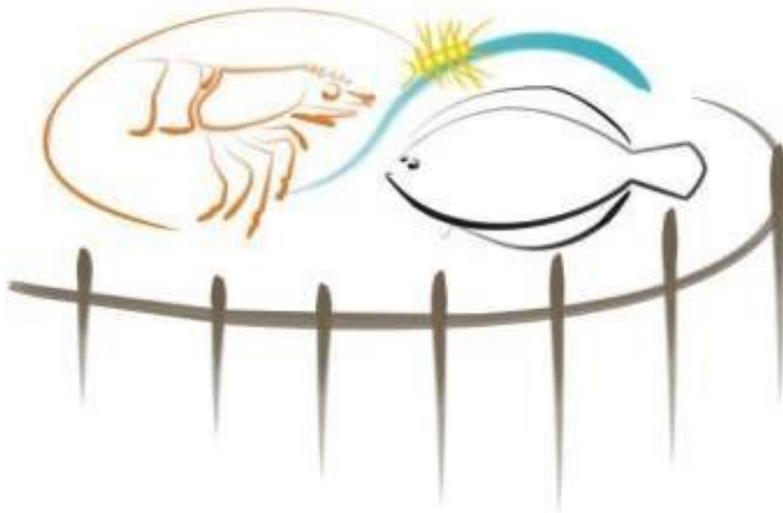




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG

INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PELA MATÉRIA
ORGÂNICA COLETADA VIA *SKIMMER* DO CULTIVO DA MICROALGA
*Nannochloropsis oceanica***

ANDRESSA COIMBRA PEREIRA

**Rio Grande, RS
Junho 2023**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PELA MATÉRIA
ORGÂNICA COLETADA VIA SKIMMER DO CULTIVO DA MICROALGA**
Nannochloropsis oceanica

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

Orientador: Dr. José Monserrat
Co-orientador: Dr. Fabio Roselet

ANDRESSA COIMBRA PEREIRA

Rio Grande, RS
Junho 2023

Índice

Agradecimentos	vi
Lista de tabelas	vii
Lista de figuras	viii
Resumo	1
Abstract	2
1 Introdução	3
2 Objetivos.....	7
2.1 Objetivo geral.....	8
2.2 Objetivos específicos.....	8
3 Materiais e métodos.....	8
3.1 Cultivo da microalga <i>Nannochloropsis oceanica</i>	8
3.2 Coleta da matéria orgânica dissolvida.....	9
3.3 Síntese de nanopartículas de prata e seu acompanhamento por UV-Vis.....	10
3.4 Caracterizações da matéria orgânica dissolvida (MOD)	12
3.4.1 Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	12
3.4.2 Análise metagenômica.....	12
3.5 Caracterizações das AgNP obtidas	13
3.5.1 Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM).....	13
3.5.2 Litesizer	13
3.6 Ensaio microbiológicos	14
3.6.1 Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	14
3.6.2 Cinética de crescimento	15
3.6.3 Inibição de formação e destruição de biofilme	15
3.7 Análises estatísticas	17
4 Resultados	17
4.1 Síntese de nanopartículas de prata e seu acompanhamento por UV-Vis	17
4.2 Caracterizações da matéria orgânica dissolvida (MOD)	22
4.2.1 Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	22
4.2.2 Análise metagenômica.....	23
4.3 Caracterizações das AgNP obtidas	24
4.4 Ensaio microbiológicos	29

4.4.1 Concentração Inibitória Mínima (MIC)	29
4.4.2 Cinética de crescimento	31
4.4.3 Inibição de formação e destruição de biofilme	32
5 Discussão	34
6 Conclusão	40
7 Perspectivas futuras	40
8 Referências	41

*Dedico esta dissertação
aos meus avós*

Agradecimentos

À toda minha família, pelo apoio em todos os momentos dessa etapa, amo vocês!

Ao meu orientador, uma pessoa extraordinária, sempre disposto a fazer ciência e churrasco. Muito obrigada por todos os ensinamentos e pelos papos sobre séries e filmes. Não poderia ter tido um orientador melhor;

Ao meu co-orientador, que um dia a FURG terá a sorte de tê-lo como professor, meu muito obrigada pelas oportunidades, ensinamentos e cobranças;

Saio dessa etapa uma cientista melhor por conta de vocês.

Agradeço aos laboratórios BIFOA, LPM, AlgaSul e NUDEFSA

Aos amigos do BIFOA, Alan, Jean e Thiago por toda a parceria e amizade nesses anos, mas em especial ao Rafa e ao Robson que foram peças fundamentais na realização dessa dissertação, sem vocês não teria dado certo, meu eterno muito obrigada;

À Bruna, Paola, Bruno e Rafa (de novo cara), obrigada por tornarem essa reta final mais leve, ansiosa pela volta do café da tarde;

Agradeço também à professora Daniela e toda equipe do NUDEFSA, em especial a Rose. E ao CEMESUL na pessoa da Carol.

À Estação Marinha de Aquicultura, os professores, funcionários, alunos e amigos, e a CAPES pela bolsa concedida.

E claro, aos amigos que fiz nessa etapa, bem como àqueles que permaneceram mesmo a distância nos separando fisicamente.

Gratidão!

Lista de tabelas

Tabela 1. Fatores e níveis estudados no planejamento experimental.	10
Tabela 2. Matriz completa dos fatores estudados em cada bloco do planejamento experimental tipo DCCR.	11
Tabela 3. Resultados obtidos via análise no Litesizer para a síntese do ensaio 4 (30 °C 24 h) do planejamento experimental.	29
Tabela 4. Resultados da atividade antimicrobiana das AgNP em relação as suas concentrações de MIC, exemplificados na Figura 2	29
Tabela 5. Atividade antimicrobiana a partir de AgNP sintetizadas de diferentes maneiras a partir de microalgas.	37
Tabela 6. Dados de potencial zeta de AgNP sintetizadas de diferentes maneiras a partir de microalgas.	38

Lista de figuras

Figura 1. (A) Reator de cultivo de <i>N. oceanica</i> com o <i>skimmer</i> instalado. (B) matéria orgânica dissolvida (MOD) coletada. (C) MOD congelada em tubos falcons.....	9
Figura 2. Placa de 96 poços esquematizada para a diluição seriada.	15
Figura 3. Espectros das sínteses a partir da MOD coletada do reator 8 em diferentes temperaturas (30 e 70 °C) e tempos (24 e 48 h).	18
Figura 4. Sobrenadantes da MOD dos reatores 4, 6 e 9 em diferentes tratamentos. Nos tubos, o sobrenadante da MOD foi apenas centrifugado, enquanto nos béqueres o sobrenadante foi sonicado e centrifugado (Seção 3.3).	19
Figura 5. Espectros das sínteses a partir da MOD coletada dos reatores 4, 6 e 9.	20
Figura 6. Espectros das sínteses a partir do mix da MOD.	21
Figura 7. Espectros das sínteses do planejamento experimental a partir do mix da MOD. As condições de cada ensaios estão descrita na Tabela 2	22
Figura 8. Espectros da análise de FTIR.....	23
Figura 9. Bactérias identificadas na MOD por análise de metagenômica.....	24
Figura 10. Imagem da AgNP do R8 (70 °C 48 h) obtidas pelo TEM e sua distribuição de tamanho ($12,28 \pm 6,19$ nm).....	25
Figura 11. Imagem da AgNP (70 °C 48 h) obtidas pelo TEM e sua distribuição de tamanho. (A) Reator 4: $11,89 \pm 6,33$ nm. (B) Reator 6: $18,46 \pm 9,29$ nm. (C) Reator 9: $14,21 \pm 6,50$ nm.....	26
Figura 12. Imagem da AgNP do mix da MOD (70 °C 48 h) obtidas pelo TEM e sua distribuição de tamanho ($20,13 \pm 12,89$ nm).....	27
Figura 13. (A) Imagem da AgNP obtidas pelo TEM e sua distribuição de tamanho ($27,55 \pm 8,41$ nm). (B) Distribuição do diâmetro hidrodinâmico medido pelo Litesizer	

(C). Os resultados referem-se ao ensaio 4 (30 °C 24 h) do planejamento experimental utilizado o mix da MOD.....	28
Figura 14. Matriz de interação dos fatores do planejamento experimental (AgNO ₃ e pH) com inserção dos dados de densidade óptica da MIC (6,25%) dos 11 ensaios (30 °C 24 h).....	31
Figura 15. Cinética da AgNP do ensaio 4 (30 °C 24 h), e dos controles de Ag ⁺ e da bactéria (positivo) frente a <i>A. baumannii</i> ao longo do tempo.	32
Figura 16. Análise estatística One-way ANOVA da Figura 15.	32
Figura 17. Análise estatística Two-way ANOVA da atividade de inibição do biofilme.	33
Figura 18. Análise estatística Two-way ANOVA da atividade de destruição do biofilme.....	34

1 **Resumo**

2 O desenvolvimento de novos métodos de síntese de nanopartículas de prata
3 (AgNP) que sejam mais amigáveis ao meio ambiente é um tópico que tem recebido muita
4 atenção nos últimos anos, e a síntese verde, especialmente a biológica, está à frente dessas
5 novas abordagens. As microalgas são organismos fotossintéticos de rápido crescimento e
6 produtoras de uma ampla gama de compostos capazes de reduzir a prata iônica em AgNP,
7 fazendo delas uma alternativa de menor impacto. As AgNP são aplicadas principalmente
8 como antimicrobianos, sendo uma alternativa ao uso de antibióticos, visto a propriedade
9 já estabelecida da prata para tal. Portanto, nesse trabalho, foi sintetizada pela primeira vez
10 AgNP a partir da matéria orgânica dissolvida (MOD) coletada por um fracionador de
11 espuma (*skimmer*) do cultivo de *Nannochloropsis oceanica*, como agente redutor e
12 estabilizador da síntese que foi monitorada através dos espectros de absorbância no UV-
13 Vis. As AgNP geradas foram avaliadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão,
14 mostrando tamanho médio de $11,89 \pm 6,33$ a $27,55 \pm 8,41$ nm. A análise no Litesizer
15 apresentou diâmetro hidrodinâmico de $263,82 \pm 4,89$ nm, índice de polidispersão 0,178 e
16 potencial zeta de $-20,41 \pm 0,32$ mV. Foi também avaliada a MOD por Infravermelho por
17 Transformada de Fourier, além de análises microbiológicas de Concentração Inibitória
18 Mínima nas bactérias *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio*
19 *coralliilyticus* e *Staphylococcus aureus*, e análises de cinética de crescimento e biofilme
20 (inibição e destruição) em *A. baumannii*, provando que a utilização da MOD é viável,
21 gerando um produto biotecnológico de alto valor agregado.

22
23 **Palavras-chave:** nanotecnologia, matéria orgânica dissolvida, “*skimmer*”, atividade
24 microbiana

25 **Abstract**

26 The development of new methods for synthesizing silver nanoparticles (AgNP)
27 that are more environmentally friendly has received attention in recent years, and green
28 synthesis, especially biological synthesis, is at the forefront of these new approaches.
29 Microalgae are fast-growing photosynthetic organisms that produce a wide range of
30 compounds capable of reducing ionic silver in AgNP, making them an alternative for the
31 generation of AgNP with less impact. AgNP are applied mainly as antimicrobials, as an
32 alternative to the use of antibiotics, given the already established properties of silver to
33 do so. Therefore, in this study, AgNP were synthesized for the first time from dissolved
34 organic matter (DOM) collected by a foam fractionator *skimmer* from the cultivation of
35 *Nannochloropsis oceanica* as a reducing agent and stabilizer of the synthesis, which was
36 monitored through UV-Vis absorbance spectra. The generated AgNP were evaluated
37 using a Transmission Electron Microscope, showing an average size of from 11.89 ± 6.33
38 to 27.55 ± 8.41 nm. The Litesizer analysis showed a hydrodynamic diameter of $263.82 \pm$
39 4.89 nm, polydispersion index 0,178 and zeta potential of -20.41 ± 0.32 mV. DOM was
40 also evaluated by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, in addition to
41 microbiological analyses of the Minimum Inhibitory Concentration of the bacteria
42 *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio coralliilyticus*, and
43 *Staphylococcus aureus*, and analyses of growth kinetics and biofilm (inhibition and
44 destruction) in *A. baumannii*, proving that the use of DOM is viable and generates a
45 biotechnological product with high added value.

46
47 **Keywords:** nanotechnology, dissolved organic matter, *skimmer*, microbial activity.

48
49

50 **1. Introdução**

51 A nanotecnologia é uma ciência que data desde o século IV d.C. com os
52 primeiros registros de produtos provenientes dessa tecnologia como o cálice de Licurgo
53 feito pelos Romanos, vitrais de igreja medievais, cerâmicas Islâmicas e da renascença
54 Italiana, lâminas de Damasco, todos com propriedades desconhecidas até os avanços
55 tecnológicos permitirem o desenvolvimento de equipamentos de microscopia e
56 espectroscopia entre o final do século XIX e o século XX. Só em 1974 o termo
57 nanotecnologia foi usado e definido pela primeira vez pelo cientista japonês Norio
58 Taniguchi, após o físico americano Richard Feynman introduzir o conceito em uma
59 palestra do encontro anual da Sociedade de Física Americana intitulado “There’s Plenty
60 of Room at the Bottom” em 1959 (Bayda et al., 2019).

61 Desde então a nanotecnologia passou por avanços e a sua aplicabilidade impacta
62 seres humanos, animais e meio ambiente com o desenvolvimento de novos produtos com
63 variadas propriedades. As nanopartículas são apenas um exemplo dos produtos gerados
64 pela nanotecnologia. Essas partículas medem de 1 a 100 nm, em pelo menos uma
65 dimensão, sendo utilizadas nas áreas da saúde (antimicrobiano, anticancerígeno,
66 antitumoral), do meio ambiente (biorremediação), da agricultura (pesticidas,
67 fertilizantes), da indústria têxtil (tecidos inteligentes), da indústria alimentícia
68 (embalagens inteligentes), da indústria cosmética (hidratantes, itens de maquiagem,
69 protetor solar), e da aquicultura (antimicrobiano, alimentação, qualidade da água), dentre
70 outras (Rafique et al., 2016; Márquez et al., 2018).

71 As nanopartículas podem ser classificadas de acordo com a sua origem,
72 composição, natureza do material, formato, dimensão, etc. As nanopartículas metálicas
73 são sintetizadas a partir de diferentes metais buscando maximizar as suas características,
74 tornando-as mais eficientes para cada aplicação específica. Deve ser salientado que as

75 nanopartículas possuem propriedades diferentes do seu material de origem já que na
76 escala nanométrica a área superficial é muito maior, o que aumenta sua eficiência. Sendo
77 assim, as nanopartículas de prata (AgNP) são utilizadas principalmente na área da saúde
78 por aumentar a área de contato no uso contra patógenos (Khanna et al., 2019).

79 Devido as já conhecidas propriedades antimicrobianas da prata, as
80 nanopartículas sintetizadas a partir deste material estão sendo amplamente estudadas,
81 principalmente na área da saúde humana e animal, como alternativa ao uso de
82 antibióticos, visto o fenômeno crescente das bactérias resistentes à múltiplas drogas (Sim
83 et al., 2018). Com o constante crescimento da aquicultura, os antibióticos se tornaram
84 cada vez mais utilizados na área, o que levou a restrições devido ao uso indiscriminado
85 e, neste contexto, as AgNP são uma promissora solução ao tratamento e prevenção de
86 doenças (Márquez et al., 2018).

87 A síntese de AgNP pode ser efetuada através de duas abordagens. Na abordagem
88 física, ou “top-down”, a prata bruta é reduzida a nanopartículas através de métodos como
89 ablação a laser e evaporação. No entanto esta abordagem resulta em nanopartículas de
90 tamanho irregular, além do alto custo dos equipamentos. Na abordagem química, ou
91 “bottom-up”, ocorre o agrupamento de átomos e moléculas através da redução dos íons
92 de prata, através de produtos químicos potencialmente danosos ao meio ambiente e a
93 saúde de humanos e animais. (Yusof et al., 2019).

94 Para que a síntese de AgNP ocorra pela abordagem “bottom-up” é preciso que
95 haja: (1) um agente redutor, (2) um agente estabilizador, (3) o agente precursor (solução
96 do metal), e (4) fatores de reação bem estabelecidos (Salem et al., 2020). A qualidade das
97 nanopartículas é definida pelo processo de síntese, que se não for adequado, resultará em
98 nanopartículas irregulares em tamanho e formato, alterando consequentemente, suas

99 propriedades e aplicações. Os fatores que influenciam a síntese são pH, temperatura,
100 tempo de reação, concentração dos agentes e a proporção entre eles, além de iluminação
101 e agitação. Com isso, faz-se necessário a otimização desses fatores para que as
102 nanopartículas sintetizadas sejam uniformes em tamanho e ação (Rahman et al., 2020).

103 Como as abordagens físicas e químicas não são sustentáveis visto que dependem
104 de uma grande demanda de energia, equipamentos custosos e reagentes tóxicos, há um
105 crescente interesse no desenvolvimento de novas técnicas de síntese que não agridam o
106 meio ambiente e a saúde, além de serem economicamente mais viáveis. Estas novas
107 alternativas são denominadas de síntese biológica, formando parte do paradigma de
108 química verde (Kaabipour et al., 2021).

109 A síntese biológica, assim como a química é uma síntese “bottom up”, onde
110 ocorre a redução dos íons de prata, porém nesta síntese a redução utiliza moléculas
111 provenientes de organismos como plantas, bactérias, fungos, vírus, e algas, que também
112 servem como agente estabilizador da reação, ao invés de reagentes químicos
113 potencialmente tóxicos (Saravanan et al., 2020). As microalgas são promissoras para a
114 utilização na síntese de AgNP por serem organismos fotossintéticos de rápido
115 crescimento, e produtores de uma ampla gama de compostos bioativos capazes de reduzir
116 a prata, formando nanopartículas com bioatividade contra células cancerígenas,
117 bacterianas, virais, e fúngicas entre outras (Khalid et al., 2017).

118 As microalgas podem ser empregadas na síntese de AgNP a partir de diferentes
119 abordagens e, dentre elas, podem ser mencionadas: (1) adição da solução do metal
120 precursor (AgNO_3) diretamente no cultivo, (2) a partir do pellet das algas ressuspendido,
121 (3) a partir de extratos da biomassa, e (4) a partir do sobrenadante do cultivo, composto
122 principalmente por matéria orgânica dissolvida (MOD). Desta forma, as reações de

123 síntese podem se valer de compostos secretados pela microalga (extracelular) ou contidos
124 nela (intracelular), dependendo da abordagem utilizada (Dahoumane et al., 2016).

125 Apesar dos resultados positivos da síntese de AgNP através destas abordagens,
126 todas têm pontos negativos que impedem a produção ou o escalonamento para uma
127 dimensão comercial. Na abordagem (1), pode ocorrer toxicidade no cultivo devido à ação
128 da própria prata, reduzindo a eficiência da síntese. Na abordagem (2) e (3), a biomassa
129 precisa ser coletada, o que é um processo oneroso, além de requerer a produção dos
130 extratos na abordagem (3). E finalmente, na abordagem (4), o sobrenadante precisa ser
131 coletado através de centrifugação ou filtração.

132 Todos esses processos, além de encarecerem a produção, são de difícil
133 escalonamento. Contudo, dentre essas abordagens a mais promissora é a (4) já que, ao
134 não utilizar a biomassa das microalgas, permite que esta seja empregada para outras
135 finalidades, de acordo com o conceito de biorrefinaria (Ummalyima et al., 2020). Porém
136 o processo de obtenção da MOD secretada no meio ainda é um problema, pois necessita
137 que seja separada das microalgas, através de métodos de custo elevado como
138 centrifugação e filtração (Dahoumane et al., 2016). Além disso, a MOD está diluída em
139 todo o volume do cultivo, o que faria ser necessário alguma concentração dessa MOD ou
140 altas concentrações de AgNO_3 para reduzir a prata a partir dela. Sendo assim, uma nova
141 alternativa para coletar essa MOD se faz necessário para que seja um processo
142 economicamente viável.

143 Fracionadores de espuma (*skimmers*) são equipamentos rotineiramente
144 empregados na aquicultura para manutenção da qualidade da água através da remoção de
145 resíduos orgânicos dissolvidos e particulados (Lekang, 2013). Este equipamento foi
146 testado pela primeira vez na remoção da matéria orgânica dissolvida de um cultivo da

147 microalga *Nannochloropsis oceanica* por Roselet et al. (2019), de forma bem-sucedida.
148 Além disto, foi observado que o equipamento não afetou as células, que permaneceram
149 viáveis e crescendo nos tanques de cultivo.

150 A hipótese deste trabalho é que a MOD, produzida pela microalga *N. oceanica*,
151 coletada pelo fracionador de espuma funcione como agente redutor e estabilizador na
152 síntese de AgNP. Sendo assim, o fracionador de espuma seria uma alternativa à
153 centrifugação e filtração para obtenção da MOD, além de obtê-la de forma mais
154 concentrada, tornando o processo de síntese mais barato e escalonável.

155 A espécie *N. oceanica* foi escolhida para o desenvolvimento desse trabalho por
156 ser a que foi empregada na metodologia de coleta da MOD pelo fracionador de espuma
157 no estudo de Roselet et al. (2019). Este trabalho representa uma continuidade no intuito
158 ao trabalho acima citado, visando gerar um uso para essa MOD coletada, fechando assim
159 um ciclo de produção de microalga sustentável em que é aproveitado todo o cultivo.

160 Especificamente sobre o uso de *N. oceanica* na síntese de AgNP, não foi
161 encontrado antecedentes que tenham sido publicados especificamente com essa espécie,
162 apesar de haver alguns registros de síntese de AgNP a partir do gênero *Nannochloropsis*
163 *sp.* A síntese a partir do cultivo de *N. oculata* foi relatada por Mohseniazar et al. (2011) e
164 por El-Kassas et al. (2017), e a partir de extratos da biomassa de *Nannochloropsis sp.* por
165 Gnanakani et al. (2019), sendo constatado que proteínas, compostos aromáticos, ácidos
166 graxos, polifenóis, etc. são responsáveis pela síntese, agindo tanto como agentes redutores
167 quanto como estabilizadores, apresentando também atividades antimicrobianas e
168 antioxidante.

169

170 **2. Objetivos**

171 **2.1. Objetivo geral**

172 • Sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana de
173 nanopartículas de prata geradas a partir da matéria orgânica dissolvida excretada pela
174 microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* e coletada por fracionador de espuma
175 (*skimmer*)

176

177 **2.2. Objetivos específicos**

- 178 • Coletar e caracterizar a matéria orgânica dissolvida;
- 179 • Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de prata;
- 180 • Aprimorar as condições de síntese;
- 181 • Testar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata.

182

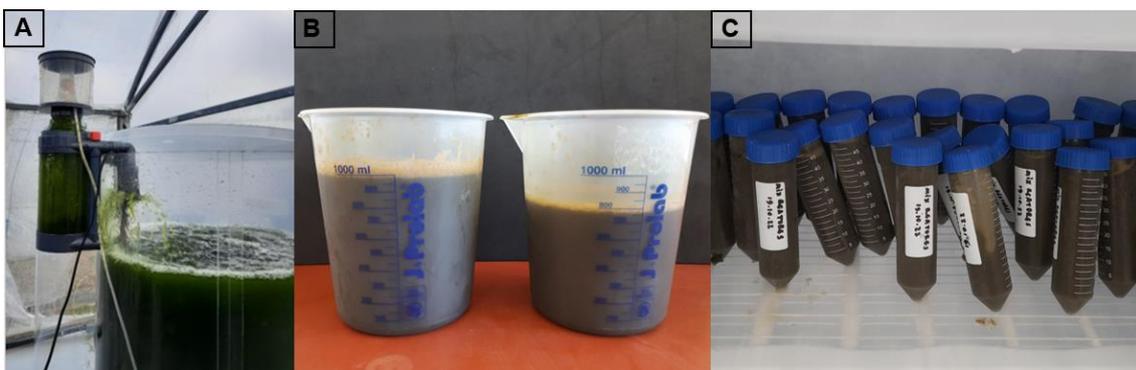
183 **3. Materiais e métodos**

184 3.1. *Cultivo da microalga Nannochloropsis oceanica*

185 O inóculo de *Nannochloropsis oceanica* foi proveniente do banco do
186 Laboratório de Produção de Microalgas. *Nannochloropsis oceanica* foi cultivada em
187 fotobiorreatores tipo coluna de bolhas de 330 L, com 55 cm de diâmetro e 150 cm de
188 altura. Os fotobiorreatores foram mantidos em uma estufa agrícola, sob condições
189 ambientais não controladas, compreendendo o período final do inverno e início da
190 primavera de 2022. Os cultivos foram realizados empregando-se um meio a base de
191 fertilizantes (Couto et al., 2021), em água salgada (28 g/L), filtrada (1 µm) e esterilizada
192 (UV). Os cultivos foram mantidos em suspensão pela injeção contínua de ar atmosférico
193 (4,8 L/min) (Kubelka et al., 2017). Diariamente, foi realizado o monitoramento dos
194 cultivos, através da absorbância (750 nm).

195 3.2. Coleta da matéria orgânica dissolvida

196 Ao longo do crescimento de *Nannochloropsis oceanica*, há a liberação de
197 matéria orgânica dissolvida (MOD), conforme observado por Roselet et al. (2019). Os
198 autores empregaram, com sucesso, um fracionador de espuma para remover a MOD.
199 Desta forma, o uso do fracionador de espuma se tornou parte da rotina de manutenção
200 dos cultivos. Assim, para a coleta da MOD para este trabalho, o *skimmer* foi instalado nos
201 reatores em atividade que necessitavam desse tratamento. Basicamente, o *skimmer* foi
202 acoplado no reator e a MOD era coletada em um béquer. Inicialmente, as coletas de MOD
203 ocorreram diversas vezes, conforme o necessário para cada experimento, sendo
204 provenientes de reatores diferentes. Posteriormente, devido à variabilidade observada
205 entre os lotes de MOD, decidiu-se formar um pool e assim garantir que todos os
206 experimentos usassem a mesma amostra. Desta forma, ao longo de duas semanas, foram
207 coletados aproximadamente 2 litros de MOD provenientes de quatro reatores diferentes.
208 Ao final de cada coleta, a MOD era congelada em freezer a -20 °C e, ao atingir o volume
209 necessário, todas as amostras de MOD foram descongeladas, misturadas e fracionadas em
210 tubos falcons de 50 mL para os experimentos posteriores (**Figura 1**).



211

212 **Figura 1.** (A) Reator de cultivo de *N. oceanica* com o *skimmer* instalado. (B) matéria orgânica
213 dissolvida (MOD) coletada. (C) MOD congelada em tubos falcons.

214

215 3.3. Síntese de nanopartículas de prata e seu acompanhamento por UV-Vis

216 O tratamento da MOD, para a síntese verde de nanopartícula de prata, consistiu
217 em sonicação por 3 minutos a 50% de amplitude (QSonica, modelo Q55, 50 watts de
218 potência), seguido de centrifugação por 5 minutos a 1.248 x g em 4 °C. O sobrenadante
219 obtido foi utilizado na síntese de nanopartículas de prata da seguinte maneira: 1,5 mL do
220 sobrenadante da MOD tratada + 15 mL água de Milli-Q (pH 7,0) + 187,5 µL da solução
221 estoque de AgNO₃ (157,5 mg AgNO₃ + 10 mL de água Milli-Q), em Erlenmeyer de 125
222 mL sob agitação magnética com temperatura e luz constante. As leituras no
223 espectrofotômetro em UV-Vis foram efetuadas após 24 e 48 horas de reação, na faixa de
224 comprimento de 300 - 600 nm (em intervalos de 10 nm) (Smitha et al., 2008).

225 Alguns testes de síntese foram realizados com a MOD de diferentes reatores, em
226 separado, porém foi constatada uma variabilidade do sobrenadante, na fase de preparação
227 da amostra, quanto a sua coloração após a centrifugação, bem como nas leituras em UV-
228 Vis e nos resultados dos testes antimicrobianos. A variabilidade da MOD pode estar
229 relacionada ao histórico de cada cultivo, como fase de crescimento, parâmetros de
230 densidade óptica, pH, temperatura, salinidade, tempo de utilização do *skimmer*, etc.
231 Portanto, para minimizar essas interferências foram coletadas a maior quantidade possível
232 de MOD de diferentes reatores, e a partir mix as sínteses foram realizadas nos mesmos
233 parâmetros de temperatura e tempo.

234 As condições de sínteses foram otimizadas através de um planejamento
235 experimental, através da análise de diferentes fatores como, concentração de AgNO₃, pH,
236 temperatura e tempo de síntese (**Tabela 1**).

237 **Tabela 1.** Fatores e níveis estudados no planejamento experimental.

238

AgNO ₃ (mM)	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)
------------------------	----	------------------	-----------

0,29	5,58	30	24
0,5	6	50	48
1	7	70	
1,5	8		
7	8,41		

239

240 Para o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) a matriz foi
 241 montada para a avaliação de duas variáveis (AgNO₃ e pH), num planejamento
 242 experimental 2² com adição de pontos centrais e axiais. A temperatura foi testada em
 243 blocos, logo, a matriz foi repetida variando a temperatura, ou seja, foram realizados 3
 244 lotes de sínteses, uma em cada temperatura a ser testada (30, 50 e 70 °C), e em todas as
 245 sínteses foram realizadas leituras após 24 e 48 h. A matriz codificada dos diferentes
 246 tratamentos bem como os valores reais do planejamento experimental está apresentada na
 247 **Tabela 2.** (Rodrigues & Iemma 2014).

248 **Tabela 2.** Matriz completa dos fatores estudados em cada bloco do planejamento experimental
 249 tipo DCCR.

250

Ensaio	AgNO ₃ (mM)		pH	
	Valores codificados	Valores reais	Valores codificados	Valores reais
1	-1	0,5	-1	6
2	-1	0,5	+1	8
3	+1	1,5	-1	6
4	+1	1,5	+1	8
5	-1,41	0,29	0	7
6	+1,41	1,7	0	7
7	0	1	-1,41	5,58
8	0	1	+1,41	8,41
9	0	1	0	7

10	0	1	0	7
11	0	1	0	7

251

252

3.4. *Caracterizações da matéria orgânica dissolvida (MOD)*

253

3.4.1. *Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)*

254

255

256

257

258

259

260

261

262

A MOD foi caracterizada quanto aos grupos funcionais a partir de uma amostra liofilizada através da análise de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (Shimadzu, Prestigie 21, modelo 210045, Japão). Essa análise é capaz de, a partir da vibração de cada ligação covalente ao absorver frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho, fornecer informações estruturais, pois cada tipo de ligação é encontrado em certas regiões características do espectro. Apesar de não identificar compostos específicos, é útil para representar de forma geral a composição da amostra, através dos grupos funcionais. Os espectros gerados foram analisados segundo Pavia et al. (2010).

263

3.4.2 *Análise metagenômica*

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

Para conhecer a diversidade microbiana presente na MOD, procedeu-se com uma análise de metagenômica. Basicamente, uma amostra de MOD foi centrifugada (2369g por 15 minutos à 10°C) e, em seguida, o sobrenadante foi filtrado (0,7µm), para recuperação das bactérias. Para extração do DNA, a amostra foi primeiramente filtrada através de um filtro Sterivex (Milipore) de 0,22 e o DNA foi extraído com o protocolo do kit Nucleospin (Macherey-Nagel). A integridade do DNA foi avaliada com eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar a qualidade, a pureza foi verificada com o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). A quantificação precisa do DNA foi obtida usando um fluorômetro Qubit 13.0 (Life Technologies-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As bibliotecas de DNA foram geradas

274 usando um kit de preparação de amostras de DNA Nextera XT (Illumina, San Diego, CA,
275 EUA). A distribuição de tamanho das bibliotecas foi avaliada usando um 2100
276 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, EUA), e a quantificação do DNA foi obtida
277 usando 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e KAPA
278 Library Quantification Kits (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA). O
279 sequenciamento paired-end foi realizado em uma máquina HiSeq (Illumina, San Diego,
280 CA, EUA). As sequências foram pré-processadas com PRINSEQ e as extremidades
281 pareadas foram mescladas com PEAR. A análise foi gentilmente realizada pelo Prof.
282 Fabiano Lopes Thompson, do Laboratório de Microbiologia, do Instituto de Biologia da
283 Universidade Federal do Rio de Janeiro.

284 *3.5. Caracterizações das AgNP obtidas*

285 *3.5.1. Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM)*

286 As amostras da síntese foram diluídas a 10% com água Milli Q, sonificadas por 3
287 minutos em 50% de amplitude (QSonica, modelo Q125, 125 watts de potência) e
288 colocadas sob o grid de cobre, e então deixadas para secar no dessecador por 48 h. O
289 software ImageJ foi utilizado para as medições das AgNP a partir das imagens geradas
290 pelo TEM (120 kEv, Jeol, JEM-1400).

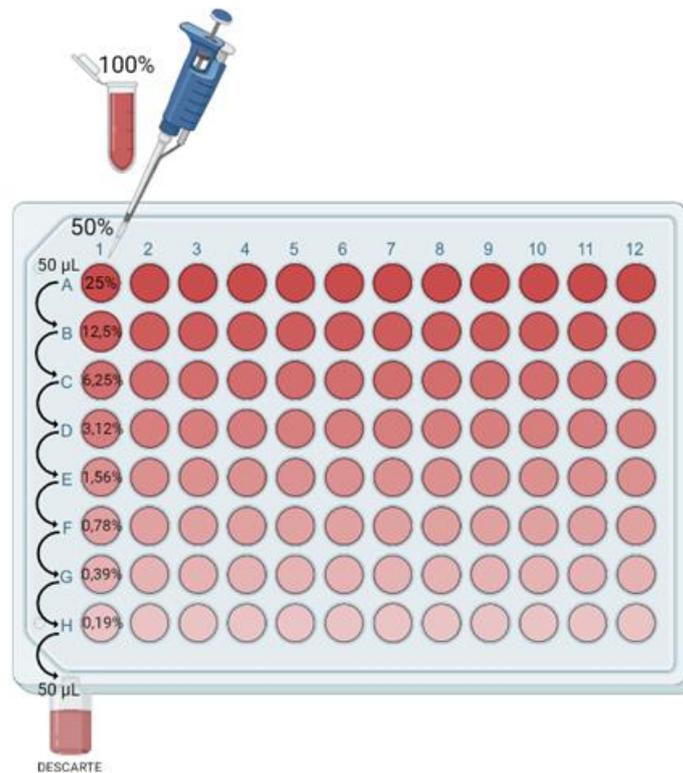
291 *3.5.2. Litesizer*

292 Para análise no Litesizer (500 Anton Paar) as AgNP tiveram o mesmo tratamento
293 quanto a diluição e sonicação (Seção 3.5.1), elas então foram analisadas através do
294 método de espalhamento dinâmico de luz, capaz de medir o diâmetro hidrodinâmico
295 (tamanho) e o índice de polidispersão (homogeneidade do tamanho) das AgNP. O método
296 de espalhamento de luz eletroforético foi utilizado para medição do potencial zeta
297 (estabilidade) em cubetas com eletrodos.

298 3.6. *Ensaio microbiológicos*

299 3.6.1. *Concentração Inibitória Mínima (MIC)*

300 As análises foram realizadas nas bactérias *Acinetobacter baumannii* (ATCC
301 19606), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Vibrio coralliilyticus* (isolado), e
302 *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598) da coleção do Núcleo de Desenvolvimento de
303 Novos Fármacos (NUDEFA). A MIC foi determinada pelo método de diluição seriada
304 (1:2) em placa de 96 poços utilizando resazurina (0,02%) como revelador e
305 ciprofloxacina como antibiótico de referência, de acordo com o manual M07-A10 da
306 *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2015). Para tal, 50 µL de meio líquido
307 Muller Hinton (MH) foi adicionado em toda a placa, e posteriormente nos poços da
308 primeira linha (linha A) foi transferido 50 µL da suspensão de AgNP, bem como do
309 controle de Ag⁺ (prata iônica) e antibiótico nos poços referentes. Após a homogeneização
310 (através da pipetagem) com o meio MH foi feita a diluição seriada (1:2) (esquematizada
311 na **Figura 2**), onde 50 µL é retirada da linha A e passada para a linha B, homogeneizada
312 e passada para a linha C até o final da placa (linha H) onde o último 50 µL é descartado.
313 Após a diluição, a concentração de AgNP em cada linha é 25% (linha A), 12,5% (B),
314 6,25% (C), 3,12% (D), 1,56% (E) 0,78% (F), 0,39% linha (G) e 0,19% (H) da suspensão
315 original. Por fim é adicionado em toda a placa, 50 µL da suspensão de bactéria preparada
316 em solução salina e diluída em MH na concentração de 1×10^6 UFC/mL, após ser
317 adicionada na placa, a concentração final de é 5×10^5 UFC/poço.



318

319

Figura 2. Placa de 96 poços esquematizada para a diluição seriada.

320

321

3.6.2. Cinética de crescimento

322

323

324

325

326

327

328

329

330

A análise de cinética foi realizada na bactéria *A. baumannii*, onde a placa de 96 poços foi preparada da mesma forma que para a análise de MIC (Seção 3.5.1). Ao finalizar a montagem da placa, a absorbância foi medida em uma leitora de microplaca Versa-Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), no comprimento de onda de 630 nm, em diferentes intervalos de tempo. A primeira leitura foi realizada no tempo zero, e então 6 leituras foram realizadas em intervalos de 15 minutos, totalizando 1:30 h de monitoramento da cinética, seguidas por 3 leituras em intervalos de 30 minutos, totalizando 3 h, e finalizando com uma leitura em 5 h e a última em 24 h.

3.6.3. Inibição de formação e destruição de biofilme

331 Assim como a cinética (Seção 3.6.2), a análise de biofilme foi realizada em *A.*
332 *baumannii*. Essa análise foi dividida em duas, a de inibição da formação de biofilme, e
333 de destruição do biofilme (Halicki et al., 2020).

334 Para a análise de inibição da formação, a placa foi montada adicionando
335 diferentes concentrações de AgNP, determinadas pelo resultado da análise de MIC, (uma
336 concentração acima (2x MIC) da resposta de MIC, o próprio MIC, e uma concentração
337 abaixo 0,5x MIC), adicionadas na placa junto à bactéria *A. baumannii*, antes da mesma
338 formar biofilme. Para tal uma suspensão de *A. baumannii* foi preparada em meio MH
339 enriquecido com 0,2% de glicose em concentração final de 1×10^6 UFC/mL. A seguir,
340 100 μ L do inóculo foi adicionado à placa e exposto às diferentes concentrações da MIC
341 preparadas com MH 0,2%, e então a placa foi incubada por 24 h a 37 °C. Após a incubação
342 a placa foi lavada três vezes com solução PBS (1x), fixada com metanol 100% durante
343 uma segunda incubação de 15 minutos. Após esse período, o metanol foi removido e o
344 biofilme formado na placa foi corado com solução de Cristal Violeta 0,4% e incubada por
345 30 minutos. Após isso, a placa foi lavada com solução PBS, e deixada para secar por
346 alguns minutos em temperatura ambiente, e então a densidade óptica foi lida a 630 nm
347 após a adição de 100 μ L etanol 100%.

348 Para a análise de destruição, a placa foi previamente preparada apenas com 100
349 μ L da suspensão de *A. baumannii* preparada na concentração final de 1×10^6 UFC/mL,
350 em meio MH enriquecido com 0,2% de glicose, a fim de promover a formação de biofilme
351 durante a incubação. Após o período de incubação (24 h a 37 °C), a placa foi lavada três
352 vezes com solução PBS, e então exposta a 100 μ L de diferentes concentrações de AgNP
353 (4x MIC, 2x MIC, MIC e 0,5x MIC), novamente incubada (24 h a 37 °C) para ação das
354 AgNP, após esse período ela teve o mesmo tratamento que a placa de inibição após a
355 incubação até a leitura.

356 *3.7. Análises estatísticas*

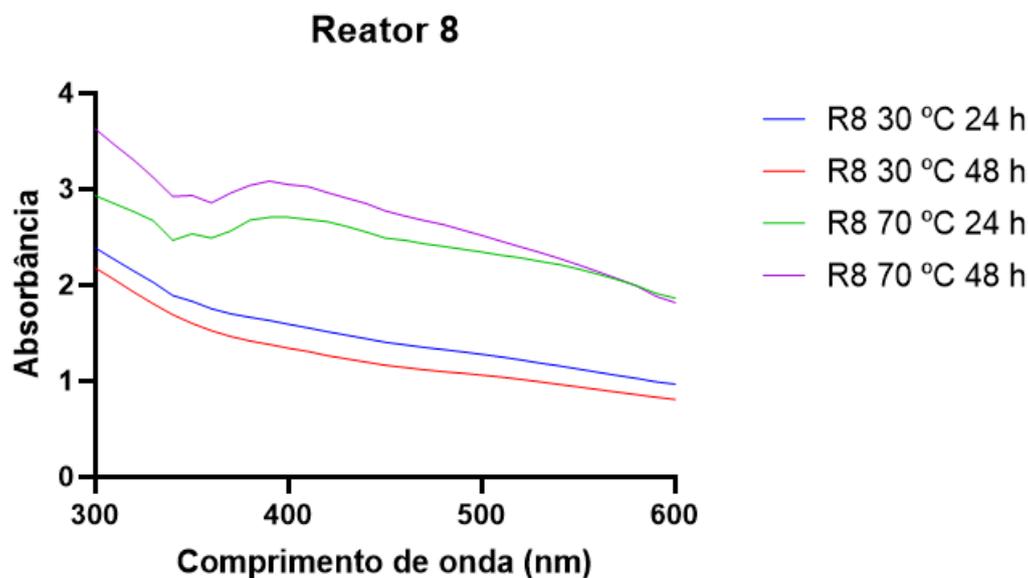
357 Análises de planejamento experimental, cinética e biofilme foram analisados
358 através da ANOVA, com nível de significância de 0,05. As interações entre fatores estão
359 apresentadas por meio de gráfico obtido pela Metodologia de Superfície de Resposta. As
360 comparações das diferentes análises microbiológicas foram determinadas usando
361 ANOVA seguindo o teste de comparações múltiplas de Tukey com nível de significância
362 estatística de 0,05. Os pressupostos da ANOVA (normalidade e homogeneidade da
363 variância) foram avaliados e transformações matemáticas aplicadas caso não fosse
364 verificado pelo menor um deles.

365

366 **4. Resultados**

367 *4.1. Síntese de nanopartículas de prata e o seu acompanhamento por UV-Vis*

368 Para confirmar a síntese de AgNP, foi observada a presença de pico característico no
369 intervalo de 400-450 nm, devido a Ressonância Plasmática de Superfície (Smitha et al.,
370 2008). O primeiro teste de síntese ocorreu com a MOD coletada do reator 8, onde foi
371 testada a temperatura (30 e 70 °C) e o tempo (24 e 48 h) (**Figura 3**).



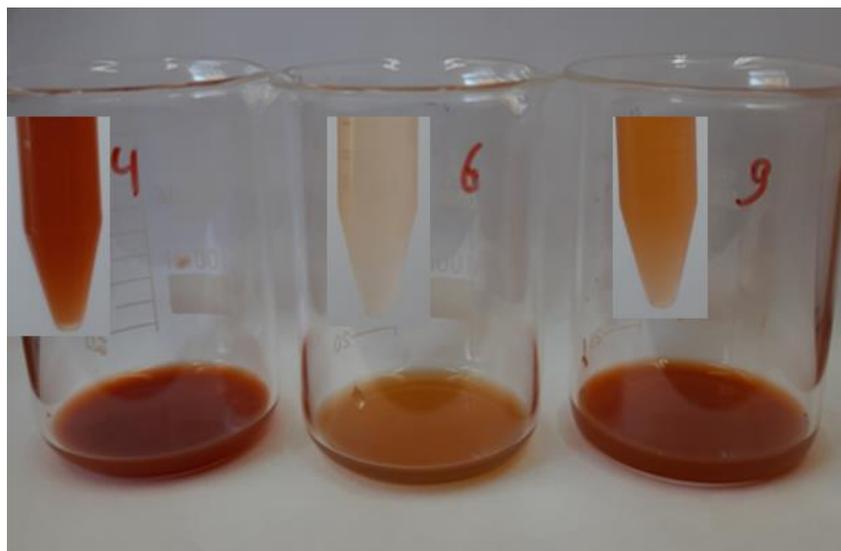
372

373 **Figura 3.** Espectros das sínteses a partir da MOD coletada do reator 8 em diferentes temperaturas
 374 (30 e 70 °C) e tempos (24 e 48 h).

375

376 Ao analisar os espectros, é possível afirmar que a melhor condição para a síntese
 377 foi em 70 °C e 48 h, pelo maior valor de absorvância na faixa de 400-450 nm, dado que
 378 corrobora a diferença de tonalidade da coloração observada durante a síntese que indica
 379 a formação de AgNP. Nas sínteses efetuadas na maior temperatura, foi observado que as
 380 suspensões possuíam uma tonalidade avermelhada mais escura, enquanto uma tonalidade
 381 rosa clara foi observada na menor temperatura.

382 Posteriormente, foram realizadas sínteses na condição de alta temperatura (70
 383 °C), partindo de amostras de MOD coletadas de três reatores diferentes (reatores 4, 6 e
 384 9). Durante o preparo das amostras foram observadas diferenças na tonalidade do
 385 sobrenadante de cada reator (**Figura 4**).

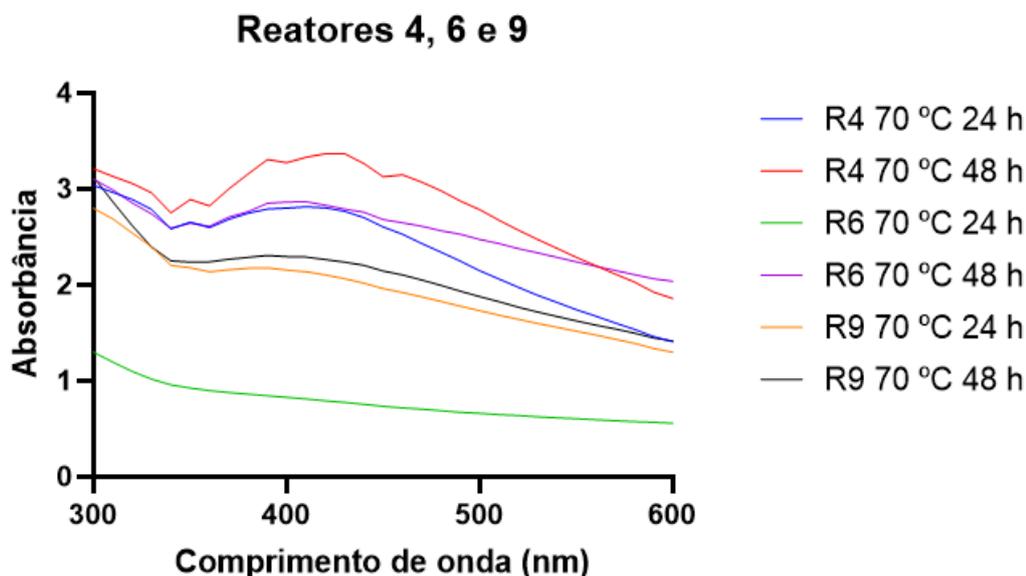


386

387 **Figura 4.** Sobrenadantes da MOD dos reatores 4, 6 e 9 em diferentes tratamentos. Nos tubos, o
388 sobrenadante da MOD foi apenas centrifugado, enquanto nos béqueres o sobrenadante foi
389 sonicado e centrifugado (Seção 3.3).

390

391 Com essas diferenças de tonalidades podemos pressupor que haverá diferenças
392 nas sínteses entre os reatores, além de evidenciar pela mudança de cor que ocorre certa
393 extração de compostos na sonicação. Apesar dessa variabilidade aparente, a síntese em
394 70 °C e 48 h se mostrou ser a mais eficiente assim como na síntese do reator 8, e essa
395 condição aparenta ser melhor devido a sua absorbância para todos os reatores (4, 6 e 9)
396 quando comparados ao seu próprio desempenho em 24 h. O espectro também evidencia
397 que a pressuposição de diferença entre reatores pela tonalidade do sobrenadante da MOD
398 é verdadeira até certo ponto com influência do parâmetro tempo, visto que o reator 4
399 possui o melhor desempenho (70 °C 24 e 48 h) além de ser o sobrenadante com a
400 tonalidade mais escura. No entanto, o reator 6, que aparentemente teria o pior
401 desempenho na síntese pela fraca tonalidade do sobrenadante, teve em 48 h um grande
402 salto de eficácia em relação a 24 h. No caso do reator 9, apesar da síntese aparentar ser
403 mais estável ao longo do tempo, ela não possui um pico bem definido (**Figura 5**).



405

406

407

Figura 5. Espectros das sínteses a partir da MOD coletada dos reatores 4, 6 e 9.

408

409

410

411

412

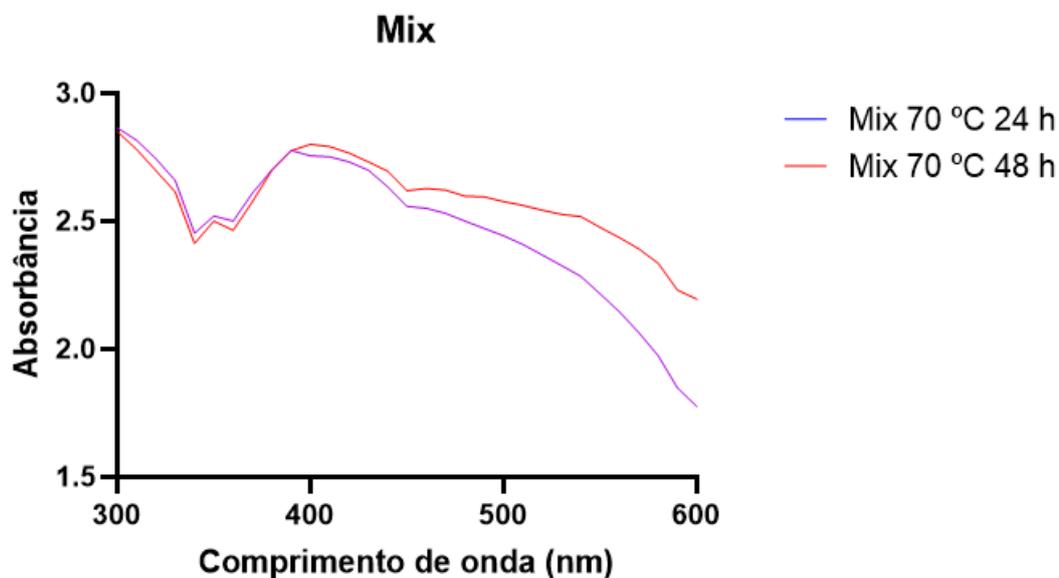
413

414

415

416

Após a detecção dessa variabilidade nas sínteses dos reatores 4, 6 e 9, todas as sínteses a partir deste ponto foram realizadas com o mix da MOD, conforme abordado na Seção 3.3. Como já foi estabelecido nas sínteses anteriores, o melhor parâmetro de síntese em relação a temperatura é 70 °C, logo a síntese do mix foi testada apenas nessa temperatura, mantendo as leituras em 24 e 48 h. No entanto, não foram observadas diferenças entre as leituras ao longo do tempo conforme haviam sido evidenciadas nas sínteses anteriores, porém parece haver uma diferença quanto a definição dos picos gerados na em comparação à **Figura 5**. O que pode ser indício de que o mix da MOD seja mais homogêneo, apresentando uma menor variabilidade (**Figura 6**).



417

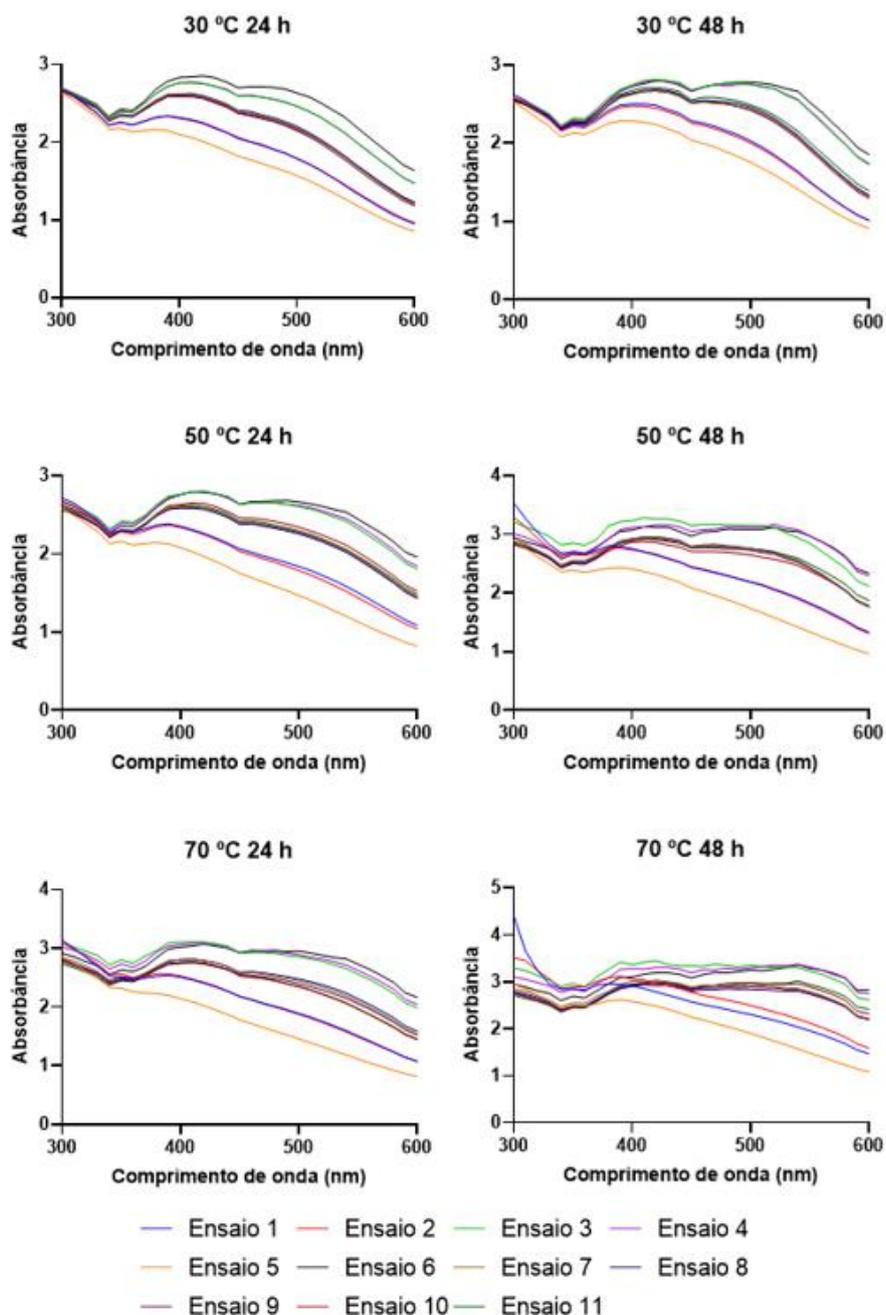
418 **Figura 6.** Espectros das sínteses a partir do mix da MOD.

419

420 Para as sínteses do planejamento experimental podemos perceber que os
 421 espectros dos ensaios com as maiores concentrações de AgNO_3 (ensaios 3, 4 e 6)
 422 apresentaram os melhores espectros, independente da temperatura ou tempo, porém com
 423 o aumento da temperatura e o passar do tempo o desempenho diminuiu.

424 Os espectros mostram que a menor temperatura (30 °C) no menor tempo (24 h)
 425 já atinge o maior nível de resposta em termos de absorbância na faixa de 400-450 nm,
 426 não havendo melhora ao se aumentar a temperatura e o tempo (**Figura 7**).

427



428

429 **Figura 7.** Espectros das sínteses do planejamento experimental a partir do mix da MOD. As
 430 condições de cada ensaios estão descrita na **Tabela 2.**

431

432 4.2. Caracterização da matéria orgânica dissolvida (MOD)

433 4.2.1. Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

434 A MOD liofilizada foi analisada quanto à composição química referente aos
 435 grupos funcionais nela presente (**Figura 8**). Para analisar os espectros gerados foi

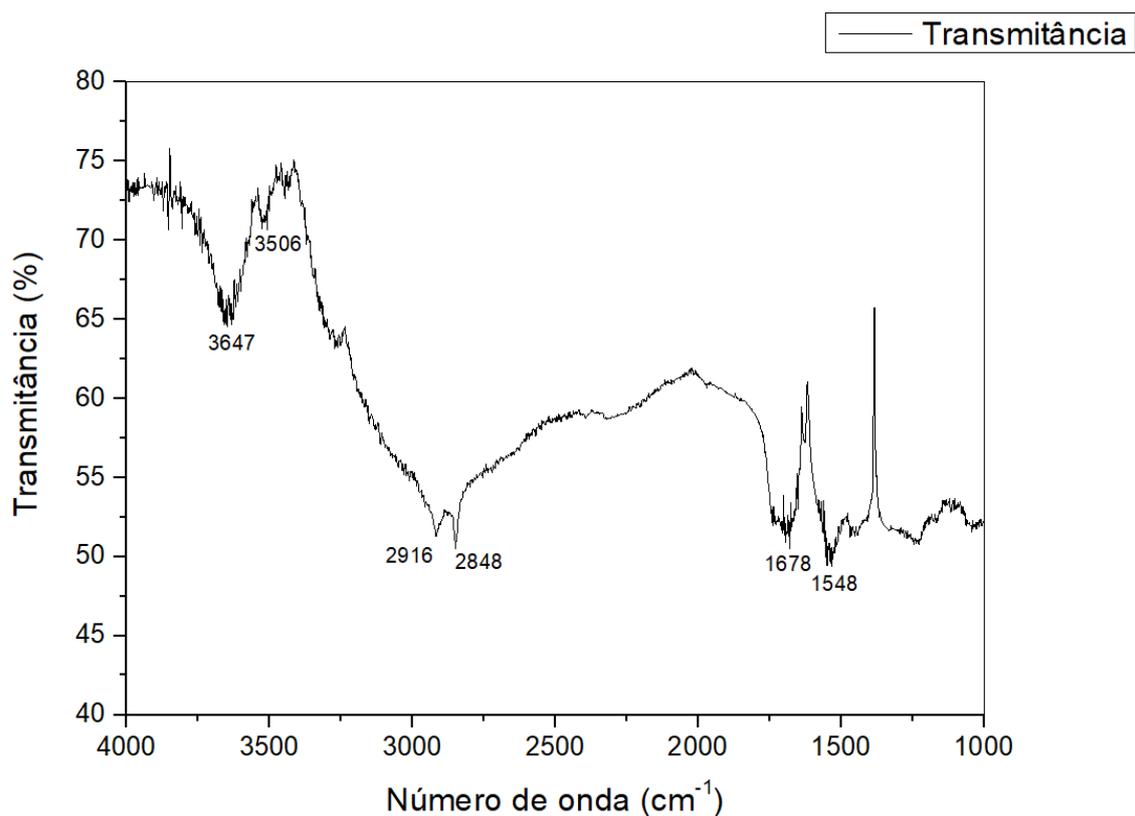
436 utilizado o livro Introdução à Espectroscopia (Pavia et al., 2010) como referência, onde
437 foi possível identificar as seguintes ligações e grupos funcionais:

438 - Os picos encontrados na faixa de 3647 a 3506 cm^{-1} indicam a ligação O-H de
439 álcoois e fenóis,

440 - Os picos encontrados entre 2916 - 2848 cm^{-1} indicam presença de C-H de
441 alcenos e aldeído,

442 - Os picos encontrados entre 1678 - 1548 cm^{-1} indicam C=C de compostos
443 aromáticos além de indicar N-H de aminas e amidas primárias e secundárias.

444



445

446 **Figura 8.** Espectros da análise de FTIR.

447

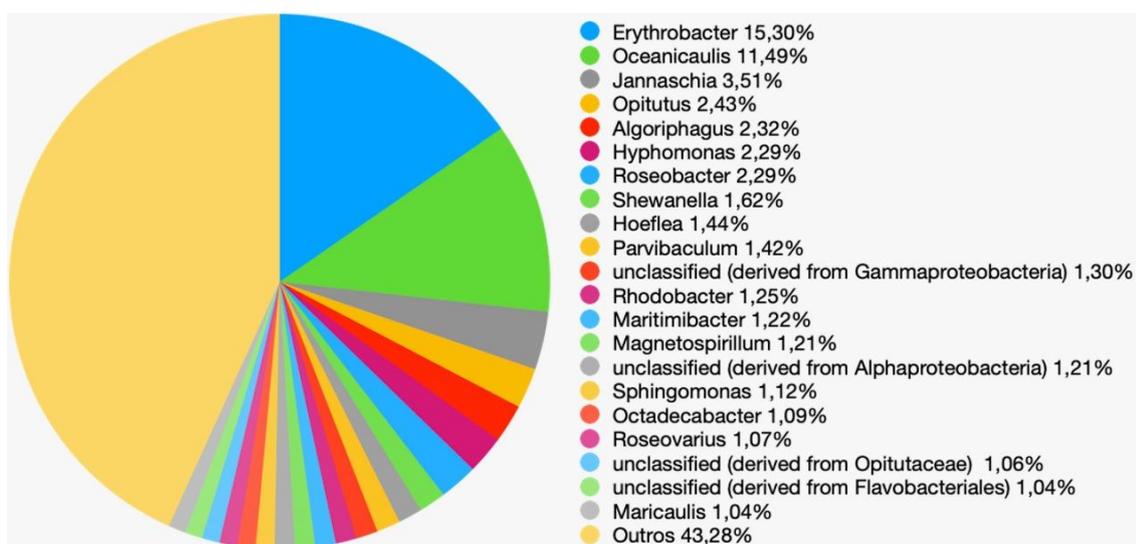
448

449

450 4.2.2 Análise metagenômica

451 As bactérias identificadas na MOD estão apresentadas na **Figura 9**, bactérias
452 cuja concentração foi maior que 1%, estão indicadas por gênero ou classe, e todas as
453 demais bactérias com menores porcentagens estão agrupadas, correspondendo a 43,28%
454 do total. Com isso, é possível observar a diversidade de bactérias presentes no cultivo de
455 *N. ocenica* que foi capaz de ser recuperada com o uso do *skimmer*, intensificando as
456 vantagens da sua utilização, já que além de não interferir nas células da microalga, é capaz
457 de promover a redução de bactérias presentes que podem interferir ao longo do cultivo,
458 além da MOD poder ser utilizada na síntese de AgNP. Os compostos, proveniente dessas
459 bactérias, além dos compostos secretados pelas microalgas foram então responsáveis pela
460 síntese de AgNP.

461



462

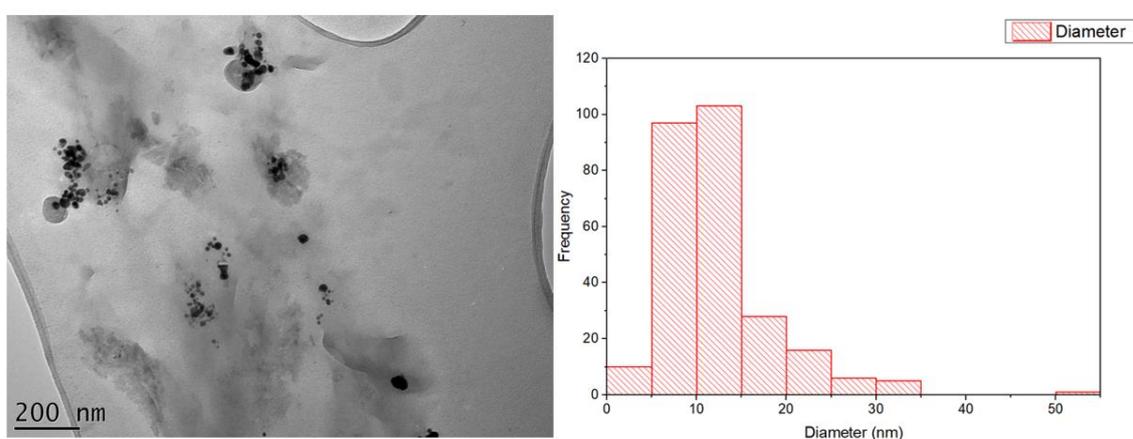
463 **Figura 9.** Bactérias identificadas na MOD por análise de metagenômica.

464

465 4.3. Caracterizações das AgNP obtidas

466 As caracterizações foram feitas no TEM e ImageJ com todas as sínteses
467 selecionadas como apresentando o melhor desempenho (UV-Vis) de cada teste realizado
468 (R8, R4, R6, R9 e MIX em 70 °C 48 h, e 30 °C 24 h do planejamento experimental)

469 As AgNP geradas a partir da MOD do reator 8, selecionadas na melhor condição
470 de síntese (70 °C 48 h), mostram através da sua medição pelo ImageJ, que houve uma
471 maior formação de nanopartículas de tamanho até 15 nm, tendo como tamanho médio
472 $12,28 \pm 6,19$ nm (**Figura 10**).

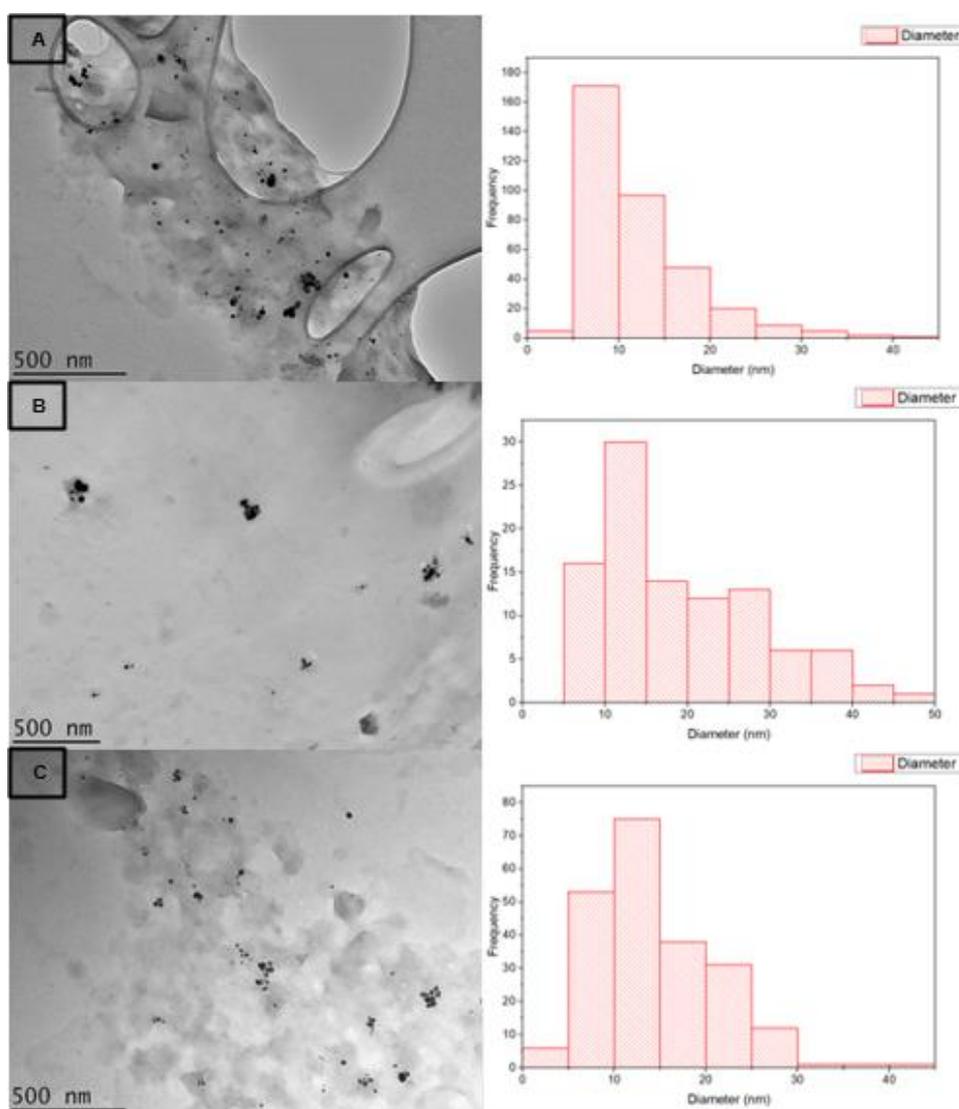


473 **Figura 10.** Imagem da AgNP do R8 (70 °C 48 h) obtidas pelo TEM e sua distribuição de tamanho
474 ($12,28 \pm 6,19$ nm).
475

476
477 As AgNP geradas pelas sínteses dos 3 reatores (reatores 4, 6 e 9) com
478 variabilidade na MOD foram analisadas a partir do melhor desempenho de cada reator
479 (70 °C 48 h). A análise das imagens mostra que o reator 4 possui a maior quantidade e o
480 menor tamanho de AgNP, com a maior parte medindo entre 5 e 15 nm, sendo o tamanho
481 médio de $11,89 \pm 6,33$ nm. Esse reator também é o que possui a melhor leitura no espectro
482 (**Figura 5**) e a maior tonalidade de coloração da MOD (**Figura 4**). Isto sugere que a
483 pressuposição realizada apenas pelo visual do sobrenadante da MOD é verdadeira já que
484 a medição também mostrou que o reator 6, como pressuposto, realmente teve o pior

485 desempenho apesar de ter tido um salto de absorvância em 48 h, apresentando um
486 espectro melhor que o reator 9 em 48 h. Porém o seu tamanho médio ($18,46 \pm 9,29$ nm)
487 foi maior que o reator 9 ($14,21 \pm 6,50$ nm), além de ter sintetizado a menor quantidade de
488 AgNP, mostrando assim que é correlacionar a tonalidade do sobrenadante com o resultado
489 da síntese (**Figura 11**).

490



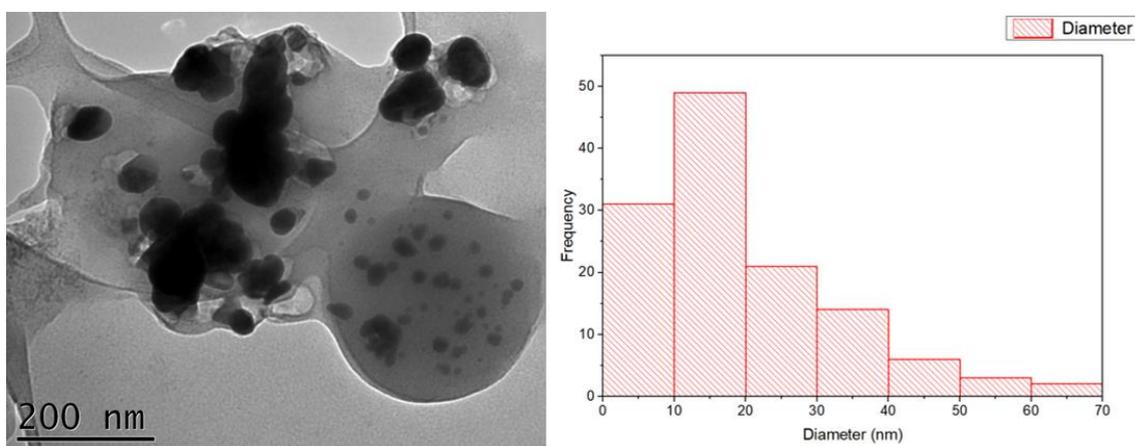
491

492 **Figura 11.** Imagem da AgNP (70 °C 48 h) obtidas pelo TEM e sua distribuição de tamanho. (A)

493 Reator 4: $11,89 \pm 6,33$ nm. (B) Reator 6: $18,46 \pm 9,29$ nm. (C) Reator 9: $14,21 \pm 6,50$ nm.

494

495 A síntese do mix da MOD foi analisada no melhor parâmetro (70 °C 48 h) e as
496 AgNP geradas mostram que houve um aumento geral do tamanho de partícula e uma
497 diminuição da quantidade em relação as outras sínteses (**Figura 12**).

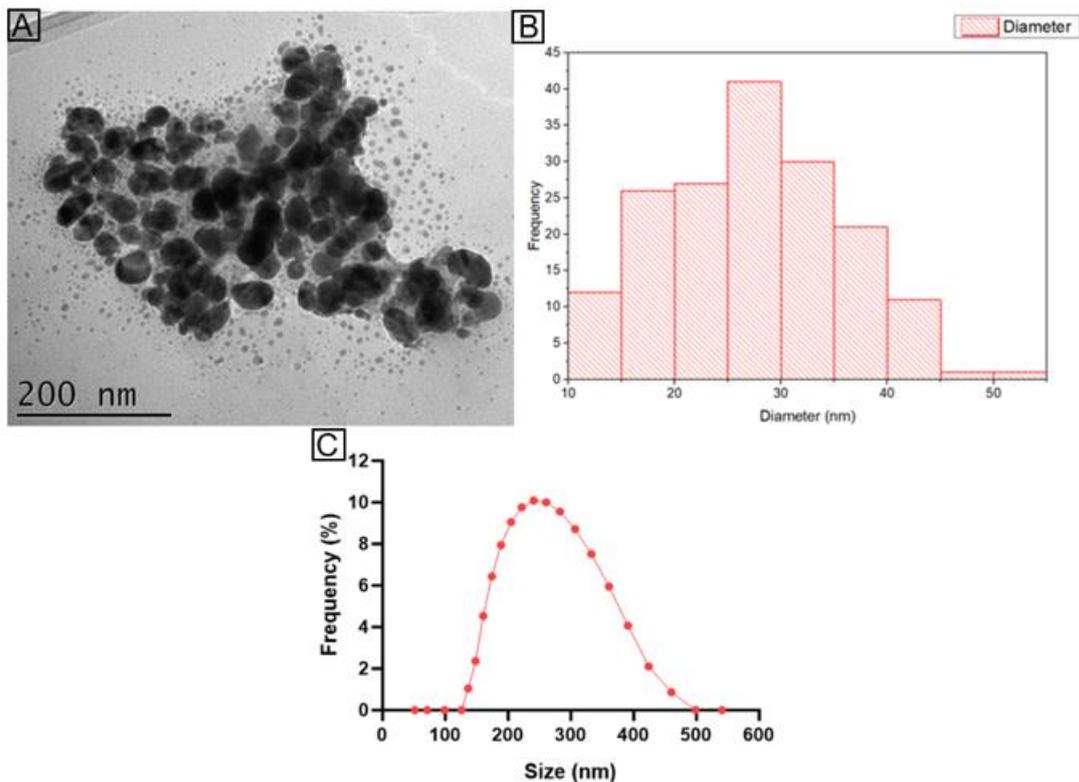


498
499 **Figura 12.** Imagem da AgNP do mix da MOD (70 °C 48 h) obtidas pelo TEM e sua distribuição
500 de tamanho ($20,13 \pm 12,89$ nm).

501

502 Para a análise do planejamento experimental, o ensaio 4 (AgNO_3 1,5 mM e pH
503 8) foi selecionada por usar uma menor concentração de AgNO_3 em relação ao ensaio 6
504 (AgNO_3 1,7 mM) e ter o pH básico, ao contrário do ensaio 3 (AgNO_3 1,5 mM e pH 6). A
505 medição das AgNP mostrou a predominância de tamanhos maiores em relação à todas as
506 sínteses analisadas anteriormente, principalmente dos reatores individuais, além de
507 evidenciar impurezas ao redor das AgNP (**Figura 13**).

508



509

510 **Figura 13.** (A) Imagem da AgNP obtidas pelo TEM e sua distribuição de tamanho ($27,55 \pm 8,41$
 511 nm). (B) Distribuição do diâmetro hidrodinâmico medido pelo Litesizer (C). Os resultados
 512 referem-se ao ensaio 4 (30 °C 24 h) do planejamento experimental utilizado o mix da MOD.

513

514 Essa AgNP (ensaio 4 - 30 °C 24 h) também foi analisada no Litesizer, cujo
 515 resultados estão apresentados na **Tabela 3**. A estabilidade das AgNP está relacionada a
 516 sua interação com o meio através da força eletrostática, a carga superficial negativa das
 517 partículas faz com que elas sejam atraídas a compostos de cargas positivas, e vice-versa.
 518 Sendo a estabilidade considerada moderada quando a carga é ± 25 mV, e partículas com
 519 cargas menores são consideradas instáveis, bem como ± 40 mV significa uma alta
 520 estabilidade. O modo de síntese afeta esses valores, a depender dos compostos que estão
 521 sendo utilizados na redução (Greenwood & Kendall, 1999).

522

523 A diferença de tamanhos entre as análises de TEM ($27,55 \pm 8,41$ nm) e Litesizer
 ($263,87 \pm 4,89$ nm) pode estar relacionado ao método de análise, já que no TEM a amostra

524 é seca e no Litesizer não, sendo assim é medido as AgNP juntamente com íons e outras
 525 moléculas ligadas a superfície. O índice de polidispersão está relacionado a
 526 homogeneidade do tamanho das partículas, na escala 0,0 a 1,0, sendo abaixo de 0,1
 527 considerado uma distribuição homogênea e quanto mais próximo de 1, maior a variação
 528 de tamanho.

529

530 **Tabela 3.** Resultados obtidos via análise no Litesizer para a síntese do ensaio 4 (30 °C 24 h) do
 531 planejamento experimental.

532

Potencial zeta (mV)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão
-20,41 ± 0,32	263,87 ± 4,89	0,178

533

534 4.4. Ensaios microbiológicos

535 4.4.1. Concentração Inibitória Mínima (MIC)

536 As análises de MIC das melhores condições de sínteses selecionadas dos reatores
 537 8, 4, 6, 9 e mix da MOD foram realizadas em *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas*
 538 *aeruginosa* e *Vibrio coralliilyticus*, todas bactérias gram-negativas. Como a concentração
 539 de AgNP sintetizada em cada teste não foi determinada, a análise de MIC está expressa
 540 em porcentagem de AgNP em relação a suspensão original (**Figura 2**).

541 **Tabela 4.** Resultados da atividade antimicrobiana das AgNP em relação as suas concentrações de
 542 MIC, exemplificados na **Figura 2**.

543

MIC (%)			
Compostos	Bactérias		
	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. coralliilyticus</i>
AgNP do R8	6,25	6,25	12,5
AgNP do R4	3,12	3,12	6,25

AgNP do R6	3,12	1,56	3,12
AgNP do R9	6,25	3,12	12,5
AgNP do Mix	1,56	1,56	3,12
Ag ⁺	3,12	1,56	6,25
Ciprofloxacina	128 µg/mL	64 µg/mL	64 µg/mL

544

545 Podemos evidenciar que o mix possuiu a melhor atividade antimicrobiana
546 juntamente com o reator 6, em relação a todas as bactérias testadas, assim como uma
547 maior atividade em relação ao controle da Ag⁺ em *A. baumannii* e *V. coralliilyticus*.

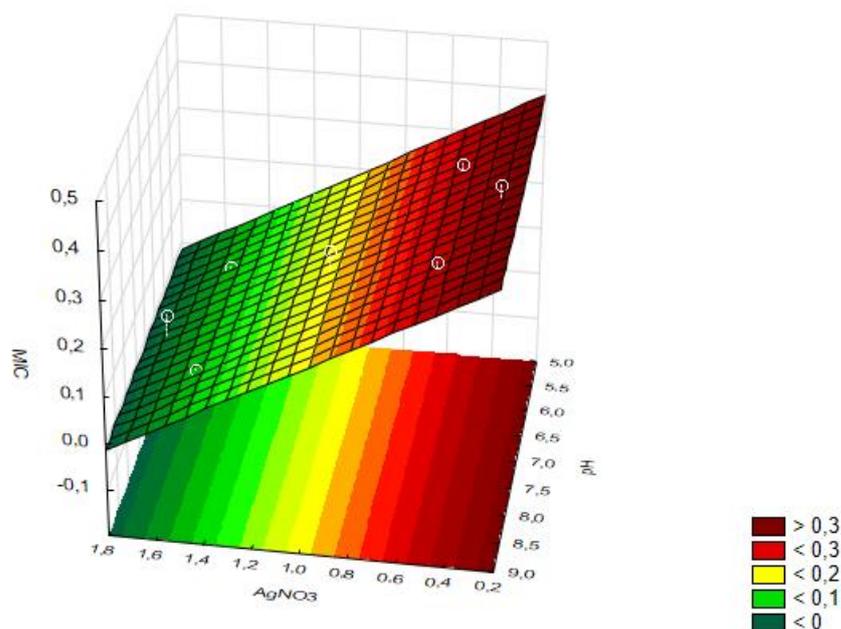
548 As análises de MIC das AgNP do planejamento experimental foi realizada com
549 todos os 11 ensaios nas três temperaturas (30, 50, e 70 °C) e dois tempos (24 e 48 h),
550 testadas em *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, as primeiras duas bactérias gram-
551 negativas e terceira gram-positiva respectivamente. Essas análises mostraram que em
552 todas as bactérias quanto maior a concentração de AgNO₃ do ensaio melhor é a resposta
553 de MIC. Também pode ser constatado que é provável que haja um ponto ótimo em relação
554 ao aumento da temperatura e tempo com o aumento da atividade de MIC, visto que a
555 mesma síntese (ensaio) em condições diferentes (30, 50 e 70 °C, 24 e 48 h) apresenta
556 variações na resposta de MIC principalmente nas bactérias gram-negativas.

557 Para a análise da superfície de resposta foram analisados os dados de MIC dos
558 11 ensaios (30 °C 24 h) em *A. baumannii*, utilizando a densidade óptica da terceira
559 diluição (6,25%) por ser a MIC dos melhores ensaios (3, 4 e 6). Desta forma todos os
560 valores de densidade óptica dos 11 ensaios nessa diluição foram incorporados a matriz. E
561 o resultado da interação desses fatores (AgNO₃, pH e MIC) mostra que o pH não
562 influencia a resposta da MIC, porém a concentração de AgNO₃ influencia, sendo o
563 aumento dessa concentração mais eficiente em relação a resposta de MIC (**Figura 14**).

564 MIC = 0,18 - 0,25[AgNP]

565

R^2 Adj = 0,91881



566

567 **Figura 14.** Matriz de interação dos fatores do planejamento experimental (AgNO₃ e pH) com
568 inserção dos dados de densidade óptica da MIC (6,25%) dos 11 ensaios (30 °C 24 h).

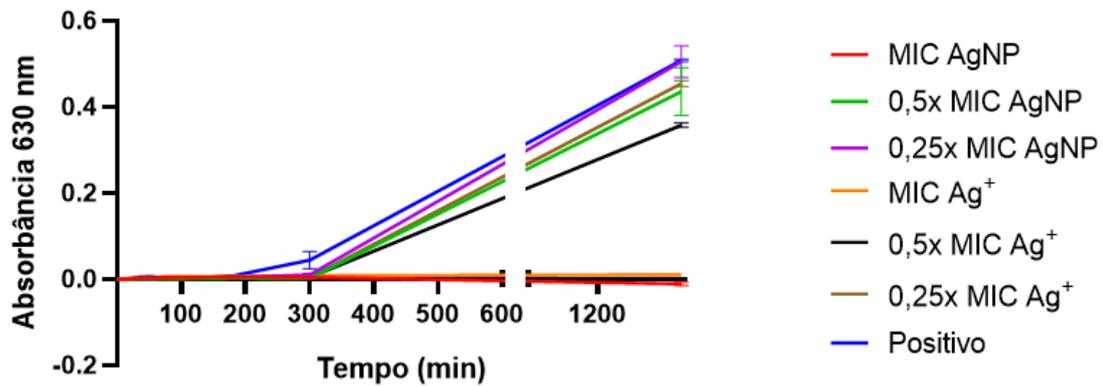
569

570 4.4.2. Cinética de crescimento

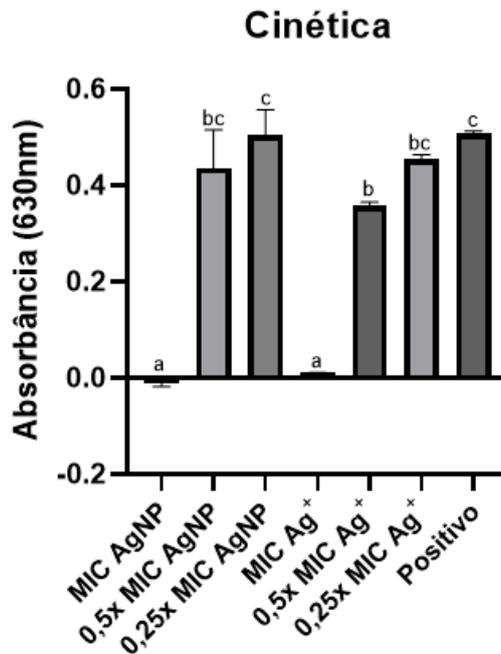
571 A bactéria *A. baumannii* apresentou os melhores resultados de MIC (6,25%) nos
572 ensaios com as maiores concentrações de AgNO₃ (ensaio 3, 4 e 6), porém como já
573 abordado ao selecionar para análise no TEM, apenas o ensaio 4 (30 °C 24 h) foi
574 selecionado para a análise cinética nessa bactéria assim como para a análise de biofilme.

575 A **Figura 15** mostra a relação entre as concentrações de MIC da AgNP e da Ag⁺
576 em relação a atividade do controle positivo (apenas a bactéria). A **Figura 16** mostra que
577 essas diferenças não são significativas entre a MIC AgNP e a MIC Ag⁺, porém são
578 significativas em relação a todos os outros tratamentos. Já o 0,5x MIC AgNP não é
579 significativo em relação ao 0,5x MIC Ag⁺ e nem ao 0,25x MIC Ag⁺. E o positivo não é
580 significativo em relação ao 0,5x MIC AgNP, 0,25x MIC AgNP e ao 0,25x MIC Ag⁺.

581 Ou seja, utilizar a concentração do MIC, tanto da AgNP quanto da Ag⁺ não teve
 582 diferenças na atividade entre eles, bem como é o limiar da atividade, mais diluído (0,5x e
 583 0,25x) no geral (exceto pelo 0,5x MIC Ag⁺) não seria diferente do que não usar nada
 584 (positivo).



585
 586 **Figura 15.** Cinética da AgNP do ensaio 4 (30 °C 24 h), e dos controles de Ag⁺ e da bactéria
 587 (positivo) frente a *A. baumannii* ao longo do tempo.
 588



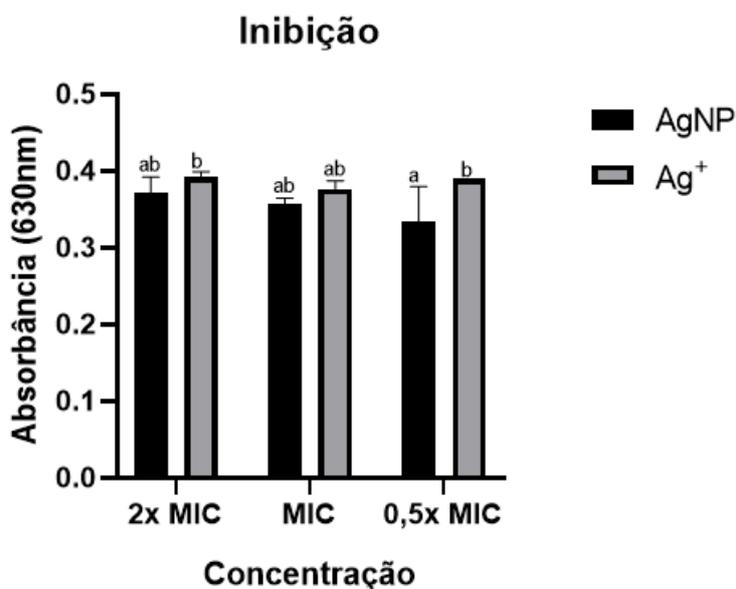
589
 590 **Figura 16.** Análise estatística One-way ANOVA da **Figura 15.**

591

592 4.4.3. Inibição de formação e destruição de biofilme

593 A análise de biofilme foi realizada com o ensaio 4 (30 °C 24 h) em *A. baumannii*
594 por ser uma cepa forte produtora de biofilme. Na análise de inibição, as concentrações
595 testadas mostram que essas comparações apenas possuem diferenças significativas entre
596 2x MIC Ag⁺ e 0,5x MIC AgNP, e entre 0,5x MIC AgNP e 0,5x MIC Ag⁺. Isso evidencia
597 que a menor concentração (0,5x MIC) terá a mesma eficácia, quanto a inibição da
598 formação de biofilme, que a maior concentração (2x MIC), tendo apenas diferença entre
599 a utilização de AgNP e Ag⁺ na menor concentração. Sendo assim, nessa concentração é
600 preciso menos AgNP que Ag⁺ para causar o mesmo efeito. Como pode ser evidenciado
601 pela eficiência de inibição do biofilme pela AgNP em relação ao controle: 37% (2x MIC),
602 36% (MIC) e 33% (0,5x MIC), e por Ag⁺ 39% (2x MIC), 38% (MIC) e 39% (0,5x MIC),
603 calculada a partir do desconto dos controles (**Figura 17**).

604



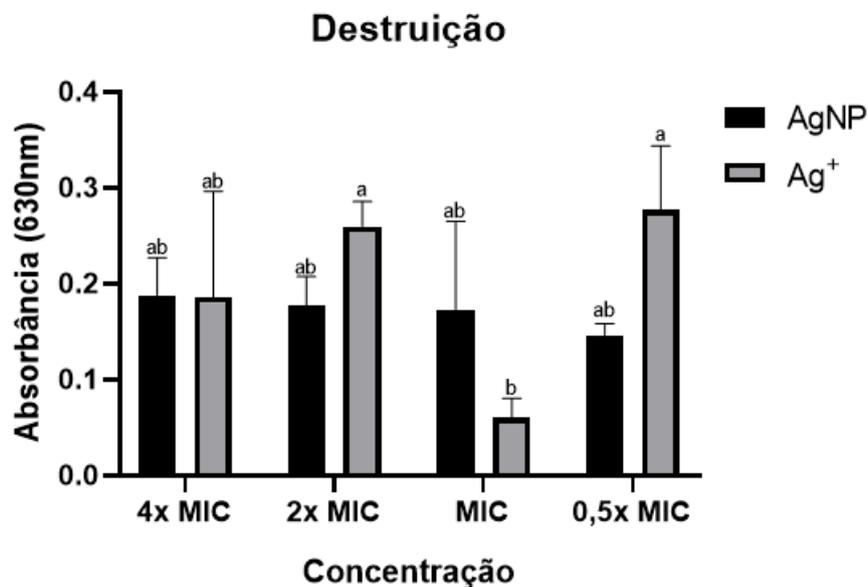
605

606 **Figura 17.** Análise estatística Two-way ANOVA da atividade de inibição do biofilme.

607

608 Na análise de destruição do biofilme, as concentrações testadas mostram que
609 essas comparações apenas possuem diferenças significativas entre 2x MIC Ag⁺ e MIC
610 Ag⁺, e entre MIC Ag⁺ e 0,5x MIC Ag⁺, evidenciando que a MIC Ag⁺ não é capaz de
611 destruir o biofilme como nessas concentrações de Ag⁺. E mostrando também que não há
612 diferença entre a utilização de AgNP ou Ag⁺ na mesma concentração, além de mostrar
613 que a menor concentração (0,5x MIC) terá a mesma eficácia quanto a destruição de
614 biofilme que a maior concentração (4x MIC). Como pode ser evidenciado pela eficiência
615 de destruição do biofilme de AgNP em relação ao controle: 19% (4x MIC), 18% (2x
616 MIC), 17% (MIC) e 15% (0,5x MIC), e por Ag⁺ 19% (4x MIC), 26% (2x MIC), 6%
617 (MIC) e 28% (0,5x MIC) (**Figura 18**).

618



619

620 **Figura 18.** Análise estatística Two-way ANOVA da atividade de destruição do biofilme.

621

622 5. Discussão

623 Como a síntese de AgNP a partir da MOD coletada do cultivo da microalga *N.*

624 *oceanica* via *skimmer* é uma inovação desse trabalho, sendo a primeira vez testada,

625 algumas comparações foram feitas a partir de sínteses utilizando a microalga
626 *Nannochloropsis sp.*, e outras com microalgas em geral, dulcícolas e marinhas, abordando
627 as diferentes formas de síntese, como visto na **Introdução** (cultivo, sobrenadante, pellet
628 e extrato).

629 *Nannochloropsis sp.* não é uma espécie bem estudada para produção de AgNP,
630 fato constatado pelo levantamento bibliográfico, onde há poucos artigos que podem ser
631 utilizados de base comparativa. A síntese intracelular a partir do cultivo de *N. oculata* foi
632 relatada por Mohseniazar et al. (2011) em que o AgNO₃ foi diretamente adicionado na
633 fase exponencial do cultivo em diferentes concentrações (1, 2 e 5 mM), e monitorados
634 dois tempos de reação (24 e 48 h), onde foi constatado que 1 mM de AgNO₃ em 24 h era
635 a melhor condição visto que não houve diferença significativa ao aumentar os parâmetros
636 (concentração de AgNO₃ e tempo), e nessas condições, a caracterização no TEM
637 demonstrou que as AgNP tinham tamanho de tamanho de até 15 nm. Outra síntese
638 utilizando o cultivo de *N. oculata* foi realizado por El-Kassas et al. (2017), ao invés de
639 adicionar AgNO₃ direto no cultivo, utilizou apenas 5 mL do cultivo junto com 100 mL
640 de solução de AgNO₃ a 1 mM, em pH 7 durante 72 h, a 28 °C. Dados do TEM mostraram
641 nanopartículas com uma média de tamanho de 19 nm, e a análise de FTIR realizada nas
642 AgNP mostrou a presença de proteína (amidas), carbonilas, álcoois terciários, sugerido
643 que as AgNP foram reduzidas por proteínas, com compostos aromáticos como agentes
644 estabilizadores.

645 Já para a síntese extracelular, Gnanakani et al. (2019) reportaram a síntese de
646 AgNP a partir de extratos da biomassa de *Nannochloropsis sp.*, onde o extrato alcoólico
647 foi incubado com 1 mM de AgNO₃ durante 7 dias a 60 °C - 80 °C. A análise no TEM
648 mostrou um tamanho médio de partículas de 57,25 nm. Esse trabalho trouxe também
649 dados sobre o índice de polidispersão (0,364) superiores que ao encontrado nesse trabalho

650 (0,178), logo, com AgNP mais heterogêneas em tamanho, potencial zeta (-5,7 mV)
651 indicando a uma grande instabilidade sendo bastante contrastado ao valor encontrado
652 nesse trabalho (-20,41). Isto sugere uma vantagem da metodologia utilizada neste trabalho,
653 que além de não utilizar a biomassa, foi capaz de sintetizar a partir da MOD uma AgNP
654 mais estável. Foi realizado também a atividade antimicrobiana (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S.*
655 *aureus* e *B. subtilis*), e FTIR das AgNP e do extrato. O FTIR do extrato mostrou picos
656 que evidenciam a presença de compostos, como ácidos graxos, polifenóis e amidas. Já na
657 análise da AgNP ocorreram algumas mudanças, como diminuição da intensidade e novos
658 picos, que indicam a participação desses compostos na redução, como a sugestão dada
659 pelos autores da oxidação dos polifenóis. Foi concluído então que grupos carboxílicos de
660 ácidos graxos, tetraterpenóides de xantofilas, carboxila e hidroxila de grupos polifenóis,
661 carbonila e amida de proteínas podem estar envolvidos na síntese de AgNP.

662 A matéria orgânica do cultivo de *N. oceanica* coletada via membrana de
663 ultrafiltração (membrana de 50 kDa) foi analisada no FTIR por Zhang et al. (2016), onde
664 foi detectado a presença de picos de grupos de hidroxila (polissacarídeos), aminas,
665 manose ou galactose ou grupos aromáticos de substâncias húmicas, fenóis e carboidratos
666 de substâncias húmicas. Ou seja, predominantemente polissacarídeos e substâncias
667 húmicas. Havendo assim, correlação com a amostra de MOD deste trabalho coletada via
668 *skimmer* onde também é constatado a presença de fenóis e aminas como apresentado na
669 **Seção 4.2.1.**

670 Além disso, Xiong et al. (2021) demonstraram que há a síntese natural de AgNP
671 em ambientes aquáticos mediados por EPS (substâncias poliméricas extracelulares) da
672 microalga *Chlorella pyrenoidosa*, mais especificamente polissacarídeos e proteínas (de
673 acordo com os dados de FTIR do EPS) facilitados pela luz, ocorrendo no escuro em
674 velocidade menor, evidenciando a síntese em condições ambientais de AgNP de tamanho

675 de 15 nm, onde a EPS atua como bom agente estabilizador. Outro, ponto a ser levando é
676 a capacidade de síntese de AgNP pelas bactérias identificadas na **Seção 4.2.2**. Por
677 exemplo, na bactéria *Shewanella sp.* já foi constatada a capacidade de síntese de AgNP
678 pelo seu sobrenadante, gerando AgNP de tamanho médio de 38 nm, com atividade
679 antibacteriana em *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Mondal et al., 2020).

680 As análises antimicrobianas de AgNP sintetizadas de microalgas não costumam
681 abordar as concentrações de AgNP testadas, tornando não palpável as comparações de
682 respostas do poder de atividade, além dos trabalhos encontrados utilizarem outras
683 metodologias em que é avaliado a zona de inibição (mm). Portanto, para comprovar que
684 há uma ampla gama de AgNP sintetizadas de diversas formas e a partir de diversas
685 microalgas foi feito um pequeno compilado (**Tabela 5**) que mostra o efeito dessas AgNP
686 em diversas bactérias.

687 Apesar de não ter sido encontrado artigos que tenham testado a atividade de
688 destruição de biofilme por AgNP sintetizadas de microalgas. Foi encontrado resultados
689 para a inibição de biofilme, porém não com a *A. baumannii*. Shafreen et al., (2017)
690 sintetizou AgNP a partir do extrato aquoso de *Nitzschia palea* que apresentou 80% de
691 inibição do biofilme em *E. coli*. Já a AgNP sintetizada do extrato alcoólico de *Spirulina*
692 *platensis* apresentou 85,63% de inibição em *P. aeruginosa* (LewisOscar et al., 2021). A
693 AgNP sintetizada do sobrenadante de *C. vulgaris* foi testado em *Citrobacter sp.*, *S. aureus*
694 (ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 35218) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853), apesar de ter
695 apresentado resultados de inibição não foi informado a porcentagem (Salaam et al., 2020).

696

697

698 **Tabela 5.** Atividade antimicrobiana a partir de AgNP sintetizadas de diferentes maneiras a partir
699 de microalgas.

Microalga	Síntese	Bactéria	Referência
<i>Botryococcus braunii</i> e <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Extrato (EPS)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922), <i>S. aureus</i> (ATCC 12600) e <i>S. aureus</i> resistente a Meticilina (MRSA-ATCC 43300)	Navarro-Gallón et al., 2019
<i>Botryococcus braunii</i>	Pellet e sobrenadante	<i>E. coli</i> (ATCC 25922), <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) e <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	Arévalo-Gallegos et al., 2018
<i>Botryococcus braunii</i>	Extrato aquoso	<i>E. coli</i> (MTCC 442), <i>P. aeruginosa</i> (MTCC 441), <i>K. pneumoniae</i> (MTCC 109) e <i>S. aureus</i> (MTCC 96)	Arya et al., 2018
<i>Nostoc linckia</i>	Extrato (ficocianina)	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>	El-Naggar et al., 2017
<i>Porphyridium cruentum</i>	Extrato alcoólico	<i>E. coli</i> (ATCC 25922), <i>P. aeruginosa</i> (PA01), <i>B. subtilis</i> (KCTC 13429), <i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	Jeon et al., 2021
<i>Chlorella</i> sp.	Extrato alcoólico	<i>B. subtilis</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. pasteurii</i> e <i>E. coli</i>	Kashyap et al., 2019
<i>Chaetoceros</i> sp., <i>Skeletonema</i> sp. e <i>Thalassiosira</i> sp.	Pellet	<i>B. subtilis</i> , <i>S. Pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Aeromonas</i> sp. e <i>E. coli</i>	Mishra et al., 2020
<i>Chaetoceros calcitrans</i> , <i>Chlorella salina</i> , <i>Isochrysis galbana</i> e <i>Tetraselmis gracilis</i>		<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Proteus</i> sp. e <i>Pseudomonas</i> sp.	Merin et al., 2010
<i>Oscillatoria limnetica</i>	Pellet	<i>E. coli</i> e <i>B. cereus</i>	Hamouda et al., 2019
<i>Scenedesmus</i> sp.	Cultivo	<i>B. subtilis</i> , <i>B. sphaericus</i> e <i>B. pasteurii</i>	Kashyap et al., 2021
<i>Oscillatoria</i> sp.	Sobrenadante	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Salmonella</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp. e <i>Pseudomonas</i> sp.	Sunil et al., 2017
<i>Nostoc aquatica</i>	Extrato aquoso	<i>E. coli</i> (ATCC 8739), <i>K. pneumoniae</i> (ATCC 2719), <i>B. subtilis</i> (ATCC 6633) e <i>S. aureus</i> (ATCC 29736)	Selvan et al., 2018
<i>S. platensis</i>	Extrato aquoso	<i>E. coli</i> (MTCC-9721), <i>Proteus vulgaris</i> (MTCC-7299), <i>Klebsiella pneumoniae</i> , (MTCC-9751), <i>S. aureus</i> (MTCC-9542), <i>S. epidermidis</i> (MTCC-2639) e <i>Bacillus cereus</i> (MTCC-9017)	Sharma et al., 2015
<i>C. vulgaris</i>	Pellet	<i>S. aureus</i> (MRSA) e <i>Streptococcus</i> sp.	Aldayel et al., 2022
<i>Isochrysis</i> sp.	Extrato aquoso	<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	Tevan et al., 2017

700

701

Além dos dados do potencial zeta de Gnanakani et al. (2019) a partir do extrato

702

alcoólico de *Nannochloropsis* sp., na **Tabela 6** está apresentado outros valores de

703

potencial zeta de sínteses de AgNP compilados da literatura.

704

Tabela 6. Dados de potencial zeta de AgNP sintetizadas de diferentes maneiras a partir de

705

microalgas.

Potencial zeta (mV)	Síntese	Referência
Microalgas dulcícolas		
<i>B. braunii</i> -51,81 ± 3,01	EPS	Navarro-Gallón et al., 2019
<i>C. vulgaris</i> -31,3	Polissacarídeo	El-Naggar et al., 2020
<i>C. vulgaris</i> +26	Sobrenadante	Ebrahiminezhad et al., 2016
<i>C. vulgaris</i> -17	Extrato aquoso	Torabfam et al., 2020
Diatomáceas marinhas		
<i>Chaetoceros</i> sp. -19,4 ± 0,10	Pellet	Mishra et al., 2020
<i>Skeletonema</i> sp. -16,33 ± 0,55		
<i>Thalassiosira</i> sp. -5,67 ± 0,467		
Cianobactérias		
<i>Nostoc carneum</i> -32 ± 4,93	Pigmento (ficoeritrina)	El-Naggar et al., 2018
<i>Nostoc linckia</i> -31,8 ± 5,37	Pigmento (ficocianina)	El-Naggar et al., 2017

<i>Synechococcus elongates</i> -9,11	Cultivo	Satapaphy et al., 2017
--------------------------------------	---------	------------------------

706

707 A **Tabela 6** evidencia variedade de resultados de estabilidade das AgNP, a
708 depender da microalga e do composto utilizado na redução. Tendo em vista os parâmetros
709 de estabilidade registrados neste trabalho (**Seção 4.3**), o valor de ± 25 mV representa
710 uma estabilidade moderada e ± 40 mV uma alta estabilidade. As AgNP desse trabalho (-
711 20,41 mV) possuem uma estabilidade moderada que pode ser melhorada com a utilização
712 de compostos estabilizantes na síntese. Compostos esses que poderiam ser extraídos de
713 microalgas como polissacarídeos, que se mostraram bons agentes estabilizantes da
714 reação, como constatado por Navarro-Gallón et al. (2019) que obteve AgNP de *B. braunii*
715 de alta estabilidade (-51.81 ± 3.01 mV) e El-Naggar et al. (2020) que obteve de *C.*
716 *vulgaris* AgNP de estabilidade moderada (-31,3 mV) e maior que a obtida nesse trabalho.

717 Vale ressaltar que um melhor uso dos recursos naturais para a síntese de AgNP
718 está em ampla discussão visto a necessidade do desenvolvimento de tecnologias
719 sustentáveis. Com isso, o conceito de economia circular está presente nos recentes
720 avanços de síntese sustentável de AgNP, como a síntese biológica e a utilização de
721 resíduos orgânicos da indústria. As microalgas representam um promissor caso da
722 aplicabilidade desse conceito, já que elas podem ser cultivadas em resíduos e o seu
723 próprio resíduo gerado, como a matéria orgânica secretada ao longo do cultivo pode ser
724 utilizada na síntese de AgNP como mostrou esse trabalho (Chan et al., 2020).

725 Sendo assim, a síntese biológica de AgNP além de ser sustentável possui custos
726 menores e é mais escalonável que a síntese física e química, já que não requer alta
727 demanda de energia e equipamentos, nem produtos químicos altamente tóxicos. Sendo
728 ainda possível na síntese biológica o uso de matéria-prima descartada pela indústria,

729 porém rica em compostos orgânicos e praticamente sem custos de obtenção, gerando um
730 produto sustentável de valor agregado (Brar et al., 2022).

731

732 **6. Conclusão**

733 Esse trabalho mostrou que a MOD coletada do cultivo de *N. oceanica* pelo
734 *skimmer* é capaz de ser utilizada biotecnologicamente gerando um produto de alto valor
735 agregado e baixo custo de produção. O uso do *skimmer* seria uma alternativa para a coleta
736 da MOD para síntese de AgNP, não se utilizando a microalga em si mas um resíduo da
737 sua produção. Assim, poderia ser empregada sem comprometer as aplicações já bem
738 estabelecidas para o uso da biomassa de microalgas, tornando a produção mais
739 sustentável, em que não há impacto na capacidade de produção de microalgas e fazendo
740 com que o cultivo e seu resíduo sejam integralmente aproveitados.

741

742 **7. Perspectivas futuras**

743 O primeiro passo em relação a utilização da MOD proveniente do cultivo de *N.*
744 *oceanica* coletada via *skimmer* foi dado com esse trabalho, se avaliando a possibilidade
745 de efetuar uma síntese verde de AgNP bem como as suas propriedades antibacterianas,
746 sendo uma alternativa ao uso de antibióticos. Porém trabalhos futuros devem ser
747 realizados para desenvolvimento integral do pacote tecnológico, como:

- 748 • Entender melhor quais são os compostos responsáveis pela síntese e a influência
749 da composição da MOD em relação a sua época de coleta, histórico do cultivo,
750 tempo de uso do *skimmer* na coleta, etc.;
- 751 • Como foi constatado que a MOD é um melhor agente redutor do que um agente
752 estabilizador da síntese, é necessário realizar testes em relação a estabilidade das

753 AgNP, a partir de condições da síntese, bem como testando compostos com essas
754 características;

- 755 • Realizar um planejamento experimental com as variáveis acima mencionadas,
756 para atingir a padronização da síntese em relação ao tamanho, formato, quantidade
757 e estabilidade das AgNP.

758

759 **8. Referências**

760 Aldayel, M.F.; Al Kuwayti, M.A.; El Semary, N.A.H. Investigating the Production of
761 Antimicrobial Nanoparticles by *Chlorella vulgaris* and the Link to Its Loss of Viability.
762 *Microorganisms* 2022, 10, 145. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010145>

763 Arévalo-Gallegos, A., Garcia-Perez, J. S., Carrillo-Nieves, D., Ramirez-Mendoza, R.,
764 Iqbal, H., & Parra-Saldívar, R. (2018). *Botryococcus braunii* as a bioreactor for the
765 production of nanoparticles with antimicrobial potentialities. *International Journal of*
766 *Nanomedicine*, Volume 13, 5591–5604. <https://doi.org/10.2147/ijn.s174205>

767 Arya, A., Gupta, K., Chundawat, T. S., & Vaya, D. (2018). Biogenic Synthesis of Copper
768 and Silver Nanoparticles Using Green Alga *Botryococcus braunii* and Its Antimicrobial
769 Activity. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018, 1–9.
770 <https://doi.org/10.1155/2018/7879403>

771 Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The History of
772 Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to
773 Nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>

774 Brar, K. K., Magdoui, S., Othmani, A., Ghanei, J., Narisetty, V., Sindhu, R., Binod, P.,
775 Pugazhendhi, A., Awasthi, M. K., A. Pandey. (2022). Green route for recycling of low-
776 cost waste resources for the biosynthesis of nanoparticles (NPs) and nanomaterials
777 (NMs)-A review. *Environmental Research* 207, 112202.
778 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112202>

779 Chan, S. S., Low, S. S., Chew, K. W., Ling, T. C., Rinklebe, J., Juan, J. C., Ng, E.P.,
780 Show, P.L. (2022). Prospects and environmental sustainability of phyconanotechnology:

781 A review on algae-mediated metal nanoparticles synthesis and mechanism.
782 Environmental Research 212, 113140. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113140>

783 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. Methods for Dilution
784 Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. CLSI, Wayne,
785 PA.

786 Dahoumane, S. A., Mechouet, M., Wijesekera, K., Filipe, C. D. M., Sicard, C.,
787 Bazylnski, D. A., & Jeffryes, C. (2017). Algae-mediated biosynthesis of inorganic
788 nanomaterials as a promising route in nanobiotechnology – a review. Green Chemistry,
789 19(3), 552–587. <https://doi.org/10.1039/c6gc02346k>

790 Ebrahiminezhad, A., Bagheri, M., Taghizadeh, S.-M., Berenjian, A., & Ghasemi, Y.
791 (2016). Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using microalgal secretory
792 carbohydrates as a novel anticancer and antimicrobial. Advances in Natural Sciences:
793 Nanoscience and Nanotechnology, 7(1), 015018. [https://doi.org/10.1088/2043-](https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/1/015018)
794 [6262/7/1/015018](https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/1/015018)

795 El-Kassas, H. Y., & Ghobrial, M. G. (2017). Biosynthesis of metal nanoparticles using
796 three marine plant species: anti-algal efficiencies against “*Oscillatoria simplicissima*”.
797 Environmental Science and Pollution Research, 24(8), 7837–7849.
798 <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8362-5>

799 El-Naggar, N. E.-A., Hussein, M. H., & El-Sawah, A. A. (2017). Bio-fabrication of silver
800 nanoparticles by phycocyanin, characterization, in vitro anticancer activity against breast
801 cancer cell line and in vivo cytotoxicity. Scientific Reports, 7(1).
802 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11121-3>.

803 El-Naggar, N. E.-A., Hussein, M. H., & El-Sawah, A. A. (2018). Phycobiliprotein-
804 mediated synthesis of biogenic silver nanoparticles, characterization, in vitro and in vivo
805 assessment of anticancer activities. Scientific Reports, 8(1).
806 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27276-6>

807 El-Naggar, N. E.-A., Hussein, M. H., Shaaban-Dessuuki, S. A., & Dalal, S. R. (2020).
808 Production, extraction and characterization of *Chlorella vulgaris* soluble polysaccharides
809 and their applications in AgNPs biosynthesis and biostimulation of plant growth.
810 Scientific Reports, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59945-w>

811 Gnanakani, P.E., Santhanam, P., Premkumar, K., Kumar, K.E., Dhanaraju, M.D. (2019).
812 Nannochloropsis extract-mediated synthesis of biogenic silver nanoparticles,
813 characterization and in vitro assessment of antimicrobial, antioxidant and cytotoxic
814 activities. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.
815 <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.8.2353>

816 Greenwood, R and K. Kendall. (1999). Electroacoustic studies of moderately
817 concentrated colloidal suspensions. Journal of the European Ceramic Society 19 (4): 479–
818 488.

819 Halicki, P. C. B., Radin, V., Von Groll, A., Nora, M. V., Pinheiro, A. C., da Silva, P. E.
820 A., & Ramos, D. F. (2020). Antibiofilm potential of Arenecarbaldehyde 2-
821 pyridinylhydrazone derivatives against *Acinetobacter baumannii*. Microbial Drug
822 Resistance, 26(12), 1429-1436. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0185>

823 Hamouda, R. A., El-Mongy, M. A., Eid, K. F. (2019) Comparative study between two
824 red algae for biosynthesis silver nanoparticles capping by SDS: Insights of
825 characterization and antibacterial activity. Microbial Pathogenesis 129, 224-232.
826 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.016>

827 Jeon, M. S., Han, S.-I., Park, Y. H., Kim, H. S., & Choi, Y.-E. (2021). Rapid green
828 synthesis of silver nanoparticles using sulfated polysaccharides originating from
829 *Porphyridium cruentum* UTEX 161: evaluation of antibacterial and catalytic activities.
830 Journal of Applied Phycology. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02540-x>

831 Kaabipour, S., Hemmati, S., (2021). A review on the green and sustainable synthesis of
832 silver nanoparticles and one-dimensional silver nanostructures. Beilstein Journal of
833 Nanotechnology. <https://doi.org/10.3762/bjnano.12.9>

834 Kashyap, M., Samadhiya, K., Ghosh, A., Anand, V., Shirage, P. M., & Bala, K. (2019).
835 Screening of microalgae for biosynthesis and optimization of Ag/AgCl nano hybrids
836 having antibacterial effect. RSC Advances, 9(44), 25583–25591.
837 <https://doi.org/10.1039/c9ra04451e>

838 Kashyap, M., & Kiran, B. (2021). Milking microalgae in conjugation with nano-
839 biorefinery approach utilizing wastewater. Journal of Environmental Management, 293,
840 112864. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112864>

841 Khalid, M., Khalid, N., Ahmed, I., Hanif, R., Ismail, M., & Janjua, H. A. (2017).
842 Comparative studies of three novel freshwater microalgae strains for synthesis of silver
843 nanoparticles: insights of characterization, antibacterial, cytotoxicity and antiviral
844 activities. *Journal of Applied Phycology*, 29(4), 1851–1863.
845 <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1071-0>

846 Khanna, P., Kaur, A., & Goyal, D. (2019). Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis,
847 characterization and applications. *Journal of Microbiological Methods*, 105656.
848 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105656>

849 Kubelka, B. G., Pinto, W. T., & Abreu, P. C. (2017). Hydrodynamic performance of two
850 air nozzles diameters on the massive microalgae culture: Computational and
851 experimental approaches. *Algal Research*, 27, 318-324.
852 <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.024>

853 Lekang OI (2013) *Aquaculture Engineering: Second Edition*. John Wiley & Sons, Oxford

854 LewisOscar, F., Nithya, C., Vismaya, S., Arunkumar, M., Pugazhendhi, A., Nguyen-Tri,
855 P., S, Alharbi., Thajuddin, N. (2021). In vitro analysis of green fabricated silver
856 nanoparticles (AgNPs) against *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilm formation, their
857 application on urinary catheter. *Progress in Organic Coatings*, 151, 106058.
858 <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.106058>

859 Márquez, J. C. M., Partida, A. H., Dosta M. C. M., Mejía, J. C., Martínez J. A. B. (2018).
860 Silver nanoparticles applications (AgNPS) in aquaculture. *International Journal of*
861 *Fisheries and Aquatic Studies*.

862 Merin, D. D., Prakash, S., & Bhimba, B. V. (2010). Antibacterial screening of silver
863 nanoparticles synthesized by marine micro algae. *Asian Pacific Journal of Tropical*
864 *Medicine*, 3(10), 797–799. [https://doi.org/10.1016/s1995-7645\(10\)60191-5](https://doi.org/10.1016/s1995-7645(10)60191-5)

865 Mishra, B., Saxena, A., Tiwari, A. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles from
866 marine diatoms *Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp., *Thalassiosira* sp., and their
867 antibacterial study. *Biotechnology Reports* 28, e00571.
868 <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00571>

869 Mohseniazar, M., Barin, M., Zarredar, H., Alizadeh, S., Shanehbandi, D. (2011). Potential
870 of microalgae and lactobacilli in biosynthesis of silver nanoparticles. *BioImpacts*. 1 (3),
871 149-152. <https://doi.org/10.5681/bi.2011.020>

872 Mondal, A. H., Yadav, D., Mitra, S., Mukhopadhyay, K. (2020). Biosynthesis of silver
873 nanoparticles using culture supernatant of *Shewanella* sp. ARY I and their antibacterial
874 activity. *International Journal of Nanomedicine*. <http://doi.org/10.2147/IJN.S274535>

875 Navarro-Gallón, S. M., Alpaslan, E., Wang, M., Larese-Casanova, P., Londoño, M. E.,
876 Atehortúa, L., Pavón, J.J., Webster, T. J. (2019). Characterization and study of the
877 antibacterial mechanisms of silver nanoparticles prepared with microalgal
878 exopolysaccharides. *Materials Science and Engineering: C*, pp 685-695.
879 <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.134>

880 Pavia, D. L. et al. *Introdução à espectroscopia* 4^aed. 2010.

881 Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M. S., & Tahir, M. B. (2016). A review on green synthesis
882 of silver nanoparticles and their applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and*
883 *Biotechnology*, 45(7), 1272–1291. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1241792>

884 Rahman, A., Kumar, S., Nawaz, T. (2020). Biosynthesis of nanomaterials using algae.
885 *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00017-5)
886 [817536-1.00017-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00017-5)

887 Rodrigues, M.I.; Iemma, A. F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos:*
888 *Uma estratégia sequencial de planejamentos*. Casa do Pão Editora, 2014 (3^a edição)

889 Roselet, M., Roselet, F., & Abreu, P. C. (2019). Foam fractionator as a tool to remove
890 dissolved organic matter and improve the flocculation of the marine microalga
891 *Nannochloropsis oceanica*. *Journal of Applied Phycology*.
892 <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01801-0>

893 Salaam A., Adebayo-Tayo B. & Ajibade A. (2020). Phycosynthesis of Silver
894 Nanoparticles Using *Chlorella vulgaris* Metabolites: Its Antibacterial, Anti-Biofilm and
895 In-Vitro Cytotoxicity Potential and Effect of Optimized Conditions on Biosynthesis. *Afr.*
896 *J. Biomed. Res.* Vol. 23.

897 Salem, S. S., & Fouda, A. (2020). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their
898 Prospective Biotechnological Applications: an Overview. *Biological Trace Element*
899 *Research*, 199(1), 344–370. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02138-3>

900 Saravanan, A., Kumar, P. S., Karishma, S., Vo, D.-V. N., Jeevanantham, S., Yaashikaa,
901 P. R., & George, C. S. (2020). A Review on Biosynthesis of Metal Nanoparticles and its

902 Environmental Applications. Chemosphere, 128580.
903 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128580>

904 Satapathy, S., Kumar, S., Sukhdane, K. S., & Shukla, S. P. (2017). Biogenic synthesis
905 and characterization of silver nanoparticles and their effects against bloom-forming algae
906 and synergistic effect with antibiotics against fish pathogenic bacteria. *Journal of Applied*
907 *Phycology*, 29(4), 1865–1875. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1091-9>.

908 Shafreen, R. B., Seema, S., Ahamed, A. P., Thajuddin, N., & Ali Alharbi, S. (2017).
909 Inhibitory Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles from Extract of *Nitzschia palea*
910 Against Curli-Mediated Biofilm of *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and*
911 *Biotechnology*, 183(4), 1351–1361. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2503-7>

912 Sharma, G., Jasuja, N. D., Kumar, M., & Ali, M. I. (2015). Biological Synthesis of Silver
913 Nanoparticles by Cell-Free Extract of *Spirulina platensis*. *Journal of Nanotechnology*,
914 Volume 2015. <http://doi.org/10.1155/2015/132675>

915 Sim, W., Barnard, R., Blaskovich, M. A. T., & Ziora, Z. (2018). Antimicrobial Silver in
916 Medicinal and Consumer Applications: A Patent Review of the Past Decade (2007–
917 2017). *Antibiotics*, 7(4), 93. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040093>

918 Smitha, S.L., Nissamudeen, K.M., Gopchandran, K.G (2008). Studies on surface plasmon
919 resonance and photoluminescence of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A* 71
920 (2008) 186–190. <https://doi:10.1016/j.saa.2007.12.002>

921 Sunil, P., Amarsinh, B., Parvin, M., Panchratna, P., & Swarali, S. (2017). Screening of
922 silver nanoparticles producing cyanobacteria and its characterization. *Int. Res. J. of*
923 *Science & Engineering*.

924 Tevan, R., Jayakumara, S., Sahimia, N. H. A., Iqbala N. F. A, Zapria, I., Govindana, N.,
925 Rahima, M. H. A., Ichwanb, S. J. A., Maniama, G. P. (2017) Biosynthesis of silver
926 nanoparticles using marine microalgae *isochrysis* sp. Volume 2 pp. 1-12.
927 <https://doi.org/10.15282/JCEIB-V1-02.29/9/2017/2.2>

928 Torabfam, M., & Yüce, M. (2020). Microwave-assisted green synthesis of silver
929 nanoparticles using dried extracts of *Chlorella vulgaris* and antibacterial activity studies.
930 *Green Processing and Synthesis*, 9(1), 283–293. <https://doi.org/10.1515/gps-2020-0024>

- 931 Ummalyma, S. B., Sahoo, D., Pandey, A., (2020). Microalgal biorefineries for industrial
932 products. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, pp 187-195.
933 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00012-6>
- 934 Xiong, S., Cao, X., Fang, H., Guo, H., Xing, B. (2021) *Science of the Total Environment*,
935 775, 145867. Formation of silver nanoparticles in aquatic environments facilitated by
936 algal extracellular polymeric substances: Importance of chloride ions and light.
937 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145867>
- 938 Yusof, H. M., Mohamad, R., Zaidan, U. H., Rahman, N. A. A. (2019). Microbial synthesis
939 of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and
940 a feed supplement in animal industry: A review. *Journal of Animal Science and*
941 *Biotechnology*. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0368-z>
- 942 Zhang, X., Lu, Z., Wang, Y., Wensel, P., Sommerfeld, M., Hu, Q. (2016). Recycling
943 *Nannochloropsis oceanica* culture media and growth inhibitors characterization. *Algal*
944 *Research*, 20 (2016) 282–290. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.001>