



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



Atividade antimicrobiana de miconanopartículas de dióxido de titânio

Carolina Assis da Silva

São Vicente

-2022-

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

**Atividade antimicrobiana de miconanopartículas de dióxido de
titânio**

Carolina Assis da Silva

Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Bociências - Campus do Litoral Paulista da
Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, como
parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas com habilitação em Biologia Marinha

SÃO VICENTE

2022

S586a Silva, Carolina Assis da
Atividade antimicrobiana de miconanopartículas de dióxido de titânio / Carolina Assis da Silva. -- São Vicente, 2022
32 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente
Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni

1. Fungo filamentoso. 2. Nanopartícula de dióxido de titânio. 3. imobilização. 4. Escherichia coli. 5. Chlorella sp.. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Agradecimentos

Agradeço à minha família por me apoiarem em todas as minhas decisões e sempre estarem por perto para me ampararem emocionalmente.

À Caterina que sempre me apoiou e incentivou, estando comigo em todos os momentos me mantendo sã e estável emocionalmente,

À Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Angélica Ottoni por ter me apoiado e orientado durante esse período de graduação,

Aos meus amigos e amigas que estiveram por perto durante todo o período de faculdade,

À Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho (UNESP) por me proporcionar a infraestrutura para meu experimento,

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro,

Ao IEAMar pela infraestrutura e oportunidade de aprendizado,

Ao Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de São Paulo (IPT) pelo material biológico cedido,

Ao Banco de Microrganismos Aidar & Kutner (BMAK) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP) pelas microalgas cedidas,

E por fim, agradeço a mim, a todo o meu percurso e aos desafios que me propus para fazer este trabalho.

Resumo

O dióxido de titânio possui capacidade de reflexão e absorção de UVA/UVB e tolerância adequada à pele humana. Devido a estas características, os filtros solares inorgânicos possuem em sua complexa composição nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂NP). Este nanomaterial metálico (NM) é produzido em escala industrial por vias físico-químicas. Contudo, a necessidade de desenvolver novas abordagens para a síntese deste NM é iminente, uma vez que, os métodos utilizados produzem um grande volume de resíduos tóxicos e os NM obtidos possuem elevado índice de compostos tóxicos aderidos em sua superfície. Diante desta demanda, a nanotecnologia verde tem dentre muitos objetivos reduzir a presença de resíduos gerados ao longo da síntese, implementar processos sustentáveis e ampliar a biocompatibilidade destes compostos. Diferentes organismos são propostos neste tipo de abordagem, contudo os fungos filamentosos são os mais promissores. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo estudar atividade antimicrobiana de duas micronanopartículas de TiO₂, presentes em suspensão e encapsuladas em alginato e, também, avaliar potenciais efeitos tóxicos sobre microalga marinha *Chlorella minutissima* e microalga de água doce *Chlorella fusca*. As TiO₂NP, foram caracterizadas por espectrofotometria UV-vis, 'Dynamic Light Scattering' (DLS) e Índice de polidispersão (PDI). A atividade antimicrobiana foi avaliada por concentração mínima inibitória utilizando as bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. As microalgas *Chlorella minutissima* e *Chlorella fusca* foram utilizadas para estudos de densidade celular. A resposta antibacteriana da nanopartícula biológica de TiO₂NP (bio-TiO₂NP) em suspensão não apresentou resultados de inibição contra as bactérias patogênicas, já a bio-TiO₂NP imobilizada tanto em 24h quanto 48h, inibiu ±80% da *E.coli*. Em relação aos ensaios de fitotoxicidade em microalgas, as duas espécies tiveram resposta tóxica, porém entre a bio-TiO₂NP e a nanopartícula sintética P25, tanto na *C. minutissima* quanto na *C. fusca*, a bio-TiO₂NP apresentou menos toxicidade do que a nanopartícula sintética P25. Visto isso, a possibilidade da substituição de TiO₂NP sintéticas por biológicas, origem fúngica, representa ser uma alternativa promissora e que atende a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável nos Objetivos (12) Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis e (13) Tomar medidas urgentes para combater a mudança do clima e seus impactos

Palavras-chave: Fungo filamentoso, nanopartícula de dióxido de titânio, imobilização, *Escherichia coli*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella fusca*.

Sumário

1. Introdução	7
2. Objetivos	11
3. Materiais e métodos	11
3.1. Fungos	11
3.2. Inóculo	11
3.3. Biossíntese de nanopartículas de dióxido de titânio	11
3.4. Caracterização das nanopartículas metálicas	12
3.4.1. UV-vis (UV-vis)	12
3.4.2. Análise de tamanho de partícula, e distribuição	12
3.5. Ação antimicrobiana de bionanopartículas em suspensão	12
3.5.1. Determinação de Concentração Inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)	12
3.6. Microencapsulação com Quitosana-alginato	13
3.6.1. Ação antimicrobiana de bionanopartículas imobilizadas	14
3.7. Ensaio de fitotoxicidade com <i>Chlorella sp.</i>	14
3.7.1. Densidade celular	14
4. Resultados e Discussão	15
4.1. Biossíntese e caracterização de nanopartículas de dióxido de titânio	15
4.2. Determinação de Concentração Inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)	16
4.3. Ação antimicrobiana de bionanopartículas imobilizadas	20
4.4. Ensaio de fitotoxicidade com <i>Chlorella sp.</i>	22
4.4.1. Curvas de crescimento celular <i>Chlorella minutissima</i> e <i>Chlorella fusca</i>	22
4.4.2. Densidade celular	23
5. Conclusão	27
6. Referências	28

1. Introdução

Nanotecnologia é uma área com grande propensão à pesquisa, com resultados que diminuem o consumo de energia, materiais e o prejuízo ao meio ambiente até mesmo remediando problemas associados a processos mais sustentáveis, tendo um influente impacto ambiental em aplicações na energia e nanoquímica no gasto de água e purificação do ar, por exemplo [1], porém ainda encontra dificuldades em protocolos estabelecidos por contar com variedades, como os tamanhos das partículas, que abrangem a faixa de 0 a 100 nm [2]. E por ter o caminho de síntese através de químicos acaba se tornando mais cara comparada com as rotas consideradas mais ecológicas [3].

A nanotecnologia verde (NV), abordagem empregada para o desenvolvimento de tecnologias limpas, contrastando com métodos de obtenção de nanomateriais (NM) produzidos por vias sintéticas (VS) e que são amplamente utilizados por diversos segmentos industriais (SI) [4], vem apresentando crescimento em métodos mais ecológicos na síntese de nanopartículas com potencial antimicrobiano, por exemplo [5] e deve potencialmente promover o desenvolvimento de estudos limpos, minimizando os consideráveis riscos associados à saúde ambiental e humana [6] desencadeados pelo aumento na produção, uso e liberação inadvertida no ambiente de NM sintéticos [7].

Ao longo dos últimos anos se têm um interesse e maior necessidade de materiais renováveis, químicos não tóxicos e da mesma forma com potencial antimicrobiano, assim, a biossíntese de nanopartículas está sendo cada vez mais visada e estudada [8]. Essa tecnologia limpa, diminui riscos ambientais e à saúde humana por conta da produção e por ser um caminho para obtenção de nanoproductos mais sustentáveis [1].

Para a produção de nanopartículas se tem a redução de complexos metálicos em soluções diluídas, mas os agentes redutores através da síntese sintética têm uma maior tendência a efeitos adicionais de toxicidade, desta forma os bionanomateriais produzidos a partir de extratos de fungos filamentosos, extratos de plantas, extratos de algas, extratos de enzimas, e extratos microbianos utilizados como agentes redutores possuem uma grande vantagem já que esses extratos biológicos combinados com soluções de sal de metais possuem possibilidade de formação de nanopartículas com menor toxicidade [9].

Dentre os organismos citados em literatura como promissores na obtenção de nanopartículas (NP), os fungos filamentosos (Ff) recebem destaque [10]. Esses microrganismos habitam variados ambientes, podendo ser de ambientes marinhos e dulcícolas, a viverem associados a animais, plantas e detritos. Possuem longos filamentos (hifas) compondo o micélio que pode ser observado a olho nu [11] e são melhores agentes biogênicos para a síntese de nanopartículas devido à sua diversidade, secreção muito eficaz de enzimas extracelulares, melhor controle do crescimento e facilidade de cultivo e manutenção em laboratório [12] além de potencial ampliação de escala em sua produção. Muitos NM metálicos foram obtidos utilizando fungos, tendo destaque as nanopartículas de prata [10] e dióxido de titânio (TiO_2) [13,14].

As TiO_2NP possuem propriedades ópticas, antimicrobianas, químicas e catalíticas fascinantes que levam a aplicações industriais como em cosméticos, pigmentos, enchimentos, branqueamento e clareamento de alimentos, em produtos de cuidados pessoais [15], e além disso, as nanopartículas de TiO_2 suspensas possuem potencial no tratamento de águas residuais, estudos mostram que as TiO_2NPs aceleram o bloqueio dos poros da membrana de biorreator, além de reduzirem a atividade enzimática microbiana causando assim a remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo [1, 16, 17].

O dióxido de titânio (TiO_2) possui uma melhor resistência à corrosão química [5], e propriedade de biocompatibilidade, sendo utilizado em aplicações biomédicas, como em regeneração e cura de danos do osso [2]. No estudo de Landage [2], as TiO_2NP foram utilizadas para aplicações biomédicas, por demonstrarem propriedades antimicrobianas por conta da super-hidrofilicidade do metal TiO_2 já que as partículas em nanoescala, por obterem uma área de contato maior com a superfície tornaram-se potenciais agentes antimicrobianos e anti-biofilme [2, 17].

As propriedades do TiO_2 têm trazido um papel de purificação ambiental, sendo o metal aplicado na remoção de bactérias e materiais orgânicos prejudiciais da água e do ar, além de ser muito utilizado em materiais de construção e protetores solar. Devido à sua efetiva capacidade de reflexão e absorção de UVA/UVB e tolerância adequada à pele humana, os filtros solares inorgânicos possuem em sua complexa composição TiO_2NP [17, 18]. Portanto as nanopartículas do metal TiO_2 suspensas são amplamente utilizadas na diversidade da indústria, estudos

recentes destacam que as TiO₂NP sintéticas do filtro solar podem aumentar as concentrações ambientais de oxigênio reativo, o que pode influenciar a transformação de substâncias dissolvidas e potencialmente afetar os processos do ecossistema [17, 19].

Thakur e Kumar [20] compararam a atividade antimicrobiana de TiO₂NP biológicas esféricas em suspensão de tamanhos compreendidos entre 25 a 87 nm e TiO₂. A atividade antibacteriana de TiO₂NP e TiO₂ foi avaliada contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* e *Klebsiella pneumoniae*. De acordo com o estudo, o efeito antibacteriano foi mais pronunciado na presença de TiO₂NP em comparação com o composto de TiO₂. O menor valor de concentração inibitória mínima (CIM) obtido com o nanomaterial biológico foi de 10,42 µg/mL contra *Salmonella typhi* e *Escherichia coli*, enquanto que, para a concentração bactericida mínima (CBM) foi de 83,3 µg/mL contra *Klebsiella pneumoniae*. As TiO₂NP em suspensão produzidas por irradiação química de microondas foram objeto de estudo da ação antimicrobiana de Ranjan e Ramalingam [21]. Segundo os autores, as nanopartículas em suspensão de tamanho 28,3 ± 3,1 nm quando expostas contra *Escherichia coli* apresentaram uma CIM de 15 µg/mL e uma CBM de 20 µg/mL. A parede interna da bactéria foi rompida e o conteúdo citoplasmático foi liberado após 5 minutos de tratamento de forma dose-dependente.

Além das nanopartículas em suspensão, outro método que vem sendo mais estudado é o de encapsulamento das nanopartículas, que dependendo do tamanho das partículas pode ser feito através da micro ou nanoencapsulação, o método pode ajudar na proteção da partícula em relação à fatores externos como luz, pH e umidade [22]. Uma forma de encapsulação de nanopartículas é com o uso de quitosana, um polissacarídeo natural produzido pela desacetilação de quitina. Esse biopolímero tem diversas aplicações, como na área de cosméticos, na forma de filmes, géis e esferas por possuir baixa toxicidade assim como biodegradabilidade, além disso, tem baixa densidade de massa, alta durabilidade e facilidade na interação com as membranas biológicas [22, 23].

A ecotoxicologia de NM vem sendo estudada em diversos ecossistemas, tendo as microalgas um grande enfoque, sendo elas presentes nos ecossistemas marinhos e dulcícolas e tendo sua principal fonte energética através da fotossíntese, são representantes mais comuns dos produtores primários, principalmente devido ao

seu valor ecológico que constitui a base das cadeias tróficas[24, 25]. Dessa forma, podem atuar como agente de biomonitoramento para detectar o nível de poluição ambiental. A *Chlorella sp.* é uma das algas de água doce ou ambiente marinho dominantes encontradas em todo o mundo e atua como um modelo para testar a toxicidade de diferentes compostos tóxicos [26].

Como o uso de TiO₂NP tem se expandido, é inerente que esse NM seja liberado nos ecossistemas aquáticos e terrestres. As concentrações de TiO₂NP na superfície da água doce podem variar de 0,6 mg · L⁻¹ a 1,6 mg · L⁻¹ (7,512-20,032 μM) [27].

Marchello et al. [28] avaliaram os efeitos de TiO₂NP sintéticas de morfologia esférica e cúbica com tamanho compreendido entre 10 - 50 nm, em uma faixa de concentração logarítmica de 3,10 a 0,89, na fotossíntese, crescimento, viabilidade e composição bioquímica da microalga *Chlorella sorokiniana*. Os resultados mostraram menor clorofila a e atividade fotossintética na mixotrofia do que na fotoautotrofia, indicando uma menor necessidade de fotossíntese na mixotrofia. As culturas de fotoautotrofia foram sensíveis às TiO₂NP, atingindo 39% de viabilidade no log 0,89, enquanto que, na mixotrofia a viabilidade celular não foi afetada pelas TiO₂NP. A composição bioquímica e a densidade celular mudaram em função das concentrações de TiO₂NP, com aumento na relação proteína/carboidrato em ambos os tratamentos. Os resultados mostraram que *C. sorokiniana* foi mais resistente as TiO₂NP durante o crescimento mixotrófico, porém, com alterações na composição bioquímica, enquanto que, as culturas fotoautotróficas foram mais sensíveis ao aumento das concentrações de TiO₂NP.

Até o ano de 2025, a produção global estimada de TiO₂NP será de 1.000 toneladas [29]. Considerando que este nanomaterial persiste por muito tempo no ambiente, a acumulação trófica aumentará. Portanto, uma compreensão abrangente de seus efeitos é importante para avaliar o risco ambiental. Muito embora as TiO₂NP sintéticas sejam amplamente utilizadas em diversos produtos, como referido anteriormente, pouco se sabe a respeito de TiO₂NP biológicas e seus efeitos antimicrobianos e ambientais. Visto isso, a possibilidade da substituição de TiO₂NP sintéticas por biológicas, de origem fúngica, representa ser uma alternativa promissora e que atende a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável nos

Objetivos (12) Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis e (13) Tomar medidas urgentes para combater a mudança do clima e seus impactos.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo estudar atividade antimicrobiana de duas miconanopartículas de TiO_2 , em suspensão e encapsuladas em quitosana-alginato e, também, avaliar potenciais efeitos tóxicos sobre microalga marinha *Chlorella minutissima* e microalga de água doce *Chlorella fusca*.

3. Materiais e métodos

3.1. Fungos

As linhagens fúngicas IBCLP20, IBCLP1212, IBCLP1213, IBCLP1214, IBCLP1215, IBCLP1216 pertencente a Coleção de Cultura do Laboratório de Micologia e Aplicações Biotecnológicas e Nanotecnológicas (MICOBIO-NANOTEC) do Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista (IB-CLP) e *Rhizopus arrhizus* IPT1011 pertencente a Coleção de Cultura do Instituto de Pesquisa Tecnológica do estado de São Paulo (IPT), foram utilizadas no presente estudo. A manutenção da viabilidade desse microrganismo foi realizada em placas de MEA (Malte Extrato ágar) modificado, composição final (g/L): extrato de malte (20,0), glicose monohidratada (20,0), peptona bacteriológica (1,0), agar (15,0) sendo mantidas a 4°C com renovação mensal das culturas.

3.2. Inóculo

Foi retirado um disco de 6 mm da área periférica da colônia crescida em placa de MEA (Malte Extrato ágar) e inserido no centro de uma placa de 90 mm com o meio de cultura MGLP (Malte glicose extrato de levedura Peptona) sólido, composição final (g/L): extrato de malte (3,0), glicose (10,0), extrato de levedura (3,0) e peptona bacteriológica (5,0), agar (15,0). Estas placas de MGLP foram incubadas por um período de 7 dias à temperatura de 30°C e, então, utilizadas como fonte de inóculo para os ensaios.

3.3. Biossíntese de nanopartículas de dióxido de titânio

Para cada linhagem foram inseridos 5 discos de 6 mm em um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de MGLP líquido. Estes frascos Erlenmeyer foram incubados por um período de 72 h à temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm. Após este período, a biomassa foi filtrada e lavada com água deionizada por três vezes. Cerca de 10 g de biomassa úmida foi transferida a um frasco Erlenmeyer de 500 mL preenchido com 100 mL de água deionizada estéril, permanecendo à temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm por um período de 72 h. Após este período, a biomassa foi separada novamente por filtração em papel filtro Whatman No. 1 e, ao filtrado foi adicionada uma solução de concentração de dióxido de titânio (TiO₂), 1 mM, em um frasco Erlenmeyer de 500 mL, que permaneceu à temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm, por um período de 72 h. Para o controle, o mesmo procedimento foi adotado, contudo, a biomassa foi autoclavada após crescimento em MGLP.

3.4. Caracterização das nanopartículas metálicas

3.4.1. UV-vis (UV-vis)

Os espectros de UV-visível foram determinados em um espectrofotômetro (U-2000 Hitachi) no intervalo de comprimento de onda de 200-800 nm.

3.4.2. Análise de tamanho de partícula, e distribuição

A distribuição de tamanho das nanopartículas (DLS) e índice de polidispersão (PDI) foram obtidos utilizando o equipamento Dynamic Light Scattering (Zetasizer Nano, ZS90).

3.5. Ação antimicrobiana de bionanopartículas em suspensão

3.5.1. Determinação de Concentração Inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)

Para o ensaio de determinação das CIM foi utilizada a metodologia adaptada proposta por Mann e Markham [32] utilizando as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* (IPT245), *Pseudomonas aeruginosa* (IPT236) e gram-positiva *Staphylococcus aureus* (IPT246) cedidas pelo Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de São Paulo (IPT). As bactérias foram crescidas em meio de cultura

Trypticase Soy Broth (TSB), composição final (g/L): peptona bacteriológica (17,0), peptona de soja (3,0), glicose (2,0), cloreto de sódio (5,0), fosfato de dipotássio (2,0), “overnight”. Foi ajustada a concentração celular de $1,0 \times 10^5$ UFC.

Para o ensaio foram utilizadas placas de 96 poços, onde as colunas 11 e 12 continham 190 μ L de meio de cultura Luria-Bertani (LB), composição final (g/L): peptona bacteriológica (10,0), extrato de levedura (5,0), cloreto de sódio (10,0), isento de ágar. As colunas 1 a 8, continham 170 μ L de inóculo e 20 μ L nanomaterial, TiO_2NP , ou seu metal precursor, TiO_2 , ou o nanomaterial sintético TiO_2NP (P25 *Evonik Aeroxide*), nas concentrações compreendidas entre 0,0001 a 1 mMol/L e 1 a 500 μ g/mL. E as colunas 9 e 10 foram utilizadas como controle positivo, com 20 μ L da solução de AgNO_3 e controle negativo respectivamente.

Um volume de 10 μ L de solução de Resazurina a 0,01% foi adicionado a todos os poços após 24 h de incubação. O tempo de incubação total foi de 48 h a 37°C e o teste foi realizado em triplicata, findado este período, foi determinada a concentração mínima inibitória (CIM). As CIMs são definidas como a menor concentração necessária para impedir o crescimento microbiano. Dessa forma os dados obtidos foram indicados como IC50, levando em conjunto as diversas concentrações de exposição do composto.

Um segundo teste foi realizado de acordo com o protocolo adaptado descrito por Abbaszadeh et al. [33] e Li et al. [34] sendo denominado Concentração bactericida mínima (CBM).

Foram retirados 10 μ L de cada poço com ausência de crescimento visível e transferida para placas com meio TSA (Tryptic Soy Agar) composição final (g/L): peptona bacteriológica (15,0), cloreto de sódio (15,0), peptona de soja (5,0), e ágar (15,0), por um período de 24 h. Após o período de incubação, foram considerados como bactericida os compostos que inibem 100% do crescimento do microrganismo. O teste CBM foi realizado em triplicata.

3.6. Microencapsulação com Quitosana-alginato

As microcápsulas foram obtidas por gelificação ionotrópica com alginato de sódio de acordo com Pereira [30, 31]. A solução do biopolímero foi preparada solubilizando 3,1% (p/v) de alginato de sódio em 10 mL de NP biológica. Posteriormente, a solução de biopolímero (10 mL) foi gotejada em 100 mL de uma

solução aquosa de cloreto de cálcio (0,14M) e 0,2% (p/v) de quitosana usando uma seringa de infusão intravenosa de 20 mL e 27g de um dispositivo de infusão intravenoso. O sistema foi mantido em agitação magnética (500 rpm) por 1 minuto. Após o processo de gelificação, as microcápsulas foram armazenadas a 4°C.

3.6.1. Ação antimicrobiana de bionanopartículas imobilizadas

Em frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade foi adicionado um volume de 17,5 mL de água destilada estéril, 2,5 mL de do inóculo da bactéria gram-negativa *Escherichia coli* (IPT245) na concentração celular de $1,0 \times 10^7$ UFC e 1,0-10 g de bionanopartícula imobilizada. Os frascos foram acondicionados em plataforma agitada a 180 rpm e 37 °C durante 48 h. Uma solução de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de AgNO_3 foi utilizada como controle positivo e água destilada estéril como controle negativo. O experimento foi realizado em triplicata.

3.7. Ensaio de fitotoxicidade com *Chlorella sp.*

As microalgas *Chlorella fusca* e *Chlorella minutissima* foram cedidas pelo Banco de Microrganismos Aidar & Kutner (BMAK) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. A renovação e manutenção da cultura foi realizada utilizando o meio de cultura líquido Bold Basal para microalga dulcícola, *C. fusca*, e meio Guillard 35% para microalga marinha, *C. minutissima*, sob condições controladas de 24 ± 1 °C, iluminado com um fluxo de fótons de aproximadamente $50 \mu\text{mol de fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, sob um ciclo claro:escuro de 12:12 h. Diariamente, ocorreu contagem celular com o auxílio de uma Câmara de *Neubauer* para a construção da curva de crescimento e determinação da fase exponencial.

3.7.1. Densidade celular

Os testes de inibição de densidade celular foram realizados em placas de 96 poços, onde as colunas 1 e 12 continham H_2O destilada estéril para evitar a evaporação, as colunas 4 a 11, continham 180 μL de inóculo ajustado para a densidade celular de $1,0 \times 10^4 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ em meio de cultura Bold Basal, microalga dulcícola, ou Guillard 35%, microalga marinha, e 20 μL nanomaterial, TiO_2NP , ou seu metal precursor, TiO_2 , ou o nanomaterial sintético TiO_2NP (P25 *Evonik Aeroxide*), nas concentrações compreendidas entre 50 a 500 $\mu\text{g/mL}$. E as colunas 9 e 10 foram

utilizadas como controle positivo, com 20 µL da solução de AgNO₃, e controle negativo respectivamente.

A resposta tóxica foi avaliada inicialmente 24, 48, 72 e 96 h, após exposição por meio da densidade óptica das microalgas em um espectrofotômetro UV-Vis. A absorvância espectrofotométrica foi medida no comprimento de onda de 670 nm [35, 36] possibilitando acompanhar o crescimento da microalga durante o experimento. A incubação total decorreu em um período de 96 h, mantendo a temperatura 24±1 ° C. O teste foi realizado em triplicata.

4. Resultados e Discussão

4.1. Biossíntese e caracterização de nanopartículas de dióxido de titânio

Todas as linhagens selecionadas apresentaram uma intensa banda de ressonância plasmônica superficial (SPR) na região compreendida entre 320-350 nm no espectro UV-visível, após 72 h de reação do filtrado fúngico, indicando formação de TiO₂NP. O SPR definido nesta faixa de espectro indica a forma anatase do TiO₂. O dióxido de titânio anatase, material funcional que possui a atividade fotocatalítica melhor compreendida através da relação com a superfície do cristal anatase em nível microscópico, é muito utilizado nas variadas áreas do meio ambiente e energia [37].

Após a caracterização das nanopartículas por DLS, a linhagem IPT1011 apresentou o menor tamanho (Tabela 1), sendo assim selecionada para os demais estudos propostos no presente projeto.

Tabela 1. Linhagens fúngicas avaliadas.

Fungo	DLS (nm)	PDI
IBCLP20	90,1	0,278
Margem Q3 Sedimento IBCLP1212	432,83	0,473
Margem Q1 Salinidade Solo IBCLP1213	380,87	0,501
Margem Q1 Salinidade Solo B IBCLP1214	343,10	0,670
Apicum Q3 Sedimento IBCLP1215	314,57	0,445
Apicum Q4 Sedimento IBCLP1216	291,93	0,392
<i>Rhizopus arrhizus</i> IPT1011	69,80	0,278

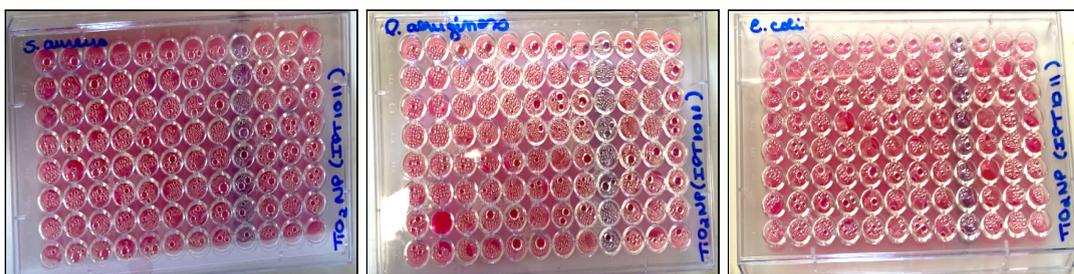
4.2. Determinação de Concentração Inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)

Foram realizados quatro testes com as bactérias patogênicas, *Escherichia coli* (IPT245), *Pseudomonas aeruginosa* (IPT236) e *Staphylococcus aureus* (IPT246), para determinar a concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). As faixas de concentrações utilizadas foram de 1 a 500 µg/mL e 0,0001 a 1 mM/L.

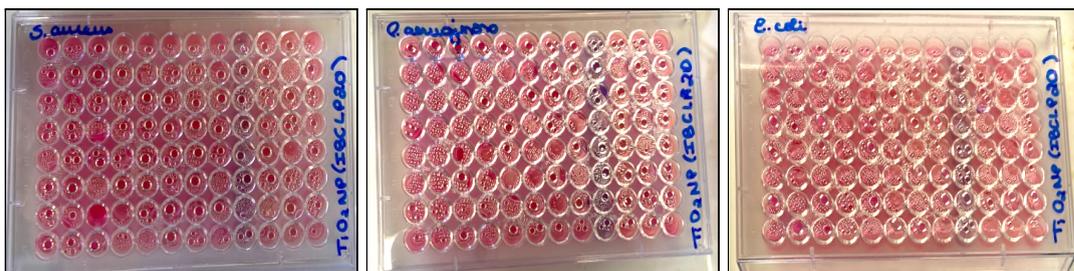
No primeiro teste as bactérias patogênicas tiveram suas concentrações ajustadas a $1,0 \times 10^5$ UFC e foram expostas ao bionanomaterial TiO₂NP (IPT1011) com o tamanho de partículas de 69,8 nm, determinado após caracterização, e ao seu metal precursor TiO₂ nas concentrações de 1; 5; 10; 15; 25; 50; 75; 100 µg/mL por um período de 48 h. As concentrações não tiveram efeito em nenhuma das espécies sendo que a Resazurina a 0,01%, corante utilizado, teve a alteração de sua coloração de azul para rosa, demonstrando assim que ainda estava ocorrendo respiração celular, já que o corante reage com o oxigênio (O₂) [38].

No segundo teste (Fig 1), as bactérias patogênicas, concentrações ajustadas a $1,0 \times 10^5$ UFC, foram expostas a dois diferentes bionanomateriais TiO_2NP (IPT1011) (Fig 1a) e TiO_2NP (IBCLP20) com o tamanho de partículas de 90,1 nm determinado por DLS (Fig 1b). As bactérias também foram expostas ao seu metal precursor TiO_2 (Fig 1c) e ao nanomaterial sintético TiO_2NP (P25 *Evonik Aeroxide*) com o tamanho de partículas de 25 nm (Fig 1d), nas concentrações de 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por um período de 48 h. Findado o período de 48h não foi observada ação mesmo com o aumento das concentrações dos compostos.

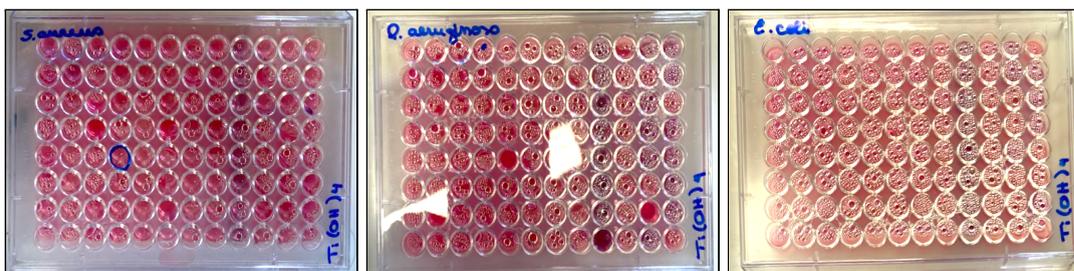
(a)



(b)



(c)



(d)

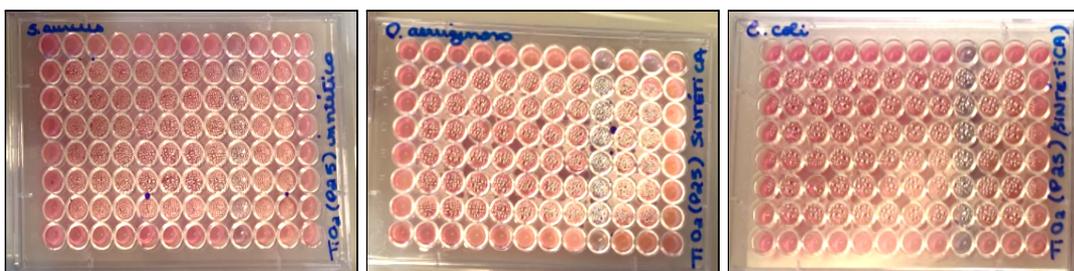


Figura 1. Placas de 96 poços após 48 h de exposição (a) a nanopartícula biológica TiO_2NP (IPT1011); (b) nanopartícula biológica TiO_2NP (IBCLP20); (c) ao metal precursor TiO_2 ; (d) ao nanomaterial sintético TiO_2NP (P25 *Evonik Aeroxide*).

No terceiro teste (Fig 2), as bactérias patogênicas foram reativadas e tiveram suas concentrações ajustadas a $1,0 \times 10^7$ UFC. As mesmas foram expostas aos bionanomateriais TiO_2NP (IPT1011) (Fig 2a) e TiO_2NP (IBCLP20) (Fig 2b), para além de seu metal precursor TiO_2 (Fig 2c) e ao nanomaterial sintético TiO_2NP (P25 *Evonik Aeroxide*) com o tamanho de partículas de 25 nm (Fig 2d), nas concentrações de 0,0001; 0,0002; 0,001; 0,002; 0,0025; 0,01; 0,02; 0,1 mM/L por um período de 48 h. Como ilustrado na figura 2, com as concentrações a que foram expostas não houve atividade antimicrobiana.

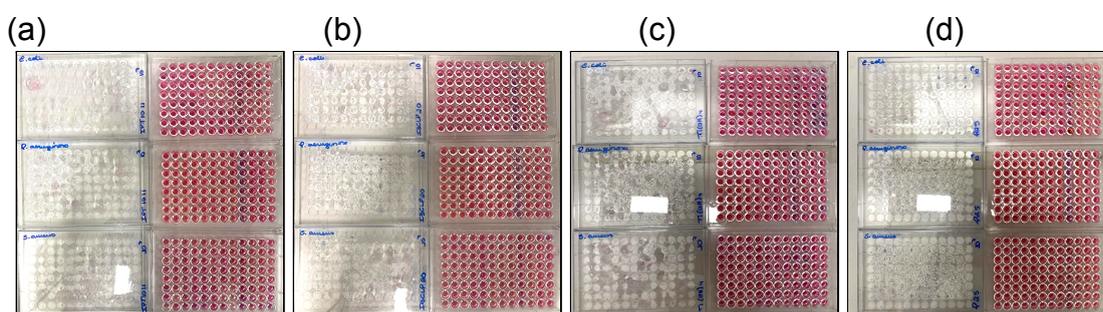


Figura 2. Placas de 96 poços após 48 h de exposição: (a) ao bionanomaterial TiO_2NP (IPT1011), (b) ao bionanomaterial TiO_2NP (IBCLP20), (c) ao metal precursor TiO_2 , (d) ao nanomaterial sintético TiO_2NP (P25 *Evonik Aeroxide*)

Por fim, o quarto teste realizado (Fig 3, 4 e 5), em que as três bactérias patogênicas tiveram as suas concentrações ajustadas a $1,0 \times 10^5$ UFC, foram expostas ao bionanomaterial TiO_2NP (IPT1011) (Fig 3a, 3b e 3c) com o tamanho de partículas de 69,8 nm, determinado após caracterização, além de serem expostas ao seu metal precursor dióxido de titânio, TiO_2 (Fig 4a, 4b e 4c), e ao nanomaterial sintético TiO_2NP (P25 *Evonik Aeroxide*) com o tamanho de partículas de 25 nm (Fig 5a, 5b e 5c), nas concentrações de 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por um período de 48 h. Ademais, o teste foi realizado sob iluminação constante com um fluxo de fótons de aproximadamente $50 \mu\text{mol}$ de fóton $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. De acordo com o estudo de Rokicka-Konieczna [39] o uso de TiO_2 sob irradiação solar artificial promoveu uma melhora da atividade antibacteriana. Desta maneira, as nanopartículas de TiO_2 ativadas com irradiação de luz solar ou artificial (UVA/UVB) podem ser usadas como fotocatalisador, aproveitando a radiação ultravioleta para quebrar variadas substâncias como por exemplo, materiais orgânicos, e por conta disso podem ser utilizadas para reduzir a poluição do ar e purificar a água e tendo assim atividade antimicrobiana [39-41].

Todavia, como ilustrado nas figuras 3, 4 e 5, mesmo com o aumento das concentrações dos compostos e uso de iluminação, não foi observada atividade antimicrobiana.

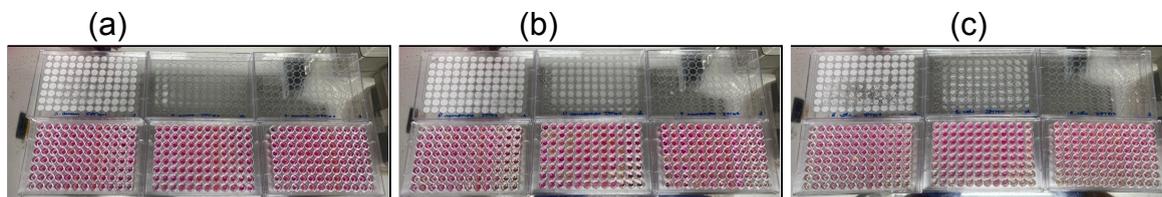


Figura 3. Placas de 96 poços em triplicata após 48 h de exposição: **(A)** ao bionanomaterial TiO_2NP (IPT1011) sobre *Staphylococcus aureus* (IPT246), **(B)** ao bionanomaterial TiO_2NP (IPT1011) sobre *Pseudomonas aeruginosa* (IPT236), **(C)** ao bionanomaterial TiO_2NP (IPT1011) sobre *Escherichia coli* (IPT245).

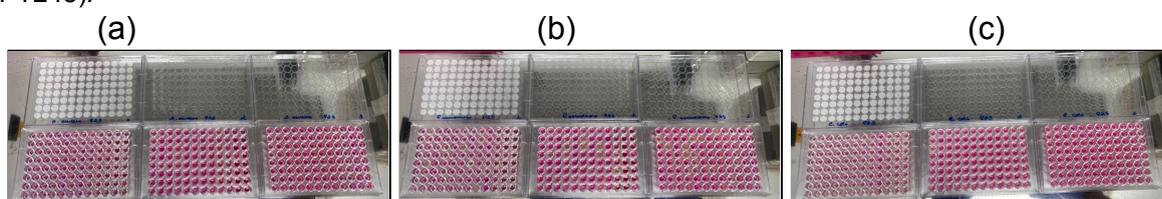


Figura 4. Placas de 96 poços em triplicata após 48 h de exposição: **(A)** ao nanomaterial sintético TiO_2NP (P25 Evonik Aeroxide) sobre *Staphylococcus aureus* (IPT246), **(B)** ao nanomaterial sintético TiO_2NP (P25 Evonik Aeroxide) sobre *Pseudomonas aeruginosa* (IPT236), **(C)** ao nanomaterial sintético TiO_2NP (P25 Evonik Aeroxide) sobre *Escherichia coli* (IPT245).

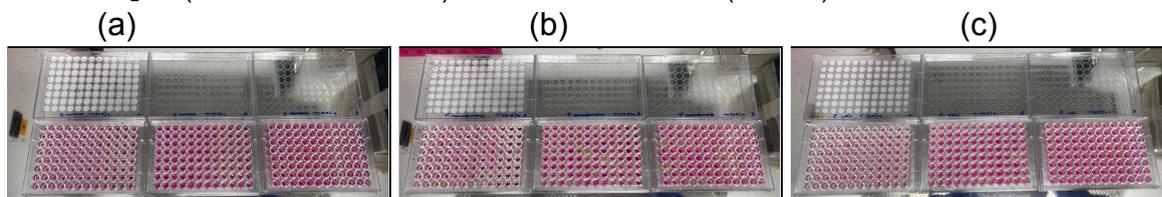


Figura 5. Placas de 96 poços em triplicata após 48 h de exposição: **(A)** ao metal precursor TiO_2 sobre *Staphylococcus aureus* (IPT246), **(B)** ao metal precursor TiO_2 sobre *Pseudomonas aeruginosa* (IPT236), **(C)** ao metal precursor TiO_2 sobre *Escherichia coli* (IPT245).

O teste de concentração bactericida mínima (CBM), foi realizado após as 48 h de exposição ao nanomaterial biológico e sintético, e ao seu metal precursor. Porém, como já esperado por conta do resultado apresentado pelo teste CIM, após 24 h se observou o crescimento das colônias bacterianas nas placas de meio TSA, confirmando a inatividade antibacteriana da nanopartícula de TiO_2NP (IPT1011) no tamanho de 69,8 nm.

O nanomaterial de dióxido de titânio, possui grande solubilidade em água, e por conta das diferentes estruturas da parede celular dos microrganismos e como é a resistência deles por danos de agentes oxidantes, inibe o crescimento microbiano [42].

A decomposição das membranas externas bacterianas por espécies reativas de oxigênio (ROS), é um efeito bactericida atribuído ao nanomaterial TiO_2NP [43]. Por conta da diferença na estrutura celular entre as bactérias gram-positivas e

gram-negativas, como membrana e a parede celular, alguns estudos acreditavam que as TiO_2NP possuíam uma maior efetividade em bactérias gram-negativas, porém a atividade antimicrobiana das nanopartículas de TiO_2 com a ativação fotocatalítica não possui diferenças significativas entre bactérias gram-positivas e negativas [44], e além disso as nanopartículas podem causar alterações mais profundas nos marcadores de estresse oxidativo quando possuem um tamanho menor [45] aos comparados a tamanhos iguais ou maiores ao de 25 nm, já que as nanopartículas de dióxido de titânio possuem uma maior atividade antimicrobiana dependendo de seu tamanho de partícula, sendo que quanto menor o diâmetro do nanomaterial mais toxicidade ele pode obter quando exposto à microrganismos [45,46].

Portanto, o tamanho da nanopartícula de TiO_2 é muito importante para determinar a eficiência deste nanomaterial, recentemente o tamanho considerado ideal da nanopartícula de TiO_2 está abaixo de 10 nm [23], sendo que a variabilidade dos resultados pode aumentar dependendo da exposição de diferentes bionanomateriais e diferentes grupos biológicos [47].

4.3. Ação antimicrobiana de bionanopartículas imobilizadas

O teste foi realizado com a bactéria patogênica gram-negativa, *Escherichia coli* (IPT245), microrganismo que demonstra risco à saúde pública pela capacidade de causar doenças gastrointestinais [48], na concentração celular de $1,0 \times 10^7$ UFC e com as concentrações, 1,0 g; 5,0 g e 10,0 g de bionanopartícula TiO_2NP (IPT1011) imobilizada com microcápsulas de quitosana-alginato. Cada concentração e os controles, positivo, com a solução de 10 mg.L^{-1} de AgNO_3 , e negativo, com água destilada estéril foram colocados em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, sendo o teste feito em triplicata.

A resposta antimicrobiana foi avaliada inicialmente 24 e 48 h após exposição à bionanopartícula imobilizada, por meio da densidade óptica da bactéria em um espectrofotômetro UV-Vis. A absorbância espectrofotométrica foi medida no comprimento de onda de 600 nm.

De acordo com a figura 6, apresentada abaixo, pode-se afirmar que houve atividade antibacteriana em todas as concentrações expostas, tanto 24 h após exposição quanto 48 h depois.

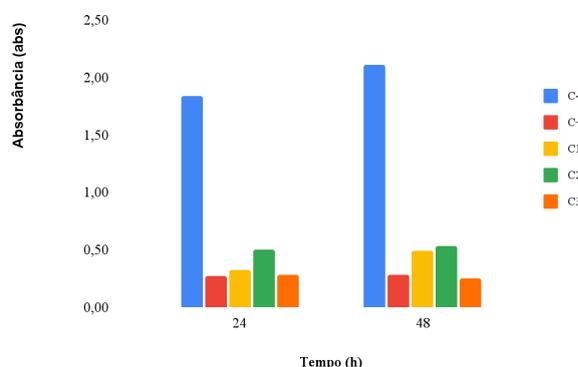


Figura 6 — Ação antibacteriana de TiO_2NP encapsulada contra *E. coli* (IPT245). Gráfico de absorvância (abs) por tempo (h) da bactéria *E.coli* exposta a nanopartícula biológica TiO_2NP encapsulada, em que C+ (controle positivo), C- (controle negativo), C1 (1g), C2 (5g) e C3 (10g).

A absorvância da bactéria *E.coli* exposta à bio- TiO_2NP (IPT1011) encapsulada em todas as concentrações foram em torno de 20% do valor do controle negativo em 24h, sugerindo também que a resposta antimicrobiana foi próxima à resposta do controle positivo, em que a bactéria exposta ao $AgNO_3$ possui 14,76% do valor comparado ao controle negativo em 24h. Desta forma, as concentrações, C1, C2 e C3 da bio- TiO_2NP apresentaram 80% de inibição da *E.coli*, enquanto ao mesmo tempo a exposição a $AgNO_3$ apresentou 95,24% de inibição da *E. coli* comparados ao controle negativo.

A resposta em 48h foi condizente com o valor em 24h, tendo uma média de 80% de inibição da *E.coli*, porém dessa vez, a C3, superou a resposta antibacteriana do controle positivo, tendo 88,22% de inibição da bactéria, havendo menos que 2% de diferença do controle positivo, que inibiu 86,70% da bactéria comparada ao controle negativo.

Desta forma, os resultados apresentados estão de acordo com demais estudos que afirmam a característica antibacteriana da nanopartícula de TiO_2 [49,50], e mesmo o biopolímero natural utilizado, quitosana, considerado atóxico [22,23], o potencial antimicrobiano apresentado pelas nanopartículas biológicas encapsuladas, assim como no trabalho de Xing [51], pode ser observado através dos efeitos inibitórios sobre a espécie *Escherichia coli*.

Diferente do nanomaterial em suspensão as bionanopartículas encapsuladas com quitosana-alginato apresentaram atividade antimicrobiana podendo assim ter ocorrido uma alteração no tamanho da nanopartícula biológica já que de acordo com

o trabalho de Politova-Brinkova [23], com altas concentrações do metal precursor (TiO_2) pode-se produzir cápsulas com partículas de tamanho de 1 a 5 nm, aumentando assim a eficiência na atividade antimicrobiana da nanopartícula.

4.4. Ensaio de fitotoxicidade com *Chlorella sp.*

4.4.1. Curvas de crescimento celular *Chlorella minutissima* e *Chlorella fusca*

As microalgas, microrganismos unicelulares, fotossintéticos, podendo ser encontradas em ambientes aquáticos, marinhos e dulcícolas, como em ambientes terrestres úmidos, possuem uma grande variedade de espécies e importante valor biológico e biotecnológico [52].

Além disso, possuem diversas fases dentro do sistema de cultivo, determinadas como fase de adaptação, aceleração do crescimento, crescimento exponencial, desaceleração do crescimento, estacionária e morte [53], observadas dentro do sistema de cultivo semicontínuo utilizado em laboratório, em que parte do cultivo é substituído por meio de cultura para que as células em crescimento exponencial tenham um melhor crescimento [54].

Desta forma, no atual trabalho foi possível determinar o perfil de crescimento das microalgas *Chlorella minutissima* e *Chlorella fusca*, espécies de grande importância econômica, e por fim estabelecer a concentração celular ideal, ou seja, a concentração celular analisada um dia antes da fase exponencial, para assim realizar os testes de fitotoxicidade [34] sob exposição do bionanomaterial, TiO_2NP (IPT1011), do metal precursor (TiO_2) e do nanomaterial sintético TiO_2NP (P25 *Evonik Aeroxide*).

As espécies foram colocadas no shaker, a 150 rpm, sob condições controladas de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, iluminadas com um fluxo de fótons de aproximadamente $50 \mu\text{mol de fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, sob um ciclo claro:escuro de 12:12 h durante 15 dias. Diariamente foram feitas as contagens de células totais com o auxílio de uma Câmara de *Neubauer*, sendo a padronização da contagem de quatro quadrantes (superior esquerdo e direito, inferior esquerdo e direito).

Após o período de contagem, foi determinado o dia em que a espécie *Chlorella minutissima* teve o maior crescimento (exponencial), 6º dia, já a espécie *Chlorella fusca* teve seu maior crescimento no 8º dia, desta forma as concentrações

ideais são encontradas no 5º e 7º dia respectivamente, estando de acordo com demais estudos [36,53,55,56].

As avaliações de crescimento da microalga de água marinha *Chlorella minutissima* e da microalga de água doce *Chlorella fusca* foram realizadas para a construção das curvas de crescimento e para o ensaio de fitotoxicidade.

4.4.2. Densidade celular

Foram realizados dois ensaios, em que as espécies de microalga, *Chlorella minutissima* e *Chlorella fusca* tiveram as suas concentrações ajustadas a $1,0 \times 10^4$ cel · mL⁻¹, e foram expostas ao bionanomaterial TiO₂NP (IPT1011) com o tamanho de partículas de 69,8 nm, determinado após caracterização, além de serem expostas ao seu metal precursor dióxido de titânio, TiO₂, e ao nanomaterial sintético TiO₂NP (P25 *Evonik Aeroxide*) com o tamanho de partículas de 25 nm, nas concentrações de 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; e 500 µg/mL por um período de 96 h. Ademais, o teste foi realizado sob iluminação constante com um fluxo de fótons de aproximadamente 50 µmol de fóton · m⁻² · s⁻¹.

Com a análise dos gráficos apresentados abaixo é possível afirmar que todas as concentrações da bio-TiO₂NP, da nanopartícula sintética e do metal precursor, sob as duas espécies de microalgas, *C. minutissima* e *C. fusca*, pelo período de 96 h, tiveram efeito inibitório no crescimento celular, parâmetro regularmente analisado [57], da espécie exposta, estando de acordo com estudos que afirmam que as microalgas são sensíveis a compostos tóxicos, podendo assim comprometer a produtividade desses microrganismos [58].

Em contrapartida, os resultados apresentados neste trabalho contradizem os estudos de Miller, R. J. [59] e Kulacki e Cardinale [60] que não encontraram nenhum efeito das nanopartículas de TiO₂ sobre microalgas, comprovando assim que variados tipos de interação podem influenciar no crescimento das microalgas que apresentam resultados divergentes por serem microrganismos com respostas espécie-específica [57], e por isso os mecanismos de acumulação e toxicidade das microalgas ainda estão sendo estudados e não se tem o completo conhecimento atualmente. [58]

De acordo com o estudo de Chen [61], outros efeitos além dos causados diretamente pelas nanopartículas podem ser responsáveis pela resposta observada

no crescimento celular das microalgas, como o efeito de sombreamento, em que as TiO_2NP agregadas nas superfícies das células de microalgas podem causar alterações na superfície celular se trabalhadas em conjunto com a luz ultravioleta ou luz natural, danificando assim a célula e evitando o recebimento de luz, impossibilitando a realização da fotossíntese [61-63].

Além disso, a nanopartícula de dióxido de titânio, sendo um fotocatalisador, pode causar danos na estrutura da parede celular de células da microalga através da peroxidação, gerando uma fotocátalise e causando a ruptura da parede celular [57].

Para cada gráfico, a absorvância de $0,067 \pm 0,03$; corresponde à concentração celular de $1 \times 10^4 \text{ cel} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

Com base nas figuras 7, 8 e 9 da microalga *C. minutissima* podemos dizer que dentre todas as concentrações testadas, as maiores concentrações (C5, C6, C7 e C8) foram as mais próximas em relação ao controle positivo, com exceção da figura 7, da *C. minutissima* exposta a bio- TiO_2NP , onde a última concentração demonstrou um aumento da absorvância nos últimos 2 dias.

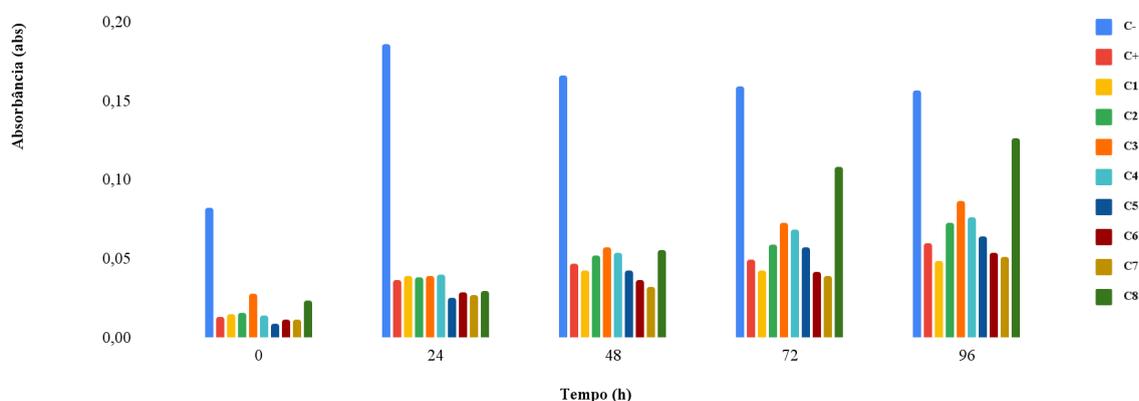


Figura 7— Fitotoxicidade de *Chlorella minutissima* exposta à nanopartícula biológica TiO_2NP . Gráfico de absorvância (abs) por tempo (h) da microalga *Chlorella minutissima* exposta a nanopartícula biológica TiO_2NP , onde C+ (controle positivo), C- (controle negativo), C1 (50,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C2 (75,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C3 (100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C4 (125,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C5 (150,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C6 (175,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C7 (200,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C8 (500,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

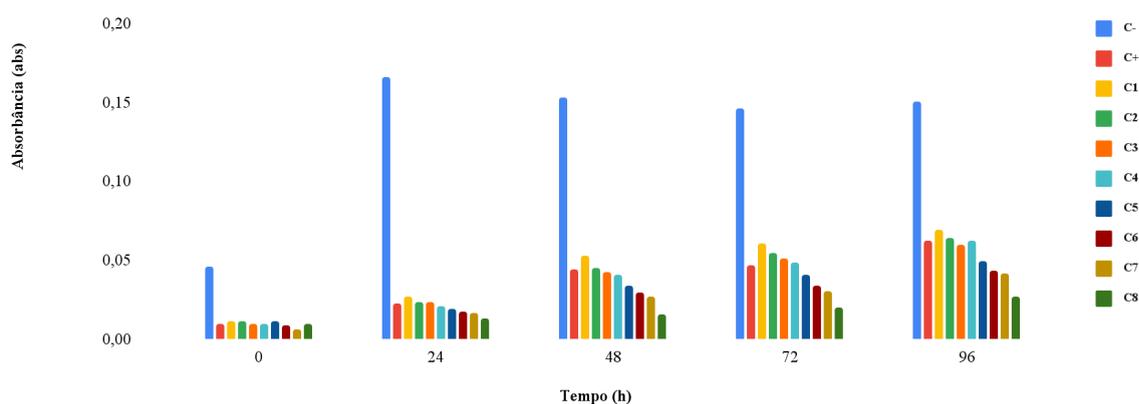


Figura 8 — Fitotoxicidade de *Chlorella minutissima* exposta ao metal precursor TiO_2 . Gráfico de absorbância (abs) por tempo (h) da microalga *Chlorella minutissima* exposta ao metal precursor TiO_2 , onde C+ (controle positivo), C- (controle negativo), C1 (50,0 $\mu\text{g/mL}$), C2 (75,0 $\mu\text{g/mL}$), C3 (100,0 $\mu\text{g/mL}$), C4 (125,0 $\mu\text{g/mL}$), C5 (150,0 $\mu\text{g/mL}$), C6 (175,0 $\mu\text{g/mL}$), C7 (200,0 $\mu\text{g/mL}$), C8 (500,0 $\mu\text{g/mL}$)

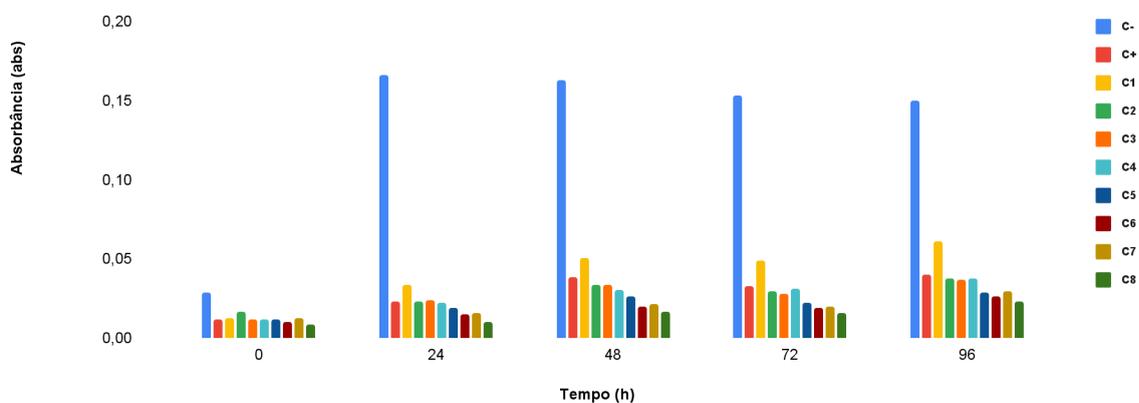


Figura 9 — Fitotoxicidade de *Chlorella minutissima* exposta à nanopartícula sintética P25. Gráfico de absorbância (abs) por tempo (h) da microalga *Chlorella minutissima* exposta a nanopartícula sintética P25, onde C+ (controle positivo), C- (controle negativo), C1 (50,0 $\mu\text{g/mL}$), C2 (75,0 $\mu\text{g/mL}$), C3 (100,0 $\mu\text{g/mL}$), C4 (125,0 $\mu\text{g/mL}$), C5 (150,0 $\mu\text{g/mL}$), C6 (175,0 $\mu\text{g/mL}$), C7 (200,0 $\mu\text{g/mL}$), C8 (500,0 $\mu\text{g/mL}$)

De acordo com Matouke, M. M. [63] as células das microalgas por conta da adaptação fisiológica do metabolismo ao serem expostas à nanopartículas de TiO_2 podem aumentar a taxa de crescimento mesmo em maiores concentrações como podemos observar na concentração C8 da figura 7, da *C. minutissima* exposta a bio- TiO_2 NP, na concentração C2 da figura 10, da *C. fusca* exposta a bio- TiO_2 NP e a nas concentrações C1 e C7 da figura 11 da *C. fusca* exposta ao metal precursor TiO_2 .

Já nas menores concentrações, C1, C2, C3 e C4 em todas as figuras, exceto as figuras 10 e 11 já mencionados acima; as absorbâncias foram de concordância com o valor do controle positivo, significando que provavelmente afetou o crescimento da microalga; é explicado no estudo de Roy [64] que o gênero *Chlorella*,

por ser caracteristicamente unicelular, tem maiores chances de ter efeitos deletérios causados pelos compostos tóxicos a que foram expostas.

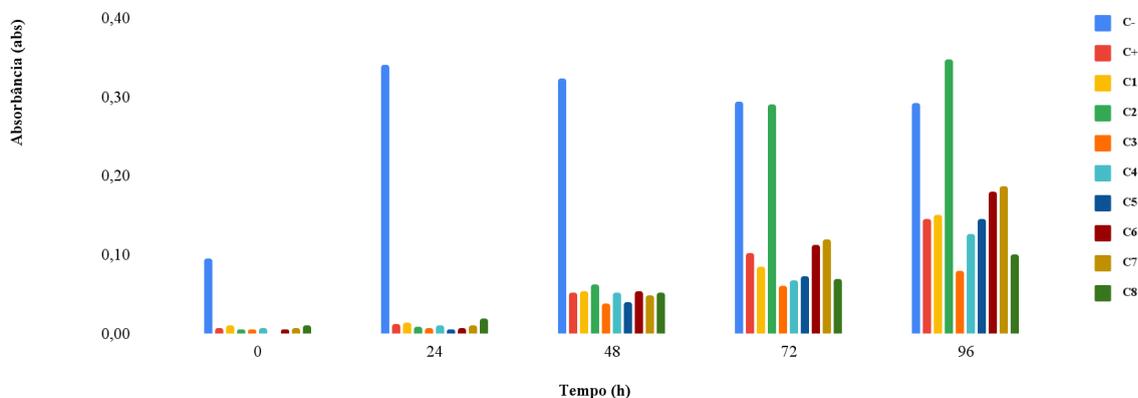


Figura 10 — Fitotoxicidade de *Chlorella fusca* exposta à nanopartícula biológica TiO_2NP . Gráfico de absorvância (abs) por tempo (h) da microalga *Chlorella fusca* exposta a nanopartícula biológica TiO_2NP , onde C+ (controle positivo), C- (controle negativo), C1 (50,0 $\mu g/mL$), C2 (75,0 $\mu g/mL$), C3 (100,0 $\mu g/mL$), C4 (125,0 $\mu g/mL$), C5 (150,0 $\mu g/mL$), C6 (175,0 $\mu g/mL$), C7 (200,0 $\mu g/mL$), C8 (500,0 $\mu g/mL$).

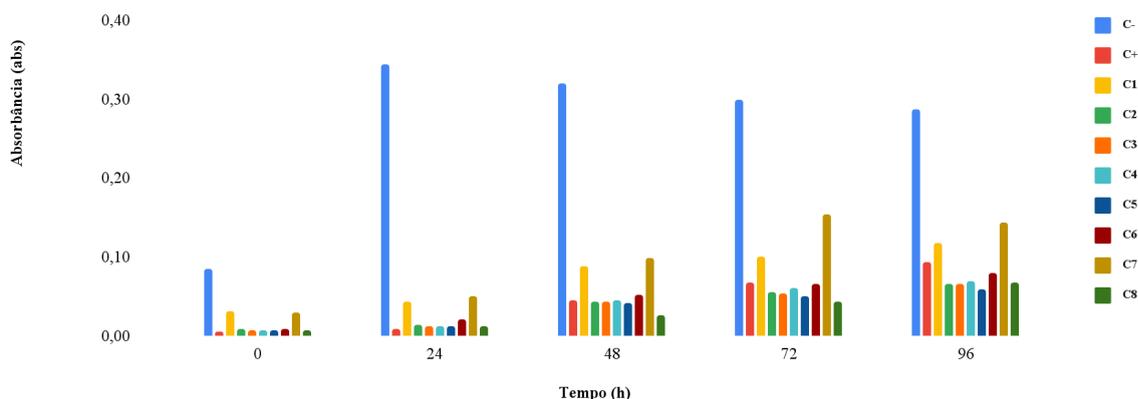


Figura 11 — Fitotoxicidade de *Chlorella minutissima* exposta ao metal precursor TiO_2 . Gráfico de absorvância (abs) por tempo (h) da microalga *Chlorella fusca* exposta ao metal precursor TiO_2 , onde C+ (controle positivo), C- (controle negativo), C1 (50,0 $\mu g/mL$), C2 (75,0 $\mu g/mL$), C3 (100,0 $\mu g/mL$), C4 (125,0 $\mu g/mL$), C5 (150,0 $\mu g/mL$), C6 (175,0 $\mu g/mL$), C7 (200,0 $\mu g/mL$), C8 (500,0 $\mu g/mL$).

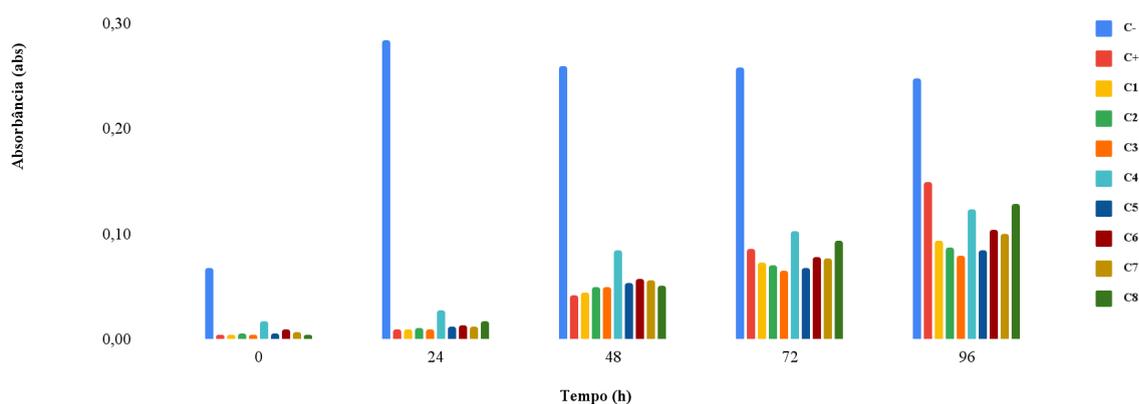


Figura 12 — Fitotoxicidade de *Chlorella fusca* exposta à nanopartícula sintética *P25*. Gráfico de absorvância (abs) por tempo (h) da microalga *Chlorella fusca* exposta a nanopartícula sintética *P25*, onde C+ (controle positivo), C- (controle negativo), C1 (50,0 µg/mL), C2 (75,0 µg/mL), C3 (100,0 µg/mL), C4 (125,0 µg/mL), C5 (150,0 µg/mL), C6 (175,0 µg/mL), C7 (200,0 µg/mL), C8 (500,0 µg/mL).

Além disso, em comparação entre a nanopartícula biológica TiO₂NP e a nanopartícula sintética *P25*, tanto na *C. minutissima* quanto na *C. fusca*, a bio-TiO₂NP apresentou menos toxicidade do que a nanopartícula sintética *P25*.

5. Conclusão

A miconanopartícula em suspensão TiO₂NP sintetizada pelo fungo *Rhizopus arrhizus* (IPT1011) com tamanho de partícula de 69,8 nm não apresentou atividade antibacteriana na presença e ausência de iluminação em nenhuma das concentrações em que as bactérias patogênicas *Escherichia coli* (IPT245), *Pseudomonas aeruginosa* (IPT236) e *Staphylococcus aureus* (IPT246) foram expostas. Em contrapartida, a miconanopartículas de TiO₂NP (IPT1011) encapsuladas com quitosana-alginato apresentou atividade antimicrobiana sobre a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* (IPT245).

Novos testes serão realizados com bionanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) com menores tamanhos de partículas, para assim analisar a atividade antimicrobiana do bionanomaterial em suspensão e imobilizado nas espécies patogênicas, *Escherichia coli* (IPT245), *Pseudomonas aeruginosa* (IPT236) e *Staphylococcus aureus* (IPT246). Além disso, a bionanopartícula de TiO₂ imobilizada em quitosana-alginato vai ser caracterizada para assim saber o tamanho e estabilidade da nanopartícula.

O efeito de fitotoxicidade das nanopartículas sintéticas foi mais tóxico nas duas espécies de microalga, *C. fusca*, dulcícola, e *C. minutissima*, de ambiente marinho, comparadas com as nanopartículas biológicas, visto isso, a possibilidade da substituição de TiO₂NP sintéticas por biológicas, de origem fúngica, representa

ser uma alternativa promissora e que atende a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável nos Objetivos (12) Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis e (13) Tomar medidas urgentes para combater a mudança do clima e seus impactos.

Por fim, as concentrações de TiO₂NP sintética na superfície da água doce podem variar de 0,6 mg·L⁻¹ a 1,6 mg·L⁻¹, ou seja, todas as concentrações utilizadas nos experimentos ultrapassaram as concentrações encontradas no meio ambiente, sendo necessário assim futuramente, caso as bio-TiO₂NPs sejam utilizadas, uma reanálise da superfície da água e novos testes, com as concentrações reais para verificar se há potencial toxicidade e desta forma analisar seu valor tecnológico.

6. Referências

1. Sivaraj, R., Salam, H. A., Rajiv, P., & Rajendran, V. (2014). Green Nanotechnology: The Solution to Sustainable Development of Environment. *Environmental Sustainability*, 311–324.
2. Landage, K. S., Arbade, G. K., Khanna, P., & Bhongale, C. J. (2020). Biological approach to synthesize TiO₂ nanoparticles using *Staphylococcus aureus* for antibacterial and anti-biofilm applications. *J. Microbiol. Exp*, 8.
3. Sethy, N. K., Arif, Z., Mishra, P. K., & Kumar, P. (2020). Green synthesis of TiO₂ nanoparticles from *Syzygium cumini* extract for photo-catalytic removal of lead (Pb) in explosive industrial wastewater. *Green Processing and Synthesis*, 9(1), 171-181.
4. Khan, S. H. (2020). Green nanotechnology for the environment and sustainable development. In *Green materials for wastewater treatment* (pp. 13-46). Springer, Cham.
5. Sun, Y., Wang, S., & Zheng, J. (2019). Biosynthesis of TiO₂ nanoparticles and their application for treatment of brain injury-An in-vitro toxicity study towards central nervous system. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 194, 1-5.
6. Sharma, P., Guleria, P., & Kumar, V. (2020). Green nanotechnology for bioactive compounds delivery. In *Biotechnological Production of Bioactive Compounds* (pp. 391-407). Elsevier.
7. Jasrotia, T., Chaudhary, S., Kaushik, A., Kumar, R., & Chaudhary, G. R. (2020). Green chemistry-assisted synthesis of biocompatible Ag, Cu, and Fe₂O₃ nanoparticles. *Materials Today Chemistry*, 15, 100214.
8. Subhapiya, S., & Gomathipriya, P. (2018). Green synthesis of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles by *Trigonella foenum-graecum* extract and its antimicrobial properties. *Microbial pathogenesis*, 116, 215-220.
9. Roy, A., Bulut, O., Some, S., Mandal, A. K., & Yilmaz, M. D. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC advances*, 9(5), 2673-2702.
10. 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.

11. Takahashi, J. A., Lima, G. S., dos Santos, G. F., Lyra, F. H., Hughes, A. F., & Gonçalves, F. A. G. (2017). Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. *Revista virtual de química*, 9(6), 2351-2382.
12. Neethu, S., Radhakrishnan, E. K., & Jyothis, M. (2019). Biofabrication of Nanoparticles Using Fungi. In *Nanotechnology for Agriculture* (pp. 53-73). Springer, Singapore.
13. Rajakumar, G., Rahuman, A. A., Roopan, S. M., Khanna, V. G., Elango, G., Kamaraj, C., & Velayutham, K. (2012). Molecular and Biomolecular Spectroscopy Fungus-mediated biosynthesis and characterization of TiO₂ nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. *Spectrochim. Acta Part A*, 91, 23-29.
14. Bansal, V., Rautaray, D., Bharde, A., Ahire, K., Sanyal, A., & Ahmad, A. (2005). Sastry M. *Fungus-mediated biosynthesis of silica and titania particles*. *J MatChem*, 15, 2583-2589.
15. Grande, F., Aiello, F., Garofalo, A., & Neamati, N. (2016). Identification and preclinical evaluation of SC144, a novel pyrroloquinoxaline derivative with broad-spectrum anticancer activity. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 16(8), 644-650.
16. Zhou, L., Zhuang, W. Q., De Costa, Y., & Xia, S. (2019). Potential effects of suspended TiO₂ nanoparticles on activated sludge floc properties in membrane bioreactors. *Chemosphere*, 223, 148-156.
17. Jayaseelan, C., Rahuman, A. A., Roopan, S. M., Kirthi, A. V., Venkatesan, J., Kim, S. K., & Siva, C. (2013). Biological approach to synthesize TiO₂ nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and its antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 107, 82-89.
18. Botta, C., Labille, J., Auffan, M., Borschneck, D., Miche, H., Cabié, M., & Bottero, J. Y. (2011). TiO₂-based nanoparticles released in water from commercialized sunscreens in a life-cycle perspective: Structures and quantities. *Environmental Pollution*, 159(6), 1543-1550.
19. Fastelli, P., & Renzi, M. (2019). Exposure of key marine species to sunscreens: Changing ecotoxicity as a possible indirect effect of global warming. *Marine pollution bulletin*, 149, 110517.
20. Thakur, B. K., Kumar, A., & Kumar, D. (2019). Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Azadirachta indica* leaf extract and evaluation of their antibacterial activity. *South African Journal of Botany*, 124, 223-227.
21. Ranjan & Ramalingam (2016). Titanium dioxide nanoparticles induce bacterial membrane rupture by reactive oxygen species generation.
22. Andrade, S. C. A. D. (2020). *Nanocápsulas quitosana-goma arabica contendo óleo essencial de Origanum vulgare: preparação, caracterização, estabilidade térmica e ação antimicrobiana em atum azul (Thunnus thynnus)*. (Doctoral dissertation, Universidade Federal de Pernambuco).
23. Politova-Brinkova, N. I., Tsibranska-Gyoreva, S. R., Tcholakova, S. S., Denkov, N. D., & Danner, T. (2020). Preparation of TiO₂ Nanoparticle Aggregates and Capsules by the 'Two-Emulsion Method'. *Colloids and Interfaces*, 4(4), 57.
24. Rivero Arze, A., Manier, N., Chatel, A., & Mouneyrac, C. (2020). Characterization of the nano-bio interaction between metallic oxide nanomaterials and freshwater microalgae using flow cytometry. *Nanotoxicology*, 14(8), 1082-1095.

25. Hinterholz, C. L. (2018). *Desenvolvimento de um fotobiorreator de placas planas para cultivo de microalgas com alta densidade celular*. (Doctoral dissertation, Universidade Estadual do Oeste do Paraná).
26. Krienitz, L., Huss, V. A., & Bock, C. (2015). *Chlorella*: 125 years of the green survivalist. *Trends in plant science*, 20(2), 67-69.
27. Roy, B., Suresh, P. K., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2020). UVB pre-irradiation of titanium dioxide nanoparticles is more detrimental to freshwater algae than UVA pre-irradiation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104076.
28. Marchello, A. E., Barreto, D. M., & Lombardi, A. T. (2018). Effects of titanium dioxide nanoparticles in different metabolic pathways in the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* (Trebouxiophyceae). *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(2), 1-11.
29. Du, J., Xu, S., Zhou, Q., Li, H., Fu, L., Tang, J. H., & Jin, M. Q. (2019). The ecotoxicology of titanium dioxide nanoparticles, an important engineering nanomaterial. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 101(3-6), 165-189.
30. Pereira, A. D. S., Diniz, M. M., De Jong, G., Gama Filho, H. S., Dos Anjos, M. J., Finotelli, P. V., & Amaral, P. F. (2019). Chitosan-alginate beads as encapsulating agents for *Yarrowia lipolytica* lipase: morphological, physico-chemical and kinetic characteristics. *International journal of biological macromolecules*, 139, 621-630.
31. Pereira, D. S., L Fraga, J., M Diniz, M., C Fontes-Sant'Ana, G., & FF Amaral, P. (2018). High catalytic activity of lipase from *Yarrowia lipolytica* immobilized by microencapsulation. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3393.
32. Mann, C. M., & Markham, J. L. (2002). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of applied microbiology*, 84(4), 538-544.
33. Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de mycologie medicale*, 24(2), e51-e56.
34. Li, Y., Kong, W., Li, M., Liu, H., Zhao, X., Yang, S., & Yang, M. (2016). *Litsea cubeba* essential oil as the potential natural fumigant: inhibition of *Aspergillus flavus* and AFB1 production in licorice. *Industrial Crops and Products*, 80, 186-193.
35. Freitas, B. C., Morais, M. G., & Costa, J. A. (2021). *Chlorella minutissima* grown with xylose and arabinose in tubular photobioreactors: Evaluation of kinetics, carbohydrate production, and protein profile. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*.
36. Deamicci, K. M., Cardias, B. B., Costa, J. A. V., & Santos, L. O. (2016). Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. *Process Biochemistry*, 51(7), 912-916.
37. Katal, R., Masudy-Panah, S., Tanhaei, M., Farahani, M. H. D. A., & Jiangyong, H. (2020). A review on the synthesis of the various types of anatase TiO₂ facets and their applications for photocatalysis. *Chemical Engineering Journal*, 384, 123384.
38. Moraes, J. D. C. (2017). *Desenvolvimento e padronização do ensaio de resazurina para avaliar a vitalidade de leveduras no contexto microcervejeiro*. Trabalho de Conclusão de Curso (Biotecnologia - UFRGS).

39. Rokicka-Konieczna, P., Wanag, A., Sienkiewicz, A., Kusiak-Nejman, E., & Morawski, A. W. (2020). Antibacterial effect of TiO₂ nanoparticles modified with APTES. *Catalysis Communications*, 134, 105862.
40. Ibhaddon, A. O., & Fitzpatrick, P. (2013). Heterogeneous photocatalysis: recent advances and applications. *Catalysts*, 3(1), 189-218.
41. Ali, T., Ahmed, A., Alam, U., Uddin, I., Tripathi, P., & Muneer, M. (2018). Enhanced photocatalytic and antibacterial activities of Ag-doped TiO₂ nanoparticles under visible light. *Materials Chemistry and Physics*, 212, 325-335.
42. Babaei, E., Dehnad, A., Hajizadeh, N., Valizadeh, H., & Reihani, S. F. S. (2016). A study on Inhibitory Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles and its Photocatalytic Type on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Aspergillus flavus*. *Applied Food Biotechnology*, 3(2), 115-123.
43. Rajakumar, G., Rahuman, A. A., Roopan, S. M., Khanna, V. G., Elango, G., Kamaraj, C., & Velayutham, K. (2012). Fungus-mediated biosynthesis and characterization of TiO₂ nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 91, 23-29.
44. Ripolles-Avila, C., Martinez-Garcia, M., Hascoët, A. S., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2019). Bactericidal efficacy of UV activated TiO₂ nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria on suspension. *CyTA-Journal of Food*, 17(1), 408-418.
45. Ali, S. A., Rizk, M. Z., Hamed, M. A., Aboul-Ela, E. I., El-Rigal, N. S., Aly, H. F., & Abdel-Hamid, A. H. Z. (2019). Assessment of titanium dioxide nanoparticles toxicity via oral exposure in mice: effect of dose and particle size. *Biomarkers*, 24(5), 492-498.
46. Sadiq, I. M., Dalai, S., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2011). Ecotoxicity study of titania (TiO₂) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.* *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(5), 1180-1187.
47. Minetto, D., Libralato, G., Marcomini, A., & Ghirardini, A. V. (2017). Potential effects of TiO₂ nanoparticles and TiCl₄ in saltwater to *Phaeodactylum tricornutum* and *Artemia franciscana*. *Science of the Total Environment*, 579, 1379-1386.
48. Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 822-880.
49. Florez, F. L. E., Hiers, R. D., Larson, P., Johnson, M., O'Rear, E., Rondinone, A. J., & Khajotia, S. S. (2018). Antibacterial dental adhesive resins containing nitrogen-doped titanium dioxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 93, 931-943.
50. Manimaran, K., Murugesan, S., Ragavendran, C., Balasubramani, G., Natarajan, D., Ganesan, A., & Seedeve, P. (2021). Biosynthesis of TiO₂ Nanoparticles Using Edible Mushroom (*Pleurotus djamor*) Extract: Mosquito Larvicidal, Histopathological, Antibacterial and Anticancer Effect. *Journal of Cluster Science*, 32(5), 1229-1240.
51. Xing, Y., Li, X., Guo, X., Li, W., Chen, J., Liu, Q., & Bi, X. (2020). Effects of different TiO₂ nanoparticles concentrations on the physical and antibacterial activities of chitosan-based coating film. *Nanomaterials*, 10(7), 1365.

52. da Rocha Simões, P., Villar, J. E., Luche, D. E. D., Silva, M. B., & Gonçalves, B. C. M. (2019). Avaliação da atividade antibacteriana do óleo da microalga *Chlorella minutissima* como alternativa para o tratamento de dermatite atópica. *Brazilian Journal of Development*, 5(11), 24893-24914.
53. Amaral, M. D. S. (2019). *Cultivo da microalga marinha Chlorella minutissima em fotobiorreator integrado (coluna de bolhas-tubular) internamente iluminado visando à obtenção de biomassa para a produção de biodiesel* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
54. Santos, W. R. D. (2020) *Análise das variáveis de processo na composição celular e nos parâmetros reológicos da Chlorella minutissima, cultivada em reator Air-Lift* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
55. Vaz, B., Duarte, J., Morais, E., Morais, M., & Costa, J. (2015). Cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Chlorella minutissima* LEB 114 Isoladas de lagoas de tratamento de efluentes de origem termelétrica. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 1(2), 1862-1868.
56. Luche, D. E. D., Gonçalves, B. C. M., & Silva, M. B. (2019). Produção de biomassa da microalga *Chlorella minutissima* usando mel como fonte de carbono. *Brazilian Journal of Development*, 5(10), 20531-20544.
57. Déniel, M., Errien, N., Daniel, P., Caruso, A., & Lagarde, F. (2019). Current methods to monitor microalgae-nanoparticle interaction and associated effects. *Aquatic Toxicology*, 217, 105311.
58. 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.
59. Miller, R. J., Lenihan, H. S., Muller, E. B., Tseng, N., Hanna, S. K., & Keller, A. A. (2010). Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. *Environmental science & technology*, 44(19), 7329-7334.
60. Kulacki, K. J., & Cardinale, B. J. (2012). Effects of nano-titanium dioxide on freshwater algal population dynamics.
61. Chen, X., Lu, R., Liu, P., & Li, X. (2017). Effects of nano-TiO₂ on *Chlamydomonas reinhardtii* cell surface under UV, natural light conditions. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, 32(1), 217–222.
62. Hund-Rinke, K., & Simon, M. (2006). Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids (8 pp). *Environmental Science and Pollution Research*, 13(4), 225-232.
63. Matouke, M. M., Elewa, D. T., & Abdullahi, K. (2018). Binary effect of titanium dioxide nanoparticles (nTiO₂) and phosphorus on microalgae (*Chlorella 'Ellipsoides Gerneck, 1907*). *Aquatic toxicology*, 198, 40-48.
64. Roy, R., Parashar, A., Bhuvaneshwari, M., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2016). Differential effects of P25 TiO₂ nanoparticles on freshwater green microalgae: *Chlorella* and *Scenedesmus* species. *Aquatic Toxicology*, 176, 161-171.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
APRESENTAÇÃO REMOTA

Discente: CAROLINA ASSIS DA SILVA

Título: "Atividade antimicrobiana de miconanopartículas de dióxido de titânio"

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni	Aprovado
Profa. Dra. Thalita Cabral Calado	Aprovado

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Carolina Assis da Silva** obteve o seguinte conceito:

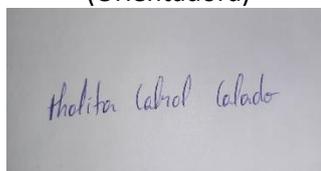
APROVADO

REPROVADO

São Vicente, 25 de janeiro de 2022.



Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni
(Orientadora)



Profa. Dra. Thalita Cabral Calado