



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA
DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

ARLENE SOUZA LESSA

**Biossíntese de nanopartículas de prata utilizando extratos
de cianobactérias (Oscillatoriales) do litoral da Bahia e
avaliação da atividade antimicrobiana**

2024

ARLENE SOUZA LESSA

**Biossíntese de nanopartículas de prata utilizando extratos
de cianobactérias (Oscillatoriales) do litoral da Bahia e
avaliação da atividade antimicrobiana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de
Santana como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edrian Mania
Coorientadora: Profa. Dr^a. Taiara Aguiar Caires

Feira de Santana, BA
2024

/

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó – UEFS

Lessa, Arlene Souza
L631b Biossíntese de nanopartículas de prata utilizando extratos de cianobactérias
(Oscillatoriales) do litoral da Bahia e avaliação da atividade antimicrobiana. / Arlene
Souza Lessa. – 2024.
49 f.: il.

Orientador: Edrian Mania Coorientadora:
Taiara Aguiar Caires
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2024.

1.Síntese verde. 2.Potencial biotecnológico. 3.Fibroblasto. 4.Macrófago. I.Mania,
Edrian, orient. II.Caires, Taiara Aguiar, coorient. III.Universidade Estadual de Feira de
Santana. IV. Título.

CDU: 615.07

Maria de Fátima de Jesus Moreira - Bibliotecária - CRB-5/1120

ARLENE SOUZA LESSA

Biossíntese de nanopartículas de prata utilizando extratos de cianobactérias (Oscillatoriales) do litoral da Bahia e avaliação da atividade antimicrobiana.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de mestre.

Feira de Santana, Bahia, 30 de setembro de 2024

Documento assinado digitalmente
 **EDRIAN MANIA**
Data: 03/10/2024 17:00:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador: Prof. Dr. **Edrian Mania**
Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente
 **LUCAS GUIMARAES CARDOSO**
Data: 03/10/2024 16:38:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Lucas Guimarães Cardoso**
Universidade Salvador

Documento assinado digitalmente
 **JANIA BETANIA ALVES DA SILVA**
Data: 02/10/2024 08:13:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof^a. Dr^a. **Jania Betania Alves da Silva**
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dedico esse trabalho, a uma menina sonhadora. Ela sempre acreditou que seria possível, pois é conduzida por Deus.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS, pois ele sempre esteve e está ao meu lado me dizendo Filha, não temas Eu sou contigo.

Agradeço a **Dr. Edrian** e **Dr^a. Taiara**, pela orientação, por me conduzirem para que esse estudo fosse concretizado;

À **Marcio**, meu amigo e irmão por toda parceria e por me incentivar a ser melhor a cada dia por tudo o que compartilhamos ao longo desse período. Te Amo Amigo;

À minha tão amada e querida equipe de trabalho Microscopia que hoje os tenho como minha família, **Adriana** e **Cláudio** por todo incentivo, ajuda e motivação;

À minha família, Pai, irmãos, cunhados e sobrinhos, e a meus Tios **Jorge** e **Minervina** por sempre me incentivar estudar e não desistir de nada;

Ao Programa de Biotecnologia e aos Professores por contribuir na minha formação;

Às agências financiadoras do projeto **Capes, Fapesb e CNPq**;

À **Fiocruz/Bahia** pela utilização de laboratórios (**Lapem**), insumos e estrutura na realização dos experimentos (**Leti**);

Às colegas do Lens **Carina** e **Flávia** por todas as trocas de experiências;

À **Helenita, Cássio, Ivan** pelo apoio na orientação partes metodológicas no projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos. Provérbios 16: 3

RESUMO

A biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) mediada por cianobactérias é um método de síntese verde, caracterizado por seu baixo impacto ambiental em comparação com os processos químicos convencionais. Neste estudo, realizamos a biossíntese de AgNPs utilizando extrato aquoso da cianobactéria filamentosa marinha brasileira *Affixifilum granulosum*. As nanopartículas foram caracterizadas com técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia de raios X por energia dispersiva, espectroscopia de espalhamento dinâmico de luz e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. Demonstramos sua eficácia na inibição do crescimento microbiano, incluindo bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus*), bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos (*Candida albicans* e *C. glabrata*). Adicionalmente, constatou-se que as AgNPs são biocompatíveis em ensaios de citotoxicidade, mantendo a viabilidade de células fibroblásticas e de macrófagos. Esses resultados destacam o potencial das AgNPs como agentes antibacterianos com baixa citotoxicidade, indicando promissora aplicação na terapêutica antimicrobiana, além da síntese ecológica a partir de um recurso marinho brasileiro.

Palavras chaves: síntese verde, potencial biotecnológico, fibroblasto, macrófago.

ABSTRACT

The biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) mediated by cyanobacteria is a green synthesis method characterized by its low environmental impact compared to conventional chemical processes. In this study, we performed the biosynthesis of AgNPs using the aqueous extract of the Brazilian marine filamentous cyanobacterium *Affixifilum granulosum*. The nanoparticles were characterized using transmission electron microscopy, energy-dispersive X-ray spectroscopy, dynamic light scattering spectroscopy, and Fourier-transform infrared spectroscopy. We demonstrated their efficacy in inhibiting microbial growth, including Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, and *Staphylococcus aureus*), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), and fungi (*Candida albicans* and *C. glabrata*). Additionally, we found that the AgNPs are biocompatible in cytotoxicity assays, maintaining the viability of fibroblast and macrophage cells. These results highlight the potential of AgNPs as antibacterial agents with low cytotoxicity, indicating their promising application in antimicrobial therapy, alongside their eco-friendly synthesis from a Brazilian marine resource.

Keywords: green synthesis, biotechnological potential, fibroblast, macrophage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de síntese de nanopartículas metálicas mediados por célula

Figura 2: Exemplo do processo de biossíntese mediada por extratos.

Figura 3: Nanopartícula de prata atravessando a parede celular da célula bacteriana.

Figura 4: Área de coleta da cianobactéria na região mesolitorânea no bairro de Costa azul Salvador, Bahia (A) Poça de maré com cianobactérias. (B) Cianobactérias armazenadas para realização de triagem.

Figura 5: Etapas do processo de biossíntese das nanopartículas de prata: (A) Biomassa da cianobactéria liofilizada. (B) Filtragem do extrato. (C) Biorredução da AgNPs.

Figura 6. Processo de contrastação negativa das nanopartículas de prata (A) AgNPs gotejada em grade (B) Secagem de grade (C) Grade pronta para análise.

Figura 7: Esquema exemplificando as etapas do ensaio antimicrobiano e antifúngico

Figura 8: Esquema exemplificando as etapas de determinação da concentração bactericida mínima para bactérias e fungos.

Figura 9: Esquema exemplificando as etapas do teste de citotoxicidade celular.

Figura 10: (A) Poça de maré, com cianobactérias apresentado talos formando massa densa; (B) Micrografia em campo claro do filamento.

Figura 11: (A) Extrato da cianobactéria; (B) Solução obtida após o processo de síntese das AgNPs

Figura 12: (A) Gráfico de UV-visível mostrando as sínteses na proporção (Extrato + AgNO₃) 10:10 (Extrato + AgNO₃) (B) Micrografia das AgNPs 10:10 Ex5% (C) Micrografia das AgNPs 10:10 Ex10%.

Figura 13: (A) Gráfico de UV-visível mostrando as sínteses na proporção 6:19 (Extrato + AgNO₃) (B) Micrografia das AgNPs 6:19 Ex5% (C) Micrografia das AgNPs 6:19 Ex10%.

Figura 14: (A) Gráfico de UV-visível mostrando as sínteses na proporção 1:19 (Extrato + AgNO₃) (B) Micrografia das AgNPs 1:19 Ex5% (C) Micrografia das AgNPs 1:19 Ex10%.

Figura. 15: Gráfico de Potencial zeta com valores de carga de superfície

Figura 16: Gráfico de DLS com distribuição do tamanho médio das nanopartículas de prata.

Figura 17: Espectros no infravermelho com transformada de Fourier do extrato aquoso da *Affixifilum granulosum* sobreposto ao das nanopartículas de prata, em vermelho o espectro do extrato e em preto o espectro da AgNPs.

Figura 18: (A) Micrografia da AgNPs por microscopia eletrônica de transmissão mostrando partículas esféricas; (B) Histograma de distribuição de frequência das AgNPs.

Figura 19: (A) Espetro de emissão de raios-x determinado por EDS. Destaque para as emissões L α 1 e L β 1/2 em torno de 3 kv. (B) Micrografia de alta resolução (HTEM) das AgNPs. Em detalhe

distância interplana atômica de 0,235 nm relacionada aos planos (111)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teste de síntese com proporções de extrato e AgNPs 10:10.

Tabela 2: Teste de síntese com proporções de extrato e AgNPs 6:17.

Tabela 3: Teste de síntese com proporções de extrato e AgNPs 6:19.

Tabela 4: Teste de síntese com proporções de extrato e AgNPs 1:19.

Tabela 5: Atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo de nanopartículas sintetizadas a partir do extrato da cianobactéria *A. granulosum* expresso em Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM).

Tabela 6: Avaliação da citotoxicidade celular com linhagens de macrófagos J774 e fibroblastos de pulmão MRC5.

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNPs – Nanopartículas de prata

AgNO₃ – Nitrato de prata

DLS - Espalhamento de luz dinâmico

EDS - Espectroscopia por dispersão de elétrons

FTIR - Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier

CBM – Concentração bactericida mínima

CIM– Concentração inibitória mínima

NPs - Nanopartículas

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.	NANOBIOTECNOLOGIA	20
1		
2.	NANOPARTÍCULAS METÁLICAS / NANOPARTÍCULAS DE PRATA	20
2		
2.	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA	21
2.		
1		
2.	BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR MICRORGANISMOS	23
2.		
2		
2.	CIANOACTÉRIAS E SEU POTENCIAL NA BIOSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	24
2.		
3		
2.	AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	25
3		
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.	COLETA DA CIANOACTÉRIA	27
1		
3.	OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO EXTRATO	27
1.		
2		
3.	BIOSSÍNTESE DA NANOPARTÍCULA DE PRATA	28
1.		
3		
3.	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	29
2		
3.	ESPECTROSCOPIA DO UV-VISÍVEL	29
2.		
1		
3.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) E ESPECTROSCOPIA POR DISPERSÃO DE ENERGIA (EDS)	30
2.		
2		
3.	ESPELHAMENTO DIMÊNICO DE LUZ (DLS) E POTENCIAL ZETA	31
2.		
3		
3.	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	31
2.		
4		
3.	BIOENSAIOS ANTIMICROBIANOS	32

3		
3.	MICRORGANISMOS TESTADOS	32
1		
3.	3.3.2. MICRODILUIÇÃO EM CALDO	32
1.		
2		
3.	CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	33
1.		
3		
3.	TESTE DE CITOTOXICIDADE CELULAR	34
4		
3.	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA	34
4.		
1		
3.	AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE COM ALAMAR BLUE	34
4.		
2		
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.	IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE	35
1		
4.	BIOSSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	36
2		
4.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	44
3		
4.	AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE COM ALAMAR BLUE	45
4		
5	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia está em constante evolução, englobando atividades que incluem a síntese, análise e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas em dimensões nanométricas (Madhuri et al., 2018). Nesse contexto, as nanopartículas de prata (AgNPs) ganharam destaque devido à estabilidade química, atividade catalítica e propriedades antimicrobianas (Ameen et al., 2020). Essas propriedades tornam as AgNPs aplicáveis em diversas áreas, como medicina, indústria e pecuária, particularmente em regiões onde o controle de microrganismos é crucial, como o semiárido nordestino. A ação antimicrobiana das AgNPs já foi evidenciada contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Iravani et al., 2011).

As AgNPs podem ser sintetizadas por diferentes métodos, incluindo químico, fotoquímico, físico e biológico. No entanto, as sínteses químicas e físicas apresentam custos elevados e alta toxicidade (Silva et al., 2017), o que é particularmente desafiador para regiões como o semiárido, onde os recursos são limitados e a sustentabilidade é uma prioridade. Assim, a síntese verde surge como uma solução viável, promovendo a redução do uso de substâncias tóxicas e a otimização de recursos renováveis (El-Naggar et al., 2017).

Neste contexto, a utilização de cianobactérias marinhas do litoral baiano como mediadoras na síntese verde de AgNPs representa uma oportunidade para o desenvolvimento biotecnológico da região, por valorizar recursos naturais abundantes e subutilizados. As ficobiliproteínas presentes em cianobactérias, por exemplo, atuam como agentes redutores no processo de biossíntese de nanopartículas (Bodnar et al., 2018), destacando o potencial desses microrganismos em oferecer uma fonte sustentável e renovável de produtos bioativos aplicáveis na biotecnologia (Carmichael, 1994; Costa et al., 2012).

Além disso, alguns estudos têm enfatizado o potencial das cianobactérias na síntese verde de AgNPs. Singh et al. (2021) demonstraram que AgNPs obtidas a partir do extrato da cianobactéria *Lyngbya majuscula* intensificaram a atividade antiproliferativa de células leucêmicas e a atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*. Ameen et al., (2020) destacaram a aplicação de *Arthrospira platensis* na síntese de nanopartículas de prata, evidenciando seu efeito bactericida contra patógenos respiratórios. O estudo de Pandey et al., (2020) evidenciou o potencial biofertilizante das cianobactérias, enfatizando sua habilidade em sintetizar uma variedade de nanopartículas metálicas, incluindo prata, ouro, óxido de zinco e ferro.

A relevância desse trabalho se estende ainda à contribuição para a Agenda 2030, particularmente no que diz respeito ao desenvolvimento sustentável, promoção da saúde e bem-estar (ODS 3), e inovação e infraestrutura sustentável (ODS 9). Ao explorar tecnologias verdes e promover o uso de recursos renováveis na região do semiárido, este estudo oferece um caminho para o desenvolvimento de soluções tecnológicas que atendem às necessidades locais, gerando benefícios socioeconômicos e contribuindo para a resiliência e sustentabilidade da região.

Nesse estudo, investigamos a eficácia antimicrobiana de AgNPs biossintetizadas a partir de extratos aquosos da cianobactéria filamentosa *Affixifilum granulosum* (Oscillatoriales), visando explorar seu potencial biotecnológico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. NANOBIOTECNOLOGIA

A nanobiotecnologia, uma subárea da biotecnologia, surgiu como um campo interdisciplinar que combina os princípios da biologia com a nanotecnologia. Seu desenvolvimento histórico começou a ganhar forma nas últimas décadas do século XX, quando cientistas começaram a explorar o potencial das nanopartículas em sistemas biológicos (Clark et al., 2016). A capacidade de interagir com sistemas biológicos em nível molecular e celular permitiu avanços significativos em áreas como medicina, agricultura e ciência dos materiais, dando origem a novas abordagens para diagnósticos, terapias e biossínteses sustentáveis (Khatoon et al., 2018).

A nanotecnologia é a ciência que envolve a manipulação e aplicação de estruturas em escala nanométrica, tipicamente entre 1 e 100 nanômetros. Nesse nível, as propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais podem diferir significativamente das mesmas substâncias em escalas maiores, o que permite o desenvolvimento de novos materiais e dispositivos com funcionalidades específicas (Elgorban et al., 2016). Isso ocorre porque, à medida que as partículas diminuem de tamanho, uma proporção maior de seus átomos fica exposta na superfície, aumentando as áreas de contato (Hulikere et al., 2019). A simples redução no tamanho dos materiais pode levar ao surgimento de características distintas e novas propriedades, como elasticidade, tenacidade, resistência, condutividade elétrica, propriedades magnéticas, acumulação de carga elétrica e diferentes cores, todas decorrentes da maior área de contato superficial (Elgorban et al., 2016).

2.2. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS / NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas metálicas (NPM) são partículas compostas por elementos metálicos, como ferro, níquel, prata, ouro, entre outros. Elas se destacam por exibirem propriedades físico-químicas distintas em comparação aos materiais na escala macroscópica. Essas diferenças incluem modificações na reatividade química, bem como nas propriedades mecânicas, ópticas, elétricas e magnéticas. As propriedades únicas das NPM são, em grande parte, resultantes do efeito de área superficial, que altera significativamente o tamanho do material em comparação ao observado em escalas maiores (Clark et al., 2016).

A prata é um metal de transição, com número atômico 47 e massa molar 107,86g/mol. Quando em escala nanométrica, conferem propriedades ópticas únicas possibilitando

aplicações como biossensores e biomarcadores (QIAN et al., 2024). Nanopartículas de prata quando em meio líquido, encontram-se em suspensão, pois se trata de pequenos sólidos insolúveis em um meio dispersante, confere cor característica e absorbância em comprimentos de onda específicos, sendo que nanopartículas esféricas de 10nm de diâmetro aproximadamente apresentam banda plasmônica $\lambda_{410\text{nm}}$ para AgNP. Possui propriedades como boa condutividade, propriedades catalíticas, efeito antimicrobiano e elevada área superficial. Essas propriedades têm possibilitado sua ampla utilização na indústria, principalmente na área de alimentos, biomédica, produção de nanosensores, catálise e têxtil (Sharma et al., 2017).

2.2.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS

A obtenção de nanopartículas, processo chamado de síntese, ocorre por meio de dois métodos: o primeiro denominado "*top-down*" (de cima para baixo) e o segundo "*bottom-up*" (de baixo para cima). Na técnica *top-down*, materiais macroestruturados são desconstruídos por técnicas, como nanolitografia ou moagem de alta energia, para obter produtos nanoparticulados (Siddiqi et al., 2018). Embora essa abordagem seja adequada para produção em grande escala, muitas vezes é difícil alcançar homogeneidade nas características do produto final. Por outro lado, na abordagem *bottom-up*, as nanopartículas são formadas por interações entre átomos ou moléculas individuais. Essa técnica permite o controle preciso de parâmetros, como distribuição de tamanho e forma das nanopartículas, sendo amplamente empregada na produção de NPs (Silva et al., 2017).

Os protocolos de síntese de nanopartículas podem envolver métodos físicos, químicos, fotoquímicos e biológicos (Lian et al., 2016). Dentre os métodos físicos utilizados para a síntese de nanopartículas estão inclusos a decomposição térmica, a irradiação a laser, a condensação, a difusão e a descarga elétrica (He et al., 2016). As vantagens dos métodos físicos são a velocidade, a radiação usada como agente redutor e a ausência de substâncias químicas perigosas envolvidas. Mas as desvantagens incluem o baixo rendimento, o alto consumo de energia, e falta de distribuição uniforme (Siddiqi et al., 2016).

Os meios que envolvem o uso de produtos químicos para a produção de nanopartículas são chamados de métodos de síntese por via química. Estes, normalmente, são realizados por reação eletroquímica ou redução química do material (Ahmed et al., 2016). Esse processo geralmente emprega três componentes principais, como: precursores de metais, agentes redutores e agentes de estabilização (Silva et al., 2017) e, embora produzam AgNPs puras, usualmente utilizam produtos químicos tóxicos. Agentes estabilizadores também são muito utilizados neste contexto

para prover uma prolongação da estabilidade coloidal e para aumentar o controle sobre a forma geométrica das nanopartículas (Elgorban et al., 2016).

Os métodos fotoquímicos de preparação de nanopartículas utilizam a fotorredução de um precursor ou de íons de prata. Na preparação de nanopartículas de prata, ocorre a utilização de intermediários ativados fotoquimicamente, por exemplo, um radical. As vantagens da utilização de métodos fotoquímicos são a preparação de AgNPs com elevada pureza, fácil processamento, ampla faixa de meios reacionais que podem ser utilizados como polímeros, micelas e emulsões (Iravani et al., 2015).

Tanto os métodos físicos quanto os químicos são comumente agressivos ao meio ambiente, pois usam soluções e metodologias que usualmente geram resíduos tóxicos e demandam alto gasto de energia (Boverhof et al., 2016). O uso de produtos químicos tóxicos é ainda objeto de preocupação, pois esses produtos podem depositar-se na superfície das nanopartículas. Deste modo, existe uma necessidade cada vez maior de desenvolver protocolos de síntese que sejam limpos, ou seja, que não utilizem substâncias tóxicas e que produzam nanopartículas biocompatíveis (Sharma et al., 2017).

Ao longo da última década, houve uma maior ênfase sobre a temática química verde e os processos químicos (Pandey et al., 2020). Esses esforços objetivam a eliminação total ou, pelo menos, a minimização do uso e da geração dos resíduos com a implementação de processos sustentáveis. A síntese verde envolve três principais etapas que devem ser avaliadas com base nas perspectivas da química verde: seleção do meio a ser utilizado como solvente; seleção de um agente redutor ecologicamente correto; seleção de substâncias não tóxicas que serão utilizadas na estabilização das AgNPs sintetizadas (Silva et al., 2017).

A síntese verde visa, mais precisamente, ao desenvolvimento de metodologias e/ou processos que usem e gerem a menor quantidade possível de materiais tóxicos e/ou inflamáveis (Rizki; Klaypradit, 2023). Neste caso, os riscos seriam minimizados e, uma vez que o processo fosse implementado, os gastos com tratamento de resíduos seriam reduzidos (Sharma et al., 2017). A síntese verde de NPs propõe a utilização de organismos biológicos, ou partes deles, em substituição aos reagentes químicos tóxicos para obtenção de nanomateriais, apresentando-se como uma alternativa sustentável (Iravani, 2011). Este método de síntese geralmente utiliza solventes com baixa toxicidade (ex. água), reduzindo os impactos ambientais relacionados a estes processos.

2.2.2 BIOSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR MICRORGANISMOS

A síntese biológica de nanopartículas pode utilizar fungos, leveduras, bactérias, enzimas, e cianobactérias para formar as nanopartículas em meio extra ou intracelular (Iravani, 2011), como ilustrado na figura 1. No meio intracelular, há a absorção dos íons metálicos que reagem com moléculas dentro da célula, sendo reduzidos para formar as nanopartículas. Por outro lado, no meio extracelular, a síntese pode ocorrer através da interação dos íons metálicos com moléculas liberadas pela célula ou com proteínas presentes na membrana e na parede celular. Nessas situações, componentes como biomoléculas e metabólitos secundários atuam como agentes redutores, facilitando a redução dos compostos-alvo e culminando na formação AgNPs (Silva et al., 2017). No meio intracelular, há a absorção dos íons metálicos que reagem com moléculas dentro da célula, sendo reduzidos para formar as nanopartículas. Por outro lado, no meio extracelular, a síntese pode ocorrer através da interação dos íons metálicos com moléculas liberadas pela célula ou com proteínas presentes na membrana e na parede celular. Nessas situações, componentes como biomoléculas e metabólitos secundários atuam como agentes redutores, facilitando a redução dos compostos-alvo e culminando na formação AgNPs (Silva et al., 2017).

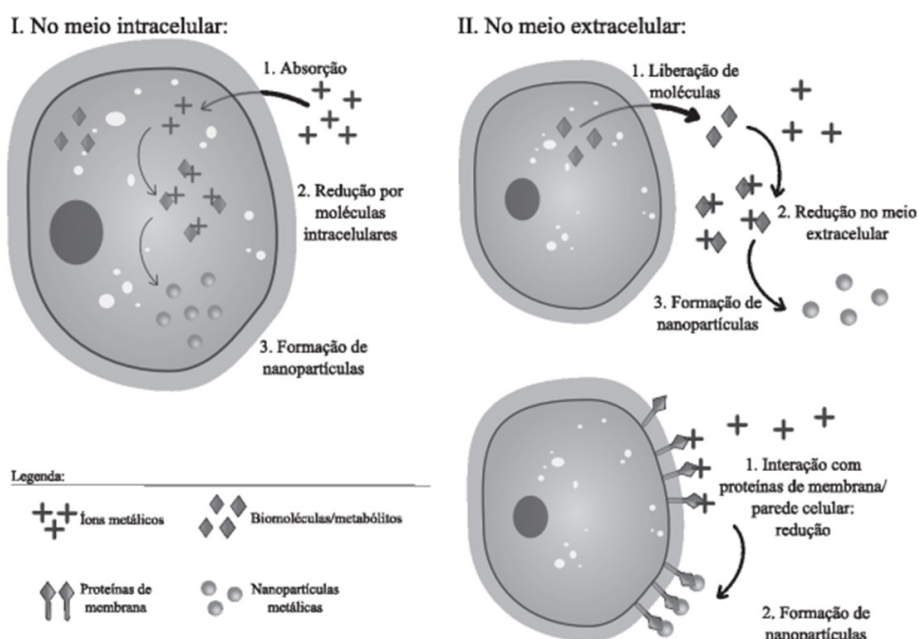


Figura 1: Mecanismos de síntese de nanopartículas metálicas mediados por células. **Fonte:** Silva et al., 2017.

Diversos pesquisadores têm direcionado suas pesquisas para a síntese verde, devido à sua facilidade, versatilidade e menor impacto ambiental. Essa abordagem utiliza uma ampla variedade de extratos vegetais como fonte de compostos redutores, que podem ser obtidos de diferentes partes das plantas, como raízes, caules, folhas, e até mesmo resíduos provenientes de processos industriais (Cruz et al., 2016). O requisito fundamental para esses extratos é a presença de compostos com propriedades redutoras, como flavonoides, terpenoides, taninos, compostos fenólicos, ficobiliproteínas e ácidos orgânicos (Abdelghany et al., 2018).

2.2.3 CIANOBACTÉRIAS E SEU POTENCIAL NA BIOSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As cianobactérias estão entre os organismos mais antigos do planeta. Evidências fósseis indicam que elas existem há cerca de 3,5 bilhões de anos. Esses microrganismos consistem nas primeiras formas de vida fotossintética, desempenhando um papel fundamental na oxigenação da atmosfera terrestre primitiva (Carmichael, 1994). Ao longo dos anos, as cianobactérias colonizaram uma variedade de habitats aquáticos e terrestres, sendo encontradas em águas doces, salobras e marinhas, ocorrendo em oceanos, rios, lagos, e até mesmo em ambientes extremos, como desertos e geleiras. Sua adaptação a uma ampla gama de condições ambientais é notável, sendo impulsionada por sua capacidade de realizar a fotossíntese e fixar nitrogênio (El-Sheekh et al., 2014).

As cianobactérias contêm ficobiliproteínas, pigmentos fotossintéticos que desempenham um papel na captura de luz para a fotossíntese. Essas proteínas são associadas a cromóforos, como ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina, que são responsáveis pela absorção da luz e pela conversão de energia luminosa em energia química durante o processo fotossintético (Mandhata et al., 2022). As ficobiliproteínas, presentes nas cianobactérias, desempenham um papel fundamental na síntese de nanopartículas devido às suas propriedades redutoras e estabilizadoras. Essas proteínas são pigmentos fotossintéticos que capturam a luz para a fotossíntese e são compostas por cromóforos ligados covalentemente a proteínas (El-Naggar et al., 2017). Essas propriedades, associadas à presença de grupos funcionais como aminoácidos, permitem que as ficobiliproteínas ajudem na redução de íons metálicos, como íons de prata (Ag^+), para formar nanopartículas de prata (AgNPs) (Mandhata et al., 2022), como ilustrado na figura 2.

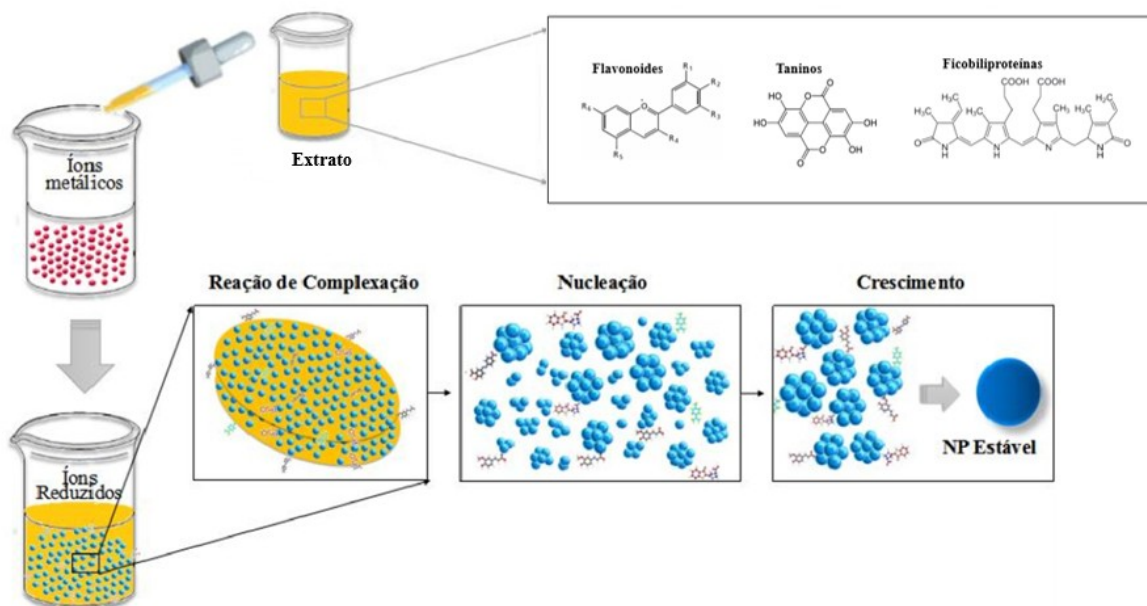


Figura 2: Exemplo das etapas do processo de biossíntese mediada por extratos. **Fonte:** Guimarães et al., 2021

Durante o processo de biossíntese de nanopartículas, as ficobiliproteínas podem atuar como agentes redutores, convertendo íons metálicos em sua forma metálica nanoparticulada. Além disso, elas também podem desempenhar um papel estabilizador, impedindo a agregação das nanopartículas recém-formadas, mantendo seu tamanho e morfologia (Ameen et al., 2020). Dessa forma, as ficobiliproteínas não só facilitam a nucleação e o crescimento das nanopartículas, mas também contribuem para a estabilidade coloidal, garantindo que as AgNPs formadas apresentem as características físico-químicas ideais para aplicações específicas, como a eficácia antimicrobiana (Pandey et al., 2020).

2.3 AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As AgNPs têm sido extensivamente estudadas devido à sua notável ação antimicrobiana. Elas são conhecidas por sua capacidade de inibir o crescimento e a sobrevivência de diversos microrganismos, incluindo vírus (Liao et al., 2019), fungos patogênicos, como *Candida albicans*, que podem causar infecções fúngicas como a candidíase (Elgorban et al., 2016), e as bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*.

O uso das AgNPs oferece várias vantagens no enfrentamento de microrganismos resistentes (Lian et al., 2019). Suas propriedades únicas, como tamanho reduzido e alta relação superfície-

volume, permitem uma interação eficiente com as células microbianas, facilitando sua entrada e interação com componentes celulares vitais (Bruna et al., 2021). Um aspecto promissor é a possibilidade de combinar as AgNPs com antibióticos e antifúngicos convencionais, o que pode aumentar a eficácia desses agentes (Singh et al., 2021). A combinação de nanopartículas de prata com medicamentos convencionais pode superar mecanismos de resistência e proporcionar um efeito sinérgico no combate a microrganismos resistentes (Liao et al., 2019).

Bruna et al. (2021) destacam a importância da carga positiva do íon Ag^+ liberado pelas AgNPs após atravessarem a parede celular dos microrganismos. Essa carga positiva é fundamental para sua atividade antimicrobiana, pois cria uma atração eletrostática entre as AgNPs (carregadas positivamente) e a membrana celular dos microrganismos (carregada negativamente). Como resultado, as AgNPs afetam a permeabilidade seletiva da membrana, aumentando-a, e interferem na respiração celular, levando à morte das células.

Adicionalmente, as AgNPs têm a capacidade de penetrar nas células e interagir com as ligações dissulfeto presentes nos conteúdos de glicoproteínas e proteínas dos microrganismos, incluindo vírus, bactérias e fungos. Esse evento prejudica as proteínas e, por consequência, afeta negativamente o DNA, dificultando sua replicação, e também o RNA, impossibilitando sua transcrição (Liao et al., 2019). As modificações nessas estruturas interferem nos processos bacterianos, levando à morte celular (Bruna et al., 2021). A Figura 3 ilustra a interação do íon prata com as células bacterianas.

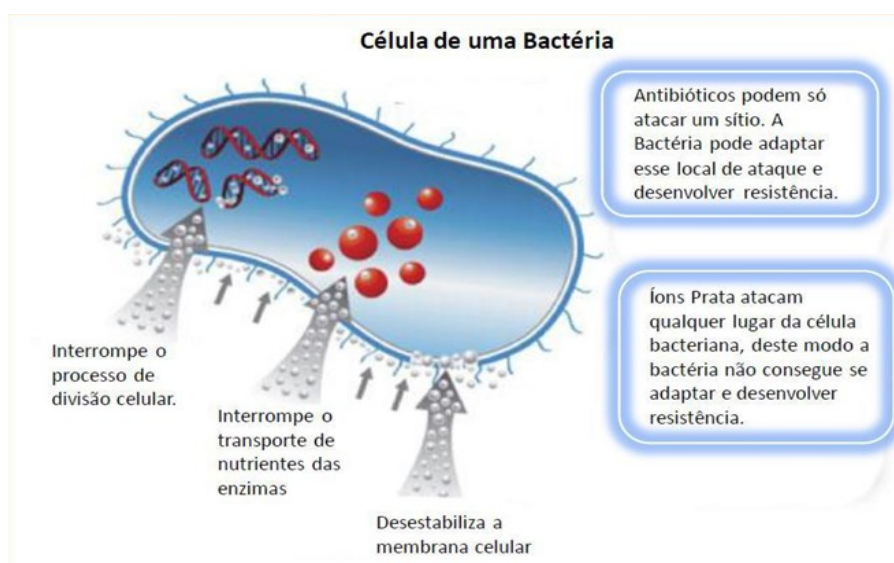


Figura 3: Nanopartícula de prata atravessando a parede celular da célula bacteriana. **Fonte:** <http://methanenanosilver.weebly.com>

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA DA CIANOBACTÉRIA

As cianobactérias foram coletadas em poças de maré (Fig. 4A) na região mesolitorânea da Praia de Jardim de Alah, na cidade de Salvador, Bahia, região tropical do Brasil, com georreferenciamento através de GPS de campo (Garmin eTrex Legend® HCx) ($12^{\circ}59'51''$ S, $38^{\circ}26'36''$ W). A biomassa foi coletada durante as marés baixas de sizígia, com o auxílio de espátula metálica, e armazenadas em sacos plásticos contendo água do mar (Fig. 4B) para posterior triagem em laboratório.



Figura 4: Área de coleta da cianobactéria na região mesolitorânea no bairro de Costa Azul Salvador Bahia (A) Poça de maré com cianobactérias. (B) Cianobactérias armazenadas para realização de triagem. **Fonte:** Própria autoria

3.1.2 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO EXTRATO

Para a obtenção dos extratos aquosos, a biomassa obtida foi congelada em nitrogênio líquido, liofilizada (FreeZone 2.5 Liter -50C Benchtop Freeze Dryer) e pesada para verificação de rendimento ao final do processo (Fig. 5A).

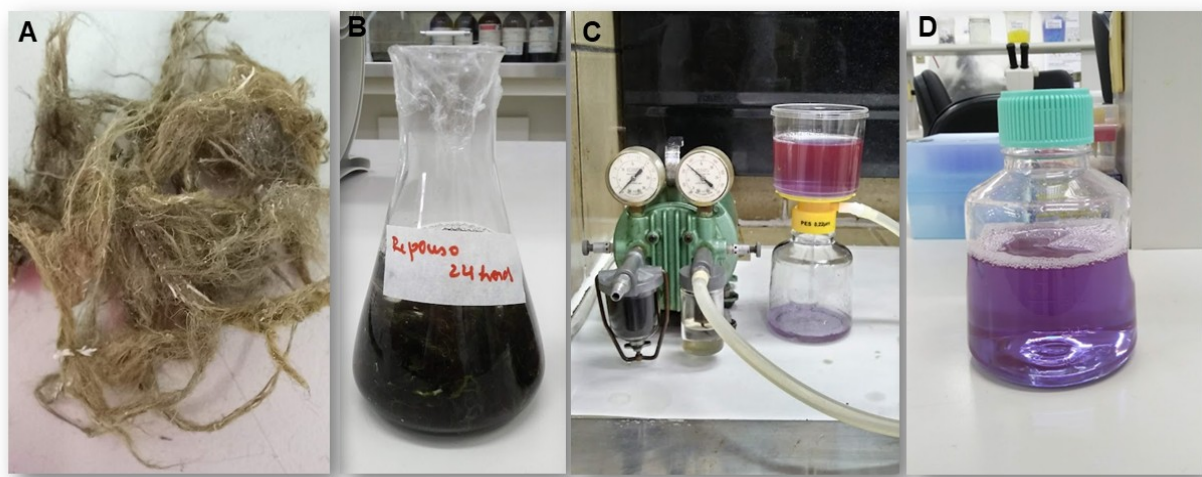


Figura 5: Etapas do processo de biossíntese das nanopartículas de prata (A) Biomassa da cianobactéria liofilizada. (B) Extrato em infusão (C) Filtração a vácuo (D) Extrato filtrado. **Fonte:** Própria autoria

Posteriormente, foi adicionado volume suficiente de água Mili-Q® para cobrir o material liofilizado, permanecendo em repouso por 24 horas (Fig. 5B). Em seguida, o extrato foi filtrado através de sistema de filtração a vácuo, com membrana de porosidade 0.22 µm (Kasvi®) (Fig. 5C). Após a filtração, o extrato foi mantido a 8°C até a utilização para a síntese de nanopartículas.

3.1.3 BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Inicialmente foram realizados testes com proporções de extrato com contrações que variam entre 1%, 5% e 10%. O AgNO₃ foi utilizado a 6mM ((51mg/mL), tempo de síntese de 45 min e temperatura 70 °C conforme exemplificados nas tabelas de 1 a 6.

Tabela 1: Teste 10:10

Proporção Ex+AgNO ₃	Extrato (%)	AgNO ₃ (mM)	pH Extrato	Tempo (h)	Temperatura	Formação de AgNPs
10:10	1%	6mM	8,5	45min	70 ^o	não
10:10	5%	6mM	8,5	45min		sim
10:10	10%	6mM	8,5	45min		sim

Tabela 2: Teste 6:17

Proporção Ex+AgNO ₃	Extrato (%)	AgNO ₃ (mM)	pH Extrato	Tempo (h)	Temperatura	Formação de AgNPs
6:17	1%	6mM	8,5	45min	70 ⁰	não
6:17	5%	6mM	8,5	45min		não
6:17	10%	6mM	8,5	45min		não

Tabela 3: Teste 6:19

Proporção Ex+AgNO ₃	Extrato (%)	AgNO ₃ (mM)	pH Extrato	Tempo (h)	Temperatura	Formação de AgNPs
6:19	1%	6mM	8,5	45min	70 ⁰	sim
6:19	5%	6mM	8,5	45min		sim
6:19	10%	6mM	8,5	45min		não

Tabela 4: Teste 1:19

Proporção Ex+AgNO ₃	Extrato (%)	AgNO ₃ (mM)	pH Extrato	Tempo (h)	Temperatura	Formação de AgNPs
1:19	1%	6mM	8,5	45min	70 ⁰	sim
1:19	5%	6mM	8,5	45min		sim
1:19	10%	6mM	8,5	45min		sim

Após todos esses testes, padronizamos a metodologia na proporção 1:19. A biossíntese das AgNPs foi então realizada utilizando 1mL de nitrato de prata PA (AgNO₃) a uma concentração de 6 mM e 19 mL do extrato aquoso da cianobactéria a 10%, com pH 8,5, sem ajustes. O extrato aquoso a 10% foi colocado em um becker de 25mL e aquecido em placa aquecedora até atingir 70°C. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de nitrato de prata (AgNO₃), com agitação constante por uma hora (Fig. 4C).

3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

3.2.1. ESPECTROSCOPIA DO UV-VISÍVEL

As AgNPs sintetizadas foram analisadas utilizando o Espectrofotômetro UV-Visível modelo V-M5 da BEL Engineering®. Para garantir a precisão da leitura, o equipamento foi calibrado com água ultrapura (Mili-Q), que foi utilizada nas leituras subsequentes. As medições

foram realizadas em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm, e os espectros de absorção foram registrados no intervalo de comprimento de onda de 200 a 700 nm.

Na análise por espectrofotometria UV-Vis, espera-se observar um espectro de absorção que indique a presença e estabilidade das nanopartículas de prata na solução. O resultado chave é a banda plasmônica de superfície, que se manifesta como um pico de absorção devido à ressonância dos elétrons de condução na superfície das nanopartículas quando excitados pela luz (Johnson et., 2024) Para as nanopartículas de prata, essa banda normalmente aparece entre 400 e 450 nm, e sua posição e intensidade fornecem informações valiosas sobre o tamanho, forma e distribuição das partículas. Um pico bem definido e simétrico indica uma distribuição uniforme de tamanhos e uma síntese eficiente (Karimi et al., 2024).

Cada metal apresenta uma banda plasmônica em uma faixa específica de comprimento de onda, de acordo com suas propriedades eletrônicas. Por exemplo, nanopartículas de ouro (Au) têm um pico entre 520 e 530 nm, enquanto o cobre (Cu) exibe uma banda entre 560 e 580 nm. A AgNP se diferencia por apresentar um pico mais agudo e em uma região mais baixa do espectro, o que facilita sua identificação (Sathiyaraj et al., 2023).

Assim, o principal resultado esperado é um pico de absorção claro na faixa de 400 a 450 nm, confirmando a presença das AgNPs. A nitidez e simetria desse pico podem indicar a uniformidade das partículas, enquanto alterações na banda plasmônica podem sugerir mudanças na estabilidade ou interações com outras substâncias.

3.2.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRASMISSÃO E ESPECTROSCOPIA POR DISPERSÃO DE ENERGIA

A técnica de contrastação negativa para Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) foi utilizada neste estudo para a avaliação do tamanho (diâmetro) das nanopartículas biossintetizadas. No Laboratório de Microscopia da Fiocruz-Bahia, as amostras foram previamente preparadas colocando-se uma gota (10µL) sobre uma grade de níquel recoberta por formvar a 0,5% (Souza, 2007). Após dois minutos, foi retirado o excesso da gota com o auxílio de um papel filtro (Fig. 6)

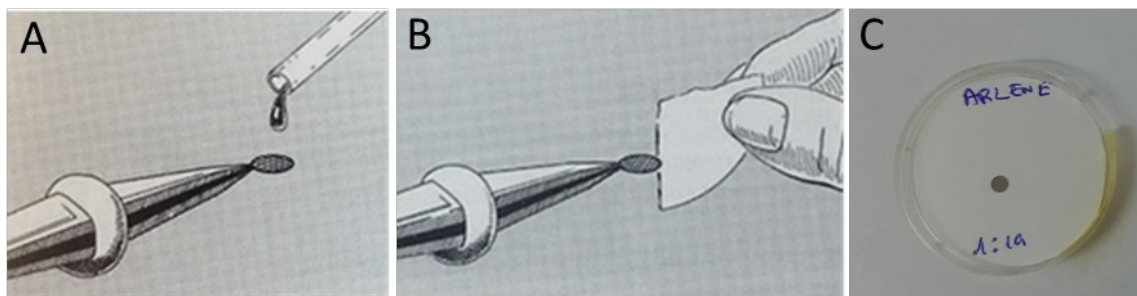


Figura 6: Processo de contrastação negativa das AgNPs. (A) AgNPs gotejada na grade (B) Secagem da grade (C) Grade pronta para análise. **Fonte:** Souza, 2007 (A e B) / Própria autoria (C)

A grade permaneceu em placa de Petri até a realização das análises no Laboratório Alume da Universidade Federal da Bahia (UFBA). As imagens foram obtidas com o auxílio de um microscópio eletrônico de transmissão (JEM-2800 JEOL® - 200kv JEOL, Tóquio, Japão) equipado com um espectrômetro de raios-x por energia dispersiva (EDS) da OXFORD instrumentos, o qual realizamos as análises de EDS para análise química elementar.

O histograma de distribuição de frequência para determinar o tamanho das (AgNPs) foi gerado utilizando o software Image J. Aproximadamente 30 micrografias foram carregadas no programa, que foi calibrado de acordo com a escala de cada imagem. As partículas foram selecionadas automaticamente pelo software, iniciando a contagem e medição das partículas para a criação do histograma.

3.2.3. ESPELHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS) E POTENCIAL ZETA

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) mede o diâmetro hidrodinâmico (D.h), que reflete o tamanho médio das partículas em suspensão, incluindo a camada de solvente ao seu redor, a partir das flutuações na intensidade da luz espalhada, causadas pelo movimento browniano. O diâmetro médio (d.m) corresponde à média desses diâmetros, e espera-se que nanopartículas de prata (AgNPs) tenham um (d.m) na faixa de alguns a dezenas de nanômetros, dependendo das condições de síntese. O índice de polidispersão (PdI) indica a uniformidade da distribuição de tamanhos, com valores baixos sugerindo uma amostra monodispersa e valores altos, uma amostra polidispersa (Barzinjy et al., 2020).

A técnica de Potencial Zeta é amplamente utilizada na caracterização de nanopartículas para medir a magnitude da carga elétrica presente na superfície dessas partículas quando suspensas em um líquido. Essa medida é essencial para entender a estabilidade das suspensões

coloidais e o comportamento de agregação das nanopartículas em soluções (Abdelghany et al., 2018)

A medição é sensível à temperatura, e a padronização a 25°C garante a consistência dos resultados. As medições, realizadas em triplicata, foram realizadas a 25°C utilizando-se 100 µL da amostra diluída em 900 µL de água para injeção (Fresenius Kabi, Alemanha), disposta na cubeta DTS 1070 do Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Zen 3600, Reino Unido).

3.2.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A técnica de FTIR baseia-se nas vibrações dos átomos em uma molécula quando se incide radiação eletromagnética na faixa do infravermelho (4000 – 400 cm^{-1}). A radiação absorvida por uma molécula é, então, convertida em energia de vibração, a qual é registrada por um espectrômetro na forma de bandas de absorção e utilizada para fornecer evidências da presença de grupo funcionais na estrutura orgânica (Gentle et al., 2020).

Em uma análise de FTIR, espera-se observar a presença de bandas de absorção em diferentes regiões do espectro, que correspondem às vibrações características de grupos funcionais presentes na amostra. Cada grupo funcional tem uma faixa específica de absorção no infravermelho, e essas bandas indicam como os átomos dentro das moléculas vibram ao absorver a radiação infravermelha (Kavitha et al., 2020).

Por exemplo:

- C-H (ligação de carbono-hidrogênio) pode aparecer na região de 3000-2850 cm^{-1} .
- O-H (grupo hidroxila) costuma aparecer na região de 3650-3200 cm^{-1} .
- C=O (carbonila) tem uma absorção característica em torno de 1750-1700 cm^{-1} .

A análise das bandas de absorção permite identificar os grupos funcionais presentes na amostra, confirmando a composição química e fornecendo informações sobre a estrutura molecular da substância estudada. Portanto, espera-se observar um padrão de bandas que pode ser correlacionado com a presença de diferentes grupos funcionais, fornecendo uma impressão digital da amostra analisada. Para esta análise utilizou-se o equipamento Nicolet iS10 FTIR Spectrometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA), com adição de três gotas (~50 µL/gota) por amostra para realização da leitura.

3.3. BIOENSAIOS ANTIMICROBIANOS

3.3.1. MICRORGANISMOS TESTADOS

Os microrganismos testados foram classificados em: (I) Bactérias Gram-positivas - *Bacillus cereus* (CCT 0096), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); (II) Bactérias Gram-negativas - *Escherichia coli* (ATCC 94863) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 94863); e (III) Fungos - *Candida albicans* (ATCC18804) e *Candida glabrata* (CCT 0728).

3.3.2. MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Os testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos foram realizados por método de microdiluição em caldo (Balouiri et al. 2016), com modificações Lopes Santos et al., 2023 a fim de verificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada amostra contra os microrganismos (I) Bactérias Gram-positivas: *Bacillus cereus* (CCT 0096), *B. subtilis* (ATCC 6633) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); (II) Bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 94863) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 94863); e (III) Fungos *Candida albicans* (ATCC18804) e *C. glabrata* (CCT 0728). As culturas dos microrganismos foram mantidas em meios de cultivo adequados, sendo ágar nutriente (Acumedia) para as bactérias e ágar de levedura e malte (Acumedia) para os fungos. O período de incubação foi de 24 horas (37°C) para as bactérias e de 72 horas (26°C) para os fungos. As linhagens foram adquiridas da Fundação de Cultura Tropical André Tosello, Campinas, São Paulo.

As diluições sucessivas foram realizadas em microplacas de 96 poços (Fig. 7), de fundo chato, com as cepas bacterianas e fúngicas. Cada poço da primeira fileira horizontal continha um volume final de 200 µL, composto por 100 µL do meio de cultivo caldo nutriente para bactérias e/ou caldo de levedura e malte para fungos (Acumedia), em todos os poços, seguido pela adição de 100 µL das soluções estoque das amostras nos poços da fileira A, em triplicata. Fez-se uma diluição seriada, com transferência de 100 µL, da fileira A para B, sucessivamente, até a fileira H. Em seguida, 100 µL da suspensão do microrganismo, ajustada para escala 0.5 de McFarland, foi distribuída em todos os poços da placa.

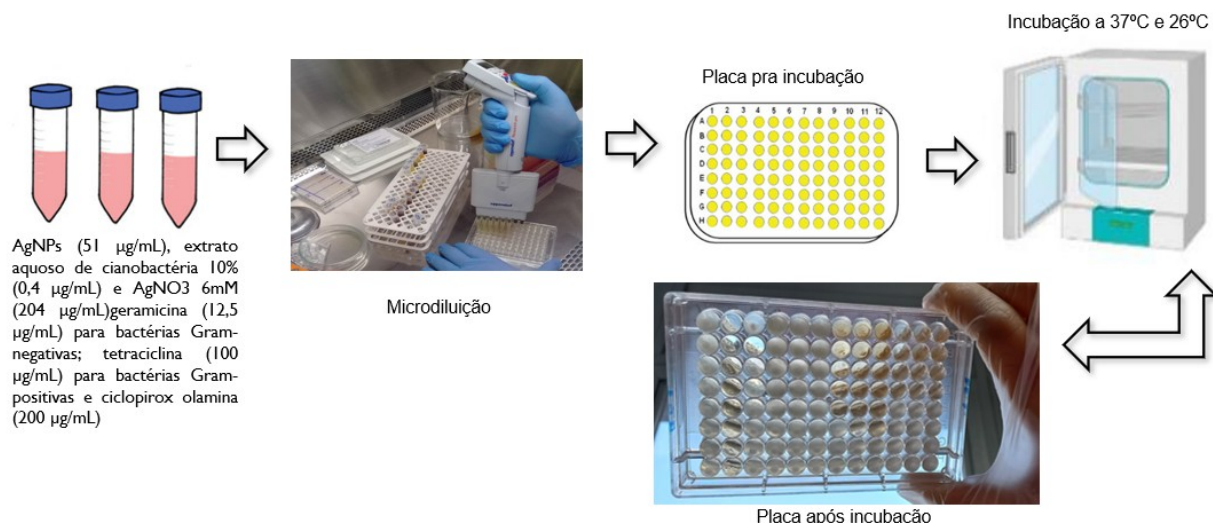


Figura 7: Esquema exemplificando as etapas do ensaio antimicrobiano. **Fonte:** Própria autoria

As concentrações das soluções estoque foram as seguintes: AgNPs (51 $\mu\text{g/mL}$), extrato aquoso de cianobactéria 10% (0,4 $\mu\text{g/mL}$) e AgNO_3 6mM (204 $\mu\text{g/mL}$). Os antibióticos empregados foram geramicina (concentração da solução estoque: 12,5 $\mu\text{g/mL}$) para bactérias Gram-negativas; tetraciclina (concentração da solução estoque: 100 $\mu\text{g/mL}$) para bactérias Gram-positivas e ciclopirox olamina (concentração da solução estoque: 200 $\mu\text{g/mL}$) para fungos. As placas foram colocadas em uma estufa (SolidSteel) e incubadas a 37°C por 24 horas para as bactérias e a 26°C por 72 horas para os fungos. Após o período de incubação, as placas foram examinadas para determinar a concentração inibitória mínima de amostra. Cada experimento foi repetido em triplicata para garantir a precisão dos resultados.

3.3.3. CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (MBC)

Ao identificar a inibição de crescimento em determinados poços, as soluções desses poços foram retiradas e semeadas em meio ágar nutriente para bactérias, e ágar de levedura e malte para fungos (Fig. 8). As bactérias foram incubadas a 37°C por 24 horas, enquanto os fungos foram incubados a 26°C por 72 horas.

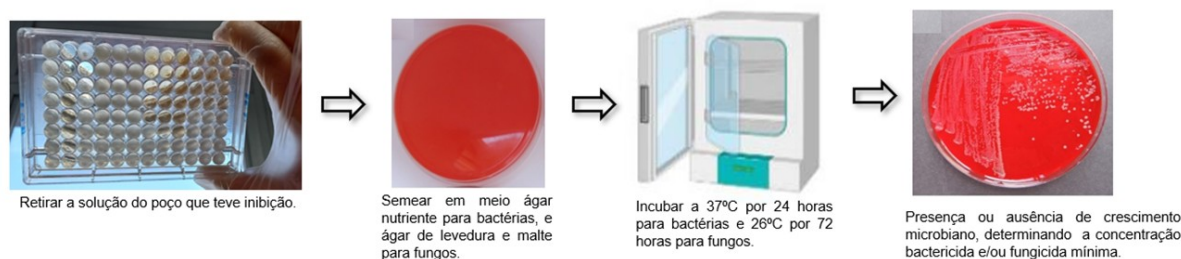


Figura 8: Esquema exemplificando as etapas de determinação da concentração bactericida mínima para bactérias e fungos. **Fonte:** Própria autoria.

Em seguida, as placas foram examinadas para determinar a presença ou ausência de crescimento microbiano e determinar a concentração bactericida e/ou fungicida mínima.

3.4. TESTE DE CITOTOXICIDADE CELULAR

3.4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando-se as linhagens de células J774 (macrófagos murinos) e MRC5 (fibroblastos de pulmão humano) obtidas da *American Type Culture Collection* - ATCC (Rockville, Maryland, U.S.A.). As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de cultura (75 cm³) no meio Eagle modificado por Dulbecco em pH 7,2~7,4 (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), suplementado com 10% de soro bovino fetal (GIBCO) e 50 µg/mL de gentamicina (GIBCO).

3.4.2 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE COM ALAMAR BLUE

A avaliação da citotoxicidade dos compostos testados e a determinação do valor da concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀), foi realizado através do método colorimétrico Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA). Nesse ensaio, baseado em Silva et al., (2018), as células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade pré-definida de 1 x 10⁴ células por poço (Fig. 9). As AgNPs, o extrato aquoso da cianobactéria, o AgNO₃ a 6mM e o controle positivo (DOX; doxorubicina) foram adicionados em uma série de 8 concentrações (400 µg/mL; 200 µg/mL; 100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL; 3,12 µg/mL;), com exceção da doxorubicina, que foi utilizada em concentrações variando de 0,08 a 10 µg/mL. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

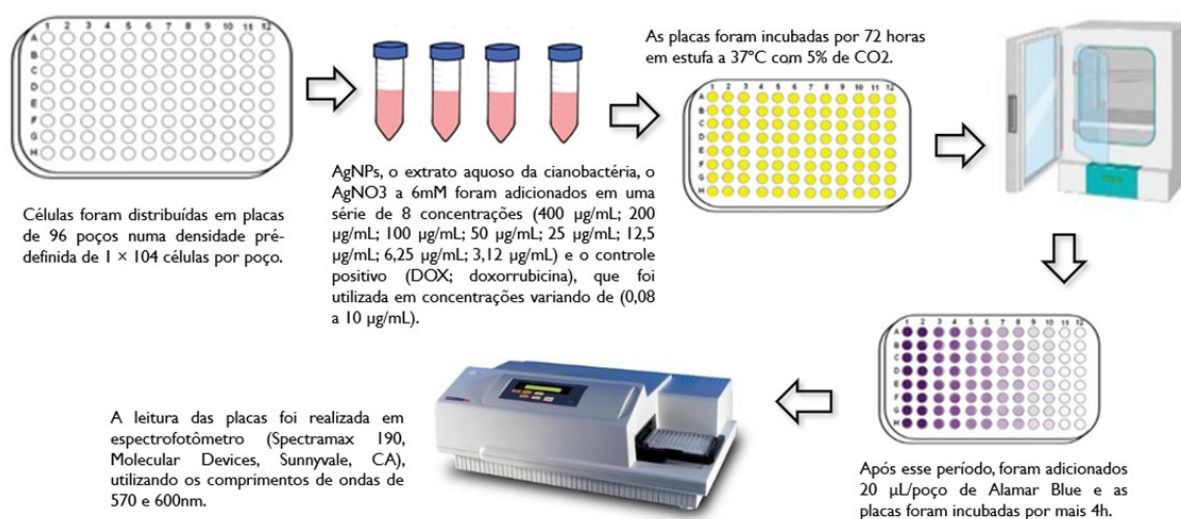


Figura 9: Esquema exemplificando as etapas do teste de citotoxicidade celular. **Fonte:** Própria autoria.

Após esse período, foram adicionados 20 $\mu\text{L/poço}$ de Alamar Blue e as placas foram incubadas por mais 4h. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), nos comprimentos de ondas de 570 e 600 nm. Após a execução dos experimentos, foram calculados os valores de concentração inibitória para 50% das células normais (CC_{50}) utilizando dados obtidos de três experimentos independentes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

A cianobactéria coletada foi identificada como *Affixifilum granulosum* (Caires et al., 2018; Lefler et al., 2021 e Strunecký et al., 2023) por apresentar talo formando massas cespitosas densas e epilíticas em poças de maré (Fig. 10A). Os filamentos são predominantemente retos a ondulados, apresentando média de 26,6 μm de diâmetro, bainha hialina, delgada ou espessa, às vezes lamelada (Fig. 10B). Os tricomas com diâmetro médio de 14,0 μm , levemente constritos e comumente atenuados, com células discoides apresentando comprimento médio de 2,72 μm e célula apical arredondada.

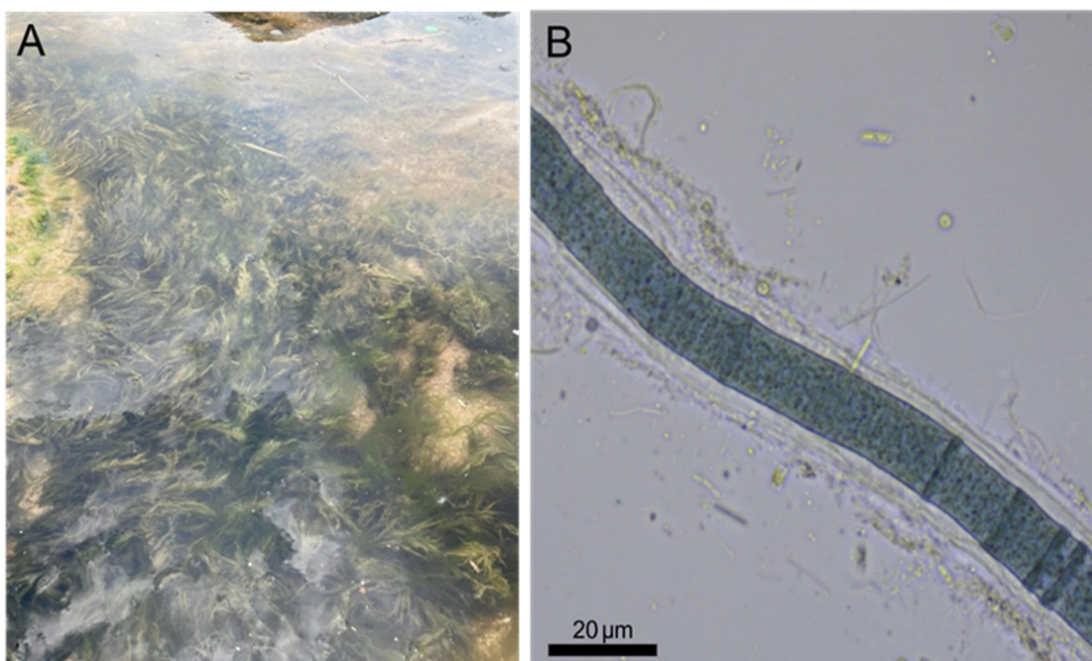


Figura 10: (A) Poça de maré, com cianobactérias apresentando talos formando massa densa; (B) Micrografia em campo claro do filamento. **Fonte:** Própria autoria.

4.2 BIOSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

O extrato aquoso das cianobactérias apresentaram uma coloração púrpura (Fig. 11A) devido à presença de ficobiliproteínas. Após a adição de AgNO_3 e a reação de síntese, observou-se uma mudança na cor da solução, que passou de púrpura para marrom claro (Fig. 11B).

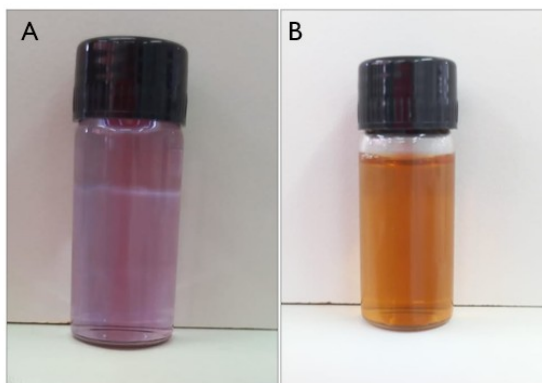


Figura 11: (A) Extrato da cianobactéria; (B) Solução obtida após o processo de síntese das AgNPs. **Fonte:** Própria autoria.

Essa alteração na coloração foi a primeira evidência da formação das nanopartículas de prata (AgNPs), que em estado coloidal e formato esférico exibem coloração amarela ou marrom em concentrações elevadas (Hamouda et al., 2019; Abo-Shama et al., 2020).

A primeira técnica analítica para se investigar a formação das nanopartículas foi a espectroscopia UV-Vis. Na figura 12 apresenta-se um gráfico de absorbância da amostra obtida pela síntese na proporção 10:10, utilizando 10 mL de extrato nas concentrações de 1%, 5% e 10%, e 10 mL de AgNO_3 a 6 mM (51 mg/mL).

No espectro de absorbância (Fig. 12A), a curva na cor preta não apresentou pico na faixa de comprimento de onda de 410 nm, indicando que não houve formação de AgNPs quando o extrato foi utilizado a 1%. Já o espectro na cor verde (Fig. 12A) exibiu um pico de comprimento de onda entre 410 e 430 nm, confirmando a formação de AgNPs com o extrato a 5%. Por sua vez, o espectro representado pela cor laranja (Fig. 12A), mostrou um pico na faixa de 450 a 470 nm, indicando a formação de AgNPs com o extrato a 10%.

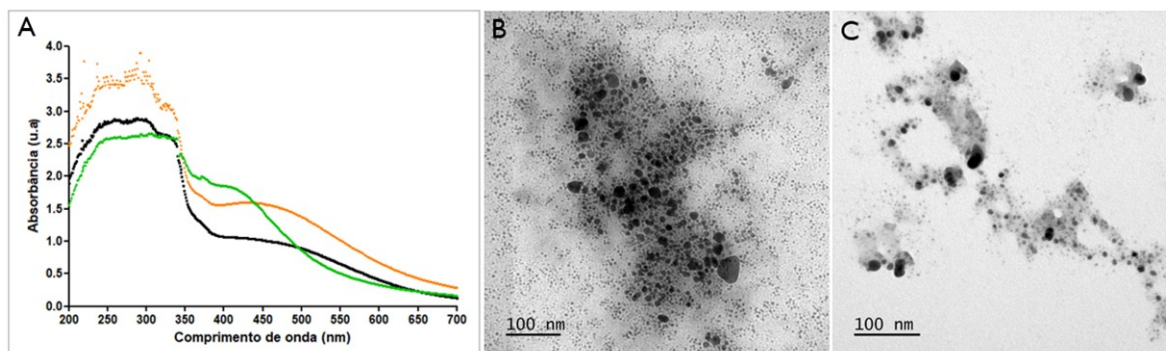


Figura 12: (A) Gráfico de UV-visível mostrando as sínteses na proporção 10:10 (B) Micrografia das AgNPs 10:10 Ex5% (C) Micrografia das AgNPs 10:10 Ex10%. **Fonte:** Própria autoria

Os picos de comprimento de onda na faixa de 430 a 470 nm indicam a formação de

AgNPs maiores e mais agregadas, como evidenciado pelas micrografias (Figs. 12B e 12C). Ao compararmos as imagens de TEM, a síntese realizada com o extrato a 5% resultou em partículas com tamanho médio de 96,29 nm e desvio padrão de 178,73. Já a síntese com o extrato a 10% apresentou um tamanho médio de 81,26 nm e desvio padrão de 97,66. Observa-se que, com o extrato a 10%, as partículas estão um pouco mais dispersas, com menores médias e desvios padrões, sugerindo uma distribuição de tamanho mais homogênea.

O gráfico apresentado (Fig. 13) ilustra a síntese AgNPs realizada na proporção de 6:19, utilizando 19 mL de extrato nas concentrações de 1%, 5% e 10%, e 6 mL de AgNO_3 a 6 mM (51 mg/mL).

O espectro de absorbância, representado pela cor verde (Fig. 13A), não exibiu pico de comprimento de onda na faixa de 410 nm, indicando que não houve formação de AgNPs com o extrato a 10%. Já o espectro na cor vermelha (Fig. 13A), apresentou um pico na faixa de 410nm, sugerindo a formação de AgNPs com o extrato a 5%. E o espectro de absorbância na cor preta (Fig. 13A), mostrou um pico de comprimento de onda entre 420 e 450nm, confirmando a formação de AgNPs com o extrato a 1%.

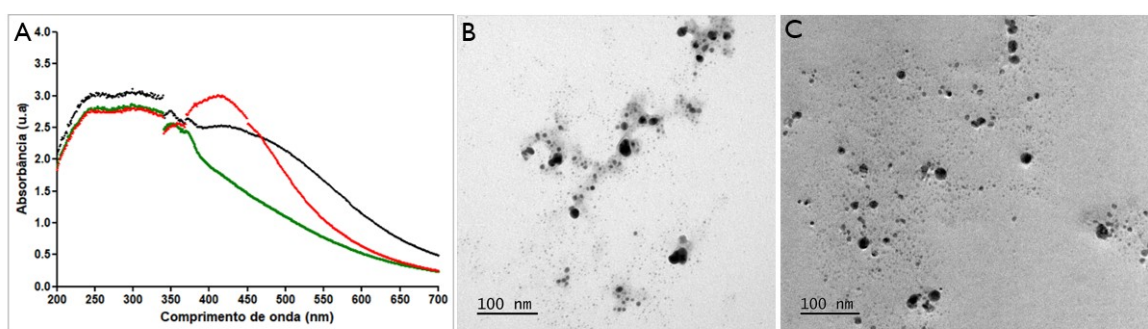


Figura 13: (A) Gráfico de UV-visível mostrando as sínteses na proporção 6:19 (B) Micrografia das AgNPs 6:19 Ex5% (C) Micrografia das AgNPs 6:19 Ex1%. **Fonte:** Própria autoria

Apesar de o pico de comprimento de onda na cor vermelha apresentar 410nm, a micrografia (Fig. 13B) revela que as AgNPs ainda estão agregadas, com um tamanho médio de 80,40 nm e desvio padrão de 121,07. Por outro lado, a micrografia (Fig. 13C) mostra partículas mais dispersas, com um tamanho médio de 58,08 nm e desvio padrão de 74,16. Nesta síntese, a utilização do extrato a 1% resultou em partículas menores e mais uniformes em comparação com o extrato a 5%.

O gráfico representado (Fig. 14) mostra a síntese das AgNPs realizada na proporção

de 1:19, utilizando 19 mL de extrato nas concentrações de 1%, 5% e 10%, e 1 mL de AgNO_3 a 6 mM (51 mg/mL). O espectro de absorbância, indicado pela cor verde (Fig. 14A), apresentou um pico de comprimento de onda na faixa de 410 nm, confirmando a formação de AgNPs com o extrato na concentração de 10%. Já o espectro de absorbância representado pela cor vermelha (Fig. 14A) também mostrou um pico na faixa de 410 nm, correspondendo à formação de AgNPs com o extrato a 5%. E o espectro de absorbância na cor preta (Fig. 14A) exibiu um pico de comprimento de onda na faixa de 420 nm, referente à síntese das AgNPs com o extrato a 1%.

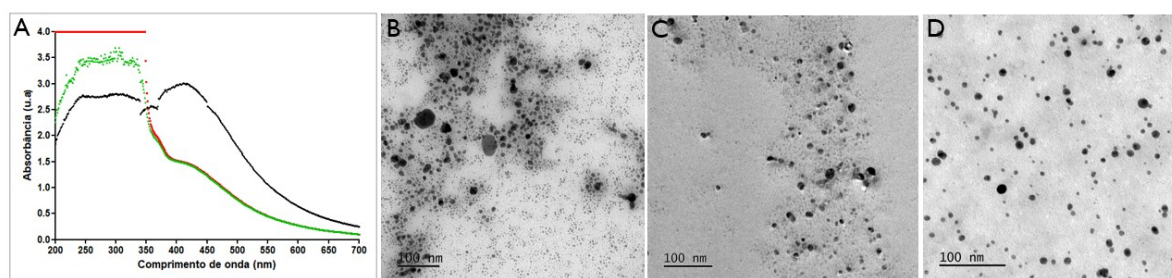


Figura 14: (A) Gráfico de UV-visível mostrando as sínteses na proporção 1:19 (B) Micrografia das AgNPs 1:19 Ex1% (C) Micrografia das AgNPs 1:19 Ex5%. (D) Micrografia das AgNPs 1:19 Ex10%. **Fonte:** Própria autoria

A micrografia apresentada na (Fig. 14D), obtida com comprimento de onda de 410 nm, representado pela cor verde (Fig. 14A), utilizou extrato na concentração de 10%. Nessa condição, AgNPs se mostraram dispersas, com formato esférico, e apresentaram um tamanho médio de 20,26 nm e desvio padrão de 21,9, demonstrando valores homogêneos.

Por outro lado, a micrografia (Fig. 14B), que também apresentou um pico de comprimento de onda de 410 nm representado pela cor vermelha (Fig. 14A), utilizando extrato a 1% revelou AgNPs agregadas, com tamanho médio de 53,11nm e desvio padrão de 68,09. Já na micrografia da (Fig. 14C), com comprimento de onda de 420 nm representado pela cor preta (Fig. 14A), utilizando extrato a 5% observou-se um tamanho médio de 42,01nm e desvio padrão de 103,6, indicando uma maior variação no tamanho das AgNPs.

Com base nas análises realizadas, a utilização do extrato a 10% foi selecionada devido à menor média e desvio padrão observados no tamanho das AgNPs. Esse critério foi decisivo para padronizar a síntese utilizando a proporção de 1:19, a qual apresentou resultados mais consistentes, com um tamanho médio de 20,26 nm e desvio padrão de 21,9, indicando uma distribuição de tamanho uniforme das AgNPs. A partir dessa padronização, iniciou-se as análises de potencial zeta, DLS e FTIR, além de um estudo mais detalhado das imagens obtidas por MET.

O potencial zeta é geralmente utilizado para determinar a carga de superfície e a

estabilidade das AgNPs (Sizochenko et al., 2021). O gráfico (Fig. 15) mostra uma distribuição unimodal, um único pico, indicando que as nanopartículas possuem uma distribuição de carga relativamente uniforme em torno de um valor central de potencial zeta. O pico principal está localizado em torno de -19,31 mV, o que sugere que a superfície das AgNPs possui uma carga negativa.

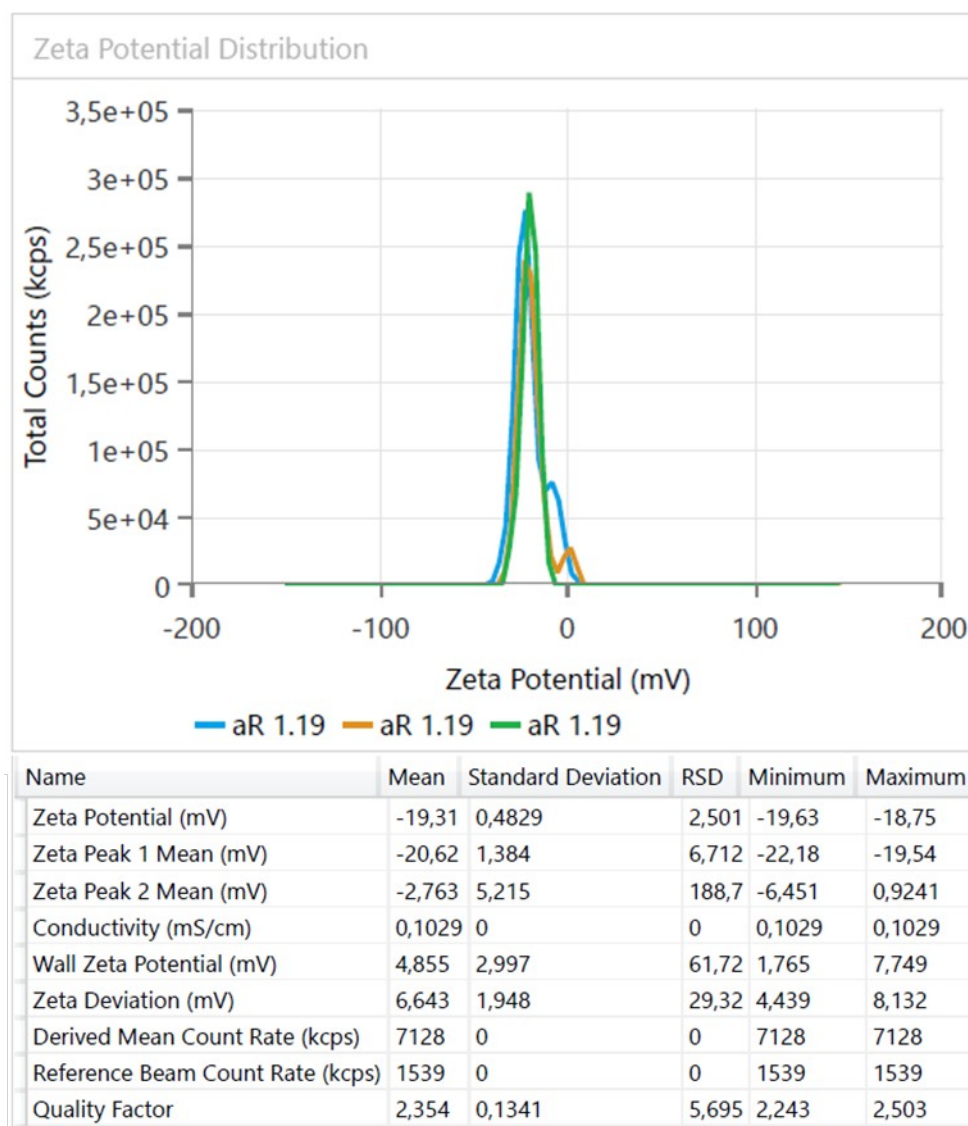


Figura 15: Gráfico de Potencial zeta com valores de carga de superfície. **Fonte:** Própria autoria

O valor negativo do potencial zeta é comum em AgNPs estabilizadas por biomoléculas, devido à presença de grupos funcionais carregados negativamente por exemplo, grupos carboxilatos ou sulfatos (Singh et al., 2024). Em termos de estabilidade coloidal, valores de potencial zeta acima de ± 30 mV indicam alta estabilidade, pois as partículas tendem a repelir-se mutuamente, prevenindo a agregação. Valores entre ± 20 mV e ± 30 mV indicam estabilidade

moderada, e valores abaixo de ± 20 mV indicam baixa estabilidade (Druzian et al. 2023, Badawy et al. 2011).

Com um potencial zeta de -19,31 mV, as nanopartículas podem ser consideradas moderadamente estáveis, mas há um risco maior de agregação em comparação com partículas com potenciais zeta mais altos. A carga superficial negativa de -19,31 mV sugere uma barreira eletrostática reduzida, o que pode facilitar a penetrabilidade das AgNPs em estruturas celulares (Singh et al. 2024).

Os resultados obtidos da análise por DLS indicam que as AgNPs apresentaram um tamanho médio um tamanho médio de 145,6 nm com uma distribuição polidispersa. A maior parte das partículas está concentrada em torno de 89,22 nm, representa no gráfico (Fig.16), mostrando uma distribuição de intensidade com um pico único e bem definido, indicando que a maioria das AgNPs tem um tamanho concentrado em torno do valor observado. A ausência de outros picos sugere uma distribuição homogênea.

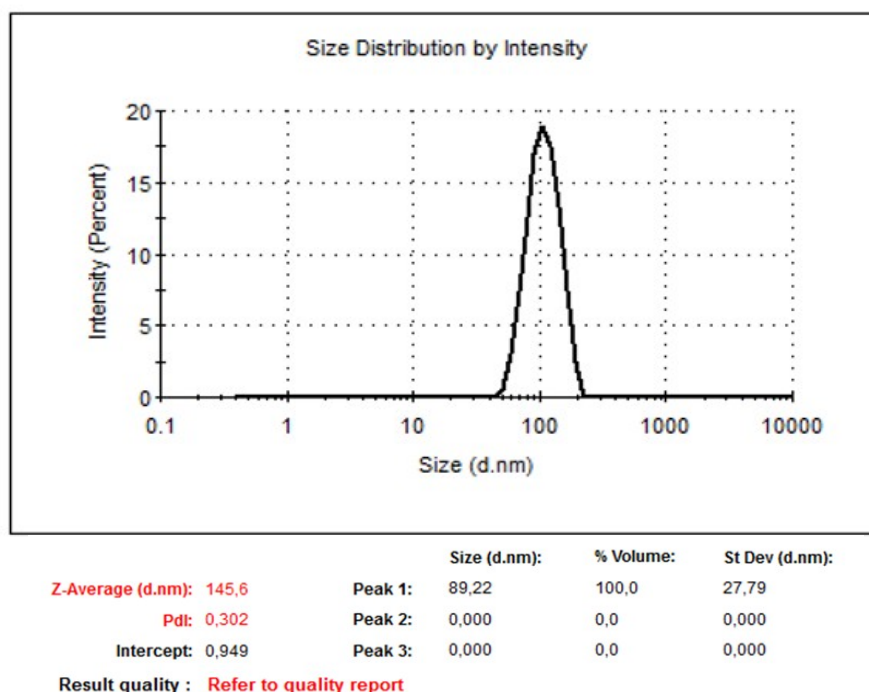


Figura 16: Gráfico de DLS com distribuição do tamanho médio das nanopartículas de prata. **Fonte:** Própria autoria.

O Pdl é uma medida da largura da distribuição do tamanho das partículas. Um valor de Pdl menor que 0,1 indica uma distribuição monodispersa, enquanto valores maiores indicam uma distribuição polidispersa (Greulich et al. 2011).

Os resultados obtidos pela técnica de FTIR permitiram identificar a presença de

potenciais grupos funcionais (Fig. 17). O extrato da *Affixifilum cf. granulosum*, destacado em vermelho na (Fig. 17), exibiu um pico de absorção entre 500-1000 cm^{-1} , característicos dos grupos funcionais presentes no extrato, como O-H (hidroxilas), C=O (carbonilas) e N-H (amidas).

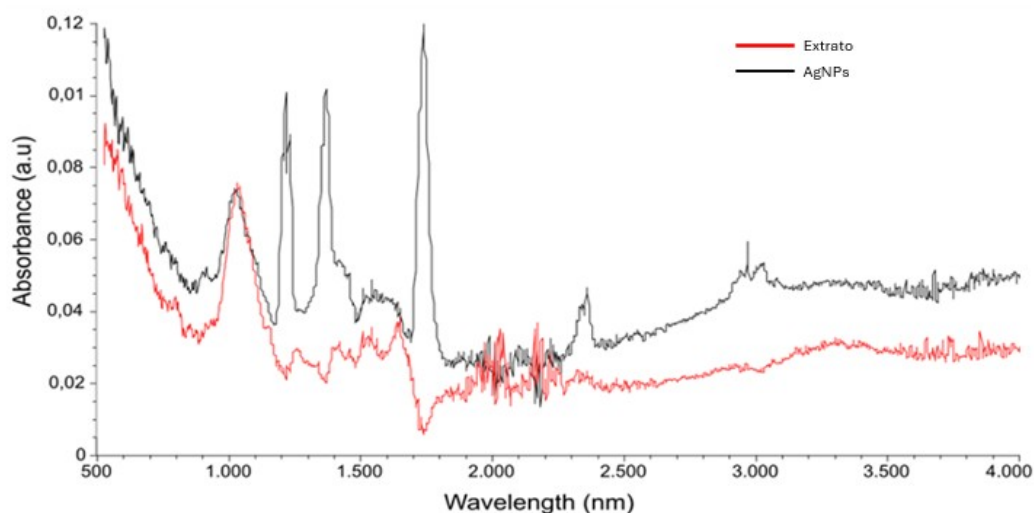


Figura 17: Espectros no infravermelho com transformada de Fourier do extrato aquoso da *Affixifilum granulosum* sobreposto ao das nanopartículas de prata, em vermelho o espectro do extrato e em preto o espectro da AgNPs.

Fonte: Própria autoria.

As AgNPs representadas pela cor preta apresentaram picos de absorção na faixa de 1500-1700 cm^{-1} , picos nesta região são típicos de estiramentos de C=O (carbonilas) ou C=C em compostos aromáticos. É comum observar uma redução ou deslocamento destes picos após a formação das AgNPs, indicando que esses grupos estão envolvidos na redução do íon prata. Comparando o pico de absorção entre 500-1000 cm^{-1} do extrato, com a das AgNPs, sugere que grupos funcionais do extrato podem atuar na redução do íon prata (Ag^+) para prata metálica (Ag^0) e podem estabilizar as AgNPs formadas. (Abo-Shama et al., 2020, Madhuri et al., 2018, Singh et al., 2021).

Nas análises realizadas por MET, as AgNPs apresentaram morfologias esféricas (Fig. 18A), distribuídas em tamanhos entre 5 e 21 nm de diâmetro, como demonstrado pelo histograma de distribuição de frequência (Fig. 18B). Resultados semelhantes foram obtidos por (Hamouda et al., 2019 e Pandey et al., 2020) as AgNPs se apresentaram esféricas, com diâmetros que variaram de 3,30 a 17,97 nm, demonstrando que quanto menor o diâmetro da partícula melhor a capacidade de penetrabilidade em membranas celulares.

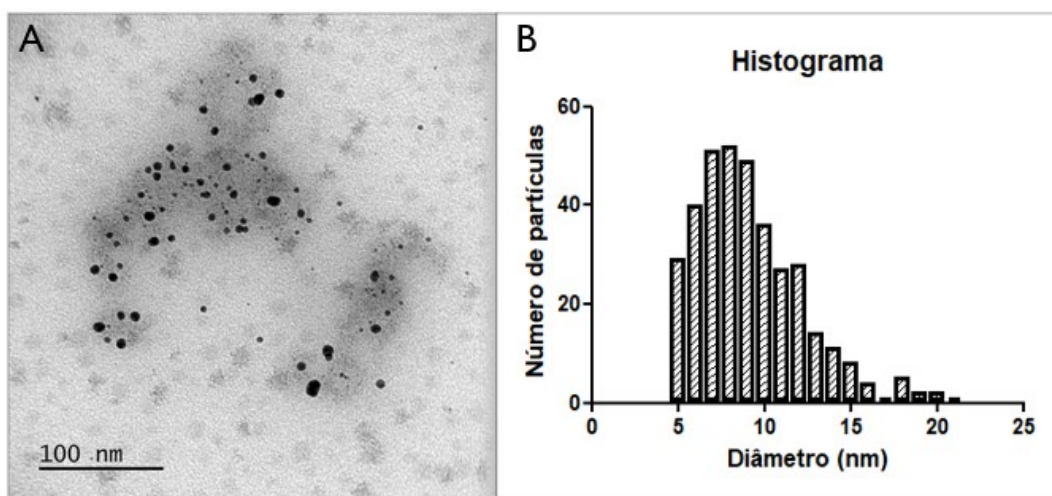


Figura 18: (A) Micrografia da AgNPs por microscopia eletrônica de transmissão mostrando partículas esféricas; (B) Histograma de distribuição de frequência das AgNPs. **Fonte:** Própria autoria.

A composição química das AgNPs, caracterizada por espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS), permite destacar as linhas de emissão da prata elementar (Ag): $L\alpha_1$ e $L\beta_{1/2}$, centradas em torno de 3keV, e as linhas $K\alpha_{1/2}$ e $K\beta_1$, centradas em torno de 22 e 25 keV (insert), além disso, vê-se picos de emissão relacionados a outros elementos e alguns reagentes utilizados na síntese (Fig. 19A).

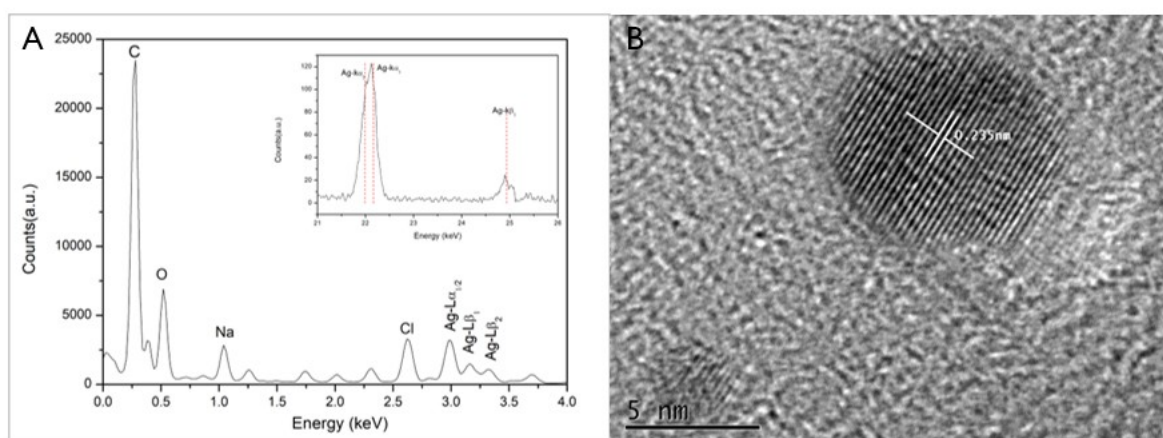


Figura 19: (A) Espectro de emissão de raios-x determinado por EDS. Destaque para as emissões $L\alpha_1$ e $L\beta_{1/2}$ em torno de 3 kv. (B) Micrografia de alta resolução (HTEM) das AgNP. Em detalhe distância interplana atômica de 0,235 nm relacionada aos planos (111). **Fonte:** Própria autoria

Essa análise de alta resolução revelou uma estrutura monocristalina de rede FCC das AgNPs

sintetizadas, conforme ilustrado na (Fig. 19B).

4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para cada substância testada estão resumidos na Tabela 5. Os valores para AgNPs demonstraram uma MIC de 6,3 µg/mL tanto para bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*), quanto para Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*). Para as cepas Gram-positivas de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, assim como para a cepa Gram-negativa *Escherichia coli*, a MIC observada foi de 12,7 µg/mL. Ao analisarmos o extrato aquoso a 10%, todos os valores de MIC foram >0,1 µg/mL, evidenciando que não teve efeito nessa concentração testada. Além disso, é interessante observar que nas cepas fúngicas *Candida glabrata* e *C. albicans*, a CIM das AgNPs foi de 12,75 µg/mL, sugerindo atividade antifúngica. É importante mencionar que esse valor é menor em comparação com o CIM do AgNO₃, indicando inibição do crescimento fúngico.

Tabela 5: Atividade antimicrobiana de nanopartículas sintetizadas através do extrato de cianobactérias expresso em Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) (µg/mL).

MIC / MBC (µg/mL)												
Amostras	Gram +				Gram -						Fungi	
	<i>Bacillus cereus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MIC
AgNPs	6.3	12.7	12.7	>6.3	12.7	>12.7	6.3	>12.7	12.7	>12.7	12.7	12.7
Extrato 10% agno ₃	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1
Ciclopirox	12.7	>25.5	12.7	>25.5	12.7	25.5	12.7	>25.5	6.3	22.5	12.7	12.7
Olamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.2	6.3
(Loprox)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geramicina	-	-	-	-	-	-	3.13	12.5	6.2	12.5	-	-
Tetraciclina	<0.2	<3.1	<0.2	<3.1	<0.2	12.5						

Faixa de concentrações testadas: AgNPs: (12,7 µg/mL–0,09 µg/mL); Extrato 10%: (0,1 µg/mL–0,0005 µg/mL); AgNO₃: (51 µg/mL–0,39 µg/mL); Gentamicina (12,5 µg/mL–1,5 µg/mL) para bactérias Gram-negativas; Tetraciclina (100 µg/mL–0,75 µg/mL) para bactérias Gram-positivas; Ciclopirox Olamina (200 µg/mL–1,5 µg/mL) para fungos, (>) não teve efeito na mais alta concentração testada.

Quando comparados os valores de MIC das AgNPs com o Ag⁺, infere-se que a MIC de 12,7 µg/mL apresentado pelo Ag⁺ foi efetivo na inibição do crescimento microbiano. No

entanto, os valores de CBM acima de 25,5 µg/mL indicam que essa concentração não foi efetiva para inibir o crescimento microbiano tanto das cepas Gram-positivas *Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *S. aureus*. Já os valores de CBM das bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli* de 25,5 µg/mL inibiram o crescimento microbiano.

Madhuri et al., 2018 e Singh et al., 2021, observaram que os efeitos antimicrobianos das AgNPs estão diretamente ligados às suas propriedades físico-químicas, incluindo tamanho e forma. Essas características desempenham um papel fundamental nos mecanismos de interação das AgNPs, permitindo que elas atravessem paredes ou membranas celulares e afetem diretamente os componentes intracelulares (Madhuri et al., 2018)

As infecções causadas por bactérias Gram-positivas, como *Bacillus cereus*, associadas à intoxicação alimentar, pode resultar em sintomas como náuseas, vômitos e diarreia. Da mesma forma, *Bacillus subtilis*, encontrado comumente no solo, pode levar a infecções em feridas e infecções respiratórias em indivíduos imunocomprometidos. *Staphylococcus aureus*, outra bactéria Gram-positiva, é conhecida por causar uma ampla gama de infecções, desde infecções cutâneas leves até infecções graves, como pneumonia e sepse (Madhuri et al., 2018 e Liao et al., 2019). O tamanho relativamente pequeno das nanopartículas permite uma interação mais eficaz com a parede celular bacteriana, resultando em uma maior permeabilidade da membrana bacteriana. Como resultado, as AgNPs podem interferir nos processos celulares bacterianos, incluindo a integridade da membrana e a função celular, o que pode levar à inibição do crescimento bacteriano e, eventualmente, à morte celular (Amini 2019).

É relevante destacar que as bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular densa composta por várias camadas de peptidoglicano, enquanto as bactérias Gram-negativas apresentam apenas uma única camada desse componente (Madhuri et al., 2018, Liao et al., 2019 e Amini 2019) A estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas age como uma barreira contra a penetração de íons Ag^+ no citoplasma. No entanto, os íons Ag^+ podem facilmente danificar a parede celular das bactérias Gram-negativas (Rodrigues et al., 2019)

4.4 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE COM ALAMAR BLUE

A tabela 6 apresenta a viabilidade celular, em percentual, para as substâncias testadas, incluindo AgNO_3 , Extrato, AgNPs e Doxorrubicina, em duas linhagens celulares diferentes: J774 e MCR-5. A CC50 (concentração citotóxica em 50%) é o valor que representa a concentração da substância necessária para induzir efeitos citotóxicos em 50% das células testadas.

Tabela 6: Avaliação da citotoxicidade celular com linhagens de macrófagos J774 e fibroblastos de pulmão MRC5.

Amostras	CC₅₀ (µg/mL) J774	CC₅₀(µg/mL) MCR-5
AgNO₃	> 400	> 400
Extrato	> 400	> 400
AgNPs	> 400	> 400
Doxorrubicina	0,3 (± 0,0)	0.52 (± 0.0)

Todos os valores representam a média ± DP e foram calculados a partir de três experimentos independentes. CC50 = concentração citotóxica a 50%. DP. = Desvio padrão

Para AgNO₃, o extrato e as AgNPs, os valores de CC50 são todos maiores que 400 µg/mL, indicando que nessas concentrações as substâncias não causaram efeitos citotóxicos significativos nas células J774 e MCR-5. Isso sugere que essas substâncias possuem baixa toxicidade nessas linhagens celulares. Por outro lado, para a Doxorrubicina, um medicamento quimioterápico amplamente utilizado, os valores de CC50 são significativamente menores: 0,3 µg/mL para J774 e 0,52 µg/mL para MCR-5. Isso indica que a Doxorrubicina é altamente citotóxica para ambas as linhagens celulares testadas, com concentrações muito baixas necessárias para causar efeitos citotóxicos em 50% das células.

Ao comparar os resultados dos ensaios de viabilidade celular com os ensaios antimicrobianos, observamos que as amostras testadas mantiveram uma viabilidade celular de 100% em relação às linhagens de macrófagos J774 e fibroblastos de pulmão MRC5. Essas observações sugerem que as AgNPs possuem propriedades antimicrobianas eficazes, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas. Esses dados sugerem que o AgNO₃, o extrato e as AgNPs têm potencial para serem usados em aplicações biológicas sem causar efeitos citotóxicos significativos, enquanto a Doxorrubicina é altamente citotóxica e deve ser usada com cautela, considerando seus potenciais efeitos adversos nas células. Além disso, a alta viabilidade celular observada nas concentrações testadas indica que as AgNPs possuem baixa citotoxicidade para as células de macrófagos e fibroblastos.

CONCLUSÃO

A utilização do extrato aquoso da cianobactéria *Affixifilum granulosum* na biossíntese das AgNPs mostrou-se eficaz no processo de síntese verde. A formação das AgNPs foi confirmada por análises espectroscópica, de microscopia eletrônica, EDS, Potencial Zeta, Dls e FTIR. As AgNPs demonstraram atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *C. glabrata*, além de exibir ação bacteriostática contra bactérias Gram-positivas, como *Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus*, e bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Além disso, as AgNPs demonstraram baixa citotoxicidade em células, não comprometendo a viabilidade de macrófagos da linhagem J774 e fibroblastos de pulmão da linhagem MRC5. Esses dados destacam a viabilidade dessas nanopartículas como alternativas antimicrobianas eficazes e com capacidade para tratar infecções fúngicas e bacterianas, ampliando o conhecimento biotecnológico das cianobactérias marinhas brasileiras, pioneiro para futuros projetos similares e para a criação de biotecnologias baseadas nessa rota verde de biossíntese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelghany, T. M., Al-Rajhi, A. M., Al Abboud, M. A., Alawlaqi, M. M., Ganash Magdah, A., Helmy, E. A., & Mabrouk, A. S. (2018). A review. *BioNanoScience*, 8, 5-16.
- Ahmed, S. A.; Gogal, R. M.; Walsh, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, v.170 (1994), p.211-224.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *Journal of radiation research and applied sciences* (2016), p.1-7.
- Aiad, M. A., Moursi, E. A., El-Dissoky, R. A. & Amer, M. M. Response of maize crop to irrigation under diferent rates and dose of nitrogen fertilization in the North Nile Delta region. *J. Soil Sci. and Agric. Eng., Mansoura Univ* 5 (2014), p.97–113.
- Albernaz, V. L. Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização fisicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico (2014).
- Alós, Juan-Ignacio. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 33.10 (2015), 692-699.
- Ameen, F.; Abdullah, M M.s.; Al-homaidan, A. A.; Al-lohedan, H. A.; Al-ghanayem, A. A.; Almansob. A Fabrication of silver nanoparticles employing the cyanobacterium *Spirulina platensis* and its bactericidal effect against opportunistic nosocomial pathogens of the respiratory tract. *Journal of Molecular Structure*, v. 1217 (2020), p.128-392.
- Amini, S.M. Preparation of antimicrobial metallic nanoparticles with bioactive compounds. *Materials Science And Engineering: C*, [S.L.] 103 (2019), p.109-809.
- Anastas, Paul T.; Warner, John C *Green chemistry: theory and practice*. [S. l.]: Oxford University Press; Revised (1998).
- Balasubramanian D, Harper L, Shopsis B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. *Pathog Dis* (2017), p.1–13.
- Balouiri, M., Moulay S., Saad K.I., Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis* 6 (2016), 71-79.
- Barzinjy, A. A., & Azeez, H. H. (2020). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *Eucalyptus globulus* Labill. leaf extract and zinc nitrate hexahydrate salt. *SN Applied Sciences*, 2 (5), 991.
- Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife* (2015), p1–12.
- Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., Caro, N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021), p.7202.

Carmichael, W. W. The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*, [S. l.], v. 270 (1994) p.78–86.

Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. *Biotechnology*. Newnes (2015).

Costa, M. et al. Marine Cyanobacteria Compounds with Anticancer Properties: A Review on the Implication of Apoptosis. *Marine Drugs*, [S. l.], v. 10 (2012), p. 2181–2207.

Cruz, P. B., Barbosa, A. F., Zeringóta, V., Melo, D., Novato, T., Fidelis, Q. C., ... & Monteiro, C. M. O. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and *spilanthol* on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Veterinary parasitology*, (2016), 137-143.

Boverhof, D.R; Bramante, C.M; Butala, J.H; Clancy, S.F; Lafranconi, M; Oeste, J; Gordon, S.C. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regul Toxicol Pharmacol*, v.73 (2016), p.137-150.

De Souza, T. A. J., Souza, L. R. R., & Franchi, L. P. Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity. *Ecotoxicology and environmental safety*, 171 (2019) p.691-700.

Da Silva, M. O.; Aquino, S. Resistência aos antimicrobianos: Uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, (2018), p.472–482

El-Naggar, N.E.A., Hussein, M.H. & El-Sawah, A.A. Bio-fabrication of silver nanoparticles by phycoerythrin, characterization, *in vitro* anticancer activity against breast cancer cell line and *in vivo* cytotoxicity. *Sci Rep* 7 (2017), p.10844.

Elgorban, A. M., Aref, S. M., Seham, S. M., Elhindi, K. M., Bahkali, A. H., Sayed, S. R., & Manal, M. A. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus versicolor* and evaluation of their activity on plant pathogenic fungi. *Mycosphere*, 7 (2016), p.844-852.

El-Sheekh MM, El-Kassas HY. Application of biosynthesized silver nanoparticles against a cancer promoter cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Asian Pac J Cancer Prev* (2014) p.6773.

Epple. M, Köller. M. Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles, *Acta Biomaterialia*, (2011)

Faraday, M. The Bakerian Lecture. Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, (1857), p.145-181.

Freire, N. B., Pires, L. C. S. R., Oliveira, H. P., & Costa, M. M. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata sobre isolados de *Aeromonas* spp. Obtidos de organismos aquáticos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38 (2018), p.244–249

Gentle, A. A., Omogbolahan, S. Q., & Godwin, J. O. (2020). Characterization of biosynthesized

silver nanoparticles using UV-visible and FTIR Spectroscopy. *Afr J Environ Nat Sci Res*, 3(5), 21-26.

Guimarães, M. L., Amarante, J. F., & Oliveira, H. P. D. A importância dos óleos essenciais na síntese verde de nanopartículas metálicas. *Matéria (Rio de Janeiro)*, V26, (2021), 13053.

Greulich, C., Diendorf, J., Simon, T., Eggeler, G., Epple, M., & Köller, M. Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta biomaterialia*, (2011), p.347-354

Hamouda, R.A., Hussein, M.H., Abo-elmagd, R.A. et al. Synthesis and biological characterization of silver nanoparticles derived from the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Sci Rep* (2019).

He, X.; Hwang, H.M. Nanotechnology in food science: functionality, applicability, and safety assessment. *Journal of Food and Drug Analysis*, (2016), p.671-681

Hull, M.S Multidimensional Impacts of Nanotechnology on Public Health. *Management of Emerging Public Health Issues and Risks* (2019), p.65–85.

Hulikere, M. Manjunath, and Chandrashekhar G. Joshi. "Characterization, antioxidant and antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using marine endophytic fungus-*Cladosporium cladosporioides*." *Process biochemistry* 82 (2019) 199-204.

Iravani, S). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry* (2011) p.2638-2650.

Johnson, J., Shanmugam, R., & Manigandan, P. Characterization and Biomedical Applications of Green-Synthesized Selenium Nanoparticles Using *Tridax procumbens* Stem Extract. *Cureus*, V16 (2024), 6.

Karatoprak, G.Ş.; Göger, F.; Yerer, M.B.; Koşar, M. Chemical composition and biological investigation of *Pelargonium endlicherianum* root extracts. *Pharmaceutical Biology* (2017), p.1608-1618.

Karimi, F., Altuner, E. E., Aygun, A., Bayat, R., Rajendran, S., & Sen, F. Synthesis of silver nanoparticles by biogenic methods: characterization and development of a Sensor Sensible to Pharmaceutical Medicine Paracetamol. *Topics in Catalysis*, V67 (2024), 585-593.

Kavitha, K., & Palaniappan, L. FTIR study of synthesized ovalbumin nanoparticles. *Analytical Biochemistry*, V636 (2022), 114456.

Khatoon, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T. F., & Alarcon, E. I. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* (2018).

Komárek, J. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology* (2016), p.346-353,

- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B: biointerfaces* (2010), 1-18.
- Lian, S., Diko, C. S., Yan, Y., Li, Z., Zhang, H., Ma, Q., & Qu, Y. Characterization of biogenic selenium nanoparticles derived from cell-free extracts of a novel yeast *Magnusiomyces ingens* (2019), p.1-8.
- Liao C, Li Y, Tjong SC. Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Int J Mol Sci* (2019).
- Madhuri S, Maheshwar S, Sunil P, Oza G *Nanotechnology: concepts and applications*, (2012) CRC Press, USA.
- Madhuri, Bais; SINGH, S. P.; Batra, R. D. *Nanotechnology in wastewater treatment: a review. Novel Applications in Polymers and Waste Management* (2018), p.173-182.
- Mahdavi M, Namvar F, Ahmad MB, Mohamad R. Green Biosynthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles Using Seaweed (*Sargassum muticum*) Aqueous Extract. *Molecules* (2013), p.5954-5964.
- Mandhata, C.P., Sahoo, C.R. & Padhy, R.N. Biomedical Applications of Biosynthesized Gold Nanoparticles from Cyanobacteria: an Overview. *Biol Trace Elem Res* 200 (2022), p.5307–5327.
- Mielko KA, Jabłoński SJ, Milczewska J, Sands D, Łukaszewicz M, Młynarz P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. Springer Netherlands (2019) p.1–11.
- Mohapatra, B.; Kuriakose, S.; Mohapatra, S. Rapid green synthesis of silver nanoparticles and nanorods using *Piper nigrum* extract. *Journal Of Alloys And Compounds* (2015), p.119-126.
- Murphy, C. J., Sau, T. K., Gole, A. M., Orendorff, C. J., Gao, J., Gou, L., & Li, T. Anisotropic metal nanoparticles: synthesis, assembly, and optical applications. *The Journal of Physical Chemistry B* (2005) p.13857-13870.
- Nasir S., Usama B. H., Mohit K., Syed F. A. Z., Jung H. Y., Nawaz A., Dong I. J, Jung H., Lee, D. H. Y. Citric acid mediated green synthesis of copper nanoparticles using cinnamon bark extract and its multifaceted applications. *Journal of Cleaner Production*, (2021).
- Niska, K; Zielinska, E; Radomski, MW. Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells. *Chem-Biol. Interact*, (2021), p.38-51.
- O. Strunecký, A.P. Ivanova, J. Mareš, An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis, *J Phycol* 59 (2023), 12–51.
- Pandey, S N; Verma, I.; Kumar, M. Cyanobacteria: potential source of biofertilizer and synthesizer of metallic nanoparticles. *Advances In Cyanobacterial Biology*, (2020), p.351-367
- Poirel, aurent; Madec, Jean-Yves; Lupo, Agnese; Schink, Anne; Kieffer N. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectr.* (2018), p1–27.

Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances* (2009), p.76-83.

Rizki, I. N., & Klaypradit, W. Utilization of marine organisms for the green synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications: A review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, (2023).

Rodrigues, J.F.B; Brandão, P.E. de S.; Guimarães, P.Q; Pinto, M.R. de O; Wellen, R.M.R.; Fook, M.V.L. Aplicação de método estatístico no estudo da influência do peróxido de hidrogênio e do borohidreto de sódio na síntese de nanopartículas de prata (AGNPS) (2019).

Sathiyaraj, S., Suriyakala, G., Gandhi, A. D., Babujanathanam, 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.

Sharma, P., Sharma, A., Sharma, M., Bhalla, N., Estrela, P., Jain, A., ... & Thakur, A. Nanomaterial fungicides: in vitro and in vivo antimycotic activity of cobalt and nickel nanoferrites on phytopathogenic fungi. *Global Challenges*, (2017).

Siddiqi, K. S., & Husen, A. Fabrication of metal nanoparticles from fungi and metal salts: scope and application. *Nanoscale research letters*, (2016), p.1-15.

Siddiqi, K. S., Rahman, A., Tajuddin, N., & Husen, A Properties of zinc oxide nanoparticles and their activity against microbes. *Nanoscale research letters* (2018), p.1-13.

Silva, C. D. S. Síntese, caracterização, reatividade e aplicações biológicas de complexos de Ru (II) contendo tioamidas. Tese (Doutorado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química Universidade Federal do Ceará – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica. Ceará. (2017), p.182.

Singh K, Mukil M, Verma AK, Kumar C, Ramawat N. Engineered zinc oxide nanoparticles: An alternative to conventional zinc sulphate in neutral and alkaline soils for sustainable wheat production. *3 Biotech* (2021), p.1-17.

Souza, Wanderley de. Técnicas De Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007.

Suresh C. M., Anita D., Chanda K. G., Rohini T. Green synthesis of copper nanoparticles using *Celastrus paniculatus* Willd. leaf extract and their photocatalytic and antifungal Properties. *Biotechnology Reports* (2020).

T. Aguiar Caires, C. Leite Sant'Anna, J.M. de Castro Nunes, Biodiversity of benthic filamentous cyanobacteria in tropical marine environments of Bahia State, Northeastern Brazil, *Brazilian Journal of Botany* 42 (2019),149–170.

T.A. Caires, A.M.S. da Silva, V.M. Vasconcelos, H.M.J. Affe, L.C. de Souza Neta, H.V.M. Boness, C.L. Sant'Anna, J.M.C. Nunes, Biotechnological potential of *Neolyngbya* (Cyanobacteria), a new marine benthic filamentous genus from Brazil, *Algal Res* 36 (2018), 1–9.

Tang G, Tian Y, Niu J, Tang J, Yang J, Gao Y, Chen X, Li X, Wang H, Cao Y. Development of carrier-free self-assembled nanoparticles based on fenhexamid and polyhexamethylene biguanide for sustainable plant disease management. *Green Chemistry* (2021).

Yin IX, Zhang J et al. The Antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. *Int J Nanomed* (2020).