

**ESTUDIO DE LA MICROBIOTA PRESENTE  
EN MATERIALES ESTRUCTURALES:  
RELACIÓN CON SU DETERIORO Y CONTROL  
MEDIANTE RECUBRIMIENTOS DE  
BASE SOL-GEL CON NANOPARTÍCULAS  
OBTENIDAS POR SÍNTESIS VERDE**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES**

TESISTA

**Lic. Erasmo J. Gámez Espinosa**

DIRECTORAS

**Dra. Marta N. Cabello  
Dra. Natalia Bellotti**

**2021**



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA**

  
**Facultad de Ciencias  
Naturales y Museo**

*A Luis Granado Pérez*

## **Agradecimientos**

A Dra. Natalia Bellotti y Dra. Marta Cabello por la dirección de esta tesis

A Dra. Cecilia Deyá por la dirección de la beca doctoral

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar mi estudio de postgrado mediante el otorgamiento de la beca doctoral.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT) por ofrecerme el lugar de trabajo para la realización del doctorado

Al Instituto Carlos Spegazzini por brindar el espacio para hacer las identificaciones

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCN y M-UNLP) por la formación recibida mediante cursos de postgrado

A Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva por el financiamiento otorgado para esta investigación.

A los Miembros del Jurado por sus críticas constructivas y la lectura de este documento

A mi familia y amigos quienes siempre me apoyaron en todo momento

## Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Resumen .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>Abstract.....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>Capítulo 1 .....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>Introducción y antecedentes .....</b>  | <b>8</b>  |
| Biodeterioro .....  | 9         |
| Biodeterioro de materiales estructurales .....  | 10        |
| Deterioro fúngico.....  | 13        |
| Recubrimientos funcionalizados con aditivos antifúngicos para el control del biodeterioro ....                                      | 26        |
| Recubrimientos Sol-gel .....  | 31        |
| Métodos de síntesis y actividad antifúngica de nanopartículas .....   | 37        |
| <b>Hipótesis y objetivos .....</b>  | <b>42</b> |
| <b>Capítulo 2 .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>Estudios micológicos de materiales estructurales expuestos a la<br/>intemperie en la ciudad de La Plata.....</b>                 | <b>44</b> |
| Introducción .....  | 45        |
| Materiales y métodos .....  | 47        |
| Sitios de muestreo y aislamiento fúngico .....  | 47        |
| Atributos biodeteriorantes .....  | 50        |
| Análisis estadístico .....  | 53        |
| Resultados.....   | 54        |
| Aislamientos fúngicos y categoría ecológica .....   | 54        |
| Atributos biodeteriorantes .....  | 59        |
| Análisis molecular de cepas fúngicas altamente deteriorantes .....  | 66        |
| Discusión .....   | 70        |
| <b>Capítulo 3 .....</b>   | <b>75</b> |
| <b>Actividad antifúngica de recubrimientos con nanoaditivos obtenidos a<br/>partir de tanino de <i>Caesalpinia spinosa</i>.....</b> | <b>75</b> |
| Introducción .....  | 76        |
| Materiales y métodos .....  | 78        |
| Biosíntesis y caracterización de las nanopartículas .....   | 78        |
| Actividad antifúngica de las nanopartículas en suspensión .....   | 79        |



|  |            |
|--|------------|
| Formulación y caracterización de los recubrimientos sol-gel .....  | 80         |
| Prueba de resistencia fúngica del recubrimiento sol-gel.....   | 81         |
| Análisis estadístico .....   | 82         |
| <b>Resultados.....</b>   | <b>83</b>  |
| Biosíntesis y caracterización de las nanopartículas .....  | 83         |
| Actividad antifúngica de las nanopartículas.....   | 90         |
| Formulación y caracterización de recubrimiento sol-gel.....  | 94         |
| Prueba de resistencia fúngica del recubrimiento sol-gel.....   | 98         |
| Discusión.....   | 104        |
| <b>Capítulo 4 .....</b>  | <b>107</b> |
| <b>Tanino de <i>Schinopsis balansae</i> aplicados en la obtención de<br/>nanocompuestos para recubrimientos antifúngicos .....</b> | <b>107</b> |
| Introducción .....   | 108        |
| Materiales y métodos .....   | 109        |
| Biosíntesis y caracterización de las nanopartículas .....  | 109        |
| Actividad antifúngica de las nanopartículas en suspensión .....  | 111        |
| Formulación y caracterización de recubrimiento sol-gel.....  | 112        |
| Prueba de resistencia fúngica del recubrimiento sol-gel.....   | 114        |
| Análisis estadístico .....   | 114        |
| <b>Resultados.....</b>   | <b>115</b> |
| Biosíntesis y caracterización de las nanopartículas .....  | 115        |
| Efecto de las nanopartículas en suspensión sobre el crecimiento fúngico .....  | 121        |
| Formulación y caracterización de recubrimiento sol-gel.....  | 124        |
| Prueba de resistencia fúngica del recubrimiento sol-gel.....   | 131        |
| Discusión.....   | 143        |
| <b>Capítulo 5 .....</b>  | <b>146</b> |
| <b>Conclusiones generales .....</b>  | <b>146</b> |
| <b>Referencias .....</b>   | <b>152</b> |

# Resumen

El biodeterioro se puede definir como cualquier cambio indeseable en un material provocado por la actividad vital de los organismos. Las bacterias, arqueas, algas, hongos, líquenes, cianolíquenes así como las plantas y animales, causan constantemente problemas en la conservación de los materiales debido a su potencial deteriorante. Sin embargo, los hongos filamentosos son los microorganismos con mayores potencialidades deteriorantes debido a su nutrición heterótrofa absorptiva, crecimiento mediante hifas y la secreción de ácidos y pigmentos. El deterioro fúngico provoca pérdidas económicas debido al presupuesto invertido en restauración y porque los materiales contaminados son potencialmente perjudiciales para la salud humana al albergar posibles patógenos. Por lo tanto, el estudio de la micobiota para prevenir el deterioro resulta de gran interés porque se puede conocer las especies cultivables que intervienen, aspectos de su ecología y posibles tratamientos.

Por otro lado, la tecnología sol-gel ofrece una alternativa en cuanto al control del crecimiento fúngico en materiales estructurales mediante recubrimientos aditivados con biocidas ecológicos. En este sentido, el método sol-gel presenta varias ventajas, entre las que destacan obtención simple, alta uniformidad en las películas delgadas y la posibilidad de aplicarlos sobre diferentes tipos de sustratos. Por su parte, la nanotecnología verde proporciona herramientas para obtener biocidas nanoestructurados utilizando sistemas biológicos y previniendo cualquier toxicidad asociada. En este sentido, la síntesis fitogénica juega un papel importante debido a que las plantas son fuentes de compuestos químicos reductores y estabilizantes. Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis doctoral fue la obtención, a partir del estudio de la micobiota presente en materiales estructurales, de hongos altamente deteriorantes para ser utilizados como bioindicadores en el estudio de la prevención del biodeterioro mediante el uso de recubrimientos de base sol-gel aditivados con nanopartículas obtenidas por síntesis verde. El muestreo microbiológico se realizó por técnica de hisopado en la fachada de la Catedral de La Plata (CP) y en la Estación Experimental del Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT). Los

aislados fueron identificados hasta el taxón más bajo posible y se calculó la densidad (DR) y la frecuencia (FR) relativa de aparición de los mismos. Los atributos biodeteriorantes fueron evaluados mediante los ensayos de: disolución de carbonato de calcio, secreción de ácidos y pigmentos, y exposición a cámara de humedad. Por otra parte, las nanopartículas (NPs) fueron obtenidas a partir de soluciones acuosas de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  a las que se añadió la solución de tanino *Caesalpinia spinosa* y *Schinopsis balansae*. Las NPs fueron caracterizadas por espectroscopía UV-vis, TEM, SEM, espectroscopía EDS, mapeo de rayos X y espectroscopía FTIR. La actividad antifúngica de las NPs se determinó mediante el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) y el ensayo de macrodilución en placa. En el caso de la formulación del recubrimiento sol-gel se emplearon dos precursores: 3-aminopropiltrietoxisilano (AMEO) y 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MTMO) y fueron caracterizados mediante la medición del ángulo de contacto, determinación de absorción de agua y técnicas de microscopía electrónica. La actividad antifúngica de los recubrimientos funcionalizados con NPs se evaluó siguiendo los lineamientos de la norma ASTM 5590.

La técnica de hisopado permitió caracterizar la microbiota presente en los sitios de muestreo. En la CP, *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. presentaron mayor FR, sin embargo, en CIDEPINT fue *Chrysonilia* sp. Los atributos biodeteriorantes mostraron que *Aspergillus niger* MN371276, *Lasiodiplodia theobromae* MN371283, *Cladosporium sphaerospermum* MN371394, *Penicillium commune* MN371392 y *Arthothelium spectabile* MT071822 fueron las cepas con mayor potencialidad deteriorante. El análisis molecular de estas cepas permitió reafirmar la identificación taxonómica y establecer relaciones evolutivas. Con el método de síntesis propuesto fue posible la obtención de nanopartículas de plata (AgNPs) quasiesféricas con actividad antifúngica frente a las cepas de estudio. Con el uso de la tecnología sol-gel fue posible la obtención de recubrimientos hidrofóbicos a partir de AMEO y MTMO con AgNPs funcionalizadas. Recubrimiento con AMEO y AgNPs presentaron mejor performance antifúngica en la protección de material cerámico y de pintura acrílica para mampostería con respecto al que contenía MTMO y AgNPs. Por lo tanto, los recubrimientos sol-gel funcionalizados con Nps

antifúngicas verificaron su eficiencia en el control del deterioro fúngico aplicable en la protección de materiales estructurales.

**Palabras claves:** biodeterioro, hongos filamentosos, nanopartículas, recubrimientos

# Abstract

Biodeterioration can be defined as any undesirable change in a material caused by the vital activity of organisms. Bacteria, archaea, algae, fungi, lichens, cyanolichens, plants and animals constantly cause problems in the preservation of materials due to their deteriorating potential. However, filamentous fungi are the microorganisms with the greatest spoilage potential due to their heterotrophic absorptive nutrition, hyphal growth and secretion of acids and pigments. Fungal deterioration phenomena cause economic losses due to the budget invested in restoration and because contaminated materials are potentially harmful to human health by harbouring potential pathogens. Therefore, the study of mycobiota to prevent deterioration is of great interest because it is possible to know the cultivable species involved, ecological aspects and possible treatments.

On the other hand, sol-gel technology offers an alternative for the control of fungal growth on building materials by means of eco-friendly biocide-additivated coatings. In this sense, the sol-gel method has several advantages, among which the most important ones are simple obtaining, high uniformity in thin films and the use of different types of substrates. Green nanotechnology provides tools to obtain nanostructured biocides using biological systems and preventing any associated toxicity. In this respect, phytogetic synthesis plays an important role because plants are sources of reducing and stabilizing chemical compounds. Therefore, the general objective of this doctoral thesis was to obtain from the study of the mycobiota present in building materials, highly degrading fungi to be used as bioindicators in the prevention of biodeterioration using sol-gel based coatings additivated with nanoparticles obtained by green synthesis. Microbiological sampling was carried out by swabbing technique on the façade of the Cathedral of La Plata (CP) and at the Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas Experimental Station (CIDEPINT). Isolates were identified to the lowest possible taxon and the density (RD) and relative frequency (RF) of occurrence of isolates was calculated. The biodeterioration attributes assessed were calcium carbonate dissolution test, acid and pigment secretion and exposure to humidity chamber. On the other hand, nanoparticles (NPs) were obtained from aqueous solutions of  $\text{AgNO}_3$  and  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  to which the

*Caesalpinia spinosa* and *Schinopsis balansae* tannin solution were added. The NPs were characterized by UV-vis spectroscopy, TEM, SEM, EDS spectroscopy, X-ray mapping and FTIR spectroscopy. The antifungal activity of the NPs was determined by agar diffusion method (Kirby-Bauer) and macrodilution assay. In the case of the sol-gel coating formulation, two precursors were used: 3-aminopropyltriethoxysilane (AMEO) and 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MTMO) and were characterized by contact angle measurement, water absorption determination and electron microscopy techniques. The antifungal activity of the NPs functionalized coatings was evaluated following ASTM 5590 standard.

The swabbing technique allowed characterization of the mycobiota present at the sampling sites. In the CP, *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. presented the highest FR, however, in CIDEPINT it was *Chrysonilia* sp. The biodeteriating attributes demonstrated that *Aspergillus niger* MN371276, *Lasiodiplodia theobromae* MN371283, *Cladosporium sphaerospermum* MN371394, *Penicillium commune* MN371392 and *Arthothelium spectabile* MT071822 were the strains with the highest deteriorating potential. Molecular analysis of these strains allowed reaffirming the taxonomic identification and establish evolutionary relationships. It was possible to obtain quasispherical silver nanoparticles (AgNPs) with antifungal activity against the strains studied with the proposed synthesis method. Bioactive coatings functionalized with AgNPs using sol-gel method were obtained. Two precursors AMEO and MTMO were assessed to the sol-gel synthesis. Coating with AMEO and AgNPs showed better antifungal performance in the protection of ceramic material and acrylic paint applied on masonry respect to that containing MTMO and AgNPs. Therefore, the sol-gel coatings functionalized with antifungal Nps verified their efficiency in the control of fungal deterioration applicable to the protection of building materials.

**Keywords:** biodeterioration, filamentous fungi, nanoparticles, coatings



# Capítulo 1

## Introducción y antecedentes



## Biodeterioro

El biodeterioro se puede definir como cualquier cambio indeseable en un material provocado por la actividad vital de los organismos (Hueck, 1965; Allsopp et al., 2004). Las bacterias, arqueas, algas, hongos, líquenes, cianolíquenes así como las plantas y animales, están constantemente poniendo en riesgo la conservación de los materiales debido a su potencial deteriorante (Morton and Surman, 1994; Pérez et al., 2014; Soto et al., 2020). En la Figura 1.1 se observa el deterioro de una fachada provocado por varios organismos. El biodeterioro de materiales ha sido descrito hace varios siglos, incluso en la Biblia se relatan casos de "lepras" rojas y verdes en las casas (por ejemplo, Levítico, capítulo 14, v. 36). Su importancia se descuidó durante mucho tiempo, en el que se creía que los procesos químicos y físicos eran los factores dominantes de la degradación del material (Sterflinger and Piñar, 2013). En las últimas décadas, este dogma ha cambiado y se admite que los organismos no sólo causan una grave destrucción estética, sino que habitan y penetran en los materiales, lo que provoca la pérdida de material, debido a la corrosión ácida, la degradación enzimática y la acción mecánica (Morton and Surman, 1994; Gilbert and Stephens, 2018).



**Figura 1.1.** Biodeterioro en la fachada de la Catedral de Reims, Francia. Tomado de Eyssautier-Chuine et al., 2021.

Por otra parte, el biodeterioro de materiales causa pérdidas económicas debido a los procesos de restauración. Por ejemplo, la descontaminación de salas y depósitos infectados supone un elevado gasto para los museos (Dias et al., 2021). Además, desde hace 10 años se afirmó que la pérdida mundial anual de materiales no alimentarios debido al ataque de hongos es de 40.000 millones de dólares (Allsopp, 2011), por solo mencionar un grupo de organismos. Sin embargo, el valor cultural e histórico de muchas pinturas, libros y manuscritos es inestimable y, por tanto, no puede expresarse simplemente en términos monetarios.

## **Biodeterioro de materiales estructurales**

El biodeterioro en materiales de construcción (piedra, cerámica, cemento, hormigón, etc.) es un problema global y costoso para las empresas constructoras (Romani et al., 2022). Los fenómenos de biodeterioro observados en los materiales estructurales están determinados por varios factores. Entre los que se destacan la composición química del propio material, el clima y la exposición, forma y la frecuencia de la limpieza de las superficies y el mantenimiento (Cwalina, 2014; Vidal et al., 2019). Los microorganismos contribuyen de forma significativa a los fenómenos de deterioro general observados en la piedra, el hormigón, el mortero, los revestimientos, el vidrio y los metales utilizados en las construcciones edilicias (Lors and Tribollet, 2018; Mitchell and Clifford, 2018).

Aunque las bacterias pueden crecer en entornos húmedos y formar biopelículas dentro del espacio poroso de materiales de construcción, su presencia puede ser limitada debido a los requerimientos vitales y a la actividad acuosa muy alta. Esta condición se da cuando ocurre la entrada de agua y no sólo la por la humedad alta o la condensación en las superficies (Saiz-Jimenez and Laiz, 2000; Eyssautier-Chuine et al., 2021). Las bacterias quimioheterótrofas pueden llegar a intervenir en el deterioro del material (Ragon et al., 2012). Su papel depende probablemente en gran medida de las condiciones ambientales. Se ha demostrado que este grupo de microorganismos tienen cierto impacto negativo en ciertos materiales, ya que potencian la precipitación de carbonato de calcio mediante procesos pasivos y activos (Wu et al., 2021). Por ejemplo en una investigación, se utilizaron cepas de *Bacillus cereus* y *Myxococcus xanthus* para

bioinducir activamente la precipitación de calcita y debilitar la piedra monumental (Ettenauer et al., 2011).

En edificios sin condiciones climáticas controladas, se observa la formación de eflorescencias salinas en la superficie de los muros. Este fenómeno imita las condiciones encontradas en hábitats extremos favoreciendo la proliferación de microorganismos halotolerantes /halófilos (Laiz et al., 2000; Catelli et al., 2016). En los edificios atacados por la sal se han detectado a menudo especies halófilas de las Gammaproteobacterias (como los géneros *Idiomarina*, *Salinisphaera* y *Halomonas*) y Firmicutes (*Halobacillus* y *Bacillus* spp.), pero también especies de los filos Bacteroidetes y Actinobacterias (Ettenauer et al., 2014).

Las bacterias no han sido las únicas reportadas bajo estas condiciones extremas, también algunas arqueas. Dentro de los géneros más importantes se encuentran *Halococcus* y *Halobacterium* (Romano et al., 2019). Muchos de estos microorganismos contienen pigmentos carotenoides como  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -bacterioruberina y derivados, y salinixantina en sus membranas celulares (Oren, 2009; Schröer et al., 2021). Su proliferación produce las típicas manchas rosadas en las superficies de las paredes, lo que influye significativamente en el aspecto estético visual (Figura 1.2). La sal puede estar disponible en el propio muro, por procesos biológicos (sales de amonio) o simplemente por co-migración con el agua infiltrada (Piñar et al., 2013b). Debido a cambios en los parámetros físicos, es decir, la temperatura o la humedad, las sales pueden precipitar en las superficies expuestas. La cristalización de las sales en las paredes tiene un efecto destructivo. Algunas sales pueden cristalizar en diferentes hidratos, ocupando un mayor espacio y produciendo una presión adicional que finalmente conduce a la pérdida y destrucción del material debido al agrietamiento y desprendimiento de los muros (Siedel, 2018).





**Figura 1.2.** Manchas rosadas características de las arqueas y bacterias halófilas. Tomado y modificado de Ettenauer et al., 2014.

Otros organismos que contribuyen al desgaste del material tanto en ambientes húmedos como secos son las cianobacterias, las algas y los líquenes (Pinheiro et al., 2019). Varios autores como Gaylarde et al., 2012 y Cutler et al., 2013 reportaron un fenómeno característico consistente en grandes manchas de color verde sobre el sustrato (Figura 1.3). La capacidad de las cianobacterias de adaptarse a diferentes calidades de luz por adaptación cromática, también les ha permitido desarrollarse sobre la piedra con bajas intensidades de luz, como es el caso de criptas y catacumbas (Crispim and Gaylarde, 2005; Gaylarde, 2020). En estos sitios, pueden ser uno de los agentes de deterioro más importantes para los materiales. En estos ambientes subsuperficiales *Eucapsis* sp., *Leptolyngbya* sp., *Scytonema* sp. y *Fischerella* sp. han sido los taxones de cianobacterias más frecuentemente encontrados (Bellezza et al., 2003).



**Figura 1.3.** Alteraciones en la coloración de la piedra con tonos verdes y blancos provocadas por algas. Tomado y modificado de Pinheiro et al., 2019.

## **Deterioro fúngico**

En comparación con otros microorganismos, los hongos desempeñan un importante papel en el deterioro de materiales estructurales. Los hongos son un grupo diverso y abundante de organismos pertenecientes al reino Fungi (Turland et al., 2018). Sobre la base de los conocimientos actuales en clasificación filogenética, se pueden definir nueve clados a nivel de Phylum: Opisthosporidia, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Zoopagomycota, Mucoromycota, Glomeromycota, Basidiomycota y Ascomycota (Naranjo-Ortiz and Gabaldón, 2019). Sin embargo, la clasificación de los hongos es muy dinámica y se estudia constantemente la taxonomía y filogenia. Tal es el caso, del phylum Sanchytriomycota recientemente propuesto por Galindo et al., 2021. Como aproximación práctica a la clasificación de los hongos, se ha realizado una división respecto a su organización celular. Van desde especies unicelulares microscópicas (levaduras) hasta especies con micelios masivos (Afonso et al., 2021). Este último gran grupo de organismos puede caracterizarse por un crecimiento hifal que soporta estructuras reproductivas sexuales macroscópicas (por ejemplo, trufas, setas) y estructuras reproductivas sexuales o asexuales microscópicas, conocidos como hongos filamentosos (Lima and Santos, 2017).



Se conoce como deterioro fúngico al conjunto de daños en la integridad de los materiales debido a la actividad vital de los organismos pertenecientes al reino Fungi. Hasta los objetos más antiguos y valiosos sufren graves invasiones fúngicas, como las cuevas de Lascaux en Francia (Bastian and Alabouvette, 2009). Este fenómeno provoca pérdidas económicas debido a los millones de dólares que se invierten en la restauración del material (Allsopp, 2011). Lamentablemente este no es el único perjuicio que genera este fenómeno, ya que materiales con signos de biodeterioro pueden ser una fuente potencial de hongos patógenos que afecten la salud humana (de Hoog et al., 2020). Se han descrito problemas relacionados como el asma, tos y las infecciones de las vías respiratorias superiores (He et al., 2018). Las pruebas epidemiológicas sugieren que los hongos filamentosos y sus metabolitos aumentan el riesgo de enfermedades respiratorias como la rinitis alérgica y el asma. Esta contaminación también puede aumentar la incidencia de enfermedades raras, como la alveolitis y la sinusitis crónica. Además, la proliferación de hongos en interiores puede causar efectos adversos y afectar a la eficiencia del trabajo (Hardin et al., 2003).

Los hongos filamentosos se describen frecuentemente como agentes de deterioro de los materiales de construcción tanto en ambientes interiores como exteriores (Gutarowska and Piotrowska, 2007; Johansson et al., 2013). Son microorganismos con mayor capacidad de supervivencia en superficies con bajo contenido de agua y pueden tolerar la radiación ultravioleta intensa (Verdier et al., 2014). Particularmente en las zonas urbanas e industrializadas, la contaminación atmosférica genera una capa de compuestos sobre construcciones edilicias denominada “capa negra” (Comite et al., 2021). Esta capa, rica en carbono, podría proporcionar nutrientes para el crecimiento de microorganismos heterótrofos como los hongos. Los ácidos producidos por estos agentes biológicos degradan la superficie que se encuentran debajo de la capa negra, causando graves daños a las fachadas de los edificios (Warscheid and Braams, 2000; Gutarowska et al., 2015).

Algunos autores han señalado diversos factores que pueden intervenir en el deterioro fúngico de los materiales de construcción. La temperatura, la humedad relativa, el contenido de agua, las rutinas de limpieza de la superficie,

la renovación del aire y la intensidad de la luz podrían conducir a la selección de ciertos microorganismos, interfiriendo en su supervivencia o resistencia. También es necesario tener en cuenta factores como el tipo y la composición química del material, el pH y la disponibilidad de nutrientes también son necesario tenerlos en cuenta (Adams et al., 2016).

La temperatura y la humedad relativa (HR) son parámetros clave que influyen en el desarrollo de los hongos (Trovão et al., 2020). La mayoría de ellos pueden agruparse en tres categorías en función de la temperatura. Los psicrófilos se desarrollan a temperaturas entre 0 °C y 5 °C, los mesófilos entre 20 °C y 45 °C, y los termófilos a 55 °C o más (Jain et al., 2009). Por ejemplo, miembros de Mucoromycetes y estados asexuales de Ascomycota crecen en sustratos con una humedad relativa del 90-100% y no por debajo, mientras *Aspergillus glaucus* crecen con una humedad relativa de hasta el 65%. La temperatura también puede afectar al contenido de agua. Se cree que la humedad influye en el crecimiento microbiano al aumentar tanto la concentración como la diversidad de los hongos en las superficies dañadas por el agua (Boutin-Forzano et al., 2004).

La disponibilidad de agua en los materiales puede expresarse en muchos parámetros diferentes, como la actividad acuosa ( $a_w$ ), la presión osmótica, la fugacidad, el potencial del agua y el contenido de agua. La  $a_w$  es una magnitud que se utiliza habitualmente en microbiología y ciencias de la alimentación, mientras que el contenido de agua se aplica en materiales estructurales (Adan and Samson, 2011). La  $a_w$  incluye información cualitativa sobre la disponibilidad de agua en un material, ya sea líquido o sólido. Por definición, la actividad acuosa oscila entre 0 y 1, de los cuales el último valor se refiere al agua pura. En el caso de una solución, la actividad del agua disminuye en función de los ingredientes disueltos. Sin embargo, la determinación de la actividad acuosa es complicada, ya que no puede medirse directamente. La actividad del agua real de una solución acuosa y sustratos sólidos (porosos o no) sólo puede medirse cuando la solución está en equilibrio con el aire que hay encima. El valor de la humedad relativa del aire, expresado como proporción, es igual a la actividad del agua, cuando se ha establecido el equilibrio entre la fase líquida y el aire y no se produce ninguna transferencia neta de agua entre el aire y la solución. La actividad del agua del material sólo puede medirse en caso de equilibrio entre el

sustrato y el aire, es decir, midiendo la humedad relativa (Adan and Samson, 2011).

En este sentido Grant et al., 1989 realizaron un estudio sobre los hongos que crecen en materiales estructurales y los dividieron en tres grupos en función de sus necesidades de agua en sustratos de laboratorio: colonizadores primarios, secundarios y terciarios. Los colonizadores primarios son aquellos capaces de crecer por debajo de  $a_w$  igual a 0,8 incluyendo especies de *Wallemia*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Eurotium*. Por su parte, los colonizadores secundarios son capaces de crecer con una  $a_w$  entre 0,8 y 0,9, incluyendo especies de *Cladosporium*, *Phoma*, *Ulocladium* y *Alternaria*. Por último, *Stachybotrys* sp., *Chaetomium* sp., *Trichoderma* sp. y *Auraeobasidium* sp. son considerados colonizadores terciarios ya que crecen con una  $a_w$  de 0,9.

El contenido de agua de un material sólido puede expresarse como una fracción volumétrica ( $m^3/m^3$ ), una fracción de masa (kg/kg) o una relación de masa por volumen ( $kg/m^3$ ). En general, el contenido de agua de un material es una función de la humedad relativa en condiciones de equilibrio. Esta relación puede expresarse gráficamente en las llamadas isotermas de sorción, que muestran el contenido de agua en equilibrio en función de la HR para una temperatura específica. Para los materiales porosos, la isoterma de sorción está estrechamente relacionada con las propiedades físicas y la geometría del sistema de poros. La retención del agua se debe a diferentes fenómenos, entre los que destacan la adsorción superficial y la condensación capilar. Esta última tiene lugar con una HR más alta, por encima del 35%. En los poros más pequeños, la condensación capilar se produce a una HR menor, mientras que para los poros más grandes se requieren HR mayores. Para la mayoría de los materiales, el contenido de agua aumenta con el aumento de la HR (Adan and Samson, 2011).

Además, Nielsen et al., 2004 estudiaron la influencia de la HR y la temperatura sobre el crecimiento y el metabolismo de *Aspergillus versicolor*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Ulocladium* sp., *Cladosporium sphaerospermum* y *Stachybotrys chartarum* en 21 tipos de materiales de construcción diferentes (concreto, yeso, madera, etc).

El crecimiento de estos hongos sobre los materiales ocurrió a una HR >90%, aunque fue necesario una HR del 95% para producir cantidades detectables de biomasa. En todos los materiales crecieron casi exclusivamente especies de *Penicillium* y *Aspergillus*.

Los materiales muy porosos son más susceptibles a la colonización fúngica por su capacidad de absorber más agua y retenerla durante más tiempo. La rugosidad de la superficie influye en la retención de agua y la concentra en microfisuras, donde el crecimiento suele ser más abundante (Gómez-Cornelio et al., 2012). También permite la acumulación de partículas: hollín, restos orgánicos e inorgánicos, pólenes y esporas. El microclima local, el macroclima, la lluvia impulsada por el viento, la contaminación, la ubicación geográfica y el diseño arquitectónico son elementos notables que influyen en la colonización (Traversetti et al., 2018). Por ejemplo, en los climas húmedos y en las latitudes septentrionales, las superficies expuestas al sur reciben menos luz solar directa. Por tanto, una vez humedecidas, permanecen húmedas durante mucho más tiempo. Esta condición de secado lento es mucho más favorable para la colonización fúngica (Gómez-Cornelio et al., 2012; Coutinho et al., 2019).

El pH del sustrato influye en la colonización biológica porque algunos organismos prefieren valores específicos o toleran un estrecho rango de pH. Los valores extremos de pH no son favorables debido al efecto perjudicial de los iones  $H^+$  u  $OH^-$  (Pinna, 2021). Aunque la mayoría de los microorganismos tienden a vivir en condiciones de pH neutro, algunos pueden colonizar el cemento en un amplio rango de pH (Allsopp et al., 2004; Miller et al., 2012). El hormigón fresco tiene un pH de 12 o 13, permite el crecimiento microbiano cuando el pH se reduce por reacción con el dióxido de carbono atmosférico (carbonatación) (Allsopp et al., 2004). La alcalinidad del hormigón es crucial para disminuir la tasa de biodeterioro al inhibir la actividad microbiana (Noeiaghahi et al., 2017). Muchos hongos prefieren sustratos ligeramente ácidos (por ejemplo piedra de granito o de arenisca), mientras que las condiciones alcalinas (por ejemplo, piedra caliza, mármol y morteros) pueden favorecer a las cianobacterias (Caneva and Ceschin, 2008).

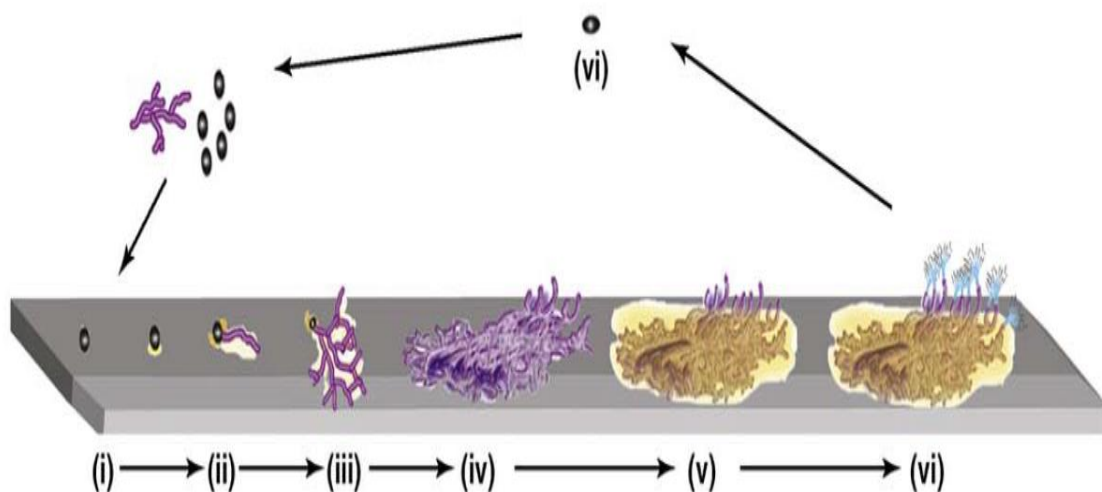
Los nutrientes contenidos en el material pueden proceder del crecimiento biológico existente en la superficie, de los excrementos de las aves, de los compuestos orgánicos utilizados en la práctica de la restauración y de los contaminantes. El aire y la lluvia transportan nutrientes en forma de polvo y partículas del suelo. La fertilización del suelo conduce a una acumulación de nitratos y fosfatos (eutrofización) que también están contenidos en los excrementos de las aves (Adams et al., 2016; Pinna, 2021).

Por otra parte, debido a su modo de nutrición heterótrofa por absorción, a la secreción de enzimas extracelulares que digieren moléculas complejas y al crecimiento hifal apical, los hongos filamentosos tienen una gran capacidad para crecer en superficies, formando así biopelículas (Jones, 1994; Priegnitz et al., 2012). Entonces posiblemente, la supervivencia y proliferación de los hongos sobre los materiales está relacionada con la capacidad de formar biopelículas. En este sentido, Harding et al., 2009 propusieron un mecanismo pionero de seis pasos para la formación de biopelículas de hongos filamentosos basado en modelos para bacterias y levaduras (Figura 1.4). Los pasos para el desarrollo del biofilm fúngico según plantearon estos autores son los siguientes: i) adsorción de propágulos, ii) adhesión activa a una superficie, iii) formación de microcolonias I, iv) formación de microcolonias II (o maduración inicial), v) maduración y, vi) dispersión (fase planctónica).

Sin embargo, Fernandes et al., 2019 actualizaron de este modelo añadiendo un paso inicial: el acondicionamiento de la superficie. En este, la hidrofobicidad tanto de la superficie como de las esporas además de la carga superficial de ambos desempeñan un papel importante en el proceso de adhesión. Cabe destacar que el estudio de Fernandes et al., 2019 fue realizado sobre sistemas sumergidos en medio acuoso. Por lo tanto, en sistemas no sumergidos como los estudiados en el presente trabajo de tesis debemos tener en cuenta otro factor fundamental al momento de considerar la etapa condicionante que es el de la actividad acuosa del sustrato. El contacto físico inicial entre las esporas y el sustrato puede dar lugar a una adhesión reversible, seguida de una adhesión irreversible con la secreción de sustancias adhesivas por parte de las esporas germinadas y las germinantes activas Harding et al., 2009. La germinación de las esporas se producirá si se dan las condiciones que

median la adhesión y la interacción hifa-sustrato (Zampieri et al., 2010). Las hidrofobinas son proteínas de pared, moderadamente hidrofóbicas producidas por especies de hongos ubicados en los filos Mucoromycota, Ascomycota y Basidiomycota que desempeñan diversas funciones en el crecimiento y desarrollo. La propiedad característica de las hidrofobinas es la formación de una membrana anfipática en contacto con una interfase hidrofílica-hidrofóbica lo cual permite cambiar la naturaleza de la superficie. Por otro lado, se ha reportado una eficiente adhesión a superficies hidrofóbicas por parte de algunas especies de hongos filamentosos por la presencia de hidrofobinas en la superficie de sus esporas (Fernandes et al., 2019).

Posteriormente, la diferenciación de las hifas produce una compleja red de hifas (micelio) que crece en todas las direcciones encerrada en una matriz extracelular polimérica, en la que están presentes las moléculas de quorum-sensing, de forma similar a las biopelículas bacterianas (Blankenship and Mitchell, 2006). La etapa de maduración de las biopelículas debería ocurrir principalmente en la superficie o en los poros del material debido al crecimiento aéreo, la posterior formación de esporas y dispersión aérea. Por último, la etapa de dispersión se produce a través de la liberación de esporas o de diferentes propágulos en respuesta al estrés ambiental o a estímulos biológicos.



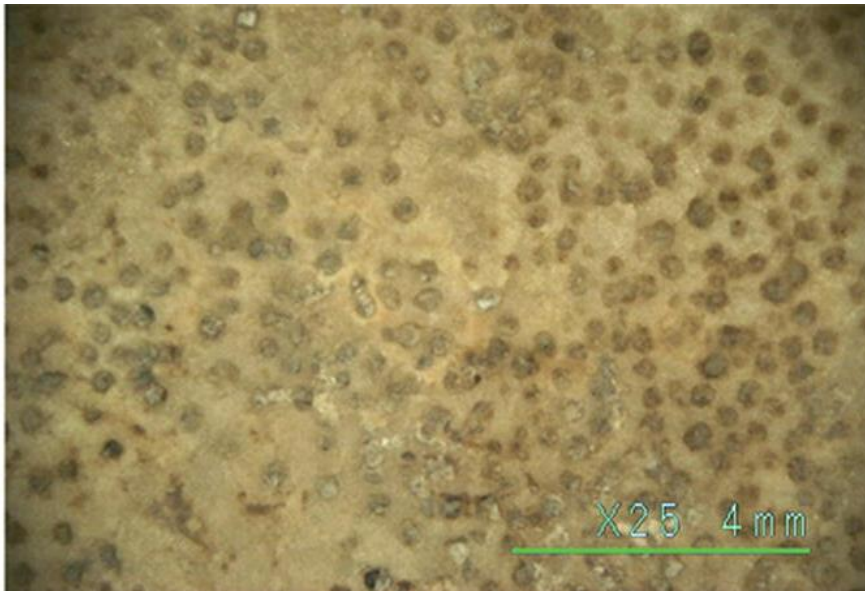
**Figura 1.4.** Formación del *biofilm* fúngico. Tomado y modificado de Harding et al., 2009.



Durante y luego de la implantación del *biofilm* fúngico en el material este puede deteriorarse producto a la biología de estos organismos (Figura 1.5). El deterioro fúngico puede ser de tipo físico, químico y estético, aunque no debe analizarse el fenómeno por separado, sino como una combinación de tipos. El deterioro fúngico físico puede producirse por expansión de las hifas en todo el material estructural dando lugar a las alteraciones mecánicas (Berdahl et al., 2008). Esto es, a medida que el *biofilm* fúngico crece, se observan grietas superficiales y profundas que aumentan la porosidad de los materiales (Coutinho et al., 2015). Además, este aumento de la porosidad facilita la colonización de los materiales por otros microorganismos y promueve su crecimiento. Por ejemplo, en materiales estructurales expuestos a la intemperie, los hongos pueden penetrar en el interior de la piedra y causar *bio-pitting* (Figura 1.6). Este fenómeno se define como la formación de picaduras de hasta 2 cm de diámetro y profundidad causado principalmente por "hongos negros" (Scheerer et al., 2009; Lombardozzi et al., 2012). Los hongos negros son un grupo polifilético del subreino Dikarya que comparten una plasticidad morfológica y rasgos adaptativos funcionales que aseguran su supervivencia en ambientes extremos por portar pigmentos oscuros. Forman colonias negras compactas que soportan desafíos ambientales extremos como la desecación, la radiación UV, la temperatura, el estrés oxidativo y los tratamientos con biocidas. El *bio-pitting* ocurre predominantemente en el mármol y la piedra caliza, pero también se ha observado en el vidrio de la época medieval (Piñar et al., 2013a).



**Figura 1.5.** Deterioro de materiales estructurales debido a la actividad del *biofilm* fúngico. A y C: Paredes de interiores en construcciones edilicias. B: Fachada de la Catedral de La Plata



**Figura 1.6.** Estereofotografías de micro agujeros circulares provocado por *bio-pitting* sobre la superficie de piedra. Galería Uffizi Florencia, Italia. Adaptado de Pinna et al., 2012.

Por otro lado, el deterioro fúngico químico se produce como resultado de la acción de metabolitos extracelulares, ácidos orgánicos y compuestos quelantes de metales. Esto conduce a la alteración de los minerales, la disolución y la posible sustitución de los minerales originales por la biomineralización secundaria (Warscheid and Braams, 2000; Trovão et al., 2021). Los hongos son conocidos por secretar gran variedad de ácidos orgánicos (oxálico, oxalacético, cítrico, glucónico, oxoacético y fumárico) lo cual, los constituyen en agentes

altamente deteriorantes para minerales y rocas (Warscheid and Braams, 2000). Los ácidos orgánicos logran formar complejos con iones de calcio, aluminio, hierro, manganeso, silicio y magnesio contribuyendo aún más con la degradación del material (Cwalina, 2014). Esto fue evidenciado en el trabajo de Chaudhuri et al., 2020 que determinaron la pérdida de peso, resistencia a la compactación y la liberación de oxalato de calcio a partir de muestras de hormigón y mármol expuestas al crecimiento de *Aspergillus tamaritii*.

Sin embargo, Coutinho et al., 2015 y Martino, 2016 plantean que el primer problema de la colonización microbiana es aspecto antiestético del material. De hecho, la biopelícula que se desarrolla en los materiales suele estar pigmentada, lo que forma manchas oscuras o verdes. Los hongos producen varios pigmentos, como carotenoides, micosporinas y melaninas, que los protegen de la irradiación UV (Cordero and Casadevall, 2017). Fundamentalmente la melanina les proporciona una fuerza extramecánica y las hifas puedan crecer mejor en las fisuras. Esto no es deseable, porque el material debe mantenerse intacto a lo largo del tiempo. El aspecto antiestético del oscurecimiento de los edificios y otros materiales es también un aspecto esencial de la conservación de las construcciones edilicias con carácter patrimonial (Grabek-Lejko et al., 2017). Por ello, los fabricantes de materiales estructurales invierten masivamente en estrategias para evitar que sus productos cambien de color rápidamente, y los propietarios de los edificios se enfrentan a importantes gastos para limpiar y restaurar los materiales que se han deteriorado con el tiempo (Romani et al., 2022).

En general, el debilitamiento de los materiales causado por el desarrollo de biopelículas conduce a un deterioro más rápido al acelerar los efectos del clima (Berdahl et al., 2008; Joseph, 2021). Por último, el biodeterioro avanzado provoca en los materiales la pérdida del aislamiento estructural o térmico, el drenaje y de la reflectancia solar (proporción de luz reflejada por la superficie de un material) (Pena-Poza et al., 2018).

En algunos estudios se han investigado las correlaciones entre los tipos de materiales de construcción y los hongos presentes. Las especies pertenecientes al género *Penicillium* son los microorganismos más frecuentemente aislados en

todo tipo de materiales de construcción. Las especies de *Aspergillus* se encuentran habitualmente en materiales de tipo cerámico (hormigón, mortero) y en pinturas (Tuomi et al., 2000; Andersen et al., 2011). También se ha mencionado la inesperada presencia de *Stachybotrys* en materiales de tipo yeso (Andersson et al., 1997). Estudios enfocados en la microbiota deteriorante de los materiales de construcción afirman que *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Stachybotrys* sp. son los aislados con mayor frecuencia, independientemente de la técnica de muestreo, la condición ambiental o el tipo de material (Lappalainen et al., 2001; Gutarowska and Czyżowska, 2009; Andersen et al., 2011). También se detectaron similitudes con los resultados de las muestras de aire. Siendo las especies asociadas más comunes *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* y *Stachybotrys* sp. (Reboux et al., 2009; Romero et al., 2021).

Las biopelículas que colonizan los materiales de construcción deben ser eliminadas regularmente debido a los problemas que causan en la durabilidad de los materiales (Sanmartín et al., 2018; Cappitelli et al., 2020). En este sentido, estrategias de limpieza mecánica siguen siendo utilizadas aunque hoy en día van desapareciendo poco a poco con el empleo de compuestos químicos de bajo costo y mayor eficacia. Sin embargo, estos tratamientos químicos tienen un elevado coste medioambiental y económico debido a su aplicación intensiva (Scheerer et al., 2009). Por ejemplo, algunos biocidas aplicados en fachadas y tejados caen en los suelos y suelen permanecer por mucho tiempo. Muchos de ellos (como el terbutrina o el isoproturon) son poco biodegradables y provocan la contaminación de suelo y agua a largo plazo (Bollmann et al., 2017; Chand et al., 2017). Además, los productos de degradación emitidos por estos biocidas siguen siendo poco conocidos y se sospecha que son extremadamente ecotóxicos (Paijens et al., 2020). Por último, estos biocidas de amplio espectro causan problemas de salud humana, especialmente cuando se utilizan sin protecciones personales básicas (Wieck et al., 2018).

La ecotoxicidad de los biocidas comerciales de amplio espectro es un factor importante para el uso en la limpieza de materiales de construcción, por lo tanto, la normativa relativa a estos compuestos es cada vez más restrictiva (Warscheid

and Braams, 2000; Scheerer et al., 2009). Los biocidas que pueden utilizarse para tratamientos preventivos o curativos de los materiales de construcción de exterior se clasifican según el tipo de producto. El grupo 1 correspondiente a desinfectantes y el grupo 2 correspondiente a conservantes, según el anexo V del Reglamento de Biocidas (BPR) de la Unión Europea (Comisión Europea, 2012). Aunque los costos en el control del biodeterioro son difíciles de calcular, estos aumentarán en el futuro, ya que incluirán no solo el gasto en restauración e impacto ambiental, sino también los asociados a su aplicación en condiciones seguras para las personas (Gaylarde et al., 2003).

Otro tema importante, son las metodologías de caracterización del biodeterioro en materiales estructurales. De manera que, los métodos de muestreo, los ensayos analíticos y los protocolos de pruebas en laboratorio son importantes para el estudio de las cepas cultivables. Desde el año 2006 están recomendados los métodos de muestreos en materiales de construcción debido a su porosidad y rugosidad (Caillaud et al., 2006). Dentro de estos se destacan, el hisopado, muestreo masivo, con cinta adhesiva y por conteo en placa.

El hisopado consiste en frotar una superficie deteriorada con una torunda de gasa generalmente sumergida en solución fisiológica estéril. Es relativamente barato y permite tomar muestras en cualquier circunstancia (Tseng et al., 2021). Se suele utilizar cuando la recolección de la muestra por cinta adhesiva es imposible debido a las dificultades de acceso a la superficie. Por ejemplo, cuando las muestras se recogen en las esquinas de las paredes (Marcin et al., 2020). La manipulación por parte del operador, el tipo de la torunda (algodón, poliéster, nailon), la humedad del hisopo y el tipo de material estructural son varios parámetros que influyen en la eficiencia de este método (Edmonds, 2009; Jansson et al., 2020).

El muestreo masivo es un método destructivo donde las muestras se extraen directamente de la superficie a analizar, mediante el raspado o la extracción de pequeños trozos de material (0,3-5 gramos). Es la técnica de muestreo más utilizada en la evaluación microbiana de los materiales de construcción (Trovão et al., 2019; Campana et al., 2020). Con esta técnica los microorganismos pueden aislarse al colocar la muestra directamente en un medio de cultivo o una



solución microbiana de la muestra en un medio de cultivo. En este último caso, las muestras se sumergen primero en una solución fisiológica y se realizan disoluciones seriadas (Flannigan et al., 2016).

En el caso de toma de muestra con cinta adhesiva, esta se aplica en la superficie del material estructural. A continuación, es posible inocular los microorganismos en placas de Petri colocando directamente la cinta a un medio de cultivo sólido u observarlos con un microscopio para identificarlos. Dentro de las desventajas de este método se encuentran que la superficie debe ser preferiblemente plana y estar seca antes del muestreo (Andersen et al., 2011; Gilbert and Stephens, 2018). Por último, con el conteo en placa, el medio de cultivo se presiona directamente contra la superficie durante el tiempo suficiente para permitir la adhesión de los microorganismos. A continuación, las placas se protegen de la contaminación del aire mediante una tapa y se incuban. Dos parámetros a tener en cuenta para el aislamiento de microorganismo mediante esta técnica son el tiempo y la presión de la placa colocada sobre el material (Andersen et al., 2011; Brambilla and Sangiorgio, 2020).

## **Recubrimientos funcionalizados con aditivos antifúngicos para el control del biodeterioro**

Para inhibir o prevenir el crecimiento de microorganismos, incluidos hongos, en los materiales de construcción, se requiere la interrupción de sus procesos vitales. Varios compuestos antimicrobianos como desinfectantes y biocidas se aplican comúnmente para controlar el crecimiento de hongos y bacterias. Los compuestos bioactivos más utilizados se pueden clasificar según sus mecanismos de acción en dos grupos principales: electrófilos y activos de membrana (Chapman, 2003).

Los electrófilos reaccionan con grupos nucleofílicos de biomoléculas como enzimas y ácidos nucleicos presentes en las células microbianas. Algunos de los biocidas (electrófilos) más utilizados comercialmente en recubrimientos antimicrobianos son: formaldehídos, liberadores de formaldehído, isotiazolinonas, carbamatos y sales metálicas de plata y cobre (Falkiewicz-Dulik et al., 2015a). Entre los electrófilos, los oxidantes como el hipoclorito de sodio (lejía) se han utilizado durante mucho tiempo debido a su bajo costo y alta

eficiencia (Pereira et al., 2015). Este tipo de compuestos oxidan la materia orgánica en general, pero su uso está siendo cuestionado y limitado debido a su toxicidad.

Sin embargo, los activos de membrana reaccionan con la membrana celular provocando su ruptura o tienen la capacidad de cambiar las condiciones del citoplasma. Este grupo incluye generalmente compuestos como los alcoholes, los derivados fenólicos, las sales de amonio cuaternario y los activadores de pH (ácidos orgánicos, parabenos, piritonas, etc.). Además, el control de los hongos en materiales estructurales puede lograrse mediante la limpieza periódica con desinfectantes sobre superficies y regulando las condiciones interiores (temperatura, humedad, ventilación y fugas de agua) (Adan and Samson, 2011; Weber and Rutala, 2013).

En las últimas décadas, se ha prestado cada vez más atención al efecto ambiental de los biocidas utilizados, lo que ha llevado a la aparición de una nueva legislación que busca restringir su uso, especialmente en América del Norte y Europa (Ribeiro et al., 2018). Ya no se permite el uso de algunos aditivos, como los fenilmercuriales, sin embargo, algunos otros han sido restringidos con relación a su concentración en formulaciones (Paulus, 2004; Falkiewicz-Dulik et al., 2015a). Algunos ejemplos de estos son derivados aromáticos y halogenados. Los biocidas convencionales que se agregan en formulaciones comerciales incluyen 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol (Triclosan), 2-octil-4-isotiazolin-3-ona (OIT), diclorooctilisotiazolona (DCOIT), metil-2-bencimidazolcarbamato (Carbendazim) y 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (Diuron) (Allsopp et al., 2004).

Por lo general, se utilizan combinaciones de biocidas para mejorar el espectro de actividad antifúngica. Sin embargo, la eficacia de tales combinaciones, que se determinan comúnmente en términos de concentración mínima de inhibición (MIC), varía según el tipo y la concentración de combinación utilizada. Por lo tanto, se han investigado composiciones de biocidas más efectivas ("reforzadoras") para reducir la concentración de los ingredientes activos que se usarían por separado (Bellotti et al., 2012c; Falkiewicz-Dulik et al., 2015a). Por ejemplo, 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (MIT) tiene una actividad

antimicrobiana relativamente baja, pero ha mostrado una actividad sinérgica significativa cuando se combina con 1,2-benzisotiazolin-3-ona (BIT) (Karsa and Ashworth, 2002).

Los recubrimientos antimicrobianos o higiénicos que contienen en sus formulación aditivos antifúngicos se pueden usar para controlar el crecimiento de hongos y, por lo tanto, el desarrollo de biopelículas (Johns, 2003; Stobie et al., 2010). Por ejemplo, las pinturas higiénicas son importantes para evitar la colonización biológica en materiales estructurales y prevenir el biodeterioro (Stobie et al., 2010; Falkiewicz-Dulik et al., 2015b). Estas pinturas funcionales se pueden utilizar para pintar en construcciones edilicias. También se pueden utilizar en la industria alimentaria y farmacéutica porque en este sector deben lidiar con el crecimiento microbiano como uno de los problemas más críticos que afectan la producción, el procesamiento, el transporte y el almacenamiento (Souza and Fernando, 2016).

La adición de biocidas en pinturas durante el proceso de dispersión a menudo no es satisfactoria, debido al hecho de que su actividad puede perderse antes del final de la vida útil del recubrimiento (Sørensen et al., 2010; Mardones et al., 2019). En el caso de las pinturas en edificios, que deberían mantener su funcionalidad biocida durante más de 10 años, en realidad lo hacen durante menos de dos años en condiciones extremas (Eversdijk et al., 2012). Las razones que limitan la eficiencia de las pinturas y recubrimientos antimicrobianos son: pérdida del biocida de la película en la superficie debido a la lixiviación o por participar en reacciones con resina, pigmento y aditivos; degradación del componente bioactivo por factores ambientales; incompatibilidad entre biocidas dentro de la pintura y, además, los biocidas orgánicos comerciales podrían ser utilizados como fuente de nutrientes por algunos microorganismos (Falkiewicz-Dulik et al., 2015a; Kakakhel et al., 2019). Para comprender mejor esta cuestión hay que tener en cuenta las capas de la pintura. Por ejemplo, las pinturas acrílicas al agua (más utilizadas en los edificios) están constituidas por una dispersión acuosa de entramados poliméricos. Tras el secado esto da lugar a la aparición de poros macroscópicos. Por tanto, esta porosidad favorece la liberación de los biocidas que residen en los poros o se adsorben en las partículas (Andersson Trojer et al., 2015).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, en la actualidad los esfuerzos están orientados en mejorar los ingredientes bioactivos utilizados en la formulación, prolongar su vida útil, reemplazar los tóxicos convencionales, disminuir las concentraciones utilizadas y evitar su pérdida del recubrimiento. En este contexto, la aparición de la nanotecnología presenta un amplio campo de estudio para nuevos materiales funcionales con propiedades dependientes del tamaño. Algunas estrategias se basan en encontrar nanopartículas libres con actividad antimicrobiana, mientras que otras se basan en asociar compuestos antimicrobianos a nanomateriales para protegerlos y controlar su liberación (Dileep et al., 2020; Ganguli and Chaudhuri, 2021).

Se calcula que el mercado mundial de la nanotecnología alcanzará unos 131.000 millones de dólares en 2026, con respecto a los 58.000 millones de dólares en 2020 (Al-Sakkaf and Onaizi, 2022). La nanotecnología se ha desarrollado como uno de los campos científicos más innovadores de las últimas décadas, ya que aprovecha la mayor reactividad de los materiales a escala nanométrica. En la actualidad, la mayoría de los científicos creen que los nanomateriales son uno de los pilares del desarrollo de la ciencia y la tecnología en el siglo XXI.

La nanotecnología aplicada en el diseño de superficies antimicrobianas busca eliminar patógenos en las proximidades de la superficie, evitando la formación de biopelículas (Ganguli and Chaudhuri, 2021). El mecanismo biocida de estos materiales es complejo y depende tanto del microorganismo como del nanomaterial utilizado (Bapat et al., 2018). Para el control del biodeterioro de materiales se han estudiado pinturas y recubrimientos aditivados con NPs antimicrobianas (Kumar et al., 2008; Zielecka et al., 2011; Holtz et al., 2012; Dominguez-Wong et al., 2014; Barberia-Roque et al., 2019b; Gámez-Espinosa et al., 2020). Estos autores plantean que hay dos formas posibles de incorporar las NPs en una formulación de pintura: libres o asociadas a otro material. El uso directo de NPs metálicas como Ag, Cu y ZnO en pinturas en base acuosa (tipo látex) puede resultar en la disminución de su actividad antimicrobiana debido a su reactividad con otros componentes presentes en la formulación o su aglomeración (Zielecka et al., 2011; Bellotti et al., 2015; Arreche et al., 2017). Teniendo en cuenta esto, hay varios trabajos realizados que mostraron la

incorporación eficiente de nanoaditivos bioactivos (asociados o inmovilizados) en otros materiales para ser aplicados en pinturas (Arreche et al., 2019).

Frecuentemente, la actividad biocida de los compuestos orgánicos decrece mucho antes de la vida útil del recubrimiento debido a su baja retención o degradación (Edge et al., 2001; Mardones et al., 2019). Por tanto, habitualmente se asocian en NPs naturales o sintéticas que actúan como portadores (Hendessi et al., 2016; Kamtsikakis et al., 2017; Nguyen-Tri et al., 2018). Sin embargo, se han desarrollado algunas nanoestructuras que pueden utilizarse como portadores en una matriz orgánica o inorgánica asociada al compuesto bioactivo por interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o enlaces covalentes (Hendessi et al., 2016; Kamtsikakis et al., 2017). Por ejemplo, el carvacrol es el principio activo del aceite esencial de tomillo y se ha incorporado en nanotubos de halloysita como portador natural para ser aplicado en pinturas y recubrimientos (Alkan Tas et al., 2019).

En el caso específico de las pinturas, se han reportado componentes nanofuncionalizados comúnmente utilizados, como resinas, pigmentos y aditivos (Fernández and Bellotti, 2017; Machado et al., 2019). En este sentido, los pigmentos convencionales como  $\text{TiO}_2$  y  $\text{CaCO}_3$  se han modificado a nivel de nanoescala para ganar funcionalidad antimicrobiana (Ferreira et al., 2013; Dominguez-Wong et al., 2014). Otro ejemplo de un componente nanofuncionalizado en pintura es la resina acrílica asociada a ZnONPs que tienen funcionalidades tanto antielectrostáticas como antimicrobiana en una concentración  $\sim 5\%$  (wt) (Xu and Xie, 2003).

La matriz silícea se ha utilizado en la tecnología de recubrimientos mediante la aplicación de arcillas naturales como los nanotubos de halloysita. Otros aluminosilicatos estudiados son las zeolitas, que se asociaron con Ag y Zn para incorporar en formulaciones acrílicas a base de agua y se probó que son eficientes en el control del crecimiento de hongos (Pereyra et al., 2014; Machado et al., 2019).

## Recubrimientos Sol-gel

El proceso sol-gel ha sido aplicado en tecnología de pinturas. Por ejemplo, (Arreche et al., 2017, 2019) han estudiado la incorporación en pinturas arquitectónicas de matrices sintéticas basadas en la química sol-gel. Además, las nanoesferas sintetizadas por el método sol-gel con NPs de Ag y Cu se evaluaron en condiciones controladas, mostrando un espectro más amplio de actividad antimicrobiana (Zielecka et al., 2011). Sin embargo, en algunos materiales estructurales no se puede aplicar pinturas para controlar el biodeterioro ya que por cuestiones estéticas debe mantenerse su color original, por ejemplo, piedras y material cerámico. Entonces, una de las estrategias para obtener recubrimientos antimicrobianos es la química relacionada con el óxido de silicio y la aplicación del proceso sol-gel directamente sobre el sustrato.

El proceso sol-gel consta de dos etapas con características fisicoquímicas muy diferentes. La etapa inicial consiste en la obtención de una suspensión coloidal estable (sol) a partir de un precursor. La etapa posterior deviene de la desestabilización del sol provocando la condensación de los monómeros/oligómeros en suspensión, para dar lugar a la formación de un polímero inorgánico. Dadas las propiedades físicas y químicas de los compuestos usados este polímero tiene las características de un gel con resistencia mecánica (Hench and West, 1990; Sakka, 2021).

Los precursores de la etapa inicial son típicamente óxidos y alcóxidos de metales o de silicio. Los precursores derivados del silicio pueden ser varios. El silicato de sodio sólido, es un vidrio amorfo obtenido mediante un proceso de fusión directa a partir de arena de sílice y carbonato de sodio, aunque también es posible obtenerlo a partir de arena de sílice, carbón y sulfato de sodio (Kros et al., 2001). Los alcoxi silanos pueden tener distintos restos alquilo, como metilo, butilo, etc. Dentro de este grupo de precursores se encuentran los silicatos orgánicamente modificados (Gupta and Kumar, 2008). Estos son alcóxidos de silicio en los que hasta tres de los restos alcoxi son remplazados por un resto alquilo con un grupo funcional. Por ejemplo, aminopropil trietoxi silano, mercaptopropil trimetoxi silano, fenil trietoxi silano y octadecil tricloro silano (Wen and Wilkes, 1996; Ohtsuki et al., 2002). De esta manera es posible introducir una gran variedad de grupos funcionales dentro de las estructuras de los entramados

poliméricos y brindarles las características químicas específicas del resto introducido.

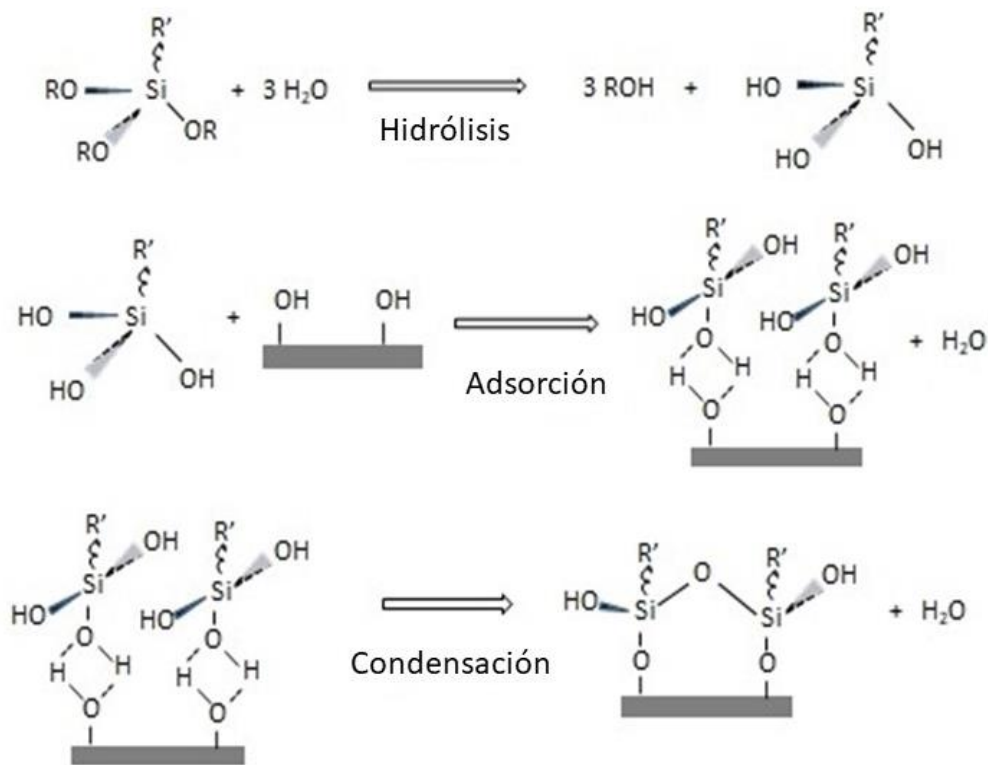
Las características particulares de un recubrimiento obtenido por el proceso sol-gel están relacionadas con los factores que regulan la hidrólisis, condensación y polimerización (Chong et al., 1997; Halliwell and Cass, 2001). Dentro de estos factores se encuentran el pH, la temperatura, naturaleza de los catalizadores y concentración de reactivos. No obstante, posterior a la síntesis, la humedad y el tiempo de envejecimiento a los que se expone al material, también influyen en la fijación de la estructura y reactividad final (Sakka, 2021).

Un sol es una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido. Los soles de dióxido pueden estar constituidos por un monómero estabilizado en solución o partículas de 1 a 1000 nm. En este rango están incluidos los oligómeros, ya que en condiciones de estabilidad y de mínima condensación, las partículas de SiO<sub>2</sub> se encuentran en constante crecimiento hasta que sea interrumpido (Hench and West, 1990). Para obtener un sol proveniente de cualquier especie silíceo el primer paso sería solubilizar el precursor, en caso de que fuera sólido y llevarlo a las condiciones desfavorables para la condensación de los monómeros. Aunque, existen casos en los que la obtención del sol estable se obtiene por hidrólisis del precursor monomérico. En cualquiera de los casos los parámetros principales de la estabilidad del sol son el pH y la concentración de sales. La forma más utilizada para la obtención de un sol a partir de un alcóxido es la hidrólisis seguida de la estabilización de los monómeros en medio ácido o alcalino (Díaz-García and Laínño, 2005).

La reacción de hidrólisis ocurre en la interfase alcóxido-agua, por lo que se necesita emplear algún método que facilite la interacción de las fases, de lo contrario, la obtención del sol sería un proceso muy lento. Por esto, técnicas como agitación o sonicado se utilizan con el fin de generar una emulsión que logre aumentar la interacción de las fases. En la mayoría de las aplicaciones de estos precursores se prefiere la hidrólisis controlada previa a gelificación. Entonces, termina así la primera etapa del proceso sol-gel (sol) e inicia la segunda etapa, la gelificación (Brinker and Scherer, 1990a; Sakka, 2021).

La gelificación consta de dos pasos: la condensación y la polimerización (Hench and West, 1990; Tiringier et al., 2019). El mecanismo propuesto para la formación del recubrimiento se ilustra en la figura 1.7. En el proceso de

condensación se necesita la desestabilización del sol. Esto se puede conseguir reduciendo el grado de hidratación o variando el pH. El sol es estable en el intervalo de pH 3 a 8, por lo tanto, llevando el pH de la suspensión a un rango entre 4 y 7 las posibilidades de condensación son factibles. La manipulación de la condensación del sol permite obtener geles de SiO<sub>2</sub> sobre una superficie para formar un recubrimiento si se tiene en cuenta la evaporación del solvente de la suspensión. Sobre una superficie el proceso de evaporación del solvente juega un rol fundamental en la mayoría de los casos. Pero los geles generados dentro de concavidades no sufren apreciablemente la influencia de la evaporación, salvo cuando en el medio existe un importante porcentaje de solvente volátil. Durante la condensación la evaporación de solvente induce la proximidad de las partículas y estimula su interacción (Tiringer et al., 2019).



**Figura 1.7.** Mecanismo de formación de recubrimiento sol-gel.

Después de la condensación puede ocurrir la polimerización. La condensación de dos monómeros libera una pequeña molécula, como agua o etanol. Si esto continúa sobre el oligómero condensado, se forma una partícula o molécula de dimensiones exponencialmente mayores al monómero (polimerización). Los polímeros de óxido de Silicio pueden obtenerse en un



rango muy amplio de pH. En el caso de SiO<sub>2</sub> el proceso de crecimiento de partícula es inevitable por lo que la condensación y polimerización son dos procesos que ocurren paralelamente (Brinker and Scherer, 1990a; Capeletti et al., 2018). Por esto, la inducción de la polimerización en un rango de pH entre 2 y 7 es una interesante estrategia para obtener un polímero lo más ramificado posible. Esto es importante para que en la solución no existan heterogeneidades en las concentraciones de silicio y lograr el comportamiento homogéneo del material. Por lo tanto, en la gelificación todo el medio se vuelve viscoso y luego se solidifica en una red polimérica (Hench and West, 1990; Sakka, 2021).

La gelificación permite determinar de manera visual el final de la polimerización. El aumento de la viscosidad y posterior solidificación determinan la obtención de un material final de estructura estática. Luego de la gelificación, se evidencia la contracción del gel controlada por la sinéresis (Wang et al., 2013). La sinéresis es la contracción del entramado polimérico producto de la expulsión de líquido contenido en los poros. Esto produce la condensación de dos grupos silanoles, de dos partículas que se encuentran a una distancia mayor que la distancia de unión Si-O-Si. Solo el acercamiento mediante la expulsión de solvente desde el interior de los poros puede permitir esta unión. Lo que trae como consecuencia el aumento de la evaporación y el favorecimiento de la contracción. La sinéresis es un proceso muy importante cuando se obtiene un gel en forma de recubrimiento (Brinker and Scherer, 1990a) (Wang et al., 2013).

Por otra parte, el envejecimiento del material ocurre debido al secado por la evaporación del solvente, junto con el proceso de sinéresis que libera agua para su posterior evaporación (Brinker and Scherer, 1990b). Los aditivos que pueda agregarse en la mezcla de polimerización pueden interferir con el envejecimiento. En los recubrimientos la superficie expuesta es mayor dando lugar a una profusa evaporación de solvente, lo que lleva a la compactación del gel (xerogel) (Shang et al., 2018; Surendren and Deb, 2021). Cuando se deposita un volumen importante de un sol sobre una superficie este gelifica y se observa un recubrimiento sólido continuo. Luego de la contracción pueden verse fácilmente desprendimientos de fragmentos del xerogel. Si la superficie sobre la que se deposita el sol es hidrofílica, está activada químicamente y, el

gel generado es suficientemente delgado (alrededor de  $1\mu\text{m}$ ), el secado luego de la gelificación es tan rápido que puede evitar la contracción y la fractura del recubrimiento. Por lo tanto, este es un recubrimiento compacto, homogéneo y adherente (Zanurin et al., 2021).

Una de las ventajas más importantes de la química sol-gel, radica en la baja viscosidad del sol previo a la gelificación. Motivo por el cual se pueden preparar recubrimientos por una gran variedad de métodos. Un aspecto informado en la literatura científica con respecto a la tecnología sol-gel lo constituyen las metodologías empleadas para el recubrimiento de superficies (Copello et al., 2008; Presentato et al., 2020). Dentro de las cuales se destacan la inmersión vertical, recubrimiento por giro sobre el eje (spin-coating), electroforesis, termoforesis y las inmovilizaciones en superficies (por impregnación, por inclusión, química y por copolimerización).

La inmersión vertical consiste en la inmersión de un soporte a recubrir de manera perpendicular a la superficie de un líquido. Posteriormente se procede a la ascensión (se comienza a retirar el soporte del sol de recubrimiento). Luego viene la etapa de deposición y drenado, donde el líquido por las paredes deja una fina película del sol dejando la superficie con una capa de líquido casi homogénea. Por último, el proceso de evaporación desencadena la condensación y lleva al secado del polímero para dar lugar al xerogel (Pan et al., 2021).

En el método de recubrimiento por spin-coating, un volumen del sol depositado sobre el centro de la superficie se esparce hacia los extremos de esta mediante un giro a gran velocidad realizado sobre el eje del soporte. Primero un exceso de líquido se aplica en la superficie a recubrir (deposición) y luego el líquido fluye radialmente fuera del centro del soporte hacia los extremos gracias a la fuerza centrífuga (giro). Finalmente, mediante escurrido, el exceso de líquido que llega al extremo de la superficie se desprende en forma de gotas, luego el afinamiento de la película y las fuerzas de resistencia al flujo terminan con el escurrido. La volatilización del solvente junto a la contracción del material producen la reducción del espesor del recubrimiento (Wang and Bierwagen, 2009).

La electroforesis consiste en el movimiento de las partículas cargadas en

el líquido bajo la influencia de un campo eléctrico externo aplicado a través de la solución. Las partículas o polímeros se mueven en la misma dirección o en dirección opuesta a la corriente externa, dependiendo de su carga y se depositan en el cátodo o en el ánodo. Las superficies para recubrir deben ser conductoras y de geometrías relativamente planas (desventajas de la técnica). También puede aplicarse la termoforesis, donde las partículas se mueven en un gradiente térmico; y por aplicación mecánica donde se esparce el sol sobre el soporte y con ayuda mecánica se obtiene el recubrimiento. También existen desarrollos con técnicas mixtas, aplicando varias capas con estas técnicas (Brinker and Scherer, 1990a; Liao et al., 2017).

La inmovilización en superficies se puede llevar a cabo por 4 formas principales: impregnación, inclusión, química y por copolimerización. La elección de la inmovilización en un recubrimiento o en un gel húmedo está relacionada con las propiedades del inmovilizando y su función. Las variaciones radican en las propiedades del material. Los principios químicos de la inmovilización se basan en uniones de tipo no covalente y covalente (Böttcher et al., 1999; Copello et al., 2008).

La impregnación se logra por la adsorción del inmovilizado expuesto a la matriz polimérica. Este tipo de encapsulamiento se utiliza para partículas que son capaces de difundir por los poros del material. Las interacciones predominantes son puente de hidrógeno, electrostáticas y de Van der Waals. Las cuales pueden aparecer en otros métodos de inmovilización. Estos tipos de interacciones son débiles y solo se mantienen en un medio químico característico al tipo de unión. Estas condiciones pueden contraponerse a las necesarias para su aplicación (Presentato et al., 2020). Por su parte, la inclusión permite el encapsulamiento por restricción mecánica. Debe controlarse la porosidad del material de manera que el diámetro de poro medio sea más chico o similar al tamaño del inmovilizado. Este debe ser agregado inicialmente junto con los reactivos de polimerización. Las condiciones de gelificación deben ser controladas y tiene mucha utilidad en biología celular (Callone et al., 2008; Blondeau and Coradin, 2012).

La inmovilización química se produce por unión covalente. La técnica más utilizada es la obtención del material en una primera etapa, para luego incubarlo junto con el inmovilizando en condiciones adecuadas de reacción.

En este método los grupos químicos de los precursores de tipo silicatos orgánicamente modificados, como el aminopropil trietoxi silano o los derivados epoxidados intervienen en la unión (Yuce-Dursun et al., 2016). En la copolimerización también se utilizan precursores de tipo silicatos orgánicamente modificados en combinación con otros sin funcionalidades agregadas como los tetraetoxisilanos (Kros et al., 2001). Por lo tanto, se utilizan dos tipos de precursores poliméricos distintos. La polimerización de ambos da lugar a un material con las características provenientes de los dos monómeros (Jal, 2004; Hatay et al., 2008).

## **Métodos de síntesis y actividad antifúngica de nanopartículas**

Los materiales con al menos una dimensión inferior a 100 nm se consideran de escala "nano" y tienen propiedades físicas y químicas diferentes a los materiales de microescala (Hauptert and Wetzel, 2005; Singh, 2016a). Tienen una relación superficie/volumen mayor a la de los micromateriales, debido al hecho de que la mayoría de los átomos se encuentran en la superficie (Morones et al., 2005; Mathiazhagan and Joseph, 2011). Sin embargo, los micromateriales también han sido usados en la formulación de pinturas higiénicas. Por ejemplo, Revuelta et al., 2021 utilizaron microcápsulas con pared de melamina-formaldehído y el centro de aceites esenciales en una pintura para la protección eficiente de yeso frente al ataque de *Aspergillus fumigatus*.

Las nanopartículas (NPs) pueden sintetizarse a través de métodos físicos, químicos y biológicos. Dentro de métodos físicos y químicos, se destacan las radiaciones de rayos gamma, el uso de microemulsiones, los métodos electroquímicos, la ablación por láser, la reducción química, las reducciones fotoquímicas, la síntesis hidrotérmal y la coprecipitación solvotérmal y sonoquímica (Han et al., 2015; Valverde-Alva et al., 2015; Liu et al., 2017). Las NPs pueden obtenerse mediante dos enfoques principales: top-down (reducir el tamaño hasta alcanzar un material adecuado) y el bottom-up (obtenerlas a partir de entidades elementales como átomos y moléculas) (Mittal et al., 2013). El enfoque top-down utiliza métodos físicos o químicos, que con frecuencia tienen una alta demanda energética y producen NPs con imperfecciones en la

superficie (Thakkar et al., 2010; Landge et al., 2017). Los enfoques bottom-up se basan en la síntesis química o biológica y suelen producir dispersiones coloidales de las NPs con menos defectos y una composición química más homogénea (Cao and Sun, 2009; Singh, 2016b). Estos métodos tienen un bajo rendimiento y presentan limitaciones como el alto coste funcional, el uso de productos químicos tóxicos y el elevado suministro de energía. La mayoría de estos métodos suelen utilizar productos químicos peligrosos para la investigación de Nps avanzadas. Por lo tanto, las desventajas de estos métodos pueden limitar su producción a gran escala y en consecuencia sus aplicaciones (Naikoo et al., 2021).

Para superar las limitaciones de los métodos físicos y químicos antes mencionados, se han utilizado técnicas alternativas rentables que se valen del uso de extractos de plantas (fitosíntesis), cultivos fúngicos (micosíntesis), cultivos bacterianos y polímeros naturales para la obtención de NPs (Khandel and Shahi, 2018; Naikoo et al., 2021). La combinación de nanotecnología y química “verde” ha ampliado la gama de Nps metálicas biológicamente compatibles (Nasrollahzadeh et al., 2019). La obtención de Nps a partir de extractos vegetales tiene muchas ventajas sobre los métodos tradicionales, como la sencillez del procedimiento, la ausencia de contaminación y toxicidad, la posibilidad de producción a gran escala y la rentabilidad (Huo et al., 2018; Jasrotia et al., 2020). Estos enfoques ecológicos tienen suficiente potencial para desarrollar Nps bien definidas en tamaño y forma para varias aplicaciones prometedoras a nivel comercial (Corsi et al., 2018).

Las propiedades de las NPs dependen fundamentalmente de su tamaño y forma. Del mismo modo, la actividad antimicrobiana de las NPs puede cambiar si se modifican estos parámetros (Morones et al., 2005; Raza et al., 2016). Teniendo en cuenta la naturaleza química de los NPs que han sido evaluadas en cuanto a su actividad antifúngica, se pueden clasificar en tres grupos principales: metálicos, no metálicos e híbridos (metálicos/no metálicos). Las NPs metálicas (y de óxido metálico) pueden mejorar su eficacia y facilitar su aplicación en diferentes campos si se optimizan su propiedades quimicofísicas, tamaño, relación superficie-volumen, estabilidad estructural y afinidad (Elbourne et al., 2017). El método de síntesis más utilizado para las NPs metálicas es la

química “húmeda”, en la que las NPs se forman a partir de los respectivos iones metálicos utilizando un sistema líquido que contiene agentes reductores (por ejemplo, borohidruro de sodio, metoxipolietilenglicol o hidracina) y agentes estabilizadores (por ejemplo, dodecibencilsulfato de sodio, polivinilpirrolidona o citrato) (Badawy et al., 2010; Singh, 2016b). Los métodos químicos han sido cuestionados debido al uso de disolventes tóxicos y la generación de subproductos peligrosos, lo que ha aumentado el interés por las alternativas ecológicas enmarcadas en la síntesis “verde” como la biorreducción o los métodos biológicos (Singh, 2016a).

La actividad antifúngica de los nanomateriales depende de sus propiedades tales como, la carga superficial, la composición, el tamaño de partícula, la forma y la capacidad de oxidación parcial (Mittal et al., 2013; Singh, 2016b). Los estudios que intentan explicar el mecanismo de acción de las NPs sugieren que estas afectan la germinación de esporas, el crecimiento del micelio y la síntesis de aflatoxinas (Kasprowicz et al., 2010; Kairyte et al., 2013; Mitra et al., 2017).

Las NPs metálicas con actividad antimicrobiana más estudiadas son: plata (Ag), cobre (Cu), óxido de zinc (ZnO), y el dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) (Ruffolo et al., 2010; El Saeed et al., 2016; Nguyen et al., 2019). Sin duda, las AgNPs son las más conocidas por su actividad antimicrobiana y su síntesis suele producirse por reducción de sales de plata solubles en presencia de agentes reductores como citrato, glucosa, etilenglicol o borohidruro de sodio (Badawy et al., 2010; Singh, 2016b). Se han producido AgNPs con diferentes formas: esféricas (más comunes), pirámides, varillas, prismas triangulares y cubos (Pal et al., 2007; Raza et al., 2016).

La plata es capaz de controlar varios patógenos con relativa seguridad, si se compara con los fungicidas sintéticos, y muestra múltiples modos de acción inhibidora de los microorganismos (Ogar et al., 2015). Hasta ahora, las AgNPs han demostrado ser activas frente a las siguientes especies: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Penicillium* spp.,

*Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum* spp. y *Mucor* sp. (Mohamed et al., 2019; Sardella et al., 2019).

Las AgNPs liberan iones de plata en las células fúngicas, que podrían afectar la cadena respiratoria y la división celular, lo que conduce a la muerte celular (Moritz and Geszke-Moritz, 2013). Además, interactúan con los grupos tiol de varias enzimas, inactivándolas y afectando procesos como la nutrición (Chung and Toh, 2014). La plata también puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS) que tienen una alta actividad citotóxica y causar la muerte celular (Morones et al., 2005; Singh et al., 2016). Los iones de plata pueden causar desnaturalización de proteínas y ADN, lo que afecta a la maquinaria replicativa de la célula fúngica (Dananjaya et al., 2017). Durante la formación del tubo germinal, la pared de la hifa es más fina y más frágil en la parte apical; este puede ser el momento que permite la interacción de las AgNPs en la pared celular, provocando un aumento de la permeabilidad de la membrana, y con ello una alteración en la viabilidad de los conidios (Jo et al., 2009; Mahmoud et al., 2014).

Por su parte, Rajesh et al., 2018 informaron la síntesis verde de CuNPs utilizando el extracto de la semilla de *Cuminum cyminum* (comino, nombre común). La actividad antimicrobiana de las CuNPs se evaluó mediante el método de Kirby-Bauer. En este trabajo CuNPs mostraron una mejor actividad inhibitoria frente a *Penicillium* spp. en comparación con *A. niger*, *A. flavus* y *Rhizopus* spp. También se estudiaron las ZnONPs y su mecanismo de acción contra dos hongos patógenos: *B. cinerea* y *Penicillium expansum* (He et al., 2011). En este caso, se comprobó que *P. expansum* era más sensible al tratamiento con ZnONPs que *B. cinerea*. Las NPs inhibían el crecimiento afectando a las funciones celulares, lo que provocaba una deformación en las hifas del hongo, e impedía el desarrollo de conidióforos y conidios de *P. expansum*. Además, Kairyte et al., 2013 obtuvieron resultados similares contra una cepa de *B. cinerea* al exponerla a estas NPs en suspensión. Del mismo modo, Sharma et al., 2010 estudiaron la actividad antifúngica de las ZnONPs contra *Fusarium* sp. y propusieron que la inhibición del crecimiento fúngico se debía a la ruptura de la membrana celular, lo que provocaba la posible disminución de la actividad enzimática del hongo.

En la literatura también hay reportes relacionados con la actividad antifúngica de las NPs de óxido de hierro contra *Trichothecium roseum*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium chrysogenum*, *A. alternata* y *A. niger*. La inhibición máxima en la germinación de esporas se produjo contra *T. roseum* (~88%), seguido de *C. herbarum* (~85%) (Parveen et al., 2018). Las NPs de óxido de hierro causan estrés oxidativo a través de la generación de ROS (sigla en inglés para especies reactivas del oxígeno) y la reacción de Fenton (oxidación de sustratos orgánicos mediante hierro (II) y peróxido de hidrógeno). Dado que el hierro es un fuerte agente reductor, induce la descomposición de los grupos funcionales en las proteínas y los lipopolisacáridos de membrana. Las NPs de hierro también provocan la oxidación por el oxígeno intracelular, lo que conduce a un daño oxidativo a través de la reacción de Fenton. Estas NPs penetran a través de las membranas alteradas causando un mayor daño y la muerte de las células (Parveen et al., 2018).

Las NPs antimicrobianas obtenidas a partir de extractos acuosos de plantas son muy prometedoras porque son accesibles, eficaces, de bajo costo y respetuosas con el medio ambiente (Mittal et al., 2013; Ananda et al., 2021). Las AgNPs sintetizadas utilizando extractos acuosos de diferentes plantas (*Schinus molle*, *Equisetum giganteum* e *Ilex paraguariensis*) han sido estudiadas por Barberia-Roque et al., 2019 contra cepas *A. alternata* y *Chaetomium globosum*. Estos hongos filamentosos son conocidos por deterioran las pinturas acrílicas de interior en base acuosa (Bellotti et al., 2013). La suspensión con AgNPs de *E. giganteum* resultó ser la más activa, con una concentración mínima inhibitoria de 3,3 y 67,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para *A. alternata* y *Chaetomium globosum*, respectivamente.

La biosíntesis de NPs puede ser un novedoso sustituto de las NPs obtenidas por síntesis química por su enfoque económico y ecológico (Ananda et al., 2021). Se informó de una actividad antifúngica mayor de las AgNPs biosintetizadas mediante el uso de cultivos de *Trichoderma viride* (MTCC 5661) en comparación con AgNPs con forma y tamaño similares sintetizadas químicamente (Kumari et al., 2019). En este sentido las AgNPs biosintetizadas mejoraron la reducción del peso seco en un 20% y 48,8% de *F. oxysporum* y *A. brassicicola* respectivamente, en comparación con sus homólogas químicas. Usando como modelo a *A. brassicicola*, los autores propusieron que el desequilibrio osmótico



y la desintegración de la membrana son la causa principal de la muerte celular fúngica tras el tratamiento con las AgNP biosintetizadas.

Entonces, la nanotecnología en general y las NPs (nanomateriales) en particular pueden desempeñar un papel clave en el control del biodeterioro. Como ya se ha comentado, existen enfoques convencionales para el control de la microbiota asociada a materiales de construcción, pero tienen ciertas limitaciones. En este contexto, teniendo en cuenta el potencial antifúngico de distintas NPs obtenida por procesos alternativos, es promisorio su uso eficaz en la prevención del deterioro fúngico de materiales estructurales. Entonces, las NPs pueden emplearse como agentes antifúngicos novedosos, eficaces y ecológicos, alternativos a los fungicidas químicos.

## Hipótesis y objetivos

En base a lo anteriormente expuesto se elaboraron las siguientes **hipótesis**:

1. Sobre ladrillo y hormigón se desarrolla una microbiota diversa y algunos de los hongos que la integran son microorganismos altamente degradantes de esos materiales.
2. Aislados fúngicos altamente deteriorantes pueden ser utilizados como bioindicadores en la evaluación de potenciales activos antifúngicos y recubrimientos.
3. Los recubrimientos basados en silanos presentan propiedades adecuadas para ser aplicados en la protección de los materiales en estudio.
4. Las nanopartículas metálicas con actividad antifúngica pueden ser obtenidas por síntesis verde mediante el uso de extractos vegetales acuosos y que las mismas presentan potencialidades antifúngicas.
5. Los recubrimientos obtenidos mediante la metodología sol-gel pueden ser funcionalizados al integrar en su matriz las nanopartículas bioactivas y por lo tanto pueden prevenir el biodeterioro fúngico.

## **Objetivos**

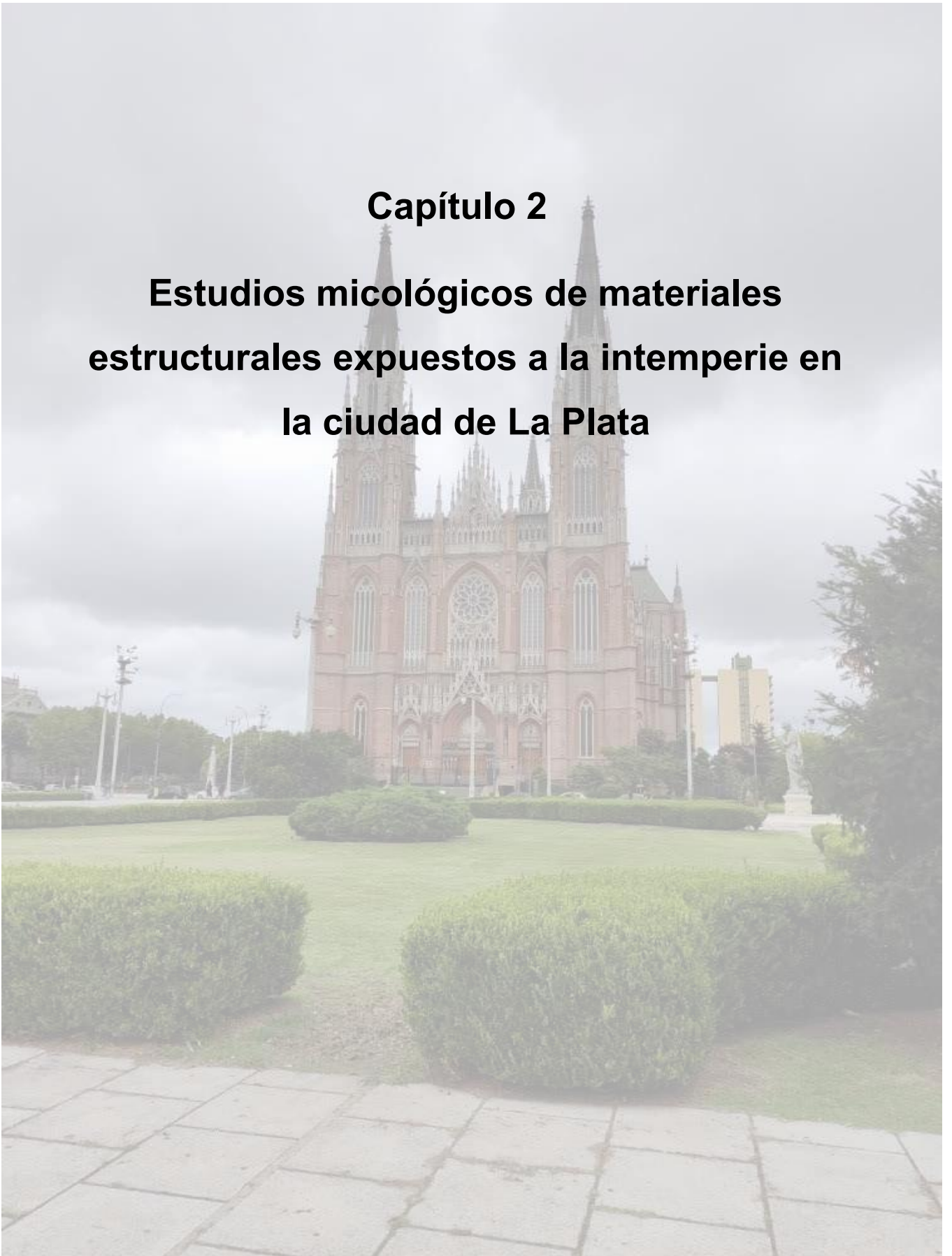
El **objetivo general** de esta investigación es obtener, a partir del estudio de la microbiota presente en materiales estructurales, hongos altamente deteriorantes para ser utilizados como bioindicadores en la prevención del biodeterioro mediante el uso de recubrimientos de base sol-gel aditivados con nanopartículas obtenidas por síntesis verde.

### **Objetivos específicos:**

1. Aislamiento de hongos a partir de materiales estructurales (ladrillo y concreto) ubicados en la ciudad de La Plata.
2. Evaluación de la actividad deteriorante de las cepas aisladas. Selección e identificación taxonómica molecular de las cepas más deteriorantes para su uso como bioindicadores.
3. Síntesis de nanopartículas metálicas utilizando extractos vegetales acuosos.
4. Caracterización y selección de las nanopartículas de mayor actividad inhibitoria frente a las especies fúngicas aisladas.
5. Formulación de recubrimientos que incorporen las nanopartículas seleccionadas y elaboración mediante la técnica sol-gel.
6. Evaluación de la eficiencia de los recubrimientos obtenidos al biodeterioro fúngico.

## **Capítulo 2**

# **Estudios micrológicos de materiales estructurales expuestos a la intemperie en la ciudad de La Plata**



## Introducción

La pérdida de integridad del material es resultado de la acción de las fuerzas mecánicas producidas por el crecimiento de carácter invasivo del micelio. A esto se suma el biodeterioro químico debido a la acción directa de los productos metabólicos secretados (Gu, 2018; Coutinho et al., 2019). El deterioro de los materiales estructurales debido a los hongos filamentosos provoca efectos negativos en la preservación de edificios histórico-culturales y de trabajo. Un ejemplo importante de esto es la Catedral de la Inmaculada Concepción, también conocida como Catedral de La Plata (CP) y la estación experimental del Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT). La CP se ve afectada por el crecimiento en la fachada de líquenes, algas verdes, cianobacterias, musgos y plantas superiores (Gómez de Saravia et al., 2016; Rosato et al., 2016). Sin embargo, no se ha estudiado el deterioro provocado por los hongos filamentosos presentes en la micobiota que se constituye en el lugar. En cuanto al biodeterioro del patrimonio histórico-cultural edilicio, es necesario evaluar los niveles de contaminación fúngica y la resistencia de los hongos a determinados materiales o tratamientos de conservación.

En los edificios de trabajo, también es importante monitorear el deterioro fúngico de los materiales estructurales, ya que pueden causar contaminación del aire interior y exterior. La micobiota de los ambientes interiores contiene alrededor de 150 especies y, en tal sentido, se considera que a partir de 1000 UFC / m<sup>3</sup> es un nivel alto de exposición para los residentes (Crook and Burton, 2010). Los géneros de hongos que se encuentran con mayor frecuencia en ambientes interiores son *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Stachybotrys* (Verdier et al., 2014).

Sin embargo, no hay antecedentes sobre la micobiota involucrada en el deterioro de la fachada de la CP y CIDEPINT. Por lo tanto, en este capítulo se describe el estudio de la micobiota involucrada en el deterioro de fachadas mediante el aislamiento y caracterización de cepas fúngicas en los lugares de muestreo correspondientes. En primer lugar, la investigación se centró en la micobiota implicada en el deterioro de ladrillo y hormigón mediante la determinación de: la densidad relativa, la frecuencia relativa de aparición y la

categoría ecológica de los aislados fúngicos. Luego, se evaluaron los atributos deteriorantes de las cepas aisladas mediante la prueba de disolución de carbonato de calcio, la determinación de producción de ácido, el ensayo de secreción de pigmentos y la variación de peso en ladrillos inoculados luego del pasaje por una cámara de humedad. Finalmente, se realizó un análisis molecular de las cepas fúngicas altamente deteriorantes. Estas cepas se utilizarán en los siguientes capítulos para estudiar nuevos materiales bioactivos en el control del biodeterioro de materiales estructurales.

## **Materiales y métodos**

### **Sitios de muestreo y aislamiento fúngico**

El muestreo microbiológico se realizó en el mes de octubre de 2017 en la Catedral de La Plata (CP) (34°55'S, 57°57'O) y en la Estación Experimental del Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT) (34°50'S, 57°53'O). En la CP fueron tomadas las muestras en la fachada paralela a la calle 53 y en el CIDEPINT en paredes límites. En ambos sitios las muestras fueron tomadas de 12 puntos. En la Figura 2.1 A y B se muestran registros fotográficos de ambos sitios.

La CP es el principal templo católico de la ciudad de La Plata (capital de la provincia de Buenos Aires), Argentina y una de las iglesias más grandes del mundo. Es un edificio neogótico con una superficie de 7000 m<sup>2</sup> construidos con ladrillo visto y mortero, lo que le confiere un aspecto característico especial. En los pináculos, arcos de las bóvedas y ornamentos se utilizó mortero de cemento blanco (Rosato et al., 2016). Por su parte, el CIDEPINT es un instituto de investigación dedicado a la obtención de nuevos desarrollos tecnológicos relacionados con pinturas y recubrimientos protectores. Cuenta con una estación experimental al aire libre construida de concreto donde se realizan ensayos de servicio natural.

Las muestras se tomaron mediante la técnica del hisopado a partir de ladrillos y hormigón con notable biodeterioro por observación visual directa a 0,5 y 1,5 metros de altura con respecto al suelo (Verdier et al., 2014; Rosato et al., 2016). Posteriormente, los hisopos se introdujeron en tubos que contenían solución fisiológica estéril. Esta se preparó añadiendo 0,85 g de NaCl / 100 mL de agua destilada (AD). Se realizaron diluciones seriadas (1:10-1:1000) y se inoculó 0,1 mL de la solución en placas de Petri con medio de cultivo Agar Papa Glucosa (PDA) suplementado con estreptomina (30 mg / 100 mL) y Rosa Bengala (5 mg / 100 mL). Las placas se incubaron en estufa a 28 °C. Se realizaron los aislamientos de los hongos filamentosos a los 2, 7 y 15 días siguiendo técnicas microbiológicas convencionales.



**Figura 2.1.** Sitios de muestreo. A: Catedral de La Plata. B: Estación Experimental del Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT). Flechas blancas indican algunos de los puntos de muestreo. C: Resaltado en rojo Provincia de Buenos Aires (tomado de Google maps).



## Identificación taxonómica y categorías ecológicas de los aislamientos

Para el análisis taxonómico, todas las cepas se cultivaron en Agar Papa Dextrosa y se utilizaron 39 g/1000 mL de AD. Los aislados se identificaron hasta el taxón más bajo posible basándose en sus estructuras reproductivas, somáticas y características culturales de la colonia utilizando claves taxonómicas estándar (Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, 2004; Pitt and Hocking, 2009). En algunos casos se utilizó la técnica del microcultivo, además de la extracción de partes del micelio de colonias maduras para la observación en microscopio óptico. En los casos requeridos se realizó la tinción de los preparados con azul de algodón. Para observar mejor los conidióforos se añadió alcohol a las preparaciones altamente esporuladas. El nombre científico de cada taxón fue corroborado utilizando la base de datos disponible en MycoBank (<https://www.mycobank.org/>).

La densidad relativa (DR) (Smith, 1980) y la frecuencia relativa de aparición (FR) (Esquivel et al., 2003) se calcularon utilizando las fórmulas (1) y (2), respectivamente:

$$DR (\%) = (a / b) \times 100 (1)$$

donde a es el número de colonias del taxón, b es el total de colonias de taxones.

$$FR (\%) = (c / d) \times 100 (2)$$

donde c es el número de veces que se detecta un taxón, d es el número total de muestreos realizados.

A partir de los valores de FR, se otorgaron las siguientes categorías ecológicas a los hongos filamentosos según lo propuesto por Esquivel et al., 2003: abundante (81-100%); común (61-80%); moderado (41-60%); ocasional (21-40%); y raro (0,1-20%).



## **Atributos biodeteriorantes**

### **Ensayo de disolución de carbonato de calcio**

El procedimiento seguido fue similar al propuesto por Unković et al., 2018. La capacidad potencial de los hongos aislados por la acidificación del sustrato donde crecen se evaluó mediante el ensayo de disolución de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Se utilizaron placas de Petri con medio de cultivo suplementado con la siguiente composición: 5 g de carbonato de calcio; 30 g de extracto de malta; 3 g de peptona micológica y 15 g de agar por litro de AD. Las placas de Petri con agar extracto de malta y  $\text{CaCO}_3$  se inocularon con un disco de micelio agarizado de 6 mm de diámetro y se incubaron durante 14 días a 28 °C. Las cepas positivas mostraron una zona clara alrededor de la colonia, lo que confirmó la disolución del carbonato de calcio. La prueba se realizó por triplicado.

### **Secreción de ácidos**

Las cepas que resultaron positivas en el ensayo de disolución de  $\text{CaCO}_3$  se seleccionaron para realizar el ensayo de secreción de ácido. El ensayo permitió determinar la variación del pH producida en el medio de cultivo por la actividad vital de los hongos seleccionados debido a su capacidad acidificante. Los aislados se cultivaron en un Medio Mínimo Líquido (MML) suplementado con glucosa al 1% y rojo fenol al 0,001%. Por litro de AD fueron añadidos: nitrato de sodio, 2 g; fosfato de potasio, 1 g; sulfato de magnesio, 0,5 g; sulfato ferroso, 0,01 g y cloruro de potasio, 0,5 g. Antes de agregar el inóculo, se ajustó el pH a 7 y como control fueron empleados tubos de ensayo con MML sin inocular. Tubos de ensayo con MML y rojo fenol fueron inoculados con una solución de esporas ( $10^5$  esporas/mL) e incubados durante 3 días a 28 °C. Por último, el indicador de pH (rojo fenol) mostró un cambio de color y se realizaron las medidas correspondientes con un medidor de pH (Anaya et al., 2016). El ensayo se realizó por triplicado. Con los datos obtenidos fue posible calcular el cambio de pH ( $\Delta\text{pH}$ ), que es el resultado de la diferencia entre el pH final del medio y el pH original.

## Secreción de pigmentos

La capacidad potencial de los aislados para secretar pigmentos orgánicos en condiciones limitadas de nutrientes (presentes en la superficie de los materiales estructurales) y, en consecuencia, para inducir alteraciones en la coloración original se evaluó en un ensayo en placa. El medio de cultivo utilizado fue igual al del ensayo de dilución de carbonato de calcio. Las placas de Petri se incubaron durante 7 días a 28°C. La secreción de pigmentos fúngicos se confirmó mediante cambios en el color del medio de cultivo por observación directa. El ensayo se realizó por triplicado. Los casos en los cuales se constató la secreción de pigmentos se informaron como positivos.

## Exposición en cámara de humedad

La exposición en condiciones de humedad relativa extrema se realizó en condiciones controladas en una cámara de humedad siguiendo un procedimiento similar al descrito por George et al., 2013. Los criterios utilizados para seleccionar las cepas en este ensayo fueron: la alta velocidad de crecimiento y la capacidad de secretar pigmentos. Se introdujeron ladrillos de  $19 \pm 1,0 \text{ cm}^3$  en placas de Petri, cada uno se inoculó con 200  $\mu\text{L}$  de solución de esporas ( $10^5$  esporas / mL). Se inocularon dos sets de tres ladrillos por cada una de las cepas estudiadas para retirar las muestras a los 6 y 12 meses respectivamente.

Los ladrillos se colocaron en una cámara de humedad al 100% de humedad relativa. La temperatura ambiente fue regulada a 25 °C. Después de la remoción, los ladrillos se pesaron con y sin biopelícula. Se realizaron observaciones de las muestras mediante un microscopio estereoscópico (Leica S8 APO) y se tomaron registros fotográficos mediante una cámara digital (Leica) acoplada a este. Para la eliminación de la biopelícula fúngica, los ladrillos se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (10%). Luego del lavado se secaron hasta peso constante a 100 °C. Se utilizaron ladrillos de control sin inoculación.

La pérdida de peso se calculó a partir de la fórmula 3:

$$Dw = W_1 - W_2 \quad (3)$$

donde  $W_1$  es el peso del ladrillo antes de introducirlo en la cámara y  $W_2$  el peso después de la eliminación de la biopelícula.

Después de un año, los ladrillos que perdieron más peso se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, sigla en inglés) en un equipo Philips FEI Quanta 200 y la condición de trabajo fue de alto vacío ( $10^{-6}$  torr). Para la observación en SEM, las muestras fueron preparadas de la siguiente manera. En primer lugar, para fijar las estructuras fúngicas a observar las muestras fueron sumergidas en una solución de glutaraldehído al 2,5 % en Buffer fosfato salino (PBS). En la preparación del PBS, por cada litro de AD se añadieron 8g de NaCl, 0,14 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0,9 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Posteriormente, para la deshidratación de las muestras, estas fueron embebidas en soluciones de etanol al 20, 50, 70, 90 y 100% durante 30 min en cada solución. No fue necesario aplicar el secado por el método del punto crítico y finalmente se aplicó metalizado con oro (Simões et al., 2013).

### **Análisis molecular de cepas fúngicas altamente deteriorantes**

La identificación taxonómica se confirmó mediante métodos moleculares basados en el análisis de secuencias que codifican para la región espaciador transcrito interno (ITS, sigla en inglés) del ARNr. Este procedimiento solo se llevó a cabo con los aislados que resultaron más deteriorantes. Las secuencias ITS se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, sigla en inglés); luego se secuenciaron y analizaron (Vu et al., 2019). Los cebadores utilizados fueron ITS1 (5'-TCC GAT GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White et al., 1990; Schoch et al., 2012). Este procedimiento fue derivado para su realización a la empresa Macrogen ([www.macrogenlatam.com.ar](http://www.macrogenlatam.com.ar)). Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el banco de datos genéticos ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)) utilizando un software de búsqueda y análisis de secuencias para encontrar los análogos conocidos más cercanos con valores de similitud del 99%. Además, la historia evolutiva se infirió utilizando el método de grupo de pares no ponderados con media aritmética, (UPGMA) por sus siglas en inglés. Este método de construcción de árboles asume que la tasa de evolución de los taxones incluidos se ha mantenido constante a lo largo de la historia evolutiva (Gomes et al., 2015).

Las distancias evolutivas se calcularon usando el método p-distancia y están en las diferencias de unidades del número base por sitio. Este análisis involucró 5 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1<sup>a</sup> + 2<sup>a</sup> + 3<sup>a</sup> + Sin codificación. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Los análisis evolutivos se realizaron en el programa MEGA 10.0.5® (Kumar et al., 2018).

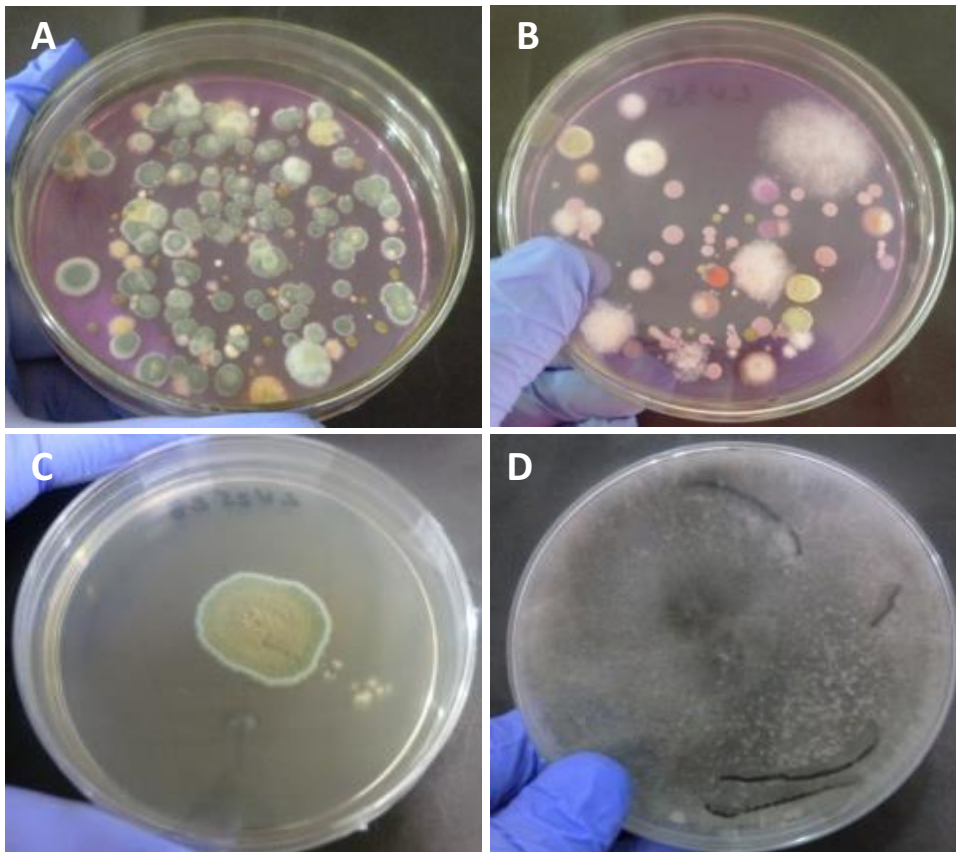
### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de la pérdida de peso del ladrillo se realizó con el programa RStudio 1.1.463®. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y la distribución de probabilidad se analizó mediante la prueba de distribución normal. Se aplicó un análisis ANOVA de dos vías. Los factores incluidos fueron el tiempo y el tratamiento. El primero tenía dos niveles: 6 y 12 meses y el segundo tenía 8 niveles, que corresponde con el número de cepas probadas. Luego, se aplicó la prueba de Tukey. Ambas pruebas se aplicaron utilizando el paquete multcomp. En forma similar, este programa se utilizó para analizar la asociación entre ciertas variables y la microbiota presente en los sitios de muestreo mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA), por sus siglas en inglés. Específicamente para estos análisis se utilizaron los paquetes MASS, ggplot2, scale y factoextra.

## Resultados

### Aislamientos fúngicos y categoría ecológica

El método de muestreo (hisopado) y las técnicas microbiológicas convencionales permitieron el aislamiento e identificación de 43 especies de hongos filamentosos.



**Figura 2.2.** Aislamiento y purificación de cepas fúngicas. PDA suplementado con Rosa Bengala, t= 2 días (A y B). Cepas puras en PDA t=4 días (C y D). T = 28°C.

En la Figura 2.2 se muestran registros fotográficos de placas durante el proceso de obtención de los aislados fúngicos. En la Figura 2.2 A y B se pueden ver diferentes colonias en placas de Petri con Agar Papa Glucosa suplementado con Rosa Bengala con crecimiento restringido debido a la presencia del Rosa Bengala que funciona como fungistático. Debido a que no ocurrió un solapamiento notable de las colonias, fue posible hacer la purificación de cada cepa como se ilustra en la Figura 2.2 C y D.

En la Tabla 2.1 se presenta un listado de los aislados pertenecientes a los Phylum: Mucoromycota, Ascomycota o Basidiomycota. Estos aislados se registraron por primera vez en ladrillos y concreto en CP y CIDEPINT. En la Tabla 2.1 también se muestra, para cada uno de los aislados, el material estructural y la altura a la que fueron recolectados; así como el resultado para las pruebas de disolución de carbonato de calcio y secreción de pigmentos.

La Figura 2.3 muestra la FR y DR de las cepas aisladas en las locaciones de muestreo, CP y CIDEPINT. En la Figura 2.3 A se puede observar que los géneros con mayor FR en la CP fueron *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y junto con *Alternaria alternata* se consideraron abundantes. Por otro lado, la aparición de *Epicoccum nigrum*, *Arthothelium spectabile* y *Lasiodiplodia theobromae* fue común en el material cerámico y el concreto. Sin embargo, en CIDEPINT los aislados se clasificaron en abundantes, comunes, moderados y ocasionales (Figura 2.3 B). En este sitio de muestreo, DUSM 1 y *Chrysonilia* sp. fueron las cepas con mayor frecuencia relativa. Además, YUSM y *C. cladosporioides* presentaron la mayor densidad relativa en CP y CIDEPINT, respectivamente.

**Tabla 2.1.** Hongos filamentosos aislados y ordenados a partir del sitio de muestreo (CP y CIDEPINT).

| No. | Aislado fúngico                                  | Sitio de muestreo | Material estructural | Altura (m) | Disolución de carbonato de calcio | Secreción de pigmentos |
|-----|--|-------------------|----------------------|------------|-----------------------------------|------------------------|
| 1   | <i>Penicillium</i> sp. Link 1                    | CP                | Ladrillo             | 1.5        | +                                 | -                      |
| 2   | <i>Epicoccum nigrum</i> Link.                    | CP                | Ladrillo             | 1.5        | -                                 | +                      |
| 3   | <i>Cladosporium</i> sp. Link 1                   | CP                | Ladrillo             | 1.5        | -                                 | -                      |
| 4   | <i>Cladosporium</i> sp. Link 2                   | CP                | Ladrillo             | 1.5        | -                                 | -                      |
| 5   | <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.        | CP                | Ladrillo             | 1.5        | -                                 | -                      |
| 6   | <i>Cladosporium</i> sp. Link 3                   | CP                | Ladrillo             | 1.5        | -                                 | -                      |
| 7   | <i>Penicillium</i> sp. Link 2                    | CP                | Ladrillo             | 0.5        | +                                 | -                      |
| 8   | <i>Cladosporium</i> sp. Link 4                   | CP                | Ladrillo             | 0.5        | -                                 | -                      |
| 9   | Coelomyces Grove. 1                              | CP                | Ladrillo             | 0.5        | -                                 | -                      |
| 10  | <i>Cladosporium</i> sp. Link 5                   | CP                | Ladrillo             | 0.5        | -                                 | -                      |
| 11  | Orbiliomyces O.E. Erikss. & Baral                | CP                | Ladrillo             | 1.5        | -                                 | -                      |
| 12  | <i>Arthrimum</i> sp.Kunze. 1                     | CP                | Ladrillo             | 1.5        | -                                 | -                      |
| 13  | <i>Lasiodiplodia theobromae</i> Griffon & Maubl. | CP                | Ladrillo             | 1.5        | -                                 | +                      |
| 14  | <i>Penicillium commune</i> Thom                  | CP                | Ladrillo             | 1.5        | +                                 | -                      |
| 15  | <i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.         | CP                | Ladrillo             | 0.5        | -                                 | -                      |
| 16  | <i>Penicillium</i> sp. Link 3                    | CP                | Ladrillo             | 0.5        | +                                 | -                      |
| 17  | <i>Penicillium</i> sp. Link 4                    | CP                | Ladrillo             | 0.5        | -                                 | -                      |
| 18  | <i>Cladosporium</i> sp. Link 6                   | CP                | Ladrillo             | 1.5        | -                                 | -                      |
| 19  | <i>Arthrimum</i> sp.Kunze. 2                     | CP                | Ladrillo             | 1.5        | -                                 | -                      |
| 20  | <i>Penicillium</i> sp. Link 5                    | CP                | Concreto             | 0.5        | -                                 | -                      |
| 21  | <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.)    | CP                | Concreto             | 0.5        | -                                 | -                      |
| 22  | Coelomyces Grove. 2                              | CP                | Concreto             | 0.5        | -                                 | -                      |
| 23  | <i>Penicillium</i> sp. Link 6                    | CP                | Concreto             | 0.5        | -                                 | -                      |
| 24  | <i>Penicillium</i> sp. Link 7                    | CP                | Concreto             | 0.5        | -                                 | -                      |

|    |   |          |                     |     |   |   |
|----|---|----------|---------------------|-----|---|---|
| 25 | Coelomycetes Grove. 3                         | CP       | Concreto            | 0.5 | - | - |
| 26 | <i>Aspergillus niger</i> Tiegh.               | CP       | Ladrillo y concreto | 0.5 | + | - |
| 27 | YUSM  | CP       | Concreto            | 1.5 | - | + |
| 28 | <i>Arthrothelium spectabile</i> A. Massal.    | CP       | Ladrillo            | 1.5 | - | + |
| 29 | <i>Moniliella</i> sp. Stolk & Dakin 1         | CIDEPINT | Concreto            | 0.5 | - | - |
| 30 | DUSM 1  | CIDEPINT | Concreto            | 1.5 | - | - |
| 31 | DUSM 2  | CIDEPINT | Ladrillo            | 0.5 | - | - |
| 32 | <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) | CIDEPINT | Ladrillo            | 0.5 | - | - |
| 33 | DUSM 3  | CIDEPINT | Concreto            | 0.5 | - | - |
| 34 | <i>Moniliella</i> sp. Stolk & Dakin 2         | CIDEPINT | Concreto            | 0.5 | - | - |
| 35 | <i>Chrysonilia</i> sp. Arx.                   | CIDEPINT | Concreto            | 1.5 | - | - |
| 36 | DUSM 4  | CIDEPINT | Ladrillo            | 1.5 | - | - |
| 37 | <i>Alternaria</i> sp. Nees, 1                 | CIDEPINT | Concreto            | 1.5 | - | - |
| 38 | SUNEM   | CIDEPINT | Ladrillo            | 1.5 | - | - |
| 39 | <i>Moniliella</i> sp. Stolk & Dakin 3         | CIDEPINT | Concreto            | 0.5 | - | - |
| 40 | <i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary)      | CIDEPINT | Concreto            | 0.5 | - | - |
| 41 | <i>Geomyces</i> sp. Traaen                    | CIDEPINT | Concreto            | 1.5 | - | - |
| 42 | <i>Mucor</i> sp. Fresen.                      | CIDEPINT | Concreto            | 1.5 | - | - |
| 43 | OUSM  | CIDEPINT | Concreto            | 0.5 | - | + |

+ : Positivo; - : Negativo

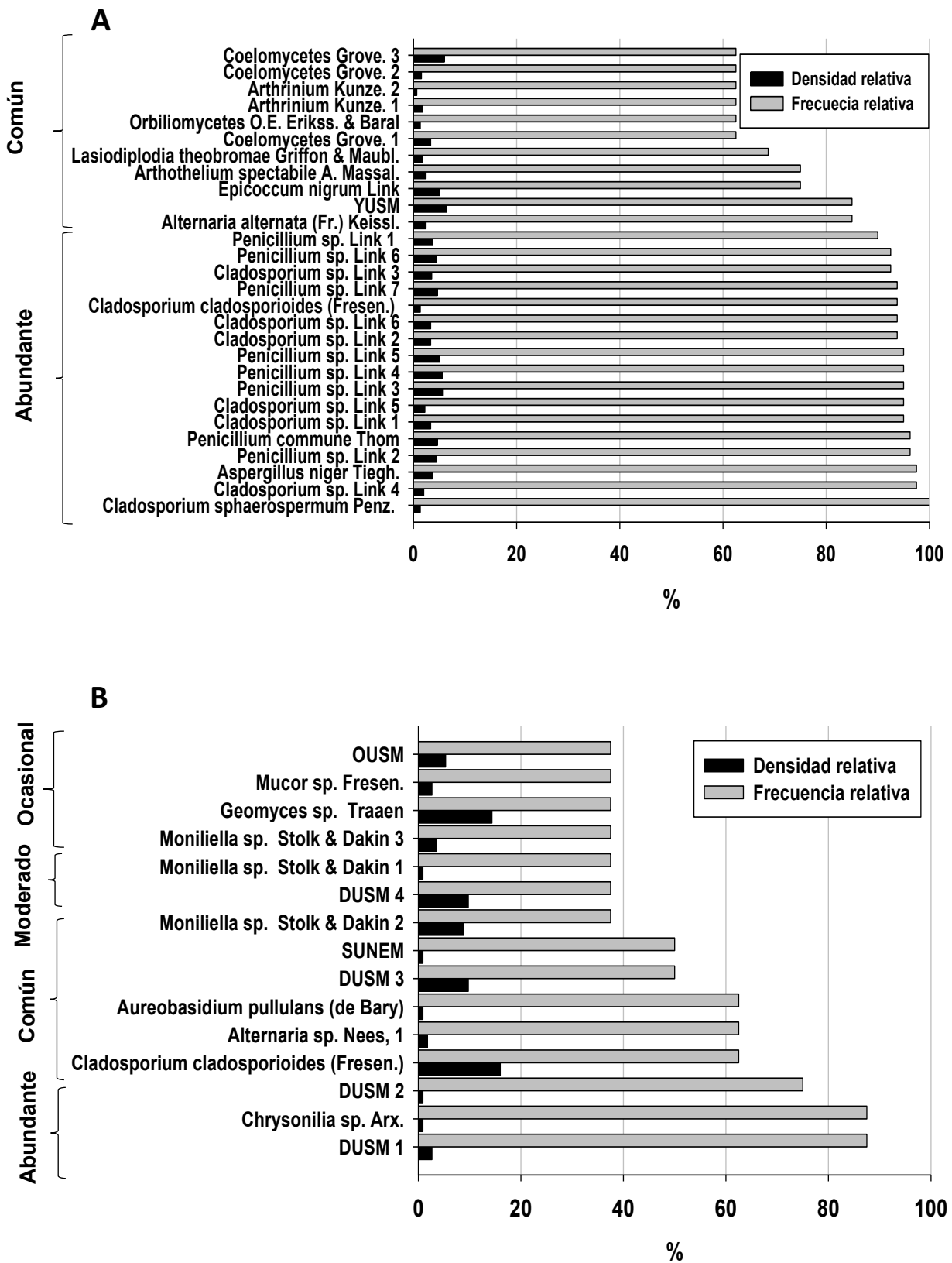
YUSM: micelio septado no esporulado amarillo

DUSM: micelio septado no esporulado dematiaceo

OUSM: micelio septado no esporulado anaranjado

SUNEM: micelio no septado no esporulado asalmonado



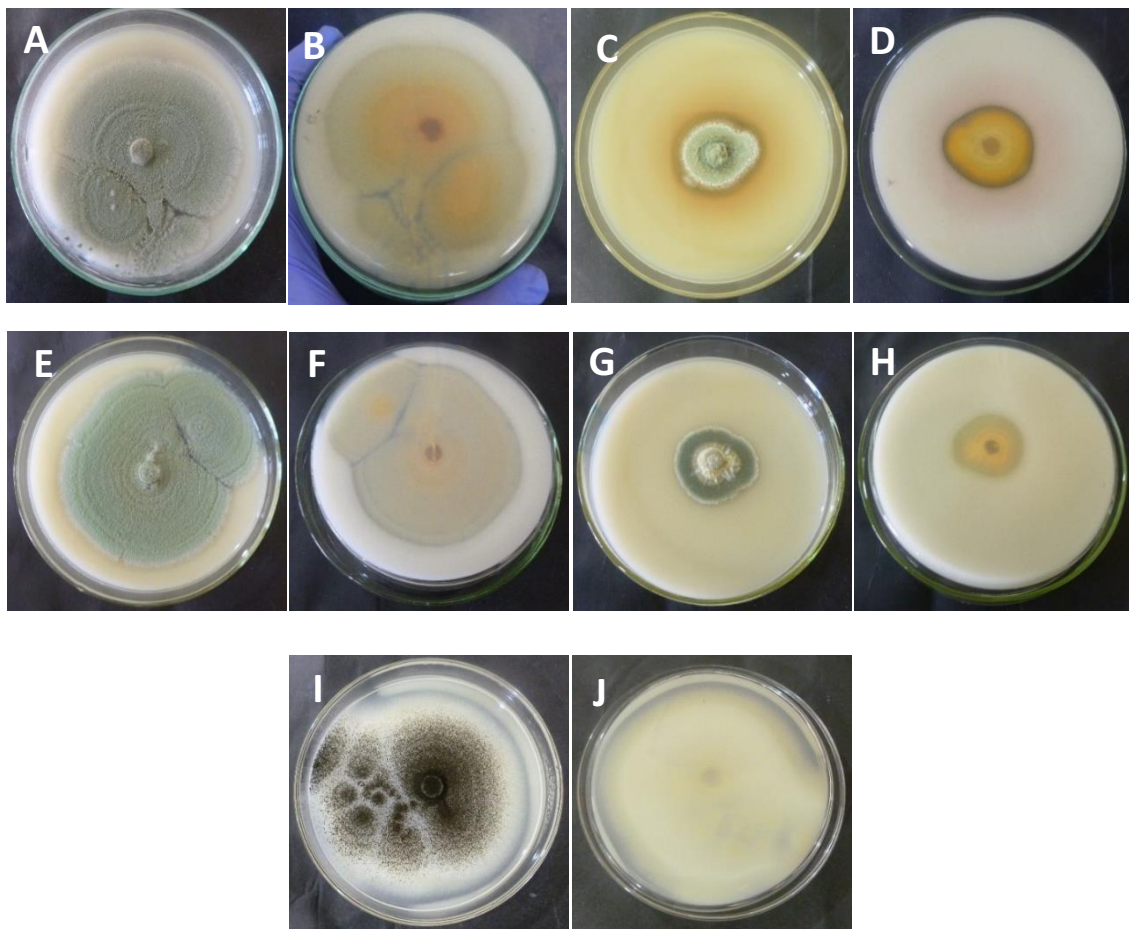


**Figura 2.3.** Densidad relativa, frecuencia relativa y categoría ecológica de los aislados fúngicos. A: Catedral de La Plata; B: Estación experimental del CIDEPINT.

## Atributos biodeteriorantes

### Ensayo de disolución de carbonato de calcio

La Tabla 2.1 muestra los resultados de la prueba de disolución de carbonato y el ensayo de secreción de pigmento. En la Figura 2.4 se puede observar la imagen frontal y el reverso de las placas con los aislados que dieron positivo a esta prueba.



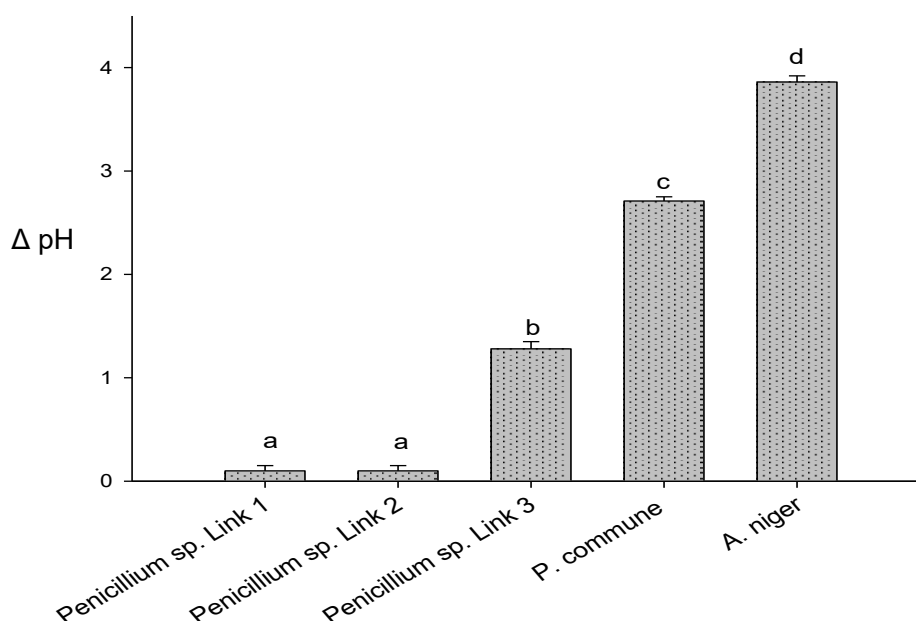
**Figura 2.4.** Cepas con resultado positivo para el ensayo de disolución de carbonato. A y B: *Penicillium* sp. 1. C y D: *Penicillium* sp. 2. E y F: *P. commune*. G y H *Penicillium* sp. 3. I y J: *A. niger*. Morfología de la colonia en agar de extracto de malta con  $\text{CaCO}_3$ . A, C, E, G e I: Anverso; B, D, F, H y J: reverso. T = 28°C, t = 14 días.

En las imágenes del reverso de las placas se puede observar con mayor detalle los halos alrededor de las colonias producto de la acidificación del medio. Solamente *Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 2, *Penicillium commune*, *Penicillium*

sp. 3 y *Aspergillus niger* fueron las cepas con capacidad para degradar el  $\text{CaCO}_3$  en las condiciones establecidas. Todas fueron aisladas de la CP. Las cepas de *Penicillium* sp. solamente se reportaron en ladrillos, mientras que *A. niger* se encontró sobre los dos materiales analizados.

### Secreción de ácidos

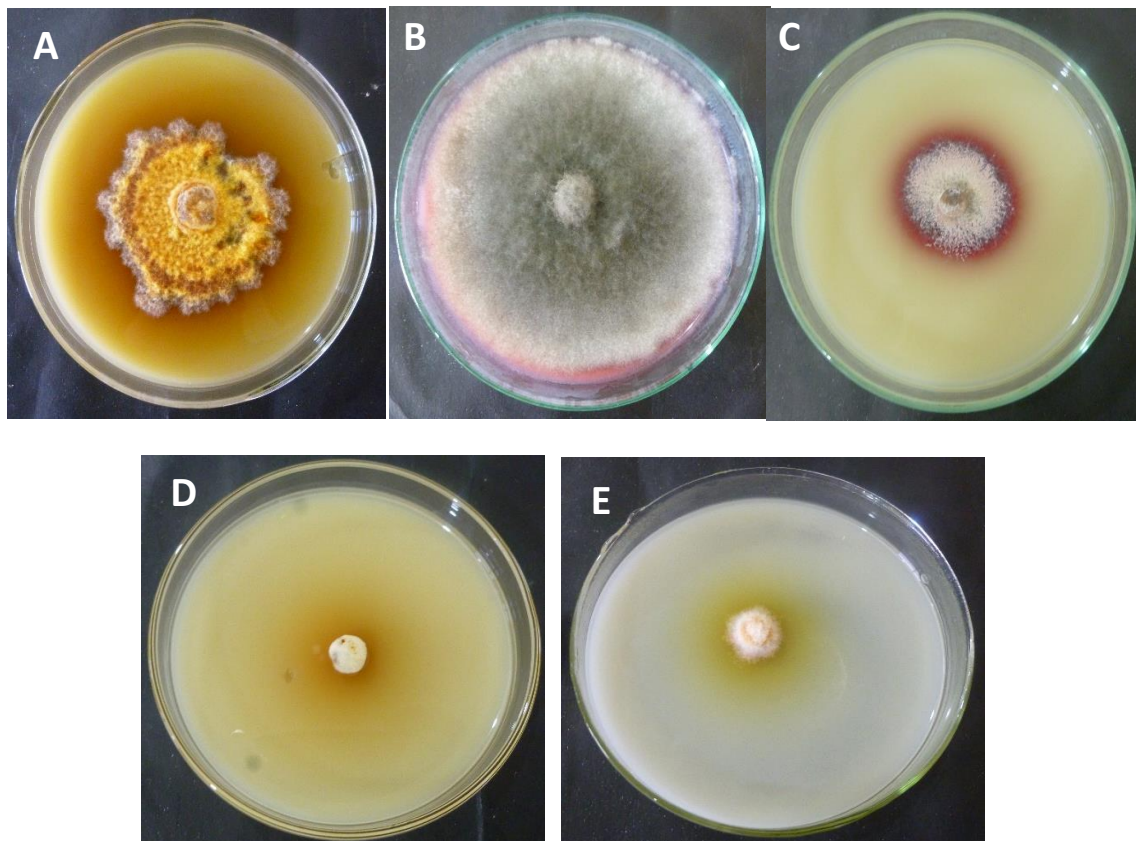
El ensayo de producción de ácido se realizó exclusivamente con las cepas que resultaron positivas en el ensayo de disolución de carbonato (Figura 2.5). La mayor disminución de pH, al concluir el ensayo fue registrado en el medio inoculado con *A. niger* seguido de *P. commune* y *Penicillium* sp. 3 que mostraron un  $\Delta\text{pH}$  promedio con desviación estándar igual a  $3,86 \pm 0,06$ ;  $2,71 \pm 0,04$  y  $1,28 \pm 0,07$ , respectivamente. Por otro lado, *Penicillium* sp. 1 y 2 presentaron una menor modificación del pH ( $0,10 \pm 0,05$ ) sin diferencia estadísticamente significativas entre ellos.



**Figura 2.5.** Valores de variación de pH y desviación estándar. Letras diferentes en las barras indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) para la prueba de Tukey.

## Secreción de pigmentos

*E. nigrum*, *L. theobromae*, YUSM, *A. spectabile* y OUSM fueron capaces de secretar pigmentos en las condiciones del ensayo. Registros fotográficos de estos aislados son presentados en la Figura 2.6. La producción de pigmentos se evidenció por un cambio en la coloración observable en forma directa en el medio de cultivo. La mayoría de los aislados que produjeron pigmentos fue dentro de algunas de las variantes del amarillo Figura 2.6 A, D y E, mientras que los pigmentos rojos estaban presentes en dos cultivos, Figura 2.6 B y C. La secreción de pigmentos es un proceso relacionado con la biología de los hongos que les ofrece resistencia contra determinadas condiciones ambientales, con lo cual, incrementan sus atributos biodeteriorantes.

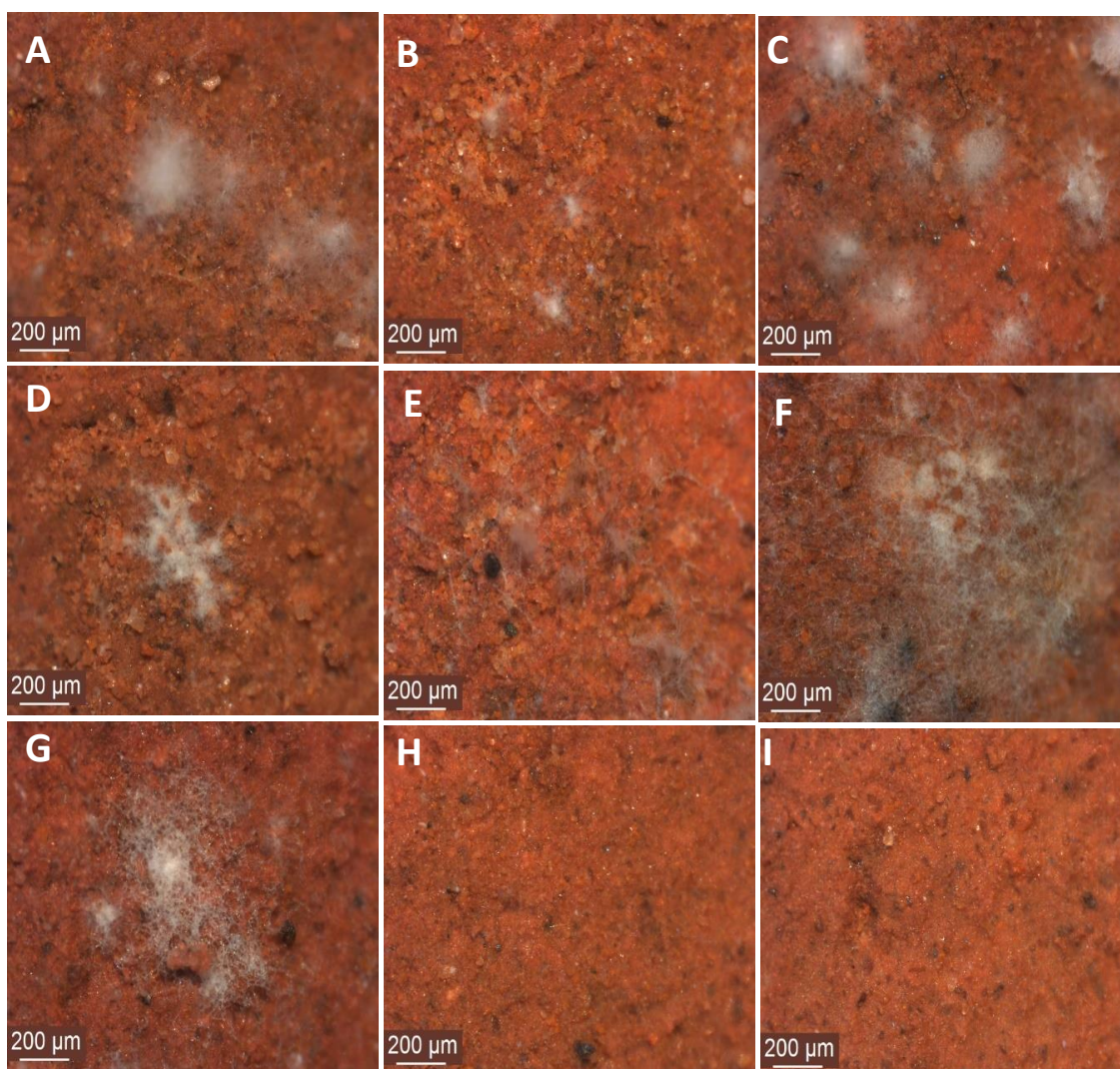


**Figura 2.6.** Hongos filamentosos capaces de secretar pigmentos. A: *E. nigrum*. B: *L. theobromae*. C: YUSM. D: *A. spectabile*. E: OUSM. Anverso de la colonia. T = 28°C, t = 7 días.



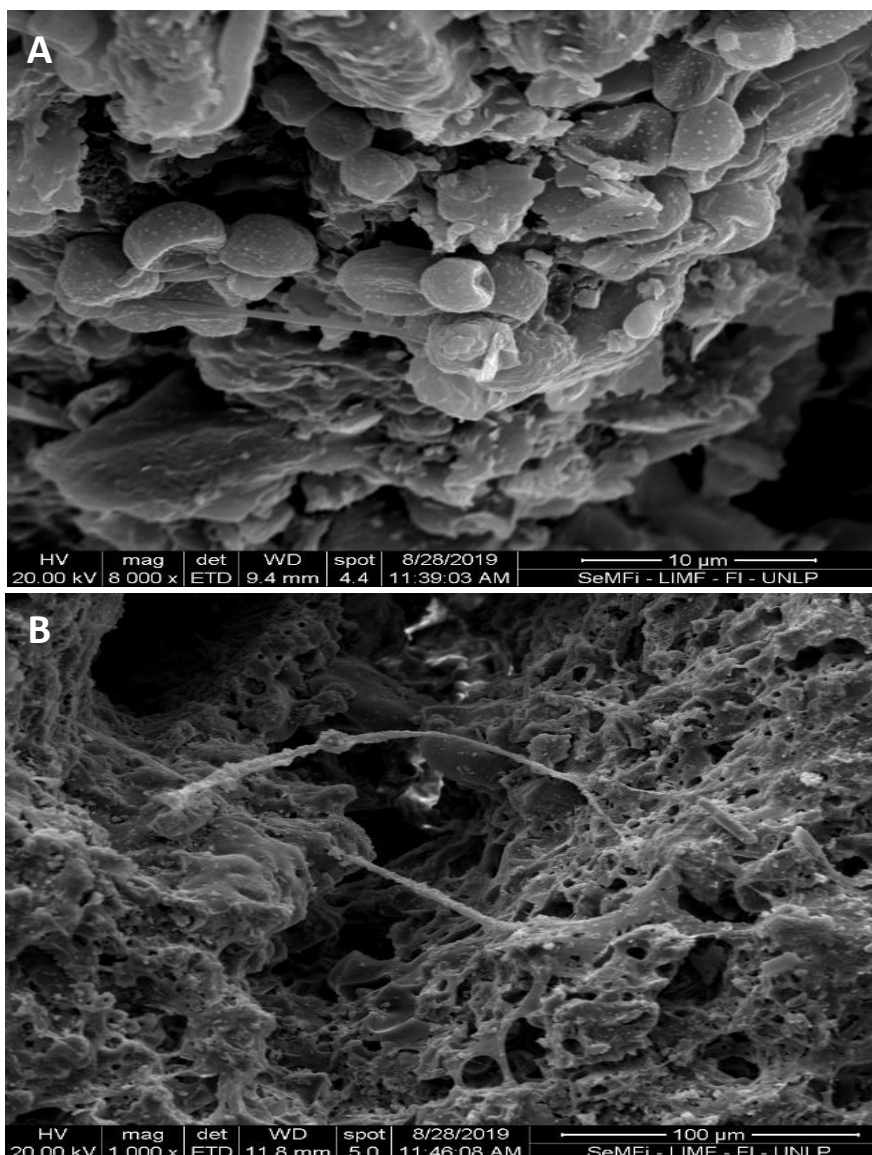
## Exposición en cámara de humedad

En la Figura 2.7 se observan imágenes obtenidas mediante un microscopio estereoscópico de los ladrillos luego de 12 meses de exposición en la Cámara de humedad. En los registros fotográficos puede apreciarse el deterioro causado por los ocho aislamientos fúngicos seleccionados. Estos se seleccionaron de acuerdo con su capacidad de secretar pigmentos (*E. nigrum*, *L. theobromae*, YUSM y *A. spectabile*) y su velocidad de crecimiento (*Arthrimum* sp. 1, *Arthrimum* sp. 2, DUSM 1 y DUSM 2).



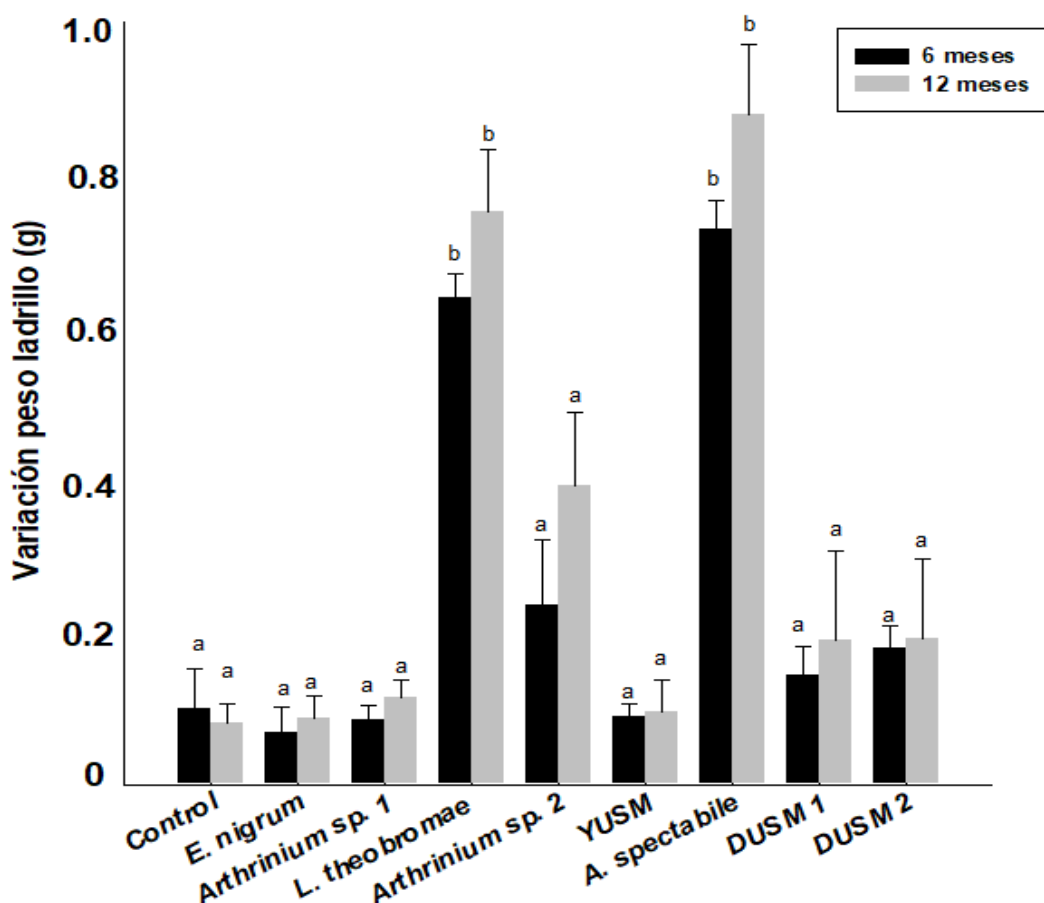
**Figura 2.7.** Ladrillos inoculados y expuestos en la Cámara de Humedad. A-I: Imágenes de microscopio estereoscópico. A: *E. nigrum*, B: *Arthrimum* sp. 1, C: *L. theobromae*, D: *Arthrimum* sp. 2, E: YUSM, F: *A. spectabile*, G: DUSM 1, H: DUSM 2 e I: Ladrillo sin inocular. (t = 12 meses).

En la Figura 2.7 se observa micelio incoloro sobre las superficies de los ladrillos, debido a que las cepas crecieron solamente a expensas de los compuestos químicos presente en el ladrillo comprometiendo su metabolismo con las funciones vegetativas. El crecimiento micelial fue más invasivo en *L. theobromae* y *A. spectabile*, Figura 2.7 C y F, respectivamente. Por este motivo, se realizaron observaciones mediante SEM para caracterizar el biofilm formado. En la Figura 2.8 A se pueden observar abundantes conidios agrupados y micelio vegetativo de *L. theobromae*. Mientras que en la Figura 2.8 B, aunque solo se observó micelio de *A. spectabile*, las hifas penetraron los poros del ladrillo.



**Figura 2.8.** Micrografías SEM de ladrillos inoculados y expuestos en la Cámara de Humedad. A: *L. theobromae* y B: *A. spectabile*. (t = 12 meses).

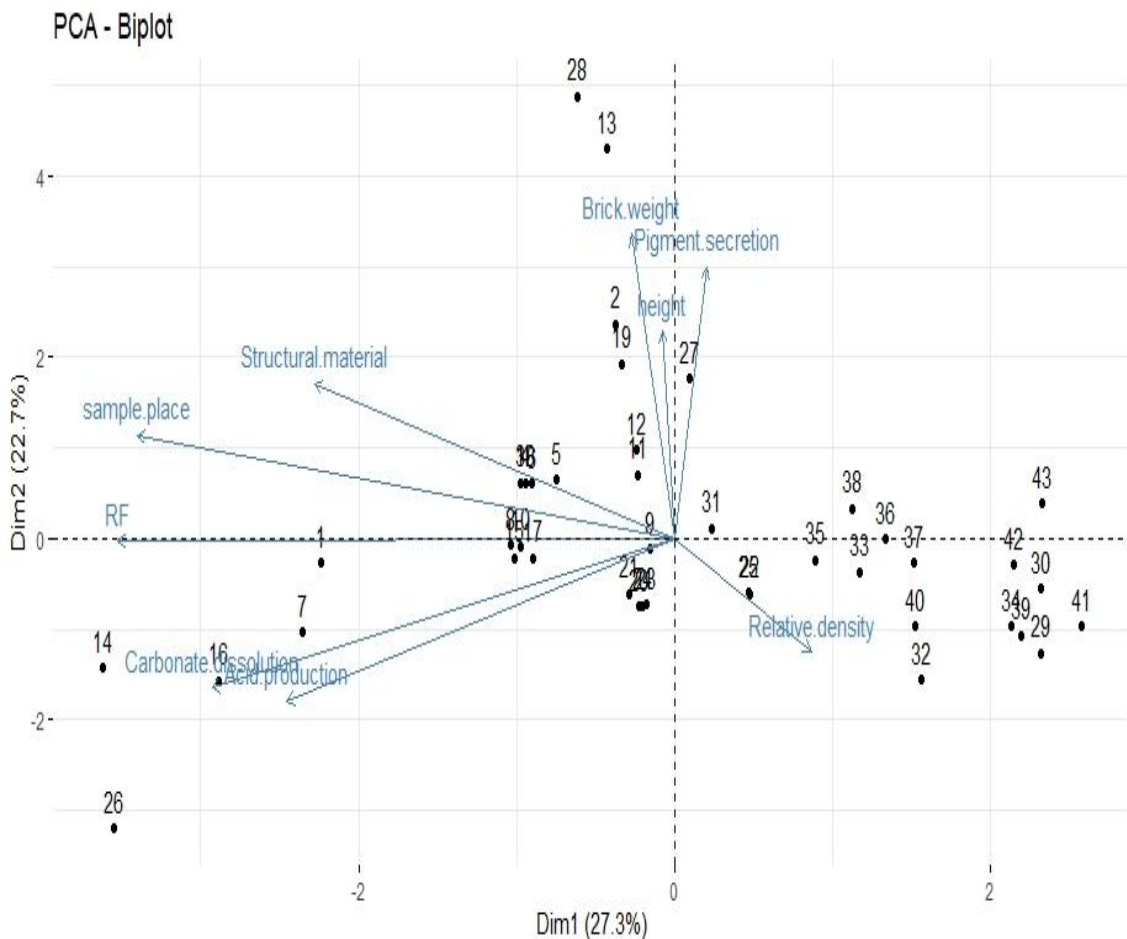
En la Figura 2.9 se presenta un gráfico con la variación del peso de los ladrillos inoculados y no inoculados (control) expuestos en la cámara de humedad calculada por la ecuación (3). Los ladrillos inoculados tanto con *L. theobromae* como con *A. spectabile* mostraron una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) en la pérdida de peso con respecto al resto de las cepas. Cabe señalar, que el crecimiento de ambas cepas sobre los ladrillos provocó una mayor pérdida de peso a los 12 meses. Pero, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 6 meses y los valores registrados a los 12 meses. Esto se puede deber a un crecimiento rápido en los primeros tiempos correspondiente a la fase exponencial y posteriormente en la fase estacionaria el crecimiento se enlentece y estabiliza (Madigan et al., 2019).



**Figura 2.9.** Valores de pérdida de peso en los ladrillos en diferentes momentos, diferentes letras en las barras indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) para la prueba de Tukey.

Por otro lado, la asociación entre determinadas variables y la microbiota cultivable presente en los sitios de muestreo se analizó mediante PCA utilizando

el programa RStudio 1.1.463®, cuyos ejes explicaron el 50 % de la variación. La Figura 2.10 muestra el PCA de los aislados según las variables analizadas. El eje 1 muestra la densidad relativa, sitio de muestreo, el material estructural, la frecuencia relativa de aparición, la disolución de carbonato de calcio y la producción de ácido con un 27,3% de variación. Por otro lado, el eje 2 muestra que el 22,7% correspondió a la variación del peso del ladrillo, la secreción de pigmento y la altura de recolección. Los números coinciden con los nombres científicos de la Tabla 1. En el PCA se obtuvo como resultado, que las cepas *Cladosporium* sp.1, *Cladosporium* sp.2, *A. alternata* y *Cladosporium* sp. 3 se agruparon en los puntos 3, 4, 5 y 6, respectivamente. Asimismo, las cepas pertenecientes al género *Penicillium* se agruparon entre los puntos 20 y 24.



**Figura 2.10.** Ordenación PCA de aislados de hongos (representados como números en la figura) según las variables analizadas.



## **Análisis molecular de cepas fúngicas altamente deteriorantes**

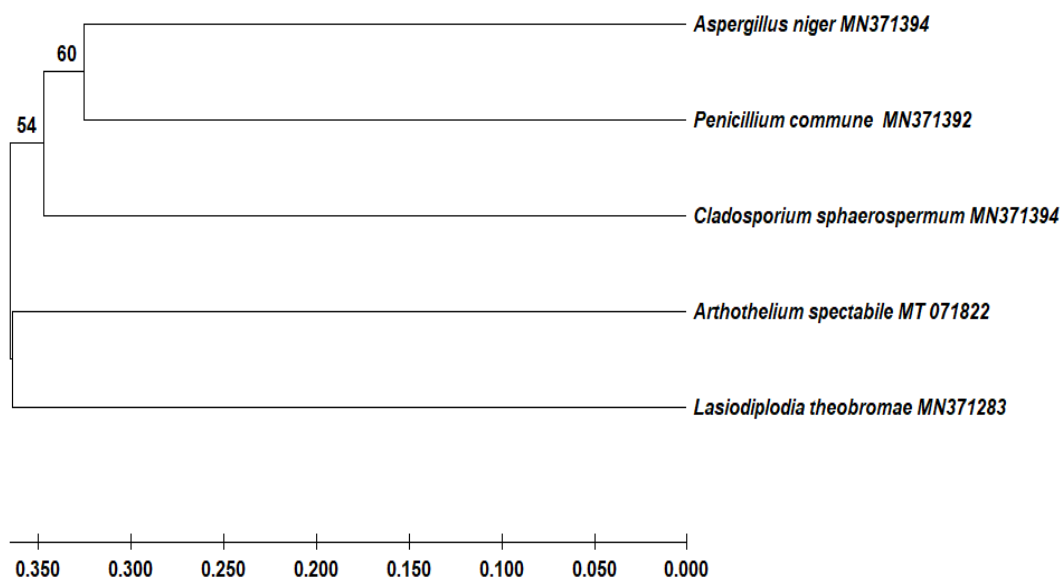
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y los análisis realizados anteriormente, se seleccionaron las cepas más deteriorantes y se profundizó en su estudio mediante un enfoque molecular. En tal sentido, se realizó un análisis molecular de las siguientes cepas:

- ✓ *Cladosporium sphaerospermum* (frecuencia relativa de aparición del 100%);
- ✓ *Penicillium commune* y *Aspergillus niger* (mayor variación de pH en MML);
- ✓ *Lasiodiplodia theobromae* y *Arthothelium spectabile*, no solo por secretar pigmentos, sino que también presentaron la mayor variación de peso en los ladrillos.

Entonces, mediante el análisis de las secuencias obtenidas luego de la amplificación de una sección específica del ARNr fue posible reafirmar la identificación taxonómica de los aislados seleccionados. Las secuencias se cargaron en la base de datos de GenBank. Además, los números de acceso: MN371394, MN371392, MN371276, MN371283 y MT071822 se asignaron a *C. sphaerospermum*, *P. commune*, *A. niger*, *L. theobromae* y *A. spectabile*, respectivamente.

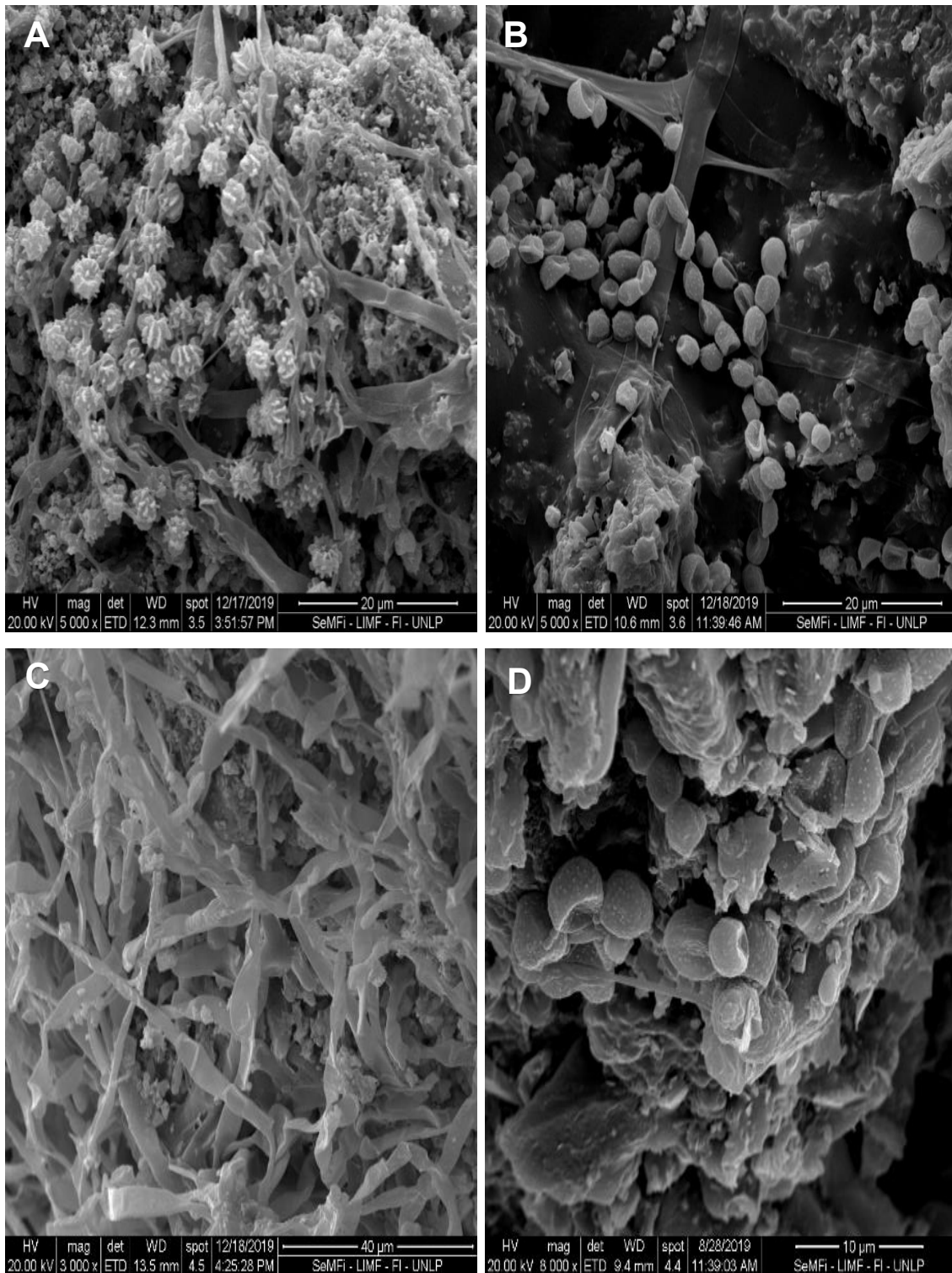
El análisis de clúster muestra la relación entre las especies con mayor actividad de biodeterioro (Figura 2.11). En el árbol filogenético, los números de izquierda a derecha al lado de cada nodo del clúster corresponden a los valores de bootstrap realizados usando 1000 repeticiones, y las ramas mostradas corresponden a valores de 95%, estando agrupados los hongos según su Familia. En particular, *P. commune* y *A. niger* pertenecen a Aspergillaceae. Sin embargo, *C. sphaerospermum*, *L. theobromae* y *A. spectabile* se encuentran dentro de Cladosporiaceae, Botryosphaeriaceae y Arthoniaceae, respectivamente. El análisis de UPGMA mostró un agrupamiento consistente de aislamientos, pero el filograma presentó un punto de divergencia donde *A. spectabile* y *L. theobromae* no compartían un ancestro común con el resto de las especies. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 1.76794872. El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las

mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Se eliminaron todas las posiciones con menos del 100% de cobertura del sitio. Hubo un total de 195 posiciones en el conjunto de datos final.



**Figura 2.11.** Análisis de clúster UPGMA de hongos aislados con mayor potencial de deterioro. Los números de Bootstrap que se muestran a la izquierda se obtuvieron utilizando 1000 repeticiones (95%). La escala horizontal indica el índice de disimilitud.

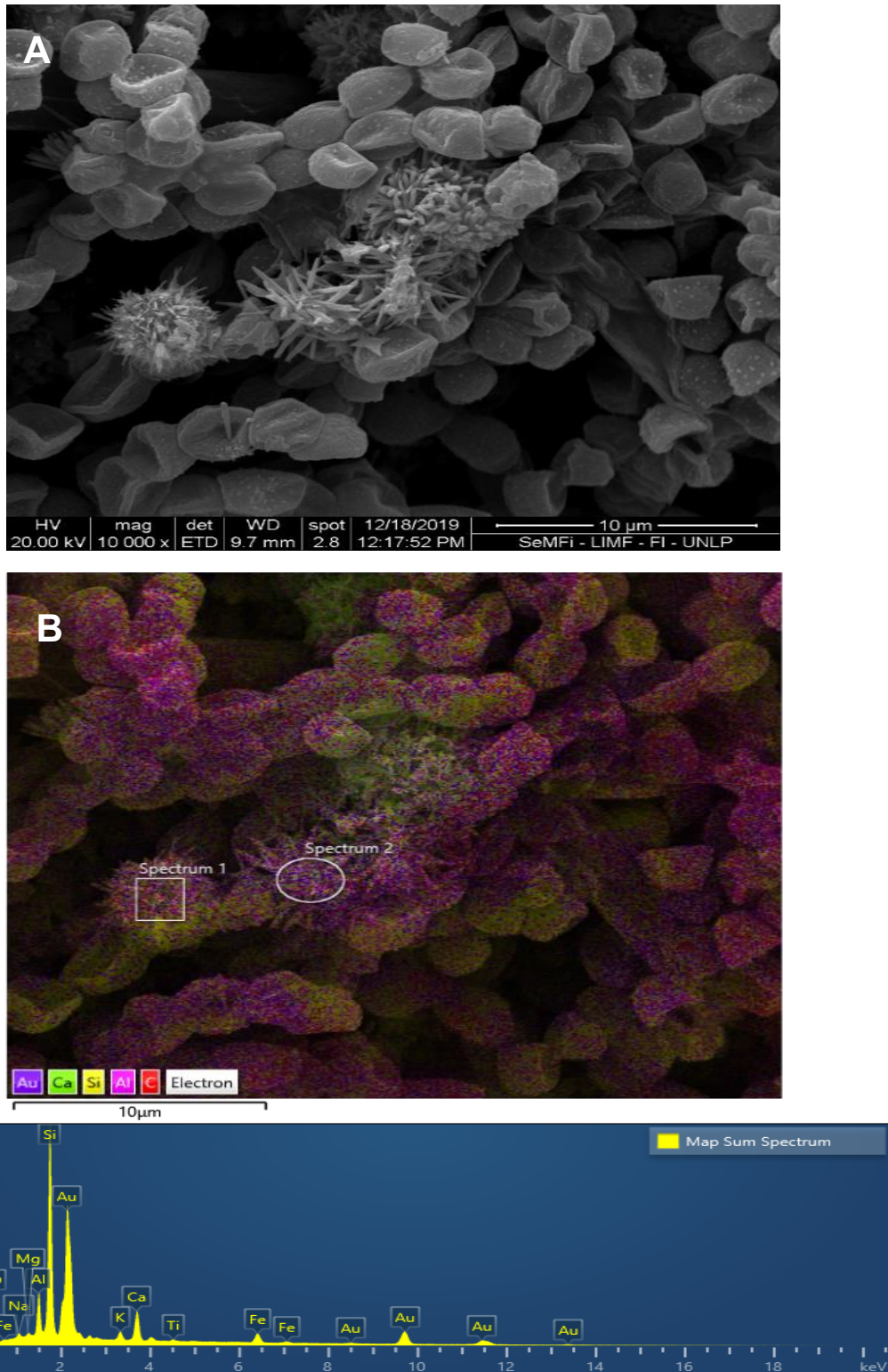
En la figura 2.12 se observan micrográficas de SEM de las cepas con mayor capacidad de biodeterioro según los resultados obtenidos a partir la frecuencia relativa de aparición y atributos deteriorantes. Se observaron numerosos filoconidios con ornamentaciones prominentes para el caso de *A. niger* y *P. commune* (Figura 2.12 A y B). En el caso de *C. sphaerospermum* se observaron abundantes hifas, las cuales pueden formar parte del micelio somático o reproductivo (Figura 2.12 C). Por último, conidios maduros con estriaciones longitudinales fueron observados en *L. theobromae* (Figura 2.12 D).



**Figura 2.12.** Cepas con mayor potencialidad deteriorante. A: *A. niger*, B: *P. commune*, C: *C. sphaerospermum* y D: *L. theobromae*. Micrografías de SEM.

En el estudio del deterioro fúngico también es importante el análisis superficial de los productos de biodeterioro como resultado de la interacción entre las sustancias de secreción del hongo filamentoso con los componentes

químicos del material estructural (ladrillo). En este sentido, en la Figura 2.13 se destaca mediante micrografía SEM, mapeo y espectro EDS la actividad deteriorante de *P. commune* sobre uno de los ladrillos inoculados.



**Figura 2.13.** *P. commune* sobre material cerámico. A: Micrografías SEM, B: Mapeo, C: Espectro EDS.

En la Figura 2.13 A se observan abundantes filioconidios con ornamentaciones junto a formaciones de morfología acicular. En el mapeo se muestra la distribución del calcio sobre la muestra (Figura 2.13 B) y la presencia de calcio y oxígeno se confirma en el espectro EDS (Figura 2.13 C) realizado sobre las formaciones estudiadas. En este espectro se observan intensos picos de oxígeno y calcio a los 0,5 y 3,7 keV, respectivamente. Estos resultados y el hecho de que se han reportado estructuras de morfología similar en el estudio sobre el rol de los hongos en la biomineralización de la calcita señalan que las formaciones observadas serían de oxalato de calcio (Bindschedler et al., 2016).

## Discusión

Teniendo en cuenta los hallazgos obtenidos en relación con los aislados fúngicos y las categorías ecológicas en estudio puede encontrarse similitudes con datos bibliográficos relevados. En tal sentido, cepas fúngicas similares fueron reportadas por Mallo et al., 2017 para la ciudad de La Plata en un estudio relacionado con la presencia de hongos transportados por el aire detectados por varios métodos de muestreo. Además, Negrin et al., 2007 informaron que *Cladosporium* sp. predominó en todas las muestras recolectadas, seguido por los géneros *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Epicoccum* en bioaerosoles de La Plata. De la misma manera, se reportaron hongos filamentosos en un estudio que evaluó el desarrollo de bioincrustaciones en superficies de mármol y mortero de varias criptas históricas con valor arquitectónico en el cementerio de La Plata (Guiamet et al., 2012).

Algunos de los aislamientos pueden ser potencialmente patógenos para los visitantes de CP y CIDEPINT. Como se menciona en la revisión de la literatura, los hongos filamentosos están asociados con problemas de salud humana como alergias, reacciones tóxicas e infecciones de las vías respiratorias superiores (Fatahinia et al., 2018). Algunas de estas especies están implicadas en el biodeterioro de materiales de construcción en todo el mundo (piedra, morteros, vidrio, mármol, etc.) por ejemplo, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium* (Hyvarinen et al., 2002; Cwalina, 2014; Guerra et al., 2019). Cabe destacar que, *L. theobromae*, *A. spectabile* y *Moniliella* sp., se detectaron y fueron reportadas por primera vez en concreto y ladrillos.

Existen variaciones entre el número de taxones y las categorías ecológicas para los sitios de muestreo (Figura 2.2). Estos resultados pueden deberse a parámetros relacionados con el clima exterior, la contaminación petroquímica y las diferencias en la composición química de los materiales. En este sentido, cerca de la ciudad de La Plata existen Plantas Petroquímicas ubicadas aproximadamente a 2.5 y 5 km de CIDEPINT y CP, respectivamente. En un trabajo relacionado con la contaminación petroquímica Wichmann et al., 2009 estudiaron los diferentes niveles de contaminantes. Los autores observaron que las concentraciones de hexano, ciclohexano, benceno y tolueno eran particularmente altas en la región industrial. En este sentido, la presencia de estos contaminantes podría influir en la microbiota encontrada en los sitios de muestreo, con mayor impacto en el CIDEPINT debido a la mayor proximidad a Plantas Petroquímicas.

Por otro lado y referido al clima exterior se ha informado de acuerdo con los datos meteorológicos obtenidos del Observatorio Astronómico de La Plata para 2017, que la primavera y el otoño son estaciones de transición, con temperaturas cálidas durante el día y temperaturas frescas durante la noche (Diulio et al., 2019). Estas temperaturas pueden variar significativamente, algunos días registrando valores superiores a 32 °C mientras que en otros pueden resultar inferiores a 0 °C. Debido a su ubicación cercana al río con vientos provenientes de este sector, la ciudad es bastante húmeda con promedio mensual superior al 75%.

La Plata recibe 1092 mm de precipitación anual, siendo los inviernos los meses más secos y el verano los más húmedos. Estas condiciones climáticas también pueden influir en la presencia de estas cepas en los lugares de muestreo. Por ejemplo, dependiendo de la actividad acuosa del material, prevalecen ciertas especies. En este sentido, los colonizadores secundarios (tales como, *Cladosporium*, *Phoma*, *Ulocladium* y *Alternaria*) y terciarios (por ejemplo, *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Auraeobasidium* y *Stachybotrys*) requieren una mayor actividad de agua en su crecimiento (Nielsen et al., 2004). Teniendo en cuenta los datos antes mencionados relacionados con la ciudad de La Plata que evidencian altos niveles de humedad a lo largo del año, se puede observar una correlación con los resultados obtenidos ya que el género *Cladosporium*

clasificado como colonizador secundario fue predominante en todas las muestras seguido de otros dos con la misma clasificación (*Alternaria* y *Epicoccum*).

Por último, existen diferencias entre la composición química del concreto y el ladrillo. El concreto es un material compuesto formado por cemento, agregados y aditivos (Makul, 2020). Sin embargo, el ladrillo es un material cerámico compuesto generalmente de óxido de hierro, calcio y magnesio (Coutinho et al., 2019). Por lo tanto, las diferencias en la estructura y composición de los materiales también pueden influir en la abundancia y frecuencia relativa de las especies en los sitios de muestreo.

En cuanto a los atributos deteriorantes ha sido reportado que principalmente cepas de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son capaces de disolver calcita (Unković et al., 2018). Es importante tener en cuenta que la degradación de calcita depende de varios factores, principalmente, de las fuentes disponibles de carbono y nitrógeno, por lo que no podemos predecir la actividad de especies aisladas *in vivo* (Ponizovskaya et al., 2019).

La disminución del pH en el MML puede estar relacionada con la secreción de ácidos orgánicos por los hongos en el medio circundante. Esto está en concordancia con datos bibliográficos que señalan que la secreción de una gran variedad de ácidos orgánicos (oxálico, oxalacético, cítrico, glucónico, oxoacético y fumárico) por diferentes hongos, los convierte en agentes altamente deteriorantes de minerales y rocas (Gilbert and Stephens, 2018; Schumacher and Gorbushina, 2020). Los ácidos orgánicos consiguen formar complejos con iones de calcio, aluminio, hierro, manganeso, silicio y magnesio contribuyendo aún más a la degradación del material (Guiamet et al., 2012; Sazanova et al., 2014).

Por otro lado, la secreción de pigmentos está estrechamente relacionada con el deterioro estético porque puede cambiar la coloración normal de los materiales de construcción. En este sentido, se ha reportado que *E. nigrum* tiene micelio aéreo pigmentado con estructuras reproductivas y su proliferación puede contribuir a alteraciones estéticas en las catedrales (Trovão et al., 2019). Este daño también puede ser causado por otros hongos dematiáceos, por ejemplo *L.*

*theobromae*. Sin embargo, no solo la secreción de pigmento puede provocar un deterioro visual, sino también el desarrollo extenso de micelio también causa deterioro físico-químico.

Los pigmentos protegen a los hongos contra muchos factores de estrés ambientales físicos y químicos (altas temperaturas, daño del ADN, acumulación de especies reactivas de oxígeno, desecación y estrés osmótico). Por ejemplo, la captura y / o la energía de radiación reflejada por los pigmentos tiene múltiples funciones biológicas que van desde el camuflaje hasta funciones fundamentales en el mantenimiento de la vida, incluido el aprovechamiento de la energía solar para uso metabólico y la protección contra los daños por radiación (Cordero and Casadevall, 2017). Además, algunos pigmentos, como la melanina, pueden reforzar la pared celular y aumentar la virulencia de hongos patógenos en plantas y animales, reduciendo su susceptibilidad a los biocidas (Chamilos et al., 2016). Otro estudio sostiene la idea de que los pigmentos se relacionan con el desarrollo de biopelículas. Los Dothideomycetes y Eurotiomycetes que habitan en rocas tienen el mismo número de fotorreceptores y el mismo conjunto de pigmentos protectores. Esto sugiere que la fotopercepción y la regulación son importantes para que los hongos reciban nutrientes a través de la cooperación con los fotótrofos (Schumacher and Gorbushina, 2020).

Por su parte, *L. theobromae* y *A. spectabile* presentaron los valores más altos en la variación del peso del ladrillo *in situ*. La humedad relativa es un factor abiótico, que no solo puede influir en el crecimiento de los hongos, sino que también puede provocar modificaciones en las propiedades mecánicas de los ladrillos (Sathiparan and Rumeskumar, 2018). Por primera vez, se encontró que estas especies tenían capacidad de biodeterioro.

Las agrupaciones formadas en el PCA son multifactoriales ya que las cepas pueden tener similitudes en su taxonomía y ecología. Sobre todo, si las variables analizadas en este estudio son caracteres diagnósticos suficientes para estos hongos. Así, los aislados que están en el mismo grupo pueden tener las mismas estrategias de crecimiento y ecológicas, compartir los mismos nichos ecológicos y utilizar el mismo sustrato.



Del mismo modo, se ha informado que cepas pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus* se aislaron en material cerámico arquitectónico (Coutinho et al., 2015). Estos dos últimos son considerados como colonizadores primarios del sustrato y estrategias r. Por otro lado, las especies de *Alternaria* y *Cladosporium* son colonizadores secundarios de los sustratos y fueron catalogadas como estrategias K (Jeschke et al., 2019). Estas características relacionadas con la biología de los aislados pueden ser las condiciones que favorezcan su participación en el biodeterioro de los materiales de construcción. Las hifas pueden penetrar los poros de estos materiales y además de causar daño físico, pueden facilitar la colonización de otras especies. Entonces, es necesario proteger las construcciones edilicias de donde se aislaron las especies. Esta protección puede realizarse mediante la aplicación de recubrimientos antifúngicos sobre los materiales para controlar el biodeterioro, tema abordado en los siguientes capítulos.

Los resultados indican que el estudio de la microbiota, que interviene en el biodeterioro de los materiales de construcción en función de su ecología y atributos de deterioro, puede contribuir a realizar posteriormente estudios enfocados a la protección del ladrillo y el concreto. A pesar de estos resultados prometedores, se deben realizar más investigaciones que puedan abordar el estudio de los hongos en consortium y el efecto de la competencia entre las cepas. En este sentido, sería interesante estudiar el crecimiento combinado de estas cepas y su efecto sobre el deterioro de los materiales.



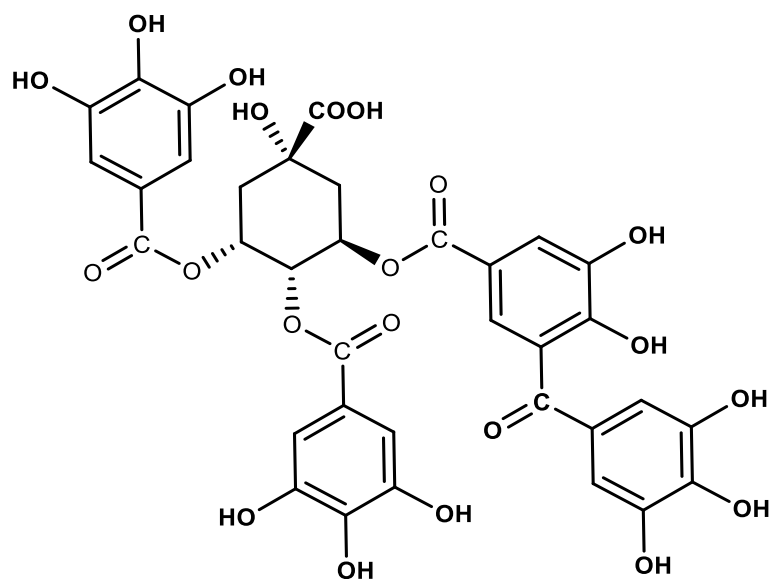
**Capítulo 3**

**Actividad antifúngica de recubrimientos con  
nanoaditivos obtenidos a partir de tanino de  
*Caesalpinia spinosa***

## Introducción

Los fitoquímicos como polifenoles, alcaloides, esteroides, terpenoides y saponinas, exhiben propiedades intrínsecas a su función biológica (Pethakamsetty et al., 2017; Kumar et al., 2019). Los polifenoles, componentes principales de los taninos, son importantes dado que forman parte del sistema de defensa de las plantas y se encuentran principalmente en sus frutos, semillas, flores y cortezas (Ping et al., 2012; Teng et al., 2019). Las propiedades químicas únicas del tanino han llevado a su amplio uso como colorante alimentario, antioxidante, agente de tratamiento de aguas residuales, adsorbente de metales y a su aplicación en el curtido de cuero (Braga et al., 2018; Pinela et al., 2019). En comparación con los metales y los agentes curtientes sintéticos, el tanino vegetal tiene las ventajas de ser renovable, ecológico y seguro de usar (Guo et al., 2020).

*Caesalpinia spinosa*, conocido como árbol de “tara”, es un pequeño árbol espinoso que se encuentra frecuentemente en las zonas áridas de América del Sur y se caracteriza por sus vainas que contienen una alta cantidad de polifenoles, superior al 40% (Cordero et al., 2016). El tanino de “tara” (TT) a diferencia de otros taninos comerciales puede ser obtenido de forma sustentable a partir de las vainas que produce el árbol permitiendo conservar los ejemplares correspondientes. Los pobladores de las zonas donde abunda este espécimen han practicado la recolección artesanal de las vainas desde la antigüedad. Los componentes principales del TT son polifenoles hidrolizables basados en una estructura química básica donde el ácido quínico se encuentra unido al ácido gálico mediante uniones del tipo éster, por lo tanto, se los puede clasificar dentro de los denominados galotaninos (Spennati et al., 2019). En la Figura 3.1 como ejemplo se muestra parte de la estructura química que puede encontrarse en los polifenoles que componen el TT.



**Figura 3.1.** Estructura química básica que puede encontrarse en los polifenoles que componen el tanino de “tara”. Tomado de Bellotti et al., 2012a.

Los polifenoles, como los presentes en el TT, poseen propiedades antioxidantes que podrían atribuirse a su capacidad para donar átomos de hidrógeno, electrones y ser agentes quelantes fuertes (Badhani et al., 2015; Odeniyi et al., 2020). Esto resulta prometedor en la biorreducción de iones metálicos para obtener NPs con actividad antimicrobiana (Valsalam et al., 2019). La actividad antimicrobiana de las NPs como las de Ag o Cu, se atribuye en gran medida a la interacción de estas con grupos tiol o amino presentes en biomoléculas.

Por tanto, en este capítulo se describe el uso de tanino de *Caesalpinia spinosa* en la síntesis de NPs antifúngicas utilizando soluciones acuosas de sal de plata y cobre. Posteriormente, se emplearán los nanoaditivos más activos en la formulación de recubrimientos funcionalizados para controlar el deterioro fúngico de materiales. El TT utilizado para la síntesis de NPs fue obtenido de forma comercial por la empresa Indunor. Las NPs fueron caracterizadas mediante espectrofotometría UV-visible, microscopia electrónica de transmisión, microscopia electrónica de barrido, mapeo y espectroscopia de rayos X y espectroscopía FTIR. La actividad antifúngica de las NPs en suspensión se determinó mediante método de difusión en agar (Kirby-Bauer) e inhibición del crecimiento fúngico en el ensayo de macrodilución sobre *Aspergillus niger*

MN371276, *Penicillium commune* MN371392, *Cladosporium sphaerospermum* MN371394 y *Lasiodiplodia theobromae* MN371283. En la formulación del recubrimiento sol-gel funcionalizado con NPs antimicrobianas se empleó 3-aminopropil trietoxisilano y mercaptopropiltrimetoxisilano. Los recubrimientos de silano se caracterizaron mediante determinación de ángulo de contacto, absorción de agua y prueba de resistencia fúngica.

## **Materiales y métodos**

### **Biosíntesis y caracterización de las nanopartículas**

Las nanopartículas se obtuvieron a partir de soluciones acuosas de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  a las que se añadió la solución de TT en constante agitación durante 30 min. Se utilizaron tres concentraciones de TT: 500, 1000 y 2000 ppm, las cuales se prepararon con el producto tal y como se suministró de forma comercial por la empresa Indunor (Figura 3.2). La concentración final de las sales en el sistema de síntesis fue de  $10^{-2}$  M en ambos casos. Este proceso se realizó a  $60^\circ\text{C}$  y el pH se ajustó a 7 con una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Deyá and Bellotti, 2017).



**Figura 3.2.** Tanino de *Caesalpinia spinosa* o árbol de “tara”

Por otro lado, se determinó la concentración de polifenoles totales en la solución acuosa de TT mediante espectrofotometría UV-visible utilizando el reactivo de Folin Denis (FD) y ácido tánico (AT) como patrón (Bellotti et al., 2012a). El resultado es expresado como polifenoles totales (PT).

La estabilidad en el tiempo de las suspensiones de NPs se evaluó mediante espectroscopía UV-visible (UV-vis) realizada en diferentes momentos: 24 horas, 1 mes y 3 meses. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro UV SP2000. Se aplicó Microscopia electrónica de transmisión (TEM por su sigla en inglés) para confirmar la obtención de las nanopartículas, observar su morfología y el tamaño de la partícula. El equipo utilizado fue un JEOL 100 CXII a una tensión de aceleración de 100 KV.

Las NPs se purificaron mediante lavados sucesivos utilizando una microcentrífuga DLAB D3024R a 15000 rpm durante 20 min a 20 °C. Las NPs purificadas fueron observadas mediante microscopía SEM, se les realizaron mapeos y el análisis superficial correspondiente mediante espectroscopía de rayos X por dispersión de energía (EDS por su sigla en inglés). Las observaciones y análisis se realizaron a bajo vacío, el equipo utilizado fue un FEI Quanta 200 Philips.

Las NPs purificadas también fueron analizadas mediante el espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR por su sigla en inglés). Se siguió la metodología del disco de KBr y se utilizó un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum One. El análisis de los espectros se realizó mediante el programa KnowItAll® Informatics System, Versión: 10.0.18362.

### **Actividad antifúngica de las nanopartículas en suspensión**

Los ensayos microbiológicos fueron realizados utilizando las cepas aisladas y seleccionadas debido a sus atributos biodeteriorantes estudiados en el Capítulo 2: *Aspergillus niger* MN371276, *Penicillium commune* MN371392, *Cladosporium sphaerospermum* MN371394 y *Lasiodiplodia theobromae* MN371283. La actividad antifúngica de las Nps en suspensión se determinó mediante dos pruebas: método de difusión en agar (Kirby-Bauer) e inhibición del crecimiento fúngico en el ensayo de macrodilución (Fernández et al., 2020).

En el caso de la prueba de Kirby-Bauer, se colocaron discos de papel de 6 mm con las suspensiones de NPs sobre 15 mL de Agar extracto de malta (MEA) inoculado con 200 mL de una solución de esporas ( $10^5$  esporas/mL). El ajuste de la concentración de esporas en solución se realizó mediante el empleo de una cámara de Neubauer. Se usó solución fisiológica como control negativo mientras que el control positivo fue una solución de sal de amonio cuaternario ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$ ) con una concentración de 3 mg/mL. El período de incubación fue de 48 horas y la temperatura se reguló a 28 °C. El diámetro (D) de la zona de inhibición alrededor de cada disco se registró utilizando un calibre digital. Por lo tanto, la muestra analizada se consideró positiva cuando D era mayor o igual a 6 mm y negativa cuando D era menor de 6 mm.

Para el método de macrodilución, se determinó el crecimiento de hongos mediante la medición de los diámetros de las colonias (mm). Se adicionó suspensión de NPs en placas de Petri con MEA, de manera que las diluciones finales tuvieron una concentración de 10, 50 y 167  $\mu\text{g/mL}$ . Como control, se utilizaron placas de Petri sin NPs (0  $\mu\text{g/mL}$ ) con MEA. Posteriormente, las placas se inocularon en el centro con 20  $\mu\text{L}$  de suspensión a  $10^5$  esporas/mL y se incubaron durante 7 días a 28 °C. La prueba se realizó por triplicado.

### **Formulación y caracterización de los recubrimientos sol-gel**

El ladrillo comercial utilizado fue caracterizado mediante la determinación de absorción de agua, densidad y porosidad, siguiendo los procedimientos estandarizados correspondientes: IRAM 12588, IRAM 12593 y ASTM C642, respectivamente. El recubrimiento sol-gel funcionalizado con NPs fue preparado para ser aplicado en la protección de ladrillos comerciales. El procedimiento utilizado y el ajuste de las condiciones de preparación del recubrimiento sol-gel fueron estudiadas en un trabajo previo (Gámez-Espinosa et al., 2020). Se emplearon dos precursores: 3-aminopropil trietoxisilano (AMEO) y 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MTMO) (Camsi-X, usado como se suministra). Tanto el AMEO como el MTMO se agregaron en una concentración de 2% (v/v). El precursor se añadió al sistema en una proporción de 0,9 ml de etanol + 0,06 mL de NPs + 0,02 mL de AD + 0.02 mL de silano por cada mL de solución. El pH se ajustó previamente a 4 con  $\text{HNO}_3$ . Se usó AD como control para reemplazar

las suspensiones de NPs. El tiempo de hidrólisis fue de una hora, luego del cual, las muestras estudiadas (ladrillos de  $4,0 \pm 0,4 \text{ cm}^3$ ) se trataron por inmersión durante 90 segundos en las soluciones preparadas y se secaron a temperatura ambiente durante dos semanas. Después de esto, se evaluó la actividad antifúngica de los recubrimientos.

Los recubrimientos de silano se caracterizaron mediante determinación de ángulo de contacto y absorción de agua. El ángulo de contacto se midió colocando una gota de AD con una pipeta Pasteur sobre cada una de las muestras estudiadas. La imagen de cada gota fue registrada mediante un microscopio digital Gaosuo y el ángulo de contacto fue determinado mediante el software Gaosuo (Koch and Barthlott, 2009). Para la determinación de absorción de agua, los ladrillos fueron colocados en un desecador con sílica gel hasta peso constante (3 días aproximadamente). Luego, se pesaron en una balanza analítica y posteriormente se colocaron en cámara de humedad a 100%.

Durante el primer ciclo se registraron valores de peso a diferentes tiempos durante 11 días. En el segundo ciclo, nuevamente se pasaron a un desecador con sílica gel durante 3 días y se colocaron en cámara de humedad a 80% por 5 días. Para lograr este valor de humedad, en la cámara se añadió una solución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y la temperatura se mantuvo entre  $20\text{-}25^\circ\text{C}$ . Después se pasan a desecador durante 10 días hasta peso constante. Finalmente, otra vez a humedad 100% durante 4 días (tercer ciclo). En todos los casos, los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizaron ladrillos sin tratar como controles.

### **Prueba de resistencia fúngica del recubrimiento sol-gel**

La actividad antifúngica de los recubrimientos funcionalizados con Nps se evaluó siguiendo los lineamientos de la norma ASTM 5590 (“ASTM D5590 Standard Test Method for Determining the Resistance of Paint films and Related Coatings to Fungal Defacement by Accelerated Four-Week Agar Plate Assay (West Conshohocken, PA: ASTM International),” 2010).

Las muestras se inocularon con 50  $\mu\text{L}$  solución de esporas ( $10^5$  esporas/mL) y se colocaron en placas de Petri con Agar Mineral Mínimo (MMA). El período de incubación fue de 30 días a  $28^\circ\text{C}$ . El crecimiento de hongos observado en las muestras se clasificó según el porcentaje del área cubierta (%). Las muestras sin



crecimiento (0%), crecimiento escaso (<10%), ligero (10-30%), moderado (30-60%) e intenso (60-100%) se evaluaron como 0, 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Finalmente, las muestras se observaron mediante microscopio estereoscópico (Leica S8 APO) SEM (Philips FEI Quanta 200) y se tomaron los registros fotográficos correspondientes.

Para la observación en SEM, las muestras fueron preparadas siguiendo la metodología propuesta por Simões et al., 2013. En primer lugar, fueron sumergidas en una solución de glutaraldehído al 2,5 % en Buffer fosfato salino (PBS). En la preparación de del PBS, por cada litro de AD se añadieron 8g de NaCl, 0,14 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0,9 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Posteriormente, para la deshidratación, estas fueron embebidos en soluciones de etanol al 20, 50, 70, 90 y 100% durante 30 min en cada solución. No fue necesario aplicar el secado por el método del punto crítico y finalmente se aplicó metalizado con oro. Las condiciones de trabajo fueron en alto vacío ( $10^{-6}$  torr).

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de la medida del diámetro de la colonia se realizó con el programa RStudio 1.1.463®. La distribución de probabilidad se analizó con la prueba de distribución normal. Se realizó un ANOVA de un factor y posteriormente se aplicó la prueba de Tukey. El factor incluido fue la concentración de nanopartículas. Las pruebas utilizadas se aplicaron mediante el paquete multcomp.

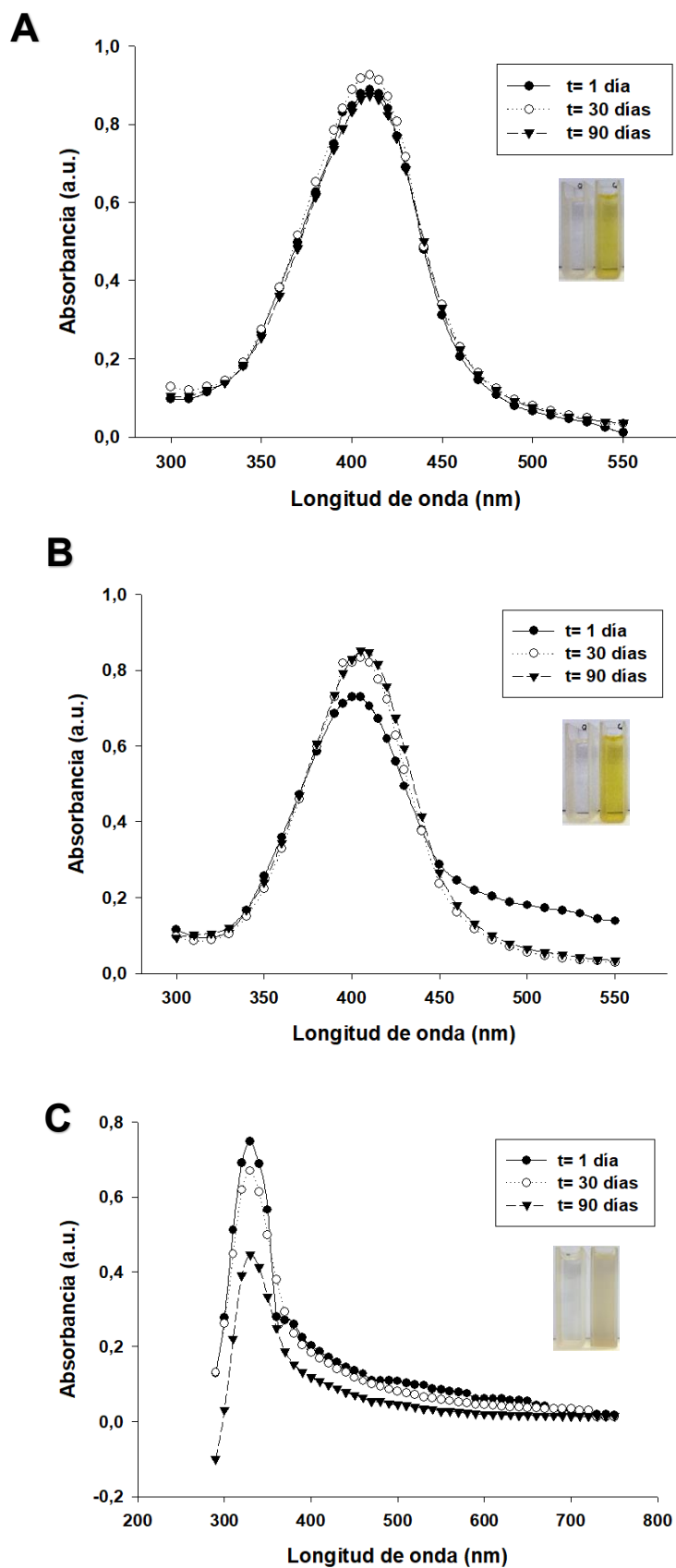
## Resultados

### Biosíntesis y caracterización de las nanopartículas

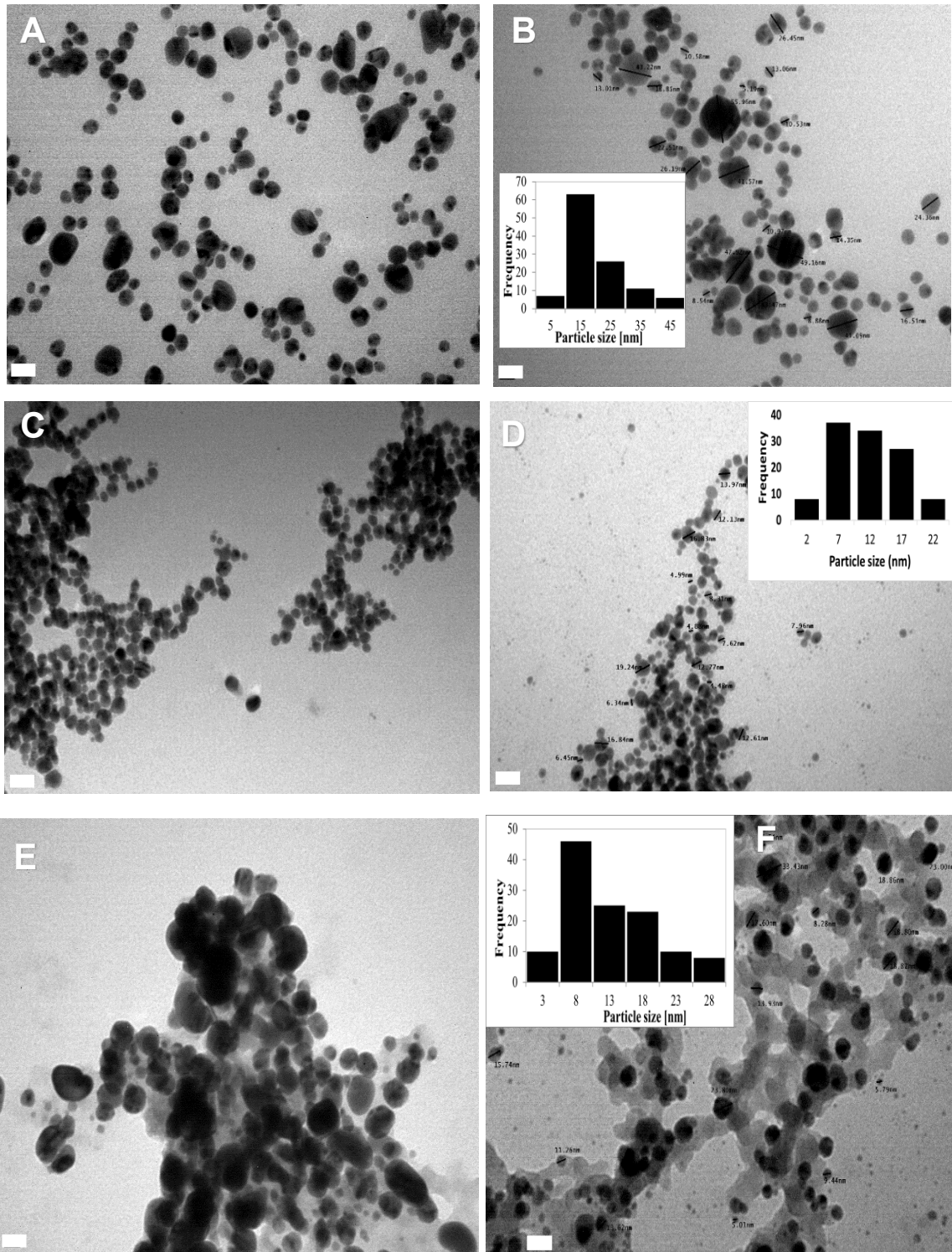
Con el método de biosíntesis propuesto, fue posible obtener NPs estables mediante el uso de TT y soluciones acuosas de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ . Los espectros UV-visible y las micrografías TEM e histogramas de la distribución de tamaño de los NPs estables en suspensión se muestran en la Figura 3.3 y 3.4, respectivamente.

La espectrofotometría UV-visible permite constatar en forma rápida la aparición de bandas de absorción característica producidas por las NPs en suspensión. Estas bandas se atribuyen a la excitación colectiva de los electrones superficiales de las NPs. De esta forma la reducción de los iones metálicos produce soluciones de color característico con bandas de absorción propias de cada NP (Valodkar et al., 2011).

Luego mediante TEM es posible corroborar la obtención de las NPs correspondientes, además, de determinar el tamaño promedio y la morfología correspondiente. Los productos obtenidos a partir de la solución de  $\text{AgNO}_3$  y TT a 1000 y 500 ppm fueron denominados como Ag1NPT y Ag5NPT, respectivamente. La suspensión obtenida con la solución de TT de 2000 ppm resultó inestable precipitando a las 24h. Por otro lado, con la solución de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y TT, solo se observó la aparición de una banda de absorción cuando la concentración de TT fue de 2000 ppm (CuNPT).



**Figura 3.3.** Espectros UV-visible de las Nps obtenidas a partir de TT. A: Ag1NPT, B: Ag5NPT y C: CuNPT.



**Figura 3.4.** Micrografías TEM e histogramas del análisis de distribución de tamaño de Nps obtenidas a partir de TT. A y B: Ag1NPT. C y D: Ag5NPT. E y F: CuNPT. La barra en cada micrografía corresponde a 20 nm y amplificación 270000x.

Las Figura 3.3 muestra los espectros UV-visible de Ag1NPT, Ag5NPT y CuNPT. En el caso de los espectros de las AgNPs se observó un pico máximo

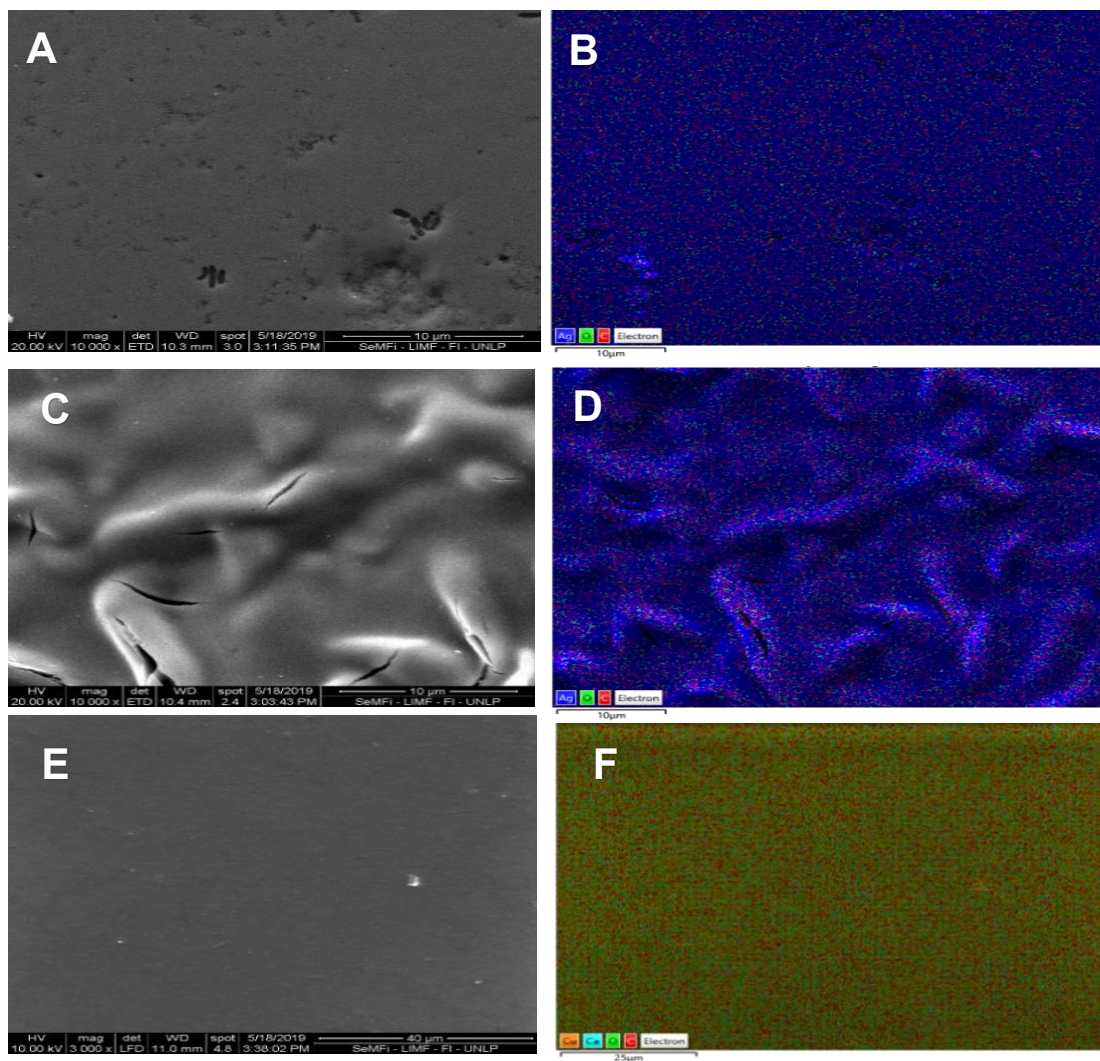
de absorción entre 400 y 410 nm que se mantiene en el tiempo, pero aumenta en intensidad para Ag5NPs (Figura 3.3 A y B). Este tipo de banda de absorción es característica y corresponde a la resonancia plasmónica superficial (RPS) de las NPs. En el caso de las NPs de Ag la longitud de onda del máximo de absorción observado en el presente trabajo es coincidente con la bibliográfica consultada (Shrivastava et al., 2007; Ider et al., 2017). A partir de estos hallazgos se pudo constatar la presencia de las NPs de Ag en ambas suspensiones. En el caso de CuNPT se puede ver un pico máximo aproximadamente a los 350 nm que se mantuvo estable en el tiempo, aunque presentando una disminución de intensidad a los 90 días (Figura 3.3 C). Esta banda correspondería a la RPS del óxido cuproso (Kerour et al., 2018).

Por otra parte, en la Figura 3.4 se observan las micrografías TEM de las NPs. Con las cuales se pudo constatar la morfología quasi-esférica exhibida por Ag1NPT (Figuras 3.4 A y B) y por Ag5NPT (Figuras 3.4 C y D). Además, Ag1NPT tienen la frecuencia de tamaño más alta en 15 nm y un tamaño medio de 20 nm mientras que, Ag5NPT mostraron una frecuencia más alta para tamaños más bajos con un tamaño promedio de 12 nm. En el caso de CuNPT, también presentaron una morfología quasi-esférica, lo cual puede observarse en las Figuras 3.4 E y F. En relación con el tamaño de estas NPs en promedio registraron un valor de 17 nm.

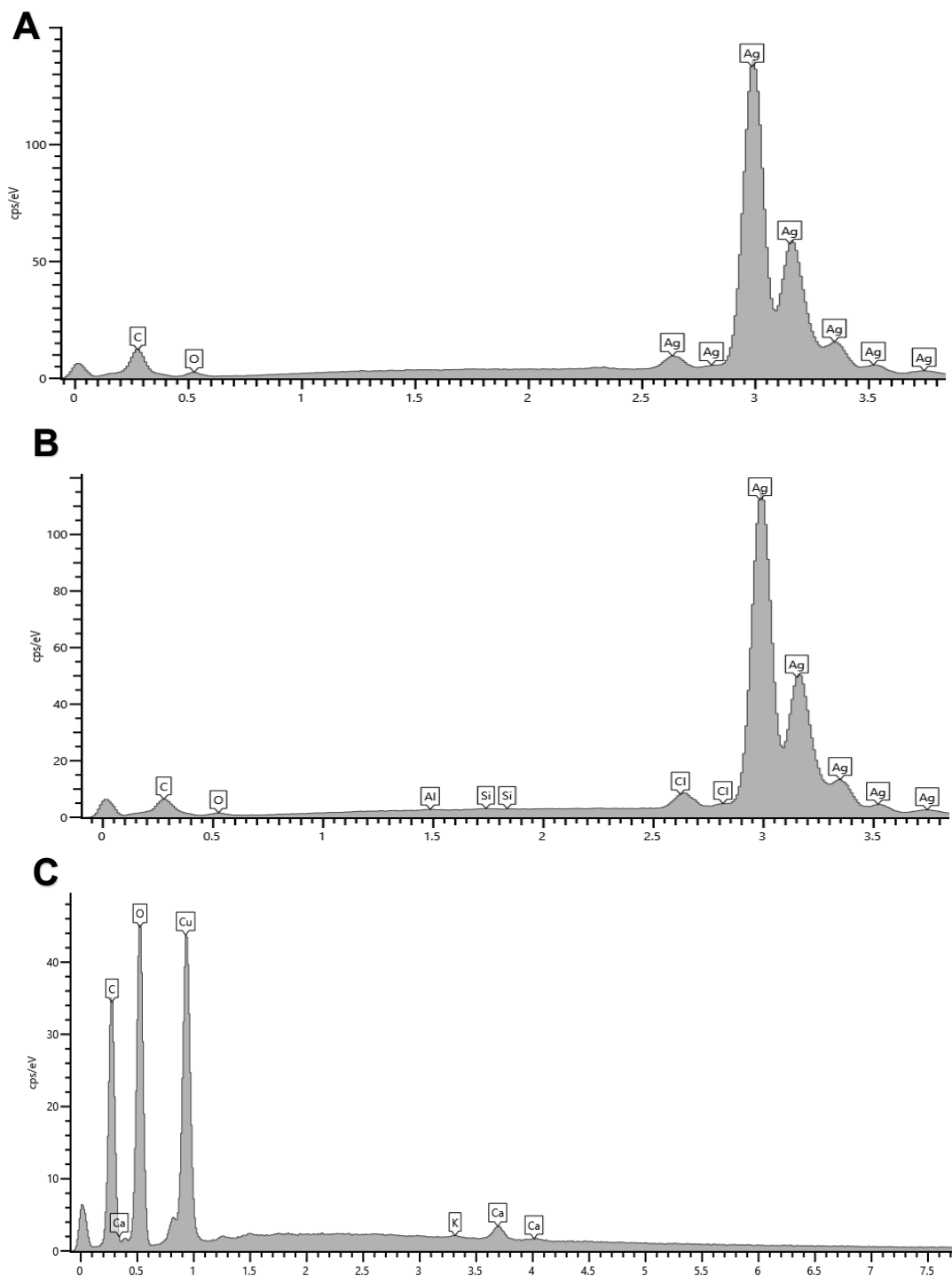
Otros métodos para la caracterización de las NPs son SEM, EDS y FTIR. En la Figura 3.5 se muestran las micrografías SEM y mapeos de las Nps obtenidas. En este sentido, Ag1NPT y Ag5NPT presentaron una disposición compacta (Figuras 3.5 A y C) y distribución uniforme como se observa en el mapeo (Figuras 3.5 B y D). La distribución uniforme de las nanopartículas puede depender de varios parámetros, por ejemplo: la disposición de las partículas durante la preparación de la muestra, su uniformidad morfológica, los tipos de electrones (detector de electrones secundarios) y las condiciones de trabajo (alto vacío). En el caso de CuNPT también presentaron una disposición compacta similar a las AgNPs y una distribución uniforme (Figura 3.5 E y F).

Asimismo, los espectros EDS de ambas AgNPs mostraron un pico resuelto a los 3 keV (Figuras 3.6 A y B) correspondiente a la Ag confirmando su presencia

en las NPs sintetizadas y reafirmando los resultados descritos por espectroscopía UV-vis y TEM. En el espectro EDS de CuNPT se observó la aparición de una señal intensa de oxígeno que corroboraría la presencia de óxido de cobre (Figura 3.6 C). Además, muestra un pico  $\sim 0,9$  keV correspondiente al Cu, confirmando la presencia de este elemento en las NPs obtenidas.



**Figura 3.5.** Micrográficas SEM y mapeos. A y B: Ag1NPT; D-F: Ag5NPT; G-I: CuNPT.



**Figura 3.6.** Espectros EDS: A: Ag1NPT. B: Ag5NPT. C: CuNPT.

La Figura 3.7 presenta los espectros FTIR del TT y las NPs purificadas. Los tres espectros muestran una banda ancha entre  $3600-3200\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del grupo O-H (enlaces de H intramoleculares) presente en los polifenoles. Los aumentos en la fuerza de los enlaces de H van acompañados de cambios a frecuencias más bajas de las bandas de absorción debido a la

vibración de estiramiento O-H, como se puede ver en el caso de TT (Singh et al., 2014). El pico a  $2922\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento simétrico del  $\text{CH}_2$  del anillo está más definido en el caso de las AgNPs.

El espectro TT presenta un pico definido y fuerte a  $1711\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento de los grupos carbonilos ( $-\text{C}=\text{O}$ ) presentes en los galotaninos. La desaparición de este pico en los espectros de ambos NPs podría estar relacionado con los mecanismos de reducción. En este sentido, la donación de electrones a partir de grupos carbonilo estaría relacionada con el cambio en su frecuencia de estiramiento (Bellotti et al., 2012a).

Los tres espectros presentan picos entre  $1623$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a grupos carboxilo en este tipo de polifenoles. Se pueden observar dos picos a  $1537$  y  $1448\text{ cm}^{-1}$  en el espectro TT que se corresponden con el estiramiento del enlace  $\text{C} = \text{C}$  del anillo aromático (Zmozinski et al., 2018). Estos picos se desplazaron hacia números de onda más bajos en el caso de los NPs.

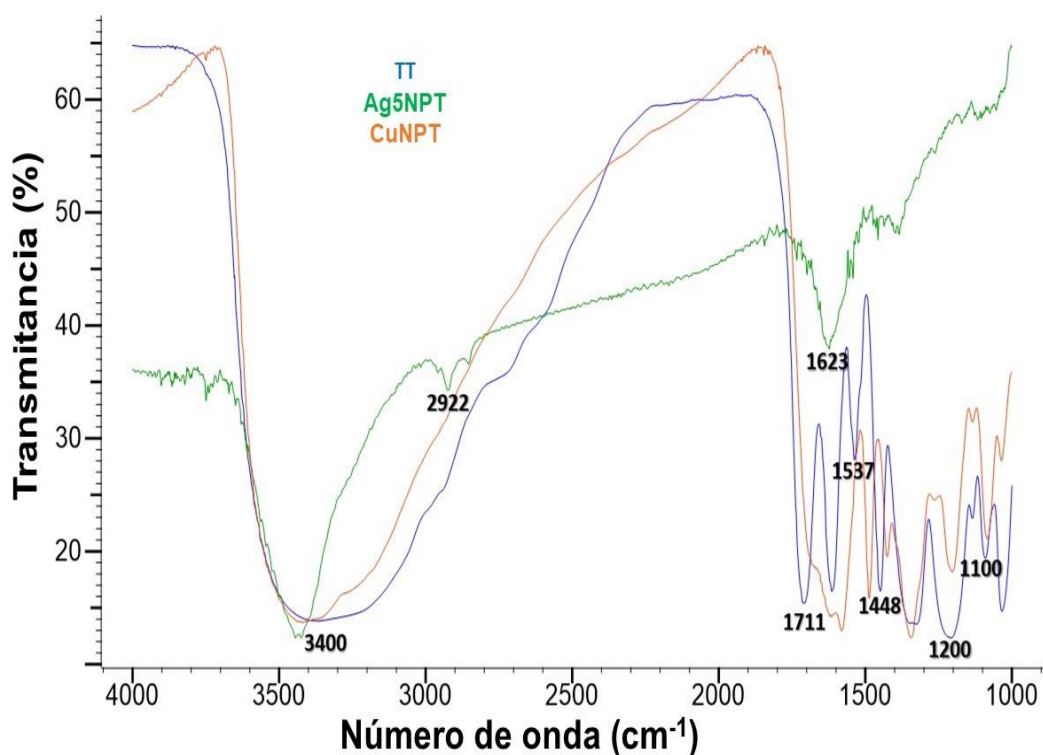


Figura 3.7. Espectros FTIR del tanino de *C. spinosa* (TT) y las NPs obtenidas.



En todos los casos, los picos a  $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$  y  $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la vibración de los enlaces fenólicos. Los espectros FTIR demostraron que los galotaninos están fuertemente asociados con las NPs purificadas.

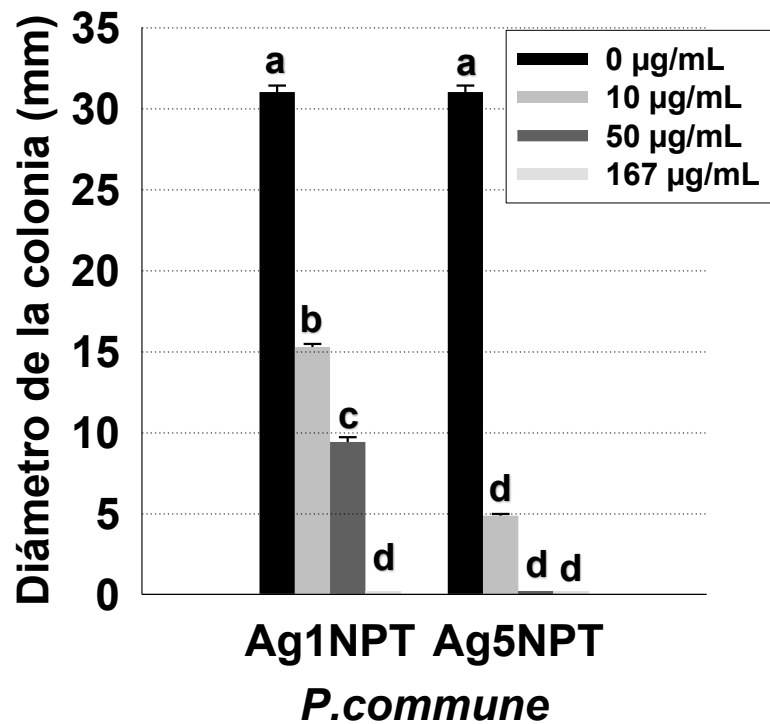
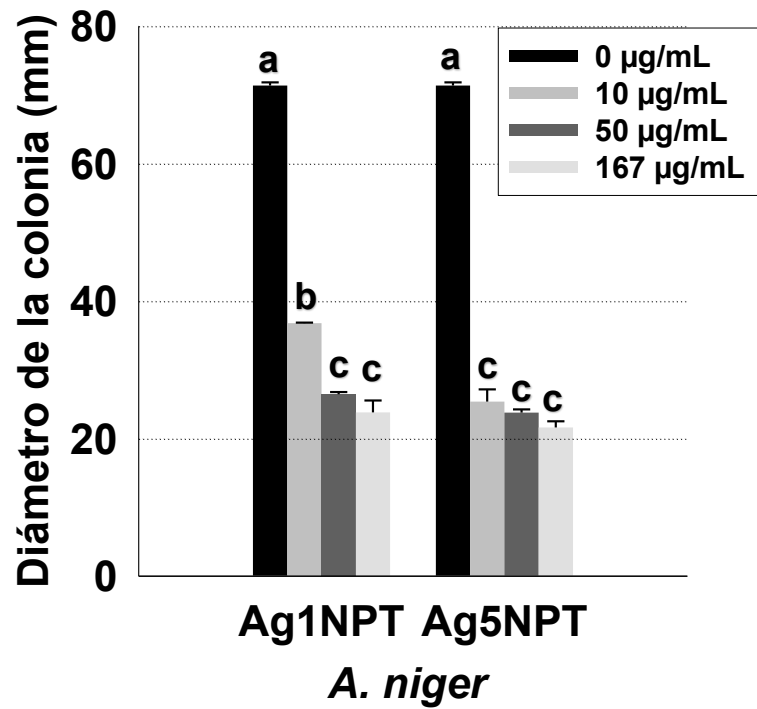
Estos resultados estarían indicando que los polifenoles intervienen en el mecanismo de síntesis. Los polifenoles presentes en el TT reducirían los iones metálicos para generar las NPs actuando como agentes reductores. Al mismo tiempo funcionan como estabilizantes verdes de las partículas en solución acuosa lo que explica la estabilidad de los sistemas obtenidos en el tiempo.

Por otro lado, la presencia de los polifenoles fue constatada mediante su determinación por espectrofotometría utilizando el reactivo de FD. La concentración de polifenoles totales en la solución de TT utilizada para la síntesis de Ag5NPT dio como resultado 287 mg/L. Esto corroboró la presencia de los polifenoles provenientes del tanino en el sistema de síntesis y el mecanismo propuesto.

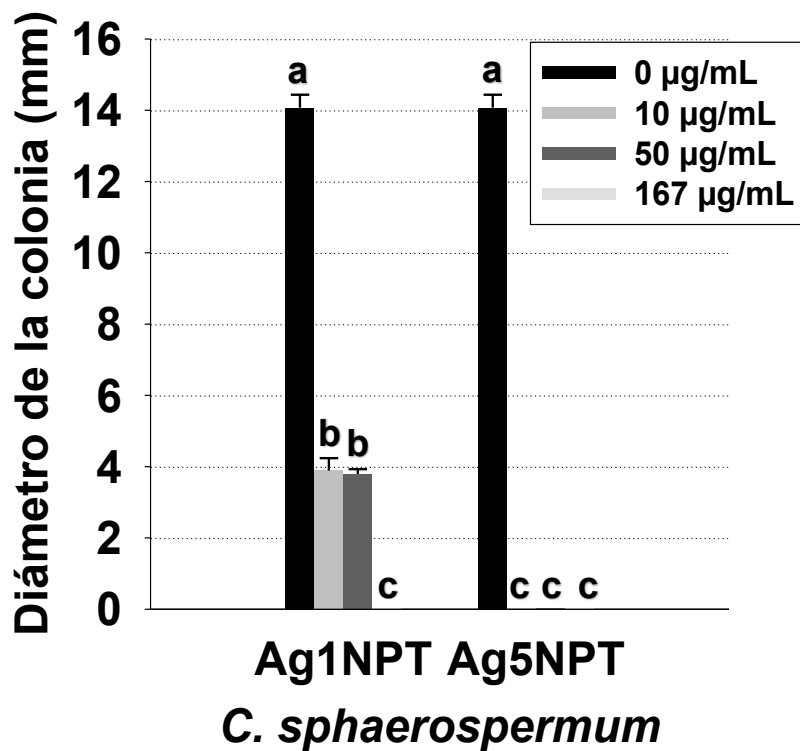
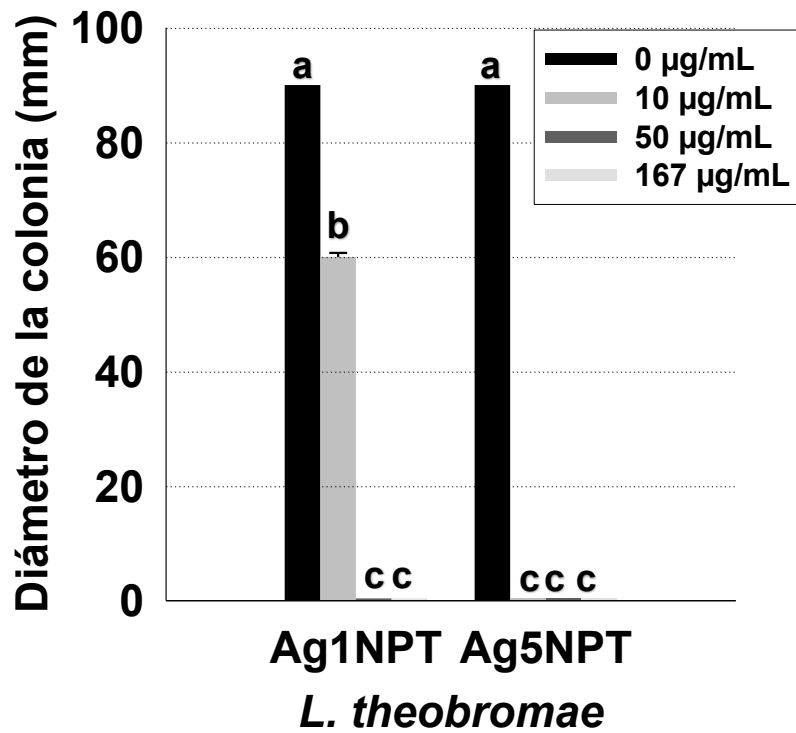
### **Actividad antifúngica de las nanopartículas**

El ensayo de difusión en agar mostró que solo las suspensiones de Ag1NPT y Ag5NPT tuvieron actividad antifúngica frente a todas las cepas estudiadas. Por esta razón, se seleccionaron estas suspensiones para continuar con el ensayo de macrodilución. Las Figuras 3.8 y 3.9 muestran el efecto de las NPs en el crecimiento micelial de las cepas. En la Figura 3.8 se puede ver que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los valores de diámetro de colonia de *A. niger* cuando la concentración de Ag1NPT y Ag5NPT fue de 10  $\mu\text{g/mL}$ .

En el caso de *P. commune*, *C. sphaerospermum* y *L. theobromae*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de Ag5NPT, indicando elevado efecto inhibitorio de estas NPs independientemente de la concentración utilizada. Por tanto, se demuestra una mayor actividad antifúngica de Ag5NPT con respecto a los Ag1NPT. Aunque no se observa inhibición total del crecimiento frente a *A. niger*, la relación entre el diámetro de la colonia y la concentración de Ag5Nps es inversamente proporcional.

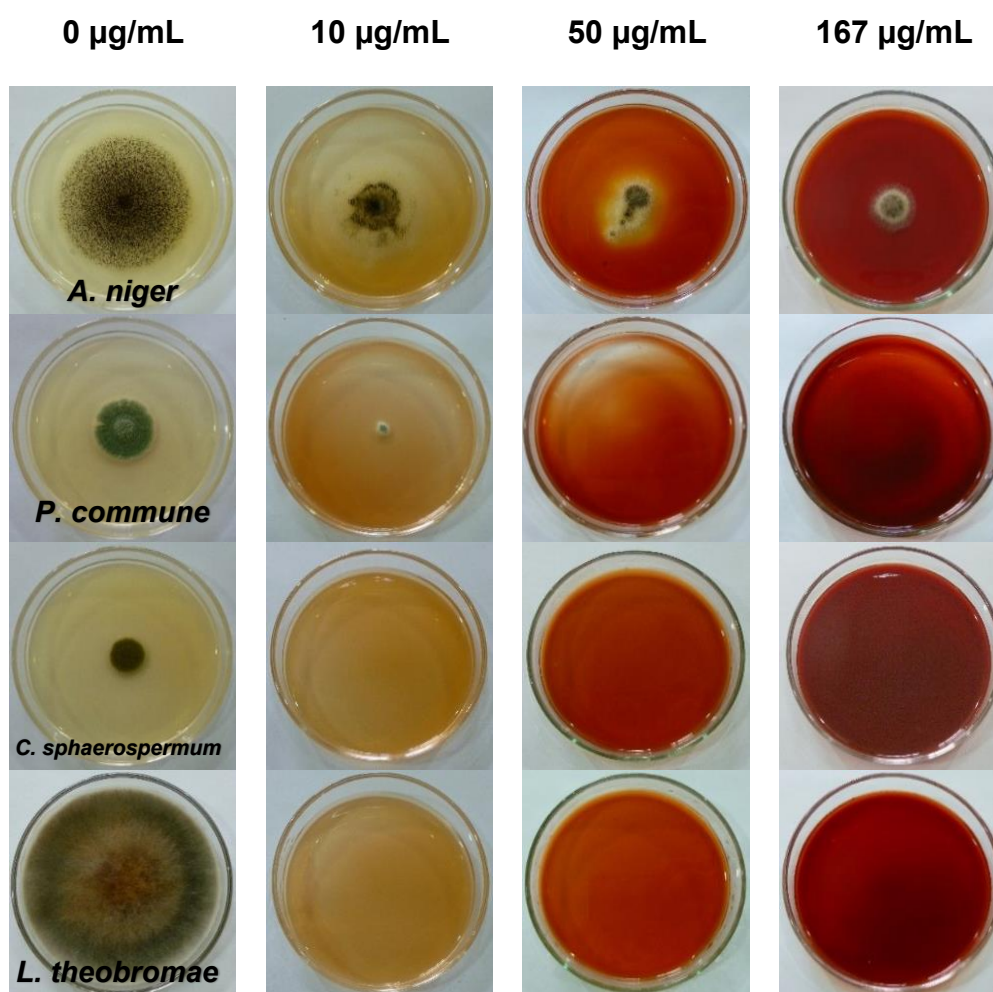


**Figura 3.8.** Medidas del diámetro de la colonia. Letras diferentes en barras indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) para la prueba de Tukey.



**Figura 3.8 (Continuación).** Medidas del diámetro de la colonia. Letras diferentes en barras indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) para la prueba de Tukey.

En los registros fotográficos que se encuentran en la Figura 3.9 se puede observar la inhibición total del crecimiento de *P. commune* en la placa a partir de la concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que en el caso de *A. niger* la inhibición, aunque no resultó total, sí presenta una relación dependiente de la concentración de las NPs en el sistema.



**Figura 3.9.** Efecto de las NPs sobre el diámetro de la colonia. Crecimiento de hongos en placa de Petri con MEA y Ag5NPT,  $t = 7$  días,  $T = 28^\circ \text{C}$ .

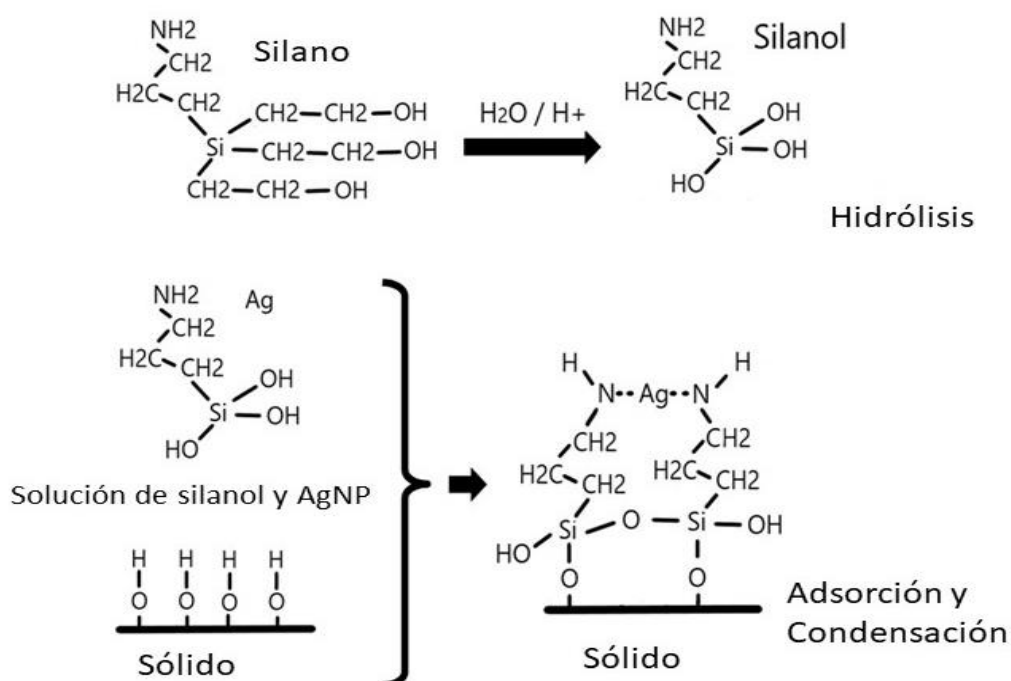
Por otro lado, no se observa crecimiento en las placas a partir de la menor concentración testada (10  $\mu\text{g/mL}$ ) frente a *C. sphaerospermum* y *L. theobromae*, mostrando estas cepas en comparación con *A. niger* y *P. commune* una mayor sensibilidad frente a las NPs. La menor sensibilidad exhibida por los

colonizadores primarios estudiados representaría una ventaja en los estadios iniciales del crecimiento sobre un material.

### Formulación y caracterización de recubrimiento sol-gel

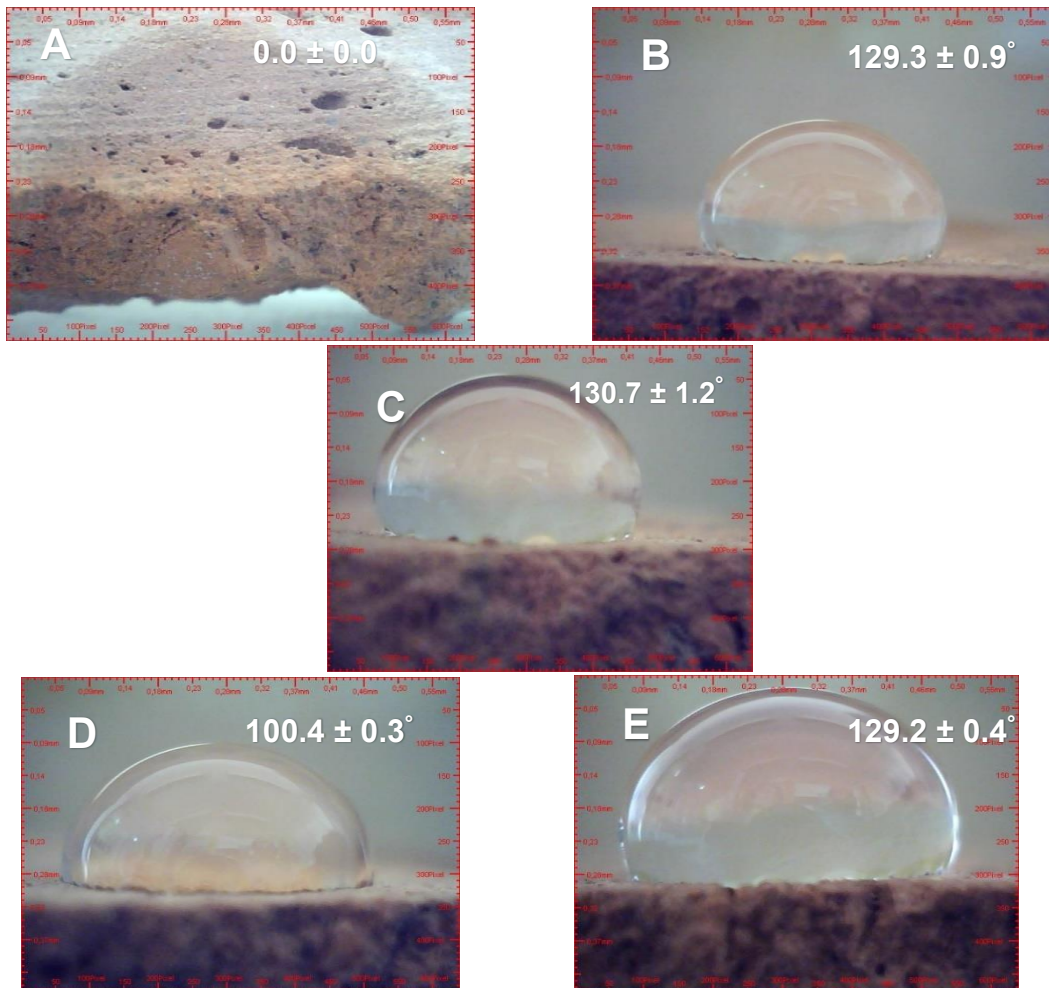
En una primera instancia se caracterizaron los ladrillos comerciales sin tratar. En este caso, la absorción de agua, densidad y porosidad tuvieron valores de:  $22 \pm 1$  %;  $1,40 \pm 0,03$  g/cm<sup>-3</sup> y  $30,9 \pm 0,8$  % respectivamente.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se seleccionó la suspensión de Ag5NPT como nanoaditivo para la formulación de los recubrimientos. El método de hidrólisis propuesto permitió obtener el recubrimiento sol-gel funcionalizado con Ag5NPT, un posible mecanismo se propone en el esquema de la Figura 3.10. Esto es, durante el proceso de hidrólisis el silano en presencia de H<sub>2</sub>O y H<sup>+</sup> se convierte en silanol. Posteriormente en la etapa de condensación, las AgNPs se asocian al silanol, mediante la interacción con los grupos -NH<sub>2</sub>. Finalmente, el sol-gel funcionalizado se adsorbe en el material mediante la condensación y la formación de los enlaces -O-Si.



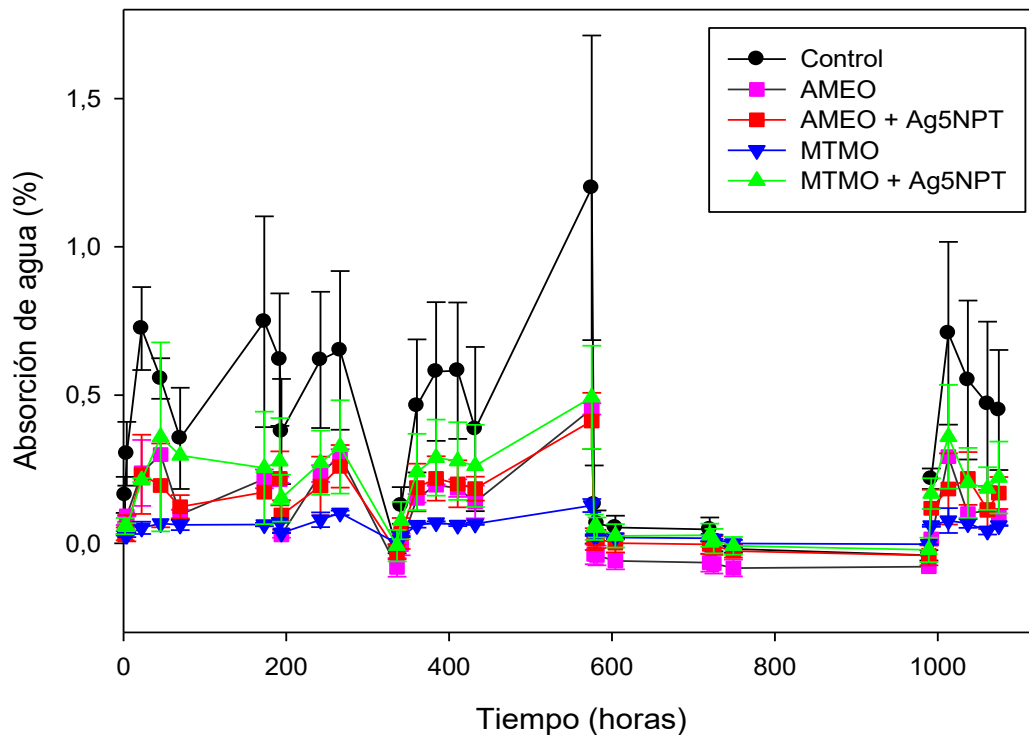
**Figura 3.10.** Mecanismo de funcionalización de sol-gel con AMEO y Ag5NPs sobre el material.

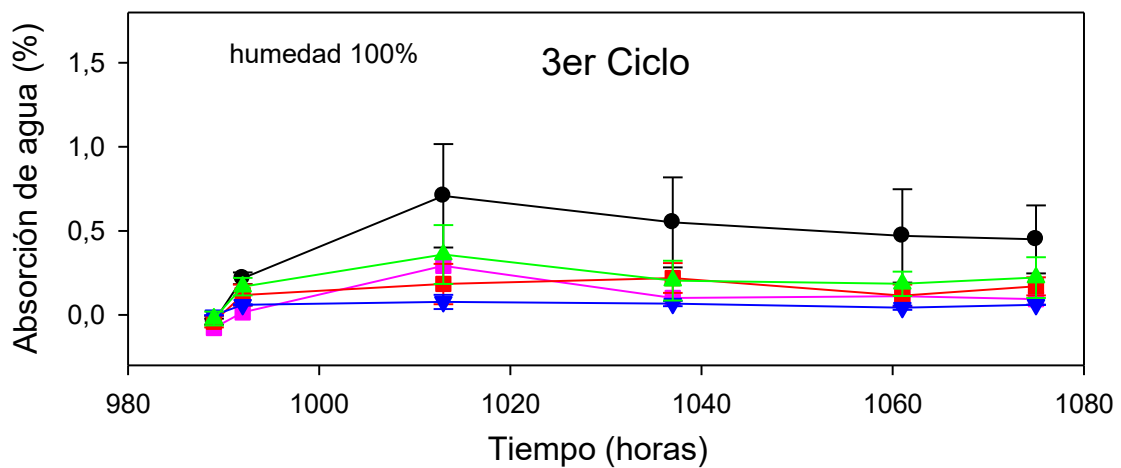
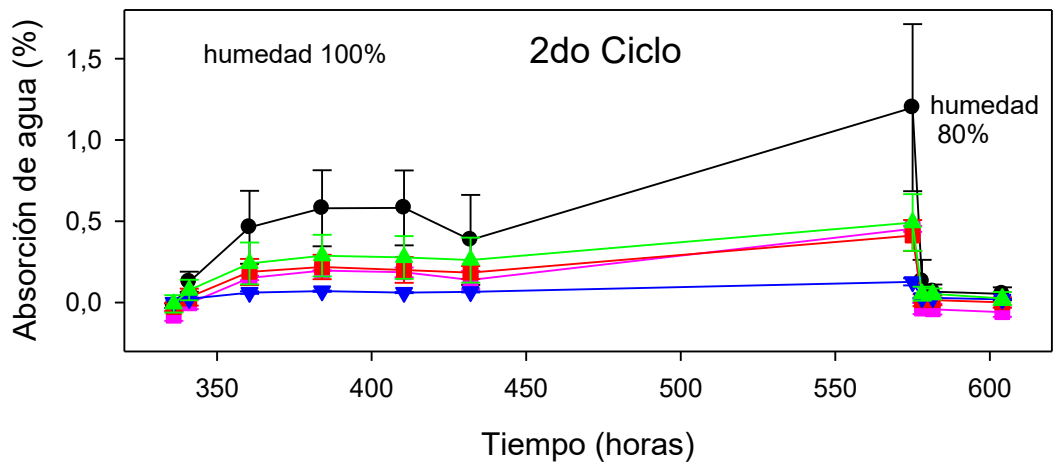
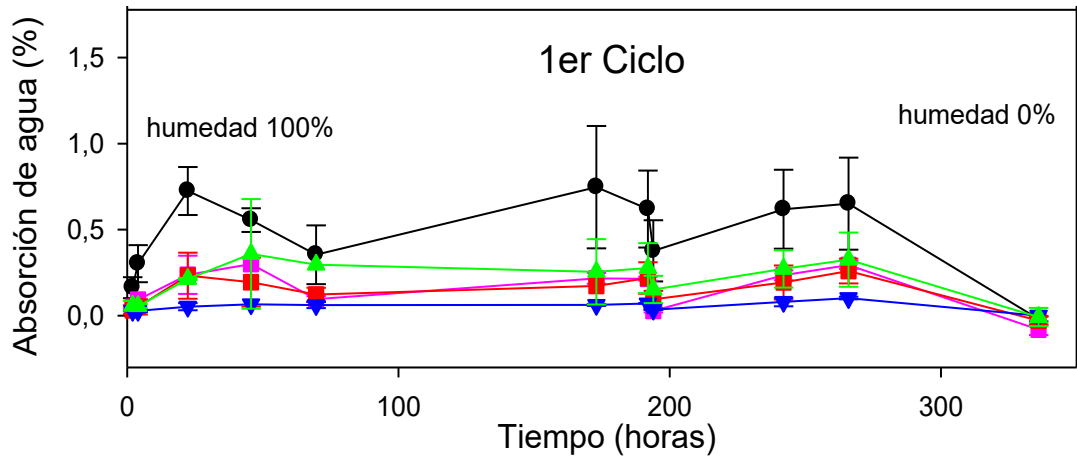
El ángulo de contacto es útil en el estudio de la hidrofiliidad de los recubrimientos. En la Figura 3.11 se observan registros fotográficos obtenidos al realizar el ensayo de determinación del ángulo de contacto donde pueden observarse las gotas depositadas sobre cada muestra estudiada. El ladrillo sin recubrir fue superhidrofílico con valores registrados menores a  $10^\circ$  (Figura 3.11 A). Sin embargo, hubo un cambio en las características de hidrofobicidad / hidrofiliidad cuando los ladrillos fueron tratados con el recubrimiento (Figura 3.11 B-E) dado que el ángulo de contacto aumentó a más de  $90^\circ$  cambiando, por lo tanto, a un comportamiento hidrofóbico. Cabe destacar, que los ladrillos tratados con AMEO presentaron ángulos de contacto mayores que los tratados con MTMO, incluso cuando el recubrimiento sol-gel fue funcionalizado con AgNps.



**Figura 3.11.** Ángulo de contacto. A: Ladrillo sin recubrimiento sol-gel (control), B: AMEO, C: AMEO + Ag5NPT, D: MTMO. E: MTMO + Ag5NPT.

En la Figura 3.12 aparecen los gráficos correspondientes al análisis de absorción de agua de los recubrimientos estudiados. En términos generales, los ladrillos recubiertos absorben menos agua que el ladrillo control. Pero hasta las 300 horas no se alcanza el punto de saturación de humedad, por lo tanto, durante este intervalo de tiempo, existen oscilaciones en la ganancia y pérdida de agua, debido probablemente a cambios de temperatura en el ambiente. Existe una relación directamente proporcional entre la humedad y la temperatura, en este caso, a mayor temperatura es mayor la humedad y los ladrillos pueden absorber más agua.





**Figura 3.12.** Absorción de humedad de los recubrimientos. Las barras representan la desviación estándar de los valores.



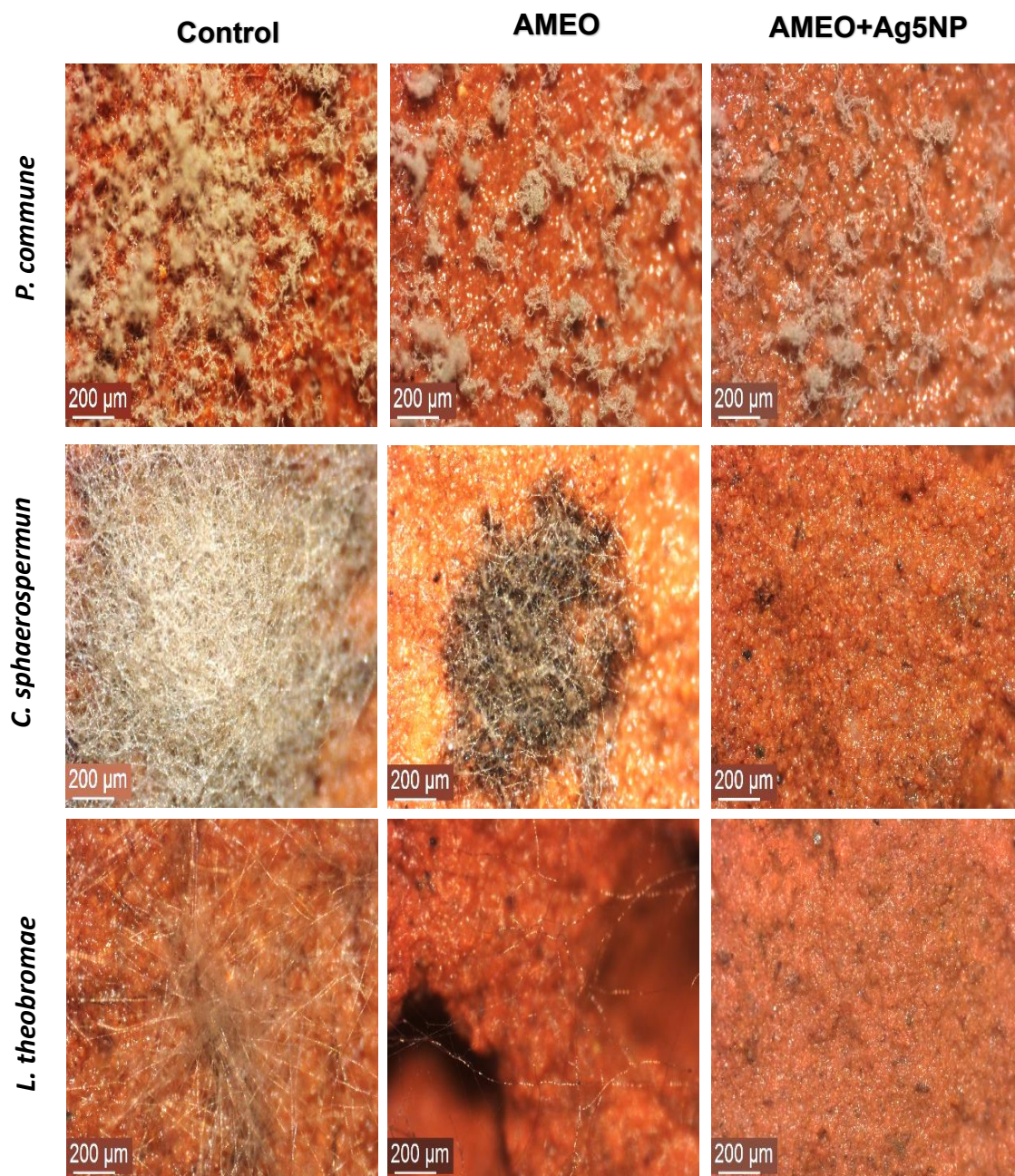
### Prueba de resistencia fúngica del recubrimiento sol-gel

La Tabla 3.1 muestra las calificaciones de la evaluación del desempeño de las distintas muestras estudiadas, en relación con el crecimiento de los hongos inoculados. Cuando las cepas estuvieron expuestas al ladrillo sin recubrir hubo un crecimiento abundante (60-100%), excepto en el caso de *C. sphaerospermum* que creció de forma moderada (30-60%). Los ladrillos que fueron recubiertos con AMEO o MTMO presentaron un crecimiento moderado frente a *P. commune* y *L. theobromae*. Cuando estas muestras fueron inoculadas con *A. niger* y *C. sphaerospermum* se observó un crecimiento invasivo y ligero, respectivamente.

**Tabla 3.1.** Índice de crecimiento fúngico según el área cubierta.

| Muestra     | <i>A.niger</i> | <i>P.commune</i> | <i>C. sphaerospermum</i> | <i>L. theobromae</i> |
|-------------|----------------|------------------|--------------------------|----------------------|
| Control     | 4              | 4                | 3                        | 4                    |
| AMEO        | 3              | 3                | 2                        | 3                    |
| AMEO+Ag5NPT | 0              | 1                | 0                        | 0                    |
| MTMO        | 4              | 3                | 3                        | 3                    |
| MTMO+Ag5NPT | 2              | 2                | 1                        | 1                    |

Los ladrillos que estuvieron recubiertos con MTMO+Ag5NPT, tuvieron un crecimiento ligero de *A. niger* y *P. commune*, mientras *C. sphaerospermum*, *L. theobromae* fue calificado como 1 (escaso). Sin embargo, no hubo crecimiento cuando las cepas se enfrentaron al material cerámico recubierto con AMEO+Ag5NPT, exceptuando las muestras inoculadas con *P. commune* en las cuales se observó crecimiento muy escaso calificado como 1.



**Figura 3.13.** Estereofotografías (80×) del ensayo de resistencia fúngica de los recubrimientos sol-gel, t = 30 días, T= 28 °C.

En la Figura 3.13 se muestran estereofotografías de algunas de las muestras al finalizar el ensayo. En los controles se observa crecimiento por casi toda la superficie del ladrillo. Cuando las cepas estuvieron enfrentadas a los ladrillos con AMEO este crecimiento disminuye, pero se mantiene en menos proporción para *P. commune* cuando fue inoculado sobre AMEO+Ag5NP. Sin embargo, no se observó crecimiento de las otras cepas en este mismo tratamiento. En la Figura

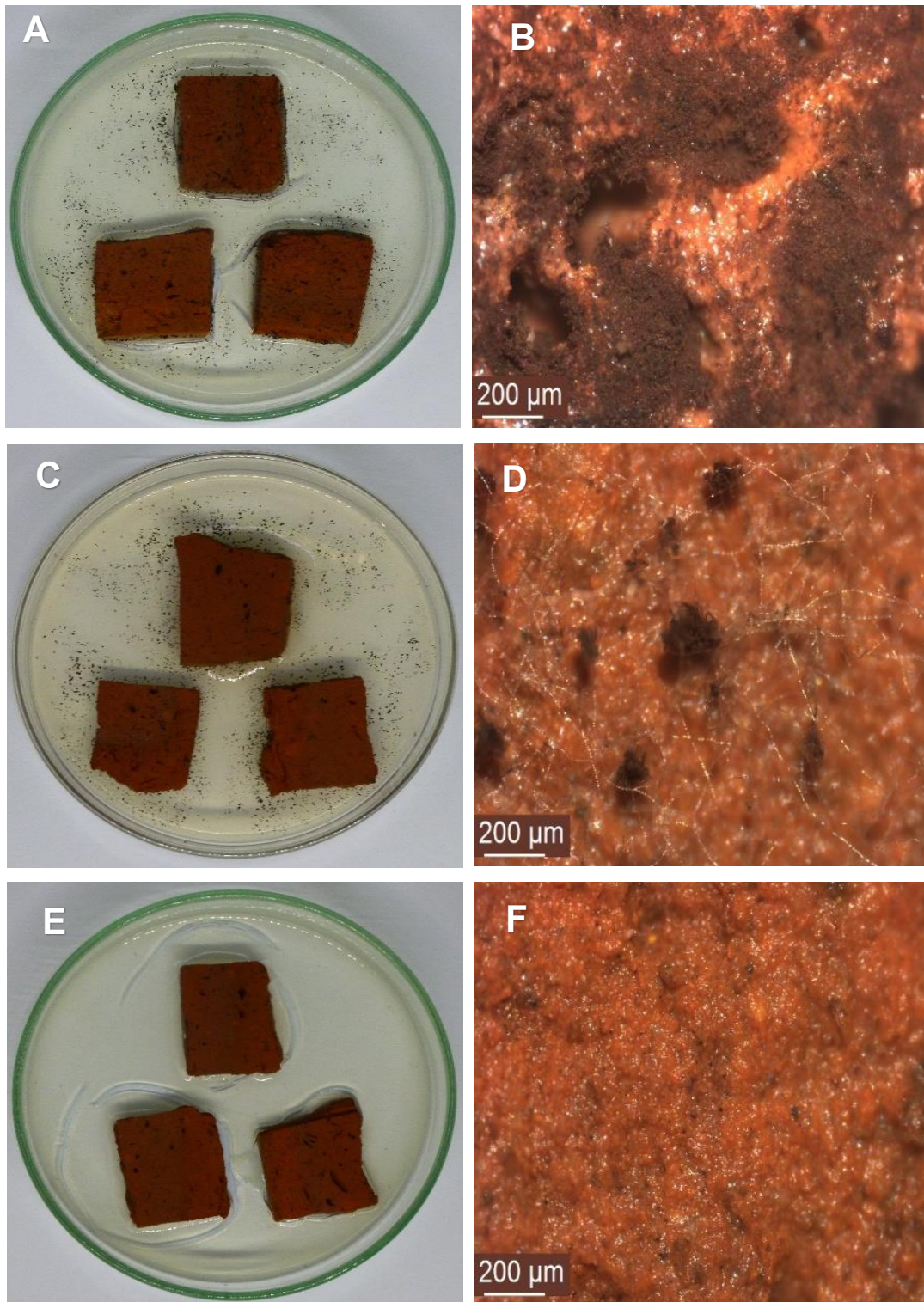
3.13 se pueden ver solamente resultados de muestras recubiertas con AMEO y + Ag5NPT ya que exhibieron la mejor performance antifúngica.

La Figura 3.14 muestra registros fotográficos del ensayo de resistencia fúngica de los recubrimientos sol-gel frente a *A. niger*. En este caso, cuando la cepa se inoculó en el ladrillo control (Figuras 3.14 A y B) y ladrillo con AMEO (Figuras 3. 14 C y D), se observó crecimiento micelial. Pero esto no ocurrió cuando la cepa fue inoculada en AMEO y +Ag5NPT (Figuras 3.14 E y F).

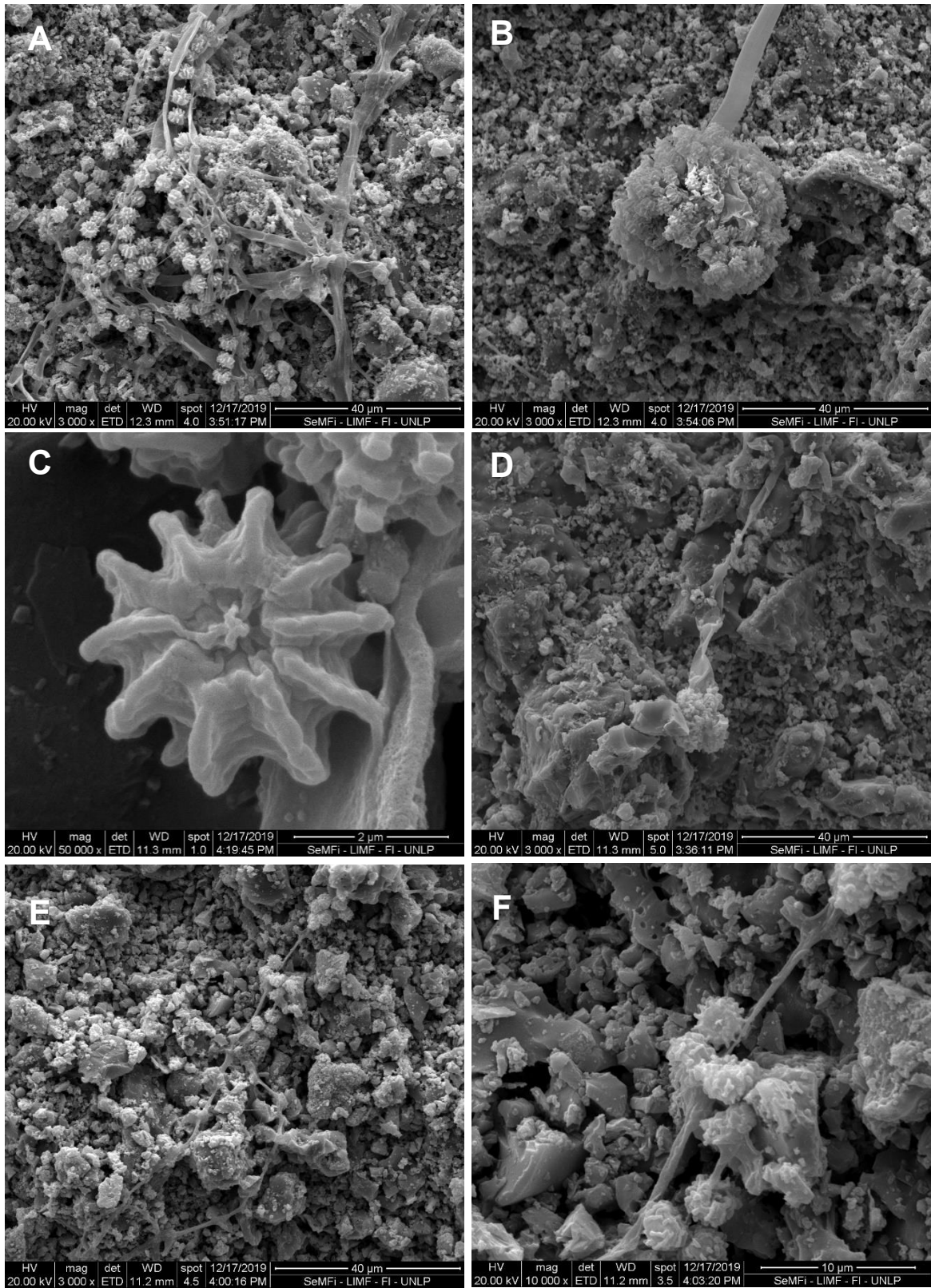
La figura 3.15 compila las imágenes SEM de este ensayo. En las microfotografías de la muestra control (Figura 3.15 A-C) se puede observar micelio somático, reproductivo y abundantes fialoconidios libres. Además, en las Figuras 3.15 B y C se muestran en detalle un conidióforo y ornamentaciones de un fialoconidio respectivamente. Por otra parte, cuando el ladrillo está cubierto con AMEO se observan parcialmente estas estructuras (Figura 3.15 D). Finalmente, se observaron conidios degenerados de *A. niger* en los ladrillos con AMEO + Ag5NPT, lo que afectó la colonización del sustrato (Figuras 3.15 E y F).

Por otra parte, en la Figura 3.16 se observan microfotografías SEM de este ensayo, pero cuando las muestras fueron inoculadas con *P. commune*. En la Figura 3.16 A-C se observan abundantes fialoconidios con ornamentaciones intactas. Sin embargo, aunque no hubo un 100% de inhibición de *P. commune*, cuando estuvo enfrentado al recubierto con AMEO+Ag5NPT, se observó que las ornamentaciones de los fialoconidios están ausentes (Figura 3.16 D).

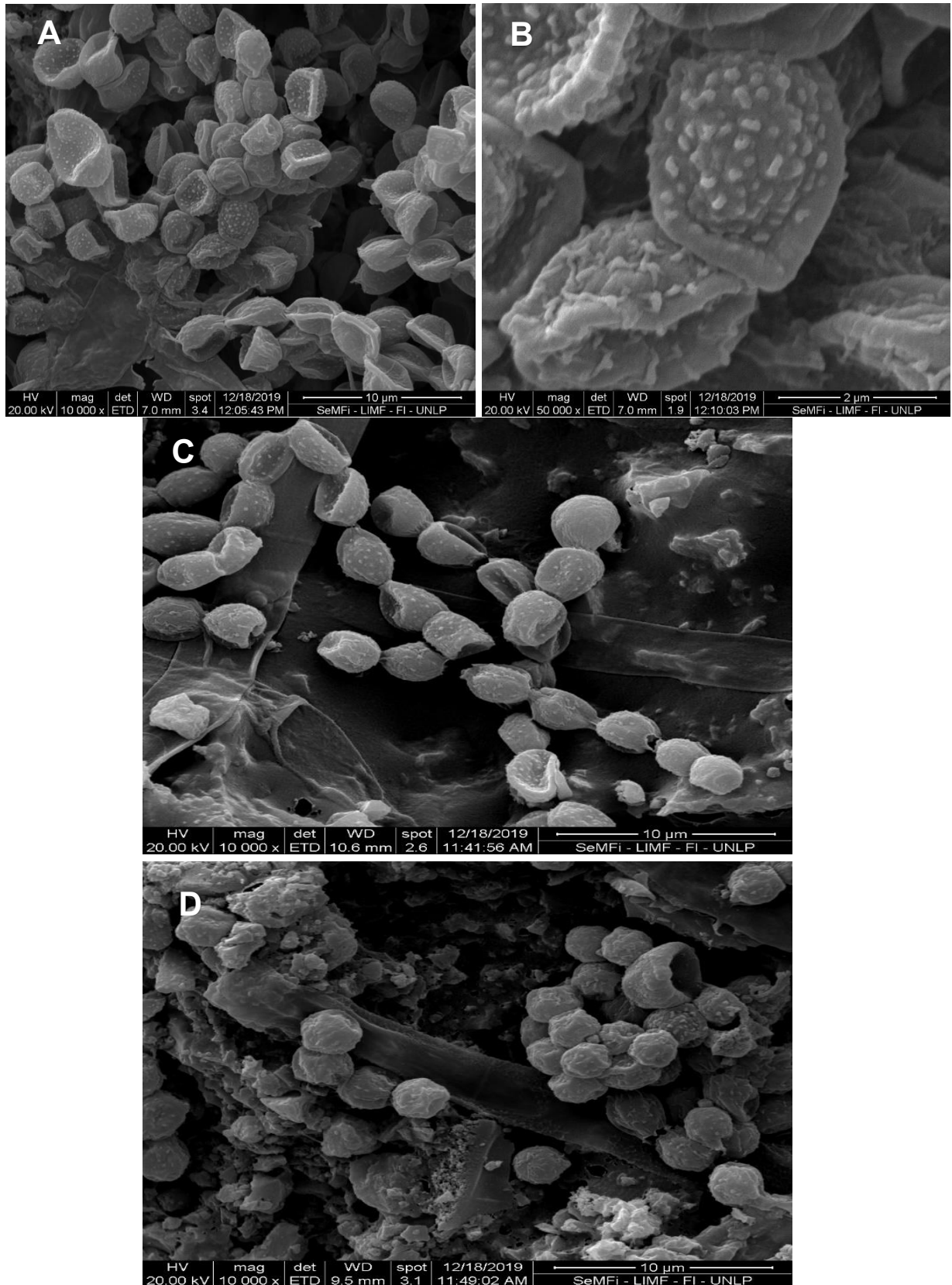




**Figura 3.14.** Ensayo de resistencia fúngica de los recubrimientos sol-gel frente a *A. niger*. A y B: control (ladrillo sin recubrimiento sol-gel ); C y D: ladrillo con AMEO; E, y F: ladrillo con AMEO+Ag5NPT. B, C y F se obtuvieron con microscopio estereoscópico (80×), t = 30 días.



**Figura 3.15.** Fotos SEM del ensayo de resistencia fúngica de los recubrimientos sol-gel frente a *A. niger*. A, B y C: control; D: ladrillo con AMEO; E y F: ladrillo con AMEO + Ag5NPT, t = 30 días.



**Figura 3.16.** Fotos SEM del ensayo de resistencia fúngica de los recubrimientos sol-gel frente a *P. commune*. A y B: control; C ladrillo con AMEO; D: ladrillo con AMEO + Ag5NPT, t = 30 días.



## Discusión

Mediante el uso de TT fue posible obtener suspensiones de NPs de plata y óxido de cobre de acuerdo a los resultados obtenidos de espectrofotometría UV-vis, TEM, SEM y EDS. Las AgNPs probaron ser activas frente a las cepas estudiadas mientras que las que contenían Cu no mostraron indicios de actividad antifúngica en el ensayo de difusión. Estos hallazgos se correlacionan con los obtenidos en otros trabajos, en cuanto a un mayor grado de actividad de las NPs de Ag en relación con otros metales entre los que podemos incluir el Cu y Zn, obtenidos a partir de extractos vegetales acuosos (Barberia-Roque et al., 2019b). Con los espectros FTIR se comprobó que los TT estaban asociados a las AgNPs. Por lo tanto, mediante esta técnica de caracterización fue posible comprobar que los polifenoles intervienen en la síntesis y estabilización de las partículas. Por su parte, con las micrografías de TEM no solo se confirmó la obtención de las NPs, sino que también se comprobó la diferencia de tamaños entre Ag1NPT y Ag5NPT. El tamaño y la forma de las partículas juega un papel importante en la función biológica (Morones et al., 2005; Mittal et al., 2013). Esto es, partículas de tamaño promedio menor (Ag5NPT) tuvieron mayor actividad en el ensayo de macrodilución con respecto a las de mayor tamaño (Ag1NPT). Además, después de la forma triangular, las quasiesféricas resultan ser las más antimicrobianas mientras tengan un tamaño similar de partícula (Raza et al., 2016).

Algunos autores también han informado de la actividad antifúngica de AgNPs. Por ejemplo, Odeniyi et al., 2020 obtuvieron AgNPs a partir de reductores verdes que tenían actividad antifúngica contra *A. niger* y Valsalam et al., 2019 describieron la síntesis verde de AgNps a partir del extracto vegetal de *Tropaeolum majus* y su actividad contra *Penicillium* sp. Según la literatura científica, un posible mecanismo de actividad antifúngica se basa en la internalización de los AgNPs por el extremo apical de la hifa en crecimiento. Una vez que las NPs están en el medio intracelular, su fuerte interacción con nucleófilos como los grupos amino y tiol provoca la inactivación de algunas enzimas y afecta procesos como la nutrición y la respiración celular. Los iones de plata pueden causar la desnaturalización de biomoléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos, enzimas y proteínas), lo que afecta la viabilidad de las células fúngicas (Shen et al., 2020). Por último, en el ensayo de macrodilución, cepas

de crecimiento más rápido como *A. niger* y *P. commune* fueron más resistentes a las Nps, comportamiento que no se observó en *L. theobromae*.

En cuanto a las condiciones de síntesis, de las tres concentraciones de tanino de tara evaluadas la menor, de 500 ppm, probó ser más eficiente en cuanto a la obtención de NPs de menor tamaño, estables y de mayor actividad antifúngica. Esto resulta promisorio en cuanto a la economía del proceso, el cual, al mismo tiempo no presenta ningún tipo de desecho al concluir la síntesis. En tal sentido, el aditivo es utilizado en forma directa en la preparación del sol-gel. De esta forma el proceso se aproxima en mayor medida a los preceptos de la síntesis verde (Zuin, 2016).

Con respecto a la caracterización de ladrillos comerciales, varios autores han informado valores de porosidad similares. Por ejemplo, Graziani et al., 2016 explicaron la influencia de la porosidad total ( $36.6\pm 0.6\%$ ) y la rugosidad de la superficie en la susceptibilidad de los ladrillos al deterioro por microorganismos. Con relación al ángulo de contacto, cuanto mayor sea la hidrofobicidad de la película menor va a ser la retención de agua por parte del material. Por lo tanto, desde el punto de vista de la colonización fúngica esto sería más eficiente que si fuera hidrofílica. Lo que guarda estrecha relación con los resultados obtenidos en el ensayo de absorción de humedad. En este caso, los ladrillos pierden totalmente la humedad absorbida cuando se ponen en ambiente de humedad baja (la pierden tanto a 0% de humedad como a 80% de humedad, aunque pierde un poco más a 0%). Además, cuando fueron puestos nuevamente en alta humedad, continúan absorbiendo la misma cantidad de agua.

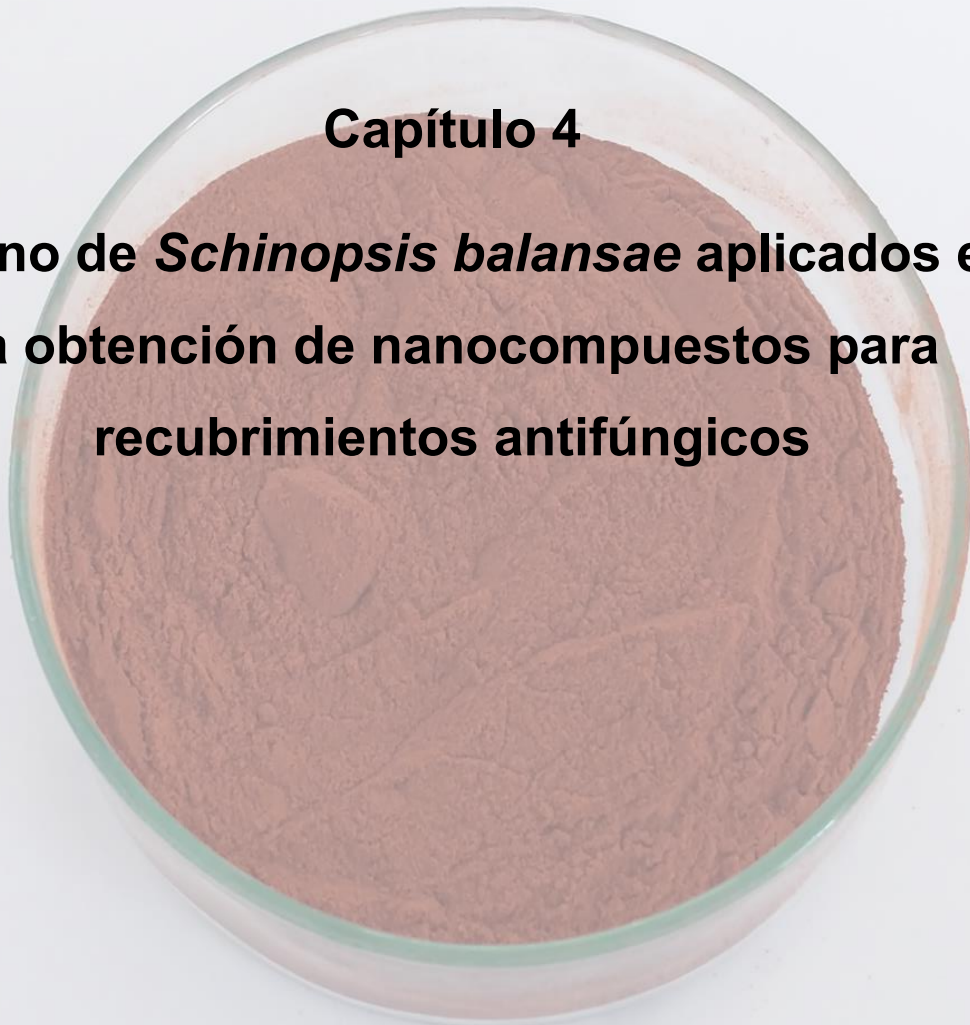
La actividad antifúngica de AMEO+ Ag5NPT puede deberse entonces a la presencia de NPs retenidas en la matriz de silano sumado al efecto de la hidrofobicidad de la superficie. Además, este resultado es novedoso ya que demuestra que los recubrimientos sol-gel formulados con AMEO y AgNPs presentan mayor actividad antifúngica con respecto a los recubrimientos que contienen MTMO y AgNPs. Los registros fotográficos de este ensayo también confirmaron que la actividad antifúngica del recubrimiento sería efectiva debido a la presencia de Ag5NP y a la hidrofobicidad que le brinda al material. Hasta el momento, este es el primer informe de recubrimiento funcionalizado con AgNP



sintetizado a partir del tanino de *C. spinosa* para la protección de ladrillos en el control del deterioro fúngico de materiales.

## Capítulo 4

**Tanino de *Schinopsis balansae* aplicados en la obtención de nanocompuestos para recubrimientos antifúngicos**



## Introducción

Recubrimientos sol-gel aditivado con biocidas ecológicos se pueden usar contra el deterioro fúngico de ladrillos y pinturas. Previamente se ha observado que el recubrimiento sol-gel aditivado con nanopartículas de plata obtenidas a partir del tanino de *Caesalpinia spinosa* se utilizó para controlar el biodeterioro de los ladrillos (Capítulo 3). Además, los recubrimientos formulados con aditivos antimicrobianos de sílice obtenidos por el método sol-gel tuvieron actividad antifúngica contra *Chaetomium globosum* y *Alternaria alternata* (Arreche et al., 2017). Incluso, la actividad antifúngica de las nanopartículas de plata fitogénicas (AgNPs) fue bien informada en la literatura científica (Żarowska et al., 2019; Kavitha et al., 2020; Khan et al., 2020).

*Schinopsis balansae* comúnmente conocido como “quebracho colorado” es un árbol nativo de América del Sur y es muy apreciado por su alto contenido de taninos condensados (Streit and Fengel, 1994; Marchesini et al., 2020). Se extraen de la madera, por lo que implica deforestación a diferencia del tanino de tara que es hidrolizable y se extrae de la vaina del árbol. Los taninos de quebracho se han utilizado en recubrimientos antiincrustantes (Bellotti et al., 2012b, 2014) y anticorrosivos (Byrne et al., 2020). Los componentes principales del tanino de “quebracho” (TQ) son polifenoles, fácilmente extraíbles con agua caliente (Bellotti et al., 2012b). Los polifenoles, como los presentes en TQ, poseen propiedades antioxidantes que podrían atribuirse a su capacidad para donar hidrógenos, electrones y quelatos de iones metálicos involucrados en la generación de radicales libres. Esto resulta prometedor para la biorreducción de iones metálicos en la obtención de NPs con potencial antimicrobiano (Valsalam et al., 2019).

En este capítulo se describe la obtención de recubrimientos sol-gel funcionalizado con AgNPs obtenidos a partir de una solución acuosa de tanino de *S. balansae* comercial para el control del deterioro fúngico de material cerámico y pintura al agua. En la formulación del recubrimiento sol-gel se emplearon dos precursores diferentes, 3-aminopropiltriétoxosilano y 3-mercaptopropiltrimetoxosilano. Los recubrimientos sobre la pintura se caracterizaron por SEM, EDS, mapeo de rayos X, ángulos de contacto, ciclos de

absorción/desorción de humedad y prueba de resistencia fúngica. Por otra parte, en la pintura acrílica se utilizó una formulación factible para fachadas de exterior y fue caracterizada mediante el grado de dispersión (método Hegman), tiempo de secado según norma ASTM D1640, poder cubritivo según norma ASTM D344 y prueba de lavabilidad. Por lo tanto, este trabajo constituye el primer estudio reportado sobre el uso de recubrimientos sol-gel funcionalizados con NPs fitosintetizadas a partir del tanino de “quebracho colorado” y su eficiencia antifúngica en sistemas protectores de ladrillos y pinturas al agua.

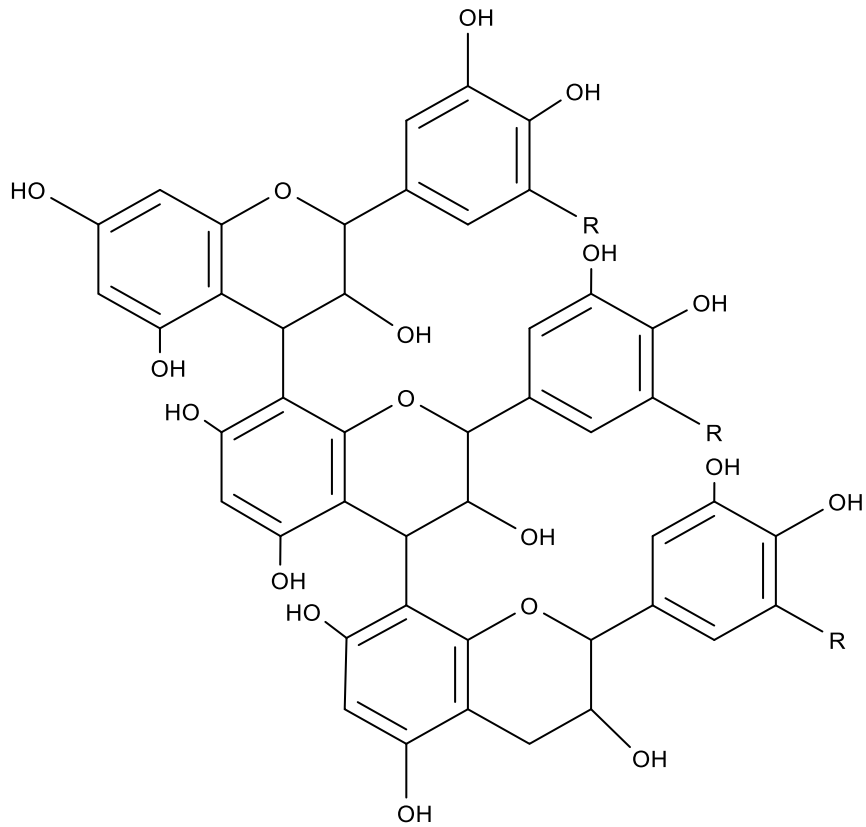
## **Materiales y métodos**

### **Biosíntesis y caracterización de las nanopartículas**

Las nanopartículas se obtuvieron a partir de una solución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  a la que se le añadió la solución de TQ en constante agitación durante 30 min a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  y se ajustó el pH a 7 mediante solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Deyá and Bellotti, 2017). La concentración final de la sal en el sistema de síntesis fue de  $10^{-2}$  M.

El TQ se usó tal y como se suministró por la empresa UNITAN. En la Figura 4.1 A y B se puede observar la estructura química básica del tipo de polifenoles que componen el TQ y, además, el aspecto del producto utilizado. Para la síntesis de las NPs se utilizaron dos concentraciones de TQ, 500 y 1000 ppm. Las partículas en suspensión se mantuvieron en la heladera a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .

**A**



**B**



**Figura 4.1.** (A) Estructura química básica de los polifenoles que componen el tanino de “quebracho colorado”. (B) Registro fotográfico del mismo.

También se determinó la concentración de polifenoles totales en la solución acuosa de TQ mediante espectrofotometría UV-visible utilizando el reactivo de Folin Denis (FD) y ácido tánico (AT) como patrón (Bellotti et al., 2012a). El resultado se expresó como polifenoles totales (PT).

En primer lugar, se realizó espectroscopía UV-vis para verificar la presencia de las NPs y luego evaluar su estabilidad en el tiempo (1, 30, 60 y 90 días). Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro UV SP 2000. Se aplicó Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) para confirmar la obtención de las NPs, observar su morfología y determinar el tamaño de partícula promedio. El equipo utilizado fue un JEOL 100 CXII a una tensión de aceleración de 100 KV. Además, las NPs se purificaron mediante lavados sucesivos utilizando una microcentrífuga DLAB D3024R a 15000 rpm durante 20 min a 20 °C. Las NPs purificadas fueron evaluadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) y mapeo de rayos X. El microscopio utilizado fue un Philips FEI Quanta 200 y las condiciones de trabajo fueron de bajo vacío ( $10^{-2}$  torr). Por último, los espectros FTIR de las NPs purificadas se obtuvieron usando el método del disco KBr mediante un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum One. El análisis de los espectros se realizó mediante el programa KnowItAll® Informatics System, Versión: 10.0.18362.

### **Actividad antifúngica de las nanopartículas en suspensión**

Las cepas seleccionadas fueron *Aspergillus niger* MN371276, *Penicillium commune* MN371392, *Cladosporium sphaerospermum* MN371394 y *Lasiodiplodia theobromae* MN371283 debido a su actividad altamente deteriorante descrita en el Capítulo 2.

El método de difusión en agar (Kirby-Bauer) y la inhibición del crecimiento fúngico en el ensayo de macrodilución fueron los ensayos empleados para determinar la actividad antifúngica de las Nps en suspensión (Fernández et al., 2020). En el caso de la primera, se colocaron discos de papel de 6 mm con las suspensiones de NPs sobre 15 mL de Agar extracto de malta (MEA) inoculado con 200 mL de una solución de esporas ( $10^5$  esporas/mL). Se usó solución fisiológica como control negativo mientras que el control positivo fue una solución de sal de amonio cuaternario ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$ ) de 3 ppm. El período de incubación fue de 48 horas y la temperatura se reguló a 28 °C. El diámetro (D) de la zona de inhibición alrededor de cada disco se registró utilizando un calibre

digital. Por lo tanto, la muestra analizada se consideró positiva cuando D era mayor o igual a 6 mm y negativa cuando D era menor de 6 mm.

Para el método de macrodilución, se determinó el crecimiento de hongos mediante la medición de los diámetros de las colonias (mm). Se adicionó suspensión de NPs en placas de Petri con MEA, de manera que las diluciones finales tuvieron una concentración de 10, 50 y 167  $\mu\text{g/mL}$ . Como control, se utilizaron placas de Petri sin NPs (0  $\mu\text{g/mL}$ ) con MEA. Posteriormente, las placas se inocularon en el centro con 20  $\mu\text{L}$  de suspensión de  $10^5$  esporas/mL y se incubaron durante 7 días a 28 ° C. La prueba se realizó por triplicado.

### **Formulación y caracterización de recubrimiento sol-gel**

El recubrimiento sol-gel funcionalizado con NPs fue preparado para su aplicación en la protección de ladrillos comerciales que fueron caracterizados en el Capítulo 3. Se emplearon dos precursores: 3-aminopropiltriétoxissilano (AMEO) y 3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MTMO) (Camsi-X, usado como se suministra) y el ajuste de las condiciones de preparación del recubrimiento sol-gel fueron de acuerdo a lo que propusieron (Gámez-Espinosa et al., 2020). Esto es, ambos silanos se agregaron en una concentración de 2% (v/v). El precursor se añadió al sistema en una proporción de 0,9 ml de etanol + 0,06 mL de NPs + 0,02 mL de AD + 0,02 mL de silano por cada mL de solución. El pH se ajustó previamente a 4 con  $\text{HNO}_3$ . Finalmente, los ladrillos ( $4,0 \pm 0,4 \text{ cm}^3$ ) se trataron por inmersión durante 90 segundos en las soluciones preparadas y se secaron a temperatura ambiente durante dos semanas.

Por otra parte, se evaluó otra variante en la protección de materiales que consistió en probar la eficiencia del recubrimiento sol-gel funcionalizado sobre una pintura acrílica. La formulación utilizada se puede ver en la Tabla 4.1. Para la formulación se tuvo en cuenta una composición básica de factible utilización en fachadas de exterior.

**Tabla 4.1.** Composición de la pintura acrílica

| <b>Compuestos</b>             | <b>% por peso</b> |
|-------------------------------|-------------------|
| Agua                          | 16,40             |
| Antiespuma                    | 0,11              |
| Agente espesante              | 0,22              |
| Agente estabilizador de pH    | 0,04              |
| Agente dispersante            | 0,15              |
| Agente surfactante            | 0,04              |
| TiO <sub>2</sub>              | 9,96              |
| CaCO <sub>3</sub> natural     | 21,91             |
| CaCO <sub>3</sub> precipitado | 1,95              |
| Resina (1:1)                  | 52,33             |
| Coalescentes                  | 1,01              |

La pintura se preparó en una dispersora de alta velocidad. En un primer paso se dispersó agua destilada con antiespuma (Q202, Diransa) y espesantes (Cellosize 52000, Dow). Luego se adicionaron agentes dispersantes estabilizadores de pH (AMP-95, Angus) y el agente surfactante (Dow), suspendidos en agua. Posteriormente, se añadieron los pigmentos uno a uno y finalmente se añadió una mezcla de resina acrílica-estireno (Thyosil 190, Diransa), coalescentes (aguarrás y butilglicol) y antiespuma.

La pintura acrílica se caracterizó por: grado de dispersión (método Hegman), tiempo de secado según norma ASTM D1640, poder cubritivo según norma ASTM D344 y prueba de lavabilidad. El método Hegman consiste en pasar el recubrimiento líquido por una ranura cónica calibrada que varía en profundidad de 100 a 0 mm. La profundidad a la que los grupos continuos de partículas o aglomerados sobresalen a través de la superficie se toma como el grado de dispersión. En la prueba de lavabilidad, la pintura se aplica a un panel de plástico negro que se frota con un cepillo de nailon sumergido en agua. Se determina el número de pasadas de ida y vuelta (ciclos) necesarios para observar el sustrato negro al quitar la pintura.

Finalmente, la pintura se aplicó en portaobjetos de vidrio para luego ser tratada por el recubrimiento sol-gel. Se sumergieron portaobjetos de 2,5 cm<sup>2</sup> con pintura acrílica en las soluciones durante 90 s y se dejaron secar durante 14 días a 25 °C. También se prepararon controles, donde el mismo volumen de NPs en



suspensión fue reemplazado por AD. Después de esto, se evaluó la actividad antifúngica de las muestras recubiertas (ladrillos y pintura acrílica).

Los recubrimientos de silano sobre la pintura se caracterizaron por SEM, EDS, mapeo de rayos X, ángulos de contacto y ciclos de absorción/desorción de humedad. El ángulo de contacto se midió por triplicado colocando una gota de agua destilada con una pipeta Pasteur sobre la pintura acrílica revestida. Se tomó una fotografía de la gota con un microscopio digital Gaosuo y se midió el ángulo de contacto con el software Gaosuo (Koch and Barthlott, 2009). Muestras de vidrios recubiertos secos, previamente pesados en balanza analítica, se colocaron en una cámara de 100% de humedad y se determinó la ganancia de peso durante 1000 h con el fin de determinar la absorción/desorción de agua. En todos los casos, los ensayos se realizaron por duplicado.

### **Prueba de resistencia fúngica del recubrimiento sol-gel**

La actividad antifúngica de los recubrimientos funcionalizados con NPs sobre el ladrillo y la pintura acrílica, se evaluaron utilizando la norma ASTM 5590. Las muestras se colocaron en placas Petri con 10 mL de Agar Mineral Mínimo (MMA). Cada una fue inoculada con el mismo volumen (50  $\mu$ L) de una solución de esporas ( $10^5$  esporas/mL). Las cepas fueron las mismas que se usaron en los ensayos previos. Las placas de Petri se incubaron a 28 °C durante 30 días. El crecimiento de hongos observado en las muestras se informó como el porcentaje (%) del área cubierta (0%, <10%, 10-30%, 30-60% y 60-100%) y se clasificó como 0,1, 2, 3 y 4 respectivamente, teniendo en cuenta la norma ASTM 5590. Al final de la prueba, las muestras se observaron con microscopio estereoscópico, Leica S8 APO, y se tomaron registros fotográficos con una cámara digital Leica y, también, mediante SEM. El procedimiento para observar las muestras en el SEM fue explicado en la sección de materiales y métodos del Capítulo 2.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de la medida del diámetro de la colonia se realizó con el programa RStudio 1.1.463®. La distribución de probabilidad se analizó con la prueba de distribución normal. Se realizó un ANOVA de un factor y posteriormente se aplicó la prueba de Tukey. El factor incluido fue la

concentración de nanopartículas. Las pruebas utilizadas se aplicaron mediante el paquete multcomp.

## Resultados

### Biosíntesis y caracterización de las nanopartículas

Con el método de síntesis propuesto, fue posible obtener AgNPs. Cuando se añadió las soluciones de TQ (500 y 1000 ppm) a la solución acuosa de  $\text{AgNO}_3$ , se obtuvieron Ag5NPQ y Ag1NPQ, respectivamente. Esto se evidenció en los espectros UV-vis donde se pudo observar la banda de absorción ( $\sim 400$  nm) correspondiente a la resonancia plasmónica superficial de las AgNPs (Ider et al., 2017). La Figura 4.2 muestra los espectros de absorción UV-vis de las AgNPs sintetizadas con las soluciones de TQ.

Ambos espectros UV-vis muestran picos máximos aproximadamente entre 400 y 410 nm que lograron mantenerse en el tiempo, aumentando en intensidad para Ag1NPQ a partir de los 30 días (Figura 4.2A).

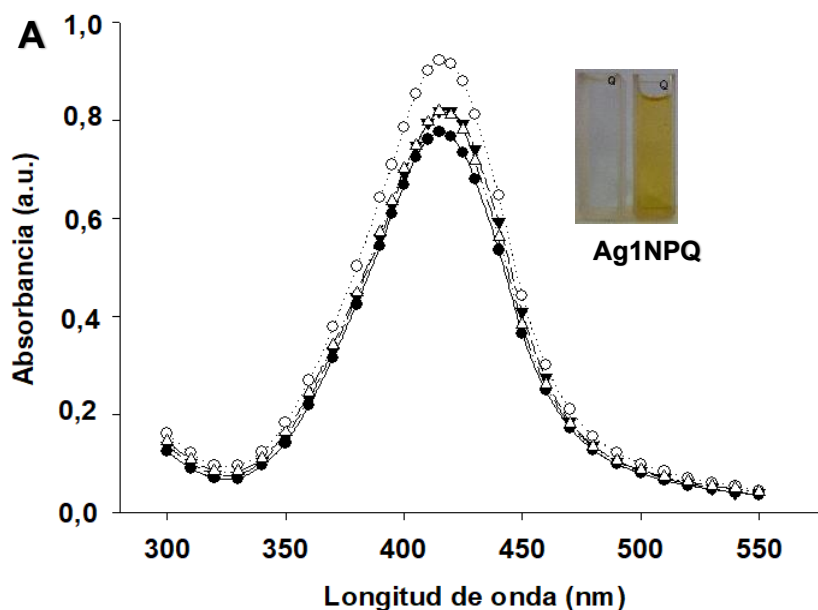
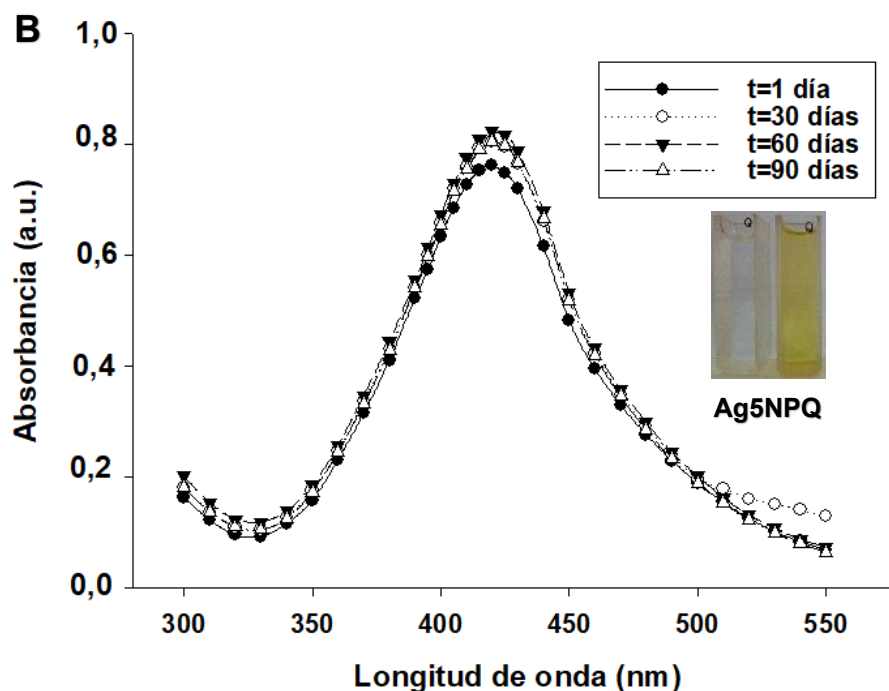
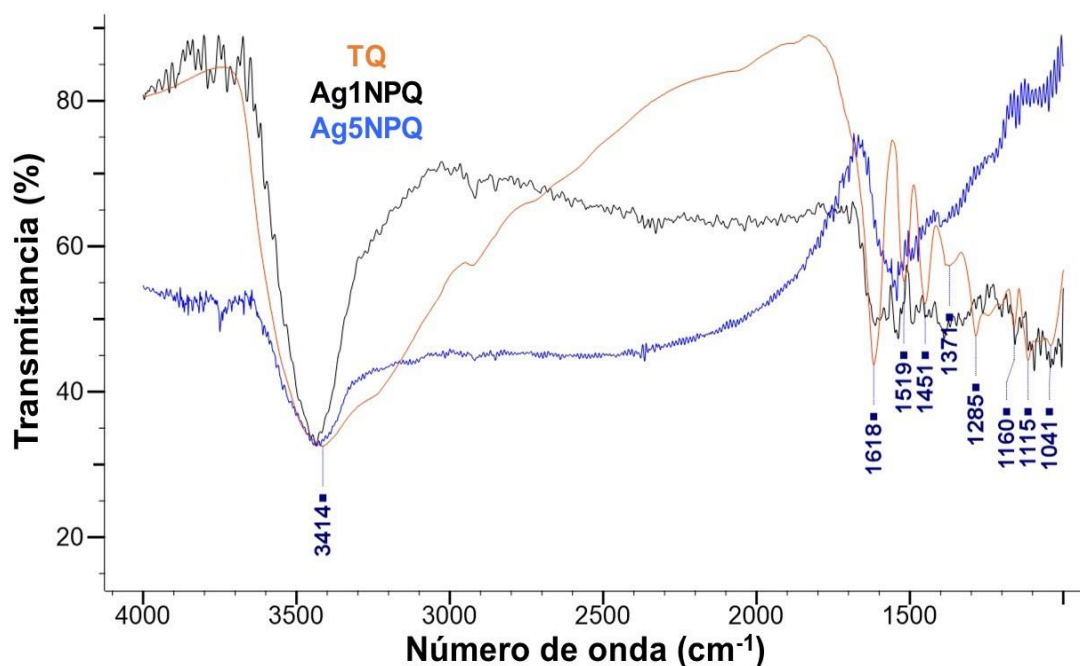


Figura 4.2. Espectros UV-vis de AgNPs sintetizadas con tanino de *S. balansae*.



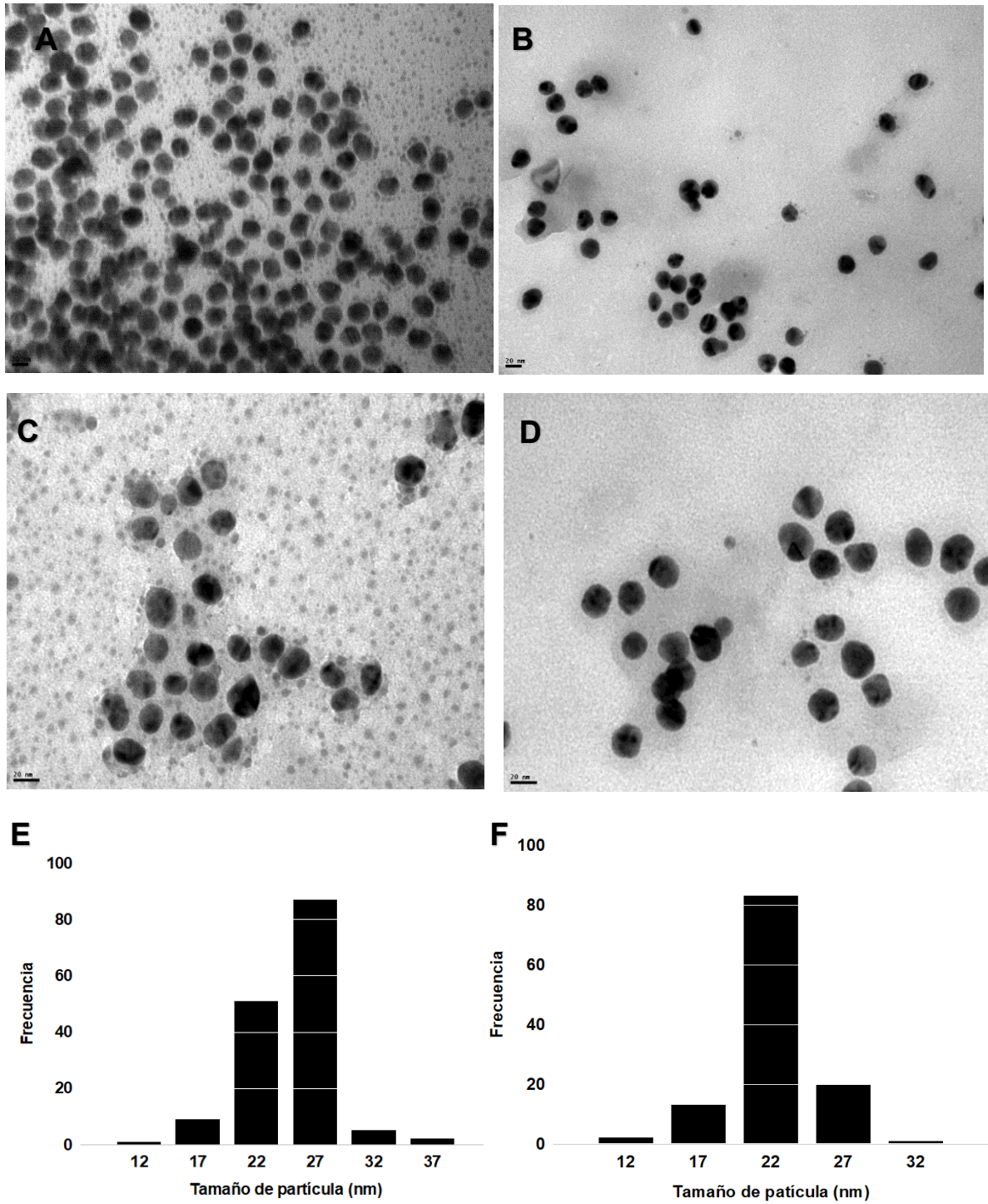
**Figura 4.2 (Continuación).** Espectros UV-vis de AgNPs sintetizadas con tanino de *S. balansae*.

Por otro lado, en los espectros FTIR de TQ y NPs obtenidas de a partir de estos taninos, existen picos bien resueltos a 3414, 1618 y 1500-1000  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 4.3). Picos entre 3600-3400  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes al estiramiento del grupo O-H (enlaces H intramoleculares, puente simple) fueron detectados. Los aumentos en la fuerza de los enlaces H van acompañados de cambios a frecuencias más bajas de las bandas de absorción debido a la vibración de estiramiento O-H. Además, se detectó el pico a 1618  $\text{cm}^{-1}$  asignado al estiramiento de las dobles uniones C=C en los compuestos aromáticos (Bellotti et al., 2012b, 2012c). En el caso de las Ag5NPQ, este pico se puede ver desplazado a frecuencias más bajas. En ambos espectros de AgNPs se puede observar un aumento en la intensidad de la absorbancia alrededor de 1700  $\text{cm}^{-1}$  a diferencia de lo que ocurre con el TQ, esto puede atribuirse a la oxidación de los polifenoles y la aparición en consecuencia de grupos C=O en las muestras. Esto último se corrobora con la reducción de los iones metálicos y la formación de las NPs. Por otro lado, se observan picos próximos a 1520 y 1450  $\text{cm}^{-1}$  debidos al estiramiento de los enlaces C=C correspondiente a los fenoles (Morrison and Boyd, 1990; Bellotti et al., 2012b).



**Figura 4.3.** Espectros FTIR del tanino de *S. balansae* (TQ) y las NPs obtenidas.

La presencia de estos grupos funcionales en las Ag1NPQ y Ag5NPQ purificadas demuestra que el TQ están asociadas a ellas. Además, permitió proponer un mecanismo de biosíntesis: los polifenoles presentes en el TQ reducirían los iones  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ , actuando como agente reductor y estabilizante “verde”, similar al mecanismo del tanino de tara a pesar de las diferencias químicas entre ellos.



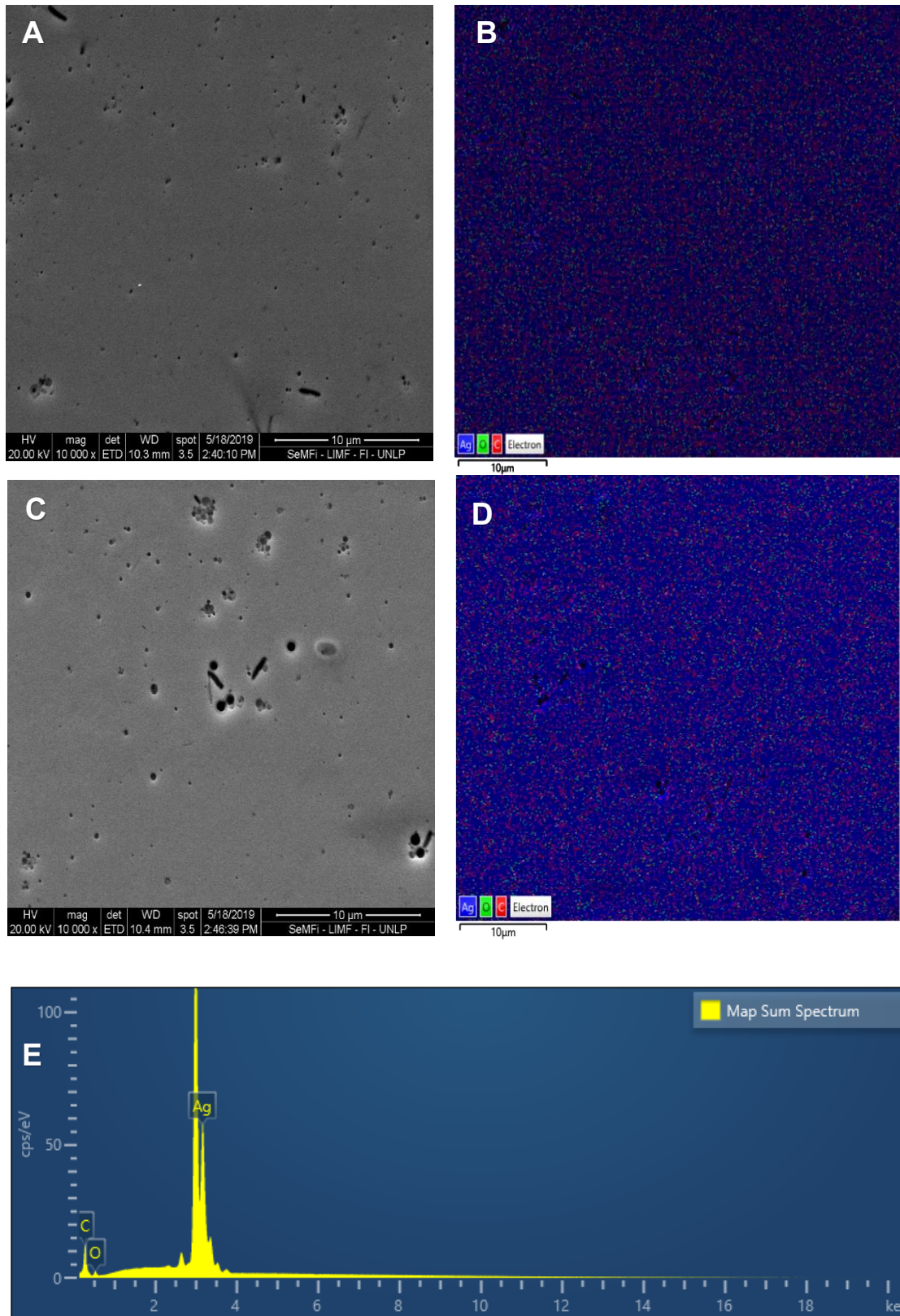
**Figura 4.4.** Imágenes TEM e histograma del análisis de distribución de tamaño. A, C y E: Ag1NPQ; B, D y F: Ag5NPQ. La barra en cada micrografía corresponde a 20 nm. A y B: 270000X; C y D: 450000X

Por otro lado, la presencia de los polifenoles fue constatada mediante su determinación por espectrofotometría utilizando el reactivo de FD. La concentración de polifenoles totales en la solución de TQ utilizada para la síntesis de Ag5NPQ dio como resultado 395 mg/L. Esto corroboró la presencia de los polifenoles provenientes del tanino en el sistema de síntesis y el mecanismo propuesto.

La Figura 4.4 muestra las micrografías TEM y el histograma del análisis de distribución de tamaño. Los Ag1NPQ (Figura 4.4 A y B) son quasiesféricas y mostraron una frecuencia más alta con un tamaño promedio de 27 nm (Figura 4.4 E). Además, las Ag5NPQ (Figura 4.4 C y D) tienen la misma forma que las Ag1NPQ, pero en este caso las partículas tuvieron un tamaño medio más bajo (22 nm) (Figura 4.4 F). Las imágenes TEM revelaron que las partículas están cubiertas por una capa que correspondería a la materia orgánica de los taninos, manteniéndolas estables y dispersas. Reafirmando los resultados obtenidos en el espectro FTIR.

Por otro lado, la Figura 4.5 proporciona micrografías SEM, mapeo y espectros EDS de las NPs biosintetizadas. Las imágenes SEM de Ag1NPQ y Ag5NPQ mostraron que las partículas tienen una disposición compacta (Figura 4.5 A y C). Con las micrografías de mapeo se determinó la distribución uniforme de Ag al momento de preparar la muestra (Figura 4.5 B y D). En el espectro EDS de Ag5NPQ se observó un pico resuelto a 3 keV, lo que confirma la presencia de Ag en el sistema de síntesis y reafirma los resultados descritos por espectroscopia UV-vis (Figura 4.5 E).





**Figura 4.5.** Micrografías SEM, mapeo de Nps y espectros EDS. A y B: Ag1NPQ. C, D y E: Ag5NPQ.

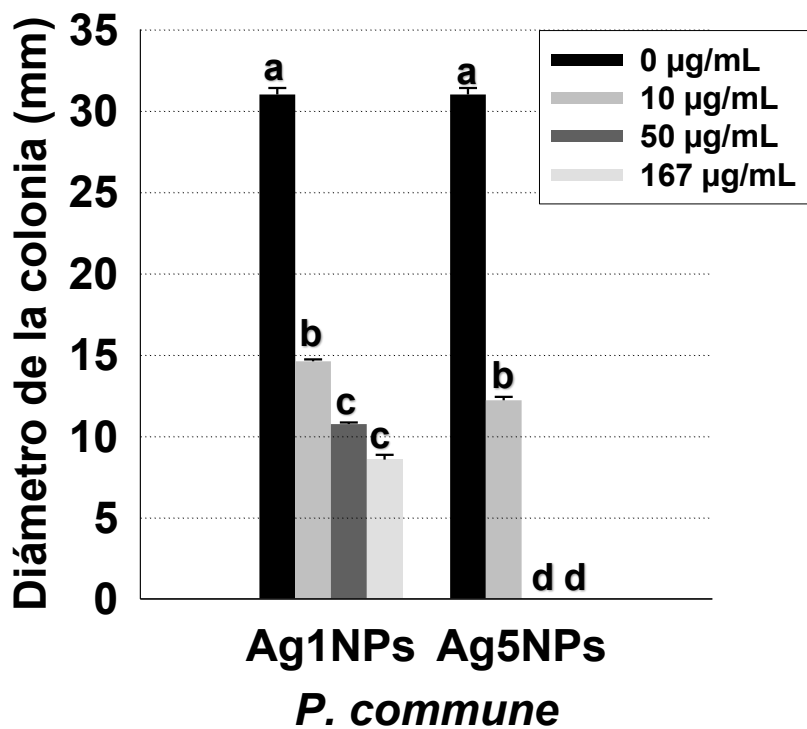
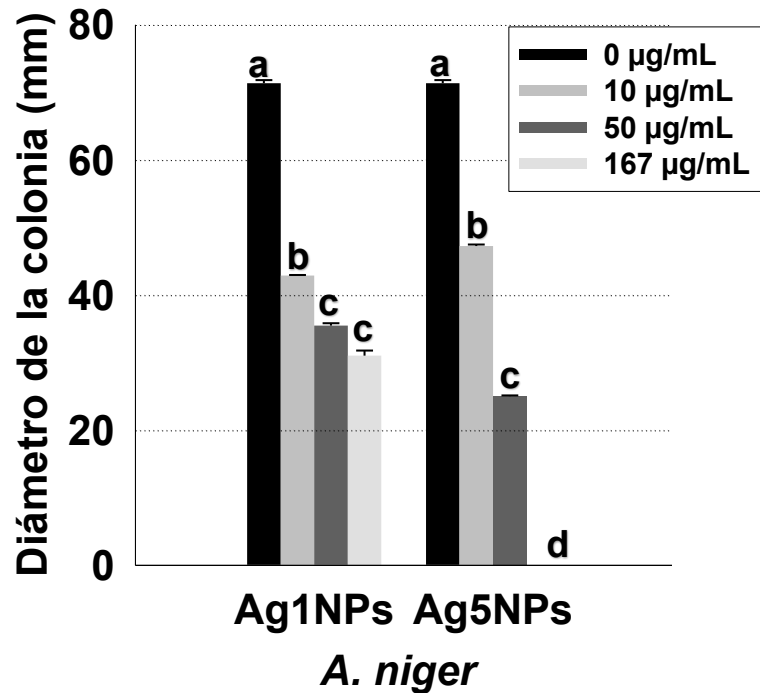
## Efecto de las nanopartículas en suspensión sobre el crecimiento fúngico

El ensayo de difusión en agar mostró que las suspensiones de Ag1NPQ y Ag5NPQ tienen actividad antifúngica en todas las cepas estudiadas ( $D \geq 6$  mm). Por esta razón, se utilizaron ambas NPs en el ensayo de macrodilución. La Figura 4.6 muestra el efecto de las NPs sobre el crecimiento de las cepas fúngicas en estudio.

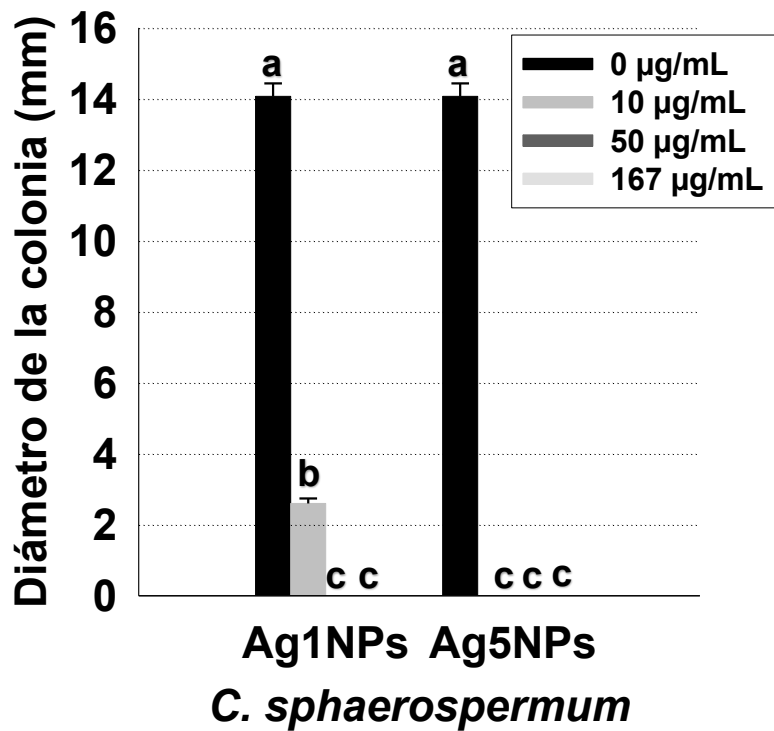
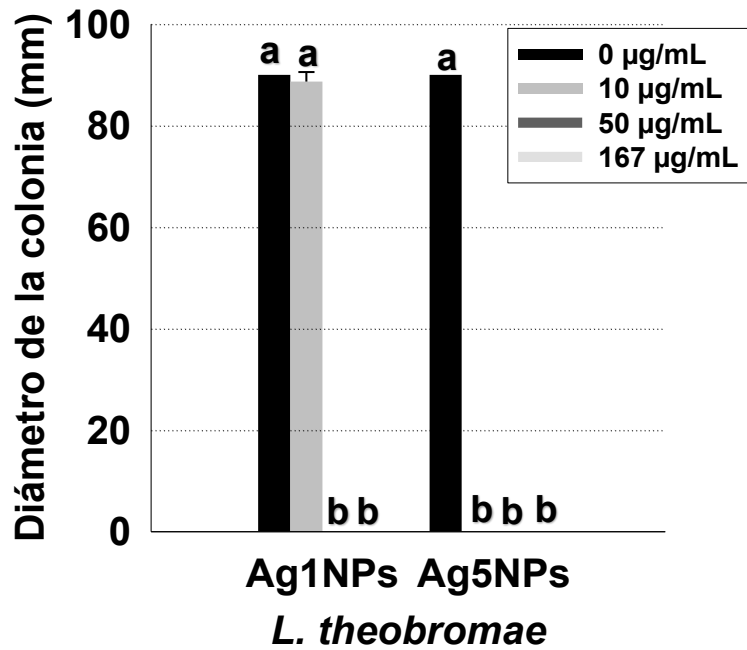
Los valores del diámetro de las colonias fueron mayores cuando las cepas se enfrentaron a Ag1NPQ, incluso *A. niger* y *P. commune* crecieron cuando la concentración fue de 167  $\mu\text{g/mL}$ . Por otro lado, cuando las cepas se enfrentaron a Ag5NPQ, solo hubo crecimiento de *A. niger* a 10 y 50  $\mu\text{g/mL}$  y *P. commune* a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Por tanto, las Ag5NPQ mostraron una mayor actividad antifúngica con respecto a Ag1NPQ. Además, *C. sphaerospermum* y *L. theobromae* fueron más sensibles a las NPs en comparación con *A. niger* y *P. commune* ambos colonizadores primarios. Esto corrobora lo observado con las NPs obtenidas con TT y cuyos resultados se muestran en el Capítulo 3.

La Figura 4.7 ilustra mediante registros fotográficos el ensayo de macrodilución con las diferentes concentraciones de Ag5NPQ en MEA frente a las cuatro cepas al final del período de incubación. Se observaron pequeñas colonias de *A. niger* y *P. commune* cuando se inocularon en medio con las concentraciones más bajas de NPs en comparación con el control. Por otro lado, no hubo crecimiento de *C. sphaerospermum* y *L. theobromae* en ninguna de las concentraciones de Ag5NPQ empleadas.

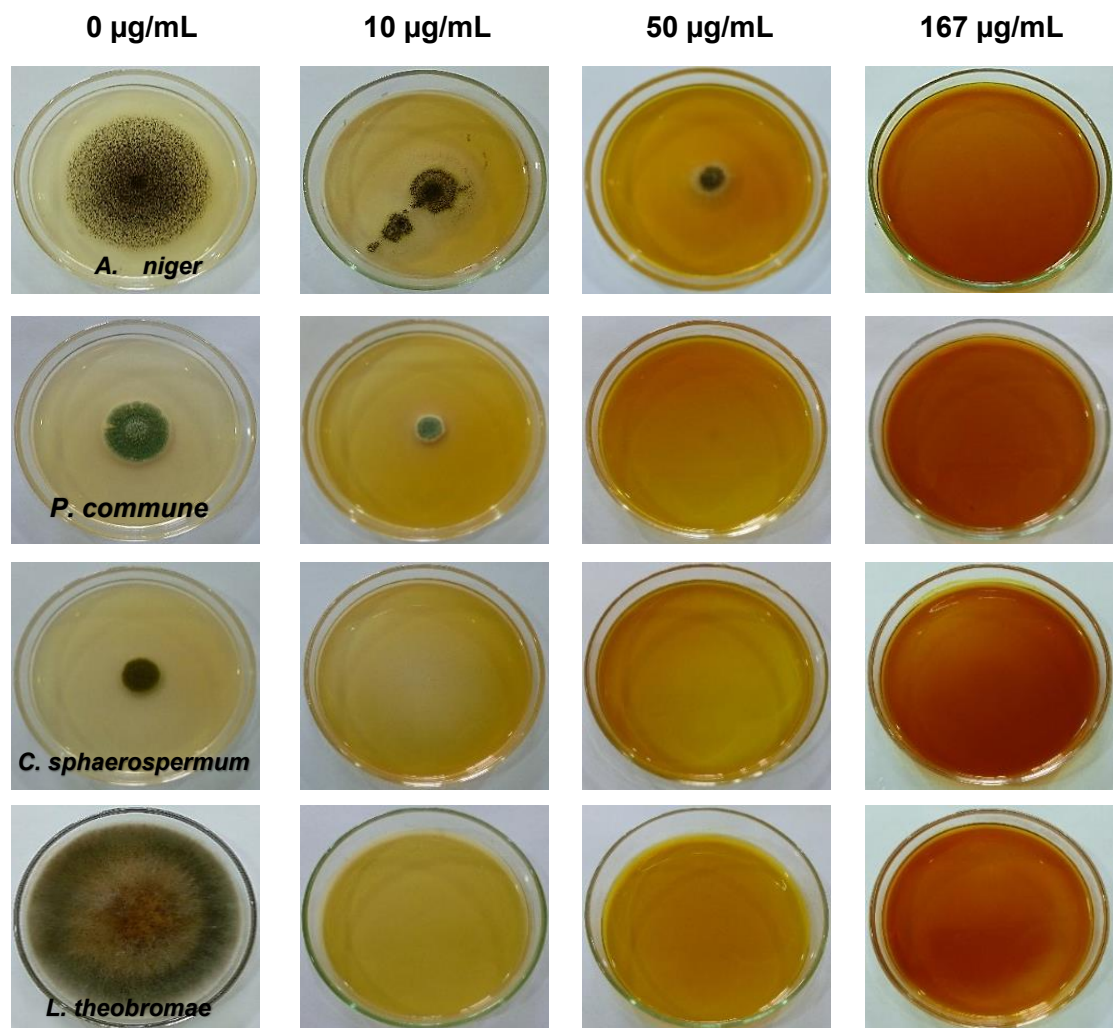




**Figura 4.6.** Medidas del diámetro de la colonia. Letras diferentes en barras indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) para la prueba de Tukey



**Figura 4.6 (Continuación).** Medidas del diámetro de la colonia. Letras diferentes en barras indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) para la prueba de Tukey.



**Figura 4.7.** Efecto de las NPs sobre el diámetro de la colonia. Crecimiento de hongos en placa de Petri con MEA y Ag5NPQ, t = 7 días, T = 28 ° C.

### Formulación y caracterización de recubrimiento sol-gel

Considerando los espectros de absorción UV-vis, los espectros FTIR, el análisis de distribución de tamaño y la actividad antifúngica, se seleccionó la suspensión de Ag5NPQ como nanoaditivo en la formulación de los recubrimientos. El método de hidrólisis y condensación propuesto permitió obtener el recubrimiento sol-gel funcionalizado con Ag5NPQ.

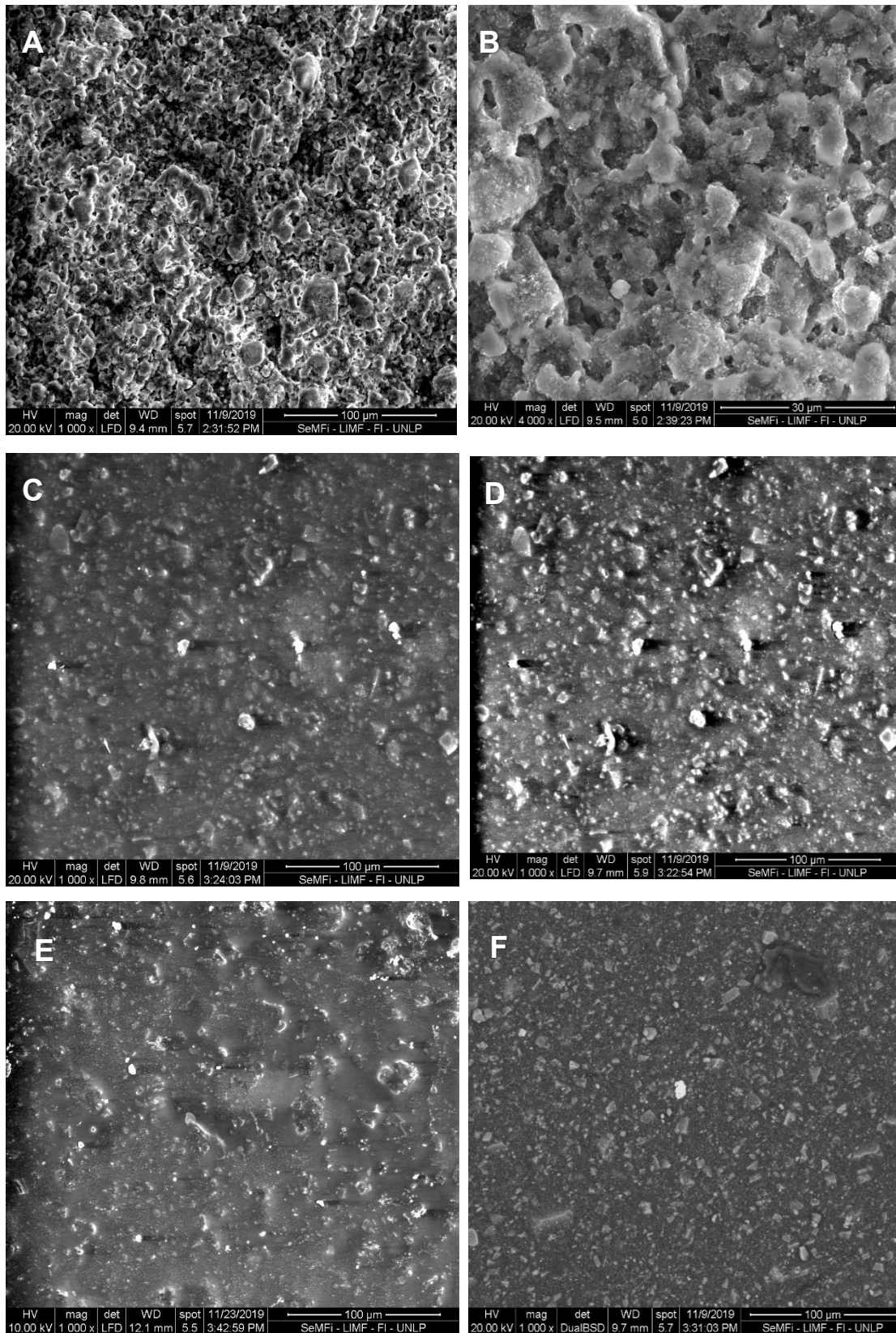
Se realizó la caracterización de la pintura acrílica utilizada y el grado de dispersión fue superior a 100 µm, el tiempo de secado al tacto fue de 45 min mientras que el secado duro fue de 115 min. El poder cubritivo se obtuvo después de dos aplicaciones cruzadas (75 + 75 µm) y la capacidad de lavabilidad

fue mayor que 4000 ciclos. Los valores mostrados son aceptables para pintura acrílica de acuerdo con los estándares utilizados.

La Figura 4.8 muestra micrográficas SEM de las muestras. En la pintura acrílica se observó una superficie muy irregular (Figura 4.8 A y B). Sin embargo, en el recubrimiento sol-gel (Figura 4.8 C y D) y el recubrimiento sol-gel + Ag5NPs (Figura 4.8 E y F) sobre la pintura acrílica, se constató la presencia de una superficie más homogénea, posiblemente debido a la presencia del recubrimiento propiamente dicho.

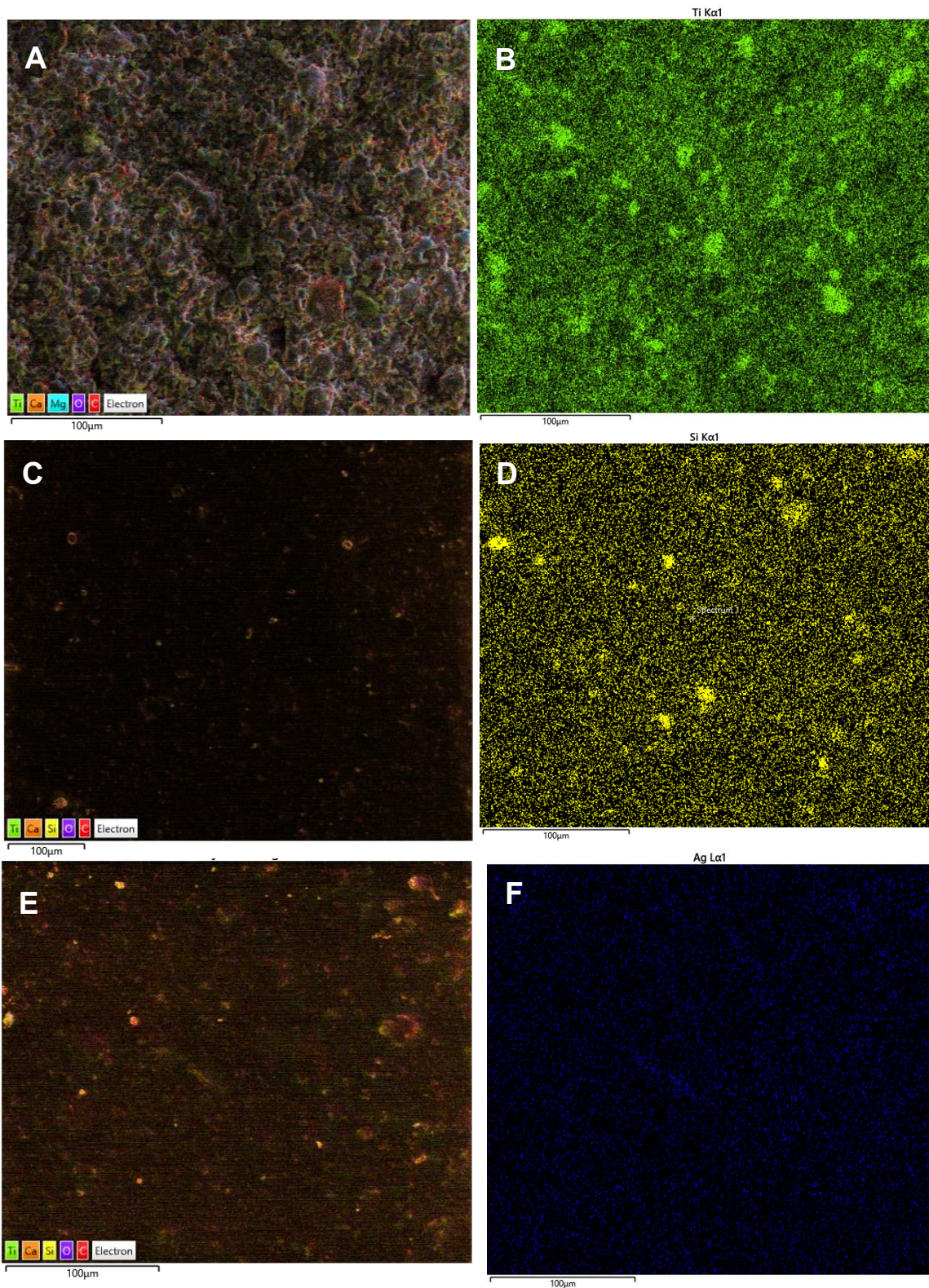
Por su parte, en la figura 4.9 se observa el mapeo de rayos X y en la figura 4.10 los espectros EDS de las mismas muestras. La pintura sin recubrimiento sol-gel presentó una distribución parcialmente homogénea de elementos Ti, Mg, O y C (Figura 4.9 A y B). Además, los picos del espectro de EDS para estos elementos se observaron a los 0,4; 1,2; 0,5 y 0,1 keV, respectivamente (Figura 4.10 A). Estos elementos están presentes en los compuestos químicos utilizados en la pintura.

Cuando la pintura estuvo recubierta con AMEO y recubrimiento AMEO+ Ag5NPQ, el mapeo de rayos X mostró una distribución homogénea de elementos como Ti, Mg, O y C (Figura 4.9 C y E). Incluso en las Figuras 4.9 D y F se observó una distribución homogénea sobre todo el material de Si y Ag. Además, los espectros EDS detectaron N y Si a los 0,1 y 1,7 keV, respectivamente (Figura 4.10 B), estos elementos son parte de la estructura química AMEO utilizado. Por último, se observó un pico de Ag a 3 keV en los espectros EDS del recubrimiento sol-gel + Ag5NPQ sobre la pintura (Figura 4.10 C). Esto estaría indicando que las Ag5NPQ fueron retenidas en la matriz durante el secado del recubrimiento sol-gel y posiblemente interactúen con los grupos amino del silano.

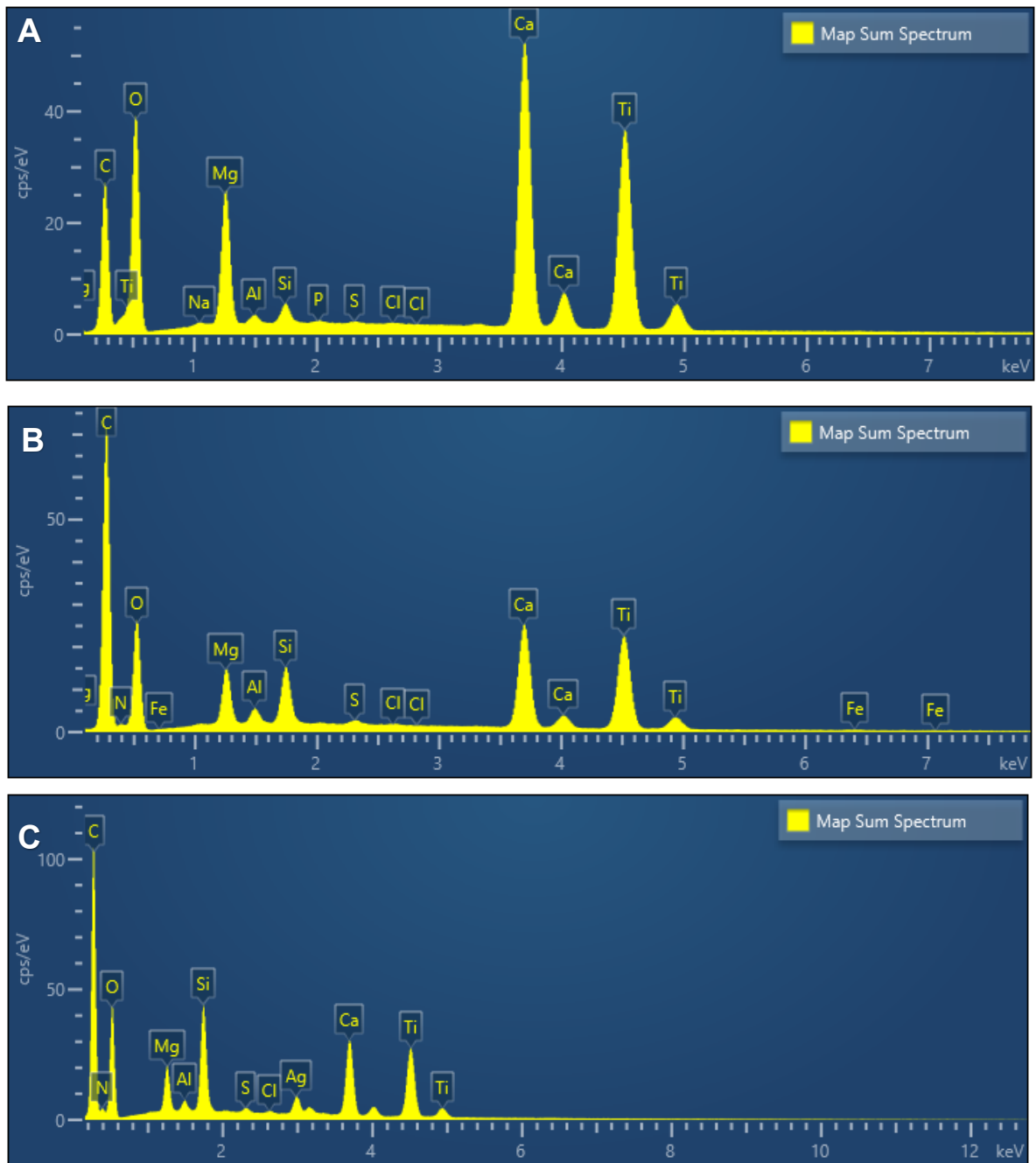


**Figura 4.8.** Microfotografías SEM. A y B: Control (pintura sin recubrimiento sol-gel). C y D: Recubrimiento de sol-gel sobre la pintura. E y F: Recubrimiento sol-gel + Ag5NPs sobre la pintura





**Figura 4.9.** Mapeo de rayos X. A y B: Control (pintura sin recubrimiento sol-gel). C y D: Recubrimiento de sol-gel sobre la pintura. E y F: Recubrimiento sol-gel + Ag5NPs sobre la pintura



**Figura 4.10.** Espectros EDS. A: Control (pintura sin recubrimiento sol-gel). B: Recubrimiento de sol-gel sobre la pintura. C: Recubrimiento sol-gel + Ag5NPs sobre la pintura.

Por otro lado, en la Figura 4.11 se muestran los resultados obtenidos a partir del ensayo de absorción de humedad lo cual evidenció que no existieron diferencias significativas en la absorción de humedad entre la pintura acrílica con y sin silano. En el primer ciclo se absorbe mucha humedad, luego en el segundo y tercero se estabiliza al 0,2%. La desorción de agua es similar. Los datos

graficados corresponden a los vidrios que absorbieron más agua en cada muestra. Los resultados indican que la presencia de la película de silano no modificó la absorción de humedad de la pintura.

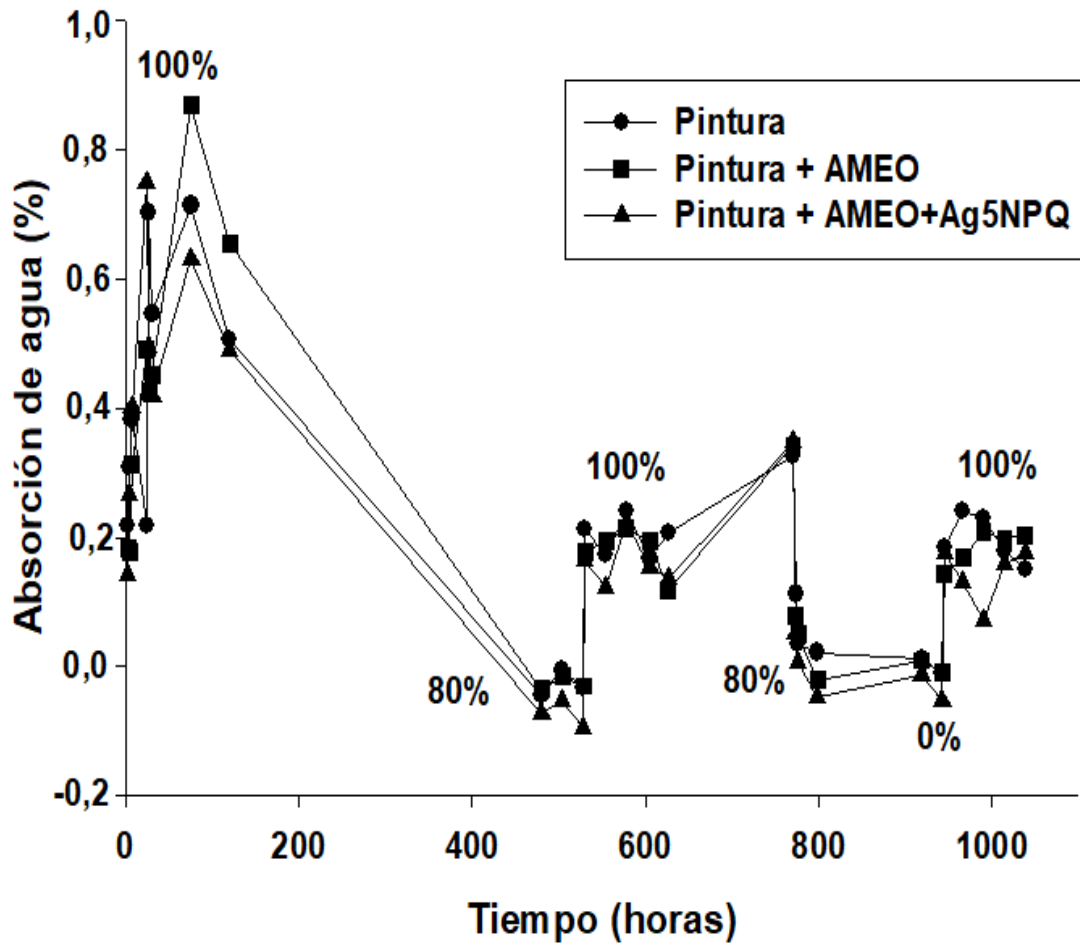
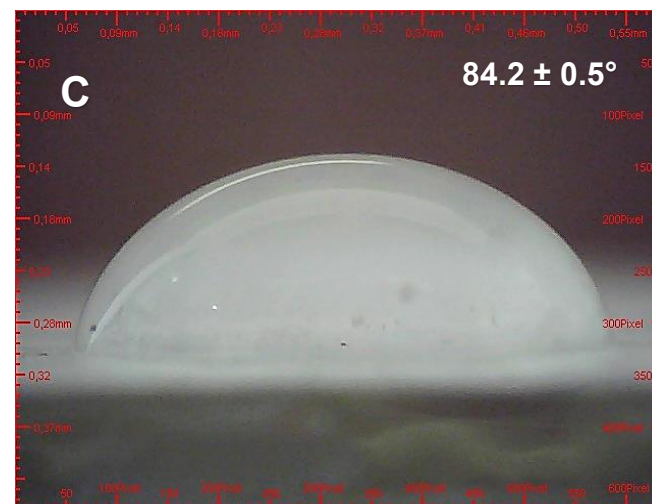
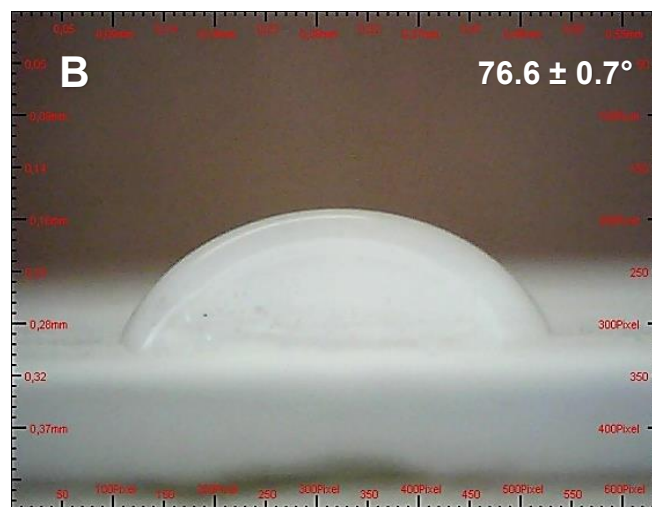
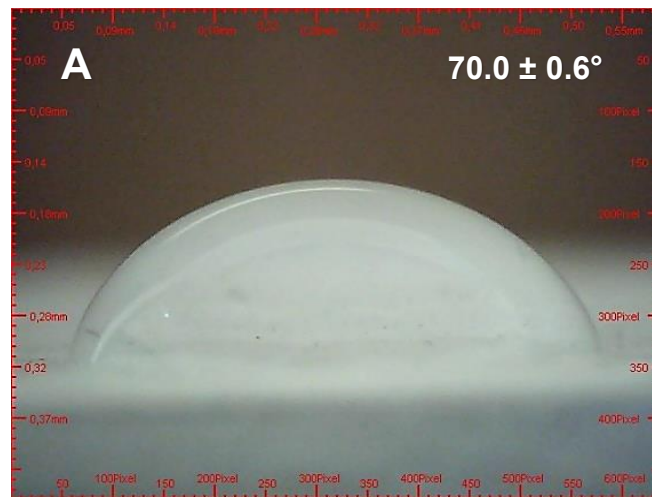


Figura 4.11. Ciclos de absorción/desorción de humedad en las muestras.





**Figura 4.12.** Estereografías de gotas de agua sobre muestras y el ángulo de contacto. A: Pintura, B: recubrimiento sol-gel sobre la pintura y C: recubrimiento de sol-gel + Ag5NPs sobre la pintura.

La Figura 4.12 proporciona estereografías de las gotas de agua depositadas sobre las muestras en el ensayo de determinación del ángulo de contacto.

Los valores del ángulo de contacto de la pintura sin recubrimiento sol-gel, recubrimiento sol-gel sobre la pintura y recubrimiento sol-gel+ Ag5NPQ sobre la pintura fueron  $70,0\pm 0,6^\circ$ ,  $76,6\pm 0,7^\circ$  y  $84,2\pm 0,5^\circ$  respectivamente (Figura 4.12 A-C). Entonces, todas las muestras fueron hidrofílicas ya que los ángulos de contacto tuvieron valores entre  $10^\circ$  y  $90^\circ$  (Koch and Barthlott, 2009). Por lo tanto, el recubrimiento no aportó la condición de hidrofobicidad a la pintura, pero la aumentó levemente, por la modificación hacia valores mayores del ángulo de contacto.

### Prueba de resistencia fúngica del recubrimiento sol-gel

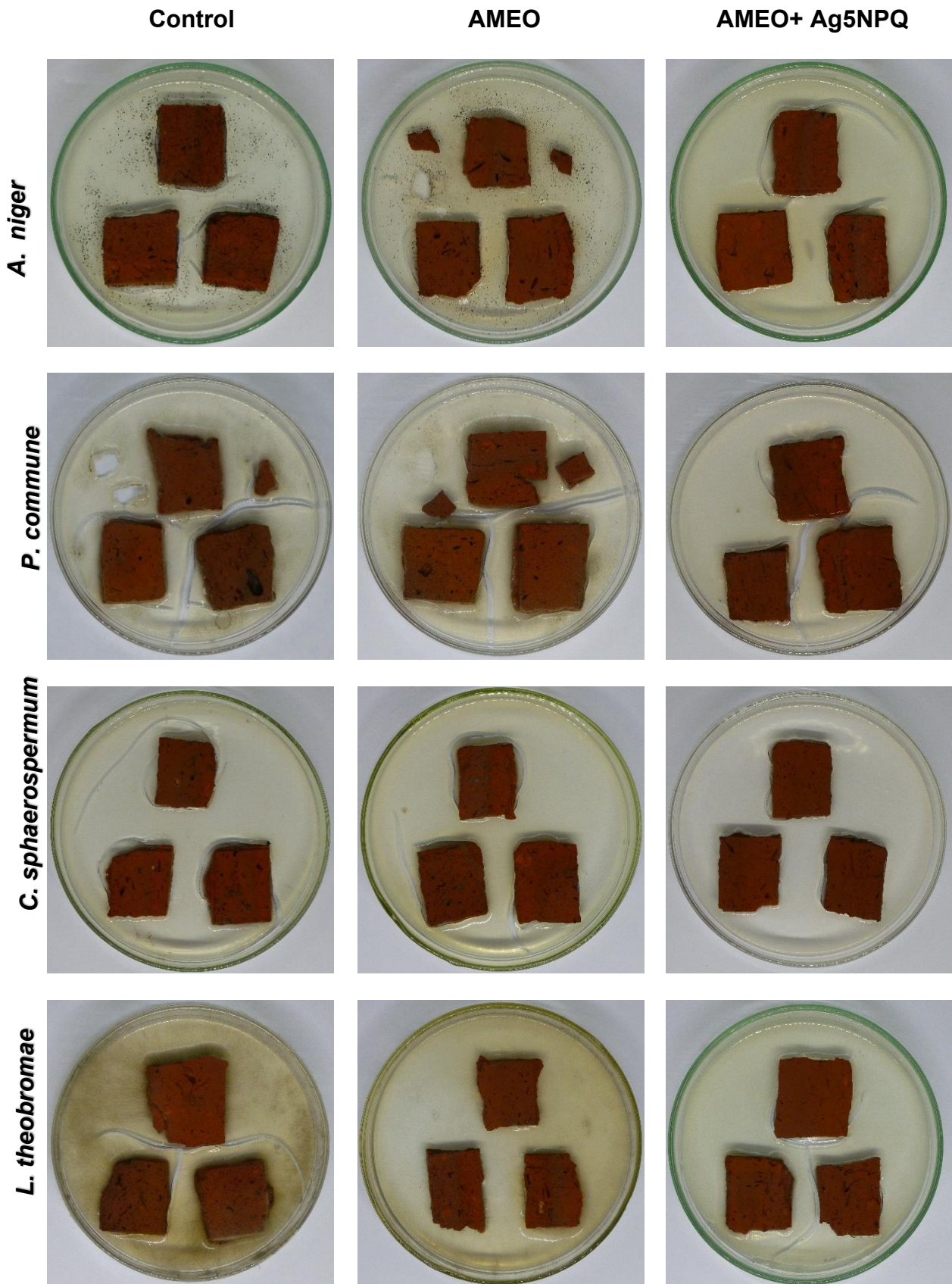
En la Tabla 4.2 se puede ver el índice de crecimiento fúngico de acuerdo con el área cubierta sobre el material cerámico.

**Tabla 4.2.** Índice de crecimiento de hongos según el área cubierta en el ladrillo.

| Muestra      | <i>A. niger</i> | <i>P. commune</i> | <i>C. sphaerospermum</i> | <i>L. theobromae</i> |
|--------------|-----------------|-------------------|--------------------------|----------------------|
| Control      | 4               | 4                 | 3                        | 4                    |
| AMEO         | 3               | 3                 | 3                        | 3                    |
| AMEO+ Ag5NPQ | 0               | 0                 | 0                        | 0                    |
| MTMO         | 4               | 3                 | 2                        | 2                    |
| MTMO+ Ag5NPQ | 2               | 2                 | 1                        | 1                    |

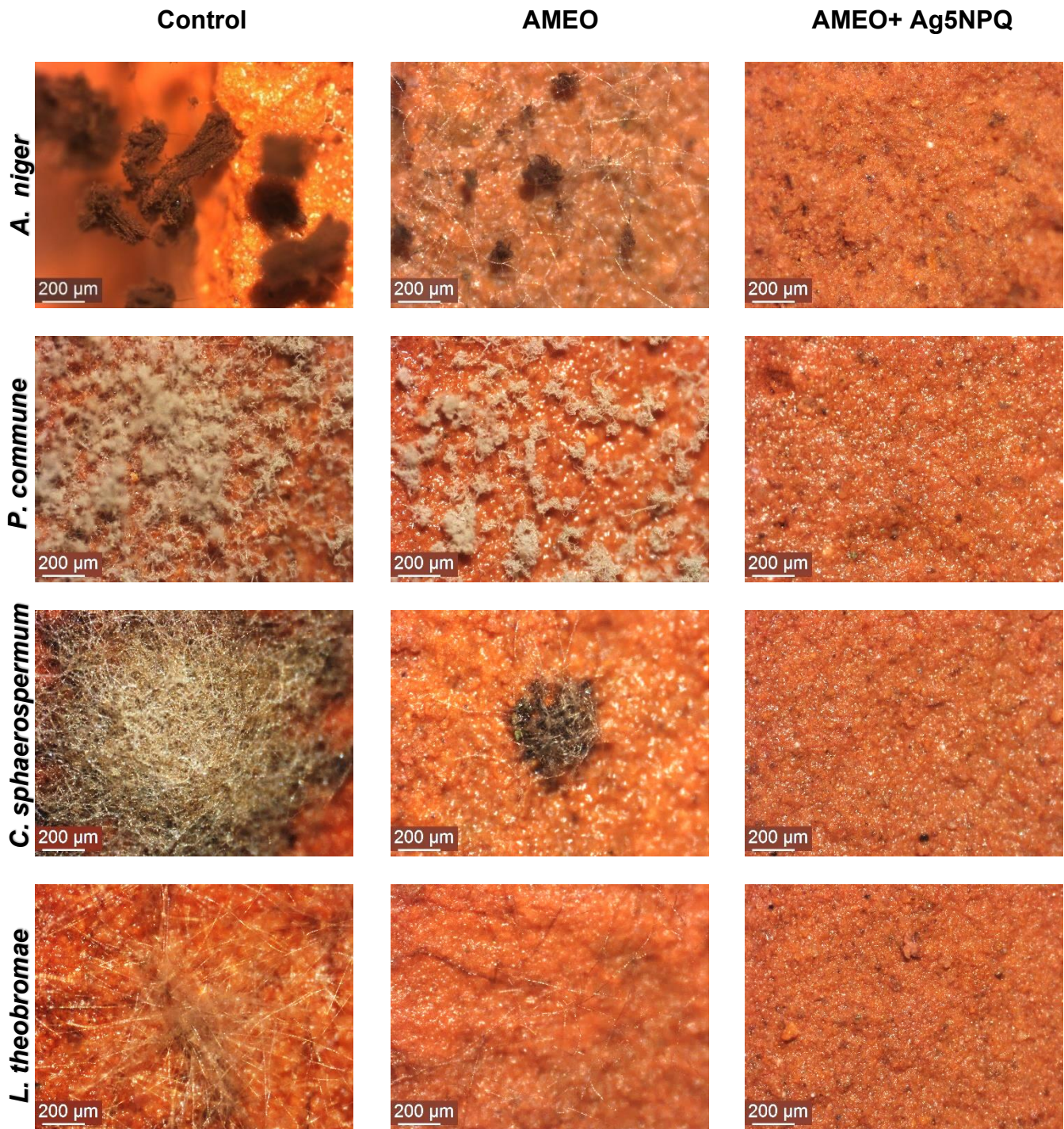
Registros fotográficos obtenidos al concluir el ensayo de resistencia fúngica en los ladrillos recubiertos con AMEO se observan en las Figuras 4.13, 4.14 y 4.15 frente a distintas cepas.

En la Figura 4.13 se observan colonias solamente en el control y en el recubrimiento de AMEO. En el caso de *A. niger*, *P. commune* y *L. theobromae* el crecimiento se observó sobre el ladrillo y en el medio de cultivo. En el caso de *C. sphaerospermum* solo se observan colonias puntuales en los ladrillos. Por su parte, en la figura 4.14 se muestran estereofotografías de este ensayo. Se observó micelio somático y reproductivo de todas las cepas cuando estuvieron enfrentadas al control y AMEO, no así en el caso de AMEO+Ag5NPQ solo se observó el ladrillo.



**Figura 4.13.** Ensayo de resistencia fúngica de los ladrillos recubiertos con AMEO en MMA, t = 30 días y T = 28 °C.

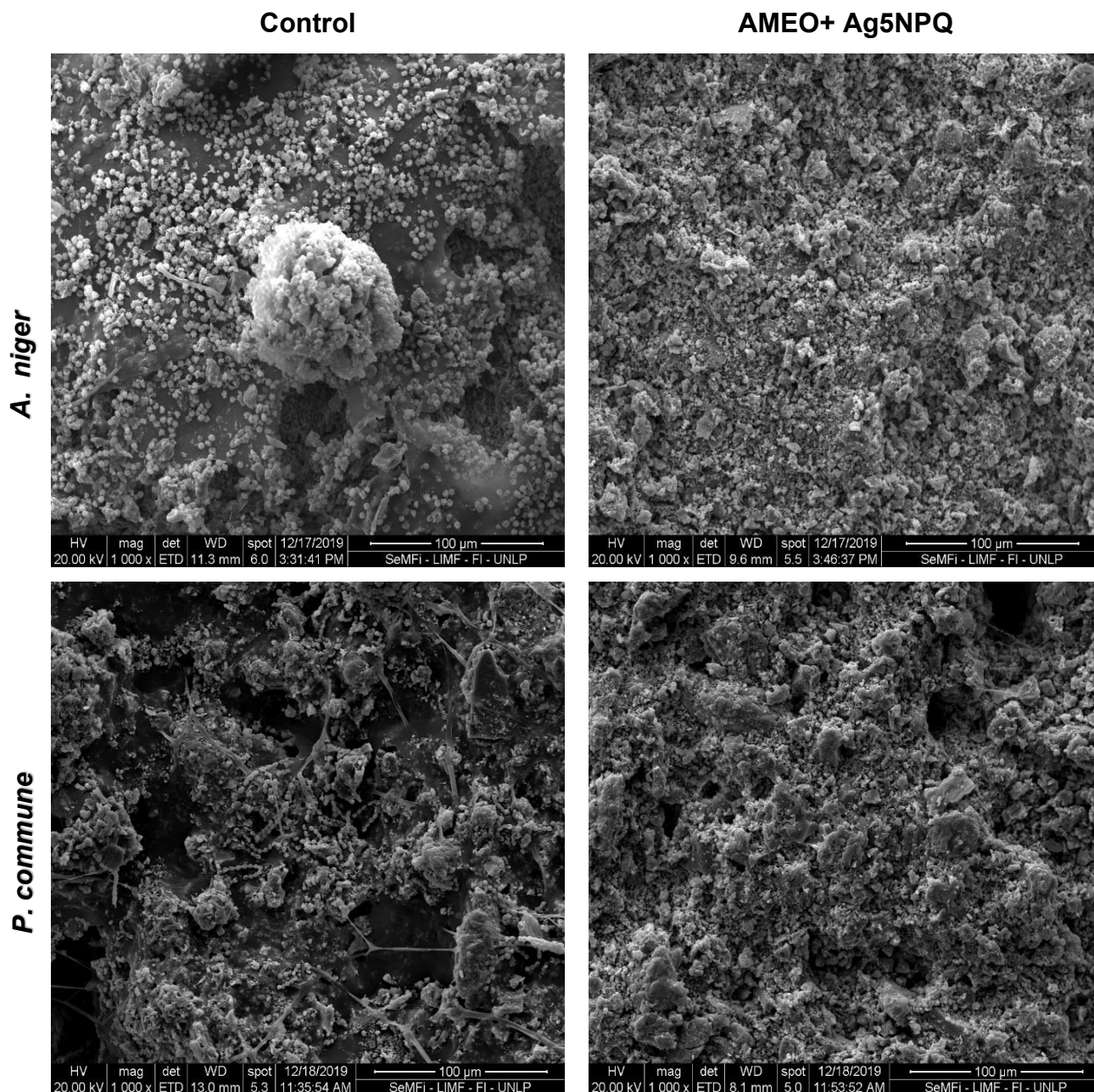




**Figura 4.14.** Estereofotografías del ensayo de resistencia fúngica de los ladrillos recubiertos con AMEO,  $t = 30$  días y  $T = 28$  °C. 80x

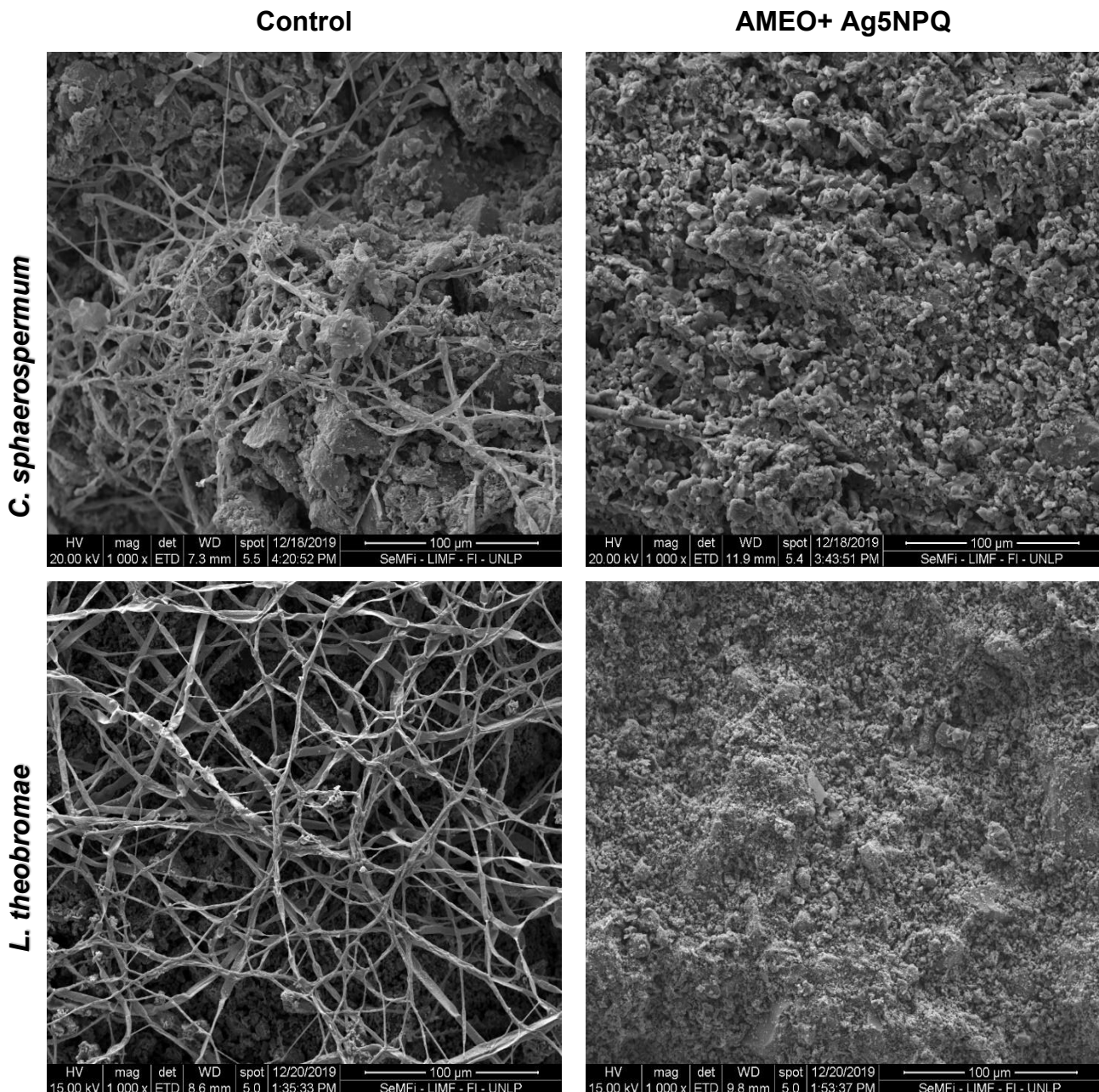
Por último, la figura 4.15 muestra las microfotografías SEM. En el control se observaron abundantes fialoconidios libres o asociados a conidióforos de *A. niger* y *P. commune*, no así en caso de *C. sphaerospermum* y *L. theobromae* donde la presencia de micelio somático es muy conspicua. No hubo crecimiento

fúngico sobre AMEO+Ag5NPQ debido a la actividad antifúngica de las nanopartículas.



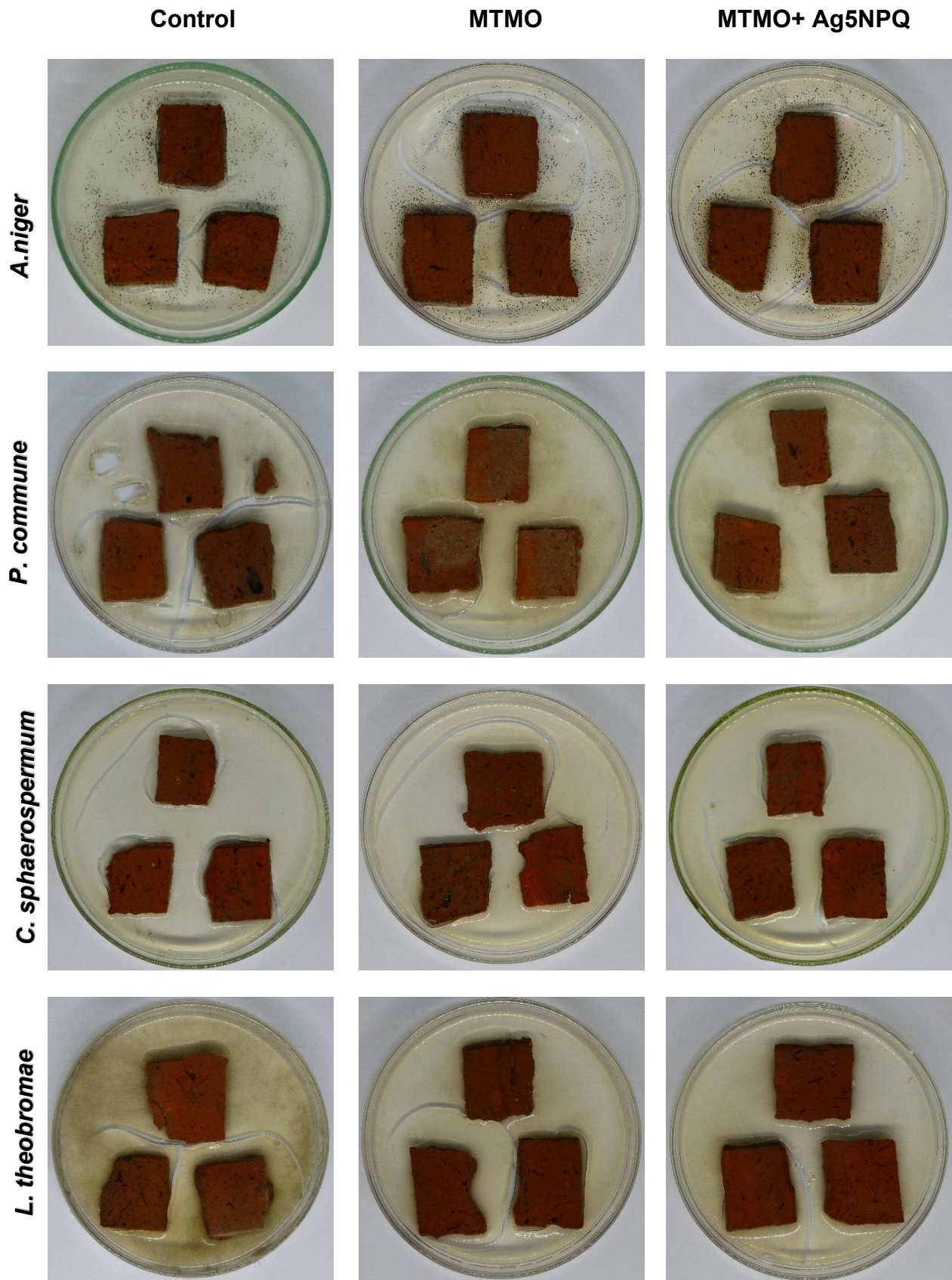
**Figura 4.15.** Micrografías SEM del ensayo de resistencia fúngica de los ladrillos recubiertos con AMEO, t = 30 días y T = 28 °C.1000x





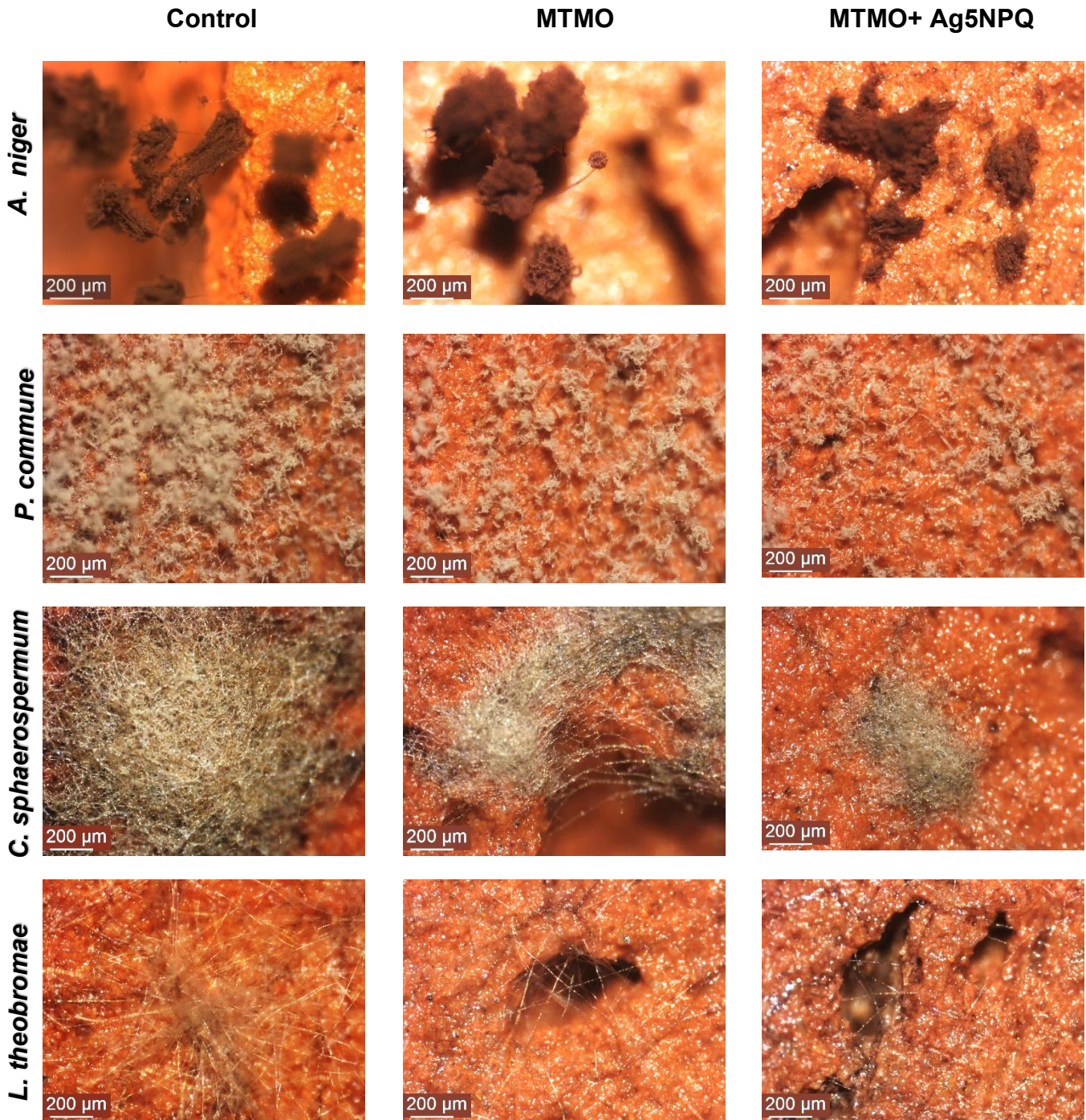
**Figura 4.15 (Continuación).** Micrografías SEM del ensayo de resistencia fúngica de los ladrillos,  $t = 30$  días y  $T = 28$  °C.1000x

Por otra parte, las figuras 4.16, 4.17 y 4.18 muestran los resultados obtenidos de este ensayo cuando los ladrillos estuvieron recubiertos con MTMO. En la figura 4.16 se observaron colonias tanto en el control, como en los tratamientos. *A. niger*, *P. commune* y *L. theobromae* mostraron un crecimiento más invasivo sobre el material con respecto a *C. sphaerospermum*.



**Figura 4.16.** Ensayo de resistencia fúngica de los ladrillos recubiertos con MTMO en MMA, t = 30 días y T = 28 °C.



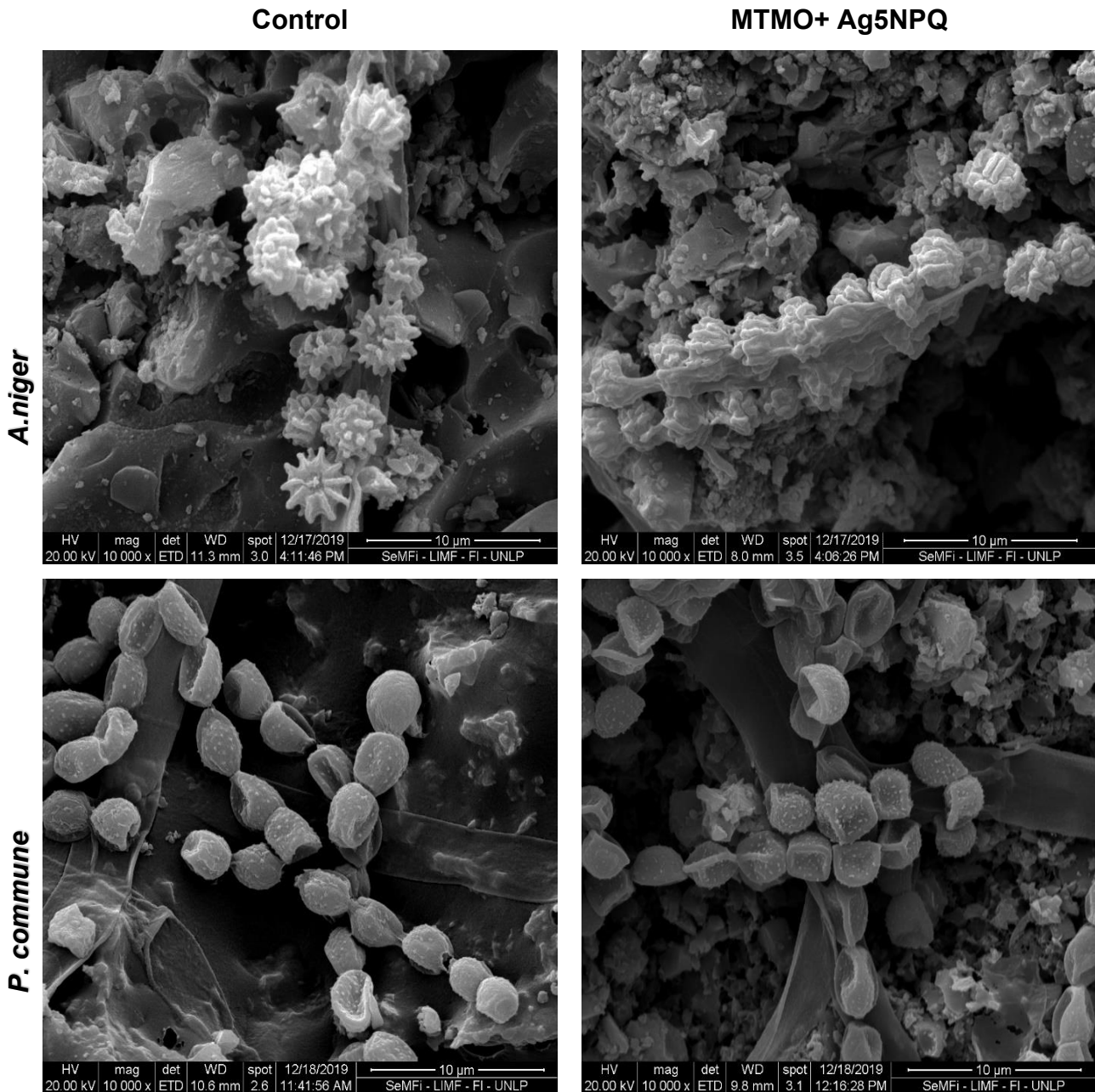


**Figura 4.17.** Estereofotografías del ensayo de resistencia fúngica de los ladrillos recubiertos con MTMO, t = 30 días y T = 28 °C. 80x

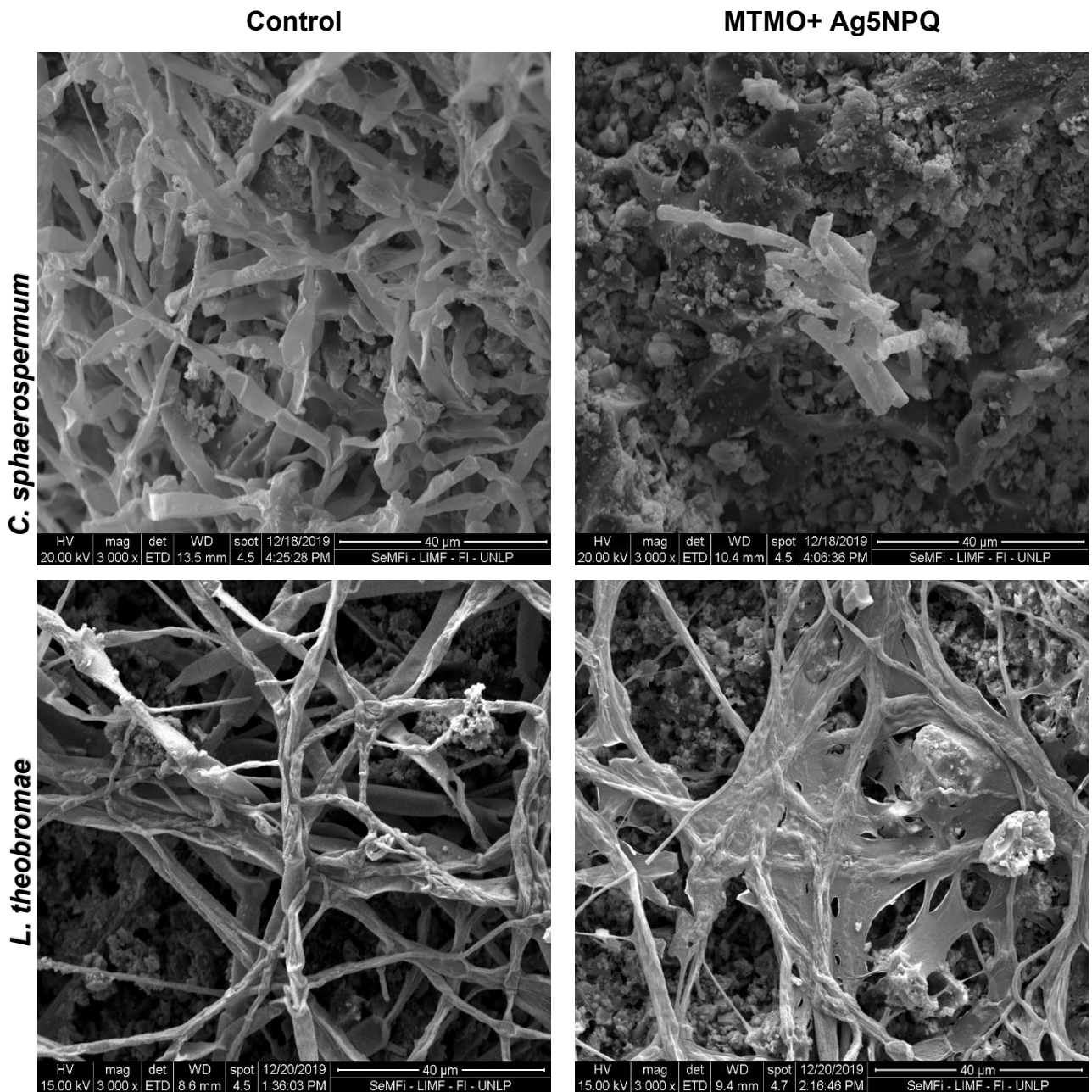
En todas las estereofotografías (Figura 4.17) se observó micelio somático y reproductivo, para el caso de *A. niger* y *P. commune* con una apariencia pulverulenta y para el resto de las cepas una apariencia algodonosa. En las micrografías de SEM (Figura 4.18) se observan solamente las ornamentaciones conidiales de *A. niger* y *P. commune*. En el caso de *C. sphaerospermum* se



observó micelio somático escaso y ruptura de las hifas en *L. theobromae* cuando estuvieron enfrentadas a MTMO+Ag5NPQ. Por lo tanto, AMEO + Ag5NPQ tuvo mejor performance antifúngico con respecto a MTMO+ Ag5NpQ en el recubrimiento de material cerámico.



**Figura 4.18.** Micrografías SEM del ensayo de resistencia fúngica de los ladrillos, t = 30 días y T = 28 °C.10000x



**Figura 4.18 (Continuación).** Micrografías SEM del ensayo de resistencia fúngica de los ladrillos,  $t = 30$  días y  $T = 28$  °C.3000x

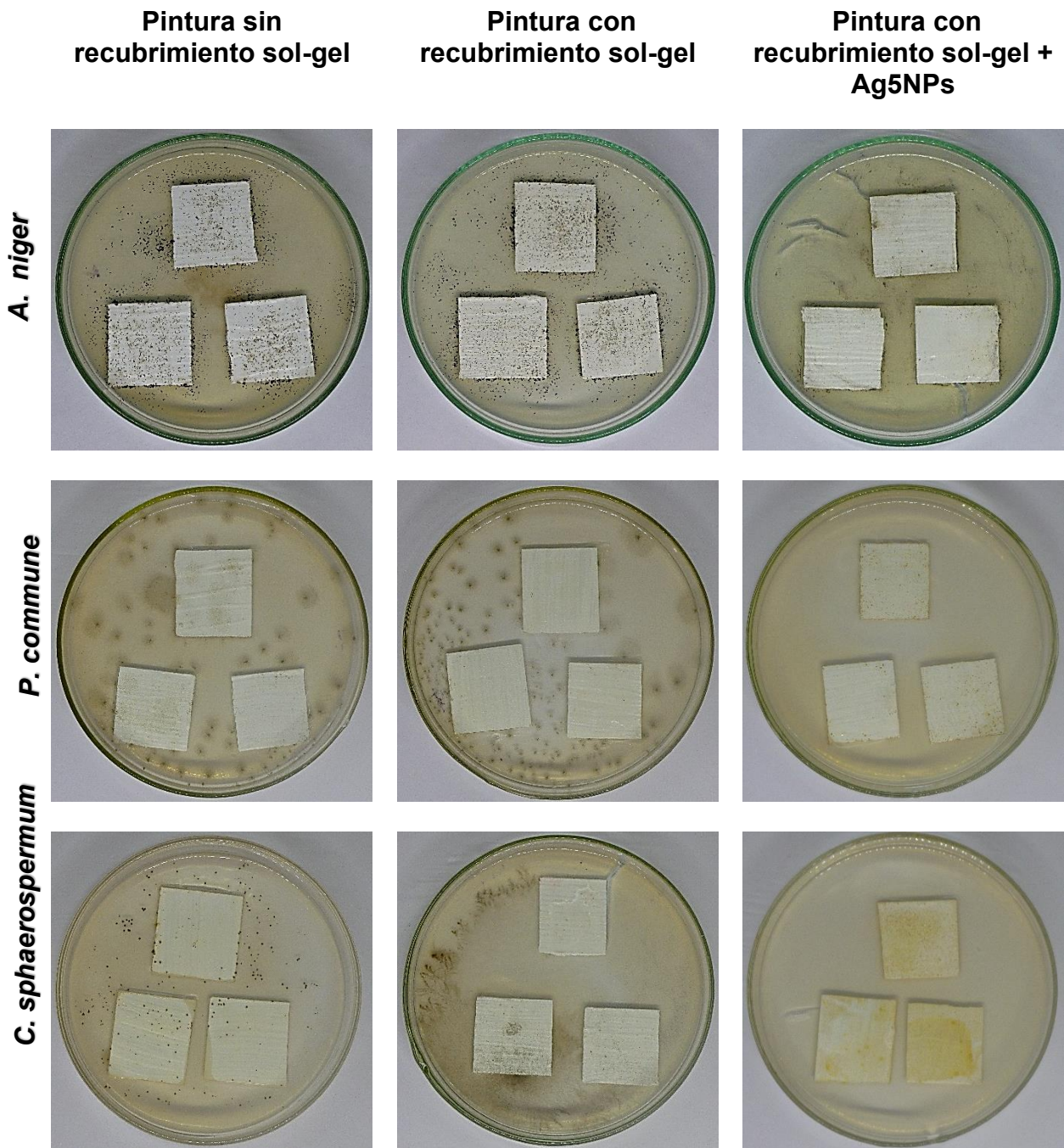
Por otra parte, en la Tabla 4.3 se puede ver el índice de crecimiento fúngico sobre la pintura con y sin el tratamiento con el sol-gel de acuerdo con el área cubierta. El recubrimiento sol-gel aplicado sobre la pintura fue el de AMEO teniendo en cuenta la mayor eficiencia reportada en el ensayo con el material cerámico.

**Tabla 4.3.** Índice de crecimiento de hongos según el área cubierta.

| Cepas                   | Pintura sin recubrimiento sol-gel | Pintura con recubrimiento sol-gel | Pintura con recubrimiento sol-gel + Ag5NPQ |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|
| <i>A. niger</i>         | 4                                 | 3                                 | 0  |
| <i>P. commune</i>       | 3                                 | 2                                 | 0  |
| <i>C.sphaerospermum</i> | 3                                 | 2                                 | 0  |
| <i>L. theobromae</i>    | 4                                 | 3                                 | 0  |

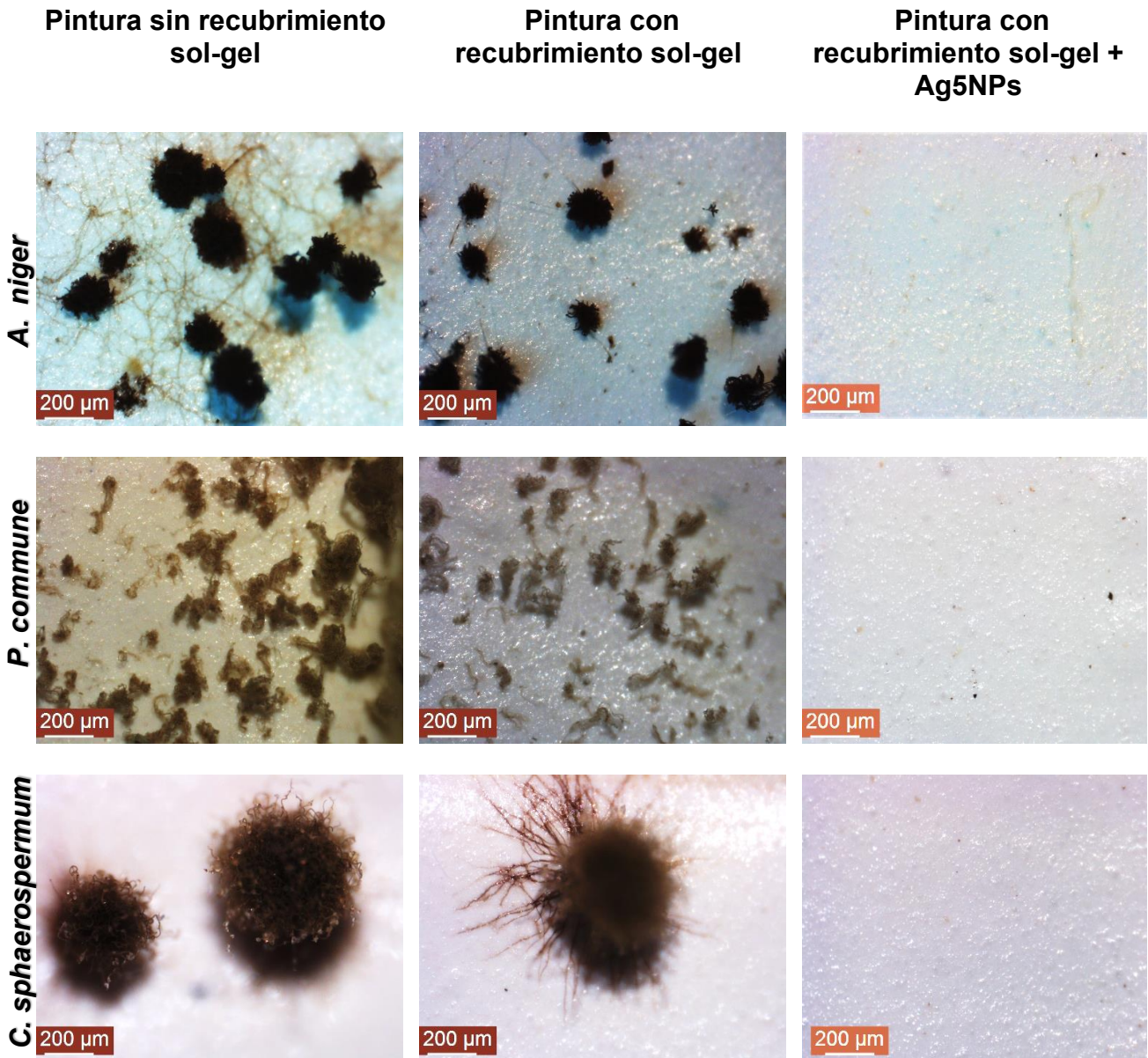
Los resultados de las pruebas de resistencia fúngica de las muestras frente a *A. niger*, *P. commune* y *C. sphaerospermum* se muestran en la Figura 4.19 y Figura 4.20 a partir de los registros fotográficos obtenidos. En las muestras no recubiertas las cepas tuvieron un crecimiento intenso (60-100%), excepto en el caso de *P. commune* y *C. sphaerospermum* que tuvieron un crecimiento moderado (30–60%) sobre pintura acrílica. En las muestras tratadas con el recubrimiento AMEO, se observó un crecimiento moderado de *A. niger* y *L. theobromae*, aunque fue ligero (10-30%) en las otras dos cepas. Sin embargo, no hubo crecimiento de hongos en las muestras cuando fueron recubiertas con AMEO + Ag5NPQ debido a la presencia de estas partículas retenidas en la matriz de silano.

En la pintura sin y con recubrimiento de sol-gel, se observó micelio somático y reproductivo, tanto en el medio de cultivo como en las muestras. En cambio, el recubrimiento de sol-gel + Ag5NPQ sobre la pintura demostró ser eficiente para prevenir el desarrollo de películas fúngicas con una inhibición del 100% contra las cepas empleadas en este estudio (Figura 4.20). Esta evidencia muestra que la actividad antifúngica del recubrimiento está relacionada con la presencia de Ag5NPQ.



**Figura 4.19.** Ensayo de resistencia fúngica de las muestras. Placas de Petri con MMA, t = 30 días y T = 28 °C.





**Figura 4.20.** Estereofotografías del ensayo de resistencia fúngica de las muestras,  $t = 30$  días,  $T = 28$  °C. 80x

## Discusión

Estudios han indicado que las biomoléculas como proteínas, carbohidratos, flavonoides y fenoles no solo juegan un papel en la estabilización de las nanopartículas, sino que también en la reducción de iones al tamaño nano (Jasrotia et al., 2020). Posiblemente, la morfología y el tamaño de partícula estuvieron influenciados por las condiciones de reacción, como la concentración de reactivos, el tipo de agente reductor (polifenoles) y el tiempo o temperatura de síntesis.

En el capítulo anterior se estudió la síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando tanino de *Caesalpinia spinosa*. Curiosamente, el tamaño de partícula promedio (27 y 22 nm) en el presente capítulo usando *S. balansae* fue mayor al tamaño de partículas (15 y 7 nm) sintetizadas con *C. spinosa*. Igualmente, la morfología de las nanopartículas fue idéntica, aunque hayan sido sintetizadas por diferentes taninos.

En el presente capítulo, se registró la actividad antifúngica de las AgNPQ biosintetizadas frente a cuatro cepas altamente deteriorantes (*A. niger*, *P. commune*, *C. sphaerospermum* y *L. theobromae*). Ambas poblaciones de partículas redujeron el crecimiento micelial de los hongos seleccionados a partir de los atributos estudiados en el Capítulo 2. Las NPs obtenidas con la solución de TQ de menor concentración mostró mayor actividad frente a las cepas en estudio. Esto puede estar relacionado con la diferencia de tamaño ya que las nanopartículas pequeñas tienen mayor actividad biológica (27 y 22 nm para Ag1NPQ y Ag5NPQ respectivamente) (Mittal et al., 2013). Anteriormente, varios estudios científicos han informado de la actividad antifúngica de los AgNPs contra diferentes hongos deteriorantes (Barberia-Roque et al., 2019a; Fernández et al., 2020; Gámez-Espinosa et al., 2020). Recientemente, (Scroccarello et al., 2021) observaron que las AgNPs sintetizadas usando compuestos fenólicos exhibían actividad antifúngica contra *A. niger*. Sin embargo, faltan informes sobre el efecto de los AgNP en *C. sphaerospermum*.

Como se menciona en la literatura científica, un posible mecanismo de actividad antifúngica se basa en la internalización de los AgNPs por el extremo apical de la hifa en crecimiento. Una vez que las NPs están en el medio intracelular, su fuerte interacción con nucleófilos como los grupos amino y tiol provoca la inactivación de algunas enzimas y afecta procesos como la nutrición y la respiración celular. Los iones de plata pueden provocar la desnaturalización de proteínas y ADN, lo que afecta la maquinaria replicativa en la célula fúngica (Żarowska et al., 2019; Kavitha et al., 2020; Khan et al., 2020).

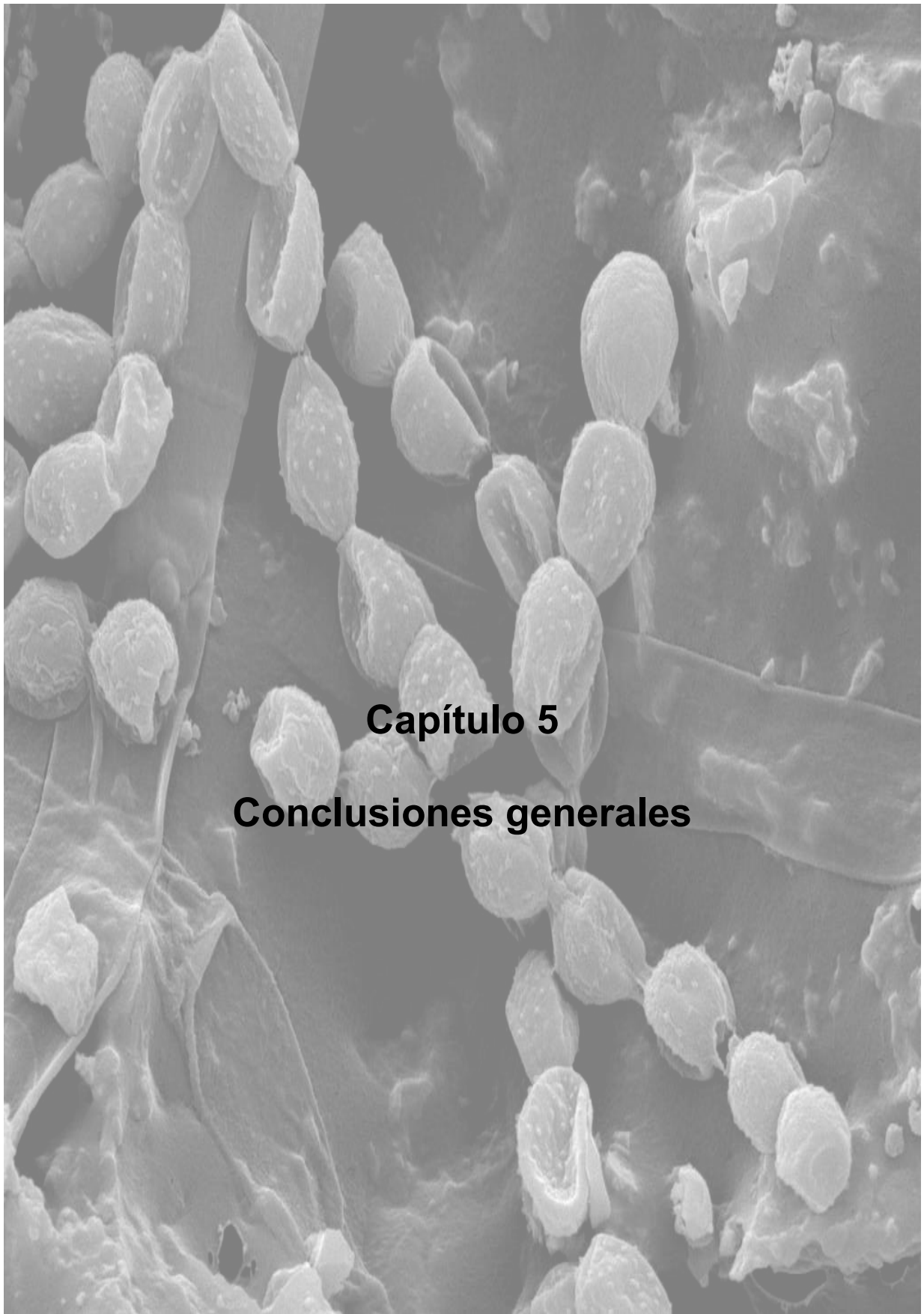
Los valores mostrados en los ensayos de caracterización son aceptables para la pintura acrílica de acuerdo con los estándares utilizados. Las NPs en combinación con el recubrimiento se considera un enfoque prometedor para fabricar superficies hidrofóbicas mecánicamente duraderas en sustratos sólidos al mejorar la adhesión entre el componente nano y los sustratos subyacentes (Seyfi et al., 2015). Sin embargo, el recubrimiento sol-gel obtenido no modificó las características de hidrofobicidad/hidrofilicidad de la pintura acrílica, aunque el ángulo de contacto cambió 10°.

Las investigaciones científicas demuestran que tanto la micro/nanoestructura rugosa como los componentes de baja energía superficial son indispensables para construir superficies hidrófobas (Buruiana et al., 2020). Sin embargo, debido a la fragilidad de la rugosidad microscópica, estas texturas no humectantes son susceptibles a la destrucción mecánica, incluso con rayones moderados (por ejemplo, toque con los dedos), provocando que la durabilidad mecánica sea una preocupación importante para las superficies hidrófobas en aplicaciones prácticas (Zhang et al., 2020).

Por otro lado, las cepas fúngicas seleccionadas crecieron en la pintura sin recubrimiento debido a los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en la formulación. Por ejemplo, los compuestos orgánicos como la resina pueden servir como fuente de carbono (Gaylarde et al., 2011). Varios autores han logrado funcionalizar recubrimiento sol-gel con nanopartículas aplicadas para controlar la corrosión y la actividad bacteriana (González et al., 2019; Zhang et al., 2021). Pero queda mucho por decir sobre el uso de recubrimientos sol-gel con nanopartículas obtenidas por síntesis verde aplicadas como sistema de



protección. Un hallazgo interesante es la obtención de un recubrimiento sol-gel funcionalizado con AgNPs sintetizados a partir del tanino de *S. balansae* para la protección contra el deterioro fúngico de las pinturas acrílicas. Sin embargo, aunque este resultado es muy prometedor, es necesario estudiar la eficiencia del recubrimiento por más de 30 días y analizar la liberación controlada de Ag5NPQ para optimizar la formulación y extender el comportamiento protector.



## **Capítulo 5**

### **Conclusiones generales**

Sobre la base de las hipótesis planteadas en esta tesis y realizado todos los experimentos detallados anteriormente, se han obtenido las siguientes conclusiones:

Hipótesis 1. Sobre ladrillo y hormigón se desarrolla una microbiota diversa y que algunos de los hongos que la integran son microorganismos altamente degradantes de esos materiales. Se acepta la primera hipótesis de la que se extraen las siguientes conclusiones:

- Mediante el método de muestreo y las técnicas de aislamiento utilizadas fue posible estudiar los especímenes cultivables obtenidos a partir de la microbiota presente en fachadas de dos edificios de La Plata (Catedral de La Plata y la Estación Experimental del Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas).
- Los géneros con mayor frecuencia relativa de aparición en la fachada de la Catedral de La Plata fueron *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria* por lo que se consideraron abundantes.
- DUSM 1 y *Chrysonilia* sp. fueron las cepas con mayor frecuencia relativa de aparición en la Estación Experimental del Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas.
- YUSM y *C. cladosporioides* presentaron la mayor densidad relativa en ambos sitios de muestreo.
- Los atributos biodeteriantes permitieron caracterizar las especies cultivables aisladas de los sitios de muestreo.
- Las pruebas realizadas permitieron seleccionar entre los aislados las cepas con mayor potencialidad biodeteriorante: *A. niger* MN371276, *L. theobromae* MN371283, *C. sphaerospermum* MN371394, *P. commune* MN371392 y *A. spectabile* MT071822.

- El análisis molecular permitió confirmar la identificación taxonómica de las cepas altamente biodeteriorantes y analizar su relación evolutiva.
- Las investigaciones en micología son una herramienta para obtener información sobre las especies cultivables presentes en la biopelícula de las construcciones edilicias

Hipótesis 2: Aislados fúngicos altamente deteriorantes pueden ser utilizados como bioindicadores en la evaluación de potenciales activos antifúngicos y recubrimientos. Se acepta la segunda hipótesis de la que se extraen la siguiente conclusión:

- *A. niger* MN371276, *L. theobromae* MN371283, *C. sphaerospermum* MN371394 y *P. commune* MN371392 son bioindicadores eficientes para la evaluación de la performance antifúngica de aditivos y recubrimientos.

Hipótesis 3: Los recubrimientos basados en silanos presentan propiedades adecuadas para ser aplicados en la protección de los materiales en estudio. Se acepta la segunda hipótesis de la que se extraen las siguientes conclusiones:

- La determinación del ángulo de contacto, la absorción de agua, SEM, EDS y mapeo de rayos X permitieron caracterizar los recubrimientos obtenidos por tecnología sol-gel.
- El AMEO y MTMO son precursores eficientes en la obtención de una suspensión coloidal estable (sol).
- Con la formulación propuesta se consiguió un recubrimiento hidrofóbico que no favorece la retención de agua superficial.
- Los recubrimientos sol-gel disminuyen considerablemente la absorción de agua en el material cerámico.

Hipótesis 4: Las nanopartículas metálicas con actividad fúngica pueden ser obtenidas por síntesis verde mediante el uso de extractos vegetales acuosos y

que las mismas presentan potencialidades antifúngicas. Se acepta la tercera hipótesis de la que se extraen las siguientes conclusiones:

- A partir del tanino de *Caesalpinia spinosa* y soluciones acuosas de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  fue posible la obtención de nanopartículas (Ag1NPT, Ag5NPT y CuNPT) estables en suspensión evidenciadas, en primer lugar, por la aparición de las bandas características de absorción en los espectros UV-Vis.
- Con el tanino de *Schinopsis balansae* y la solución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  también fue posible la síntesis de nanopartículas (Ag1NPQ y Ag5NPQ) estables en suspensión.
- Imágenes de TEM confirmaron la obtención de las nanopartículas permitiendo determinar su forma y tamaño promedio.
- Espectros FTIR mostraron que los polifenoles tanto del tanino de *Caesalpinia spinosa* como de *Schinopsis balansae* se encontraban asociados a las nanopartículas como consecuencia del proceso de síntesis.
- La concentración y el tipo de tanino utilizado en el proceso de síntesis afectó el tamaño y morfología de las nanopartículas obtenidas.
- Imágenes SEM, de mapeo y espectro EDS permitieron determinar la disposición, dispersión y presencia de los elementos metálicos correspondientes.
- Mediante el ensayo de difusión en agar se pudo determinar que las nanopartículas de Ag fueron en todos los casos activas frente a *A. niger*, *L. theobromae*, *C. sphaerospermum* y *P. commune*. Por otro lado, las nanopartículas de óxido cuproso no resultaron tener actividad frente a los mismos bioindicadores.

- Mediante el ensayo de macrodilución se pudo determinar que la actividad antifúngica era diferente según el proceso de síntesis realizado, en tal sentido las nanopartículas obtenidas a partir de sales de plata con la menor concentración de tanino de quebracho (Ag5NPQ) lograron un mayor grado de inhibición con concentraciones más bajas al considerar la cepa de *A. niger* que ha resultado la más resistente de los cuatro bioindicadores en los ensayos en placa.

Hipótesis 5: Los recubrimientos obtenidos mediante la metodología sol-gel pueden ser funcionalizados al integrar en su matriz las nanopartículas bioactivas y por lo tanto pueden prevenir el biodeterioro fúngico. Se acepta la cuarta hipótesis de la que se extraen las siguientes conclusiones:

- En la formulación del recubrimiento sol-gel se pudo integrar Ag5NPT y Ag5NPQ independientemente de los precursores usados (AMEO y MTMO).
- La actividad antifúngica de los recubrimientos sol-gel puede evaluarse siguiendo un procedimiento basado en la norma ASTM 5590.
- Recubrimientos con AMEO+Ag5NPT aplicados sobre los materiales cerámicos tuvieron mejor performance antifúngica que los recubrimientos con MTMO+Ag5NPT.
- Recubrimientos con AMEO+Ag5NPQ aplicados sobre los materiales cerámicos tuvieron mejor performance antifúngica que los recubrimientos con MTMO+Ag5NPQ.
- Recubrimientos sol-gel con precursor AMEO presentan mayor actividad antifúngica con respecto a los recubrimientos con MTMO.
- Recubrimiento con AMEO y AgNPs son eficientes protectores de pinturas acrílicas contra el deterioro fúngico.



- Recubrimientos sol-gel funcionalizados con Nps pueden ser usados en el control del deterioro fúngico de materiales estructurales.
- El control del deterioro fúngico puede contribuir a la conservación preventiva de construcciones edilicias.
- La obtención de Nps por síntesis verde con actividad biocida y funcionalizadas en recubrimientos sol-gel proporciona un enfoque útil en la preservación de los materiales estructurales frente al biodeterioro.

**El empleo de nanopartículas de plata obtenidas a partir de taninos para su aplicación en recubrimientos protectores antifúngicos es beneficioso porque implica el aprovechamiento de un recurso natural renovable y, en especial, en el caso del tanino de tara dado que se obtiene a partir de las vainas del árbol, lo cual lo hace una fuente sustentable y accesible.**

## Referencias

- Adams, R.I., Bhangar, S., Dannemiller, K.C., Eisen, J.A., Fierer, N., Gilbert, J.A., Green, J.L., Marr, L.C., Miller, S.L., Siegel, J.A., Stephens, B., Waring, M.S., Bibby, K., 2016. Ten questions concerning the microbiomes of buildings. *Build. Environ.* 109, 224–234. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2016.09.001>
- Adan, O.C.G., Samson, R.A., 2011. *Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living*, First. ed. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-722-6>
- Afonso, T.B., Simões, L.C., Lima, N., 2021. Occurrence of filamentous fungi in drinking water: their role on fungal-bacterial biofilm formation. *Res. Microbiol.* 172, 103791. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.11.002>
- Al-Sakkaf, M.K., Onaizi, S.A., 2022. Rheology, characteristics, stability, and pH-responsiveness of biosurfactant-stabilized crude oil/water nanoemulsions. *Fuel* 307, 121845. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121845>
- Alkan Tas, B., Sehit, E., Erdinc Tas, C., Unal, S., Cebeci, F.C., Menciloglu, Y.Z., Unal, H., 2019. Carvacrol loaded halloysite coatings for antimicrobial food packaging applications. *Food Packag. Shelf Life* 20, 100300. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.01.004>
- Allsopp, D., 2011. Worldwide wastage: the economics of biodeterioration. *Q. Mag. Soc. Gen. Microbiol.* 38, 150–153.
- Allsopp, D., Seal, K.J., Gaylarde, C.C., 2004. *Introduction to Biodeterioration*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511617065.002>
- Ananda, A., Ramakrishnappa, T., Archana, S., Reddy Yadav, L.S., Shilpa, B.M., Nagaraju, G., Jayanna, B.K., 2021. Green synthesis of MgO nanoparticles using *Phyllanthus emblica* for Evans blue degradation and antibacterial activity. *Mater. Today Proc.* <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.05.340>
- Anaya, M., Borrego, S.F., Gámez, E., Castro, M., Molina, A., Valdés, O., 2016. Viable fungi in the air of indoor environments of the National Archive of the Republic of Cuba. *Aerobiologia (Bologna)*. 32, 513–527. <https://doi.org/10.1007/s10453-016-9429-3>
- Andersen, B., Frisvad, J.C., Søndergaard, I., Rasmussen, I.S., Larsen, L.S., 2011. Associations between Fungal Species and Water-Damaged Building Materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4180–4188. <https://doi.org/10.1128/AEM.02513-10>
- Andersson, M.A., Nikulin, M., Kõljalg, U., Andersson, M.C., Rainey, F., Reijula, K., Hintikka, E.L., Salkinoja-Salonen, M., 1997. Bacteria, molds, and toxins

- in water-damaged building materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 387–393. <https://doi.org/10.1128/aem.63.2.387-393.1997>
- Andersson Trojer, M., Nordstierna, L., Bergek, J., Blanck, H., Holmberg, K., Nydén, M., 2015. Use of microcapsules as controlled release devices for coatings. *Adv. Colloid Interface Sci.* 222, 18–43. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.06.003>
- Arreche, R., Bellotti, N., Deyá, C., Vázquez, P., 2017. Assessment of waterborne coatings formulated with sol-gel/Ag related to fungal growth resistance. *Prog. Org. Coatings* 108, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.04.007>
- Arreche, R.A., Igal, K., Bellotti, N., Deyá, C., Vázquez, P.G., 2019. Functionalized zirconia compounds as antifungal additives for hygienic waterborne coatings. *Prog. Org. Coatings* 128, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.12.004>
- ASTM D5590 Standard Test Method for Determining the Resistance of Paint films and Related Coatings to Fungal Defacement by Accelerated Four-Week Agar Plate Assay (West Conshohocken, PA: ASTM International), 2010.
- Badawy, A.M. El, Luxton, T.P., Silva, R.G., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., Tolaymat, T.M., 2010. Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1260–1266. <https://doi.org/10.1021/es902240k>
- Badhani, B., Sharma, N., Kakkar, R., 2015. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv.* 5, 27540–27557. <https://doi.org/10.1039/C5RA01911G>
- Bapat, R.A., Chaubal, T. V., Joshi, C.P., Bapat, P.R., Choudhury, H., Pandey, M., Gorain, B., Kesharwani, P., 2018. An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Mater. Sci. Eng. C* 91, 881–898. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.069>
- Barberia-Roque, Gámez-Espinosa, E., Viera, M., Bellotti, N., 2019a. Assessment of three plant extracts to obtain silver nanoparticles as alternative additives to control biodeterioration of coatings. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 141, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.06.011>
- Barberia-Roque, Obidi, O.F., Gámez-Espinosa, E., Viera, M., Bellotti, N., 2019b. Hygienic coatings with bioactive nano-additives from *Senna occidentalis*-mediated green synthesis. *NanoImpact* 16, 100184. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100184>
- Bastian, F., Alabouvette, C., 2009. Lights and shadows on the conservation of a rock art cave: the case of Lascaux Cave. *Int. J. Speleol.* 38, 55–60. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.38.1.6>
- Bellezza, S., Paradossi, G., De Philippis, R., Albertano, P., 2003. *Leptolyngbya*

- strains from Roman hypogea: cytochemical and physico-chemical characterisation of exopolysaccharides. *J. Appl. Phycol.* 15, 193–200. <https://doi.org/10.1023/A:1023811311686>
- Bellotti, del Amo, B., Romagnoli, R., 2012a. Tara tannin a natural product with antifouling coating application. *Prog. Org. Coatings* 74, 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2011.11.014>
- Bellotti, del Amo, B., Romagnoli, R., 2012b. Quaternary Ammonium “Tannate” for Antifouling Coatings. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51, 16626–16632. <https://doi.org/10.1021/ie301524r>
- Bellotti, Deyá, C., del Amo, B., Romagnoli, R., 2012c. “Quebracho” tannin derivative and boosters biocides for new antifouling formulations. *J. Coatings Technol. Res.* 9, 551–559. <https://doi.org/10.1007/s11998-012-9403-0>
- Bellotti, N., Del Amo, B., Romagnoli, R., 2014. Assessment of tannin antifouling coatings by scanning electron microscopy. *Prog. Org. Coatings* 77, 1400–1407. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2014.05.004>
- Bellotti, N., Romagnoli, R., Quintero, C., Domínguez-Wong, C., Ruiz, F., Deyá, C., 2015. Nanoparticles as antifungal additives for indoor water borne paints. *Prog. Org. Coatings* 86, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.03.006>
- 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 mold growth in indoor waterborne coatings. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 104, 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.11.037>
- Berdahl, P., Akbari, H., Levinson, R., Miller, W.A., 2008. Weathering of roofing materials – An overview. *Constr. Build. Mater.* 22, 423–433. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2006.10.015>
- Bindschedler, S., Cailleau, G., Verrecchia, E., 2016. Role of Fungi in the Biomineralization of Calcite. *Minerals* 6, 41. <https://doi.org/10.3390/min6020041>
- Blankenship, J.R., Mitchell, A.P., 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.003>
- Blondeau, M., Coradin, T., 2012. Living materials from sol–gel chemistry: current challenges and perspectives. *J. Mater. Chem.* 22, 22335. <https://doi.org/10.1039/c2jm33647b>
- Bollmann, U.E., Fernández-Calviño, D., Brandt, K.K., Storgaard, M.S., Sanderson, H., Bester, K., 2017. Biocide Runoff from Building Facades: Degradation Kinetics in Soil. *Environ. Sci. Technol.* 51, 3694–3702. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05512>
- Böttcher, H., Jagota, C., Trepte, J., Kallies, K.-H., Haufe, H., 1999. Sol–gel composite films with controlled release of biocides. *J. Control. Release* 60,

57–65. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00053-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00053-X)

- Boutin-Forzano, S., Charpin-Kadouch, C., Chabbi, S., Bennedjai, N., Dumon, H., Charpin, D., 2004. Wall relative humidity: a simple and reliable index for predicting *Stachybotrys chartarum* infestation in dwellings. *Indoor Air* 14, 196–199. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2004.00233.x>
- Braga, W.L.M., Roberto, J.A., Vaz, C., Samanamud, G.R.L., Loures, C.C.A., França, A.B., Lofrano, R.C.Z., Naves, L.L.R., José Henrique de Freitas Gomes, J.H., Naves, F.L., 2018. Extraction and optimization of tannin from the flower of *Musa* sp. applied to the treatment of iron ore dump. *J. Environ. Chem. Eng.* 6, 4310–4317. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.05.058>
- Brambilla, A., Sangiorgio, A., 2020. Mould growth in energy efficient buildings: Causes, health implications and strategies to mitigate the risk. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 132, 110093. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110093>
- Brinker, C.J., Scherer, G.W., 1990a. Film Formation, in: *Sol-Gel Science The Physics and Chemistry of Sol–Gel Processing*. Elsevier, United States of America, pp. 786–837. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-057103-4.50018-0>
- Brinker, C.J., Scherer, G.W., 1990b. Aging of Gels, in: *Sol-Gel Science The Physics and Chemistry of Sol–Gel Processing*. Elsevier, pp. 356–405. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-057103-4.50011-8>
- Buruiana, A.T., Sava, F., Matei, E., Zgura, I., Burdusel, M., Mihai, C., Velea, A., 2020. Simple and clean method for obtaining Sn nanoparticles for hydrophobic coatings. *Mater. Lett.* 278, 128419. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2020.128419>
- Byrne, C., Selmi, G.J., D’Alessandro, O., Deyá, C., 2020. Study of the anticorrosive properties of “quebracho colorado” extract and its use in a primer for aluminum 1050. *Prog. Org. Coatings* 148, 105827. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.105827>
- Caillaud, D., I, A.-M., Bennedjai, N., 2006. Contaminations fongiques en milieux intérieurs. Diagnostic, effet sur la santé respiratoire, conduite à tenir. Conseil Supérieur d’Hygiène Publique de France, Francia.
- Callone, E., Campostrini, R., Carturan, G., Cavazza, A., Guzzon, R., 2008. Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. *J. Mater. Chem.* 18, 4839. <https://doi.org/10.1039/b807301e>
- Campana, R., Sabatini, L., Frangipani, E., 2020. Moulds on cementitious building materials—problems, prevention and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 509–514. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10185-7>
- Caneva, G., Ceschin, S., 2008. Ecology of biodeterioration, in: *Plant Biology for Cultural Heritage: Biodeterioration and Conservation*. Getty Conservation

Institute, Los Angeles, pp. 35–58.

- Cao, Z., Sun, Y., 2009. Polymeric N-halamine latex emulsions for use in antimicrobial paints. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 1, 494–504. <https://doi.org/10.1021/am800157a>
- Capeletti, L.B., do Carmo Martins Alves, M., Cardoso, M.B., dos Santos, J.H.Z., 2018. Hybrid silica based catalysts prepared by the encapsulation of zirconocene compound via non-hydrolytic sol-gel method for ethylene polymerization. *Appl. Catal. A Gen.* 560, 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2018.03.013>
- Cappitelli, F., Cattò, C., Villa, F., 2020. The Control of Cultural Heritage Microbial Deterioration. *Microorganisms* 8, 1542. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101542>
- Catelli, E., Bănică, F.-G., Bănică, A., 2016. Salt efflorescence in historic wooden buildings. *Herit. Sci.* 4, 31. <https://doi.org/10.1186/s40494-016-0099-9>
- Chamilos, G., Akoumianaki, T., Kyrmizi, I., Brakhage, A., Beauvais, A., Latge, J.-P., 2016. Melanin targets LC3-associated phagocytosis (LAP): A novel pathogenetic mechanism in fungal disease. *Autophagy* 12, 888–889. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1157242>
- Chand, R., Tulucan, T., Aburlacitei, M., 2017. Investigation of Biocide Biodegradation in Wastewater under Laboratory Set-Up in Anaerobic, Aerobic and Aerobic with Substrate Conditions. *J. Civ. Environ. Eng.* 08. <https://doi.org/10.4172/2165-784X.1000295>
- Chapman, J.S., 2003. Biocide resistance mechanisms. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 51, 133–138. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00097-5](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00097-5)
- Chaudhuri, A., Bhattacharyya, S., Chaudhuri, P., Sudarshan, M., Mukherjee, S., 2020. In vitro deterioration study of concrete and marble by *Aspergillus tamarii*. *J. Build. Eng.* 32, 101774. <https://doi.org/10.1016/j.jobbe.2020.101774>
- Chong, S.L., Wang, D., Hayes, J.D., Wilhite, B.W., Malik, A., 1997. Sol-Gel Coating Technology for the Preparation of Solid-Phase Microextraction Fibers of Enhanced Thermal Stability. *Anal. Chem.* 69, 3889–3898. <https://doi.org/10.1021/ac9703360>
- Chung, P.Y., Toh, Y.S., 2014. Anti-biofilm agents: Recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Dis.* 70, 231–239. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12141>
- Comisión Europea, 2012. Règlement (UE) N° 528/2012 du parlement européen et du conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides. *Off. J. Eur. Union, Francia*.
- Comite, V., Miani, A., Ricca, M., La Russa, M., Pulimeno, M., Fermo, P., 2021. The impact of atmospheric pollution on outdoor cultural heritage: an analytic methodology for the characterization of the carbonaceous fraction in black crusts present on stone surfaces. *Environ. Res.* 201, 111565.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111565>

- Copello, G.J., Teves, S., Degrossi, J., D'Aquino, M., Desimone, M.F., Díaz, L.E., 2008. Proving the antimicrobial spectrum of an amphoteric surfactant-sol-gel coating: a food-borne pathogen study. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1041–1046. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0380-3>
- Cordero, I., Jiménez, M.D., Delgado, J.A., Villegas, L., Balaguer, L., 2016. Spatial and demographic structure of tara stands (*Caesalpinia spinosa*) in Peru: Influence of present and past forest management. *For. Ecol. Manage.* 377, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.06.034>
- Cordero, R.J.B., Casadevall, A., 2017. Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biol. Rev.* 31, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.12.003>
- Corsi, I., Winther-Nielsen, M., Sethi, R., Punta, C., Della Torre, C., Libralato, G., Lofrano, G., Sabatini, L., Aiello, M., Fiordi, L., Cinuzzi, F., Caneschi, A., Pellegrini, D., Buttino, I., 2018. Ecofriendly nanotechnologies and nanomaterials for environmental applications: Key issue and consensus recommendations for sustainable and ecosafe nanoremediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 154, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.037>
- Coutinho, M.L., Miller, A.Z., Macedo, M.F., 2015. Biological colonization and biodeterioration of architectural ceramic materials: An overview. *J. Cult. Herit.* 16, 759–777. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2015.01.006>
- Coutinho, M.L., Miller, A.Z., Phillip, A., Mirão, J., Dias, L., Rogerio-Candelera, M.A., Saiz-Jimenez, C., Martin-Sanchez, P.M., Cerqueira-Alves, L., Macedo, M.F., 2019. Biodeterioration of majolica glazed tiles by the fungus *Devriesia imbrexigena*. *Constr. Build. Mater.* 212, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.03.268>
- Crispim, C.A., Gaylarde, C.C., 2005. Cyanobacteria and Biodeterioration of Cultural Heritage: A Review. *Microb. Ecol.* 49, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-1052-5>
- Crook, B., Burton, N.C., 2010. Indoor moulds, Sick Building Syndrome and building related illness. *Fungal Biol. Rev.* 24, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.05.001>
- Cutler, N.A., Viles, H.A., Ahmad, S., McCabe, S., Smith, B.J., 2013. Algal 'greening' and the conservation of stone heritage structures. *Sci. Total Environ.* 442, 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.050>
- Cwalina, B., 2014. Biodeterioration of concrete, brick and other mineral-based building materials, in: *Understanding Biocorrosion*. Elsevier, pp. 281–312. <https://doi.org/10.1533/9781782421252.3.281>
- Dananjaya, S.H.S., Erandani, W.K.C.U., Kim, C., Nikapitiya, C., Lee, J., De Zoysa, M., 2017. Comparative study on antifungal activities of chitosan nanoparticles and chitosan silver nano composites against *Fusarium*



- oxysporum species complex. *Int. J. Biol. Macromol.* 105, 478–488.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.056>
- de Hoog, G., J, Guarro, J, Gené, S, A., AMS, A.-H., MJ, F., RG, V., 2020. *The Atlas of Clinical Fungi*, 4th ed. Foundation Atlas of Clinical Fungi, Hilversum, The Netherlands.
- Deyá, C., Bellotti, N., 2017. Biosynthesized silver nanoparticles to control fungal infections in indoor environments. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 8, 025005. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aa6880>
- Dias, D.S.B., Jaramillo, L.Y.A., Guedes, D., Duran, R., Carbon, A., Bertolino, L.C., Vasconcelos, U., Lutterbach, M.T.S., Sérvulo, E.F.C., Cravo-Laureau, C., 2021. Assessment of acid mist on mortar biodeterioration simulating the wall of Jardim da Princesa, the National Museum of Rio de Janeiro, Brazil. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 157, 105155.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105155>
- Díaz-García, M.E., Laínño, R.B., 2005. Molecular Imprinting in Sol-Gel Materials: Recent Developments and Applications. *Microchim. Acta* 149, 19–36. <https://doi.org/10.1007/s00604-004-0274-7>
- Dileep, P., Jacob, S., Narayanankutty, S.K., 2020. Functionalized nanosilica as an antimicrobial additive for waterborne paints. *Prog. Org. Coatings* 142, 105574. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.105574>
- Diulio, M. de la P., Mercader-Moyano, P., Gómez, A.F., 2019. The influence of the envelope in the preventive conservation of books and paper records. Case study: Libraries and archives in La Plata, Argentina. *Energy Build.* 183, 727–738. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2018.11.048>
- Dominguez-Wong, C., Loredó-Becerra, G.M., Quintero-González, C.C., Noriega-Treviño, M.E., Compeán-Jasso, M.E., Niño-Martínez, N., Dealba-Montero, I., Ruiz, F., 2014. Evaluation of the antibacterial activity of an indoor waterborne architectural coating containing Ag/TiO<sub>2</sub> under different relative humidity environments. *Mater. Lett.* 134, 103–106.  
<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.07.067>
- Edge, M., Allen, N.S., Turner, D., Robinson, J., Seal, K., 2001. The enhanced performance of biocidal additives in paints and coatings. *Prog. Org. Coatings* 43, 10–17. [https://doi.org/10.1016/S0300-9440\(01\)00244-2](https://doi.org/10.1016/S0300-9440(01)00244-2)
- Edmonds, J.M., 2009. Efficient methods for large-area surface sampling of sites contaminated with pathogenic microorganisms and other hazardous agents: current state, needs, and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 811–816. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2136-z>
- El Saeed, A.M., Abd El-Fattah, M., Azzam, A.M., Dardir, M.M., Bader, M.M., 2016. Synthesis of cuprous oxide epoxy nanocomposite as an environmentally antimicrobial coating. *Int. J. Biol. Macromol.* 89, 190–197.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.043>
- Elbourne, A., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2017. Nano-structured antimicrobial

- surfaces: From nature to synthetic analogues. *J. Colloid Interface Sci.* 508, 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.07.021>
- Esquivel, P., Mangiaterra, M., Giusiano, G., Sosa, M.A., 2003. Anemophilous microfungi in outdoor environments of two cities in Argentinian northeastern. *Boletín Micológico* 18, 21–28. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2003.18.0.376>
- Ettenauer, J., Piñar, G., Sterflinger, K., Gonzalez-Muñoz, M.T., Jroundi, F., 2011. Molecular monitoring of the microbial dynamics occurring on historical limestone buildings during and after the in situ application of different bio-consolidation treatments. *Sci. Total Environ.* 409, 5337–5352. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.063>
- Ettenauer, J.D., Jurado, V., Piñar, G., Miller, A.Z., Santner, M., Saiz-Jimenez, C., Sterflinger, K., 2014. Halophilic Microorganisms Are Responsible for the Rosy Discolouration of Saline Environments in Three Historical Buildings with Mural Paintings. *PLoS One* 9, e103844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103844>
- Eversdijk, J., Erich, S.J.F., Hermanns, S.P.M., Adan, O.C.G., De Bolle, M., de Meyer, K., Bylemans, D., Bekker, M., ten Cate, A.T., 2012. Development and evaluation of a biocide release system for prolonged antifungal activity in finishing materials. *Prog. Org. Coatings* 74, 640–644. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2011.09.029>
- Eyssautier-Chuine, S., Vaillant-Gaveau, N., Charpentier, E., Reffuveille, F., 2021. Comparison of biofilm development on three building and restoration stones used in French monuments. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 165, 105322. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105322>
- Falkiewicz-Dulik, M., Janda, K., Wypych, G., 2015a. Analytical Methods in Biodegradation, Biodeterioration, and Biostabilization. *Handb. Mater. Biodegrad. Biodeterior. Biostabilization* 377–393. <https://doi.org/10.1016/b978-1-895198-87-4.50011-6>
- Falkiewicz-Dulik, M., Janda, K., Wypych, G., 2015b. Industrial Biocides. *Handb. Mater. Biodegrad. Biodeterior. Biostabilization* 33–65. <https://doi.org/10.1016/B978-1-895198-87-4.50005-0>
- Fatahinia, M., Zarei-Mahmoudabadi, A., Shokri, H., Ghaymi, H., 2018. Monitoring of mycoflora in outdoor air of different localities of Ahvaz, Iran. *J. Mycol. Med.* 28, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.002>
- Fernandes, S., Simões, L.C., Lima, N., Simões, M., 2019. Adhesion of filamentous fungi isolated from drinking water under different process conditions. *Water Res.* 164, 114951. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114951>
- Fernández, M.A., Barberia Roque, L., Gámez Espinosa, E., Deyá, C., Bellotti, N., 2020. Organo-montmorillonite with biogenic compounds to be applied in antifungal coatings. *Appl. Clay Sci.* 184. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105369>

- Fernández, M.A., Bellotti, N., 2017. Silica-based bioactive solids obtained from modified diatomaceous earth to be used as antimicrobial filler material. *Mater. Lett.* 194, 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.01.144>
- Ferreira, C., Pereira, A.M., Pereira, M.C., Simões, M., Melo, L.F., 2013. Biofilm control with new microparticles with immobilized biocide. *Heat Transf. Eng.* 34, 712–718. <https://doi.org/10.1080/01457632.2012.739040>
- Flannigan, B., Samson, R., Miller, J., 2016. *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b10838>
- Galindo, L.J., López-García, P., Torruella, G., Karpov, S., Moreira, D., 2021. Phylogenomics of a new fungal phylum reveals multiple waves of reductive evolution across Holomycota. *Nat. Commun.* 12, 4973. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25308-w>
- Gámez-Espinosa, E., Barberia-Roque, L., Obidi, O.F., Deyá, C., Bellotti, N., 2020. Antifungal applications for nano-additives synthesized with a bio-based approach. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 11, 015019. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/ab790f>
- Ganguli, P., Chaudhuri, S., 2021. Nanomaterials in antimicrobial paints and coatings to prevent biodegradation of man-made surfaces: A review. *Mater. Today Proc.* 45, 3769–3777. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.275>
- Gaylarde, C., Silva, M.R., Warscheid, T., 2003. Microbial impact on building materials: an overview. *Mater. Struct.* 36, 342–352. <https://doi.org/10.1617/13867>
- Gaylarde, C.C., 2020. Influence of Environment on Microbial Colonization of Historic Stone Buildings with Emphasis on Cyanobacteria. *Heritage* 3, 1469–1482. <https://doi.org/10.3390/heritage3040081>
- Gaylarde, C.C., Gaylarde, P.M., Neilan, B.A., 2012. Endolithic Phototrophs in Built and Natural Stone. *Curr. Microbiol.* 65, 183–188. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0123-6>
- Gaylarde, C.C., Morton, L.H.G., Loh, K., Shirakawa, M.A., 2011. Biodeterioration of external architectural paint films – A review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 65, 1189–1198. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.09.005>
- George, R.P., Ramya, S., Ramachandran, D., Kamachi Mudali, U., 2013. Studies on Biodegradation of normal concrete surfaces by fungus *Fusarium* sp. *Cem. Concr. Res.* 47, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2013.01.010>
- Gilbert, J.A., Stephens, B., 2018. Microbiology of the built environment. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 661–670. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0065-5>
- Gomes, E., Pereira, O.L., Silva, C.C. da, Bento, C.B.P., Queiroz, M.V. de, 2015. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. *Microbiol. Res.* 181, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.010>

- Gómez-Cornelio, S., Mendoza-Vega, J., Gaylarde, C.C., Reyes-Estebanez, M., Morón-Ríos, A., De la Rosa-García, S. del C., Ortega-Morales, B.O., 2012. Succession of fungi colonizing porous and compact limestone exposed to subtropical environments. *Fungal Biol.* 116, 1064–1072. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.07.010>
- Gómez de Saravia, S., Battistoni, P., Guiamet, P., 2016. Phototrophic Biofilms on Exterior Brick Substrate. *Res. Rev. Biosci.* 11, 1–10.
- González, E.A., Leiva, N., Vejar, N., Sancy, M., Gulppi, M., Azócar, M.I., Gomez, G., Tamayo, L., Zhou, X., Thompson, G.E., Páez, M.A., 2019. Sol-gel coatings doped with encapsulated silver nanoparticles: inhibition of biocorrosion on 2024-T3 aluminum alloy promoted by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mater. Res. Technol.* 8, 1809–1818. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2018.12.011>
- Grabek-Lejko, D., Tekiela, A., Kasprzyk, I., 2017. Risk of biodeterioration of cultural heritage objects, stored in the historical and modern repositories in the Regional Museum in Rzeszow (Poland). A case study. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 123, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.05.028>
- Grant, C., Hunter, C.A., Flannigan, B., Bravery, A.F., 1989. The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *Int. Biodeterior.* 25, 259–284. [https://doi.org/10.1016/0265-3036\(89\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0265-3036(89)90002-X)
- Graziani, L., Quagliarini, E., D’Orazio, M., 2016. The role of roughness and porosity on the self-cleaning and anti-biofouling efficiency of TiO<sub>2</sub>-Cu and TiO<sub>2</sub>-Ag nanocoatings applied on fired bricks. *Constr. Build. Mater.* 129, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2016.10.111>
- Gu, J.-D., 2018. Microbial Biofilms, Fouling, Corrosion, and Biodeterioration of Materials, in: *Handbook of Environmental Degradation of Materials*. Elsevier, pp. 273–298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52472-8.00014-9>
- Guerra, F.L., Lopes, W., Cazarolli, J.C., Lobato, M., Masuero, A.B., Dal Molin, D.C.C., Bento, F.M., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2019. Biodeterioration of mortar coating in historical buildings: Microclimatic characterization, material, and fungal community. *Build. Environ.* 155, 195–209. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2019.03.017>
- Guiamet, P.S., Rosato, V., de Saravia, S.G., García, A.M., Moreno, D.A., 2012. Biofouling of crypts of historical and architectural interest at La Plata Cemetery (Argentina). *J. Cult. Herit.* 13, 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2011.11.002>
- Guo, L., Qiang, T., Ma, Y., Wang, K., Du, K., 2020. Optimisation of tannin extraction from *Coriaria nepalensis* bark as a renewable resource for use in tanning. *Ind. Crops Prod.* 149, 112360. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112360>
- Gupta, R., Kumar, A., 2008. Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology. *Biomed. Mater.* 3, 034005.

<https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/3/034005>

- Gutarowska, B., Celikkol-Aydin, S., Bonifay, V., Otlewska, A., Aydin, E., Oldham, A.L., Brauer, J.I., Duncan, K.E., Adamiak, J., Sunner, J.A., Beech, I.B., 2015. Metabolomic and high-throughput sequencing analysis—modern approach for the assessment of biodeterioration of materials from historic buildings. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00979>
- Gutarowska, B., Czyżowska, A., 2009. The ability of filamentous fungi to produce acids on indoor building materials. *Ann. Microbiol.* 59, 807–813. <https://doi.org/10.1007/BF03179227>
- Gutarowska, B., Piotrowska, M., 2007. Methods of mycological analysis in buildings. *Build. Environ.* 42, 1843–1850. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2006.02.015>
- Halliwell, C.M., Cass, A.E.G., 2001. A Factorial Analysis of Silanization Conditions for the Immobilization of Oligonucleotides on Glass Surfaces. *Anal. Chem.* 73, 2476–2483. <https://doi.org/10.1021/ac0010633>
- Han, L., Cui, P., He, H., Liu, H., Peng, Z., Yang, J., 2015. A seed-mediated approach to the morphology-controlled synthesis of bimetallic copper–platinum alloy nanoparticles with enhanced electrocatalytic performance for the methanol oxidation reaction. *J. Power Sources* 286, 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2015.04.003>
- Hardin, B.D., Kelman, B., Saxon, A., 2003. Adverse Human Health Effects Associated with Molds in the Indoor Environment. *J. Occup. Environ. Med.* 45, 470–478. <https://doi.org/10.1097/00043764-200305000-00006>
- Harding, M.W., Marques, L.L.R., Howard, R.J., Olson, M.E., 2009. Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol.* 17, 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.007>
- Hatay, I., Gup, R., Ersöz, M., 2008. Silica gel functionalized with 4-phenylacetophenone 4-aminobenzoylhydrazone: Synthesis of a new chelating matrix and its application as metal ion collector. *J. Hazard. Mater.* 150, 546–553. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.002>
- Hauptert, F., Wetzel, B., 2005. Reinforcement of Thermosetting Polymers by the Incorporation of Micro- and Nanoparticles, in: Friedrich, K., Fakirov, S., Zhong, Z. (Eds.), *Polymer Composites From Nano- to Macro-Scale*. Springer US, p. 368.
- He, L., Liu, Y., Mustapha, A., Lin, M., 2011. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiol. Res.* 166, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.03.003>
- He, Y., Luo, Q., Ge, P., Chen, G., Wang, H., 2018. Review on Mould Contamination and Hygrothermal Effect in Indoor Environment. *J. Environ. Prot. (Irvine, Calif.)* 09, 100–110. <https://doi.org/10.4236/jep.2018.92008>
- Hench, L.L., West, J.K., 1990. The sol-gel process. *Chem. Rev.* 90, 33–72. <https://doi.org/10.1021/cr00099a003>

- Hendessi, S., Sevinis, E.B., Unal, S., Cebeci, F.C., Menciloglu, Y.Z., Unal, H., 2016. Antibacterial sustained-release coatings from halloysite nanotubes/waterborne polyurethanes. *Prog. Org. Coatings* 101, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2016.09.005>
- Holtz, R.D., Lima, B.A., Filho, A.G.S., Brocchi, M., Alves, O.L., 2012. Nanostructured silver vanadate as a promising antibacterial additive to water-based paints. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 8, 935–940. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.11.012>
- Hueck, H., 1965. The biodeterioration of materials as part of hylobiology. *Mater. und Org.* 1, 5–34.
- Huo, C., Khoshnamvand, M., Liu, P., Yuan, C.-G., Cao, W., 2018. Eco-friendly approach for biosynthesis of silver nanoparticles using *Citrus maxima* peel extract and their characterization, catalytic, antioxidant and antimicrobial characteristics. *Mater. Res. Express* 6, 015010. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aae34c>
- Hyvarinen, A., Meklin, T., Vepsalainen, A., Nevalainen, A., 2002. Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials — concentrations and diversity. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 49, 27–37. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00103-2](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00103-2)
- Ider, M., Abderrafi, K., Eddahbi, A., Ouaskit, S., Kassiba, A., 2017. Silver Metallic Nanoparticles with Surface Plasmon Resonance: Synthesis and Characterizations. *J. Clust. Sci.* 28, 1051–1069. <https://doi.org/10.1007/s10876-016-1080-1>
- Jain, A., Bhadauria, S., Kumar, V., Chauhan, R.S., 2009. Biodeterioration of sandstone under the influence of different humidity levels in laboratory conditions. *Build. Environ.* 44, 1276–1284. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2008.09.019>
- Jal, P., 2004. Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions. *Talanta* 62, 1005–1028. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2003.10.028>
- Jansson, L., Akel, Y., Eriksson, R., Lavander, M., Hedman, J., 2020. Impact of swab material on microbial surface sampling. *J. Microbiol. Methods* 176, 106006. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106006>
- Jasrotia, T., Chaudhary, S., Kaushik, A., Kumar, R., Chaudhary, G.R., 2020. Green chemistry-assisted synthesis of biocompatible Ag, Cu, and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Mater. Today Chem.* 15, 100214. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2019.100214>
- Jeschke, J.M., Gabriel, W., Kokko, H., 2019. r-Strategists/K-Strategists, in: *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier, pp. 193–201. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11121-2>
- Jo, Y.-K., Kim, B.H., Jung, G., 2009. Antifungal Activity of Silver Ions and Nanoparticles on Phytopathogenic Fungi. *Plant Dis.* 93, 1037–1043.

<https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1037>

- Johansson, P., Svensson, T., Ekstrand-Tobin, A., 2013. Validation of critical moisture conditions for mould growth on building materials. *Build. Environ.* 62, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2013.01.012>
- Johns, K., 2003. Hygienic coatings: The next generation. *Surf. Coatings Int. Part B Coatings Trans.* 86, 101–110. <https://doi.org/10.1007/BF02699620>
- Jones, E.B.G., 1994. Fungal adhesion. *Mycol. Res.* 98, 961–981. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80421-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80421-8)
- Joseph, E., 2021. *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-69411-1>
- Kairyte, K., Kadys, A., Luksiene, Z., 2013. Antibacterial and antifungal activity of photoactivated ZnO nanoparticles in suspension. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 128, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.07.017>
- Kakakhel, M.A., Wu, F., Gu, J.-D., Feng, H., Shah, K., Wang, W., 2019. Controlling biodeterioration of cultural heritage objects with biocides: A review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 143, 104721. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104721>
- Kamtsikakis, A., Kavetsou, E., Chronaki, K., Kiosidou, E., Pavlatou, E., Karana, A., Papaspyrides, C., Detsi, A., Karantonis, A., Vouyiouka, S., 2017. Encapsulation of Antifouling Organic Biocides in Poly(lactic acid) Nanoparticles. *Bioengineering* 4, 81. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4040081>
- Karsa, D.R., Ashworth, D., 2002. *Industrial Biocides Selection and Application*. Royal Society of Chemistry, Cambridge. <https://doi.org/10.1039/9781847551115>
- Kasproicz, M.J., Koziół, M., Gorczyca, A., 2010. The effect of silver nanoparticles on phytopathogenic spores of *Fusarium culmorum*. *Can. J. Microbiol.* 56, 247–253. <https://doi.org/10.1139/w10-012>
- Kavitha, K., Vijaya, N., Krishnaveni, A., Arthanareeswari, M., Rajendran, S., Al-Hashem, A., Subramania, A., 2020. Nanomaterials for antifungal applications, in: *Nanotoxicity*. Elsevier, pp. 385–398. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819943-5.00019-1>
- Kerour, A., Boudjadar, S., Bourzami, R., Allouche, B., 2018. Eco-friendly synthesis of cuprous oxide (Cu<sub>2</sub>O) nanoparticles and improvement of their solar photocatalytic activities. *J. Solid State Chem.* 263, 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2018.04.010>
- Khan, T., Yasmin, A., Townley, H.E., 2020. An evaluation of the activity of biologically synthesized silver nanoparticles against bacteria, fungi and mammalian cell lines. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 194, 111156. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111156>



- Khandel, P., Shahi, S.K., 2018. Mycogenic nanoparticles and their bio-prospective applications: current status and future challenges. *J. Nanostructure Chem.* 8, 369–391. <https://doi.org/10.1007/s40097-018-0285-2>
- Koch, K., Barthlott, W., 2009. Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: An inspiration for biomimetic materials. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 367, 1487–1509. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0022>
- Kros, A., Gerritsen, M., Sprakel, V.S.I., Sommerdijk, N.A.J.M., Jansen, J.A., Nolte, R.J.M., 2001. Silica-based hybrid materials as biocompatible coatings for glucose sensors. *Sensors Actuators B Chem.* 81, 68–75. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(01\)00933-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(01)00933-9)
- Kumar, A., Vemula, P.K., Ajayan, P.M., John, G., 2008. Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nat. Mater.* 7, 236–241. <https://doi.org/10.1038/nmat2099>
- Kumar, I., Mondal, M., Sakthivel, N., 2019. Green synthesis of phytogenic nanoparticles, in: *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*. Elsevier, pp. 37–73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00003-4>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumari, M., Giri, V.P., Pandey, S., Kumar, M., Katiyar, R., Nautiyal, C.S., Mishra, A., 2019. An insight into the mechanism of antifungal activity of biogenic nanoparticles than their chemical counterparts. *Pestic. Biochem. Physiol.* 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.005>
- Laiz, L., Recio, D., Hermosin, B., Saiz-Jimenez, C., 2000. Microbial Communities in Salt Efflorescences, in: *Of Microbes and Art*. Springer US, Boston, MA, pp. 77–88. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4239-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4239-1_6)
- Landge, S., Ghosh, D., Aiken, K., 2017. Solvent-Free Synthesis of Nanoparticles, *Green Chemistry: An Inclusive Approach*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809270-5.00022-4>
- Lappalainen, S., Kähkönen, E., Loikkanen, P., Palomäki, E., Lindroos, O., Reijula, K., 2001. Evaluation of priorities for repairing in moisture-damaged school buildings in Finland. *Build. Environ.* 36, 981–986. [https://doi.org/10.1016/S0360-1323\(00\)00082-2](https://doi.org/10.1016/S0360-1323(00)00082-2)
- Liao, C.-H., Hung, P.-S., Cheng, Y., Wu, P.-W., 2017. Combination of microspheres and sol-gel electrophoresis for the formation of large-area ordered macroporous SiO<sub>2</sub>. *Electrochem. commun.* 85, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.10.009>
- Lima, N., Santos, C., 2017. MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. *Curr. Opin. Food Sci.* 13, 26–30.

<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.002>

- Liu, D., Li, L., You, T., 2017. Superior catalytic performances of platinum nanoparticles loaded nitrogen-doped graphene toward methanol oxidation and hydrogen evolution reaction. *J. Colloid Interface Sci.* 487, 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.10.038>
- Lombardozi, V., Castrignanò, T., D'Antonio, M., Casanova Municchia, A., Caneva, G., 2012. An interactive database for an ecological analysis of stone biopitting. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 73, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.04.016>
- Lors, C., Tribollet, B., 2018. *Interactions Materials-Microorganisms Concrete and Metals more Resistant to Biodeterioration*, 1st ed. CNRS sciences, Francia.
- Machado, G.E., Pereyra, A.M., Rosato, V.G., Moreno, M.S., Basaldella, E.I., 2019. Improving the biocidal activity of outdoor coating formulations by using zeolite-supported silver nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* 98, 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.040>
- Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M. hew, HI, D. d A.S., 2019. *Brock Biology of Microorganisms*, 15th Editi. ed. Pearson Education Limited, United Kingdom.
- Mahmoud, M.A., Eifan, S.A., Majrashi, M., 2014. Application of silver nanoparticles as antifungal and antiaflatoxin B1 produced by *Aspergillus flavus*. *J. Nanomater. Biostructures* 9, 151–157.
- Makul, N., 2020. Modern sustainable cement and concrete composites: Review of current status, challenges and guidelines. *Sustain. Mater. Technol.* 25, e00155. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2020.e00155>
- Mallo, A.C., Elíades, L.A., Nitiu, D.S., Saparrat, M.C.N., 2017. Fungal monitoring of the indoor air of the Museo de La Plata Herbarium, Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.* 34, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.05.003>
- Marchesini, V.A., Nosetto, M.D., Houspanossian, J., Jobbágy, E.G., 2020. Contrasting hydrological seasonality with latitude in the South American Chaco: The roles of climate and vegetation activity. *J. Hydrol.* 587, 124933. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.124933>
- Marcin, C., Ławniczek-Walczyk, A., Rafał L, G., Stobnicka-Kupiec, A., 2020. Indoor Microbial Pollutants, in: *Microbiological Corrosion of Buildings A Guide to Detection, Health Hazards and Mitigation*. Florida, pp. 15–19.
- Mardones, L.E., Legnoverde, M.S., Monzón, J.D., Bellotti, N., Basaldella, E.I., 2019. Increasing the effectiveness of a liquid biocide component used in antifungal waterborne paints by its encapsulation in mesoporous silicas. *Prog. Org. Coatings* 134, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.04.058>
- Martino, P.D., 2016. What About Biofilms on the Surface of Stone Monuments?

- Open Conf. Proc. J. 6, 14–28.  
<https://doi.org/10.2174/2210289201607020014>
- Mathiazhagan, A., Joseph, R., 2011. Nanotechnology-A New Prospective in Organic Coating -Review. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* 2, 225–237.  
<https://doi.org/10.7763/IJCEA.2011.V2.108>
- Miller, A.Z., Sanmartín, P., Pereira-Pardo, L., Dionísio, A., Saiz-Jimenez, C., Macedo, M.F., Prieto, B., 2012. Bioreceptivity of building stones: A review. *Sci. Total Environ.* 426, 1–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.026>
- Mitchell, R., Clifford, J., 2018. Biodeterioration and preservation in art, archaeology and architecture. Archetype Publications Ltd, London, UK.
- Mitra, C., Gummadidala, P.M., Afshinnia, K., Merrifield, R.C., Baalousha, M., Lead, J.R., Chanda, A., 2017. Citrate-Coated Silver Nanoparticles Growth-Independently Inhibit Aflatoxin Synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Environ. Sci. Technol.* 51, 8085–8093.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01230>
- Mittal, A.K., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol. Adv.* 31, 346–356.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
- Mohamed, H.E.A., Afridi, S., Khalil, A.T., Zia, D., Iqbal, J., Ullah, I., Shinwari, Z.K., Maaza, M., 2019. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Hyphaene thebaica* fruits and their in vitro pharmacognostic potential. *Mater. Res. Express* 6, 1050c9. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab4217>
- Moritz, M., Geszke-Moritz, M., 2013. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chem. Eng. J.* 228, 596–613. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.046>
- Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., Yacaman, M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- Morrison, R., Boyd, R., 1990. *Organic Chemistry*, fifth. ed. Allyn & Bacon, Boston, Massachusetts, United States.
- Morton, L.H.G., Surman, S.B., 1994. Biofilms in biodeterioration — a review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 34, 203–221. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(94\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0964-8305(94)90083-3)
- Naikoo, G.A., Mustaqeem, M., Hassan, I.U., Awan, T., Arshad, F., Salim, H., Qurashi, A., 2021. Bioinspired and green synthesis of nanoparticles from plant extracts with antiviral and antimicrobial properties: A critical review. *J. Saudi Chem. Soc.* 25, 101304. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101304>
- Naranjo-Ortiz, M.A., Gabaldón, T., 2019. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biol. Rev.* 94, 2101–2137.  
<https://doi.org/10.1111/brv.12550>

- Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Sajadi, S.M., Issaabadi, Z., 2019. Green Nanotechnology, in: *An Introduction to Green Nanotechnology*. pp. 145–198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00005-5>
- Negrin, M.M., Del Panno, M.T., Ronco, A.E., 2007. Study of bioaerosols and site influence in the La Plata area (Argentina) using conventional and DNA (fingerprint) based methods. *Aerobiologia (Bologna)*. 23, 249–258. <https://doi.org/10.1007/s10453-007-9069-8>
- Nguyen-Tri, P., Nguyen, T.A., Carriere, P., Ngo Xuan, C., 2018. Nanocomposite Coatings: Preparation, Characterization, Properties, and Applications. *Int. J. Corros.* 2018, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2018/4749501>
- Nguyen, T.N.L., Do, T.V., Nguyen, T.V., Dao, P.H., Trinh, V.T., Mac, V.P., Nguyen, A.H., Dinh, D.A., Nguyen, T.A., Vo, T.K.A., Tran, D.L., Le, T.L., 2019. Antimicrobial activity of acrylic polyurethane/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Ag nanocomposite coating. *Prog. Org. Coatings* 132, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.02.023>
- Nielsen, K.F., Holm, G., Uttrup, L.P., Nielsen, P.A., 2004. Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54, 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.05.002>
- Noeiaghaj, T., Mukherjee, A., Dhimi, N., Chae, S.R., 2017. Biogenic deterioration of concrete and its mitigation technologies. *Constr. Build. Mater.* 149, 575–586. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.05.144>
- Odeniyi, M.A., Okumah, V.C., Adebayo-Tayo, B.C., Odeniyi, O.A., 2020. Green synthesis and cream formulations of silver nanoparticles of *Nauclea latifolia* (African peach) fruit extracts and evaluation of antimicrobial and antioxidant activities. *Sustain. Chem. Pharm.* 15, 100197. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100197>
- Ogar, A., Tylko, G., Turnau, K., 2015. Science of the Total Environment Antifungal properties of silver nanoparticles against indoor mould growth. *Sci. Total Environ.* 521–522, 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.101>
- Ohtsuki, C., Miyazaki, T., Tanihara, M., 2002. Development of bioactive organic–inorganic hybrid for bone substitutes. *Mater. Sci. Eng. C* 22, 27–34. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00109-1](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00109-1)
- Oren, A., 2009. Microbial diversity and microbial abundance in salt-saturated brines: why are the waters of hypersaline lakes red? *Nat. Resour. Environ. Issues* 15, 247–255.
- Paijens, C., Bressy, A., Frère, B., Moilleron, R., 2020. Biocide emissions from building materials during wet weather: identification of substances, mechanism of release and transfer to the aquatic environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 3768–3791. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06608-7>

- Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M., 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
- Pan, Z., Guo, J., Li, S., Li, X., Zhang, H., 2021. Properties of alumina coatings prepared on silica-based ceramic substrate by plasma spraying and sol-gel dipping methods. *Ceram. Int.* 47, 27453–27461. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.06.168>
- Parveen, S., Wani, A.H., Shah, M.A., Devi, H.S., Bhat, M.Y., Koka, J.A., 2018. Preparation, characterization and antifungal activity of iron oxide nanoparticles. *Microb. Pathog.* 115, 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.068>
- Paulus, W., 2004. Introduction to microbicides. *Dir. Microbicides Prot. Mater.* 1–8. [https://doi.org/10.1007/1-4020-2818-0\\_1](https://doi.org/10.1007/1-4020-2818-0_1)
- Pena-Poza, J., Ascaso, C., Sanz, M., Pérez-Ortega, S., Oujja, M., Wierzchos, J., Souza-Egipsy, V., Cañamares, M.V., Urizal, M., Castillejo, M., García-Heras, M., 2018. Effect of biological colonization on ceramic roofing tiles by lichens and a combined laser and biocide procedure for its removal. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 126, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.003>
- Pereira, S.S.P., de Oliveira, H.M., Turrini, R.N.T., Lacerda, R.A., 2015. Disinfection with sodium hypochlorite in hospital environmental surfaces in the reduction of contamination and infection prevention: A systematic review. *Rev. da Esc. Enferm.* 49, 675–681. <https://doi.org/10.1590/S0080-623420150000400020>
- Pereyra, A.M., Gonzalez, M.R., Rosato, V.G., Basaldella, E.I., 2014. A-type zeolite containing Ag<sup>+</sup>/Zn<sup>2+</sup> as inorganic antifungal for waterborne coating formulations. *Prog. Org. Coatings* 77, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2013.09.008>
- Pérez, M., García, M., Sánchez, M., Stupak, M., Mazzuca, M., Palermo, J.A., Blustein, G., 2014. Effect of secochiliolide acid isolated from the Patagonian shrub *Nardophyllum bryoides* as active component in antifouling paints. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 89, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.009>
- Pethakamsetty, L., Kothapenta, K., Nammi, H.R., Ruddaraju, L.K., Kollu, P., Yoon, S.G., Pammi, S.V.N., 2017. Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles using methanolic root extracts of *Diospyros sylvatica*. *J. Environ. Sci.* 55, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.04.027>
- Piñar, G., Garcia-Valles, M., Gimeno-Torrente, D., Fernandez-Turiel, J.L., Ettenauer, J., Sterflinger, K., 2013a. Microscopic, chemical, and molecular-biological investigation of the decayed medieval stained window glasses of two Catalan churches. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 84, 388–400. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.02.008>

- Piñar, G., Piombino-Mascalì, D., Maixner, F., Zink, A., Sterflinger, K., 2013b. Microbial survey of the mummies from the Capuchin Catacombs of Palermo, Italy: biodeterioration risk and contamination of the indoor air. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 341–356. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12165>
- Pinela, J., Prieto, M.A., Pereira, E., Jabeur, I., Barreiro, M.F., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2019. Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants. *Food Chem.* 275, 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.118>
- Ping, L., Pizzi, A., Guo, Z.D., Brosse, N., 2012. Condensed tannins from grape pomace: Characterization by FTIR and MALDI TOF and production of environment friendly wood adhesive. *Ind. Crops Prod.* 40, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.039>
- Pinheiro, A.C., Mesquita, N., Trovão, J., Soares, F., Tiago, I., Coelho, C., de Carvalho, H.P., Gil, F., Catarino, L., Piñar, G., Portugal, A., 2019. Limestone biodeterioration: A review on the Portuguese cultural heritage scenario. *J. Cult. Herit.* 36, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2018.07.008>
- Pinna, D., 2021. Microbial Growth and its Effects on Inorganic Heritage Materials, in: *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*. Springer International Publishing, Cham, pp. 3–35. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-69411-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-69411-1_1)
- Pinna, D., Salvadori, B., National, I., Galeotti, M., 2012. Monitoring the performance of innovative and traditional biocides mixed with consolidants and water-repellents for the prevention of biological growth on stone. *Sci. Total Environ.* 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.012>
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*, *En Fungi and food Spoilage*. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Ponizovskaya, V.B., Rebrikova, N.L., Kachalkin, A. V., Antropova, A.B., Bilanenko, E.N., Mokeeva, V.L., 2019. Micromycetes as colonizers of mineral building materials in historic monuments and museums. *Fungal Biol.* 123, 290–306. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.01.002>
- Presentato, A., Armetta, F., Spinella, A., Chillura Martino, D.F., Alduina, R., Saladino, M.L., 2020. Formulation of Mesoporous Silica Nanoparticles for Controlled Release of Antimicrobials for Stone Preventive Conservation. *Front. Chem.* 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00699>
- Priegnitz, B.E., Wargenau, A., Brandt, U., Rohde, M., Dietrich, S., Kwade, A., Krull, R., Fleißner, A., 2012. The role of initial spore adhesion in pellet and biofilm formation in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet. Biol.* 49, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.12.002>
- Ragon, M., Fontaine, M.C., Moreira, D., López-García, P., 2012. Different

- biogeographic patterns of prokaryotes and microbial eukaryotes in epilithic biofilms. *Mol. Ecol.* 21, 3852–3868. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05659.x>
- Rajesh, K.M., Ajitha, B., Reddy, Y.A.K., Suneetha, Y., Reddy, P.S., Ahn, C.W., 2018. A facile bio-synthesis of copper nanoparticles using *Cuminum cyminum* seed extract: antimicrobial studies. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 035005. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aad12f>
- Raza, M., Kanwal, Z., Rauf, A., Sabri, A., Riaz, S., Naseem, S., 2016. Size- and Shape-Dependent Antibacterial Studies of Silver Nanoparticles Synthesized by Wet Chemical Routes. *Nanomaterials* 6, 74. <https://doi.org/10.3390/nano6040074>
- Reboux, G., Bellanger, A.P., Roussel, S., Grenouillet, F., Sornin, S., Piarroux, R., Dalphin, J.C., Millon, L., 2009. Indoor mold concentration in Eastern France. *Indoor Air* 19, 446–453. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2009.00598.x>
- Revuelta, M.V., Bogdan, S., Gámez-Espinosa, E., Deyá, M.C., Romagnoli, R., 2021. Green antifungal waterborne coating based on essential oil microcapsules. *Prog. Org. Coatings* 151, 106101. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.106101>
- Ribeiro, M., Simões, L.C., Simões, M., 2018. Biocides, in: Reference Module in Life Sciences. Elsevier, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12118-1>
- Romani, M., Warscheid, T., Nicole, L., Marcon, L., Di Martino, P., Suzuki, M.T., Lebaron, P., Lami, R., 2022. Current and future chemical treatments to fight biodeterioration of outdoor building materials and associated biofilms: Moving away from ecotoxic and towards efficient, sustainable solutions. *Sci. Total Environ.* 802, 149846. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149846>
- Romano, I., Abbate, M., Poli, A., D’Orazio, L., 2019. Bio-cleaning of nitrate salt efflorescence on stone samples using extremophilic bacteria. *Sci. Rep.* 9, 1668. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38187-x>
- Romero, S.M., Giudicessi, S.L., Vitale, R.G., 2021. Is the fungus *Aspergillus* a threat to cultural heritage? *J. Cult. Herit.* 51, 107–124. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2021.08.002>
- Rosato, V., Lloro, F., Traversa, L., 2016. Deterioro biológico de materiales y técnicas para su limpieza y prevención, 1 ed. ed. Laboratorio de Entrenamiento Multidisciplinario para la Investigación Tecnológica, La Plata.
- Ruffolo, S.A., La Russa, M.F., Malagodi, M., Oliviero Rossi, C., Palermo, A.M., Crisci, G.M., 2010. ZnO and ZnTiO<sub>3</sub> nanopowders for antimicrobial stone coating. *Appl. Phys. A* 100, 829–834. <https://doi.org/10.1007/s00339-010-5658-4>



- Saiz-Jimenez, C., Laiz, L., 2000. Occurrence of halotolerant/halophilic bacterial communities in deteriorated monuments. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 46, 319–326. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00104-9](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00104-9)
- Sakka, S., 2021. Birth of the sol–gel method: early history. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1007/s10971-021-05640-9>
- Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C., 2004. *Introduction to food and airborne fungi*, 7th ed. CBS, The Netherlands.
- Sanmartín, P., DeAraujo, A., Vasanthakumar, A., 2018. Melding the Old with the New: Trends in Methods Used to Identify, Monitor, and Control Microorganisms on Cultural Heritage Materials. *Microb. Ecol.* 76, 64–80. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0770-4>
- Sardella, D., Gatt, R., Valdramidis, V.P., 2019. Metal nanoparticles for controlling fungal proliferation: quantitative analysis and applications. *Curr. Opin. Food Sci.* 30, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.12.001>
- Sathiparan, N., Rumeskumar, U., 2018. Effect of moisture condition on mechanical behavior of low strength brick masonry. *J. Build. Eng.* 17, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.jobe.2018.01.015>
- Sazanova, K. V., Shchiparev, S.M., Vlasov, D.Y., 2014. Formation of organic acids by fungi isolated from the surface of stone monuments. *Microbiology* 83, 516–522. <https://doi.org/10.1134/S002626171405021X>
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O., Gaylarde, C., 2009. Microbial Deterioration of Stone Monuments—An Updated Overview, in: *Advances in Applied Microbiology*. pp. 97–139. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00805-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00805-8)
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schröer, L., Boon, N., De Kock, T., Cnudde, V., 2021. The capabilities of bacteria and archaea to alter natural building stones – A review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 165, 105329. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105329>
- Schumacher, J., Gorbushina, A.A., 2020. Light sensing in plant- and rock-associated black fungi. *Fungal Biol.* 124, 407–417. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.01.004>
- Scroccarello, A., Molina-Hernández, B., Della Pelle, F., Ciancetta, J., Ferraro, G., Fratini, E., Valbonetti, L., Chaves Copez, C., Compagnone, D., 2021. Effect of phenolic compounds-capped AgNPs on growth inhibition of *Aspergillus niger*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 199, 111533. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111533>
- Seyfi, J., Jafari, S.H., Khonakdar, H.A., Sadeghi, G.M.M., Zohuri, G., Hejazi, I., Simon, F., 2015. Fabrication of robust and thermally stable

- superhydrophobic nanocomposite coatings based on thermoplastic polyurethane and silica nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* 347, 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.04.112>
- Shang, D., Sun, X., Shen, X., Hang, J., Jin, L., Shi, L., 2018. Effects of PEG-TMS on the stability and antifouling performances of hydrocarbon-modified amphiphilic xerogel coatings. *Prog. Org. Coatings* 121, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.04.029>
- Sharma, D., Rajput, J., Kaith, B.S., Kaur, M., Sharma, S., 2010. Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. *Thin Solid Films* 519, 1224–1229. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2010.08.073>
- Shen, T., Wang, Q., Li, C., Zhou, B., Li, Y., Liu, Y., 2020. Transcriptome sequencing analysis reveals silver nanoparticles antifungal molecular mechanism of the soil fungi *Fusarium solani* species complex. *J. Hazard. Mater.* 388, 122063. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122063>
- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., Dash, D., 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 18. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/22/225103>
- Siedel, H., 2018. Salt efflorescence as indicator for sources of damaging salts on historic buildings and monuments: a statistical approach. *Environ. Earth Sci.* 77, 572. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7752-4>
- Simões, M.F., Santos, C., Lima, N., 2013. Structural Diversity of *Aspergillus* (Section *Nigri*) Spores. *Microsc. Microanal.* 19, 1151–1158. <https://doi.org/10.1017/S1431927613001712>
- Singh, A.K., 2016a. Structure, Synthesis, and Application of Nanoparticles, in: *Engineered Nanoparticles*. Elsevier, pp. 19–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801406-6.00002-9>
- Singh, A.K., 2016b. Experimental Methodologies for the Characterization of Nanoparticles, in: *Engineered Nanoparticles*. Elsevier, pp. 125–170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801406-6.00004-2>
- Singh, K.S., Majik, M.S., Tilvi, S., 2014. Vibrational Spectroscopy for Structural Characterization of Bioactive Compounds, in: *Analysis of Marine Samples in Search of Bioactive Compounds*. Elsevier B.V, pp. 115–148. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63359-0.00006-9>
- Singh, P., Kim, Y., Zhang, D., Yang, D., 2016. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends Biotechnol.* 34, 588–599. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>
- Smith, R., 1980. *Ecology and Field Biology*, 3rd ed. ed. Harper and Row, New York.
- Sørensen, G., Nielsen, A.L., Pedersen, M.M., Poulsen, S., Nissen, H., Poulsen, M., Nygaard, S.D., 2010. Controlled release of biocide from silica microparticles in wood paint. *Prog. Org. Coatings* 68, 299–306.

<https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2010.03.009>

- Soto, D., Otlewska, A., Rajkowska, K., Gutarowska, B., Guiamet, P., 2020. Monitoring Bioadhesion and Biofilm Formation Within Biopits in Archaeological Potsherds by Microscopic Techniques. *Microsc. Microanal.* 26, 109–110. <https://doi.org/10.1017/S143192762000077X>
- Souza, V.G.L., Fernando, A.L., 2016. Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food—A review. *Food Packag. Shelf Life* 8, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.04.001>
- Spennati, F., Mora, M., Tigini, V., La China, S., Di Gregorio, S., Gabriel, D., Munz, G., 2019. Removal of Quebracho and Tara tannins in fungal bioreactors: Performance and biofilm stability analysis. *J. Environ. Manage.* 231, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.001>
- Sterflinger, K., Piñar, G., 2013. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art — tilting at windmills? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9637–9646. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5283-1>
- Stobie, N., Duffy, B., Colreavy, J., McHale, P., Hinder, S.J., McCormack, D.E., 2010. Dual-action hygienic coatings: Benefits of hydrophobicity and silver ion release for protection of environmental and clinical surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 345, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.02.009>
- Streit, W., Fengel, D., 1994. Purified tannins from quebracho colorado. *Phytochemistry* 36, 481–484. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97100-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97100-0)
- Surendren, S., Deb, B., 2021. Studies on spontaneously reduced vanadium pentoxide xerogel coatings for electro-chromic applications. *Electrochim. Acta* 389, 138629. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138629>
- Teng, B., Hayasaka, Y., Smith, P.A., Bindon, K.A., 2019. Effect of Grape Seed and Skin Tannin Molecular Mass and Composition on the Rate of Reaction with Anthocyanin and Subsequent Formation of Polymeric Pigments in the Presence of Acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* 67, 8938–8949. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01498>
- Thakkar, K.N., Mhatre, S.S., Parikh, R.Y., 2010. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002>
- Tiringer, U., Mušič, B., Zimerl, D., Šekularac, G., Stavber, S., Milošev, I., 2019. The effects of cerium ions on the curing, polymerisation and condensation of hybrid sol-gel coatings. *J. Non. Cryst. Solids* 510, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.12.021>
- Traversetti, L., Bartoli, F., Caneva, G., 2018. Wind-driven rain as a bioclimatic factor affecting the biological colonization at the archaeological site of Pompeii, Italy. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 134, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.07.016>
- Trovão, J., Gil, F., Catarino, L., Soares, F., Tiago, I., Portugal, A., 2020.

Analysis of fungal deterioration phenomena in the first Portuguese King tomb using a multi-analytical approach. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 149, 104933. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104933>

- Trovão, J., Portugal, A., Soares, F., Paiva, D.S., Mesquita, N., Coelho, C., Pinheiro, A.C., Catarino, L., Gil, F., Tiago, I., 2019. Fungal diversity and distribution across distinct biodeterioration phenomena in limestone walls of the old cathedral of Coimbra, UNESCO World Heritage Site. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 142, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.05.008>
- Trovão, J., Soares, F., Tiago, I., Catarino, L., Portugal, A., Gil, F., 2021. A contribution to understand the Portuguese emblematic Ançã limestone bioreceptivity to fungal colonization and biodeterioration. *J. Cult. Herit.* 49, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2021.04.003>
- Tseng, C.-C., Huang, N., Hsieh, C.-J., Hung, C.-C., Guo, Y.-L.L., 2021. Contribution of Visible Surface Mold to Airborne Fungal Concentration as Assessed by Digital Image Quantification. *Pathogens* 10, 1032. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081032>
- Tuomi, T., Reijula, K., Johnsson, T., Hemminki, K., Hintikka, E.-L., Lindroos, O., Kalso, S., Koukila-Kähkölä, P., Mussalo-Rauhamaa, H., Haahtela, T., 2000. Mycotoxins in Crude Building Materials from Water-Damaged Buildings. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1899–1904. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1899-1904.2000>
- Turland, N., Wiersema, J., Barrie, F., Greuter, W., Hawksworth, D., Herendeen, P., Knapp, S., Kusber, W.-H., Li, D.-Z., Marhold, K., All, S., 2018. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, *Regnum Vegetabile*. Koeltz Botanical Books. <https://doi.org/10.12705/Code.2018>
- Unković, Dimkić, I., Stupar, M., Stanković, S., Vukojević, J., Ljaljević Grbić, M., 2018. Biodegradative potential of fungal isolates from sacral ambient: In vitro study as risk assessment implication for the conservation of wall paintings. *PLoS One* 13, e0190922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190922>
- Valodkar, M., Nagar, P.S., Jadeja, R.N., Thounaojam, M.C., Devkar, R. V., Thakore, S., 2011. Euphorbiaceae latex induced green synthesis of non-cytotoxic metallic nanoparticle solutions: A rational approach to antimicrobial applications. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 384, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.04.015>
- Valsalam, S., Agastian, P., Arasu, M.V., Al-Dhabi, N.A., Ghilan, A.-K.M., Kaviyarasu, K., Ravindran, B., Chang, S.W., Arokiyaraj, S., 2019. Rapid biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from the leaf extract of *Tropaeolum majus* L. and its enhanced in-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and anticancer properties. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 191, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.010>
- Valverde-Alva, M.A., García-Fernández, T., Villagrán-Muniz, M., Sánchez-Aké, C., Castañeda-Guzmán, R., Esparza-Alegría, E., Sánchez-Valdés, C.F.,

- Llamazares, J.L.S., Herrera, C.E.M., 2015. Synthesis of silver nanoparticles by laser ablation in ethanol: A pulsed photoacoustic study. *Appl. Surf. Sci.* 355, 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.07.133>
- Verdier, T., Coutand, M., Bertron, A., Roques, C., 2014. A review of indoor microbial growth across building materials and sampling and analysis methods. *Build. Environ.* 80, 136–149. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2014.05.030>
- Vidal, F., Vicente, R., Mendes Silva, J., 2019. Review of environmental and air pollution impacts on built heritage: 10 questions on corrosion and soiling effects for urban intervention. *J. Cult. Herit.* 37, 273–295. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2018.11.006>
- Vu, D., Groenewald, M., de Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J.Z., Cardinali, G., Houbraken, J., Boekhout, T., Crous, P.W., Robert, V., Verkley, G.J.M., 2019. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Stud. Mycol.* 92, 135–154. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>
- Wang, D., Bierwagen, G.P., 2009. Sol–gel coatings on metals for corrosion protection. *Prog. Org. Coatings* 64, 327–338. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2008.08.010>
- Wang, X., Schröder, H.C., Schloßmacher, U., Jiang, L., Korzhev, M., Müller, W.E.G., 2013. Biosilica aging: From enzyme-driven gelation via syneresis to chemical/biochemical hardening. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 3437–3446. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.006>
- Warscheid, T., Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: a review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 46, 343–368. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00109-8)
- Weber, D.J., Rutala, W.A., 2013. Self-disinfecting surfaces: Review of current methodologies and future prospects. *Am. J. Infect. Control* 41, S31–S35. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.12.005>
- Wen, J., Wilkes, G.L., 1996. Organic/Inorganic Hybrid Network Materials by the Sol–Gel Approach. *Chem. Mater.* 8, 1667–1681. <https://doi.org/10.1021/cm9601143>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols*. Elsevier, New York, pp. 315–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wichmann, F.A., Müller, A., Busi, L.E., Cianni, N., Massolo, L., Schlink, U., Porta, A., Sly, P.D., 2009. Increased asthma and respiratory symptoms in children exposed to petrochemical pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.09.052>

- Wieck, S., Olsson, O., Kümmerer, K., 2018. Not only biocidal products: Washing and cleaning agents and personal care products can act as further sources of biocidal active substances in wastewater. *Environ. Int.* 115, 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.040>
- Wu, F., Zhang, Y., He, D., Gu, J.-D., Guo, Q., Liu, X., Duan, Y., Zhao, J., Wang, W., Feng, H., 2021. Community structures of bacteria and archaea associated with the biodeterioration of sandstone sculptures at the Beishiku Temple. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 164, 105290. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105290>
- Xu, T., Xie, C.S., 2003. Tetrapod-like nano-particle ZnO/acrylic resin composite and its multi-function property. *Prog. Org. Coatings* 46, 297–301. [https://doi.org/10.1016/S0300-9440\(03\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9440(03)00016-X)
- Yuce-Dursun, B., Cigil, A.B., Dongez, D., Kahraman, M.V., Ogan, A., Demir, S., 2016. Preparation and characterization of sol–gel hybrid coating films for covalent immobilization of lipase enzyme. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 127, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.02.007>
- Zampieri, F., Wösten, H.A.B., Scholtmeijer, K., 2010. Creating Surface Properties Using a Palette of Hydrophobins. *Materials (Basel)*. 3, 4607–4625. <https://doi.org/10.3390/ma3094607>
- Zanurin, A., Johari, N.A., Alias, J., Mas Ayu, H., Redzuan, N., Izman, S., 2021. Research progress of sol-gel ceramic coating: A review. *Mater. Today Proc.* <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.09.203>
- Żarowska, B., Koźlecki, T., Piegza, M., Jaros-Koźlecka, K., Robak, M., 2019. New Look on Antifungal Activity of Silver Nanoparticles (AgNPs). *Polish J. Microbiol.* 68, 515–525. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-051>
- Zhang, S., Liang, X., Gadd, G.M., Zhao, Q., 2021. A sol–gel based silver nanoparticle/polytetrafluorethylene (AgNP/PTFE) coating with enhanced antibacterial and anti-corrosive properties. *Appl. Surf. Sci.* 535, 147675. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.147675>
- Zhang, X.-F., Jiang, F., Chen, R.-J., Chen, Y.-Q., Hu, J.-M., 2020. Robust superhydrophobic coatings prepared by cathodic electrophoresis of hydrophobic silica nanoparticles with the cationic resin as the adhesive for corrosion protection. *Corros. Sci.* 173, 108797. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2020.108797>
- Zielecka, M., Bujnowska, E., Kępska, B., Wenda, M., Piotrowska, M., 2011. Antimicrobial additives for architectural paints and impregnates. *Prog. Org. Coatings* 72, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2011.01.012>
- Zmozinski, A. V., Peres, R.S., Freiburger, K., Ferreira, C.A., Tamborim, S.M.M., Azambuja, D.S., 2018. Zinc tannate and magnesium tannate as anticorrosion pigments in epoxy paint formulations. *Prog. Org. Coatings* 121, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.04.007>
- Zuin, V.G., 2016. Circularity in green chemical products, processes and

services: Innovative routes based on integrated eco-design and solution systems. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 2, 40–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2016.09.008>