

Evaluación de la actividad antimicrobiana del ACTICIDE RS

Nidia M. Rojas Hernández, Viviana Escobar Zúñiga y Ana Gloria Guerra Málvarez.

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25 entre J e I, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 16 de mayo de 1998. Aceptado: 19 de abril de 1998.

Palabras clave: Antimicrobiano, antibacteriano, antifúngico, preservante.

Key words: Antimicrobial, antibacterial and antifungal action, preservative activity.

RESUMEN. Las pinturas emulsionadas no escapan de la acción biodeteriorante de los microorganismos. Por ello, la adición de preservantes antimicrobianos capaces de evitar los efectos indeseables que se producen en las pinturas como consecuencias del establecimiento y multiplicación microbianas es una necesidad. Los productos empleados como preservantes deben ser capaces de impedir el crecimiento bacteriano durante el almacenamiento y la aplicación de la pintura, así como impedir el establecimiento de los hongos sobre las superficies recubiertas con ella. En el presente trabajo, se evaluó la actividad del ACTICIDE RS como preservante antimicrobiano y antifúngico de pinturas emulsionadas. Se empleó como inóculo una mezcla de cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* fenol-resistentes en una concentración de $6,8 \cdot 10^8$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL para las pruebas de envase, evaluadas semanalmente para detectar la presencia de bacterias viables en ellas y durante un periodo total de 6 semanas. Las muestras de pintura contenían 0,1, 0,15 y 0,3 % del ACTICIDE. También se emplearon como controles una muestra sin preservante y otra con MERGAL K-7 0,3 %. Se trabajó con tres réplicas por tipo de muestra. La efectividad antifúngica del ACTICIDE se evaluó por el método de paneles con pintura aplicada sometidos a inoculación fúngica y cámara tropical frente a una mezcla de esporas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium notatum*, *Trichoderma viride*, *Cunninghamella* sp. y *Paecilomyces terricolans*. Se determinó que las Concentraciones Mínimas Inhibitoria y Bactericida del ACTICIDE frente a los cultivos bacterianos coincidieron con una concentración de 0,01 % en la prueba sin pintura. Por otra parte, el efecto inhibitorio del preservante incorporado en las pinturas se detectó a concentraciones iguales o mayores que 0,15 %. El MERGAL K-7 tampoco mostró efecto bacteriostático a la concentración empleada en la pintura. No se detectó efecto antifúngico alguno sobre ninguna de las cepas probadas con ninguno de los preservantes evaluados a las concentraciones empleadas.

ABSTRACT. The emulsified paints are susceptible to microbial decay. In order to inhibit the effect produced by microbial growth, it is necessary to add any type of preservative product to emulsified industrial paints. The preservative antibacterial and antifungal action of ACTICIDE RS in emulsified paints was determined. Phenol-resistant strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* was used as inocula in wet paint samples containing 0.1, 0.15 and 0.3 % concentrations of ACTICIDE. Samples of paint without any antimicrobial preservative and with MERGAL K-7 at 0.3 % were also tested. All the tests were made with three replications for sample paints. The Minimal Inhibitory and Bactericidal Concentrations of ACTICIDE were determined and they were identical (0.01 %), but the preservative effect of the product in the paints was 0.15 %. The antifungal action of ACTICIDE in dry paint against *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium notatum*, *Cunninghamella* sp. *Trichoderma viride* and *Paecilomyces terricolans* were evaluated. MERGAL K-7 did not show any inhibitory effect at the concentration used in the paint. None of the preservative showed any antifungal activity in dry paints versus the fungal strains employed at concentrations tested.

INTRODUCCION

Los microorganismos son responsables del biodeterioro de una gran diversidad de materiales.¹⁻³

Los productos industriales al igual que las obras de arte son susceptibles de albergar a microorganismos capaces de contaminar, sobrevivir y multiplicarse en ellos, ocasionando cambios ostensibles en la coloración, la acidez, la viscosidad, ruptura de emulsiones, producción de gases, etcétera.⁴ De estos cambios son responsables tanto bacterias como hongos.⁵

Las pinturas emulsionadas poseen en su composición determinados componentes que pueden servir de elementos nutritivos para el crecimiento microbiano, por lo tanto, para poder conservarlas en buen estado durante un tiempo prudencial que incluya su almacenamiento y utilización, se requiere de la adición de preservantes destinados a impedir la proliferación microbiana en ellos.^{6,8} Las condiciones ambientales (tales como las existentes en el clima tropical cubano) pueden afectar la capacidad antimicrobiana de estos preservantes, pudiendo influir también, el posible tipo de microorganismo contaminante en el producto. Es por eso que la evaluación de la eficacia antibacteriana y antifúngica de los preservantes es una determinación necesaria si se quiere contar con un producto de buena calidad.

El ACTICIDE RS⁷ es un preservante antimicrobiano que se oferta comercialmente para impedir la proliferación microbiana en pinturas emulsionadas. La dosificación reco-

mendada por el productor, en ocasiones no es eficaz en la inhibición del crecimiento microbiano en tales productos, lo cual puede estar influido por los componentes de la pintura. Por esto, algunas veces, hay que reajustar las concentraciones usuales para lograr el efecto deseado.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad preservante antimicrobiana del ACTICIDE RS⁷ para su posible empleo en la producción industrial de pinturas emulsionadas.

MATERIALES Y METODOS

El preservante utilizado fue ACTICIDE RS (ACTICIDE TL 636)⁷ puro e incluido en las pinturas emulsionadas preparadas por la Empresa Nacional de Pinturas Vitral, a 0,1; 0,15 y 0,30 % en las muestras. También se empleó una muestra que contenía el preservante MERGAL K-7 como control y una pintura sin preservante alguno añadido.

Pruebas de envase

Para detectar la eficiencia antibacteriana del preservante en las pinturas en estado húmedo se emplearon tres cultivos de bacterias fenol-resistentes⁹ por su mayor fortaleza frente a los compuestos tóxicos de efecto antimicrobiano y una cepa de *Bacillus megaterium* contaminante ambiental en un inóculo mixto a una concentración de $6,8 \cdot 10^8$ UFC/mL. Esta prueba tuvo una duración de 6 semanas y en ella se inoculó 1 mL de suspensión bacteriana por cada 30 mL de pintura durante las cuatro primeras semanas y se extrajeron alícuotas cada 7 d durante todo el período para constatar la presencia o no de bacterias viables en las muestras.

Se emplearon dos muestras de pintura sin preservante, como control negativo y dos muestras de pinturas formuladas con 0,10; 0,15 y 0,3 % de ACTICIDE, así como dos muestras con 0,30 % de MERGAL K-7 como control.

Determinación de CMI y CMB

Las Concentraciones Mínimas Inhibitoria (CMI) y Bactericida (CMB) para cada cepa bacteriana por separado se determinaron en ausencia de pintura.¹⁰

Prueba de Paneles

Para determinar la eficacia del preservante para impedir la proliferación fúngica sobre la pintura aplicada, se pintaron piezas de material inerte según las recomendaciones de la British Standard Institution¹¹ para la evaluación de preservantes anti-

microbianos para pinturas, impregnando los paneles con un inóculo mixto de esporas de *Aspergillus niger* (cepa 48), *Aspergillus versicolor* (cepa 83), *Trichoderma viride* (cepa 95), *Cunninghamella* sp. (cepa 94) *Penicillium notatum* (cepa 19) y *Paecilomyces terricolans* (cepa 79) a una concentración total de 10^4 esporas/mL. Los paneles inoculados se incubaron en una cámara tropical durante 21 d, al cabo de los cuales se realizaron las mediciones, según la codificación siguiente:

- (-) No detectado crecimiento.
- (+1) Crecimiento hasta 1 % del área inoculada.
- (+2) Crecimiento entre 1-10 % del área inoculada.
- (+3) Crecimiento entre 11-30 % del área inoculada.
- (+4) Crecimiento entre 31-70 % del área inoculada.
- (+5) Crecimiento en más del 70 % del área inoculada.

Igualmente, la actividad antifúngica del preservante en las pinturas, se evaluó por separado para cada cepa empleada, utilizando piezas de madera pintadas, de las cuales tres réplicas por cada muestra, se sometieron a envejecimiento por lixiviación en agua durante 5 d, mientras tres se mantuvieron como control. Cada pieza de madera se colocó en una placa Petri con una capa de medio agar-agua estéril solidificado y sobre ella, se adicionó una capa de agar Malta fundido al cual se le agregó una suspensión de esporas de cada cepa fúngica en estudio. Una vez culminada la incubación a 25 °C, se procedió a medir el tamaño del halo de inhibición alrededor de la pieza pintada.⁹

Todo el trabajo se realizó con tres réplicas por muestra. Se usó un muestra de pintura sin preservante

como control negativo y una preparada con MERGAL K-7⁷ al 0,30 % como control de pintura con preservante.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la prueba de envase demostraron que las muestras de pintura poseían buena calidad microbiana antes de ser inoculadas cuando se muestrearon al inicio del experimento (S-1) (Tabla 1), ya que no se obtuvo crecimiento microbiano en ellas. Las muestras 1 y 2 (carentes de preservante) quedaron contaminadas desde la primera inoculación, como se observa a los 7 d de incubación (S-2). El ACTICIDE al 0,1 % fue capaz de eliminar el inóculo añadido durante las tres primeras semanas, pero no ocurrió así con el que se adicionó en la semana 3, el cual se mantuvo viable en la cuarta semana, ya que las muestras correspondientes se mantuvieron contaminadas en los dos últimos análisis, detectándose en ellas crecimiento bacteriano. Sin embargo, las pinturas que contenían 0,15 (muestras 5 y 6) y 0,30 % (muestras 7 y 8) del preservante en estudio, sí fueron efectivas para eliminar la contaminación bacteriana. Las pinturas 9 y 10 que contenían MERGAL K-7 no aportaron buenos resultados, demostrando que este producto no fue efectivo como preservante antibacteriano. En todas las muestras en las cuales se encontró crecimiento bacteriano, este correspondió a *Pseudomonas aeruginosa* y a *Bacillus megaterium*.

Se observó una gran homogeneidad en el comportamiento de las tres primeras cepas, las cuales fueron inhibidas hasta una concentración de 0,01 % (Tabla 2). *B. megaterium* fue sensible frente al ACTICIDE hasta una concentración de 0,1 %. Estos resultados coincidieron con lo decla-

Tabla 1. Resultado semanal de la prueba en envase.

Muestra	Descripción	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6
1	Control sin preservante	-	+5	+5	+5	+5	+5
2	Control sin preservante	-	+5	+5	+5	+5	+5
3	ACTICIDE 0,1 %	-	-	-	-	+5	+5
4	ACTICIDE 0,1 %	-	-	-	-	+5	+5
5	ACTICIDE 0,15 %	-	-	-	-	-	-
6	ACTICIDE	-	-	-	-	-	-
7	ACTICIDE 0,30 %	-	-	-	-	-	-
8	ACTICIDE 0,30 %	-	-	-	-	-	-
9	MERGAL K-7 0,30 %	-	-	+5	+5	+5	+5
10	MERGAL K-7 0,30 %	-	-	+5	+5	+5	+5

Tabla 2. Resultados de la inhibición bacteriana debida al ACTICIDE RS a diferentes concentraciones.

Cepa	ACTICIDE (%)					
	10	1.0	0.1	0.01	0.001	0.000 1
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+	+
<i>B. megaterium</i>	-	-	-	+	+	+

- No crecimiento. + Crecimiento igual al del Control.

Tabla 3. Concentración Mínima Bactericida (CMB) del ACTICIDE RS para cada cepa estudiada.

Cepas	CMB (%)
<i>E. coli</i>	0.01
<i>P. aeruginosa</i>	0.01
<i>S. aureus</i>	0.01
<i>B. megaterium</i>	> 10

rado por Petroplastics & Chemicals Limited⁷ en cuanto a los géneros bacterianos sensibles al ACTICIDE, institución que recomienda el producto para la protección de las pinturas en estado húmedo. Esto se corresponde con la prueba en envase realizada en este trabajo, pero no hay coincidencia en los valores recomendados como efectivos por el productor, (0,1 y 0,15 %), de los cuales, el primero no surtió efecto más que para inhibir parcialmente la contaminación bacteriana.

En cuanto a las diferencias de concentración inhibidora encontradas para el ACTICIDE solo o incorporado a la pintura (pruebas *in situ*), se deben a la presencia de los diferentes componentes de la pintura, algunos de los cuales al parecer tienen un efecto antagónico sobre el preservativo, disminuyendo su actividad.

El ACTICIDE RS mostró una mayor actividad y por tanto efectividad como preservativo que el MERGAL K-7. Esto puede deberse a la presencia de sales de cobre como sistema estabilizador en el ACTICIDE RS, ya que ambos tienen el mismo principio activo y el producto de referencia carece de las sales de cobre.⁷

Se encontró que los valores de CMB y CMI coincidieron para las tres primeras cepas (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*) con el valor de 0,01% (Tabla 3), pero *B. megaterium* resultó más resistente, y requirió concentraciones de ACTICIDE superiores al 0,1 %. Esto se debe sin du-

das a la presencia de endosporas en este cultivo, las cuales son muy resistentes a los agentes físicos y químicos.¹²

Las diferencias entre las CMI y CMB en la cepa de *B. megaterium* se debieron a la mayor sensibilidad de las formas vegetativas ante el efecto inhibidor del ACTICIDE (Tabla 2), mientras que para eliminar totalmente la presencia de formas viables y lograr un efecto letal o biocida (Tabla 3), se requiere de una concentración muy superior por la presencia de endosporas, muy resistentes en esta especie. Ya que las esporas de las especies del género *Bacillus* se encuentran como un contaminante normal en polvo, tierra y agua, este resultado es importante desde el punto de vista de la evaluación del preservativo en estudio. Esto implica la necesidad de tener cuidado durante el proceso industrial de elaboración de pinturas con la limpieza ambiental y la calidad microbiológica del aire para evitar la presencia de esporas de tales especies que pueden contaminar las pinturas, las cuales resisten el efecto antibacteriano del ACTICIDE. Su resistencia les permite mantenerse viables en el producto hasta que se den las condiciones propicias para su germinación y crecimiento.

Los resultados de la prueba de paneles demuestran que en todas las muestras hubo un crecimiento fúngico que recubría más del 70 % del área del panel (+5 según la clave), igual que en la pintura sin preservativo, por tanto, ninguna concentración del ACTICIDE fue efectiva como antifúngico, pero tampoco el MERGAL K-7 presentó actividad preservante. En todas las muestras el crecimiento consistió en micelio vegetativo y de fructificación, con cabezas conidiales observables en ocasiones.

Al aplicar el inóculo fúngico sobre las piezas de madera pintadas para detectar si existía alteración del

crecimiento de cada cepa por separado por efecto de los preservativos empleados, tampoco se pudo evidenciar tal actividad. En todas las muestras (exceptuando las pruebas correspondientes a la cepa 95 de *Trichoderma viride*) el crecimiento alrededor de la pieza de madera pintada fue igual que en el resto del medio de cultivo y que en las placas con las muestras de pintura sin preservativo. Tanto para las envejecidas por lixiviación como en las no tratadas, el resultado fue similar.

La cepa 95 presentó un halo de inhibición del crecimiento en todas las placas, incluyendo las que contenían las piezas de pintura sin preservativo, por lo tanto el efecto encontrado en esta cepa se debe a su sensibilidad extrema a alguno de los componentes de la pintura y no al preservativo.

Es muy particular el hecho de que las cepas 19 y 48 presentaran un sobrecrecimiento en la zona cercana a las piezas de madera pintadas, lo cual indica que a pesar de la presencia de preservativo en estas piezas, algún componente de la pintura favorece su crecimiento.

Se debe aclarar, que en el documento oficial del ACTICIDE⁷ los productores lo recomiendan como preservativo antimicrobiano de envases para pinturas de base acuosa, es decir, en estado húmedo, en el que los principales contaminantes microbianos responsables del biodeterioro de la pintura son las bacterias.⁸ Por otra parte, los principales causantes de manchas, pigmentaciones y levantamientos en las pinturas ya aplicadas sobre diferentes superficies son los hongos y no las bacterias^{3,9} lo que requeriría el empleo simultáneo de un buen agente antifúngico.

CONCLUSIONES

Se comprobó que la efectividad *in situ* del ACTICIDE RS como antibacteriano se manifiesta a partir del 0,15 % cuando se incorpora como preservativo en las pinturas emulsionadas.

El efecto antifúngico del ACTICIDE como preservativo antimicrobiano (antifúngico) de la pintura aplicada (pruebas secas), no se pudo evidenciar a las concentraciones recomendadas por los fabricantes, por lo que sería recomendable probar concentraciones superiores con tales fines. En caso de emplearse este producto como antibacteriano a las concentraciones aquí estudiadas, debe combinarse con otro producto de ac-

tividad antifúngica ya demostrada en las pinturas emulsionadas, realizando previamente las pruebas correspondientes.

BIBLIOGRAFIA

- Montegut D., Indictor N., Koestler R.J. Fungal deterioration of cellulosic textiles. A Review. **International Biodeterioration**, 28, 209, 1991.
- Warscherd T., Oetling M., Krumbein W.F. Physico-Chemical aspects of biodeterioration processes on rocks with special regard to organic pollutants. **International Biodeterioration**, 28, 37, 1991
- Ahcarn D.G., Simmons R.B., Switzer K.F., Ajello L and Pierson D.L. Colonization by *Cladosporium* spp. Of painted metal surfaces associated with heating and air conditioning systems. **J. Industrial Microbiology**, 8, 277, 1991.
- Giacobini C., Pedica M., Spinucci M. Problems and future projects on the study of Biodeterioration: mural and Canvas paintings. **Biodeterioration. Cultural Properties**, 31, 275, 1990.
- Leznicka S., Kuriczkin J., Krumbein W.E., Strzelczyk A.B., Peterson K. Studies on the growth of selected fungal strains on limestones impregnated with silicone resins. **International Biodeterioration**, 28, 91, 1991.
- Gwynne S. Laboratory Report SC/294/B, Imperial Chemical Industries PLC, Speciality Chemicals, 9Manchester, England, August 6th, 1988.
- Petroplastics & Chemical Limited, ACTICIDE RS (Formerly ACTICIDE TL 636), U.K. Nov., 19, 1996.
- Gillatt J. Methods for the efficacy testing of industrial biocides. 1. Evaluation of wet state preservatives. **International Biodeterioration**, 27, 283, 1991.
- Martínez M., Concepción M., Betancourt M. y Beade M. Actividad antimicrobiana de tres aceites esenciales para su posible utilización como desinfectantes. **Rev. Cubana Farmacia**, 31, 54, 1997.
- NCCLS. Document M7-A3, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that growth aerobically. Third Edition, Approved Standard, Vol. 13, No. 25, 8, 1993.
- B.S. 3900, Part G6. Briths Standard Institution. Assesment of Resistance to fungal growth, 1989.
- Madigan M.T., Martinko J.M., and Parker J. Brock Biology of Microorganisms. Cap. 8, 8th Edition, Prentice Hall, International Inc., 345-357, 1997.

¿Problemas con el sueño?

La Clínica de Sueño le puede ayudar a resolverlos felizmente.



Es conocido que siempre han existido personas que sufren trastornos relacionados con el sueño, pero sólo en la última década, se le ha dado a las alteraciones del sueño la significación requerida como problema de salud que causa no sólo serias enfermedades médicas, sino también, que afecta las relaciones sociales y los negocios de las personas, sin límites de edad o profesión.

La Clínica de Sueño reúne a un colectivo profesional multidisciplinario con más de 20 años de experiencia en el estudio del Sistema Nervioso Humano y está dotada con moderna tecnología que le permite un rápido y eficaz diagnóstico y con novedosas técnicas de tratamiento de los diferentes trastornos del sueño.

Esta institución ha sido concebida para la evaluación y rehabilitación de los pacientes con trastornos del sueño aquejados de:

- Dificultades para iniciar o mantener el sueño o sueño no restaurador (insomnios) de todos lo tipos y en todas las edades.
- Somnolencia excesiva diurna (hipersomnias) con sospecha de narcolepsia, síndrome de apnea de sueño y otras causas.
- Sospecha de alteraciones asociadas al sueño como crisis epilépticas, asma nocturna, movimientos periódicos de las piernas, etcétera.
- Alteraciones del ciclo normal día-noche (cambio de huso horario y en los turnos laborales, patrones de sueño-vigilia irregulares, síndromes de fase atrasada y adelantada de sueño, etc.).
- Parasomnias mal soportadas, con riesgos de accidente o de larga evolución (sonambulismo, terrores nocturnos, pesadillas, etc.).
- Problemas del sueño relacionados con enfermedades neuropsiquiátricas

(asociadas a enfermedades neurológicas, traumas craneales, depresiones enmascaradas).



CENTRO INTERNACIONAL
DE RESTAURACIÓN NEUROLÓGICA

Teléfonos: 33 6003; 21 9966.
Fax: (537) 33 6339; 33 2420; 33 6302.
Telefax: 33 6028.