

Tópico: S11. Materiales para la construcción

Evaluación de la actividad antifúngica de una sal de amonio cuaternario microencapsulada para pinturas de interior

Mariana V. Revuelta^(a,b), Roberto Romagnoli^(a,b), Natalia Bellotti^{(a,c)*}

^a CIDEPINT, Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas. (CICPBA-CONICET). Av. 52 s/n entre 121 y 122, C.P. B1900AYB, La Plata, Argentina

^b Facultad de Ciencias Exactas - Universidad Nacional del La Plata, Argentina

^c Facultad de Ciencias Naturales y Museo-Universidad Nacional del La Plata, Argentina

* Correo Electrónico: pinturashigienicas@cidepint.gov.ar

ABSTRACT

The formation of complex communities of microorganisms, named biofilms, on different materials alters its surface characteristics changing its appearance and, also, facilitating its deterioration. Among the microorganisms that colonize painted walls, fungi are considered the most deleterious and more abundant in biofilms. These microorganisms release into the environment highly degrading products like organic acids, enzymes, etc., and also cause the materials breakdown by the direct action of the mycelium growth. Furthermore, microorganisms contribute to the formation of bioaerosol which partially or fully spread in the air affecting human health. Paints incorporate antimicrobial active agents (biocides) in low concentrations to prevent the microorganisms proliferation inside urban buildings. Currently, the development of new paints formulations seeks to replace traditional biocides (organochlorine and organometallic) for some low environmental impact compounds. In this sense, the objective of this study was to evaluate the antifungal activity of a quaternary ammonium salt, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) free and encapsulated to be incorporated into an antimicrobial paint. Microencapsulation of CTAB was made to optimize its incorporation into waterborne paint, since the salt has a high solubility in water. Microparticles of CaCO₃ were synthesized by coprecipitation and were coated with chitosan and loaded with CTAB. The obtained particles were characterized by FTIR and SEM. The CTAB was quantified by UV spectroscopy. The antifungal activity of free and encapsulated CTAB were assessed by growth inhibition tests with two filamentous fungi (*Chaetomium globosum* and *Alternaria alternata*) previously isolated from biodeteriorated paints films. According to this study, the microencapsulation of CTAB can be considered as a potential biocide agent for incorporation into antimicrobial waterborne paints.

Keywords: biodeterioration, antimicrobial paint, biocide, quaternary ammonium salts, encapsulation.

RESUMEN

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. Entre los microorganismos que colonizan las paredes pintadas, los hongos son considerados los más deteriorantes y los más abundantes en las biopelículas. 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. Por otro lado, también contribuyen a la formación de bioaerosoles al diseminarse parcial o totalmente por el aire, afectando la salud humana. Las pinturas antimicrobianas incorporan agentes activos (biocidas), en bajas concentraciones, para evitar la proliferación de hongos y bacterias en el interior de edificaciones urbanas. Actualmente el desarrollo de nuevas formulaciones de pinturas busca reemplazar los biocidas tradicionales (organoclorados y organometálicos) por otros de menor impacto ambiental. En tal sentido, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de una sal de amonio cuaternario, bromuro de cetiltrimetil amonio (BCTA) en forma libre y encapsulada. La microencapsulación del BCTA se realiza para optimizar su incorporación en una pintura antimicrobiana de base acuosa, ya que la sal presenta una elevada solubilidad en agua. Se sintetizaron por coprecipitación micropartículas de CaCO₃, conteniendo BCTA, recubiertas con quitosano. Las partículas obtenidas se caracterizaron por FTIR y SEM. El BCTA fue cuantificado mediante espectrofotometría. Se evaluó la actividad antifúngica del BCTA libre y encapsulado mediante ensayos de inhibición del crecimiento de dos hongos filamentosos (*Chaetomium globosum* y *Alternaria alternata*) aislados previamente de películas de pintura biodeterioradas. Según el presente trabajo, el BCTA microencapsulado puede ser considerado como un potencial agente biocida para ser incorporado en pinturas antimicrobianas de base acuosa.

Palabras Clave: biodeterioro, pinturas antimicrobianas, biocidas, sales de amonio cuaternario, microencapsulación.

1. Introducción

El deterioro de las estructuras edilicias muchas veces se encuentra asociado a una elevada proliferación microbiológica con el desarrollo de complejas comunidades llamadas biopelículas [1,2]. En tal sentido el biodeterioro, puede ser definido como cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material causado por la actividad vital de los organismos [3]. Un factor clave resulta el contenido de agua retenido en los materiales expuestos [4]. Cabe destacar que la degradación de los sustratos no sólo ocurre a nivel superficial, en especial, cuando se trata de hongos filamentosos que logran romper los materiales debido al crecimiento invasivo de su micelio [2,5]. Por otro lado, las biopelículas afectan la calidad del aire en el interior de las viviendas al contribuir con la formación de bioaerosoles [4]. Por esta razón la Organización Mundial de la Salud aconseja eliminar o minimizar el crecimiento microbiológico en las viviendas dado que es un peligro para la salud humana [6]. Una de las estrategias para prevenir la formación de las biopelículas es el uso de recubrimientos con actividad antimicrobiana como es el caso de las pinturas higiénicas [7]. Estas pinturas protectoras cuentan con uno o más componentes activos, llamados biocidas, que tienen como objetivo prevenir la colonización y posterior crecimiento microbiológico [2,8]. En tal sentido el uso de sales de amonio cuaternario como el bromuro de cetiltrimetil amonio (BCTA), aplicado a la formulación de pinturas resulta promisorio dado que este tipo de sales ya son usadas habitualmente en la industria como surfactantes y/o desinfectantes.

Debido a la elevada solubilidad en agua del BCTA fue necesario aplicar una estrategia que permitiera su incorporación de forma eficiente a una formulación de pintura de base acuosa. Mediante la microencapsulación se busca impedir la rápida lixiviación del principio activo a partir de la matriz polimérica. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue sintetizar micropartículas de CaCO_3 recubiertas con un biopolímero cargado con el BCTA, las que serán incorporadas a la formulación de pinturas antimicrobianas.

El carbonato de calcio se seleccionó como soporte para vehicular el BCTA, ya que es ampliamente usado en formulaciones de la industria de pinturas como pigmento extendedor, y además, por la ventaja de su bajo costo. En trabajos previos, se observó un bajo porcentaje de encapsulación del BCTA al ser agregado en la reacción de síntesis de las partículas de CaCO_3 . Para solucionar este problema se optó por cubrir a las micropartículas con un polímero para aumentar la capacidad de BCTA asociada. El quitosano, un polímero biodegradable que presenta además propiedades antimicrobianas conocidas, se empleó como material de recubrimiento [9].

Las micropartículas obtenidas (CaCO_3 -Chi) se caracterizaron por FTIR y SEM. El BCTA encapsulado se cuantificó mediante técnica espectrofotométrica.

Se evaluó la actividad antifúngica de las micropartículas diseñadas, mediante ensayos de inhibición fúngica en placa [10]. Se utilizaron dos hongos filamentosos, *Chaetomium globosum* y *Alternaria alternata* [10]. Las especies empleadas en los ensayos fueron aisladas previamente a partir de películas de pintura biodegradadas. Tanto *Chaetomium* como *Alternaria* son hongos filamentosos capaces de crecer sobre películas de pintura y se vinculan tanto con el deterioro del sustrato correspondiente como con un efecto negativo sobre la salud humana [11,12,13].

2. Procedimiento experimental

2.1. Preparación de las micropartículas CaCO_3 -Chi

Las micropartículas de CaCO_3 se obtuvieron mediante coprecipitación [14,15]: se tomaron 615 μl de CaCl_2 0,5 M, luego se añadió gota a gota 615 μl de Na_2CO_3 0,5 M en continua agitación a una velocidad de 1300 rpm a 25 °C hasta observar un precipitado blanco. Finalmente se centrifugó a 2000 rpm por 3 min, luego se lavaron dos veces con agua destilada y se secó en estufa a 90 °C. Las partículas de CaCO_3 fueron inmersas en soluciones de quitosano (Chi) de 0,3 y 1,5 % (p/v) durante 3 min con agitación. Cada una de estas soluciones fueron preparadas en ácido acético al 1% (v/v) y conteniendo 2 o 5% (p/v) de BCTA. Luego las partículas recubiertas se centrifugaron a 2000 rpm durante 1 min, se lavaron dos veces con agua destilada y se secaron en estufa a 90 °C

Las micropartículas resultantes, CaCO_3 -Chi cargadas con BCTA, se disolvieron en HCl 0,1 M. La cantidad de BCTA en el sobrenadante se determinó por espectrofotometría. Esto permitió el cálculo del contenido de carga de BCTA (CCBCTA) obtenido por la siguiente ecuación:

$$CCBCTA (\%) = \frac{\text{Cantidad de BCTA encapsulado}}{\text{Peso de micropartículas}} \times 100 \quad (1)$$

2.2. Determinación del bromuro de cetiltrimetil amonio

La cuantificación del BCTA se realizó mediante espectrofotometría [16], basada en el efecto del amonio cuaternario sobre el complejo de Al^{+3} con el colorante Cromo Azurol S.

Las soluciones utilizadas en el ensayo fueron: Cromo Azurol S (CAS) 0,25 mM en agua, Al^{+3} 0,74 mM preparada con $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Triton X-100 1% (v/v) en agua y buffer acetato a pH 5,4 preparado con ácido acético 0,2 M y acetato de sodio 0,2 M.

En un matraz de 10 ml se adicionó 0,5 ml de la solución problema de BCTA junto con 2 ml de CAS, 1 ml de Al^{+3} , 0,4 ml de Tritón, 2 ml de buffer acetato y se llevó a volumen con agua destilada. Se mezcló ligeramente y se midió la absorbancia del complejo azulado a 611 nm. Para las determinaciones se utilizó un blanco como referencia que se preparó con 0,5 ml de agua destilada. Para obtener la curva de calibración de BCTA se utilizaron soluciones que contenían 0-2000 ppm de la sal, las cuales fueron tratadas de igual manera que las muestras. Las medidas se realizaron por duplicado en un espectrofotómetro Spectrum (SP 2000 UV, EEUU.).

2.3. Caracterización de las micropartículas CaCO_3 -Chi

La morfología de la superficie y el tamaño de partícula se examinaron por microscopía electrónica de barrido (MEB) en un equipo Philips ESEM XL-30 (EE.UU.). Las muestras se metalizaron con oro y se escanearon con una tensión de aceleración de 15 kV.

Los espectros FTIR de los productos obtenidos y de los respectivos controles se obtuvieron mediante el uso de pastillas de KBr. Los espectros se registraron en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} con un espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum One (EE.UU.) y se escanearon con una resolución

de 4 cm⁻¹. La caracterización de cada compuesto se realizó para detectar posibles interacciones entre el BCTA y el biopolímero.

2.4. Actividad antifúngica

La actividad antifúngica de las micropartículas preparadas se evaluaron frente a los hongos *Chaetomium globosum* y *Alternaria alternata* [10] obtenidos de películas de pintura biodeterioradas. Se inocularon placas con 20 µl de la suspensión de esporas (0,3-0,5 10⁶ esporas/ml) obtenida a partir del cultivo en un medio agarizado (0,5g proteasa peptona, 1g glucosa, 0,1g KH₂PO₄, 0,05g MgSO₄.7H₂O y 1,5g agar para 100 ml de solución) las cuales fueron incubadas a 25 °C por 20-25 días. Las esporas se suspendieron en solución 0,85 % (p/v) de NaCl y 0,005 % (p/v) de Tween 20 y su concentración se ajustó empleando una cámara de Neubauer. Las placas inoculadas contenían el medio de cultivo junto con una cantidad de micropartículas CaCO₃-Chi equivalentes a una concentración de 400, 800, 1600 y 2000 ppm de BCTA. Además, se prepararon placas con BCTA libre empleando las mismas concentraciones y placas control sin el agregado del BCTA. Las placas inoculadas fueron incubadas a 25 °C durante 10 días y se midió el crecimiento fúngico, como el diámetro promedio de la colonia [17]. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición (I) según la siguiente fórmula:

$$I = \left[\frac{(C - E)}{C} \right] \times 100 \tag{2}$$

Donde C y E corresponden a los diámetros promedio de crecimiento radial de cada hongo en las placas de control y en las placas con BCTA respectivamente. El diámetro de crecimiento se obtuvo por el promedio de tres medidas independientes sobre los mismos.

3. Resultados y discusión

3.1. Preparación de las micropartículas CaCO₃-Chi

La tabla 1 muestra la composición de las micropartículas CaCO₃ sin recubrir y cubiertas con quitosano a distintas concentraciones, con dos cantidades de BCTA diferentes. También se puede observar el contenido de carga del BCTA calculado según la ec. (1).

Tabla 1. Composición de las micropartículas CaCO₃-Chi y el Contenido de carga de BCTA

Formulación de micropartículas CaCO ₃	0/2	0/5	0,3/2	0,3/5	1,5/2	1,5/5
Quitosano (%)	0	0	0,3	0,3	1,5	1,5
BCTA (%)	2	5	2	5	2	5
Contenido de carga de BCTA (%)	0.06	0.8	2	4	8	10

3.2. Caracterización de las micropartículas CaCO₃-Chi

3.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

En la Fig. 1 se muestran las micrografías MEB de las micropartículas de CaCO₃ y las partículas recubiertas con quitosano.

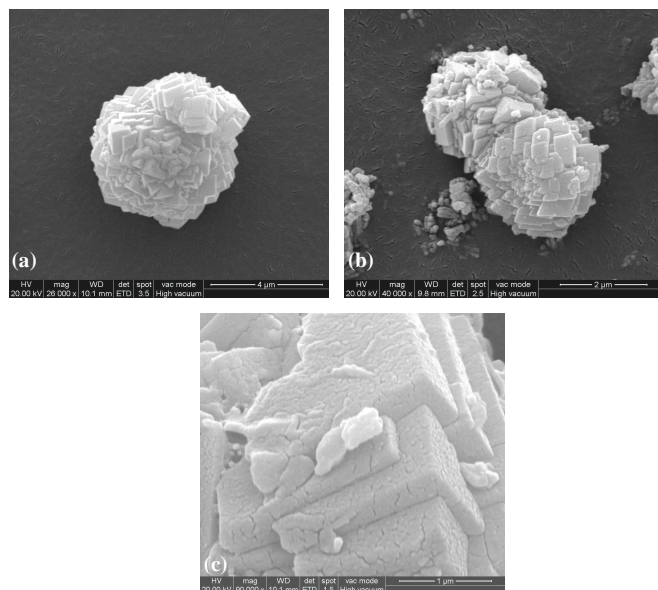


Figura 1 – Micrografías MEB de las micropartículas: a) CaCO₃, b) y c) CaCO₃-Chi.

Todas las micrografías muestran morfologías romboédricas irregulares y agregados en forma de “placa” características del carbonato de calcio correspondientes al polimorfismo de la calcita, con un tamaño de partícula de alrededor de 3 a 5 µm. En la Fig. 1(c), obtenida con un aumento de 90000X, se puede apreciar con más detalle que la cubierta de quitosano ha alterado la textura de la superficie de CaCO₃, comparada con las partículas sin cubrir que presentan superficies lisas y homogéneas, Fig. 1(a).

3.2.2. Espectroscopía Infrarroja

En la Fig. 2 se muestran los espectros obtenidos por espectroscopía infrarroja (FTIR).

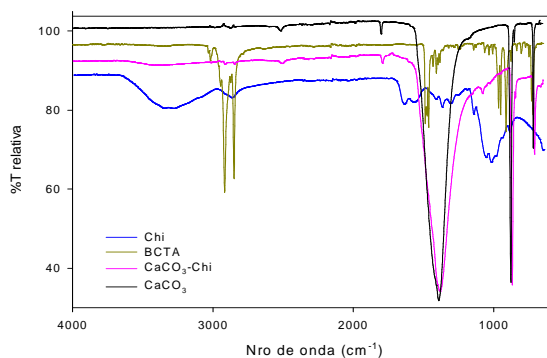


Figura 2: Espectro FTIR : BCTA y quitosano puros, micropartículas de CaCO₃ y micropartículas de CaCO₃-Chi (10 % (p/p) de BCTA).

A fin de avanzar en la caracterización de las micropartículas obtenidas

y estudiar posibles interacciones entre el carbonato de calcio, BCTA y la cubierta de quitosano se realizó el análisis por FTIR del BCTA y quitosano puros y de las micropartículas sin y con la cubierta de quitosano.

En la Fig. 2 se muestran los espectros FTIR de BCTA y quitosano puros, micropartículas de CaCO_3 y micropartículas de CaCO_3 -Chi conteniendo 10 % (p/p) de BCTA.

En los espectros de FTIR identificados como CaCO_3 y CaCO_3 -Chi aparecen picos de absorción a 1382, 875 y 715 cm^{-1} correspondientes a las frecuencias vibracionales características de la calcita [15]. Estos resultados se corroboran con las micrografías obtenidas por MEB, en las que se observa que el polimorfismo de carbonato de calcio formado durante la coprecipitación es la calcita, ya sea en ausencia o presencia del quitosano. El espectro Chi de la Fig.2 muestra una banda debida al estiramiento $-\text{OH}$ a 3414 cm^{-1} ; a 2926 cm^{-1} se evidencia el estiramiento C-H, a 1664 cm^{-1} aparece la vibración de tensión del C=O, a 1423 cm^{-1} la torsión $-\text{CH}_2$, a 1316 cm^{-1} la vibración de tensión C-N y el estiramiento simétrico C-O aparece a 1074 cm^{-1} [18]. En el espectro CaCO_3 -Chi se evidencia la presencia de algunas de las bandas características del quitosano a 3414 cm^{-1} y 1423 cm^{-1} demostrando que la unión entre éstos podría ser física o por interacciones químicas débiles. El espectro del BCTA puro de la Fig 2 muestra dos picos máximos de absorción a 2920 cm^{-1} y 2856 cm^{-1} pertenecientes a los modos de estiramiento asimétrico y simétrico del grupo $\text{CH}_3-(\text{N}^+)$, respectivamente [19]. Estas bandas también se pueden observar en el espectro CaCO_3 -Chi, lo que indica que el BCTA se encuentra asociado a la matriz polimérica.

3.3. Actividad antifúngica

La Tabla 2 muestra los porcentajes de inhibición conseguidos al aplicar la ec. (2) a los valores obtenidos a partir de las mediciones de los diámetro de crecimiento radial de los hongos *A. alternata* y *C. globosum* empleando BCTA en forma libre y encapsulado en placa.

Tabla 2– Porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico en placa.

Productos evaluados	Contenido de BCTA (ppm)	% de inhibición	
		<i>Alternaria alternata</i>	<i>Chaetomium globosum</i>
BCTA (sin encapsular)	400	100	100
	800	100	100
	1600	100	100
	2000	100	100
CaCO_3 -Chi	0,3/2	400	100
	0,3/5	800	100
	1,5/2	1600	100
	1,5/5	2000	100
Control 0,3% Chi	0	41	6
Control 1,5% Chi	0	35	0

En general se observa que la sal de amonio posee actividad inhibitoria frente a ambos hongos. Cabe destacar que el quitosano presenta cierta actividad inhibitoria frente a ambos hongos también, aunque resulta inferior que cuando se encuentra asociado al BCTA (Tabla 2).

Todas las micropartículas diseñadas presentaron una actividad inhibitoria similar al BCTA libre, aún en la menor concentración ensayada, como puede verse en la Tabla 2. Esto demuestra que el BCTA, incorporado en el biopolímero, conserva su propiedad antimicrobiana activa.

En la Fig. 3, se muestran los registros fotográficos de algunas de las placas que fueron incubadas durante diez días con los hongos *A. alternata* y *C. globosum* que contenían las micropartículas obtenidas con la menor cantidad de BCTA.

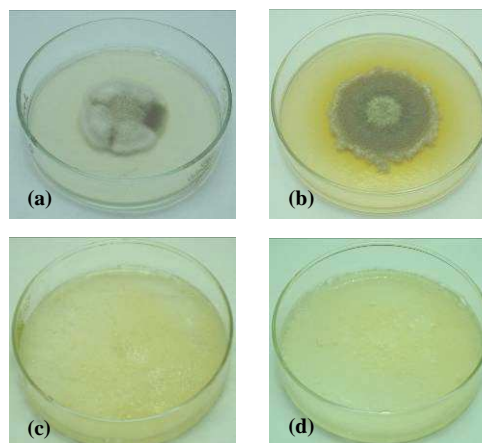


Figure 3 - (a) y (c) con *A. alternata*, control y CaCO_3 -Chi -BCTA respectivamente; (b) y (d) con *C. globosum*, control y CaCO_3 -Chi-BCTA respectivamente.

En el caso de las Figs. 3 (a)-(b) se destacan las placas sin BCTA (control) solo con el medio de cultivo inoculado. Esto muestra que el encapsulado con el menor contenido de BCTA podría ser apropiado para evitar el crecimiento de ambos hongos.

4. Conclusión

Las micropartículas de CaCO_3 recubiertas con distintas concentraciones de quitosano permitieron una mayor carga de BCTA.

El BCTA mostró ser activo e inhibir el 100% el crecimiento de los hongos *Chaetomium globosum* y *Alternaria alternata* tanto en forma libre como encapsulada con el menor contenido de BCTA ensayado (400 ppm).

Este estudio preliminar demuestra que el BCTA encapsulado en micropartículas de CaCO_3 recubiertas con quitosano sería una alternativa eficiente como vehículo para incorporar el BCTA a una pintura de base acuosa con actividad antimicrobiana.

Por lo tanto en una siguiente etapa se formularán y elaborarán pinturas de base acuosa. En la misma se realizarán ensayos tendientes a verificar las velocidades de lixiviación del BCTA en forma libre y encapsulada, así como también evaluar la eficiencia antifúngica de la pintura. Esto permitirá seleccionar la micropartícula más apropiada que evite el crecimiento de ambos hongos ensayados.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT), a la Universidad Nacional de la Plata (UNLP), a la

Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

REFERENCIAS

- [1] J.D. Gu Int. Biodeterior. Biodegrad. **52** (2003) 69.
- [2] T. Warscheida, J. Braams, International Biodeterioration & Biodegradation **46** (2000) 343.
- [3] D. Allsopp, K. Seal and C. Gaylarde, *Introduction to Biodeterioration*, United Kingdom: Press Syndicate of the University of Cambridge (2004).
- [4] Environmental Protection Agency (EPA) Indoor Environments Division (IED), *Mold Remediation in Schools and Commercial Buildings*, www.epa.gov/mold (2008).
- [5] C.C. Gaylarde, P.M. Gaylarde, International Biodeterioration & Biodegradation **55** (2005) 131.
- [6] World Health Organization (WHO) Regional Office for Europe, *WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould*, http://www.euro.who.int (2009).
- [7] K. Johns, Surface Coatings International **86** (2003)101.
- [8] D. Vaughan-Lee August, Polymer Paint Colour Journal (2002) 24.
- [9] M. Kong, X.G. Chen, K. Xing, H.J. Park, International Journal of Food Microbiology **144** (2010) 51.
- [10] N. Bellotti, L. Salvatore, C. Deyá, M.T. Del Panno, B. del Amo, R. Romagnoli, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **104** (2013)140.
- [11] L. Carrillo, Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>, (2003).
- [12] C.J. Alexopoulos, *Introducción a la micología*, Barcelona: OMEGA (1985).
- [13] K. Licorish, H. S. Novey, P. Kozack, R. D. Fairshter, and A. F. Wilson, Journal of Allergy and Clinical Immunology **76** (1985)819.
- [14] Y. Ueno, H. Futagawa, Y. Takagi, A. Ueno, Y. Mizushima, Journal of Controlled Release **103** (2005) 93.
- [15] S. Li, L. Yu, F. Geng, L. Shi, L. Zheng, S. Yuan, Journal of Crystal Growth **312** (2010)1766.
- [16] A. Afkhami, D. Nematollahi, T. Madrakian, M.Hajihadi, Water **39** (2010) 171.
- [17] E. Vagui, B. Simándi, Á. Suhajda, É. Héthelyi, Food research international **38** (2005) 51.
- [18] A. Garlea, V. Melnig, M. I. Popa, "Nanostructured chitosan-surfactant matrices as polyphenols nanocapsules template with zero order release kinetics", J Mater Sci: Mater Med (2010), Vol 21 p. 1211-1223.
- [19] R. Viana, A. da Silva, A. Pimentel, "Infrared Spectroscopy of Anionic, Cationic, and Zwitterionic Surfactants", Advances in Physical Chemistry (2012), p. 1-14.