

PROCEDIMIENTO PARA EL ENSAYO BIOLÓGICO
DE PINTURAS AL AGUA TIPO EMULSION

Dr. Luis A. Borlando

Serie II, nº 185

INTRODUCCION

El problema del enmohecimiento no está limitado desde luego a pinturas del tipo emulsión al latex únicamente. Si bien las películas de pintura no son en general un substrato adecuado para el crecimiento de microorganismos, en determinadas condiciones éstos pueden obtener de la misma la energía necesaria para su desarrollo.

Además, en la mayoría de los casos, tal desarrollo prospera en base a substratos nutrientes depositados encima del film de pintura en forma de polvo, restos orgánicos, agua condensada, etc., o también porque debajo de la película se dan condiciones muy favorables para el mismo en las innumerables cavidades del yeso o del revoque, que son oscuros y generalmente contienen nutrientes constituidos por restos de colas, papel, o simplemente polvo.

Es también evidente que la humedad de la pared es factor determinante del desarrollo de los mohos que pueden entonces esporular y llegar a atravesar la película de pintura.

En otros casos, el ataque prospera en base a plastificantes, espesantes o coloides protectores, de tal modo entonces que si bien el film contribuye poco o nada para la nutrición del microorganismo, los demás factores mencionados contribuyen para aumentar la gravedad y la frecuencia con que aparece el problema en las condiciones climáticas comunes en nuestro medio.

Los mohos responsables pertenecen a pocas especies y en ello coincide la información bibliográfica procedente de distintos países. En el exterior predomina la especie Pullularia pullulans, de color vegro, y en pinturas de interiores el Cladosporium herbarum de color gris verdoso, Phoma violácea o Aspergillus niger.

En menos oportunidades se encuentran infecciones debidas a Penicillium, Trichodorma, Alternaria, Stemphyllium, Fusarium, etc.

La principal consecuencia de la acción de los mohos sobre una película de pintura resulta ser de orden estético, dado que en general se trata de un desarrollo superficial de micelios de colores característicos que cambian por ello el color y aspecto de la misma. En otros casos, como consecuencia de su metabolismo elaboran productos coloreados que se disuelven en los componentes del film (tal es el caso de la especie Phoma violacea), o productos de carácter ácido que pueden también atacarlo.

Si bien este manchado puede removerse inicialmente por simple lavado, más adelante la infección penetra en la película produciendo entonces su ampollamiento o rotura.

A pesar de ello se considera comunmente que, aparte del problema estético, la destrucción de películas de pinturas por acción biológica es mínima con relación a la producida por otros agentes físico-químicos, tales como luz ultravioleta, oxígeno, agua, etc.

La mayor o menor aptitud para el enmohecimiento depende además de otras propiedades físicas de la película: brillo, dureza, impermeabilidad y uniformidad, que también juegan un rol importante concediéndole en ciertas condiciones una resistencia extra al ataque de los microorganismos.

Se llega entonces a la conclusión de que actualmente se debe agregar a los tipos normales de pinturas compuestos altamente tóxicos para los microorganismos, dado que comunmente las películas no resultan resistentes a su ataque, en especial si son lo suficientemente decorativos y protectores y poseen las demás características físicas deseables.

ANTECEDENTES

Con relación a la existencia de procedimientos de ensayos normalizados se consultó a 19 Institutos de Normalización pertenecientes a otros tantos países, y se logró la información de que solamente dos de ellos han editado normas referentes a .

pinturas tipo emulsión con su correspondiente ensayo biológico: Irlanda en 1964 (3) y la Unión Sudafricana en 1960 (4), siendo ambas prácticamente iguales. Además, en las Normas Federales de los Estados Unidos hay un procedimiento para ensayar la resistencia a los mohos que se aplica a pinturas, barnices o lacas en general (5).

METODOS DE ENSAYO

Con relación a ellos haremos primeramente referencia al método propuesto por el IRAM, basado en la especificación del South African Bureau of Standards, 633-1960 y que consiste en lo siguiente:

a) Técnica del Papel de Filtro sobre Agar Nutritivo

Aparatos: Para efectuar esta determinación deben emplearse los aparatos siguientes:

Autoclave. Un autoclave adecuado para mantener una temperatura de $122 \pm 2^{\circ}\text{C}$ a una presión de 1 kg/cm^2 para esterilizar el medio de cultivo.

Placa de Petri. De 10 cm de diámetro.

Ambiente estéril. Un ambiente estéril para efectuar la inoculación de las muestras, lámparas de esterilización, llovizna antiséptica o aire filtrado a una presión adecuada para mantener el ambiente estéril.

Cámara de incubación. Una cámara de incubación mantenida a una temperatura de $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a una humedad relativa de $98,5 \% \pm 2,5 \%$.

Elementos para el ensayo:

Medio de cultivo.

Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	2 g
Nitrato de amonio ($NH_4 NO_3$)	3 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	2 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	25 g
Sacarosa	30,5g
Agar	15,0g
Agua destilada (C.S.P.)	1000 cm ³

Microorganismos. Pueden emplearse indistintamente Aspergillus niger o Pullularia pullulans.

Subcultivos. Los subcultivos de los organismos pueden ser mantenidos en un medio adecuado tal como dextrosa de papa y agar.

Procedimiento. La realización de este ensayo debe efectuarse en condiciones asépticas.

Preparación de las muestras. Se aplica a pincel una mano de la pintura en su estado de entrega si se trata de las emulsiones al latex o diluida con agua hasta obtener una consistencia adecuada para ser aplicada a pincel si son de los otros dos tipos, sobre ambos lados de una hoja de papel de filtro de porosidad media. Se deja secar 48 horas, se corta el papel en forma de un cuadro de 4 cm de lado, y se demarca con un trozo negro resistente al agua un cuadrado de 3 cm de lado. Es conveniente emplear probetas testigo sin pintar.

Lavado de las muestras. Se sumergen las probetas en agua destilada a 40°C de temperatura en un recipiente de tamaño adecuado y con una fluencia de agua desde el fondo del recipiente con el fin de cambiar el agua

a razón de cinco veces durante 24 horas. El volumen de agua por cada probeta no será menor de 100 ml; luego de una inmersión de 24 horas se retiran los papeles de filtro y se secan por exposición en el ambiente del laboratorio.

Preparación del medio de cultivo. Se mezcla íntimamente el medio de cultivo en un frasco adecuado y se coloca este recipiente en un autoclave hasta fundir el medio. Se transfiere aproximadamente 25 cm³ del mismo a cada cápsula de Petri; luego se esteriliza en el autoclave cada disco y su contenido durante 20 min. Se retira del autoclave y se deja solidificar.

Preparación de la contaminación. A un subcultivo en estado de fructificación y con esporos maduros se le agrega 10 ml de agua destilada estéril que contiene 0,05 g por litro de un detergente atóxico y se agita para lograr una suspensión de esporos. Tal suspensión debe ser preparada durante el día del ensayo.

Inoculación. Se colocan tres de las muestras preparadas como ya se ha indicado sobre la superficie del medio de cultivo de tres diferentes placas de Petri, y una muestra testigo sin pintar sobre la superficie de otra placa. Empleando una pipeta esterilizada se distribuyen uniformemente aproximadamente 2 ml de la suspensión de esporos sobre toda la superficie de cada una de las placas.

Incubación. Se colocan las placas durante siete días en una cámara de cultivo a una temperatura comprendida entre 28^o y 30^oC y una humedad relativa del 90 % al 95 %.

T A B L A I

ENSAYO DE RESISTENCIA A LOS MOHOS

Técnica del papel de filtro sobre agar nutritivo

7 días de incubación a 28-30°C y 90-95% de H.R.

Pintura	Moho	Sin Fung.	50 % Menos	Normal	50 % Más	No Declar.
A	1	T	T	50 %	40 %	
	2	T	T	70 %	40 %	
	3	T	T	T	T	
	4	T	80 %	T	70 %	
B	1	T	Satisf.	Satisf.	Satisf.	
	2	T	Satisf.	Satisf.	Satisf.	
	3	T	T	80 %	Satisf.	
	4	T	Satisf.	Satisf.	Satisf.	
C	1	T	T	T	T	Satisf.
	2	T	T	T	T	Satisf.
	3	T	T	T	T	Satisf.
	4	T	T	T	T	Satisf.
D	1	T	80 %	Satisf. (*)	Satisf. (*)	
	2	T	80 %	Satisf. (*)	Satisf. (*)	
	3	T	90 %	60 %	40 %	
	4	T	70 %	50 %	50 %	

CEPA Nº 1: ATCC 9642, *Aspergillus Niger* (Negro)

CEPA Nº 2: ATCC 9644, *Penicillium Luteum* (Amarillo)

CEPA Nº 3: Contaminación Indeterminada (Verde)

CEPA Nº 4: Indeterminada, Aislada de Pintura (Gris-Verdoso)

T : Invasión Total de la Probeta con Micelio Fructificado

% : Invasión de un Porcentaje de la Probeta con Micelio Fructificado

(*) : Invasión Total o Parcial de Micelio Blanco, sin Fructificar

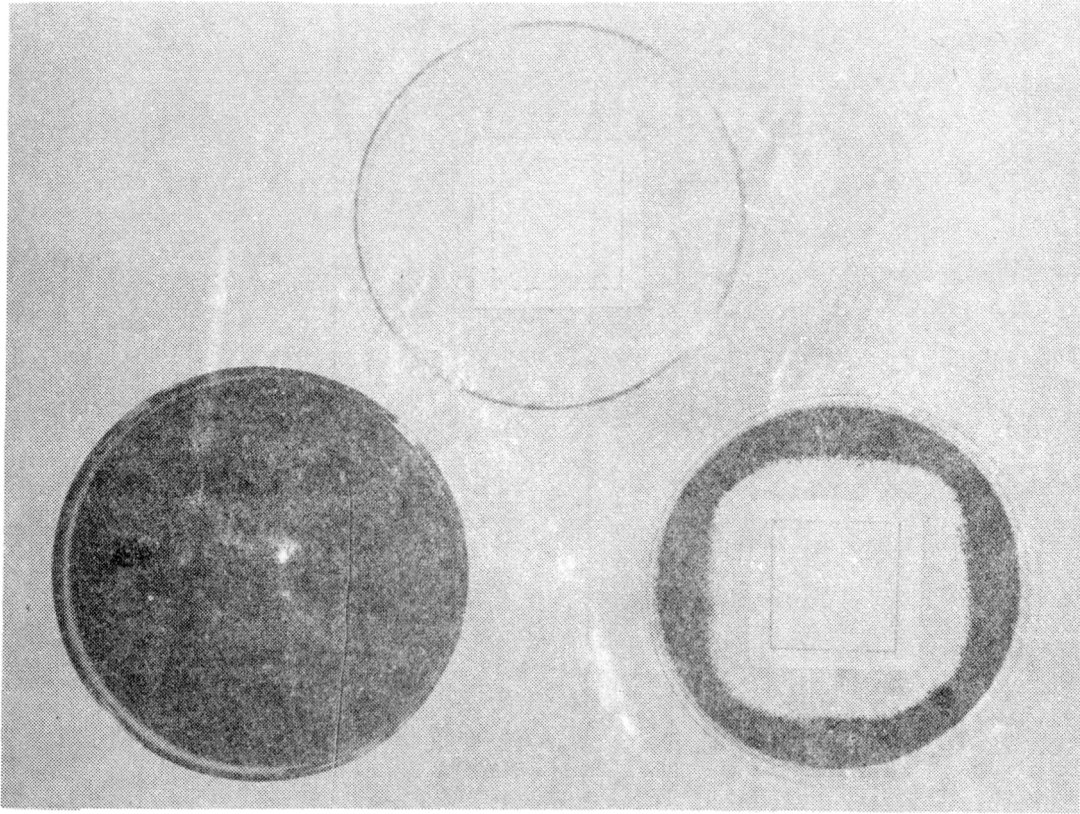


Fig. 1.- Ensayo con la técnica del papel de filtro sobre agar nutritivo

Arriba: Detalle del dispositivo utilizado

Abajo : Un ensayo de resultado no satisfactorio y otro con notable inhibición del desarrollo del moho (Aspergillus niger)

Observación de los resultados. Transcurrido dicho lapso se observa en las tres muestras y en la testigo el desarrollo de los microorganismos dentro de la superficie demarcada. Si sobre el testigo que no ha sido pintado no se observa desarrollo de microorganismos se repite la determinación.

b) Procedimiento de la placa de yeso.

El segundo método para el ensayo de la re-

T A B L A II

ENSAYO DE RESISTENCIA A LOS MOHOS

Procedimiento de la placa de yeso
(80 días de incubación a 26-28°C)

Pintura	Sin Fung.	50 % Menos	Normal	50 % Más	No Declar.
A	30-5	30-5	20-4	10-2	--
B	30-8	25-8	20-7	20-5	--
C	40-5	30-3	0	0	0
D	60-9	20-7	20-5	20-5	--

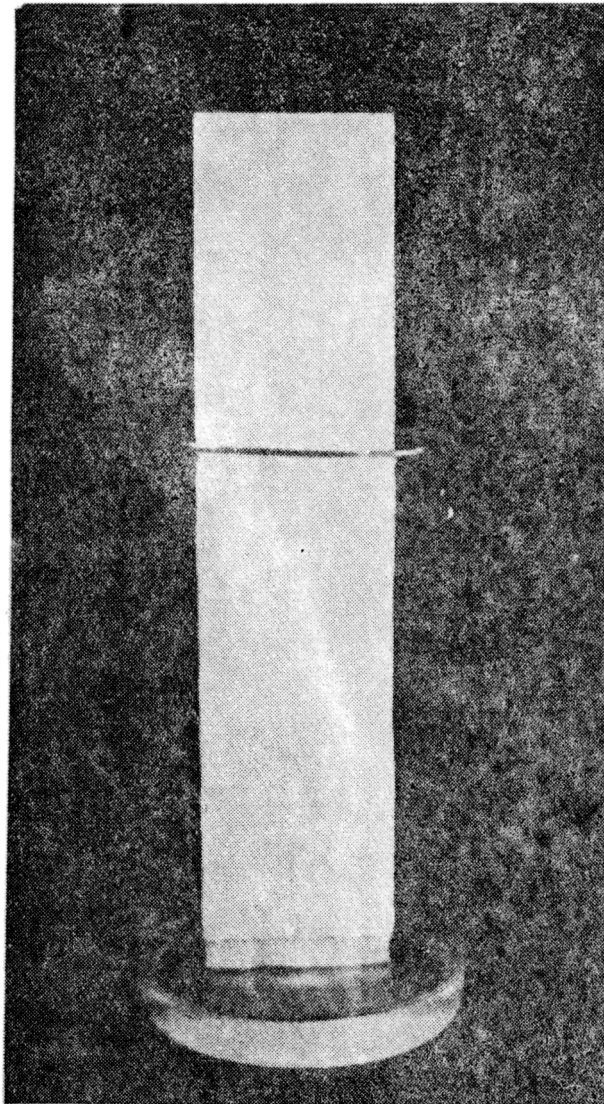


Fig. 2.- Técnica de la placa de yeso

sistencia a los microorganismos consiste en pintar probetas de yeso de aproximadamente 20 cm de alto, 4,5 cm de ancho y 1 cm de espesor con dos manos de la pintura en ensayo, convenientemente diluída. Se deja sin cubrir una franja de 1 cm en su parte inferior para permitir luego la absorción de agua y otra de 4 cm en la parte superior para facilitar la identificación y manipuleo de la muestra.

Una vez seca la pintura se introduce ca-

T A B L A IIIENSAYO DE RESISTENCIA A LOS MOHOS

Procedimiento de la placa de yeso
(180 días de incubación a 26-28°C)

Pintura	Sin Fung.	50 % Menos	Normal	50 % Más	No Declar.
A	100-6	100-5	100-5	100-3	--
B	100-10	100-10	100-10	100-10	--
C	100-6	100-5	50-5	50-3	0
D	100-10	100-10	50-5	50-10	--

Extensión: 0 % a 100 %

Intensidad: 1 a 10

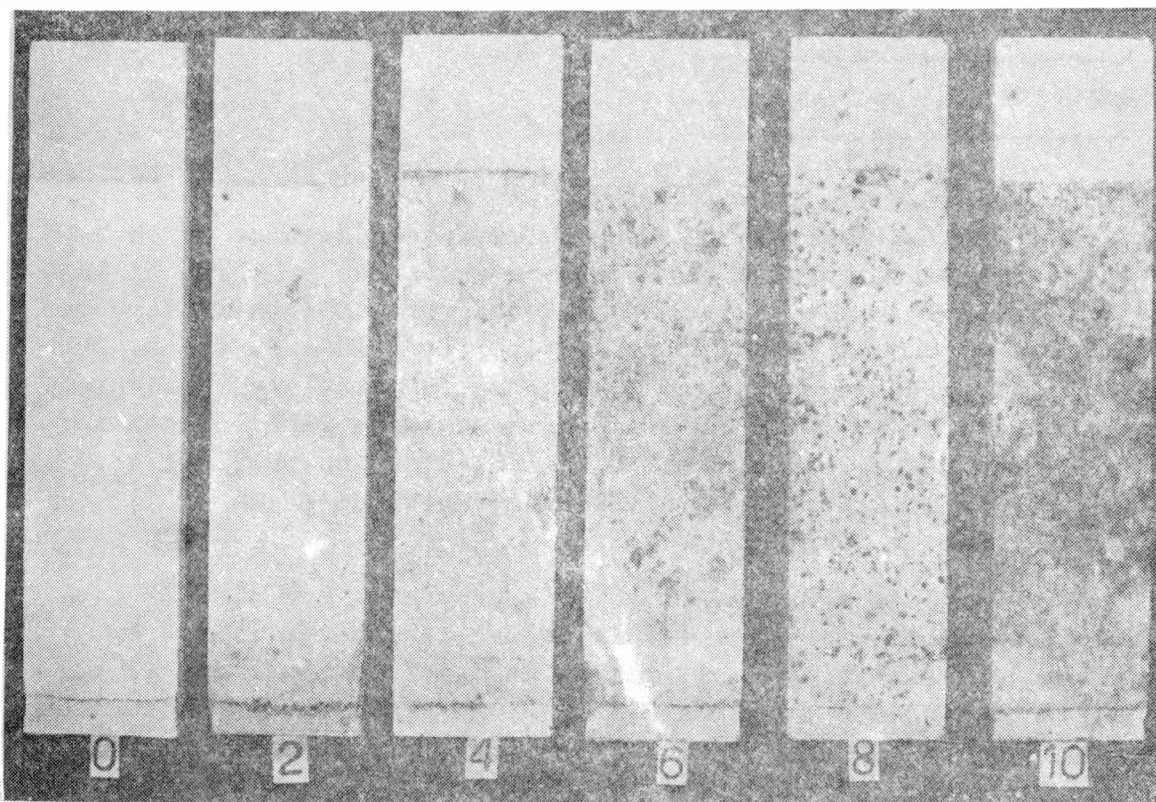


Fig. 3.- Placas de yeso con la superficie pintada, luego de 180 días de incubación a $26^{\circ} - 28^{\circ}\text{C}$. La extensión del desarrollo es 100 % y la intensidad es la indicada con el número correspondiente

da placa convenientemente identificada, en un recipiente cilíndrico de vidrio de aproximadamente 6 cm de diámetro y 15 cm de altura, en el que se mantienen constantemente un nivel de agua de 0,5 cm.

El conjunto se incubaba a $28-30^{\circ}\text{C}$ de temperatura y en ambiente oscuro; se lo observa periódicamente y se anota el tiempo en días en que el moho aparece sobre la pintura y va luego cubriendo determinados porcentajes de la superficie pintada.

En las figs. 1, 2 y 3 se aprecian los detalles de los dos procedimientos utilizados.

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS

Para la realización de los dos procedimientos de ensayo mencionados, se utilizaron cuatro marcas de pinturas al látex, todas de color blanco y provistas por sus fabricantes, que se identifican en este informe con las letras A, B, C y D. De cada una de ellas se dispuso de cuatro formulaciones distintas con la dosis de fungicida considerada en cada fábrica como normal; con una dosis del mismo incrementada en un 50 % con respecto a la anterior; con otra dosis disminuída en un 50 %; y sin adición de fungicida.

Los ensayos según la técnica propuesta por el IRAM (papel de filtro sobre agar nutritivo) se realizaron frente a cuatro diferentes cepas de mohos. De la pintura marca C se ensayó, además de las cuatro formulaciones mencionadas, otra más cuya dosis de fungicida no fue declarada por sus fabricantes. Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla I.

Los resultados del ensayo que utilizó placa de yeso se exponen en las Tablas II y III y permiten apreciar comparativamente el comportamiento de las diferentes marcas de pinturas.

Para la valoración del ataque de microorganismos se utilizó el criterio de apreciar el porcentaje de extensión del desarrollo sobre cada probeta y también la intensidad del mismo de acuerdo con una escala convencional entre los valores 1 y 10.

En la primera de ellas se exponen los resultados de una de las observaciones periódicas efectuadas: a los 80 días de incubación y en la segunda, el estado de las placas luego de 180 días de incubación.

En la Tabla IV se informan los resultados obtenidos en el ensayo según la técnica del papel de filtro (IRAM), de varias pinturas preparadas en el laboratorio mediante la adición a una base de emulsión al látex de diferentes dosis de cada uno de los siguientes compuestos: clorofenata; fenilacetato de mercurio; mezcla de fenilacetato de mercurio y cloro-

fenol y mezcla de fenilacetato de mercurio con clorofenato.

Los resultados del ensayo de esas mismas pinturas según la técnica de la placa de yeso se exponen en la Tabla V, habiéndose usado el mismo criterio ya expuesto para la valoración del ataque de microorganismos.

EXAMEN DE LOS RESULTADOS

1. El análisis de los resultados expuestos en la Tabla I, indica que en el ensayo que utiliza papel de filtro pintado, solamente la muestra con dosis 50 % superior a la normal de la pintura marca B, y la muestra con dosis no declarada de la marca C, pasan satisfactoriamente la prueba frente a las cuatro cepas de mohos.

Sin embargo, las muestras de pintura marca B con dosis normal y 50 % menos, tienen comportamiento satisfactorio frente a las cepas n° 1, 2 y 4. Lo mismo puede decirse de las muestras marca D con dosis normal y 50 % más, frente a las cepas n° 1 y 2 si se sigue el criterio de la norma S.A.B.S., 633-1960 que al interpretar el resultado parece considerar satisfactorio un ensayo en el que el moho invade el cuadro marcado sobre el papel de filtro, aunque sin esporular.

2. En el mismo ensayo es también fácil apreciar la diferente susceptibilidad de las cepas utilizadas, en especial la n° 3 que se muestra mucho más resistente que las restantes para los fungicidas adicionados. Esta propiedad de la cepa n° 3 se aprecia todavía mejor al examinar la Tabla IV.

3. Las abundantes contaminaciones que han podido apreciarse durante la realización de los ensayos en placa de Petri, hacen ver la necesidad de extremar en lo posible las condiciones de asepsia, utilizando efectivamente una pequeña cámara para realizar la inoculación en ambiente estéril.

4. Tal como se indica en la Tabla I, hubo numerosos ensayos en placa de Petri en los cuales el cuadro demarcado en la pro-

T A B L A IV

ENSAYO DE RESISTENCIA A LOS MOHOS

Técnica del Papel de Filtro sobre Agar Nutritivo

7 días de incubación a 28-30°C y 90-95 de H.R.

Fungicida	Moho	0,25 %	0,75 %	1,50 %
Clorofenatos	1	T	10%	Satisfact.
	3	T	T	T
		0,010+0,30%	0,030+0,90	0,060+1,80%
F.A.M. + Clorofenoles	1	T	30 %	Satisfact.
	3	T	T	T
		0,05%	0,10%	0,20%
F.A.M.	1	Satisfact.	Satisfact.	Satisfact.
	3	T	T	T
		0,05+0,25%	0,10+0,50%	0,20+1,00%
F.A.M. + Clorofenatos	1	90%	15%	Satisfact.
	3	T	T	T

CEPA nº 1: ATCC 9642. *Aspergillus niger* (color negro).

CEPA nº 3: Contaminación indeterminada (color verde).

T: Invasión de la totalidad de la probeta con micelio fructificado.

%: Invasión de determinado porcentaje de la superficie de la probeta con micelio fructificado.

T A B L A V

ENSAYO DE RESISTENCIA A LOS MOHOS

Procedimiento de la placa de yeso

(180 días de incubación a 26-28°C)

Fungicida	0,25 %	0,75 %	1,50 %
Clorofenatos	30-6	30-3	0
	0,010+0,30%	0,030+0,90%	0,060+1,80%
F.A.M. + Clorofenoles	20-3	40-1	0
	0,05%	0,10%	0,20%
F.A.M.	100-3	40-3	40-1
	0,05+0,25%	0,10+0,50%	0,20+1,00%
F.A.M. + Clorofenatos	40-2	40-1	0

Extensión: 0 % a 100 %

Intensidad: 1 a 10

beta de papel de filtro resulta invadido por micelio blanco, no fructificado. De acuerdo con el esquema de IRAM, muestras con este comportamiento deben ser consideradas como de resultado "no satisfactorio" y en ello coincide la mencionada norma irlandesa I.S. 129:1964, que también tiene en cuenta cualquier "desarrollo" de micelio en dicha tabla.

Sin embargo, la norma S.A.B.S. 633-1960 consideraría tal muestra como de resultado "satisfactorio" por la razón anteriormente expuesta.

5. Todos los ensayos cuyos resultados figuran en las tablas n^os. I y IV se realizaron con probetas de papel pintado sometidas al lavado con agua a 40^oC de temperatura, según el esquema del IRAM.

Numerosos ensayos realizados posteriormente con probetas no sometidas al ciclo de lavado dieron resultados muy diferentes; por ejemplo, la pintura C con las tres dosis de fungicida pasa satisfactoriamente el ensayo frente a las cepas n^o 1, 2 y 4. También se encontraron importantes diferencias con las pinturas marca B y marca A.

A este respecto debe hacerse notar que según las normas sudafricanas e irlandesa deben lavarse las probetas a 28^oC ± 1,5^oC de temperatura, mientras que en la Especificación Federal de Estados Unidos no se realiza lavado alguno de las mismas.

6. En la Tabla III se aprecia que solamente una de las muestras de la pintura marca C (dosis no declarada) tiene un comportamiento satisfactorio en el ensayo de la placa de yeso.

Las observaciones realizadas a los 80 días de incubación que se informan en la Tabla II hacen ver que en ese período se comportan también en forma satisfactoria las dosis normal y 50 % en exceso, de la misma marca de pintura.

7. Los resultados consignados en las Tablas IV y V, resultan interesantes para apreciar el comportamiento de pinturas adicionadas de dosis variadas de cuatro fungicidas diferentes, y valoradas según ambas técnicas de ensayo. También se aprecia en el primero de ellos la notable diferencia en la susceptibilidad de las dos cepas de mohos utilizados en el ensayo según IRAM.

8. El análisis comparativo de los resultados obtenidos con uno y otro procedimiento en el ensayo de las pinturas marcas A, B, C y D no demuestra una concordancia aceptable, en especial en el caso de la pintura B, y si se toman en cuenta las observaciones realizadas a los 80 días de incubación ello ocurre también con la pintura marca C (debe hacerse notar que ambos ensayos completos se realizaron por duplicado, obteniéndose para cada uno los mismos resultados en las dos oportunidades).

9. El examen comparativo de las Tablas IV y V demuestra mejor concordancia entre los resultados de ambos procedimientos si se tiene en cuenta el comportamiento frente a la cepa nº 1 en el ensayo del papel de filtro, pero no aparece correlación alguna si se considera el mismo ensayo frente a la cepa nº 3. Ellas también demuestran que la correlación es función de las características del preservador utilizado.

CONSIDERACIONES FINALES

El ensayo sobre placa de yeso realizado en la forma descrita en este informe, esto es, sin embeber la placa en soluciones nutritivas tales como engrudo de harina, caseína, extracto de malta, etc., provee condiciones aceptables para el desarrollo de mohos sobre las pinturas y permite, por tanto valorar el comportamiento de los fungicidas tanto en relación con su toxicidad como con su permanencia.

Con relación a la duración del mismo la experiencia acumulada a través de este estudio, hace ver la conveniencia de prolongar la exposición de las placas al menos durante 150 días, para obtener resultados definitivos.

El ensayo que utiliza papel de filtro pintado según la técnica propuesta por el IRAM, si bien permite determinar en el corto período de 8 días, la presencia de sustancias preservadoras en una pintura, no revela en forma satisfactoria el comportamiento final de la misma al ser puesta en servicio.

Sin embargo consideramos que el mismo da buena informa-

ción sobre la toxicidad de los preservadores y tiene valor en especial para descartar fungicidas ineficaces, determinar dosis o valorarlos comparativamente.

El resultado de numerosos ensayos realizados con este procedimiento hace ver la importancia de las cepas utilizadas en el mismo, dado que el diagnóstico de la efectividad de un determinado preservador resulta demasiado influenciado por las mismas. Quizás convenga modificar el esquema en lo referente a cepas, usando una mezcla de esporos de especies bien determinadas.

Cuando tal procedimiento se utilice con el criterio anteriormente expuesto de descartar muestras o valorar comparativamente la toxicidad de preservadores debiera realizarse el lavado de las probetas a $28^{\circ} \pm 5^{\circ}$ de temperatura como especifican las normas S.A.B.S. 633-1960 o I.S. 129:1964, en lugar de hacerlo a 40°C como establece el esquema IRAM en cuestión, teniendo en cuenta que ello tiene gran influencia sobre el resultado.

Referente al criterio utilizado para la apreciación del resultado, consideramos conveniente el especificado por la norma irlandesa y por la norma IRAM, en cuanto a que cualquier desarrollo de micelio sobre el cuadro marcado en la superficie del papel de filtro hace negativo el ensayo para la muestra en cuestión.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Norma IRAM 1 070. - Pinturas al agua tipo emulsión para interiores. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales.
2. Norma IRAM 1 077. - Pinturas al agua tipo emulsión blancas y de base blanca para exteriores.
3. Irish Standard Specification. I.S.129: 1964.
4. South African Bureau of Standards. - Standard Specification for Emulsion Paints for Interior Decorative Purposes, S.A.B.S. 633-1960. Standard Specification for Emulsion

Paints for Exterior Use. S.A.B.S. 634-1960.

5. Federal Specification, TT-P-18 (1947). F-3g. Mildew resistance. - Paint; Alkyd resin-emulsion, exterior, paste tints and white.

OTRA BIBLIOGRAFIA SOBRE EL TEMA

6. Arnold, M.H.M. y Clarke, H.J. - J.O.C.C.A. 39, 900, (1956).
7. Eveleigh, D.E. - Ann. Appl. Biol., 48, 403, (1961).
8. Galloway, L.D. - J.O.C.C.A.- 38, 250, (1955).
9. Goll, M. - Of. Digest, 28, 364, (1958).
10. Hoffman, E. - Austral. Paint J., 9, nº 9, (1963).
11. Klens, P.F. y Lang, J.F. - J.O.C.C.A., 39, 887, (1956).
12. O'Neill, L.A. - J.O.C.C.A.- 46, 425, (1963).
13. O'Neill, L.A. - J.O.C.C.A., 45, 843, (1962).
14. Schapiro, S. - Off. Digest, 30, 414, (1958).
15. Scofret, F. - Paint Ind. Mag., 61, 176, (1946).
16. Whiteley, P. - J.O.C.C.A. 43, 842, (1960).

Nota.- Este trabajo fue presentado al 2º Congreso Latinoamericano de Ingeniería Química. San Juan, Puerto Rico, 1965.