

Síntesis verde y caracterización de sólidos de matriz silícea con cobre y plata obtenidos a partir de dos precursores para su aplicación como aditivos antifúngicos

Romina Arreche¹, Katerine Igal¹,
Natalia Bellotti², Patricia Vázquez¹

¹CINDECA - Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas “Dr. Jorge J. Ronco”, (CCT-CONICET) UNLP, 47 N° 257, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina

²CIDEPINT - Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas, (CIC-CONICET) Calle 52 e/ 121 y 122, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina.

e-mail: pinturashigienicas@cidepint.gov.ar

RESUMEN

La síntesis de nuevos productos con actividad antimicrobiana, amigables con el medio ambiente, aplicados a la formulación de recubrimientos que prevengan la formación de biopelículas es un tema que ha cobrado gran relevancia en los últimos años. Las biopelículas producen cambios indeseables (biodeterioro) en las propiedades de los materiales como consecuencia de la actividad vital de los microorganismos. Por otro lado, afectan la salud humana, al constituirse en el interior de las viviendas y disminuir la calidad del aire por contribuir con la formación de bioaerosoles. El presente trabajo tiene como objetivo la síntesis *verde* y la caracterización de sólidos de matriz silícea asociados con cobre y plata, como contracciones de un heteropoliácido para su uso como aditivos antimicrobianos en pinturas. Los sólidos se obtienen a partir del método sol-gel mediante diferentes medios ácidos. La actividad antifúngica de los sólidos sintetizados se evaluó frente a dos aislamientos fúngicos, *Alternaria alternata* y *Chaetomium globosum*, obtenidos a partir de películas de pinturas biodeterioradas. Se prepararon sílices empleando tetraetilortosilicato y metiltrimetoxisilano como precursores y catalizadores ácidos para la reacción de hidrólisis del alcóxido. Una vez finalizada la etapa de síntesis y caracterización de las sílices propuestas, se evaluó su actividad antifúngica frente a los hongos de interés y se determinó el porcentaje de inhibición en cada caso. De los sólidos ensayados, la mayoría mostraron tener actividad antifúngica por inhibir el crecimiento de ambos hongos con las menores concentraciones en relación a su blanco, aunque los que contenían cobre y plata presentaron un mayor grado de inhibición en todos los casos.

Palabras clave: biodeterioro, pinturas higiénicas, sílice, cobre, plata, método sol-gel, aditivos antimicrobianos.

ABSTRACT

The synthesis of new environmentally friendly products with antimicrobial activity, applied to the formulation of coatings that prevent biofilm formation is an issue that has become important in recent years. Biofilms produce undesirable changes (biodeterioration) in material properties due to the vital activity of microorganisms. They reduce indoor air quality by contributing to the formation of bioaerosols and therefore affect human health. This paper aims to *green* synthesis and characterization of solid silica matrix associated with copper and silver, as counter cations of a heteropolyacid for use as antimicrobial additives in paints. The solids were obtained from the sol-gel method using different acidic medium. The antifungal activity of the synthesized solids was evaluated against two fungal isolates, *Alternaria alternata* and *Chaetomium globosum*, obtained from biodeteriorated paints films. Different silicas were prepared using tetraethyl orthosilicate and methyltrimethoxysilane as precursors and acids as catalysts for the hydrolysis reaction of the alkoxide. Once the synthesis phase and the characterization of the samples were finished, the antifungal activity against the microorganisms selected was evaluated and the inhibition percent was determined in each case. Among the solids tested, most showed antifungal activity, because they inhibited the fungal growth at the lower concen-

trations compared to the sample without the solids, although the presence of copper and silver increases the inhibition in most cases.

Keywords: biodeterioration, hygienic paints, silica, copper, silver, sol-gel method, antifungal additive.

1. INTRODUCCIÓN

Los materiales que forman parte de las edificaciones urbanas (ladrillos, mampostería, maderas, pinturas etc.) son susceptibles a la colonización microbiológica mayormente por parte de hongos, bacterias y algas [1,2]. La constitución de complejas comunidades de microorganismos (biopelículas) altera las características superficiales de los materiales pero, también, facilitan su deterioro en forma más profunda [3-5]. La biodegradación de los sustratos comienza con la liberación por parte de los microorganismos de productos que reaccionan químicamente con estos, muchas veces rompiendo estructuras complejas para generar moléculas simples, que pueden atravesar las membranas celulares y ser aprovechados por los microorganismos [3]. Además, las biopelículas afectan la calidad del aire en el interior de las viviendas al contribuir con la formación de bioaerosoles [6]. Por esta razón la Organización Mundial de la Salud aconseja eliminar o minimizar el crecimiento microbiológico en las viviendas dado que es un peligro para la salud humana [7].

Para prevenir la colonización de los materiales por parte de los microorganismos se utilizan generalmente recubrimientos especiales. Entre los sistemas protectores, las pinturas son de los más utilizados y contienen uno o más aditivos antimicrobianos (biocidas) incorporados en bajas concentraciones en las formulaciones [8]. Entre los microorganismos que colonizan las paredes pintadas, los hongos son considerados los más deteriorantes y los más abundantes en las biopelículas, en especial, en Latinoamérica [1,2]. El uso de pinturas especiales que contengan agentes antimicrobianos es una herramienta importante para la prevención del biodeterioro. En lo que respecta a los agentes antimicrobianos la tendencia actual es buscar reemplazos a los tradicionales (isotiazolonas, benzoisotiazolonas, cloraminas, cloruros de alquilo o arilo, piritiona de cinc, etc.) por otros de menor toxicidad [9]. La preocupación por el impacto ambiental de nuevos materiales se extiende también al proceso de obtención de los mismos. En tal sentido, la síntesis *verde* presenta una opción importante al abordar la temática en forma integral buscando minimizar o eliminar los efectos adversos en un proceso de síntesis [10].

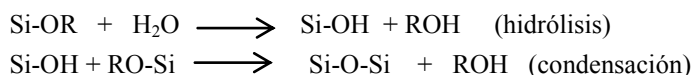
Existen materiales que pueden ser modificados con el objetivo de prevenir o impedir por simple contacto el asentamiento de los microorganismos, un ejemplo lo constituyen las sílices bioactivas [11]. Las modificaciones pueden estar relacionadas con la estructura, propiedades superficiales y/o la disponibilidad de algún agente activo [12]. En tal sentido, las sílices bioactivas resultan una línea de investigación promisorio por su obtención mediante síntesis *verde* por el método sol-gel, por permitir modificaciones estructurales y la posibilidad de adicionar agentes con actividad antimicrobiana para su aplicación en diversos materiales, entre los que se encuentra, la formulación de recubrimientos [13,14].

Teniendo en cuenta lo expresado, el presente trabajo se propone la obtención y caracterización de sólidos de base silícea de distinta estructura utilizando el método sol-gel con diferentes precursores, un heteropoliácido como catalizador y sales de cobre y plata, como agentes bioactivos. La evaluación de la actividad antifúngica se realizó utilizando el método de inhibición en placa con distintas concentraciones frente a los hongos *A. alternata* y *C. globosum* [15,16]. Los hongos utilizados fueron seleccionados por su capacidad de crecer y deteriorar distintos materiales, en especial películas de pintura, además del efecto negativo que tienen sobre la salud humana [17]. Los hongos del género *Alternaria* son capaces de producir una variedad de compuestos entre los que se encuentran las micotoxinas que son tóxicas para los mamíferos y las aves [17], y en el caso de *Chaetomium* son conocidos por producir compuestos celulolíticos que originan la degradación, especialmente, de las pinturas de base acuosa que contienen espesantes celulósicos [18].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Síntesis de sílice por el método sol-gel

Las sílices se sintetizaron a través del método sol-gel caracterizado por ser relativamente rápido y fácil de llevar a cabo. Esta clase de métodos son comúnmente llamados “one shot”, se identifican por realizarse en un solo paso y utilizar un único recipiente. El proceso sol-gel generalmente involucra un precursor alcóxido $M(OR)_n$, donde R es un grupo alquilo (C_xH_{2x+1}), y la hidrólisis y condensación de estos precursores conduce a la formación de una red de sílice, a través de las siguientes reacciones [19]:



Los precursores utilizados fueron: Tetraetilortosilicato (TEOS, Aldrich 98%) y Metiltrimetoxisilano (MTMS, Aldrich 95%), con la finalidad de obtener distintas estructuras en los geles silíceos. Como catalizador de la reacción de hidrólisis se utilizó ácido acético glacial (Anedra) y un heteropoliácido comercial, el ácido fosfomolibdico $H_3PMo_{12}O_{40}$ (HPA, Fluka); como solvente se utilizó etanol absoluto (Carlo Erba) y como agentes bioactivos nitrato de cobre (Sigma-Aldrich purum) y acetato de plata (Sigma-Aldrich 99,99%).

En las síntesis con ácido acético como catalizador (muestras ST y SM), la relación molar de los reactivos utilizados fue 1:1,17:5:3,73 (precursor: catalizador: solvente: agua), respectivamente. Las cantidades utilizadas de cada componente fueron establecidas a partir de ensayos previos del grupo de trabajo. En las restantes muestras, preparadas utilizando el heteropoliácido como catalizador, el mismo fue agregado con el objetivo de obtener una concentración final en el sólido de 11% (p/p) según trabajo en bibliografía [20] y el nitrato de cobre ($(NO_3)_2Cu$) y acetato de plata (CH_3COOAg) fueron incorporados en las síntesis en cantidad necesaria para ocupar la mitad de los sitios ácidos del HPA ($H_{1,5}Cu_{1,5}$ ó $H_{1,5}Ag_{1,5}$ respectivamente).

El método consiste en colocar en un vaso de precipitado una porción de solvente y el catalizador correspondiente, luego se incorpora el precursor y, finalmente, el agregado de la cantidad restante de etanol. En las muestras sintetizadas con heteropoliácido y la sal de cobre o plata, dichas sustancias sólidas fueron adicionadas disueltas en la segunda porción de etanol. Finalmente, se lleva a cabo la adición lenta de H_2O .

Los sólidos obtenidos fueron denominados según el precursor, el heteropoliácido y el metal utilizados en la síntesis: ST (TEOS), ST-H (TEOS/HPA), ST-HCu (TEOS/HPA/Cu), ST-HAg (TEOS/HPA/Ag), SM (MTMS), SM-H (MTMS/HPA), SM-HCu (MTMS/HPA/Cu) y SM-HAg (MTMS/HPA/Ag).

En todos los casos se obtuvieron aproximadamente 10 g de sílice. Como los alcóxidos, en general, y el utilizado en particular se hidrolizan fácilmente con la sola presencia de trazas de agua, se trabajó todo el tiempo con atmósfera de N_2 , a temperatura ambiente, dentro de una campana y así evitar la humedad ambiente. También, para evitar ese problema, se utilizó un solvente anhidro, como etanol absoluto (99,99%). Una vez que se ha finalizado la síntesis, el gel formado se agita por 2 h y luego se deja 5 a 7 días en la campana para la evaporación del solvente. Finalmente, se obtiene un cristal de sílice denominado *vidrio*, que posteriormente, se muele para obtener un tamaño uniforme de macropartícula.

2.2 Caracterización de las muestras sintetizadas

Se realizó la caracterización de las muestras mediante las siguientes técnicas: Absorción-Desorción de N_2 (S_{BET}), Titulación Potenciométrica con *n*-butilamina, Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), fotografías digitales y Difracción de Rayos X (DRX).

Las propiedades texturales, como el área superficial de los sólidos (S_{BET}), se determinaron mediante un equipo Micromeritics Accusorb 2100, utilizando N_2 como gas adsorbible.

La estimación de las propiedades ácidas de los materiales se realizó por medio de titulación potenciométrica con *n*-butilamina. Se llevó a cabo en un equipo Metrohm 794 Basic Titrino con un electrodo de doble junta. Se agregaron 0,025 ml/min de solución de *n*-butilamina en acetonitrilo (0,025 N) a una cantidad conocida (0,025 g) del sólido de interés previamente suspendido en acetonitrilo (45,0 ml), agitando por un período de 2 h.

Los diagramas de rayos X (DRX) se realizaron con un equipo Philips modelo PW-1390 (control de canal) y PW-1394 (control de motor) con registrador gráfico de barrido incorporado. Se usó radiación $Cu K\alpha$ ($\alpha=1,5417 \text{ \AA}$), filtro de níquel, 20 mA y 40 kV en la fuente de alta tensión, ángulo de barrido (2θ) comprendido entre 5° y 60° , velocidad de barrido de 2° por minuto y amplitud de la escala vertical 2000 cuentas por segundo.

Se realizó Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para la obtención de micrografías de los sólidos, empleando un equipo Philips Modelo 505, a un potencial de trabajo de 15 kV, soportando las muestras sobre grafito y metalizándolas con oro. Las imágenes se obtuvieron con un adquisidor ADDAIL, con Soft Imaging System.

2.3 Actividad antifúngica

Los hongos, *A. alternata* y *C. globosum*, aislados previamente a partir de sustratos biodeteriorados [15], fueron utilizados como bioindicadores para determinar la actividad antifúngica de las sílices con el HPA como blanco y con HPA/cobre y HPA/plata.

Se realizaron subcultivos de los aislamientos mencionados, en placas de Petri. La composición del medio de cultivo (MC) utilizado fue: 1,5 g agar, 1 g dextrosa, 0,5 g proteasa peptona, 0,1 g KH_2PO_4 , 0,05 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y agua destilada. Las placas fueron incubadas en estufa a $28^\circ C$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de los sólidos

En la Figura 1 se observan fotografías digitales de los distintos sólidos sintetizados una vez secos. A simple vista, se puede visualizar el cambio de coloración que sufren las muestras cuando el heteropoliácido es incorporado en la síntesis en comparación con las muestras ST y SM (Figuras 1a y 1e, respectivamente) donde se utilizó ácido acético como catalizador.

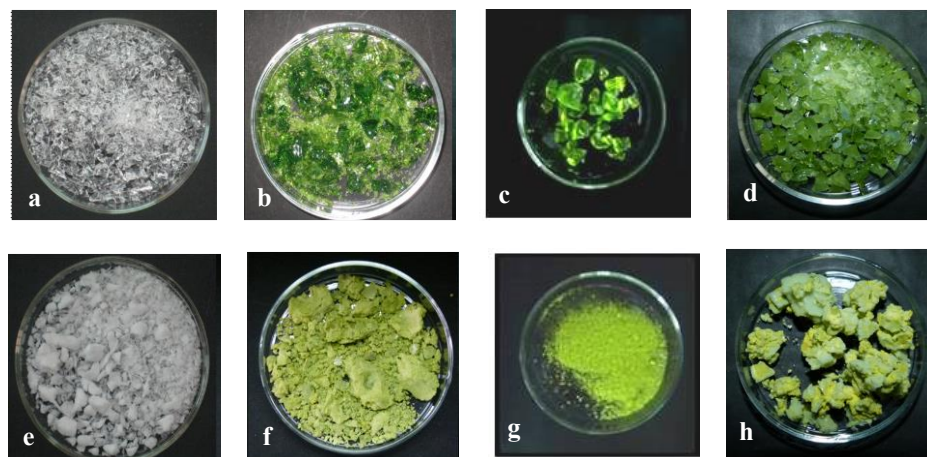


Figura 1: Fotografías digitales de las muestras sintetizadas: (a) ST (TEOS), (b) ST-H (TEOS/HPA), (c) ST-HCu (TEOS/HPA/Cu), (d) ST-HAg (TEOS/HPA/Ag), (e) SM (MTMS), (f) SM-H (MTMS/HPA), (g) SM-HCu (MTMS/HPA/Cu), (h) SM-HAg (MTMS/HPA/Ag).

En cuanto a la estimación de las propiedades ácidas de los materiales, se determinaron los potenciales de cada uno de los sólidos obtenidos (Tabla 1). El método utilizado se basa en la diferencia de potencial del electrodo (E) el cual es determinado, principalmente, por el ambiente ácido alrededor de la membrana del mismo, por lo tanto, el potencial del electrodo medido es un indicador de las propiedades ácidas de la dispersión de partículas sólidas. Para interpretar los resultados, el potencial de electrodo (EI) indica la fuerza ácida máxima de los sitios superficiales y los valores (meq/g sólido), donde se alcanza el plateau, indica el número total de sitios ácidos. La fuerza ácida de los sitios superficiales puede clasificarse de acuerdo a los siguientes rangos: sitio muy fuerte, $EI > 100$ mV; sitio fuerte, $0 < EI < 100$ mV; sitio débil, $-100 < EI < 0$ mV; y sitio muy débil, $EI < -100$ mV [21]. En tal sentido presentaron una mayor acidez los sólidos cuyo precursor fue el MTMS y se observó en general un descenso de la misma al agregar ambos metales.

Tabla 1: Propiedades superficiales y acidez inicial de las muestras

MUESTRA	S_{BET} (m^2/g)	VOLUMEN DE PORO (cm^3/g)	TAMAÑO DE PORO (Å)	EI (mV)
ST-H	227	0,1	19,4	464
SM-H	-	-	-	781
ST-HCu	527	0,2	18,6	275
SM-HCu	-	-	-	260
ST-HAg	316	-	29,8	99
SM-HAg	-	-	-	134

Las propiedades texturales se presentan en la Tabla 1. Los sólidos cuyo precursor era el MTMS presentaron la textura de una goma y los valores de S_{BET} , volumen y tamaño de poro fueron bajos y estuvieron dentro del error experimental por lo que no son reportados. Estos resultados se correlacionan con datos bibliográficos que muestran que el uso de MTMS como precursor en lugar de TEOS imparte propiedades texturales diferentes en las sílices obtenidas, menor tamaño de poro, menor número de grupos silanol en superfi-

cie y mayor hidrofobicidad [22,23]. En las muestras con TEOS, la superficie específica S_{BET} aumenta al agregar la sal de cobre o plata, esto se debería al efecto estérico, al aumentar el radio del compuesto incluido.

La microscopía electrónica de barrido se utilizó para el estudio de la topografía superficial de los especímenes sólidos, permitiendo una detallada observación de morfologías, tamaños de partículas (en la escala micro y submicrométrica), y hasta la localización diferencial de distintas fases o componentes del espécimen en estudio. A continuación se presentan las micrografías de las muestras sintetizadas con los diferentes precursores (Figura 2). En su mayoría son similares en morfología ya que se trata de sílice modificada en todos los casos. Se puede observar que las sílices obtenidas con TEOS conservan la morfología laminar característica de la sílice amorfa, mientras que con MTMS como precursor de síntesis se observa la presencia de aglomeraciones y esto se condice con su baja superficie específica, Figuras 2b, 2d y 2f.

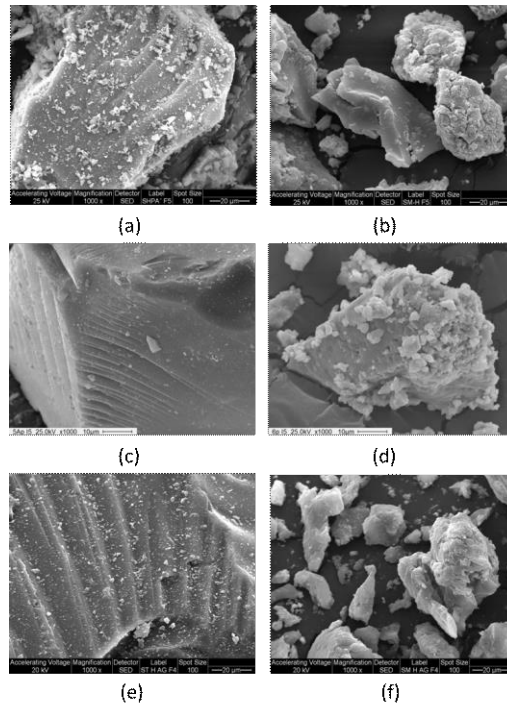


Figura 2: Micrografías SEM de las muestras (a) ST-H, (b) SM-H, (c) ST-HCu, (d) SM-HCu, (e) ST-HAg y (f) SM-HAg (Magnificación 1000x).

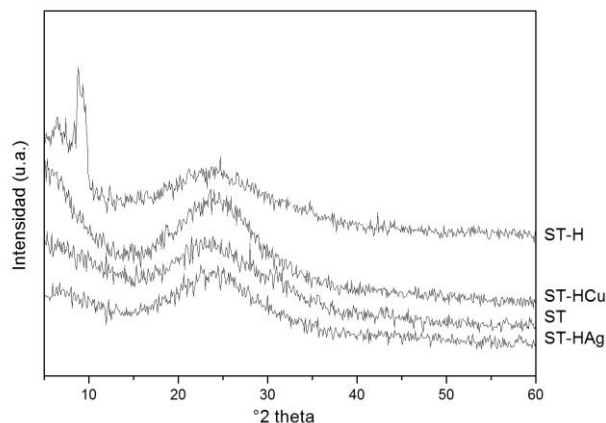


Figura 3: Diagramas de Difracción de Rayos X de las muestras sintetizadas con TEOS como precursor.

Los diagramas de difracción de rayos X (DRX) corresponden a materiales con morfología de tipo amorfa. El pico ubicado alrededor de $23^\circ 2\theta$ es la difracción típica de este tipo de sílice. En las sílices obtenidas con TEOS como precursor se observa la aparición de señales características de los compuestos con es-

estructura Keggin, en los intervalos comprendidos entre 6,5-10° 2θ, cuando se realiza la incorporación del mismo a la sílice (Figura 3).

3.2 Actividad antifúngica

Los diámetros promedios de cada cultivo de *A. alternata* y *C. globosum* frente a los sólidos ensayados, se muestran en las Figura 4.

En el caso de las muestras con Ag se decidió ensayar una concentración menor (0,01 mg/ml) en comparación con las muestras que contenían Cu, esto debido a que se esperaba una mayor actividad antimicrobiana de las que contenían Ag según datos bibliográficos [24,25]. En la Figura 4 se destaca, principalmente, la diferencia en el diámetro de crecimiento fúngico de las muestras con Cu y Ag, respecto de los sólidos sin ellos, siendo mayor la inhibición observada en las muestras con Ag a menor concentración (0,10 mg/ml) respecto de las que contenían Cu, cuando el precursor era TEOS. Cabe remarcar que la muestra SM-HAg no pudo ser incluida en el ensayo descrito previamente por ser un sólido de extrema dureza (muy difícil de moler). A partir de las mediciones efectuadas de los diámetros de crecimiento de cada cultivo frente a los agentes evaluados se determinaron los % de inhibición con respecto a cada concentración ensayada, según la ecuación (1):

$$I = [(C-E)/C] \times 100 \quad (1)$$

donde: C corresponde a los diámetros promedio de crecimiento radial de cada hongo en las placas de control y E en las placas con los productos evaluados.

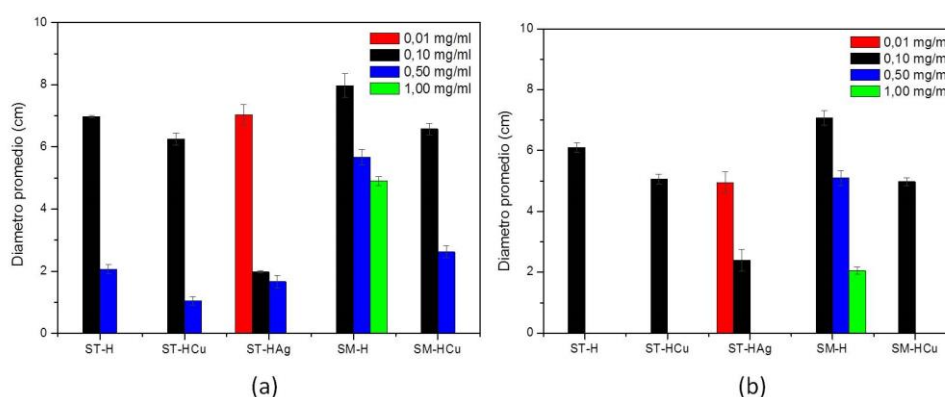


Figura 4: Diámetro promedio de los cultivos de *A. alternata* (a) y *C. globosum* (b), frente a distintas concentraciones de Cu y Ag (barras de color rojo, negro, azul y verde) con los respectivos controles.

Los resultados de % de inhibición obtenidos, presentados en la Tabla 2, muestran que las sílices sin contenido metálico inhibieron por si solas el crecimiento de ambos hongos, destacándose la actividad presentada por ST-H. Esto podría deberse a la elevada acidez de los sólidos (determinada por las medidas de potencial (Tabla 1), lo cual se ve potenciado en el caso de ST-H por una mayor superficie expuesta.

Tabla 2: Porcentaje de inhibición de los cultivos de *A. alternata* (*A. a*) y *C. globosum* (*C. g*) en placa.

Sólidos	CONCENTRACIÓN (mg/ml) RESPECTO AL CONTENIDO DE Cu y Ag							
	0,01		0,1		0,5		1,0	
	<i>A. a</i>	<i>C. g</i>	<i>A. a</i>	<i>C. g</i>	<i>A. a</i>	<i>C. g</i>	<i>A. a</i>	<i>C. g</i>
ST-H	5%	0%	19%	19%	76%	100%	100%	100%
SM-H	7%	0%	8%	6%	35%	32%	43%	73%
ST-HCu	-	-	24%	32%	79%	100%	100%	100%
SM-HCu	-	-	20%	33%	68%	100%	100%	100%
ST-HAg	19%	0%	77%	50%	78%	100%	-	-

En general, las sílices modificadas con Cu y Ag mostraron una mayor actividad antifúngica y, especialmente, se destacan SM-HCu y ST-HAg en relación a sus respectivos blancos, frente a ambos hongos. La sílice ST-HCu no mostró un aumento significativo en el porcentaje de inhibición respecto a su blanco a diferencia de lo que ocurre entre SM-H y SM-HCu. Esto podría deberse a que el sólido de origen SM-H presentó una mayor acidez según las medidas de potencial realizadas (EI, Tabla 1) junto con una superficie específica baja, a diferencia de lo mostrado por ST-H lo cual conduciría, al agregar la sal de Cu, a una distribución del agente activo distinto y más eficiente para la inhibición fúngica.

Por otro lado, la mayor actividad del sólido ST-HAg, en relación al de la misma base silícea que contiene Cu, puede deberse a que la Ag, en sus distintas formas, resulta más activa que el Cu frente a diversas especies de microorganismos [25, 26].

Dentro del rango de concentraciones ensayadas, la concentración inhibitoria mínima (CIM) representa la mínima concentración del agente activo en estudio que produjo una inhibición total del crecimiento fúngico. En general, en el caso de *A. alternata*, la CIM fue de 1,0 mg/ml y cuando el hongo ensayado fue *C. globosum* (Figura 5), resultó de 0,5 mg/ml.

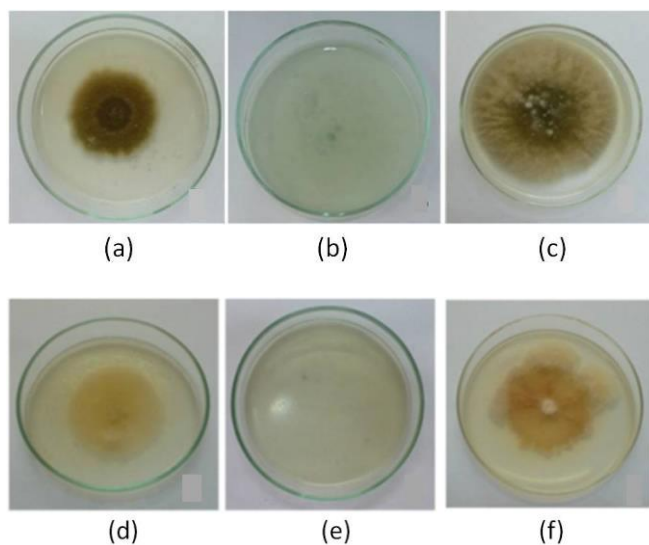


Figura 5: Cultivos de *A. alternata* (CIM, 1,0 mg/ml): a) SM-H (blanco), b) SM-HCu y c) Control. Cultivos de *C. globosum* (CIM, 0,5 mg/ml): d) SM-H (blanco), e) SM-HCu y f) Control.

En la Figura 5 se muestran algunos de los registros fotográficos obtenidos de las placas con los cultivos de *A. alternata* y *C. globosum* que contenían los sólidos, de base SM-H en estudio, con la mínima concentración de Cu con la que se registró un mayor grado de inhibición al crecimiento fúngico en relación a los respectivos controles.

4. CONCLUSIÓN

Fue posible la síntesis, caracterización y evaluación de la actividad antifúngica de los sólidos de matriz silícea obtenidos. Los sólidos obtenidos mediante los precursores, tetraetilortosilicato y metiltrimetoxisilano mostraron diferencias en su estructura y propiedades.

La actividad antifúngica de los sólidos obtenidos se determinó mediante el ensayo de inhibición en placa frente a dos hongos de interés (*A. alternata* y *C. globosum*), y se determinó el porcentaje de inhibición en cada caso. Se pudo observar cierta correlación entre los resultados de bioactividad obtenidos y las diferencias en las propiedades de las distintas sílices sintetizadas. En tal sentido, se destaca que ambas sílices sin contenido metálico inhibieron por si solas el crecimiento fúngico destacándose la actividad presentada por ST-H en los ensayos en placa. Los sólidos SM-HCu y ST-HAg mostraron tener una mayor actividad antifúngica por inhibir en mayor grado el crecimiento del micelio dentro del rango de concentraciones ensayadas en relación a sus respectivos blancos. En especial, se destaca la sílice SM-H dado que la adición de Cu aumentó en forma significativa el grado de inhibición frente a ambas especies fúngicas.

Por lo tanto, la metodología aplicada logró, en forma preliminar, orientar la selección de un biocida

ecológico adecuado a partir de una lista de posible agentes antifúngicos. Una adecuada selección del sólido activo y su concentración permite obtener sílices que podrían emplearse como aditivos en pinturas para la prevención de la colonización y crecimiento por parte de microorganismos.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración a Mariela Theiller por las imágenes de microscopía electrónica de barrido y a Edgardo Soto por los estudios de absorción-desorción de N₂.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] GAYLARDE, C.C., MORTON, L.H.G., LOH, K., et al., “Biodeterioration of external architectural paint films - A review”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, n. 8, pp. 1189-1198, Dec. 2011.
- [2] GAYLARDE, C. C., GAYLARDE, P. M., "A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America", *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 55, n 2, pp. 131-139, Mar. 2005.
- [3] GU, J.D., “Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances Biodeterior”, *International biodeterioration & biodegradation*, v.52, n.2, pp. 69-91, Sep. 2003.
- [4] WARSCHIED, T., BRAAMS, J.,”Biodeterioration of the stone: a review”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 46, pp. 343-368, Oct. 2000.
- [5] ALLSOPP, D., SEAL, K., and GAYLARDE, C., *Introduction to Biodeterioration*, 2 ed., Cambridge, Cambridge University Press, 2004.
- [6] ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, www.epa.gov/mold. Accedido en junio de 2014.
- [7] WORLD HEALTH ORGANIZATION, <http://www.euro.who.int>. Accedido en junio 2014.
- [8] JOHNS, K., “Hygienic coatings: The next generation”, *Surface Coatings International* , v. 86, pp. 101-110, jul. 2003.
- [9] LINDNER, W., *Directory of Microbicides for the Protection of Material A Handbook*, 1 ed., Kluwer Academic Publishers, 2005.
- [10] LI, C. J., TROST, B.M., “Green chemistry for chemical synthesis”, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, pp. 13197- 13202, Sep. 2008.
- [11] JONES, J.R., “Review of bioactive glass: From Hench to hybrids”, *Acta Biomaterialia*, v. 9, pp. 4457-4486, Aug. 2013.
- [12] SIEDENBIEDEL, F., TILLER, J., C., “Review Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles”, *Polymers*, v. 4, pp. 46-71, Jan. 2012.
- [13] PALZA, H., ESCOBAR, B., BEJARANO, J., et al., “Designing antimicrobial bioactive glass materials with embedded metal ions synthesized by the sol-gel method”, *Materials Science and Engineering*, v. 33, pp. 3795–3801, May. 2013.
- [14] MARINI, M., BONDI, M., ISEPPI, R., et al., “Preparation and antibacterial activity of hybrid materials containing quaternary ammonium salts via sol-gel process”, *European Polymer Journal*, v. 43, pp. 3621-3628, Jun. 2007.
- [15] BELLOTTI, N., SALVATORE, L., DEYÁ, C., et al., “The application of bioactive compounds from the food industry to control mold growth in indoor waterborne coatings”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 104, pp. 140 -144, nov. 2013.
- [16] VAGUI, E., SIMÁNDI, B., SUHAJDA, Á., et al., “Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide”, *Food research international* , v. 38, pp. 51-57. Jul. 2005.
- [17] PITT, J. I., HOCKING, A. D., *Fungi and food Spoilage*, 3 ed., New York, Springer, 2009.
- [18] CONSTANTINE, A., CHARLES, M., *Introducción a la micología*, 1 ed., Barcelona, OMEGA, 1985.
- [19] LIVAGE, J., “Sol-gel processes”, *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, v.2, n.2, pp. 132-136, Apr. 1997
- [20] POPA, A., SASCA, V., KISS, E.E., et al., “Studies in structural characterization of silica-HPA composites prepared by sol-gel method”, *Materials Chemistry and Physics*, v. 119 pp. 465–470, 2010

- [21] ROMANELLI, G., VAZQUEZ, P., PIZZIO, L., et al., “Phenol tetrahydropyranylation catalyzed by silica-alumina supported heteropolyacids with Keggin structure”, *Applied Catalysis A: General*, v. 261, pp. 163-170, 2004.
- [22] KRIHAK, M., SHAHRIARI, M.R., “The effect of MTMS on the optical properties synthesized gels doped with thionin”, *Optical Materials*, v. 5, pp. 301-310, Nov. 1996.
- [23] SOARES, C.M.F., SANTOS, O.A., OLIVO, J.E., et al., “Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol–gel encapsulated lipase activity”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 29, pp. 69–79, Apr. 2004.
- [24] RAI, A., YADAV, A., GADE, A., “Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials”, *Biotechnology Advances*, v. 27, n.1, pp. 76–83, Feb. 2009.
- [25] MORITZ, M., GESZKE-MORITZ, M., “The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. Review”, *Chemical Engineering Journal*, v. 228, pp. 596–613, 2013.
- [26] KHAN, S.T., AHAMED, M., AL-KHEDHAIRY, A., et al., “Biocidal effect of copper and zinc oxide nanoparticles on human oral microbiome and biofilm formation”, *Material Letters*, v. 97, pp. 67-70, 2013.