



## Atividade antifúngica da madeira de *Pinus elliottii* tratada com nanopartículas de prata

### **Gabriel Victor Gazoni Ferreira**

Professor Mestre, UNOESTE, Brasil.  
gazoniferreira@gmail.com

### **Jacqueline Roberta Tamashiro**

Professora Doutora, UNOESTE, Brasil.  
arquiteta.jtamashiro@gmail.com

### **Fábio Friol Guedes de Paiva**

Professor Doutor, UNOESTE, Brasil.  
fabio.vha@hotmail.com

### **Kelly Cristina Barzan Yabunaka**

Mestre, UNOESTE, Brasil.  
kc-barzan@hotmail.com

### **Angela Kinoshita**

Professora Doutora, UNOESTE, Brasil.  
angela@unoeste

### **Daniela Vanessa Moris**

Professora Doutora, UNOESTE, Brasil.  
danimoris@unoeste.br

## RESUMO

A madeira é um material versátil e sustentável que tem ampla utilização na construção civil, cumprindo funções estruturais e de acabamento. No entanto, é suscetível ao crescimento de fungos filamentosos, incluindo bolores. Este estudo avalia a eficácia das nanopartículas de prata no combate ao *Aspergillus niger*, uma cepa fúngica comum na madeira de *Pinus elliottii*. Amostras padronizadas de madeira esterilizados foram tratados com concentrações variadas de nanopartículas de prata para avaliar sua atividade antifúngica. Tanto as amostras tratadas como as não tratadas foram inoculadas com *Aspergillus niger* para promover a formação de biofilme. As unidades formadoras de colônias presentes no biofilme aderido de cada amostra foram quantificadas e a atividade metabólica foi avaliada. Os resultados demonstraram que todas as amostras de madeira tratadas com nanopartículas de prata inibiram efetivamente o crescimento do biofilme e a atividade metabólica de *Aspergillus niger*. Conseqüentemente, pode-se concluir que o tratamento da madeira com nanopartículas de prata inibe efetivamente o crescimento do biofilme e a atividade metabólica do *Aspergillus niger*. Este tratamento inovador tem um potencial significativo para melhorar a qualidade e durabilidade das estruturas de madeira na construção. Além disso, a prevenção da formação de mofo contribui para melhorar a qualidade de vida dos moradores e do meio ambiente, pois reduz a necessidade de produtos de limpeza e minimiza a necessidade de reformas prediais que geram resíduos em aterros sanitários.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Pinus elliottii*. AgNP. Antimicrobiano. Antifúngico. *Aspergillus niger*.

## 1 INTRODUCTION

*Pinus elliottii* é uma espécie de pinheiro que fornece madeira certificada para uso e reflorestamento. Apresenta rápido crescimento e facilidade de manuseio e serve como fonte crucial de madeira para as indústrias de construção e móveis. Além disso, são utilizados na fabricação de diversos produtos, como terebintina, breu, celulose, papel e outros. *Pinus elliotti var. elliottii*, comumente conhecido como pinheiro-bravo, é uma espécie muito significativa para a produção de madeira e resina (YANG; LI, 2016).

O surgimento de tecnologias de “madeira engenheirada”, juntamente com pesquisas técnicas relacionadas e revisões regulatórias, destaca o potencial dos produtos de madeira artificial e dos sistemas estruturais para servirem como alternativas viáveis aos materiais de base mineral na construção de edifícios urbanos (CHURKINA et al., 2020). A substituição de materiais de construção convencionais por madeira maciça reduz as emissões da fase de construção em 69%, ou uma média de 216 kgCO<sub>2</sub>e/m<sup>2</sup> de área útil. Os estudos analisados mostram de forma unânime reduções de emissões com o uso de madeira maciça. Aumentar a sua utilização em 50% das novas construções urbanas poderia proporcionar até 9% da redução de emissões globais necessária para cumprir as metas de 2030 para limitar o aquecimento global abaixo de 1,5°C (HIMES; BUSBY, 2020).

Embora algumas espécies de madeira sejam menos suscetíveis a agentes deteriorantes, nenhuma madeira possui resistência natural a todas as formas de biodeterioração, como fungos, insetos e brocas marinhas. A proteção da madeira envolve a adição de substâncias tóxicas ou repelentes, chamadas conservantes, para aumentar a resistência ao apodrecimento e melhorar a durabilidade. Os tratamentos preventivos podem prolongar a vida útil da madeira, reduzir os custos de substituição e maximizar a utilização dos recursos florestais. As crescentes preocupações ambientais e o desejo de práticas sustentáveis levaram à pressão para reduzir ou eliminar o uso de conservantes tradicionais, como o arseniato de cobre cromatado e o borato de cobre cromatado, que são eficazes, mas contribuem para a

poluição ambiental, enfatizando a necessidade do desenvolvimento de produtos mais seguros para preservação ambiental (BORGES et al., 2018).

As nanopartículas de prata demonstraram propriedades antimicrobianas, levando à sua ampla aplicação em setores como biomedicina, farmacêutica, indústria cosmética e têxtil. Em comparação com outras partículas metálicas, as AgNPs apresentam eficácia antimicrobiana superior, toxicidade reduzida e melhor biocompatibilidade (CRISAN et al., 2021; DE SOUZA; SOUZA; FRANCHI, 2019). AgNPs possuem uma grande área de contato superficial, exibem alta reatividade química e ação antimicrobiana (NAKAMURA et al., 2019). Portanto, tem sido aplicado em produtos médicos e biomédicos para reduzir infecções, prevenir a colonização bacteriana em superfícies.

A possibilidade de utilização de AgNP em materiais de construção civil para torná-los antimicrobianos foi demonstrada por DA SILVA et al. (2019). Os autores demonstraram a prevenção da formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* em gesso e argamassa composta com AgNP e a eficácia contra *A. Niger*. Na pesquisa do Web of Science, apenas dois artigos descreveram o potencial antifúngico da madeira de pinus tratada com AgNP. Paril et al. (2017) avaliaram o tratamento de *Pinus Sylvestris L.* com nanopartículas de prata e cobre, testando contra o fungo da podridão parda (*Poria placenta*). Os corpos de prova de madeira de pinus foram impregnados a vácuo a 80 kPa por 20 minutos com soluções de 1 e 3 g/L de AgNP e Cu-NP. A perda de massa foi avaliada após 16 semanas de exposição ao fungo. Embora não tenha sido possível confirmar a eficácia do tratamento com AgNP, o tratamento com 3 g/L de Cu-NP apresentou menor perda de massa em comparação às amostras não tratadas (PAŘIL et al., 2017). Can et al. (2018) também avaliaram a perda de peso de *Pinus Sylvestris L.*, devido à infecção pelo fungo da podridão branca (*Trametes versicolor*). Amostras de 5 x 15 x 30 mm (A x L x C) foram tratadas com polímero de óleo de soja auto oxidado contendo nanopartículas de Ag (Agsbox) e copolímero de poliestireno-óleo de soja (AgPSsb). Os corpos de prova controle apresentaram perda de peso de 29,74%, enquanto o tratamento com Agsbox e AgPSsb reduziu a perda de peso em 90,38% e 97,07%, respectivamente (CAN; SIVRIKAYA; HAZER, 2018). Estudos de eficiência antifúngica foram realizados com aplicação de nanopartículas de Ag em madeira transparente e madeira de choupó, resultando na redução da degradação por ataque fúngico das madeiras estudadas (KÜNNIGER; HEEB; ARNOLD, 2014; MORADI MALEK et al., 2013). Portanto, a literatura ainda é escassa, indicando necessidade de estudos que demonstrem o potencial das AgNP como tratamento antifúngico da madeira de pinus.

Os tratamentos com nanopartículas apresentam métodos alternativos para proteção da madeira e são cruciais para reduzir os impactos ambientais. Este estudo avaliou a ação antifúngica contra *Aspergillus niger* em amostras de madeira de *Pinus elliottii* tratadas com nanopartículas de prata (AgNPs).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Síntese de AgNP

As AgNPs foram sintetizadas através da redução química do nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) utilizando borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) (GUIDELLI et al., 2013). Uma solução de  $\text{AgNO}_3$  8 mM

foi adicionada a uma solução de NaBH<sub>4</sub> 16 mM. Todo o sistema foi mantido sob agitação a 200 rpm por 6 horas a 21°C para garantir a redução completa da prata.

Durante a síntese, o NaBH<sub>4</sub> é adicionado em excesso em relação ao AgNO<sub>3</sub>, pois atua como agente redutor dos íons de prata e é responsável pela estabilização das nanopartículas. O NaBH<sub>4</sub> adsorve-se na superfície das nanopartículas, envolvendo-as e criando cargas em suas superfícies, que geram repulsão eletrostática entre elas, evitando aglomeração (MELO JR. et al., 2012).

## 2.2 Concentração inibitória mínima (CIM) de AgNP contra *Aspergillus niger*

O experimento foi realizado para determinar um ponto de interrupção da ação antifúngica das AgNPs. *Aspergillus niger* (CCCD-AA 001) foi utilizado em todos os experimentos. A concentração final do inóculo variou de 1,0 x 10<sup>5</sup> a 2,5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL, utilizando o método de suspensão de conídios preparado seguindo as diretrizes do "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" com modificações propostas pelo "The Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (BRCAST) (MELETIADIS et al., 2020).

Os isolados foram cultivados em ágar batata dextrose e incubados a 35°C e as suspensões de inóculo foram preparadas a partir de culturas após 5 dias de incubação. A cultura de *Aspergillus niger* (CCCD-AA 001) de 5 dias foi coberta com aproximadamente 5 mL de água destilada estéril suplementada com Tween 20 a 0,1%. Posteriormente, os conídios foram cuidadosamente raspados com um swab estéril e o material foi transferido com uma pipeta estéril para um tubo Falcon estéril. A suspensão foi homogeneizada durante 15 segundos num misturador vórtex a aproximadamente 2000 rpm. Em seguida, 5 mL da suspensão foram filtrados através de filtro estéril com poros de 11 µm de diâmetro. Esta etapa removeu as hifas para obter uma suspensão composta por conídios. A suspensão foi ajustada para concentração de 2-5 x 10<sup>6</sup> conídios/mL por contagem em hemocítmetro (câmara de Neubauer). Em seguida, foi feita uma diluição de 1:10 em meio RPMI 1640 (com L-glutamina e indicador de pH sem bicarbonato) suplementado com glicose até concentração final de 2% (RPMI 2% G), estéril, para obtenção da concentração de trabalho do inóculo, 2-5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL.

Foram utilizadas placas com 96 poços com capacidade de aproximadamente 300 µL por poço. Dos poços 2 a 11, em cada coluna, foram dispensados 100 µL da concentração correspondente de AgNP. Diluições seriadas (1:2) da solução de AgNPs foram feitas em meio de cultura RPMI com 2% de glicose (MELETIADIS et al., 2020). A concentração inicial de AgNPs foi de 216 µg/mL e a concentração final foi de 0,42 µg/mL.

Na coluna 01, foram dispensados 200 µL de meio RPMI de glicose a 2% como controle de esterilidade, e na coluna 12, foram dispensados 100 µL de meio RPMI de glicose a 2% mais 100 µL de inóculo de *Aspergillus niger*, servindo como controle de crescimento.

As placas de microdiluição foram inoculadas 30 minutos após o preparo da suspensão do inóculo para manter a concentração de conídios viável. A suspensão de conídios a 2-5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL foi agitada e inoculada em cada poço da placa de microdiluição, sem tocar no conteúdo do poço, utilizando uma pipeta multicanal em 100 µL, no sentido horizontal - fileiras "A, B, C, D,

E, F, G e H” nos poços 2 a 12 de cada linha. Após este procedimento, obteve-se a concentração necessária de AgNP e a densidade do inóculo.

As placas de microdiluição foram incubadas sem agitação a 37°C por 48 ± 2 horas em ar atmosférico. A contagem de viabilidade foi realizada para controle de qualidade e confirmação de que os poços de teste continham entre 1-2,5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL.

A CIM para AgNP é definida como a concentração mínima que inibe visualmente o crescimento de fungos no poço, em comparação com o crescimento de controle (coluna 12). Além da leitura visual direta, foi realizado outro teste com resazurina, indicador redox. Inicialmente, a resazurina apresenta coloração azul, mas ao entrar nas células e em resposta à atividade metabólica das células viáveis, é reduzida a resorufina, que possui coloração rosa e é fluorescente. Portanto, após o período de incubação e leitura visual para determinação da CIM de AgNP, foram adicionados 20 µL da solução de resazurina (2 mg/mL), e o teste foi revelado após um período adicional de incubação de duas horas.

### 2.3 Amostra de madeira e tratamentos

Foram utilizados corpos de prova de madeira medindo 5 x 5 x 5 mm de *Pinus elliottii*. O tamanho das amostras permitiu a utilização de uma placa de 24 poços para os experimentos de microbiologia. Os corpos de prova de madeira foram cortados utilizando uma serra de mesa com lâmina de 10 polegadas e uma serra de esquadria com lâmina do mesmo tamanho. Posteriormente foram esterilizados em autoclave.

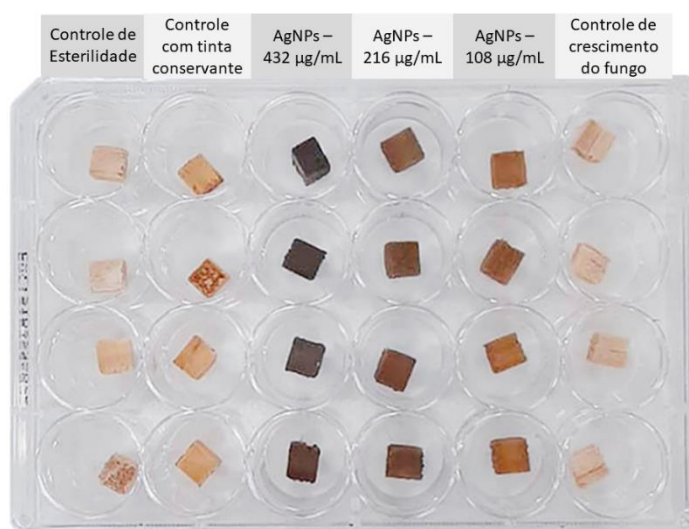
O tratamento com AgNPs foi realizado por imersão dos espécimes em soluções de AgNP em 3 concentrações: 432 µg/mL, 216 µg/mL e 108 µg/mL. Foram utilizados três tubos Falcon, com 40 mL de cada solução e 12 corpos de prova. Os tubos com as amostras foram colocados em agitador orbital por um período de 60 minutos. Após intervalo de 60 minutos, foram agitados novamente por 60 minutos. Após esse processo de imersão de 3 horas, as amostras foram retiradas com pinça estéril e colocadas em placas de Petri com espaçamento suficiente para secar em estufa a 37°C por 24 horas. Observou-se que cada corpo de prova tem capacidade de absorver 0,125 mL de solução de nanopartículas, e a solução residual manteve a mesma coloração, demonstrando a estabilidade das nanopartículas.

Como referência, 4 corpos de prova de madeira sem tratamento foram testados e 4 corpos de prova de madeira foram tratados com tinta conservante Osmocolor®. Segundo o fabricante (Montana® Química LTDA, São Paulo, Brasil), este produto é composto por 0,25% de IPBC (3-iodo, 2-propinil-butil-carbamato) e 99,75% de resinas, pigmentos, cargas minerais e solvente. Quando aplicado, confere à madeira alta resistência aos raios ultravioleta e à infestação por fungos, além de função hidrofóbica. No entanto, não é recomendado para recipientes em contato com alimentos, água ou solo. Para este tratamento, os corpos de prova de madeira, previamente esterilizados, foram imersos no produto por 1 hora. Em seguida foram retirados e secos em estufa com temperatura controlada de 37°C. Todas as amostras foram autoclavadas após o tratamento para garantir a esterilidade das amostras.

## 2.4 Avaliação microbiológica do tratamento com *P. elliottii*

Para avaliar a eficácia dos tratamentos foi realizado um experimento de biofilme com *A. niger*. Quatro espécimes de madeira de cada tipo, tratados com AgNPs nas 3 concentrações, quatro tratados com corante e oito espécimes não tratados, foram submetidos ao experimento de biofilme fúngico. Os espécimes foram posicionados em uma placa de 24 poços (Fig. 1).

Figura 1 - Espécimes de madeira de *Pinus elliottii*. Controle de esterilidade, controle com tinta conservante Osmocolor®, tratada com diferentes concentrações de nanopartículas de prata (AgNPs) e controle de crescimento do fungo



Fonte: elaborado pelos autores.

Poços contendo apenas meio de cultura foram incluídos no ensaio como controle de esterilidade da reação, bem como poços com inóculo em meio RPMI como controles de crescimento (100% de viabilidade celular). Quatro espécimes não tratados foram mantidos sem contato com o fungo (controle negativo) e quatro espécimes não tratados foram colocados em contato com o fungo (controle positivo).

A suspensão fúngica preparada conforme descrito anteriormente, com concentração de inóculo de  $2-5 \times 10^6$  UFC/mL, foi agitada e 2,0 mL foram inoculados no poço correspondente sem tocar na amostra, usando uma pipeta automática de 5,0 mL.

Em seguida, a placa foi incubada a 37°C por 4 horas para a fase de adesão celular. Após o período de incubação, o sobrenadante foi aspirado e 2,0 mL de RPMI foram adicionados a cada poço contendo a amostra de madeira, seguido de nova incubação por um total de 72 horas (PIERCE et al., 2008; SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008).

Os resultados da formação de biofilme foram avaliados através do método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) (2 amostras), atividade metabólica (MTT) (1 amostra) e imagem de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM) (1 amostra).

#### 2.4.1 Avaliação da massa de biofilme por contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Após o período de incubação, a amostra de madeira foi lavada três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril e transferida para 10 mL de PBS. Em seguida foi agitado em misturador vortex por 5 minutos. Diluições decimais foram feitas em PBS, e a atividade antifúngica de cada amostra foi avaliada plaqueando 100 µL em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) e incubando a 30°C por até 7 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 redução igual ou superior a 3 Log<sub>10</sub> UFC/mL em relação ao inóculo inicial, resultando em redução de 99,99% ou mais de UFC/mL, enquanto a atividade fungistática foi considerada quando houve redução do crescimento inferior a 99,9% ou <3 Log<sub>10</sub> UFC/mL do inóculo inicial (CANTÓN et al., 2003).

Cada amostra foi testada individualmente e a média dos valores triplicados de UFC/mL foi utilizada para análise comparativa. Uma amostra da sequência de diluição e controles foi reservada para posterior análise por microscopia eletrônica. A seguinte fórmula foi usada para determinar UFC/mL:

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

Onde “n” corresponde ao valor da diluição e “q” é o volume pipetado em mL em cada placa de Petri contendo ágar Sabouraud.

#### 2.4.2 Ensaio MTT e atividade metabólica do biofilme

A avaliação da atividade metabólica dos biofilmes foi realizada através do ensaio colorimétrico de redução de sal utilizando MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). O MTT solúvel em água é convertido por células fúngicas viáveis em cristais insolúveis de formazan, que são roxos. Quando esses cristais são solubilizados com álcool isopropílico, sua concentração pode ser determinada por densidade óptica (espectrofotometria).

Após o tempo de incubação do biofilme, o corpo de prova foi lavado três vezes com PBS estéril e transferido para 10 mL de PBS. Foi agitado por 5 minutos em vortex. Em uma placa de 96 poços foi colocada uma alíquota de 100 µL para avaliação da atividade metabólica. Em seguida, 100 µL de solução MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço. As microplacas foram incubadas no escuro a 37°C durante 3 horas. Após a incubação, a solução de MTT foi removida de todos os poços. Em seguida, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5% foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazano MTT. As microplacas foram agitadas durante 10 minutos num agitador orbital. Posteriormente, o conteúdo de 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) em comprimento de onda de 490 nanômetros (DO 490 nm).

A porcentagem (%) de redução do biofilme, com base na atividade metabólica do fungo, utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ redução do biofilme} = \frac{\text{positivoC} - \text{média do teste}}{\text{positivoC}}$$

Onde PositivoC representa a média do controle positivo e a média do teste representa a média dos grupos de tratamento.

#### 2.4.3 FE-SEM imagens das amostras

Uma amostra de cada grupo de tratamento e uma referência foram preparadas para geração de imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (FE-SEM). As amostras foram lavadas três vezes com PBS, seguindo a mesma técnica para biofilmes tratados e não tratados. Para fixação do biofilme, 1 mL de glutaraldeído a 3% e paraformaldeído a 2% em tampão fosfato de potássio 0,1 M em pH 7,4 foram adicionados a cada poço. Posteriormente, as amostras foram submetidas a seis lavagens com solução pura de PBS em intervalos de 15 minutos, seguidas de pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% por 16 horas. Após o período de fixação, o material foi submetido a seis lavagens com a mesma solução tampão e desidratado com concentrações crescentes de etanol. (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) (RAMAGE et al., 2012).

As imagens foram obtidas para investigar a superfície do material e a ação de AgNPs sobre biofilmes de *A. niger* por Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (FE-SEM), Jeol, modelo JSM-7500F, software PC-SEM v.2.1. 0,3. As amostras foram revestidas com ouro ultrafino por um revestidor por pulverização catódica (Edwards Model T-Station 75) para evitar quaisquer artefatos nas imagens.

#### 2.5 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os dados de atividade metabólica foram analisados pelo teste ANOVA seguido do teste post hoc de Tukey. Os dados de UFC/mL foram submetidos ao teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do teste post hoc de Dunn. Para todos os testes, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0.05$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Síntese de nanopartículas de prata (AgNP)

A solução coloidal sintetizada pelo método de redução química, com concentração de prata de 432 µg/mL de Ag, apresentou coloração marrom. A confirmação da formação de nanopartículas foi obtida pela presença de pico plasmônico em 400 nm, obtido por espectrofotometria UV-Vis. O espectro de absorção com banda de plasmon ressonante nesta



região indica que as nanopartículas de prata possuem formato esférico (ISLAM; JACOB; ANTUNES, 2021). Variações na coloração podem ocorrer devido à extinção da luz incidente (absorção e/ou espalhamento) em comprimentos de onda específicos, que dependem fortemente do tamanho, morfologia e ambiente químico das nanopartículas (KHAN; SAEED; KHAN, 2019). A estabilidade do sistema ocorre porque as nanopartículas formadas permanecem em suspensão e não se agregam para formar partículas maiores (MELO JR. et al., 2012)

### 3.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima de AgNP, ou seja, o ponto de quebra do crescimento de *Aspergillus niger* (CCCD-AA001), encontrada é de 27 µg/mL, caracterizada pelo aumento do crescimento fúngico nos poços da coluna 4, também confirmado pela redução da resazurina, que tem cor azul e se reduz a resorufina, que tem cor rosa, ao entrar em contato com células viáveis.

As propriedades antimicrobianas das AgNPs já são conhecidas contra microrganismos como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus. O efeito ocorre quando as nanopartículas encontram a membrana celular desses microrganismos, causando danos aos processos de respiração e permeabilidade celular. Eles também se ligam ao enxofre e ao fósforo presentes no DNA, inibindo a divisão celular (ISLAM; JACOB; ANTUNES, 2021; WAHAB; MAMUN, 2020).

Assis da Silva et al. (2022) demonstrou inibição contra diferentes patógenos testados, o autor mostrou que AgNPs em concentrações variando de 80 a 300 µg/mL inibiram o crescimento de *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* e *Trichophyton mentagrophytes*, semelhante aos resultados encontrados no trabalho de Gutarowska et al. (2012) que também constataram a eficácia das AgNPs contra 32 cepas de bactérias e fungos pertencentes a 12 gêneros, responsáveis pela contaminação de museus e arquivos. Os autores testaram duas cepas de *Aspergillus niger*, uma da ATCC, que apresentou CIM de 22,5 ppm, e outra fornecida pelo Museu Central de Tecidos da Polônia, com CIM de 45,00 ppm. Foi revelado que uma concentração de 90 ppm foi eficaz contra todos os microrganismos testados, enquanto uma concentração de 45 ppm foi eficaz contra 94% deles. Assim, pode-se observar que existem variações nos resultados da CIM dependendo do tipo de microrganismo, e mesmo tratando-se do mesmo fungo, existem variações na CIM dependendo da sua origem. O resultado deste estudo está de acordo dentro da faixa de valores encontrados na literatura Assis da Silva et al. (2022) e Gutarowska et al. (2012) indica que o tratamento da madeira com AgNPs pode ser eficaz contra outros microrganismos.

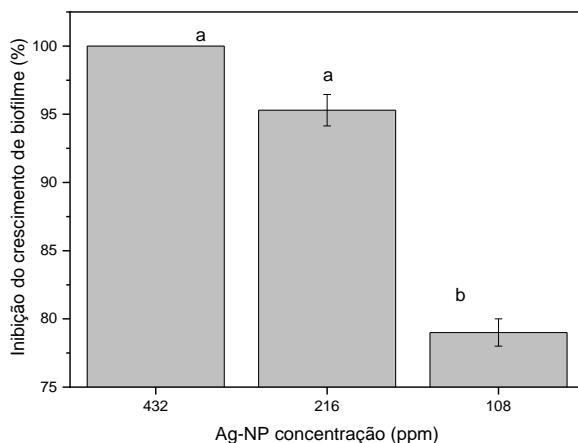
Falcão et al. (2022) estudaram o uso de nanopartículas de prata associadas ao fluconazol, constataram que AgNPs exibiam atividade fungistática e fungicida em baixas concentrações (entre 4 a 8 ppm e 8 a 16 ppm, respectivamente). Quando AgNPs foram utilizadas em combinação com fluconazol, foi possível reverter a resistência das cepas de *Candida albicans*. A redução da CIM do fluconazol passou de 87,5 para 99,8%. Todas as associações foram sinérgicas. Mesmo em concentrações sub inibitórias, como 2 ppm (50% da MIC), as nanopartículas de prata foram capazes de inibir a formação de tubos germinativos. Os

resultados demonstraram atividade fungistática e fungicida em concentrações inferiores às obtidas neste trabalho, porém, estes resultados fortalecem a demonstração de que AgNPs promovem ação fungistática e fungicida contra diferentes espécies de microrganismos.

### 3.3 Avaliação da inibição do crescimento do biofilme de *Aspergillus niger*

A avaliação das unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) dos biofilmes revelou inibição do crescimento de *Aspergillus niger* (CCCD-AA001) em todas as concentrações testadas em comparação ao controle de viabilidade fúngica (controle de crescimento) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2).

Figura 2 - Porcentagem de inibição do crescimento de *Aspergillus niger* (CCCD-AA001) em madeira tratada com nanopartículas de prata em diferentes concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ). Letras diferentes indicam diferenças significativas determinadas pelo teste post hoc de Kruskal Wallis e Dunn ( $p < 0.05$ )



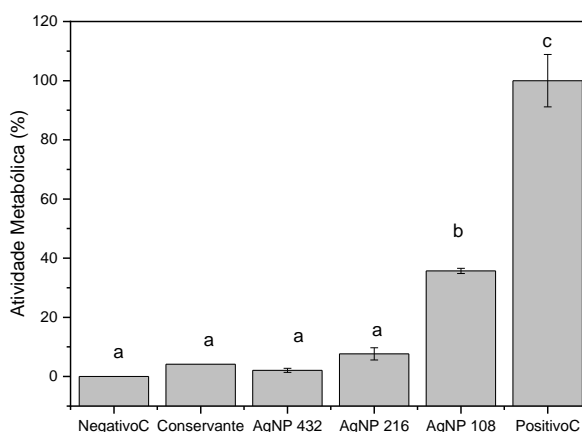
Fonte: elaborado pelos autores.

Houve atividade fungicida na concentração de 432  $\mu\text{g/mL}$ , com redução de 100% em relação ao inóculo inicial, e atividade fungistática foi observada na concentração de 108  $\mu\text{g/mL}$ , com redução de 80% no crescimento em relação ao inóculo inicial (CANTÓN et al., 2003).

### 3.4 Redução da atividade metabólica do biofilme

Em relação à atividade metabólica das células viáveis no biofilme, foi observada maior atividade metabólica de *Aspergillus niger* (CCCD-AA 001) no grupo não tratado (grupo controle de crescimento) em comparação aos demais grupos tratados. A redução na atividade metabólica de *Aspergillus niger* foi de 95,8%, 97,9%, 92,3% nas amostras com tinta conservante, AgNP 432 e 216  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, e uma redução de 64,3% na atividade metabólica no grupo de 108  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 3)

Figura 3 - Prevalência de atividade metabólica de *Aspergillus niger* (CCCD - AA 001) devido ao tratamento com nanopartículas de prata em diferentes concentrações e controles. Letras diferentes indicam diferenças significativas determinadas pelo teste One way ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey ( $p < 0.05$ ).

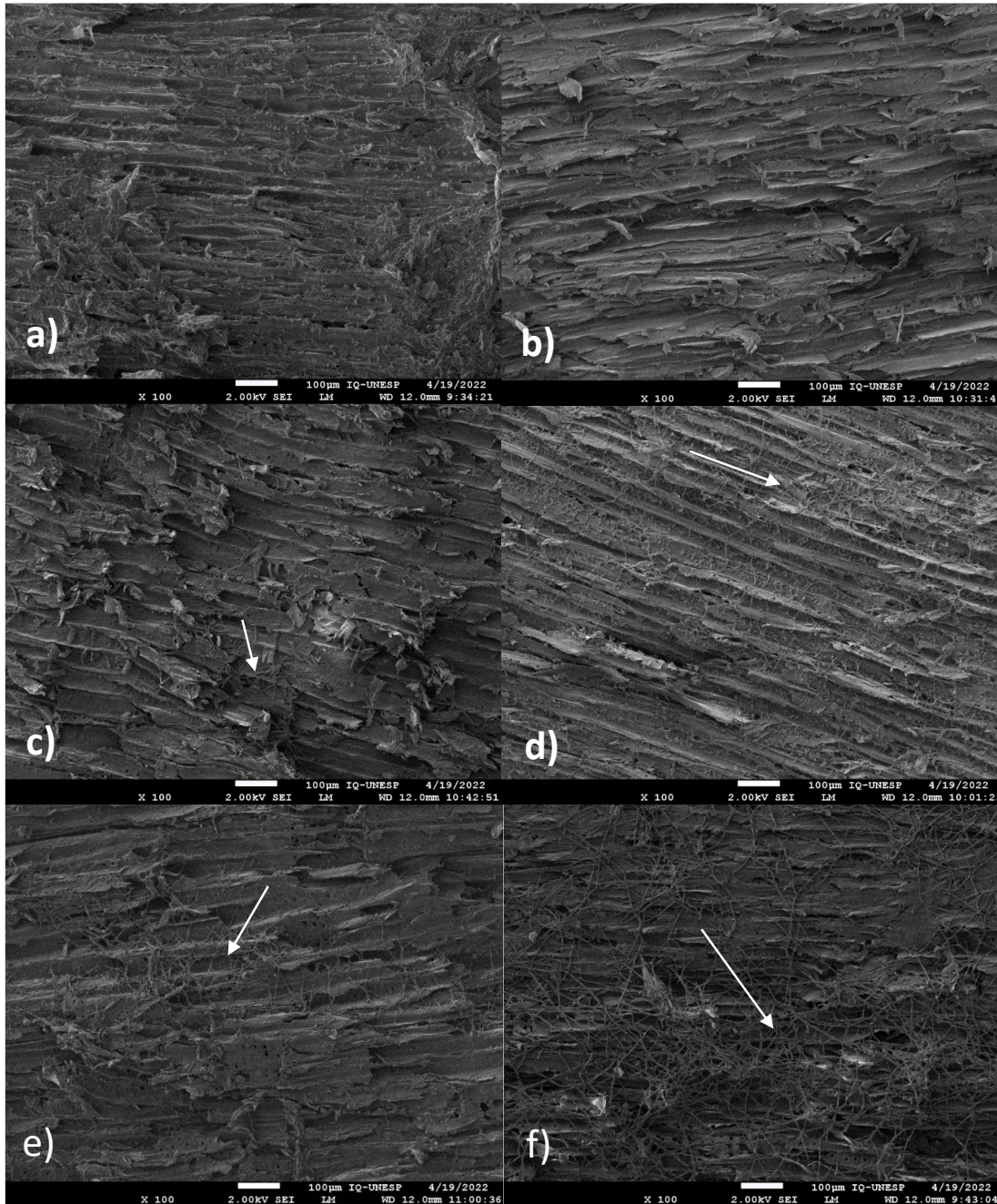


Fonte: elaborado pelos autores.

### 3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FE-SEM) e Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS)

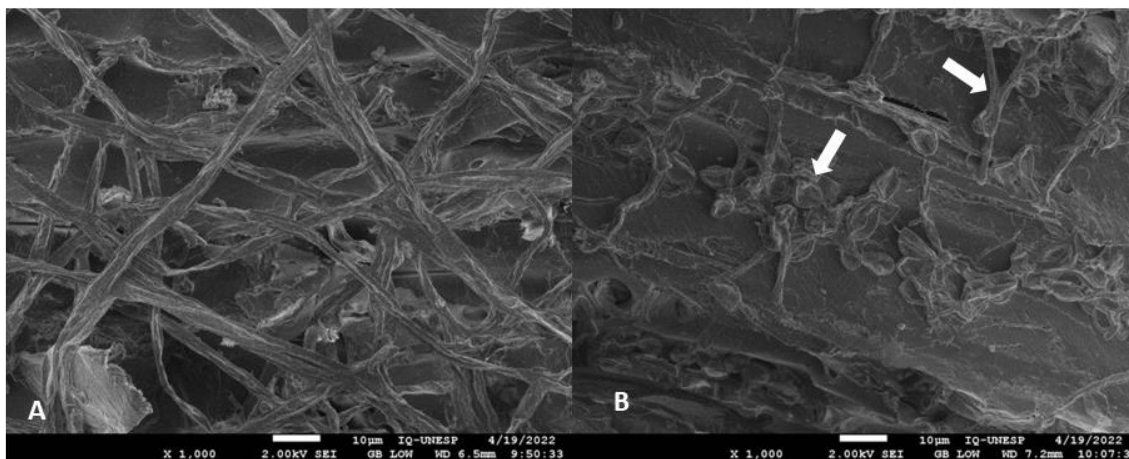
A Fig. 4 mostra imagens FE-SEM das amostras de referência (controle negativo e positivo), tratadas com diferentes concentrações de AgNPs e com tinta conservante. Em comparação com a imagem do Controle Negativo (4a), observa-se que o tratamento com conservante (4b) evita a fixação do biofilme de *Aspergillus niger*. Isto provavelmente se deve à natureza hidrofóbica do material, conforme especificado pelo fabricante. Nas amostras tratadas com AgNPs (4c, 4d e 4e), pode-se observar, no aumento de 100x, a presença em quantidades muito inferiores ao controle positivo (4f), que se refere à amostra não tratada que esteve em contato com o fungo. Em maior aumento (Fig. 5) é possível observar a estrutura do biofilme de *Aspergillus niger*. Na Fig. 5a, o biofilme maduro revelou um biofilme microarquitetônico, consistindo de aglomerados de células compactas, conectadas por matriz extracelular (ECM) composta principalmente por galactomanano, galactosaminogalactano,  $\alpha$ -1,3-glucano e melanina. Adicionalmente, na Figura 5b do espécime tratado com AgNP (432  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pode-se observar que o fungo presente nas amostras está inativado, caracterizado por depleção do número de células e diminuição do material extracelular, perda de estrutura organização, além de alterações morfológicas nas células que foram colapsadas.

Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura (FE-SEM) de amostras de *P. elliottii* (Mag 100x) - (a) Controle Negativo (esterilidade); (b) tinta conservante; amostras tratadas com AgNPs: (c) Ag-NPs 432 µg/mL, (d) Ag-NPs 216 µg/mL, (e) Ag-NPs 108 µg/mL e (f) Controle Positivo (sem tratamento). As setas brancas indicam o biofilme *A. Niger*



Fonte: elaborado pelos autores.

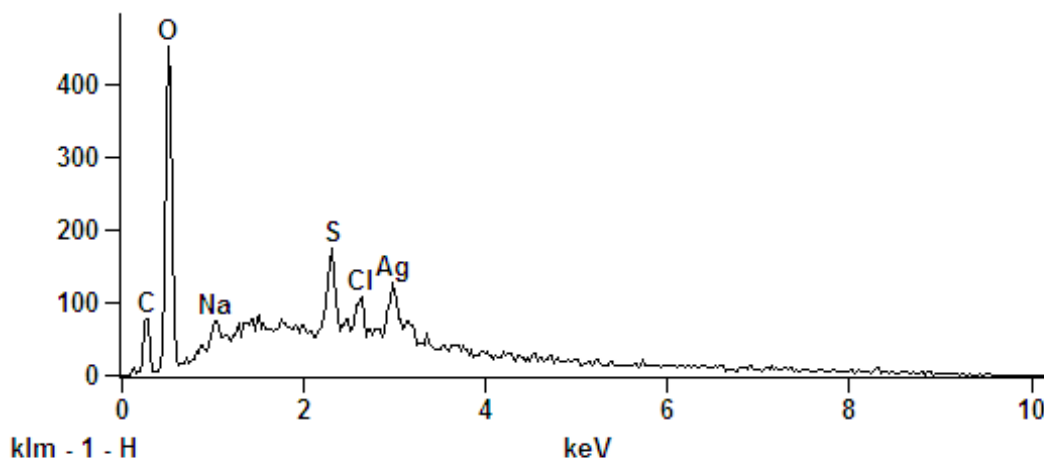
Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura (FE-SEM) de amostras de *P. Elliottii*, (a) biofilme maduro em amostra não tratada (controle positivo) mostrou aglomerados de células compactas, conectadas por matriz extracelular e (b) biofilme maduro em amostra tratada com AgNP, mostrando células morfologicamente alteradas (setas) e estrutura fragmentada do biofilme



Fonte: elaborado pelos autores.

Fig. 6 mostra o espectro EDS da amostra de *P. Elliottii* tratada com AgNP 432 µg/mL, mostrando o pico de Ag, demonstrando a eficácia do procedimento para impregnar o Ag na amostra.

Figura 6 - Espectro EDS da amostra *P. Elliottii* tratada com AgNP 432 µg/mL. Tensão de aceleração: 10,0 kV



Fonte: elaborado pelos autores.

Melo Jr. et al. (2012) identificaram que a estabilidade do sistema advém do fato das nanopartículas formadas permanecerem em suspensão e não se agregarem em partículas maiores. Pode-se notar que alcançar uma síntese estável pode ser um desafio para a produção em escala industrial de madeira tratada com AgNPs. Porém, os resultados satisfatórios deste trabalho podem corroborar a aplicabilidade do tratamento sugerido, que pode ser ampliado em futuras pesquisas científicas.

Análises FE-SEM de biofilmes de *Aspergillus niger* (CCCD-AA 001) mostram uma matriz extracelular envolvendo células dentro da estrutura do biofilme. Esta matriz é um importante fator responsável pela resistência do biofilme ao estresse ambiental e às agressões químicas e físicas (RAMAGE et al., 2012). Ainda, a partir da análise das imagens FE-SEM, é possível observar a estrutura do biofilme de *Aspergillus niger* (CCCD-AA 001) como um conjunto de células compactas, conectadas por uma matriz extracelular (BEAUVAIS et al., 2007) e que as nanopartículas de prata foram capazes de fragmentar e romper o biofilme, causando perda de estrutura.

Mohajerani et al. (2019) afirmam que no setor industrial as nanopartículas proporcionam diversos benefícios, como novas possibilidades de produção que permitem avanços tecnológicos, sanitários e ambientais. Os dados obtidos neste estudo indicam também que o tratamento da madeira com nanopartículas de prata proposto é viável e eficaz para aplicação em diversos setores do mercado. Outro fato interessante é que a típica cor escura das AgNPs pode fornecer características estéticas interessantes para distinguir entre madeira não tratada e tratada com AgNPs. Sabe-se que existem diferentes tipos de tratamentos que alteram a cor da madeira, como o tratamento com arseniato de cobre cromado, que lhe confere uma cor esverdeada, ou o tratamento através da carbonização superficial da madeira, que lhe confere uma cor escura, semelhante à AgNPs aplicados em concentrações mais altas. Portanto, além do ganho com a atribuição de atividade antimicrobiana, o tratamento também proporciona aspecto visual que pode se tornar um valioso recurso estético. Contudo, apesar dos inúmeros benefícios demonstrados, é importante enfatizar que mais pesquisas são necessárias para garantir a segurança do uso de produtos com AgNPs, incluindo seus potenciais efeitos ao meio ambiente e à saúde humana.

#### 4 CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou a ação antifúngica contra *Aspergillus niger* em amostras de madeira de *Pinus elliottii* tratadas com nanopartículas de prata (AgNPs). Observou-se que a madeira tratada com AgNPs resultou em redução da massa de biofilme aderido (100%) e redução da atividade metabólica do biofilme (76,1%), demonstrando a ação fungicida (432 µg/mL) e fungistática (108 µg/mL) /mL ação do novo material.

Assim pode-se concluir que a madeira de *Pinus elliottii* tratada com nanopartículas de prata apresenta atividade antimicrobiana.

**Agradecimentos:** Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Brasil - Código Financeiro 001 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (bolsa CNPq 309186/2020-0). Os autores agradecem ao PPGMADRE da Universidade do Oeste de São Paulo.

#### REFERÊNCIAS

ASSIS DA SILVA, C. et al. Effects of mycogenic silver nanoparticles on organisms of different trophic levels.

**Chemosphere**, v. 308, p. 136540, 2022.

BEAUVAIS, A. et al. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1588–1600, 2007.

BORGES, C. C. et al. Nanoparticles-based wood preservatives: the next generation of wood protection? **CERNE**, v. 24, n. 4, p. 397–407, 2018.

CAN, A.; SIVRIKAYA, H.; HAZER, B. Fungal inhibition and chemical characterization of wood treated with novel polystyrene-soybean oil copolymer containing silver nanoparticles. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 133, p. 210–215, 2018.

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, 2003.

CHURKINA, G. et al. Buildings as a global carbon sink. **Nature Sustainability**, v. 3, n. 4, p. 269–276, 2020.

CRISAN, C. M. et al. Review on Silver Nanoparticles as a Novel Class of Antibacterial Solutions. **Applied Sciences**, v. 11, n. 3, p. 1120, 2021.

DA SILVA, G. D. et al. Silver nanoparticles in building materials for environment protection against microorganisms. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 3, p. 1239–1248, 2019.

DE SOUZA, T. A. J.; SOUZA, L. R. R.; FRANCHI, L. P. Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, p. 691–700, 2019.

FALCÃO, C. M. C. et al. Activity of poly(methacrylic acid)-silver nanoparticles on fluconazole-resistant *Candida albicans* strains: Synergistic and cytotoxic effects. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 6, p. 4300–4309, 2022.

GUIDELLI, É. J. et al. Silver nanoparticles delivery system based on natural rubber latex membranes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 4, 2013.

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, 2012.

HIMES, A.; BUSBY, G. Wood buildings as a climate solution. **Developments in the Built Environment**, v. 4, p. 100030, 2020.

ISLAM, M. A.; JACOB, M. V.; ANTUNES, E. A critical review on silver nanoparticles: From synthesis and applications to its mitigation through low-cost adsorption by biochar. **Journal of Environmental Management**, v. 281, n. January, p. 111918, 2021.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles : Properties , applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, 2019.

KÜNNIGER, T.; HEEB, M.; ARNOLD, M. Antimicrobial efficacy of silver nanoparticles in transparent wood coatings. **European Journal of Wood and Wood Products**, v. 72, n. 2, p. 285–288, 2014.

MELETIADIS, J. et al. E.DEF. 7.3.2- Método para determinação de concentração inibitória mínima em caldo dos agentes antifúngicos para leveduras. **BrCAST, Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, p. 1–19, 2020.

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**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

MOHAJERANI, A. et al. Nanoparticles in construction materials and other applications , and implications of

nanoparticle use. **Materials**, v. 12, p. 1–25, 2019.

MORADI MALEK, B. et al. Effects of silver nanoparticles and fungal degradation on density and chemical composition of heat-treated poplar wood (*Populus euroamerica*). **European Journal of Wood and Wood Products**, v. 71, n. 4, p. 491–495, 2013.

NAKAMURA, S. et al. Synthesis and Application of Silver Nanoparticles (Ag NPs) for the Prevention of Infection in Healthcare Workers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3620, 2019.

PAŘIL, P. et al. Antifungal effects of copper and silver nanoparticles against white and brown-rot fungi. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 5, p. 2720–2729, 2017.

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.

RAMAGE, G. et al. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

SEIDLER, M. J.; SALVENMOSER, S.; MÜLLER, F.-M. C. *Aspergillus fumigatus* Forms Biofilms with Reduced Antifungal Drug Susceptibility on Bronchial Epithelial Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4130–4136, 2008.

WAHAB, J. A.; MAMUN, S. AL. Polyacrylonitrile nanofiber mats containing titania/AgNP composite nanoparticles for antibacterial applications. **Materials Research Express**, v. 7, n. 1, p. 015416, 2020.

WILSON, C. et al. Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review Christina. **Res Rev J Eng Technol**, v. 6, n. 4, 2017.

YANG, Y.; LI, C. Photosynthesis and growth adaptation of *Pterocarya stenoptera* and *Pinus elliottii* seedlings to submergence and drought. **Photosynthetica**, v. 54, n. 1, p. 120–129, 2016.