

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

Matheus Alves Siqueira de Assunção

Avaliação do potencial larvicida de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de algas marinhas do litoral pernambucano contra *Aedes aegypti*

RECIFE

2024

Matheus Alves Siqueira de Assunção

Avaliação do potencial larvicida de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de algas marinhas do litoral pernambucano contra *Aedes aegypti*

Dissertação de Mestrado Acadêmico apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Dr. Fábio Rocha Formiga
Coorientadora: Dr^a Mara Elga Medeiros Braga
Coorientador: Dr. Severino Alves Júnior

RECIFE
2024

Título do trabalho em inglês: Evaluation of the larvicidal potential of silver nanoparticles synthesized from seaweeds along the coast of Pernambuco against *Aedes aegypti*.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) - Código de Financiamento 001.

A851a Assunção, Matheus Alves Siqueira de.
Avaliação do potencial larvicida de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de algas marinhas do litoral pernambucano contra *Aedes aegypti* / Matheus Alves Siqueira de Assunção. -- 2024.
131 p. : il.color, fotos.

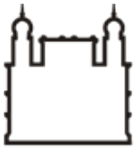
Orientador: Fábio Rocha Formiga.
Coorientadores: Mara Elga Medeiros Braga e Severino Alves Júnior.
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2024.
Bibliografia: f. 105-120.

1. nanopartículas de prata. 2. síntese verde. 3. macroalgas. 4. extrato bruto. I. Título.

CDU 578.833.2

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Matheus Alves Siqueira de Assunção

Avaliação do potencial larvicida de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de algas marinhas do litoral pernambucano contra o *Aedes aegypti*

Dissertação apresentada ao Programa de Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (IAM/Fiocruz), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 20 de fevereiro de 2024.

Banca Examinadora

Dr. José Lamartine Soares Sobrinho
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Fábio Rocha Formiga
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz



Documento assinado eletronicamente por **Fábio Rocha Formiga, Pesquisador em Saúde Pública**, em 27/02/2024, às 10:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo, Pesquisadora em Saúde Pública**, em 29/02/2024, às 14:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **jose lamartine soares sobrinho, Usuário Externo**, em 15/03/2024, às 09:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.fiocruz.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3617816** e o código CRC **17820DD9**.

AGRADECIMENTOS

Eu dedico a todos que de maneira pura e sincera me apoiam e desejam o meu bem, aos que estão do meu lado em todas as minhas escolhas e aos que nunca desistem do mais puro e verdadeiro eu. A vocês, eu agradeço de todo o meu coração.

Começando pela vida acadêmica, sou eternamente grato a minha primeira orientadora Dr^a Joanny Kelly Silva dos Santos, que me fez não só amar a ciência, mas vivenciar e celebrar cada vitória científica e pessoal. A Dr^a Fálba Bernadete Ramos dos Anjos por ter sido uma parceira acadêmica e uma instrutora excepcional, só confirmou o que Joanny me mostrou que é a beleza da ciência. Ao meu orientador Dr. Fábio Rocha Formiga por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e a Dr^a Mara Elga Medeiro Braga por me receber em seu laboratório com muito carinho e atenção, a nossa técnica Neidinha, a Dr^a Zulma e ao Dr. Douglas Oliveira que além do profissional se tornou um amigo extremamente importante... Douglas você é luz!

Ao pessoal eu agradeço aos meus pais, Roseli e Odilon, que nunca deixaram de me apoiar nas minhas aventuras em busca de conhecimento e a toda minha família, minha irmã e meu tio (Sabrina e Ricardo) que sempre que eu precisar sei que poderei contar com vocês, além das minhas tias Rosana e Elaine Alves, que mesmo de longe sei que sempre me aceitaram pelo que eu sou e me apoiam. Agradeço às minhas amigas que me fazem querer ser sempre o meu melhor. Saibam que sem vocês eu não sou nada. Saudações a Marcos Vinicius que além de um grande amigo, é um excepcional pesquisador, a Célia Cristina, Anna Claudia, Anna Thereza, Paloma, Daiane, mais uma vez a minha grande amiga Joanny Kelly, Maria Myllena, Elson, Edson, a todos os amigos brasileiros que conheci em minha mobilidade em Portugal que moram no meu coração, com enfoque especial a Bruno Fonseca e Marcelo Costa.

Agora saudações especiais a pessoas que já fazem parte da minha vida a tanto tempo que já são uma família para mim; Saudações a Isabela Alves, Isabela Assoni, Gabriela Assoni, Tassyia Reis, Vitor e Luciano, Maria Fernanda, Nivea Akemi, Patricia Gomes e a todos que sempre estiveram em contato comigo mesmo com toda a distancia entre nós.

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.”

Guimarães Rosa (1994)

RESUMO

ASSUNÇÃO, Matheus Alves Siqueira de. Avaliação do potencial larvicida de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de algas marinhas do litoral pernambucano contra *Aedes aegypti*. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife 2024.

Aedes aegypti é o principal mosquito transmissor de arboviroses, possuindo comportamento antropofílico. A nanotecnologia verde tem sido identificada como um método promissor para o biocontrole de mosquitos vetores utilizando biomoléculas, extraídas de fontes naturais para a produção de nanopartículas metálicas. O principal objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de extratos de algas marinhas com atividade biocida para controle vetorial do *Ae. aegypti*. As algas foram coletadas na praia de Serrambi, Ipojuca/ PE, secas e utilizadas para a preparação dos extratos brutos aquosos e hidroalcóolicos. As nanopartículas de prata (AgNPs) foram preparadas por síntese verde utilizando o nitrato de prata como precursor e os extratos das algas como agentes redutores e estabilizadores. Os extratos brutos foram caracterizados por FTIR, GC-MS e HPLC-PDAD e as AgNPs por Uv-visível, DLS, Potencial Zeta, DCS, MET, DRX, FTIR, MEV-EDS e DSC. A toxicidade das AgNPs contra larvas de *Ae. aegypti* e os efeitos na atividade da acetilcolinesterase (AChE), bem como contra larvas de *Danio rerio* foram avaliadas. As AgNPs, apresentaram picos de Uv-vis entre 400 e 450nm, tamanho entre 198,4-323,0 nm (DLS), Pdl entre 0,261-0,470 e potencial zeta entre -38,6 e -47,8. Pela técnica de DCS se observou a presença nanopartículas com tamanhos variando de 11,08-343,22 nm, as quais se apresentaram tanto isoladas quanto agregadas. As imagens obtidas através de Microscopia eletrônica de Transmissão confirmam a escala nanométrica com nanopartículas de tamanhos inferiores à 100 nm. Ademais, a partir das análises de DRX, foi possível se compreender a natureza cristalina das AgNPs, demonstrando um perfil de tamanho médio variando entre 34,6-86,17nm. Pela análise por FTIR foi possível demonstrar que as biomoléculas presentes nos extratos também estão presentes na redução e estabilização das AgNPs, bem como em seu capeamento. As análises por MEV-EDS demonstraram picos característicos de Ag em 3 keV devido à RPS característica das AgNPs. Pelas análises de DSC foi possível demonstrar a presença de picos endotérmicos e exotérmico relacionados à perda de água, quebra térmica e cristalinidade das AgNPs, bem como a dessorções das biomoléculas responsáveis pela redução do sal de prata. As AgNPs demonstraram toxicidade contra larvas de *Ae. aegypti* com LC₅₀ variando entre 0.50-1.15 ppm e LC₉₀ entra 0.81-2.24ppm, além da variação da presença e atividade da AChE. As AgNPs foram tóxicas para a espécie não-alvo *Danio rerio*, com LC₅₀ variando entre 0.10-0.29ppm. A síntese biológica rápida de nanopartículas de prata usando extrato de algas marinhas fornece uma rota ecológica, simples e econômica para a síntese de nanopartículas. Os extratos das algas selecionadas foram efetivos na formação das AgNPs, apresentando capacidade redutora e estabilizadora. Apesar da toxicidade em espécies não-alvo, as atividades larvicidas contra larvas de *Ae. aegypti*, demonstram um avanço importante no desenvolvimento de possíveis candidatos para a substituição de biocidas já comercializados tóxicos para a saúde humana e para o meio-ambiente.

Palavras-chave: nanopartículas de prata; síntese verde; macroalgas; extrato bruto.

ABSTRACT

ASSUNÇÃO, Matheus Alves Siqueira de. Evaluation of the larvicidal potential of silver nanoparticles synthesized from seaweeds along the coast of Pernambuco against *Aedes aegypti*. Dissertation (Master's in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife 2024.

Aedes aegypti is the primary mosquito vector of arboviruses, exhibiting anthropophilic behavior. Green nanotechnology has been recognized as a promising method for the biocontrol of vector mosquitoes using biomolecules extracted from natural sources for the production of metallic nanoparticles. The main objective of the present study was the development of silver nanoparticles synthesized from extracts of seaweed with biocidal activity for vector control of *Ae. aegypti*. Seaweeds were collected at Serrambi Beach, Ipojuca/PE, dried, and used for the preparation of aqueous and hydroalcoholic crude extracts. Silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized through green synthesis using silver nitrate as a precursor and seaweeds extracts as reducing and stabilizing agents. The crude extracts were characterized by FTIR, GC-MS, and HPLC-PDA, while the AgNPs were characterized by UV-visible spectroscopy, DLS (Dynamic Light Scattering), Zeta potential, DCS (Differential Centrifugal Sedimentation), TEM (Transmission Electron Microscopy), XRD (X-ray Diffraction), FTIR, SEM-EDS (Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive Spectroscopy), and DSC (Differential Scanning Calorimetry). The toxicity of AgNPs against *Ae. aegypti* larvae, their effects on acetylcholinesterase (AChE) activity, as well as their impact on *Danio rerio* larvae, were assessed. The AgNPs exhibited UV-visible peaks between 400 and 450 nm, sizes ranging from 198.4 to 323.0 nm (DLS), Pdl (Polydispersity Index) between 0.261 and 0.470, and zeta potential between -38.6 and -47.8. DSC analysis revealed the presence of nanoparticles with sizes ranging from 11.08 to 343.22 nm, appearing both as isolated particles and aggregates. The images obtained through TEM confirm the nanoscale with nanoparticle sizes below 100 nm. Additionally, from XRD analyses, it was possible to understand the crystalline nature of the AgNPs, demonstrating an average size profile ranging from 34.6 to 86.17 nm. FTIR analysis showed that the biomolecules present in the extracts are also involved in the reduction and stabilization of AgNPs, as well as in their capping. SEM-EDS analyses demonstrated characteristic Ag peaks at 3 keV due to the characteristic X-ray emission of AgNPs. DSC analyses revealed the presence of endothermic and exothermic peaks related to water loss, thermal breakdown, and crystallinity of AgNPs, as well as desorption of biomolecules responsible for reducing the silver salt. The AgNPs exhibited toxicity against *Ae. aegypti* larvae with LC₅₀ ranging between 0.50-1.15 ppm and LC₉₀ between 0.81-2.24 ppm, along with variations in the presence and activity of acetylcholinesterase (AChE). The AgNPs were also toxic to the non-target species *Danio rerio*, with LC₅₀ ranging between 0.10-0.29 ppm. The rapid biological synthesis of silver nanoparticles using seaweed extract provides an ecological, simple, and cost-effective route for nanoparticle synthesis. The extracts from the selected algae were effective in the formation of AgNPs, displaying both reducing and stabilizing capabilities. Despite the toxicity observed in non-target species, the larvicidal activities against *Ae. aegypti* larvae represent a significant advancement in the development of potential candidates for replacing commercially available biocides that are toxic to human health and the environment.

Keywords: silver nanoparticles; green synthesis; macroalgae; crude extract.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Abordagens “Top-down” e “Bottom-up” para síntese de nanopartículas de prata.	21
Figura 2 - Síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs) por extratos de algas marinhas	26
Figura 3 - Potencial das nanopartículas de prata no controle vetorial de <i>Aedes aegypti</i>	32
Figura 4 - Algas marinhas coletadas na praia de Serrambi, Pernambuco, Brasil (8°33'21”S e 35°00'21”W) <i>Sargassum vulgare</i> (C. Agardh); <i>Caulerpa sertularioides</i> (S.G.Gmelin); <i>Caulerpa chemnitzia</i> (J.V.Lamour); <i>Padina gymnospora</i> (Sonder 1871); <i>Bryopsis pennata</i> (J.V.Lamour); <i>Gracilaria cervicornis</i> (J.Agardh).	35
Figura 5 - Centrifuga de disco CPS DC24000 (Laboratório Nanotox – CNPEM).	41
Figura 6 - A) Aquários para reprodução e liberação de ovos com embriões de <i>Danio rerio</i> utilizados em estudos. B) Ovos com embriões <i>Danio rerio</i> visualizados no estereomicroscópio.	46
Figura 7 - Espectros de FTIR dos extratos aquosos e hidroalcóolicos das algas marinhas <i>Sargassum vulgare</i> , <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> , <i>Padina gymnospora</i> , <i>Bryopsis pennata</i> e <i>Gracilaria cervicornis</i> coletadas na Praia de Serrambi, Ipojuca, Pernambuco, em abril de 2022.....	47
Figura 8 - CG-MS dos extratos aquosos e hidroalcóolicos das algas marinhas <i>Sargassum vulgare</i> , <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> , <i>Padina gymnospora</i> , <i>Bryopsis pennata</i> e <i>Gracilaria cervicornis</i>	54
Figura 9 – HPLC-PDA dos extratos aquosos e hidroalcóolicos das algas marinhas <i>Sargassum vulgare</i> , <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> , <i>Padina gymnospora</i> , <i>Bryopsis pennata</i> e <i>Gracilaria cervicornis</i> avaliados nos comprimentos de onda 270, 324 e 373nm.	58
Figura 10 - Cromatogramas de HPLC dos padrões: 270nm: 1 = ácido gálico, 2 = ácido siríngico, 3 = ácido vanílico, 4 = catequina e 5 = epicatequina; 324nm: 6 = ácido clorogênico, 7 = ácido p-cumárico, 8 = ácido cafeico; e 373nm: 9 = quercetina e 10 = rutina.	65

Figura 11 - Espectros UV-Vis de nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos das algas marinhas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i>	71
Figura 12 - Espectros UV-Vis de nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos hidroalcoólicos das algas marinhas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i>	71
Figura 13 - Representação da distribuição das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde utilizando os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i>	73
Figura 14. Representação do Potencial Zeta das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde utilizando os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i>	75
Figura 15 - Representação gráfica do diâmetro aparente das partículas (nm) pelo número relativo de partículas (au) pela técnica de sedimentação centrífuga diferencial (DCS) de nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i>	77
Figura 16 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) obtidas das nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i>	79
Figura 17 - Análise do padrão de difração de raios-X (DRX) de liófilos de nanopartículas de prata (AgNPs) biossintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i>	81
Figura 18 - Espectros de FTIR das nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i>	84
Figura 19 - Análise por SEM e EDS de nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das	

algas marinhas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i>	88
Figura 20 - Termogramas (DSC) das AgNPs sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i>	90
Figura 21 - Curvas de dose-resposta para o efeito larvicida nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i> contra larvas de <i>Ae. aegypti</i> nas concentrações de 0.1-1.5 ppm.	94
Figura 22 - Quantificação da acetilcolinesterase (AChE) em larvas L3 de <i>Ae. aegypti</i> após 48hrs de exposição a AgNPs sintetizadas a partir dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das algas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i> nas concentrações de 0.1-1.5 ppm.	98

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Dados de estudos de síntese de nanopartículas de prata pelo método de 'síntese-verde'	24
Tabela 2 - Comprimentos de onda (nm) dos padrões ácido gálico, quercetina, rutina, epicatequina, ácido cafeico, catequina, ácido vanílico, ácido clorogenico, ácido siríngico e ácido p-cumárico.	39
Tabela 3 - Espectros de FTIR dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas <i>Sargassum vulgare</i> , <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> , <i>Padina gymnospora</i> , <i>Bryopsis pennata</i> e <i>Gracilaria cervicornis</i> coletadas na Praia de Serrambi, Ipojuca, Pernambuco, em abril de 2022.....	49
Tabela 4 - Composição dos extratos aquosos e hidroalcoólicos esterificados das algas marinhas <i>Sargassum vulgare</i> , <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> , <i>Padina gymnospora</i> , <i>Bryopsis pennata</i> e <i>Gracilaria cervicornis</i> pela técnica de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS).....	53
Tabela 5 - Relação de comprimento de onda, tempo de retenção prováveis compostos encontrados nos extratos de algas marinhas diluídos em metanol (1mg/mL) por HPLC-PDA.	66
Tabela 6 - Relação de comprimento de onda, tempo de retenção, equação de regressão e coeficiente de correlação encontrados nos padrões diluídos em metanol (1mg/mL) por HPLC-PDA.....	68
Tabela 7 - Quantidades de polifenóis em extratos de algas <i>Sargassum vulgare</i> , <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> , <i>Padina gymnospora</i> , <i>Bryopsis pennata</i> e <i>Gracilaria cervicornis</i> determinadas por análise de HPLC-PDA	69
Tabela 8 - Dados obtidos por análise de tamanho (size) e índice de polidispersão (Pdl), pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde utilizando os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i>	73

Tabela 9 - Potencial Zeta das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde utilizando os extratos brutos aquosos e hidroalcolóicos das algas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i>	74
Tabela 10 - Tamanho (nm) das nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcolóicos das algas marinhas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i> analisadas pela técnica de sedimentação centrífuga diferencial (DCS).	76
Tabela 11 - Espectros, grupos funcionais e modo de vibração de FTIR das nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcolóicos das algas marinhas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i>	85
Tabela 12 - Temperaturas e entalpias envolvidas no processo de calorimetria diferencial exploratórias das AgNPs.....	92
Tabela 13 - Resultados de LC ₅₀ e LC ₉₀ para o efeito larvicida nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcolóicos das algas marinhas <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Caulerpa chemnitzia</i> e <i>Bryopsis pennata</i> contra larvas de <i>Ae. aegypti</i> nas concentrações de 0.1-1.5 ppm.	95
Tabela 14 - Concentração eficaz que mata 50% dos embriões em 96 h (LC ₅₀). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AgNPs	Nanopartículas de Prata
CEBEM	Centro de Biologia Estrutural do Mercosul
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
DCS	Sedimentação por Centrifugação Diferenciada
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DRX	Difração de raios-X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTNB	ácido 5,5'-Ditiobis 2-nitrobenzato
FFNSC	Flavour and Fragrance Natural and Synthetic Compounds
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
HPLC-PDA	Cromatografia líquida de alto eficiência acoplada a um detector de arranjo de fotodiodo
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
KPI	Tampão fosfato de potássio
LABECOTOX	Laboratório de Ecotoxicologia Aquática
LC50/90	Concentração letal
LNNano	Laboratório Nacional de Nanotecnologia
LTM	Laboratorio de tecnologia de medicamentos
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações

MEV-EDS	Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Raios-X Dispersiva em Energia
NIST	National Institute of Standards and Technology,
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PdI	Índice de polidispersão
PPM	Partes por milhão
PVC	Policloreto de vinila
RPM	Rotação por minuto
RPS	Ressonância plasmônica de superfície
Rt	Tempo de retenção
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
UV-Vis	UV-Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS).....	20
2.2	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR SÍNTESE VERDE UTILIZANDO ALGAS	22
2.3	CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	26
2.3.1	Espectroscopia UV-Vis	26
2.3.2	Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)	27
2.3.3	Difração de Raios X (DRX)	28
2.3.4	Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS)	29
2.3.5	Microscopia	30
2.4	ATIVIDADE LARVICIDA DE AGNPS CONTRA <i>Aedes Aegypti</i>	31
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVOS GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS MACROALGAS.....	35
4.2	DESIDRATAÇÃO DAS MACROALGAS MARINHAS E PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	36
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO SECO.....	37
4.3.1	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	37
4.3.2	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)	37
4.3.3	Cromatografia líquida de alto eficiência acoplada a um detector de arranjo de fotodiodo (HPLC-PDA)	38
4.4	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	40
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	40
4.5.1	Análise por UV-visível (UV-Vis)	40
4.5.2	Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta ..	41
4.5.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	42

4.5.4	Difração de raios-X (DRX).....	42
4.5.5	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	42
4.5.6	Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Raios-X Dispersiva em Energia (MEV-EDS)	43
4.5.7	Avaliação do perfil térmico das AgNPs por calorimetria exploratória diferencial (DSC)	43
4.6	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS AGNPS EM <i>Ae. aegypti</i>	44
4.6.1	Ensaio larvívora contra <i>Ae. aegypti</i>	44
4.6.2	Ensaio de quantificação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em larvas de <i>Ae. aegypti</i>	44
4.7	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS BRUTOS EM ESPÉCIES NÃO-ALVO	45
4.7.1	<i>Danio rerio</i> (Zebra fish)	45
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	47
5.1.1	Análise por Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier (FTIR).....	47
5.1.2	Análise GC-MS.....	52
5.1.3	Análise por HPLC	57
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS) SINTETIZADAS POR SÍNTESE VERDE.	70
5.2.1	Análise do pico RPS por absorvância por UV-visível	70
5.2.2	Determinação do tamanho hidrodinâmico de partículas, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta.	72
5.2.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	78
5.3	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	81
5.4	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)....	84
5.5	ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDS) INTEGRADA AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV) (MEV-EDS)	87
5.6	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	90

6	AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE	93
6.1	ATIVIDADE LARVICIDA (<i>Aedes aegypti</i>).....	93
6.2	ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (ACHE) EM LARVAS DE <i>Ae. aegypti</i>	97
7	TOXICIDADE EM ESPÉCIES NÃO-ALVO (<i>Danio rerio</i>).....	101
8	CONCLUSÕES	103
9	REFERÊNCIA	104
	ANEXO A - CADASTRO SISBIO.....	120
	ANEXO B - CADASTRO SIGEN	124
	ANEXO C – DECLARAÇÃO MOBILIDADE ACADÊMICA – FACEPE	126
	ANEXO D – CARTA DE ACEITE MOBILIDADE - COIMBRA.....	127
	ANEXO E – CARTA DE ACEITE MOBILIDADE - GSP	128
	ANEXO F - CARTA PREMIAÇÃO – CEBEM	129
	ANEXO G – DECLARAÇÃO UTILIZAÇÃO CNPEM	130

1 INTRODUÇÃO

Arbovírus são doenças causadas por patógenos e transmitidos por artrópodes hematófagos ao homem durante o repasto sanguíneo. Embora muitos destes patógenos sejam mantidos em carrapatos (MANSFIELD, K. L. *et al.*, 2017), flebotomíneos (ALKAN, C. *et al.*, 2013) e outros artrópodes (CARPENTER, S. *et al.*, 2013), os mosquitos são os seus vetores mais importantes (CONWAY, M. J.; COLPITTS, T. M.; FIKRIG, E., 2014), representando um grande problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (GOMES, H.; DE JESUS, A. G.; QUARESMA, J. A. S. J. O. H., 2023). *Aedes aegypti* (*Stegomyia*) Linnaeus (1762) (Diptera: Culicidae), conhecido como mosquito da dengue, é vetor de importantes arbovírus, incluindo a Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela (SILVA, L. L. S. *et al.*, 2021).

Tendo em vista que a endemicidade da dengue depende da presença do mosquito *Ae. aegypti*, as estratégias para o controle destas doenças devem incluir métodos de controle direcionados ao vetor, como a pulverização de inseticidas sintéticos (sendo a estratégia mais comum devido à falta de vacinas) ou tratamentos orientados ao paciente (OLIVEROS-DÍAZ, A. F. *et al.*, 2022; ROIZ, D. *et al.*, 2018). Além disso, a ausência de tratamentos antivirais específicos contra arbovírus dificultam o controle dos surtos de doenças (OLIVEROS-DÍAZ, A. F. *et al.*, 2022).

Uma estratégia emergente para controlar vetores arbovirais são os nanomateriais ou formulações de base nanométrica, chamados de nanopesticidas (BOSLY, H. A. E.-K. *et al.*, 2023; DEKA, B. *et al.*, 2021). Dessa forma, busca-se fornecer formulações novas, modernas e de baixo custo com a capacidade de penetrar através do exoesqueleto e nas células dos mosquitos, causando mortalidade após ligação a proteínas ou DNA (NASIR, S. *et al.*, 2022). Os nanoproductos ou nanomateriais possuem características vantajosas como maior capacidade de absorção, maior biodisponibilidade, liberação gradual de ativos, melhor solubilidade de substâncias hidrofóbicas em água e boa estabilidade cinética (PORTO, A. S.; ALMEIDA, I. V. d.; VICENTINI, V. E. P., 2020; VIANA, V. *et al.*, 2023; VUITIKA, L. *et al.*, 2022).

Entre os nanomateriais, as nanopartículas metálicas têm sido investigadas como uma abordagem promissora para o controle de vetores. A capacidade que alguns compostos biológicos apresentam de reduzir metais pode ser usada como

alternativas “verdes” não tóxicas e ambientalmente amigáveis na forma de nanopartículas à base de metal (CHITHIGA, A.; MANIMEGALAI, K. J. E. P., 2023).

Uma alternativa promissora ao uso direto de produtos químicos são as nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas a partir de extratos naturais, geralmente utilizadas nas medidas de controle de vetores, devido ao efeito menos deletério sobre os organismos não-alvo e à sua inerente biodegradabilidade. Os extratos podem conter metabólitos secundários que atuam como agentes redutores e estabilizadores, como alcanos, fenóis, éteres, aminas e amidas, que são conhecidos por estarem envolvidos na redução e estabilização de íons de prata (ATHANASSIOU, C. *et al.*, 2018; BENELLI, G.; CASELLI, A.; CANALE, A. J. J. o. K. S. U.-S., 2017; MIKAILI, P. *et al.*, 2013; NASIR, S. *et al.*, 2022; RAJAGOPAL, G. *et al.*, 2021; SANTHOSHKUMAR, J. *et al.*, 2017; SHAALAN, E. A.-S. *et al.*, 2005).

Com o objetivo de melhorar as condições de saúde pública, estudos para o desenvolvimento de produtos produzidos pelo método de ‘síntese-verde’ com atividades biocidas para combater vetores de arbovirose são boas alternativas aos produtos comerciais devido ao seu baixo custo e sua rápida biodegradabilidade, se mostrando bastante promissor para a saúde pública.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

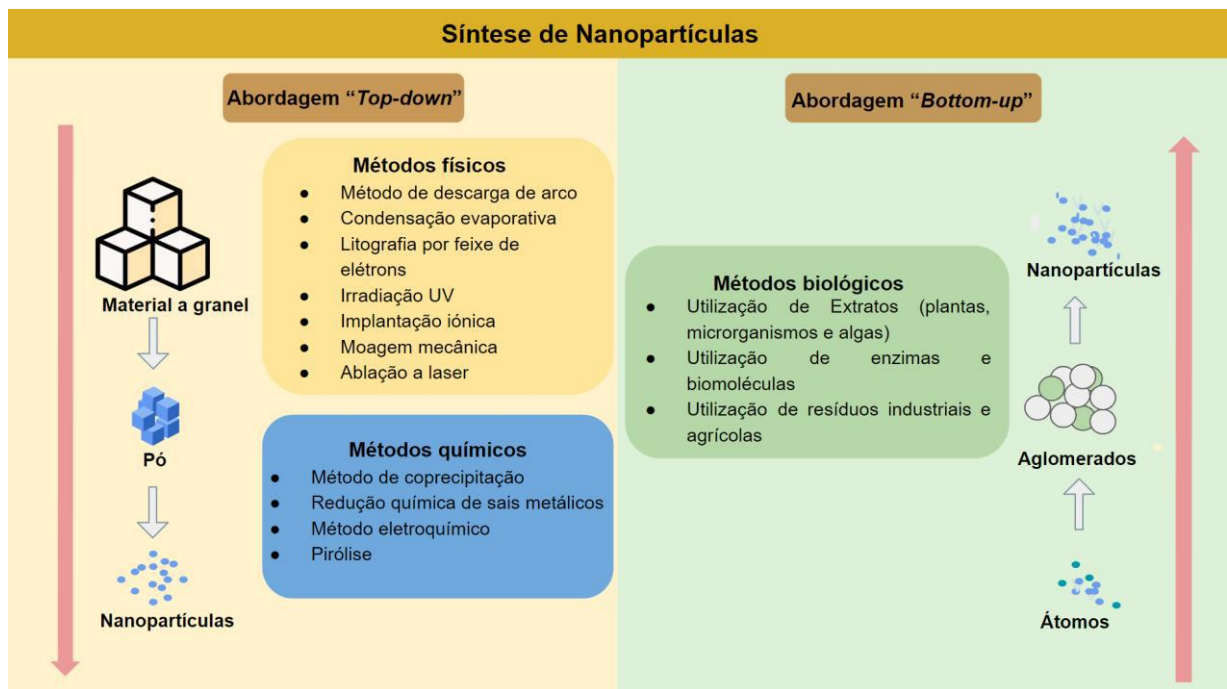
2.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS)

Nanopartículas de prata (AgNPs) são nanopartículas metálicas com tamanho/diâmetro na faixa de 1 e 100 nm, apresentando propriedades elétricas, ópticas e magnéticas únicas e uma ampla gama de aplicabilidade (GALATAGE, S. T. *et al.*, 2021; KLAUS, T. *et al.*, 1999). Estas nanopartículas podem ser sintetizadas por diferentes procedimentos baseados em duas abordagens “*Top-down*” ou “*Bottom-up*” (SAMUEL, M. S. *et al.*, 2022) (Figura 1).

Nanopartículas de prata sintetizadas “*Top-down*” podem ser obtidas por (i) litografia, (ii) atrito, (iii) moagem e (iv) outros processos que envolvem a redução do tamanho dos materiais de prata a granel para o tamanho atômico dos AgNPs (JUNAM, Y.; LEAD, J. R., 2008). Por outro lado, AgNPs “*bottom-up*” são sintetizados a partir de reações de sais precursores que levam à formação de AgNPs (BAPAT, M.

S. *et al.*, 2022), sendo desenvolvidos de formas simples utilizando diferentes métodos como condensação, precipitação, pirólise e etc. (KHAN, M. *et al.*, 2021).

Figura 1 - Abordagens “Top-down” e “Bottom-up” para síntese de nanopartículas de prata.



Fonte: Autor, 2024.

Dentre as abordagens de síntese, as AgNPs podem ser produzidas a partir de métodos físicos, químicos ou biológicos (LYUBOMIR, L.; RISHAM SINGH, G.; EDMUNDS, T., 2021). As AgNPs obtidas por métodos químicos geralmente utilizam substâncias tóxicas como agentes estabilizantes (polivinilpirrolidona, álcool polivinílico e poliácridonitrila) e agentes redutores (borohidreto de sódio, hidrazina e hidroxilamina) (LEEMA, M. *et al.*, 2019). Devido à geração de resíduos tóxicos, esses agentes podem estar associados a vários riscos ambientais (HASSAN, A. I. *et al.*, 2021). Por outro lado, os métodos físicos podem utilizar ablação a laser, irradiação UV, condensação por evaporação, aerossol e litografia, caracterizando-se por um alto custo de produção, alto consumo de energia e a necessidade de equipamentos caros e de difícil acesso, o que torna esse método antieconômico (SRI RAMKUMAR, S. R. *et al.*, 2017).

Devido a essas desvantagens, métodos de síntese baseados em biomateriais de ocorrência natural têm sido adotados como alternativa para obtenção dessas nanopartículas de prata (KALIMUTHU, K. *et al.*, 2020; KALIMUTHU, K. *et al.*, 2016).

Esses métodos não envolvem produtos químicos sintéticos e requerem baixo consumo de energia e tempo de síntese. Nessa perspectiva, extratos biológicos têm sido empregados na síntese de AgNPs, utilizando protocolos simples, envolvendo o processo de redução de íons metálicos utilizando extratos biológicos como fonte de agentes redutores (ASMATHUNISHA, N.; KATHIRESAN, K., 2013). Desta forma, o desenvolvimento da síntese verde de nanopartículas expandiu-se na nanociência e na nanotecnologia (MOORTHY, P. V.; BALASUBRAMANIAN, C.; MOHAN, S., 2015).

2.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR SÍNTESE VERDE UTILIZANDO ALGAS

O método de 'síntese-verde', aplicado à produção de nanopartículas metálicas, consiste na concepção e desenvolvimento de estratégias para a produção de nanomateriais aplicando os métodos biológicos, com o intuito de reduzir o uso ou formação de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente (HAMEDY, S.; SHOJAOSADATI, S. A., 2019; TAMULY, C. *et al.*, 2013). Este método apresenta vantagens em comparação com os métodos químicos e físicos, tais como: (i) baixa toxicidade, (ii) ausência de poluição, e (iii) características ecológicas e econômicas (DEVI, H. S. *et al.*, 2019; SAJADI, S. M.; NASROLLAHZADEH, M.; MAHAM, M., 2016). Além disso, há uma variedade de recursos naturais para a síntese verde de nanopartículas, incluindo leveduras, plantas, fungos, algas e bactérias, capazes de reduzir rapidamente íons metálicos inorgânicos a nanopartículas metálicas (JAVAN BAKHT DALIR, S. *et al.*, 2020; PONNUCHAMY, K.; JACOB, J. A., 2016). Entre esses recursos, as algas têm se destacado devido ao seu vasto potencial bioativo, contendo compostos como pigmentos acessórios, proteínas, polissacarídeos sulfatados e outras biomoléculas, como flavonóides, alcalóides, esteróides, fenóis, saponinas, grupos funcionais hidroxila, carboxila e amino, que atuam como agentes eficazes de redução e revestimento de metal, proporcionando um revestimento robusto nas nanopartículas metálicas em uma única etapa (ABDEL-RAOUF, N.; AL-ENAZI, N. M.; IBRAHEEM, I. B. M., 2017; ABDEL-RAOUF, N. *et al.*, 2019; ABDEL-RAOUF, Neveen *et al.*, 2019; DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A., 2003; GNANADESIGAN, M. *et al.*, 2012; ROSELINE, T. A. *et al.*, 2019).

A presença desses compostos bioativos, associados a nanopartículas metálicas, aumenta a entrega específica ao alvo e reduz a carga do princípio ativo (SELVARAJ, P. *et al.*, 2020). Além disso, como o controle do tamanho e da morfologia das partículas são características essenciais para aplicação em biotecnologia, a abordagem biológica oferece uma melhor capacidade de controle sobre o tamanho das partículas em comparação com os métodos de síntese química e física de nanopartículas metálicas (DADASHPOUR, M. *et al.*, 2018; GURUNATHAN, S. *et al.*, 2013). Assim, diferentes espécies de algas têm sido utilizadas na síntese verde de nanopartículas de prata (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados de estudos de síntese de nanopartículas de prata pelo método de 'síntese-verde'.

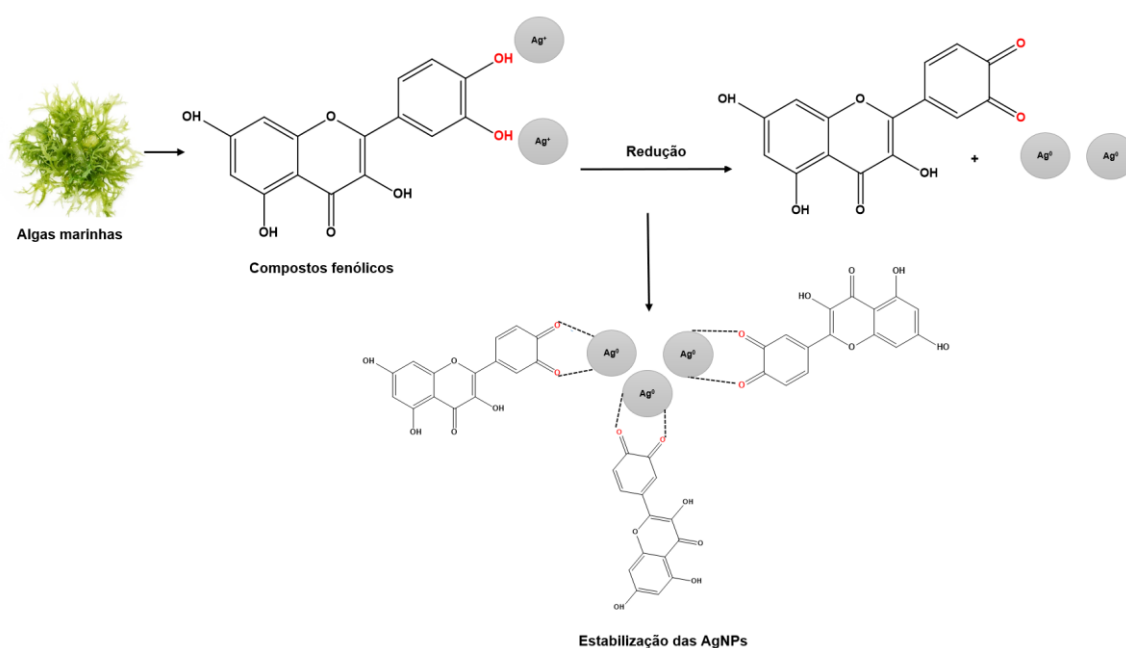
Extrato de algas	Condições de síntese	Caracterizações	Características das partículas	Referências
Extrato aquoso de <i>Sargassum polycystum</i>	Concentração de AgNO ₃ - 1 mM Período de reação - 3 horas Temperatura de reação - 37–80 °C	UV-Vis ^a ; FTIR ^b ; MEV ^c ; EDAX ^d ; DRX ^e	SPR ^f - 418 nm Tamanho - 20 - 88nm Forma - cúbica	(VINOTH, S. <i>et al.</i> , 2018)
Extrato aquoso de <i>Padina gymnospora</i>	Concentração de AgNO ₃ - 1 mM Período de reação - durante a noite Temperatura de reação - NDg	UV-Vis; FTIR; HR-TEM ^h ; MEV; EDAX; DRX; AFM ⁱ	SPR - 377 nm Tamanho - 10 - 28nm Forma - esférica	(RAJAGOPAL, G. <i>et al.</i> , 2021)
Extrato de etanol de <i>Hypnea musciformis</i>	Concentração de AgNO ₃ - 1 mM Período de reação - 120 min Temperatura de reação - temperatura ambiente	UV-Vis; FTIR; MEV-EDX ⁱ ; DRX	SPR - 420 nm Tamanho - 40 - 65 nm Forma - esférica	(RONI, M. <i>et al.</i> , 2015a)
Extrato de álcool etílico de <i>Sargassum natans</i>	Concentração de AgNO ₃ - 100 mmol Período de reação - 24 h Temperatura de reação - temperatura ambiente	UV-Vis; FTIR; MEV	SPR - 340 nm Tamanho - 50nm Forma - ND	(BARNAWI, A. <i>et al.</i> , 2019)
Extrato aquoso de <i>Centroceras clavulatum</i>	Concentração de AgNO ₃ - 1 mM Período de reação - ND Temperatura de reação - temperatura ambiente	UV-Vis; FTIR; MEV-EDX; DRX; DLS ^k	SPR - 410 nm Tamanho - 35 - 65 nm Forma - esférica e cúbica	(MURUGAN, K. <i>et al.</i> , 2016)
Extrato aquoso de <i>Amphiroa rigida</i>	Concentração de AgNO ₃ - 1 mM Período de reação - 30 min Temperatura de reação - 37 °C	UV-Vis; FTIR; MET ^l ; MEV; EDX; DRX	SPR - 420 nm Tamanho - 20 - 30 nm Forma - esférica	(GOPU, M. <i>et al.</i> , 2021)
Extrato aquoso de <i>Oscillatoria sancta</i>	Concentração de AgNO ₃ - 1 mM Período de reação - 60 min Temperatura de reação - 28 °C	UV-Vis; FTIR; DRX; HRMEV; HR MET	SPR - 450 nm Tamanho - 25 - 50 nm Forma - cúbica e hexagonal	(ELUMALAI, D <i>et al.</i> , 2021)
Extrato aquoso de <i>Gracilaria firma</i>	Concentração de AgNO ₃ - 1 mM Período de reação - ND	UV-Vis; FTIR; MET; DRX	SPR - 440 nm Tamanho - 12 - 200nm	(KALIMUTHU, K. <i>et al.</i> , 2016)

	Temperatura de reação - temperatura ambiente		Forma - esférica	
Extrato aquoso de <i>Ulva lactuca</i>	Concentração de AgNO ₃ - 1 mM Período de reação - ND Temperatura de reação - ND	UV-Vis; MET; EDAX; DLS; DRX	SPR - 453 nm Tamanho - 20 - 50 nm Forma - ND	(AZIZ, A. T., 2022)

^aEspectroscopia ultravioleta-visível; ^bEspectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier; ^cMicroscopia Eletrônica de Varredura; ^dAnálise de Raios X Dispersivos de Energia; ^eDifração de raios X; ^fRessonância Plasmática de Superfície; ^gNão definido; ^hMicroscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução; ⁱMicroscópio de Força Atômica; ^jMicroscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução; ^kDispersão Dinâmica de Luz; ^lMicroscopia Eletrônica de Transmissão.
Fonte: Autor, 2024.

Diferentes compostos químicos estão envolvidos na reação de redução de AgNO_3 e estabilização de AgNPs. Dentre estes, a predominância de compostos fenólicos é evidente no seu potencial de reduzir os íons Ag^+ a Ag^0 e estabilizar as nanopartículas por meio de capecamento (OMIDI, S. *et al.*, 2018) (Figura 2).

Figura 2 - Síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs) por extratos de algas marinhas



Fonte: Autor, 2024.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas de prata podem ser caracterizadas por diferentes técnicas analíticas, cada uma fornecendo informações e parâmetros relacionados às propriedades físico-químicas e morfológicas, associadas também à estabilidade.

2.3.1 Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica importante para caracterizar nanoestruturas (ABBAS, Q., 2019). Em nanopartículas metálicas, essa técnica permite a previsão da estabilidade e confirmação da síntese ocorrida. Além

disso, o processo de síntese de nanopartículas metálicas a partir de seus sais particulares proporciona um pico característico com absorções fortes na região visível (ALMATROUDI, A., 2020; MAGUDAPATHY, P. *et al.*, 2001). Neste contexto, espectroscopia UV-Vis tem sido empregada como ferramenta para confirmar a síntese de AgNPs.

A mudança visual de cor observada ao final da síntese pode ser atribuída à ressonância plasmônica de superfície (SPR) em nanopartículas metálicas que pode ser confirmada por espectroscopia UV-Vis (ER, M., 2019). As nanopartículas metálicas biossintetizadas recebem elétrons livres, que dão origem a uma banda de absorção SPR, devido à vibração combinada dos seus elétrons em ressonância com a onda de luz (BENELLI, G.; CASELLI, A.; CANALE, A. J. J. o. K. S. U.-S., 2017; NOGINOV, M. A. *et al.*, 2006).

Vinoth, S. *et al.* (2018) realizaram varredura por espectroscopia UV-Vis de AgNPs obtidos do extrato da alga marrom *Sargassum polycystum*, obtendo forte absorção em 418 nm. Outras algas marrons também obtiveram absorção, mas em comprimentos de onda de 377 nm para *Padina gymnospora* (RAJAGOPAL, G. *et al.*, 2021) e 340 nm para *Sargassum natans* (BARNAWI, A. *et al.*, 2019). As NPs obtidas das algas vermelhas *Centroceras clavulatum* (MURUGAN, K. *et al.*, 2016), *Hypnea musciformis* (RONI, M. *et al.*, 2015a), *Gracilaria firma* (KALIMUTHU, K. *et al.*, 2016) apresentaram absorção na faixa de 410-440nm. NPs obtidas de algas como *Ulva lactuta* (AZIZ, A. T., 2022) e *Oscillatoria sancta* (ELUMALAI, D *et al.*, 2021) revelaram os maiores valores de absorbância (450 nm).

2.3.2 Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) consiste na passagem de raios infravermelhos pela amostra, de forma que os espectros resultantes indicam as características de absorção e transmissão do material analisado (BILIŠKOV, N., 2022). Esta técnica é uma ferramenta importante para a identificação de grupos funcionais de AgNPs sintetizados, os quais podem estar associados à estabilidade de nanopartículas (HUQ, M. A., 2020).

Nas AgNPs derivada de espécies de algas marrons (*Sargassum polycystum*, *Sargassum natans* e *Padina gymnospora*), algas vermelhas (*Hypnea musciformis*, *Centroceras clavulatum*, *Amphiroahira* e *Gracilaria firma*), algas azuis (*Oscillatoria sancta*) e algas verdes (*Ulva lactuta*) foram identificaram grupos funcionais característicos de compostos fenólicos, ácidos graxos, aminas, amidas, polissacarídeos e proteínas (AZIZ, A. T., 2022; GOPU, M. *et al.*, 2021; MURUGAN, K. *et al.*, 2016; RAJAGOPAL, G. *et al.*, 2021; RONI, M. *et al.*, 2015a; VINOTH, S. *et al.*, 2018). Esses bioativos podem contribuir tanto para as propriedades biológicas quanto para a estabilização e/ou redução dos íons de prata (AHMAD, N.; SHARMA, S., 2012; ASGHARI, G.; VARSHOSAZ, J.; SHAHBAZI, N. J. N. J., 2014).

2.3.3 Difração de Raios X (DRX)

DRX é uma técnica analítica amplamente utilizada para observar estruturas cristalinas pela penetração dos raios-X no material (RAJESHKUMAR, S.; BHARATH, L. V., 2017). Em AgNPs, o DRX é usado para detectar a formação de nanopartículas, sua estrutura cristalina e calcular o seu tamanho (pela equação de Debye Scherrer) (CHANDA, S., 2013; PHILIP, D., 2011). Vários estudos relataram a natureza cristalina de AgNPs sintetizadas a partir de extratos de algas marinhas por análise de DRX (ELUMALAI, D. *et al.*, 2021; GOPU, M. *et al.*, 2021; MURUGAN, Kadarkarai *et al.*, 2016; RONI, M. *et al.*, 2015a; VINOTH, S. *et al.*, 2018).

Elumalai, D. *et al.* (2021) verificaram a estrutura cristalina de AgNPs sintetizadas a partir de extratos de *Oscillatoria sanca* identificando quatro diferentes planos de estruturas cristalinas ($27,72^\circ$, $32,22^\circ$, $46,27^\circ$, $57,52^\circ$) com alta pureza, confirmando a produção das NPs, além disso, o padrão cristalino revelado configura uma estrutura cúbica de face centrada (fcc). Este mesmo padrão também foi observado em AgNPs sintetizadas a partir de extratos de algas marinhas, *Centroceras clavulatum* (MURUGAN, K. *et al.*, 2016), *Sargassum polycystum* (VINOTH, S. *et al.*, 2018), *Hypnea muciformis* (RONI, M. *et al.*, 2015b) e *Amphiroa rigida* (GOPU, M. *et al.*, 2021). Roni, M. *et al.* (2015) em seu trabalho com extratos de *Hypnea muciformis*, além de confirmar a

estrutura cristalina e a geometria das AgNPs sintetizadas, definiu o tamanho das AgNPs na faixa de 20-60 nm. Rajagopal *et al* (2021) apesar de não terem descrito sua geometria, demonstraram que AgNPs utilizando *Padina Gymnospora* apresentavam diâmetro de 30 nm. As AgNPs obtidas do extrato da alga *Ulva lactuca* também apresentaram estrutura cristalina confirmada por DRX (AZIZ, A. T., 2022). O difratograma revelou um padrão de difração de picos nos ângulos 20-40 (2 picos), 40-60 (3 picos) e 60-80 (1 pico), que são sugestivos de padrão cúbico centrado na face.

2.3.4 Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS)

A análise de energia dispersiva de raios X (EDX / EDS / EDXA), também chamada de espectroscopia de energia dispersiva de raios X, é uma técnica de raios X usada para determinar a composição elementar ou caracterização química do material (KEPEKÇI, R. A.; YENER İLÇE, B.; DEMIR KANMAZALP, S., 2021). Essa técnica permite a medição da composição e quantidade de íons de metais pesados em nanopartículas, que são colocadas próximas ou na superfície de uma amostra (ROODBAR SHOJAEI, T.; SOLTANI, S.; DERAKHSHANI, M., 2022).

As NPs obtidas pelos extratos de algas marinhas de *Padina gymnospora*, *Uva lactuca*, *Oscillatoria sanca*, *Amphiroa rigida*, *Gracilaria firma*, *Centroceras clavulatum*, *Sargassum polycystum* e *Hypneia muciformis* revelaram forte sinal na região da Ag, confirmando a presença de nanocristais de prata, apresentando pico típico de absorção óptica de aproximadamente 3 keV devido à ressonância plasmônica de superfície (RSP) (KAVIYA, S. *et al.*, 2011; MAGUDAPATHY, P. *et al.*, 2001). Além disso, algumas AgNPs obtidas a partir de extratos de algas marinhas *Sargassum polycystum* (VINOTH, S. *et al.*, 2018), *Padina gymnospora* (RAJAGOPAL, G. *et al.*, 2021), *Hypneia muciformis* (RONI, M. *et al.*, 2015a), *Uva lactuca* (AZIZ, A. T., 2022), *Gracilaria firma* (KALIMUTHU, K. *et al.*, 2016) e *Oscillatoria sanca* (ELUMALAI, D. *et al.*, 2021) mostraram outros sinais correspondentes a proteínas e outros compostos orgânicos e inorgânicos. Foi relatado que nanopartículas sintetizadas usando extratos vegetais e metabólitos são cercadas por uma fina camada de material orgânico de cobertura e isso pode

permitir a estabilização da solução após a biossíntese (AHMAD, N.; SHARMA, S., 2012; GHOLAMREZA, A.; VARSHOSAZ, J.; SHAHBAZI, N., 2014).

2.3.5 Microscopia

A microscopia é uma análise importante na caracterização de nanopartículas metálicas. Entre elas, para o estudo das AgNPs, são comumente utilizadas a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (RAJAGOPAL, G. *et al.*, 2021).

MEV é um método amplamente utilizado para a geração de imagens de superfícies com alta resolução, que podem ser utilizadas para caracterização de nanomateriais (HAN, W.; JIAO, H.; FOX, D., 2018). Esta ferramenta produz uma variedade de sinais usando um feixe focado de elétrons de alta energia, de forma que a medida que o feixe de elétrons incidente percorre a superfície da amostra, ele emite elétrons em cada local da região escaneada (ERDMAN, N.; BELL, D. C.; REICHEL, R., 2019; LÔBO, M.; DOURADO, D.; SOUSA, A., 2019).

MET fornece informações sobre morfologia, estrutura cristalina, difração e análise espectroscópica (ZHOU, W. *et al.*, 2023) utilizando feixes de elétrons mais fortes (intensos), resultando em maior resolução e imagens de partículas mais detalhadas, quando comparado ao MEV (MANAIA, E. B. *et al.*, 2017; MOURDIKOU, S.; PALLARES, R. M.; THANH, N. T. K., 2018). Vistos em conjunto, MEV e MET forneceram informações importantes na caracterização de AgNPs.

Nanopartículas menores que 100 nm foram observadas em nanomateriais obtidos a partir de extratos de algas marinhas de *Sargassum polycystum* (20-88 nm por MEV) (VINOTH, S. *et al.*, 2018), *Hypnea musciformis* (40-65 nm por MEV) (RONI, M. *et al.*, 2015b), *Centroceras clavulatum* (35-65 nm por MEV), *Ulva lactuca* (20-50 nm por MET) (AZIZ, A. T., 2022), *Amphiroa rigida* (20-30 nm por MET) (GOPU, M. *et al.*, 2021), *Oscillatoria sanca* (> 50 nm por MEV e MET) (ELUMALAI, D. *et al.*, 2021) e *Padina gymnospora* (10-33 nm por MET, MEV) (RAJAGOPAL, G. *et al.*, 2021).

Nanopartículas obtidas do extrato de algas marinhas de *Gracilaria firma* (KALIMUTHU, K. *et al.*, 2016) apresentaram grandes variações na distribuição

de tamanho de partícula, superiores a 100 nm (12-200 nm por MET). Este fator pode estar correlacionado com o capeamento de biomoléculas na superfície da nanopartícula que pode formar outras nanoestruturas (CHANDRAN, S. P. *et al.*, 2006).

Em termos de morfologia das AgNPs, foi observada configuração cúbica para as nanopartículas obtidas das espécies *Sargassum polycystum* e *Hypnea musciformis*. Isto é consistente com o padrão de DRX destas nanopartículas. Por sua vez, nanopartículas obtidas de *Centroceras clavulatum*, *Ulva lactuca*, *Amphiroa rigida*, *Oscillatoria Sanca*, *Gracilaria firma* e *Padina gymnospora* revelaram formato esférico. É digno de nota que fatores como tamanho e morfologia podem impactar as propriedades biológicas das nanopartículas, conforme relatado anteriormente para a atividade larvicida de nanopartículas metálicas com diferentes tamanhos e morfologia contra mosquitos vetores (GUNATHILAKA, U. A.-O. *et al.*, 2021).

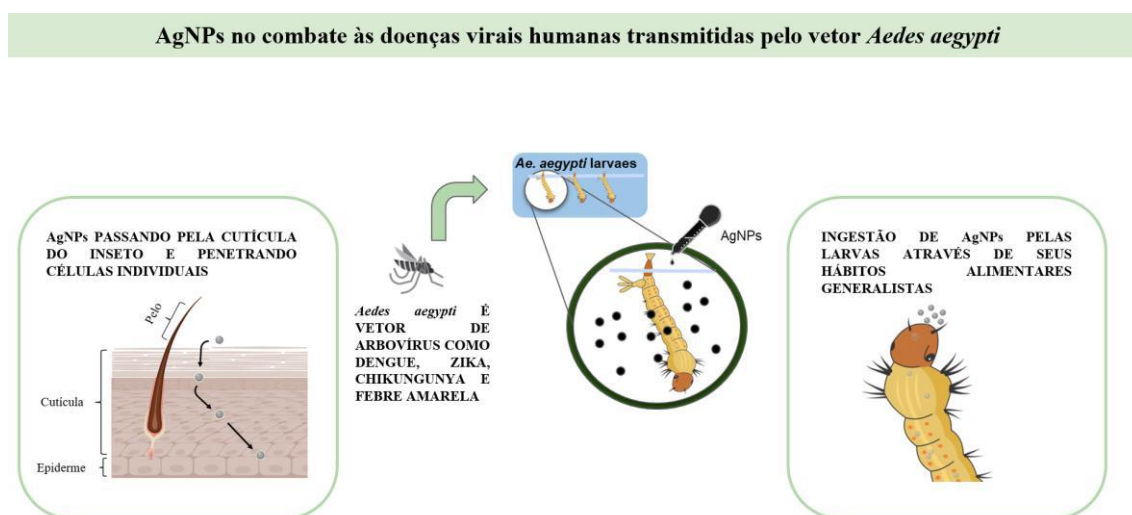
2.4 ATIVIDADE LARVICIDA DE AgNPs CONTRA *Aedes aegypti*

Aedes aegypti, conhecido como mosquito da dengue, também é vetor de importantes arbovírus, incluindo Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela (LIU, Y. *et al.*, 2020; SILVA, L. L. S. *et al.*, 2021). Dentre elas, destaca-se a dengue, pois esta doença é endêmica em mais de 100 países, revelando-se um importante problema de saúde pública (WHO, 2023). A sua incidência cresceu em todo o mundo nas últimas décadas, com um aumento no número de casos notificados pela OMS de 505.430 no ano 2000 para 5,2 milhões em 2019 (WHO, 2023). Além disso, prevê-se que cerca de 60% da população global estará em risco de contrair dengue em 2080 (MESSINA, J. P. *et al.*, 2019). Portanto, é imperativo que sejam desenvolvidas estratégias mais avançadas e eficientes para controlar a incidência de insetos transmissores de doenças. Nesta perspectiva, tem sido dada maior atenção à utilização de nanopartículas no controle de mosquitos vetores como uma solução para doenças emergentes e reemergentes (GUNATHILAKA, U. A.-O. *et al.*, 2021).

Dentre as nanopartículas investigadas quanto ao seu potencial larvicida no controle vetorial, as AgNPs sintetizadas a partir de algas marinhas tem se

mostrado uma estratégia promissora. A compatibilidade e potencialização da formação de nanopartículas de prata (AgNPs) após a mistura de extratos de algas com um sal de prata precursor (ex. nitrato de prata (AgNO_3)) pode ser devido à sinergia das biomoléculas com a atividade redutora presente nos extratos que se ligam à superfície das partículas (BORASE, H. P.; D PATIL, C., 2013). Após a redução das nanopartículas, sua toxicidade sob as larvas pode ocorrer de diversas formas (Figura 3).

Figura 3 - Potencial das nanopartículas de prata no controle vetorial de *Aedes aegypti*.



Fonte: Autor, 2024.

O pequeno tamanho das AgNPs está associado a duas vias de ação na toxicidade: (i) a capacidade de atravessar a cutícula do inseto e penetrar nas células individuais e (ii) a ingestão de AgNPs pelas larvas através de seus hábitos alimentares generalistas, ingerindo água e substâncias para serem absorvidas no intestino (RODRIGUES DOS SANTOS, D. *et al.*, 2023). Ambas as vias podem resultar em danos ao intestino médio, às células epiteliais e ao córtex nas larvas do mosquito, ocasionando alterações fisiológicas, como encolhimento da região abdominal e mudança no formato do tórax e brânquias (ZOHRA, T. *et al.*, 2022). Esses processos levam à oxidação e degradação de enzimas e organelas intracelulares, afetando processos fisiológicos e culminando em

apoptose em larga escala e, conseqüentemente, à morte da larva (ATHANASSIOU, C. *et al.*, 2018; RODRIGUES DOS SANTOS, D. *et al.*, 2023; ZOHRA, T. *et al.*, 2022).

Vinoth *et al.* (2018) avaliaram a atividade larvicida de AgNPs sintetizadas a partir do extrato de algas *S. polycys* em *Ae. aegypti*. As larvas L4 foram tratadas com NPs e sua mortalidade foi verificada nos tempos de 24h (60%, valor de CL₅₀ de 0.30 µg/mL), 48h (80% de valor de CL₅₀ de 0.06 µg/mL e 72 h (90%, valor de CL₅₀ de 0.03 µg/ml). Gopu, M. *et al.* (2021) sintetizaram e investigaram o potencial larvicida de AgNPs do extrato de algas marinhas *Amphiroa rigida*. Larvas de *Aedes aegypti* nos estágios L3 e L4 foram tratadas com *A. rigida*-AgNPs (5-80 µg/mL) e após 24 horas de exposição foi observada mortalidade. A partir da concentração de 20 µg/mL (L3) e 40 µg/mL (L4) foi evidenciada mortalidade das larvas.

Uma das maiores problemáticas em relação ao controle de vetores, é o desenvolvimento de resistência à inseticidas sintéticos, dessa forma de faz de grande importância a busca de bioprodutos que possuam baixo custo, baixa toxicidade para organismos não-alvo e que possuam alta eficiência e alta biodegradabilidade. Uma vez que as vacinas contra dengue apresentam limitações importantes e não estão disponíveis no sistema público de saúde, se faz necessário o controle do vetor, *Aedes aegypti* Linn. (Culicidae, Diptera), para controle da doença. As algas marinhas, presentes em abundância nas águas costeiras brasileiras, apresentam grande potencial fonte de novos compostos que podem ajudar a combater vetores de parasitas na fase adulta ou larval, sendo uma ótima alternativas aos produtos sintéticos, contribuindo assim para a melhoria das condições de saúde pública em países tropicais em desenvolvimento.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAL

Desenvolvimento de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de extratos de algas marinhas com atividade biocida para controle vetorial do *Aedes aegypti*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização química dos extratos brutos por FTIR, GC-MS e HPLC.
- Síntese e caracterização das nanopartículas de prata (AgNPs) a partir do extrato bruto.
- Avaliar o potencial larvicida das AgNPs contra de *Ae. aegypti*.
- Avaliar a toxicidade das nanopartículas frente à organismos não-alvo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS MACROALGAS

As algas *Sargassum vulgare* (C. Agardh), *Caulerpa sertularioides* (S.G. Gmelin), *Caulerpa chemnitzia* (J.V.Lamour), *Padina gymnospora* (Sonder 1871), *Bryopsis pennata* (J.V.Lamour) e *Gracilaria cervicornis* (J.Agardh) (Figura 4) foram coletadas na praia de Serrambi, Pernambuco sob as coordenadas: 8°33'21"S e 35°00'21"W. A Praia de Serrambi está situada no município de Ipojuca, cerca de 70 km ao sul da cidade do Recife. A praia de Serrambi, se dá pela presença de arenitos de praia (*beachrocks* ou recifes de arenito), os quais se apresentam geralmente paralelos a costa e servem de substrato para o desenvolvimento de algas e corais além de ser uma proteção efetiva para o litoral (Chaves, 1991; Manso *et al.*, 2003). As algas foram coletadas em 01 de abril de 2022. Foram realizados os registros dos materiais biológicos coletados nas plataformas SISGEM e SISBIO (Anexo A e B).

Figura 4 - Algas marinhas coletadas na praia de Serrambi, Pernambuco, Brasil (8°33'21"S e 35°00'21"W) *Sargassum vulgare* (C. Agardh); *Caulerpa sertularioides* (S.G.Gmelin); *Caulerpa chemnitzia* (J.V.Lamour); *Padina*

gymnospora (Sonder 1871); *Bryopsis pennata* (J.V.Lamour); *Gracilaria cervicornis* (J.Agardh).



Fonte: Autor, 2024.

4.2 DESIDRATAÇÃO DAS MACROALGAS MARINHAS E PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

Em laboratório as biomassas coletadas foram lavadas com água para remoção de sujeiras macroscópicas, deixadas sobre papel absorvente para drenar o excesso de água e colocadas para secagem em estufa com circulação e renovação de ar (Quimis, modelo Q314M242) à 45°C por 24 horas. As macroalgas secas foram trituradas para o preparo dos dois extratos, um aquoso e um hidroalcolico (etanol 70%), após a mistura do material triturado com o solvente escolhido, foram levados para o banho ultrassônico (EASY 10 H) por 30 min e filtrados em papel filtro (Whatman nº1). Os extratos hidroalcolicos foram tratados no evaporador rotativo para a retirada do etanol e então, assim

como os extratos aquosos, foram secos em *Spray Drier* nos seguintes parâmetros: Blower control: Vazão: 1,50 m³/min; Temperatura: SP = 80.0, E= 59.7 S=37.5; Flowmeter: 35 l/min (AIR); Feed pump: Vazão 0,40 L/H. Todos os extratos foram armazenados a -80°C.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO SECO

4.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A avaliação dos diferentes grupos constituintes funcionais presentes nos extratos brutos secos, aquoso e hidroalcolico, das algas *Sargassum vulgare*, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia*, *Padina gymnospora*, *Bryopsis pennata* e *Gracilaria cervicornis* foi conduzida por Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram obtidos a uma temperatura ambiente em estado sólido, utilizando espectrômetro de IV (PerkinElmer® - Spectrum 400), por dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio, com um intervalo de 650 - 4000 cm⁻¹. A resolução utilizada foi de 4 cm⁻¹ e a porcentagem com intervalo da transmitância de 40% - 60%.

4.3.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

As análises de GC-MS foram realizadas no Laboratório *Green e Sustainable Processes* (GSP) do Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, pelo Auxílio à Mobilidade Discente, da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE, com processo AMD-0086-2.10/22 (Anexo C, D e E).

Para as análises de GC-MS as amostras dos extratos aquosos passaram pela reação de transesterificação de ácidos carboxílicos, seguindo a metodologia pré-definida por Fernandes *et al.* (2021) com modificações, para melhor visualização dos constituintes químicos na coluna cromatográfica, utilizando como reagente de saponificação uma solução de NaOH (0,5M) em metanol; um reagente de esterificação com uma solução contendo cloreto de amônia em metanol, ácido sulfúrico; éter de petróleo e uma solução salina saturada (NaCl).

A composição das frações obtidas nos procedimentos de extração sequencial foi determinada utilizando um sistema de cromatografia gasosa (Agilent Technologies, 7890A GC, GC Systems) acoplado a um detector de espectrometria de massa (Agilent Technologies, 5975C inert MSD com with Triple-Axis Detector) e equipado com uma coluna DB Wax (30 m x 0.53 mm, i.d., 1.00 µm) e DB5. O gás transportador usado foi o hélio (3 mL / min) e 1 µL de amostra diluída em acetato de etila a uma concentração de 10 mg/mL foi injetada, no modo *split* de 9 mL/minuto. A temperatura do injetor foi de 220°C e a do detector foi de 300°C, sendo a rampa de temperatura de 100 a 220°C a uma taxa de 20°C/min e posterior de 220 a 250°C a uma taxa de 10°C/min mantendo a temperatura a 260°C durante 15 minutos, numa programação de 24 minutos. A identificação dos compostos baseou-se na análise comparativa de espectros de massa das substâncias com as dos bancos de dados do sistema de CG-MS (NIST e FFNSC 2).

Foram considerados apenas os compostos com certeza de identificação superior a 80% de combinação baseada nos espectros de massa das substâncias quando comparadas com as dos bancos de dados NIST e FFNSC 2.

4.3.3 Cromatografia líquida de alto eficiência acoplada a um detector de arranjo de fotodiodo (HPLC-PDA)

Os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas foram analisados por HPLC-PDA (Prominence UFLC Shimadzu - SPDM20A) no Laboratório *Green e Sustainable Processes* (GSP) do Departamento de

Engenharia Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, pelo Auxílio à Mobilidade Discente, da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE, com processo AMD-0086-2.10/22 (Anexo C, D e E).

As condições cromatográficas foram baseadas na literatura relatada por López *et al.* (2011). A separação foi realizada com uma coluna Surf C18 100A (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Um sistema de gradiente foi usado envolvendo duas fases móveis. O eluente A foi água com 0,1% de ácido fórmico e o eluente B metanol. A vazão foi de 1,0 mL/min e o volume de injeção foi de 60 µL de extrato diluído em metanol. O sistema operou a 27°C. As condições de eluição aplicadas foram: 0–5 min, 20% B isocrático; 5–30 min, gradiente linear de 20% a 60% B; 30–35 min, 60% B isocrático; 35–40, gradiente linear de 60% a 20% B e, acondicionamento da coluna. O monitoramento simultâneo foi feito em 270 nm, 324 nm e 373 nm de acordo com as absorbâncias encontradas para os padrões. Ainda em López *et al.* (2011) foram preparados padrões de ácido gálico, quercetina, rutina, epicatequina, ácido cafeico, catequina, ácido vanílico, ácido clorogenico, ácido siríngico e ácido p-cumárico na concentração de 1 mg/mL. Os comprimentos de ondas de cada padrão estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Comprimentos de onda (nm) dos padrões ácido gálico, quercetina, rutina, epicatequina, ácido cafeico, catequina, ácido vanílico, ácido clorogenico, ácido siríngico e ácido p-cumárico.

Padrão	Comprimento de onda (nm)
Ácido gálico	270nm
Quercetina	373nm
Rutina	373nm
Epicatequina	270nm
Ácido cafeico	324nm
Catequina	270nm
Ácido vanílico	270nm
Ácido clorogenico	324nm
Ácido siríngico	270nm
Ácido p-cumárico	324nm

Fonte: Autor, 2024.

A análise dos dados foi realizada com base em dois critérios: tempo de retenção e cromatogramas dos padrões e dos picos correspondentes nas amostras. Para a identificação foram usados os critérios anteriormente descritos, mas para a quantificação foram feitas curvas de calibração com os referidos padrões com concentrações conhecidas (1 mg/mL).

4.4 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Após a caracterização química dos extratos brutos das algas marinhas *Sargassum vulgare*, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia*, *Padina gymnospora*, *Bryopsis pennata* e *Gracilaria cervicornis*, foi utilizado como critério de seleção os três extratos que apresentaram uma maior quantidade de biomoléculas extraídas, sendo elas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*.

As nanopartículas metálicas foram sintetizadas via “síntese verde” de acordo com adaptações de metodologias pré-estabelecidas (BALASUBRAMANI, G. *et al.*, 2015; VIMALA, R. *et al.*, 2015). Em resumo, 10 mL do extrato bruto das algas marinhas foram adicionados 90 mL de AgNO₃ (10 mM) à 90 °C por 48hrs. Uma alíquota das soluções foi coletada para caracterização por UV-visível. Em seguida, as suspensões de nanopartículas foram submetidas a três ciclos de centrifugação (5.000rpm/30min), congeladas a -80°C, liofilizadas e armazenadas para as caracterizações físico-químicas e testes biológicos.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.5.1 Análise por UV-visível (UV-Vis)

Os espectros de UV-Vis foram obtidos a partir da varredura das suspensões de nanopartículas de prata (AgNPs) após 48hrs de síntese em um intervalo de comprimentos de onda entre 200 a 800 nm no espectrofotômetro (Spectramax M3) no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (LABECOTOX) do Departamento de Zoologia – UFPE.

4.5.2 Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

4.5.2.1 Sedimentação por Centrifugação Diferencial - CPS Disc Centrifuge

A análise de CPS foi realizado nas instalações do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), uma organização social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI). A equipe da instalação Nanotoxicologia e Nanobiotecnologia é reconhecida pela assistência durante os experimentos (Nanotox-20230212) e pela contribuição do Centro de Biologia Estrutural do Mercosul (CEBEM) por meio da subvenção número 2021-240160 da Iniciativa Chan Zuckerberg DAF, um fundo assessorado de Silicon Fundação Comunitária do Vale.

As amostras foram submetidas a centrifugação em centrífuga de disco CPS DC24000 (Figura 5) em gradiente de sacarose de 1-8%. Cada medição de sedimentação foi calibrada utilizando um padrão de policloreto de vinila (PVC) de tamanho nominal de 544 nm e realizada com injeção de 0,1 mL de amostra.

Figura 5 - Centrifuga de disco CPS DC24000 (Laboratório Nanotox – CNPEM).



Fonte: Autor, 2024.

4.5.2.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A distribuição hidrodinâmica do tamanho das nanopartículas foi determinada pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, utilizando-se um

analisador de partículas Zetasizer nano ZS90 (Malvern Panalytical) com detector em ângulo fixo de 90° e temperatura de 25 °C. Medidas de potencial zeta foram determinadas pela técnica de mobilidade eletroforética no mesmo equipamento.

4.5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Nanopartículas foram visualizadas através da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), utilizando um Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol® JEM-1230 operando a 80 kV. No preparo da amostra, uma amostra de 20 µL foi aplicada sobre uma grade de cobre revestida com filme de carbono. Após secagem, o excesso de amostra foi removido, seguido de análise morfológica das partículas.

4.5.4 Difração de raios-X (DRX)

Para as análises das amostras de AgNPs em pó obtidas via síntese-verde foi utilizado um difratômetro de raios-X da Rigaku SmartLab® da Central Multiusuário do Departamento de Física da UFPE com detector de fita de silicone D/teX Ultra 250 ou cintilação. Como parâmetros de operação foram utilizados na medida: intervalo de varredura (2θ) de 20 a 100°; passo angular= 0,005°, velocidade = 2°/min. O tubo do feixe foi de cobre, emitindo um comprimento de onda de 1,58059 Å.

4.5.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A avaliação dos diferentes grupos constituintes funcionais presentes nas nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas pelo método de 'síntese-verde' a partir dos extratos brutos secos, aquoso e hidroalcolico, das algas *Sargassum vulgare*, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia*, *Padina gymnospora*, *Bryopsis pennata* e *Gracilaria cervicornis* foi conduzida por Espectroscopia na

região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), realizado no Laboratório de tecnologia de medicamentos (LTM) no Departamento de Farmácia da UFPE. Os espectros foram obtidos a uma temperatura ambiente em estado sólido, utilizando espectrômetro de IV (PerkinElmer® - Spectrum 400), por dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio, em intervalo de 650 - 4000 cm^{-1} . A resolução utilizada foi de 4 cm^{-1} e a porcentagem com intervalo da transmitância de 40% - 60%.

4.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Raios-X Dispersiva em Energia (MEV-EDS)

As amostras para MEV-EDS foram preparadas fixando uma fita de carbono ao suporte e despejando uma pequena quantidade de amostra sobre a fita com a remoção do excesso de pó com um borrifador de ar. Posteriormente, as amostras foram metalizadas com ouro (Au) em uma metalizadora BalTec SCD 050 da Central Multiusuário do Departamento de Física da UFPE. Após a metalização, as amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura acoplado a um espectrômetro de raios-X dispersivo em energia Mira3 LMU da Rui Tescan para detecção de elétrons secundários a uma potência de feixe de 25 kV. O equipamento está disponível nos espaços do prédio do Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais no departamento de Química Fundamental (Dqf) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.5.7 Avaliação do perfil térmico das AgNPs por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Curvas de fluxo de calor foram obtidas em um calorímetro diferencial de varredura, modelo 1 Star^{*system} (Mettler Toledo) sob atmosfera de nitrogênio. As análises foram realizadas no Laboratório de Nanodispositivos Fotônico no Departamento de Química Fundamental da UFPE. As amostras foram acondicionadas em cadinhos de alumínio e submetidas a aquecimento de 25°C

a 550°C, com taxa de 10°C/min e fluxo de gás 50 mililitros por minutos (50 mL/min).

4.6 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS AgNPs EM *Ae. aegypti*

4.6.1 Ensaio larvicida contra *Ae. aegypti*

As atividades larvicidas das nanoformulações foram avaliadas através de bioensaios toxicológico, de acordo com adaptações da metodologia preconizada pela OMS (LEAL, W. S. *et al.*, 2017). Larvas de terceiro estágio (L3) de *Aedes aegypti* foram obtidas de uma colônia estabelecida no Instituto Aggeu Magalhães (IAM) sob condições adequadas de temperatura ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa ($60 \pm 10\%$) e fotoperíodo de 12 horas. Ensaios-piloto foram conduzidos para estabelecer as faixas de concentração a serem utilizadas no bioensaio de toxicidade através de uma curva concentração-resposta com 20 larvas para a determinação da faixa de concentração larvicida. As larvas foram expostas a diferentes concentrações de nanopartículas, em triplicata, durante 24 e 48 horas. Neste período, foram notificadas a taxa de mortalidade. Temefós (6 ppm) foi utilizado como controle positivo e água ultrapura foi utilizada como controle negativo.

4.6.2 Ensaio de quantificação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em larvas de *Ae. aegypti*.

O método de quantificação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), realizado no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (LABECOTOX) do Departamento de Zoologia – UFPE, foi adaptado do método descrito por (ELLMAN, G. L. *et al.*, 1961). O homogenato foi constituído por 10 larvas L3 de *Ae. aegypti*, tratadas com as AgNPs e com o controle negativo (água ultrapura), e 100 µL de tampão fosfato de potássio (KPI 0,1 M com pH 7,4). Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas por 20 min, 4°C a 9000g. A

atividade da acetilcolinesterase foi avaliada utilizando 50 μL do homogenato e 200 μL de uma solução de ácido 5,5'-Ditiobis 2-nitrobenzato (DTNB) 0,3 g L^{-1} . Após a leitura da atividade de basal, 50 μL do substrato iniciador de iodeto de acetilcolina a 2,6 g L^{-1} foram adicionados e em seguida lida a atividade enzimática por absorvância no comprimento de onda 415 nm em um espectro de fluorímetro (SpectraMax[®] M3) por 2 min. A atividade da AChE foi quantificada utilizando o coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon = 14.150 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e dada em $\text{nmol de TNB min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$.

A quantificação das proteínas totais foram executadas seguindo o método colorimétrico descrito por (BRADFORD, M. M., 1976) a partir de uma curva de diluições de albumina bovina com seis concentrações, considerando ($r^2 > 0,995$).

4.7 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS BRUTOS EM ESPÉCIES NÃO-ALVO

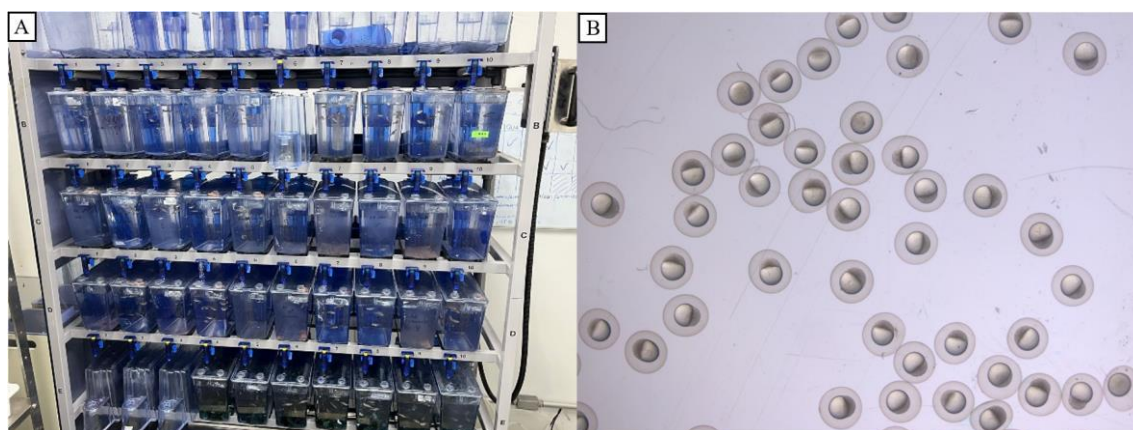
4.7.1 *Danio rerio* (Zebra fish)

Os bioensaios com *Danio rerio* foram realizados nas instalações do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), uma Organização Social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI). A equipe da instalação Nanotoxicologia e Nanobiotecnologia é reconhecida pela assistência durante os experimentos (Nanotox-20230212 e pela contribuição do Centro de Biologia Estrutural do Mercosul (CEBEM) por meio da subvenção número 2021-240160 da Iniciativa Chan Zuckerberg DAF, um fundo assessorado de Silicon Fundação Comunitária do Vale” (Anexo F e G).

O ensaio dos primeiros estágios de vida do peixe-zebra foi realizado de acordo com a diretriz da OCDE sobre o teste FET (OCDE, 2013). A instalação Nanotox do LNNano-CNPEM (Campinas, São Paulo, Brasil) forneceu ovos de peixe-zebra usados no estudo. O teste começou expondo ovos recém-fertilizados de peixe-zebra por 96 horas a $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo 16:8 (claro:

escuro) às concentrações selecionadas das nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas pelos extratos aquoso e hidroalcoólicos (0.005 - 0.30ppm), incluindo o grupo controle (EPA). A diluição do extrato foi realizada em água reconstituída (meio EPA) preparada com NaHCO_3 (96 mg/L), MgSO_4 (60 mg/L), KCl (4 mg/L) e CaSO_4 (60 mg/L) (pH $7,5 \pm 0,5$) (USEPA, 2002). Vinte ovos por tratamento (3 repetições) foram selecionados e distribuídos em microplacas de 24 poços (Figura 6). Embriões e larvas foram observados diariamente sob um estereomicroscópio (Stereo Discovery V20, Zeiss). Foram notificadas a taxa de mortalidade.

Figura 6 - A) Aquários para reprodução e liberação de ovos com embriões de *Danio rerio* utilizados em estudos. B) Ovos com embriões *Danio rerio* visualizados no estereomicroscópio.



Fonte: Autor, 2024.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de concentração letal (LC_{50} e LC_{90}) foram calculados usando análise de dados de dose-mortalidade de estudos de bioensaios no software Origin (versão 8.5). Os dados foram analisados quanto à distribuição de normalidade por meio dos testes de Shapiro-Wilk. Como os resultados foram normais e homocedásticos, as diferenças entre as médias dos tratamentos foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA-one way) e teste de Tukey com intervalo de confiança de $p < 0,05$. As análises estatísticas e os gráficos

foram gerados no software Origin (versão 8.5). Todos os dados são apresentados como médias \pm DP. Para os testes de AChE, as comparações entre tratamentos e controle foram feitas com base nos testes a posteriori de Dunnett (ANOVA) e Dunn (Kruskal Wallis), respectivamente, utilizando o software Sigmaplot 12.0 (Jandel Scientific, Erkrath, Alemanha).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

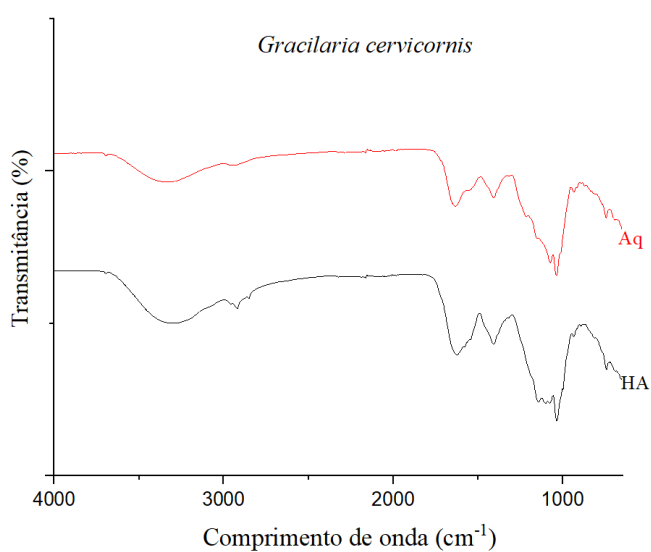
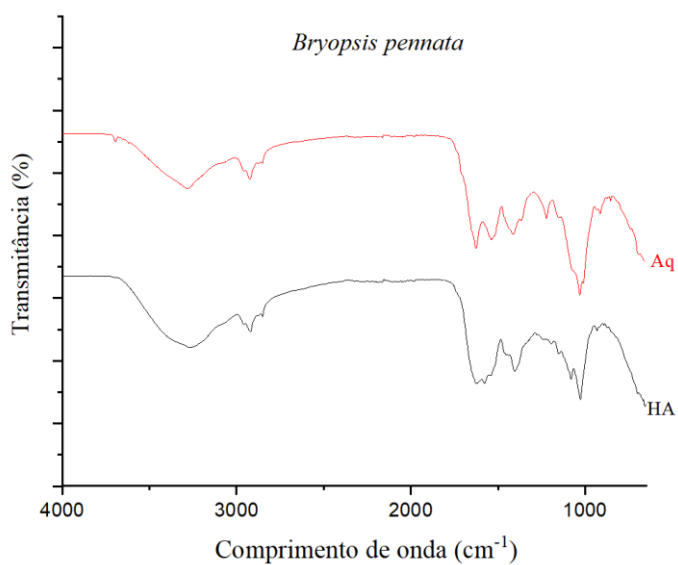
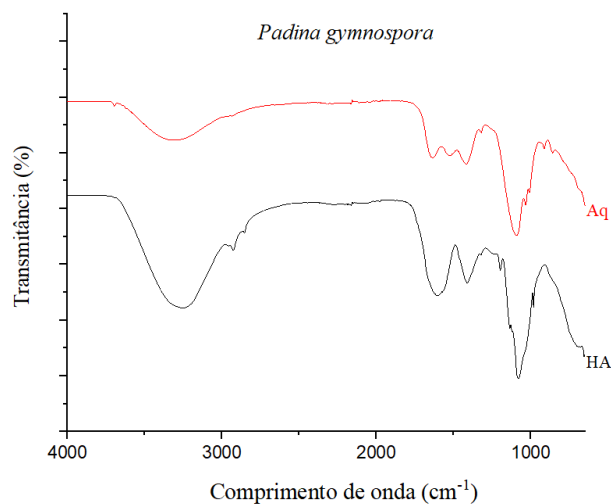
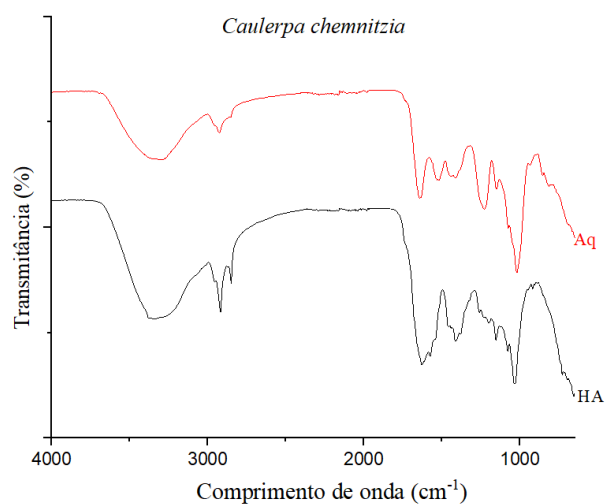
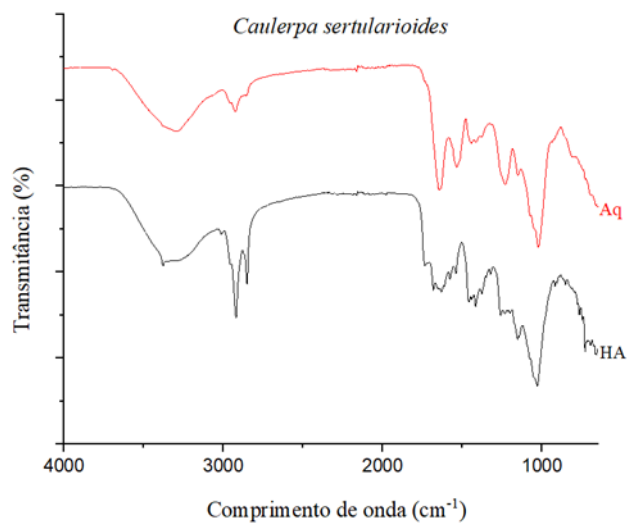
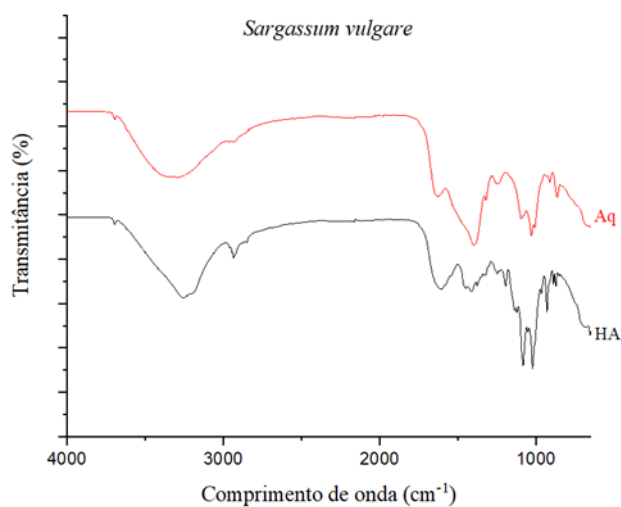
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

5.1.1 Análise por Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FT-IR dos extratos aquosos e hidroalcolóico de *Sargassum vulgare*, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia*, *Padina gymnospora*, *Bryopsis pennata* e *Gracilaria cervicornis* estão representados na Figura 7 e os grupos funcionais compilados na Tabela 3.

Figura 7 - Espectros de FTIR dos extratos aquosos e hidroalcolóicos das algas marinhas *Sargassum vulgare*, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia*, *Padina gymnospora*,

Bryopsis pennata e *Gracilaria cervicornis* coletadas na Praia de Serrambi, Ipojuca, Pernambuco, em abril de 2022.



Aq = aquoso e HA = hidroalcolico.

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 3 - Espectros de FTIR dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas *Sargassum vulgare*, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia*, *Padina gymnospora*, *Bryopsis pennata* e *Gracilaria cervicornis* coletadas na Praia de Serrambi, Ipojuca, Pernambuco, em abril de 2022.

Frequência (cm ⁻¹)		Grupo funcional	Modo de vibração
Aquoso	Hidroalcoólico		
<i>Sargassum vulgare</i>			
3328	3254	-OH	fenol e álcool
2931	2936	CH-	alongamento de alcanos
1396	-	C=O-H	deformação de fenóis
1246	1247	SO ₃	alongamento
1096	-	C-O	vibração de alongamento de álcoois e
1080	1083		ácidos carboxílicos
1030	-	C-O e C-C	alongamento
-	1022	C-N	estiramento de aminas alifáticas
1009	-	Aromáticos C-H	flexão no plano
615	654	C=C	dobramento de alceno
<i>Caulerpa sertularioides</i>			
3292	-	OH	alongamento de taninos
2957	-	CH ₃	alongamento assimétrico e simétrico
2924	-	CH-	alongamento de alcanos
-	2919	C-H	ligações alifáticas carbono-hidrogênio
2852	2851	C-H	alongamento de alcanos
1642	-	OH	vibração de curvatura
-	1629	(NH)=O	vibração de alongamento
1419	-	C=H	curvatura assimétrica/simétrica para o grupo dimetil ou isometil
-	1416	-CH (CH ₃)	curvatura
1380	1376	OH	Vibrações de deformação
1163	-	C=O	alongamento assimétrico arom-O
1150	1154	Aromatico C-H	flexão plana
1075	-	CC e CH	alongamento e flexão respectivamente
-	1030	C-N	vibração de alongamento de aminas alifáticas
1022	-	C-N	Alongamento de aminas alifáticas
-	728	-	modo de curvatura Alcanos
<i>Caulerpa chemnitzia</i>			
3322	3339	OH	alongamento de taninos
2927	-	C-H	ligações alifáticas carbono-hidrogênio (2.963 a 2.855 cm ⁻¹)
-	2916		
-	2877		
2854	2848	C-H	alongamento de alcanos
-	1629	(NH)=O	vibração de alongamento do grupo
-	1081	C-N	vibração de alongamento de aminas alifáticas
1020	-	C-O	alongamento de carboxílicos e aminas
<i>Padina gymnospora</i>			
-	2926	C-H	ligações alifáticas carbono-hidrogênio (2.963 a 2.855 cm ⁻¹)
1634	-	-	grupos carbonila e ligações amida de proteínas
-	1081	C-N	vibração de alongamento de aminas alifáticas

<i>Bryopsis pennata</i>			
2925	2920	C-H	alongamento de alcanos
2854	2849		
2323	-	C≡C	alongamento
-	1622	(NH)=O	vibração de alongamento do grupo
-	1580	-	vibração assimétrica e simétrica do íon carboxilato
-	1027	C-N	Estiramento de aminas alifáticas
<i>Gracilaria cervicornis</i>			
-	3294	O-H	modo de vibração alongamento (sym)
2931	2922	C-H	alongamento de alcanos
-	1622	(NH)=O	vibração de alongamento do grupo
1406	1404	C-O	estiramento de éter alquil arílico
-	1031	C-O	alongamento de grupos alcoólicos

Fonte: Autor, 2024.

Os picos observados para os extratos de *Sargassum vulgare*, para o extrato aquoso, foram 3328, 2931, 1396, 1246, 1096, 1080, 1030, 1009 e 615 cm^{-1} , e para o hidroalcoólico 3254, 2936, 1247, 1083, 1022 e 654 cm^{-1} . Os espectros mostraram fortes picos de absorção em 3328 e 3254 cm^{-1} indicando a vibração da hidroxila (OH) do fenol e do álcool. Os picos 2931 e 2936 cm^{-1} significam o alongamento CH- de alcanos. O pico em 1396 cm^{-1} indica a deformação de fenóis (C=O-H) e o 1246 e 1247 cm^{-1} , o alongamento do óxido sulfúrico (SO₃). Os picos encontrados em 1096, 1080 e 1083 cm^{-1} indicam a vibração de alongamento de álcoois e ácidos carboxílicos (C-O), já em 1030 cm^{-1} se encontra o alongamento de C-O e C-C. Em 1022 cm^{-1} há o estiramento de cadeias alifáticas (C-N), em 1009 cm^{-1} a flexão no plano do grupamento C-H aromático e, em 615 e 654 cm^{-1} , a presença de dobramento de alcenos (C=C).

Para *Caulerpa sertularioides* foram observados, para o extrato aquoso, picos em 3292, 2957, 2924, 2852, 1642, 1419, 1380, 1163, 1150, 1075 e 1022 cm^{-1} , e para o extrato hidroalcoólico, 2919, 2851, 1629, 1416, 1376, 1154, 1030 e 728 cm^{-1} . Os espectros mostraram fortes picos de absorção em 3292 cm^{-1} indicando alongamento de taninos (OH), em 2957 cm^{-1} indicando alongamento simétrico e assimétrico do grupamento CH₃. Os picos em 2924, 2852 e 2851 cm^{-1} indicam o alongamento de alcanos (CH). Em 2919 cm^{-1} são encontradas ligações alifáticas C-H. Para o pico 1642 cm^{-1} se encontra vibrações de curvatura para o grupamento OH e para em 1380 e 1376 cm^{-1} se encontra vibrações de deformação OH. O pico encontrado em 1629 cm^{-1} apresenta vibrações de alongamento do grupo (NH)=O, em 1419 cm^{-1} apresenta uma curvatura

assimétrica/simétrica para o grupo dimetil ou isometil (C=H), em 1416 cm^{-1} se tem curvatura para $-\text{CH}(\text{CH}_3)$, em 1163 cm^{-1} alongamento assimétrico em grupos aromáticos-O (C=O) e em 1150 e 1154 cm^{-1} uma flexão plana em aromáticos C-H. Para o pico encontrado em 1075 cm^{-1} se encontra alongamento de grupo CC e flexão para CH. Para os picos 1030 e 1022 cm^{-1} se encontra vibração de alongamento e estiramento de aminas alifáticas, respectivamente e em 728 cm^{-1} apresenta o modo de curvatura de alcanos.

Para *Caulerpa chemnitzia*, foram observados, para o extrato aquoso, picos em 3322 , 2927 , 2854 e 1020 cm^{-1} , e para hidroalcolica 3339 , 2916 , 2877 , 2848 , 1629 e 1081 cm^{-1} . Os espectros mostraram picos de absorção em 3322 e 3339 cm^{-1} indicando alongamento de taninos (OH). Os picos em 2927 , 2916 e 2877 cm^{-1} apresentaram ligações alifáticas carbono-hidrogênio (C-H). Foram observados picos nos planos 2854 e 2848 cm^{-1} indicando alongamento de alcanos (C-H), em 1629 cm^{-1} é demonstrado vibração de alongamento do grupo (NH)=O, em 1081 cm^{-1} apresenta vibrações de alongamento de aminas alifáticas (C-N) e em 1020 cm^{-1} alongamento do grupamento carboxílico e aminas.

Para *Padina gymnospora*, foi observado para o extrato aquoso o pico em 1634 cm^{-1} , e para o hidroalcolico os picos 2926 e 1081 cm^{-1} . Os espectros mostraram picos de absorção em 1634 cm^{-1} apresentando grupos carbonila e ligações amida de proteínas, 2962 cm^{-1} demonstrando ligações alifáticas carbono-hidrogênio (C-H) e 1081 cm^{-1} representando vibração de alongamento de aminas alifáticas (C-N).

Para *Bryopsis pennata* foram observados, para o extrato aquoso, os picos 2925 , 2854 e 2323 cm^{-1} , e para hidroalcolico 2920 , 2849 , 1622 , 1580 e 1027 cm^{-1} . Os espectros mostraram picos de absorção em 2925 , 22920 , 2854 e 2849 cm^{-1} demonstrando alongamento de alcanos (C-H), em 2023 cm^{-1} apresenta alongamento em $\text{C}\equiv\text{C}$, em 1622 cm^{-1} apresenta vibração de alongamento do grupo (NH)=O, em 1580 cm^{-1} se tem a vibração assimétrica e simétrica do íon carboxilato e em 1027 cm^{-1} apresenta o estiramento de aminas alifáticas (C-N).

Para *Gracilaria cervicornis*, foram observados, para os extratos aquosos, os picos 2931 e 1406 cm^{-1} , e para o hidroalcolico 3294 , 2922 , 1622 , 1404 e 1031 cm^{-1} . Os espectros mostraram picos de absorção em 3294 cm^{-1}

demonstrando modo de vibração de alongamento (simétrico) em ligações O-H. Para os picos em 2931 e 2922 cm^{-1} apresenta alongamento de alcanos (C-H), em 1622 cm^{-1} a vibração de alongamento do grupo (NH)=O, em 1406 e 1404 cm^{-1} o estiramento de éter alquil arílico (C-O) e para 1031 cm^{-1} o alongamento de grupos alcoólicos (C-O).

Quando analisamos e comparamos a Figura 7, é possível se observar um padrão de picos muito parecidos entre os extratos aquosos e hidroalcoólicos, porém a intensidade dos picos se mostram bem maiores nos hidroalcoólicos, podendo se dar devido à capacidade de solventes orgânicos, mistura entre solventes orgânicos: água, ácidos, hipocloritos, entre outros, poderem interagir com componentes da parede celular das algas causando deformações e promovendo ruptura celular e a extração dos seus compostos (CORRÊA, P. S. *et al.*, 2020).

5.1.2 Análise GC-MS

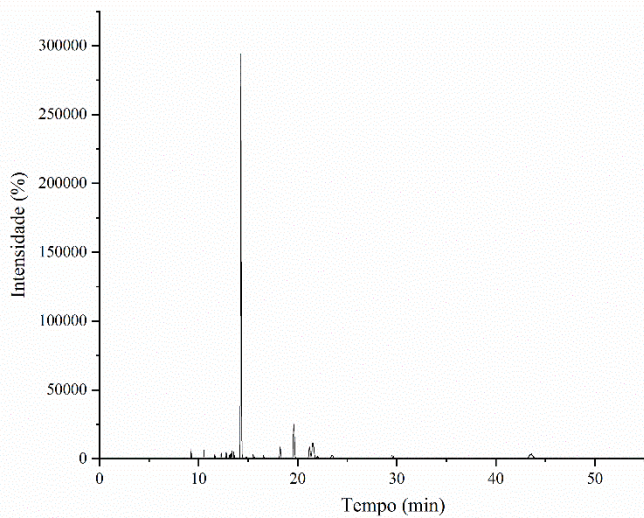
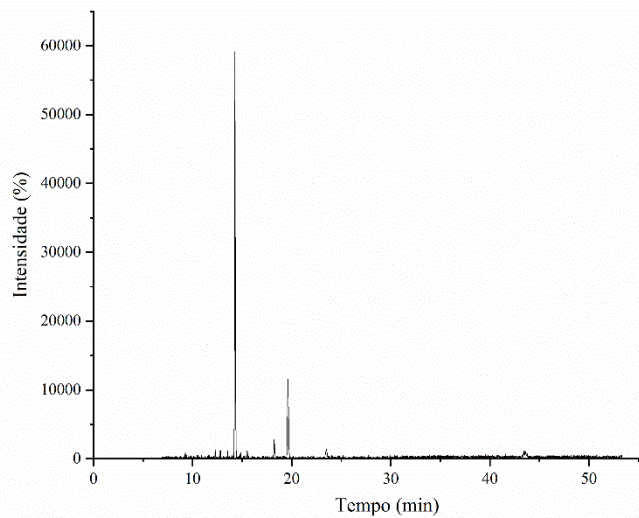
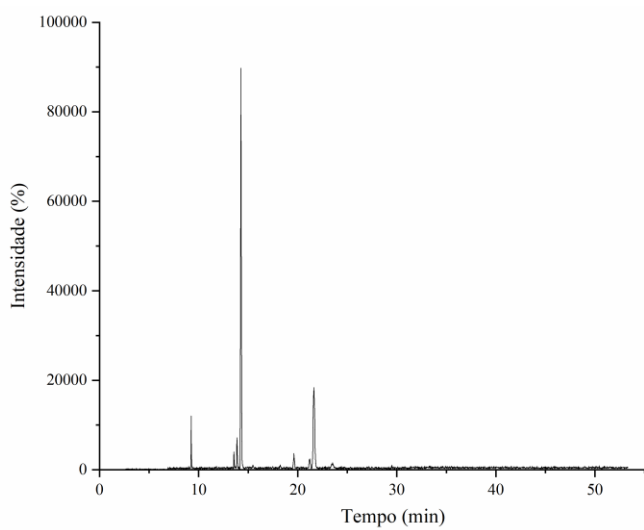
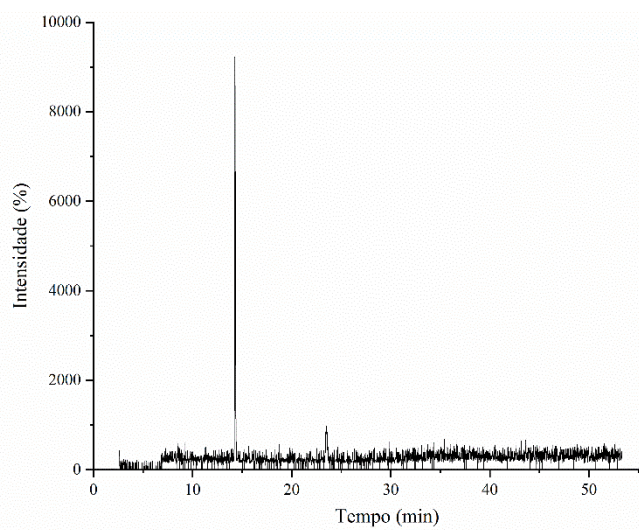
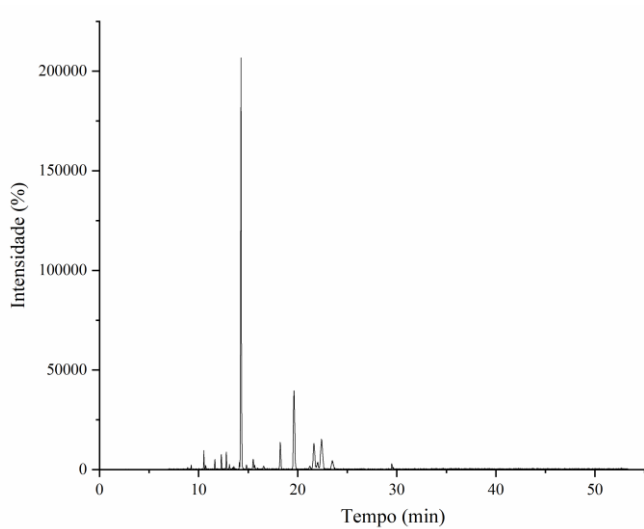
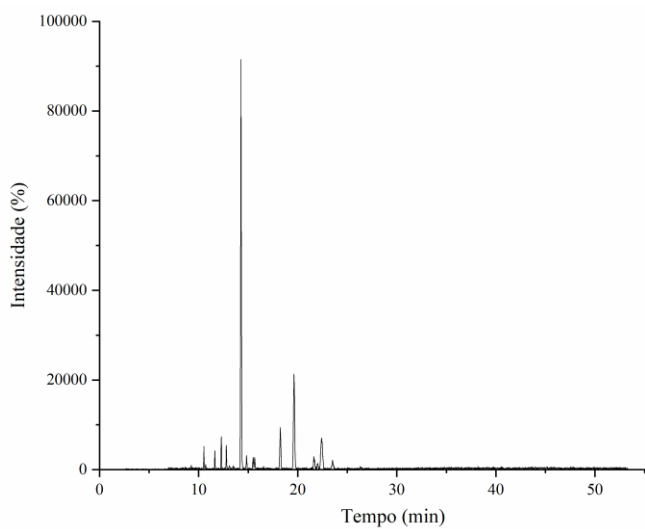
Os extratos brutos das algas marinhas *Sargassum vulgare*, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia*, *Padina gymnospora*, *Bryopsis pennata* e *Gracilaria cervicornis* foram caracterizados pela técnica de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS). A composição química elucidada foi compilada na Tabela 4 e foram representados nos cromatogramas na Figura 8.

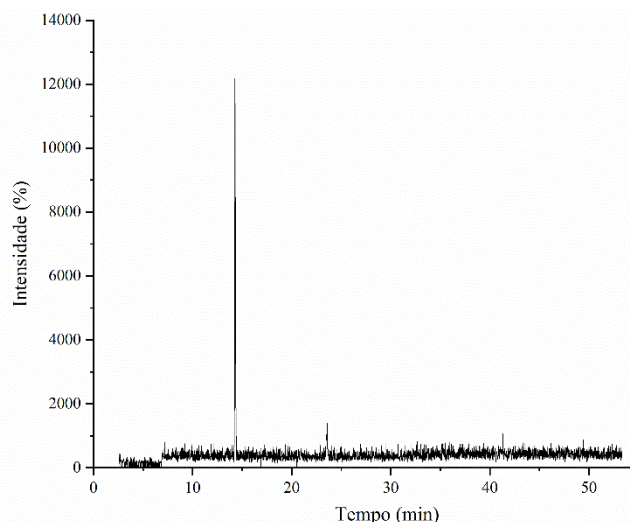
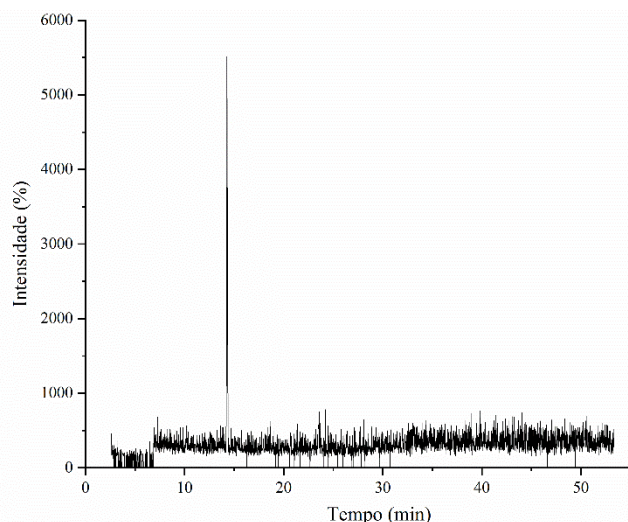
Tabela 4 - Composição dos extratos aquosos e hidroalcolócos esterificados das algas marinhas *Sargassum vulgare*, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia*, *Padina gymnospora*, *Bryopsis pennata* e *Gracilaria cervicornis* pela técnica de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS).

Amostra	Tipo de Extrato	RT* (min)	% Base de dados	Compostos Químicos	Área (%)
<i>Sargassum vulgare</i>	Aquoso	14.28	91	Hexadecanoic acid	100
		9.25	97	Tetradecanoic acid	4.27
	Hidroalcolóco	13.57	87	9-Hexadecenoic acid	3.73
		14.28	98	Hexadecanoic acid	64.59
		21.22	96	9,12-Octadecadienoic acid	3.70
		21.66	99	Octadecenoic acid	17.67
		29.51	83	5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid	6.03
<i>Caulerpa sertularioides</i>	Aquoso	9.26	91	Tetradecanoic acid	2.30
		14.28	99	Hexadecanoic acid	97.70
	Hidroalcolóco	9.25	98	Tetradecanoic acid	2.02
		12.30	83	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen	0.50
		13.17	95	Hexadecadienoic acid	3.00
		13.32	94	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	4.73
		13.56	94	9-Hexadecenoic acid	1.60
		14.290	99	Hexadecanoic acid	58.78
		21.20	99	9,12-Octadecadienoic acid	12.21
		21.52	99	9,12,15-Octadecatrienoic acid	11.31
		23.49	93	Octadecanoic acid	1.39
		29.67	94	5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	1.77
		30.15	83	6,9,12-Octadecatrienoic acid	0.51
		43.51	90	Tetracosanoic acid	1.18
43.61	90	Tetracosanoic acid	0.99		
<i>Caulerpa chemnitzia</i>	Aquoso	14.28	98	Hexadecanoic acid	100.00
	Hidroalcolóco	9.26	90	Tetradecanoic acid	1.35
		14.27	98	Hexadecanoic acid	91.77
		21.21	98	9,12-Octadecadienoic acid	4.79
		23.51	86	Octadecanoic acid	1.23
		29.49	83	Methyl eicosatetraenoate	0.87
<i>Padina gymnospora</i>	Aquoso	14.28	95	Hexadecanoic acid	100.00
	Hidroalcolóco	13.88	80	9-Hexadecenoic acid	4.35
		14.28	99	Hexadecanoic acid	66.94
		21.65	91	9-Octadecenoic acid (Z)-	28.71
<i>Bryopsis pennata</i>	Aquoso	14.28	98	Hexadecanoic acid	100.00
	Hidroalcolóco	10.54	94	Pentadecanoic acid	2.38
		14.28	99	Hexadecanoic acid	83.56
		21.64	87	10-Octadecenoic acid	11.62
		22.03	80	9-Octadecenoic acid (Z)-	2.44
<i>Gracilaria cervicornis</i>	Aquoso	14.28	86	Hexadecanoic acid	100.00
	Hidroalcolóco	14.28	96	Hexadecanoic acid	100.00

*RT = Tempo de Retenção; (%) certeza de identificação. Dos picos encontrados, foram identificados para *Sargassum vulgare* (100% aq. e 60% HA), *Caulerpa sertularioides* (25% aq. e 43,3% HA), *Caulerpa chemnitzia* (33,33% aq. e 22,72% HA), *Padina gymnospora* (100% aq. e 42,85% HA), *Bryopsis pennata* (7,69% aq. e 21,05% HA) e *Gracilaria cervicornis* (100% aq. e 100% HA).

Fonte: Autor, 2024.

Caulerpa chemnitzia*Padina gymnospora**Bryopsis pennata*



Fonte: Autor, 2024.

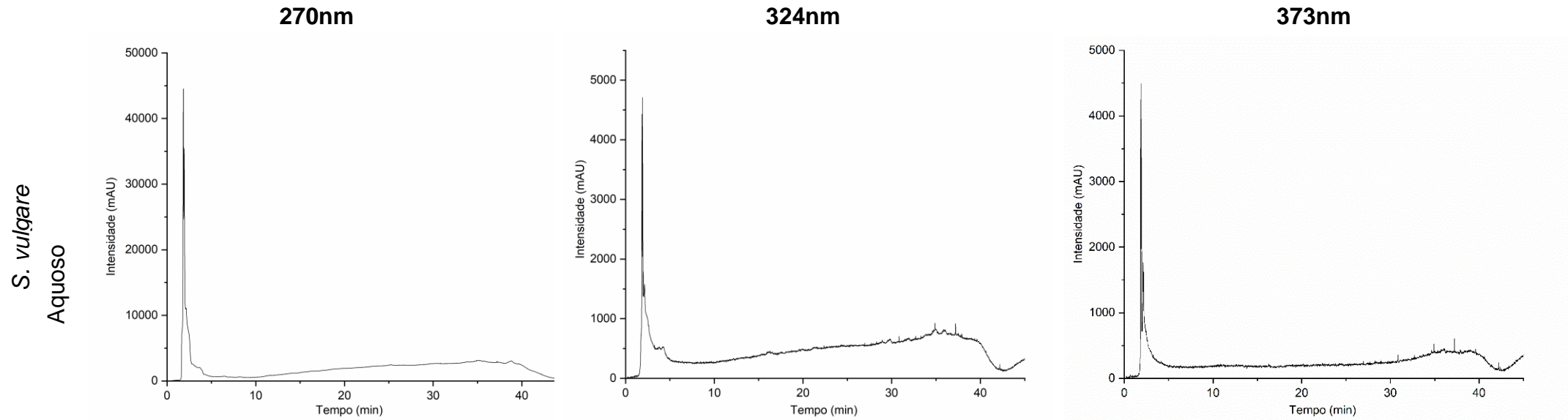
Uma vez que as amostras passaram pelo processo de transesterificação, foram encontradas majoritariamente ácidos graxos em todos cromatogramas analisados (Figura 8). Esses padrões de ácidos graxos já foram apresentados por outros autores quando aplicaram as mesmas técnicas de transesterificação em extratos de algas marinhas.

O ácido hexadecanoico é um dos ácidos graxos mais comuns em algas, independente do filo, uma vez que, assim como no presente estudo, são apresentados em todos os extratos das as algas marinhas, sendo a partir deste ácido graxo que os seres vivos podem realizar biossíntese de ácidos graxos de cadeias maiores (SILVA, D. L. d., 2014). Assim como apresentado no presente estudo, Hariram, John *et al.* (2019) em seu estudo com a alga parda *Stoechospermum marginatum*, encontraram picos correspondentes a ácido hexadecanoico (palmitato de metila), ácido octadecadienóico (octadecadienoato de metila), ácido tetracosanoico (lignocerato de Metila). Foseid, Natvik *et al.* (2020) em seu trabalho com extratos das algas marinhas *Palmaria palmata*, *Alaria esculenta* e *Saccharina latíssima* encontram picos correspondentes ao ácido hexadecanoico (Palmitato de metila), ácido eicosapentaenóico, ácido tetradecanoico (ácido mirístico), Ácido octadecanoico (ácido esteárico), ácido 9-hexadecenóico (ácido palmitoléico), ácido 9,12-octadecadienóico (ácido linoleico), ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico (ácido araquidônico).

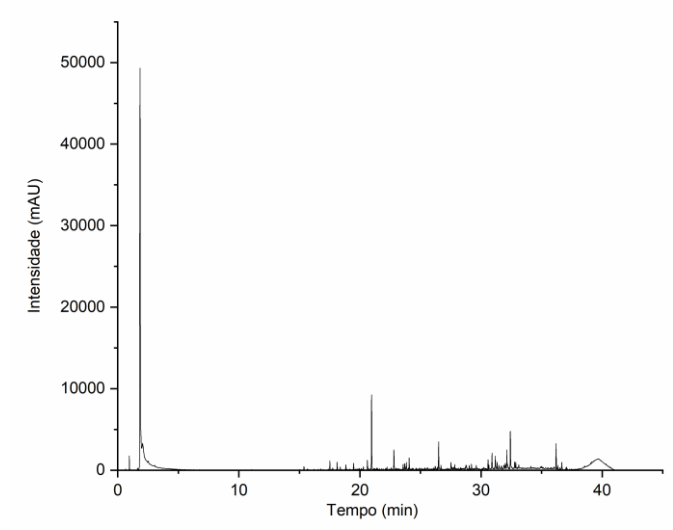
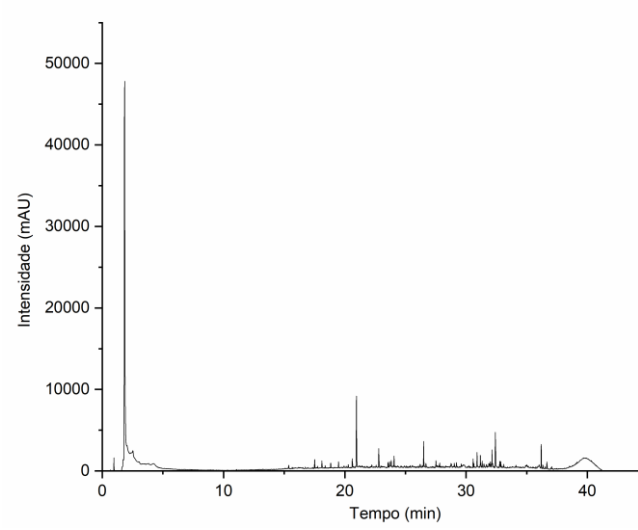
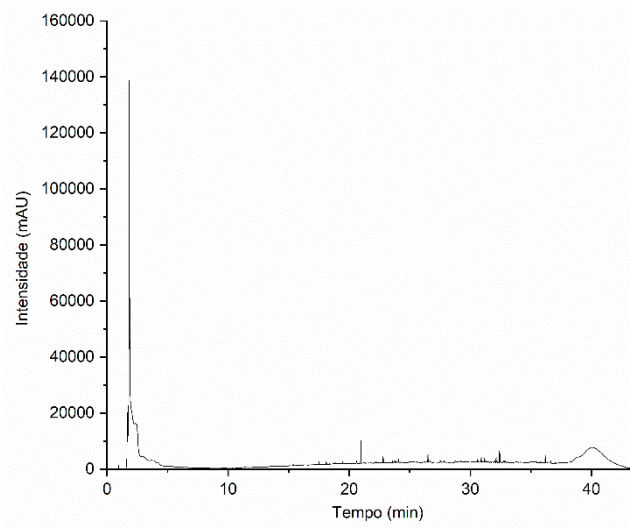
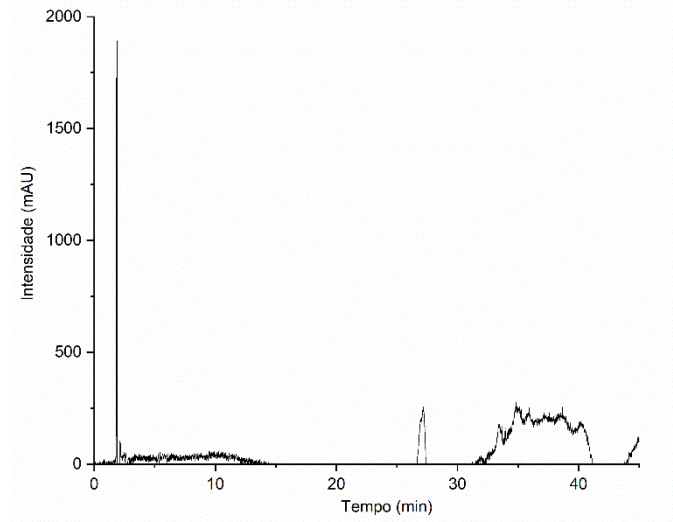
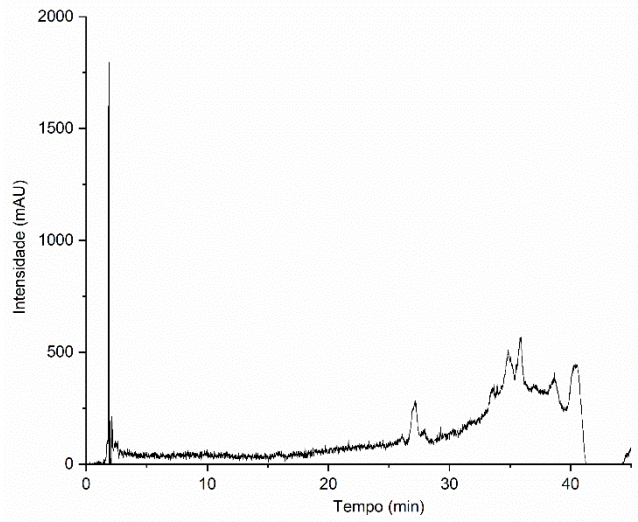
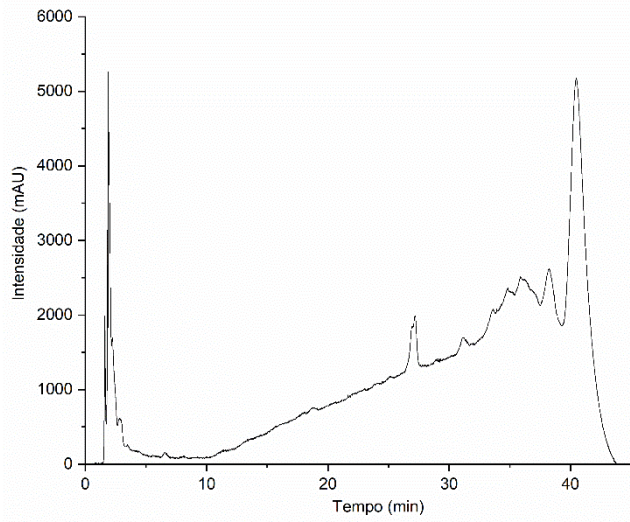
5.1.3 Análise por HPLC-PDA

Os extratos foram analisados em três comprimentos de ondas diferentes, sendo eles 270nm, 324nm e 373nm. Os cromatogramas dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas *Sargassum vulgare*, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia*, *Padina gymnospora*, *Bryopsis pennata* e *Gracilaria cervicornis* estão representados na Figura 9.

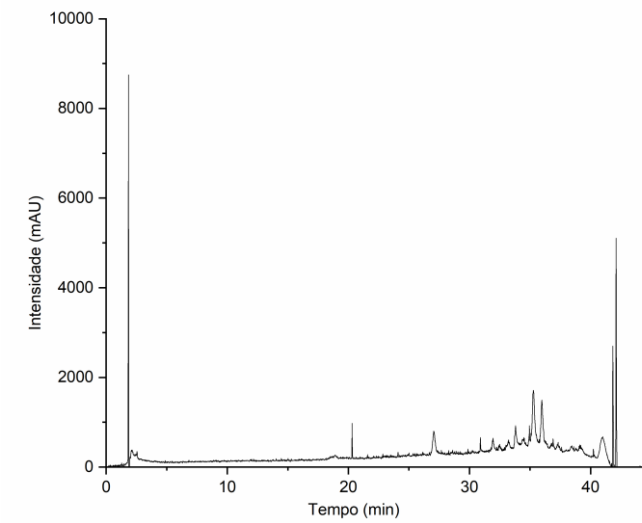
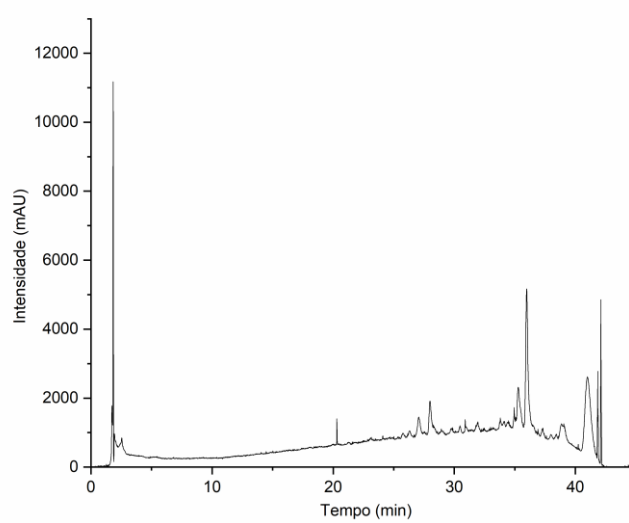
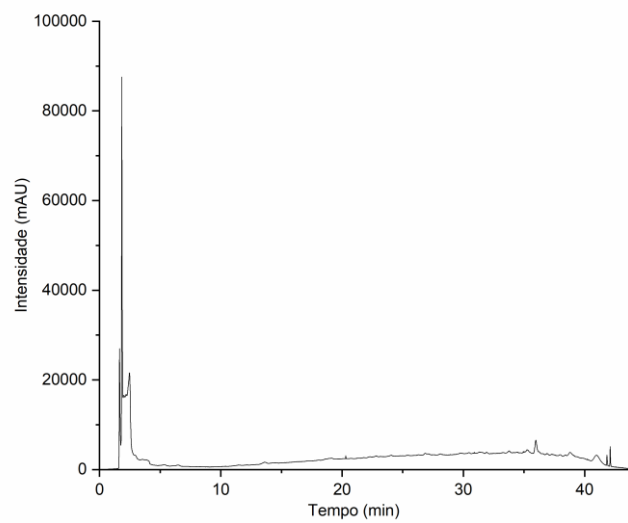
Figura 9 – HPLC-PDA dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas *Sargassum vulgare*, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia*, *Padina gymnospora*, *Bryopsis pennata* e *Gracilaria cervicornis* avaliados nos comprimentos de onda 270, 324 e 373nm.



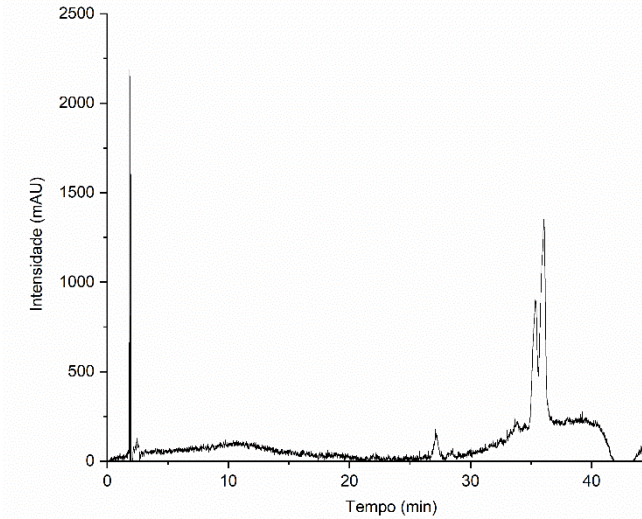
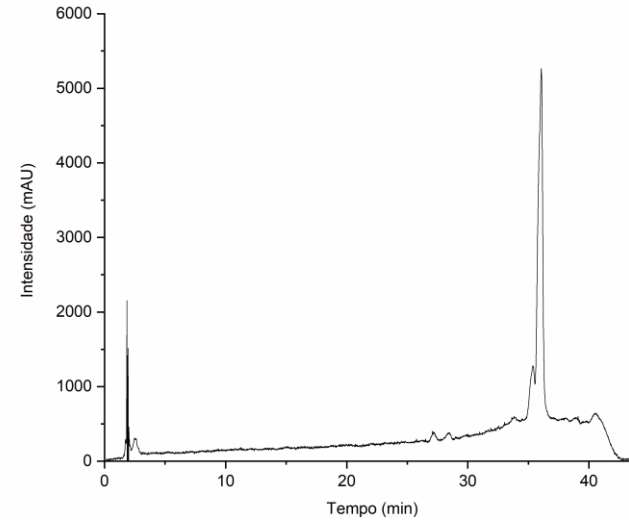
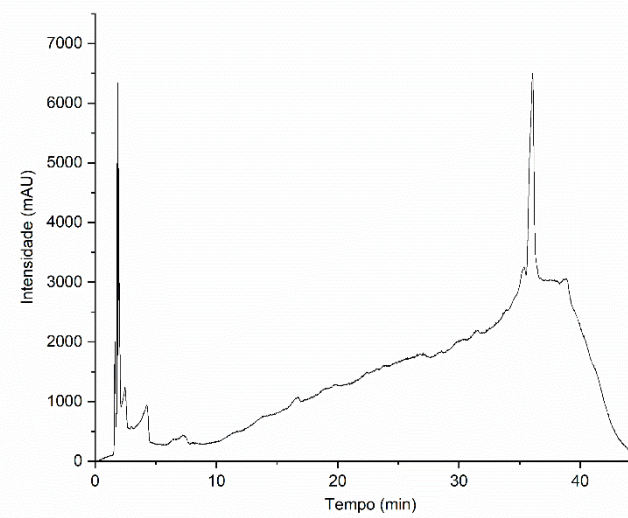
Hidroalcoólico

*C. sertularioides*
Aquoso

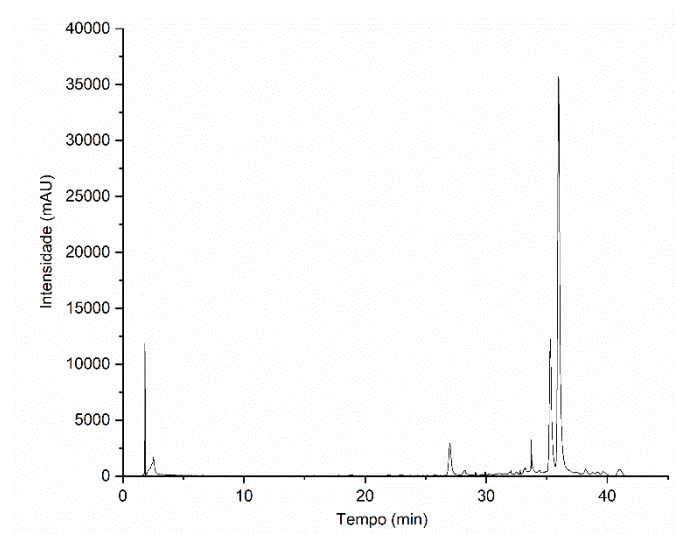
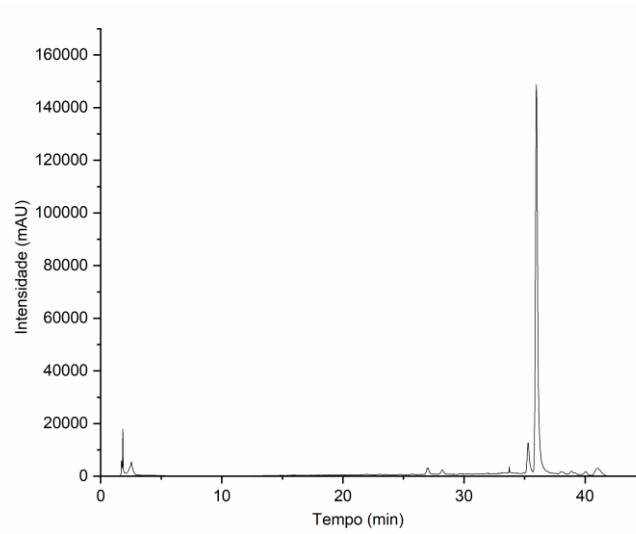
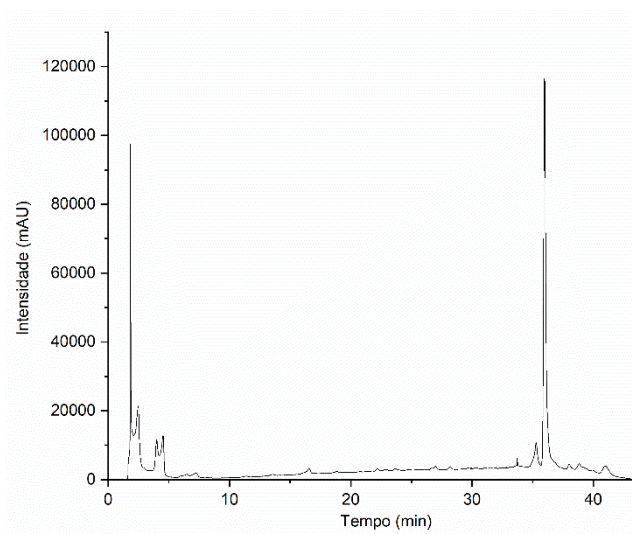
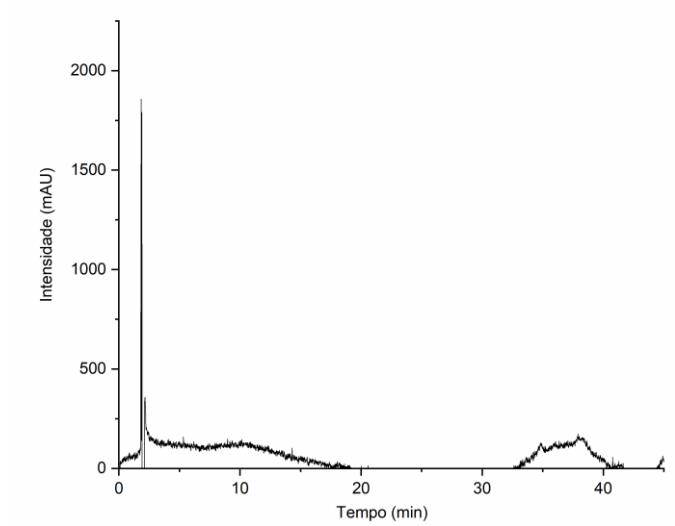
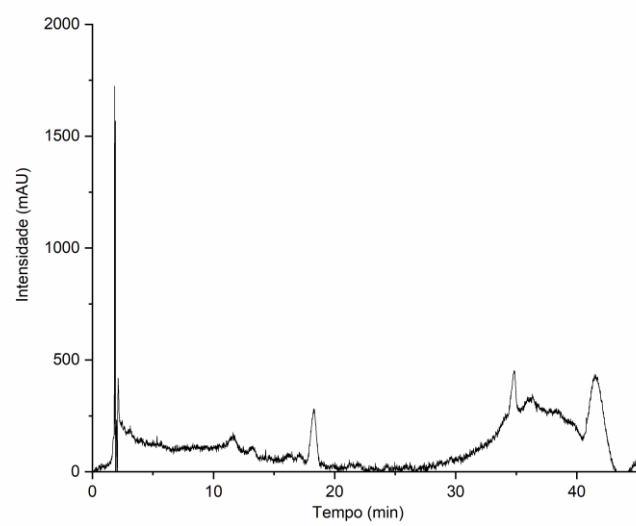
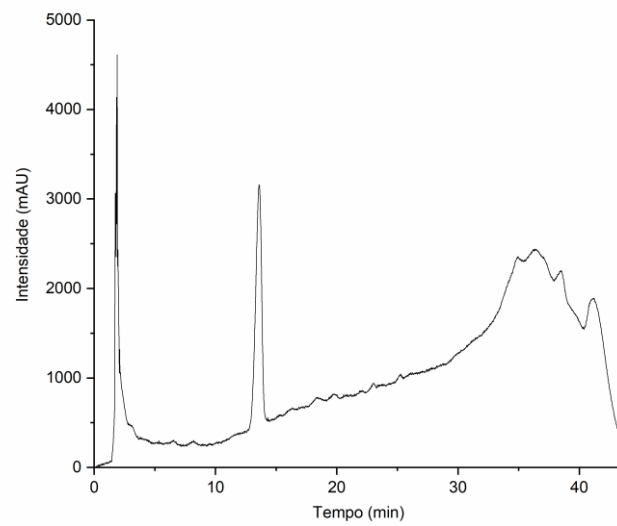
Hidroalcolico

*C. chemnitzia*

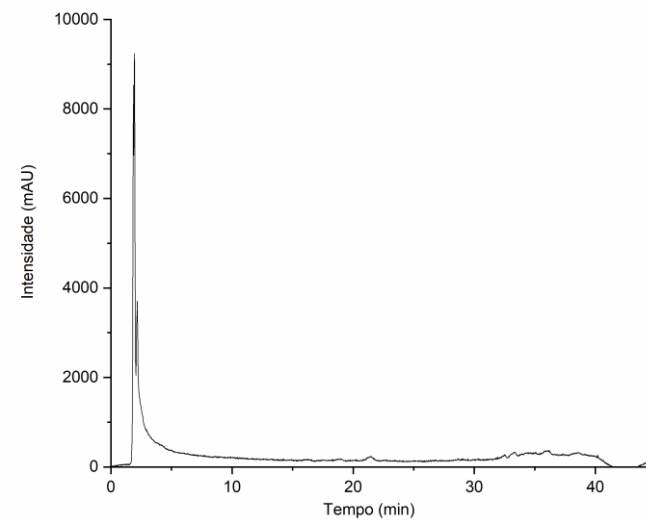
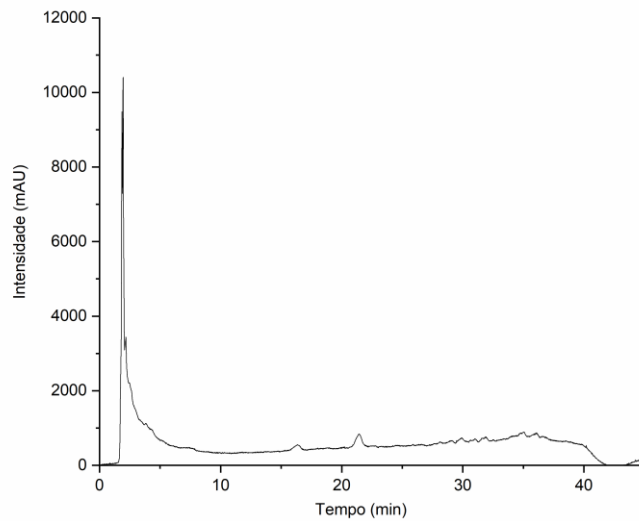
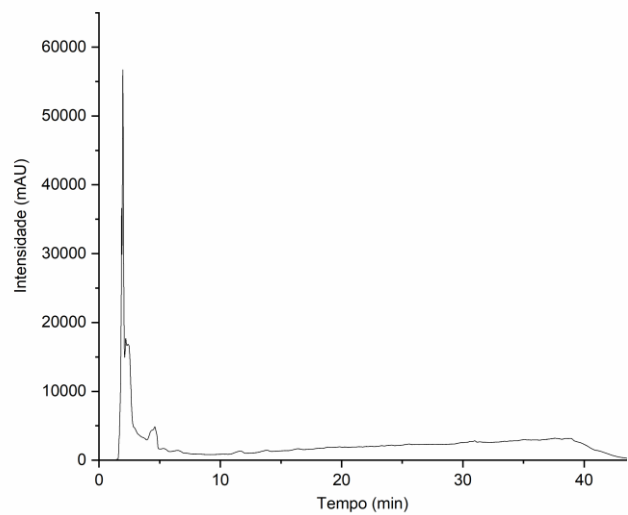
Aquoso



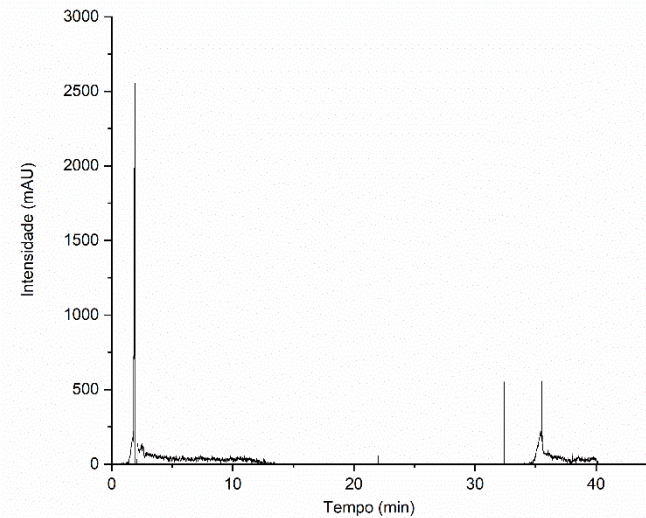
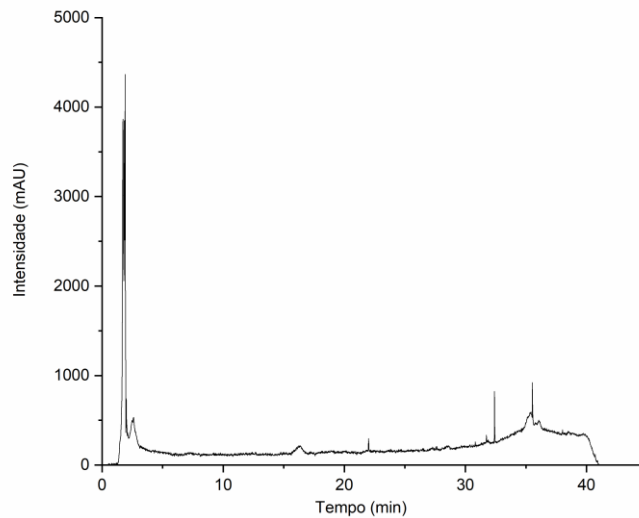
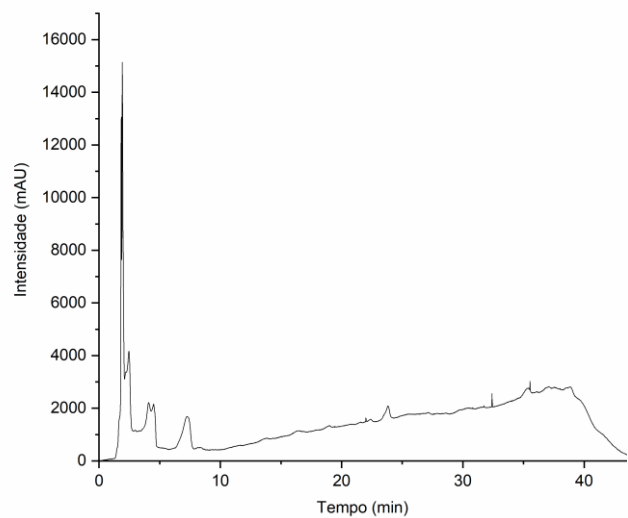
Hidroalcoólico

*P. gymnospora*
Aquoso

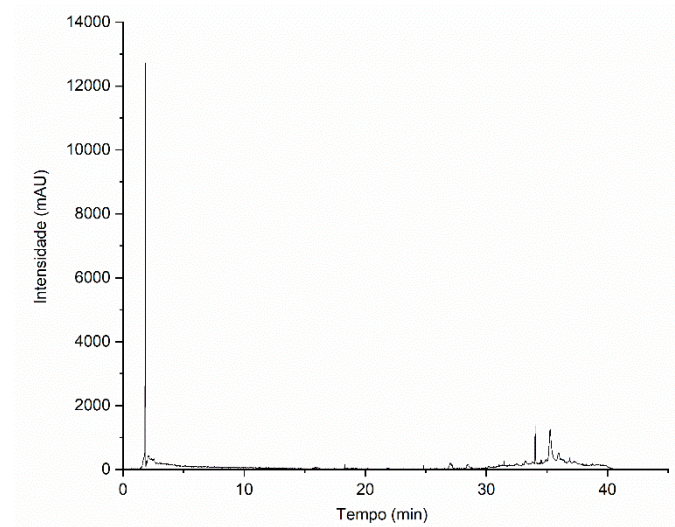
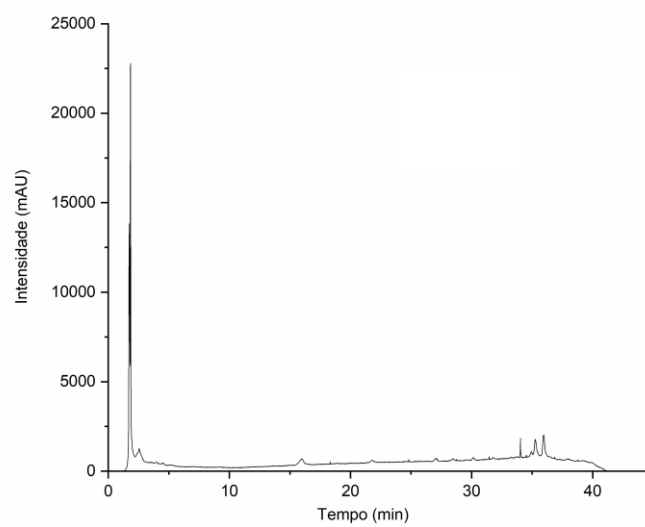
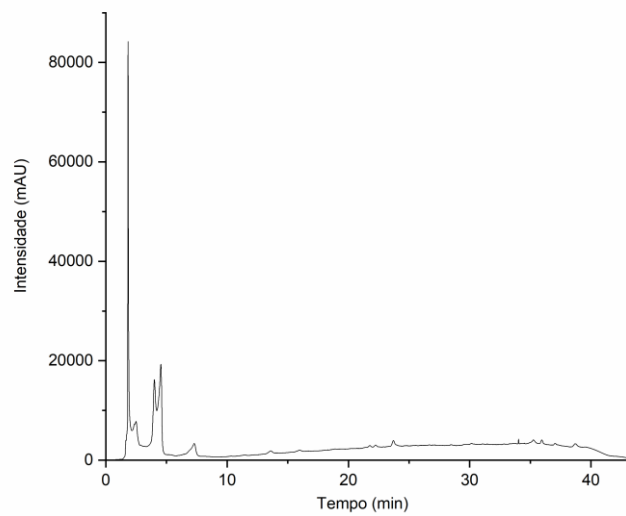
Hidroalcolico



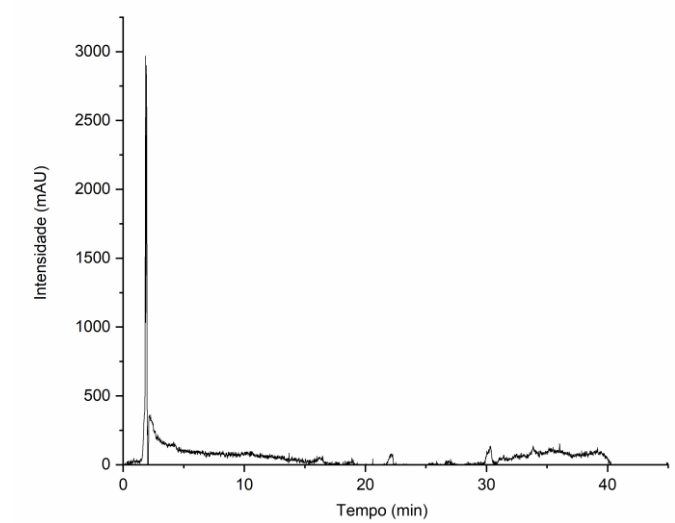
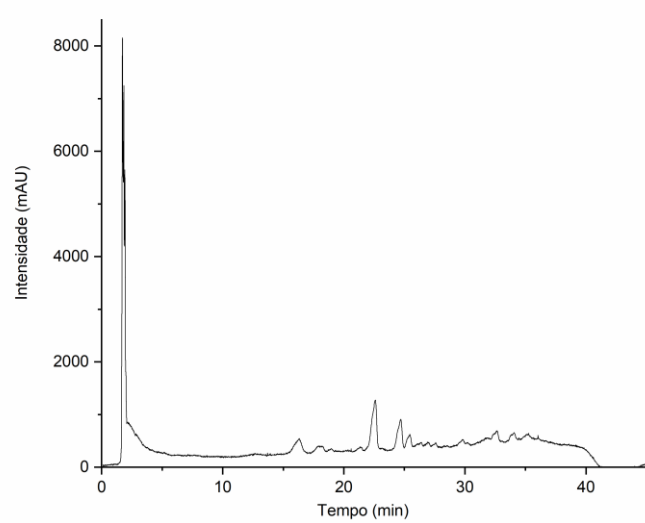
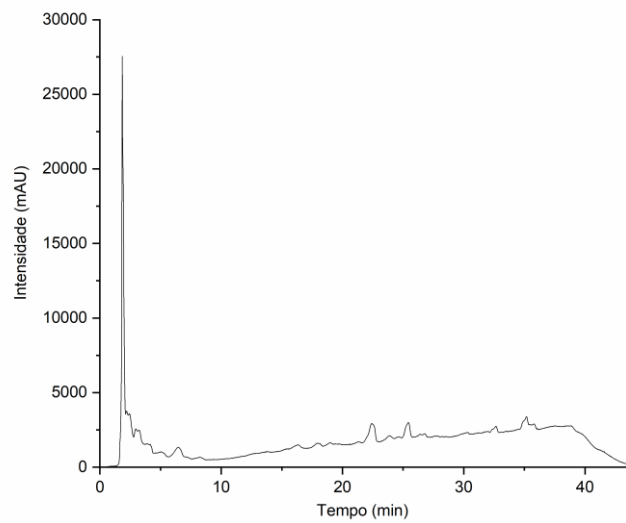
B. pennata
Aquoso



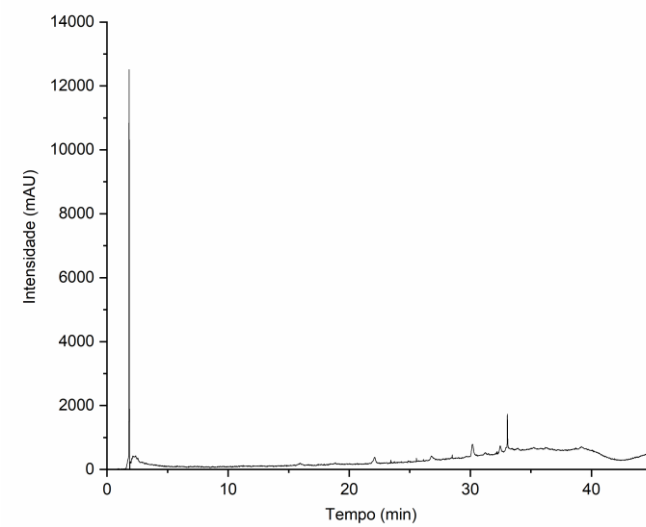
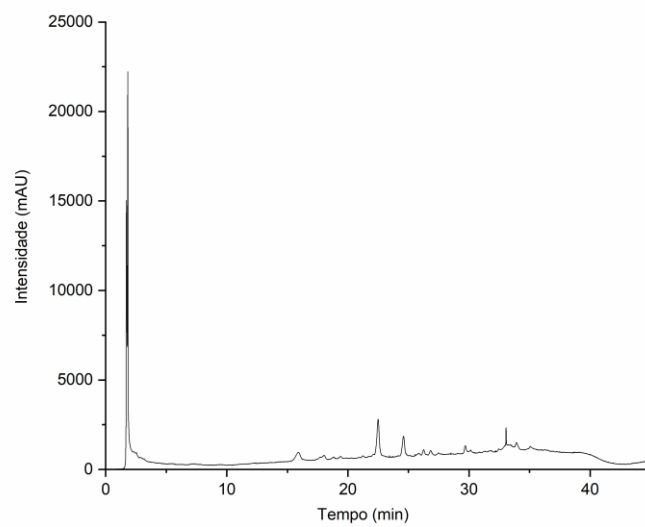
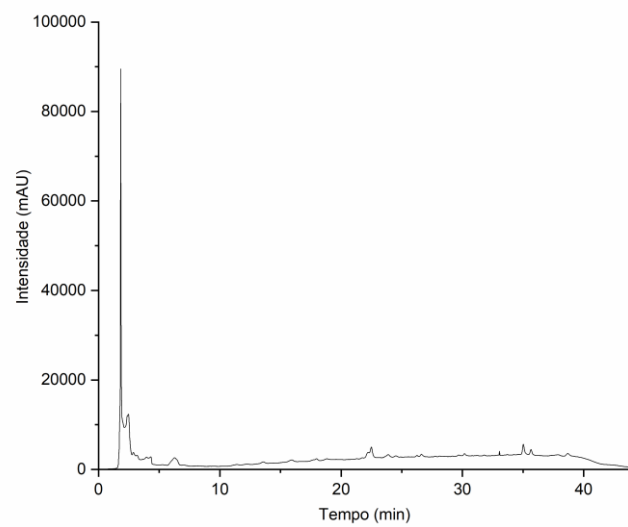
Hidroalcoólico

*G. cervicornis*

Aquoso



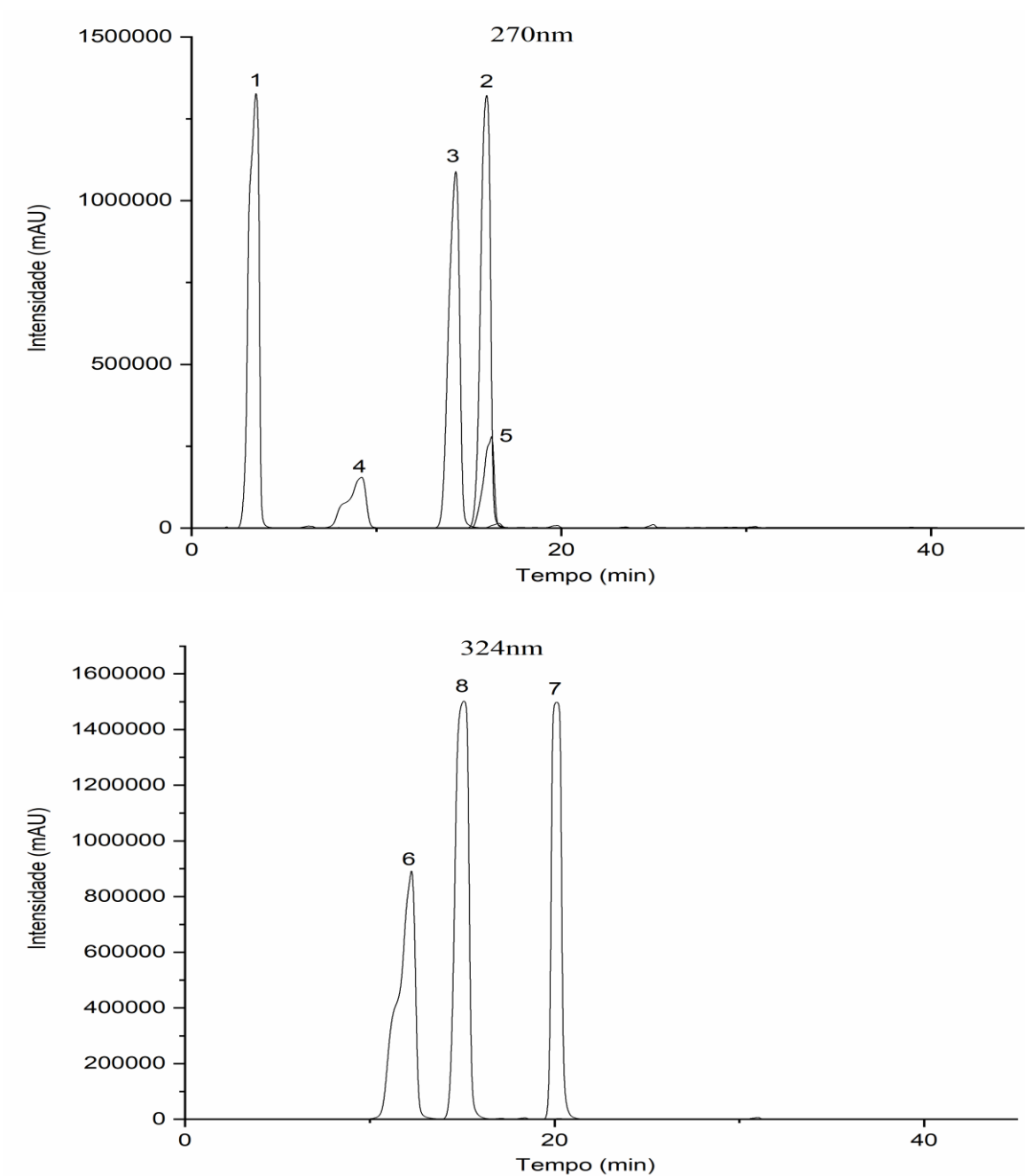
Hidroalcoólico

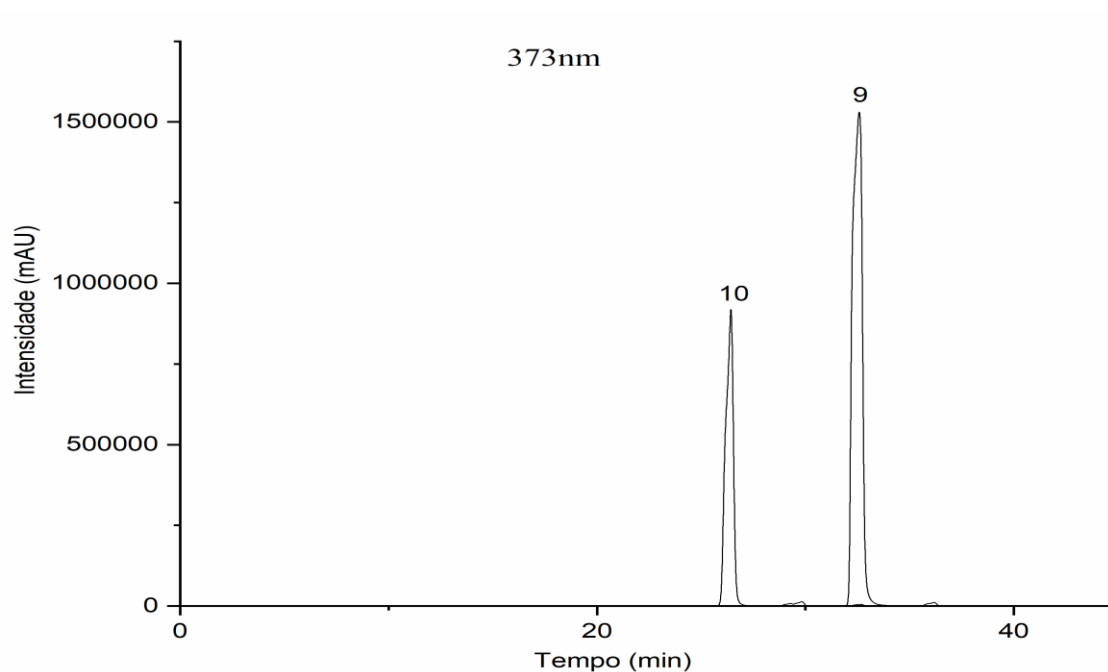


Fonte: Autor, 2024.

Os cromatogramas dos padrões ácido gálico (270nm), quercetina (373nm), rutina (373nm), epicatequina (270nm), ácido cafeico (324nm), catequina (270nm), ácido vanílico (270nm), ácido clorogênico (324nm), ácido sirínico (270nm) e ácido p-cumárico (324nm) na concentração de 1 mg/mL estão representados na Figura 10.

Figura 10 - Cromatogramas de HPLC dos padrões: 270nm: 1 = ácido gálico, 2 = ácido sirínico, 3 = ácido vanílico, 4 = catequina e 5 = epicatequina; 324nm: 6 = ácido clorogênico, 7 = ácido p-cumárico, 8 = ácido cafeico; e 373nm: 9 = quercetina e 10 = rutina.





Fonte: Autor, 2024.

Através da análise do detector de arranjo de fotodiodos (PDA) foi possível ter um levantamento dos tempos de retenção mais significativos dos extratos das algas marinhas nos três comprimentos de onda (270nm, 324nm e 373nm) apresentados na Tabela 5, bem como a equação de regressão e coeficiente de correlação dos padrões analíticos na Tabela 6 e a sua quantificação na Tabela 7.

Tabela 5 - Relação de comprimento de onda, tempo de retenção prováveis compostos encontrados nos extratos de algas marinhas diluídos em metanol (1mg/mL) por HPLC-PDA.

Amostra	λ (nm)	RT (min)	Área (%)		Provável Composto
			Aquoso	Hidroalcolólico	
<i>Sargassum vulgare</i>	270	3.67±0.05	100	100	ácido gálico
		1.84	4	-	n.i.
	324	1.92	4	-	n.i.
		2.13	5	-	n.i.
		4.17	9	-	n.i.
		35.84	78	-	n.i.
373	26.49	-	100	rutina	
<i>Caulerpa sertularioides</i>	270	2.34	2	-	n.i.
		3.53	-	9	ácido gálico
		13.61	-	91	ácido vanílico
		26.91	2	-	n.i.
		27.17	3	-	n.i.

		38.26	8	-	n.i.
		40.47	85	-	n.i.
	324	1.71	9	-	n.i.
		1.83	37	-	n.i.
		1.97	19	-	n.i.
		2.13	10	-	n.i.
		34.82	11	-	n.i.
		35.89	15	-	n.i.
	373	1.83	41	-	n.i.
		2.01	12	-	n.i.
		2.14	6	-	n.i.
		27.04±0.12	31	77	rutina
		32.67±1.03	6	23	quercetina
		34.82	4	-	n.i.
<i>Caulerpa chemnitzia</i>	270	3.99	-	100	ácido gálico
		4.25	100	-	ácido gálico
		1.74	2	-	n.i.
		1.84	4	-	n.i.
		1.93	3	-	n.i.
		2.01	3	-	n.i.
		2.10	2	-	n.i.
		2.47	9	-	n.i.
		35.38	9	-	n.i.
		36.06	67	-	n.i.
		1.69	2	-	n.i.
		1.85	10	-	n.i.
		1.93	7	-	n.i.
		2.16	10	-	n.i.
		2.47	9	-	n.i.
		2.61	2	-	n.i.
		27.03±0.05	2	96	rutina
		32.47	-	4	quercetina
		35.35	22	-	n.i.
		36.06	36	-	n.i.
	2.35	4	-	n.i.	
	4.60	-	100	n.i.	
	13.59	96	-	ácido vanílico	
	1.77	9	22	n.i.	
	1.83	24	-	n.i.	
	1.96	14	28	n.i.	
	2.15	21	20	n.i.	
	2.46	7	21	n.i.	
	3.35	1	-	n.i.	
	3.48	0,47	-	n.i.	
	18.31	16	-	n.i.	
	21.43	-	4	n.i.	
	34.80	8	-	n.i.	
<i>Padina gymnospora</i>		1.83	61	-	n.i.
		2.01	22	-	n.i.
		2.15	18	-	n.i.
		30.59	-	0,46	n.i.
		30.99	-	0,46	n.i.
		31.53	-	1	n.i.
		31.82	-	1	n.i.
		35.06	-	1	n.i.
		32.49	-	100	quercetina

<i>Bryopsis pennata</i>	270	4.32±0.31	100	100	ácido gálico
		1.72	38	-	n.i.
		1.83	14	-	n.i.
		1.90	24	-	n.i.
		2.46	8	-	n.i.
	324	2.58	8	-	n.i.
		32.39	1	-	n.i.
		34.96	3	-	n.i.
		35.41	3	-	n.i.
		35.53	1	-	n.i.
	373	27.03	-	86	rutina
		32.43±0.06	100	14	quercetina
<i>Gracilaria cervicornis</i>	270	3.64±0.95	100	-	ácido gálico
		1.72	23	-	n.i.
		1.83	15	-	n.i.
		1.91	16	-	n.i.
		2.13	2	-	n.i.
		2.27	2	-	n.i.
		2.36	2	-	n.i.
		2.46	2	-	n.i.
		2.55	1	-	n.i.
		2.62	2	-	n.i.
		2.84	1	-	n.i.
	324	2.92	1	-	n.i.
		3.06	1	-	n.i.
		3.15	1	-	n.i.
		16.32	4	-	n.i.
		22.61	12	-	n.i.
		24.71	7	-	n.i.
		25.27	1	-	n.i.
		25.45	2	-	n.i.
		32.28	1	-	n.i.
	32.67	1	-	n.i.	
	33.76	1	-	n.i.	
	34.05	1	-	n.i.	
	373	26.77	-	100	rutina

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 6 - Relação de comprimento de onda, tempo de retenção, equação de regressão e coeficiente de correlação encontrados nos padrões diluídos em metanol (1mg/mL) por HPLC-PDA.

Padrão	λ (nm)	Tempo de Retenção (RT) (min)	Equação de regressão	Coefficiente de correlação (r^2)
ácido gálico	270	3.48	$y = 51952x + 1E+06$	0,9927
quercetina	373	32.57	$y = 1334.4x - 1.334$	0.9992
rutina	373	26.41	$y = 487.09x - 0.8493$	0.9998
ácido vinílico	270	14.28	$y = 0.9786x + 7.4972$	0.9865

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 7 - Quantidades de polifenóis em extratos de algas *Sargassum vulgare*, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia*, *Padina gymnospora*, *Bryopsis pennata* e *Gracilaria cervicornis* determinadas por análise de HPLC-PDA

Amostra		Padrão analítico/extrato (mg/mg)			
		ácido gálico	quercetina	rutina	ácido vanílico
<i>Sargassum vulgare</i>	Aquoso	0.01921	-	-	-
	Hidroalcóolico	0.01922	-	0.02869	-
<i>Caulerpa sertularioides</i>	Aquoso	-	0.00241	0.02691	-
	Hidroalcóolico	0.01924	0.00232	0.02847	0.001
<i>Caulerpa chemnitzia</i>	Aquoso	0.01888	-	0.02983	-
	Hidroalcóolico	0.01860	0.00226	0.02120	-
<i>Padina gymnospora</i>	Aquoso	-	-	0.10122	0.087
	Hidroalcóolico	0.01764	0.00122	-	-
<i>Bryopsis pennata</i>	Aquoso	0.01813	0.00181	-	-
	Hidroalcóolico	0.00924	0.00130	-	-
<i>Gracilaria cervicornis</i>	Aquoso	0.01887	-	0.02226	-
	Hidroalcóolico	0.01875	-	-	-

Fonte: Autor, 2024.

Através das análises dos picos mais representativos apresentados nos cromatogramas das amostras de extratos brutos aquosos e hidroalcóolicos das algas marinhas e comparando com os picos dos padrões avaliados, é possível visualizar uma semelhança nos tempos de retenção (Rt). O extrato aquoso da alga *Sargassum vulgare* apresenta um Rt 3.64min em 270nm muito próximo ao encontrado no padrão do ácido gálico e seu extrato hidroalcóolico apresenta um pico de 3.71min (ácido gálico) em 270nm e 26.49min (rutina) em 373nm. Para a alga *Caulerpa sertularioides*, o extrato aquoso apresentou Rt 26.92min (rutina) e 34.82min (quercetina) no comprimento de onda de 373nm, já o extrato hidroalcóolico apresentou Rt 3.53min (ácido gálico) e 13.61min (ácido vanílico) em 270nm, 27.04min (rutina) e 31.94min (quercetina) e 33.40min (Quercetina) em 373nm. O extrato aquoso de *Caulerpa chemnitzia* demonstrou Rt 4.25min (ácido Gálico) em 270nm e 27.07 (rutina) em 373nm, já o extrato hidroalcóolico, apresentou Rt 3.99min (ácido Gálico) em 270nm e 27.00min (rutina) e 32.47min (quercetina) em 373nm. Em *Padina gymnospora*, apresentou Rt 13.59 (ácido vanílico) em 270nm, já no extrato hidroalcóolico apresentou Rt 32.49min (quercetina) em 373nm. *Bryopsis pennata* apresentou em seu extrato aquoso Rt 4.10min (ácido gálico) em 270nm e 32.39min (quercetina) em 373nm, no extrato hidroalcóolico foi encontrado Rt 4.54min (ácido Gálico) em 270nm e 27.03min (Rutina) e 32.47min (quercetina) em 373nm. A alga *Gracilaria cervicornis* apresentou Rt 2.97min (ácido gálico) em 270nm em seu extrato aquoso, já no hidroalcóolico apresentou Rt em 4.31min (ácido gálico) em 270nm e

26.77min (rutina) em 373nm. Em conjunto, esses dados são úteis para um melhor entendimento sobre o processo de formação das nanopartículas de prata a partir do Nitrato de Prata (AgNO_3) pelo método de 'síntese verde', uma vez que, de acordo com a literatura, os polifenóis estão diretamente relacionados com o processo de redução e estabilização das nanopartículas de prata por esse método de síntese (KALIMUTHU, K. *et al.*, 2017; MURUGAN, Kadarkarai *et al.*, 2016; SHETTY, P. *et al.*, 2014).

Assim como demonstrado no presente estudo, López, Rico *et al.* (2011) analisaram a composição química de extratos da alga marinha *Stypocaulon scoparium* também encontraram picos cromatográficos referentes ao ácido gálico (Rt: 5.3 min) em 270nm, rutina (Rt: 28.1 min) em 373nm e quercetina (Rt: 34.6 min) em 373nm. Ainda em López, Rico *et al.* (2011) foi observado que a solubilidade dos polifenóis muda com a polaridade do solvente, assim como encontrado no presente trabalho, os quais a presença de picos correspondentes a classes de compostos fenólicos (ácido gálico e ácido vanílico) e flavonoides (rutina e quercetina) foram encontrados e caracterizados com predominância nos extratos hidroalcóolicos. Ademais, os compostos fenólicos já foram relatados com grande capacidade de redução de íons de prata, resultando na formação, capeamento e estabilidade das AgNPs (EDISON, T. J. I.; SETHURAMAN, M. G., 2012; MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G. A. *et al.*, 2008; WANG, W. *et al.*, 2007)

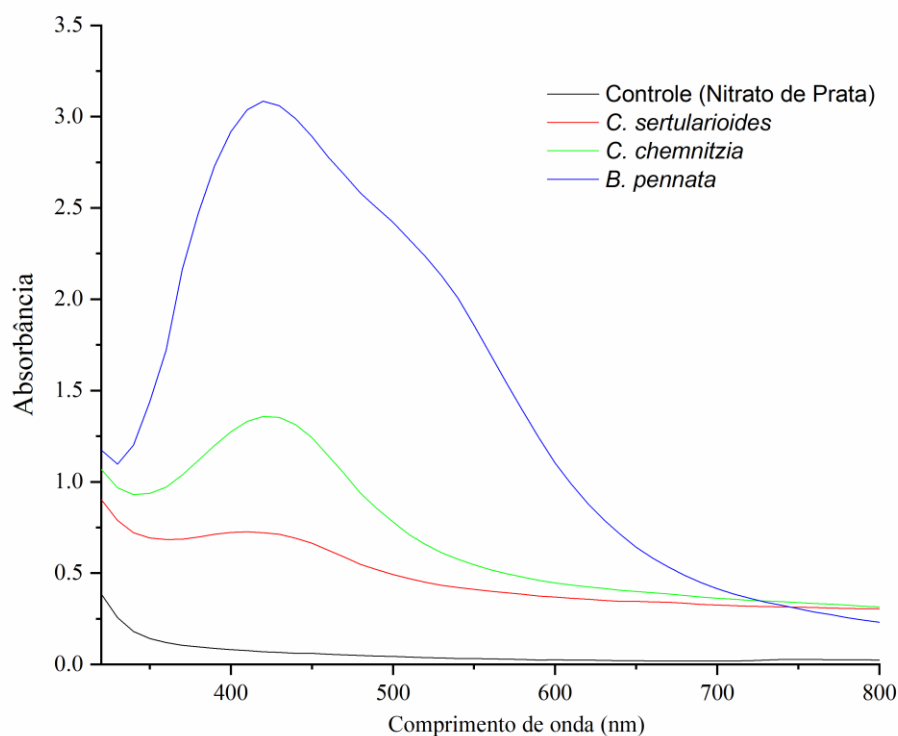
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS) SINTETIZADAS POR SÍNTESE VERDE.

Após a caracterização e análise química dos extratos brutos aquosos e hidroalcóolicos das espécies de algas marinhas, foram selecionados os extratos das algas *C. sertularioides*, *C. chemnitzia* e *B. pennata* para a síntese das nanopartículas de prata (AgNPs) através do método 'síntese-verde'.

5.2.1 Análise do pico RPS por absorvância por UV-visível

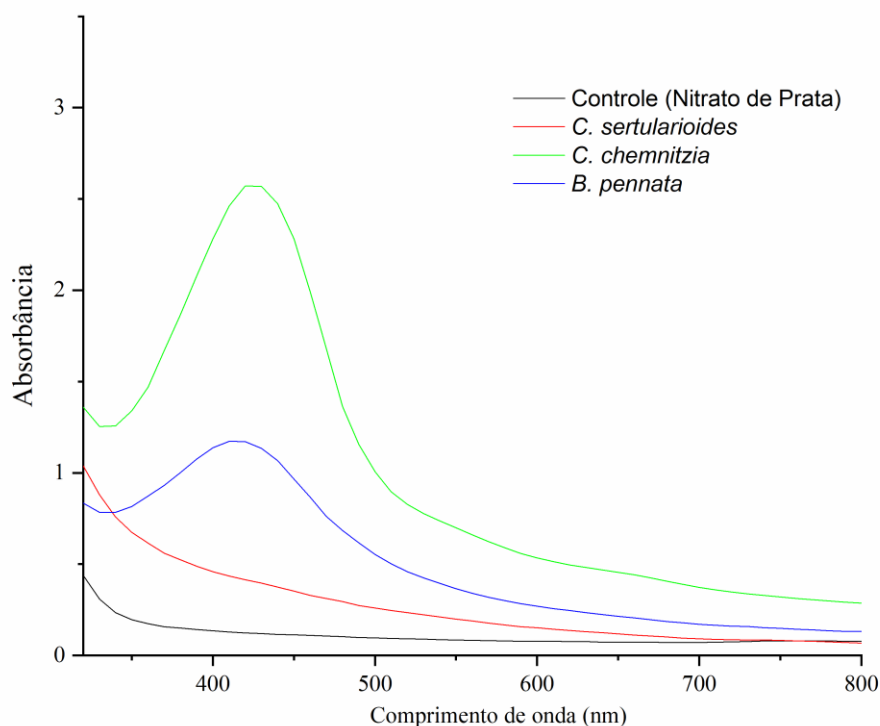
As reações de biossíntese de nanopartículas de prata foram avaliadas através de varredura por espectrofotometria por UV-vis, após a síntese, no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 800 nm. Os resultados das análises por espectrofotometria por UV-vis são apresentados na Figura 11 e 12, os quais são apresentados picos no intervalo entre 400-450 em todas as sínteses devido à sua ressonância plasmônica de superfície (RPS), por outro lado, o controle de AgNO_3 (10mM) não apresentou picos de absorção característicos.

Figura 11 - Espectros UV-Vis de nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos das algas marinhas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*



Fonte: Autor, 2024.

Figura 12 - Espectros UV-Vis de nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos hidroalcoólicos das algas marinhas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*.



Fonte: Autor, 2024.

Esses comprimentos de onda distintos podem ser devidos às diferenças no tamanho das nanopartículas ou a diferenças nos agentes de capeamento dos extratos (GONZÁLEZ-BALLESTEROS, N. *et al.*, 2019). Os valores encontrados se assemelham com os valores encontrados por Rajasekar *et al.*(2020), Princy & Gopinath (2021) e Princy, Holaday, & Gopinath (2021), os quais demonstraram que as produções de AgNPs por síntese verde utilizando algas verde apresentaram picos em 427, 410 e 414 nm, respectivamente, indicando a presença de ressonância plasmônica de superfície (RPS), e que podem indicar também a presença de nanopartículas de formato esférico na solução, sendo necessária a confirmação por outras técnicas de caracterização.

5.2.2 Determinação do tamanho hidrodinâmico de partículas, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta.

5.2.2.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

DLS (*Dynamic Light Scattering*) é um método comumente utilizado para determinar o diâmetro hidrodinâmico, e a carga superficial de nanopartículas metálicas é medido pela técnica de mobilidade eletroforética (CAPUTO, F. *et al.*, 2019; SHANMUGANATHAN, R. *et al.*, 2023).

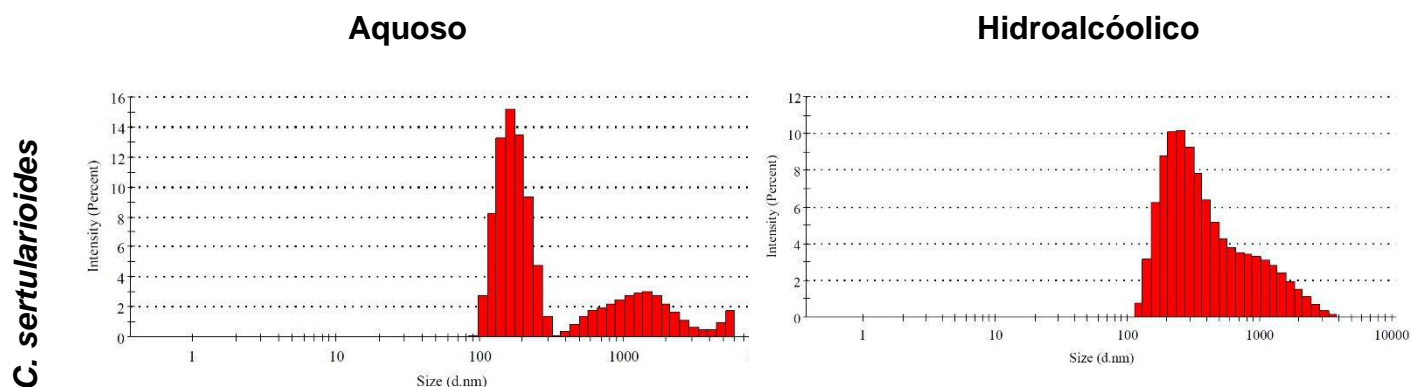
Os valores das difrações expostas pelas nanopartículas de prata (AgNPs), obtidos pela técnica de DLS em mistura polidispersa, estão descritas na tabela 8, bem como os valores do Índice de Polidispersão (Pdl). Adicionalmente, a distribuição do tamanho de partículas está apresentada em forma de histogramas na figura 13.

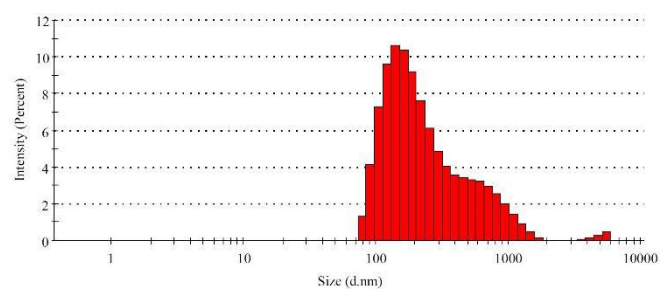
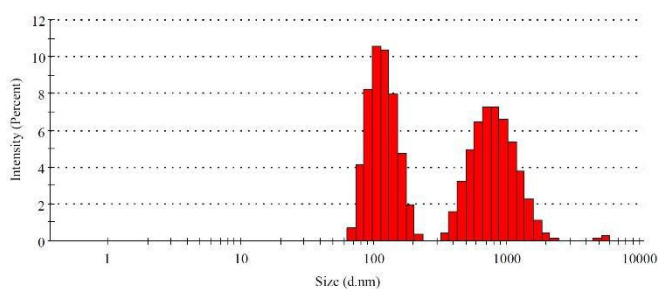
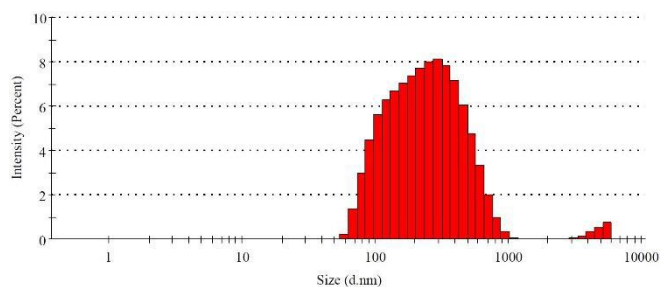
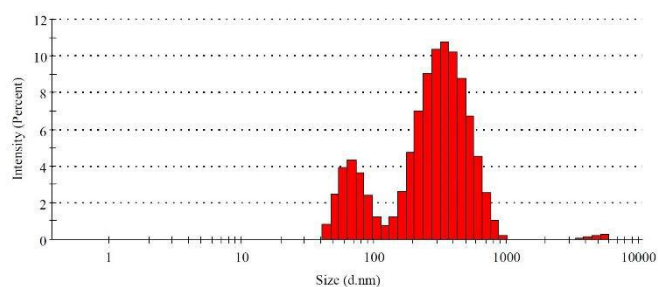
Tabela 8 - Dados obtidos por análise de tamanho (size) e índice de polidispersão (Pdl), pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde utilizando os extratos brutos aquosos e hidroalcóolicos das algas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*.

Amostra	Z-average (d.nm)		Pdl	
	Aquosa	Hidroalcóolica	Aquosa	Hidroalcóolica
<i>C. sertularioides</i>	249,5	323,0	0,443	0,261
<i>C. chemnitzia</i>	213,5	198,4	0,470	0,263
<i>B. pennata</i>	202,3	207,3	0,437	0,272

* Diferenças dos valores encontrados pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).
Fonte: Autor, 2024.

Figura 13 - Representação da distribuição das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde utilizando os extratos brutos aquosos e hidroalcóolicos das algas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*.



C. chemnitzia**B. pennata**

Fonte: Autor, 2024.

Os valores de potencial zeta representam a estabilidade das nanomateriais e a diferença entre a carga de superfície da partícula no plano de deslizamento, de forma que o alto valor, positivo ou negativo (em módulo) da amostra, demonstra a repulsão entre as partículas conferindo estabilidade a longo prazo (ANJALI, R. *et al.*, 2022; LAVAKUMAR, V. *et al.*, 2015).

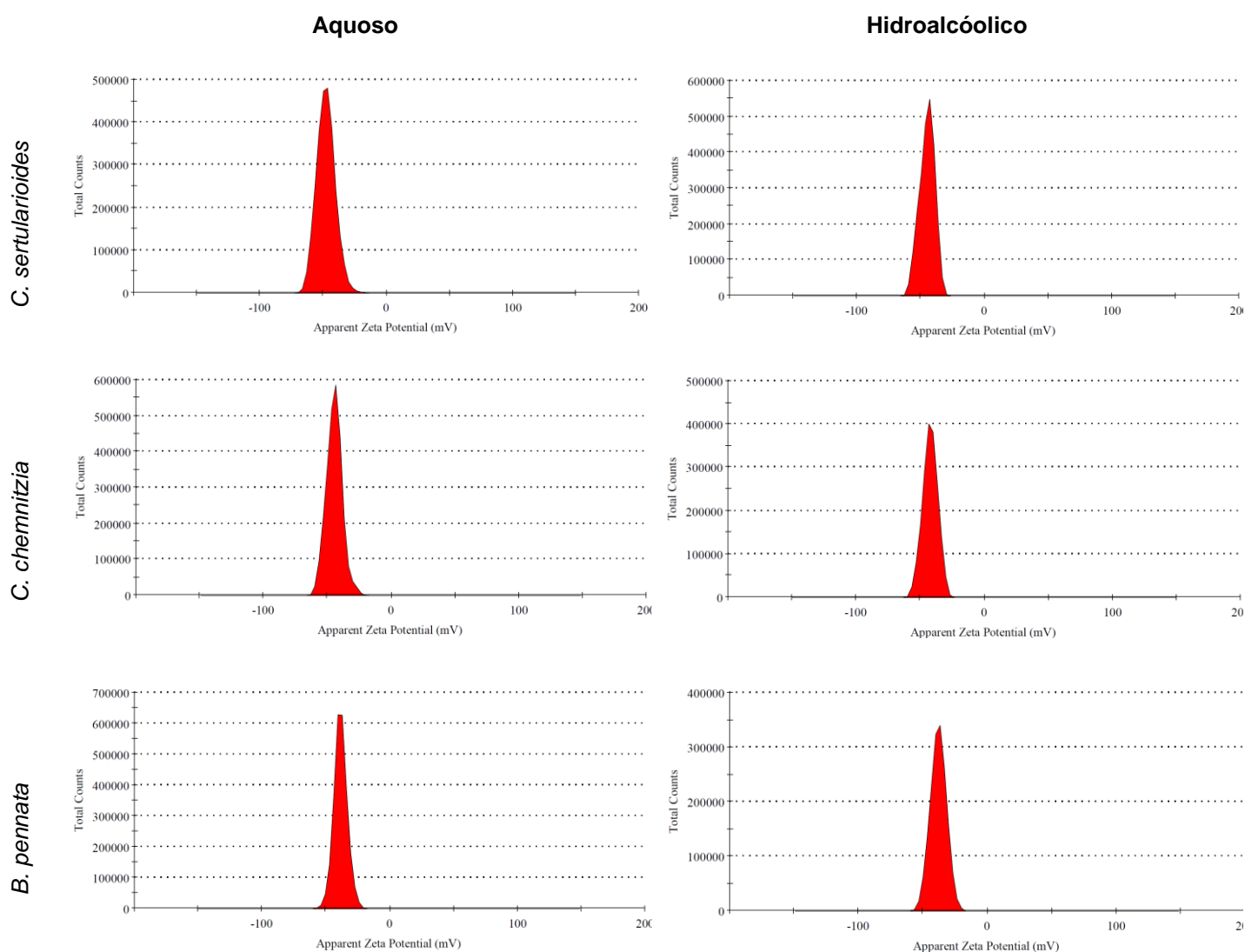
Os valores do potencial zeta encontrados para as AgNPs estão apresentados na Tabela 9 e representados graficamente na Figura 14.

Tabela 9 - Potencial Zeta das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde utilizando os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*.

Amostra	Zeta Potential (mV)	
	Aquosa	Hidroalcoólica
<i>C. sertularioides</i>	-47,8	-44,9
<i>C. chemnitzia</i>	-44,5	-42,2
<i>B. pennata</i>	-38,6	-38,7

Fonte: Autor, 2024.

Figura 14. Representação do Potencial Zeta das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde utilizando os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*.



Fonte: Autor, 2024.

A presença de múltiplos picos de dimensão de partícula, encontrados na figura 14, provavelmente é devido as diferenças de tamanho encontrada nas partículas sintetizadas (ANJALI, R. et al., 2022; SINGH, H. et al., 2018). Foram encontradas nanopartículas com tamanhos variando entre 198,4 – 323,0, bem como os valores do Índice de Polidispersão (Pdl), variando de 0,261 - 0,470 (Tabela 9).

Todas as suspensões obtidas apresentaram potencial zeta carregados negativamente em meio aquoso, com valores variando entre -38,7 e -47,8, o que pode se relacionar com moléculas orgânicas, como os grupamentos carboxílicos,

presentes nos extratos e nas nanopartículas avaliados pelas técnicas de físico-químicas (SHANMUGANATHAN, R. *et al.*, 2023; SLAVIN, Y. N. *et al.*, 2017).

5.2.2.2 Sedimentação por Centrifugação Diferencial (CPS Disc Centrifuge)

A sedimentação por Centrifugação Diferencial (Differential Centrifugal Sedimentation – DCS) é uma técnica simples que mede a distribuição de tamanho com base no tempo de sedimentação de uma partícula através de um gradiente de densidade de sacarose colocado em um disco giratório, de forma que as partículas irão se separar de acordo com o seu tamanho e densidade (PEREZ-POTTI, A. *et al.*, 2021). Esta técnica pode ser utilizada como complemento à técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). A DCS é uma técnica mais confiável para estudar o tamanho das partículas, pois esta técnica é menos afetada pela polidispersidade da amostra do que o DLS (SCHNEID, A. d. C. *et al.*, 2020).

Os tamanhos (nm) das partículas (AgNPs) e suas médias (nm) encontradas estão demonstradas na Tabela 10.

Tabela 10 - Tamanho (nm) das nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata* analisadas pela técnica de sedimentação centrífuga diferencial (DCS).

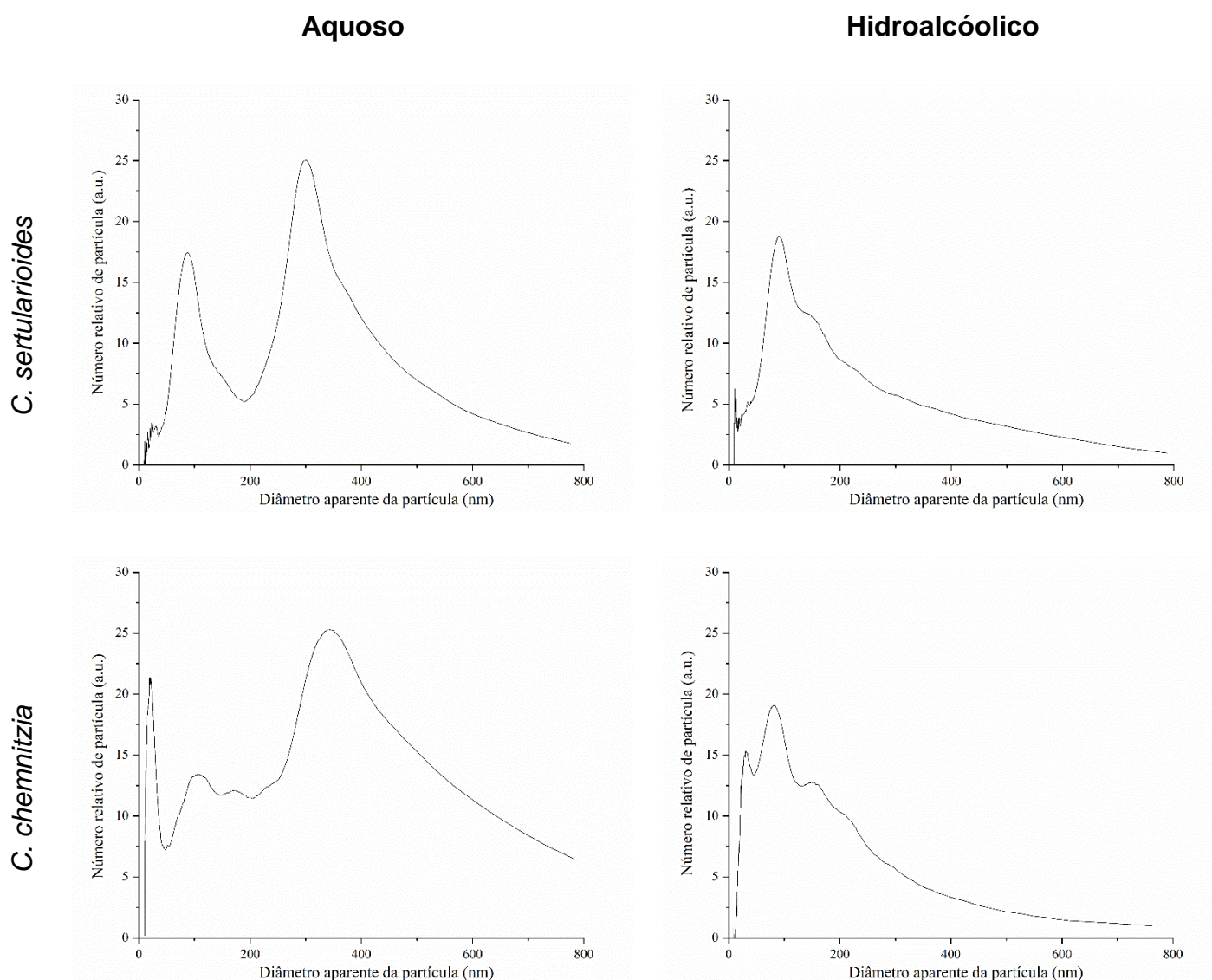
Amostras	Tamanho (nm)			
	Aquosa		Hidroalcoólica	
	Tamanho	Média	Tamanho	Média
<i>C. sertularioides</i>	87,68	193,84	11,08	50,47
	300		89,87	
<i>C. chemnitzia</i>	20,38	158,64	30,77	56,49
	112,31		82,21	
	343,22			
<i>B. pennata</i>	12,72	95,98	24,76	85,40
	101,09		74	
	174,14		157,45	

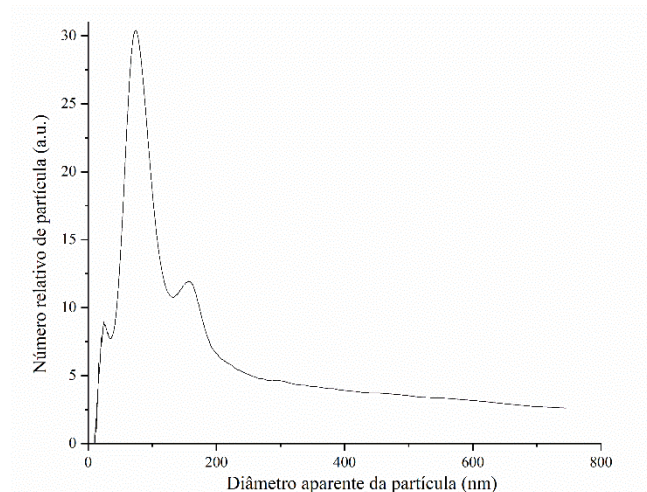
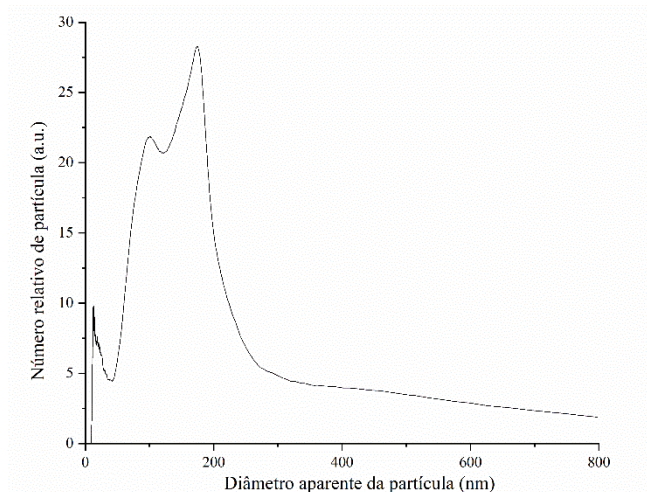
Fonte: Autor, 2024.

Para as amostras *C. sertularioides* (aquosas e hidroalcoólicas) e *C. chemnitzia* (hidroalcoólicas) foi observada uma distribuição de tamanho bimodal,

para as demais amostras foi observada uma distribuição de tamanho multimodal (Figura 15).

Figura 15 - Representação gráfica do diâmetro aparente das partículas (nm) pelo número relativo de partículas (au) pela técnica de sedimentação centrífuga diferencial (DCS) de nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcóolicos das algas marinhas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*.



B. pennata

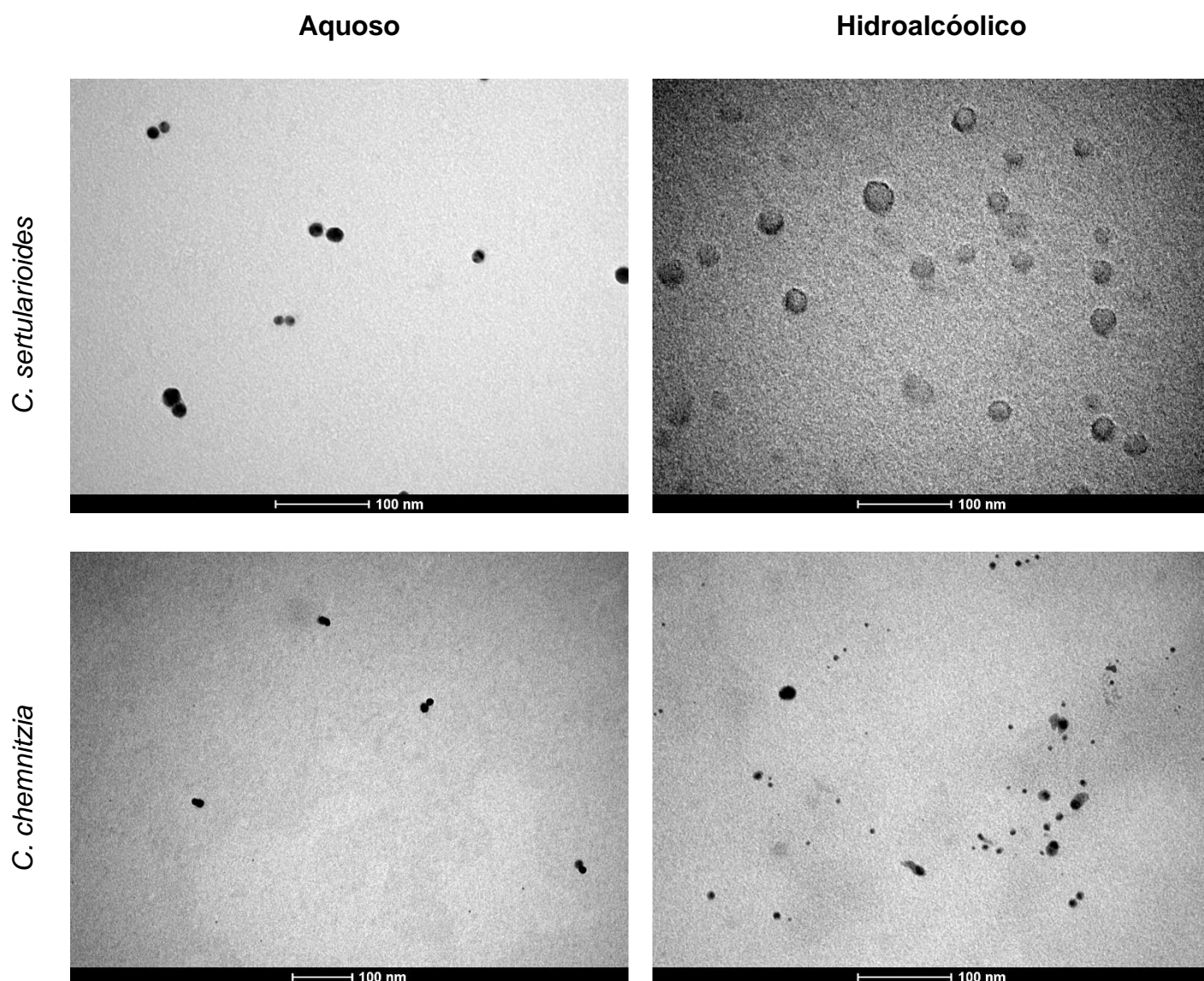
Fonte: Autor, 2024.

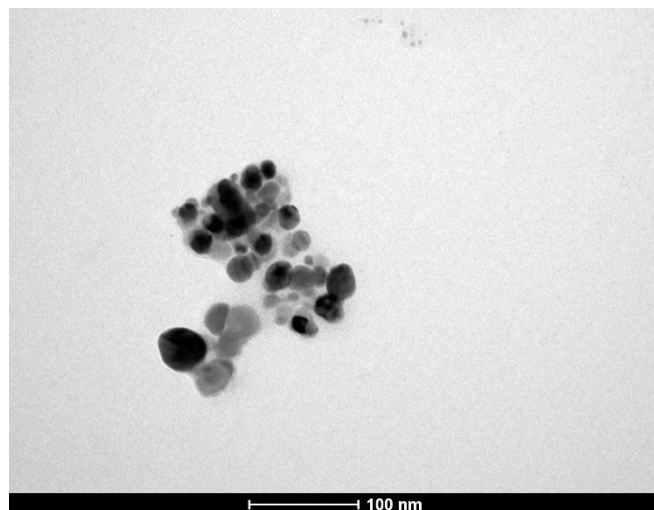
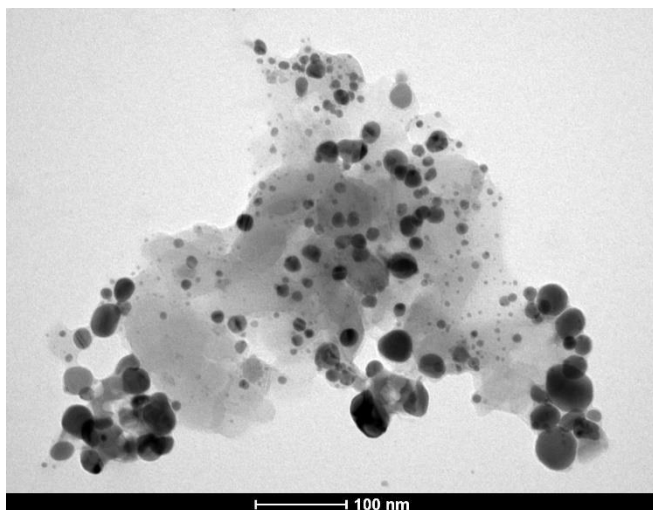
Cascio *et al.* (2015), em seu trabalho, detectaram e quantificaram o tamanho de nanopartículas de prata em produtos comercializados, e quando compararam técnicas como DLS e DCS, encontraram o mesmo padrão do presente estudo, de forma que em todos os produtos avaliados, as nanopartículas analisadas pela técnica de DCS, demonstraram um menor tamanho quando comparado com as leituras feitas por DLS. Ainda em Cascio *et al.* (2015), foram demonstrados que os tamanhos maiores encontrados pela técnica de DLS (além de um elevado PDI) quando comparado com os dados de DCS, se deram provavelmente pela número de agregações das nanopartículas, assim como proposto no presente estudo, demonstrando a importância da aplicação de múltiplas técnicas de caracterização a nível de complementação e entendimento das amostras estudadas.

5.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) é uma ferramenta poderosa para examinar nanopartículas, as quais o tamanho e a forma das nanopartículas podem ser bem documentados usando esta técnica (SHANMUGANATHAN, R. *et al.*, 2023; SMITH, D. J. J. N., 2015). Nessa perspectiva, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para identificar a morfologia das nanopartículas (Figura 16).

Figura 16 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) obtidas das nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*.



B. pennata

Fonte: Autor, 2024.

É possível se perceber a presença de NPs esféricas tanto isoladas quando agregadas, apresentando tamanhos inferiores a 100nm. Assim como apresentado por Edison *et al.* (2012), é possível a visualização material amorfo ao redor das AgNPs, podendo ser o capeamento por biomolécula presentes nos extratos das algas marinhas, responsáveis pela redução e estabilidade das NPsAg, o que pode explicar o maior tamanho encontrado nos estudos utilizando as técnicas de DLS e DCS.

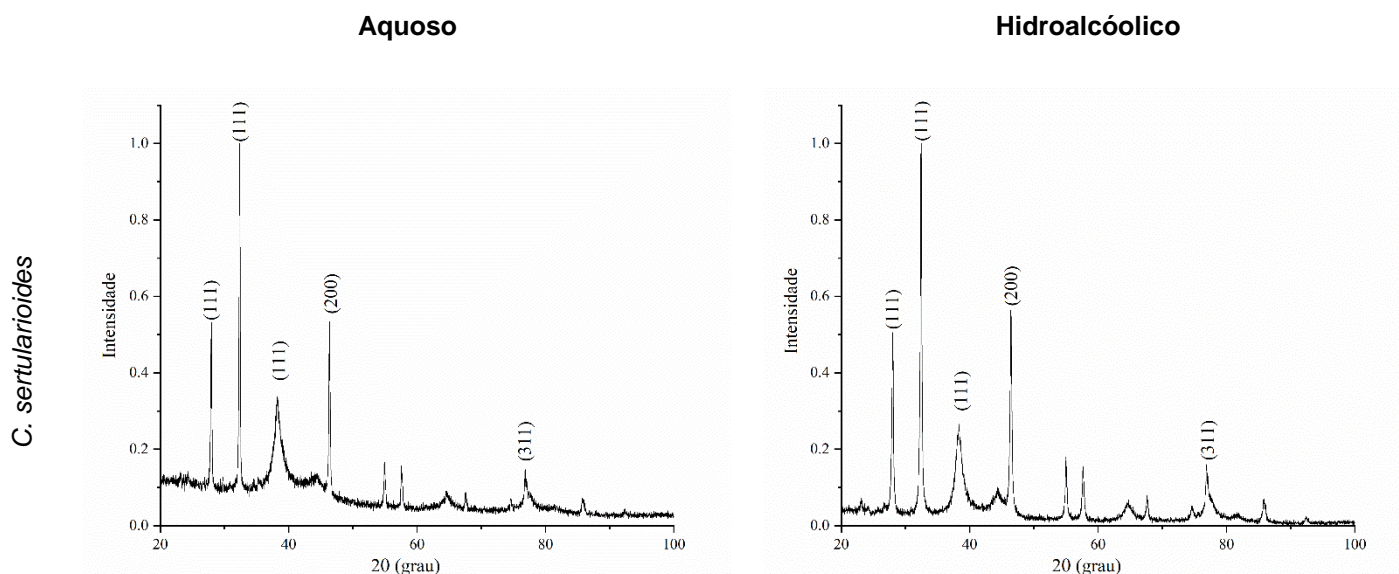
Além disso, os valores encontrados das AgNPs sintetizadas com as algas marinhas pelo método de “síntese-verde” diferem dos valores encontrados pela técnica de DLS provavelmente pela formação de agregados durante a leitura. O processo de agregação pode ser melhor visualizado quando as NPs foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Resultados semelhantes foram encontrados por Kumar *et al.* (2012) em seu estudo da síntese de AgNPs utilizando o extrato bruto de *Sargassum Tenerrimum*, os quais relataram valores de tamanhos diferentes de 45 nm e 20 nm, quando as NPs foram avaliadas por DLS e MET, respectivamente, sendo possível visualizar uma pequena agregação e partículas de tamanhos diferentes (KUMAR, P. *et al.*, 2012). Estes resultados podem ser melhor compreendidos quando comparadas as técnicas de pela técnica de DCS na qual é possível a visualização da presença de partículas de tamanhos inferiores a 100nm para todas as amostras. Quando comparadas com os dados encontrados por DLS é possível perceber a presença de agregação pelo valor

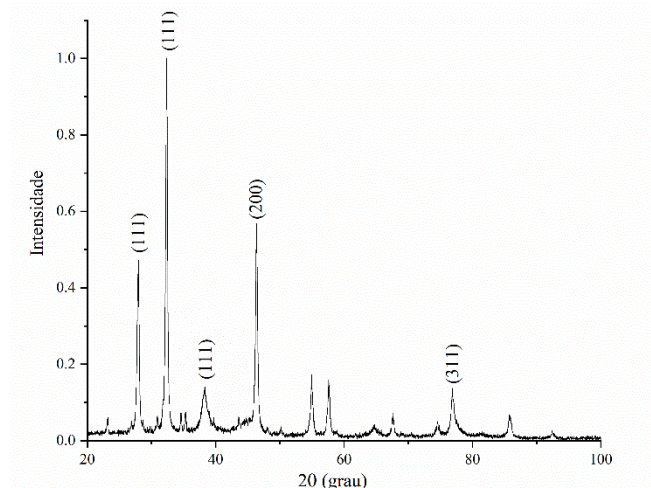
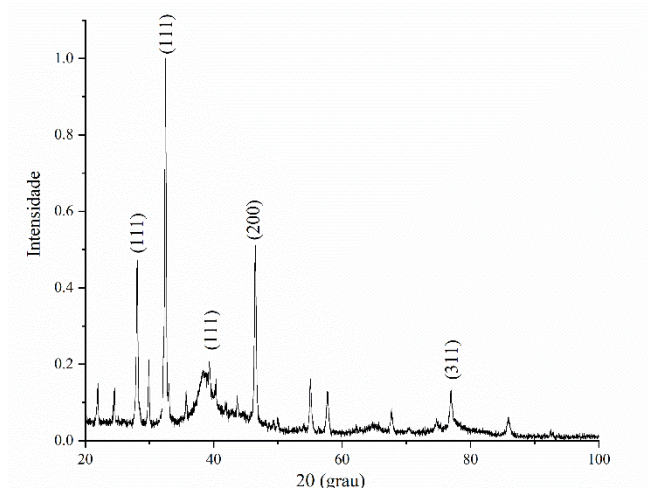
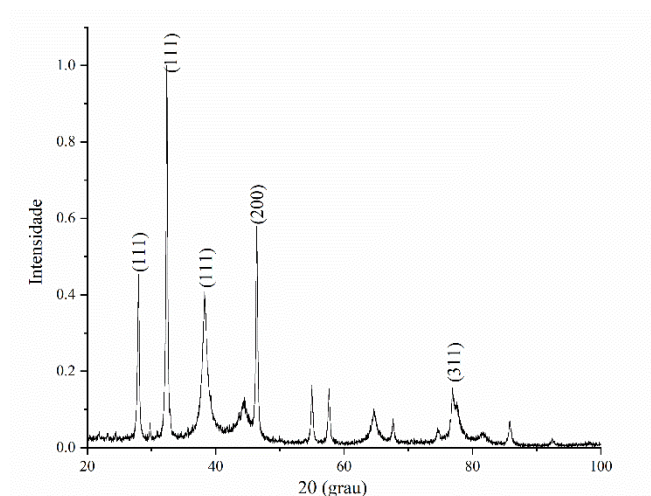
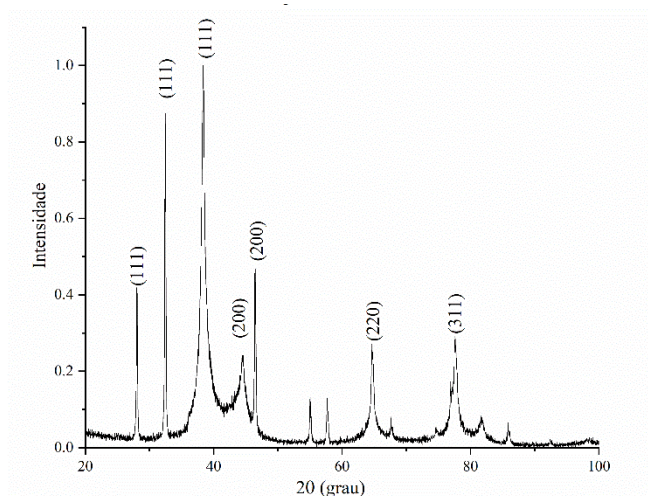
do índice de polidispersão (Pdl) acima de 0,4.(EDISON, T. J. I.; SETHURAMAN, M. G., 2012).

5.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

A análise de difração de raios-X foi realizada para comprovar a natureza cristalina das nanopartículas de prata. Os picos característicos principais de Ag metálico foram registrados e estão representados na Figura 17.

Figura 17 - Análise do padrão de difração de raios-X (DRX) de liófilos de nanopartículas de prata (AgNPs) biossintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcolólicos das algas marinhas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*.



C. chemnitzia*B. pennata*

Fonte: Autor, 2024.

A análise de DRX exibe a estrutura cristalina relacionando os picos de difração dos planos com a intensidade da amostra. Os valores de pico foram verificados e comparados com o cartão JCPDS com o número de arquivo 04–0783 e comparados com os dados na literatura. Para as AgNPs sintetizadas com os extratos *C. sertularioides* aquosos, os picos 27.94°, 32.36°, 38.29°, 46.35° e 76.81° correspondem aos planos (111), (111), (111), (200) e (311) respectivamente e para as AgNPs sintetizadas com o extrato hidroalcolóico apresentou os picos 28.03°, 32.44°, 38.36°, 46.43° e 76.89° que correspondem aos planos (111), (111), (111), (200) e (311), respectivamente. Para a espécie *C. chemnitzia*, a amostra aquosa apresentou os picos 28.11°, 32.50°, 38.33°, 46.50° e 76.94° que correspondem aos planos (111), (111), (111), (200) e (311) respectivamente, e para a hidroalcolóica apresentou os picos 27.96°, 32.36°, 38.26°, 46.38° e 76.86° correspondentes aos

planos (111), (111), (111), (200) e (311) respectivamente. Para a espécie *B. pennata*, a amostra aquosa apresentou os picos 28.04°, 32.45°, 38.34°, 44.52°, 46.45°, 64.64° e 77.57° que correspondem aos planos (111), (111), (111), (200), (200), (220) e (311) respectivamente, e para a hidroalcolica apresentou os picos 27.94°, 32.37°, 38.28°, 46.41° e 76.87° correspondendo aos planos (111), (111), (111), (200) e (311) respectivamente.

A orientação do pico encontrada corresponde principalmente à estrutura cúbica de face centrada (fcc) das nanopartículas de prata, assim como demonstrado por Anjali *et al.*(2022). A existência de picos de difração não atribuídos e os ruídos presentes podem ser relacionados a presença e a possível cristalização de fases das macromoléculas biológicas originadas dos extratos utilizados para a síntese das AgNPs (ALISHAH, H. *et al.*, 2016; RAJASEKAR, P. *et al.*, 2020; RONI, M. *et al.*, 2015b).

A presença de picos alargados indica que a formação das AgNPs se deu em nível de nanoescala (AUGUSTINE, R.; KALARIKKAL, N.; THOMAS, S. J. A. N., 2014; RAJASEKAR, P. *et al.*, 2020). Além disso, nota-se que a intensidade do pico relacionado ao plano (111) está no topo dos demais picos, propondo que o maior crescimento das nanopartículas foi apontado ao longo do plano (111), assim como demonstrado por Princy & Gopinath(2021) e Philip (2010) (PHILIP, D., 2010; PRINCY, K. F.; GOPINATH, A., 2021).

A partir da largura do plano (111), o tamanho médio do cristal das nanopartículas biossintetizadas foi calculado aplicando a equação de Debye-Scherrer:

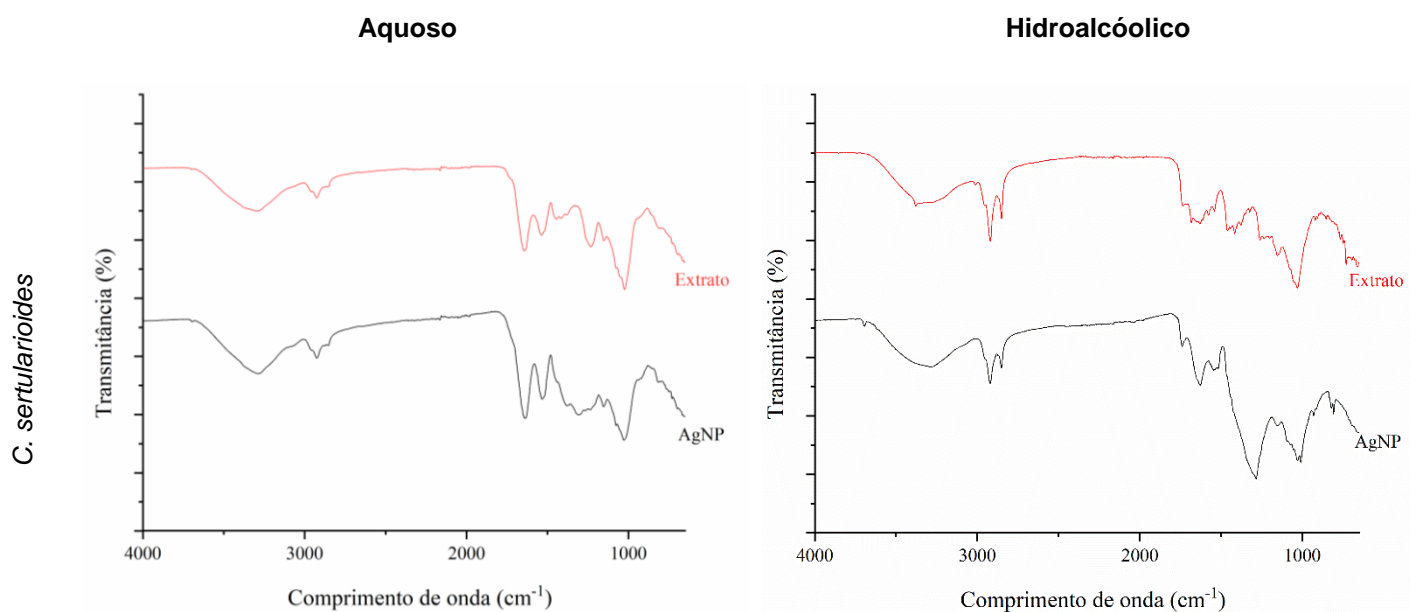
$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

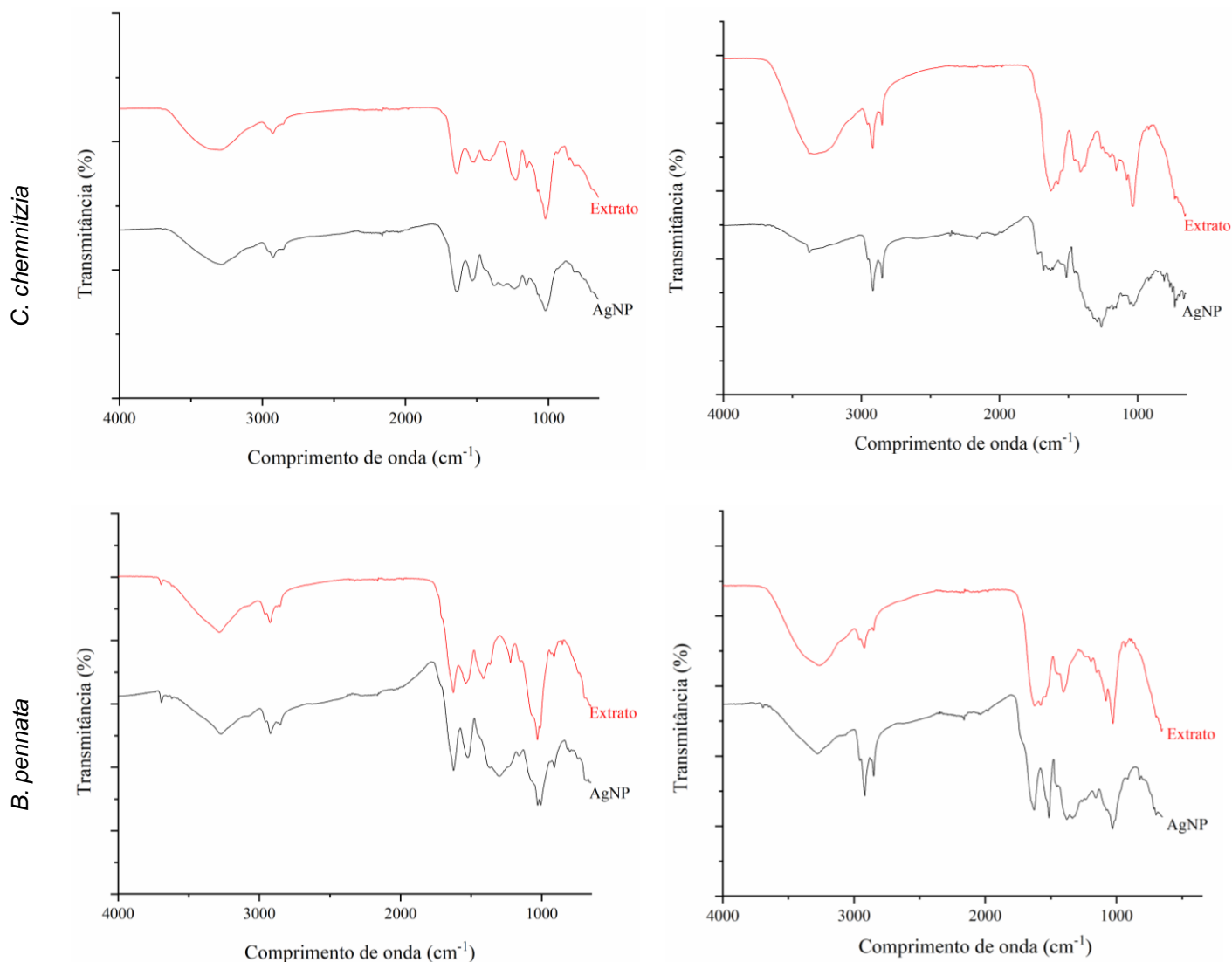
De forma que D é o tamanho do cristalino, 0,94 é o valor da constante (K) de Scherrer, λ é o comprimento de onda dos raios-X (0,15406 nm), θ é o ângulo de Bragg e β é a largura total na metade do máximo. O tamanho cristalino médio dos AgNPs para *C. sertularioides* foi de 78.14nm (aquoso) e 54.56nm (hidroalcolico), para *C. chemnitzia* foi de 34.96nm (aquoso) e 54.56nm (hidroalcolico) e para *B. pennata* foi de 86.17nm (aquoso) e 69.37nm (hidroalcolico), o que está de acordo com o obtido pelas análises das imagens MET.

5.4 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

O espectro FT-IR das AgNPs sintetizadas pelos extratos aquosos e hidroalcolóico de *C. sertularioides*, *C. chemnitzia* e *B. pennata* estão representados na Figura 18 e Tabela 11.

Figura 18 - Espectros de FTIR das nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcolóicos das algas marinhas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*.





Fonte: Autor, 2024.

Tabela 11 - Espectros, grupos funcionais e modo de vibração de FTIR das nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*.

Frequência (cm ⁻¹)		Grupo funcional	Modo de vibração
Aquoso	Hidroalcoólico		
<i>Caulerpa sertularioides</i>			
3285	3283	OH	alongamento de taninos
3006	3007	CH ₃	alongamento assimétrico e simétrico
2924	2920	CH-	alongamento de alcanos
2851	2852		
-	1625	(NH)=O	vibração de alongamento
1376	-	OH	Vibrações de deformação
1154	1150	Aromático C-H	flexão plana
-	1030	C-N	vibração de alongamento de aminas alifáticas

1027	-		
<i>Caulerpa chemnitzia</i>			
2924	-	C-H	ligações alifáticas carbono-hidrogênio (2.963 a 2.855 cm ⁻¹)
-	2915		
-	2880		
-	2848	C-H	alongamento de alcanos
-	1628	(NH)=O	vibração de alongamento
1018	-	C-O	alongamento de carboxílicos e aminas
<i>Bryopsis pennata</i>			
2922	-	C-H	alongamento de alcanos
-	2916		ligações alifáticas carbono-hidrogênio (2.963 a 2.855 cm ⁻¹)
2850	2849	C-H	alongamento de alcanos
1625	1626	(NH)=O	vibração de alongamento
1577	1581		vibração assimétrica e simétrica do íon carboxilato
1030	1030	C-N	Alongamento de aminas alifáticas

Fonte: Autor, 2024.

Os picos observados para os extratos de *C. sertularioides*, foram, para o extrato aquoso, 3285, 3006, 2924, 2851, 1376, 1154 e 1027 cm⁻¹, e para hidroalcolica 3283, 3007, 2920, 2852, 1625, 1150 e 1030 cm⁻¹. Os espectros mostraram picos de absorção em 3285 e 3283 cm⁻¹ demonstrando alongamento de taninos (OH), 3006 e 3007 cm⁻¹ para alongamento simétrico e assimétrico de CH₃. Foram demonstrados os picos de 2924, 2920, 2851 e 2852 cm⁻¹ demonstrando alongamento de alcanos (CH-). Picos em 1625 cm⁻¹ demonstraram vibrações de alongamento para os grupos (NH)=O, para 1376 cm⁻¹ vibrações de deformação para OH, em 1154 e 1150 cm⁻¹ flexão plana para grupamentos C-H aromáticos, 1030 e 1027 cm⁻¹ vibração de alongamento de aminas alifáticas (C-N).

Para *C. chemnitzia*, foi observado para o extrato aquoso picos em 2924 e 1018 cm⁻¹, e para o hidroalcolico os picos 2915, 2880, 2848 e 1628 cm⁻¹. Os espectros mostraram picos de absorção em 2924, 2915 e 2880 cm⁻¹ para ligações alifáticas carbono-hidrogênio (C-H), 2848 cm⁻¹ para alongamento de alcanos (C-H), 1628 cm⁻¹ para vibrações de alongamento do grupo (NH)=O e em 1018 cm⁻¹, alongamento de carboxílicos e aminas (C-O).

Para *B. pennata* foram observados, para o extrato aquoso, os picos 2922, 2850, 1625, 1577 e 1030 cm⁻¹, e para hidroalcolico 2916, 2849, 1626, 1581 e 1030 cm⁻¹. Os espectros mostraram picos de absorção em 2922, 2850 e 2849 cm⁻¹ demonstrando alongamentos de alcanos (C-H), 2916 cm⁻¹ ligações alifáticas carbono-hidrogênio (C-H), 1625 e 1626 cm⁻¹ demonstrando vibração de alongamento

do grupamento (NH)=O, 1577 e 1581 cm^{-1} vibração assimétrica e simétrica do íon carboxilato e 1030 cm^{-1} demonstrando alongamento de aminas alifáticas.

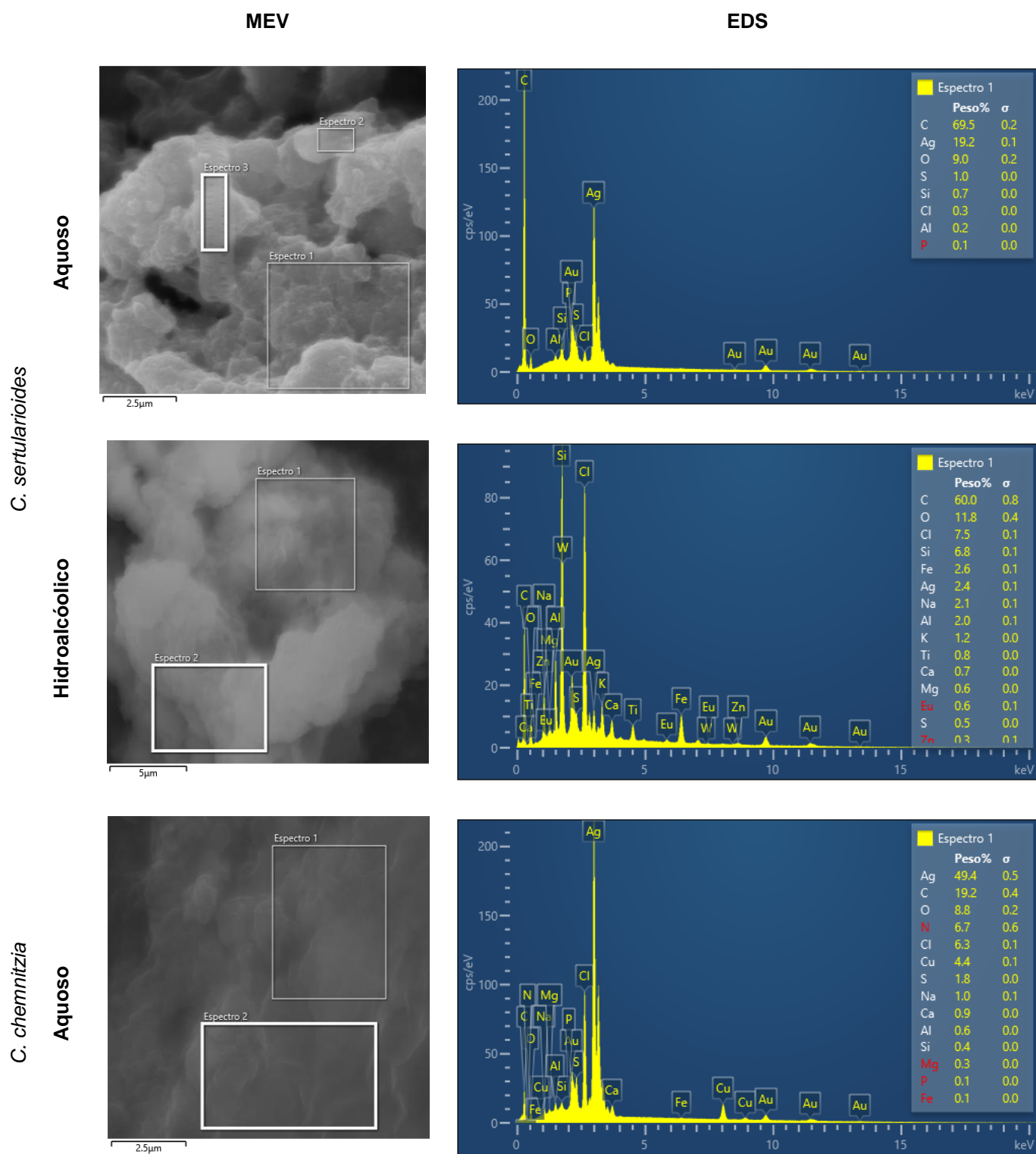
A semelhança entre os espectros encontrados nas análises de FTIR dos extratos brutos e das nanopartículas de prata sintetizadas pelo método de síntese verde com as algas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata* demonstram a presença de grupos funcionais de moléculas bioativas envolvidas na redução e estabilização das AgNPs assim como demonstrado por Dogmaz & Cavas (2023) em seu trabalho com extratos de *Ulva lactuca* para produção de AgNPs pelo mesmo método.

Porém a ausência ou a diminuição da intensidade dos espectros de grupos C-N e CO nas leituras de AgNPs quando comparadas com as leituras dos extratos brutos confirmam suas importâncias na síntese desses nanomateriais como já apresentados por diversos autores (ANJALI, R. *et al.*, 2022; KANNAN, R. R. R.; STIRK, W. A.; VAN STADEN, J., 2013; RAJASEKAR, P. *et al.*, 2020; SHETTY, P. *et al.*, 2014). Ademais, como apresentado por Shanmuganathan *et al.*(2023) e Ponnuchamy and Jacob (2016), a presença nos extratos brutos de grupos funcionais, como vibrações de estiramento O-H em ácidos carboxílicos, alcenos com vibrações de estiramento C=C e grupos de flexão C-H, influenciam o capeamento e estabilização de AgNPs.

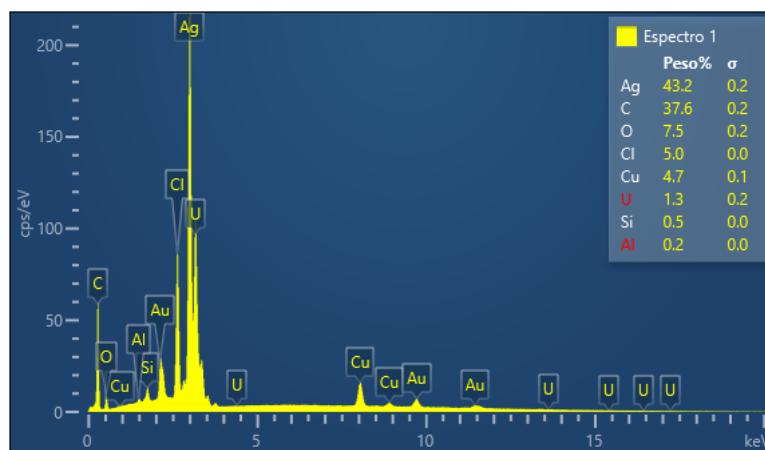
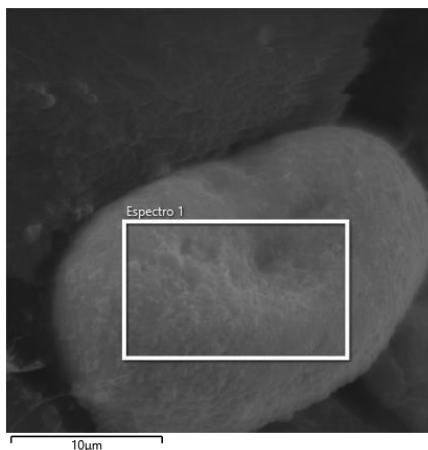
5.5 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDS) INTEGRADA AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV) (MEV-EDS)

A análise de Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) integrada ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) foi executada para analisar a composição elementar de AgNPs biossintetizadas como apresentado na Figura 19.

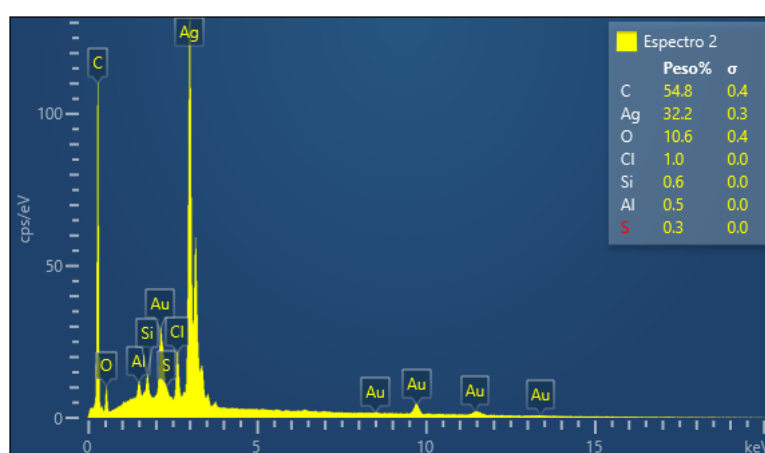
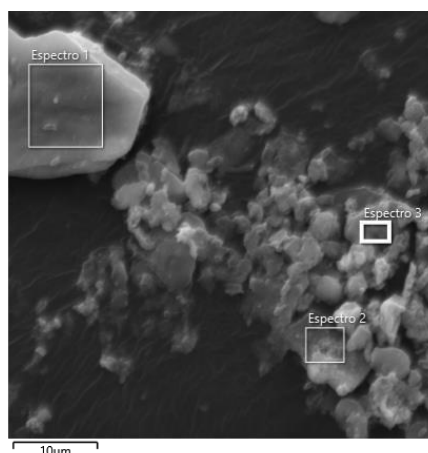
Figura 19 - Análise por SEM e EDS de nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*.



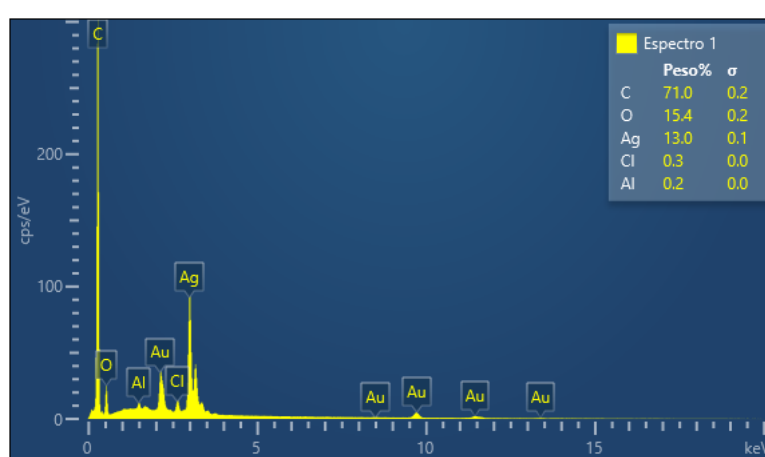
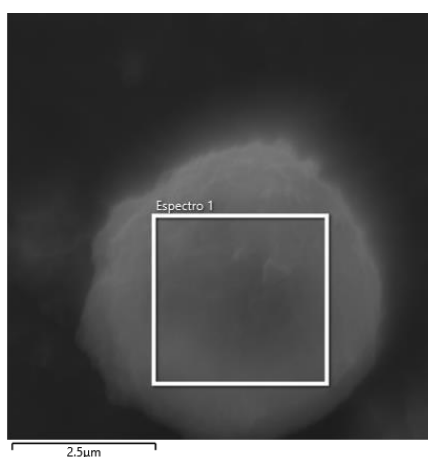
Hidroalcolico



Aquoso

*B. pennata*

Hidroalcolico



Fonte: Autor, 2024.

Os resultados dos estudos morfológicos e nanoestruturais de superfície usando MEV encontrados na Figura 19 indicaram que foram obtidas nanopartículas de prata altamente cristalinas com morfologia, de forma geral, de formato esférico com aglomerações. Os tamanhos de grão das amostras estimados a partir da imagem

MEV são maiores que os obtidos a partir das outras técnicas de caracterização (DLS, DCS, TEM e DRX), podendo entender que as imagens de MEV indicam o tamanho das partículas policristalinas aglomeradas (THEIVASANTHI, T.; ALAGAR, M. J. a. p. a., 2011).

Os espectros de EDS de AgNPs sintetizadas pelo método de 'síntese verde' utilizando extratos aquosos e hidroalcoólicos das algas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata* demonstraram sinal específico para Ag em 3 keV, confirmando a presença da prata metálica devido à ressonância plasmônica de superfície (RPS), como já apresentados pelos nossos resultados das análises por UV-Vis e demonstrado por outros trabalhos com este mesmo nanomaterial (FRANCIS, S. *et al.*, 2018; PRINCY, K. F.; GOPINATH, A., 2021).

A presença de picos de ouro (Au) em todas as amostras de AgNPs, observados no espectro, se deve ao processo de metalização utilizando ouro usado na preparação das amostras para as análises de MEV-EDS. O surgimento de outros sinais elementares como C, O e Cl pode ser devido à existência de biomoléculas nas AgNPs, assim como demonstrado por Rajasekar, Palanisamy *et al.* (2020) em seu trabalho utilizando extrato de *Cladophora fascicularis* como agente redutor na síntese de AgNPs.

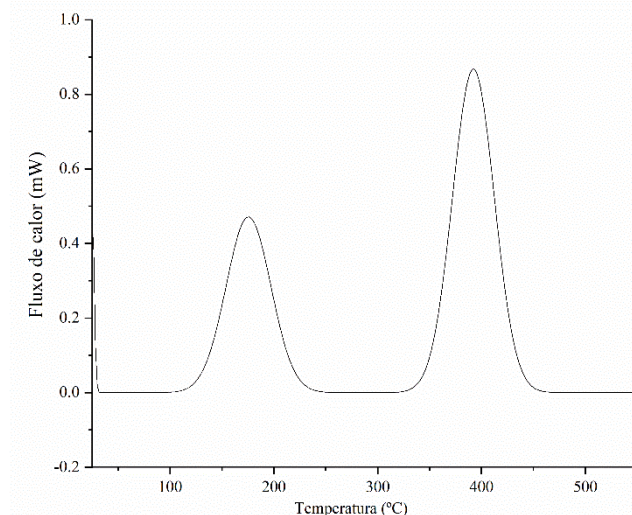
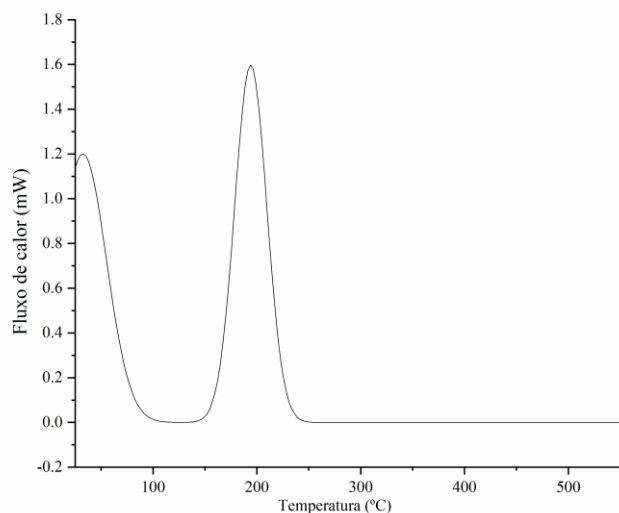
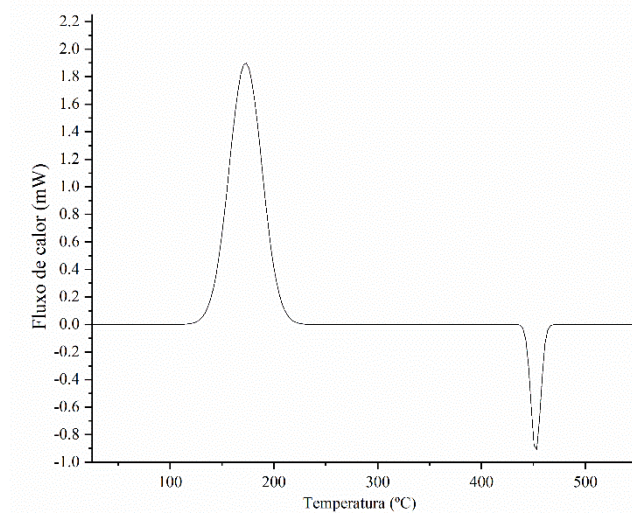
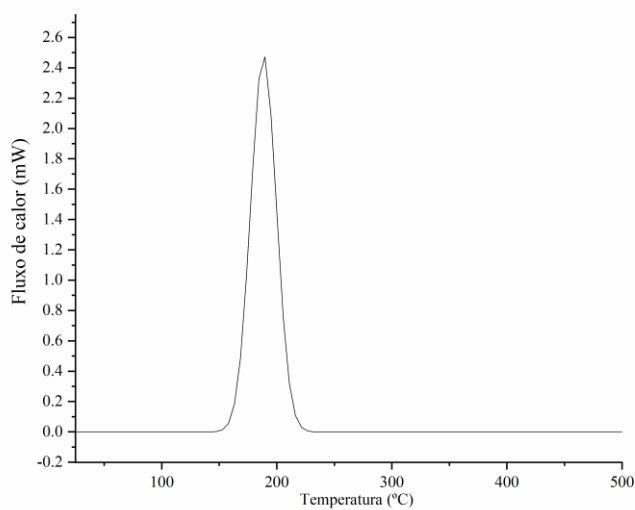
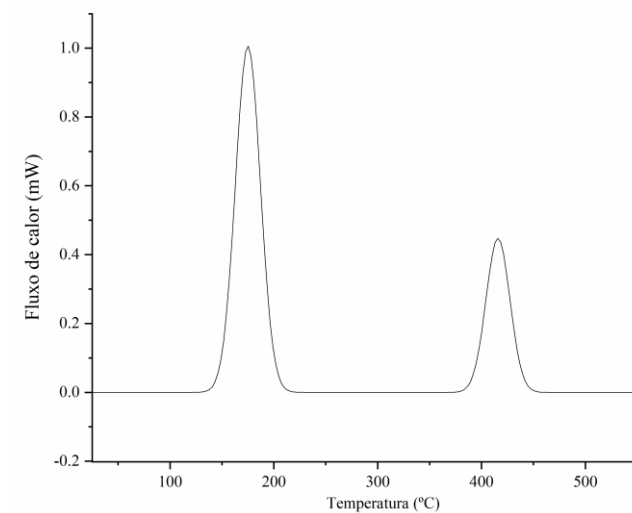
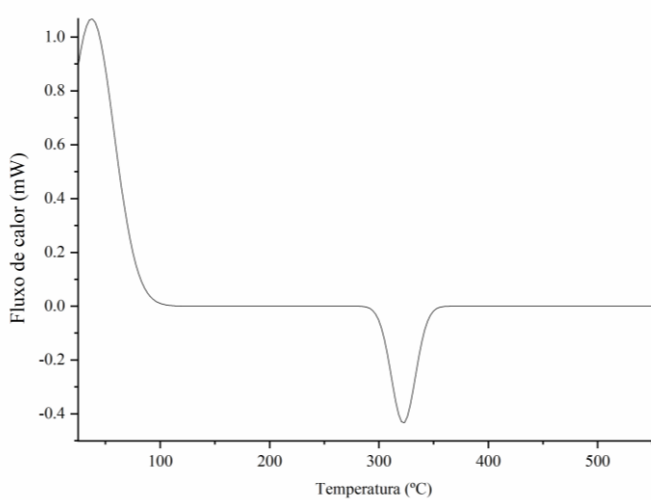
5.6 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As AgNPs foram submetidas a calorimetria exploratória diferencial para verificar os eventos térmicos envolvidos na sua estabilidade térmica. Os termogramas estão representados na Figura 20.

Figura 20 - Termogramas (DSC) das AgNPs sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata*.

Aquoso

Hidroalcoólico

C. sertularioides*C. chemnitzia**B. pennata*

Fonte: Autor, 2024.

A partir dos termogramas obtidos foram identificadas as temperaturas iniciais (T_{onset}) máxima (T_{peak}) e final (T_{endset}). Adicionalmente, as entalpias envolvidas nos eventos térmicos das AgNPs foram calculadas. Os valores estão compilados na Tabela 12.

Tabela 12 - Temperaturas e entalpias envolvidas no processo de calorimetria diferencial exploratórias das AgNPs.

AgNPs	Evento	T_{onset}	T_{peak}	T_{endset}	ΔH	
<i>C. sertularioides</i>	Aquoso	1	138.23	194.02	251.34	16.97953
	Hidroalcóolico	1	104.97	175.37	245.51	25.48433
2		324.97	392.16	459.79	43.67834	
<i>C. chemnitzia</i>	Aquoso	1	149.74	189.74	227.59	68.99649
	Hidroalcóolico	1	120.96	173.29	223.64	74.24235
		2	435.94	453.47	468.54	-
<i>B. pennata</i>	Aquoso	1	285.86	323.01	359.44	11.92952
	Hidroalcóolico	1	133.04	175.47	218.76	30.1914
2		375.27	415.90	454.77	12.88573	

Fonte: Autor, 2024.

Apenas as AgNPs sintetizadas com extrato hidroalcóolico de *C. chemnitzia* e aquoso de *B. pennata* apresentaram picos exotérmicos (173 e 37°C respectivamente) seguidos de um pico endotérmico (453 e 323 °C respectivamente), de forma que os picos endotérmicos podem ser atribuídos à perda de água, quebra térmica e cristalinidade dos NPs de prata metálica sintetizadas por 'síntese-verde' (BALAJI, V. *et al.*, 2023).

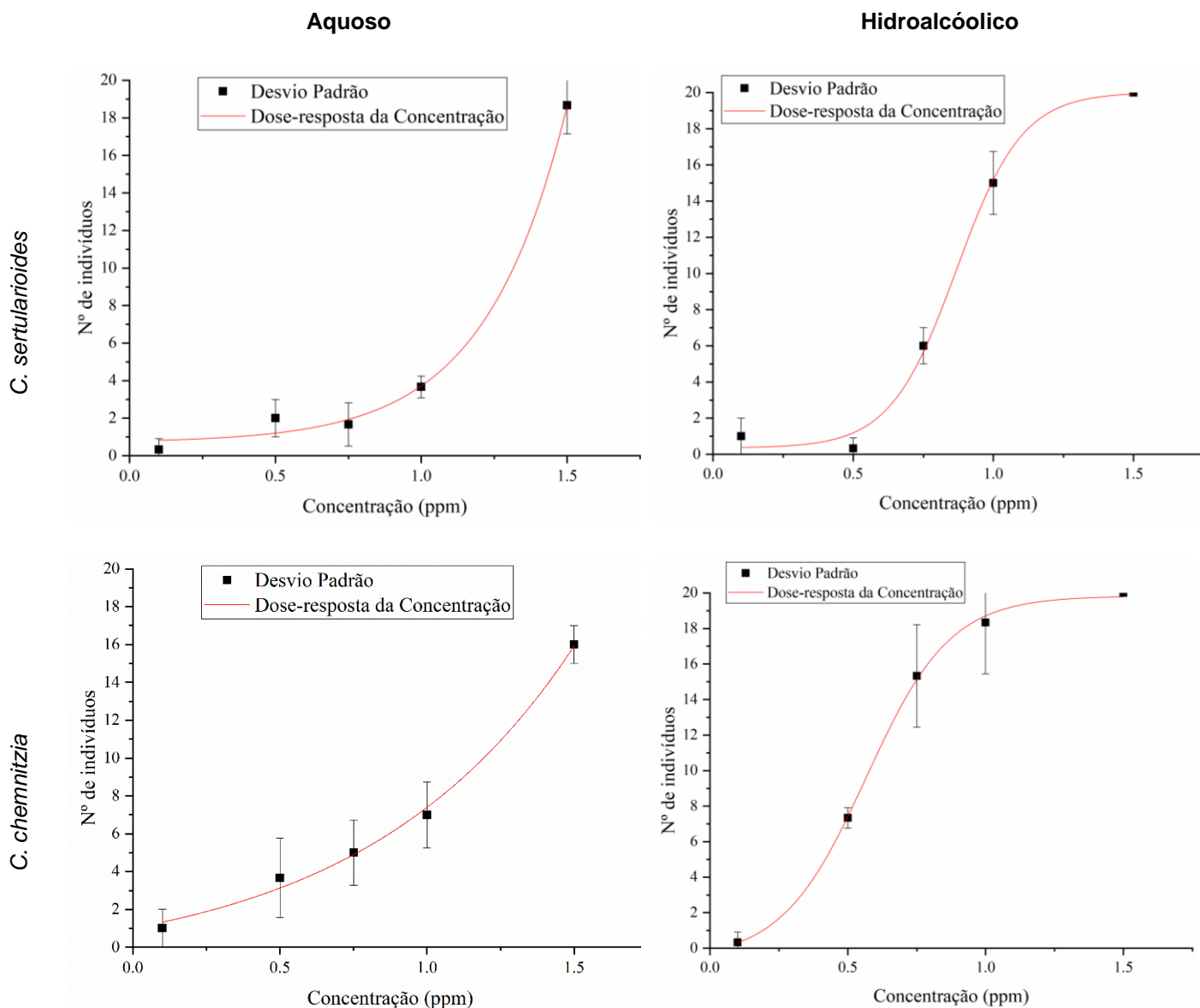
As outras AgNPs apresentaram apenas picos exotérmicos de forma que *C. sertularioides* sintetizada pelo extrato aquoso apresentou picos em 32 e 193 °C e para o extrato hidroalcóolico em 175 e 392 °C. *C. chemnitzia* sintetizada pelo extrato aquoso apresentou um pico em 189°C e *B. pennata*, sintetizada pelo extrato hidroalcóolico, apresentou picos em 175 e 415 °C. Os picos exotérmicos podem estar relacionados as dessorções das biomoléculas presentes nas AgNPs, sugerindo que essas biomoléculas, responsáveis pela redução de Ag^+ para Ag^0 , estão fortemente coordenadas com a prata e que são compostos relativamente estáveis. Ademais o resíduo remanescente após o aquecimento é uma microestrutura de prata pura (ELEMIKE, E. E. *et al.*, 2017).

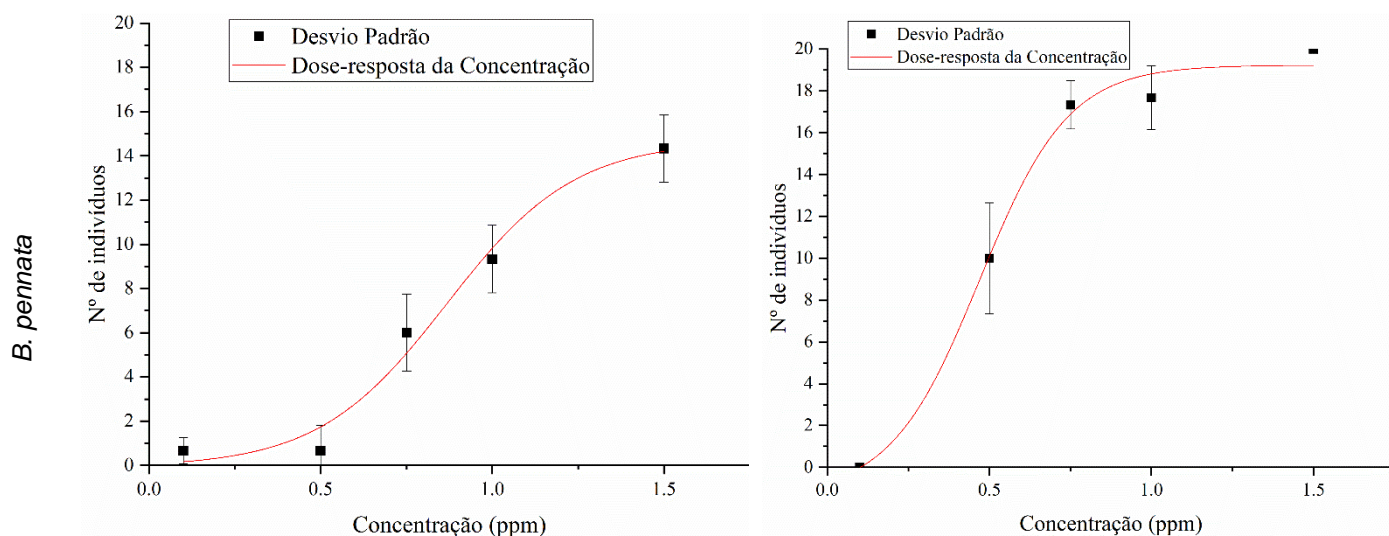
6 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE

6.1 ATIVIDADE LARVICIDA (*Aedes aegypti*)

Os testes de toxicidade contra larvas de *Ae. aegypti* foram realizados para avaliar a eficácia das AgNPs sintetizadas pelas algas marinhas *C. sertularioides*, *C. chemnitzia* e *B. pennata* nas concentrações 0.1-1.5 ppm. As curvas de dose-resposta para o efeito larvicida estão apresentadas na Figura 21 e os valores de LC₅₀ e LC₉₀ foram calculados após 48 h de exposição apresentados na Tabela 13.

Figura 21 - Curvas de dose-resposta para o efeito larvídica nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcolócos das algas marinhas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata* contra larvas de *Ae. aegypti* nas concentrações de 0.1-1.5 ppm.





Fonte: Autor, 2024.

Tabela 13 - Resultados de LC₅₀ e LC₉₀ para o efeito larvicida nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com os extratos brutos aquosos e hidroalcoólicos das algas marinhas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata* contra larvas de *Ae. aegypti* nas concentrações de 0.1-1.5 ppm.

Amostras (AgNPs)	<i>C. sertularioides</i>		<i>C. chemnitzia</i>		<i>B. pennata</i>	
	LC ₅₀ *	LC ₉₀ *	LC ₅₀ *	LC ₉₀ *	LC ₅₀ *	LC ₉₀ *
Aquoso	1.15±0.04	1.38±0.10	1.08±0.06	2.24±0.54	1.06±0.04	2.23±0.39
Hidroalcoólico	0.85±0.01	1.18±0.07	0.56±0.01	0.81±0.05	0.50±0.02	0.93±0.15

*Dados de LC₅₀ e LC₉₀ apresentados em ppm em média ± desvio padrão.

Fonte: Autor, 2024.

Como pode ser observado na Tabela 13, todas as AgNPs produzidas na presença dos extratos hidroalcoólicos apresentaram maior toxicidade contra larvas de *Ae. aegypti* quando comparadas com as nanopartículas sintetizadas usando extratos aquosos, tanto para a concentração que matou 50% (LC₅₀) quanto para que matou 90% (LC₉₀) da população total testada, não havendo diferença estatística entre nenhum dos tratamentos. Após 48 horas de exposição com diferentes concentrações de AgNPs, foram visualizados, para as nanopartículas sintetizadas a partir dos extratos aquosos, valores de LC₅₀ de 1.15, 1.08 e 1.06 ppm e de LC₉₀ de 1.38, 2.24 e 2.23 ppm para *C. sertularioides*, *C. chemnitzia* e *B. pennata*, respectivamente. Para as nanopartículas sintetizadas usando os extratos hidroalcoólicos foram visualizados os valores de LC₅₀ de 0.85, 0.56 e 0.50 ppm e de

LC₉₀ de 1.18, 0.81 e 0.93ppm para *C. sertularioides*, *C. chemnitzia* e *B. pennata*, respectivamente.

Atividades larvicidas diferentes foram encontradas no trabalho de Rajagopal, Manivannan *et al.* (2021), no qual para nanopartículas sintetizadas através de extratos de *P. gymnospora* com tamanho entre 10-28 nm foi encontrado toxicidade com valores de LC₅₀ de 6.06 ppm e de LC₉₀ de 10.88ppm, demonstrando que nossas AgNPs foram mais eficientes na atividade larvicida de larvas de terceiro instar de *Ae. aegypti*. Nossos resultados larvicidas contra *Ae. aegypti* ainda se mostraram mais eficientes quando comparados com outros estudos, como as AgNPs sintetizados por *H. musciformis*, apresentando tamanho de 40-65 nm, que apresentou LC₅₀ de 26.61ppm (RONI, M. *et al.*, 2015a), AgNPs sintetizadas por *C. clavulatum* (20-30 nm) que demonstraram LC₅₀ de 25.91 ppm (MURUGAN, K. *et al.*, 2016) e as AgNPs sintetizadas a partir de extrato de *Oscillatoria sancta* (20-50nm) que demonstraram LC₅₀ de 3.98 ppm e LC₉₀ de 8.90 ppm (ELUMALAI, D. *et al.*, 2021).

As variações nas eficiências das atividades larvicidas contra as larvas de *Aedes aegypti*, quando comparadas aos dados da literatura, podem ser atribuídas ao padrão multimodal do tamanho das nanopartículas apresentadas neste estudo, bem como à presença de aglomerados e compostos orgânicos na superfície das AgNPs, responsáveis pelo processo de 'capeamento' (RONI, M. *et al.*, 2015a). Através das técnicas de caracterização empregadas neste estudo, observamos partículas acima de 100nm e a presença de aglomerados. Vale ressaltar também a detecção de partículas isoladas menores (<100 nm e <50 nm), as quais podem penetrar na cutícula da larva do inseto e alcançar o interior das células individuais. Uma vez no interior destas células, estas partículas podem interferir na muda e em outros processos fisiológicos, proporcionando assim mais vantagens do que os inseticidas convencionais (AZARUDEEN, R. M. S. T. *et al.*, 2017; AZIZ, A. T., 2022; VINOTH, S. *et al.*, 2018). Além disso, a presença de AgNPs maiores e possíveis aglomerações podem estar relacionada à toxicidade em larvas de *Ae. aegypti*, devido ao acúmulo de nanopartículas na região do intestino médio do mosquito. Isso resulta em danos nessa região, bem como nas áreas do córtex e nas células epiteliais. (RAJAGOPAL, G. *et al.*, 2020).

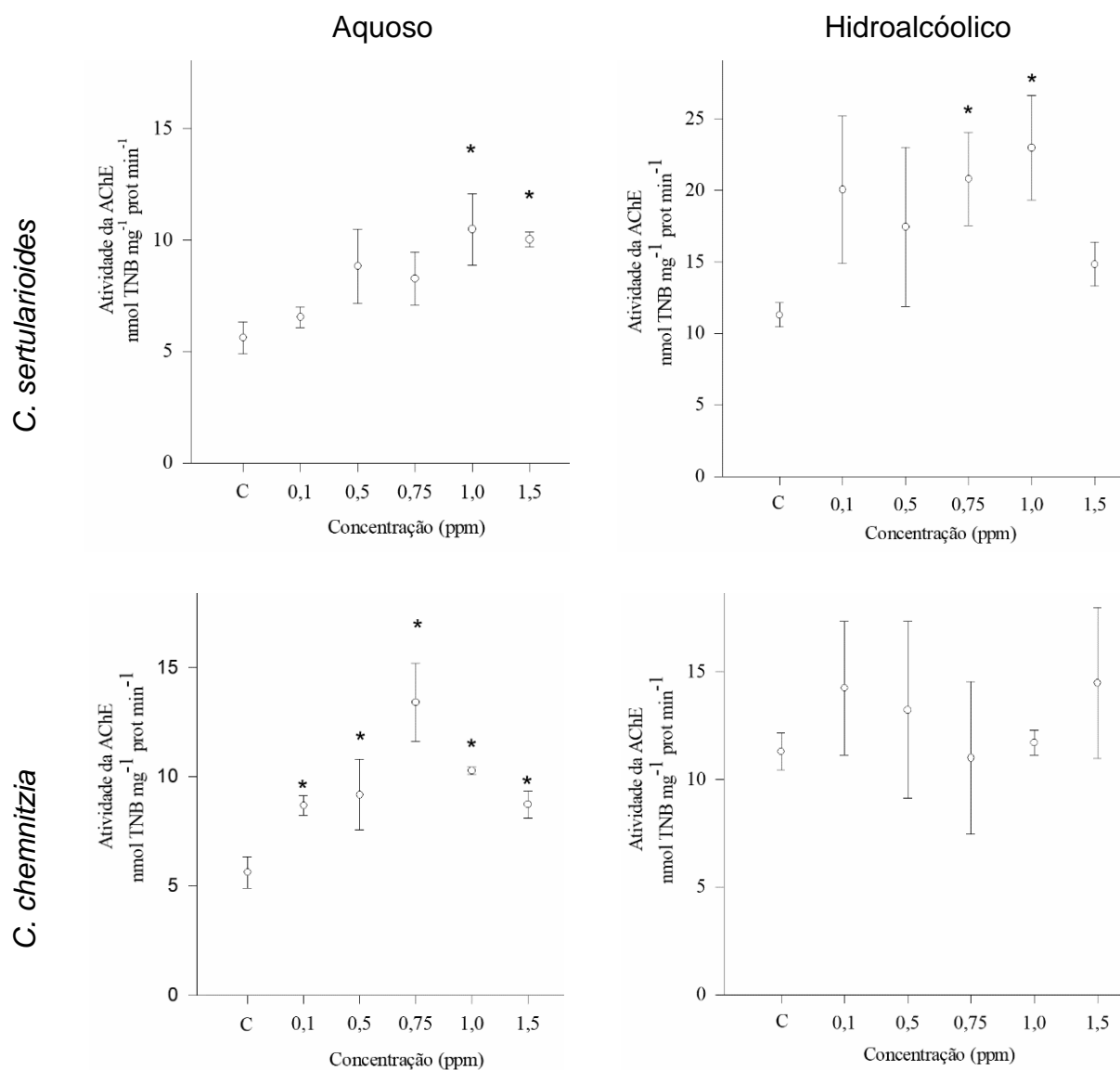
Além dos impactos do tamanho das AgNPs na toxicidade em larvas de *Ae. aegypti*, há também a ação dos compostos orgânicos bioativos, presentes na superfície desses nanomateriais como demonstrado nas análises de FTIR e DRX. Aziz (2022) demonstrou que em amostras reduzidas com extratos de *U. lactuca* que biomoléculas presentes nesse extrato foram ativos contra insetos vetores de doenças (*Ae. aegypti*), ligando-se aos locais-alvo e proporcionando melhores resultados de toxicidade, assim como demonstrado por Roni, Murugan *et al.*(2015) que sugeriram que as propriedades larvicidas das AgNPs sintetizadas por *H. musciformis* poderiam estar relacionadas ao efeito sinérgico de AgNPs e proteínas e metabólitos secundários que se aderem à superfície de AgNPs durante a sua redução e estabilização.

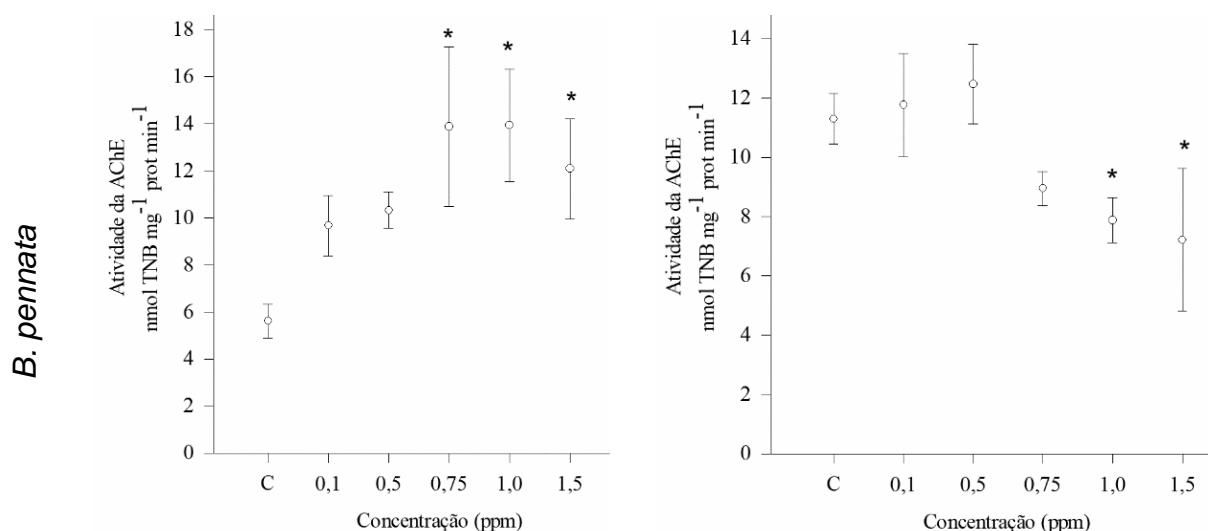
6.2 ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (ACHE) EM LARVAS DE *Ae. aegypti*.

No processo de transição de impulsos entre os neurônios, a acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima chave, que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas dos neurônios (COLOVIC, M. B. *et al.*, 2013; SHOBA, V. J. I. J. Z. A. B., 2018). Nos insetos, a desregulação da atividade da AChE é uma maneira já utilizada para o controle vetorial através da utilização de inseticidas comerciais, como os organofosforado e carbamato, que inibem a enzima, bloqueando ou reduzindo sua atividade, levando ao acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas, interferindo na transmissão normal de sinais nervosos e, conseqüentemente, a morte da larva (PANG, Y.-P., 2014; PRADEEPA, V. *et al.*, 2016; RUEDA, A. G. *et al.*, 2018).

Para avaliar o efeito das AgNPS no sistema nervoso de *Aedes aegypti*, foi avaliado seu efeito sobre a acetilcolinesterase (AChE) (Figura 22) em homogeneizados de larvas de *Ae. aegypti* utilizados nos testes de toxicidade.

Figura 22 - Quantificação da acetilcolinesterase (AChE) em larvas L3 de *Ae. aegypti* após 48hrs de exposição a AgNPs sintetizadas a partir dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das algas *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa chemnitzia* e *Bryopsis pennata* nas concentrações de 0.1-1.5 ppm.





* Comparações entre tratamentos e controle foram feitas com base nos testes a posteriori de Dunnett (ANOVA) e Dunn (Kruskall Wallis) *p < 0.05.
Fonte: Autor, 2024.

É possível perceber que para as larvas L3 de *Ae. aegypti* expostas as AgNPs preparadas com os extratos aquosos, houveram induções das atividades da AChE nmol TNB min⁻¹ mg proteína⁻¹ para todas as espécies e para todas as concentrações quando comparadas com o controle. *C. sertularioides* apresentou indução significativa nas larvas expostas às maiores concentrações de 1.0 e 1.5 ppm. Em *C. chemnitzia* houve diferença significativa na indução da enzima em todas as concentrações quando comparado com o controle. Para *B. pennata* houve diferença significativa no aumento da atividade da enzima nas concentrações 0.75, 1.0 e 1.5 ppm.

Em relação as AgNPs preparadas com os extratos hidroalcoólicos, é possível perceber que apenas as nanopartículas preparadas com o extrato de *C. sertularioides* seguiu o padrão das AgNPs sintetizadas pelos extratos aquosos, os quais se observa a indução da atividade da AChE (nmol TNB min⁻¹ mg proteína⁻¹), apresentando diferença significativa na indução apenas nas concentrações 0.75 e 1.0ppm. Em *C. chemnitzia*, houve uma pequena redução na atividade da enzima na concentração de 0.75ppm, e o restante apresentou indução, quando comparado com o controle, porém não houve diferença significativa entre os tratamentos. Para *B. pennata* houve indução da enzima nas concentrações 0.1 e 0.5ppm e redução da atividade nas concentrações 0.75, 1.0 e 1.5ppm quando comparado com o controle, apresentando redução significativa nas maiores concentrações de 1.0 e 1.5ppm.

O presente estudo apresentou um aumento na atividade da AChE para todas as AgNPs sintetizadas com os extratos aquosos de *C. sertularioides*, *C. chemnitzia* e *B. pennata*, e para a AgNPs sintetizada pelo extrato hidroalcolico de *C. sertularioides* em todas as concentrações testadas. Até o presente momento, não há relatos na literatura evidenciando o aumento da atividade da enzima AChE em larvas de *Ae. aegypti* após a exposição de nanopartículas de prata, porém, autores já demonstraram esse comportamento em outras espécies. Ulm, *et al.* (2015), demonstraram em seu trabalho com *Daphnia magna*, quando expostas a nanopartículas de prata, que houve um aumento da atividade da AChE, podendo ser uma resposta do organismo às AgNPs que aumentaram a síntese da enzima para decompor os níveis mais elevados de neurotransmissor que interagem com o receptor de acetilcolina e, assim, afetar a sua eficiência de ligação.

Ademais, estudos anteriores sugeriram que modificações de membrana poderiam ser responsáveis por uma mudança no estado conformacional da AChE, o que poderia ser responsável pela indução da atividade da enzima observada após exposição a materiais metálicos (KAIZER, R. R. *et al.*, 2005; SENGER, M. R. *et al.*, 2011). Adicionalmente, em experimentos *in vivo*, relataram-se que o acúmulo de metais nos tecidos contribuiu para alterações nas taxas de síntese e/ou degradação da enzima, além de a possibilidade de uma síntese 'de novo' da enzima em resposta a uma inibição inicial para repor a AChE removida da superfície das membranas celulares (NAJIMI, S. *et al.*, 1997; ULM, L. *et al.*, 2015).

Para a AgNP sintetizada pelo extrato hidroalcolico de *C. chemnitzia* houve um aumento na atividade da enzima AChE em todas as concentrações, exceto em 0.75ppm, os quais houve uma pequena diminuição, sem diferença significativa. Para as AgNPs sintetizadas por *B. pennata* apresentou aumento na atividade da AChE nas concentrações mais baixas de 0.1 e 0.5ppm, mas houve uma diminuição na atividade nas concentrações 0.75, 1.0 e 1.5ppm, havendo diferença significativa nas duas maiores concentrações. Dados semelhantes foram encontrados por Boily, Sarrasin *et al.* (2013) em seu trabalho com *Apis mellifera*, demonstrando uma dupla resposta da atividade enzimática. Essa diminuição provavelmente se deu pelo fato de a enzima acetilcolinesterase (AChE) estar envolvida no processo de catalisação da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (Ach) nas sinapses nervosas e junções neuromusculares, dessa forma sua atividade foi inibida pela toxicidade dos

compostos testados, como demonstrado por Ga'al, Fouad *et al.* (2018). Assim como encontrado nos pesticidas organofosforados e carbamatos, uma variedade de metais inibem a atividade da AChE e da α e β carboxilesterase em *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex pipiens* (FOUAD, H. *et al.*, 2018; GA'AL, H. *et al.*, 2018; NASIR, S. *et al.*, 2022; PARTHIBAN, E. *et al.*, 2019; REGOLI, F.; PRINCIPATO, G., 1995).

7 TOXICIDADE EM ESPÉCIES NÃO-ALVO (*DANIO RERIO*)

Os dados de LC₅₀ (concentração letal que mata 50% dos embriões em 96 h) são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Concentração eficaz que mata 50% dos embriões de *Danio rerio* em 96hrs (LC₅₀).

Amostra	LC50 (ppm)*		
	<i>C. sertularioides</i>	<i>C. chemnitzia</i>	<i>B. pennata</i>
Aquosa	0.23 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Hidroalcolica	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.01

*Os dados são apresentados como média ± desvio padrão

Fonte: Autor, 2024.

Como pode ser observado na Tabela 14, em geral, as AgNPs produzidas pelos extratos hidroalcolicos apresentaram maior toxicidade contra larvas de *Danio rerio* quando comparadas pelas nanopartículas sintetizadas pelos extratos aquosos, não havendo diferença estatística entre nenhum dos tratamentos. Após 96 horas de exposição de diferentes concentrações de AgNPs, foram visualizados, para as nanopartículas sintetizadas na presença dos extratos aquosos, valores de LC₅₀ de 0.23, 0.29 e 0.11ppm para *C. sertularioides*, *C. chemnitzia* e *B. pennata*, respectivamente. Para as nanopartículas sintetizadas na presença dos extratos hidroalcolicos foram visualizados os valores de LC₅₀ de 0.10, 0.10 e 0.11ppm para *C. sertularioides*, *C. chemnitzia* e *B. pennata*, respectivamente.

Os dados encontrados no presente estudo demonstraram maior toxicidade quando comparados aos apresentados por Massarsky *et al.* (2013) em seu estudo

utilizando nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas a partir de um agente redutor e estabilizador (poliacrilato de sódio). Neste estudo as nanopartículas apresentaram em média tamanho de 8.39 nm e Pdl de 0.156, foram encontraram uma LC₅₀ de 1.18ppm após 96h de exposição. Muñoz-Carrillo *et al.* (2023) em seu trabalho com AgNPs sintetizadas a partir de extratos de *Opuntia ficus-indica* pelo método de 'síntese-verde', demonstraram que as AgNPs com tamanho médio de 137.33nm e potencial zeta de -23 mV apresentaram um LC₅₀ de 0.53ppm após 96h de exposição. A maior toxicidade apresentadas pelas AgNPs no presente estudo provavelmente pode ser explicada pela formação tanto de nanopartículas isoladas quanto nanopartículas agregadas. As AgNPs isoladas (menores) possuem maior facilidade de penetrar os ovos das larvas de *Danio rerio* por difusão passiva através dos poros encontrados no córion, enquanto que as AgNPs agregadas podem se manter no meio afetando os organismos pós eclosão dos ovos. Desta forma, as AgNPs se acumulariam nos tecidos e os íons Ag⁺ seriam liberados causando estresse oxidativo e o aumento na expressão de genes envolvidos na apoptose celular (D'AMORA, M. *et al.*, 2021; MUÑOZ-CARRILLO, M. G. *et al.*, 2023; QIANG, L. *et al.*, 2020).

8 CONCLUSÕES

O controle e gestão eficaz e sustentável de doenças transmitidas por vetores ainda é um desafio em todo o mundo, sendo predominante em países tropicais que possuem altos índices endêmicos. Os inseticidas de base química são altamente eficazes contra pragas, mas muitas vezes persistem no meio ambiente e permanecem tóxicos para as gerações futuras. Desta forma, o desenvolvimento de agentes de controle biológico utilizando ferramentas nanobiotecnológicas é de grande interesse populacional. No geral, aqui propomos um método barato, rápido e de etapa única para biofabricar AgNPs usando extratos aquosos e hidroalcolóicos das macroalgas marinhas *C. sertularioides*, *C. chemnitzia* e *B. pennata* como agentes redutores e estabilizadores. A nanossíntese eficaz foi confirmada por UV-Vis, DLS, DCS, TEM, DRX, FTIR, MEV-EDS e DSC. As AgNPs demonstraram atividade larvicida contra larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* de maneira dose-dependente apresentando letalidade em baixas concentrações, podendo ser considerado uma alternativa para os larvicidas já comerciais. Por outro lado, as AgNPs demonstraram toxicidade elevada para as larvas de *Danio rerio* (espécie não-alvo), o que explicado pelo nível de agregação das AgNPs.

Do ponto de vista biológico, as AgNPs sintetizadas pelos extratos hidroalcolóicos de *B. pennata* apresentaram maior toxicidade contra larvas de *Aedes aegypti*, apresentando um LC50 e LC90 em baixas concentrações (0.50 e 0.93 ppm) bem como atividades de indução e inibição da AChE. Porém, assim como todas as AgNPs sintetizadas, apresentaram LC50 abaixo de 0.50 ppm contra espécies não-alvo (*Danio rerio*), desta forma, futuros trabalhos são necessários para compreender maneiras de manter as AgNPs menos agregadas ou em relação com outros materiais para otimizar os efeitos larvicidas contra *Ae. aegypti* e a diminuição da toxicidade contra espécies não-alvo.

9 REFERÊNCIA

ABBAS, Q. Understanding the UV-Vis spectroscopy for nanoparticles. J Nanomater Mol Nanotechnol, 8, n. 3, 2019.

ABDEL-RAOUF, N.; AL-ENAZI, N. M.; IBRAHEEM, I. B. M. Green biosynthesis of gold nanoparticles using Galaxaura elongata and characterization of their antibacterial activity. Arabian Journal of Chemistry, 10, p. S3029-S3039, 2017.

ABDEL-RAOUF, N.; AL-ENAZI, N. M.; IBRAHEEM, I. B. M.; ALHARBI, R. M. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles by using of the marine brown alga Padina pavonia and their characterization. Saudi Journal of Biological Sciences, 26, n. 6, p. 1207-1215, 2019.

ABDEL-RAOUF, N.; AL-ENAZI, N. M.; IBRAHEEM, I. B. M.; ALHARBI, R. M. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles by using of the marine brown alga Padina pavonia and their characterization. Saudi J Biol Sci, 26, n. 6, p. 1207-1215, Sep 2019.

AHMAD, N.; SHARMA, S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extracts of Ananas comosus. Green and Sustainable Chemistry, 02, n. 04, p. 141-147, 2012.

ALISHAH, H.; SEYEDI, S. P.; EBRAHIMIPOUR, S. Y.; ESMAEILI-MAHANI, S. J. J. o. C. S. A green approach for the synthesis of silver nanoparticles using root extract of Chelidonium majus: characterization and antibacterial evaluation. 27, p. 421-429, 2016.

ALKAN, C.; BICHAUD L FAU - DE LAMBALLERIE, X.; DE LAMBALLERIE X FAU - ALTEN, B.; ALTEN B FAU - GOULD, E. A. *et al.* Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. Antiviral Res., 100, n. 1, p. 54-74, 2013.

ALMATROUDI, A. Silver nanoparticles: synthesis, characterisation and biomedical applications. Open Life Sci, 15, n. 1, p. 819-839, 2020.

ANJALI, R.; PALANISAMY, S.; VINOSHA, M.; SELVI, A. M. *et al.* Fabrication of silver nanoparticles from marine macro algae Caulerpa sertularioides: Characterization, antioxidant and antimicrobial activity. Process Biochemistry, 121, p. 601-618, 2022/10/01/ 2022.

ASGHARI, G.; VARSHOSAZ, J.; SHAHBAZI, N. J. N. J. Synthesis of silver nanoparticle using Portulaca oleracea L. extracts. 1, p. 94-99, 2014.

ASMATHUNISHA, N.; KATHIRESAN, K. A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, p. 283-287, 2013/03/01/ 2013.

ATHANASSIOU, C.; KAVALLIERATOS, N.; BENELLI, G.; LOSIC, D. *et al.* Nanoparticles for pest control: current status and future perspectives. 91, p. 1-15, 2018.

AUGUSTINE, R.; KALARIKKAL, N.; THOMAS, S. J. A. N. A facile and rapid method for the black pepper leaf mediated green synthesis of silver nanoparticles and the antimicrobial study. 4, p. 809-818, 2014.

AZARUDEEN, R. M. S. T.; GOVINDARAJAN, M.; AMSATH, A.; MUTHUKUMARAN, U. *et al.* Single-Step Biofabrication of Silver Nanocrystals Using *Naregamia alata*: A Cost Effective and Eco-Friendly Control Tool in the Fight Against Malaria, Zika Virus and St. Louis Encephalitis Mosquito Vectors. *Journal of Cluster Science*, 28, n. 1, p. 179-203, 2017/01/01 2017.

AZIZ, A. T. Toxicity of *Ulva lactuca* and green fabricated silver nanoparticles against mosquito vectors and their impact on the genomic DNA of the dengue vector *Aedes aegypti*. *IET Nanobiotechnol*, 16, n. 4, p. 145-157, Jun 2022.

BALAJI, V.; PERUMAL, S.; PALANISAMY, S.; KARUPPAIAH, M. *et al.* Bio-inspired synthesis of silver nanoparticles and their nanocomposites for antibacterial and anticancer activity: A comparative study. 966, p. 171503, 2023.

BALASUBRAMANI, G.; RAMKUMAR, R.; KRISHNAVENI, N.; SOWMIYA, R. *et al.* GC-MS analysis of bioactive components and synthesis of gold nanoparticle using *Chloroxylon swietenia* DC leaf extract and its larvicidal activity. 148, p. 1-8, 2015.

BAPAT, M. S.; SINGH, H.; SHUKLA, S. K.; SINGH, P. P. *et al.* Evaluating green silver nanoparticles as prospective biopesticides: An environmental standpoint. *Chemosphere*, 286, p. 131761, 2022/01/01/ 2022.

BARNAWI, A.; TARIQ S ALGHAMDI, T.; MAHYOUB, J.; AL-GHAMDI, K. Effect of green synthesized silver nanoparticles using *Sargassum natans* extract as a pesticidal against the dengue fever mosquito *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7, n. 2, p. 333-337, 2019.

BENELLI, G.; CASELLI, A.; CANALE, A. J. J. o. K. S. U.-S. Nanoparticles for mosquito control: challenges and constraints. 29, n. 4, p. 424-435, 2017.

BILIŠKOV, N. Infrared spectroscopic monitoring of solid-state processes. Physical Chemistry Chemical Physics, 24, n. 32, p. 19073-19120, 2022.
10.1039/D2CP01458K.

BOILY, M.; SARRASIN, B.; DEBLOIS, C.; ARAS, P. *et al.* Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. Environmental Science and Pollution Research, 20, n. 8, p. 5603-5614, 2013/08/01 2013.

BORASE, H. P.; D PATIL, C. Phyto-Synthesized Silver Nanoparticles: A Potent Mosquito Biolarvicidal Agent. Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery, 03, n. 01, 2013.

BOSLY, H. A. E.-K.; SALAH, N.; SALAMA, S. A.; PASHAMEAH, R. A. *et al.* Oil fly ash as a promise larvicide against the *Aedes aegypti* mosquitoes. 237, p. 106735, 2023.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72, p. 248-254, May 7 1976.

CAPUTO, F.; CLOGSTON, J.; CALZOLAI, L.; RÖSSLEIN, M. *et al.* Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. Journal of Controlled Release, 299, p. 31-43, 2019/04/10/ 2019.

CARPENTER, S.; GROSCHUP, M. H.; GARROS, C.; FELIPPE-BAUER, M. L. *et al.* Culicoides biting midges, arboviruses and public health in Europe. Antiviral Research, 100, n. 1, p. 102-113, 2013/10/01/ 2013.

CASCIO, C.; GEISS, O.; FRANCHINI, F.; OJEA-JIMENEZ, I. *et al.* Detection, quantification and derivation of number size distribution of silver nanoparticles in antimicrobial consumer products. 30, n. 6, p. 1255-1265, 2015.

CHANDA, S. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). Spain: Formatex, 2013. cap. Silver nanoparticles (medicinal plants mediated): A new generation of antimicrobials to combat microbial pathogens- a review, p. 1314-1323.

CHANDRAN, S. P.; CHAUDHARY, M.; PASRICHA, R.; AHMAD, A. *et al.* Synthesis of Gold Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using Aloe vera Plant Extract. Biotechnology Progress, 22, n. 2, p. 577-583, 2006/01/01 2006.
<https://doi.org/10.1021/bp0501423>.

CHITHIGA, A.; MANIMEGALAI, K. J. E. P. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Indigofera tinctoria* and their efficacy against dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). p. 108513, 2023.

COLOVIC, M. B.; KRSTIC, D. Z.; LAZAREVIC-PASTI, T. D.; BONDZIC, A. M. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.

CONWAY, M. J.; COLPITTS, T. M.; FIKRIG, E. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annu Rev Virol.*, 1, n. 1, p. 71-88, 2014.

CORRÊA, P. S.; MORAIS JÚNIOR, W. G.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. *et al.* Microalgae biomolecules: Extraction, separation and purification methods. 9, n. 1, p. 10, 2020.

D'AMORA, M.; RAFFA, V.; DE ANGELIS, F.; TANTUSSI, F. Toxicological Profile of Plasmonic Nanoparticles in Zebrafish Model. 22, n. 12, p. 6372, 2021.

DADASHPOUR, M.; FIROUZI-AMANDI, A.; POURHASSAN-MOGHADDAM, M.; MALEKI, M. J. *et al.* Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using *Matricaria chamomilla* extract and their potential anticancer activity against human lung cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*, 92, p. 902-912, 2018.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, 37, n. 18, p. 4311-4330, 2003/11/01/ 2003.

DEKA, B.; BABU, A.; BARUAH, C.; BARTHAKUR, M. J. F. i. N. Nanopesticides: A systematic review of their prospects with special reference to tea pest management. 8, p. 686131, 2021.

DEVI, H. S.; BODA, M. A.; SHAH, M. A.; PARVEEN, S. *et al.* Green synthesis of iron oxide nanoparticles using *Platanus orientalis* leaf extract for antifungal activity. *Green Processing and Synthesis*, 8, n. 1, p. 38-45, 2019.

DOGMAZ, S.; CAVAS, L. Biohydrogen production via green silver nanoparticles synthesized through biomass of *Ulva lactuca* bloom. *Bioresource Technology*, 379, p. 129028, 2023/07/01/ 2023.

EDISON, T. J. I.; SETHURAMAN, M. G. Instant green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* fruit extract and evaluation of their catalytic

activity on reduction of methylene blue. *Process Biochemistry*, 47, n. 9, p. 1351-1357, 2012/09/01/ 2012.

ELEMIKE, E. E.; FAYEMI, O. E.; EKENNIA, A. C.; ONWUDIWE, D. C. *et al.* Silver Nanoparticles Mediated by Costus afer Leaf Extract: Synthesis, Antibacterial, Antioxidant and Electrochemical Properties. 22, n. 5, p. 701, 2017.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R. M. J. B. p. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

ELUMALAI, D.; HEMAVATHI, M.; REKHA, G.; PUSHPALATHA, M. *et al.* Photochemical synthesizes of silver nanoparticles using Oscillatoria sancta micro algae against mosquito vectors *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 34, p. 100457, 2021.

ELUMALAI, D.; HEMAVATHI, M.; REKHA, G. S.; PUSHPALATHA, M. *et al.* Photochemical synthesizes of silver nanoparticles using Oscillatoria sancta micro algae against mosquito vectors *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 34, 2021.

ER, M. **Synthesis of silver nanoparticles using a plasma-liquid process**. 2019. (Ph.D) - Chemical Physics, Université Sorbonne Paris Cité.

ERDMAN, N.; BELL, D. C.; REICHEL, R. Scanning Electron Microscopy. *In*: HAWKES, P. W. e SPENCE, J. C. H. (Ed.). **Springer Handbook of Microscopy**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 229-318.

FERNANDES, D. A.; CHAVES, O. S.; TELES, Y. C.; AGRA, M. d. F. *et al.* Fatty Acids Analysis and Chemotaxonomic Considerations of Malvoideae (Malvaceae) Species. 44, p. 137-141, 2021.

FOSEID, L.; NATVIK, I.; DEVLE, H.; EKEBERG, D. J. J. o. A. P. Identification of fatty acids in fractionated lipid extracts from *Palmaria palmata*, *Alaria esculenta* and *Saccharina latissima* by off-line SPE GC-MS. 32, n. 6, p. 4251-4262, 2020.

FOUAD, H.; HONGJIE, L.; HOSNI, D.; WEI, J. *et al.* Controlling *Aedes albopictus* and *Culex pipiens pallens* using silver nanoparticles synthesized from aqueous extract of *Cassia fistula* fruit pulp and its mode of action. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46, n. 3, p. 558-567, 2018/04/03 2018.

FRANCIS, S.; JOSEPH, S.; KOSHY, E. P.; MATHEW, B. Microwave assisted green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *elephantopus scaber* and its

environmental and biological applications. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 46, n. 4, p. 795-804, 2018/05/19 2018.

GA'AL, H.; FOUAD, H.; TIAN, J.; HU, Y. *et al.* Synthesis, characterization and efficacy of silver nanoparticles against Aedes albopictus larvae and pupae. 144, p. 49-56, 2018.

GALATAGE, S. T.; HEBALKAR, A. S.; DHOBALE, S. V.; MALI, O. R. *et al.* Silver Nanoparticles: Properties, Synthesis, Characterization, Applications and Future Trends. Silver Micro-Nanoparticles - Properties, Synthesis, Characterization, and Applications. In, 2021. cap. Silver Nanoparticles: Properties, Synthesis, Characterization, Applications and Future Trends.

GHOLAMREZA, A.; VARSHOSAZ, J.; SHAHBAZI, N. Synthesis of silver nanoparticle using Portulaca oleracea L. extracts. Nanomed J, 1, n. 2, p. 94-99, 2014.

GNANADESIGAN, M.; ANAND, M.; RAVIKUMAR, S.; MARUTHUPANDY, M. *et al.* Antibacterial potential of biosynthesised silver nanoparticles using Avicennia marina mangrove plant. Applied Nanoscience, 2, n. 2, p. 143-147, 2012/06/01 2012.

GOMES, H.; DE JESUS, A. G.; QUARESMA, J. A. S. J. O. H. Identification of risk areas for arboviruses transmitted by Aedes aegypti in northern Brazil: A One Health analysis. 16, p. 100499, 2023.

GONZÁLEZ-BALLESTEROS, N.; RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, M. C.; PRADO-LÓPEZ, S.; LASTRA, M. *et al.* Macroalgae to nanoparticles: Study of Ulva lactuca L. role in biosynthesis of gold and silver nanoparticles and of their cytotoxicity on colon cancer cell lines. Materials Science and Engineering: C, 97, p. 498-509, 2019/04/01/ 2019.

GOPU, M.; KUMAR, P.; SELVANKUMAR, T.; SENTHILKUMAR, B. *et al.* Green biomimetic silver nanoparticles utilizing the red algae Amphiroa rigida and its potent antibacterial, cytotoxicity and larvicidal efficiency. Bioprocess Biosyst Eng, 44, n. 2, p. 217-223, Feb 2021.

GUNATHILAKA, U. A.-O.; DE SILVA, W. A.-O.; DUNUWEERA, S. A.-O. X.; RAJAPAKSE, R. A.-O. Effect of morphology on larvicidal activity of chemically synthesized zinc oxide nanoparticles against mosquito vectors. RSC Adv, n. 2046-2069 (Electronic), 2021.

GURUNATHAN, S.; RAMAN, J.; ABD MALEK, S. N.; JOHN, P. A. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using Ganoderma neo-japonicum Imazeki: a

potential cytotoxic agent against breast cancer cells. International journal of nanomedicine, 8, p. 4399, 2013.

HAMEDI, S.; SHOJAOSADATI, S. A. Rapid and green synthesis of silver nanoparticles using Diospyros lotus extract: Evaluation of their biological and catalytic activities. Polyhedron, 171, p. 172-180, 2019.

HAN, W.; JIAO, H.; FOX, D. Scanning Electron Microscopy. In: WANG, R.; WANG, C., *et al* (Ed.). **Progress in Nanoscale Characterization and Manipulation**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 35-68.

HARIRAM, V.; JOHN, J. G.; SERALATHAN, S. Spectrometric analysis of algal biodiesel as a fuel derived through base-catalysed transesterification. International Journal of Ambient Energy, 40, n. 2, p. 195-202, 2019/02/17 2019.

HASSAN, A. I.; SAMIR, A.; YOUSSEF, H. F.; MOHAMED, S. S. *et al*. Effects of silver nanoparticles–polysaccharide on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 73, n. 11, p. 1503-1512, 2021.

HUQ, M. A. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Pseudoduganella eburnea MAHUQ-39 and Their Antimicrobial Mechanisms Investigation against Drug Resistant Human Pathogens. Int J Mol Sci, 21, n. 4, Feb 22 2020.

JAVAN BAKHT DALIR, S.; DJAHANIANI, H.; NABATI, F.; HEKMATI, M. Characterization and the evaluation of antimicrobial activities of silver nanoparticles biosynthesized from Carya illinoensis leaf extract. Heliyon, 6, n. 3, p. e03624, Mar 2020.

JU-NAM, Y.; LEAD, J. R. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. Sci Total Environ, 400, n. 1-3, p. 396-414, Aug 1 2008.

KAIZER, R. R.; CORRÊA, M. C.; SPANEVELLO, R. M.; MORSCH, V. M. *et al*. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. 99, n. 9, p. 1865-1870, 2005.

KALIMUTHU, K.; CHA, B. S.; KIM, S.; PARK, K. S. Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: A review. Microchemical Journal, 152, p. 104296, 2020/01/01/ 2020.

KALIMUTHU, K.; PANNEERSELVAM, C.; CHOU, C.; LIN, S.-M. *et al*. Predatory efficiency of the copepod Megacyclops formosanus and toxic effect of the red alga

Gracilaria firma-synthesized silver nanoparticles against the dengue vector *Aedes aegypti*. Hydrobiologia, 785, n. 1, p. 359-372, 2016.

KALIMUTHU, K.; PANNEERSELVAM, C.; CHOU, C.; LIN, S.-M. *et al.* Predatory efficiency of the copepod *Megacyclops formosanus* and toxic effect of the red alga *Gracilaria firma*-synthesized silver nanoparticles against the dengue vector *Aedes aegypti*. Hydrobiologia, 785, n. 1, p. 359-372, 2017.

KANNAN, R. R. R.; STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Codium capitatum* P.C. Silva (Chlorophyceae). South African Journal of Botany, 86, p. 1-4, 2013/05/01/ 2013.

KAVIYA, S.; SANTHANALAKSHMI, J.; VISWANATHAN, B.; MUTHUMARY, J. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 79, n. 3, p. 594-598, 2011/08/01/ 2011.

KEPEKÇI, R. A.; YENER İLÇE, B.; DEMİR KANMAZALP, S. Plant-derived biomaterials for wound healing. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, 2021. v. 70, cap. 8, p. 227-264.

KHAN, M.; KHAN, M. S. A.; BORAH, K. K.; GOSWAMI, Y. *et al.* The potential exposure and hazards of metal-based nanoparticles on plants and environment, with special emphasis on ZnO NPs, TiO₂ NPs, and AgNPs: A review. Environmental Advances, 6, p. 100128, 2021/12/01/ 2021.

KLAUS, T.; JOERGER, R.; OLSSON, E.; GRANQVIST, C. G. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. Proc Natl Acad Sci 96, p. 13611-13614, 1999.

KUMAR, P.; SENTHAMIL SELVI, S.; LAKSHMI PRABHA, A.; PREM KUMAR, K. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles from *Sargassum tenerrimum* and screening phytochemicals for its antibacterial activity. Nano Biomed Eng, 4, n. 1, p. 12-16, 2012.

LAVAKUMAR, V.; MASILAMANI, K.; RAVICHANDIRAN, V.; VENKATESHAN, N. *et al.* Promising upshot of silver nanoparticles primed from *Gracilaria crassa* against bacterial pathogens. 9, n. 1, p. 1-8, 2015.

LEAL, W. S.; BARBOSA, R. M.; ZENG, F.; FAIERSTEIN, G. B. *et al.* Does Zika virus infection affect mosquito response to repellents? 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

LEEMA, M.; SREEKUMAR, G.; SIVAN, A.; PILLAI, Z. S. Synthesis of silver nanoparticles from a bioactive precursor. *Materials Today: Proceedings*, 18, p. 4724-4728, 2019/01/01/ 2019.

LIU, Y.; LILLEPOLD, K.; SEMENZA, J. C.; TOZAN, Y. *et al.* Reviewing estimates of the basic reproduction number for dengue, Zika and chikungunya across global climate zones. n. 1096-0953 (Electronic), 2020.

LÔBO, M.; DOURADO, D.; SOUSA, A. Physicochemical evaluations for nanoemulsions characterization. In: BARTUL, Z. e TRENOR, J. (Ed.). **Microscopy is an important analysis in the characterization of metallic nanoparticles**: Nova Publisher, 2019. v. 23, cap. 5, p. 189-219.

LÓPEZ, A.; RICO, M.; RIVERO, A.; DE TANGIL, M. S. J. F. C. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. 125, n. 3, p. 1104-1109, 2011.

LYUBOMIR, L.; RISHAM SINGH, G.; EDMUNDS, T. Silver Nanoparticles - Preparation Methods and Anti-Bacterial/Viral Remedy Impacts against COVID 19. In: SAMIR, K.; PRABHAT, K., *et al* (Ed.). **Silver Micro-Nanoparticles**. Rijeka: IntechOpen, 2021. p. Ch. 7.

MAGUDAPATHY, P.; GANGOPADHYAY, P.; PANIGRAHI, B.; NAIR, K. *et al.* Electrical transport studies of Ag nanoclusters embedded in glass matrix. 299, n. 1-2, p. 142-146, 2001.

MANAIA, E. B.; ABUÇAFY, M. P.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; SILVA, B. L. *et al.* Physicochemical characterization of drug nanocarriers. n. 1178-2013 (Electronic), 2017.

MANSFIELD, K. L.; JIZHOU, L.; PHIPPS, L. P.; JOHNSON, N. Emerging Tick-Borne Viruses in the Twenty-First Century. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, n. 7, p. 298, 2017.

MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G. A.; NIÑO-MARTÍNEZ, N.; MARTÍNEZ-GUTIERREZ, F.; MARTÍNEZ-MENDOZA, J. R. *et al.* Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10, n. 8, p. 1343-1348, 2008/12/01 2008.

MESSINA, J. P.; BRADY, O. J.; GOLDING, N.; KRAEMER, M. U. G. *et al.* The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nature Microbiology*, 4, n. 9, p. 1508-1515, 2019/09/01 2019.

MIKAILI, P.; MAADIRAD, S.; MOLOUDIZARGARI, M.; AGHAJANSHAKERI, S. *et al.* Therapeutic uses and pharmacological properties of garlic, shallot, and their biologically active compounds. 16, n. 10, p. 1031, 2013.

MOORTHI, P. V.; BALASUBRAMANIAN, C.; MOHAN, S. An Improved Insecticidal Activity of Silver Nanoparticle Synthesized by Using Sargassum muticum. Applied Biochemistry and Biotechnology, 175, n. 1, p. 135-140, 2015/01/01 2015.

MOURDIKOU DIS, S.; PALLARES, R. M.; THANH, N. T. K. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. Nanoscale, 10, n. 27, p. 12871-12934, Jul 13 2018.

MUÑOZ-CARRILLO, M. G.; GARCIDUEÑAS-PIÑA, C.; PEDROZA-JIMENEZ, M. M.; VALERIO-GARCÍA, R. C. *et al.* Toxicity of Silver Nanoparticles Synthesized from Opuntia ficus-indica on Danio rerio and Arabidopsis thaliana and Their Antimicrobial Activity. 2023, 2023.

MURUGAN, K.; ARUNA, P.; PANNEERSELVAM, C.; MADHIYAZHAGAN, P. *et al.* Fighting arboviral diseases: low toxicity on mammalian cells, dengue growth inhibition (in vitro), and mosquitocidal activity of Centrocercas clavulatum-synthesized silver nanoparticles. Parasitology Research, 115, n. 2, p. 651-662, 2016/02/01 2016.

MURUGAN, K.; ARUNA, P.; PANNEERSELVAM, C.; MADHIYAZHAGAN, P. *et al.* Fighting arboviral diseases: low toxicity on mammalian cells, dengue growth inhibition (in vitro), and mosquitocidal activity of Centrocercas clavulatum-synthesized silver nanoparticles. Parasitol Res, 115, n. 2, p. 651-662, Feb 2016.

NAJIMI, S.; BOUHAIMI, A.; DAUBEZE, M.; ZEKHNINI, A. *et al.* Use of acetylcholinesterase in Perna perna and Mytilus galloprovincialis as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). 58, p. 901-908, 1997.

NASIR, S.; WALTERS, K. F.; PEREIRA, R. M.; WARIS, M. *et al.* Larvicidal activity of acetone extract and green synthesized silver nanoparticles from Allium sativum L.(Amaryllidaceae) against the dengue vector Aedes aegypti L.(Diptera: Culicidae). 25, n. 3, p. 101937, 2022.

NOGINOV, M. A.; ZHU, G.; BAHOURA, M.; ADEGOKE, J. *et al.* The effect of gain and absorption on surface plasmons in metal nanoparticles. Applied Physics B, 86, n. 3, p. 455-460, 2006.

OLIVEROS-DÍAZ, A. F.; PÁJARO-GONZÁLEZ, Y.; CABRERA-BARRAZA, J.; HILL, C. *et al.* Larvicidal activity of plant extracts from Colombian North Coast against Aedes aegypti L. mosquito larvae. 15, n. 12, p. 104365, 2022.

OMIDI, S.; SEDAGHAT, S.; TAHVILDARI, K.; DERAKHSHI, P. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles with adiantum capillus-veneris L leaf extract in the batch process and assessment of antibacterial activity. Green Chemistry Letters and Reviews, 11, n. 4, p. 544-551, 2018/10/02 2018.

PANG, Y.-P. Chapter Six - Insect Acetylcholinesterase as a Target for Effective and Environmentally Safe Insecticides. In: COHEN, E. (Ed.). **Advances in Insect Physiology**: Academic Press, 2014. v. 46, p. 435-494.

PARTHIBAN, E.; RAMACHANDRAN, M.; JAYAKUMAR, M.; RAMANIBAI, R. Biocompatible green synthesized silver nanoparticles impact on insecticides resistant developing enzymes of dengue transmitted mosquito vector. SN Applied Sciences, 1, n. 10, p. 1282, 2019/09/25 2019.

PEREZ-POTTI, A.; LOPEZ, H.; PELAZ, B.; ABDELMONEM, A. *et al.* In depth characterisation of the biomolecular coronas of polymer coated inorganic nanoparticles with differential centrifugal sedimentation. Scientific Reports, 11, n. 1, p. 6443, 2021/03/19 2021.

PHILIP, D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using Hibiscus rosa sinensis. Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures, 42, n. 5, p. 1417-1424, 2010/03/01/ 2010.

PHILIP, D. Mangifera indica leaf-assisted biosynthesis of well-dispersed silver nanoparticles. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 78, n. 1, p. 327-331, Jan 2011.

PONNUCHAMY, K.; JACOB, J. A. Metal nanoparticles from marine seaweeds – a review. Nanotechnology Reviews, 5, n. 6, 2016.

PORTO, A. S.; ALMEIDA, I. V. d.; VICENTINI, V. E. P. Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade. 2020.

PRADEEPA, V.; SENTHIL-NATHAN, S.; SATHISH-NARAYANAN, S.; SELIN-RANI, S. *et al.* Potential mode of action of a novel plumbagin as a mosquito repellent against the malarial vector Anopheles stephensi, (Culicidae: Diptera). 134, p. 84-93, 2016.

PRINCY, K. F.; GOPINATH, A. Green synthesis of silver nanoparticles using polar seaweed Fucus gardeneri and its catalytic efficacy in the reduction of nitrophenol. Polar Science, 30, p. 100692, 2021/12/01/ 2021.

PRINCY, K. F.; HOLADAY, M. G. D.; GOPINATH, A. Marine macroalgae biofabricated silver nanoparticles as naked-eye colorimetric and turn-on fluorescent sensor for cyanide ions in aqueous media. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 15, p. 100399, 2021/05/01/ 2021.

QIANG, L.; ARABEYYAT, Z. H.; XIN, Q.; PAUNOV, V. N. *et al.* Silver Nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos: Uptake, Growth and Molecular Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, n. 5, 2020.

RAJAGOPAL, G.; MANIVANNAN, N.; MAHALINGAM, S.; ANAND, K. *et al.* Biogenic Synthesis of Silver Chloride Nanoparticles from *Padina gymnospora* and their Evaluation of Antimicrobial, Larvicidal, Hemolytic and Anticancer Activities. 2020.

RAJAGOPAL, G.; MANIVANNAN, N.; SUNDARARAJAN, M.; KUMAR, A. G. *et al.* Biocompatibility assessment of silver chloride nanoparticles derived from *Padina gymnospora* and its therapeutic potential. *Nano Express*, 2, n. 1, 2021.

RAJASEKAR, P.; PALANISAMY, S.; ANJALI, R.; VINOSHA, M. *et al.* *Cladophora fascicularis* mediated silver nanoparticles: assessment of their antibacterial activity against *Aeromonas hydrophila*. 31, p. 673-683, 2020.

RAJESHKUMAR, S.; BHARATH, L. V. Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles - A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. *Chem Biol Interact*, 273, p. 219-227, Aug 1 2017.

RAVIKUMAR, S.; GNANADESIGAN, M.; SUGANTHI, P.; RAMALAKSHMI, A. J. I. J. M. M. S. Antibacterial potential of chosen mangrove plants against isolated urinary tract infectious bacterial pathogens. 2, n. 3, p. 94-99, 2010.

REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31, n. 2, p. 143-164, 1995/02/01/ 1995.

RODRIGUES DOS SANTOS, D.; LOPES CHAVES, L.; COUTO PIRES, V.; SOARES RODRIGUES, J. *et al.* New weapons against the disease vector *Aedes aegypti*: From natural products to nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 643, p. 123221, 2023/08/25/ 2023.

ROIZ, D.; WILSON, A. L.; SCOTT, T. W.; FONSECA, D. M. *et al.* Integrated *Aedes* management for the control of *Aedes*-borne diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12, n. 12, p. e0006845, 2018.

RONI, M.; MURUGAN, K.; PANNEERSELVAM, C.; SUBRAMANIAM, J. *et al.* Characterization and biotoxicity of Hypnea musciformis-Synthesized Silver nanoparticles as potential eco-friendly control tool against *Aedes aegypti* and *Plutella xylostella*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 121, 2015// 2015a.

RONI, M.; MURUGAN, K.; PANNEERSELVAM, C.; SUBRAMANIAM, J. *et al.* Characterization and biotoxicity of Hypnea musciformis-synthesized silver nanoparticles as potential eco-friendly control tool against *Aedes aegypti* and *Plutella xylostella*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 121, p. 31-38, Nov 2015b.

ROODBAR SHOJAEI, T.; SOLTANI, S.; DERAKHSHANI, M. Synthesis, properties, and biomedical applications of inorganic bionanomaterials. In: BARHOUM, A.; JEEVANANDAM, J., *et al* (Ed.). **Fundamentals of Bionanomaterials**: Elsevier, 2022. cap. 6, p. 139-174.

ROSELINE, T. A.; MURUGAN, M.; SUDHAKAR, M. P.; ARUNKUMAR, K. Nanopesticidal potential of silver nanocomposites synthesized from the aqueous extracts of red seaweeds. *Environmental Technology & Innovation*, 13, p. 82-93, 2019/02/01/ 2019.

RUEDA, A. G.; CARREÑO OTERO, A. L.; DUQUE, J. E.; KOUZNETSOV, V. V. Synthesis of new α -amino nitriles with insecticidal action on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 62, n. 2, p. 112-118, 2018/04/01/ 2018.

SAJADI, S. M.; NASROLLAHZADEH, M.; MAHAM, M. Aqueous extract from seeds of *Silybum marianum* L. as a green material for preparation of the Cu/Fe₃O₄ nanoparticles: A magnetically recoverable and reusable catalyst for the reduction of nitroarenes. *J Colloid Interface Sci*, 469, p. 93-98, May 1 2016.

SAMUEL, M. S.; RAVIKUMAR, M.; JOHN J, A.; SELVARAJAN, E. *et al.* A Review on Green Synthesis of Nanoparticles and Their Diverse Biomedical and Environmental Applications. *Catalysts*, 12, n. 5, 2022.

SANTHOSHKUMAR, J.; RAJESHKUMAR, S.; KUMAR, S. V. J. B.; REPORTS, b. Phyto-assisted synthesis, characterization and applications of gold nanoparticles—A review. 11, p. 46-57, 2017.

SCHNEID, A. d. C.; SILVEIRA, C. P.; GALDINO, F. E.; FERREIRA, L. F. *et al.* Colloidal stability and redispersibility of mesoporous silica nanoparticles in biological media. 36, n. 39, p. 11442-11449, 2020.

SELVARAJ, P.; NEETHU, E.; RATHIKA, P.; JAYASEELI, J. P. R. *et al.* Antibacterial potentials of methanolic extract and silver nanoparticles from marine algae. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, p. 101719, 2020/09/01/ 2020.

SENGER, M. R.; SEIBT, K. J.; GHISLENI, G. C.; DIAS, R. D. *et al.* Aluminum exposure alters behavioral parameters and increases acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. 27, p. 199-205, 2011.

SHAALAN, E. A.-S.; CANYON, D.; YOUNES, M. W. F.; ABDEL-WAHAB, H. *et al.* A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. 31, n. 8, p. 1149-1166, 2005.

SHANMUGANATHAN, R.; BRINDHADEVI, K.; AL-ANSARI, M. M.; AL-HUMAID, L. *et al.* In vitro investigation of silver nanoparticles synthesized using *Gracilaria verucosa* – A seaweed against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. *Environmental Research*, 227, p. 115782, 2023/06/15/ 2023.

SHETTY, P.; SUPRAJA, N.; GARUD, M.; PRASAD, T. N. V. K. V. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of *Alstonia scholaris* bark-extract-mediated silver nanoparticles. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 4, n. 4, p. 161-170, 2014/12/01 2014.

SHOBA, V. J. I. J. Z. A. B. Biochemical status and histological changes of *Catharanthus roseus* ethanolic leaves extract against mosquito larvae *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). 3, n. 2, p. 352-358, 2018.

SILVA, D. L. d. Aplicação de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas na identificação de substâncias obtidas de algas marinhas de dois estados do Nordeste brasileiro. 2014.

SILVA, L. L. S.; SILVA, S. C. C.; DE OLIVEIRA, A. P. S.; DA SILVA NASCIMENTO, J. *et al.* Effects of a solid formulation containing lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds on egg hatching and development of *Aedes aegypti* larvae. 214, p. 105789, 2021.

SINGH, H.; DU, J.; SINGH, P.; YI, T. H. Role of green silver nanoparticles synthesized from *Symphytum officinale* leaf extract in protection against UVB-induced photoaging. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 8, n. 3, p. 359-368, 2018/09/01 2018.

SLAVIN, Y. N.; ASNIS, J.; HNFELI, U. O.; BACH, H. J. J. o. n. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. 15, p. 1-20, 2017.

SMITH, D. J. J. N. Characterization of nanomaterials using transmission electron microscopy. 37, p. 1-29, 2015.

SRI RAMKUMAR, S. R.; SIVAKUMAR, N.; SELVAKUMAR, G.; SELVANKUMAR, T. *et al.* Green synthesized silver nanoparticles from *Garcinia imberti* bourd and their impact on root canal pathogens and HepG2 cell lines. RSC Advances, 7, n. 55, p. 34548-34555, 2017. 10.1039/C6RA28328D.

TAMULY, C.; HAZARIKA, M.; BORAH, S.; DAS, M. R. *et al.* In situ biosynthesis of Ag, Au and bimetallic nanoparticles using *Piper pedicellatum* C.DC: green chemistry approach. Colloids Surf B Biointerfaces, 102, p. 627-634, Feb 1 2013.

THEIVASANTHI, T.; ALAGAR, M. J. a. p. a. Electrolytic synthesis and characterizations of silver nanopowder. 2011.

ULM, L.; KRIVOHLAVEK, A.; JURAŠIN, D.; LJUBOJEVIĆ, M. *et al.* Response of biochemical biomarkers in the aquatic crustacean *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. 22, p. 19990-19999, 2015.

VIANA, V.; MACHADO, F.; ESTEVES, R.; DUARTE, J. *et al.* Green Nanobioinsecticide of a Brazilian endemic plant for the *Aedes aegypti* control. 32, p. 100992, 2023.

VIMALA, R.; SATHISHKUMAR, G.; SIVARAMAKRISHNAN, S. J. S. A. P. A. M.; SPECTROSCOPY, B. Optimization of reaction conditions to fabricate nano-silver using *Couroupita guianensis* Aubl.(leaf & fruit) and its enhanced larvicidal effect. 135, p. 110-115, 2015.

VINOTH, S.; SHANKAR, S. G.; GURUSARAVANAN, P.; JANANI, B. *et al.* Anti-larvicidal Activity of Silver Nanoparticles Synthesized from *Sargassum polycystum* Against Mosquito Vectors. Journal of Cluster Science, 30, n. 1, p. 171-180, 2018.

VUITIKA, L.; PRATES-SYED, W. A.; SILVA, J. D. Q.; CREMA, K. P. *et al.* Vaccines against emerging and neglected infectious diseases: an overview. 10, n. 9, p. 1385, 2022.

WANG, W.; CHEN, Q.; JIANG, C.; YANG, D. *et al.* One-step synthesis of biocompatible gold nanoparticles using gallic acid in the presence of poly-(N-vinyl-2-pyrrolidone). 301, n. 1-3, p. 73-79, 2007.

WHO. World Health Organization-Dengue and severe dengue. 2023.

ZHOU, W.; IKUHARA, Y. H.; ZHENG, Z.; WANG, K. *et al.* 17 - Transmission electron microscopy (TEM) studies of functional nanomaterials. *In:* TEWARY, V. K. e ZHANG, Y. (Ed.). **Modeling, Characterization, and Production of Nanomaterials (Second Edition)**: Woodhead Publishing, 2023. p. 467-512.

ZOHRA, T.; KHALIL, A. T.; SAEED, F.; LATIF, B. *et al.* Green Nano-Biotechnology: A New Sustainable Paradigm to Control Dengue Infection. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2022, p. 3994340, 2022/08/08 2022.

10 ANEXO A - CADASTRO SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 83014-1	Data da Emissão: 13/05/2022 11:42:48	Data da Revalidação*: 13/05/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: MATHEUS ALVES SIQUEIRA DE ASSUNCAO	CPF: 421.448.838-58
Título do Projeto: Coleta de algas marinhas na praia de Serrambi, município do Ipojuca - PE.	
Nome da Instituição: FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de Material Biológico (Algas Marinhas)	04/2022	01/2027

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, possessor ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Deve-se observar as as recomendações de prevenção contra a COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
3	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
4	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
9	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
10	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0830140120220513

Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 83014-1	Data da Emissão: 13/05/2022 11:42:48	Data da Revalidação*: 13/05/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: MATHEUS ALVES SIQUEIRA DE ASSUNCAO	CPF: 421.448.838-58
Título do Projeto: Coleta de algas marinhas na praia de Serrambi, município do Ipojuca - PE.	
Nome da Instituição: FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

Observações e ressalvas

11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
----	--

Outras ressalvas

1	CEPENE Tamandaré/PE
---	---------------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Praia de Serrambi	Ipojuca-PE	Marinho	Não	Dentro de UC Municipal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Padina	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Bryopsis	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Sargassum	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Gracilaria	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Tricleocarpa	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Caulerpa	-
7	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Penicillus	-

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

A quantidade significa: por espécie X localidade X ano.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0830140120220513

Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 83014-1	Data da Emissão: 13/05/2022 11:42:48	Data da Revalidação*: 13/05/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: MATHEUS ALVES SIQUEIRA DE ASSUNCAO	CPF: 421.448.838-58
Título do Projeto: Coleta de algas marinhas na praia de Serrambi, município do Ipojuca - PE.	
Nome da Instituição: FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Vegetais hidróbios)	Outras amostras biológicas(Coleta de amostra marinha (algas marinhas))

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0830140120220513

Página 3/4

11 ANEXO B - CADASTRO SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Remessa
Cadastro Nº R6B32A6

A atividade de remessa de amostra de patrimônio genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	R6B32A6
Usuário:	Fiocruz
CPF/CNPJ:	33.781.055/0001-35
Espécie:	Sargassum vulgare
Tipo do Patrimônio Genético remetido:	Extratos vegetais, animais ou fúngicos
Forma do Patrimônio Genético remetido:	Outra
Variedade tradicional local ou crioula ou Raça localmente adaptada ou crioula:	Não
<hr/>	
Espécie:	Caulerpa sertularioides
Tipo do Patrimônio Genético remetido:	Extratos vegetais, animais ou fúngicos
Forma do Patrimônio Genético remetido:	Outra
Variedade tradicional local ou crioula ou Raça localmente adaptada ou crioula:	Não
<hr/>	
Espécie:	Caulerpa chemnitzia
Tipo do Patrimônio Genético remetido:	Extratos vegetais, animais ou fúngicos
Forma do Patrimônio Genético remetido:	Outra
Variedade tradicional local ou crioula ou Raça localmente adaptada ou crioula:	Não
<hr/>	
Espécie:	Padina gymnospora
Tipo do Patrimônio Genético remetido:	Extratos vegetais, animais ou fúngicos
Forma do Patrimônio Genético remetido:	Outra
Variedade tradicional local ou crioula ou Raça localmente adaptada ou crioula:	Não
<hr/>	
Espécie:	Bryopsis pennata
Tipo do Patrimônio Genético remetido:	Extratos vegetais, animais ou fúngicos
Forma do Patrimônio Genético remetido:	Outra
Variedade tradicional local ou crioula ou Raça localmente adaptada ou crioula:	Não
<hr/>	

Espécie:	Gracilaria cervicornis
Tipo do Patrimônio Genético remetido:	Extratos vegetais, animais ou fúngicos
Forma do Patrimônio Genético remetido:	Outra
Variedade tradicional local ou crioula ou Raça localmente adaptada ou crioula:	Não

Instituição Destinatária:	UNIVERSIDADE DE COIMBRA (UC)
Sede da Instituição Destinatária:	Rua Sílvio Lima, sem número, Pólo II, Pinhal de Marrocos, Universidade de

Data de Cadastro: **14/04/2023 11:48:10**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:49** de **14/04/2023**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

12 ANEXO C – DECLARAÇÃO MOBILIDADE ACADÊMICA – FACEPE



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Matheus Alves Siqueira de Assunção, CPF: 421.448.838-58**, foi beneficiário(a) de um **Auxílio à Mobilidade Discente**, da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE, com processo **AMD-0086-2.10/22**, para desenvolvimento do projeto: **“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NANBIOTECNOLÓGICO DE ALGAS MARINHAS DO LITORAL PERNAMBUCANO SOBRE O CICLO DE VIDA DO *Aedes aegypti*”** no período de 28/02/2023 a 27/05/2023.

Recife, 18 de Dezembro de 2023

Este documento foi assinado digitalmente. Para validar este documento acesse o link <https://agil.facepe.br/verificarDecl.php?id=fa089306-85d1-71f7-5b56-2ae891e65ca9> ou utilize o código QR:



13 ANEXO D – CARTA DE ACEITE MOBILIDADE - COIMBRA



CARTA DE ACEITAÇÃO LETTER OF ACCEPTANCE

Eu, abaixo assinada, Lilliana Moreira, Chefe da Divisão de Relações Internacionais da Universidade de Coimbra, confirmo que **Matheus Alves Siqueira de Assunção**, portador do Passaporte nº GB493535, natural da República Federativa do Brasil, foi aceite para realizar um período de investigação, sob a orientação científica da Prof.^a Doutora Mara Elga Medeiros Braga, no laboratório *Green and Sustainable Processes (GSP)*, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, de 28 de fevereiro de 2023 a 27 de maio de 2023.

*I, the undersigned, Lilliana Moreira, Head of the International Relations Unit of the University of Coimbra, confirm that **Matheus Alves Siqueira de Assunção**, bearer of the passport nº GB493535, from Brazil, was accepted for an investigation period at the laboratory Green and Sustainable Processes (GSP), Faculty of Science and Technology, University of Coimbra, under the scientific supervision of Professor Mara Elga Medeiros Braga from the 28th of February 2023 to the 27th of May 2023.*

Coimbra, 12 de dezembro de 2022
Coimbra, 12th of December 2022

A Chefe da Divisão de Relações Internacionais
The Head of the International Relations Unit



ACD/LM

RI133-22-002987

14 ANEXO E – CARTA DE ACEITE MOBILIDADE - GSP



INFORMAÇÃO

Para os devidos efeitos, declara-se que o aluno de mestrado, Matheus Alves Siqueira de Assunção, RG: 44.425.772-X/SSP, CPF: 421.448.838-58, Passaporte: GB493535, matriculado no curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz Pernambuco (Fiocruz-PE), Brasil, do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular (LIBM), orientado pelo professor Doutor Fábio Rocha Formiga, co-orientado pelo professor Doutor Severino Alves Júnior (Universidade Federal de Pernambuco - UFPE), foi aceito no no laboratório Green e Sustainable Processes (GSP) do Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (DEQ-FACTUC), Coimbra, Portugal, para a realização de atividades de investigação científica, num estágio de três meses (28/02/2023 à 28/05/2023).

Nesta missão o aluno irá executar uma etapa do seu projeto de mestrado intitulado **“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NANBIOTECNOLÓGICO DE ALGAS MARINHAS DO LITORAL PERNAMBUCANO SOBRE O CICLO DE VIDA DO *Aedes aegypti*”**, para aprendizagem de técnicas de caracterização físico-química dos extratos de algas marinhas e das amostras desenvolvidas no âmbito do seu mestrado.

A proposta de investigação e respetivo plano de trabalho será supervisionado pela Doutora Mara Elga Medeiros Braga, investigadora no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, e pertencente ao Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta (CIEPQPF).

Mais se informa que, e durante a sua estadia, todas as condições materiais exigidas/necessárias (com a exceção de bolsas, seguros, subsídios, moradia e despesas de viagens) serão providenciadas pelo GSP.

Coimbra, 21 de Novembro de 2022

Assinado por: **HERMÍNIO JOSÉ CIPRIANO DE SOUSA**
 Num. de Identificação: 08544715
 Data: 2022.11.19 13:56:50+00'00'



Hermínio José Cipriano de Sousa

(Professor Associado do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra)

Assinado por: **MARA ELGA MEDEIROS BRAGA**
 Num. de Identificação: 31432329
 Data: 2022.11.21 12:51:19+00'00'

Mara Elga Medeiros Braga

(Investigadora Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra)

15 ANEXO F - CARTA PREMIAÇÃO – CEBEM

Rosario, September 29th 2023

To whom it may concern,

Hereby, as general coordinator of the Center for Structural Biology of the Mercosur (CEBEM), I certify that Matheus Alves Siqueira de Assunção was selected in the 2022 call for CEBEM mobility fellowships for access to research infrastructure and the promotion of scientific collaborations. Thus, Matheus Alves Siqueira de Assunção received from CEBEM the sum of 2200 USD, to work on the project "Evaluation of the Nanobiotechnological Potential of Marine Algae from the Pernambuco Coast on the Life Cycle of *Aedes aegypti*".

Sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Natalia Lisa', is written over a horizontal blue line.

Dr. María Natalia Lisa
General Coordinator of CEBEM

16 ANEXO G – DECLARAÇÃO UTILIZAÇÃO CNPEM

03/10/2023, 19:59

sauonline.cnpem.br/duo/duo_view_permanence.php?VISITID=11367&MANAGER=27



SAU - SERVIÇOS DE APOIO AOS USUÁRIOS

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que MATHEUS ALVES SIQUEIRA DE ASSUNÇÃO esteve no Laboratório Nacional de Nanotecnologia - LNNano, entre os dias 18/06/2023 a 02/07/2023 realizando medidas como pesquisador(a) pela proposta de pesquisa abaixo:

Proposta de Pesquisa	Título	Data de Realização
Nanotox-20230212	TOXICITY EVALUATION OF AgNPs SYNTHESIZED WITH MARINE ALGAE EXTRACTS FROM THE COAST OF PERNAMBUCO ON NON-TARGET SPECIES	18/06/2023 a 02/07/2023

Atenciosamente,

 Serviços de Apoio aos Usuários

The Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM) is a private, non-profit organization overseen by the Ministry of Science, Technology, and Innovation (MCTI). Address: Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 - Polo II de Alta Tecnologia - Caixa Postal 6192 - 13083-100 Campinas/SP | Phone: +55.19.3512.1000 | diretoriageral@cnpem.br | www.cnpem.br

