



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ZINC Y MAGNESIO POR VÍA
HIDROTÉRMAL Y CO-PRECIPITACIÓN Y SU EVALUACIÓN
ANTIFÚNGICA SOBRE HONGOS CAUSANTES DE BIODETERIORO DEL
PATRIMONIO CULTURAL PÉTREO.**

TESIS

Para optar por el título de:

Licenciado en Biología

PRESENTA:

GONZÁLEZ NÚÑEZ GIBRAN DARVEY

DIRECTORES:

DRA. SUSANA DEL CARMEN DE LA ROSA GARCÍA

DR. PABLO GENARO MARTÍNEZ TORRES

Villahermosa, Tabasco

Enero, 2019

Universidad Veracruzana Autónoma de Tabasco.

Síntesis De Nanopartículas De Zinc Y Magnesio Por Vía Hidrotérmal Y Co- Precipitación Y Su Evaluación Antifúngica Sobre Hongos Causantes De Biodeterioro Del Patrimonio Cultural Pétreo

Por Gibran Darvey Gonzalez Nuñez

CANTIDAD DE PALABRAS 16501

HORA DE ENTREGA

01-JUL-2025 08:27A. M.

NÚMERO DE
IDENTIFICACIÓN DEL
TRABAJO

117014991

Síntesis De Nanopartículas De Zinc Y Magnesio Por Vía Hidrotérmal Y Co-Precipitación Y Su Evaluación Antifúngica Sobre Hongos Causantes De Biodeterioro Del Patrimonio Cultural Pétreo

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.esapa.org Internet	109 palabras — 1%
2	eprints.uanl.mx Internet	108 palabras — 1%
3	repositorioinstitucional.buap.mx Internet	85 palabras — 1%
4	hdl.handle.net Internet	80 palabras — 1%
5	pt.scribd.com Internet	73 palabras — 1%
6	es.scribd.com Internet	72 palabras — 1%
7	Hafedh Hajlaoui, Soumaya Arraouadi, Emira Noumi, Kaïss Aouadi, Mohd Adnan, Mushtaq Ahmad Khan, Adel Kadri, Mejdi Snoussi. "Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Acetylcholinesterase, Antidiabetic, and Pharmacokinetic Properties of Carum carvi L. and Coriandrum sativum L. Essential Oils Alone and in Combination", Molecules, 2021 Crossref	64 palabras — < 1%

8	www.aranzadi-zientziak.org Internet	53 palabras — < 1%
9	core.ac.uk Internet	51 palabras — < 1%
10	biblioteca.cio.mx Internet	47 palabras — < 1%
11	bdigital.unal.edu.co Internet	42 palabras — < 1%
12	up-rid.up.ac.pa Internet	41 palabras — < 1%
13	tesis.ipn.mx Internet	33 palabras — < 1%
14	digibuo.uniovi.es Internet	29 palabras — < 1%
15	es.slideshare.net Internet	25 palabras — < 1%
16	"Consolidantes para soportes pétreos con manifestaciones de Arte Rupestre en la Comunidad Valenciana. Análisis práctico en Cova Remígia (Barranc de Gassulla-Ares del Mestre)", 'Universitat Politècnica de Valencia' Internet	23 palabras — < 1%
17	O. Balocchi L., J. Caballero V., R. Smith R.. "CARACTERIZACIÓN Y VARIABILIDAD AGRONÓMICA DE 125 ECOTIPOS DE <i>Bromus valdivianus</i> Phil. RECOLECTADOS EN LA PROVINCIA DE VALDIVIA", Agro Sur, 2001 Crossref	23 palabras — < 1%

18	Instan Ballesteros, Alvaro A. "Comparative study of aluminum nitride thin films grown by pulsed DC sputtering ", Proquest, 20111108 ProQuest	21 palabras — < 1%
19	www.coursehero.com Internet	19 palabras — < 1%
20	www.scielo.org.mx Internet	18 palabras — < 1%
21	ri.uaq.mx Internet	17 palabras — < 1%
22	www.researchgate.net Internet	17 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS ACTIVADO
EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES DESACTIVADO
EXCLUIR COINCIDENCIAS < 15 PALABRAS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCION

ENERO 21 DE 2019

C. GIBRAN DARVEY GONZÁLEZ NÚÑEZ
PAS. DE LA LIC. EN BIOLOGIA
PRESENTE

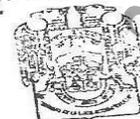
En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tests denominado: **"SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ZINC Y MAGNESIO POR VÍA HIDROTÉRMAL Y CO-PRECIPITACIÓN Y SU EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA SOBRE HONGOS CAUSANTES DE BIODETERIORO DEL PATRIMONIO CULTURAL PÉTREO"**, asesorado por la Dra. Susana del Carmen de la Rosa García y Dr. Pablo Genaro Martínez Torres sobre el cual sustentará su examen profesional, cuyo jurado está integrado por el Gabriel Núñez Nogueira, Dr. Magdiel Torres de la Cruz, Dra. Susana del Carmen de la Rosa García, Dra. Susana Camarillo Coop y Dra. Silvia Cappello García.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

M. EN C. ROSA MARTHA PADRÓN LÓPEZ
DIRECTORA

C.c.p.- Expediente del Alumno.
Archivo.

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis denominado: **“SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ZINC Y MAGNESIO POR VÍA HIDROTÉRMAL Y CO-PRECIPITACIÓN Y SU EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA SOBRE HONGOS CAUSANTES DE BIODETERIORO DEL PATRIMONIO CULTURAL PÉTREO”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 21 de Enero de 2019.

AUTORIZO



GIBRAN DARVEY GONZÁLEZ NÚÑEZ

DEDICATORIA

A mi madre Yanet del Pilar Núñez Bernal por su paciencia, consejos, apoyo, por creer en mí y darme las herramientas necesarias para mi formación académica y personal, también por su gran esfuerzo y motivaciones para que saliera adelante.

Al Sr. Antonio Sánchez Bermea por los consejos que me ha brindado para beneficio de mi persona.

A mi padre José Ernesto González Hernández por permitirme iniciar mi carrera profesional.

A la Dra. Susana de la Rosa García por su apoyo, comprensión y gran paciencia para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Susana de la Rosa García por haberme dado la oportunidad de trabajar bajo su asesoría y depositar su confianza en mí para la realización de este trabajo, y permitirme así concluir mis estudios de licenciatura. Le agradezco toda la paciencia y el apoyo que me ha brindado.

Al Dr. Pablo Genaro Martínez Torres por la oportunidad brindada de trabajar bajo su asesoría y por los conocimientos aportados para la realización de este trabajo en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

A mi Sinodales, Dr Gabriel Núñez Nogueira, Magdiel Torres de la Cruz, Susana Camarillo Coop y Silvia Cappello García, por su paciencia y valiosa asesoría en las revisiones y correcciones para el enriquecimiento de este trabajo.

A Yaremy Sánchez Román y Ana Lizbeth Hernández Prudencio por su apoyo y amabilidad para enseñarme la utilización de las técnicas empleadas en este trabajo.

A mis compañeros y amigos por su gran apoyo en la escuela, en especial a Carlos Alberto Leyva Trinidad, Evy Gerardo Rico Velasco, Kiara Lizbeth Arévalo Perez, Jessica Cruz Álvarez y Ana Lizbeth Hernández por su confianza, amistad y sobre todo la motivación para culminar este proyecto.

RESUMEN

La nanotecnología aplicada para la conservación del patrimonio cultural aporta diversas posibilidades para diseñar y desarrollar nuevos productos consolidantes y protectores altamente compatibles con el material a tratar; ya que la escala nanométrica de las nanopartículas (NPs), les permite interactuar con los microorganismos que colonizan la superficie de los diferentes materiales pétreos, principalmente los hongos. En ese sentido, los óxidos metálicos de magnesio (MgO) y zinc (ZnO) son nanomateriales altamente compatibles para la protección del patrimonio pétreo. Por lo tanto, en este trabajo se evaluaron 15 NPs, 6 sintetizadas vía hidrotérmal y 9 por co-precipitación, contra cuatro hongos con capacidad biodeteriorante (*Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum*, *Pestalotiopsis maculans* y *Phoma eupyrena*) obteniendo la concentración mínima fungicida (CMF) por la técnica de microdilución. Las NPs fueron caracterizadas por Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Las NPs de ZnO mostraron mayor actividad antifúngica independientemente del tipo de síntesis con una CMF de 70 a 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con acción fungicida predominante y una relación de mayor actividad antifúngica con morfología de prismas irregulares y barras. En contraste, para las NPs de MgO se requiere una mayor CMF (156 a 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y algunas de ellas solo presentaron un efecto fungistático sobre los hongos, y sin inhibir al hongo *P. eupyrena*. Concluyendo que la actividad antifúngica de las NPs está más involucradas parcialmente a su morfología que tamaño. Por tanto, estas NPs pueden ser una alternativa viable para los recubrimientos y protección del patrimonio cultural edificado.

Palabras clave: Biodeterioro, Nanopartículas, MgO, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, ZnO, $\text{Zn}(\text{OH})_2$, Antifúngicos.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Nanotecnología	4
3.1.2 Clasificación de las nanopartículas	4
3.2 Métodos para la síntesis de nanopartículas	5
3.2.1 Síntesis hidrotermal	5
3.2.2 Síntesis de co-precipitación	6
3.2.3 Ventajas y desventajas de los métodos de síntesis de nanopartículas ...	6
3.3 Nanopartículas de óxido de zinc	7
3.4 Nanopartículas de óxido de magnesio	7
3.5. Actividad biológica de las nanopartículas	8
3.6 Actividad biológica de ZnO y MgO	9
3.6 Patrimonio cultural	10
3.7 Biodeterioro	10
3.8 Hongos y su papel en el biodeterioro	12
4. OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo general	14
4.2 Objetivos específicos	14
5. DIAGRAMA EXPERIMENTAL	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1 Síntesis de las nanopartículas	16
6.1.1 Método de co-precipitación	16

6.2 Método hidrotermal.....	16
6.2.1 Síntesis de nanopartículas metálicas de óxido e hidróxido de ZnO y MgO	16
6.3 Caracterización estructural y morfológica de las nanopartículas	17
6.3.1 Difracción de rayos X	17
6.3.2 Caracterización por microscopia electrónica de barrido (MEB)	18
6.3.2.1 Procesamiento de muestras para microscopia electrónica de barrido	18
6.4 Modelos fúngicos.....	18
6.4.1 Obtención de inóculos fúngicos	19
6.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución.....	19
6.5.1 Ensayo de microdilución.....	19
6.6 Determinación del modo de acción antifúngica	20
6.6.1 Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF)	20
6.7 Análisis estadístico.....	20
7. RESULTADO Y DISCUSION.....	21
7.1. Síntesis de NPs metálicas de óxido e hidróxido de ZnO y MgO.....	21
7.1.1 Caracterización de la síntesis por difracción de rayos X.....	21
7.1.2 Análisis del tamaño del cristalito por difracción de rayos X.....	22
7.2 Caracterización por microscopía electrónica de barrido (MEB)	24
7.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), Fungicida (CMF) y el modo de acción de las nanopartículas.....	27
7.3.1 Actividad del Óxido de ZnO	28
7.3.1 Actividad del nitrato de hidróxido de Zinc	31
7.3.1 Actividad del óxido de magnesio	32

7.3.1 Actividad del hidróxido de magnesio	33
7.4 Relación del tamaño y forma de las NPs con la actividad antifúngica.	38
9. CONCLUSIÓN	42
8. Referencias bibliográficas.....	44

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos químicos para la obtención de nanopartículas.....	6
Tabla 2. Actividad antifúngica reportada para diferentes tamaños de nanopartículas de óxido de zinc y magnesio.....	10
Tabla 3. Condiciones para la obtención de NPs por el método hidrotérmico y co-precipitación y tamaño del cristalito obtenido.....	24
Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI), Concentración mínima fungicida (CMF) en $\mu\text{g/mL}$ y modo de acción (MA) de las NPs de ZnO obtenidas por los métodos de co-precipitación (verde) e hidrotermal (azul) contra los cuatro hongos biodeteriorantes.....	28
Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI), Concentración mínima fungicida (CMF) en $\mu\text{g/mL}$ y modo de acción (MA) de las NPs de $\text{Zn}_5(\text{OH})_8(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ obtenidas por los métodos de co-precipitación (verde) e hidrotermal (azul) contra los cuatro hongos biodeteriorantes.....	31
Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI), Concentración mínima fungicida (CMF) en $\mu\text{g/mL}$ y modo de acción (MA) de de las NPs de MgO obtenidas por los métodos hidrotermal contra cuatro hongos biodeteriorantes.....	32
Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria (CMI), Concentración mínima fungicida (CMF) en $\mu\text{g/mL}$ y modo de acción (MA) de las NPs de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ obtenidas por los métodos de co-precipitación (verde) e hidrotermal (azul) contra cuatro los hongos biodeteriorantes.....	34
Tabla 8. Determinación del tamaño del cristalito, morfología, y CMF de las diferentes NPs ZnO obtenidos vía co-precipitación e hidrotermal.....	38
Tabla 9. Determinación del tamaño del cristalito, morfología, las CMF de las diferentes muestras de NPs de nitrato de hidróxido de zinc obtenidos vía co-precipitación e hidrotermal.....	40
Tabla 10. Determinación del tamaño del cristalito, morfología, las CMF de las diferentes muestras de NPs de óxido de magnesio obtenidas vía Co-precipitación.....	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismos propuestos de la actividad bactericida causado por diferentes óxidos metálicos nanoestructurados. Tomado de Vazquez-Olmos et al., 2018 Imagen diseñada con base en Lemire <i>et al.</i> , 2013; Stankinc <i>et al.</i> , 2016; Hemeg, 2017; Raghunath <i>et al.</i> , 2017; Wang <i>et al.</i> , 2017).	9
Figura 2 Patrones de difracción de rayos X representativos de las nanopartículas sintetizadas	22
Figura 3 Determinación del tamaño del cristalito, el diámetro promedio y morfología de las NPs de ZnO y $Zn_5(OH)_8(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$ sintetizadas vía hidrotermal.	25
Figura 4 Determinación del tamaño del cristalito, el diámetro promedio y morfología de las Nps de ZnO , Zn(OH) y MgO sintetizadas vía co-precipitación. 26	
Figura 5 Distribución de la actividad antifúngica contra los cuatro modelos fúngicos biodeteriorantes evaluados de las diferentes NPs sintetizadas por lo métodos hidrotermal y co-precipitación.....	27
Figura 6 Actividad mostrada por las NPs de ZnO obtenidas A) Síntesis co-precipitación, B) síntesis hidrotermal. Las líneas roja a la izquierda indica la CMI y las de la derecha la CMF.....	29
Figura 7 Actividad mostrada por las NPs de nitrato de hidróxido de zinc obtenidas A) co-precipitación, B) vía hidrotermal. Las líneas roja a la izquierda indica la CMI y las de la derecha la CMF.....	31
Figura 8 Actividad mostrada por las NPs de MgO obtenidas vía co-precipitación. Las líneas roja a la izquierda indica la CMI y las de la derecha la CMF.....	33
Figura 9 Actividad mostrada por las NPs de $Mg(OH)_2$ obtenidas A) co-precipitación, B) vía hidrotermal. Las líneas roja y azul a la izquierda indica la CMI y las de la derecha la CMF.....	34
Figura 10 Dendrograma de similitud de la actividad antifúngica de las diferentes Nps sintetizadas por los métodos hidrotermal y co-precipitación para los diferentes hongos evaluados. Utilizando el método de distancia euclidiana.....	37

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, un problema latente en la conservación de los monumentos históricos, es el crecimiento de una gran diversidad de microorganismos que conforman comunidades microbianas altamente estructuradas (Mansch y Bock, 1998). Los organismos fotótrofos son los primeros colonizadores y proporcionan la materia orgánica que sostiene el crecimiento de otros microorganismos heterótrofos como las bacterias y hongos (Warscheid y Braams, 2000)

Las comunidades microbianas forman biopelículas complejas de diversos colores que ocasionan el daño estético a los monumentos históricos. Si bien, es cierto que este daño aporta la apariencia de antiguo, debido a los productos metabólicos como los ácidos orgánicos que biomineralizan la roca, ocasionándoles alteraciones físicas y químicas (Gadd y Dyer, 2017) lo cual es denominado como biodeterioro. Particularmente, los hongos ejercen un mayor efecto debido a la intrusión física o penetración de sus hifas en la estructura de la roca, causando una desestabilización de su textura (May *et al.*, 1993, Dakal y Cameotra, 2012).

Ante la problemática del biodeterioro, la aplicación de la nanotecnología en la conservación del patrimonio pétreo, aporta diversas posibilidades para diseñar y desarrollar nuevos productos consolidantes y protectores altamente compatibles con el material a tratar, ya que no introduce componentes químicos diferentes al sustrato original; como ocurre, con el uso de polímeros sintéticos (Sierra-Fernández *et al.*, 2014). Las nanopartículas (NPs) más utilizadas son los hidróxidos; debido a la estructura cristalina de estos materiales, los cuales se han convertido en la principal estrategia para tratar la restauración y conservación de los materiales pétreos. Entre ellos, los más comunes son los hidróxidos de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$, de magnesio $\text{Mg}(\text{OH})_2$ y los de estroncio $\text{Sr}(\text{OH})_2$ (Gómez-Villalba *et al.*, 2010).

La escala nanométrica de las nanopartículas, permite la penetración más efectiva en los microorganismos que colonizan la superficie de los diferentes materiales pétreos. Los mecanismos por los que las NPs inhiben a los microorganismos son diversos e incluyen, la producción fotocatalítica de especies reactivas de oxígeno (ERO), producidas en respuestas a la presencia de NPs de TiO_2 y ZnO , la compresión de la envoltura celular bacteriana e interrupción de la transducción de energía ejercida por nanotubos de carbono, ZnO y NPs de plata, y la inhibición de la actividad enzimática y síntesis de ADN ocasionada por las NPs de quitosano (Li *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012).

Los métodos para la obtención de NPs son muy diversos; tres métodos de síntesis destacan por sus grandes cualidades: método sol-gel, síntesis hidrotermal y co-precipitación. El método sol-gel permite la formación de NPs de estructura y tamaño muy homogéneas; la síntesis hidrotermal produce estructuras cúbicas con gran actividad biológica (Stankic *et al.*, 2016), y el método de co-precipitación el cual genera NPs muy homogéneas, es fácil y económico, lo que permite la producción a gran escala de las NPs.

A pesar de la gran variedad de NPs que se producen, la mayoría de los estudios están dedicados a evaluar su actividad antibacteriana y son escasos los estudios que reportan el potencial antifúngico de estos nanomateriales. Particularmente, Sierra-Fernández *et al.* (2017), han demostrado que NPs de MgO y ZnO , y su combinación (MgO/ZnO), obtenidas vía síntesis sol-gel, presentan excelente actividad antifúngica contra dos hongos altamente biodeteriorantes: *A. niger* y *P. oxalicum*. Sin embargo, no hay reportes en la literatura de la actividad antifúngica de NPs de hidróxidos y óxidos de zinc y magnesio, obtenidos por el método hidrotermal y co-precipitación

2. JUSTIFICACIÓN

El patrimonio cultural es el legado más importante en una civilización, que está permanentemente expuesto a una gran diversidad de microorganismos, principalmente a los hongos, bacterias y algas; estos microorganismos colonizan la superficie de los distintos materiales pétreos de origen natural o artificial, causando un cambio estético denominado biodeterioro, el cual es considerado uno de los principales procesos de degradación del patrimonio construido debido al daño profundo ocasionado a la roca.

Los tratamientos más comunes son la limpieza y desinfección de las superficies porosas con productos químicos y el empleo de recubrimientos orgánicos o inorgánicos con propiedades antimicrobianas. Pero los biocidas que se utilizan tradicionalmente no promueven una protección a largo plazo y se necesitan de repetidas limpiezas y aplicaciones, lo que incrementa notablemente los costos de mantenimiento, además de la toxicidad de los productos empleados.

Es por ello que la nanotecnología puede brindar una alternativa más efectiva y menos costosa, al ser utilizada para la producción de nanomateriales con actividad antifúngica. Los nanomateriales son generados a niveles nanométricos con propiedades ópticas, químicas, físicas, significativamente más eficiente que sus respectivos homólogos a mayor escala. La reducción en el tamaño de partícula, permite una mejor penetración de las NPs al interior de los materiales pétreos dañados, favoreciendo con ello considerablemente su efectividad.

En la actualidad, existe una gran diversidad de metodológicas de síntesis; sin embargo el método hidrotermal y co-precipitación ofrecen grandes ventajas con respecto a otras, con mayor relevancia; debido a la homogeneidad en el tamaño y forma de las NPs producidas como resultado de la temperatura de síntesis y calcinación. En ese sentido, los óxidos metálicos de magnesio (MgO) y zinc (ZnO) son nanomateriales altamente compatibles y con actividad antifúngica que pueden ser utilizados para la protección del patrimonio pétreo.

3. ANTECEDENTES

3.1 Nanotecnología

El término nanotecnología fue acuñado por Norio Taniguchi en 1974, para describir con precisión los biomateriales industrializados a nivel nanométrico (Taniguchi, 1974). Posteriormente se amplió el concepto donde la nanotecnología comprende el estudio y las técnicas en las que se estudia, manipula y se obtiene de manera controlada: materiales, sustancias y dispositivos de reducida dimensiones a escala nanométrica (Villareal, 2005)

El desarrollo de la nanotecnología tiene un gran potencial en diversas aplicaciones, ya que moderniza distintas áreas tales como: la alimentaria, textil, la medicina, química, tecnologías de información y energética; prometiendo crear y manipular nuevos materiales a escala nanométrica (Almendares-Camarillo y González-Calderón, 2011).

3.1.2 Clasificación de las nanopartículas

Los nanomateriales se clasifican en cuatro clases generales, de acuerdo con EPA (2004), citado por Delgado (2006):

1.-Materiales de base de carbón: Estos nanomateriales están compuestos principalmente por carbono y suelen adoptar formas como esferas huecas, elipsoides o tubos. Los nanomateriales de carbono con forma elipsoidal o esférica se conocen como fullerenos, mientras que los cilíndricos reciben el nombre de nanotubos.

2.- Materiales de base metálica: Como su nombre lo indica, se encuentran constituidos por cualquier material metálico, como ejemplo las nanopartículas de oro, plata o de metales reactivos como el dióxido de titanio, entre otras.

3.-Dendrímeros: Polímeros nanométricos construidos a modo de árbol, en el que las ramas crecen a partir de otras y así sucesivamente. Las terminaciones de cada cadena de ramas pueden diseñarse para ejecutar funciones químicas específicas

(una propiedad útil para los procesos catalíticos); además, dado que tienen cavidades internas, su uso médico para la “entrega de droga” es factible, lo mismo sucede con el caso de algunas estructuras de carbón y metálicas.

4.-Compósitos: Combinan ciertas NPs con otras o con materiales de mayor dimensión. Las arcillas nanoestructuradas son ejemplo de uso extendido para la fabricación de diversos productos como autopartes.

3.2 Métodos para la síntesis de nanopartículas

Los métodos de síntesis para la obtención de NPs están divididos en dos categorías conocidas como *top-down* (de arriba abajo) y *bottom-up* (de abajo arriba). Los métodos *top-down* son aquellos que reducen el tamaño de agregación del material hasta llegar a un tamaño nanométrico con un consumo considerable de energía, utilizando métodos físicos y de molienda. Mientras que los métodos *bottom-up* involucran la obtención de un estado de agregación nanométrico, partiendo de una dispersión molecular (Gómez, 2013).

El método *bottom-up* es el más conveniente para la obtención de NPs uniformes y pequeñas. Los métodos más reportados en la literatura son el método coloidal, reducción fotoquímica y radioquímica, irradiación con microondas, utilización de dendrímeros, hidrotermal, sol-gel y co-precipitación (Zanella, 2012).

3.2.1 Síntesis hidrotermal

La síntesis solvotermal o hidrotermal se refiere a reacciones heterogéneas en medio acuoso por encima de los 100 °C a 1 bar de presión. El objetivo de esta técnica es lograr una mejor disolución de los componentes de un sistema y así se logran disolver o hacer reaccionar especies muy poco solubles en condiciones habituales, por ejemplo el sílice, aluminosilicatos, titanatos, sulfuros, entre otros (Xie y Shang, 2007).

3.2.2 Síntesis de co-precipitación

La co-precipitación consiste en una reacción, en la cual, en el matraz de reacción se encuentra la solución que se desea reaccionar con grupos hidróxidos (ej, NaOH, KOH); los carbonatos o las bases de retardo como la urea que caen al matraz mediante goteo y al reaccionar forma un precipitado del producto deseado (Zanella, 2002). Durante la reacción se obtiene un aumento gradual y homogéneo del pH de la solución en la cual se lleva a cabo la reacción.

3.2.3 Ventajas y desventajas de los métodos de síntesis de nanopartículas

Los métodos de producción de NPs metálicas por métodos químicos más reportados son: co-precipitación, depósito químico en fase de vapor, sol-gel, micro-emulsión e hidrotérmica. Cada uno de estos métodos presenta sus ventajas y desventajas, como se resume en la tabla 1.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos químicos para la obtención de nanopartículas

Método	Ventajas	Desventajas	Referencias
Co-precipitación	<ul style="list-style-type: none"> El tamaño y composición fáciles de controlar. Modificación de la superficie de las partículas. Alta producción. 	<ul style="list-style-type: none"> Fácil contaminación del material. Las variables no se controlan. Heterogeneidad del tamaño. 	Parak <i>et al.</i> , 2003
Depósito químico en fase de vapor	<ul style="list-style-type: none"> Materiales altamente densos y puros Producción de películas uniformes. Control de la estructura cristalina, morfología y orientación. 	<ul style="list-style-type: none"> Uso de reactores y sistema de vacío sofisticado. Dificultad de procesamiento. Manejo de productos químicos tóxicos. 	Gómez-Aleixandre <i>et al.</i> , 2003
Micro-emulsión	<ul style="list-style-type: none"> Distribución de tamaño homogéneo Fácil control del tamaño y forma de la nanoestructura. 	<ul style="list-style-type: none"> Mala cristalinidad. Baja producción. 	Helen <i>et al.</i> , 2007
Hidrotermal	<ul style="list-style-type: none"> Formación de fases cristalinas estables en el punto de fusión. Es adecuado para el crecimiento de grandes cristales de buena calidad, Manteniendo un buen control sobre su composición. 	<ul style="list-style-type: none"> Requiere de autoclaves caras. No se observa el crecimiento del cristal. 	Yao e Yu, 2007; Byrappa e Yoshimura, 2013
Sol-gel	<ul style="list-style-type: none"> Alta pureza, uniforme y reproducible Control de la composición. Mezcla homogénea. Alta reactividad de las partículas, (amorfa o cristalina). 	<ul style="list-style-type: none"> Alto costo de los alcóxidos. Tiempo prolongado. Manejo de productos tóxicos. 	Mehrotra, 1988 Yamane <i>et al.</i> , 1997 Livage <i>et al.</i> , 1998

3.3 Nanopartículas de óxido de zinc

Las nanoestructuras de ZnO están a la vanguardia de las investigaciones debido a sus propiedades únicas y sus amplias aplicaciones industriales. Actualmente son empleadas para la liberación controlada de medicamentos, ingredientes cosméticos y materiales médicos (Zhou *et al.*, 2006; Huh y Kwon, 2011). En este sentido, se han reportado las propiedades antibacterianas de amplio espectro del ZnO con baja o selectiva toxicidad, dada su naturaleza bio-compatibile, cada vez se usan más como agentes antimicrobianos (Azam *et al.*, 2012).

La actividad biológica de ZnO es producida por sus características microestructurales, tales como su morfología, cristalinidad y su composición química, que depende del tratamiento térmico sometido. Frecuentemente se obtienen tamaños de entre 5-90 nm (Pérez-Taborda, 2008), por lo que el efecto sobre el tamaño de las NPs ha generado mucha atención y cada vez hay más estudios dirigidos a su modificación, en la búsqueda de potenciar su actividad biológica (Jáuregui *et al.*, 2011).

3.4 Nanopartículas de óxido de magnesio

Óxidos metálicos como el TiO₂, ZnO, MgO y CaO son de particular interés, debido a su estabilidad química y por considerarse seguras para los humanos y animales (Stoimenov *et al.*, 2002). En la medicina, el MgO se utiliza para el alivio de la acidez estomacal, dolor de estómago, y para la regeneración ósea (Bertinetti *et al.*, 2009; Martínez-Boubeta *et al.*, 2010). Las NPs de MgO también se han documentado para su aplicación en el tratamiento de tumores (Di *et al.*, 2012) y como un agente antibacteriano. Esas propiedades se han potencializando en su forma de polvo a nivel nanométrico. El óxido de magnesio como un agente antibacteriano inorgánico tiene alta resistencia al calor y buena estabilidad. Al mismo tiempo, debido a que hay un gran número de defectos presentes en la superficie de MgO, este puede absorber algunos agentes antibacterianos iónicos-orgánicos o puramente orgánicos para formar un material antibacteriano compuesto con una estabilidad térmica mejorada (Cui *et al.*, 2015). El óxido de

magnesio a escala nanométrica inhibe actividad bacteriana de forma eficiente contra bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, pero también contra esporas fúngicas y virus (Beyth *et al.*, 2015). Comparado con otras NPs metálicas, las NPs de MgO tienen la ventaja de que pueden prepararse a partir de precursores económicos.

Muchos métodos, incluyendo el método sol-gel, método hidrotermal, coprecipitación, métodos mecano-químicos, método de microemulsión, entre otros, se han utilizado para la preparación de NPs de MgO. La morfología y tamaños de las NPs de MgO pueden controlarse ajustando las condiciones de procesamiento (Kumar y Kumar, 2008; Tang y Lv, 2014).

3.5. Actividad biológica de las nanopartículas

La capacidad antimicrobiana de las NPs en gran parte depende del tamaño, la estabilidad de las NPs, y de su concentración en el medio de cultivo donde crecen los microorganismos. Las poblaciones microbianas son inhibidas por la íntima interacción de las NPs (Raghupati, *et al.*, 2011), ya que el tamaño de la célula bacteriana está en un nivel de micrómetros, mientras que sus membranas celulares exteriores tienen poros en el rango nanométrico (Padmavathy y Vijayaraghavan, 2008), por lo que la eficiencia para atravesar la membrana es muy alta.

Diversos estudios han indicado que el mecanismo antibacteriano de las NPs de MgO y ZnO se debe a la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO), tales como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), (Yamamoto *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2005a, 2005b, Lin *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2010; Lemire *et al.*, 2013; Stankinc *et al.*, 2016; Hemeg, 2017; Raghunath *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). Debido al aumento de la superficie de las partículas, las NPs de óxido metálicos conducen a un aumento de la concentración de O_2 que destruye eficientemente la pared celular de las bacterias, causando daño en la síntesis de proteína y del ADN, lo que conlleva a la supresión de la división celular •

(Fig. 1). Sin embargo, cuando el tamaño de partícula de los óxidos metálicos es inferior a 15 nm, el efecto de agregación se vuelve muy significativo debido a la alta energía superficial de las partículas, esto causa la muerte celular, debido a la inhibición de la cadena de transporte de electrones que produce el ATP; vía oxidación fosforilativa (Raghunath *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

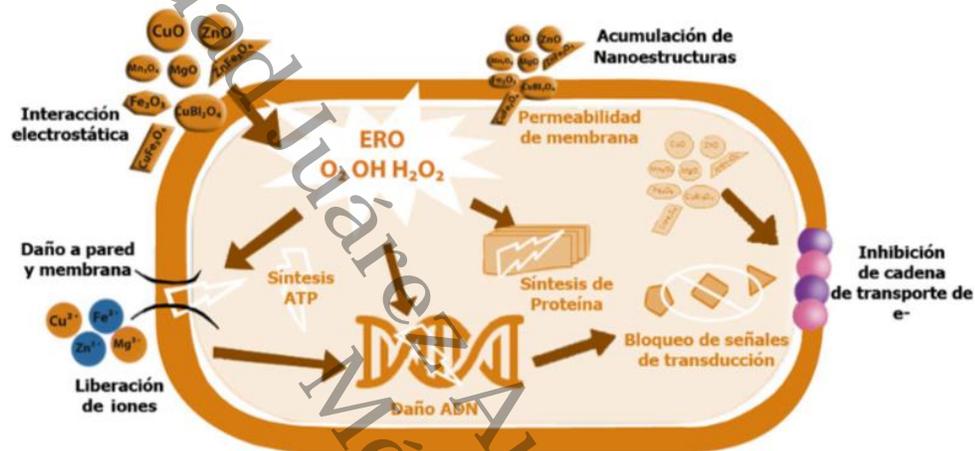


Figura 1. Mecanismos propuestos de la actividad bactericida causado por diferentes óxidos metálicos nanoestructurados. Tomado de Vazquez-Olmos *et al.*, 2018. Imagen diseñada con base en Lemire *et al.*, 2013; Stankinc *et al.*, 2016; Hemeg, 2017; Raghunath *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

3.6 Actividad biológica de ZnO y MgO

Recientemente Kumar *et al.* (2016), han compilado la información de la actividad antibacteriana de NPs de ZnO obtenidas vía hidrotermal. Sin embargo, la actividad antifúngica por este método es poco reportada. Entre los pocos estudios, está el de Sierra-Fernandez *et al.* (2017), quienes reportaron la obtención de NPs mediante el método sol-gel, para ser usadas como recubrimientos antifúngicos de piedras dolomíticas y calcínicas, eficaces contra diferentes hongos biodeteriorantes como *A. niger*, *P. oxalicum*, *P. maculans* y *Paraconiothyrium* sp.

A continuación en la tabla 2 se presenta una recopilación de datos de trabajos en los que se han evaluado NPs de ZnO y MgO contra el hongo levaduriforme (*Candida albicans*) y diversos hongos filamentosos, es importante hacer notar que

son escasos los reportes sobre la actividad antifúngica contra los hongos involucrados en el biodeterioro.

Tabla 2. Actividad antifúngica reportada para diferentes tamaños de nanopartículas de óxido de zinc y magnesio.

NPs/Tamaño	Hongo	Concentración Mínima inhibitoria	Referencia
MgO 40 nm ZnO 20 nm	<i>Candida albicans</i>	>3200 µg/mL 200 µg/mL	Karimiyan <i>et al.</i> , 2015
ZnO 30 nm	<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>	200 µg/mL	Li <i>et al.</i> , 2017
ZnO 15-70 nm	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Penicillium expansum</i>	6 mM/L Fungicida	He <i>et al.</i> , 2011
ZnO 35 nm	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Candida albicans</i>	2.5 mg/mL 5 mg/mL	Gondal <i>et al.</i> , 2012
ZnO <100 nm	<i>Fusarium graminearum</i>	89 mg/mL	Dimkpa <i>et al.</i> , 2013
ZnO 65 nm	<i>Aspergillus niger</i> <i>Candida albicans</i>	12.5 µg/mL 6.5 µg	Singh y Nanda, 2013
ZnO 4-38 nm	<i>Candida albicans</i> <i>Malassezia pachydermatis</i>	200 µg/mL 200 µg/mL	Palanikumar <i>et al.</i> , 2012
ZnO 130 nm MgO y Mg _{1-x} Zn _x O 39 -52 nm	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium oxalicum</i> <i>Paraconiothyrium sp.</i> <i>Pestalotiopsis maculans</i>	1.25 mg/ml 0.625 mg/ml 1.25 mg/ml 5 mg/ml	Sierra-Fernández <i>et al.</i> , 2017

3.6 Patrimonio cultural

De acuerdo con Velasco (2009) "El patrimonio cultural es el conjunto de bienes, materiales e inmateriales, que son identificados por una sociedad concreta como portadores de valores culturales propios de la comunidad". En este sentido, el patrimonio cultural adquiere un significado especial cuando es considerado como uno de los recursos del territorio, susceptible de generar riqueza; discurso que aún resulta más valioso cuando éste se centra en las potencialidades de las regiones desfavorecidas (Caravana *et al.*, 1996).

3.7 Biodeterioro

Una definición ampliamente aceptada de biodeterioro fue propuesta por Hueck (2001) como: "cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material causado por las actividades vitales de los organismos". Proceso por el cual "los

agentes biológicos, es decir, los organismos vivos, son la causa de la disminución estructural de la calidad o del valor". Es importante distinguir entre biodeterioración y biodegradación, ya que pueden usarse erróneamente como iguales. De acuerdo con Allsopp *et al.* (2004), la biodegradación se refiere al uso de microorganismos para modificar materiales con un propósito positivo o útil, mientras que el biodeterioro refiere al impacto negativo de la actividad de los organismos vivos.

Existen otros factores que influyen significativamente en el grado del deterioro del patrimonio histórico cultural. Entre ellos cabe mencionar la humedad, la temperatura, las sales y el uso inadecuado de tratamientos para la conservación, como pueden ser la aplicación de algunos tipos de polímeros sintéticos (Fort, 2007; Giorgi *et al.*, 2010). Tanto las pinturas, como las piedras utilizadas en los monumentos, frecuentemente sufren procesos de deterioro debido a condiciones medioambientales agresivas (Baglioni y Giorgi, 2006).

Saiz-Jiménez (1997), menciona que la participación de los microorganismos en el biodeterioro puede deberse a diferentes mecanismos, tales como: 1) La presencia física de las células microbianas, que llegan a producir conexión y formar parte de un posible circuito electroquímico. 2) La producción de ácidos orgánicos (oxálico, acético, fumárico, glucónico,) e inorgánicos (sulfúrico, nítrico, carbónico), causando hidrólisis en los materiales y la producción de compuestos dañinos tras su combinación con el agua; formando así, sulfuro de hidrógeno, óxidos de nitrógeno, precipitando los sulfuros de la piedra y actuando como oxidantes/reductores. 3) Estrés salino, por los productos de reacción de los ácidos; aumentando la sensibilidad al congelamiento y permitiendo la formación de cristales en los poros internos de la piedra. 4) Producción de biopelículas y biodepósitos, por los exopolímeros, formando celdas de corrosión las cuales retienen agua en el interior de los poros de la roca, formando superficies hidrofóbicas las cuales reducen la eficiencia en el intercambio de calor y aumenta la presión. 5) Producción de enzimas extracelulares que producen la liberación de compuestos inorgánicos a moléculas solubles en agua. 6) La producción de

agentes quelantes, solubilizando sustancias hidrofóbicas o potencialmente insolubles.

3.8 Hongos y su papel en el biodeterioro

Los hongos son microorganismos heterótrofos y pueden colonizar numerosos sustratos por su amplia diversidad fisiológica y los diferentes mecanismos de dispersión de sus esporas, especialmente a través del aire (Madinga *et al.*, 2012). Pueden tener un mayor potencial deteriogénico que las bacterias, ya que producen y excretan concentraciones más altas de ácidos orgánicos (Palmer y Hirsch, 1991). Además, estos microorganismos pueden causar la biodegradación física de la roca mediante el crecimiento de redes de hifas a través del sistema espacial de poros (Urzi *et al.*, 2000). El desarrollo de los hongos exige un cierto grado de humedad, siendo ideal entre 50 y 98% de humedad relativa, de modo que la presencia de hongos se exagera en las superficies de las piedras situadas al nivel de suelo y en sitios donde hay infiltración del agua subterránea (Griffin y Koestler, 1991).

Los hongos también son agentes importantes del biodeterioro de la piedra, la madera, el yeso, el cemento, el hormigón y otros materiales de construcción y son componentes importantes de las comunidades microbianas que habitan en las rocas. Además, tienen un papel importante en la disolución mineral y la formación de minerales secundarios (Gadd, 2007).

El trabajo de Manley (1986) ya ha demostrado la participación de los hongos en el deterioro de los diferentes tipos de roca monumental, debido a la producción de diversos ácidos orgánicos tipo quelantes (láctico, oxálico o glucónico), así como la habilidad que tienen las hifas para penetrar la roca. De manera habitual, los hongos colonizan la roca, formando simbioses con algas (líquenes) responsables de la formación de estructuras denominadas “costras negras”, un aspecto habitual de la degradación en este tipo de rocas (Alava, 1995). Por otro lado, los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Cladosporium*, han sido reportados como los

principales microorganismos involucrados en el deterioro de las rocas calcita y dolomita, ya que son conocidos como productores de ácidos orgánicos (Koestler *et al.*, 1985; Gómez-Cornelio *et al.*, 2016).

Por lo anterior, el conocimiento de este tipo de deterioro cobra una gran importancia para la protección y restauración de monumentos históricos elaborados en roca. Su estudio permite actuar de modo específico y utilizar las técnicas y las NPs adecuadas para cada tipo de deterioro.

México.

4. OBJETIVOS

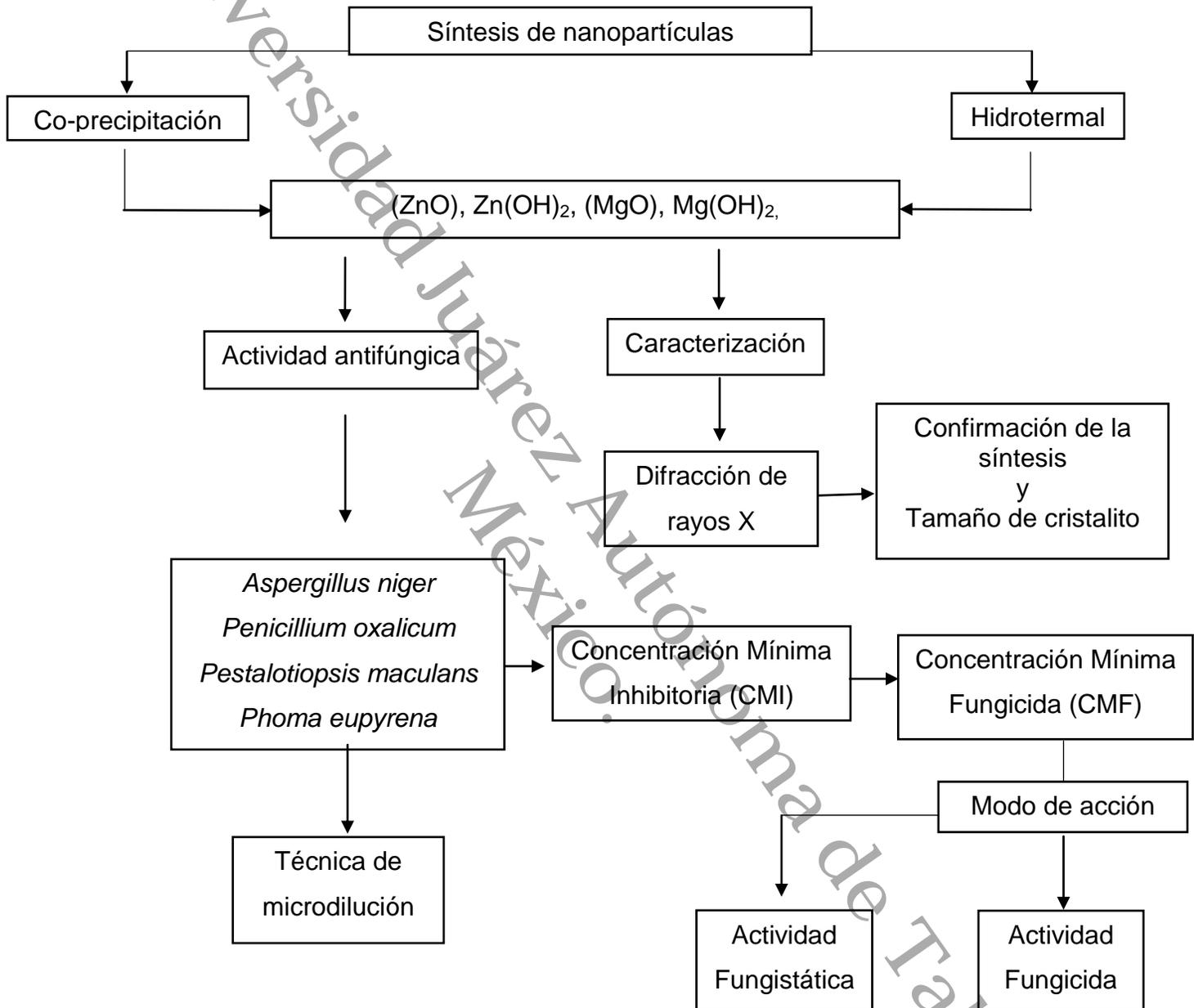
4.1 Objetivo general

Sintetizar nanopartículas de óxido e hidróxido de zinc y magnesio por los métodos hidrotermal y co-precipitación, y evaluar su capacidad antifúngica en diferentes hongos involucrados en el biodeterioro del material pétreo.

4.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de óxido e hidróxido de zinc y magnesio por el método hidrotermal.
- Sintetizar nanopartículas de óxido e hidróxido de zinc y magnesio por el método de co-precipitación.
- Evaluar la actividad antifúngica de nanopartículas de óxido e hidróxido de zinc y magnesio sintetizado por los métodos hidrotermal y co-precipitación sobre *Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum*, *Pestalotiopsis maculans* y *Phoma eupyrena*.
- Definir el modo de acción fungicida o fungistático de las nanopartículas de óxido e hidróxidos de zinc y magnesio sobre *Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum*, *Pestalotiopsis maculans* y *Phoma eupyrena*.

5. DIAGRAMA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Síntesis de las nanopartículas

6.1.1 Método de co-precipitación

6.1.1.1 Síntesis de NPs metálicas de óxido e hidróxido de ZnO y MgO

Se elaboraron soluciones de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, Aldrich 98%) con una concentración de 0.2 M en 100 mL de agua desionizada. La reacción se llevó a cabo manteniendo la temperatura de síntesis a temperatura ambiente, 60 °C y 70 °C, con agitación vigorosa. Una vez alcanzadas dichas condiciones, se añadió, gota a gota, 100 mL de solución 0.4 M de NaOH (Sigma, Aldrich 98%) por un tiempo aproximado de 2.5 h.

Después, las muestras se lavaron con etanol y centrifugaron a 3000 rpm por 10 min; este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente, las muestras se secaron en un horno a 50 °C durante un tiempo de 24 a 48 h, obteniéndose hidróxido de zinc e hidróxido de magnesio. Por último, las muestras se sometieron a una temperatura de 500 °C y 1000 °C durante 2 h con una rampa de calentamiento de 5 °C/min, para así obtener óxido de zinc y óxido de magnesio. Estas síntesis se realizaron de acuerdo con Tamilselve *et al.* (2013).

6.2 Método hidrotermal

6.2.1 Síntesis de nanopartículas metálicas de óxido e hidróxido de ZnO y MgO

Las muestras de ZnO y MgO se prepararon por el método hidrotérmico. Las NPs de ZnO se elaboraron a partir de una solución de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, Aldrich 98%) con una concentración de 0.2 M en 100 mL de agua desionizada, mientras que para el $\text{Mg}(\text{OH})_2$ se preparó con los mismos reactivos descritos en la sección 6.1.1.1 con una relación 1:1 a una concentración 0.2 M en 100 mL de agua desionizada. La reacción se llevó a cabo manteniendo la temperatura de síntesis a temperatura ambiente y 70 °C, con agitación vigorosa. Una vez alcanzadas dichas

condiciones, se añadió, gota a gota, 100 mL de una solución 0.4 M de NaOH (Aldrich 98%), por un tiempo aproximado de 2.5 h; Una vez mezcladas ambas soluciones, las muestras se sometieron a un tratamiento hidrotérmico que consistió en transferir la solución en una autoclave de digestión, sometiéndola a distintas temperaturas dentro de un rango de 100-160 °C por un periodo de 24 h.

Se prepararon diferentes muestras variando la temperatura de tratamiento hidrotérmico. Una muestra se trató a temperatura de 100 °C por un periodo de 24 h, la segunda muestra a 160 °C durante 24 h y la tercera muestra se sometieron a una temperatura de 100 °C por un periodo de 24 h y posteriormente se llevó a una temperatura de 160 °C durante 24 h. Al término de este procedimiento, las muestras se lavaron con etanol y centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min; este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente, las muestras se secaron en un horno a temperatura constante de 50 °C de 24 a 48 h, obteniéndose así óxido de zinc y óxido de magnesio (Corral-Aguado *et al.*, 2016).

6.3 Caracterización estructural y morfológica de las nanopartículas

Las NPs sintetizadas se caracterizaron mediante las técnicas de Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Estas técnicas permitieron conocer el tamaño de las NPs y la dispersión o estructura de los átomos que se aglomeran formando dichas NPs (Henriquez *et al.*, 2008; Villanueva *et al.*, 2009).

Los difractogramas se compararon con la base de datos del Joint Committee Diffraction Standart (JCPDS), para establecer las coincidencias con los patrones característicos de las nanopartículas sintetizadas.

6.3.1 Difracción de rayos X

La composición de la fase y de estructuras cristalográficas de las NPs de los óxidos metálicos, se analizaron usando un difractómetro de rayos X (Bruker D-8 advance), con una geometría de Bragg-Brentano y una radiación Cu-K α ($\lambda=1.5418$ Å) utilizando las siguientes condiciones: tamaño de paso = 0,02°, tiempo

de paso = 5 s, $5^\circ \leq 2\theta \leq 90^\circ$. El tamaño de cristalito (r), se calculó usando la ecuación de Scherrer.

$$d = \frac{0.9\lambda}{B \cos \theta}$$

Dónde:

d es el tamaño del cristalito, 0.9 el factor de Scherrer

λ La longitud de onda de los rayos X utilizados (1.5418×10^{-10} A)

B es el ensanchamiento del pico a la mitad de la intensidad máxima, después de restarle ensanchamiento del instrumento (B_{ins} es 2.9×10^{-3} radianes)

θ es el ángulo de Bragg.

6.3.2 Caracterización por microscopía electrónica de barrido (MEB)

6.3.2.1 Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de barrido

Las muestras verificadas por DRX se disolvieron en alcohol isopropílico y se sonicaron por 15 min. Posteriormente se depositaron en una película de carbono y se dejó evaporar el isopropanol en una parrilla de calentamiento a 60°C durante 1 h. La morfología y el tamaño de las NPs representativas para cada reacción se determinaron usando el microscopio electrónico de barrido (MEB, JEOL JSM-7600F). Para determinar el diámetro de las partículas, las imágenes fueron analizadas con la ayuda del software ImageJ.

6.4 Modelos fúngicos

En este estudio se probaron las propiedades antifúngicas de las NPs contra cuatro tipos de hongos por ocasionar la biomineralización y el biodeterioro estético de la piedra caliza: *Aspergillus niger* SG-174, *Penicillium oxalicum* SG-169, *Pestalotiopsis maculans* SG-756 que producen altas cantidades de ácidos oxálicos con un efecto biomineralizante; lo que contribuye al biodeterioro de la piedra, y *Phoma eupyrena* SG-83 que fue seleccionado por ocasionar un daño estético sobre la superficie del material pétreo debido a su alta pigmentación marrón oscuro (melanina) presente en su paredes celulares (Gómez-Cornelio *et al.*, 2016; De la Rosa-García *et al.*, 2018).

6.4.1 Obtención de inóculos fúngicos

Los hongos se cultivaron en cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA, Difco) y se incubaron a 28 °C de 4-14 días. El inóculo de cada hongo se obtuvo agregando solución salina isotónica (NaCl 0.85%) a la caja de Petri. La suspensión obtenida se contabilizó con ayuda de una cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración final de 5×10^5 esporas/mL, las cuales se utilizaron para realizar los ensayos.

6.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución

La técnica de microdilución en caldo es de gran utilidad para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), y es definida como la concentración mínima requerida de un compuesto para prevenir el crecimiento microbiano *in vitro*.

6.5.1 Ensayo de microdilución.

El ensayo se realizó en microplacas estériles de 96 pozos, y se evaluaron las NPs a concentraciones finales de 5000 a 2.44 $\mu\text{g/mL}$; para tal efecto, se pesaron 5000 μg de cada NPs a evaluar y se disolvieron en 1000 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, Aldrich) para obtener una concentración final de 100,000 $\mu\text{g/mL}$. Se transfirieron 20 μL (1000 μg) al primer pozo de la microplaca con 190 μL de Caldo Papa Dextrosa (CPD, Difco), se homogenizó y se transfirió 100 μL al siguiente pozo que contiene previamente 100 μL de CPD, realizándose así diluciones dobles seriadas. Este paso se realizó sucesivamente hasta llegar al pozo 12. Después se realizaron todas las diluciones de las NPs, se agregó 100 μL de la suspensión de esporas a una concentración ajustada de 5×10^5 esporas/mL. De tal manera que se evaluaron las NPs a las siguientes concentraciones 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.2, 78.1, 39, 19.5, 9.76, 4.88 y 2.44 $\mu\text{g/mL}$. Las microplacas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Se usaron como control negativo DMSO y como positivo se utilizó el antifúngico comercial Itraconazol a una concentración

de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Soria-Castro, 2014). Los ensayos se realizaron por triplicado para cada hongo. La determinación de la CMI en los hongos, se realizó mediante la observación de germinación de las esporas de manera visual, con ayuda del microscopio invertido. Para este caso, el valor de CMI corresponde a la concentración más baja a la cual no se observa la germinación de las esporas.

6.6 Determinación del modo de acción antifúngica

La técnica de microdilución también permite determinar el modo de acción de la sustancia como la concentración mínima fungicida (CMF), que es definida como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento del hongo después de sub-cultivar en un medio libre del compuesto evaluado.

6.6.1 Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF)

A las 48 h de incubación de las microplacas, se tomaron 25 μL de cada dilución donde no se observó crecimiento o germinación de las esporas y se depositó en una caja de PDA para cada hongo. Las placas se incubaron a 28 $^{\circ}\text{C}$ por 48 h y se determinó la CMF que corresponde a la concentración mínima a la cual las NPs evaluadas no permiten el crecimiento del hongo o la presencia de menos de tres colonias. Para determinar si la NPs tiene un efecto fungicida o bien fungistático, se utilizó la relación CMF/CMI, considerándose, fungistático cuando la relación es > 4 , y fungicida cuando la relación de CMF/CMI es ≤ 4 (de Castro *et al.*, 2015).

6.7 Análisis estadístico

Para la concentración mínima fungicida se realizó un análisis multivariado de agrupamiento para delimitar los grupos de nanopartículas obtenidas bajo diferentes síntesis, con base en al valor de la concentración mínima necesaria para causar la lisis celular de los hongos. El análisis se realizó utilizando un algoritmo de grupo pareado (UPGMA) con su índice de similitud euclidiana en el software Past3 versión 3.03 (Hammer, 2009).

7. RESULTADO Y DISCUSION

7.1. Síntesis de NPs metálicas de óxido e hidróxido de ZnO y MgO

Se sintetizaron un total de 15 NPs (seis obtenidas por el método hidrotermal y nueve por co-precipitación), de las cuales nueve fueron óxidos (6 de ZnO y 3 de MgO), cuatro hidróxidos de $Mg(OH)_2$ y dos nitrato de hidróxido de zinc.

7.1.1 Caracterización de la síntesis por difracción de rayos X

La difracción de Rayos X (DRX) es una técnica esencial y rutinaria para la caracterización de sólidos y en particular, para la identificación de fases cristalinas. La DRX de los diferentes planos cristalinos produce una serie de reflejos que difieren en su posición e intensidad y constituyen en su conjunto, un perfil o patrón característico del cristal que lo han provocado. Por lo tanto, el análisis de patrón permite obtener información sobre la naturaleza del material, así como la forma cristalina del material (Jenkis y Snyder, 2012).

De esta manera, se confirmó la identidad de cada síntesis, el análisis de los patrones de DRX revelaron que la NPs de ZnO sintetizado por ambos métodos (co-precipitación e hidrotermal) presentaron el mismo patrón de difracción (00-036-1451) correspondiente a la zincita (ZnO). Se observan pequeñas variaciones en el ancho del pico, las cuales están relacionadas con el tamaño del cristalito obtenido por las diferentes síntesis.

Por el método hidrotermal no fue posible obtener directamente las NPs de MgO, ya que metodológicamente se obtiene $Mg(OH)_2$, debido a que necesita temperaturas elevadas ($>500\text{ }^{\circ}\text{C}$) para obtener el MgO. En cambio, por el método de co-precipitación, se confirmó la obtención de MgO por el patrón de difracción característico 00-004-0829 que corresponde a la periclase (MgO). Los patrones de difracción de los MgO obtenidos difieren solo en términos del ancho de los picos, lo que está relacionado con el tamaño de los cristalitos.

Para el caso de la síntesis del hidróxido de zinc debido a la inestabilidad de este compuesto, tanto por co-precipitación como por hidrotermal, no se logró obtener el Zn(OH)_2 . En los difractograma se observan dos fases, una fase mayoritaria que corresponde al nitrato de hidróxido de zinc (JCPDS) 00-024-1460 (indicada con cruces azules) para $\text{Zn}_5(\text{OH})_8(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y una segunda fase que coincide con el patrón de difracción (JCPDS) 00-036-1451 para ZnO (*zincita).

Con respecto a las NPs de Mg(OH)_2 , obtenido por ambos métodos de síntesis, se observó una fase pura con la presencia de cuatro reflexiones características del Mg(OH)_2 que coincide con el patrón de difracción de la fase cristalina de brucita (JCPDS) 00-075-1527. En la Figura 2 se muestran los patrones de difracción de los rayos X representativos de los nanomateriales sintetizados anteriormente.

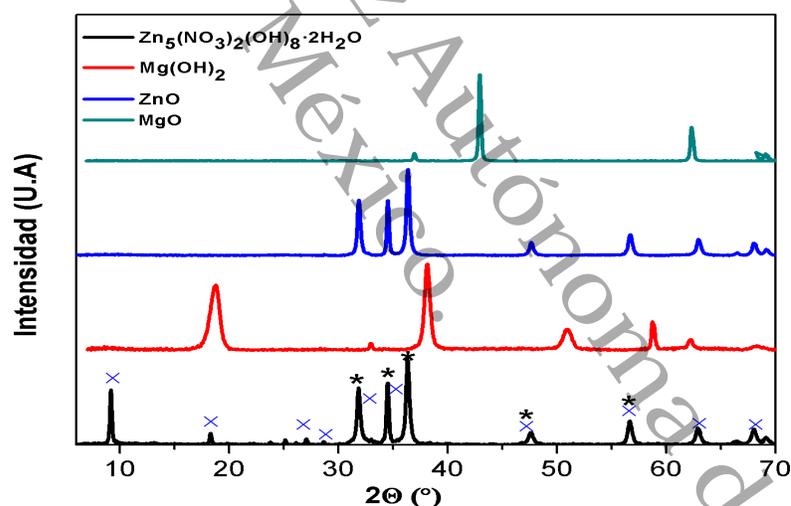


Figura 2. Patrones de difracción de rayos X representativos de las nanopartículas sintetizadas

7.1.2 Análisis del tamaño del cristalito por difracción de rayos X

Con la información obtenida de los patrones de difracción de rayos X, se calculó el tamaño del cristalito de las NPs usando la ecuación de Scherrer. Sin embargo, es importante indicar que el tamaño calculado no es necesariamente el tamaño real de la partícula, ya que una partícula se puede componer por uno o varios cristalitos.

Las condiciones durante las síntesis para la obtención de las diferentes NPs, se muestran en la tabla 3 para los dos tipos de síntesis (hidrotermal en color verde y co-precipitación en color azul) y el tamaño del cristalito determinado con la ecuación Scherrer.

Como se puede observar durante la síntesis hidrotermal a una temperatura de 100°C, las NPs obtenidas de ZnO tienen un tamaño de cristalito de 31 nm. Mientras que con un tratamiento térmico a 160 °C, el tamaño del cristalito aumenta a 42 nm. En comparación, al usar temperaturas en rampa de 100-160 °C se obtiene un tamaño menor que en los casos anteriores (29 nm), probablemente debido a las variaciones de temperatura, ya que primero está 100 °C durante 1 hora y luego a 160 °C por otra hora. En este caso, se observa que el tiempo de reacción tiene un efecto en el tamaño del cristalito obtenido.

En el método de co-precipitación, el tamaño del cristalito se ve modificado conforme aumenta la temperatura de calcinación. El tamaño de cristalito es más pequeño (36 nm) cuando se trabajó a una temperatura de 60 °C y sin calcinación; en cambio, a temperatura ambiente y calcinación de 500 °C el tamaño incremento a 39 nm y finalmente a una temperatura de síntesis de 70 °C y horneado de 1000 °C el tamaño de cristalito casi duplica en tamaño (61 nm).

Como se mencionó anteriormente, el $Zn(OH)_2$ no se obtuvo vía hidrotermal, en su lugar el material $Zn_5(NO_3)_2(OH)_8 \cdot 2H_2O$ obtenido a temperatura ambiente presentó un tamaño de cristalito más pequeño (17 nm), por el contrario, las mismas NPs sintetizada vía co-precipitación fueron del doble del tamaño con 33 nm.

De igual forma, las NPs de $Mg(OH)_2$ sintetizadas por el método hidrotermal muestran que las temperaturas a las cuales fueron sometidas y el tratamiento hidrotérmico de 100 a 160 °C, generan NPs de diferentes tamaños. En el caso del uso de 100 °C se obtiene tamaños de NPs de 29 nm, mientras que con un tratamiento hidrotérmico de 160 °C se consigue tamaños de 22 nm. En contraste con la síntesis de co-precipitación se observaron tamaños de NPs más pequeño

(18 nm) sin el uso temperatura, y a una temperatura a 70 °C se obtiene un tamaño ligeramente mayor (22 nm).

Tabla 3. Condiciones para la obtención de NPs por el método hidrotérmico y co-precipitación y tamaño del cristalito obtenido

Clave	Síntesis	Condiciones de Temperatura (°C)			NPs obtenida verificada por DRX	Tamaño del Cristalito (nm)
		Síntesis	Hidrotérmico	Calcificación		
B.3.2	Hidrotermal	T/A	100	---	ZnO	31
B.3.3		T/A	160	---	ZnO	42
B.3.4		T/A	100-160	---	ZnO	29
B.3.1		T/A	---	---	Zn ₅ (NO ₃) ₂ (OH) ₈ ·2H ₂ O	17
B.9.2		70	100	---	Mg(OH) ₂	29
B.2.1		70	160	---	Mg(OH) ₂	22
S6	Co-precipitación	60	---	---	ZnO	36
M19		T/A	---	500	ZnO	39
A2		70	---	1000	ZnO	61
M19.2		T/A	---	---	Zn ₅ (NO ₃) ₂ (OH) ₈ ·2H ₂ O	33
M15		T/A	---	500	MgO	13
M10		T/A	---	1000	MgO	92
A3		70	---	1000	MgO	34
M.1.1		T/A	---	---	Mg(OH) ₂	18
M11		70	---	---	Mg(OH) ₂	22

Temperatura ambiente (T/A), Difracción de rayos X (DRX).

7.2 Caracterización por microscopía electrónica de barrido (MEB)

La microscopía electrónica de barrido (MEB), se basa en el principio de la microscopía óptica en la que se sustituye el haz de luz por un haz de electrones. Con esto conseguimos hasta los 100 Å, resolución muy superior a cualquier instrumento óptico.

En la Figura 3, se puede observar que las NPs de ZnO sintetizadas por vía hidrotérmica a los diferentes tratamientos térmicos: 100 °C, 160 °C y 100-160 °C, respectivamente, muestran que las variaciones en la temperatura tienen un efecto en la morfología de las NPs. En el caso del ZnO (B.3.2) se observa prismas con extremos piramidales y rectangulares, en cambio en la síntesis B.3.3 predominan las barras hexagonales.

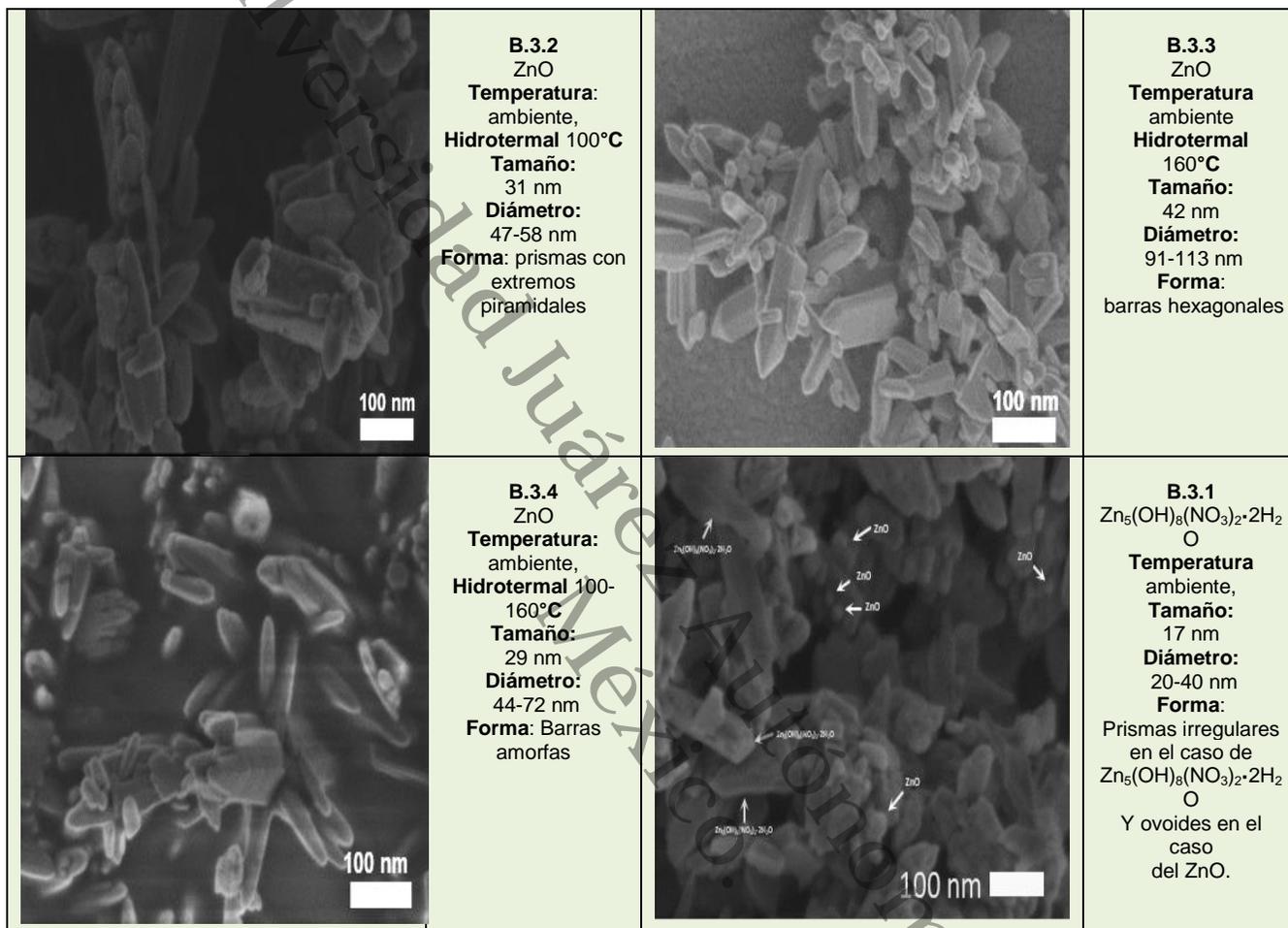


Figura 3. Determinación del tamaño del cristalito, el diámetro promedio y morfología de las NPs de ZnO y $Zn_5(OH)_8(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$ sintetizadas vía hidrotermal.

De manera contrastante, las variaciones de temperatura durante la síntesis de ZnO (B.3.4) generaron NPs con una morfología poco definida y aglomeradas. En ese sentido, las NPs de ZnO sintetizadas vía co-precipitación (Fig. 4) a temperatura ambiente y bajo condiciones de calcinación de 500 °C (M19), presentaron estructuras ovoides, en comparación con las NPs A2 las cuales presentaron una morfología con estructuras de barras hexagonales y rectangulares bien definidas a una temperatura de 70 °C con una calcinación de 1000 °C.

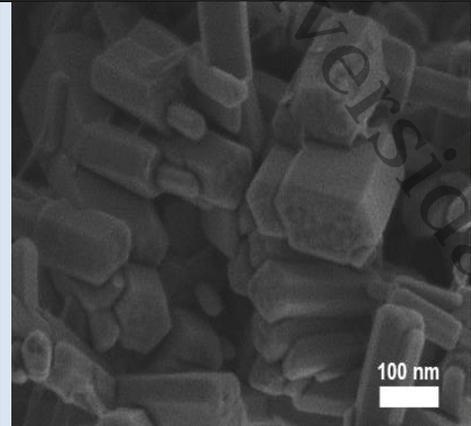
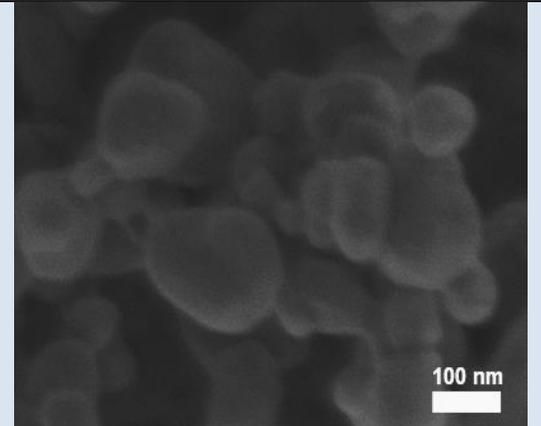
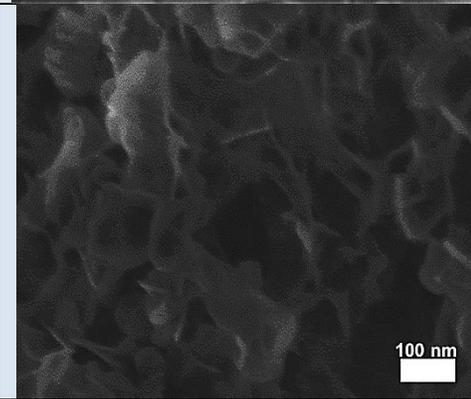
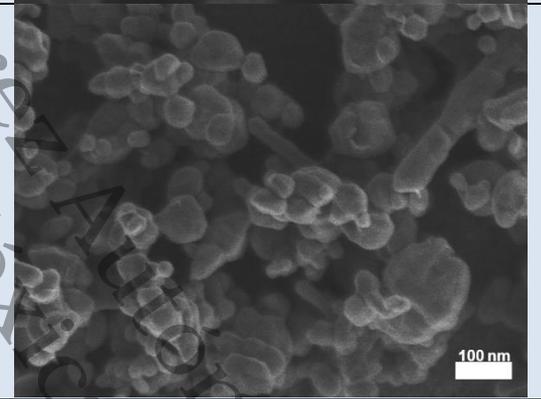
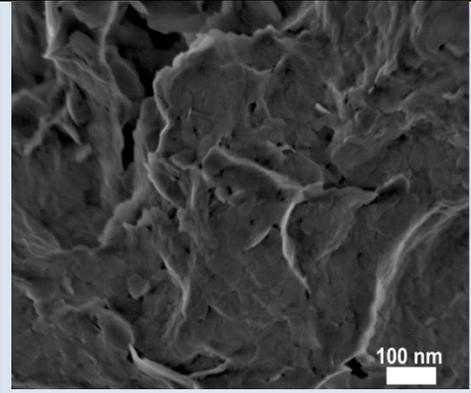
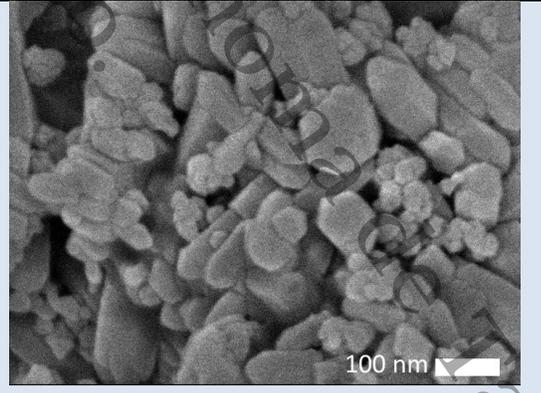
	<p>A2 ZnO Temperatura: 70°C Calcificación: 1000°C Tamaño: 30 nm Diámetro: 19-116 nm Forma: Barras hexagonales y rectangulares</p>		<p>M19 ZnO Temperatura: ambiente Calcificación: 500°C Tamaño: 28 nm Diámetro: 24-130 nm Forma: ovoides</p>
	<p>M19.2 Zn(OH)₂ Temperatura: ambiente Calcificación: --- Tamaño: 16 nm Diámetro: 30-121nm Forma: Nanoflakes (hojuelas)</p>		<p>A3 MgO Temperatura: 70°C Calcificación: 1000°C Tamaño: 17 nm Diámetro: 13-51 nm Forma: Pequeñas esferas y cilindros</p>
	<p>M15 MgO Temperatura: ambiente Calcificación: 500°C Tamaño: 6nm Diámetro: 18-58nm Forma: Nanoflakes (hojuelas)</p>		<p>S6 ZnO Temperatura: 60°C Tamaño: 36 nm Diámetro: 23-80 nm Forma: Barras hexagonales</p>

Figura 4. Determinación del tamaño del cristalito, el diámetro promedio y morfología de las Nps de ZnO, Zn(OH) y MgO sintetizadas vía co-precipitación

Por otra parte, las NPs de $Zn_5(NO_3)_2(OH)_8 \cdot 2H_2O$ sintetizados vía hidrotérmal y co-precipitación a una temperatura ambiente presentan formas contrastantes, mientras que la NPs M19.2 corresponde a una morfología ovoide con presencia de algunas varillas, las NPs B.3.1 presentan prismas irregulares (Fig. 3). De la misma manera, la morfología de las NPs de MgO sintetizadas por co-precipitación también se ven alterada por el uso de temperatura, se observan NPs en forma de pequeñas esferas y algunos cilindros a una temperatura de 70 °C con una calcinación de 1000 °C, mientras que a temperatura ambiente y una calcinación de 500 °C estas presentan formas de hojuelas (Fig. 4).

7.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), Fungicida (CMF) y el modo de acción de las nanopartículas

Una vez confirmada la identidad y pureza de la NPs, estas fueron evaluadas contra los cuatro hongos biodeteriorantes. En general se puede observar que de las 60 actividades evaluadas, que corresponden a las 15 NPs sintetizadas contra los 4 diferentes hongos (Fig. 5), solo en 6 ensayos no se detectó actividad de la NPs aún a la concentración más alta evaluada (5000 µg/mL).

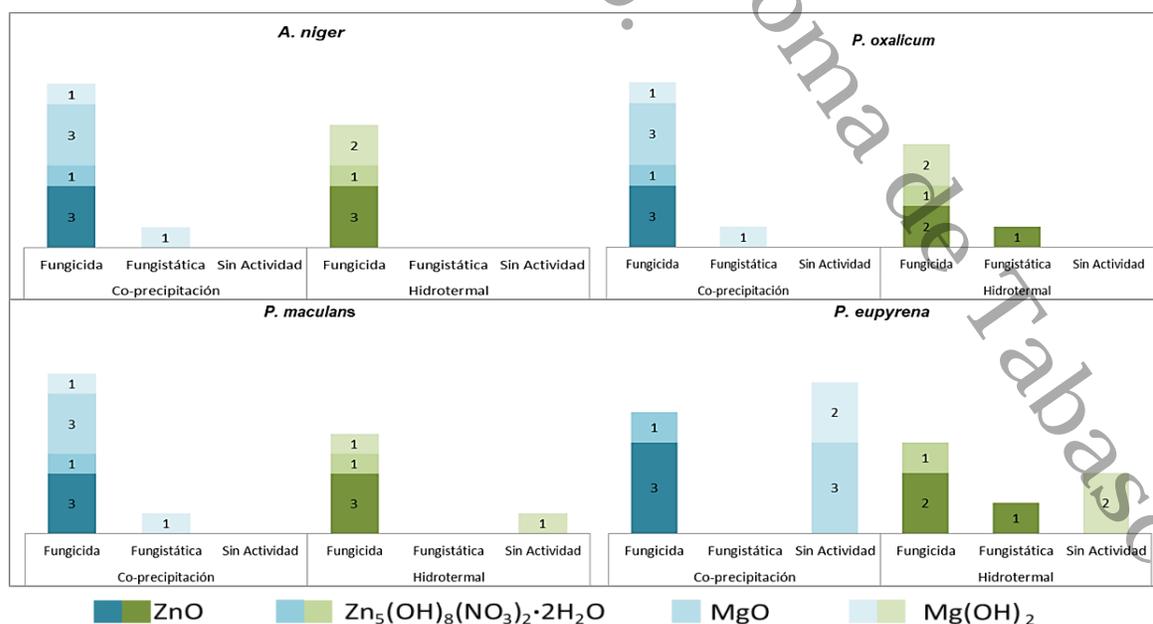


Figura 5. Distribución de la actividad antifúngica contra los cuatro modelos fúngicos biodeteriorantes evaluados de las diferentes NPs sintetizadas por lo métodos hidrotérmal y co-precipitación.

En la mayoría de los casos la actividad mostrada por la NPs fue de tipo fungicida independientemente del método de síntesis. Las NPs de óxido y nitrato de hidróxido de zinc fueron las que presentaron una mejor actividad antifúngica contra los cuatro modelos evaluados (Fig. 5).

Para una mejor presentación de los resultados, se describirán la actividad antifúngica por el tipo de NPs.

7.3.1 Actividad del Óxido de ZnO

Todas las NPs evaluadas de ZnO sintetizadas vía co-precipitación (color azul) e hidrotermal (color verde) mostraron los valores más bajos de CMI y CMF que van desde los 78.1 a 312 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En especial las NPs obtenida vía co-precipitación (S6) y (B.3.4) obtenida vía hidrotermal, presentaron las mejores actividades con valores de CMF más bajos (desde 78.1 a 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$), siendo igual o más bajo con respecto al resto de la NPs de ZnO, contra los cuatro hongos evaluados (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI), Concentración mínima fungicida (CMF) en $\mu\text{g}/\text{mL}$ y modo de acción (MA) de las NPs de ZnO obtenidas por los métodos de co-precipitación (verde) e hidrotermal (azul) contra los cuatro hongos biodeteriorantes

Clave ZnO	<i>A. niger</i>				<i>P. oxalicum</i>				<i>P. maculans</i>				<i>P. europyrena</i>			
	CMI	CMF	CMF /CMI	MA	CMI	CMF	CMF /CMI	MA	CMI	CMF	CMF /CMI	MA	CMI	CMF	CMF /CMI	MA
S6	78.1	78.1	1	Fg	312	625	2	Fg	78.1	78.1	1	Fg	312	312	1	Fg
M.19	78.1	78.1	1	Fg	1250	1250	1	Fg	78.1	78.1	1	Fg	312	312	1	Fg
A2	312	312	1	Fg	625	1250	2	Fg	156.2	156.2	1	Fg	312	312	1	Fg
B.3.2	312	312	1	Fg	5000	5000	1	Fg	312	312	1	Fg	1250	>5000	ND	Fgt
B.3.3	156.2	156.2	1	Fg	312	625	2	Fg	78.1	78.1	1	Fg	312	312	1	Fg
B.3.4	78.1	78.1	1	Fg	625	5000	8	Fgt	78.1	78.1	1	Fg	312	312	1	Fg

Fungicida (Fg), Fungistático (Fgt), No determinada a la concentración evaluada (ND).

Para determinar el modo de acción de las NPs se consideró la relación entre el CMF y la CMI, ya que no siempre el valor del CMI corresponde a la concentración mínima fungicida; ya que el valor de la concentración mínima fungicida (CMF) se

obtiene después de sub-cultivar en un medio libre del compuesto evaluado. Por lo tanto, en función a la propuesta por de Castro *et al.* (2015), se considera que el compuesto es de naturaleza fungistática cuando la relación entre la CMF/CMI es >4 , y fungicida cuando la relación es ≤ 4 .

Tomando en cuenta lo anterior, todas las NPs de ZnO tienen una relación CMF/CMI de uno, o sea el valor del MIC es igual al de CMF lo que indica un modo de acción fungicida. En la figura 6 se muestran los resultados visuales de la actividad más efectivas obtenidas por las NPs sintetizadas por co-precipitación e hidrotérmal respectivamente, frente a los diferentes hongos evaluados, y se observan que los valores de la CMI y la CMF son iguales, así confirmándose su naturaleza fungicida de estas NPs.

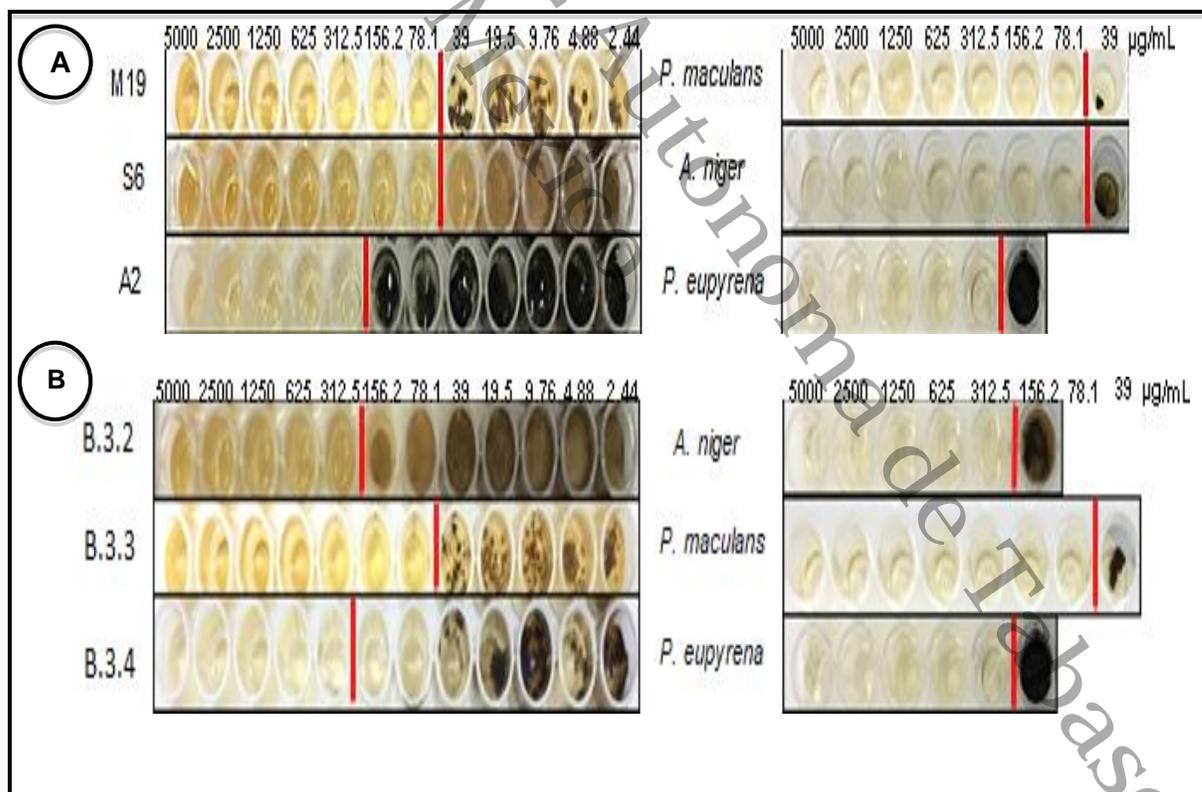


Figura 6. Actividad mostrada por las NPs de ZnO obtenidas A) Síntesis co-precipitación, B) síntesis hidrotérmal. Las líneas roja a la izquierda indica la CMI y las de la derecha la CMF.

Recientemente, las NPs de ZnO se han propuesto como una estrategia para la prevención, intervención y restauración del patrimonio cultural, debido a su transparencia, capacidad fotocatalítica (Ruffolo *et al.*, 2010) y eficiencia para inhibir a diversos microorganismos (Janaki *et al.*, 2015; Sierra-Fernández *et al.*, 2018), cualidades que permiten mantener la legibilidad de las obras de arte sin dañar su estética (Ditaranto *et al.*, 2015; Van der Werf *et al.*, 2015). En ese sentido, para la preparación de estos óxidos nanocristalinos con tamaños y formas controladas; se han empleado diferentes métodos de síntesis, como el sol-gel (Fernández-Osorio *et al.*, 2007; Fernández-Osorio *et al.*, 2011), el coloidal (Vázquez-Olmos *et al.*, 2005), síntesis hidrotérmica (Fernández-Osorio *et al.*, 2009), así como la co-precipitación (Fernández-Osorio *et al.*, 2015), por mencionar algunos.

Nuestros resultados muestran que las NPs de ZnO sintetizadas vía co-precipitación e hidrotérmica son efectivas a concentraciones bajas (78.1 µg/mL) contra los cuatro modelos fúngicos evaluados. Aunque los resultados no pueden ser contrastados con otros estudios, ya que las NPs de ZnO han sido obtenidas por otras vías de síntesis, es evidente que las síntesis utilizadas en este trabajo resultan más efectivas, particularmente las NPs S6 obtenida vía co-precipitación y B.3.4 obtenida vía hidrotérmica. En la literatura solo hay 4 reportes contra hongos biodeteriorantes, específicamente contra el hongo *A. niger*. En todos los casos, la síntesis utilizada para la obtención de las NPs de ZnO fue por el método de Sol-gel. Gondal *et al.* (2012), y Sierra-Fernández *et al.* (2017), reportan un MIC de 1.25 mg/mL, mientras que Gambino *et al.* (2017), y Soria-Castro *et al.* (2018), reportan una concentración más alta de 2.5 mg/mL y 10 mg/mL respectivamente, para inhibir completamente al hongo *A. niger*. Por lo tanto, los resultados obtenidos son muy alentadores, debido a las bajas concentraciones requeridas, en contraste con los estudios antes mencionados que reportan la actividad antifúngica en el orden de los miligramos.

Un efecto observado a concentraciones menores de 4.88 µg/mL de las NPs es su mejor crecimiento y esporulación de los hongos, incluso mejor que sin las NPs,

esto puede deberse a un fenómeno de dosis-respuesta, denominado hormesis, que se caracteriza por estimulación en dosis bajas e inhibición en dosis altas (Southam y Ehrlich, 1943; Calabrese *et al.*, 2011). Los metálicos divalentes como el Zn o Mg son cofactores enzimáticos, por lo tanto podrían funcionar como herméticos. Sin embargo, los mecanismos moleculares precisos de la hormesis son aún desconocido.

7.3.1 Actividad del nitrato de hidróxido de Zinc

Las NPs de nitrato de hidróxido de zinc, independientemente del método de síntesis, ambas muestran un buen desempeño antifúngico contra los cuatro modelos fúngicos evaluados. Los valores de CMI y CMF más bajos fueron de 156.2 µg/mL (Tabla 5) con un modo de acción fungicida de acuerdo al radio CMF/CMI (Fig. 8). Si bien, ambas NPs muestran valores similares contra los 3 de modelos fúngicos, la NP M19.2, obtenida por co-precipitación, mostró una mejor efectividad al inhibir a concentraciones más baja a los cuatros hongos, particularmente por que la NP B.3.1 requiere de una mayor concentración (1250 µg/mL) para inhibir al hongo *P. oxalicum*.

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI), Concentración mínima fungicida (CMF) en µg/mL y modo de acción (MA) de las NPs de $Zn_5(OH)_8(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$ obtenidas por los métodos de co-precipitación (verde) e hidrotermal (azul) contra los cuatro hongos biodeteriorantes

Clave	<i>A. niger</i>				<i>P. oxalicum</i>				<i>P. maculans</i>				<i>P. eupyrena</i>			
	CMI	CMF	CMF /CMI	MA	CMI	CMF	CMF /CMI	MA	CMI	CMF	CMF /CMI	MA	CMI	CMF	CMF /CMI	MA
M.19.2	156.2	156.2	1	Fg	625	625	1	Fg	312.5	312.5	1	Fg	312.5	312.5	1	Fg
B.3.1	156.2	156.2	1	Fg	1250	1250	1	Fg	312.5	312.5	1	Fg	312.5	312.5	1	Fg

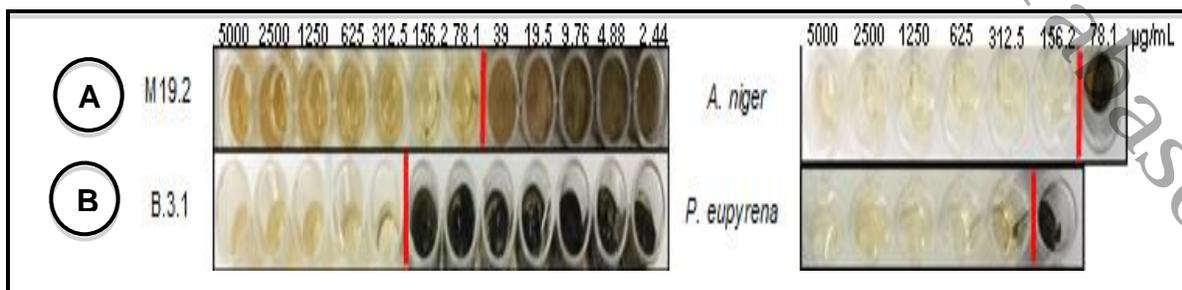


Figura 7. Actividad mostrada por las NPs de nitrato de hidróxido de zinc obtenidas A) co-precipitación, B) vía hidrotermal. Las líneas roja a la izquierda indica la CMI y las de la derecha la CMF

A pesar de que no se logró obtener hidróxido de zinc, debido a la inestabilidad, se obtuvo hidróxido nitrato de zinc dihidratado, lo cual resultó ser una mezcla de zincita (ZnO) con hidróxido nitrato de zinc dihidratado; compuesto que se ha reportado que no presenta una transformación de fase (Li *et al.*, 2012).

Las NPs hidróxido nitrato de zinc dihidratado obtenidas por co-precipitación mostraron la mejor efectividad al inhibir a concentraciones bajas a los cuatro hongos. En la literatura no encontramos ningún reporte de la actividad antifúngica contra hongos biodeteriorantes. Pero se ha reportado que el hidróxido nitrato de zinc dihidratado presenta una buena actividad fúngica contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* a concentraciones 625 µg/mL. (De la Rosa-García *et al.*, 2018b). Es así, que desde nuestro conocimiento, este es el reporte de la actividad antifúngica de las NPs de hidróxido nitrato de zinc dihidratado, contra hongos involucrados en el biodeterioro.

7.3.1 Actividad del óxido de magnesio

Otras NPs evaluadas fueron las de MgO, estas presentaron una menor actividad con respecto a las NPs de ZnO, y el hidróxido nitrato de zinc dihidratado. Aunque en la mayoría de los casos el modo de acción fue fungicida, ninguna de estas NPs fue capaz de inhibir a *P. eupyrena* a la concentración más alta evaluada (5000 µg/mL), (Tabla 6). Como se puede observar en el Figura 8, el crecimiento de *P. eupyrena* en todos los pozos de la microplaca. En general las NPs mostraron una mejor actividad contra *A. niger* y *P. oxalicum* con valores de CMF de 156.2 a 625 µg/mL respectivamente (Tabla 6 y Fig. 8).

Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI), Concentración mínima fungicida (CMF) en µg/mL y modo de acción (MA) de de las NPs de MgO obtenidas por los métodos hidrotermal contra cuatro hongos biodeteriorantes

Clave	<i>A. niger</i>				<i>P. oxalicum</i>				<i>P. maculans</i>				<i>P. eupyrena</i>			
	CMI	CMF	CMF /CMI	MA	CMI	CMF	CMF /CMI	MA	CMI	CMF	CMF /CMI	MA	CMI	CMF	CMF /CMI	MA
A3	312.5	312.5	1	Fg	156.2	156.2	1	Fg	1250	2500	2	Fg	NA	NA	NA	NA
M15	625	625	1	Fg	156.2	156.2	1	Fg	1250	5000	2	Fg	NA	NA	NA	NA
M10	156.2	156.2	1	Fg	156.2	156.2	1	Fg	1250	1250	1	Fg	NA	NA	NA	NA

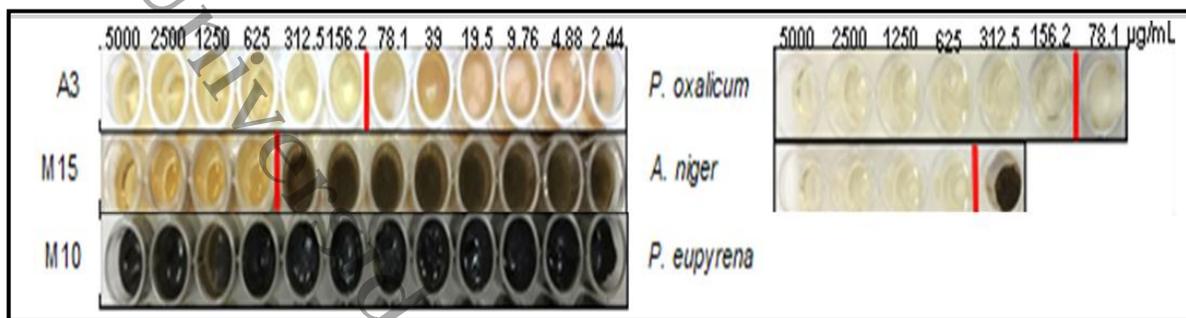


Figura 8. Actividad mostrada por las NPs de MgO obtenidas vía co-precipitación. Las líneas rojas a la izquierda indica la CMI y las de la derecha la CMF.

Los resultados aquí obtenidos son de dos a cuatro veces mejor a los de Sierra-Fernández *et al.* (2017), que reporta un MIC de 1250 µg/mL para las NPs de MgO obtenidas por el método sol-gel contra *A. niger* y *P. oxalicum*, y aunque intento mejorar la actividad; sintetizando NPs de MgO dopadas con ZnO, obtiene una actividad menor a una concentración de 625 µg/mL contra *P. oxalicum*, pero no contra *A. niger* (1250 mg/mL). En este trabajo se utilizó una gran cantidad de NPs de MgO para inhibir a *P. maculans* (1250µg/mL), este mismo efecto fue observado por Sierra-Fernández *et al.* (2017), quien reporta un MIC de (5000 µg/mL) de MgO para inhibir a *P. maculans*, lo cual atribuye al hecho de que este hongo presenta esporas con 4 septos, o sea que el hongo tienen 4 opciones para germinar, además este es un hongo melanizado, por tanto se requiere de una mayor cantidad de las NPs para inhibirlo. Estas características hacen de *P. maculans* un hongo importante en el biodeterioro del material pétreo, debido al daño estético que causa y la alta resistencia a los diversos tratamientos tradicionalmente usados. Este fenómeno de resistencia ya se ha documentado por otras NPs como el doble hidróxido de Zinc (CZ), (De la Rosa-García 2018a). Es así, que la síntesis de co-precipitación es una técnica viable para la síntesis de NPs de MgO con capacidad antifúngica, en este caso contra 3 hongos involucrados en el biodeterioro.

7.3.1 Actividad del hidróxido de magnesio

La actividad antifúngica de las NPs Mg(OH)₂ independientemente del método de síntesis, fueron menos activas, ya que necesitan de una mayor de cantidad de las

NPs y además son incapaz de inhibir a *P. eupyrena* a las concentraciones evaluadas (5000 µg/mL), ver Tabla 7. En este sentido, las NPs con menor actividad fue M.1.1 que solo es capaz inhibir a *A. niger* y *P. oxalicum* a las concentraciones más alta (5000 µg/mL) y su efecto es fungistático, contrastando con las NPs M11 ya que sus valores de CMF fueron los más bajos de 625 a 156.2 µg/mL contra *A. niger* y *P. oxalicum* respectivamente (Fig. 9).

Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria (CMI), Concentración mínima fungicida (CMF) en µg/mL y modo de acción (MA) de las NPs de Mg(OH)₂ obtenidas por los métodos de co-precipitación (verde) e hidrotermal (azul) contra cuatro los hongos biodeteriorantes

Clave	<i>A. niger</i>				<i>P. oxalicum</i>				<i>P. maculans</i>				<i>P. eupyrena</i>			
	CMI	CMF	CMF /CMI	MA	CMI	CMF	CMF /CMI	MA	CMI	CMF	CMF /CMI	MA	CMI	CMF	CMF /CMI	MA
M11	625	625	1	Fg	156.2	156.2	1	Fg	1250	1250	1	Fg	NA	NA	NA	NA
M.1.1	2500	>5000	ND	Fgt	2500	>5000	ND	Fgt	5000	>5000	ND	Fgt	NA	NA	NA	NA
B.9.2	5000	5000	1	Fg	5000	5000	1	Fg	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B.2.1	312.5	312.5	1	Fg	625	2500	4	Fg	2500	2500	1	Fg	NA	NA	NA	NA

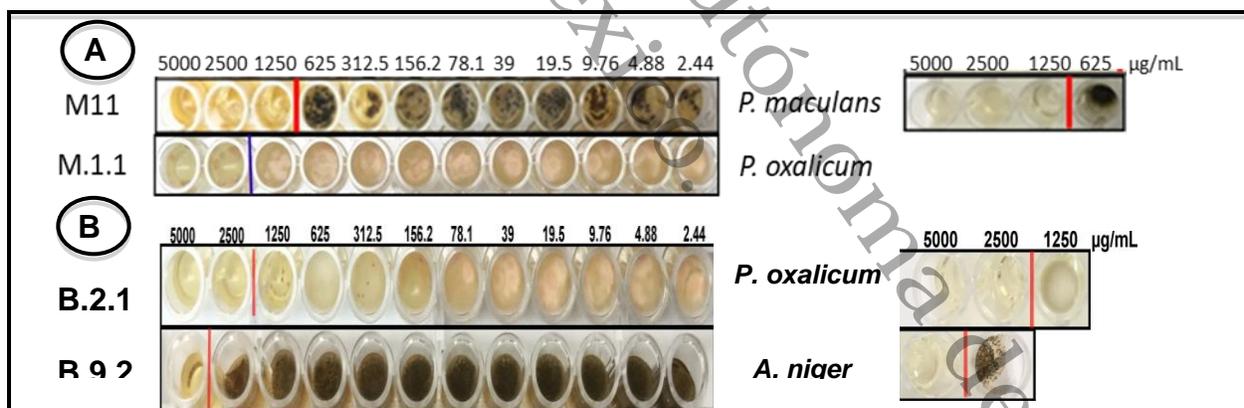
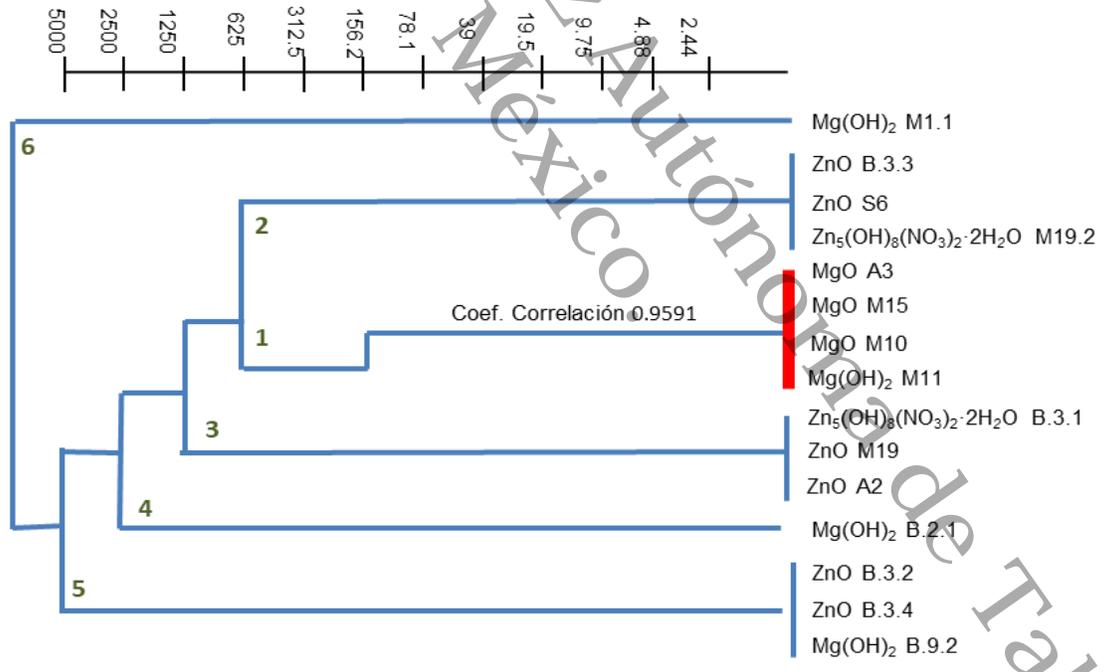
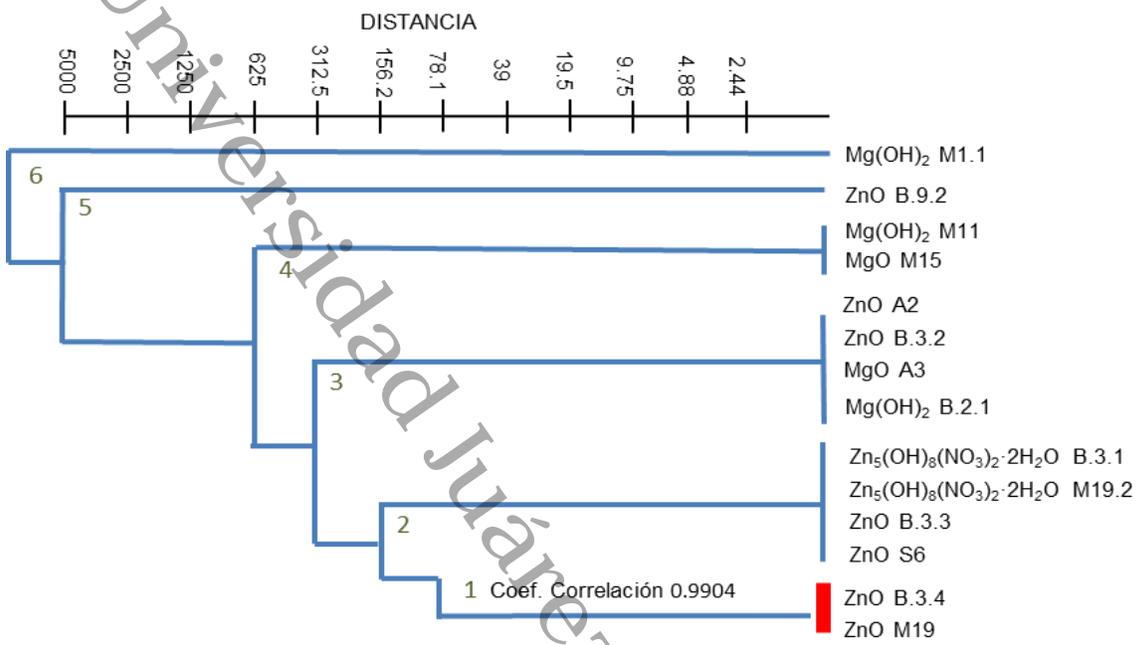


Figura 9. Actividad mostrada por las NPs de Mg(OH)₂ obtenidas A) co-precipitación, B) vía hidrotermal. Las líneas roja y azul a la izquierda indica la CMI y las de la derecha la CMF.

Con el fin de determinar qué tipo de NPs y que método de síntesis es el más efectivo para inhibir a los hongos involucrados en el biodeterioro de material pétreo, se realizó un análisis de conglomerados (clúster) con base en una matriz de similitud; misma que constó de las 15 NPs sintetizadas por los dos métodos de síntesis, dando lugar a la construcción de un dendrograma para cada uno de los hongos evaluados (Fig. 10).

El dendograma de similitud por distancia euclidiana mostró un coeficiente de correlación contra *A. niger* de 0.9904, cabe mencionar que cuanto mayor es el valor absoluto del coeficiente de correlación, mayor es la contribución de la variable para la formación del componente principal (Hammer, 2009). Considerando esto, el presente análisis permitió identificar los compuestos que más contribuyen al agrupamiento de las accesiones estudiadas al identificar las concentraciones y NPs que más influyen en cada uno de los hongos evaluados. Particularmente las NPs de ZnO sintetizadas por los dos métodos, hidrotermal (B.3.4) y co-precipitación (M19) mostraron mejor agrupamiento tal y como se muestra en la Fig. 10A.

No obstante, con *P. oxalicum* mostró una correlación de 0.9591, agrupando particularmente las Nps de MgO: A3, M15, M10 y M11 sintetizadas por el método de co-precipitación (Fig. 10B) demostrando que las NPs de MgO tienen mejor capacidad para inhibir a este microorganismos en comparación con las otras NPs evaluados. Para el hongo *P. maculans* el coeficiente de correlación fue de 0.9751, mostrando la agrupación de las Nps de ZnO (Fig. 10C), agrupando particularmente las NPs sintetizadas por el método hidrotermal (B.3.3 y B.3.4) y co-precipitación (S6). Mientras que *P.eupyrena* tuvo un coeficiente de 0.9667 mostrando una gran agrupación de Nps de ZnO y nitrato de hidróxido de zinc; sintetizadas por las vías hidrotermal y co-precipitación. Demostrando que las diferentes NPs sintetizadas por las dos via son susceptibles para este hongo evaluado.



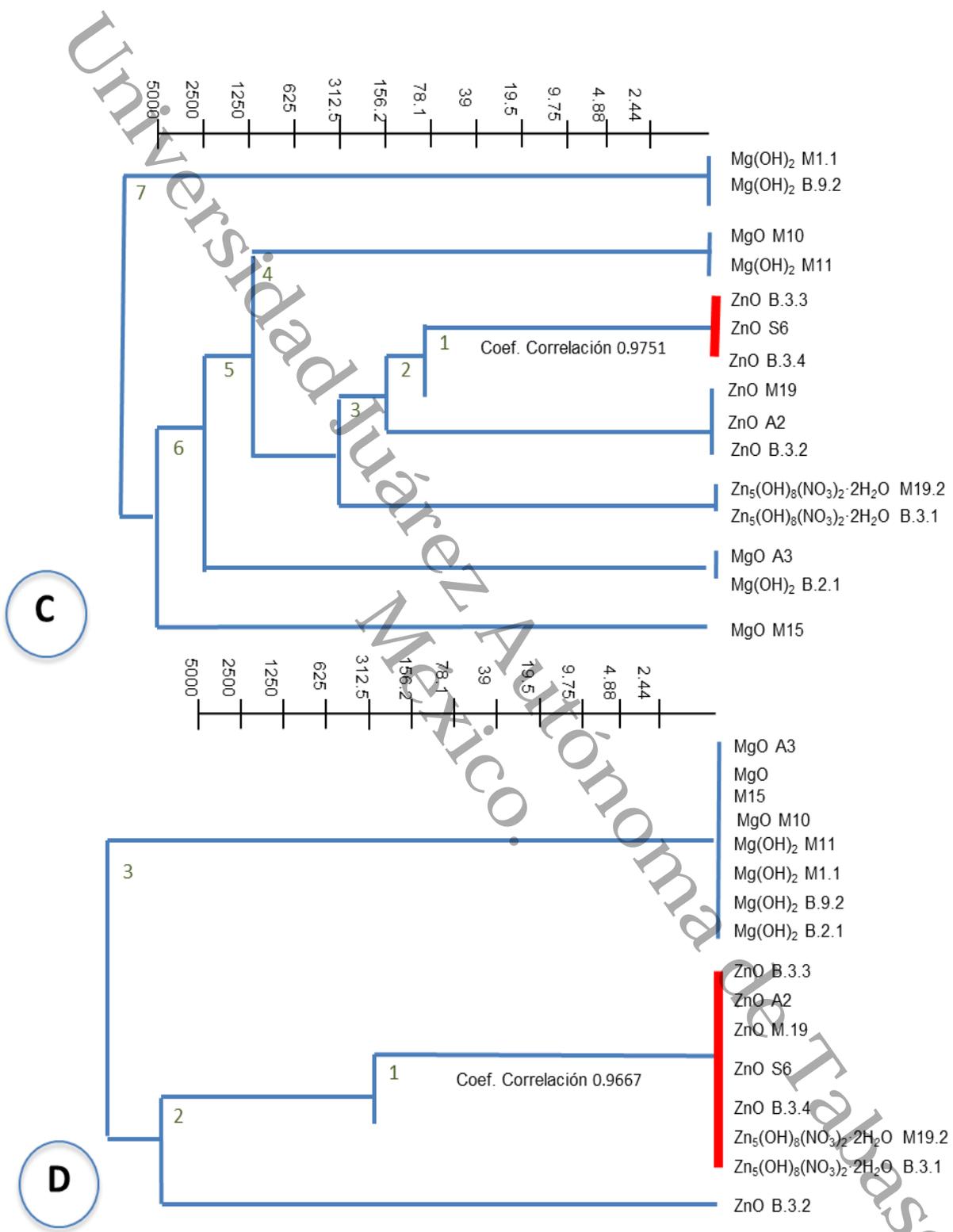


Figura 10. Dendrograma de similitud de la actividad antifúngica de las diferentes Nps sintetizadas por los métodos de síntesis (hidrotermal y co-precipitación) para los diferentes hongos evaluados. Utilizando el método de distancia euclidiana

7.4 Relación del tamaño y forma de las NPs con la actividad antifúngica.

Con establecer si la forma o el tamaño de la NPs son importantes en la capacidad para inhibir a los hongos evaluados, se analizaron los resultados obtenidos de la actividad antifúngica contra la forma y los tamaños de las NPs. Sin embargo, es oportuno mencionar que solo se compararon los resultados de las 10 NPs más activas.

Como se puede observar en la tabla 8, el tamaño del cristalito para las NPs de ZnO varía entre los 29 y 61 nm y el diámetro promedio fluctúa de los 28 y 113 nm, y en ninguno de los casos se observa una relación entre el tamaño y la actividad. Sin embargo, se puede observar que las NPs en formas geométricas (S6) y rectangulares (A2) ejercen un mejor efecto inhibitorio sobre todos los hongos evaluados.

Tabla 8. Determinación del tamaño del cristalito, morfología, y CMF de las diferentes NPs ZnO obtenidos vía co-precipitación e hidrotermal.

clave	Muestra	Tamaño del cristalito (nm)	Morfología	CMF ($\mu\text{g/mL}$)				MA
				<i>A. niger</i>	<i>P. oxalicum</i>	<i>P. maculans</i>	<i>P. eupyrena</i>	
B.3.4	ZnO	29	Amorfos	78.1	5000	78.1	312	Fg
B.3.2		31	Barras hexagonales	312	5000	312	>5000	Fg
B.3.3		42	Prismas piramidales y rectangulares	156.2	625	78.1	312	Fg
S6		36	Geométricas	156.2	625	78.1	312	Fg
M19		39	Ovoide	78.1	1250	156.2	312	Fg
A2		61	Barras hexagonales y rectangulares	312	1250	156.2	312	Fg
				312	1250	156.2	312	Fg

En particular, e independientemente del tamaño, las formas amorfas y ovoideas fueron las más efectivas contra *A. niger*, con los valores de CMF más bajos 78.1 $\mu\text{g/mL}$. Particularmente las formas geométricas son más efectivas para inhibir a *P.*

oxalicum que el resto de las morfologías obtenidas. Por otra parte, las barras hexagonales tienen un menor efecto particularmente contra los hongos *P. oxalicum* y *P. eupyrena*.

Estudios previos, han reportado que el género *P. oxalicum* es el más susceptible a la acción de NPs de ZnO que *A. niger* (Sierra-Fernández *et al.*, 2017; Gambino *et al.*, 2017; Soria-castro *et al.*, 2018). Sin embargo, aquí encontramos un efecto inverso, que puede deberse precisamente a las formas que adoptan las NPs de acuerdo al tipo de síntesis. Todos los autores antes mencionados que sintetizaron NPs de ZnO por vía sol-gel, reportan que las formas pseudo-hexagonales con tamaño de entre 40 y 130 nm (Sierra-Fernández *et al.*, 2017) y las formas esféricas entre 15 a 100 nm (Soria-Castro, 2014) y 3 a 70 nm (Gambino *et al.*, 2017), inhiben más eficientemente a *P. oxalicum* que a *A. niger*.

En nuestros resultados, mostramos que las NPs de ZnO pueden inhibir a concentraciones más bajas a *A. niger* independientemente del método de síntesis y tamaño del cristalito, siendo este más susceptible; por el contrario *P. oxalicum* fue el más resistente a concentraciones 1250 $\mu\text{g/mL}$ por la síntesis de co-precipitación y mayor (5000 $\mu\text{g/mL}$) por la vía hidrotermal, lo que indica desde nuestro punto de vista que la morfología de las NPs de ZnO son las que pueden influir en la actividad.

Con respecto a las NPs de nitrato de hidróxido de zinc, se observa que independientemente del tamaño y morfología, ambas síntesis muestran un buen desempeño antifúngico contra los cuatro modelos fúngicos evaluados (Tabla 9). Si bien, ambas NPs muestran valores similares contra los cuatro modelos fúngicos, las formas ovoides parecen estar más asociadas a la actividad antifúngica para inhibir al hongo *P. oxalicum* precisamente como los indican otros autores con la NPs de ZnO (Sierra-Fernández *et al.*, 2017; Gambino *et al.*, 2017; Soria-castro *et al.*, 2018).

Tabla 9. Determinación del tamaño del cristalito, morfología, las CMF de las diferentes muestras de NPs de nitrato de hidróxido de zinc obtenidos vía co-precipitación e hidrotermal

Clave	Muestra	Tamaño del cristalito	Morfología	CMF ($\mu\text{g/mL}$)				MA
				<i>A. niger</i>	<i>P. oxalicum</i>	<i>P. maculans</i>	<i>P. eupyrena</i>	
B.3.1	$\text{Zn}_5(\text{OH})_8(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	17	Prismas irregulares Y ovoides	156.2	1250	312.5	312.5	Fg
M19.2		33	Varillas y ovoides	156.2	625	312.5	312.5	Fg

El empleo de nanopartículas de hidróxidos se ha convertido en la principal herramienta para tratar los materiales en restauración y conservación debido a la estructura cristalina de estos materiales. Dentro de las NPs usadas, son bastante comunes la de hidróxidos de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y de magnesio $\text{Mg}(\text{OH})_2$ para la restauración de obras de piedra (Danielle *et al.*, 2008; López-Arce *et al.*, 2010), pinturas murales, lienzos, madera y documentos de papel (Giorgi *et al.*, 2005; Baglioni y Giorgi 2006; Gómez-Villalba *et al.*, 2010).

Por otro lado, para las NPs de MgO también fue evidente que el tamaño no tiene un efecto en la actividad (Tabla 10), pero tampoco la forma aparentemente tiene un efecto sobre la actividad. Sin embargo, a pesar del pequeño tamaño de las NPs estas no fueron capaces de inhibir a *P. eupyrena*, lo cual sugiere que es la morfología lo que dicta probablemente su actividad, tal y como se observó para las otras NPs.

Tabla 10. Determinación del tamaño del cristalito, morfología, las CMF de las diferentes muestras de NPs de óxido de magnesio obtenidas vía Co-precipitación

Clave	Muestra	Tamaño del cristalito	Morfología (MEB)	CMF ($\mu\text{g/mL}$)				MA
				<i>A. niger</i>	<i>P. oxalicum</i>	<i>P. maculans</i>	<i>P. eupyrena</i>	
M15	MgO	13	Hojuelas pequeñas	625	156.2	2500	N/A	Fg
A3		34	esferas y cilindros	312.5	156.2	5000	N/A	Fg
M10		92	----	156.2	156.2	1250	N/A	Fg

A su vez, las NPs de óxidos metálicos constituyen una importante alternativa como productos biocidas para los monumentos pétreos, por las ventajas que presentan principalmente: su carácter inorgánico, mayor superficie específica y el tamaño de la partícula. Por lo tanto, los óxidos metálicos nanoestructurados son de gran interés como agentes antifúngicos, debido a su inocuidad, compatibilidad, con el material pétreo así como el amplio espectro de actividad que presenta contra diferentes microorganismos (La Russa *et al.*, 2014).

En cambio, Sierra-Fernández *et al.*, 2018 reporta que las NPs de $Mg(OH)_2$, $Ca(OH)_2$ y sus respectivas combinaciones $Mg(OH)_2/Ca(OH)_2$ han mostrado un comportamiento y estabilidad favorable cuando han sido expuestas a factores como: la humedad relativa, el tiempo de exposición y la concentración de CO_2 , antes de ser aplicadas al material pétreo dolomítico y calcítico atendiendo así, su composición mineralógica de los sustratos pétreos a tratar, ya que debido a su carácter básico, estos materiales al entrar en contacto con superficies que han sufrido procesos de acidificación, producidos por agentes de deterioro en piedra de tipo carbonatada (caliza, dolomía, mármol), en morteros, cerámicos, pueden modificar el pH y conducir a su desacidificación (Giorgi *et al.*, 2010).

Para concluir, se demostró que los dos métodos de síntesis demostraron tener similitud ya que el tamaño de la NPs y su morfología se ve afectado por la temperatura a la cual se realiza el tratamiento, debido a esta similitud, es consecuente que los resultados de su actividad fueran similares. Adicionalmente, el hecho es que las dos síntesis permiten utilizarse para la elaboración de NPs de ZnO y MgO y en su caso hidróxido nitrato de zinc dihidratado.

9. CONCLUSIÓN

Basado en los análisis de los resultados, se puede concluir que:

Todas las NPs de ZnO son capaces de inhibir a bajas concentraciones a los cuatro hongos biodeteriorantes. Siendo la NP de ZnO (S6) obtenida vía co-precipitación más activa con valores de CMI y CMF más bajos (desde 78.1 a 625 µg/mL).

El modo de acción de la mayoría de las NPs de ZnO fue de tipo fungicida, de acuerdo a su relación CMI/CMF.

Las NPs de ZnO evaluadas presentaron una mejor actividad contra los hongos *P. maculans* y *P. eupyrena* con un coeficiente de correlación superior al 0.9904.

Las NPs de hidróxido nitrato de zinc dihidratado sintetizados por los dos métodos de síntesis poseen una buena capacidad para controlar el crecimiento de los hongos biodeteriorantes evaluados. La NP M19.2 obtenida vía co-precipitación presento mayor actividad contra los hongos *A. niger*, *P. oxalicum*, *P. maculans* y *P. eupyrena*, con valores de CMI y CMF más bajos (156.2 a 625 µg/mL). Este resultado permite proponer el uso del hidróxido nitrato de zinc como una opción más en el control de los distintos hongos causantes del biodeterioro.

El modo de acción determinado para las NPs de hidróxido nitrato de zinc dihidratado de acuerdo a su relación CMI/CMF es de tipo fungicida.

Las NPs de hidróxido nitrato de zinc dihidratado evaluadas presentaron tener mayor actividad contra el hongo: *P. eupyrena* con un coeficiente de correlación de 0.9667.

Todas las NPs de MgO sintetizadas por el método de co-precipitación poseen una buena capacidad de inhibición contra tres de los hongos (*A. niger*, *P. oxalicum* y *P. maculans*) biodeteriorantes a concentraciones de 156.2 a 2.5 µg/mL.

El modo de acción determinado para las NPs de MgO de acuerdo a su relación CMI/CMF es de tipo fungicida.

Las NPs de MgO evaluadas presentaron una mejor actividad contra el hongo *P. oxalicum* con un coeficiente de correlación de 0.9591.

Ninguna de las NPs de MgO logró inhibir *P. eupyrena*.

Por el contrario, las NPs de Mg(OH)₂ mostraron los valores más bajos de CMI y CMF, particularmente contra *A. niger* y *P. oxalicum* con concentraciones de 156.2 a 625 µg/mL.

La NP de Mg(OH)₂ (M11) sintetizada por el método de co-precipitación, presentó una mejor actividad contra el hongo *P. oxalicum* con un coeficiente de relación de 0.9591.

Ninguna de las NPs de Mg(OH)₂ logró inhibir a *P. eupyrena*

La actividad antifúngica de las NPs está más relacionada a sus diferentes morfologías que tamaño.

La buena actividad fungicida mostrada por las NPs a concentraciones bajas, son una opción viable para la aplicación de estas NPs en forma de recubrimientos para la prevención del biodeterioro y restauración de monumentos históricos.

Respecto al método de síntesis, se concluye que los dos métodos de síntesis son recomendables, ya que presentan tener buenos resultados contra cada uno de los diferentes hongos dependiendo del compuesto.

8. Referencias bibliográficas

1. Alava, I., Gonzalez, A., Ortiz de Urbina, G., Yurramendi, L., y Valero, J. M. (1995). Deterioro de Materiales pétreos por hongos filamentosos en conjuntos monumentales del área de San Sebastián. *Munibe Ciencias Naturales*, 47, 3–6.
2. Allsopp, D., Seal, K. J., y Gaylarde, C. C. (2004). *Introduction to biodeterioration*. United Kingdom: Cambridge University Press.
3. Almendárez-Camarillo, A. y González-Calderón, J. (2011). Nanomateriales: su crecimiento, caracterización estructural y tendencias, *Ide@s CONCYTEG*, 6 (72), 772–787.
4. Azam, A., Ahmed, A. S., Oves, M., Khan, M. S., y Memic, A. (2012). Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and-negative bacterial strains. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3527–3535.
5. Baglioni, P., y Giorgi, R. (2006). Soft and hard nanomaterials for restoration and conservation of cultural heritage. *Soft Matter*, 2(4), 293–303.
6. Bertinetti, L., Drouet, C., Combes, C., Rey, C., Tampieri, A., Coluccia, S., y Martra, G. (2009). Surface characteristics of nanocrystalline apatites: effect of Mg surface enrichment on morphology, surface hydration species, and cationic environments. *Langmuir*, 25(10), 5647-5654.
7. Beyth, N., Houry-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W., y Hazan, R. (2015). Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 1–16
8. Byrappa, K., & Yoshimura, M. (2013). *Handbook of hydrothermal Technology: Technology for Crystal Growth and Materials Processing*. William Andrew.

9. Calabrese, V., Cornelius, C., Cuzzocrea, S., Iavicoli, I., Rizzarelli, E., & Calabrese, E. J. (2011). Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Molecular aspects of medicine*, 32(4-6), 279–304.
10. Caravaca, I., Colorado, D., Fernández, V., Paneque, P., y Puente, R. (1996). Patrimonio cultural y desarrollo regional. *Revista EURE-Revista de Estudios Urbano Regionales*, 22(66), 1–11.
11. Corral-Aguado, A., Martínez-Torres, P., Gomez-Ortiz, N., Pichardo-Molina, J., De la Rosa-García, S., Borjas-García, E., y Medina, A. (2016). Synthesis of Mg doped ZnO with hexagonal shape by hydrothermal method. *Microscopy Microanalysis*, 22(3), 1882–1883.
12. Cui, H., Wu, X., Zhang, D., Zhang, J., Xiao, H., y Chen, Y. (2015). Thermotolerance and Antibacterial Properties of MgO-Triclosan Nanocomposites. *Procedia Engineering*, 102, 410–416.
13. Dakal, T., y Cameotra, S. (2012). Microbially induced deterioration of architectural heritages: routes and mechanisms involved. *Environmental Sciences Europe*, 24(1), 1–36.
14. Danielle, V.; Taglieri, G., y Quaresima, R. (2008). The nanolimes in cultural heritage conservation: Characterization and analysis of the carbonation process, *Journal of Cultural Heritage*, 9(3). 294–301.
15. de Castro, R. D., de Souza, T. M. P. A., Bezerra, L. M. D., Ferreira, G. L. S., de Brito Costa, E. M. M., & Cavalcanti, A. L. (2015). Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 417.

16. De la Rosa-García, S. C., Fuentes, A. F., Gómez-Cornelio, S., Zagada-Domínguez, U., y Quintana, P. (2018). Structural characterization of antifungal $\text{CaZn}_2(\text{OH})_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nanoparticles obtained via mechanochemical processing. *Journal of Materials Science*, 53, 13758–13768.
17. De la Rosa-García, S. C., Martínez-Torres, P., Gómez-Cornelio, S., Corral-Aguado, M. A., Quintana, P., y Gómez-Ortíz, N. M. (2018b). Antifungal Activity of ZnO and MgO Nanomaterials and Their Mixtures against *Colletotrichum gloeosporioides* Strains from Tropical Fruit. *Journal of Nanomaterials*, 2018, 1–9.
18. Delgado, G. C. (2016). Riesgos Ambientales de la nanotecnología: nanopartículas y nanoestructuras. *Escuela de Ciencias Naturales*, 34–39.
19. Di, D.R., He, Z.Z., Sun, Z.Q., y Liu, J. (2012). A new nano-cryosurgical modality for tumor treatment using biodegradable MgO nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(8), 1233–1241.
20. Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Britt, D. W., y Anderson, A. J. (2013). Antifungal activity of ZnO nanoparticles and their interactive effect with a biocontrol bacterium on growth antagonism of the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Biometals*, 26(6), 913–924.
21. Ditaranto, N., van der Werf, I. D., Picca, R. A., Sportelli, M. C., Giannossa, L. C., Bonerba, E.... y Sabbatini, L. (2015). Characterization and behaviour of ZnO-based nanocomposites designed for the control of biodeterioration of patrimonial stoneworks. *New Journal of Chemistry*, 39(9), 6836–6843.
22. Fernández-Osorio, A., Castañeda-Guzmán, R., Vázquez-Olmos, A., y Huanosta-Tera, A. (2007). Photoacoustic and dielectric study of lead zirconate titanate nanoparticles. *Ferroelectrics*, 361(1), 92–104.

23. Fernández–Osorio, A., Jiménez–Segura, M., Vázquez–Olmos, A., y Sato–Berru, R. (2011). Turquoise blue nanocrystalline pigment based on $\text{Li}_{1.33}\text{Ti}_{1.66}\text{O}_4$: Synthesis and characterization. *Ceramics International*, 37(5), 1465–1471.
24. Fernández–Osorio, A., Rivera, C., Vázquez–Olmos, A., y Chávez, J. (2015). Luminescent ceramic nano-pigments based on terbium-doped zinc aluminate: Synthesis, properties and performance. *Dyes and Pigments*, 119, 22–29.
25. Fernandez-Osorio, A., Vazquez-Olmos, A., Sato-Berru, R., Escudero, R., Fernández-Osorio, A., Vázquez-Olmos, A... y Escudero, R. (2009). Hydrothermal synthesis of Co_3O_4 nanooctahedra and their magnetic properties. *Reviews on Advanced Materials Science*, 22, 60–66.
26. Fort, R. (2007). Polímeros sintéticos para la conservación de materiales pétreos. *Ciencia, Tecnología y Sociedad para una conservación sostenible del patrimonio pétreo*, 71–82.
27. Gadd, G., y Dyer, T. (2017). Bioprotection of the built environment and cultural heritage. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1152–1156.
28. Gadd, G.M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, 111(1), 3–49.
29. Gambino M, Ahmed M.A.A.A, Villa F, y Cappitelli F. (2017). Zinc oxide nanoparticles hinder fungal biofilm development in an ancient Egyptian tomb. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 122,92–99.
30. Giorgi, R., Baglioni, M., Berti, D., y Baglioni, P. (2010). New methodologies for the conservation of Cultural Heritage: Micellar solutions, microemulsions

- and hydroxide nanoparticles. *Accounts of Chemical Research*, 43(6), 695–704.
31. Giorgi, R.; Bozzi, C.; Dei, L.; Gabbiani, CH.; Ninham, BW., y Baglioni P. (2005). Nanoparticles of $Mg(OH)_2$: Synthesis and application to paper conservation, *Langmuir*, 21(18), 8495–8500.
32. Gómez, G. (2013). Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación en Discapacidad*, 2(1), 18–22.
33. Gómez-Aleixandre, C., Albella, J. M., Ojeda, F., y Martí, F. J. (2003). Síntesis de materiales cerámicos mediante técnicas químicas en fase vapor (CVD). *Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 42(1), 27–31.
34. Gómez-Cornelio, S., Ortega-Morales, O., Morón-Ríos, A., Reyes-Estebanez, M., y De la Rosa-García, S. (2016). Changes in fungal community composition of biofilms on limestone across a chronosequence in Campeche, Mexico. *Acta Botánica Mexicana*, 117, 59–77.
35. Gómez-Villalba, L. S., López-Arce, P., y Fort, R. (2010). La aportación de la nanociencia a la conservación de bienes del patrimonio cultural. *Patrimonio Cultural de España*, (4), 42–55.
36. Gondal, M. A., Alzahrani, A. J., Randhawa, M. A., y Siddiqui, M. N. (2012). Morphology and antifungal effect of nano-ZnO and nano-Pd-doped nano-ZnO against *Aspergillus* and *Candida*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47, 1413–1418.
37. Griffin, P. S., Indictor, N., y Koestler, R. J. (1991). The biodeterioration of stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories, and treatment. *International Biodeterioration*, 28(1–4), 187–207.

38. Hammer, Ø., 2009. New methods for the statistical analysis of point alignments. *Comput. Geosci.* 35, 659–666.
39. He, L., Liu, Y., Mustapha, A., y Lin, M. (2011). Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiological Research*, 166(3), 207–215.
40. Hemeg, H. A. (2017). Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 8211–8225.
41. Henle, J., Simon, P., Frenzel, A., Scholz, S., y Kaskel, S. (2007). Nanosized BiOX (X = Cl, Br, I) Particles Synthesized in Reverse Microemulsions. *Chemistry of Materials*, 19(3), 366–373.
42. Henríquez, Y., Lourdes, R., Domínguez-Quintero, O., Martínez, S., D'ornelas, L., Krentzien, H., y Casanove, M.-J (2008). Síntesis y caracterización de óxidos de hierro nanoparticulados soportados en PVP y sílice. *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela*, 23(4), 29–35.
43. Huang, L., Li, D.-Q., Lin, Y.-J., Wei, M., Evans, D. G., y Duan, X. (2005). Controllable preparation of nano-MgO and investigation of its bactericidal properties. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(5), 86–993.
44. Hueck, H. J. (2001). The biodeterioration of materials—an appraisal. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 48(1–4), 5–11.
45. Huh, A. J., y Kwon, J. Y. (2011). Nanoantibiotics: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 156(2), 128–145.
46. Janaki, A.C., Sailatha, E., y Gunasekaran, S., (2015). Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles.

- Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 144, 17–22.
47. Jáuregui, S., Sánchez, O., y Perales, O. (2011). Efecto de la temperatura de recocido en la cristanilidad. *Sciéndo*, 14(1–2), 56–66.
48. Jenkins, R., y Snyder, R. L. (2012). *Introduction to X-ray Powder Diffractometry*. New York: John Wiley & Sons.
49. Karimiyan, A., Najafzadeh, H., Ghorbanpour, M., y Hekmati-Moghaddam, S. H. (2015). Antifungal Effect of Magnesium Oxide, Zinc Oxide, Silicon Oxide and Copper Oxide Nanoparticles Against *Candida albicans*. *Zahedan Journal Research of Medical Sciences*, 17(10), 1–3.
50. Koestler, R.J. Charola, A. E., Wypesky, M., y Lee, J. J. (1985), Microbiologically induced deterioration of dolomitic and calcitic stone as viewed by scanning electron microscopy. *International Congress on the Deterioration and Conservation of Stone*, 2, 612–626.
51. Kumar, A., y Kumar, J. (2008). On the synthesis and optical absorption studies of nano-size magnesium oxide powder. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 69(11), 2764–2772.
52. Kumar, R., Umar, A., Kumar, G., y Nalwa, H. S. (2016). Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. *Ceramics International*, 46(5), 940–3961.
53. La Russa, M. F.; Macchia, A.; Ruffolo, S. A.; De Leo, F.; Barberio, M.; Barone, P.; Crisci, G. M., y Urzi, C. (2014). Testing the antibacterial activity of doped TiO₂ for preventing biodeterioration of cultural heritage building materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 96, 87–96.

54. Lemire, J. A., Harrison, J. J., y Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6), 371–384.
55. Li, J., Sang, H., Guo, H., Popko, J. T., He, L., White, J. C.,.....y Xing, B. (2017). Antifungal mechanisms of ZnO and Ag nanoparticles to *Sclerotinia homoeocarpa*. *Nanotechnology*, 28(15), 1–10.
56. Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D., Brunet, L., Liga, M., Li, D., y Alvarez, P. (2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research*, 48(18), 4591–4602.
57. Lin, K.-F., Cheng, H.-M., Hsu, H.-C., Lin, L.-J., y Hsieh, W.-F. (2005). Band gap variation of size-controlled ZnO quantum dots synthesized by sol-gel method. *Chemical Physics Letters*, 409(4–6), 208–211.
58. Liu, C., Xie, X., y Cui, Y. (2012). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection. *Nano-Antimicrobials*, 465–494
59. Livage, J., Henry, M., y Sanchez, C. (1998). Sol-Gel Chemistry of Transition Metal Oxides. *Progress in Solid State Chemistry*, 18(4), 259–341.
60. López-Arce, P., Varas, M., Dewanckele, J., Pieters, K., Vázquez-Calvo, C., Álvarez de Buergo, M., Fort, R. (2010). Modification of the pore system of dolostone and granite after sodium sulphate salt crystallization test. *Proceedings 12th Euroseminar on Microscopy Applied to Building Materials*. Presented at the 12th Euroseminar on Microscopy Applied to Building Materials. 60–61.
61. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., y Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of Microorganisms: 13th Edition*. USA: Benjamin Cummings.

62. Manley, E. P., y Evans, L. J. (1986). Dissolution of feldspars by low-molecular-weight aliphatic. *Soil Sciences*, 141(2), 7.
63. Mansch, R., y Bock, E. (1998). Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria. *Biodegradation*, 9(1), 47v64.
64. Martinez-Boubeta, C., Balcells, L., Cristòfol, R., Sanfeliu, C., Rodríguez, E., Weissleder, R., y Martínez, B. (2010). Self-assembled multifunctional Fe/MgO nanospheres for magnetic resonance imaging and hyperthermia. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 362–370.
65. May, E., Lewis, F., Tayler, S., Seaward, M., y Al Isopp, D. (1993). Microbial deterioration of building stone— a review. *Biodeterioration Abstracts*, 7, 109–123.
66. Mehrotra, R. C. (1988). Synthesis and reactions of metal alkoxides. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 100(1–3), 1–15.
67. Padmavathy, N., y Vijayaraghavan, R. (2008). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. *Science and Technology of Advanced Materials*, 9(3), 1–7.
68. Palanikumar, L., Ramasamy, S. N., y Balachandran, C. (2012). Size-dependent antimicrobial response of zinc oxide. *Nanobiotechnology*, 8(2), 111–117.
69. Palmer, R. J., y Hirsch, P. (1991). Photosynthesis-based microbial communities on two churches in Northern Germany: Weathering of granite and glazed brick. *Geomicrobiology Journal*, 9(2–3), 103–118.
70. Parak, J. W., Gerion, D., Pellegrino, T., Zanchet, D., Micheel, C., Williams, C. S., y Alivisatos, P. A. (2003). Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology*, 14(7). 1–15.

71. Pérez-Taborda, J. A., Gallego, J. L., Stiven, W., y Henry, R. (2008). Películas nanoestructuradas de óxido de zinc. *Scientia et Technica*, 14(39), 416–421.
72. Raghunath, A., y Perumal, E. (2017). Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(2), 137–152.
73. Raghupathi, K. R., Koodali, R. T., y Manna, A. C. (2011). Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. *Langmuir*, 27(7), 4020–4028.
74. Rai, M.K., Deshmukh, S.D., Ingle, P., y Gade, K. (2012). Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 841–852.
75. Ruffolo, S. A., La Russa, M. F., Malagodi, M., Rossi, C. O., Palermo, A. M., y Crisci, G. M. (2010). ZnO and ZnTiO₃ nanopowders for antimicrobial stone coating. *Applied Physics A*, 100(3), 829–834.
76. Saiz-Jimenez, C. (1997). Biodeterioration vs Biodegradation: The role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on historic buildings. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40(2v4), 225–232.
77. Sawai, J., Kojima, H., Igarashi, H., Hashimoto, A., Shoji, S., Sawaki, T.... y Shimizu, M. (2000). Antibacterial characteristics of magnesium oxide powder. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(2), 187–194.
78. Sawai, J., y Yoshikawa, T. (2004). Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 803–809.

79. Sierra-Fernandez A, Gomez-Villalba, L. RabanaL M, y Fort R. (2017). New nanomaterials for applications in conservation and restoration of stony materials: A review. *Materiales de Construcción*, 67(325), 1–18.
80. Sierra-Fernandez, A., De la Rosa-García, S. C., Yañez-Macías, R., Guerrero-Sanchez, C., Gomez-Villalba, L. S., Gómez-Cornelio, S.... y Quintana, P. (2018). Sol–gel synthesis of $Mg(OH)_2$ and $Ca(OH)_2$ nanoparticles: a comparative study of their antifungal activity in partially quaternized p(DMAEMA) nanocomposite films. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 1–12.
81. Sierra-Fernández, A., Gómez-Villalba, L. S., Rabanal, M. E., y Fort, R. (2014). New consolidant product based on nanoparticles to preserve the dolomitic stone heritage. *Science, Technology and Cultural Heritage*, Taylor & Francis Group, London, 139–144.
82. Sierra-Fernandez, A., Gómez-Villalba, L., De la Rosa-García, S.C., Rabanal, G.M.E., Quintana, P., y Fort, R (2017). Aplicación de nanomateriales para la consolidación y protección del patrimonio pétreo. *Escuela Superior de Arte del principado de Asturias. ATEMPO*, 1,106–123
83. Singh, P., y Nanda, A. (2013). Antimicrobial and antifungal potential of zinc oxide nanoparticles in comparison to conventional zinc oxide particles. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(11), 457v463.
84. Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H., Ann, L. C., Bakhor, S.y K., Mohamad, D. (2015). Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), 219–242.
85. Soria-Castro, M. (2014). Determinación de la actividad antimicrobiana de $Ca [Zn(OH)_3]_2 \cdot 2H_2O$ y ZnO . (Tesis de maestría). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Mérida

86. Soria-Castro, M., De la Rosa-García, S. C., Quintana, P., Gómez-Cornelio, S., Sierra-Fernandez, A., y Gómez-Ortíz, N. (2018). Broad spectrum antimicrobial activity of $\text{Ca}(\text{Zn}(\text{OH})_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and ZnO nanoparticles synthesized by the sol-gel method. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 1–11.
87. Southam, C.M., y Ehrlich, J., (1943). Effects of extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology*, 33, 517–524.
88. Stankic, S., Suman, S., Haque, F., y Vidic, J. (2016). Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 1–20.
89. Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L., y Klabunde, K. J. (2002). Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. *Langmuir*, 18(17), 6679–6686.
90. Tamilselvi, P., Yelilarasi, A., Hema, M., y Anbarasan, R. (2013). Synthesis of hierarchical structured MgO by sol-gel method. *Nano Bulletin*, 2(1), 1–4.
91. Tang, Z.-X., y Lv, B.-F. (2014). MgO nanoparticles as antibacterial agent: preparation and activity. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(3), 591–601.
92. Taniguchi, N. (1974). On the basic concept of nano-technology. *Proceedings of the International Conference on Production Engineering*. Tokyo. Part II Japan Society of Precision Engineering. *Nano Ethics*, 1, 1–2.
93. Urzì, C., De Leo, F., de Hoog, S., y Sterflinger, K. (2000). Recent Advances in the Molecular Biology and Ecophysiology of Meristematic Stone-Inhabiting Fungi. *Of Microbes and Art*, 3–19.

94. Van der Werf, I.D., Ditaranto, N., Picca, R.A., Sportelli, M.C., y Sabbatini, L., (2015). Development of a novel conservation treatment of stone monuments with bioactive nanocomposites. *Heritage. Science.* 3, 1–9.
95. Vázquez Olmos, A. R., Vega Jiménez, A. L., y Paz Díaz, B. (2018). Mecanosíntesis y efecto antimicrobiano de óxidos metálicos nanoestructurados. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 11(21), 29–44.
96. Vázquez–Olmos, A., Redón, R., Fernández–Osorio, A., y Saniger, J. (2005a). Room temperature synthesis of Mn_3O_4 nanorods. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 81(6), 1131–1134.
97. Velazco, M. (2009). Gestión turística del patrimonio cultural: enfoques para un desarrollo sostenible del turismo cultural. *Cuaderno de Turismo.* 23, 237–253.
98. Villanueva, A., Cañete, M., Roca, A. G., Calero, M., Veintemillas-Verdaguer, S., Serna, C. J., y Miranda, R. (2009). The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology*, 20(11), 1–9.
99. Villareal, N.E., (2005). Nanotecnología: La nanocatálisis y sus aplicaciones, *Ciencia UANL*, 8(2), 165–167.
100. Wang, L., Hu, C., y Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249.
101. Warscheid, T., & Braams, J. (2000). Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46(4), 343v368.

102. Xie, R.-C., y Shang, J. K. (2007). Morphological control in solvothermal synthesis of titanium oxide. *Journal of Materials Science*, 42(16), 6583–6589.
103. Yamamoto, O., Fukada, T., Kimata, M., Sawai, J., y Sasamoto, T. (2001). Antibacterial characteristics of MgO-mounted spherical carbons prepared by carbonization of ion-exchanged resin. *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 109(4), 363–365.
104. Yamamoto, O., Ohira, T., Alvarez, K., y Fukuda, M. (2010). Antibacterial characteristics of CaCO₃-MgO composites. *Materials Science and Engineering B*, 173(1–3), 208–212.
105. Yamane, M., Aso, S., y Sakaino, T. (1977). Preparation of a Gel from Metal Alkoxide and its Properties as Precursors of Oxide Glass. *Journal of Materials Science*, 13(4), 865–870.
106. Yao, W.-T., y Yu, S.-H. (2007). Recent advances in hydrothermal syntheses of low dimensional nanoarchitectures. *International Journal of Nanotechnology*, 4(1-2), 2–22.
107. Zanella, Z. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Revista Interdisciplinaria En Nanociencia y Nanotecnología*, 5(1), 1–12.
108. Zhou, J., Xu, N., y Wang, Z. L. (2006). Dissolving behavior and stability of ZnO wires in biofluids: a study on biodegradability and biocompatibility of ZnO nanostructures. *Advanced Materials*, 18(18), 2432–2435.