UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista

MICOSSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO E AVALIAÇÃO DE FITOTOXICIDADE

CATERINA DO VALLE TROTTA

São Vicente

2024

Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista
Praça Infante D. Henrique s/nº - CEP 11330-900 - São Vicente (SP) - Brasil
Tel. (13) 3569-7100 - Fax (13) 3569-7146 - diretoria@clp.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

MICOSSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO E AVALIAÇÃO DE FITOTOXICIDADE

CANDIDATA: CATERINA DO VALLE TROTTA
ORIENTADORA: CRISTIANE ANGÉLICA OTTONI
COORIENTADOR: RAFAEL FIRMANI PERNA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

SÃO VICENTE - SP

2024

T858m

Trotta, Caterina do Valle
Micossíntese e Caracterização de Nanopartículas de Ouro com Potencial Antimicrobiano e Avaliação de Fitotoxicidade / Caterina do Valle Trotta. -- São Vicente, 2024
44 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente
Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni
Coorientador: Rafael Firmani Perna

1. Micossíntese. 2. Nanopartículas de ouro biogênicas. 3. Alginato de sódio. 4. Escherichia coli. 5. Desinfecção de água. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de mestrado do programa Demanda Social (DS), que foi fundamental para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMar), à Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp) e à Universidade Federal de Alfenas (Unifal) Campus Poços de Caldas pela infraestrutura oferecida e pelo ambiente propício à pesquisa, que contribuíram significativamente para o desenvolvimento deste estudo.

À minha orientadora, Professora Doutora Cristiane Angélica Ottoni, sou imensamente grata pela sua orientação, paciência e incentivo ao longo deste trabalho. Seu auxílio e dedicação foram essenciais para o sucesso deste projeto. Ao meu coorientador, Professor Doutor Rafael Firmani Perna, agradeço pela sua colaboração e apoio técnico, os quais enriqueceram este estudo.

À minha família, Berenice, Giacomo, Francesco, Arcangelo, Nat e tia Eli e amigos, Igor, Matheus, Bela, Biricumigos e Puns pelo constante encorajamento, compreensão e apoio incondicional ao longo dessa jornada acadêmica, expresso minha sincera gratidão.

Dedico um agradecimento especial à minha namorada, Carolina Assis da Silva, pela sua compreensão, amor e apoio inabalável em todos os momentos, tornando esta jornada mais leve e significativa.

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio e contribuições de todos vocês. Obrigado por fazerem parte desta trajetória.

Resumo

Nanopartículas de ouro (AuNPs) biogênicas são consideradas uma alternativa ecológica e promissora no tratamento de água contra bactérias patogênicas. Os fungos filamentosos (Ff) são comumente empregados para a síntese de AuNPs, devido à sua facilidade de cultivo, rápido crescimento e capacidade de sobreviver sob condições extremas. Porém, ainda existe a necessidade em selecionar Ff capazes de sintetizar AuNPs . Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar dez linhagens de fungos capazes de biossintetizar AuNPs. Dentre as linhagens selecionadas para o estudo, IBCLP15, IBCLP1212, AQ3A, IPT1011 e IPT1013 formaram AuNPs. As AuNPs obtidas foram codificadas como $AuNPs_{IBCLP15}$, $AuNPs_{1212}$, $AuNPs_{IPT1011}$ e $AuNPs_{IPT1013}$ e caracterizadas por tamanho e morfologia utilizando as técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta (ζ), índice de polidispersidade (PDI) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os nanomateriais biológicos obtidos apresentaram tamanho médio de 30-100 nm e forma esférica. Apenas $AuNPs_{IPT1011}$ e $AuNPs_{IPT1013}$ apresentaram estabilidade ao longo de um mês. A ação antimicrobiana das $AuNPs_{IPT1011}$ em solução coloidal e imobilizada em alginato de sódio foi avaliada contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* IPT245 e *Pseudomonas aeruginosa* IPT365. $AuNPs_{IPT1011}$ demonstrou ação antimicrobiana para ambas as bactérias em concentrações superiores a 50 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Estudos de fitotoxicidade foram conduzidos com a microalga dulcícola *Chlorella fusca*. De acordo com os resultados obtidos, após 72h de exposição a viabilidade celular de *C. fusca* permaneceu acima de 85%. Portanto, concluímos que para se ter resultados relevantes sobre os efeitos antimicrobianos e ecotoxicológicos de AuNPs biogênicas, são ainda necessários estudos complementares associados a completa caracterização dessas nanoestruturas e também o desenvolvimento de uma metodologia robusta e padronizada para estudos antimicrobianos e ecotoxicológicos.

Palavras-chave: Micossíntese, Nanopartículas de ouro biogênicas, Alginato de sódio, *Escherichia coli*, Desinfecção de água.

Abstract

Biogenic gold nanoparticles (AuNPs) are currently considered an ecological and promising alternative in water treatment against pathogenic bacteria. Microorganisms such as filamentous fungi (Ff) are commonly employed for AuNPs synthesis due to their ease of cultivation, fast growth and ability to survive under extreme conditions. However, there is still a need to select Ff capable of synthesizing AuNPs. In this context, the present study aimed to evaluate ten fungal strains capable of biosynthesizing AuNPs. Among the strains selected for the study, IBCLP15, IBCLP1212, AQ3A, IPT1011, and IPT1013 formed AuNPs. The obtained AuNPs were encoded as $AuNPs_{IBCLP15}$, $AuNPs_{1212}$, $AuNPs_{IPT1011}$ and $AuNPs_{IPT1013}$ and characterized by size and morphology using dynamic light scattering (DLS), zeta potential (ζ), polydispersity index (PDI), and transmission electron microscopy (TEM). The obtained biogenic nanomaterials had an average size of 30-100 nm and spherical shape. Only $AuNPs_{IPT1011}$ and $AuNPs_{IPT1013}$ showed stability over one month. The antimicrobial activity of $AuNPs_{IPT1011}$ in colloidal solution and immobilized in sodium alginate was evaluated against the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* IPT245 and *Pseudomonas aeruginosa* IPT365. $AuNPs_{IPT1011}$ demonstrated antimicrobial activity for both bacteria at concentrations above 50 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Phytotoxicity studies were conducted with the freshwater microalgae *Chlorella fusca*. According to the results obtained, after 72h of exposure, the cell viability of *C. fusca* remained above 85%. Therefore, we conclude that further complementary studies associated with the complete characterization of these nanostructures and the development of a robust and standardized methodology for antimicrobial and ecotoxicological studies are still necessary to obtain relevant results on the antimicrobial and ecotoxicological effects of biogenic AuNPs.

Keywords: Micosynthesis, Biogenic gold nanoparticles, Sodium alginate, *Escherichia coli*, Water disinfection.

SUMÁRIO

1. Introdução **8**
2. Revisão da Literatura **10**
2.1. Nanomateriais e Nanopartículas Metálicas 10
2.2. Micossíntese 12
2.3. Avaliação da fitotoxicidade usando microalgas 14
3. Objetivos **15**
4. Metodologia **16**
4.1. Microrganismos 16
4.1.1. Fungos 16
4.1.2. Bactérias 16
4.1.3. Microalga 16
4.2. Biossíntese e Caracterização das AuNPs 17
4.3. Imobilização com gel de alginato 17
4.4. Ensaio de ação antimicrobiana de AuNPs 18
4.4.1. Solução coloidal 18
4.4.2. Imobilizadas 18
4.5. Ensaio de fitotoxicidade 19
5. Resultados e Discussão **19**
5.1. Seleção de linhagens fúngicas e caracterização 19
5.2. Ação antimicrobiana de AuNPs livres 24
5.3. Ação antimicrobiana de AuNPs imobilizadas 26
5.4. Ensaio de fitotoxicidade 27
6. Conclusões **29**
7. Referências **29**

1. Introdução

A qualidade da água em níveis aceitáveis para o consumo humano é uma das necessidades essenciais para a preservação da vida, servindo como elo crucial entre a sociedade e o meio ambiente e um desafio para o setor de gestão de recursos hídricos [1,2]. As contaminações da água ocorrem devido a alguns fatores-chave, ou seja, lançamento de efluentes industriais e de esgoto, indústria agrícola, descarte ilegal de lixo e vazamento de lixiviados de aterros sanitários [3]. O acesso a serviços de água potável e saneamento administrados com segurança e higiene básica são fundamentais para a manutenção da saúde humana e ambiental, bem como o pleno desenvolvimento socioeconômico [2]. Deste modo, obter o acesso universal a serviços gerenciados com segurança é uma prerrogativa na política de desenvolvimento global, refletida no Objetivo 6 (água limpa e saneamento) dos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) [4].

A água contaminada tem graves implicações para a saúde humana. De acordo com o Relatório "*World Water Development*" disponibilizado pela UNESCO no ano de 2021, cerca de 829.000 pessoas morrem ao ano por diarréia causada por água contaminada, deste total, 5,3 % das mortes estão associadas a crianças com idade inferior a 5 anos [5]. Esforços de organizações governamentais e não governamentais para garantir a segurança da água nos últimos anos falharam em muitas áreas devido à falta de sustentabilidade das infraestruturas de abastecimento de água [6].

Cerca de 80% de toda a água residual gerada no mundo é lançada no ambiente sem tratamento prévio adequado [7], promovendo a quase 2 bilhões de pessoas a utilização de fontes de água de abastecimento contaminadas com fezes, colocando-as em risco de contraírem diversas doenças, como cólera, disenterias, tifo, poliomielite, dentre outras enfermidades [8].

O saneamento básico é definido no Brasil por quatro serviços, sendo estes o esgotamento sanitário, a gestão de resíduos sólidos, o manejo de águas pluviais e o abastecimento de água potável [9]. O controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano, distribuída por meio de sistema ou abastecimento coletivo alternativo, bem como seu padrão de potabilidade, são definidos pela Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde (MS) nº 5 de 28/09/2017 [10], onde para os parâmetros microbiológicos, a vigilância da qualidade da água potável é baseada na determinação de coliformes totais e *Escherichia coli*,

recomendado ausência de ambos em 100 ml e que não se ultrapasse o limite de 500 UFC·ml^{-1}. Segundo esta portaria, cabe ao MS e ao Sistema Único de Saúde (SUS) o controle e a vigilância da qualidade da água para consumo humano, definida no Anexo XX como: "água potável destinada à ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, independentemente da sua origem", estando incluída, portanto, água consumida em zona rural oriunda de poços de qualquer natureza.

A presença de *E. coli* na água frequentemente indica contaminação fecal e serve como um indicador mais preciso de contaminação fecal do que outras bactérias coliformes, fornecendo insights sobre a possível presença de bactérias nocivas e a natureza dos poluentes presentes [11]. A distribuição geográfica da presença de *E. coli* na água é ampla e global, sendo encontrada em diversos ambientes aquáticos, como rios, lagos e reservatórios [12]. A detecção e monitoramento de *E. coli* são essenciais para avaliar e garantir a segurança da água para consumo humano e atividades recreativas, contribuindo para a prevenção de surtos de doenças transmitidas pela água e minimizar os riscos à saúde dos usuários deste sistema [13].

As bactérias do gênero *Pseudomonas*, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*, são amplamente distribuídas e frequentemente encontradas em diversos ambientes, como lagos, água do mar, piscinas e até mesmo na água potável. São associadas a infecções do trato urinário, respiratório, da pele e da corrente sanguínea, exibindo resistência a vários antibióticos [14]. Estas bactérias também são caracterizadas como patógenos oportunistas e reconhecidas como indicadoras da qualidade da água para banho [15]. Adicionalmente, têm a capacidade de formar biofilmes problemáticos, especialmente em superfícies como chuveiros, torneiras, banheiras de hidromassagem e outros acessórios de encanamento [16]. Em função desta bactéria, é disposto na resolução RDC nº 275 de 22/09/2005 [17] um limite para cada cinco (5) amostras individuais, apenas uma pode mostrar um resultado positivo, não devendo exceder 2 UFC·ml^{-1} de amostra.

À medida que a resistência bacteriana tem se tornado cada vez mais séria, diversos estudos têm destacado o papel de nanomateriais (NM) com ação antimicrobiana, principalmente as nanopartículas (NPs) biológicas, em especial NP metálicas [18-20]. Desde a antiguidade, os íons de prata (Ag) e ouro (Au) foram utilizados como potentes agentes antimicrobianos e são amplamente utilizados contra bactérias patogênicas presentes em cateteres e na área odontológica [19]. A partir do desenvolvimento de novas tecnologias, os NM, principalmente à base de Ag e Au, passaram a ser amplamente estudados devido a suas

propriedades únicas.

As AuNPs biológicas se destacam pela fácil síntese, baixa toxicidade, forte absorção óptica e facilidade de funcionalização da superfície [21-25]. Este NM é amplamente utilizado em áreas como ação antimicrobiana, armazenamento em baterias, "*drug delivery*" e terapia do câncer [25-27]. As AuNPs comerciais demonstram eficácia contra bactérias gram-positivas, como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e bactérias gram-negativas patogênicas humanas multirresistentes como *E.coli, P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* [21, 27-30].

A síntese biológica emerge como um substituto superior para métodos químicos e físicos, sendo rápida, eficaz, econômica e produzindo grandes quantidades de AuNPs de forma reprodutível, sem que resíduos tóxicos sejam liberados no ambiente [31,32]. Estudos evidenciam as propriedades não citotóxicas das AuNPs biologicamente sintetizadas (bio-AuNPs), confirmando sua biocompatibilidade e facilidade de modificação para associação com fármacos e moléculas antitumorais, direcionadas a células específicas, incluindo células cancerígenas [33,34]. Além disso, essas AuNPs têm aplicações promissoras em nanomedicina [35], representando uma nova estratégia de biossíntese ambientalmente segura, aproveitando os efeitos sinérgicos com a natureza [36].

Entretanto, é conveniente exemplificar os impactos toxicológicos de NP em outros organismos da cadeia trófica para assim, avaliar o efeito dessas bionanopartículas. Alguns desses organismos modelo para o estudo de atividades biológicas e toxicidade de NP compreendem microalgas [37], microcrustáceos como artêmias e daphnias [38, 39], crustáceos [40] e peixes [41]. Cada um dos organismos promove elucidação sobre partes dos mecanismos de AuNPs, sendo, impacto na cadeia de produção primária e secundária, verificação de testes em modelos *in vivo*, testes pré-clínicos, entre outras resoluções que levam à uma melhora do processo de biossíntese e de aplicações de NPs [41].

2. Revisão da Literatura

2.1. Nanomateriais e Nanopartículas Metálicas

A nanotecnologia oferece soluções personalizadas empregando NM multifuncionais que atendem às necessidades de diferentes partes do mundo [42], sendo considerada uma alternativa promissora de resolver as limitações de instalações de tratamento de água e esgoto

atuais e convencionais, além de também ser uma alternativa substituta equivalente ou complemento em áreas sem essas instalações [43].

As NPs têm um enorme potencial no tratamento de água devido às suas propriedades únicas, como alta área de superfície, reatividade, propriedades magnéticas e fotocatalíticas [44,45]. Atualmente, estão sendo utilizadas diversas abordagens para empregar nanomateriais na purificação da água, entre elas, quatro tipos se destacam: membranas de nanofiltração, materiais de nano-adsorção, materiais de nano-redução e materiais de nano-fotocatálise [44,46].

NMs inorgânicos com base de metal ou óxido de metal são frequentemente usados para remover da água, partículas de metais pesados, poluentes químicos e corantes [44, 47, 48], para tal remoção também são utilizadas nanopartículas magnéticas e seus mecanismos de interações eletrostáticas [56]. Esses NMs têm uma ampla gama de aplicações no tratamento de água, incluindo tratamento de água com contaminantes organoclorados [44], inclusão em membranas para filtração de água [48], remoção de pesticidas [50] e atividade fotocatalítica [51].

Nos últimos anos, as nanopartículas metálicas (NPM) têm recebido uma maior atenção devido às suas propriedades físico-químicas únicas e potenciais aplicações em diversos campos, incluindo no tratamento de água, processos de biorremediação, medicina, eletrônica e catálise [52, 53]. Estas partículas podem ser compostas por óxidos metálicos, metais puros ou ligas metálicas e são altamente eficientes na remoção de contaminantes da água devido às suas grandes áreas superficiais e alta atividade [45].

O processo de ação bactericida de diversas NPM é descrito por meio de diversos mecanismos, incluindo a disrupção da membrana celular, desnaturação de proteínas, conjugado com biomoléculas, geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo [47, 54-57].

AuNPs são outro tipo de NPM que tem recebido interesse particular devido à sua alta estabilidade, biocompatibilidade e propriedades ópticas e eletrônicas únicas [58]. As AuNPs podem ser sintetizadas em uma variedade de formas e tamanhos usando vários métodos químicos, físicos e biológicos, sejam por plantas ou microrganismos, como fungos e bactérias, ou por meio da redução de íons de ouro, resultando em nanopartículas com tamanho, forma e propriedades de superfície únicas [59].

Bio-AuNPs demonstraram ser catalisadoras para a degradação de poluentes, incluindo metais pesados, compostos orgânicos e patógenos, bem como na detecção e quantificação de contaminantes na água [53-61]. Seu uso no tratamento de água e esgoto tem várias vantagens, incluindo elevada eficiência, baixo custo e mínimo impacto ambiental, com aplicações potenciais no desenvolvimento de tecnologias de tratamento sustentáveis e econômicas [61, 62].

2.2. Micossíntese

Nas últimas duas décadas, intensificou-se a pesquisa por métodos de síntese de nanopartículas (NPs) através da utilização de fungos ou seus extratos [63]. A micossíntese apresenta-se como uma alternativa energeticamente eficiente, ajustável e ecologicamente correta em comparação aos procedimentos físico-químicos convencionais [63]. Esta abordagem, que também inclui o uso de plantas e outros micro-organismos, responde à demanda por processos mais sustentáveis na produção de NPs, especialmente aquelas contendo metais [64]. A micossíntese de NPs contendo metais é frequentemente preferida devido à capacidade dos fungos em participar de processos naturais semelhantes, como a formação biogênica de minerais durante a formação do solo [65].

A caracterização de quaisquer NPs inicia-se com a observação visual da mudança de cor. Na formação de AuNPs, pode-se observar a mudança de cor de amarelo para vermelho, com variação de cor de vermelho intenso para roxo dependendo do aumento do tamanho das partículas [66]. A conversão da redução de ouro ao estado elementar foi confirmada pela mudança de cor nas colônias microbianas para vermelho na presença de compostos áuricos, indicando a acumulação de nanopartículas de ouro na cultura [67]. Devido à diferença na Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) exibida pelas nanopartículas, observa-se uma mudança de cor [68]. Além disso, os espectros de absorção variam para diferentes materiais, como por exemplo, para as AuNPs é de 500–550 nm [69]. A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e o Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) são técnicas amplamente utilizadas para a determinação do tamanho, forma, morfologia e agregação das nanopartículas. A MET é utilizada para a determinação de tamanho, forma, morfologia e agregação de nanopartículas. A devida preparação da amostra seca com espessura apropriada é a principal tarefa na análise de nanopartículas usando MET. A partir dos elétrons transmitidos através da amostra, uma imagem MET bidimensional é formada. Informações

sobre as estruturas internas das partículas nanocarreadoras e das paredes poliméricas das nanocápsulas podem ser fornecidas pela resolução sub-nanométrica da MET em nanopartículas poliméricas [70]. O DLS é uma das técnicas amplamente utilizadas para a determinação do tamanho de nanopartículas, sendo vantajosa para suspensões coloidais, e outras vantagens incluem seletividade, sensibilidade, facilidade de operação e menor tempo de medição. [71]. Na análise de DLS, a luz laser monocromática é usada para iluminar uma suspensão coloidal que se dispersa em um detector de fótons. A medição da intensidade da luz dispersa é estudada com base no tempo, o que fornece o tamanho hidrodinâmico das partículas. As medições do potencial zeta das NPs de ouro sintetizadas a partir de *Fusarium solani* mostraram uma transição do potencial zeta entre valores negativos e positivos, sendo que o valor positivo indica menor estabilidade das NPs devido a uma maior agregação e menos repulsão entre partículas [72].

Fungos possuem sistemas enzimáticos únicos capazes de reduzir íons metálicos a nanopartículas. A biossíntese de AuNPs por fungos envolve a redução dos íons Au(III) para Au(0) na presença de redutores intracelulares ou extracelulares, como enzimas, proteínas e metabólitos secundários. A micossíntese de AuNPs oferece várias vantagens, incluindo alta estabilidade, distribuição de tamanho estreita e escalabilidade fácil. Além disso, a imobilização de fungos em biopolímeros aumenta a eficiência e a reprodutibilidade do processo de síntese, levando à produção de AuNPs biocompatíveis com propriedades ajustáveis.

Os mecanismos predominantes de síntese extracelular e intracelular são os dois principais mecanismos pelos quais as espécies microbianas se envolvem na produção de nanopartículas. A síntese extracelular envolve a sorção de metais na superfície celular microbiana e sua consequente redução com a ajuda de enzimas [66]. Enquanto na síntese intracelular, ocorre o transporte de íons metálicos para o interior dos microrganismos e a subsequente redução dentro da célula seguida pela expulsão das nanopartículas formadas no extrato [66]. O mecanismo intracelular, no qual a membrana celular e os polipeptídeos desempenham um papel importante na biorredução de NPs metálicas. A principal membrana celular dos fungos é a rede mais externa, composta por associações 1, 4 de carboidratos, quitina e glucano. Existe uma ligação de hidrogênio inter e intramolecular entre quitina e glucano que confere rigidez à parede celular [73].

O princípio extracelular envolve enzimas dependentes de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH), especialmente redutases de nitrato, que são naturalmente produzidas com transportes de elétrons como a hidroxiquinolina no meio de reação. A transferência de elétrons de NADPH regula as morfologias de NADH e NAD+, e a transformação de íons de prata em nanopartículas de prata [74, 75]. Um estudo mostrou que *Verticellum sp.* de fungos descobriu que as sacarinas na membrana celular são necessárias para reduzir Au^{3+} [66].

2.3. Avaliação da fitotoxicidade usando microalgas

As microalgas desempenham um papel fundamental na manutenção dos ecossistemas aquáticos, contribuindo para a produção de oxigênio, a fixação de carbono e a base da cadeia alimentar aquática. Além disso, microalgas têm sido amplamente utilizadas em aplicações biotecnológicas, incluindo a produção de biocombustíveis e compostos bioativos, sendo consideradas uma fonte renovável de bioenergia [76].

As algas são amplamente reconhecidas pelo seu potencial no tratamento de águas residuais, biorremediação e sequestro de carbono. Elas representam uma fonte inestimável de produtos medicinais, bioativos e outros compostos de alto valor, incluindo ácidos graxos poliinsaturados, carotenóides, carboidratos, proteínas, aminoácidos, astaxantina, glutationa, ficotoxinas, entre outros [77].

Portanto, qualquer impacto negativo nas microalgas pode ter consequências significativas para a qualidade da água, a biodiversidade aquática e as indústrias que dependem desses organismos. Assim, a avaliação da fitotoxicidade dessas nanopartículas em microalgas é fundamental para determinar os limites seguros de concentração e compreender os mecanismos subjacentes aos efeitos adversos. Isso contribui para a gestão responsável e sustentável da nanotecnologia e para a preservação dos ecossistemas aquáticos.

A toxicidade específica de NPMs em células de algas ainda não está completamente compreendida. Além disso, os mecanismos de internalização, toxicidade e excreção de NPMs em algas precisam ser investigados para avaliar os riscos das NPMs para a biota aquática [76].

Embora a internalização de NPM em algas seja um fato incontestável, os mecanismos exatos de seu transporte através das membranas celulares ainda carecem de estudos detalhados. As propostas de mecanismos ativos e passivos para a internalização de NPs em algas e cianobactérias são, em grande parte, teóricas e não têm comprovação experimental [78]. A primeira etapa do acúmulo de NPM envolve principalmente a adsorção de NPM em

grupos funcionais presentes na parede celular. Após essa adsorção, na superfície celular e em outras matrizes extracelulares, as NPM se difundem passivamente no espaço entre a parede celular e a membrana celular, através dos poros nanométricos formados após a ruptura da parede celular [79]. A membrana celular age como uma barreira para a internalização de NPM na célula. A segunda etapa da captação intracelular das NPM envolve o transporte através da bicamada lipídica da membrana celular. Esse transporte pode ocorrer por meio de difusão simples (transporte não mediado) ou por um sistema de transporte transmembranar mediado por proteínas não identificadas [76].

É importante destacar que várias algas e cianobactérias secretam substâncias extracelulares, como exopolissacarídeos e glicoproteínas que podem mediar a adsorção de NPM não carregadas nas superfícies carregadas negativamente das células [76].

A capacidade das algas e cianobactérias de acumular NPM é altamente relevante para aplicações industriais na biorremediação de águas contaminadas [76]. A absorção e acumulação de NPM são influenciadas pela estrutura celular, composição e espessura da parede celular, composição da membrana, hidrofobicidade e permeabilidade da membrana, agregação de partículas e o tamanho resultante das partículas e outras propriedades da membrana celular. Variações nas propriedades físicas dos NPs ou nas características da membrana celular podem afetar significativamente as interações NPs-células e os processos de captação [80]. Foi demonstrada mortalidade dependente da concentração após o tratamento com AuNP revestida com amina na alga verde *Scenedesmus subspicatus* [81].

A parede celular das algas e das plantas superiores é porosa e permite o transporte bidirecional de NPM, sendo que partículas menores podem se difundir facilmente através da parede celular das algas [82]. No entanto, a taxa de difusão das NPs através das paredes celulares pode variar de acordo com a estrutura e a composição química da parede celular [76].

3. Objetivos

Produzir nanopartículas de ouro micogênicas com comprovada ação antimicrobiana e isentas de toxicidade.

Para atingir tal objetivo, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

3.1. Selecionar linhagens fúngicas que produzam bio-AuNPs;

3.2. Caracterizar as bio-AuNPs em solução coloidal;

3.3. Imobilizar as bio-AuNPs em gel alginato de sódio baixa viscosidade;

3.4. Ensaios antimicrobianos com as bactérias patogênicas;

3.5. Ensaios de fitotoxicidade com a microalga *Chlorella fusca*.

4. Metodologia

4.1. Microrganismos

4.1.1. Fungos

Dez fungos foram selecionados para o estudo, sendo os de denominação IBCLP15, IBCLP1212, IBCLP1213, IBCLP1214, IBCLP1215, IBCLP1216, IBCLP1217 (MQ1C) e IBCLP1218 (AQ3A) isolados de sedimentos de manguezal e apicum da Estação Ecológica de Juréia-Itatins/São Paulo e os fungos *Rhizopus arrhizus* IPT1011 e *Rhizopus arrhizus* IPT1013 cedidos pela Coleção de Cultura do Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de São Paulo (IPT). A manutenção da viabilidade desses microrganismos foi realizada em placas de Petri que continham Batata Dextrose Agar (PDA, do inglês Potato Dextrose Agar) a 39 $g \cdot L^{-1}$. Os isolados foram mantidos a 4ºC com renovação mensal das culturas. Para os ensaios, um fragmento de 6 mm coletado da área periférica foi sub cultivado em outra placa de Petri contendo PDA, sendo incubado a 30 ºC por 7 dias.

4.1.2. Bactérias

As bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* IPT245 e *Pseudomonas aeruginosa* IPT365 foram cedidas pelo Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de São Paulo (IPT). Os microrganismos foram crescidos "*overnight*" em meio de cultura Caldo Triptona Soja (TSB), composição final ($g \cdot l^{-1}$): peptona bacteriológica (17,0), peptona de soja (3,0), glicose (2,0), cloreto de (5,0), fosfato de dipotássio (2,0). A concentração celular foi ajustada para o ensaio em $1{,}0x10^4$ $UFC \cdot ml^{-1}$.

4.1.3. Microalga

A microalga *Chlorella fusca* foi cedida pelo Banco de Microrganismos Aidar & Kutner (BMAK) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP). A cultura foi mantida em meio de cultura líquido Bold Basal Medium (BBM) sob condições controladas de temperatura (24±1 °C) e iluminação (fluxo de fótons de aproximadamente 70 µmol de fóton $m^{-2}s^{-1}$), com fotoperíodo de 12:12 horas (claro:escuro). Para os ensaios, a

densidade celular foi ajustada com o auxílio de uma Câmara de Neubauer a uma concentração de $1{,}0\times10^{4}$ cel·ml^{-1}.

4.2. Biossíntese e Caracterização das AuNPs

O processo de biossíntese de AuNPs foi adaptado de acordo com o método descrito por Ottoni et al. [79]. Para cada linhagem, 5 fragmentos de 6 mm foram inoculados em 50 ml de MGLP (composição final: 3 g·l^{-1} de extrato de malte, 10 g·l^{-1} de glicose, 3 g·l^{-1} de extrato de levedura, 5 g·l^{-1} de peptona bacteriológica) em um Erlenmeyer de 250 ml. As culturas foram incubadas a 30 ºC, 150 rpm por 72 h. Em seguida, a biomassa foi filtrada, lavada em 500 ml de água deionizada estéril e pesada. Cinco gramas da biomassa foram adicionadas a um frasco Erlenmeyer de 250 ml que continha 50 ml de água estéril. O frasco foi mantido a 30ºC, 150 rpm por 72 h. Após este período, o filtrado foi coletado por filtração utilizando papel de filtro Whatman Grau 3. Sequencialmente, a suspensão foi filtrada em filtro de 0,22 µm (Millipore) e adicionado para cada 10 ml, 10 μl de uma solução a 1 mM de Ácido cloroáurico ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, Sigma Aldrich, Alemanha), seguida de incubação a 30 °C a 150 rpm por 72 h, no escuro.

As AuNPs foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis (comprimento de onda de 540-560 nm), mudança de cor da solução coloidal de translúcido para roxo, espalhamento dinâmico de luz (DLS) para determinação do tamanho hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (PDI) e por carga elétrica de superfície para potencial zeta (Pζ, Zetasizer Nano - ZS90, Malvern Instruments - Reino Unido). O tamanho e a forma das AuNPs foram determinados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM-JEOL, modelo JEM-2100) operado a 200 kV.

4.3. Imobilização com gel de alginato

As microcápsulas foram obtidas por gelificação ionotrópica com alginato de sódio de acordo com Pereira et al. [83]. A solução do biopolímero foi preparada solubilizando 4% (p/v) de alginato de sódio em 12 ml de bio-AuNPs. Posteriormente, a solução de biopolímero (100 ml) foi gotejada em 100 ml de uma solução aquosa de cloreto de cálcio ($CaCl_2$ a 0,14 mol·l^{-1}). O sistema foi mantido sob agitação magnética (200 rpm) por 1 min a 25 °C. Após o processo de gelificação, as microcápsulas foram filtradas a vácuo e armazenadas a 4 °C.

4.4. Ensaio de ação antimicrobiana de AuNPs

4.4.1. Solução coloidal

As atividades antibacterianas da $AuNP_{IPT1011}$ e $AuNP_{IPT1013}$ em solução coloidal contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* IPT245 e *Pseudomonas aeruginosa* IPT365 foram avaliadas pela concentração inibitória mínima (CIM) baseada no guia "Clinical and Laboratory Standards Institute" [84]. Resumidamente, 90 µL das $AuNPs_{IPT1011}$ em concentrações de 5; 10; 20; 50; 100; 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$ foram adicionadas em cada poço de uma placa de 96 poços. Em seguida, 90 µL da suspensão bacteriana em TSB, concentração final $1x10^4$ $UFC \cdot ml^{-1}$, foram adicionadas aos respectivos poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. Como controle positivo foi utilizada uma solução 100 $\mu g \cdot ml^{-1}$ de $AgNO_3$ e como controle negativo, suspensão bacteriana sem tratamento. Para indicar a presença ou ausência de o crescimento dos patógenos, após 24 h do início do ensaio, 20 µL de corante resazurina a 0,01% foram adicionados a cada poço. Os ensaios foram realizados em triplicata e a CIM foi definida como a concentração mais baixa da nanopartícula capaz de inibir o crescimento de pelo menos 90% dos patógenos.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada a partir da ausência de crescimento de patógenos. Para isso, 50 µL de duas concentrações anteriores aos CIMs foram coletadas da placa e incubadas em placas de Petri contendo meio Ágar Tripticase de Soja (do inglês Trypticase Soy Agar, TSA) composição final ($g \cdot L^{-1}$): ágar (15,0), peptona bacteriológica (15,0), cloreto de sódio (5,0) e peptona de soja (5,0), a 37 °C por 48 h.

4.4.2. Imobilizadas

Os parâmetros avaliados foram concentração do contaminante ($1,0 \times 10^3$ e $1,0 \times 10^4$ $UFC \cdot ml^{-1}$), velocidade de agitação (150 e 200 rpm), temperatura (30, 35 e 40 ºC) e quantidade dos compostos testados de 17,5 g e 8,75 g.

Utilizando frascos Erlenmeyer de 250 ml foi adicionado um volume de 50 ml de água destilada contaminada com *Escherichia coli* IPT245 ou *Pseudomonas aeruginosa* IPT365 e 8,75 g de AuNPs imobilizadas em gel alginato. Os frascos foram acondicionados em plataforma agitadora por 2 h. Uma solução de 100 $mg \cdot L^{-1}$ de $AgNO_3$ foi utilizada como controle positivo, como controle negativo apenas com inóculo e foram testadas também as condições com 8,75 g de alginato e com 8,75 g do precursor de ouro ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$). O experimento foi realizado em triplicata.

A cada 1 h de ensaio, um volume de 10 µL foi retirado e transferido para placas de Petri contendo meio sólido TSA. Após 24h de incubação à 37 ºC, foram efetuadas as contagens das UFC.

4.5. Ensaio de fitotoxicidade

O protocolo experimental para determinação de toxicidade em microalgas da espécie *C. fusca* seguiu a norma ABNT NBR 12648 [85]. Os testes de inibição de densidade celular foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 ml que continham 17,5 g de AuNPs imobilizadas em um volume de 50 ml total de BBM e inóculo ajustado para a densidade celular de $1{,}0\times10^{4}$ cel·ml^{-1}. A resposta tóxica foi avaliada a cada 24 h, por meio da densidade óptica (DO) das microalgas em um espectrofotômetro UV-Vis. A absorbância espectrofotométrica foi medida no comprimento de onda de 670 nm [86]. A incubação total decorreu a temperatura 24±1 °C, por um período de 72 h. O teste foi realizado em triplicata.

5. Resultados e Discussão

5.1. Seleção de linhagens fúngicas e caracterização

Foram avaliados 10 fungos quanto à capacidade de biossintetizar AuNPs. Dentre eles, apenas os fungos IPT1013, IBCLP15, IPT1011, IBCLP1212 e AQ3A apresentaram banda de superfície de ressonância plasmônica (SPR) correspondente à camada de valência do ouro (Au) (Figura 1). Muito embora a linhagem IBCLP1212 apresentasse capacidade em biossintetizar AuNPs, a sua estabilidade foi baixa, cerca de uma semana. A coloração das bio-AuNPs variam de acordo com seu diâmetro médio, variando entre rosa e roxo [16], quanto mais claro, menor o tamanho.

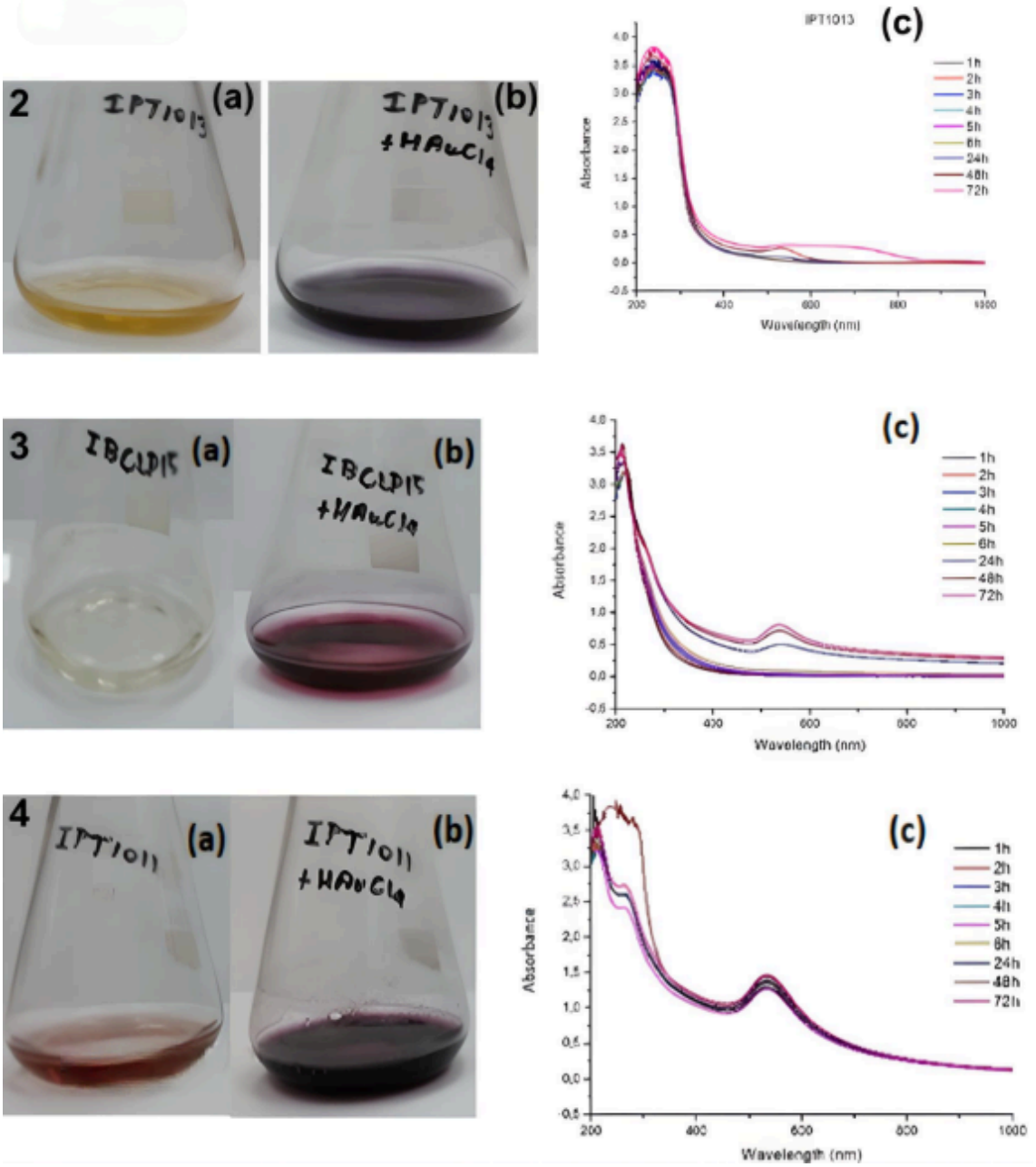


Figura 1. Coloração do extrato fúngico, para a linhagem IPT1013 (2), IBCLP15 (3) e IPT1011 (4), antes da adição de $HAuCl_4.3H_2O$ (2, 3 e 4a), fase final da reação fúngica (2, 3 e 4b) e espectro de absorção UV-Vis da região da ressonância plasmônica obtida para a solução coloidal de AuNPs (2, 3 e 4c).

A caracterização de nanomateriais é muito importante para a aplicabilidade biotecnológica, pois dependendo das características físico-químicas como morfologia, tamanho e carga, as AuNPs podem apresentar diferentes propriedades. Os nanomateriais de ouro apresentam um intenso pico de absorção por ressonância plasmônica (SPR) na região do visível, que pode ser usado para monitorar o estado de agregação das nanopartículas [87, 88].

As vantagens dos nanomateriais de ouro como agentes antibacterianos incluem ouro ser quimicamente inerte portanto a eliminação/metabolização corporal dos nanomateriais de ouro pode ser ajustada pelo design do material, possuem mecanismos antimicrobianos multimodais e, por fim induzem menos frequentemente a taxa de ocorrência de resistência bacteriana [89].

O perfil desejável para melhor ação antimicrobiana de AuNPs são valores de tamanho médio de até 80 nm, Pζ com valor maior que +30 mV ou menor que –30 mV (indicando estabilidade de AuNPs), e PDI variando de 0 a 0,3 (verificando distribuição de tamanho monodisperso).

O potencial zeta (Pζ), que quantifica o potencial eletrostático em torno de nanopartículas em solução, é um parâmetro fundamental na caracterização de nanopartículas, devido à sua influência direta na estabilidade da suspensão e na morfologia das partículas, tornando-o indispensável em investigações de estabilidade de produtos e pesquisa de adsorção em superfícies [90]. As nanopartículas podem ser classificadas com base no seu Pζ, com valores entre -10 e +10 mV indicando neutralidade aproximada, enquanto Pζ superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV correspondem a nanopartículas fortemente catiônicas e fortemente aniônicas, respectivamente [91]. Além disso, a relação entre o tamanho das nanopartículas e o Pζ, sinaliza o aumento gradual do tamanho das nanopartículas [92]. No entanto, a interpretação do comportamento das nanopartículas em relação a pequenas diferenças no Pζ deve ser realizada com cautela, dada a sensibilidade das medições a variações nas condições [93]. Diretrizes propostas para a caracterização de nanomateriais destacam a importância de utilizar o mesmo meio de medição e métodos para garantir consistência, uma vez que mesmo alterações mínimas nesses parâmetros podem resultar em discrepâncias significativas [93]. Consequentemente, a apresentação de valores de Pζ sem contexto de meio, delineação do modelo e metadados associados pode diminuir a utilidade desses dados na tomada de decisões regulatórias [93].

As características estruturais das $AuNPs_{IPT1011}$, $AuNPs_{IPT1013}$, $AuNPs_{IBCLP1218}$, $AuNPs_{IBCLP1212}$ e $AuNPs_{IBCLP15}$ estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização físico-química das AuNPs obtidas, incluindo DLS (nm), Pζ(mV) e índice de polidispersão (PDI). (*) valores a revisar.

Linhagem fúngica	Cor AuNPs (72 h)	UV-vis espectro (nm)	DLS (nm)	Pζ (mV)	PDI
IPT1011	roxo	533	29,3	-13,20	0,189
IPT1013	violeta	556	73	-38,33	*
IBCLP15	roxo	533	40,2	-24,97	0,273
IBCLP1218 (AQ3A)	violeta	545	40,49	-0,952	0,440
IBCLP1212	roxo	*	248,3	*	0,669
Parâmetros ideais	violeta	entre 400 e 750 [118]	menor que 80	entre +30 mV e -30 mV	entre 0 e 0,300

As $AuNPs_{IPT1011}$ e $AuNPs_{IPT1013}$ apresentaram estabilidade aparente, pois não foi observada alteração na cor, turbidez ou tamanho por um período de 1 mês. As AuNPs esféricas abrangem uma parte significativa do espectro visível, variando de aproximadamente 500 a 550 nm [69], correspondendo aos valores obtidos.

Para as AuNPs esféricas, a cor roxa observada é predominantemente devida à absorbância, à medida que o diâmetro aumenta, o espalhamento de luz se torna cada vez mais significativo [87]. As AuNPs com diâmetros superiores a 80 nm apresentam desvios substanciais no espalhamento de luz em direção à região do infravermelho, tornando as AuNPs de até 80 nm o tamanho ideal para detecções visualmente perceptíveis [87, 94]. Devido a essa característica, as $AuNPs_{IPT1013}$ demonstram um tamanho próximo à faixa ideal para uso como biossensores em detecções.

A Figura 2 apresenta a micrografia da $AuNPs_{IPT1011}$. As $AuNPs_{IPT1013}$ e $AuNPs_{IPT1011}$ apresentaram forma esférica, boa dispersão e tamanho médio compreendido entre 20-80 nm.

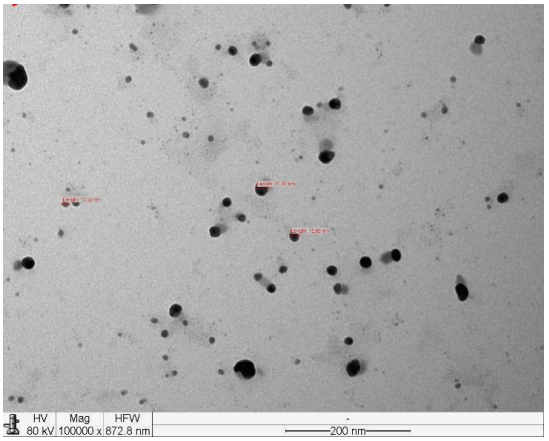


Figura 2. Imagem de Microscopia eletrônica de transmissão (MET) $AuNPs_{IPT1011}$ (Escala 200 nm, 100.000 x).

O tamanho hidrodinâmico das AuNPs em dispersão foi determinado utilizando o espalhamento dinâmico de luz (DLS). Complementarmente, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi empregada, pois, embora o DLS revele o tamanho das NPs, a medição em solução pode resultar na avaliação de aglomerações. O MET, que avalia o tamanho do núcleo das NPs sólidas, proporciona uma medição mais precisa na escala nanométrica [95-97].

A atividade catalítica das AuNPs é influenciada por diversos fatores, sendo o tamanho das partículas o principal determinante, uma vez que a área de superfície de contato das nanopartículas é inversamente proporcional ao tamanho [98].

Em relação à forma das NPs, estudos anteriores indicaram que as NPs triangulares e esféricas são mais eficazes quando comparadas às NPs em formato de bastonete [99-101]. Em um estudo envolvendo osteoblastos, foi demonstrado que as AuNPs com formato de estrela exibem maior citotoxicidade em comparação com as formas de bastão e esféricas, que são menos citotóxicas [102]. Além disso, uma pesquisa conduzida em células HeLa confirmou que as AuNPs esféricas apresentam uma maior taxa de absorção celular quando comparadas às NPs em formato de bastão [103]. A captação celular pelas células HepG2, por sua vez, provavelmente depende tanto do formato quanto do tamanho das partículas; as nanoesferas demonstraram maior captação celular em comparação com as nanoestrelas [104].

Um estudo estabeleceu que em alguns casos a forma da NP não tem muita importância para poder desenvolver o efeito antibacteriano, devido capacidade de AuNPs de liberar íons que atacam as defesas da bactéria que não vai depender se a NP é esférica ou não [105].

Com base nas características ideais que selecionamos para atividade antimicrobiana, como cor violeta, DLS menor que 80 nm, Pζ entre +30 mV e -30 mV, PDI entre 0 e 0,300, optamos por seguir os experimentos com as $AuNPs_{IPT1011}$.

5.2. Ação antimicrobiana de AuNPs livres

A atividade antibacteriana das $AuNPs_{IPT1011}$ contra *E. coli* IPT245 e *P. aeruginosa* IPT365 foi promissora. AuNPs inibiram similarmente o crescimento dos agentes patogênicos, com CIMs variando de 50 a 100 $\mu g \cdot ml^{-1}$ (Tabela 2). A solução de $AgNO_3$ utilizada como controle positivo apresentou CIM entre 1 e 10 $\mu g \cdot ml^{-1}$. A suspensão de patógenos sem tratamento foi utilizada como controle negativo, mostrando o crescimento dos microrganismos e a mudança da cor do corante resazurina, de azul para rosa.

Tabela 2. Atividade antibacteriana por concentrações inibitórias mínimas (CIMs - em $\mu g \cdot ml^{-1}$) de AuNPs sobre *Escherichia coli* IPT245 e *Pseudomonas aeruginosa* IPT365.

Amostra	IPT245	IPT365
$AuNP_{IPT1011}$	≤ 50	≤ 75
$AgNO_3$	1	10

$AgNO_3$= nitrato de prata utilizado como controle.

A literatura apresenta resultados divergentes sobre os efeitos antibacterianos das AuNPs. Alguns estudos indicam que as AuNPs não têm efeito antibacteriano [106, 107], enquanto outros demonstram a toxicidade das AuNPs em bactérias Gram-negativas como *E. coli* [108-110] e Gram-positivas como *S. epidermidis* [111]. A pesquisa de Moreno-Garrido *et al.* [108] observou enfraquecimento das membranas bacterianas e respostas de choque térmico, enquanto Cui *et al.* [109] relatou que as AuNPs causam declínio no metabolismo e colapso de processos biológicos. Além disso, a atividade antibacteriana das AuNPs é evidente em estudos com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, especialmente quando as AuNPs têm tamanhos menores, como 50 nm [111-113] e 2 a 10 nm [110]. Basiratnia *et al.* [113] sugeriram que a atividade se deve à adsorção e penetração das AuNPs nas células.

As AuNPs com tamanhos entre 6–40 nm demonstram uma maior atividade antibacteriana tamanho-dependente, com estudos utilizando AuNPs nessa faixa de tamanho obtendo resultados eficazes [114-117]. Um tamanho reduzido de NPs, inferior ao tamanho da

membrana bacteriana, pode facilitar os efeitos antibacterianos por meio da interação ou penetração das NPs na bactéria. As AuNPs ultrapequenas (2 nm) não danificam a parede celular bacteriana, mas podem ser eficazes como veículos para transportar medicamentos ou agentes antimicrobianos para dentro da bactéria [118, 119]. As nanopartículas menores que 10 nm podem penetrar nas células bacterianas e exercer seu efeito antibacteriano [120], enquanto aquelas maiores que 10 nm não podem [121, 122].

No entanto, as AuNPs de 80 nm mostraram atividade antibacteriana apenas em concentrações muito elevadas, como 197 $\mu g \cdot ml^{-1}$, contra *S. aureus* [123]. A viabilidade celular pode ser afetada à medida que a concentração de AuNPs aumenta, podendo as AuNPs penetrar facilmente na membrana e se acumular em organelas, como os vacúolos, em concentrações superiores a 600 $\mu g \cdot ml^{-1}$ [124, 125].

A estrutura da parede celular bacteriana também influencia a penetração das nanopartículas, com as bactérias Gram-positivas possuindo uma parede celular espessa (20–80 nm) e as bactérias Gram-negativas uma camada mais fina (<10 nm), além de uma membrana externa adicional com poros e apêndices [126]. A parede celular das bactérias Gram-negativas é mais complexa e consiste em duas bicamadas de fosfolipídios (membrana interna e externa), separadas por um espaço periplasmático que contém peptidoglicano [125,126]. A rede de peptidoglicano é limitada a apenas algumas camadas (a espessura da parede celular é de até 10 nm) [117]. Devido às diferenças na estrutura da parede celular bacteriana, espera-se que a penetração de nanopartículas nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas seja diferente [117,126,127]. Essas diferenças na estrutura da parede celular devem ser levadas em consideração ao estudar a interação entre AuNPs e bactérias.

É importante ressaltar que, ao contrário dos estudos anteriores que utilizaram o método Kirby-Bauer de difusão em disco, o presente trabalho não seguiu esse método. Portanto, as AuNPs foram aplicadas em placas de 96 poços, o que pode explicar a divergência nos resultados em relação aos estudos anteriores que não detectaram atividade antibacteriana. Estudos de toxicidade nem sempre são sistemáticos, o que explica os resultados contraditórios [128].

Estudos têm demonstrado que a resistência das bactérias a metais pesados e antibióticos pode aumentar simultaneamente com a presença de metais pesados, alterando a resistência a antibióticos nas fontes de água e, indiretamente, aumentar a ameaça à saúde humana [129-131].

5.3. Ação antimicrobiana de AuNPs imobilizadas

Uma vez que as AuNPs também possuem interesse de estudos, devido a suas diversas aplicações [132,133], entre elas, a purificação da água e controle de poluição [134], foram realizados testes antimicrobianos contra a bactéria *E. coli* utilizando AuNPs e seu precursor $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ (Figura 3a e 3b). A imobilização de nanopartículas evita a aglomeração e aumenta sua estabilidade, permitindo sua reutilização. O alginato adicionalmente estabiliza as pequenas NPs de ouro bem dispersas [135].

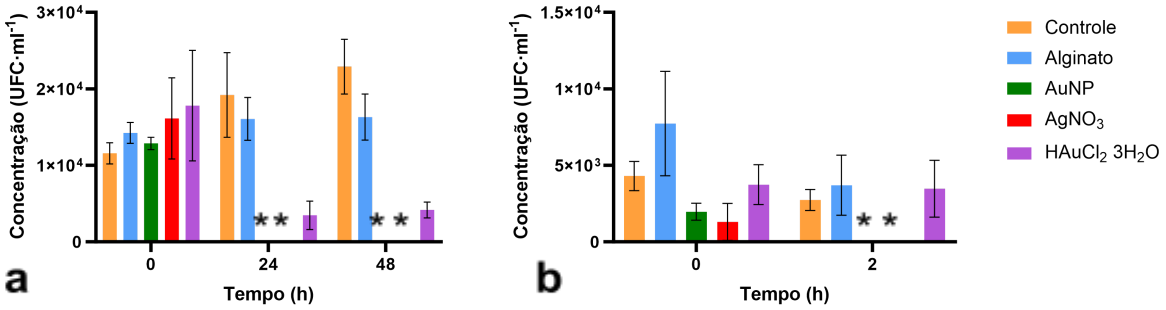


Figura 3. Efeito da concentração AuNPs imobilizadas em alginato (a) 17,5 g e (b) 8,75 g contra *Escherichia coli* IPT245 na concentração de 10^4 UFC·ml^{-1} (a) e 10^3 UFC·ml^{-1} (b). Controle (■) alginato (■), $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ (■), $AgNO_3$ (■) e AuNPs (■). O ensaio foi realizado a uma temperatura constante de 35°C, 150 rpm por 48 h (a) e 2 h (b). A contagem de UFC·ml^{-1} foi realizada em placas contendo meio TSA. (*) valores não detectados.

O ensaio preliminar com 17,5g e 48 h, teve ótima eficiência, 100% de citotoxicidade, portanto optamos por reduzir o tempo de experimento e concentração do composto. Sendo o segundo ensaio com 8,75 g e 2 h, também demonstrando 100% de citotoxicidade a partir de 2 h. Em ambos os experimentos o precursor $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ apresentou toxicidade, especialmente em 48 h de incubação.

Além disso, em contraste, estudos presentes na literatura como o de Williams *et al.* [136] demonstraram que havia pouco ou nenhum efeito das AuNPs inorgânicas, produzidas por reação de citrato de sódio com $HAuCl_4$ em água e posteriormente revestida com polietilenoglicol (PEG) ± 30 nm, sobre o crescimento de *E. coli*, indicando que as AuNPs produzidas por rota biológica são promissoras, além de sustentáveis.

Na sequência foram feitos ensaios com 8,75 g dos compostos a 40°C, 150 rpm por 2 h (Figura 4).

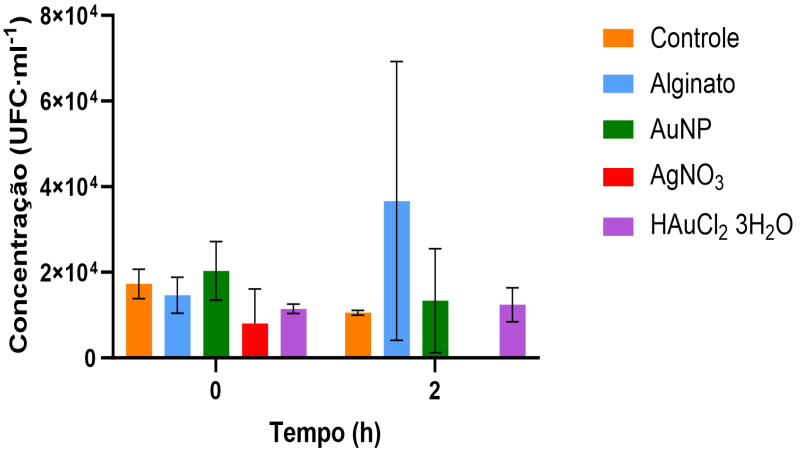


Figura 4. Efeito da concentração AuNPs imobilizadas em alginato 8,75 g contra *Escherichia coli* IPT245 na concentração de 10^4 UFC·ml^{-1}. Controle (■) alginato (■), $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ (■), $AgNO_3$ (■) e AuNPs (■). O ensaio foi realizado a uma temperatura constante de 40°C, 150 rpm por 2 h. A contagem de UFC·ml^{-1} foi realizada em placas contendo meio TSA.

Quanto ao teste utilizando a temperatura de 40°C, as $AuNPs_{IPT1011}$ não se mostraram eficiente no período de 2 h, assim como o precursor $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, resultado semelhante a estudos com pouco ou nenhum efeito das AuNPs quando não revestidas por algum composto com efeitos antimicrobianos [137, 138].

5.4. Ensaio de fitotoxicidade

De acordo com os resultados obtidos de densidade celular da microalga *C. fusca*, nenhum dos compostos apresentaram toxicidade para o microrganismo (Figura 5).

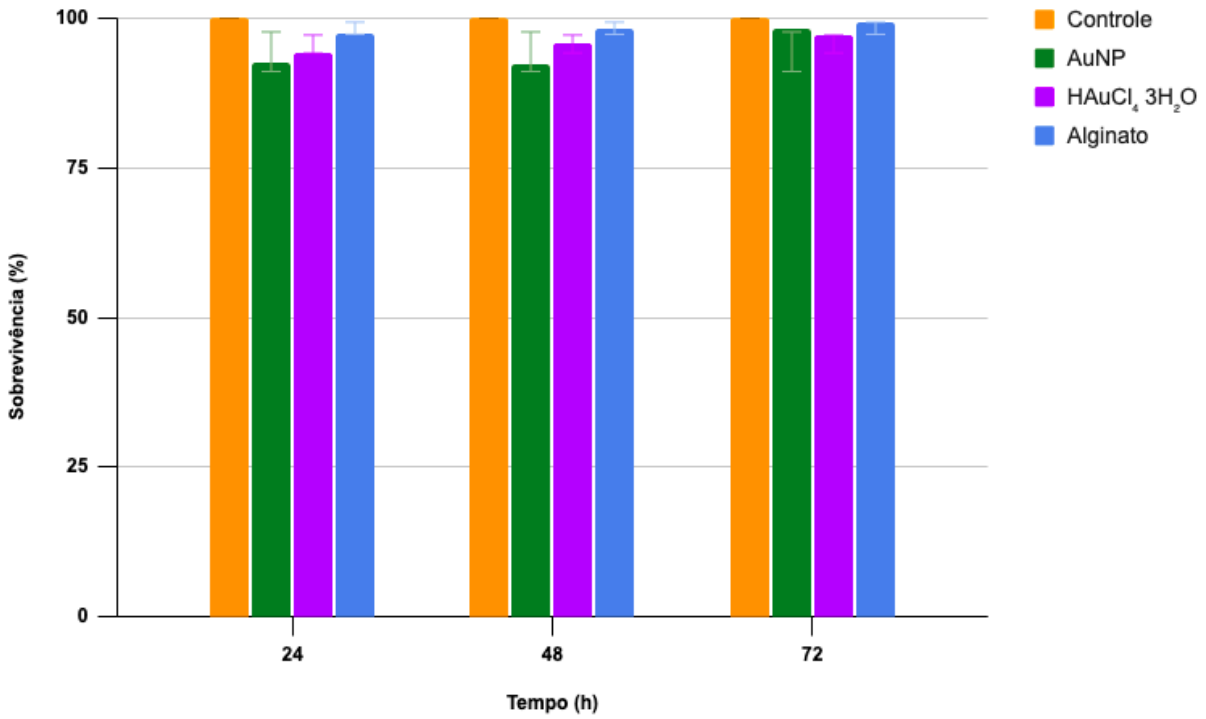


Figura 5. Fitotoxicidade de *Chlorella fusca* expostas a $AuNPs_{IPT1011}$, $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ e alginato. Barras de erro representando o desvio padrão.

Nos ensaios de fitotoxicidade, as $AuNPs_{IPT1011}$ não apresentaram comprometimento no crescimento de *C. fusca* e, após 72 h de exposição, a viabilidade celular permaneceu acima de 85%. É geralmente observado que a citotoxicidade das AuNPs é dependente do tamanho, onde tamanhos menores demonstraram maior potencial de efeitos tóxicos nas células [138]. A resposta das algas a condições de estresse, incluindo a presença de metais, envolve a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS), induzindo estresse oxidativo nas células e superprodução de pigmentos e carotenóides [140-143]. As ROS são tóxicas, no entanto, em um nível moderado desempenham um papel essencial nas vias de sinalização celular [144].

Os mecanismos biológicos de citotoxicidade podem variar de acordo com as características físico-químicas das AuNPs. Wei e Wang [145] mostraram que as NPs imitam os antioxidantes, mecanismos de eliminação de ROS, presentes em algas e cianobactérias, esse resultado também é consistente com alguns resultados publicados por outros pesquisadores [146, 147]. Além disso, íons metálicos liberados por agregados de NPs podem causar toxicidade em algas, levando à formação de ROS, peroxidação lipídica entre outras respostas de toxicidade [144, 148]. Ainda, a agregação de NPs reduz a biodisponibilidade das

nanopartículas e influencia sua biodisponibilidade no sistema, posteriormente, isso pode afetar a captação dessas NPs e torná-la mais complicada nas avaliações de toxicidade [149, 150]. Portanto, a compreensão dos mecanismos de resposta das algas às AuNPs é crucial para o desenvolvimento seguro da nanotecnologia [151].

6. Conclusões

Dentre os 10 fungos avaliados quanto à capacidade de formar bio-AuNPs, apenas, IPT1011, IPT1013, IBCLP15, IBCLP1212 e AQ3A formaram o nanomaterial. As AuNPs IPT1011 e IPT1013 apresentaram maior estabilidade e características estruturalmente relevantes para estudos a condução dos estudos associados a ação antimicrobiana e de fitotoxicidade, tais quais UV-Vis no espectro do ouro, entre 400 e 750 nm, cor da NP violeta, tamanho médio em abaixo de 80 nm, Pζ entre +30 mV e -30 mV e PDI entre 0 e 0,300 indicando distribuição monodispersa.

Os ensaios antimicrobianos utilizando as $AuNPs_{IPT1011}$ em solução coloidal, e contra *E. coli* IPT245 e *P. aeruginosa* IPT365 demonstraram que o bionanomaterial na forma livre possui ação antimicrobiana, para ambas as bactérias, em concentrações superiores a 50 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Na forma encapsulada em alginato de sódio, foi observada uma citotoxicidade de 100% quando exposta a 17,5 g e 8,75 g dos compostos empregados após 2 horas de ensaio.

Nos ensaios de fitotoxicidade, as $AuNPs_{IPT1011}$ não comprometeram o crescimento de *C. fusca* e, após 72 h de exposição, a viabilidade celular permaneceu acima de 85%.

7. Referências

1. Mukate, S., Wagh, V., Panaskar, D., Jacobs, J.A., Sawant, A. (2019). Development of new integrated water quality index (IWQI) model to evaluate the drinking suitability of water, Ecological Indicators, 101, 348-354. doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.01.034.
2. Anthonj, C., Setty, KE., Ferrero, G., Yaya, Al-M.A., Poague, K.I.H.M., Marsh,A.J., Augustijn, E-W. (2022). Do health risk perceptions motivate water - and health-related behaviour? A systematic literature review, Science of The Total Environment, 819, 152902. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152902.
3. Hasan, H.A., Muhammad, M.H., Ismail, N'I. (2020). A review of biological drinking water treatment technologies for contaminants removal from polluted water resources, Journal of Water Process Engineering, 33, 101035, doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.101035.

4. Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil. Nações Unidas Brasil. 2024. Disponível em: https://brasil.un.org/pt-br/sdgs
5. Lin, L., Yang, H., Xu, X. (2022). Effects of water pollution on human health and disease heterogeneity: a review. Frontiers in Environmental Science, 10, 880246. doi.org/10.3389/fenvs.2022.880246.
6. WHO. Guidelines for Drinking Water Quality 4th Edn (World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011). http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf.
7. Luvhimbi, N., Tshitangano, T.G., Mabunda, J.T., Olaniyi, F.C., Edokpayi, J.N. (2022). Water quality assessment and evaluation of human health risk of drinking water from source to point of use at Thulamela municipality, Limpopo Province, Scientific Reports, 12, 6059.doi.org/10.1038/s41598-022-10092-4
8. Vieira, A., Pyrrho, A., Maia, P. (2018). Conhecendo as doenças transmitidas pela água. 10.17655/9788567211855.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006. 212 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde) https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_qualidade_agua.pdf
10. Brasil, Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação MS nº 5 de 28 de setembro de 2017. Dispõe sobre a Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. http://portalsinan.saude.gov.br/images/documentos/Legislacoes/Portaria_Consolidacao_5_28_SETEMBRO_2017.pdf
11. Khan, F.M., Gupta, R. (2020). *Escherichia coli* (*E. coli*) as an Indicator of Fecal Contamination in Groundwater: A Review. Sustainable Development of Water and Environment: Proceedings of the ICSDWE2020, 225-235.
12. Yoneda, I., Rozanah, U.N., Nishiyama, M., Mith, H., Watanabe, T. (2022). Detection and genetic analysis of Escherichia coli from Tonle Sap Lake and its tributaries in Cambodia: Spatial distribution, seasonal variation, pathogenicity, and antimicrobial resistance. Environmental Pollution, 315, 120406.
13. Sousa, L.S.D.M., Souza, F.F.G., Henriques, J.A. (2022). Qualidade da Água do Sistema de Abastecimento numa Comunidade Rural em Município de Pequeno Porte no Sudeste do

Brasil. Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology, 26(1), 59-64.

14. Langoni, H., Troncarelli, M.Z., de Souza, L.C., da Silva, R.C. (2015). Microbiological quality of water from swimming pools of a sport club in Botucatu-SP, Brazil. Veterinária e Zootecnia, 22(1), 61-71.
15. Neves P.R., Mamizuka E.M., Levy C.E., Lincopan N. 2011 *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil (Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: an endemic problem in Brazil). Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 47, 409–420.
16. Anversa, L., Arantes Stancari, R.C., Garbelotti, M., da Silva Ruiz, L., Pereira, V.B.R., Nogueira Nascentes, G.A., Mores Rall, V.L. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* in public water supply. Water Practice and Technology, 14(3), 732-737.
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. RDC no. 275, de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural [resolução RDC na internet]. Diário Oficial da União 23 set 2005; seção 1. https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0275_22_09_2005.html
18. Badeggi, U.M., Ismail, E., Adeloye, A.O., Botha, S., Badmus, J.A., Marnewick, J.L., Hussein, A.A. (2020). Green synthesis of gold nanoparticles capped with procyanidins from *Leucosidea sericea* as potential antidiabetic and antioxidant agents. Biomolecules, 10(3), 452.
19. Su, C., Huang, K., Li, H. H., Lu, Y. G., Zheng, D. L. (2020). Antibacterial properties of functionalized gold nanoparticles and their application in oral biology. Journal of Nanomaterials. Article ID 5616379, 13 pages. https://doi.org/10.1155/2020/5616379
20. Deepa, K., Sridhar, A., Panda, T. (2022). Biogenic Gold Nanoparticles: Current Applications and Future Prospects. J Clust Sci. https://doi.org/10.1007/s10876-022-02304-8
21. Senthilkumar, S., Kashinath, L., Ashok, M., Rajendran, A. (2017). Antibacterial Properties and Mechanism of Gold Nanoparticles Obtained from *Pergularia daemia* Leaf Extract. J Nanomed Res 6(1): 00146. DOI: 10.15406/jnmr.2017.06.00146
22. Aromal, S. A., Vidhu, V. K., Philip, D. (2012). Green synthesis of well-dispersed gold nanoparticles using Macrotyloma uniflorum. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 85(1), 99-104.
23. Payne, J.N.; Badwaik, V.D.; Waghwani, H.K.; Moolani, H.V.; Tockstein, S.; Thompson, D.H.; Dakshinamurthy, R. (2018). Development of dihydrochalcone-functionalized gold

nanoparticles for augmented antineoplastic activity. Int. J. Nanomed. 13, 1917–1926.

24. Benedec, D.; Oniga, I.; Cuibus, F.; Sevastre, B.; Stiufiuc, G.; Duma, M.; Lucaciu, C.M. (2018) *Origanum vulgare* mediated green synthesis of biocompatible gold nanoparticles simultaneously possessing plasmonic, antioxidant and antimicrobial properties. Int. J. Nanomed. 13, 1041.
25. Torabi, N., Nowrouzi, A., Ahadi, A., Vardasbi, S., Etesami, B. (2019). Green synthesis of gold nanoclusters using seed aqueous extract of *Cichorium intybus L.* and their characterization. SN Appl. Sci. 1, 981.
26. Rai, R.V., Bai, J.A. (2017). Nanoparticles and their potential application as antimicrobials in the food industry. Sci Against Microb Pathog: Commun Curr Res Technol Adv. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804303-5.00016-x.R.
27. Bindhu, M. R., Umadevi, M. (2014). Silver and gold nanoparticles for sensor and antibacterial applications. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 128, 37-45. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142514003175?via%3Dihub
28. Boomi, P., Ganesan, R.M., Poorani, G., Prabu, H.G., Ravikumar, S., Jeyakanthan, J. (2019). Biological synergy of greener gold nanoparticles by using *Coleus aromaticus* leaf extract. Materials Science and Engineering: C, 99, 202-210.
29. Toledo, A.C.O. (2021). Desenvolvimento, caracterização e avaliação das atividades biológicas de nanopartículas de prata e de ouro, obtidas por síntese verde, a partir do extrato aquoso das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae) associadas à gentamicina e ao ácido hialurônico. https://tede2.uepg.br/jspui/bitstream/prefix/3339/1/Ana%20Cristina%20Oltramari%20Toledo.pdf
30. Abdel-Raouf, N., Al-Enazi, N.M., Ibraheem, I.B. (2017). Green biosynthesis of gold nanoparticles using *Galaxaura elongata* and characterization of their antibacterial activity. Arabian Journal of Chemistry, 10, S3029-S3039. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535213004140?via%3Dihub
31. Aisida, S.O., Ugwoke, E., Uwais, A., Iroegbu, C., Botha, S., Ahmad, I., Ezema, F.I. (2019). Incubation period induced biogenic synthesis of PEG enhanced *Moringa oleifera* silver nanocapsules and its antibacterial activity. Journal of Polymer Research, 26(9), 1-11.
32. Folorunso, A., Akintelu, S., Oyebamiji, A.K., Ajayi, S., Abiola, B., Abdusalam, I., Morakinyo, A. (2019). Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of gold

nanoparticles from leaf extracts of *Annona muricata*. Journal of Nanostructure in Chemistry, 9(2), 111-117.

33. Shunmugam, R., Balusamy, S.R., Kumar, V., Menon, S., Lakshmi, T., Perumalsamy, H. (2021). Biosynthesis of gold nanoparticles using marine microbe (*Vibrio alginolyticus*) and its anticancer and antioxidant analysis. Journal of King Saud University-Science, 33(1), 101260.
34. Goddard, Z.R., Marín, M.J., Russell, D.A., Searcey, M. (2020). Active targeting of gold nanoparticles as cancer therapeutics. Chemical Society Reviews, 49(23), 8774-8789.
35. Botteon, C.E.A., Silva, L.B., Ccana-Ccapatinta, G.V., Silva, T.S., Ambrosio, S.R., Veneziani, R.C.S., Marcato, P. D. (2021). Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles using Brazilian red propolis and evaluation of its antimicrobial and anticancer activities. Scientific Reports, 11(1), 1-16.
36. Saravanan, M., Vahidi, H., Cruz, D.M., Vernet-Crua, A., Mostafavi, E., Stelmach, R., Barabadi, H. (2020). Emerging antineoplastic biogenic gold nanomaterials for breast cancer therapeutics: a systematic review. International Journal of Nanomedicine, 15, 3577.
37. Davarpanah, E., Guilhermino, L. (2019). Are gold nanoparticles and microplastics mixtures more toxic to the marine microalgae *Tetraselmis chuii* than the substances individually?. Ecotoxicology and Environmental Safety, 181, 60-68.
38. Vijayakumar, S., Chen, J., Kalaiselvi, V., Divya, M., González-Sánchez, Z.I., Durán-Lara, E. F., Vaseeharan, B. (2021). Antibacterial and antibiofilm activities of marine polysaccharide laminarin formulated gold nanoparticles: An ecotoxicity and cytotoxicity assessment. Journal of Environmental Chemical Engineering, 9(4), 105514.
39. Hnamte, S., Kaviyarasu, K., Siddhardha, B. (2020). Evaluation of Toxicity of Nanoparticles Using Brine Shrimp. In Model Organisms to Study Biological Activities and Toxicity of Nanoparticles (pp. 401-415). Springer, Singapore.
40. Borase, H.P., Muley, A. B., Patil, S. V., Singhal, R.S. (2019). Nano-eco toxicity study of gold nanoparticles on aquatic organism *Moina macrocopa*: As new versatile ecotoxicity testing model. Environmental Toxicology and Pharmacology, 68, 4-12.
41. Jagdale, S. C., Hude, R.U., Chabukswar, A.R. (2020). Zebrafish: a laboratory model to evaluate nanoparticle toxicity. In Model organisms to study biological activities and toxicity of nanoparticles (pp. 371-399). Springer, Singapore.
42. Hlongwane, G.N., Sekoai, P.T., Meyyappan, M., Moothi, K. (2019). Simultaneous removal of pollutants from water using nanoparticles: A shift from single pollutant control to multiple

pollutant control. Science of The Total Environment, 656, 808-833.

43. Mautner, A. (2020). Nanocellulose water treatment membranes and filters: a review. Polymer international, 69(9), 741-751. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pi.5993
44. Abid, J., Bano, N., Khan, S., Khan, T.M. (2022). A review on nanomaterial applications in wastewater treatment and toxicity to human beings. 10.9790/2402-1610014854.
45. Barbosa, J.R.M. (2019). Desenvolvimento de tecnologia para purificação de água através do uso de nanomateriais. U. Porto. https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/122892/2/358471.pdf
46. Sadegh, H., Ali, G.A., Gupta, V.K., Makhlouf, A.S.H., Shahryari-Ghoshekandi, R., Nadagouda, M.N., Megiel, E. (2017). The role of nanomaterials as effective adsorbents and their applications in wastewater treatment. Journal of Nanostructure in Chemistry, 7, 1-14. https://link.springer.com/article/10.1007/s40097-017-0219-4
47. Khan, S. T., Malik, A. (2019). Engineered nanomaterials for water decontamination and purification: From lab to products. Journal of hazardous materials, 363, 295-308. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389418308859
48. Mohammed, L., Gomaa, H.G., Ragab, D., Zhu, J. (2017). Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. Particuology, 30, 1-14. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674200116300852
49. Singh, D.V., Bhat, R.A., Dervash, M.A., Qadri, H., Mehmood, M.A., Dar, G. H., Hameed, M., Rashid, N. (2020). Wonders of nanotechnology for remediation of polluted aquatic environs. Fresh Water Pollution Dynamics and Remediation, 319-339.
50. Hot, J., Topalov, J., Ringot, E., Bertron, A. (2017). Investigation on parameters affecting the effectiveness of photocatalytic functional coatings to degrade NO: TiO2 amount on surface, illumination, and substrate roughness. International Journal of Photoenergy, 2017. https://www.hindawi.com/journals/ijp/2017/6241615
51. Fogler, S. C. Elements of chemical engineering reactions, 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2012.
52. Demchenko, V., Riabov, S., Sinelnikov, S., Radchenko, O., Kobylinskyi, S., Rybalchenko, N. (2020). Novel approach to synthesis of silver nanoparticles in interpolyelectrolyte complexes based on pectin, chitosan, starch and their derivatives. Carbohydrate polymers, 242, 116431. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720306056
53. Agarwal, H., Nakara, A., Shanmugam, V. K. (2019). Anti-inflammatory mechanism of

various metal and metal oxide nanoparticles synthesized using plant extracts: A review. Biomedicine & Pharmacotherapy, 109, 2561-2572. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218371956

54. Uchiyama, M.K., Deda, D.K., Rodrigues, S.F.D.P., Drewes, C.C., Bolonheis, S.M., Kiyohara, P.K., Toledo, S.P., Colli, W., Araki, K., Farsky, S. H. P. (2014). In vivo and in vitro toxicity and anti-inflammatory properties of gold nanoparticle bioconjugates to the vascular system. Toxicological Sciences, 142(2), 497-507. 10.1093/toxsci/kfu202

55. Ortiz-Benítez, E.A., Velázquez-Guadarrama, N., Durán Figueroa, N.V., Quezada, H., Olivares-Trejo, J.D.J. (2019). Antibacterial mechanism of gold nanoparticles on *Streptococcus pneumoniae*. Metallomics, 11(7), 1265-1276. https://doi.org/10.1039/c9mt00084d

56. Godoy-Gallardo, M., Eckhard, U., Delgado, L.M., de Roo Puente, Y.J., Hoyos-Nogués, M., Gil, F.J., Perez, R.A. (2021). Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications. Bioactive Materials, 6(12), 4470-4490. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X21002024

57. Hammami, I., Alabdallah, N. M. (2021). Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. Journal of King Saud University - Science, 33(7), 101560. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101560

58. Budlayan, M.L., Lagare-Oracion, J.P., Rosa, L.D., Rodriguez, M.J., Manigo, J., Alguno, A., Austria, E., Arco, S., Patricio, J., Deocaris, C., Basilia, B., Capangpangan, R. (2021). Gold nanoparticles-decorated paper-based sensor for rapid cyanide detection in water. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 12(2), 025007. 10.1088/2043-6262/abffc7

59. Huang, J., Sun, J., Warden, A. R., Ding, X. (2020). Colorimetric and photographic detection of bacteria in drinking water by using 4-mercaptophenylboronic acid functionalized AuNPs. Food Control, 108, 106885. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106885

60. Bindhu, M.R., Saranya, P., Sheeba, M., Vijilvani, C., Rejiniemon, T.S., Al-Mohaimeed, A. M., AbdelGawwad, M.R., Elshikh, M. S. (2021). Functionalization of gold nanoparticles by β-cyclodextrin as a probe for the detection of heavy metals in water and photocatalytic degradation of textile dye. Environmental Research, 201, 111628. https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111628

61. Nguyen, T.H.A., Nguyen, V.C., Phan, T.N.H., Vasseghian, Y., Trubitsyn, M.A., Nguyen, A.T.,

Chau, T.P., Doan, V.D. (2022). Novel biogenic silver and gold nanoparticles for multifunctional applications: Green synthesis, catalytic and antibacterial activity, and colorimetric detection of Fe (III) ions. Chemosphere, 287, 132271.

62. FAO. (2021). The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture (SOLAW)—Systems at Breaking Point. https://www.fao.org/nr/solaw/en/
63. Šebesta, M., Vojtková, H., Cyprichová, V., Ingle, A. P., Urík, M., Kolenčík, M. (2022). Mycosynthesis of metal-containing nanoparticles—Fungal metal resistance and mechanisms of synthesis. International Journal of Molecular Sciences, 23(22), 14084. https://www.mdpi.com/1422-0067/23/22/14084
64. Salem, S.S.; Fouda, A. (2021). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: An Overview. Biol. Trace Element Res. 199, 344–370
65. Yadav, A.; Kon, K.; Kratošová, G.; Durán, N.; Ingle, A.P.; Rai, M. (2015). Fungi as an efficient mycosystem for the synthesis of metal nanoparticles: Progress and key aspects of research. Biotechnol. Lett. 37, 2099–2120.
66. Saravanan, A., Kumar, P. S., Karishma, S., Vo, D. V. N., Jeevanantham, S., Yaashikaa, P. R., & George, C. S. (2021). A review on biosynthesis of metal nanoparticles and its environmental applications. Chemosphere, 264, 128580. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653520327752
67. Vetchinkina, E. P., Loshchinina, E. A., Burov, A. M., Dykman, L. A., & Nikitina, V. E. (2014). Enzymatic formation of gold nanoparticles by submerged culture of the basidiomycete *Lentinus edodes*. Journal of Biotechnology, 182, 37-45.
68. Zhang, X., Qu, Y., Shen, W., Wang, J., Li, H., Zhang, Z., ... & Zhou, J. (2016). Biogenic synthesis of gold nanoparticles by yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1 for catalytic reduction of nitrophenols. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 497, 280-285.
69. Shukla, A. K., & Iravani, S. (2017). Metallic nanoparticles: green synthesis and spectroscopic characterization. Environmental Chemistry Letters, 15, 223-231.
70. Crucho, C. I., & Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. Materials Science and Engineering: C, 80, 771-784.
71. Kumari, Y., Kaur, G., Kumar, R., Singh, S. K., Gulati, M., Khursheed, R., Porwal, O. (2019). Gold nanoparticles: New routes across old boundaries. Advances in colloid and interface

science, 274, 102037.

72. Clarance, P., Luvankar, B., Sales, J., Khusro, A., Agastian, P., Tack, J. C., Kim, H. J. (2020). Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using endophytic fungi *Fusarium solani* and its in-vitro anticancer and biomedical applications. Saudi Journal of Biological Sciences, 27(2), 706-712
73. Bhati, M. (2023). Biogenic synthesis of metallic nanoparticles: Principles and applications. Materials Today: Proceedings, 81, 882-887.
74. Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M. I., Kumar, R., & Sastry, M. (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 28(4), 313-318.
75. Komatsu, H., Kang, D., Lin, H., Cook, C. A., Mendez, D., Rawson, J., Tai, Y. C. (2016). MEMS oxygen transport device for islet transplantation in the subcutaneous site. Micro & Nano Letters, 11(10), 632-635.
76. Mahana, A., Guliy, O.I., Mehta, S.K. (2021). Accumulation and cellular toxicity of engineered metallic nanoparticle in freshwater microalgae: Current status and future challenges. Ecotoxicology and Environmental Safety, 208, 111662.
77. Mehta, S.K., Gaur, J.P. (2005). Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. Critical reviews in biotechnology, 25(3), 113-152.
78. Nguyen, M. K., Moon, J. Y., Lee, Y. C. (2020). Microalgal ecotoxicity of nanoparticles: An updated review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 201, 110781.
79. Ottoni, C.A., Simões, M.F., Fernandes, S., Dos Santos, J.G., Da Silva, E.S., de Souza, R.F.B., Maiorano, A.E. (2017). Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. AMB Express, 7(1), 1-10.
80. Tripathi, D.K., Ahmad, P., Sharma, S., Chauhan, D.K., Dubey, N.K. (Eds.). (2017). Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms: Concepts and Controversies: Volume 1.
81. Renault, S., Baudrimont, M., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P. M., Mornet, S., Brisson, A. (2008). Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: a phytoplanktonic alga (Scenedesmus subspicatus) and a benthic bivalve (Corbicula fluminea). Gold bulletin, 41, 116-126.
82. Samberg, M.E., Orndorff, P.E., Monteiro-Riviere, N.A. (2011). Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods. Nanotoxicology, 5(2), 244-253.

83. Pereira, A., Fraga, J.L., Diniz, M., Fontes-Sant'Ana, G., Amaral, P. (2018). High catalytic activity of lipase from *Yarrowia lipolytica* immobilized by microencapsulation. International Journal of Molecular Sciences, 19(11), 3393.

84. Clinical and Laboratory Standards Institute - NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9].

85. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 12648:2018. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae).

86. Comitre, A. A., da Silva Vaz, B., Costa, J. A. V., de Morais, M. G. (2020). Renewal of nanofibers in *Chlorella fusca* microalgae cultivation to increase CO2 fixation. Bioresource Technology, 124452. doi:10.1016/j.biortech.2020.1

87. Tessaro, L., Aquino, A., de Carvalho, A.P.A., Conte-Junior, C.A. (2021). A systematic review on gold nanoparticles based-optical biosensors for Influenza virus detection. Sensors and Actuators Reports, 3, 100060.

88. Tessaro L., Aquino A., Panzenhagen P., Ochioni A.C., Mutz Y.S., Raymundo-Pereira P.A., Vieira I.R.S., Belem N.K.S., Conte-Junior C.A. (2022). Development and application of an SPR nanobiosensor based on AuNPs for the detection of SARS-CoV-2 on food surfaces. Biosensors, 12(12), 1101.

89. Zhao, X., Tang, H., Jiang, X. (2022). Deploying gold nanomaterials in combating multi-drug-resistant bacteria. ACS nano, 16(7), 10066-10087.

90. Xu, R. (2008). Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. Particuology, 6(2), 112-115.

91. Clogston, J.D., Patri, A.K. (2011). Zeta potential measurement. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery, 63-70.

92. Qu, H., Linder, S.W., Mudalige, T.K. (2017). Surface coating and matrix effect on the electrophoretic mobility of gold nanoparticles: a capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry study. Analytical and bioanalytical chemistry, 409, 979-988.

93. Lowry, G.V., Hill, R.J., Harper, S., Rawle, A.F., Hendren, C.O., Klaessig, F., Rumble, J. (2016). Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. Environmental Science: Nano, 3(5), 953–965. doi:10.1039/c6en00136j

94. Wilson, R. (2008). The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. Chemical Society Reviews, 37(9), 2028-2045.

95. Loza, K., Heggen, M., Epple, M. (2020). Synthesis, structure, properties, and applications of bimetallic nanoparticles of noble metals. Advanced functional materials, 30(21), 1909260.

96. Ndaba, B., Roopnarain, A., Haripriya, R.A.M.A., Maaza, M. (2022). Biosynthesized metallic nanoparticles as fertilizers: An emerging precision agriculture strategy. Journal of Integrative Agriculture, 21(5), 1225-1242.

97. Ameen, F., Al-Homaidan, A. A., Al-Sabri, A., Almansob, A., AlNAdhari, S. (2023). Anti-oxidant, anti-fungal and cytotoxic effects of silver nanoparticles synthesized using marine fungus Cladosporium halotolerans. Applied Nanoscience, 13(1), 623-631.

98. Suchomel, P., Kvitek, L., Prucek, R., Panacek, A., Halder, A., Vajda, S., Zboril, R. Simple size-controlled synthesis of Au nanoparticles and their size-dependent catalytic activity. Sci Rep 8, 4589 (2018). https://doi.org/10.1038/s41598-018-22976-5

99. Ottoni, C.A., Neto, M.L., Léo, P., Ortolan, B.D., Barbieri, E., De Souza, A.O. (2020). Environmental impact of biogenic silver nanoparticles in soil and aquatic organisms. Chemosphere, 239, 124698.

100. da Silva, C.A., Ribeiro, B.M., do Valle Trotta, C., Perina, F.C., Martins, R., de Souza Abessa, D.M., Barbieri, E., Simões, M.F., Ottoni, C.A. (2022). Effects of mycogenic silver nanoparticles on organisms of different trophic levels. Chemosphere, 308, 136540.

101. Rajan, R., Huo, P., Chandran, K., Dakshinamoorthi, B.M., Yun, S., Liu, B., (2022). A review on the toxicity of silver nanoparticles against different biosystems. Chemosphere 292, 133397. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133397.

102. Steckiewicz, K.P., Barcinska, E., Malankowska, A., Zauszkiewicz–Pawlak, A., Nowaczyk, G., Zaleska-Medynska, A., Inkielewicz-Stepniak, I. (2019). Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in in vitro model. Evaluation of the safety of use and anti-cancer potential. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 30, 1-15.

103. Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. Nano letters, 6(4), 662-668.

104. Lee, Y.J., Ahn, EY., Park, Y. (2019). Shape-dependent cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles synthesized using green tea extract. Nanoscale Res Lett 14, 129 . https://doi.org/10.1186/s11671-019-2967-1

105. Niño-Martínez, N., Salas Orozco, M.F., Martínez-Castañón, G.A., Torres Méndez, F., Ruiz, F. (2019). Molecular mechanisms of bacterial resistance to metal and metal oxide nanoparticles.

International journal of molecular sciences, 20(11), 2808.

106. Chatterjee, S., Bandyopadhyay, A., Sarkar, K. (2011). Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. Journal of Nanobiotechnology, 9(1), 1-7.

107. Allahverdiyev AM, Kon KV, Abamor ES, Bagirova M, Rafailovich M. (2011). Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. Expert Rev Anti Infect Ther 9(11):1035-1052.

108. Moreno-Garrido, I., Pérez, S., & Blasco, J. (2015). Toxicity of silver and gold nanoparticles on marine microalgae. Marine Environmental Research, 111, 60–73.

109. Cui, Y., Zhao, Y., Tian, Y., Zhang, W., Lü, X., & Jiang, X. (2012). The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. Biomaterials, 33(7), 2327-2333.

110. Annamalai, J., & Nallamuthu, T. (2015). Characterization of biosynthesized gold nanoparticles from aqueous extract of *Chlorella vulgaris* and their anti-pathogenic properties. Applied Nanoscience, 5(5), 603-607.

111. Dang, H., Fawcett, D., Poinern, G.E.J. (2019). Green synthesis of gold nanoparticles from waste macadamia nut shells and their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermis*. International Journal Of research in medical sciences, 7(4).

112. Sathiyaraj, S., Suriyakala, G., Gandhi, A. D., Babujanarthanam, R., Almaary, K. S., Chen, T. W., Kaviyarasu, K. (2021). Biosynthesis, characterization, and antibacterial activity of gold nanoparticles. Journal of Infection and Public Health, 14(12), 1842-1847.

113. Basiratnia, E., Einali, A., Azizian-Shermeh, O., Mollashahi, E., Ghasemi, A. (2021). Biological Synthesis of Gold Nanoparticles from Suspensions of Green Microalga *Dunaliella salina* and Their Antibacterial Potential. BioNanoScience, 11(4), 977-988.

114. Dudhane, A. A., Waghmode, S. R., Dama, L. B., Mhaindarkar, V. P., Sonawane, A., Katariya, S. (2019). Synthesis and characterization of gold nanoparticles using plant extract of Terminalia arjuna with antibacterial activity. International Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 15(2), 75-82.

115. Katas, H., Lim, C.S., Azlan, A.Y.H.N., Buang, F., Busra, M.F.M. (2019). Antibacterial activity of biosynthesized gold nanoparticles using biomolecules from *Lignosus rhinocerotis* and chitosan. Saudi Pharmaceutical Journal, 27(2), 283-292.

116. Chums-ard, W., Fawcett, D., Fung, C.C., Poinern, G.E.J. (2019). Biogenic synthesis of gold

nanoparticles from waste watermelon and their antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. International Journal of Research in Medical Sciences, 7(7), 2499-2505.

117. Shamaila, S., Zafar, N., Riaz, S., Sharif, R., Nazir, J., Naseem, S. (2016). Gold nanoparticles: an efficient antimicrobial agent against enteric bacterial human pathogen. Nanomaterials, 6(4), 71.

118. Białas, N., Sokolova, V., van der Meer, S. B., Knuschke, T., Ruks, T., Klein, K., Epple, M. (2022). Bacteria (*E. coli*) take up ultrasmall gold nanoparticles (2 nm) as shown by different optical microscopic techniques (CLSM, SIM, STORM). Nano Select, 3(10), 1407-1420.

119. Boda, S. K., Broda, J., Schiefer, F., Weber‐Heynemann, J., Hoss, M., Simon, U., Jahnen‐Dechent, W. (2015). Cytotoxicity of ultrasmall gold nanoparticles on planktonic and biofilm encapsulated gram‐positive staphylococci. Small, 11(26), 3183-3193.

120. Khalandi B, Asadi N, Milani M, Davaran S, Abadi AJN, Abasi E, Akbarzadeh A. (2017). A review on potential role of silver nanoparticles and possible mechanisms of their actions on bacteria. Drug Res 11:70–76

121. Butler KS, Peeler DJ, Casey BJ, Dair BJ, Elespuru RK. (2015). Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. Mutagenesis 30:577–591

122. Wang S, Lawson R, Ray PC, Yu H. (2011). Toxic effects of gold nanoparticles on *Salmonella typhimurium* bacteria. Toxicol Ind Health 227:547–554

123. Hernández-Sierra, J.F., Ruiz, F., Pena, D.C.C., Martínez-Gutiérrez, F., Martínez, A. E., Guillén, A.D.J.P., Tapia-Pérez, H., Castañón, G.M. (2008). The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 4(3), 237-240.

124. Pernodet, N., Fang, X., Sun, Y., Bakhtina, A., Ramakrishnan, A., Sokolov, J., Rafailovich, M. (2006). Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. Small, 2(6), 766-773.

125. Avila, S.R.R. (2020). Atividade antibacteriana e citotóxica de nanopartículas de ouro sintetizadas com epigalocatequina 3-galato (egcg). Dissertação Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

126. Gupta, Akash. (2019). Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials. Chemical Society Reviews, v. 48, n. 2, p. 415–427.

127. Balasubramanian, S., Kala, S.M.J., Pushparaj, T.L.; Kumar, P.V. (2019). Biofabrication of

gold nanoparticles using *Cressa cretica* leaf extract and evaluation of catalytic and antibacterial efficacy. Nano Biomedicine and Engineering, v. 11, n. 1, p. 58–66.

128. Tao, C. (2018). Antimicrobial activity and toxicity of gold nanoparticles: Research progress, challenges and prospects. Letters in applied microbiology, 67(6), 537-543.

129. Rabiee, N., Ahmadi, S., Akhavan, O., Luque, R. (2022). Silver and gold nanoparticles for antimicrobial purposes against multi-drug resistance bacteria. Materials, 15(5), 1799.

130. Bai, Y., Ruan, X., Xie, X., Yan, Z. (2019). Antibiotic resistome profile based on metagenomics in raw surface drinking water source and the influence of environmental factor: A case study in Huaihe River Basin, China. Environ. Pollut. 248, 438–447.

131. Zhang, M., Wan, K., Zeng, J., Lin, W., Ye, C., Yu, X. (2020). Co-selection and stability of bacterial antibiotic resistance by arsenic pollution accidents in source water. Environ. Int. 135, 105351.

132. Burygin, G. L., Khlebtsov, B. N., Shantrokha, A. N., Dykman, L. A., Bogatyrev, V. A., Khlebtsov, N. G. (2009). On the enhanced antibacterial activity of antibiotics mixed with gold nanoparticles. Nanoscale research letters, 4, 794-801.

133. Zhang, Y., Shareena Dasari, T. P., Deng, H., Yu, H. (2015). Antimicrobial activity of gold nanoparticles and ionic gold. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 33(3), 286-327.

134. Wang, C., Yu, C. (2013). Detection of chemical pollutants in water using gold nanoparticles as sensors: a review. Reviews in Analytical Chemistry, 32(1), 1-14.

135. Ghorbani-Vaghei, R., Veisi, H., Aliani, M.H., Mohammadi, P., Karmakar, B. (2021). Alginate modified magnetic nanoparticles to immobilization of gold nanoparticles as an efficient magnetic nanocatalyst for reduction of 4-nitrophenol in water. Journal of Molecular Liquids, 327, 114868.

136. Williams, D. N., Ehrman, S. H., Pulliam Holoman, T. R. (2006). Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles. Journal of nanobiotechnology, 4(1), 1-8.

137. Allahverdiyev, A. M., Kon, K. V., Abamor, E. S., Bagirova, M., & Rafailovich, M. (2011). Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. Expert review of anti-infective therapy, 9(11), 1035-1052.

138. Zhang, Y., Shareena Dasari, T. P., Deng, H., Yu, H. (2015). Antimicrobial activity of gold nanoparticles and ionic gold. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 33(3), 286-327.

139. Vijayakumar, S., Ganesan, S. (2012). In vitro cytotoxicity assay on gold nanoparticles with different stabilizing agents. Journal of Nanomaterials, v. 2012.

140. Chua, E.T., Dal'Molin, C., Thomas-Hall, S., Netzel, M.E., Netzel, G., Schenk, P.M. (2020). Cold and dark treatments induce omega-3 fatty acid and carotenoid production in Nannochloropsis oceanica. Algal Research, 51, 102059.

141. Potijun, S., Yaisamlee, C., & Sirikhachornkit, A. (2021). Pigment production under cold stress in the green microalga Chlamydomonas reinhardtii. Agriculture, 11(6), 564.

142. Da Costa, M. V. J., & Sharma, P. K. (2016). Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in Oryza sativa. Photosynthetica, 54, 110-119.

143. Venkatesan, J., Singh, S. K., Anil, S., Kim, S. K., & Shim, M. S. (2018). Preparation, characterization and biological applications of biosynthesized silver nanoparticles with chitosan-fucoidan coating. Molecules, 23(6), 1429.

144. Wang, F., Guan, W., Xu, L., Ding, Z., Ma, H., Ma, A., Terry, N. (2019). Effects of nanoparticles on algae: Adsorption, distribution, ecotoxicity and fate. Applied Sciences, 9(8), 1534.

145. Wei, H., Wang, E. (2013). Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. Chemical Society Reviews, 42(14), 6060-6093.

146. Bai, X., Wang, S., Yan, X., Zhou, H., Zhan, J., Liu, S., Yan, B. (2019). Regulation of cell uptake and cytotoxicity by nanoparticle core under the controlled shape, size, and surface chemistries. ACS nano, 14(1), 289-302.

147. Zayadi, R.A., Bakar, F.A. (2020). Comparative study on stability, antioxidant and catalytic activities of bio-stabilized colloidal gold nanoparticles using microalgae and cyanobacteria. Journal of Environmental Chemical Engineering, 8(4), 103843.

148. Mahana, A., Guliy, O. I., Mehta, S. K. (2021). Accumulation and cellular toxicity of engineered metallic nanoparticle in freshwater microalgae: Current status and future challenges. Ecotoxicology and Environmental Safety, 208, 111662.

149. Alkilany A.M., Murphy C.J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? J Nanopart Res 12(7):2313–2333

150. Iswarya, V., Johnson, J. B., Parashar, A., Pulimi, M., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A. (2017). Modulatory effects of Zn 2+ ions on the toxicity of citrate-and PVP-capped gold nanoparticles towards freshwater algae, Scenedesmus obliquus. Environmental Science and

Pollution Research, 24, 3790-3801.

151. Kula-Maximenko, M., Gorczyca, A., Pociecha, E., Gąstoł, A., Maciejewska-Prończuk, J., & Oćwieja, M. (2022). Characterization of selected parameters of Chlorella vulgaris microalgae after short-term exposure to gold nanoparticles with different surface properties. Journal of Environmental Chemical Engineering, 10(5), 108248. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343722011216