

**Análise dos efeitos antimicrobianos e  
ecotoxicológicos de nanopartículas fúngicas de  
ouro sobre bactérias**

**Caterina do Valle Trotta**

**SÃO VICENTE**  
**2022**

# **Análise dos efeitos antimicrobianos e ecotoxicológicos de nanopartículas fúngicas de ouro sobre bactérias**

**Caterina do Valle Trotta**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Angélica Ottoni**

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

**SÃO VICENTE  
2022**

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha mãe, meu pai, meus irmãos e minha avó por tudo, por sempre me acolherem e apoiarem nas minhas decisões e questões da vida,  
À Carolina que sempre me apoiou e incentivou,  
À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Angélica Ottoni por ter me apoiado e orientado durante esse período,  
À minha família e amigos de fora da área por me perguntarem sempre como funcionam as coisas que faço, me ajudando a conseguir passar as informações científicas de uma forma mais acessível,  
Aos meus amigos e amigas que estiveram por perto me mantendo sã e estável emocionalmente durante todo o período de faculdade,  
À Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho (UNESP) por me proporcionar a infraestrutura para meu experimento,  
Agradeço ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) da Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP, pelo auxílio financeiro,  
Ao IEAMar pela infraestrutura e oportunidade de aprendizado,  
Ao Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de São Paulo (IPT) pelas bactérias cedidas,  
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.

T858a Trotta, Caterina do Valle  
Análise dos efeitos antimicrobianos e ecotoxicológicos de nanopartículas fúngicas de ouro sobre bactérias / Caterina do Valle Trotta. -- São Vicente, 2022  
24 p. : il., tabs.

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 ouro. 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.

## Resumo

As nanopartículas de ouro (AuNPs) têm atraído enorme interesse científico e tecnológico devido à sua facilidade de síntese, apresentam propriedades distintas além das decorrentes de seu tamanho reduzido, apresentando aplicações como na construção de biossensores, no tratamento e diagnóstico de câncer, além de agir como agentes antimicrobianos. Métodos químicos e físicos são usados para sintetizar NPs; no entanto, os métodos biológicos são preferidos devido às suas fontes ecológicas, sendo a síntese verde de nanopartículas (NPs) uma ferramenta promissora e inovadora na bionanotecnologia. Os fungos filamentosos (Ffs) recebem destaque na literatura pela obtenção de nanopartículas metálicas por conta da diversidade, sendo considerados os mais promissores. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana da bionanopartícula AuNP em suspensão sobre as bactérias *Escherichia coli* IPT245, *Pseudomonas aeruginosa* IPT236 e *Staphylococcus aureus* IPT246 e potenciais efeitos tóxicos sobre microalga marinha *Chlorella minutissima* e microalga de água doce *Chlorella fusca*. A AuNP foi caracterizada por espectrofotometria UV-vis, 'Dynamic Light Scattering' (DLS) e Índice de polidispersão (PDI) e a atividade antimicrobiana 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. Em síntese, a AuNP em suspensão não apresentou atividade antibacteriana em nenhuma das concentrações em que as bactérias patogênicas foram expostas. Em contrapartida, a AuNP encapsulada com quitosana-alginato obteve atividade antibacteriana sobre a bactéria gram-negativa *E. coli* IPT245, e de acordo com os resultados do teste de densidade celular com as microalgas *C. minutissima* e *C. fusca*, pode-se dizer que o uso das AuNPs em meio aquático pode ser considerado um risco ambiental, portanto, o resíduo e descarte gerado deve ser devidamente encaminhado. Tendo em vista os resultados obtidos, a biossíntese ainda necessita ser otimizada, explorando principalmente fatores que influenciam no tamanho e tempo de obtenção do nanomaterial de estudo.

**Palavras-chave:** Fungo filamentoso, nanopartícula de ouro, imobilização, *Escherichia coli*, *Chlorella sp.*

## Sumário

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introdução</b>                                                                            | <b>7</b>  |
| <b>Objetivos</b>                                                                             | <b>10</b> |
| <b>Materiais e Métodos</b>                                                                   | <b>10</b> |
| Fungos                                                                                       | 10        |
| Biossíntese da nanopartícula biológica                                                       | 10        |
| Caracterização das nanopartículas metálicas                                                  | 11        |
| UV-Vis                                                                                       | 11        |
| Análise de tamanho de partícula, distribuição e carga das nanopartículas metálicas           | 11        |
| Ação antimicrobiana de bionanopartículas                                                     | 11        |
| Determinação de Concentração Inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) | 11        |
| Imobilização de bionanopartículas                                                            | 12        |
| Ação antimicrobiana de bionanopartículas imobilizadas                                        | 12        |
| Análise ecotoxicológica                                                                      | 12        |
| Ensaio de fitotoxicidade com <i>Chlorella</i> sp.                                            | 12        |
| Densidade celular                                                                            | 12        |
| <b>Resultados e Discussão</b>                                                                | <b>13</b> |
| Biossíntese e caracterização de nanopartículas de ouro                                       | 13        |
| Ação antimicrobiana de bionanopartículas                                                     | 14        |
| Determinação de Concentração Inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) | 14        |
| Ação antimicrobiana de bionanopartículas imobilizadas                                        | 15        |
| Análise ecotoxicológica                                                                      | 16        |
| <i>Chlorella minutissima</i>                                                                 | 17        |
| <i>Chlorella fusca</i>                                                                       | 18        |
| <b>Conclusão</b>                                                                             | <b>19</b> |
| <b>Referências</b>                                                                           | <b>20</b> |

## 1. Introdução

A nanotecnologia está associada a diversas áreas além da biologia, como medicina, física, química, e engenharia de materiais, sendo o estudo de manipulação da matéria em escala atômica e molecular, incluindo as nanopartículas, substâncias particuladas que abrangem o tamanho de 0 a 100 nanômetros e que contém de 20 a 15.000 átomos, sendo parte importante da nanociência [1-4].

Além disso, a nanotecnologia traz um grande interesse econômico pelo uso das nanopartículas, como por exemplo nanopartícula de prata (AgNP), nanopartícula de ouro (AuNP) e nanopartícula de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>NP), que possuem ação antimicrobiana comprovada para o tratamento de infecções bacterianas como uma alternativa aos antibióticos [5], sendo ainda um campo pouco explorado e muito promissor [6].

As nanopartículas de ouro (AuNPs) podem ter uma variedade de tamanhos, e com estabilidade e biocompatibilidade, foram inicialmente utilizadas como sistema de entrega de drogas, além disso podem transportar peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos para terapia gênica por conta da afinidade de ligação às biomoléculas [7]. AuNPs têm atraído enorme interesse científico e tecnológico devido à sua facilidade de síntese [8]. Apresentam propriedades distintas além das decorrentes de seu tamanho reduzido, como as propriedades ópticas, eletrônicas, magnéticas e catalíticas. Sendo assim, a AuNP possui aplicações como na construção de biossensores, em sistema de liberação gradativa de drogas, lubrificantes, células solares, catálise, bioimagem, antioxidante e no tratamento e diagnóstico de câncer, além de agir como agentes antimicrobianos. Entretanto, AuNPs são termodinamicamente instáveis e tendem a coalescer, formando agregados de tamanhos maiores os quais resultam na perda de suas propriedades [9-11].

As AuNPs de tamanho de 1,5 a 10 nm são geralmente sintetizadas por tratamento químico e utilizadas para aplicações biomédicas, na imagem de tecidos por exemplo, além de serem utilizadas para tratamento de fibras de lã ou algodão trazendo uma coloração permanente de têxteis de valor econômico e industrial [12, 13]. As aplicações das nanopartículas de ouro são muito variadas, podendo também serem usadas na purificação de água e controle de poluição [14], além de componentes para cremes antienvelhecimento [15], desta forma, a quantidade de AuNPs consumidas anualmente é incerta, mas estima-se que seja em torno de 3 toneladas métricas, sendo assim muito utilizada na indústria [16].

A síntese verde de nanopartículas (NPs) usando células vivas é uma ferramenta promissora e inovadora na bionanotecnologia. Métodos químicos e físicos são usados para sintetizar NPs; no entanto, os métodos biológicos são preferidos devido às suas fontes ecológicas, limpas, seguras, econômicas, fáceis e eficazes de alta produtividade e pureza [17]. A biossíntese pode ser realizada através de microrganismos como bactérias e fungos filamentosos, tornando assim o processo menos tóxico, sendo que poucos microrganismos foram testados para a produção de AuNPs, e menos de 30 espécies de fungos utilizadas apesar da grande capacidade biossintética de AuNP por bactérias e fungos, que sugere a redução de Au<sup>3+</sup> formando nanoconjugados de proteínas metálicas como uma resposta comum ao estresse tóxico, em que as enzimas necessárias estão prontamente disponíveis nesses microrganismos ambientais [18].

Além dos fungos filamentosos e bactérias, plantas, algas, leveduras, actinomicetos e vírus também possuem a capacidade de sintetizar diferentes tipos de

nanopartículas, uma forma de síntese que possui cada vez mais importância por ter um menor custo e serem mais ambientalmente benignos comparada com a síntese de nanopartículas sintéticas [19].

Desta forma, a biossíntese de nanomateriais é cada vez mais visada por ter a facilidade de redução dos seus sais à temperatura ambiente, econômica e não tóxica. Sendo um ótimo método de produção em grande escala, além de como já citado ambientalmente benigno e biocompatível [9].

Os fungos filamentosos recebem destaque na literatura pela obtenção de nanopartículas metálicas por conta da diversidade, são melhores agentes biogênicos além de secretarem enzimas extracelulares eficazes na biossíntese [20], e possuem capacidade de produzir maiores concentrações de proteínas, que auxiliam na redução de íons metálicos para formas menos tóxicas [2]. Ademais, o cultivo em laboratório e controle de crescimento é mais fácil, tendo assim escala de produção com potencial de ampliação [20].

Há uma maior dificuldade de caracterização dos fungos e das nanopartículas que eles produzem e acabam os tornando menos estudados em comparação aos demais microrganismos que também possuem a característica de biossíntese de nanopartículas, como por exemplo, dificuldades financeiras em conseguir equipamentos e técnicas complexas de caracterização de fungos. Apesar disso, os fungos possuem vantagens sobre as bactérias no bioprocessamento como a possibilidade de biossíntese de AuNPs, por secretar uma grande quantidade de enzimas extracelulares os tornando melhores candidatos para a síntese verde de AuNPs [18]. Consideradas como alternativa aos antibióticos as nanopartículas podem prevenir a resistência microbiana aos medicamentos [21], as nanopartículas de ouro, AuNPs, são facilmente sintetizadas, possuindo um efeito bactericida comprovado e que de acordo com estudos a nanopartícula induz a formação de vesículas que produzem orifícios na membrana da bactéria *Escherichia coli*, em contrapartida na bactéria *Staphylococcus aureus*, tendem a aumentar a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares, assim as AuNPs se ligam e inibem a transcrição [22]. A atividade antibacteriana e efeito antifúngico são influenciados por diversos parâmetros como a forma, o tamanho e a área da superfície da nanopartícula [21]. As AuNPs já mostraram resultados promissores de efeitos antimicrobianos, com ótimos resultados de inibição devido às suas características de tamanho e carga [5, 23]. Em contraponto, de acordo com o estudo de Zhang *et al.* (2015) as nanopartículas de ouro não possuem ação antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* na faixa de tamanho de 20-30 nm [23].

As AuNPs possuem propriedades físico-químicas que as tornam eficientes veículos de entrega de fármacos, aumentando assim a atividade antimicrobiana em conjunto com outras moléculas. Desta forma, a nanopartícula de ouro sintética possui uma melhora na eficiência antimicrobiana de antibióticos lidando até com bactérias resistentes [23]. Como exemplo, as AuNPs reduzidas pelo antibiótico cefaclor, possui uma alta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas *S. aureus* e Gram-negativas *E. coli* comparado com a mesma substância ou nanopartícula de ouro separadamente [24]. Quanto aos efeitos em bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas, as bactérias Gram-negativas se demonstraram mais sensíveis à desinfecção fotocatalítica do que as bactérias Gram-positivas em estudo com TiO<sub>2</sub>NP [25].

Em relação aos estudos de ecotoxicologia de nanomateriais, as microalgas do gênero *Chlorella* são muito utilizadas para experimentos de fitotoxicidade por terem um cultivo mais rápido em laboratório e apresentarem grande produtividade celular, sendo as espécies *C. minutissima* e *C. vulgaris* as mais frequentemente vistas e estudadas, possuindo grande valor econômico [26]. Além disso, elas são importantes indicadores biológicos para a detecção de nutrientes e substâncias tóxicas. Contudo, as microalgas podem reduzir o efeito estufa absorvendo CO<sub>2</sub> dos processos de queima de combustíveis fósseis e de práticas agrícolas como a queima podendo também produzir biocombustíveis (como o biodiesel) [27]. A remoção do gás carbônico da atmosfera se deve em parte pelas microalgas que apesar de retirarem o CO<sub>2</sub> apenas durante o dia, à noite, parte dele é transportado para as profundezas do oceano para a recirculação do carbono nas cadeias alimentares, desta forma são responsáveis por mais de 50% da fotossíntese do planeta, e por estarem em contato direto com a coluna d'água ou sedimentos são muito sensíveis a contaminação além de possuírem ciclo de vida curtos [28].

As microalgas são microrganismos que podem ser encontrados em ambientes aquáticos, dulcícolas ou marinhos, e no solo, possuem clorofila e demais pigmentos fotossintéticos. São microrganismos muito utilizados em laboratório por conta da importância na base da cadeia alimentar, já que servem como alimento para peixes, pós-larvas de organismos aquáticos, moluscos e crustáceos, além disso, possuem facilidade no cultivo, com alto e rápido crescimento [27, 29].

Os impactos dos nanomateriais em ecossistemas aquáticos por conta do desenvolvimento das indústrias que levam à soltura de nanopartículas de óxidos metálicos nesses ecossistemas ainda precisam ser melhor estudados [30]. Apesar da ecotoxicologia ser uma ciência inquestionável, para entender o destino, comportamento e toxicidade ambiental de nanopartículas, é preciso uma maior integração entre ambientalistas, químicos e físicos [16]. Contudo, por serem parte da base da cadeia trófica, os produtores primários microscópicos ao serem expostos a poluentes tendem a afetar o restante do ecossistema, e sendo organismos unicelulares, as microalgas possuem danos inteiramente, afetando assim todo indivíduo [16].

O estresse tóxico causado pela presença de nanopartículas metálicas em ambientes aquáticos sobre as microalgas pode afetar a fisiologia celular desse microrganismo, porém algumas NPs são mais tóxicas que outras, já que dependem o tamanho e metal precursor para definir sua toxicidade além das diferenças da sensibilidade entre as espécies e habitats das microalgas [28].

Em síntese, a bioacumulação na cadeia trófica aquática é muito preocupante, resíduos orgânicos e nanomateriais como óxidos metálicos podem causar danos na fisiologia, comportamento e reprodução de organismos aquáticos, por esses resíduos serem despejados no ecossistema aquático tendo assim um acúmulo na cadeia alimentar desses organismos, e, contudo em sua maioria são resíduos de origem antropológica [31].

De acordo com o estudo de Moreno-Garrido *et al.* [16], a toxicidade das AuNPs pode ocorrer pela liberação de íons metálicos livres no ambiente aquático. Muito embora, o ouro seja referenciado como um metal de baixa toxicidade, estudos com o material em nanoescala devem ser explorados em diferentes organismos.

## 2. Objetivos

Avaliar a atividade antimicrobiana da bionanopartícula AuNP em suspensão e imobilizada sobre as bactérias *Escherichia coli* IPT245, *Pseudomonas aeruginosa* IPT236 e *Staphylococcus aureus* IPT246 e potenciais efeitos tóxicos sobre microalga marinha *Chlorella minutissima* e microalga de água doce *Chlorella fusca*.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Fungos

Os fungos marinhos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e outros encaminhados para identificação a nível de espécie, Margem Q3 Sedimento (IBCLP1212), Apicum Q3 Sedimento (IBCLP1213), Margem Q1 Solo (IBCLP1214), Margem Q1 Solo B (IBCLP1215), Margem Q1 Solo V (IBCLP1216), Margem Q1 Solo D (IBCLP1217) e Apicum Q4 Sedimento (IBCLP1218), utilizados na biossíntese foram isolados de sedimentos de manguezal e apicum da Estação Ecológica de Juréia-Itatins coletados em 2019 e mantidos na 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).

O fungo *Rhizopus arrhizus* IPT1011 foi cedido pela Coleção de Cultura do Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de São Paulo (IPT) e, também, utilizado no estudo.

A manutenção da viabilidade desses microrganismos foi realizada em placas de Extrato de Malte e Agar (MEA) 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.

Os fungos foram testados de forma individualizada. Foi feita a caracterização a partir das técnicas de Espectrofotometria de luz (UV-Vis), Potencial Zeta e Índice de Polidispersão (PDI).

### 3.2. Biossíntese da nanopartícula biológica

Foram testadas oito linhagens de fungos para biossíntese das nanopartículas de ouro. Para cada linhagem foram inseridos 5 discos de 6 mm em um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio Methylglucose lipopolysaccharide (MGLP líquido). Estes frascos Erlenmeyer foram incubados por um período de 72 horas à temperatura de 30°C e agitação de 180 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 250 mL preenchido com 100 mL de água deionizada estéril, permanecendo à temperatura de 30°C e agitação de 180 rpm por um período de 72 horas. Após este período, a biomassa foi separada novamente por filtração em papel filtro Whatman N°1 e, ao filtrado foi adicionada uma solução de concentração de ouro, feita a partir do precursor químico ácido tetracloroáurico(III) tri-hidratado 99% ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ), 1 mM, em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, que permaneceu à temperatura de 30°C e agitação de 180 rpm, por um período de 72 horas. Para o controle, o mesmo procedimento foi adotado, contudo, a biomassa foi autoclavada após crescimento em MGLP líquido.

### **3.3. Caracterização das nanopartículas metálicas**

#### **3.3.1. 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.

#### **3.3.2. Análise de tamanho de partícula, distribuição e carga das nanopartículas metálicas**

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

### **3.4. Ação antimicrobiana de bionanopartículas**

#### **3.4.1. 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 1 e 12 continham 200 µL de água destilada, para evitar qualquer contato externo com a placa. As colunas 1 a 11 continham 150 µL de meio de cultura Trypticase Soy Broth (TSB). A coluna 3 continha 20 µL de meio de cultura, além dos 150 µL, para manter todos os poços com a mesma quantidade total de µL, total final em cada poço de 200 µL. Em todas as colunas continham 20 µL do inóculo. As colunas 2 e 4 a 11 continham 20 µL da bionanopartícula AuNP, ou seu metal precursor,  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ , nas concentrações compreendidas entre 2 a 200 µg/mL (2; 5; 10; 20; 50; 75; 100; 200). E as colunas 2 e 3 foram utilizadas como controle positivo, com 20 µL da solução de  $\text{AgNO}_3$  e controle negativo respectivamente. Um volume de 10 µL de solução de Resazurina a 0,01% foi adicionado a todos os poços. O tempo de incubação total foi de 48 horas a 37°C e o teste foi realizado em triplicata, após 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 µL 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 horas. 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.

### 3.5. Imobilização de bionanopartículas

As microcápsulas foram obtidas por gelificação ionotrópica com alginato de sódio de acordo com Pereira *et al.* [35, 36]. A solução do biopolímero foi preparada solubilizando 3,1% (p/v) de alginato de sódio em 10mL de NP biológica. Posteriormente, a solução de biopolímero (10mL) foi gotejada em 100mL de uma solução aquosa de cloreto de cálcio (0,14M) e 0,2% (p/v) de quitosana usando uma seringa de infusão intravenosa de 20mL 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. 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 *E. coli* IPT245 na concentração de  $1,0 \times 10^7$  UFC e 0,5-3,0 g de bionanopartícula imobilizada. Os frascos foram acondicionados em plataforma agitada a 180 rpm e 37°C por 2 dias. Uma solução de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  foi utilizada como controle positivo, pois foram realizados outros testes no laboratório MICOBIONANOTEC e comprovada ação antibacteriana da solução de  $\text{AgNO}_3$ . E como controle negativo foi utilizada água estéril. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.7. Análise ecotoxicológica

#### 3.7.1. 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 (IOUSP). A renovação e manutenção da cultura foi realizada utilizando o meio de cultura líquido Bold Basal para microalga dulcícola e meio Guillard 35% para microalga marinha, sob condições controladas de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 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 horas. Diariamente, ocorreu contagem celular com o auxílio de uma Câmara de Neubauer para a construção da curva de crescimento e determinação da fase exponencial.

#### 3.7.2. Densidade celular

Os testes de inibição de densidade celular foram realizados em placas de 96 poços, onde as colunas 1 e 12 continham 200  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril para evitar a evaporação e contaminação dos poços, as colunas 4 a 11, continham 170  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  nanomaterial, AuNP, ou seu metal precursor  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ , nas concentrações compreendidas entre 2 a 200  $\mu\text{g/mL}$ . E as colunas 2 e 3 foram utilizadas como controle positivo, com 20  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{AgNO}_3$ , e controle negativo respectivamente.

A resposta tóxica foi avaliada em 24, 48, 72 e 96 horas, após exposição por meio da densidade óptica das microalgas em um espectrofotômetro UV-Vis. A absorbância espectrofotométrica foi medida no comprimento de onda de 670 nm [37, 38] possibilitando acompanhar o crescimento da microalga durante o experimento. A incubação total decorreu em um período de 96 horas, mantendo a temperatura  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . O teste foi realizado em triplicata.

#### 4. Resultados e Discussão

##### 4.1. Biossíntese e caracterização de nanopartículas de ouro

Foram testados oito fungos para formação de nanopartículas de ouro (AuNP). Dentre eles, apenas dois apresentaram coloração arroxeada (IPT1011 e IBCLP1212), logo, apenas estes foram levados para caracterização das nanopartículas por DLS (Tabela 1).

A coloração da nanopartícula de ouro varia de acordo com seu diâmetro médio, podendo ser apresentadas colorações de rosa até roxo [13]. Os fungos, IBCLP1213, IBCLP1214, IBCLP1215 e IBCLP1216 não apresentaram mudança de cor, sugerindo que não houve produção de nanopartículas de ouro. Os fungos IBCLP1217 e IBCLP1218 apresentaram mudança de coloração, porém o fungo IBCLP1217 precipitou antes de conseguir uma data para caracterização e o fungo IBCLP1218 contaminou no transporte para caracterização.

**Tabela 1.** Linhagens fúngicas utilizadas e caracterização das nanopartículas de ouro.

| Fungo                            | DLS (nm)                       | PDI   |
|----------------------------------|--------------------------------|-------|
| IPT1011                          | 98,48                          | 0,330 |
| Margem Q3 Sedimento<br>IBCLP1212 | 248,30                         | 0,669 |
| Apicum Q3 Sedimento<br>IBCLP1213 | não formou - não caracterizado |       |
| Margem Q1 Solo<br>IBCLP1214      | não formou - não caracterizado |       |
| Margem Q1 Solo B<br>IBCLP1215    | não formou - não caracterizado |       |
| Margem Q1 Solo V<br>IBCLP1216    | não formou - não caracterizado |       |
| Margem Q1 Solo D<br>IBCLP1217    | formou - não caracterizado     |       |
| Apicum Q4 Sedimento<br>IBCLP1218 | formou - não caracterizado     |       |

As nanopartículas de ouro apresentaram índice de polidispersão (PDI) relativamente baixo (Tabela 1). A linhagem IPT1011 apresentou o menor tamanho, 98,48 nm, sendo assim selecionada para os demais estudos propostos no presente projeto.

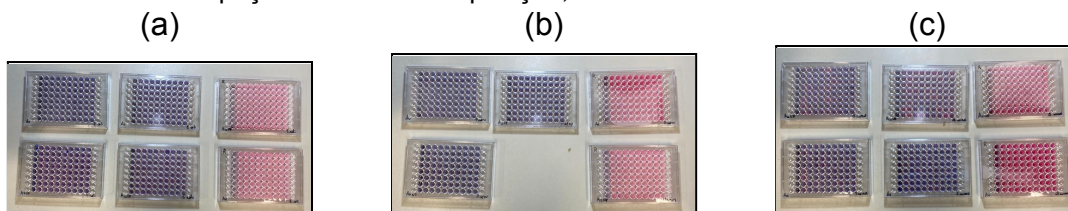
## 4.2. Ação antimicrobiana de bionanopartículas

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

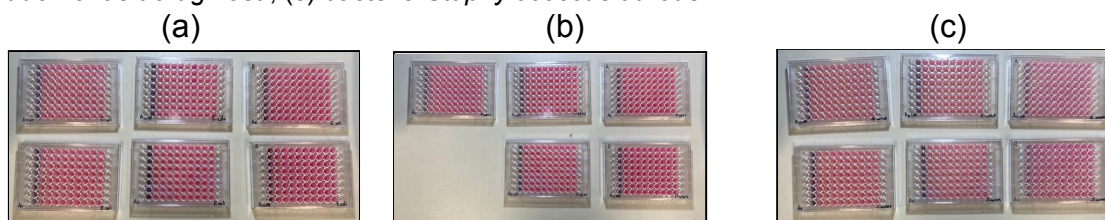
Foi realizado um teste antimicrobiano (Fig 1, 2 e 3), em que as três bactérias patogênicas, *Escherichia coli* IPT245, *P. aeruginosa* IPT236 e *S. aureus* IPT246, com concentrações ajustadas a  $1,0 \times 10^5$  UFC, foram expostas à bionanopartícula AuNP IPT1011 com o tamanho de partículas de 98,48 nm, determinado após caracterização, além de serem expostas ao seu metal precursor,  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ , nas concentrações de 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200  $\mu\text{g/mL}$  por um período de 48 horas a  $37^\circ\text{C}$ . 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 está ocorrendo respiração celular, já que o corante reage com o oxigênio ( $\text{O}_2$ ) [39].



**Figura 1.** Placas de 96 poços no início da exposição, hora 0.

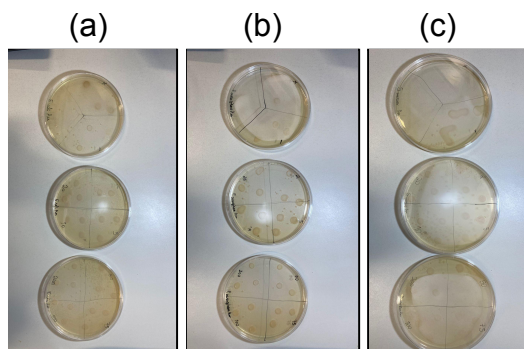


**Figura 2.** Placas de 96 poços após 24 horas de exposição (a) bactéria *Escherichia coli*; (b) bactéria *Pseudomonas aeruginosa*; (c) bactéria *Staphylococcus aureus*.



**Figura 3.** Placas de 96 poços após 48 horas de exposição (a) bactéria *Escherichia coli*; (b) bactéria *Pseudomonas aeruginosa*; (c) bactéria *Staphylococcus aureus*.

O teste de concentração bactericida mínima (CBM), foi realizado após as 48 horas de exposição ao nanomaterial biológico e ao seu metal precursor. Porém, conforme o resultado apresentado pelo teste CIM, após 24 horas se observou o crescimento das colônias bacterianas nas placas de meio TSA, confirmando a inatividade antibacteriana da nanopartícula de AuNP (IPT1011) no tamanho de 98,48 nm (Figura 4).



**Figura 4.** Placas de Petri após 48 horas de exposição ao metal precursor (a) bactéria *Escherichia coli*; (b) bactéria *Pseudomonas aeruginosa*; (c) bactéria *Staphylococcus aureus*.

Em alguns artigos as AuNPs não mostraram efeito antibacteriano independente da concentração, alegando que atividade antibacteriana não consiste nas características das AuNPs [40, 41].

No entanto, existem artigos mais recentes que demonstram toxicidade de AuNPs para bactérias Gram-negativas como *E. coli* [16, 42, 43] e *S. epidermidis* [44], tendo causas diferentes, por exemplo, enfraquecendo as membranas e causando respostas de choque térmico, no caso de Moreno-Garrido *et al.* [16]; e para Cui *et al.* [42] as AuNPs exercem sua ação antibacteriana principalmente de duas maneiras, uma indicando um declínio geral no metabolismo, outra indicando um colapso do processo biológico. Além disso, estudos com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas mostraram forte atividade antibacteriana de AuNPs [43, 45], contudo seus tamanhos são menores que a apresentada neste trabalho, em torno de 50 nm [44-46] e 2 a 10 nm [43]; Basiratnia *et al.* [46] sugeriram que a atividade ocorreu devido à adsorção e penetração das AuNPs nas células.

Já no estudo de Hernández-Sierra *et al.* [47] com AuNP de 80 nm contra *S. aureus*, as AuNPs mostraram atividade antibacteriana apenas em uma concentração muito alta, de 197 µg/mL, este estudo tem o tamanho e concentração mais próximo do trabalho atual e resultado semelhante, pois concentrações menores que 197 µg/mL não tiveram antibacteriana, neste caso não houve atividade antibacteriana, visto que a AuNP em questão tem o tamanho de 98,48 nm.

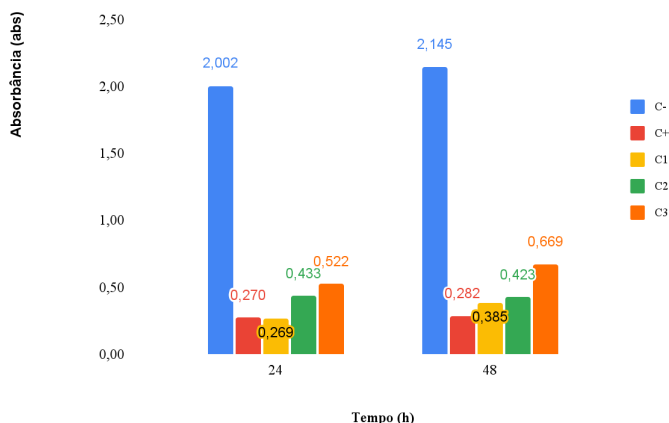
Em todos os artigos mencionados previamente os testes utilizados seguiram o método Kirby-Bauer [48], de difusão em disco. O atual trabalho não foi feito de acordo com esse método, por fazer parte de um projeto maior que pretende ver os efeitos antibacterianos no meio aquático, portanto a aplicação das AuNPs em placas de 96 poços. Talvez, por esse motivo, os resultados antibacterianos foram de encontro aos estudos que não houveram atividade, apesar de ter maior exatidão quando feito em placas de 96 poços.

#### **4.3. Ação antimicrobiana de bionanopartículas imobilizadas**

Existe ainda o questionamento das AuNPs serem mais eficazes contra bactérias Gram-negativas devido à fina camada de peptidoglicano na parede celular [49]. Portanto, o teste foi realizado com a bactéria patogênica Gram-negativa, *Escherichia coli* IPT245, microrganismo que já resultou em sérios problemas de saúde pública e perdas econômicas [50, 51], na concentração celular de  $1,0 \times 10^7$  UFC e com as concentrações, 0,5 g; 1,0 g e 3,0 g de bionanopartícula AuNP IPT1011 imobilizada com microcápsulas de quitosana-alginato. Cada concentração e os controles,

positivo, com a solução de 10 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ , 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 horas após exposição à bionanopartícula imobilizada, por meio da densidade óptica da bactéria em um espectrofotômetro UV-Vis. A absorvância espectrofotométrica foi medida no comprimento de onda de 600 nm (Figura 5).



**Figura 5.** Ação antibacteriana de AuNP encapsulada contra *E. coli* IPT245. Gráfico de absorvância (abs) por tempo (h) da bactéria *E. coli* exposta a nanopartícula biológica AuNP encapsulada, em que C+ (controle positivo), C- (controle negativo), C1 (0,5g), C2 (1g) e C3 (3g).

Em 24 horas, as concentrações C1, C2 e C3 apresentaram absorvância de aproximadamente 20% do valor do controle negativo, sendo respectivamente, 13,5%, 21,5% e 26%. O controle positivo apresentou absorvância de 13% do valor do controle negativo. Em 48 horas, as concentrações C1, C2 e C3 apresentaram absorvância de aproximadamente 24% do valor do controle negativo, sendo respectivamente, 19%, 21,5% e 33%. O controle positivo apresentou absorvância de 14% do valor do controle negativo. O valor em 24h e 48h não alterou significativamente em nenhuma das concentrações.

Pode-se afirmar com esse teste que as concentrações testadas se assemelham ao controle positivo, havendo atividade antibacteriana tal qual a solução de 10 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ .

Não foi feito um estudo prévio sobre a nanocápsula de quitosana-alginato, porém, de acordo com a literatura, esta possui baixa toxicidade e não tem atividade antibacteriana [52], apesar disso há um estudo com o nanoencapsulamento que demonstra ter ocorrido uma alteração no tamanho da nanopartícula biológica, ocasionando sua redução, aumentando a eficiência da nanopartícula [53], logo tal resultado pode ter ocorrido no experimento em questão.

#### 4.4. Análise ecotoxicológica

Previamente ao teste de densidade celular, foram feitas as curvas de crescimento das microalgas *Chlorella minutissima* e *Chlorella fusca*, para 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].

As espécies foram colocadas na plataforma agitadora, 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 horas 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 *C. minutissima* teve o maior crescimento (exponencial), sexto dia, já a espécie *C. fusca* teve seu maior crescimento no oitavo dia, desta forma as concentrações ideais são encontradas no quinto e sétimo dia respectivamente, estando de acordo com demais estudos [26, 38, 54, 55].

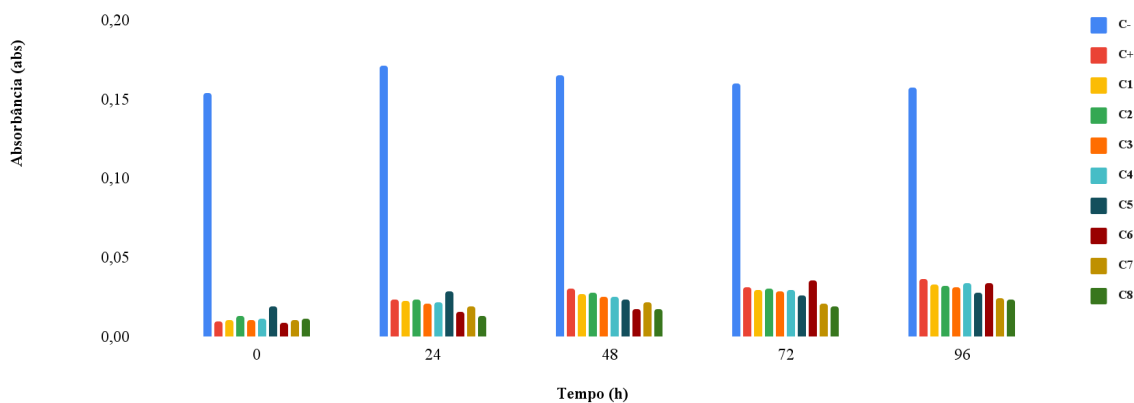
A interação entre as NPs e as microalgas é incerta, sendo o fator de crescimento e densidade celular o mais monitorado na literatura [56]. Com isso, foi feita a análise dos gráficos apresentados abaixo (Figuras 6, 7, 8 e 9), onde é possível afirmar que a maioria das concentrações da nanopartícula biológica AuNP e do metal precursor,  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ , sob as duas espécies de microalgas, *C. minutissima* e *C. fusca*, pelo período de 96 horas, apresentaram efeito inibitório no crescimento celular, 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 [57].

#### 4.4.1. *Chlorella minutissima*

Os testes de inibição de densidade celular foram realizados em placas de 96 poços e a resposta tóxica nas concentrações de 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100; e 200  $\mu\text{g/mL}$ , foi avaliada em 24, 48, 72 e 96 horas, após exposição por meio da densidade óptica das microalgas em um espectrofotômetro UV-Vis. O gráfico foi gerado pelo Excel após cálculo da média dos valores obtidos em triplicata.

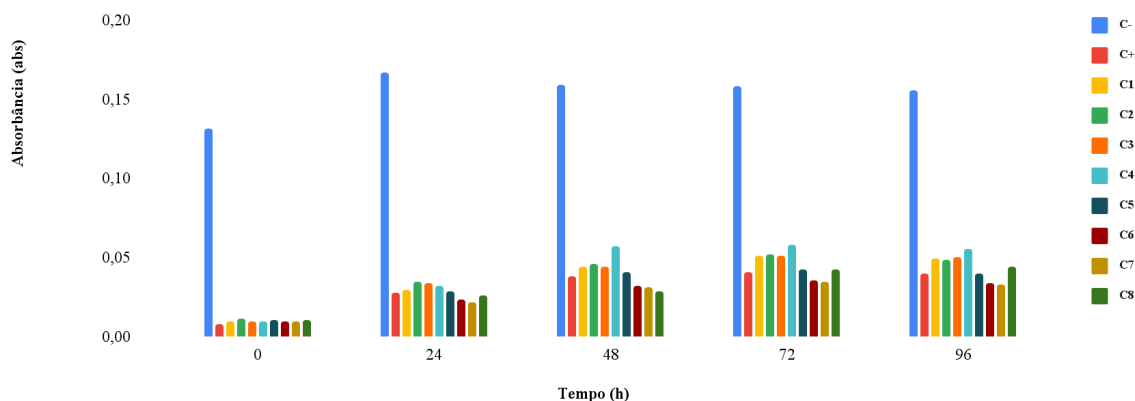
Para cada gráfico, a absorbância de  $0,140 \pm 0,03$ ; corresponde à concentração celular de  $1 \times 10^4 \text{ cel } \mu\text{L}^{-1}$ , nas figuras 6 e 7.

Com base nas figuras 6 e 7, pode-se dizer que a microalga *C. minutissima* apresentou inibição da densidade celular em todas as concentrações testadas, tanto pela nanopartícula biológica AuNP, quanto pelo metal precursor  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ , tendo valores de absorbância sem diferença significativa do controle positivo.



**Figura 6.** Fitotoxicidade de *Chlorella minutissima* exposta a nanopartícula biológica AuNP. Gráfico de absorbância (abs) por tempo (h) da microalga *Chlorella minutissima* exposta a nanopartícula biológica AuNP, onde C+ (controle positivo), C- (controle negativo), C1 (2,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C2 (5,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C3 (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C4 (25,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C5 (50,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C6 (75,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C7 (100,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C8 (200,0  $\mu\text{g/mL}$ ).

Câmpus do Litoral Paulista (CLP) - Unidade do Litoral Paulista Praça Infante D. Henrique s/nº - CEP 11330-900 - São Vicente (SP) - Brasil Tel. (13) 3569-7100 - Fax (13) 3569-7146 - [coordenadoria@clp.unesp.br](mailto:coordenadoria@clp.unesp.br)



**Figura 7.** Fitotoxicidade de *Chlorella minutissima* exposta ao metal precursor  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ . Gráfico de absorbância (abs) por tempo (h) da microalga *Chlorella minutissima* exposta ao metal precursor  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ , onde C+ (controle positivo), C- (controle negativo), C1 (2,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C2 (5,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C3 (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C4 (25,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C5 (50,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C6 (75,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C7 (100,0  $\mu\text{g/mL}$ ), C8 (200,0  $\mu\text{g/mL}$ ).

A toxicidade de NPs tem sido mais associada à redução de tamanho e agregação celular [30, 58], e os efeitos na espécie *Chlorella* têm como pretexto o fato de serem unicelulares e, portanto, mais propensas aos efeitos deletérios das NPs. [59]

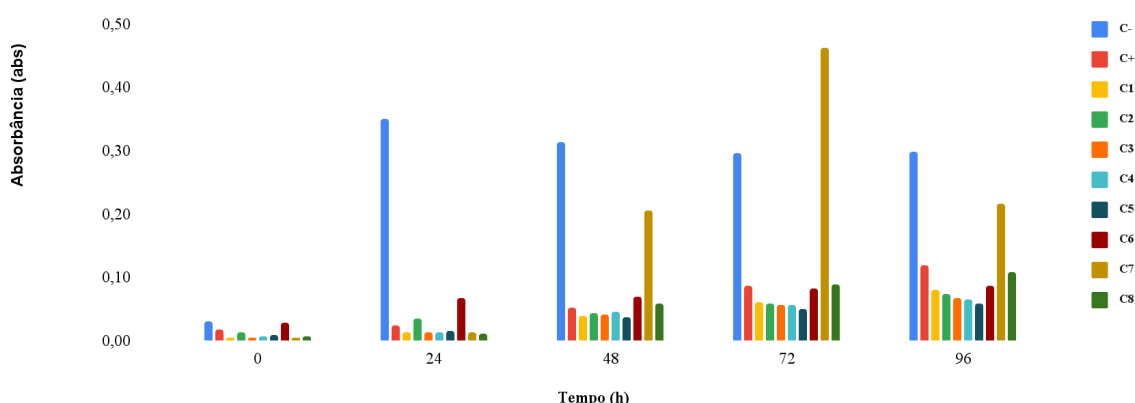
#### 4.4.2. *Chlorella fusca*

Os testes de inibição de densidade celular foram realizados em placas de 96 poços. A resposta tóxica nas concentrações de 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100; e 200  $\mu\text{g/mL}$ , foi avaliada em 24, 48, 72 e 96 horas, após exposição por meio da densidade óptica das microalgas em um espectrofotômetro UV-Vis. O gráfico foi gerado pelo Excel após cálculo da média dos valores obtidos em triplicata.

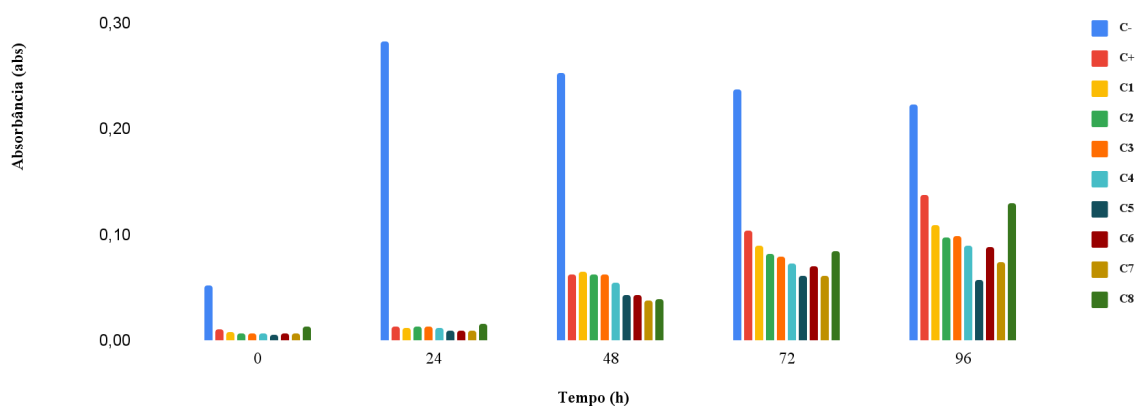
Para cada gráfico, a absorbância de  $0,315 \pm 0,04$ ; corresponde à concentração celular de  $1 \times 10^4 \text{ cel } \mu\text{L}^{-1}$ , nas figuras 8 e 9.

Com base nas figuras 8 e 9, pode-se dizer que a microalga *C. fusca* apresentou inibição da densidade celular em todas as concentrações testadas, exceto a concentração 7 na figura 8, tanto pela nanopartícula biológica AuNP, quanto pelo metal precursor  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ . Fora a C7 da figura 8, todas as outras concentrações não apresentaram diferenças significativas em comparação ao controle positivo.

Pode-se observar o crescimento celular na C7 da figura 8, mas este pode estar ligado à uma resposta de adaptação fisiológica da microalga aos efeitos da nanopartícula, como visto em Matouke [31].



**Figura 8.** Fitotoxicidade de *Chlorella fusca* exposta a nanopartícula biológica AuNP. Gráfico de absorvância (abs) por tempo (h) da microalga *Chlorella fusca* exposta a nanopartícula biológica AuNP, onde C+ (controle positivo), C- (controle negativo), C1 (2,0 µg/mL), C2 (5,0 µg/mL), C3 (10,0 µg/mL), C4 (25,0 µg/mL), C5 (50,0 µg/mL), C6 (75,0 µg/mL), C7 (100,0 µg/mL), C8 (200,0 µg/mL).



**Figura 9.** Fitotoxicidade de *Chlorella fusca* exposta ao metal precursor  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ . Gráfico de absorvância (abs) por tempo (h) da microalga *Chlorella fusca* exposta ao metal precursor  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ , onde C+ (controle positivo), C- (controle negativo), C1 (2,0 µg/mL), C2 (5,0 µg/mL), C3 (10,0 µg/mL), C4 (25,0 µg/mL), C5 (50,0 µg/mL), C6 (75,0 µg/mL), C7 (100,0 µg/mL), C8 (200,0 µg/mL).

Pode-se ainda observar que a sensibilidade da *C. fusca* à tanto o metal precursor como à AuNP ao longo dos dias diminuiu, tendo valores mais altos de absorvância conforme os dias, resultado corroborado pelo resultado de Monteiro [60], com *Chlorella vulgaris* exposta a nanorods de ouro.

O motivo da toxicidade de AuNPs em microalgas ainda é incerto pois não houve um teste posterior de análise celular das microalgas e na literatura ainda não há um consenso, sendo necessários mais estudos para evidenciar o real malefício dessas nanopartículas não só nas microalgas como no ecossistema. [28, 56, 61]

## 5. Conclusão

Em síntese, a AuNP sintetizada pelo fungo IPT1011 com tamanho de 98,48 nm em suspensão não apresentou atividade antibacteriana em nenhuma das concentrações em que as bactérias patogênicas *E. coli* IPT245, *P. aeruginosa* IPT236 e *S. aureus* IPT246 foram expostas. Em contrapartida, a AuNP encapsulada com quitosana-alginato obteve atividade antibacteriana sobre a bactéria gram-negativa *E. coli* IPT245.

Tendo em vista os resultados obtidos, a biossíntese ainda necessita ser otimizada, explorando principalmente fatores que influenciam no tamanho e tempo de obtenção do nanomaterial de estudo. Ademais, o comportamento de AuNPs em cada ambiente, marinho ou dulcícola é diferente, assim como, espécie-específico, portanto, serão necessários mais estudos para averiguar a os mecanismos exatos envolvidos entre as nanopartículas e cada espécie ou cada ambiente.

Além disso, testes com microalgas devem ser realizados em maior escala além de testes antibacterianos segundo o método de Kirby-Bauer, para confirmação dos dados apresentados neste estudo, pois a escala e métodos feitos podem ter colaborado para resultados divergentes da literatura.

Por fim, com os resultados do teste de densidade celular com as microalgas *C. minutissima* e *C. fusca*, pode-se dizer que o uso das AuNPs em meio aquático pode ser considerado um risco ambiental, portanto, o resíduo e descarte gerado deve ser devidamente encaminhado. Concluindo-se que devem ser feitos testes com nanopartículas comerciais para assim comparar o efeito tóxico da nanopartícula de ouro biológica em relação à sintética, além de estudos de longo termo, pouco encontrados na literatura, que podem servir de base para estudos de risco ambiental, uma vez que os efeitos de testes de toxicidade de curto prazo podem subestimar ou superestimar o risco representado pelas AuNPs.

## 6. Referências

1. Ganguly, R., Singh, A. K., Kumar, R., Gupta, A., Pandey, A. K., & Pandey, A. K. (2019). Nanoparticles as modulators of oxidative stress. In Nanotechnology in modern animal biotechnology (pp. 29-35). Elsevier.
2. Dhillon, G. S., Brar, S. K., Kaur, S., & Verma, M. (2011). Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(1), 49–73.
3. Nanotecnologia. MCTI governo federal. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/rede-mcti/cetene/areas-de-atuacao/nanotecnologia>. Acesso em: 25 set. 2021
4. Nanotecnologia. Nota técnica. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-nanotecnologia/nota-tecnica> Acesso em: 10 dez. 2021
5. Marques, R. D. R. (2020). Nanopartículas de ouro reduzidas com *Viola oleifera* inibem o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.
6. Panpatte, D. G., & Jhala, Y. K. (Eds.). (2019). Nanotechnology for Agriculture.
7. Cheng, Y., & Burda, C. (2011). 2.01—Nanoparticles for Photodynamic Therapy Comprehensive. *Nanosci. Technol*, 2, 1-28.
8. Alkilany, A. M., & Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?. *Journal of nanoparticle research*, 12(7), 2313-2333.
9. Ahmed, S., Annu, Ikram, S., & Yudha S., S. (2016). Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 161, 141–153.

10. Oliveira, J. P., Barbosa, L. S., Prado, A. R., Pontes, M. J., Ribeiro, M. R. N., Nogueira, B. V., & Guimarães, M. C. C. (2014). Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro por técnicas de microscopia e tomografia eletrônica. *Blucher Physics Proceedings*, 1(2), 25-26.
11. Rana, A., Yadav, K., & Jagadevan, S. (2020). A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity. *Journal of Cleaner Production*, 122880.
12. Tekade, R. K., Maheshwari, R., Soni, N., Tekade, M., & Chougule, M. B. (2017). Nanotechnology for the development of nanomedicine. In *Nanotechnology-based approaches for targeting and delivery of drugs and genes* (pp. 3-61). Academic Press.
13. Verma, H. N., Singh, P., & Chavan, R. M. (2014). Gold nanoparticle: synthesis and characterization. *Veterinary world*, 7(2), 72.
14. Wang, C., & Yu, C. (2013). Detection of chemical pollutants in water using gold nanoparticles as sensors: a review. *Reviews in Analytical Chemistry*, 32(1), 1-14.
15. Wu, Y. Z., Tsai, Y. Y., Chang, L. S., & Chen, Y. J. (2021). Evaluation of Gallic Acid-Coated Gold Nanoparticles as an Anti-Aging Ingredient. *Pharmaceutics*, 14(11), 1071.
16. Moreno-Garrido, I., Pérez, S., & Blasco, J. (2015). Toxicity of silver and gold nanoparticles on marine microalgae. *Marine Environmental Research*, 111, 60–73.
17. Salem, S. S., & Fouda, A. (2021). Green synthesis of metallic nanoparticles and their prospective biotechnological applications: an overview. *Biological trace element research*, 199(1), 344-370.
18. Kitching, M., Ramani, M., & Marsili, E. (2015). Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up. *Microbial biotechnology*, 8(6), 904-917.
19. Thakkar NK, Snehit Mhatre S, Rasesh Parikh Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med*, 6, 257–262.
20. Abu-Tahon, M. A., Ghareib, M., & Abdallah, W. E. (2020). Environmentally benign rapid biosynthesis of extracellular gold nanoparticles using *Aspergillus flavus* and their cytotoxic and catalytic activities. *Process Biochemistry*, 95, 1-11.
21. Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International journal of nanomedicine*, 12, 1227.
22. Ortiz-Benitez, E. A., Velazquez-Guadarrama, N., Duran-Figueroa, N. V., Quezada, H., & Olivares-Trejo, J. J. (2019). Antibacterial mechanism of gold nanoparticles on *Streptococcus pneumoniae*. *Metallomics*. doi:10.1039/c9mt00084d
23. Zhang, Y., Shareena Dasari, T. P., Deng, H., & Yu, H. (2015). Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 33(3), 286–327. doi:10.1080/10590501.2015.1055161
24. Rai, A., Prabhune, A., & Perry, C. C. (2010). Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings. *Journal of Materials Chemistry*, 20(32), 6789.

25. Ripolles-Avila, C., Martinez-Garcia, M., Hascoët, A. S., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2019). Bactericidal efficacy of UV activated TiO<sub>2</sub> nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria on suspension. *CyTA-Journal of Food*, 17(1), 408-418.
26. Amaral, Mateus de Souza. (2018) 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. Dissertação de Doutorado Universidade de São Paulo.
27. Derner, R. B., Ohse, S., Villela, M., Carvalho, S. M. D., & Fett, R. (2006). Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, 36(6), 1959-1967.
28. Sendra, M., & Moreno-Garrido, I. (2019). Nanopartículas y microalgas.
29. Bezerra, J. H. C. (2020). Produção da microalga *Nannochloropsis oculata* e seu uso como aditivo na ração do camarão *Litopenaeus vannamei*.
30. Fazelian, N., Yousefzadi, M., & Movafeghi, A. (2020). Algal Response to Metal Oxide Nanoparticles: Analysis of Growth, Protein Content, and Fatty Acid Composition. *Bioenergy Research*, 13(3).
31. Matouke, M. M., Elewa, D. T., & Abdullahi, K. (2018). Binary effect of titanium dioxide nanoparticles (nTiO<sub>2</sub>) and phosphorus on microalgae (*Chlorella 'Ellipsoides* Gerneck, 1907). *Aquatic toxicology*, 198, 40-48.
32. Mann & Markham. (2002). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils.
33. Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszdeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and methol as alternative agents to control the growth 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 as the potential natural fumigant: Inhibition of *Aspergillus flavus* and AFB1 production in licorice. *Industrial Crops and Products*, 80, 186 - 193
35. 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.
36. 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.
37. Freitas, B. C. B., Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (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*.
38. Deamici, 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
39. Moraes, Júlia. (2017). Desenvolvimento e padronização do ensaio de resazurina para avaliar a vitalidade de leveduras no contexto microcervejeiro. Trabalho de Conclusão de Curso (Biotecnologia - UFRGS)

40. Chatterjee, S., Bandyopadhyay, A., & Sarkar, K. (2011). Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 1-7.
41. Allahverdiyev AM, Kon KV, Abamor ES, Bagirova M, Rafailovich M: Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011, 9(11):1035-1052.
42. Cui, Y., Zhao, Y., Tian, Y., Zhang, W., Lü, X., & Jiang, X. (2012). The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials*, 33(7), 2327-2333.
43. Annamalai, J., & Nallamuthu, T. (2015). Characterization of biosynthesized gold nanoparticles from aqueous extract of *Chlorella vulgaris* and their anti-pathogenic properties. *Applied Nanoscience*, 5(5), 603-607.
44. Dang, H., Fawcett, D., & Poinern, G. E. J. (2019). Green synthesis of gold nanoparticles from waste macadamia nut shells and their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermis*. *International Journal Of research in medical sciences*, 7(4).
45. Sathiyaraj, S., Suriyakala, G., Gandhi, A. D., Babujanarthanam, R., Almaary, K. S., Chen, T. W., & Kaviyarasu, K. (2021). Biosynthesis, characterization, and antibacterial activity of gold nanoparticles. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1842-1847.
46. Basiratnia, E., Einali, A., Azizian-Shermeh, O., Mollashahi, E., & Ghasemi, A. (2021). Biological Synthesis of Gold Nanoparticles from Suspensions of Green Microalga *Dunaliella salina* and Their Antibacterial Potential. *BioNanoScience*, 11(4), 977-988.
47. Hernández-Sierra, J. F., Ruiz, F., Pena, D. C. C., Martínez-Gutiérrez, F., Martínez, A. E., Guillén, A. D. J. P., Tapia-Pérez, H., Castañón, G. M. (2008). The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4(3), 237-240.
48. Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: *Manual of clinical microbiology*, 9th ed. Murray PR, Baron EJ, ed. ASM Press, Washington; 2007:1152-7.
49. Zawrah, M. F., El-Moez, S. A., & Center, D. (2011). Antimicrobial activities of gold nanoparticles against major foodborne pathogens. *Life Science Journal*, 8(4), 37-44.
50. Zou, Y., Liang, J., She, Z., Kraatz, H. B. (2019). Gold nanoparticles-based multifunctional nanoconjugates for highly sensitive and enzyme-free detection of *E. coli* K12. *Talanta*, 193, 15-22.
51. F. Huang, H. Zhang, L. Wang, W. Lai, J. Lin. A sensitive biosensor using double-layer capillary based immunomagnetic separation and invertase-nanocluster based signal amplification for rapid detection of foodborne pathogen. *Biosens. Bioelectron.*, 100 (2018), pp. 583-590
52. Andrade, S. C. A. D. (2020). Nanocápsulas quitosana-goma arábica contendo óleo essencial de *Origanum vulgare*: preparação, caracterização, estabilidade térmica e ação antimicrobiana em atum azul (*Thunnus thynnus*)
53. Politova-Brinkova, N. I., Tsibranska-Gyoreva, S. R., Tcholakova, S. S., Denkov, N. D., & Danner, T. (2020). Preparation of TiO<sub>2</sub> Nanoparticle

- Aggregates and Capsules by the 'Two-Emulsion Method'. *Colloids and Interfaces*, 4(4), 57
54. 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
  55. 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
  56. Dénier, M., Errien, N., Daniel, P., Caruso, A., & Lagarde, F. (2019). Current methods to monitor microalgae-nanoparticle interaction and associated effects. *Aquatic Toxicology*, 217, 105311.
  57. 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.
  58. Khoshnamvand, M., Ashtiani, S., Chen, Y., & Liu, J. (2020). Impacts of organic matter on the toxicity of biosynthesized silver nanoparticles to green microalgae *Chlorella vulgaris*. *Environmental research*, 185, 109433
  59. Roy, R., Parashar, A., Bhuvaneshwari, M., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2016). Differential effects of P25 TiO<sub>2</sub> nanoparticles on freshwater green microalgae: *Chlorella* and *Scenedesmus* species. *Aquatic Toxicology*, 176, 161-171.
  60. Monteiro, C., Daniel-da-Silva, A. L., Venâncio, C., Soares, S. F., Soares, A. M., Trindade, T., & Lopes, I. (2019). Effects of long-term exposure to colloidal gold nanorods on freshwater microalgae. *Science of the Total Environment*, 682, 70-79.
  61. Davarpanah, E., & Guilhermino, L. (2019). Are gold nanoparticles and microplastics mixtures more toxic to the marine microalgae *Tetraselmis chuii* than the substances individually?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 181, 60-68.

**PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**APRESENTAÇÃO REMOTA**

**Discente:** CATERINA DO VALLE TROTTA

**Título:** "Análise dos efeitos antimicrobianos e toxicológicos de nanopartículas fúngicas de ouro sobre bactérias"

**Orientadora:** Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

**Curso/Habilitação:** Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

| COMISSÃO EXAMINADORA                      | CONCEITO |
|-------------------------------------------|----------|
| Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni     | APROVADO |
| Dra. Marta Filipa Jesus de Freitas Simões | APROVADO |

**CONCEITO FINAL:**

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Caterina do Valle Trotta** obteve o seguinte conceito:

☒ APROVADO

☐ REPROVADO

São Vicente, 24 de janeiro de 2022.



**Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni**  
(Orientadora)



**Dra. Marta Filipa Jesus de Freitas Simões**