



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



Stella Daniels Kovacs

Nanotecnologia verde: Utilização de fungos endofíticos de mangue na síntese de nanopartículas de óxido de zinco e otimização do processo

São Vicente - SP
2026

Stella Daniels Kovacs

Nanotecnologia verde: Utilização de fungos endofíticos de mangue na síntese de nanopartículas de óxido de zinco e otimização do processo

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de bacharel em Ciências Biológicas, com habilitação em Gerenciamento Costeiro.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Angélica Ottoni

São Vicente - SP
2026

K88n	Kovacs, Stella Daniels Nanotecnologia verde: Utilização de fungos endofíticos de mangue na síntese de nanopartículas de óxido de zinco e otimização do processo / Stella Daniels Kovacs. -- , 2026 29 p. : tabs., fotos Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente, Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni 1. Nanotecnologia verde. 2. Fungos endofíticos. 3. Nanopartículas de óxido de zinco. 4. Biossíntese fúngica. 5. pH. I. Título.
------	--

Sumário

Agradecimentos	4
Resumo	5
Abstract	6
1.0 Introdução e justificativa	7
2.0 Objetivo	11
2.1. <i>Objetivos específicos</i>	11
3.0 Material e métodos	12
3.1. <i>Microrganismos</i>	12
3.2. <i>Obtenção de biomassa fúngica</i>	13
3.3. <i>Biossíntese de ZnO_{NP}</i>	13
3.4. <i>Otimização da síntese</i>	14
3.5. <i>Caracterização das ZnO_{NPs}</i>	14
4.0 Resultados e discussão	15
4.1. <i>Seleção das linhagens produtoras de ZnO_{NPs}</i>	15
4.1.1 <i>Caracterização das ZnO_{NPs}</i>	17
4.2 <i>Otimização da síntese das ZnO_{NPs}</i>	19
4.2.1 <i>Caracterização das ZnO_{NPs}</i>	21
5.0 Conclusão	23
6.0 Referências Bibliográficas	23

Agradecimentos

Gostaria de oferecer meus sinceros agradecimentos:

À minha família, pelo apoio e incentivo;

À Professora Cristiane Angélica Ottoni, pela oportunidade oferecida em seu laboratório;

Aos colegas de laboratório;

Ao Instituto de Biociências – Câmpus do Litoral Paulista (IB-CLP/UNESP) pela infraestrutura cedida;

Ao Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMar/UNESP) pela infraestrutura e oportunidade de aprendizado;

À Central de Análises Multiusuário (CAM) do IPEN pelo suporte técnico;

Ao Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia (LQSN) do IQ-USP pelo apoio laboratorial;

À FAPESP (Processo nº 2025/12240-3) e ao CNPq (Processo nº 101141/2025-4) pelo auxílio financeiro;

Ao ICTEx- Conexão Hubei pela oportunidade de intercâmbio acadêmico e cultural.

Resumo

A síntese verde de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO_{NPs}) tem sido amplamente investigada como alternativa sustentável aos métodos químicos convencionais. Fungos endofíticos (FE) representam microrganismos promissores para a biossíntese de nanomateriais devido à produção de metabólitos extracelulares capazes de atuar como agentes redutores e estabilizantes. Neste estudo, sete linhagens fúngicas isoladas de plantas de mangue foram avaliadas quanto à capacidade de biossintetizar ZnO_{NPs} utilizando acetato de zinco diidratado ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como metal precursor. A formação das nanopartículas foi inicialmente evidenciada pelo aparecimento de precipitado branco nas reações. O ajuste do pH para condições alcalinas favoreceu significativamente a síntese de ZnO_{NPs} , resultando em maiores massas de material obtido, com valores máximos de 0,2300 g para a linhagem ASP9, 0,2224 g para AS2 e 0,2100 g para ASP6. Com base nos parâmetros de caracterização físico-química, as linhagens ASP8 e *Nemania* sp. RMP5 foram selecionadas para a etapa de otimização da síntese. A variação da concentração do precursor (45,45 -1 mM) influenciou significativamente o tamanho hidrodinâmico (DLS) das partículas, sendo observados os menores valores a 12,5 mM para ASP8 (352,6 nm) e RMP5 (325,7 nm). Os valores de índice de polidispersão (PDI) variaram entre 0,104 e 0,808, enquanto o potencial zeta ($\text{P}\zeta$) apresentou variação entre +11,3 mV e -18,4 mV, indicando baixa estabilidade coloidal e tendência à aglomeração. Os resultados demonstram o potencial de FE de mangue para a biossíntese de ZnO_{NPs} e indicam que o controle do pH e da concentração do precursor são parâmetros determinantes para a obtenção de nanopartículas com características adequadas.

Palavras-chave: Nanotecnologia verde; Fungos endofíticos; Nanopartículas de óxido de zinco; Biossíntese fúngica; pH.

Abstract

The green synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO_{NPs}) has been extensively investigated as a sustainable alternative to conventional chemical methods. Endophytic fungi (EFs) represent promising microorganisms for the biosynthesis of nanomaterials due to the production of extracellular metabolites capable of acting as reducing and stabilizing agents. In this study, seven fungal strains isolated from mangrove plants were evaluated for their ability to biosynthesize ZnO_{NPs} using zinc acetate dihydrate ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) as a precursor metal. The formation of nanoparticles was initially evidenced by the appearance of a white precipitate in the reactions. Adjusting the pH to alkaline conditions significantly favored the synthesis of ZnO_{NPs} , resulting in higher material masses, with maximum values of 0,2300 g for the ASP9 strain, 0,2224 g for AS2, and 0,2100 g for ASP6. Based on the physicochemical characterization parameters, the ASP8 and *Nemania* sp. RMP5 strains were selected for the synthesis optimization. The variation in precursor concentration (45,45 -1 mM) significantly influenced the hydrodynamic size (DLS) of the particles, with the smallest values observed at 12,5 mM for ASP8 (352,6 nm) and RMP5 (325,7 nm). Polydispersity index (PDI) values ranged from 0,104 to 0,808, while the zeta potential ($\text{P}\zeta$) varied between +11,3 mV and -18,4 mV, indicating low colloidal stability and a tendency towards agglomeration. The results demonstrate the potential of mangrove EFs for the biosynthesis of ZnO_{NPs} and indicate that controlling the pH and precursor concentration are key parameters for obtaining nanoparticles with suitable characteristics.

Keywords: Green nanotechnology; Endophytic fungi; Zinc oxide nanoparticles; Fungal biosynthesis; pH.

1.0 Introdução e justificativa

A utilização de materiais em escala nanométrica se expandiu substancialmente na última década devido a sua ampla aplicação em diversos setores industriais e ambientais (Karthikeyan e Velvizhi, 2024). No setor ambiental, uma das demandas mais urgentes está relacionada ao desenvolvimento de metodologias amigas do ambiente para a síntese de nanopartículas, levando em consideração os aspectos de sustentabilidade ambiental, inovação e de viabilidade econômica (Rocha *et al.*, 2024).

De acordo com Santos *et al.* (2024) e Shahcheraghi *et al.* (2022) a nanotecnologia verde (NV), também denominada de bionanotecnologia, se apresenta como uma abordagem sustentável (Gottardo *et al.*, 2021). A NV, campo interdisciplinar entre a nanotecnologia e biotecnologia, viabiliza a obtenção de nanomateriais (NM) por processos que utilizam matérias primas renováveis e seguras sob condições de pressão atmosférica e temperatura ambiente, ou abaixo de 200 °C, que possuem poucas etapas de síntese e que reduzem a utilização de fontes de energia não renováveis (García-Quintero e Palencia, 2021).

A utilização de organismos unicelulares ou pluricelulares como bactérias, actinomicetos, algas e fungos filamentosos (Ff) tem sido reportada (Salem, 2023). Os Ff são organismos promissores para a síntese biológica de NP devido principalmente à facilidade no cultivo e manutenção em laboratório (Neethu *et al.*, 2019). Além disso, estes microrganismos apresentam elevada tolerância e capacidade em reduzir metais, incluindo os metais pesados, a escalas nanométricas.

As NP geradas apresentam maior biocompatibilidade em comparação às NP comerciais (Zainab *et al.*, 2023), uma vez que, durante o processo de síntese, os fungos liberam uma grande variedade de metabólitos extracelulares, incluindo enzimas, proteínas, polissacarídeos, flavonóides e compostos fenólicos, que atuam como agentes redutores e estabilizadores (Sidhu *et al.*, 2025). As NP de óxido de zinco (ZnO_{NPs}) de origem fúngica são um dos nanomateriais biogênicos mais promissores, devido ao potencial de aplicação em diversas áreas industriais, incluindo a farmacêutica, alimentícia, fotocatalisadores, cosméticos e agricultura (Murali *et al.*, 2023; Daniel *et al.*, 2023).

A aplicação de ZnO_{NPs} micogênicas no setor agrícola é promissora, uma vez que, pode suprimir patógenos causadores de doenças ou alterar mecanismos de resistência do hospedeiro (Rehman *et al.*, 2024). Além disso, as ZnO_{NPs} têm demonstrado a capacidade de induzir respostas antioxidantes, sobretudo em condições de estresse salino, atuando como reguladoras

positivas na mitigação dos efeitos da salinidade sobre o crescimento vegetativo e a produtividade agrícola (Daniel *et al.*, 2023).

Dentro das comunidades fúngicas, os fungos endofíticos (F_E) são amplamente distribuídos, residindo em parte ou em todo o seu ciclo de vida em uma ampla variedade de espécies vegetais, sem causar quaisquer sintomas de doenças. Esses microrganismos representam uma fonte confiável e inexplorada de substâncias bioativas. Essa categoria de fungos exibe maior atividade metabólica em comparação com suas contrapartes livres, tornando-os candidatos promissores para aplicações no campo da NV (Adeleke *et al.*, 2024).

A variabilidade nos efeitos promovidos pelas ZnO_{NP} é influenciada por fatores como o tamanho e a forma das partículas, o estágio de desenvolvimento da planta, o método e a dosagem de aplicação do material e a duração da exposição (Al Jabri *et al.*, 2022). Essas nanopartículas oferecem eficácia prolongada, liberando gradualmente íons metálicos durante o crescimento da cultura. Essa liberação gradual torna também mais desafiador o desenvolvimento de fungos patogênicos em comparação com fungicidas químicos tradicionais. No entanto, sua implementação apresenta desafios relacionados à estabilidade ambiental e custos de produção e aplicação, ressaltando a necessidade de pesquisas completas e regulamentações apropriadas (Ahumada-Rudolph *et al.*, 2025). Em um estudo conduzido por Fouda *et al.* (2018), no qual ZnO_{NP} esféricas foram sintetizadas a partir de extrato fúngico de *Aspergillus terreus*, os autores destacaram que pouca atenção tem sido dada à relação entre a linhagem fúngica utilizada, o formato das NP biossintetizadas e suas propriedades bioativas e multifuncionais.

As ZnO_{NPs} podem ser produzidas por via intracelular ou extracelular. O processo mais simples e que requer um menor número de etapas é o extracelular. As enzimas e proteínas extracelulares fúngicas secretadas no meio, atuam como agentes redutores e capeadores, que garantem estabilidade sem aglomeração. A forma das ZnO_{NPs} sintetizadas mediadas por fungos depende do tipo de espécie e do precursor utilizado (Mohamed *et al.*, 2019). É ainda relevante destacar que existem divergências nos protocolos de síntese dessas NP, especialmente em relação ao tempo necessário para sua formação e ao pH empregado durante a reação (Gallo *et al.*, 2025; Anjum *et al.*, 2024; Abdelkader *et al.*, 2022).

Abdelhakim *et al.* (2020) obtiveram ZnO_{NPs} de tamanho compreendido entre 15-45 nm e formato esférico utilizando extrato do fungo endofítico *Alternaria tenuissima*. As miconanopartículas obtidas apresentaram ação antimicrobiana e antioxidante. Sumanth *et al.* (2020) utilizaram extrato do Ff *Xylaria acuta* para a síntese do nanomaterial supracitado. Os miconanomateriais obtidos apresentaram atividade antimicrobiana e antitumoral. Narendra

Kumar *et al.* (2024) também utilizaram o extrato do F_E *Alternaria alternata* e obtiveram ZnONPs no tempo de 24 horas com tamanho compreendido entre 20 e 60 nm. De acordo com Kumar *et al.* (2022) o F_E *Aspergillus* sp. apresentou capacidade de síntese de ZnONP de tamanho aproximado de 80-100 nm. Abdelkader *et al.* (2022) relataram que o extrato do F_E *Aspergillus niger* promoveu a formação de ZnONP de $31,75 \pm 4,38$ nm. Os autores relataram que as ZnONPs apresentaram atividade antibacteriana promissora contra *Staphylococcus aureus*. A Tabela 1 apresenta outros estudos recentes para a obtenção de ZnONP produzidas por F_E.

Segundo Okaiyeto *et al.* (2024), o pH alcalino favorece a formação de ZnONPs por regular as cargas elétricas das biomoléculas, o que pode ter uma influência em sua capacidade de encapsular e estabilizar nanopartículas. Este fator abiótico é reconhecido por ser determinante no tamanho e forma da NP (Rani *et al.*, 2022; Okaiyeto *et al.*, 2024). Outro fator relevante é o metal precursor utilizado, que varia entre acetato de zinco $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$, sulfato de zinco $[\text{ZnSO}_4]$ e nitrato de zinco $[\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$. O tipo de metal, assim como sua concentração, pode influenciar algumas características das nanopartículas, como a sua forma e tamanho (Rani *et al.*, 2022).

Tabela 1: Fungos endofíticos utilizados na síntese de nanopartículas de óxido de zinco.

Fungo	Metal precursor & Concentração	Extrato fúngico: metal precursor	pH	Propriedade	Referências
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	Zn SO4 0,1 M	10:1	ND*	Antibacteriana Anticancerígena	Hammad <i>et al.</i> (2025)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Zn (CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O 1, 2, 4, e 5 mM	1:5	6-9	Antifúngica	Mishra <i>et al.</i> (2025)
<i>Aspergillus</i> sp. as17	Zn (CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O 1g/L	ND*	ND*	Antibacteriana Antifúngica	Abdelrahman <i>et al.</i> (2024)
<i>Mucor racemosus</i>	(Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O) 4 mM	ND*	8	Antimicrobianas Erradicação de biofilme Anticancerígena	Elkady <i>et al.</i> (2025)
<i>Xylaria arbuscula</i>	Zn (CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O 1mM	ND*	9	Antibacteriana Antifúngica Atividade Antioxidante Anti-inflamatória Atividade citotóxica Atividade cicatrizante	Nehru <i>et al.</i> (2023)
<i>Trichoderma viride</i>	Zn (CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O 0,2 M	3:7	ND*	Antibacteriana Antifúngica	Kaur <i>et al.</i> (2022)
<i>Periconium</i> sp.	(Zn (NO ₃) ₂ · 6H ₂ O) 20g/100 mL	1:4	5	Antibacteriana Antioxidante	Ganesan <i>et al.</i> (2020)

*ND: Não descrito.

A concentração do metal precursor utilizado pode influenciar o tamanho, forma, tendência a aglomeração e outras características das nanopartículas. Mishra *et al.* (2025) utilizaram diferentes concentrações de acetato de zinco diidratado (1, 2, 4 e 5 mM), estabelecendo 5 mM como a concentração ideal. Esta concentração em questão produziu nanopartículas de tamanho hidrodinâmico (DLS) de 50,79 nm, índice de polidispersão (PDI) de 1 e carga superficial (Potencial Zeta, Pζ) de -17,49 mV com formato predominantemente hexagonal. Hammad *et al.* (2025) empregaram uma concentração de 0,1 M de sulfato de zinco

e obtiveram nanopartículas de DLS de 15,77 nm , PDI de 0,952 e Pζ de 8,01 mV, apresentando formato hexagonal e esférico.

Singh *et al.* (2025) avaliaram o potencial de ZnONPs, sintetizadas a partir de filtrado do fungo *Trichoderma harzianum*, para prolongar a vida útil de bananas e controlar a deterioração fúngica pós-colheita. A atividade antifúngica das ZnONPs foi testada contra *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., por meio de ensaios de concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM), estimativas de biomassa fúngica e inibição do crescimento micelial. Segundo os autores, em concentrações entre 80 e 100 ppm, as ZnONPs reduziram a biomassa fúngica em até 32,59% para *Fusarium* spp. e 30,66% para *Penicillium* spp. A utilização dessas NPs inibiu de forma eficaz a colonização fúngica, preservou a integridade dos frutos e contribuiu para o prolongamento de sua vida útil.

Quanto ao efeito conservante, os frutos tratados com 80 ppm de ZnONPs apresentaram a menor perda de peso fisiológica (5,36%), em comparação com as amostras-controle (9,31%). Elshafie *et al.* (2023) demonstraram que a utilização *in situ* de ZnONPs, tanto sintéticas quanto biogênicas, na concentração de 2.000 µg/ml no tratamento pós-colheita de laranjas artificialmente infectadas por *Alternaria citri*, reduziram a severidade da doença para 6,92% e 9,23%, respectivamente. Segundo os autores, as ZnONPs biogênicas, podem reduzir a infecção fúngica da laranja e melhorar a situação socioeconômica dos agricultores.

Em síntese, existe uma necessidade iminente no desenvolvimento de processos eficientes, de baixo custo e não prejudiciais ao meio ambiente, para a obtenção de nanopartículas. Neste sentido, propomos neste projeto a seleção de F_E capazes de sintetizar de forma extracelular ZnONPs por uma rota ecológica. Outrossim, os resultados gerados contemplarão os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 2 e 12 propostos pela Agenda 2030 e que estão pautados em desenvolver sistemas sustentáveis de produção (ODS2) e assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis (ODS12).

2.0 Objetivo

Selecionar fungos filamentosos endofíticos com capacidade de sintetizar nanopartículas de óxido de zinco.

2.1. Objetivos específicos

A fim de alcançar o objetivo principal do estudo, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Avaliar o efeito da centrifugação e da filtração do extrato fúngico na obtenção de nanopartículas;
- ✓ Investigar a influência do pH na síntese das nanopartículas;
- ✓ Investigar a influência da concentração do metal precursor na obtenção de nanopartículas;
- ✓ Caracterizar as nanopartículas obtidas por meio de diferentes técnicas físico-químicas;

3.0 Material e métodos

3.1. Microrganismos

Foram utilizadas as linhagens: *Hypoxylon monticulosum* AS2 (Figura 1A), *Colletotrichum apelinum* ASP6 (Figura 1B), *Colletotrichum* sp. ASP9 (Figura 1C), *Fusarium* sp. RMP1 (Figura 1D), *Nemania* sp. RMP5 (Figura 1E) e não identificado ASP8 (Figura 1F) de fungos endofíticos (F_E) previamente isolados de plantas de mangue, *Rhizophora mangle* e *Avicennia, schaueriana*, e uma linhagem de vida livre, *Aspergillus niger* IBCLP20 (Figura 1G), provenientes da Coleção do Laboratório de Micologia e Bionanotecnologia (MICOBIONANOTEC) da UNESP coordenado pela Prof^a. Dr^a. Cristiane Ottoni, para avaliação quanto à capacidade de biossintetizar ZnO_{NP}. Para a realização dos ensaios, os F_E foram previamente reativados em placas de Petri de 90 mm contendo meio Agar Batata Dextrose (BDA). Os microrganismos foram incubados a 30 °C por 7 dias.

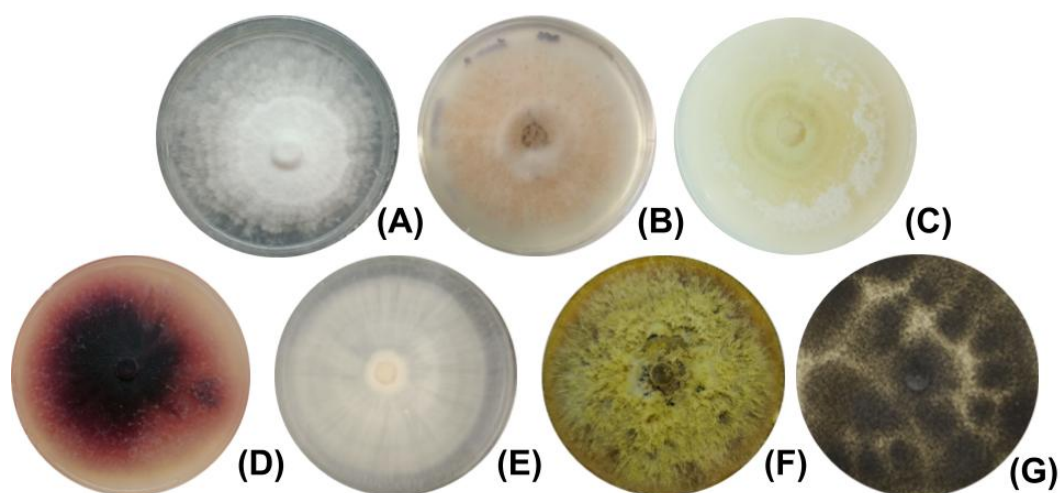


Figura 1: Crescimento dos fungos endofíticos: *Hypoxylon monticulosum* AS2 (A), *Colletotrichum apelinum* ASP6 (B), *Colletotrichum* sp. ASP9 (C), *Fusarium* sp. RMP1 (D), *Nemania* sp. RMP5 (E), não identificado (ASP8) (F) e *Aspergillus niger* IBCLP20 (G) em placa de Petri contendo meio Ágar Batata Dextrose (BDA), utilizado para a reativação das linhagens fúngicas antes dos ensaios de biossíntese de ZnO_{NPs}.

3.2. Obtenção de biomassa fúngica

Para cada linhagem fúngica avaliada, cinco discos de 6 mm de diâmetro foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio lipossacarídeo de metil glicose (composição final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): extrato de malte (3,0), glicose (10,0), extrato de levedura (3,0), peptona bacteriológica (5,0) (Figura 2).

Os frascos foram incubados a 30 °C, sob agitação de 150 rpm, por um período de 72 horas. Após esse período de incubação, a biomassa foi separada por filtração e lavada três vezes com 100 mL de água deionizada estéril. Em seguida, 5 g de biomassa úmida foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de água deionizada estéril e submetidos a nova incubação sob as mesmas condições (30 °C, 150 rpm, por 72 horas).

Os sistemas isentos de células foram obtidos por meio de dois procedimentos distintos: (i) separação de uma alíquota de 25 mL submetida à filtração em membrana com porosidade de 0,45 μm ; e (ii) separação de uma alíquota de 25 mL submetida à centrifugação a 24 °C, sob agitação de 5.000 rpm, durante 10 minutos. Os filtrados e sobrenadantes resultantes foram empregados nos ensaios de biossíntese de ZnONPs (Paraguay-Delgado *et al.*, 2022).



Figura 2: *Nemania* sp. (RMP5) cultivado em meio MGLP para obtenção de biomassa fúngica utilizada na biossíntese de ZnONPs .

3.3. Biossíntese de ZnONP

A metodologia para síntese foi adaptada do protocolo descrito por Dias *et al.* (2022). Em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo solução de acetato de zinco diidratado ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (45,45 mM), foram inoculados, vagarosamente, 5 mL do filtrado ou do sobrenadante fúngico, sob agitação contínua a 60 °C.

Os sistemas foram incubados em duas condições distintas de pH: (i) sem ajuste prévio; e (ii) com ajuste para pH 8,0, empregando solução de NaOH (2,0 M). Em ambos os casos, a incubação foi conduzida a 60 °C, sob agitação de 150 rpm, por 3 horas, na ausência de luz. A formação das ZnONP foi evidenciada pelo aparecimento de um precipitado branco-amarelado cremoso.

O material precipitado foi coletado por centrifugação a 24 °C, sob agitação de 3.800 rpm, por 15 minutos, lavado com 20 mL de água deionizada estéril duas vezes e submetido à centrifugação nas mesmas condições (24 °C, 3.800 rpm, por 15 minutos). Posteriormente, o material foi submetido à secagem a 30 °C, durante 72 horas, visando a obtenção do pó branco de ZnONPs.

3.4. Otimização da síntese

As linhagens fúngicas cujas ZnONPs apresentaram características coloidais compatíveis ou próximas dos critérios de qualidade estabelecidos: $DLS \leq 100$ nm, $PDI \leq 0,3$, $P\zeta \geq |30|$ mV, foram selecionadas para a etapa subsequente de otimização. Essa etapa teve como propósito refinar as condições experimentais de síntese, avaliando a influência da concentração do metal precursor sem alteração do pH da reação.

O método de separação do extrato fúngico selecionado foi a filtração em membranas sem surfactante, com porosidade de 0,45 μ m e, posteriormente, 0,22 μ m (Aguiar *et al.*, 2024). Foram avaliadas diferentes concentrações de $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ (45,45; 37,5; 25; 12,5; 10; 5; 3 e 1 mM), empregando-se distintas proporções entre o extrato fúngico e o metal precursor, correspondentes a 1:10, 1:3, 1:1, 3:1, 5:1, 9:1, 47:3 e 49:1, respectivamente.

3.5. Caracterização das ZnONPs

As ZnONPs foram analisadas por diferentes técnicas analíticas que fazem parte da rotina do grupo de pesquisa MICOBIONANOTEC (Ottoni *et al.*, 2017). Estas técnicas foram utilizadas com o intuito de determinar tamanho hidrodinâmico (DLS), carga (Potencial Zeta, $P\zeta$) e índice de polidispersão (PDI).

O DLS, $P\zeta$ e PDI foram determinados medindo as flutuações dinâmicas da intensidade de espalhamento de luz (Zetasizer Nano ZS, Malvern instruments Ltd, Reino Unido) com utilização do material em suspensão em 10 ml de água deionizada (Figura 3) e sonicadas por 20 minutos. As análises foram realizadas no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

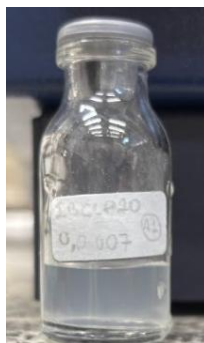


Figura 3: Suspensão aquosa de ZnO_{NPs} utilizada nas análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta ($\text{P}\zeta$). As amostras foram dispersas em água deionizada e submetidas à sonicação para favorecer a homogeneização da suspensão antes das medições.

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG) foi realizada utilizando o equipamento JEOL modelo JSM-IT700HR. As amostras foram dispersas de forma individualizada sobre uma lâmina de vidro e pressionadas levemente no porta-amostra, revestido previamente com fita de carbono. As análises foram realizadas na Central de Análises Multiusuários do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

4.0 Resultados e discussão

4.1. Seleção das linhagens produtoras de ZnO_{NPs}

As sete linhagens fúngicas avaliadas: *Aspergillus niger* IBCLP20, *Hypoxylon monticulosum* AS2, *Colletotrichum apelinum* ASP6, não identificado ASP8, *Colletotrichum* sp. ASP9, *Fusarium* sp. RMP1 e *Nemania* sp. RMP5, apresentaram variações na capacidade de síntese de ZnO_{NPs} , em função do método de preparo do filtrado ou sobrenadante e da condição de pH aplicada.

A formação inicial das ZnO_{NPs} foi evidenciada pelo aparecimento de um precipitado branco (Figura 4). Esse precipitado foi observado em todas as amostras nas quais o pH foi ajustado para condições alcalinas e na maioria das demais condições experimentais. As exceções foram o extrato do fungo *Fusarium* sp. RMP1, no qual não houve formação de precipitado sem ajuste de pH, e o extrato filtrado de *Hypoxylon monticulosum* AS2, que também não apresentou precipitação na ausência de ajuste de pH.



Figura 4: Precipitado úmido de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) biossintetizadas pelo fungo endofítico RMP5 após centrifugação do extrato fúngico sob condição de pH ajustado.

A massa (g) de ZnONPs obtida variou entre as diferentes condições de pH avaliadas. De modo geral, o pH alcalino resultou em maior massa de nanopartículas produzidas (Tabela 2) em comparação às condições sem ajuste de pH. As maiores massas foram registradas para as linhagens IBCLP20, AS2 e ASP6. Por outro lado, o método de separação da biomassa para obtenção do extrato fúngico não apresentou influência significativa na massa de ZnONPs obtidas.

Tabela 2: Massa (g) das ZnONPs secas biossintetizadas por diferentes linhagens fúngicas utilizando $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como precursor. As nanopartículas foram obtidas a partir de extratos preparados por filtração ou centrifugação, avaliando-se diferentes condições de pH da reação. O símbolo (–) indica ausência de formação de nanopartículas.

Linhagem fúngica	Precursor		$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		
	Método		Filtração		Centrifugação
	Condição	pH sem ajuste	pH com ajuste	pH sem ajuste	pH com ajuste
IBCLP20		0,0020	0,2050	0,0030	0,2090
AS2		0,0024	0,2289	-	0,2224
ASP6		0,0040	0,1890	0,0036	0,2100
ASP8		0,0018	0,1960	0,0020	0,1840
ASP9		0,0025	0,1600	0,0023	0,2300
RMP1		-	0,1640	-	0,1760
RMP5		0,0024	0,1588	0,0016	0,1560

O ajuste do pH influenciou significativamente a quantidade de ZnONPs obtidas. De modo geral, maiores massas do material foram registradas nas amostras submetidas à centrifugação com pH ajustado, destacando-se as linhagens ASP9 (0,2300 g), AS2 (0,2224 g) e ASP6 (0,2100 g). Em contraste, menores quantidades foram obtidas para RMP5 (0,1588 g) e RMP1 (0,1760 g) sob as mesmas condições.

Quando utilizado o método de filtração, também se verificou melhor desempenho nas condições de pH ajustado, especialmente para as linhagens ASP9 (0,2289 g) e IBCLP20 (0,2050 g), que apresentaram as maiores massas entre as amostras analisadas. Por outro lado,

nas condições sem ajuste de pH, as massas obtidas foram significativamente menores, com valores inferiores a 0,0040 g para todas as linhagens avaliadas. Esse comportamento pode estar relacionado ao favorecimento da formação de espécies hidroxiladas de zinco em condições alcalinas, que promovem a nucleação e precipitação de ZnO_{NPs} durante o processo de síntese.

4.1.1 Caracterização das ZnO_{NPs}

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para as ZnO_{NPs} sintetizadas a partir do precursor $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Observa-se ampla variação no DLS, oscilando entre 409.1 nm (ASP8 – filtração, sem ajuste de pH) e 3454 nm (RMP1 – filtração, pH ajustado). Essa heterogeneidade sugere que as condições de síntese, especialmente o controle de pH, influenciaram significativamente na formação e agregação das partículas.

Tabela 3: Caracterização físico-química das ZnONPs biossintetizadas por diferentes linhagens fúngicas, determinada por espalhamento dinâmico de luz (DLS), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (Pζ). As nanopartículas foram obtidas a partir de extratos fúngicos preparados por filtração ou centrifugação, sob condições de pH sem ajuste e pH ajustado. O símbolo (–) indica ausência de dados experimentais.

Linhagem fúngica	Variação		Análise		
	Método	Condição	DLS (nm)	PDI	Pζ (mV)
IBCLP20	Filtração	pH sem ajuste	1625.0	0.512	-8.59
		pH ajustado	1913.0	0.808	-10.20
	Centrifugação	pH sem ajuste	973.4	0.589	-13.80
		pH ajustado	1307.0	0.446	-14.90
AS2	Filtração	pH sem ajuste	-	-	-
		pH ajustado	1606.0	0.677	-12.80
	Centrifugação	pH sem ajuste	517.8	0.530	-11.20
		pH ajustado	2089.0	0.782	-13.80
ASP6	Filtração	pH sem ajuste	617.0	0.530	-10.40
		pH ajustado	445.2	0.215	-14.70
	Centrifugação	pH sem ajuste	841.9	0.484	-9.54
		pH ajustado	959.8	0.549	-15.50
ASP8	Filtração	pH sem ajuste	409.1	0.457	-15.20
		pH ajustado	780.5	0.413	-15.00
	Centrifugação	pH sem ajuste	1267.0	0.429	11.30
		pH ajustado	3290.0	0.104	-2.79
ASP9	Filtração	pH sem ajuste	2302.0	0.249	-9.67
		pH ajustado	1822.0	0.518	-15.60
	Centrifugação	pH sem ajuste	937.4	0.458	-10.60
		pH ajustado	2127.0	0.593	-14.60
RMP1	Filtração	pH sem ajuste	-	-	-
		pH ajustado	3454.0	0.463	-8.81
	Centrifugação	pH sem ajuste	-	-	-
		pH ajustado	2977.0	0.790	-7.82
RMP5	Filtração	pH sem ajuste	2328.0	0.681	-12.30
		pH ajustado	994.8	0.524	-15.20
	Centrifugação	pH sem ajuste	1818.0	0.527	-7.56
		pH ajustado	512.6	0.290	-17.50

Essas características são relevantes para avaliar o potencial de aplicação do material em diferentes áreas, como agricultura e saúde. No entanto, a maior parte do material analisado apresentou tamanho superior a 100 nm, o que, de acordo com os critérios convencionais de definição, não permitiria classificá-lo estritamente como nanopartícula. Entretanto, as ZnONPs

são pouco solúveis em água e apresentam elevada tendência à aglomeração em meio aquoso (Kaur *et al.*, 2022). Dessa forma, as amostras foram submetidas à sonicação por 20 minutos antes da análise, com o objetivo de favorecer a dispersão das partículas.

Os elevados valores de DLS observados podem estar associados às interações entre partículas, como forças de Van der Waals e interações eletrostáticas, que promovem a formação de agregados em suspensão (Raju *et al.*, 2025). Assim, as medidas obtidas por DLS podem refletir o tamanho de aglomerados de partículas, e não necessariamente o tamanho individual das ZnO_{NPs} (Ndaba *et al.*, 2022).

Os valores de PDI variaram de 0,104 a 0,808, evidenciando desde amostras moderadamente polidispersas (ASP8 – centrifugado, pH ajustado; PDI = 0,104) até altamente polidispersas (IBCLP20 – filtrado, pH ajustado; PDI = 0,808). Essa amplitude indica diferenças marcantes na distribuição de tamanho, associadas à estabilidade coloidal e ao grau de aglomeração (Kaur *et al.*, 2022).

O $\text{P}\zeta$ das amostras variou entre $-17,5$ mV e $+11,3$ mV, sendo predominantemente negativo, o que sugere a presença de proteínas e metabólitos fúngicos como agentes estabilizantes (“capping agents”) que conferem carga superficial negativa às NPs. No entanto, os valores absolutos inferiores a $|30|$ mV indicam baixa estabilidade coloidal e tendência à aglomeração (Dias *et al.*, 2022). Os resultados obtidos de $\text{P}\zeta$ condizem com aqueles obtidos por Abdelrahman *et al.* (2024) e Mishra *et al.* (2025), ou seja, NPs pouco estáveis e com tendência a aglomeração.

4.2 Otimização da síntese das ZnO_{NPs}

De modo geral, as linhagens ASP8 e RMP5 destacaram-se pelos valores de índice de polidispersão (PDI) e tamanho hidrodinâmico (DLS). Em função desse desempenho, ambas foram selecionadas para a etapa de otimização do processo de síntese. O método de separação do extrato fúngico adotado foi a filtração, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os métodos de separação avaliados.

A concentração do metal precursor $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi alterada para analisar as características e qualidade das ZnO_{NPs} , a partir da diminuição do volume de metal precursor em relação ao extrato fúngico. As concentrações de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ avaliadas foram 45,45; 37,5; 25; 12,5; 10; 5; 3 e 1 mM. A formação inicial das nanopartículas foi evidenciada pelo aparecimento de um precipitado de coloração branca (Figura 5A) ou castanha (Figura 5B).

A formação do precipitado foi observada em todas as condições avaliadas, com exceção da amostra RMP5 na concentração de 1 mM.

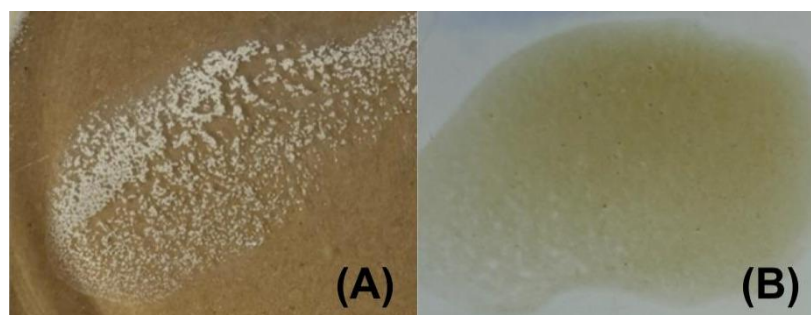


Figura 5: Nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) secas biossintetizadas pelo fungo endofítico ASP8 em diferentes concentrações de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 45,45 mM (A) e 25 mM (B).

As diferentes concentrações testadas resultaram em quantidades distintas de ZnONPs obtidas em cada condição experimental (Tabela 4). As maiores massas do material foram observadas em concentrações intermediárias do precursor, destacando-se 10 mM para a linhagem ASP8 (0,0143 g) e 12,5 mM (0,0079 g) e 10 mM (0,0078 g) para a linhagem RMP5.

Tabela 4: Massa (g) das ZnONPs secas biossintetizadas pelos fungos endofíticos ASP8 e RMP5 em função da concentração do precursor $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (45,45 mM). Os valores representam o rendimento do material obtido após a síntese. O símbolo (–) indica ausência de dados experimentais.

Linhagem fúngica	Precursor	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$							
	Concentração (mM)	45,45	37,50	25,00	12,50	10,00	5,00	3,00	1,00
ASP8		0,0052	0,0019	0,0064	0,0059	0,0143	0,0048	0,0021	0,0020
RMP5		0,0047	0,0019	0,0068	0,0079	0,0078	0,0060	0,0044	–

O símbolo (–) indica ausência de precipitação.

O gênero *Nemania* de fungos endofíticos é reconhecido pela produção de metabólitos secundários (Tibpromma *et al.*, 2021; Mayrhofer *et al.*, 2024), assim como outros da ordem Xylariales (Becker & Stadler, 2021; Zhang *et al.*, 2024). Esta característica demonstra grande potencial para síntese de NPs por fungos endofíticos deste gênero (Zhang *et al.*, 2024).

Os métodos de síntese micológica atuais de ZnONPs empregam quantidades significativas do metal precursor com altas concentrações (Dias *et al.*, 2022; Zaki *et al.*, 2021) ou volumes equivalentes de extrato e metal (Anjum *et al.*, 2024). Estudos recentes demonstram que a síntese micológica de outras NPs metálicas, como AgNP , o volume de extrato e metal é igual com concentrações menores do metal precursor (Basheer *et al.*, 2023; Ahmad *et al.*, 2024; Jana *et al.*, 2025) ou o volume de metal é menor do que o de extrato como para síntese de AuONPs (Abu-Tahon *et al.*, 2020).

4.2.1 Caracterização das ZnO_{NPs}

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para as ZnO_{NPs} sintetizadas a partir do precursor Zn(CH₃COO)₂·2H₂O em diferentes concentrações. Observa-se diminuição do DLS com a diminuição da concentração, de 2627 nm (ASP8 45,45 mM) até 352,6 nm (ASP8 12,5 mM) e de 2248 nm (RMP5 45,45 mM) até 325,7 nm (RMP5 12,5 mM). No entanto, com baixas concentrações (10 mM a 1 mM) o material aumentou o DLS. A variação do tamanho do material sugere que a concentração influenciou significativamente na formação e tamanho das partículas.

O PDI do material varia entre 0,270 e 0,787, evidenciando amostras moderadamente polidispersas (RMP5 5 mM, PDI= 0,270) e altamente polidispersas (RMP5 45,45 mM, PDI=0,705). Segundo Kaur *et al.*, (2022) os valores de PDI podem ser classificados como monodispersas (<0,1), moderadamente polidispersas (0,1-0,4) até altamente polidispersas (>0,4).

O Pζ das amostras corresponde a NPs pouco estáveis, com valores negativos e variação entre -7,91 mV a -18,4 mV. Estes resultados indicam NPs com Pζ neutro (entre 10 e -10), o que demonstra NPs com maior tendência a aglomeração (Kaur *et al.*, 2022; Nehru *et al.*, 2023). Os valores de Pζ obtidos estão alinhados com as pesquisas atuais sobre a síntese de ZnO_{NPs} por fungos endofíticos (Ganesan *et al.*, 2020; Abdelkader *et al.*, 2022; Kaur *et al.*, 2022; Abdelrahman *et al.*, 2024; Hammad *et al.*, 2025), que indicam a instabilidade e predominância de ZnO_{NP} aniônicas.

Tabela 5: Tamanho hidrodinâmico (DLS), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (P ζ) das ZnO_{NPs} obtidas por diferentes linhagens fúngicas em distintas concentrações do precursor (mM). O símbolo (–) indica ausência de dados experimentais.

Linhagem fúngica	Variação	Análise		
	Concentração (mM)	DLS (nm)	PDI	P ζ (mV)
ASP8	45,45	2627	0,611	-13,6
	37,50	1395	0,493	-13,9
	25,00	785,7	0,507	-15,1
	12,50	352,6	0,458	-16,6
	10,00	863,8	0,568	-12,5
	5,00	1763	0,407	-13,1
	3,00	1951	0,787	-15,5
	1,00	821,4	0,657	-18,4
RMP5	45,45	2248	0,705	-7,91
	37,50	726,7	0,598	-13,2
	25,00	883,4	0,479	-13,3
	12,50	325,7	0,491	-14,1
	10,00	889,9	0,638	-13,3
	5,00	2216	0,270	-15,8
	3,00	521,8	0,516	-14,5
	1,00	-	-	-

A concentração do metal precursor pode afetar o tamanho, rendimento e estabilidade de NPs (Gao *et al.*, 2019; Al-Kordy *et al.*, 2021). Concentrações maiores tendem a resultar em NPs de tamanhos maiores, e o inverso também é válido, ou seja, concentrações menores formam nanopartículas de tamanhos menores. (Singh *et al.*, 2024). Entretanto, a ampla oscilação dos valores de DLS pode ser atribuída à significativa instabilidade do material, conforme estabelecido na literatura (Kaur *et al.*, 2022; Ndaba *et al.*, 2022; Raju *et al.*, 2025) e comprovado pelos valores de PDI e P ζ .

A análise por MEV destacou ZnO_{NPs} de formatos distintos a cada parâmetro analisado, com NPs de formato irregular (Figura 6A), coluna (Figura 6B), *platelet* (Figura 6C) e irregular (Figura 6D). A análise morfológica utilizada foi definida por Hamida *et al.* (2020).

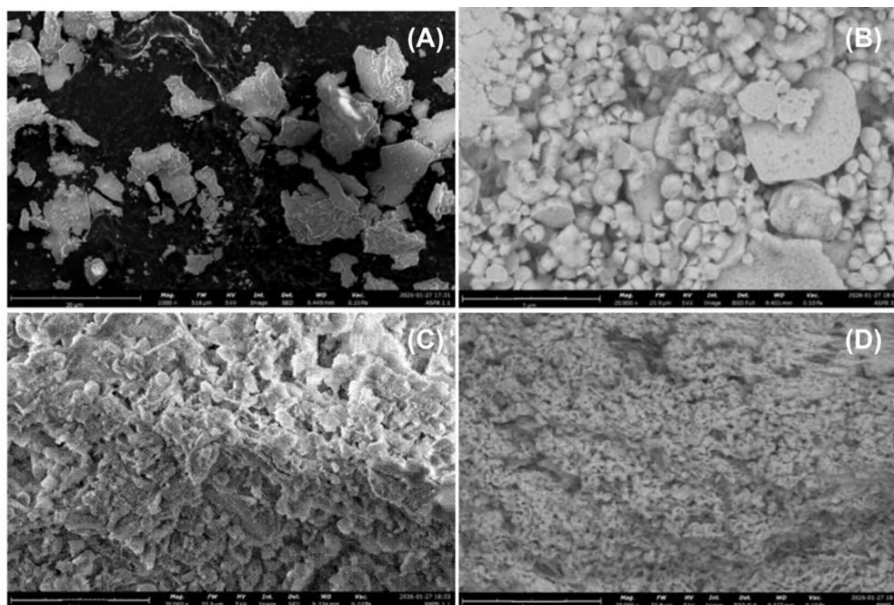


Figura 6. Análise morfológica das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO_{NPs}) biossintetizadas pelos fungos ASP8 (A, B) e RMP5 (C, D), obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As imagens mostram a superfície das ZnO_{NPs} produzidas nas proporções extrato fúngico:metal precursor de 1:1 (A e C) e 3:1 (B e D). Escala: (A) 20 μm ; (B–D) 1 μm .

5.0 Conclusão

As linhagens ASP8 e *Nemania* sp. RMP5 apresentaram maior potencial para a biossíntese de ZnO_{NPs} . O ajuste do pH para condições alcalinas favoreceu o rendimento das nanopartículas, enquanto a redução da concentração do precursor metálico resultou em diminuição do tamanho hidrodinâmico das partículas. No entanto, os valores de P ζ indicam baixa estabilidade coloidal, sugerindo tendência à aglomeração. Estudos adicionais são necessários para otimizar o processo de síntese e aprofundar a caracterização físico-química das nanopartículas obtidas.

6.0 Referências Bibliográficas

ABDELHAKIM, H., EL-SAYED, E., RASHIDI, F. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles with antimicrobial, anticancer, antioxidant and photocatalytic activities by the endophytic *Alternaria tenuissima*. **J Appl Microbiol**, v. 128, p. 1634–1646. 2020.

ABDELKADER, D.H., NEGM, W.A., ELEKHNAWY, E. Zinc oxide nanoparticles as potential delivery carrier: green synthesis by *Aspergillus niger* endophytic fungus,

characterization, and in vitro/in vivo antibacterial activity. **Pharmaceuticals**. v. 15, p.1057.2022.

ABDELRAHMAN, S.E.S.A.H., EL HAWARY, S., MOHSEN, E., *et al.* Bio-fabricated zinc oxide nanoparticles mediated by endophytic fungus *Aspergillus* sp. SA17 with antimicrobial and anticancer activities: in vitro supported by in silico studies. **Front Microbiol.** v. 15, p.1366614. 2024.

ABU-TAHON, M.A., GHAREIB, M., ABDALLAH, W.E. Environmentally benign rapid biosynthesis of extracellular gold nanoparticles using *Aspergillus flavus* and their cytotoxic and catalytic activities. **Process Biochem.** v. 95, p. 1–11. 2020.

ADELEKE, B.S., OLOWE, O.M., AYILARA, M.S., *et al.* Biosynthesis of nanoparticles using microorganisms: a focus on endophytic fungi. **Heliyon**. v. 10, p. e39636. 2024.

AGUIAR, A.P., OTTONI, C.A., AQUAROLI, C.L.R., *et al.* Mycogenic silver nanoparticles from *Penicillium citrinum* IB-CLP11 – antimicrobial activity and potential toxicity effects on freshwater organisms. **Environ Sci Nano**. v. 11, p. 2229. 2024.

AHMAD, N., MALIK, M.A., WANI, A.H., *et al.* Biogenic silver nanoparticles from fungal sources: synthesis, characterization, and antifungal potential. **Microb Pathog.** v. 193, p. 106742. 2024.

AHUMADA-RUDOLPH, R., NOVA, M., NOVOA, V., *et al.* Advancing agricultural sustainability: nanoparticles and zeolites for pathogenic fungal control and seed germination. **Food Biosci.** v. 68, p. 106409. 2025.

AL JABRI, H., SALEEM, M.H., RIZWAN, M., *et al.* Zinc oxide nanoparticles and their biosynthesis: overview. **Life (Basel)**. v. 12, p. 594. 2022.

AL-KORDY, H.M.H., SSABRY, S.A., MABROUK, M.E.M. Statistical optimization of experimental parameters for extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticles by a novel haloaliphilic *Alkalibacillus* sp. W7. **Sci Rep**. v. 11, p. 10924. 2021.

ANJUM, S., VYAS, A., SOFI, T.A. Mycogenic fabrication of zinc nanoparticles for antifungal activity against *Alternaria mali*. **Indian J Microbiol.** 2024.

BASHEER, M.A., ABUTALEB, K., ABED, N.N., *et al.* Mycosynthesis of silver nanoparticles using marine fungi and their antimicrobial activity against pathogenic microorganisms. **J Genet Eng Biotechnol.** v. 21, p. 164. 2023.

BECKER, K., STADLER, M. Recent progress in biodiversity research on the Xylariales and their secondary metabolism. **J Antibiot.** v. 74, p. 1–23. 2021

DANIEL, A.I., KEYSTER, M., KLEIN, A. Biogenic zinc oxide nanoparticles: a viable agricultural tool to control plant pathogenic fungi and its potential effects on soil and plants. **Sci Total Environ.** v. 897, p. 165483. 2023.

DIAS, C., AYYANAR, M., AMALRAJ, S., *et al.* Biogenic synthesis of zinc oxide nanoparticles using mushroom fungus *Cordyceps militaris*: characterization and mechanistic insights of therapeutic investigation. **J Drug Deliv Sci Technol.** v. 73, p. 103444. 2022.

ELKADY, F.M., BADR, B.M., SAIED, E., *et al.* Mycosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Mucor racemosus* with their antimicrobial, antibiofilm, anticancer and antioxidant activities. **Sci Rep.** v. 15, p. 18772. 2025.

ELSHAFIE, H.S., OOSMAN, A., EL-SABER, M.M., *et al.* Antifungal activity of green and chemically synthesized ZnO nanoparticles against *Alternaria citri*, the causal agent of citrus black rot. **Plant Pathol J.** v. 39, p. 265–274. 2023.

FOUDA, A., HASSAN, S., SALEM, S.S., *et al.* In vitro cytotoxicity, antibacterial and UV protection properties of biosynthesized zinc oxide nanoparticles for medical textile applications. **Microb Pathog.** v. 125, p. 252–261. 2018.

GALLO, M.B., BADER, A.N., TORRES-NICOLINE, A., *et al.* Proteomic analysis of *Trichoderma harzianum* secretome and its role in the biosynthesis of zinc/iron oxide nanoparticles. **Sci Rep.** v. 15, p. 3252. 2025.

GANESAN, V., HARIRAM, M., VIVEKANANDHAN, S., *et al.* *Periconium* sp. extract mediated sol-gel synthesis of ZnO nanoparticles for antimicrobial and antioxidant applications. **Mater Sci Semicond Process.** v. 105, p. 104739. 2020.

GAO, Y., ANAND, M.A.V., RAMACHANDRAN, V., *et al.* Biofabrication of zinc oxide nanoparticles from *Aspergillus niger*: antioxidant, antimicrobial and anticancer activity. **J Cluster Sci.** v. 30, p. 937–946. 2019.

GARCÍA-QUINTERO, A., PALENCIA, M. Critical analysis of environmental sustainability metrics applied to green synthesis of nanomaterials and assessment of environmental risks associated with nanotechnology. **Sci Total Environ.** v. 793, p. 148524. 2021.

GOTTARDO, S., MECH, A., DRBOHLAVOVÁ, J., *et al.* Towards safe and sustainable innovation in nanotechnology: state-of-play for smart nanomaterials. **NanoImpact.** v. 21, p. 100297. 2021.

HAMIDA, R.S., ALI, M.A., REDWAN, A., *et al.* Cyanobacteria – a promising platform in green nanotechnology: a review on nanoparticles fabrication and their prospective applications. **Int J Nanomedicine.** v. 15, p. 6033–6066. 2020

HAMMAD, S.E., EL-ROUBY, M.N., ABDEL-AZIZ, M.M., *et al.* Endophytic fungi-assisted biomass synthesis of gold and zinc oxide nanoparticles for increasing antibacterial and anticancer activities. **Biomass Convers Biorefin.** v. 15, p. 2285–2302. 2025.

JANA, S., DAS, D., BHATTACHARYYA, S., *et al.* Mycogenic synthesis of silver nanoparticles using endophytic fungi and their characterization and biological activities. **Fungal Biol.** v. 129, p. 101610. 2025.

Karthikeyan B., Velvizhi G. State-of-the-art on the application of nanotechnology for enhanced biohydrogen production. **Int J Hydrogen Energy.** v. 52, p. 536–554. 2024.

KAUR, T., BALA, M., KUMAR, G., *et al.* Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles via endophyte *Trichoderma viride* and evaluation of antimicrobial and antioxidant properties. **Arch Microbiol.** v. 204, p. 620. 2022.

KUMAR, R.V., Vinoth S., Baskar V., *et al.* Synthesis of zinc oxide nanoparticles mediated by *Dictyota dichotoma* endophytic fungi and its photocatalytic degradation of fast green dye. **S Afr J Bot.** v. 151, p. 337–344. 2022.

MAYRHOFFER, B.F., IANTAS, J., NORILER, S.A., *et al.* Highly diverse endophytic fungi from Serra do Amolar-Pantanal producing bioactive secondary metabolites against phytopathogens. **Front Microbiol.** v. 15, p. 1501182. 2024.

MISHRA, D.N., PRASAD, L., SUYAL, U. Synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Trichoderma harzianum* and its bio-efficacy on *Alternaria brassicae*. **Front Microbiol.** v. 16, p. 1506695. 2025.

MOHAMED, A.A., FOUDA, A., ANDEL-RAHMAN, M.A., *et al.* Fungal strain impacts the shape and bioactivity of green synthesized zinc oxide nanoparticles. **Biocatal Agric Biotechnol.** v. 19, p. 101103. 2019.

MURALI, M., GOWTHAM, H.G., SHILPA, N., *et al.* Zinc oxide nanoparticles prepared through microbial mediated synthesis for therapeutic applications. **Front Microbiol.** v. 5, p. 1227951. 2023.

NARENDRA KUMAR, H.K., CHANDRA MOHANA, N., ABHILASH, M.R., *et al.* Biosynthesis of ZnO-NPs from mycoendophyte *Alternaria alternata*. **Inorg Nano-Met Chem.** 2024.

NDABA, B., ROOPNARAIN, A., HARIPRIYA, R.A.M.A., *et al.* Biosynthesized metallic nanoparticles as fertilizers: an emerging precision agriculture strategy. **J Integr Agric.** v. 21, p. 1225–1242. 2022.

NEHRU, L., KANDASAMY, G.D., SEKAR, V., *et al.* Green synthesis of ZnO-NPs using endophytic fungal extract of *Xylaria arbuscula*. **Artif Cells Nanomed Biotechnol.** v. 51, p.318–333. 2023.

NEETHU, S., RADHAKRISHNAN, E.K., JYOTHIS, M. Biofabrication of nanoparticles using fungi. In: **Nanotechnology for Agriculture**. Singapore: Springer.p.53–73. 2019

OKAIYETO, K., GIGLIOBIANCO, M.R., MARTINO, P.D. Biogenic zinc oxide nanoparticles as a promising antibacterial agent: synthesis and characterization. **Int J Mol Sci.** v. 25, p.9500. 2024.

OTTONI, C.A., SIMÕES, M.F., FERNANDES, S., *et al.* Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. **AMB Express.** v. 7, p. 1. 2017.

PARAGUAY-DELGADO, F., HERMIDA-MONTERO, L.A., MORALES-MENDOZA, J.E., *et al.* Photocatalytic properties of Cu-containing ZnO nanoparticles and antifungal activity. **RSC Adv.** v. 12, p. 9898–9908. 2022.

RAJU, P., KANNAIAH, S., DEVI, W.S., *et al.* Mycosynthesis of ZnO-NPs using *Phoma* sp. RDSE17 endophytic fungal extract. **Discover Chem.** v. 2, p.183. 2025.

RANI, S., KUMAR, P., DAHIYA, P., *et al.* Biogenic synthesis of zinc nanoparticles: applications and toxicity prospects. **Front Microbiol.** v. 13, p. 824427. 2022.

REHMAN, F., PAKER, N.P., REHMAN, S., *et al.* Zinc oxide nanoparticles: biogenesis and applications against phytopathogens. **J Plantol.** v. 106, p. 45–65. 2024.

ROCHA, V., FERREIRA-SANTOS, P., AGUIAR, C., *et al.* Valorization of plant by-products in the biosynthesis of silver nanoparticles. **Environ Sci Pollut Res.** v. 31, p. 14191–14207. 2024.

SALEM, S.S. Mini review on green nanotechnology and its development in biological effects. **Arch Microbiol.** v. 205, p. 128. 2023

SANTOS, M.S., SILVA, J.M., BARBIERI, M.B., *et al.* Bionanotechnology and its applications. **Plant Nano Biol.** v. 7, p. 100060. 2024.

SHAHCHERAGHI, N., GOLCHIN, H., SADRI, Z., *et al.* Nano-biotechnology, an applicable approach for sustainable future. **3 Biotech.** v. 12, p. 65. 2022.

SIDHU, A.K., AGRAWAL, S.B., VERMA, N, *et al.* Fungal-mediated synthesis of multimetallic nanoparticles: mechanisms, properties and applications. **Front Nanotechnol.** v. 7. 2025.

SINGH, A., KUMAR, S., SAH, P., *et al.* Impact of biogenic zinc oxide nanoparticles on shelf life and disease management in banana. **BioNanoScience.** v. 15, p.365. 2025.

SINGH, V., PANDIT, C., PANDIT, S., *et al.* Mechanisms and biotechnological implications of nanoparticle synthesis through microbial consortia. **J Basic Microbiol.** v. 64, p. e2400035. 2024.

SUMANTH, B., LAKSHMEESHA, T.R., ANSARI, M.A., *et al.* Mycogenic synthesis of extracellular zinc oxide nanoparticles from *Xylaria acuta*. **Int J Nanomedicine**. v. 15, p. 8519. 2020.

TIBPROMMA, S., ZHANG, L., KARUNARATHNA, S.C., *et al.* Volatile constituents of endophytic fungi isolated from *Aquilaria sinensis*. **Life (Basel)**. v. 11, p. 363. 2021

ZAINAB, S., JADOON, M., SIKANDAR, S., *et al.* *Thermomyces lanuginosus*: thermophilic fungus for green synthesis and stabilization of bioAgNPs. **Mater Chem Phys**. v. 297, p. 127442. 2023.

ZAKI, S.A., OUF, S.A., ALBARAKATY, F.M., *et al.* *Trichoderma harzianum*-mediated ZnO nanoparticles: a green tool for controlling soil-borne pathogens in cotton. **J Fungi**. v. 7, p. 952. 2021.

ZHANG, S., SHI, G., XU, X., *et al.* Global analysis of natural products biosynthetic diversity encoded in fungal genomes. **J Fungi**. v. 10, p. 653. 2024

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: STELLA DANIELS KOVACS

Título: "Nanotecnologia verde: Utilização de fungos endofíticos de mangue na síntese de nanopartículas de óxido de zinco e otimização do processo"

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Gerenciamento Costeiro

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni	<i>Aprovada</i>
Dra. Roberta Alves Merguizo Chinellato	<i>Aprovada</i>
MSC. Arthur Pérez Aguiar	<i>Aprovada</i>

PARECER:

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Stella Daniels Kovacs** obteve o seguinte conceito:

☒ APROVADO

☐ REPROVADO

São Vicente, 26 de maio de 2026.

Cristiane Angélica Ottoni
Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Roberta Alves Merguizo Chinellato
Dra. Roberta Alves Merguizo Chinellato

Arthur Pérez Aguiar
MSC. Arthur Pérez Aguiar