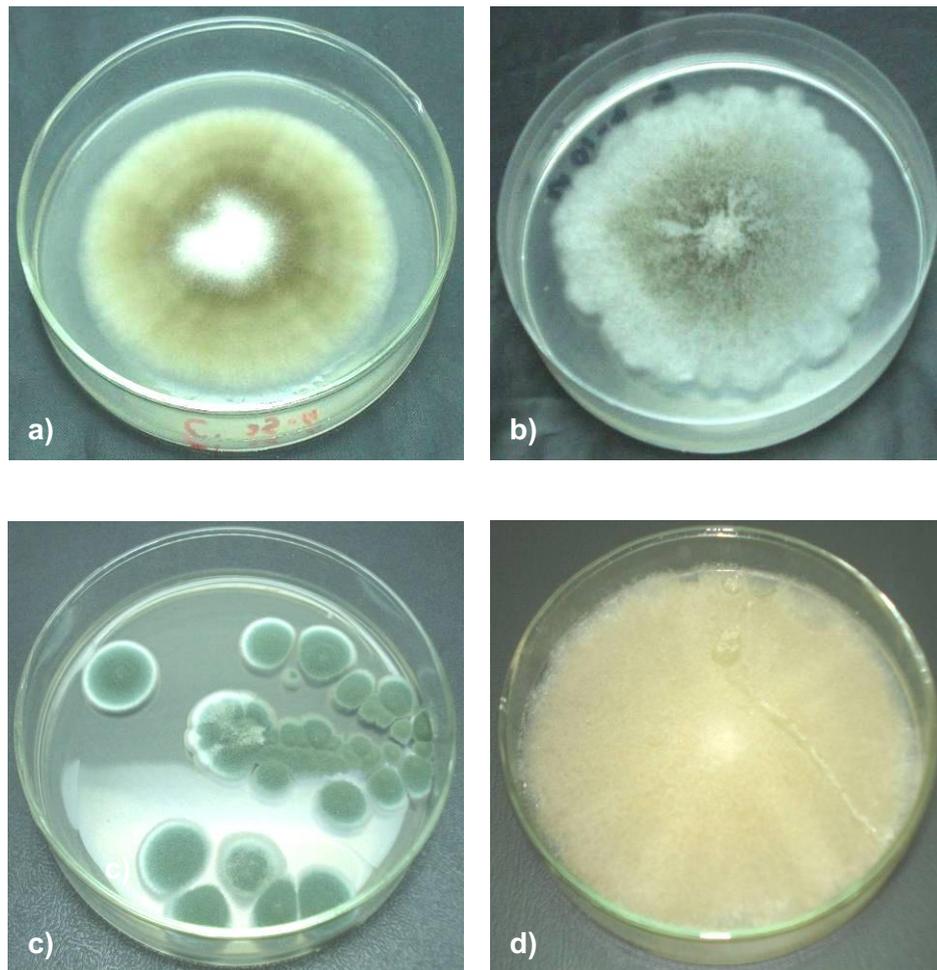


Figura 5 – Cultivos de una semana de: *A. alternata* (a), *C. globosum* (b), y *Penicillium sp.* (c) y *Mucor sp.* (d).

3.2 Actividad Antifúngica

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de las medidas de cada halo de inhibición con cada una de las concentraciones de BCTA ensayadas. Se debe tener en cuenta que diámetros mayores a 6 mm indican una mayor sensibilidad del microorganismo frente al producto probado, si son iguales a 6 mm indica que inhibió sobre el disco y NI significa que no se observó inhibición alguna.

Los resultados muestran una mayor actividad inhibitoria de la sal de amonio con respecto *A. alternata* y *Penicillium sp.* debido a que con las concentraciones más bajas se obtuvieron halos mayores a 6 mm. Se puede observar también que con la concentración de 0,6 mg/mL se obtuvo una inhibición mayor o igual al diámetro del disco frente a tres de los aislamientos. Ésta sería la menor concentración que estaría afectando a un mayor número de hongos.

En La Fig. 6 se muestran algunos de los registros fotográficos obtenidos a partir del ensayo de difusión en agar con los hongos *A. alternata*, *C. globosum* y *Penicillium sp.* que mostraron ser los más susceptibles frente a la acción del BCTA.



Tabla 1 Ensayo de difusión en agar.

BCTA (mg/mL)	Halos de inhibición (mm)			
	<i>A. alternata</i>	<i>C. globosum</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Mucor sp.</i>
20,6	30,0	-----	-----	24,0
10,3	25,0	20,0	18,0	19,0
5,1	18,0	17,0	17,0	15,5
2,6	16,0	14,0	12,0	12,0
1,3	11,5	11,0	11,0	6,5
0,6	8,5	6,0	10,0	NI
0,3	-----	NI	8,0	-----

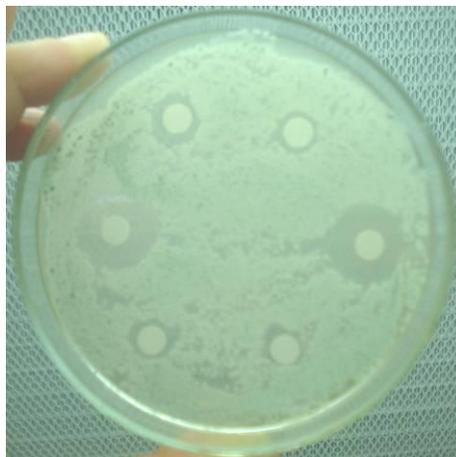
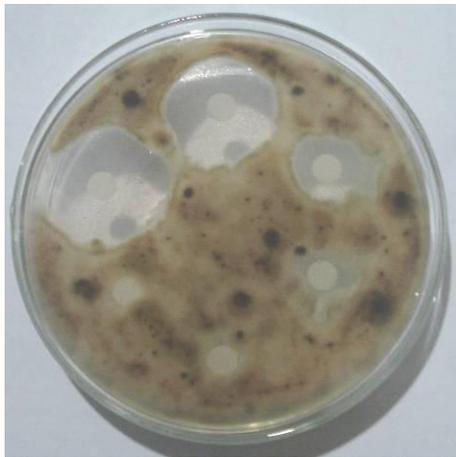


Figura 6– Halos de inhibición producidos por distintas concentraciones de BCTA frente a: *A. alternata* (a), *C. globosum* (b) y *Penicillium sp.* (c).



4. CONCLUSIONES

El aislamiento de los hongos filamentosos: *Penicillium sp. (c)* y *Mucor sp. (d)*. a partir de películas de pintura biodeterioradas fue satisfactorio. Éstos aislamientos resultaron útiles como bioindicadores para el estudio de la actividad antifúngica de un potencial biocida, en este caso una sal de amonio cuaternario.

El ensayo de difusión en agar mostró ser rápido y efectivo para evaluar la bioactividad de la sal en cuestión. Además, permitió probar distintas diluciones frente a las cuales el BCTA mostró diversos grados de inhibición en relación a los hongos: *A. alternata*, *C. globosum*, y *Penicillium sp.* y *Mucor sp.*.

Los resultados preliminares obtenidos hasta este momento permiten pensar en una siguiente etapa donde se podrá evaluar la eficiencia del BCTA integrado a una formulación de pintura.

También podrían utilizarse soluciones de BCTA, de concentración no menor a 1,3 mg/mL, para realizar el lavado de superficies afectadas por hongos; ya sean de piedra, pintadas, etc.

5. REFERENCIAS

- [1] Gaylarde C.C., Morton L.H.G., Loh K., Shirakawa M.A. (2011), "Biodeterioration of external architectural paint films. A review", Vol. 65, October 2011, pp. 1189-1198.
- [2] Gaylarde C.C., Gaylarde P.M. (2005), "A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America"; International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 55, September 2005, pp. 131-139.
- [3] Gu J.D. (2003), "Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances", Vol. 52, November 2003, pp.69-91.
- [4] Warscheida T., Braams J. (2000), "Biodeterioration of stone: a review"; International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 46, 2000, pp. 343-368.
- [5] EPA. (1992), Indoor Air – Assessment. Indoor Biological Pollutants. Office of Health and Environmental Assessment. Washington, DC.
- [6] Górný R.L. (2004), "Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air- A review", Vol. 11, November 2004, pp.185-197.
- [7] Gent, J.F., Ren, P., Belanger, K., Triche, E., Bracken, M.B., Holford, T.R., Leaderer, B.P. (2002), "Levels of Household Mold Associated with Respiratory Symptoms in the First Year of Life in a Cohort at Risk for Asthma. Environmental Health Perspectives", Vol. 110, December 2002, pp.781-786.
- [8] Cooley J.D., Wong W.c., Jumper, C.A., Straus, D.C. (2004), "Section I. Fungi and Sick Building Syndrome, Fungi and the Indoor Environment: Their Impact on Human Health". Advances in Applied Microbiology. Vol.55, 2004, pp.3-30.
- [9] Cao Z., Sun Y. (2009), "Polymeric N-halamine latex emulsions for use in antimicrobial paints". ACS App. Mat. Int. Vol.1, 2009, pp. 494-504.
- [10] Johns K. (2003), "Hygienic coatings: the next generation"; Surface Coatings International, Vol. 86, 2003, pp. 101-110.
- [11] Lindner W. (2004), "Surface coatings, in: Directory of Microbicides for the Protection of Materials" Handbook, Wilfried Paulus (eds.), Ed. Kluwer Academic Publishers, 347 pág.
- [12] Kumar, R., Kumar, A.V. (1999) "Biodeterioration of the stone in tropical environments. An overview", J. Paul Getty Trust, USA, 1999, 30-34 pág.
- [13] Kenawy, E. R.; Abdel-Hay, F. I.; El-Shanshoury, A. E. R. R.; El- Newehy, M. H. Biologically active polymers. V. Synthesis and antimicrobial activity of modified poly(glycidyl methacrylate-co-2-hydroxyethylmethacrylate) derivatives with quaternary ammonium and phosphonium salts. J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 2002, 40, 2384..
- [14] Samson R. A. and Hoekstra E.S. (1995), "Introduction to food-borne fungi", Frisvad J.C., Filtenborg O., (eds.), Ed. CBS.
- [15] Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Área Micología, <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>
- [16] Salvatore L., Romagnoli R., del Amo B., Bellotti N., Del Panno M. T. (2010), Evaluación de la resistencia de pinturas frente a aislamientos fúngicos", 3er. Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales, SAM – UTN, Concepción del Uruguay.



-
- [17] Bellotti N., Salvatore L., Deyá C., Del Panno M.T., del Amo B., Romagnoli R. (2013), "The application of bioactive compounds from the food industry to control mould growth in indoor waterborne coatings". *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, Vol.104, February 2013, pp.140-144.
- [18] Alexopoulos C.J. (1985), "Introducción a la micología", Ed. OMEGA, Barcelona, 197-305 pág.
- [19] Licorish, K. Novey, H. S. Kozack, P. Fairshter, R. D. and Wilson, A. F. (1985), "Role of *Alternaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma", *J. Allergy Clin. Immunol.* Vol. 76, 1985, pp. 819–825.
- [20] Morello, J.A., Granato, P.A, Mizer, H.E. (2003), "Antimicrobial agent susceptibility testing and resistance", en: "Laboratory manual and workbook", Ed. McGraw-Hill, 95-105 pág.
- [21] Parija, S.C. (2006), "Textbook of Practical Microbiology", Ed. Ahuja Publishers Bangalore, New Delhi, 223-224 pág.