



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO
AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO REGIONAL**

GABRIEL VICTOR GAZONI FERREIRA

**DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE MADEIRA *PINUS ELLIOTTII*
TRATADA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Presidente Prudente – SP
2022



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO
AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO REGIONAL**

GABRIEL VICTOR GAZONI FERREIRA

**DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE MADEIRA *PINUS ELLIOTTII*
TRATADA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Daniela Vanessa Moris de Oliveira

Coorientadora:
Prof.^a Dr.^a Alba Regina de Azevedo Arana

575.46
F383d

Ferreira, Gabriel Victor Gazoni.

Determinação da ação antifúngica de madeira *Pinus elliottii* tratada com nanopartículas de prata / Gabriel Victor Gazoni Ferreira. – Presidente Prudente, 2022.
41 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2022.

Bibliografia.

Orientadora: Dr.^a Daniela Vanessa Moris de Oliveira

Co-orientadora: Dr.^a Alba Regina de Azevedo Arana

1. *Pinus elliottii*. 2. Nanopartículas de prata.
3. Atividade Antifúngica. 4. *Aspergillus niger*. I. Título.

GABRIEL VICTOR GAZONI FERREIRA

**DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE MADEIRA *PINUS ELLIOTTII*
TRATADA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Presidente Prudente, 23 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Vanessa Moris de Oliveira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof.^a Dr.^a Keila Zaniboni Siqueira Batista
Fundação Universidade Regional de Blumenau - FURB
Blumenau - SC

Prof. Dr. Sérgio Marques Costa
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Homero e Leodete, meu irmão Pedro, minha namorada Elena e outros familiares e amigos próximos, pelo incentivo constante, apoio emocional e financeiro.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Daniela Vanessa Moris de Oliveira e à coorientadora Prof.^a Dr.^a Alba Regina Azevedo Arana. Às professoras doutoras, Angela Mitie Otta Kinoshita e Keila Zaniboni Siqueira Batista. E à minha colega, também arquiteta e urbanista, Dr.^a Jacqueline Tamashiro, pela paciência, gentileza, cooperação e toda contribuição científica.

Cada pessoa que esteve ao meu lado, torcendo pelos meus resultados enquanto eu explorava os desafios da rotina de laboratório. Daniel, Laira, Maria, Flávia, Adriane e outras pessoas que foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Determinação da ação antifúngica de madeira *Pinus elliottii* tratada com nanopartículas de prata

A madeira é um material utilizado na construção civil de diversas maneiras e apresenta um expressivo valor estético. Problemas que prejudicam seriamente suas propriedades estéticas e estruturais são, em especial, o aparecimento de pragas e o desenvolvimento de fungos filamentosos, ou seja, os bolores, e outros micro-organismos. Este trabalho propôs avaliar a ação antifúngica das nanopartículas de prata (NPAg) contra *Aspergillus niger* em madeira *Pinus elliottii*. A síntese de NPAg foi realizada por meio da redução química do nitrato de prata (AgNO_3) utilizando borohidreto de sódio (NaBH_4), confirmada pela coloração amarelada, característica e por espectrofotometria UV-Vis, com detecção do pico plasmônico em 400 nm. Foi então realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de NPAg sobre *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) e, em seguida, avaliou-se a atividade antifúngica da madeira *Pinus elliottii* com NPAg. As amostras de madeira foram cortadas em pequenos cubos de 5x5x5 mm, esterilizadas em autoclave e tratadas com diferentes concentrações de NPAg (428, 214 e 107 ppm). Após o tratamento, foram inseridas em placas de cultura contendo meio de cultura inoculado com o *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) a fim de obter a formação do biofilme, seguido de plaqueamento para quantificar as UFC/mL e, por fim, verificou-se a atividade metabólica por meio da redução do Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio (MTT). Observou-se que o CIM foi de 53,56 ppm e todas as amostras de madeira tratadas com NPAg inibiram o crescimento e a atividade metabólica de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001). Foi possível concluir que as amostras de madeira impregnadas com NPs evitam a proliferação de micro-organismos, podendo trazer benefícios para a saúde dos habitantes e para o meio ambiente e conferir qualidade e durabilidade nas construções que utilizam madeira.

Palavras-chave: *Pinus elliottii*. Nanopartículas de prata. Atividade Antifúngica. *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

Determination of the antifungal action of *Pinus elliottii* wood treated with silver nanoparticles

Wood is a material used in civil construction in many ways and has a great aesthetic value. Problems that seriously impair its aesthetic and structural properties are the appearance of pests and the development of filamentous fungi, that is, molds, and other microorganisms. This work proposed to evaluate the antifungal action of silver nanoparticles (NP_{Ag}) against *Aspergillus niger* on *Pinus elliottii* wood. The synthesis of NP_{Ag} was carried out from the chemical reduction of silver nitrate (AgNO₃) using sodium borohydride (NaBH₄) and confirmed by the yellowish coloration and by UV-Vis spectrophotometry, with detection of the plasmonic peak at 400 nm. determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of NP_{Ag} on *Aspergillus niger* (CCCD-AA 001), then the antifungal activity of *Pinus elliottii* wood with NP_{Ag} was evaluated. The wood samples were cut into small 5x5x5mm cubes, sterilized and treated with different concentrations of AgNP, after the treatment they were placed in culture plates containing culture medium inoculated with *Aspergillus niger* (CCCD-AA 001) in order to obtain the formation of the biofilm, followed by plating to establish the CFU/mL and finally, the metabolic activity was verified through the reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) It was observed that the MIC was 53.56 ppm, all samples of wood treated with NP_{Ag} inhibited the growth and metabolic activity of *Aspergillus niger* (CCCD-AA 001). It was possible to conclude that the wood samples impregnated with NPs prevent the proliferation of pests, fungi, bacteria and other microorganisms, which can bring benefits to the health of the inhabitants and the environment, providing quality and durability in buildings that use wood.

Keywords: *Pinus elliottii*. Silver nanoparticles. Antifungal Activity. *Aspergillus niger*.

LISTA DE SIGLAS

NPAg	Nanopartícula de prata
NP	Nanopartícula
SiO₂	Dióxido de silício
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação
IBN	Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia
AgNO₃	Nitrato de prata
NaBH₄	Boro-hidreto de sódio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
ASTM	American Society for Testing and Materials
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
PBS	Phosphate Buffered Saline ou Tampão fosfato-salino
DMSO	Dimetil sulfóxido
BRCAST	Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
Tween-20	Tensoativo hidrofílico, polissorbato por etoxilação do monolaurato de sorbitano
RPMI 1640	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
UV-vis	Radiação Ultra-Violeta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

rpm	Rotações por minuto
ppm	Partes por milhão
M	Molaridade
h	Hora
m	Metro
mm	Milímetro
min	Minuto
nm	Nanômetro
µL	Microlitro
mL	Mililitro
C+	Controle positivo
C-	Controle negativo
MTT	(3-(4,5- dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
°C	Grau Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Síntese de nanopartículas de prata (NPAg) - AgNO₃ adicionado à solução de NaBH₄ gota a gota, sob agitação a 200 rpm.....20
- Figura 2 - Diluição 1/10 de 2-5 x 10⁵ UFC/mL em água destilada estéril, suplementado com 0,1% de Tween 20, para obtenção do inóculo de uso de 2-5 x 10⁶ UFC/mL pronto para distribuir nas placas de microtitulação contendo as diferentes concentrações de NPAg22
- Figura 3 - Distribuição de 100µL da suspensão de 2-5 x 10⁶ UFC/mL de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) em placa de microtitulação contendo as diferentes concentrações de NPAg, concentração final de 1,0 a 2,5 10⁶ UFC/mL23
- Figura 4 - Lâminas e Palitos.....23
- Figura 5 - Palitos Agrupados23
- Figura 6 - Cubos de 5x5x5mm23
- Figura 7 - Tubos no agitador orbital.....27
- Figura 8 - Amostras em diferentes concentrações de nanopartículas de prata (NPsAg)27
- Figura 9 - Organização dos corpos de prova da madeira *Pinus* impregnadas com nanopartículas de prata (NPsAg) em placa de cultura de 24 poços29
- Figura 10 - Concentração inibitória mínima de NPsAg sobre *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001)32
- Figura 11 - Prevalência de Inibição do crescimento de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) em madeiras tratadas com nanopartículas de prata em diferentes concentrações (ppm) em relação ao controle de viabilidade do fungo33
- Figura 12 - Avaliação da atividade metabólica de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) em razão do tratamento com nanopartículas de prata em diferentes concentrações (ppm) e controles (média e desvio padrão dos valores de absorbância). Teste ANOVA de dois fatores, letras diferentes, demonstram diferenças significativas, diagnosticadas pelo

teste *a posteriori* (Bonferroni) $p < 0,05$. Letras maiúsculas comparação entre os tratamentos, letras minúsculas comparação entre as espécies .

.....34

Figura 13 - Prevalência de redução da atividade metabólica de *Aspergillus niger* (CCCD - AA 001) em razão do tratamento com nanopartículas de prata em diferentes concentrações (ppm) e a atividade metabólica do controle de viabilidade (controle de crescimento)34

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Esquematização da concentração final de nanopartículas de prata (NPAg) em placa de microtitulação de 96 poços após inoculação de 100µL da suspensão de $2-5 \times 10^6$ UFC/mL de *Aspergillus niger* (CCCD-AA 001)24
- Quadro 2 - Esquema da organização da placa de cultura de 24 poços, em amostras de madeira *Pinus elliottii* impregnadas com as nanopartículas de prata (NPAg)28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Síntese de nanopartículas de prata	20
3.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de NPAg contra <i>Aspergillus niger</i>	21
3.2.1	Diluição das NPsAg e preparo das soluções de trabalho	21
3.2.2	Preparação das placas de microdiluição	21
3.2.3	Preparação do inóculo de <i>Aspergillus niger</i>	21
3.2.4	Inoculação da placa de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de NPAg	23
3.2.5	Interpretação dos resultados	24
3.3	Preparação das amostras de madeira	25
3.3.1	Impregnação das amostras	26
3.4	Produção do biofilme de <i>Aspergillus niger</i> (CCCD- AA 001) em madeira <i>Pinus elliottii</i> tratada com nanopartículas de prata (NPsAg)	28
3.5	Determinação da Unidade Formadora de Colônias (UFC) para a avaliação da inibição do crescimento do biofilme de <i>Aspergillus niger</i> (CCCD- AA 001) em madeira <i>Pinus elliottii</i> tratada com nanopartículas de prata (NPAg)	29
3.6	Quantificação do biofilme – ensaio MTT, e porcentagem (%) de redução da atividade metabólica do biofilme exposto à NPAg	30
3.7	Análise estatística	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Síntese de nanopartículas de prata (NPAg)	32
4.2	Concentração inibitória mínima de nanopartículas de prata sobre <i>Aspergillus niger</i> (CCCD- AA 001)	32

4.3	Determinação da Unidade Formadora de Colônias (UFC) para a avaliação da inibição do crescimento do biofilme <i>Aspergillus niger</i> (CCCD- AA 001) em madeira <i>Pinus elliottii</i> tratada com nanopartículas de prata (NPsAg).....	33
4.4	Quantificação do biofilme – ensaio MTT, e porcentagem (%) de redução da atividade metabólica do biofilme exposto à NPAg.....	33
5	DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país extenso e com vastas florestas que produzem diversas espécies de madeira para o uso na construção civil. Segundo Gonçalves e Bartholomeu (2000), a madeira é um material importante utilizado na construção, seja na estrutura, no fechamento, na decoração, seja em quaisquer outras funções possíveis. Pode ser usada como matéria-prima para uma ampla quantidade de produtos e substâncias que são empregados em vários setores industriais. No entanto, por causa da sua composição química e estrutura anatômica, pode ser atacada por agentes deterioradores, como por exemplo, fungos, térmitas e brocas marinhas, que a utilizam como fonte de energia (PAES; MELO; LIMA, 2007).

Os agentes deterioradores da madeira que causam maior dano são os fungos e as térmitas (cupins). A maioria das manchas e bolores e o consumo da madeira são provocados por fungos, cujo crescimento e desenvolvimento dependem da temperatura (25 a 30°C), da umidade ($\approx 20\%$), do oxigênio (O) e do pH (4,5 a 5,5) adequados (CLAUSEN, 2010). Já os cupins de madeira seca conseguem se desenvolver em material lignocelulósico com umidade de 10 a 12%, ao passo que os de hábitos subterrâneos são dependentes de umidade mais alta, que retiram do solo ou de outro substrato. A capacidade de resistir à deterioração é determinada de acordo com o tempo que a madeira suporta o ataque de tipos específicos de agentes deterioradores, ou do quanto de biomassa é consumido durante o tempo de exposição a esses agentes, conforme determina a American Society for Testing and Materials ASTM (2017), no método de teste ASTM-D2017.

Existem espécies madeireiras que possuem resistência ao ataque de agentes deterioradores (organismos xilófagos) por apresentarem características peculiares, como a presença de extrativos de caráter fenólico e componentes minerais da madeira (presentes nas cinzas) que acarretam na inibição do ataque dos agentes biológicos. Os minerais fazem parte da constituição química da madeira e dependem das condições ambientais sob as quais a árvore cresce e de sua localização na planta. A sílica, sob a forma de dióxido de silício (SiO_2), ocorre no interior das células, nos raios e no parênquima axial. A dureza dos silicatos lhes confere propriedades que reduzem o ataque de fungos e, em especial, de insetos e brocas marinhas (SOUZA *et al.*, 2009). Madeiras que apresentam alto teor de silicato ($>2\%$) em sua estrutura são consideradas resistentes ao ataque de cupins e brocas marinhas (PANSHIN; DE

ZEEUW, 1980). Foi constatado que madeiras com aproximadamente 0,5% de sílica causam rápido desgaste em serras, durante o processamento primário e secundário, provavelmente provocado pela ação abrasiva do composto e o mesmo efeito é causado às mandíbulas dos agentes xilófagos mencionados (FARMER, 1968). No entanto, há espécies que possuem baixo teor de extrativos fenólicos e cinzas, que são susceptíveis ao ataque de agente xilófago, sendo necessária a aplicação de substâncias químicas para aumentar sua vida útil. Dessa forma, são madeiras de baixa durabilidade, cuja vida útil mais curta resulta na necessidade de reposições e maior exploração dos recursos florestais (PAES *et al.*, 2013).

Para prevenir o ataque dos organismos xilófagos, são aplicados métodos de tratamento da madeira com uso de substâncias preservativas, a fim de prolongar a sua vida útil. No entanto, a maioria dos produtos desenvolvidos para esta finalidade inclui na sua formulação substâncias químicas, como arsênio, cromo, cobre e boro, que tornam o processo oneroso, além de serem danosos ao homem e ao ambiente, exigindo cuidados na manipulação, dosagem, vazamentos e descarte ou reutilização do material tratado após o término de sua utilização (EUFLOSINO, 2015). Na indústria de tratamento de madeira, geralmente buscam redução de custos com o processo, como a utilização de menos produto e resultado satisfatório, deixando na maioria das vezes de lado a busca por métodos e, ou, produtos que acarretem na diminuição dos riscos à saúde e à vida do homem (MORESCHI, 2011).

O desenvolvimento de pesquisas sobre substâncias preservativas para madeira sempre esteve em expansão, sendo necessário o seu direcionamento para a análise de produtos com menor potencial de danos ambientais e à saúde de outros organismos (BRAND; ANZALDO; MORESCHI, 2006). Assim, tratamentos que envolvam métodos alternativos para a proteção da madeira são importantes para viabilizar custos, além de reduzir impactos ao ambiente.

Já faz um tempo que o uso de nanopartículas é estudado e inserido em novos produtos. Com a mudança na combinação e estrutura dos materiais em escala nano, novos materiais são obtidos, apresentando propriedades específicas, especialmente a atividade antimicrobiana, que é estudada como opção frente ao aumento da resistência que os micro-organismos têm desenvolvido em relação aos antibióticos convencionais (DASHTI *et al.*, 2012).

Em 2013, o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC) fundou a Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBN), que foi lançada com

o objetivo de criar, integrar e fortalecer ações governamentais para promover o desenvolvimento científico e tecnológico da nanotecnologia, focado na promoção da inovação na indústria e na prosperidade econômica e social do país. Já os nanossensores, a nanomedicina e a nanossegrurança tornaram-se assuntos prioritários a partir de 2019 (SILVA; SANTOS, 2020).

As NPs apresentam alta superfície de contato, isso costuma proporcionar maiores reatividades químicas, mais atividades biológicas e comportamentos catalíticos, do que particulados de maiores dimensões (GARNETT; KALLINTERI, 2006). No Brasil já foram desenvolvidos diversos produtos com nanopartículas, tais como: Grafite (Faber-Castell®); Secador de cabelo (Nanox/TAIFF®); Nanodosímetro molecular de uso pessoal (Ponto Quântico®); Pigmentos especiais para tintas (Bunge®); Língua eletrônica (Embrapa); Partículas de prata para evitar o odor (Diklatex®); Sistema de liberação controlada de medicamentos (Nanocore®); Revestimentos (Nanox Tecnologia S.A.); Cosméticos para controle de sinais de envelhecimento (Boticário®); Prótese arterial (Nano Endoluminal) (BRASIL, 2010).

As nanopartículas de prata (NPAg) têm inúmeras aplicações, tais como: antimicrobiana, nas embalagens alimentares, peles artificiais, tratamentos de água, curativos; também podem ser considerados biossensores, catalizadores, antifalsificação, na indústria de papel, odontológica, entre outras (BRASIL, 2010).

A citotoxicidade das NPs de prata é bem elevada, funcionando contra muitos micro-organismos tais como bactérias e fungos (CARLSON *et al.*, 2008).

As propriedades antimicrobianas dos metais prata e do cobre (tanto na forma de NPs como na forma iônica) são amplamente difundidas, sendo a prata a mais utilizada. O seu efeito contra fungos patogênicos não era tão estudado quanto o efeito antibacteriano (PINTO, 2012). No caso específico da prata, Pinto (2012) ressalta que este metal é utilizado desde os egípcios, sobretudo na medicina moderna desde o início do século XX. Carniel (2013) cita que as NPs de prata têm um potencial na agricultura importantíssimo, pois seu uso é apropriado para todas as fases da agricultura, indo do plantio a fertilizantes e defensivos agrícolas.

Zanatta *et al.* (2018) concluíram que NPs de dióxido de titânio formam uma camada protetora que proporciona maior estabilidade e resistência térmica em amostras de madeira, em razão do caráter cerâmico das NPTiO₂. As análises termogravimétricas realizadas determinaram que na madeira sem tratamento ocorre perda de massa de 70% aos 380°C e 11% de resíduos aos 700°C, diferentemente

da madeira tratada com NPTiO_2 , que nestas temperaturas atingiu percentagens de 45% e 46%, respectivamente. Em adição, verificou-se pelos testes de chama, que o tempo para a ignição da madeira modificada foi retardado em cerca de 7 vezes em relação ao controle. O estudo concluiu que a modificação da madeira pelo processo solvotermal assistido por micro-ondas foi eficiente na redução da inflamabilidade e degradação da madeira exposta ao aumento de temperatura.

Em recente pesquisa com NPAg, Valcorte (2021) identificou que durante a secagem, peças de madeira impregnadas com solução de NPs de 100 ppm obtiveram menor perda de massa que as amostras sem adição de NPAg. Além disso, o teste de molhabilidade indicou que as tábuas com impregnação de 100 e 40 ppm mostraram maior potencial hidrofóbico. Os resultados deste estudo constataram que a impregnação de nanopartículas de prata traz benefícios de resistência e higroscopicidade para as madeiras do *Eucalyptus grandis* (VALCORTE, 2021).

A madeira de seringueira contém altos teores de carboidratos que contribuem para uma baixa durabilidade biológica, isso inviabiliza um processo de secagem natural e dificulta sua utilização após a exploração do látex. Porém, o tratamento dessa espécie de madeira com NPAg é capaz de melhorar as suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas, além de catalisar o processo de secagem, reduzir a higroscopicidade e aumentar a estabilidade dimensional (LATORRACA *et al.*, 2022).

Embora algumas pesquisas apontem a relevância de um possível impacto negativo das NPs no meio ambiente, Martínez *et al.* (2020) alegam que elas também podem ter um impacto benéfico que deve ser cuidadosamente considerado. As nanopartículas podem ter uma influência positiva em seu entorno com algumas de suas aplicações. Entre a ampla gama de atividades potenciais que elas podem possuir para reduzir a poluição e melhorar a saúde ambiental como promover sistemas de produção com menor gasto de energia ou auxiliar no processo de tratamento de água e solo.

Como se pode notar, nos parágrafos anteriores, o avanço das pesquisas envolvendo NPs e madeira tem revelado diversos benefícios que comprovam a importância da realização de mais estudos relacionados.

Após o levantamento dessas informações, para o desenvolvimento deste trabalho, foi escolhida a espécie de madeira *Pinus elliottii*, que é uma espécie muito utilizada para funções que não exigem resistência mecânica, porém se trabalhado de maneira adequada e com dimensionamento correto ele pode ser utilizado para

cumprir função estrutural e até mesmo cobrir grandes vãos livres. Além disso, é uma madeira de reflorestamento, que apresenta rápido crescimento e facilidade de manejo, além de ser amplamente utilizada no Brasil, que é o maior exportador mundial de compensado de *Pinus* e exporta grandes quantidades desse material. Ela é utilizada para construção, molduras, produtos beneficiados e pré-acabados, tais como portas, janelas e torneados, armários e gabinetes para banheiro, cozinha, tamponamento de móveis domésticos, comerciais, de jardinagem e institucionais, além de pallets e contêineres, estruturas e casas pré-fabricadas, e sua produção está basicamente concentrada nas regiões Sul e Sudeste do país. As plantações de *pinus* para serraria são manejadas com fuste alto, as mudas são plantadas com espaçamento de 3 x 2 m, e são realizadas três desramas entre o quinto e sétimo ano da planta, e quatro desbastes dos 10 aos 14 anos, geralmente para plantações com rotação de 26 anos (FLORIANO *et al.*, 2009).

A utilização de materiais nanoestruturados tem se difundido cada vez mais na indústria brasileira. Há um grande interesse na utilização de nanopartículas de prata (NPAg), uma vez que elas possuem propriedades como boa condutividade, elevado efeito catalítico, alta área superficial e excelente atividade antimicrobiana e podem ser utilizadas para reduzir infecções, prevenir a colonização bacteriana em superfícies de próteses e outros materiais, também é utilizada na indústria de alimentos, tratamento de água e fabricação de tintas antibacterianas. O efeito antimicrobiano da prata é reconhecido há muito anos (ANTUNES *et al.*, 2013).

O uso de nanopartículas na proteção da madeira, de acordo com Borges (2019), tem avançado bastante nos últimos anos, fato que abre portas para novos experimentos e aplicações do conhecimento dentro da área de preservação de madeiras. Ainda segundo a autora, estudos com a aplicação de nanopartículas de óxidos de zinco e cobre comprovaram eficácia no combate ao cupim de madeira seca. Além disso, as NPs aplicadas em madeira costumam conferir proteção UV, conforme foi constatado no trabalho de Salla, Pandey e Srinivas (2012).

Nesse contexto, perante a necessidade de investigar a eficácia de métodos alternativos que tornem evidente a potencialidade de novos produtos para o tratamento de madeira, pode-se asseverar que a presente pesquisa, que tem como hipótese a eficácia do uso de nanopartículas de prata (NPAg) no tratamento da madeira de *Pinus elliottii* contra a ação do fungo *Aspergillus niger*, se torna importante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar se as amostras de madeira *Pinus elliottii* impregnadas com nanopartículas de prata (NPsAg) apresentam ação antifúngica contra *Aspergillus niger*.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar as nanopartículas de prata (NPsAg).
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de NPAg contra *Aspergillus niger* (ATCC)
- Verificar a atividade antifúngica de NPAg impregnada em madeira *Pinus elliottii* contra *Aspergillus niger* (ATCC) por meio dos testes de biofilme e plaqueamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese de nanopartículas de prata

De acordo com o método proposto por Guidelli *et al.* (2013), as NP_{Ag} foram sintetizadas a partir da redução química do nitrato de prata (AgNO_3) utilizando boro-hidreto de sódio (NaBH_4). Adicionou-se 200 mL de uma solução de AgNO_3 2 mM em 200 mL de uma solução de NaBH_4 8 mM. Todo o sistema foi mantido sob agitação vigorosa por 6 horas em 200 rpm e temperatura ambiente, a fim de garantir a redução total da prata.

Durante a síntese, o NaBH_4 é adicionado em excesso em relação ao AgNO_3 , já que ele atua como agente redutor dos íons prata e é responsável pela estabilização das nanopartículas. Isso ocorre pois os íons do NaBH_4 se adsorvem nas superfícies das NPs, envolvendo-as e gerando cargas em suas superfícies, que criam repulsão eletrostática entre as NPs, evitando que se agreguem (MELO JR. *et al.*, 2012).

Figura 1 - Síntese de nanopartículas de prata (NP_{Ag}) - AgNO_3 adicionado à solução de NaBH_4 gota a gota, sob agitação a 200 rpm



Fonte: O autor.

3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de NPAG contra *Aspergillus niger*

3.2.1 Diluição das NPsAg e preparo das soluções de trabalho

A diluição das concentrações de NPAG foi realizada para determinar um ponto de corte para a ação antifúngica das NPAG. Séries de diluições de 2 vezes baseadas em 1000 µL NPAG/1000 µL, foram preparadas em meio de cultura RPMI 2% G, 2x concentrado. O meio RPMI 2% G usado nas placas foi preparado com o dobro da concentração final para permitir uma diluição de 50%, uma vez que o inóculo foi adicionado. Esta abordagem permitiu que o inóculo fosse preparado em água destilada. Sendo assim, foram preparadas diluições seriadas de NPAG e a concentração inicial foi de 428,5 ppm e a final foi de 2,14 ppm.

3.2.2 Preparação das placas de microdiluição

Foram utilizadas placas de microdiluição com 96 poços estéreis e descartáveis, com poços de fundo chato, sem tampas de baixa evaporação, com capacidade de aproximadamente 300 µL por poço.

Nos poços de 2 a 11 de cada coluna da placa de microdiluição, foram dispensados 100 µL de cada tubo, contendo a concentração correspondente (2 x a concentração final) de NPAG. Nos poços 1 e 12, foram dispensados 100 µL do meio RPMI 2% G com o dobro da concentração.

Sendo assim, nas colunas de 2 a 11 foram adicionados 100 µL de 2x a concentração final de NPAG em meio RPMI 2% G com o dobro da concentração, sendo a maior concentração de 428,5 ppm e a menor de 0,42 ppm. As colunas 01 e 12 receberam o dobro da concentração do meio RPMI 2% G.

3.2.3 Preparação do inóculo de *Aspergillus niger*

Para todos os experimentos foi utilizada a cepa CCCD- AA 001 de *Aspergillus niger*. A concentração final do inóculo foi de $1,0 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, utilizando-se o método de suspensão dos conídios, como descrito a seguir e, de acordo com a metodologia desenvolvida pelo "The European Committee on

Antimicrobial Susceptibility Testing - EUROCAST”, com modificações propostas pelo “*The Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BRCAST*” (EUROCAST, 2015).

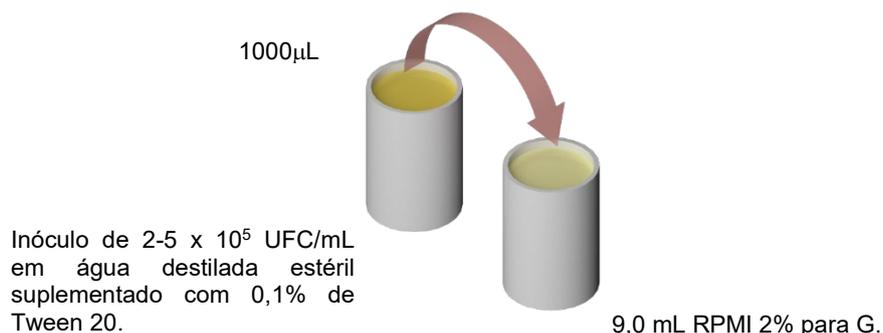
Os isolados foram subcultivados sobre ágar batata dextrose e incubados a 35°C. As suspensões dos inóculos foram preparadas de culturas frescas e maduras após cinco dias de cultura.

A cultura de cinco dias de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) foi coberta com aproximadamente 5 mL de água destilada estéril suplementada com 0,1% de Tween 20. Posteriormente, os conídios foram cuidadosamente raspados com um *swab* estéril e o material foi transferido com uma pipeta estéril para um tubo do tipo Falcon também estéril. A suspensão foi homogeneizada por 15 segundos em agitador giratório a aproximadamente 2.000 rpm.

Após agitação, a amostra foi examinada para a presença de hifas e aglomerados. Como foi observado um número significativo de hifas (> 5% das estruturas fúngicas), 5 mL da suspensão foi filtrada em filtro estéril com poros de diâmetro de 11 µm. Esta etapa removeu as hifas para obtenção de uma suspensão composta por conídios.

A suspensão foi ajustada a uma concentração de $2-5 \times 10^6$ conídios/mL, pela contagem de conídios em uma câmara hemocitométrica (câmara de Neubauer), após o ajuste da concentração foi realizada uma diluição de 1:10 em meio RPMI 1640 (com L-glutamina e indicador de pH sem bicarbonato) suplementada com glicose para uma concentração final de 2% (RPMI 2% G) estéril para obter a concentração de trabalho do inóculo de $2-5 \times 10^5$ UFC/mL, conforme a Figura 2.

Figura 2 - Diluição 1/10 de $2-5 \times 10^5$ UFC/mL em água destilada estéril, suplementado com 0,1% de Tween 20, para obtenção do inóculo de uso de $2-5 \times 10^6$ UFC/mL pronto para distribuir nas placas de microtitulação contendo as diferentes concentrações de NPAg



Fonte: O autor.

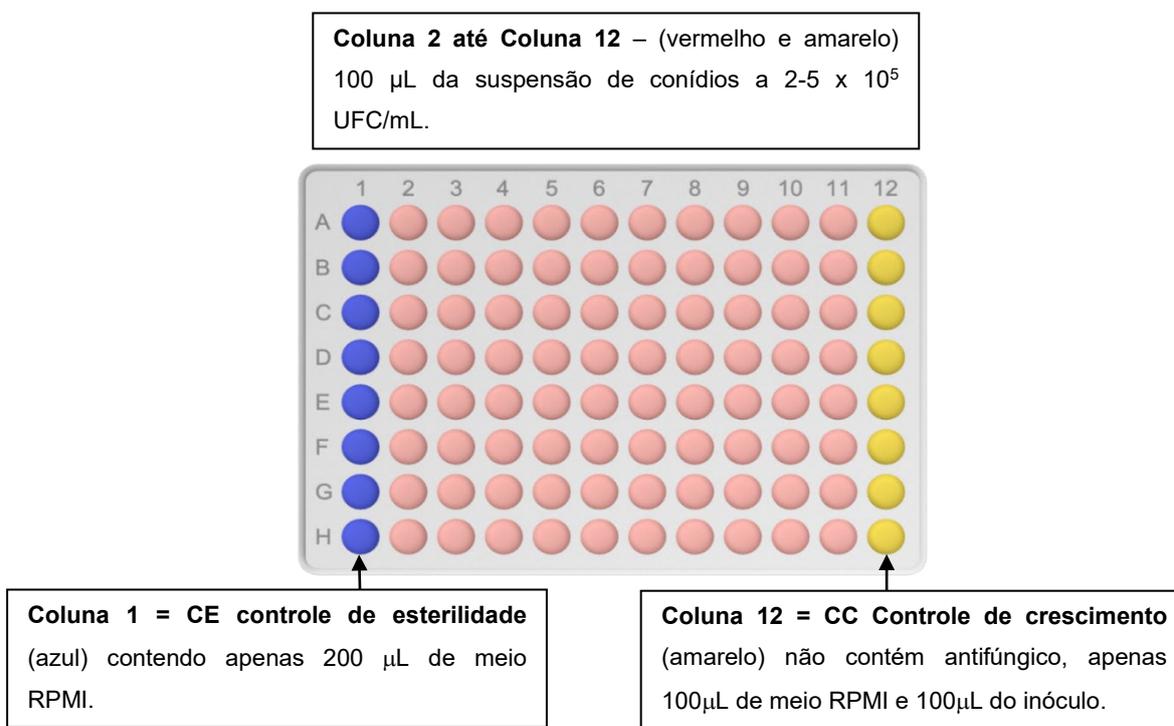
3.2.4 Inoculação da placa de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de NPAg

Define-se a CIM para os NPAg como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle (coluna 12).

As placas de microdiluição foram inoculadas dentro de 30 min da preparação da suspensão do inóculo, a fim de manter a concentração de conídios viáveis. A suspensão de conídios a $2-5 \times 10^5$ UFC/mL foi agitada e inoculada em cada poço da placa de microdiluição, sem tocar no conteúdo do poço, com o auxílio de pipeta multicanal em 100µL, no sentido horizontal-fileiras A, B, C, D, E, F, G e H nos orifícios de 2 a 12 de cada fileira.

Ao final desse procedimento obteve-se a concentração da NPAg e a densidade do inóculo requeridas (inóculo final = $1-2,5 \times 10^5$ UFC/mL), como demonstrado na Figura 3 e no Quadro 1.

Figura 3 - Distribuição de 100µL da suspensão de $2-5 \times 10^6$ UFC/mL de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) em placa de microtitulação contendo as diferentes concentrações de NPAg, concentração final de $1,0$ a $2,5 \times 10^6$ UFC/mL



Fonte: O autor.

Quadro 1 - Esquematização da concentração final de nanopartículas de prata (NPAg) em placa de microtitulação de 96 poços após inoculação de 100µL da suspensão de $2-5 \times 10^6$ UFC/mL de *Aspergillus niger* (CCCD-AA 001)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<u>A</u>	c-	214,25	107,13	53,56	26,78	13,39	6,70	3,35	1,67	0,84	0,42	c+
<u>B</u>	c-	214,25	107,13	53,56	26,78	13,39	6,70	3,35	1,67	0,84	0,42	c+
<u>C</u>	c-	214,25	107,13	53,56	26,78	13,39	6,70	3,35	1,67	0,84	0,42	c+
<u>D</u>	c-	214,25	107,13	53,56	26,78	13,39	6,70	3,35	1,67	0,84	0,42	c+
<u>E</u>	c-	214,25	107,13	53,56	26,78	13,39	6,70	3,35	1,67	0,84	0,42	c+
<u>F</u>	c-	214,25	107,13	53,56	26,78	13,39	6,70	3,35	1,67	0,84	0,42	c+
<u>G</u>	c-	214,25	107,13	53,56	26,78	13,39	6,70	3,35	1,67	0,84	0,42	c+
<u>H</u>	c-	214,25	107,13	53,56	26,78	13,39	6,70	3,35	1,67	0,84	0,42	c+

Fonte: O autor.

C - Controle negativo: 200µL de meio RPMI 2% G

C + Controle positivo (crescimento): 100µL inóculo + 100µL RPMI 2% G

Linhas A a H: 100 µL de suspensão fúngica (inóculo final = $1-2,5 \times 10^5$ UFC/mL

Colunas de 2 a 11: concentrações finais de NPAg após inoculação da suspensão fúngica

As placas de microdiluição foram incubadas sem agitação a 37°C por 48 ± 2 h em ar atmosférico.

Foi realizada a contagem de viabilidade para controle de qualidade e confirmação de que os poços testes continham entre $1 - 2,5 \times 10^5$ UFC/mL do seguinte modo: 10 µL da suspensão do inóculo foi diluída em 2 mL de água destilada estéril suplementada com 0,1% Tween 20. A suspensão foi agitada em um agitador giratório a 2.000 rpm. Posteriormente, 100 µL desta suspensão foi plaqueada na superfície de ágar batata dextrose, e incubada por 48 h. Contagem de 100 a 250 colônias são esperadas de uma suspensão teste aceitáveis.

3.2.5 Interpretação dos resultados

A concentração inibitória mínima (CIM) de NPAg, ou seja, o ponto final de crescimento fúngico, foi lido visualmente, registrando-se o grau de crescimento fúngico de cada poço. A concentração de NPAg que não produz crescimento visível a olho foi considerada o valor da CIM. Além disso, também foi realizado outro teste, com a utilização da resazurina, um indicador redox, que a princípio apresenta coloração azulada, e após a entrada nas células, em resposta à atividade metabólica

das células vivas, é reduzida a resorufina, que tem uma coloração rosa e é fluorescente. Dessa forma, após o período de incubação e a leitura visual para determinação da CIM de NPAg, foram adicionadas 20µL da solução de resazurina, teste que foi revelado após um período de incubação de duas horas.

3.3 Preparação das amostras de madeira

Para o desenvolvimento do trabalho foi escolhida a espécie de madeira *Pinus elliottii*, amostras medindo 5x5x5 mm. A escolha desse tamanho de amostras se deu em razão da necessidade de colocar essas amostras dentro de uma placa de cultura de 24 poços, o que permitiu uma redução significativa na quantidade de placas e no custo do experimento.

Para cortar as amostras de madeira foram utilizadas uma serra circular de bancada com disco de 10 polegadas, e uma serra de meia esquadria, com disco do mesmo tamanho, após cortar lâminas de 5 mm de espessura (Figura 4), as quais foram fatiadas em palitos de seção 5 x 5 mm (Figura 5). Esses palitos foram agrupados e envolvidos com fita crepe para possibilitar o corte transversal em serra de meia esquadria, que resultou nos cubos de 5 x 5 x 5 mm (0,125 cm³) (Figura 6).

Figura 4 - Lâminas e palitos



Fonte: O autor.

Figura 5 - Palitos agrupados



Fonte: O autor.

Figura 6 - Cubos de 5x5x5mm



Fonte: O autor.

Após o corte, foram descartadas as amostras que estavam em contato com a fita crepe, para evitar que resíduos de cola pudessem interferir no experimento. Os pequenos cubos de madeira foram todos embalados em papel grau cirúrgico e autoclavados para eliminar qualquer possível contaminação prévia.

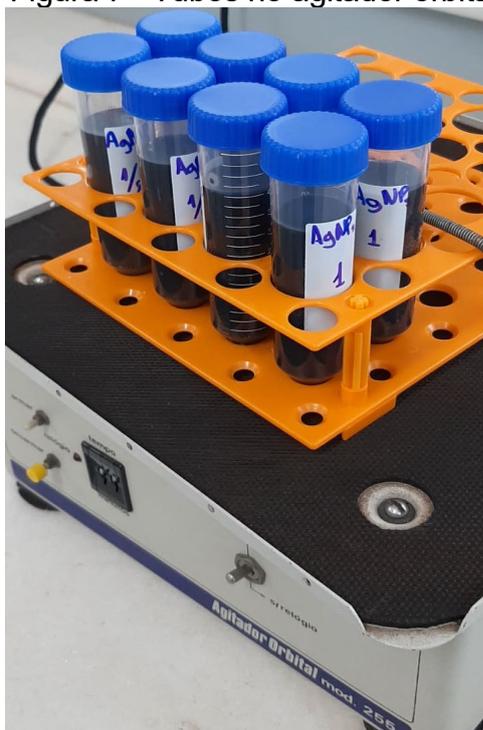
Com a finalidade de comparar os resultados do tratamento com NPs proposto neste trabalho, utilizando um produto eficaz e existente no mercado, decidiu-se preparar amostras tratadas com Stain preservativo Osmocolor[®]. Segundo o fabricante (Montana[®] Química LTDA, São Paulo, Brasil), esse produto é composto por 0,25% de IPBC e 99,75% de resinas, pigmentos, cargas minerais e solvente. Após aplicado, possibilita que a madeira apresente alta resistência a raios ultravioleta, fungos e adquira função hidrorrepelente. Porém, não é indicado para recipientes que entrarão em contato com alimentos, água e solo. Essas amostras, previamente esterilizadas, foram mergulhadas no produto e serviram como uma opção de controle negativo. As amostras foram imersas pelo período de uma hora no Stain, e depois foram retiradas para escorrer o excesso do produto, após 24 horas de secagem em estufa, com temperatura controlada de 37°C, foram novamente embaladas e autoclavadas para garantir a esterilidade do experimento.

3.3.1 Impregnação das amostras

A fim de descobrir a quantidade de NPs que as amostras eram capazes de absorver, foram colocadas 20 amostras de 0,125 cm³ e percebeu-se que cada amostra absorveu 0,125 mL da solução de nanopartículas.

Para impregnar as amostras com as nanopartículas, foram reservados três tubos Falcon de 50 mL. Nesses tubos foram adicionados 40 mL de NPs, sendo o primeiro com concentração de 428 ppm, o segundo com 214 ppm e o terceiro com 107 ppm. Em cada tubo foram inseridas 12 amostras de madeira, para haver reserva além das 4 que foram utilizadas. Com o objetivo de analisar visualmente a estabilidade das NPsAg, a mesma quantidade foi adicionada em outros tubos que não receberam as amostras de madeira. Foi constatado que não houve alteração visual nas NPs após a impregnação, o que indica que elas não se desestabilizaram.

Figura 7 - Tubos no agitador orbital



Fonte: O autor.

Os tubos com as amostras foram colocados em um agitador orbital (Figura 7) por um período de 60 minutos, após um intervalo de tempo igual, foram novamente agitados durante 60 minutos. Após esse processo de 3 horas de imersão, as amostras foram retiradas com a ajuda de pinças estéreis e colocadas em placas de Petri com espaçamento suficiente para secarem em estufa a 37°C, por um período de 24 horas (Figura 8).

Figura 8 - Amostras em diferentes concentrações de nanopartículas de prata (NPsAg)



Fonte: O autor.

3.4 Produção do biofilme de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) em madeira *Pinus elliottii* tratada com nanopartículas de prata (NPAg)

O próximo passo do experimento consistiu na montagem da placa de cultura (Figura 9), que se deu em face da necessidade de se trabalhar com amostras banhadas por três concentrações diferentes de NPAg e três grupos de controle, sendo um somente com as amostras de madeira (corpo de prova) e o meio de cultura, sem a presença do fungo, outro com meio de cultura e fungo, porém com as amostras que sofreram aplicação de *stain* e, por fim, um grupo de amostras de madeira, em meio de cultura com a aplicação de fungo. O experimento foi realizado em quadruplicata. Poços com apenas meio de cultura foram incluídos no ensaio como um controle da esterilidade da reação, bem como poços com inóculo em meio RPMI como controles de crescimento (100% de viabilidade celular), como demonstra o Quadro 2.

Foi utilizada a suspensão fúngica preparada de acordo com o item 2.2c e a concentração do inóculo foi de $2-5 \times 10^6$ UFC/mL. A suspensão de conídios a $2-5 \times 10^6$ UFC/mL foi agitada e 2,0 mL foram inoculados em cada poço da placa de 24 poços sem tocar no corpo de prova, com o auxílio de pipeta automática de 5,0 mL.

Quadro 2 - Esquema da organização da placa de cultura de 24 poços, em amostras de madeira *Pinus elliottii* impregnadas com as nanopartículas de prata (NPAg)

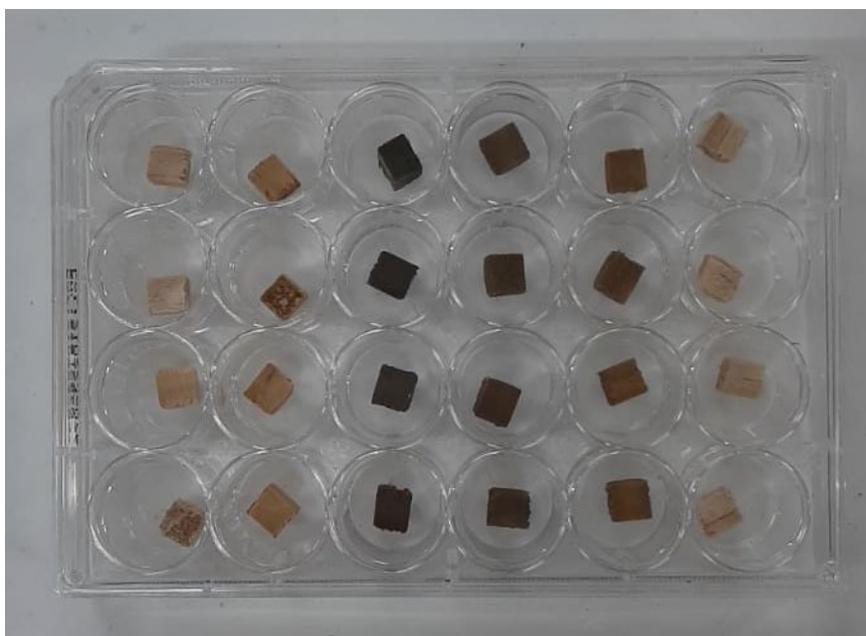
	1 (C-)	2	3	4	5	6 (C+)
A	Madeira sem fungo	Madeira com Stain + <i>A. niger</i>	Madeira com NPs (428ppm) + <i>A. niger</i>	Madeira com NPs (214ppm) + <i>A. niger</i>	Madeira com NPs (107ppm) + <i>A. niger</i>	Madeira + <i>A. niger</i>
B	Madeira sem fungo	Madeira com Stain + <i>A. niger</i>	Madeira com NPs (428ppm) + <i>A. niger</i>	Madeira com NPs (214ppm) + <i>A. niger</i>	Madeira com NPs (107ppm) + <i>A. niger</i>	Madeira + <i>A. niger</i>
C	Madeira sem fungo	Madeira com Stain + <i>A. niger</i>	Madeira com NPs (428ppm) + <i>A. niger</i>	Madeira com NPs (214ppm) + <i>A. niger</i>	Madeira com NPs (107ppm) + <i>A. niger</i>	Madeira + <i>A. niger</i>
D	Madeira sem fungo	Madeira com Stain + <i>A. niger</i>	Madeira com NPs (428ppm) + <i>A. niger</i>	Madeira com NPs (214ppm) + <i>A. niger</i>	Madeira com NPs (107ppm) + <i>A. niger</i>	Madeira + <i>A. niger</i>

Fonte: O autor.

Coluna 1: controle de esterilidade

Coluna 6: controle de crescimento ou 100% de viabilidade celular.

Figura 9 - Organização dos corpos de prova da madeira *Pinus* impregnadas com nanopartículas de prata (NPsAg) em placa de cultura de 24 poços



Fonte: O autor.

Em seguida, incubou-se a placa a 37°C por 4h para a fase de adesão das células. Após o período de incubação, aspirou-se o sobrenadante, adicionando-se 2,0 mL de RPMI em cada poço contendo a madeira e incubou-se por um período total de 72h (PIERCE *et al.*, 2008; SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008).

3.5 Determinação da Unidade Formadora de Colônias (UFC) para a avaliação da inibição do crescimento do biofilme de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) em madeira *Pinus elliotii* tratada com nanopartículas de prata (NPAg)

Após o tempo de incubação, o corpo de prova foi lavado com solução salina tamponada (PBS) estéril por 3 vezes e transferido para 10 mL de PBS, sonificado por 5 minutos, em vórtex.

Diluições decimais foram realizadas em PBS e a atividade antifúngica de cada corpo de prova foi avaliada pelo plaqueamento de 100 µL em ágar Sabouraud Dextrose (SDA), incubado a 30°C por até sete dias.

O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro (mL) foi calculado com base no número de colônias formadas multiplicado pelo fator de diluição (WILSON *et al.*, 2017).

A atividade fungicida foi considerada quando houve uma diminuição maior ou igual a 3 Log₁₀ UFC/mL em relação ao inóculo inicial, resultando em uma redução de 99,99% ou mais das UFC/mL, e a atividade fungistática foi considerada como redução do crescimento menor que 99,9% ou <3 Log₁₀ em UFC/mL do inóculo inicial (CANTÓN *et al.*, 2003).

Cada amostra foi testada individualmente e a média aritmética da triplicata das UFC/mL obtida foi utilizada para análise comparativa. Uma amostra da sequência de diluições e controles foi reservada para posterior análise de microscopia eletrônica.

Para contagem de UFC/mL foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{UFC/mL} = \text{número de colônias} \times 10^n}{q}$$

Onde n corresponde ao valor da diluição, e q à quantidade pipetada em mL, em cada placa de Petri, contendo ágar Sabouraud.

3.6 Quantificação do biofilme – ensaio MTT, e porcentagem (%) de redução da atividade metabólica do biofilme exposto à NPAg

A avaliação da atividade metabólica dos biofilmes foi realizada por meio do teste colorimétrico de redução de sais de MTT (Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio). O MTT solúvel em água é convertido por células fúngicas viáveis em cristais de formazan insolúveis em água, e de cor roxa. Quando esses são solubilizados com álcool isopropílico, a concentração pode ser determinada por meio de densidade óptica (espectrofotometria).

Para utilização do MTT, foi preparada uma solução mãe na concentração de 5mg/mL com solução salina tamponada (PBS). Após o tempo de incubação do biofilme, o corpo de prova disco foi lavado PBS estéril por 3 vezes e transferido para 10 mL de PBS, sonificado por 5 minutos, em vórtex. Uma alíquota de 100 µL foi destinada à avaliação da atividade metabólica em placas de microdiluição de 96 poços, foram acrescentados 100 µL de solução de MTT a cada poço. As microplacas foram incubadas por 3h a 37°C no escuro. Após a incubação, a solução de MTT foi removida de todos os poços. Em seguida, 100 µL de Dimetil Sulfóxido

(DMSO) a 0,5% foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazan MTT, as microplacas foram agitadas por 10 min em um agitador orbital. Posteriormente, o DMSO de cada poço foi transferido para outra placa de 96 poços e a absorbância foi lida em leitor de microplacas (Mindray, modelo MR 96-A, EUA), no comprimento de onda a 490 nanômetros (DO 490 nm).

Os efeitos da exposição dos corpos de prova – tratados com as diferentes concentrações de NPAG ao biofilme de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) – foram calculados como porcentagem (%) de redução de biofilme, calculado pela atividade metabólica do fungo, usando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Redução do Biofilme} = \frac{\text{D.O. do C}^+ - \text{D.O. do teste}}{\text{D.O. do C}^+} \times 100$$

Onde: D.O. do C⁺ é a média do controle positivo, e D.O. do teste é a média dos grupos de tratamento

3.7 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata, cujos resultados foram reportados calculando-se as médias de cada experimento, e os resultados de prevalência em porcentagem (%). Os dados de D.O. foram analisados pelos testes t-independente e x² para comparação da atividade metabólica entre biofilme. Aos dados de UFC/mL foram empregados o teste Kruskal-Wallis, seguidos de teste *a posteriori* de Dunn. Para todos os testes foram considerados valores significativos, os valores que apresentaram um p<0,05.

4 RESULTADOS

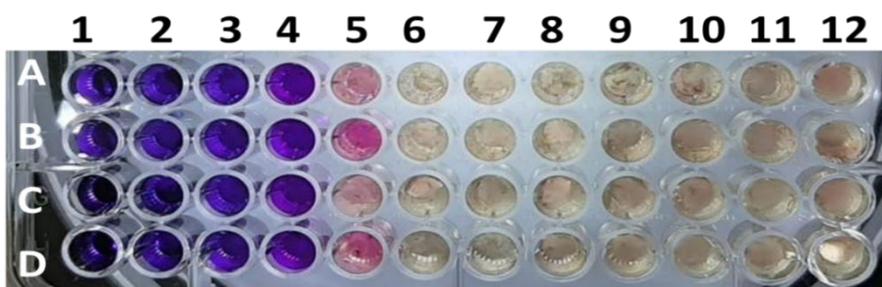
4.1 Síntese de nanopartículas de prata (NPAg)

A solução coloidal sintetizada pelo método de redução química, com concentração de prata de 428,5 ppm, apresentou coloração marrom (Figura 1). A confirmação da formação de nanopartículas se deu pela presença do pico plasmônico em 400 nm, obtido por espectrofotometria UV-Vis. O espectro de absorção com banda plasmon ressonante nesta região indica que as nanopartículas de prata possuem forma esférica (NORGUEZ, 2007; PINTO *et al.*, 2010; ANTUNES *et al.*, 2013). Variações de coloração podem ocorrer em virtude da extinção da luz incidente (absorção e/ou espalhamento) em faixas de comprimentos de onda específicas, que dependem fortemente do tamanho, da morfologia e da vizinhança química das nanopartículas (COSTA, 2011). A estabilidade do sistema provém do fato de que as nanopartículas formadas permanecem em suspensão e não se agregam para a formação de partículas maiores (MELO JR. *et al.*, 2012).

4.2 Concentração inibitória mínima de nanopartículas de prata sobre *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001)

A concentração inibitória mínima (CIM) de NPAg, ou seja, o ponto final de crescimento de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) foi 53,56 ppm, caracterizado pela ausência de crescimento fúngico nos poços da coluna 4, confirmado também pela redução da resazurina, que tem uma cor azul e depois de entrar na célula, em resposta à atividade metabólica das células vivas, é reduzida a resorufina, que tem uma cor rosa, conforme observado na Figura 10.

Figura 10 - Concentração inibitória mínima de NPsAg sobre *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001)

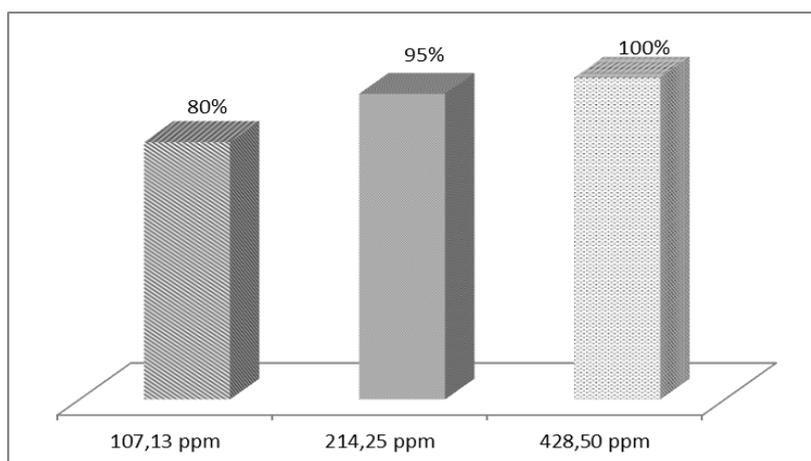


Fonte: O autor.

4.3 Determinação da Unidade Formadora de Colônias (UFC) para a avaliação da inibição do crescimento do biofilme *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) em madeira *Pinus elliottii* tratada com nanopartículas de prata (NPsAg)

A avaliação das unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) dos biofilmes revelou inibição do crescimento do *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) em todas as concentrações testadas em relação ao controle de viabilidade do fungo (controle de crescimento) ($p < 0,05$) (Figura 11).

Figura 11 - Prevalência de Inibição do crescimento de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) em madeiras tratadas com nanopartículas de prata em diferentes concentrações (ppm) em relação ao controle de viabilidade do fungo



Fonte: O autor.

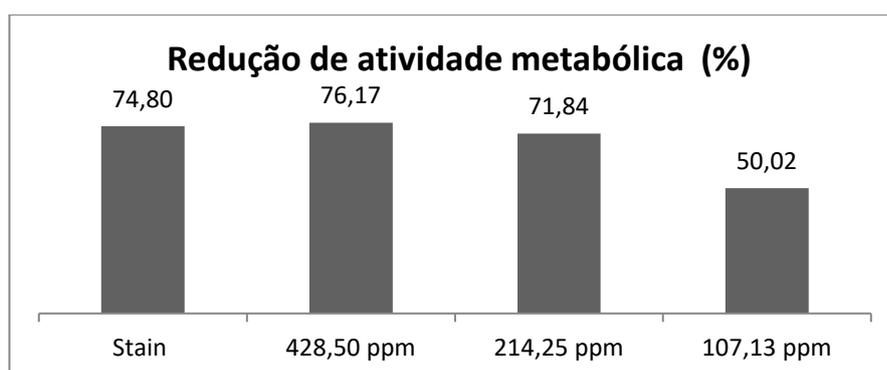
A atividade fungicida foi considerada, portanto, para concentração de 428,50ppm, cuja redução foi de 100% em relação ao inóculo inicial, e a atividade fungistática foi atribuída à concentração de 214,25 ppm, como redução do crescimento de 80% em relação ao inóculo inicial (CANTÓN *et al.*, 2003).

4.4 Quantificação do biofilme – ensaio MTT, e porcentagem (%) de redução da atividade metabólica do biofilme exposto à NPAg

Em relação à atividade metabólica das células viáveis do biofilme, observou-se maior atividade metabólica de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) no sem tratamento com NPAg (grupo controle de crescimento) em relação aos demais

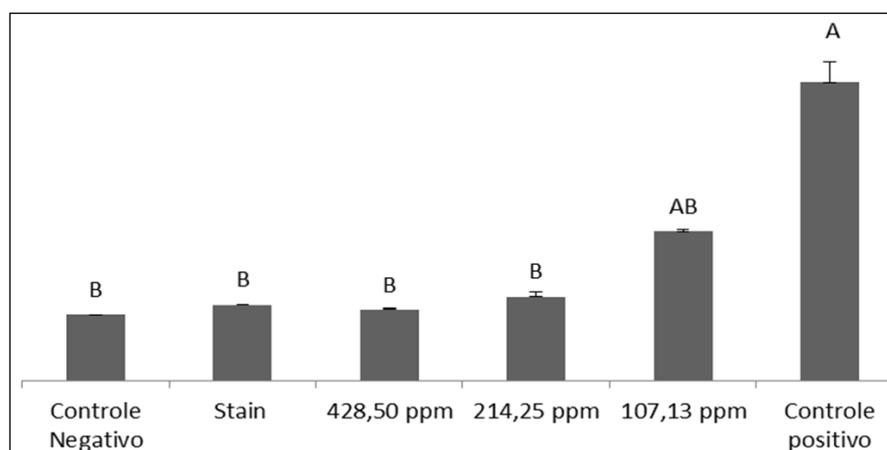
grupos tratados (Figura 12). Em relação à redução da atividade metabólica das células de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001), observou-se redução de atividade de 74,8%, 76,1% e 71,8 % nos grupos Stain, NPsAg 428,50 ppm e NPsAg 214,25 ppm respectivamente, e redução da atividade metabólica do fungo de 50,0% no grupo NPsAg 107,13 ppm (Figura 13).

Figura 12 - Avaliação da atividade metabólica de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) em razão do tratamento com nanopartículas de prata em diferentes concentrações (ppm) e controles (média e desvio padrão dos valores de absorbância). Teste ANOVA de dois fatores, letras diferentes, demonstram diferenças significativas, diagnosticadas pelo teste *a posteriori* (Bonferroni) $p < 0,05$. Letras maiúsculas comparação entre os tratamentos, letras minúsculas comparação entre as espécies



Fonte: O autor.

Figura 13 - Prevalência de redução da atividade metabólica de *Aspergillus niger* (CCCD - AA 001) em razão do tratamento com nanopartículas de prata em diferentes concentrações (ppm) e a atividade metabólica do controle de viabilidade (controle de crescimento)



Fonte: O autor.

5 DISCUSSÃO

As propriedades antimicrobianas das NPAg são conhecidas contra micro-organismos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus (ANTUNES *et al.*, 2013; WAHAB; MAMUN, 2020). A incidência desse efeito da prata se dá ao entrarem em contato com a membrana celular desses micro-organismos, causando danos no processo de respiração celular e permeabilidade, ligam-se também ao enxofre e ao fósforo presentes no DNA, inibindo a divisão celular (MORONES *et al.*, 2005; LEVIN *et al.*, 2009).

No estudo de Ribeiro (2020), foram obtidos resultados que demonstraram inibição em diferentes agentes patogênicos testados, com diferenças de CIM muito baixas de acordo com as espécies submetidas ao experimento. A autora demonstrou que as NPsAg em concentrações de 20 a 75µg/mL inibiram, além do crescimento de *Aspergillus niger*, o crescimento de *Penicillium funiculosum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* e *Trichophyton mentagrophytes*.

A pesquisa de Gutarowska *et al.* (2012) que constatou a eficácia de NPAg contra 32 linhagens de bactérias e fungos, pertencentes a 12 gêneros, responsáveis pela contaminação de museus e arquivos. Os autores testaram duas cepas de *Aspergillus niger*, uma de origem da ATCC (American Type Culture Collection) que apresentou CIM de 22,5 ppm e a outra coletada no museu central de tecidos da Polônia (CMT) com CIM de 45,00 ppm. Este trabalho também revelou que a concentração de 90 ppm foi efetiva contra todos os micro-organismos testados, já a de 45 ppm apresentou eficácia para 94% destes.

Dessa forma, é razoável inferir que o tratamento de madeira com NPAg pode ser eficaz contra outros micro-organismos. Além disso, é possível afirmar que o resultado do teste de CIM realizado no presente estudo, onde as NPAg na concentração de 53,56 ppm encontra-se de acordo com as pesquisas de Ribeiro (2020) e Gutarowska *et al.* (2012).

Falcão (2018), que estudou o uso de nanopartículas de prata associado com fluconazol, descobriu que as NPsAg apresentaram atividade fungistática e fungicida em baixas concentrações (entre 4 a 8 ppm e 8 a 16 ppm, respectivamente). Quando as NPsAg foram usadas em combinação com o fluconazol, foi possível reverter a resistência a cepas de *C. albicans*. A redução da CIM do fluconazol mudou de 87,5

para 99,8%. Todas as associações foram sinérgicas. Mesmo em concentrações subinibitórias, como 2 ppm (50% da CIM), as nanopartículas de prata foram capazes de inibir a formação do tubo germinativo.

Os resultados de Falcão (2018) apresentam atividade fungistática e fungicida em concentrações abaixo dos obtidos nesta pesquisa, fato comum por se tratar da ação contra um micro-organismo diferente. Mas são resultados que fortalecem a demonstração de qualidade do uso de NPsAg em promover ação fungistática e fungicida contra diferentes espécies de micro-organismos.

Melo Jr. *et al.* (2012) identificaram que a estabilidade do sistema provém do fato que as nanopartículas formadas permanecem em suspensão e não se agregam em partículas.

É possível constatar que obter uma síntese estável pode ser um desafio para a produção em escala industrial de madeira tratada com NPsAg, porém os resultados satisfatórios deste e de outros estudos citados são capazes de corroborar a aplicabilidade do tratamento sugerido, algo que pode ser explorado em novas produções científicas.

Outro fato interessante é que a coloração escura típica das NPsAg pode atribuir características estéticas interessantes para distinguir a madeira crua da que sofreu aplicação de NPs. Sabe-se que existem diferentes tipos de tratamento que alteram a cor das madeiras, como o tratamento com arseniato de cobre cromatado (CCA), que ficam com or esverdeada, ou o tratamento através da carbonização superficial da madeira, que apresenta coloração escura semelhante à das NPs que foram aplicadas em maior concentração.

Além dos ganhos relacionados à funcionalidade (como a ação antimicrobiana), essa coloração permite que as madeiras tratadas com NPsAg apresentem um aspecto visual característico capaz de se tornar elemento de valorização estética.

Seria interessante avaliar o uso de madeira impregnada com nanopartículas combinado com outros métodos de preservação, como complementação ao verniz, por exemplo, que é um produto que oferece apenas proteção superficial da madeira. Dessa forma, por meio de uma prévia aplicação de NPs, as madeiras poderão ter um nível de proteção na sua parte interna também.

Mohajerani *et al.* (2019) afirmam que no setor industrial as nanopartículas fornecem diversos benefícios, como novas possibilidades de produção que permitem

avanços tecnológicos, de saúde e ambientais. Os dados obtidos neste estudo apontam também que o tratamento de madeira com nanopartículas de prata proposto é viável e eficaz para aplicação nos diversos setores do mercado. Porém, apesar dos inúmeros benefícios demonstrados, é importante ressaltar que, para garantir o uso de produtos com NPs de maneira segura, são necessárias mais pesquisas sobre os possíveis efeitos no meio ambiente e na saúde das pessoas, bem como o estudo de tecnologias preventivas que reduzam a produção acidental de nanopartículas com efeitos negativos e os resultados da ação de NPs em sistemas biológicos.

6 CONCLUSÃO

Ao analisar apenas as nanopartículas de prata contra *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001), foi obtido o resultado de concentração inibitória mínima (CIM) de 53,56 ppm. Este ensaio mostrou que a solução coloidal de NPsAg possui capacidade de inibir o crescimento de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) em solução com concentração baixa, que é facilmente obtida.

O teste de biofilme realizado com amostras de madeira *Pinus elliottii* mostrou que a avaliação das unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) dos biofilmes revelou que todas as concentrações testadas apresentaram inibição do crescimento do *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) em relação ao controle de viabilidade do fungo (controle de crescimento).

A redução da atividade metabólica das células apresentou valores de 74,8%, 76,1% e 71,8 % nos grupos Stain, NPsAg 428,50 ppm e NPsAg 214,25 ppm respectivamente. Já a redução da atividade metabólica do fungo foi de 50,0% no grupo de NPsAg com 107,13 ppm.

Após os procedimentos e testes realizados, é possível concluir que as amostras de madeira *Pinus elliottii* tratadas com nanopartículas de prata foram eficientes contra a cepa de *Aspergillus niger* (CCCD- AA 001) e apresentam significantes características antimicrobianas.

Em conjunto com a análise literária realizada, foi possível concluir que essa eficácia é capaz de se estender a outros micro-organismos, o que fortalece que o emprego das NPsAg no tratamento de madeira é possível e promissor.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, F. *et al.* Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, São Leopoldo, v. 9, n. 1, p. 20-26, jan./jun. 2013. Acesso em: 24 set. 2021. DOI: 10.4013/ete.2013.91.03
- ASTM. American Society for Testing and Materials. **ASTM D-2017**: Standard method of accelerated laboratory test of natural decay resistance of wood. West Conshohocken: ASTM, 2017. Disponível em: <https://www.astm.org/d2017-05.html> Acesso em: 10 set. 2021.
- BORGES, C. C. **Performance of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on wood protection**. 2019. 65 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia da Madeira) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2019. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/37165>. Acesso em: 21 dez. 2019.
- BRAND, M. A.; ANZALDO, J.; MORESCHI, J. C. Novos produtos para o tratamento preservante da madeira: “perspectivas da pesquisa e utilização”. **Floresta**, Curitiba, v. 36, n. 1, p. 139-138, mar. 2006. DOI: 10.5380/rf.v36i1.5600
- BRASIL. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Estudo prospectivo nanotecnologia**. Brasília: IBDI, 2010. (Série Cadernos da indústria ABDI, 20). Disponível em: <http://livroaberto.ibict.br/handle/1/545> Acesso em: 07 dez. 2021.
- CANTÓN, E. *et al.* Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, n. 3, p. 203-206, mar. 2003 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12663162/>. Acesso em: 19 jul. 2021. DOI: 10.1016/s0732-8893(02)00525-4
- CARLSON, C. *et al.* Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 43, p. 13608-13619, out. 2008. Acesso em: 29 set. 2021. DOI: 10.1021/jp712087m
- CARNIEL, B. F. **Avaliação de impactos ambientais e sociais do uso da nanotecnologia na agricultura**: uma proposta metodológica. 2013. 240 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2013. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/99917/1/2013TS08.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.
- CLAUSEN, C. A. Biodeterioration of wood. *In*: UNITED STATES. Department of Agriculture. **Wood handbook**: wood as an engineering material. 100. ed. Madison: USDA, Forest Service, Forest Products Laboratory, 2010. p. 312-327. (FPL-GTR-190).
- COSTA, L. P. **Controle morfológico de nanopartículas de prata e nanoestruturas do tipo carço-casca Ag@Sn'O IND.2'**. 2011. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de

Campinas, Campinas, SP, 2011. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/250547>. Acesso em: 19 ago. 2021.

DASHTI, H. *et al.* The effect of nanoclay on the mass transfer properties of plywood digest. **Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 7, n. 3, p. 853-860, abr./jun. 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/259444416_The_effect_of_nanoclay_on_the_mass_transfer_properties_of_plywood. Acesso em: 19 jul. 2021.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Document E.DEF 9.3.1**: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for moulds. 2015. Disponível em: https://www.aspergillus.org.uk/wp-content/uploads/2016/03/EUCAST_E_Def_9_3_Mould_testing_definitive_0.pdf. Acesso em: 25 fev. 2022.

EUFLOSINO, A. E. R. **Análise química da madeira tratada com CCA - C, do carvão vegetal e do licor pirolenhoso**. 2015. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES, 2015.

FALCÃO, C. M. de S. B. C. **Atividade antifúngica de nanopartículas de prata e de sua associação com fluconazol frente a cepas de *Candida albicans* resistentes**. 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/29642/1/DISSERTA%c3%87%c3%83O%20Cec%c3%adlia%20Maria%20de%20S%c3%a1%20Barreto%20Cruz%20Falc%c3%a3o.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2022.

FARMER, V. C. Infrared spectroscopy in clay mineral studies. **Clay Minerals**, v. 7, n. 4, p. 373-387, 1968. Disponível em: <https://doi.org/10.1180/claymin.1968.007.4.01>. Acesso em: 19 jul. 2021. DOI: 10.1180/claymin.1968.007.4.01

FLORIANO, E. P. *et al.* Análise econômica da produção de *Pinus elliottii* na Serra do Sudeste, Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 19, p. 393-406, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/19805098895>. Acesso em: 12 dez. 2021. DOI: 10.5902/19805098895

GARNETT, M.; KALLINTERI, P. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. **Occupational Medicine**, v. 56, n. 5, p. 307-311, ago. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/occmed/kql052>. Acesso em: 09 dez. 2021. DOI: 10.1093/occmed/kql052

GONCALVES, R.; BARTHOLOMEU, A. Avaliação do desempenho de ensaio não destrutivo em vigas de madeira de *Eucalyptus citriodora* e *Pinus elliottii*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 2, p. 269-274, 2000. Acesso em: 05 dez. 2021. DOI: 10.1590/S1415-43662000000200023

GUIDELLI, E. J. *et al.* Silver nanoparticles delivery system based on natural rubber latex membranes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 4, p. 1536, mar. 2013. Acesso em: 26 nov. 2021. DOI: 10.1007/s11051-013-1536-2

GUTAROWSKA, B. *et al.* Analysis of the sensitivity of microorganisms contaminating museums and archives to silver nanoparticles. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 68, p. 7-17, mar. 2012. Acesso em: 13 fev. 2022. DOI: 10.1016/j.ibiod.2011.12.002

LATORRACA, J. V. de F. *et al.* Drying and physical properties of rubber wood impregnated with silver nanoparticles. **Revista de Ciências**, Belém, v. 65, 2022. Disponível em: <http://periodicos.ufra.edu.br/index.php/ajaes/article/view/3441/1646>. Acesso em: 12 fev. 2022.

LEVIN, S. C. *et al.* Magnetic plasmonic core-shell nanoparticles. **Journal American Chemical Society - ACS Nano**, v. 3, n. 6, p. 1379-1388, mai. 2009. Acesso em: 29 set. 2021. DOI: 10.1021/nn900118a

MARTÍNEZ, G. *et al.* Environmental Impact of Nanoparticles' Application as an Emerging Technology: A Review. **Materials (Basel)**, v. 14, n. 1, p. 1-26, dez. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7795427/pdf/materials-14-00166.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2022. DOI: 10.3390/ma14010166

MELO JR., M. A. *et al.* Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, jul. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900030>. Acesso em: 12 dez. 2021. DOI: 10.1590/S0100-40422012000900030

MOHAJERANI, A. *et al.* Nanoparticles in construction materials and other applications, and implications of nanoparticle use. **Materials (Basel)**, v. 12, n. 19, p. 1-25, out. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6804222/pdf/materials-12-03052.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2021. DOI: 10.3390/ma12193052

MORESCHI, J. C. **Biodegradação e preservação da madeira**. 3. ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2011. (Manual Didático).

MORONES, J. R. *et al.* The bacterial effect of silver nanoparticles. **Nanobiotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, out. 2005 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20818017/>. Acesso em: 03 jul. 2021. DOI: 10.1088/0957-4484/16/10/059

NORGUEZ, C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 11, p.3806-3819, 2007. DOI:10.1088/0957-4484/16/10/059. Acesso em: 07 dez. 2021

PAES, J. B. *et al.* Efeitos dos extrativos e cinzas na resistência natural de quatro madeiras a cupins xilófagos. **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 3, p. 399-405, set. 2013.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-77602013000300006>. Acesso em: 05 dez. 2021. DOI: 10.1590/S0104-77602013000300006

PAES, J. B.; MELO, R. R.; LIMA, C. R. Resistência natural de sete madeiras a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. **Cerne**, Lavras, v. 13, n. 2, p. 160-169, abr./jun. 2007. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/14113>. Acesso em: 05 dez. 2021.

PANSHIN, A.J.; DE ZEEUW, C. Textbook of wood technology: structure identification, properties and uses of the commercial woods of the United States and Canada. 4. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1980.

PIERCE, C. G. *et al.* A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494-1500, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18772877/>. Acesso em: 09 dez. 2021. DOI: 10.1038/nprot.2008.141

PINTO, R. J. B. **Compósitos de polímeros naturais e nanopartículas metálicas**. 2012. 209 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de Aveiro, Aveiro, PT, 2012. Disponível em: <https://ria.ua.pt/handle/10773/10089>. Acesso em: 09 dez. 2021.

PINTO, V. V. *et al.* Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. **Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 364, n. 1-3, p. 19-25, jul. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092777571000244X>. Acesso em: 19 jul. 2021. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.04.015

RIBEIRO, B. M. **Efeitos de nanopartículas de prata biossintetizadas por *Aspergillus niger* em diferentes níveis tróficos**. 2020. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade de Ambientes Costeiros) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Vicente, SP, 2020. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/192577/ribeiro_bm_me_svic_int.pdf?sequence=3&isAllowed=y. Acesso em: 13 fev. 2022.

SALLA, J.; PANDEY, K. K.; SRINIVAS, K. Improvement of UV resistance of wood surfaces by using ZnO nanoparticles. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, n. 4, p. 592-596, abr. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.01.013>. Acesso em: 10 dez. 2021. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.01.013

SEIDLER, M. J.; SALVENMOSER, S.; MÜLLER, F. M. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4130-4136, nov. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18710910/>. Acesso em: 10 dez. 2020. DOI: 10.1128/AAC.00234-08.

SILVA, K. F. D.; SANTOS, A. G. A importância das divulgações e aproximações conceituais para o ensino da nanotecnologia: uma revisão narrativa. *In*: NÓBREGA, D. de S.; SANTOS, L. F. dos. (org.). **Ciências em Ação**: perspectivas distintas para o ensino e aprendizagem de ciências. Guarujá: Científica Digital, 2020. cap. 15, p. 227-239. Disponível em: <https://downloads.editoracientifica.org/articles/210303976.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2022. DOI: 10.37885/210303976

SOUZA, S. S. *et al.* Detecção do teor de cinzas e sílica em materiais lignocelulósicos. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 61., 2009, Manaus. **Anais [...]**. São Paulo: SBPC, 2009. Disponível em: <http://www.sbpnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/5044.htm>. Acesso em: 22 ago. 2021.

VALCORTE, G. **Secagem da madeira de *Eucalyptus grandis* utilizando diferentes processos e impregnação de nanopartículas de prata**. 2021. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2021. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/22418/DIS_PPGEF_2021_VALCORTE_GUILHERME.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 13 fev. 2022.

WAHAB, J. A.; MAMUN, S. A. Polyacrylonitrile nanofiber mats containing titania/AgNP composite nanoparticles for antibacterial applications. **Materials Research Express**, v. 7, n. 1, jan. 2020. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2053-1591/ab6c26/pdf>. Acesso em: 19 jul. 2021. DOI: 10.1088/2053-1591/ab6c26

WILSON, C. *et al.* Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. **Research & reviews. Journal of engineering and technology**, v. 6, n. 4, dez. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6133255/>. Acesso em: 19 jul. 2021.

ZANATTA, P. *et al.* Redução da inflamabilidade da madeira de *Pinus elliottii* modificada com partículas de TiO₂. **Matéria (Rio de Janeiro)**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rmat/a/DPTGQJZpBT9ySmDWcRyk8Cp/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 07 dez. 2021.