

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Jeferson do Rosário Almeida

**“Integração de Nanomateriais na Parede Celular de Fungos
Filamentosos para Produção de Materiais Biohíbridos e
Biomiméticos”**

VIRTUTE SPIRITUS

1808

SALVADOR-BA
Julho de 2019

Jeferson do Rosário Almeida

**“Integração de Nanomateriais na Parede Celular de Fungos
Filamentosos para Produção de Materiais Biohíbridos e
Biomiméticos”**

**Tese apresentada à Universidade Federal da
Bahia, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Química, para a obtenção
do título de Doutor em Química.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcos Malta
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Geris**

**SALVADOR-BA
Julho de 2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Almeida, Jeferson Rosario
Integração de Nanomateriais na Parede Celular de
Fungos Filamentosos para Produção de Materiais
Biohíbridos e Biomiméticos / Jeferson Rosario Almeida.
-- Salvador, 2019.
162 f. : il

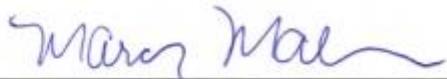
Orientador: Marcos Malta dos Santos.
Coorientadora: Regina Geris.
Tese (Doutorado - Programade pós-graduação em
Química) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto
de Química, 2019.

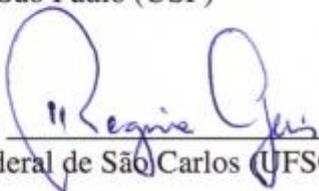
1. Fungos filamentosos. 2. Ln-MOFs. 3. Titanatos
nanoestruturados. 4. Materiais biohíbridos. 5.
Materiais biomórficos. I. dos Santos, Marcos Malta.
II. Geris, Regina. III. Título.

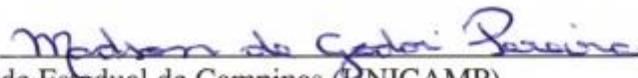
TERMO DE APROVAÇÃO
JEFERSON DO ROSARIO ALMEIDA

“INTEGRAÇÃO DE NANOMATERIAIS NA PAREDE CELULAR DE FUNGOS
FILAMENTOSOS PARA PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOHÍBRIDOS E
BIOMIMÉTICOS”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

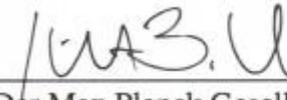
Prof. Dr. Marcos Malta dos Santos 
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof.^a. Dr.^a. Regina Maria Geris dos Santos 
Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Madson de Godoi Pereira 
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Antonio Ferreira da Silva 
Doutorado em Física, LINKOPING UNIVERSITY
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus 
Doutorado em Bioquímica Vegetal e Biologia Molecular, Wageningen University
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Hamilton Brandão Varella de Albuquerque 
Doutorado em Ciências Naturais, Fritz Haber Institut Der Max Planck Gesellschaft/Freie
Universitat Berlin
Universidade de São Paulo

Salvador, 26 de julho de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais Valdemiro (*in memoriam*) e Luiza, à minha esposa Renata e meus filhotes e, também a todos os meus irmãos e sobrinhos, que sempre me apoiaram e me acompanharam em todos os momentos da minha vida.

“Nenhum atleta será coroado, se não tiver lutado
segundo as regras.” São Paulo, II Timóteo 2,5.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por sempre me fortalecer com o testemunho do seu filho Jesus que todos os dias me ensina a ser pessoa no sentido mais sublime dessa palavra.

A Renata (esposa) e aos meus filhos (João Miguel e Maria Cecília) que me motivam a prosseguir sempre, só por estarem na minha vida!

Aos meus pais Valdemiro (in memória) e Luiza que sempre acreditaram em mim e a minha grande família pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Marcos Malta e Profa. Regina Geris, pela orientação, e principalmente pelas pessoas que são: muito simples, dedicados, competentes, compreensivos e pacientes.

Ao Prof. Severino Alves Junior e ao Dr. Leonis Lourenço da Luz, ambos da UFPE, pela colaboração em todas as partes do trabalho dos biohíbridos luminescentes.

Ao programa de Pós-graduação em Química da UFBA e ao corpo docente, pela oportunidade de crescimento científico.

Ao Instituto Federal Baiano por me conceder um período de afastamento para capacitação docente durante dois anos, e ao IFBaiano-Campus Catu pelo suporte nas técnicas de espectroscopia molecular na região do infravermelho e difração de raios-x permitindo a apresentação importantes resultados no desenvolvimento e defesa da presente tese.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), nas pessoas de Maria Lúcia Vieira Moreno, Adriana Lanfredi Rangel e Cláudio Pereira Figueira, pelo auxílio nas etapas de secagem dos bio-híbridos preparados, nas imagens de microscopia eletrônica transmissão e microscopia óptica de fluorescência.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da UFBA (LAMUME), pela realização de imagens de microscopia eletrônica de varredura realizada pela estudante de doutorado e colaboradora ímpar, Jéssica Guerreiro.

Aos amigos que fazem parte do LBQM: Verônica, Messias, Camila, Leonardo, Ícaro, Letícia, Mauricio, Marina, Sara, pela amizade sincera e pelo apoio, regado à muitas resenhas.

Ao contribuinte brasileiro, que com os pagamentos dos impostos viabilizou a criação de órgãos fomentadores de pesquisa, no meu caso a CAPES que financiou 3 anos de bolsa, que através do suporte financeiro concedido possibilitou a execução desse trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
SUMÁRIO.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1 Introdução.....	18
REFERÊNCIA	24
CAPÍTULO 1	28
2 ESTRUTURAS METAL-ORGÂNICAS E BIOHÍBRIDOS LUMINESCENTES	28
2.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	28
2.1.1 Redes Metal-Orgânicas.....	28
2.1.2 Redes Metal-Orgânicas de Lantanídeos – Ln-MOFs.....	34
2.1.3 Materiais Biohíbridos.....	38
2.1.4 Fungos Filamentosos.....	42
2.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	49
2.2.1 Reagentes.....	49
2.2.2 Produção de Biohíbridos com Ln-MOFs.....	49
2.2.3 Secagem de Ponto Crítico.....	50
2.2.4 Propriedades Luminescentes das Ln-MOFs em Solução Salina e Contendo Aminoácidos	51
2.2.5 Ensaios de Viabilidade Celular	51
2.3 CARACTERIZAÇÕES.....	53
2.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	53
2.3.2 Microscopia Óptica de Luminescência.....	53
2.3.3 Espectroscopia de Luminescência de Estado Sólido	53
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
2.5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	76

REFERÊNCIAS.....	78
3 TITANATOS NANOESTRUTURADOS E MATERIAIS BIOMÓRFICOS	87
3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	87
3.1.1 Derivados de Óxido de Titânio Nanoestruturado.....	87
3.1.2 Síntese de Materiais Biomórficos	98
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	103
3.2.1 Reagentes.....	103
3.2.2 Produção de Biohíbridos com Óxidos de Titânio (<i>P.m</i> -TiO ₂).....	103
3.2.3 Produção de Materiais Biomórficos a partir do Biohíbrido <i>P.m</i> -TiO ₂	104
3.2.4 Produção de Biohíbridos com TiO ₂ /WO ₃ e de Biohíbridos com TiO ₂ /V ₂ O ₅ com Diferentes Quantidades de Pentóxido de Vanádio	104
3.2.5 Produção de Materiais Biomórficos a partir do Biohíbrido <i>P.m</i> -TiO ₂ /WO ₃ (ou <i>P.m</i> -TiO ₂ /V ₂ O ₅).....	105
3.2.6 Produção de Materiais Biomórficos a partir do Biohíbrido <i>P.m</i> -TiO ₂ /V ₂ O ₅ Empregando Diferentes Concentrações da Solução de NaOH.....	105
3.3 CARACTERIZAÇÕES.....	107
3.3.1 Difração de Raios X - DRX	107
3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de absorção de raios-X por energia dispersiva	107
3.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	107
3.3.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR.....	108
3.3.5 Espectroscopia Raman.....	108
3.4 RESULTADO E DISCUSSÕES.....	109
3.5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	131
REFERÊNCIAS.....	133
APÊNDICE I.....	143
APÊNDICE II	144
ANEXO I.....	147
APÊNDICE III	157
APÊNDICE IV	159

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Diagrama da importância relativa de vários materiais em diferentes períodos..	19
Figura 1.2 -Diferentes escalas de interações dos componentes biológicos que compõem o osso..	21
Figura 2.1.1 - Representação esquemática da formação de redes metal-orgânicas com uma, duas e três dimensões.	26
Figura 2.1.2 – Exemplos de componentes orgânicos utilizados na síntese de MOFs.	27
Figura 2.1.3 – Exemplos de unidades de construção secundárias. As esferas de cor preta, vermelha, verde, amarelo representam os átomos do metal, carbono, oxigênio e nitrogênio, respectivamente.	28
Figura 2.1.4 - Combinação ente $Zn_4O(CO_2)_6$ SBU e ligante ácido 1,4-benzendicarboxílico com diferentes substituições para formar a MTV-MOF-5. (a) SUBs, (b) representação molecular e (c) topológica em duas dimensões.	29
Figura 2.1.5 - Diferentes métodos de preparação de MOFs. (a) Método hidro ou solvotermal, (b) método mediado por micro-ondas, (c) método sonoquímico, (d) método eletroquímico e (e) método mecânico-químico.	30
Figura 2.1.6 - Ácido melítico e ânion melitato exibindo modos de coordenação observados em compostos metal-melitato.	33
Figura 2.1.7 – Diagrama de Jablonski da representação esquemática de processos foto-físicos observados (b) nas redes metal-orgânicas íons lantanídeos e (b) as transições observadas na emissões de MOFs de európio e térbio.	34
Figura 2.1.8 - Exemplos de materiais biohíbridos.	37
Figura 2.1.9 – Representação esquemática do (a) micélio fúngico, b) de hifas septadas e (c) hifas não-septadas.	40
Figura 2.1.10 - Representação esquemática mostrando de uma forma geral a reprodução sexuada e assexuada de fungos.	41
Figura 2.1.11 - Etapas da germinação em fungos filamentosos: (a) Etapas de expansão isotrópica e polarizada durante o desenvolvimento das hifas. (b) Gráfico mostrando o surgimento das hifas em função do tempo.	43
Figura 2.1.12 - Disposição esquemática da estrutura da parede celular de fungos filamentosos.	44
Figura 2.4.1 - Micrografias de MEV das partículas de Eu-MOF após sonicação durante 2 h.	56

Figura 2.4.2 - Micrografias de MEV do fungo <i>A. niger</i> nativo (a) com 5000X de aumento e do seu biohíbrido <i>A. niger</i> /Tb-MOF (b) com 10000X de aumento, (c) <i>P. macrosporus</i> /Eu-MOF com 500X de aumento e (d) <i>Trich</i> /Tb-MOF com 1000X de aumento.....	57
Figura 2.4.3 - Micrografias de MEV do fungo <i>P. macrosporus</i> /Eu-MOF com 10 000X de aumento.	58
Figura 2.4.4 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência para (a) <i>A.n</i> /Tb-MOF, (b) <i>A.n</i> /Eu-MOF, (c) <i>Trich</i> /Tb-MOF e (d) <i>Trich</i> /Eu-MOF.....	63
Figura 2.4.5 - Micrografias dos biohíbridos fungos/Ln-MOFs em campo claro, fluorescência e sobreposição das duas primeiras imagens. Magnificação de 100x e barra de 10 μ m.....	64
Figura 2.4.6 - Imagem confocal de varredura a laser do An/Tb-MOF: (a) hifa não recoberta contendo partículas de Tb-MOF internalizada e armazenadas em vários vacúolos, (b) destaque para os vacúolos fluorescentes, (c) e (d) reconstrução 3D de (b) destacando a localização interior de objetos luminescentes na estrutura tubular do fungo, escala de 10 μ m.	66
Figure 2.4.7 - Espectros de emissão de (a) estado estacionário (SS) para Tb-MOF em 312 nm (linha verde) e 405 (linha azul) e (b) de SS para An/Tb-MOF em 312 nm (linha verde), em 405 nm (linha azul) e resolvido no tempo (TR) em 405 nm (linha cinza). Para a aquisição do espectro resolvido no tempo, o intervalo do flash foi de 0.05 ms com a janela da amostra 0.2 ms, sendo considerado a contagem de 100 flashes.....	67
Figura 2.4.8 - (a) Intensidade de emissão integrada relativa de Tb-MOF na presença de sais e aminoácidos. I ₀ e I representam a intensidade da emissão integrada da suspensão de Tb-MOF em água sem os sais e/ou aminoácidos, respectivamente. b) Espectro de absorção das soluções de aminoácidos e (c) Espectro de emissão da Eu-MOF na presença de sais e aminoácidos. ..	69
Figure 2.4.9 - Imagens das placas de 96 poços para a realização dos ensaios de atividade biológica. (a) Placas no início da incubação dos sistemas e (b) após 24 h de incubação.....	73
Figure 2.4.10 - (a) Imagem da placa de Petri usada para os ensaios de crescimento radial dos fungos. As linhas tracejadas e numeradas de cor azul indicam os eixos utilizados na coleta das medidas. (b) Gráfico de barras do diâmetro de crescimento radial das colônias de fungos durante 9 dias.....	74
Figure 2.4.11 - Imagem digital do crescimento radial das colônias de <i>Trichoderma ssp</i> e dos seus biohíbridos em placas de Petri durante três dias mostrando o crescimento similar das	

três amostras. As Imagens obtidas através da luz UV foram aumentadas para melhor visualização.....	75
Figura 3.1.1 - Diferentes morfologias de materiais derivados do óxido de titânio. (a) nanotubos de titanato de hidrogênio (Fonte: DU <i>et al.</i> , 2001) (b) nanobastões de óxido de titânio (rutilo) (Fonte: ZHANG; GAO, 2003), (c) nanocubos de óxido de titânio (anatase) (Fonte: DO <i>et al.</i> , 2018), (d) nanofios de polititanato de potássio (Fonte: SHAHID <i>et al.</i> , 2014) e (e) nanofitas de titanato de hidrogênio (Fonte: MA <i>et al.</i> , 2005).....	89
Figura 3.1.2 – Exemplo de estrutura lamelar dos titanatos.	90
Figura 3.1.3 - Diagrama de fase morfológico da óxido de titânio nas fases anatase, rutilo e da mistura das fases anatase (75%) e rutilo (25%) (Degussa P25).	92
Figure 3.1.4 - Faixa de temperatura para a formação de nanotubos e nanofibras obtidas com soluções de hidróxido de sódio e hidróxido de potássio.	93
Figura 3.1.5 - Rotas de síntese para a obtenção de titanatos nanoestruturados.	95
Figure 3.1.6 - Estrutura cristalina de titanatos nanoestruturados (a) monoclinica do trititanato de sódio e (b) ortorrômbica da lepidocrocita.....	98
Figure 3.1.7 – Exemplos de materiais biomórficos. (a, b) esferas de óxido de zinco obtidas via calcinação da bactéria <i>Streptococcus thermophilus</i> decorado ZnO (Fonte: ZHOU <i>et al.</i> , 2007). (c, d) frústulas de prata metálica preparadas via calcinação das frústulas da diatomácea <i>Synedra spp</i> revestida de Ag(s) (Fonte: PAYNE <i>et al.</i> , 2005). (e, f) microtubos de ouro produzidos via calcinação do fungo <i>Phialomyces macrosporus</i> recobertos com nanopartículas de ouro (Fonte: FONTES <i>et al.</i> , 2014).....	100
Figura 3.4.1 - (a) Difratoograma de raios -X de (1) TiO ₂ e (2) P.m/TiO ₂ . Micrografias eletrônica de varredura do P.m-TiO ₂ (b) 3000x de aumento e (c) 23000x de aumento.....	109
Figura 3.4.2 - Difratoograma de raios-X do biohíbridos P.m-TiO ₂ após tratamento hidrotérmico em meio alcalino.....	110
Figure 3.4.3 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do biohíbrido tratado hidrotermicamente em meio alcalino. (a) aumento de 350x, (b) 6000x (c) 8000x e (d) 23000x.	112
Figure 3.4.4 - Imagens do mapa elementar dos biohíbridos tratados hidrotermicamente em meio alcalino obtidos via espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	113

Figure 3.4.5 - Micrografias eletrônicas de transmissão do corte transversal de microtubos (a) com aumento de 8 000x, (b) com aumento de 150 000x e (c) com 250 000x.	114
Figure 3.4.6 - Espectro de infravermelho do <i>P.m-TiO₂</i> (a) e <i>P.m-NaTiNTs</i> (b).	115
Figure 3.4.7 - (a) <i>P.m-NaTiNTs/V₂O₅</i> , (I e II) imagens de MEV em aumentos de 2 500x e 10 000x, respectivamente e (III) espectro Raman. (b) <i>P.m-NaTiNTs/WO₃</i> , (I e II) imagens de MEV do tratado em aumentos de 2 500x e 10 000x, respectivamente e (III) espectro Raman. A = anatase e TN = Titanto nanoestruturado.	120
Figure 3.4.8 - (a) difratograma do <i>P.m-TiO₂-V₂O₅(25%)</i> e (b) espectro de infravermelho de (1) <i>P.m-TiO₂-V₂O₅(5%)</i> , (2) <i>P.m-TiO₂-V₂O₅(10%)</i> e (3) <i>P.m-TiO₂-V₂O₅(25%)</i>	121
Figure 3.4.9 - (a) <i>P.m-NaTiNTs/V₂O₅(5%)</i> (I e II) imagens de MEV em aumentos de 1100x e 10000x, respectivamente e (III) difratograma de raios-X. (b) <i>P.m-NaTiNTs/V₂O₅(10%)</i> , (I e II) imagens de MEV em aumentos de 1100x e 15000x, respectivamente e (III) difratograma de raios-X. (c) <i>P.m-NaTiNTs/V₂O₅(25%)</i> , (I e II) imagens de MEV em aumentos de 1200x e 16000x, respectivamente e (III) difratograma de raios-X.	123
Figure 3.4.10 - Micrografia de MEV de <i>NaTiNTs-V₂O₅(25%)</i> em (a) em aumento de 2000x e (b) em aumento de 40000x. (c) Difratograma de raios-X de <i>NaTiNTs-V₂O₅(25%)</i>	125
Figure 3.4.11 - (a) <i>P.m-NaTiNTs - 6,5 M</i> (I e II) imagens de MEV em aumentos de 6500x e 20000x, respectivamente e (III) difratograma de raios-X. (b) <i>P.m-NaTiNTs-7,5 M</i> , (I e II) imagens de MEV em aumentos de 6000x e 20000x, respectivamente e (III) difratograma de raios-X. b) <i>P.m-NaTiNTs-7,5 M</i> , (I e II) imagens de MEV em aumentos de 6000x e 20000x, respectivamente e (III) difratograma de raios-X.	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.4-1 - Tabela indicado os ângulos de difração e distância interplanar do Pm-TiO ₂ antes e depois do tratamento hidrotérmico em meio básico.....	111
Tabela 3.4-2 - Ângulos de reflexão e distancia interplanares dos sistemas P.m-NaTiNTs/V ₂ O ₅ (5%), P.m-NaTiNTs/V ₂ O ₅ (10%), P.m-NaTiNTs/V ₂ O ₅ (25%).	124
Tabela 3.4-3 - Ângulos de reflexão e distancia interplanares dos sistemas Pm-NaTiNTs preparados com soluções de NaOH 6,5, 7,5 e 8,0 mol L ⁻¹	128

LISTA DE ABREVIATURAS

A.n – *Aspergillus niger*

An-N – *Aspergillus niger nativo*

DRX – Difração de raios-X

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva

Eu-MOFs - redes metal-orgânica constituídas de íons melitato e íons európio

FT-IR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MOF – redes metal-orgânica (Metal Organic Framework)

Ln-MOFs – redes metal-orgânica de íons lantanídeos

P.m – *Phialomyces macrosporus*

P.m-N – *Phialomyces macrosporus nativo*

P.m-TiO₂ – Biohíbrido constituídos pelo *Phialomyces macrosporus* e pela fase anatase do dióxido de titânio.

P.m-NaTiNTs – material biomiméticos constituído de titanatos de sódio nanoestruturados obtidos via biohíbrido P.m-TiO₂

P.m-NaTiNTs/V₂O₅ – material biomiméticos constituído de titanatos de sódio nanoestruturados obtidos via biohíbrido P.m-TiO₂/V₂O₅

P.m-TiO₂/V₂O₅ - Biohíbrido constituídos pelo *Phialomyces macrosporus* e pela mistura do dióxido de titânio com pentóxido de vanádio.

P.m-TiO₂/WO₃ - Biohíbrido constituídos pelo *Phialomyces macrosporus* e pela mistura do dióxido de titânio com trióxido de tungstênio.

OMT – óxidos de metais de transição

Tb-MOFs - redes metal-orgânica constituídas de íons melitato e íons térbio

Trich – *Trichoderma spp*

Trich – N – *Trichoderma spp nativo*

RESUMO

A integração de partículas nanométricas na parede celular de fungos filamentosos tem se mostrado uma estratégia eficiente para a produção de materiais biohíbridos e biomórficos com propriedades interessantes. O presente trabalho, no primeiro capítulo, discuti a conversão de fungos não-luminescentes em luminescentes após a funcionalização da parede celular desses microrganismos com partículas de redes metal-orgânicas de íons lantanídeos (Tb-MOFs ou Eu-MOFs). Os biohíbridos luminescentes foram produzidos, cultivando os fungos das espécies *Aspergillus niger* (A.n), *Phialomyces macrosporus* (P.m) e *Trichoderma spp* (Trich) no meio nutritivo contendo Tb-MOFs ou Eu-MOFs. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), de microscopia óptica de fluorescência e medidas de espectroscopia luminescência indicaram que as MOFs foram integradas na parede celular dos fungos que apresentaram propriedades luminescentes artificiais. As imagens de microscopia óptica de fluorescência ainda revelaram que partículas de Tb ou Eu-MOFs, provavelmente menores do que 15 nm, foram internalizadas e armazenadas nos vacúolos fúngicos das três espécies. As partículas internalizadas apresentaram emissões com maiores intensidades, provavelmente devido à presença de substâncias como aminoácidos e proteína localizadas no vacúolo fúngico. A internalização de Tb ou Eu-MOFs abre um campo vasto para a aplicação desses materiais no tratamento de fungos infecciosos. No segundo capítulo da tese, foi explorado a transformação de óxido de titânio embebido na parede celular do fungo *P.m* em titanatos nanoestruturados biomiméticos. Para isso, o biohíbrido *P.m*-TiO₂ foi submetido a um tratamento hidrotérmico em meio alcalino (NaOH ~10 mol L⁻¹), na faixa de temperatura de 100-140°C. As medidas de difração de raios-X, associada as imagens de MEV, de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e dados de espectroscopia energia dispersiva de raios-X (EDS) mostraram a obtenção de microtubos, com tamanhos de 30 a 100 µm, constituídos de nanotubos de titanato de sódio. Alterações

na concentração da solução de NaOH no intervalo de 6,5 a 8,0 mol L⁻¹, levaram a formação de microtubos compostos por nanofitas de titanato de sódio. Um mecanismo tem sido proposto para a formação de nanofios e nanofitas na estrutura biomórfica que considera a lenta degradação de componentes da parede celular e adesivos que mantêm as partículas de TiO₂ ligadas a hifas fúngicas. A utilização de materiais biohíbridos como precursores de nanofitas de titanato é uma estratégia que garante um menor consumo de reagentes e de energia no processo de síntese, uma vez que, no método convencional, nanofitas de titanato de sódio são obtidas a partir de soluções de NaOH de aproximadamente 9,0 mol L⁻¹ e temperatura de 160 °C.

Palavras chaves: fungos filamentosos, Ln-MOFs, materiais biohíbridos, materiais biomórficos, titanatos nanoestruturados

ABSTRACT

The integration of nanometric particles in the filamentous fungi cell wall has been shown to be an efficient strategy to produce biohybrid and biomorphic materials with interesting properties. The present paper, in the first chapter, discussed the conversion of non-luminescent to luminescent fungi after the cell wall functionalization of these microorganisms with particles of metal-organic lanthanide ion networks (Tb-MOFs or Eu-MOFs). Luminescent biohybrids were produced by cultivating the fungi of the species *Aspergillus niger* (*A.n*), *Phialomyces macrosporus* (*P.m*) and *Trichoderma spp* (*Trich*) in the nutrient medium containing Tb-MOFs or Eu-MOFs. Scanning electron microscopy (SEM), fluorescence light microscopy, and luminescence spectroscopy images indicated that MOFs were integrated into the cell wall of fungi that had artificial luminescent properties. Fluorescence light microscopy images also revealed that particles of Tb or Eu-MOFs, probably smaller than 15 nm, were internalized and stored in the fungal vacuoles of the three species. The internalized particles presented higher intensity emissions, probably due to the presence of substances such as amino acids and proteins located in the fungal vacuole. The internalization of Tb or Eu-MOFs opens a vast field for the application of these materials in the treatment of infectious fungi. In the second chapter of the thesis, the transformation of titanium oxide embedded in the *P.m* fungus cell wall into biomorphic nanostructured titanates was explored. For this, the *P.m*-TiO₂ biohybrid was subjected to an alkaline hydrothermal treatment (NaOH ~ 10 mol L⁻¹) in the temperature range 100-140 ° C. X-ray diffraction measurements, associated with SEM, transmission electron microscopy (TEM) and X-ray dispersive energy spectroscopy (EDS) showed microtubes made up of sodium titanate nanotubes. Changes in NaOH solution concentration in the 6.5 to 8.0 mol L⁻¹ range led to the formation of microtubes composed of sodium titanate nanoribbons. A mechanism has been proposed for the formation of nanotubes and nanoribbons on the

biomorphic structure that considers the slow degradation of cell wall components and adhesives that keep TiO₂ particles attached to fungal hyphae. It is believed that to obtain the nanoribbons, the fungal cell wall components are degraded more slowly when the NaOH solution concentration is in the 6.5 to 8.0 mol L⁻¹ range. The use of biohybrid materials as precursors of titanate nanoribbons ensures lower reagent and energy consumption in the synthesis process, since sodium titanate nanaribbons, by conventional method, are obtained from NaOH solutions of approximately 9.0 mol L⁻¹ and a temperature of 160 ° C,

Key words: titanium oxide, filamentous fungi, Ln-MOFs, biohybrid materials, biomorphic materials, titanate nanotubes

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, a produção de materiais tem marcado profundamente a história de todos os seres vivos de um modo geral. Dados obtidos através de escavações arqueológicas permitiram inferir que o sucesso da evolução da espécie humana teve como um dos motores a arte de produção de ferramentas a partir dos materiais disponíveis (CALLISTER; RETHWISCH, 2008; SASS, 2011; VALIULIS, 2014). Com a confecção de ferramentas e objetos à base de pedras, ossos, madeira e pele de animais, o homem pré-histórico pôde adquirir alimentos, sobreviver ao lado de outros animais selvagens, desbravar e ocupar outras terras (DOBRZANSKI, 2006; SOBOYEJO; SRIVATSAN, 2006; SASS, 2011; VALIULIS, 2014). Assim, a chegada do homem pré-histórico à civilização foi alcançada, apoiada em grande parte, pelo uso, fabricação e aperfeiçoamento dos métodos de produção de materiais (DOBRZANSKI, 2006; SASS, 2011; VALIULIS, 2014).

O processo de fabricação de diversos tipos de materiais ao longo da história foi sendo tecnicamente especializado, o que contribuiu de maneira significativa para o gradual desenvolvimento da humanidade (DOBRZANSKI, 2006; SASS, 2011; ZHANG, 2012; VALIULIS, 2014). Não por acaso, vários períodos da história da humanidade receberam nomes de materiais (por exemplo, idade da pedra, do bronze, do ferro e do silício), os quais geraram profundas mudanças no modo de viver dos seres humanos (DOBRZANSKI, 2006; VALIULIS, 2014). Além disso, o desenvolvimento de materiais foi importante no surgimento, fortalecimento e/ou queda de várias nações (SASS, 2011; VALIULIS, 2014). A Figura 1.1 apresenta vários exemplos de materiais produzidos e a importância relativa nas épocas indicadas. Os materiais citados fazem parte de uma série de produtos comerciais que estão disseminados por todo o planeta, facilitando a vida dos seres humanos.

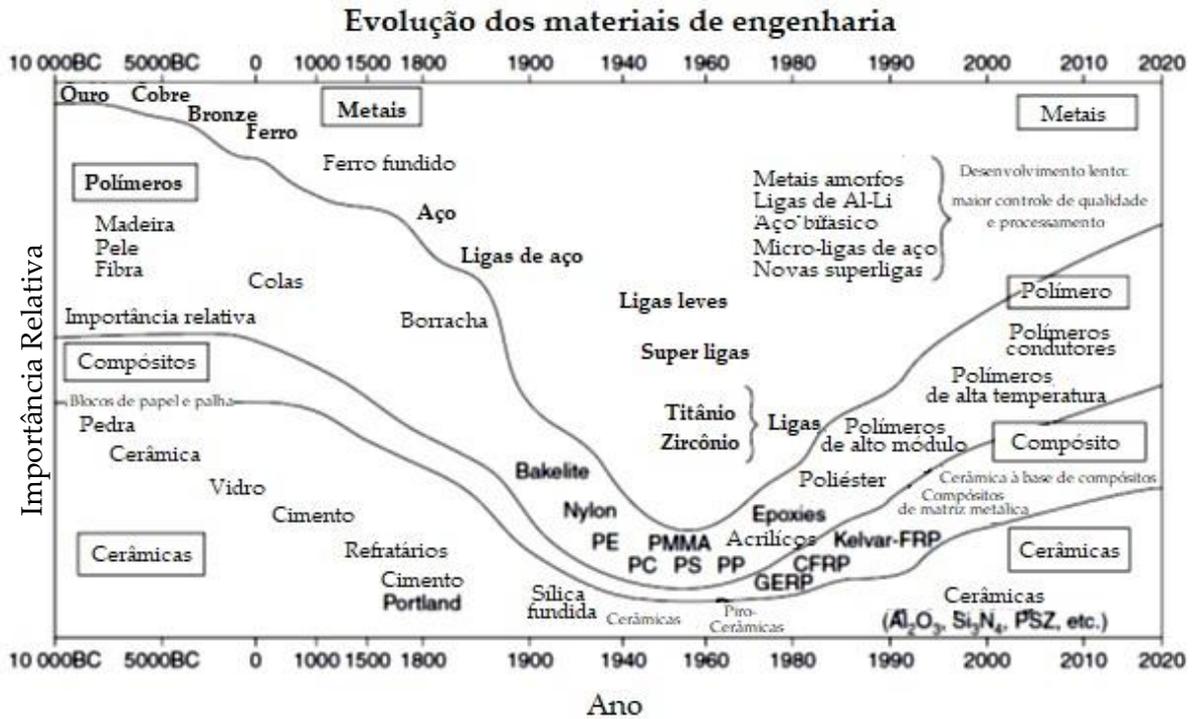


Figura 1.1 - Diagrama da importância relativa de vários materiais em diferentes períodos.
 Fonte: SOBOYEJO; SRIVATSAN, 2006.

Mesmo com todos os avanços alcançados pelo homem com a confecção de materiais, a nossa capacidade de inovar e de produzir novos materiais só aumenta. Os séculos XX e XXI, mais do que em qualquer outra época da história, vêm testemunhando uma explosão na síntese de novos materiais, com um destaque particular para a classe dos materiais avançados. A produção desses tipos de materiais tem se tornado uma política de estado em virtude do desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas em áreas fundamentais e estratégicas da sociedade como transportes, saúde, segurança, construção, armazenamento e conversão de energia (SOBOYEJO; SRIVATSAN, 2006; MOSKOWITZ, 2008). Além disso, os materiais avançados vem aquecendo a economia global, o que contribui para fortalecer ainda mais da hegemonia de um país (SOBOYEJO; SRIVATSAN, 2006; MOSKOWITZ, 2008; WEGST *et al.*, 2015).

Os materiais avançados podem ser considerados novos materiais (do ponto de vista da constituição química) ou simplesmente uma versão “atualizada” dos materiais comuns (metais, ligas metálicas, semicondutores, polímeros, compositos e

etc.) seguindo outra forma de usa-los e/ou novas combinações dos materiais existentes (ROONEY, 2000; CALLISTER; RETHWISCH, 2008). Esses materiais necessariamente apresentam performance superior em uma ou mais propriedades quando comparada com os materiais usuais (CURLEE; DAS, 1991; ROONEY, 2000; CALLISTER; RETHWISCH, 2008).

Um ponto de partida, adotado por muitos cientistas para o desenvolvimento de materiais avançados, segue a partir de uma investigação de materiais produzidos pela natureza. Essa inspiração, sugestivamente chamada de “bioinspiração”, é fundamentada em uma série de características próprias dos materiais biológicos que exibem morfologias e propriedades requisitadas para o desenvolvimento de novos materiais (DUJARDIN; MANN, 2002; SANCHEZ *et al.*, 2005; XIA; JIANG, 2008; WEGST *et al.*, 2015). A bioinspiração é justificada porque a natureza possui uma exímia habilidade de produzir materiais multifuncionais (DUJARDIN ; MANN, 2002; SANCHEZ *et al.*, 2005; XIA; JIANG, 2008; LIN; MAO, 2011; MEYERS *et al*, 2011; WEGST *et al.*, 2015).

Os materiais biológicos são formados por um número limitado de elementos químicos interagindo entre si, além de apresentar diferentes tamanhos e configurações estruturais (SANCHEZ *et al.*, 2005; MEYERS *et al*, 2011; WEGST *et al.*, 2015). Tanto as interações entre os blocos construtores, as quais ocorrem em múltiplas escalas de comprimento (desde a atômica até a macroscópica), quanto as diferentes orientações dessas estruturas, conferem aos materiais biológicos distintas propriedades que são fundamentais à sua durabilidade (XIA; JIANG, 2008; WEGST *et al.*, 2015). A Figura 1.2, por exemplo, mostra a complexidade das interações entre os componentes orgânico/inorgânico que formam os ossos e sua sofisticada engenharia de construção. A organização das moléculas de colágenos, constituída por fibras helicoidais, e dos nanocristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), formando placas distribuídas periodicamente ao longo das fibras de colágeno, faz com que a estrutura óssea seja mais resistente, mais leve e com propriedade de autorregeneração (WEGST *et al.*, 2015).

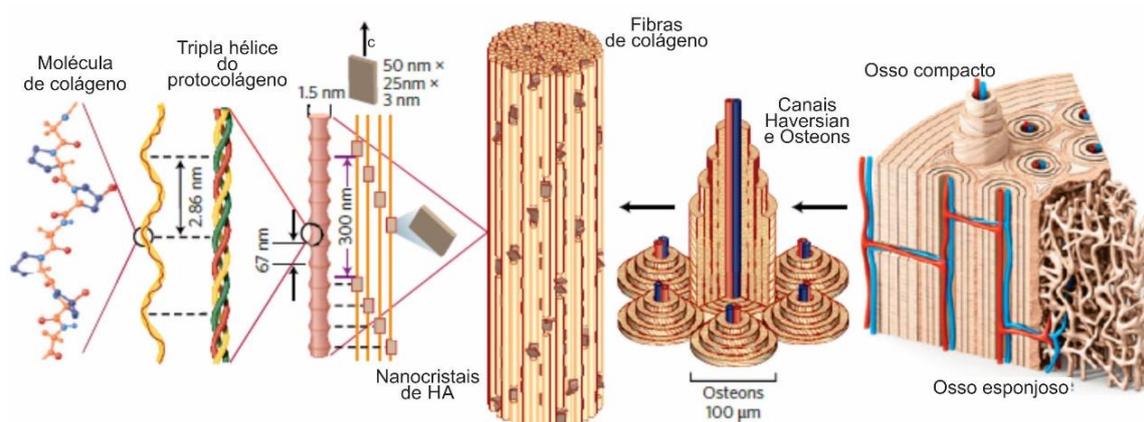


Figure 1.2 - Diferentes escalas de interações dos componentes biológicos que compõem o osso.
 Fonte: WEGST *et al.*, 2015.

Imitar a arquitetura dos materiais biológicos não é uma tarefa muito fácil devido às complexidades morfológicas das estruturas que compõem tais materiais e também em virtude das interações que ocorrem em diferentes escalas de comprimento (SANCHEZ *et al.*, 2005; XIA; JIANG, 2008; LIN; MAO, 2011; WEGST *et al.*, 2015). Além disso, os sistemas biológicos foram cunhados e aperfeiçoadas ao longo de milhões de anos como consequência de severas condições ambientais propiciando a evolução desses sistemas (WEGST *et al.*, 2015). Então, para contornar essas dificuldades, os cientistas têm empregado uma estratégia bem mais simples que é a de utilizar os materiais biológicos como moldes, sendo, portanto, chamados de biotemplates (ZHANG *et al.*, 2010; FAKHRULLIN; LVOV, 2012; MATHAPA; PAUNOV, 2014). Com a utilização de biotemplates é possível obter materiais inorgânicos biomiméticos (ou biomórficos). Esse processo pode ser realizado empregando-se métodos químicos de automontagem em meio aquoso (FAKHRULLIN; LVOV, 2012).

Vários trabalhos publicados na última década têm explorado essa estratégia de utilização de materiais biológicos para a produção de materiais inorgânicos biomiméticos. Por exemplo, madeira, casca de arroz, asas de borboleta, vírus, e células vivas - microrganismos (bactérias, fungos e algas) e até mesmo células de mamíferos - , têm sido empregados como biotemplates (FLYNN *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2010; SHARMA; SRIVASTAVA, 2013; MATHAPA; PAUNOV, 2014). Para a obtenção do

material inorgânico biomimético, o componente biológico tem de ser degradado (FLYNN *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2010; SHARMA; SRIVASTAVA, 2013; MATHAPA E PAUNOV, 2014). Assim, no final, resta somente o material inorgânico com a mesma morfologia do componente biológico.

Além da estratégia citada acima, a interação de materiais biológicos e não-biológicos (materiais inorgânicos ou orgânicos) pode ser utilizada para a preparação de materiais de híbridos. Esses novos materiais, também chamados de células ciborgues (FAKHRULLIN; LVOV, 2012), apresentam novas funcionalidades: as células vivas adquirem as propriedades físico-químicas dos materiais que às recobrem, enquanto que, os materiais depositados podem passar a fazer parte das funções biológicas das células vivas (JUNG *et al.*, 2011; FAKHRULLIN; LVOV, 2012; MATHAPA; PAUNOV, 2014). Nessa linha de atuação, por exemplo, vários tipos de microrganismos vêm sendo extensivamente explorados (DUJARDIN *et al.*, 2003; MARTIN *et al.*, 2014; FONTES *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2016).

Com relação aos materiais não-biológicos, nanopartículas metálicas (LI, 2003; BERRY; SARAF, 2005; BIGALL *et al.*, 2008; SABAH *et al.*, 2012; SABAH *et al.*, 2013; SHARMA; SRIVASTAVA, 2013; FONTES *et al.*, 2014), quantum-dots (MEI *et al.*, 2014; RISPAIL *et al.*, 2014), óxidos de metais de transição (LI *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2013; HWANG *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015) e polímeros (WANG *et al.*, 2015) têm sido largamente utilizados para funcionalização de microrganismos e formação de materiais biohíbridos.

Dentre os microrganismos empregados como biotemplates e componente biológico passível de funcionalização, os fungos ganham um notável destaque, em virtude de uma série de fatores tais como disponibilidade dos mesmos na região, custo baixo, morfologia microtubular de tamanho uniforme, facilidade de cultivo em uma ampla faixa de temperatura e pH (INGOLD ; HUDSON, 1993), e a existência de infraestrutura de trabalho adequada para a manipulação dos mesmos.

Assim, o presente trabalho discutirá a síntese e caracterização de materiais biohíbridos e biomiméticos, utilizando fungos filamentosos como o componente biológico e como biotemplates, respectivamente. A abordagem desenvolvida no Capítulo 1 envolve a funcionalização de fungos filamentosos com materiais chamados de redes metal-orgânicas (MOFs). Nesse capítulo, serão apresentadas as características gerais das MOFs, bem como, sua obtenção e propriedades físico-químicas, com destaque para as redes MOFs formadas a partir do ácido melítico e de cátions metálicos de térbio e európio. Ainda, no Capítulo 1, será apresentado uma ideia geral de como a funcionalização ocorre em microrganismos e como essa estratégia possibilita gerar materiais biohíbridos com propriedades semelhantes à de microrganismos encontrados na natureza. Em seguida, na parte de resultados e discussão, será visto como os biohíbridos preparados no presente trabalho possuem propriedades luminescentes e como partículas das MOFs internalizam na região intracelular dos fungos durante o desenvolvimento do microrganismo. A evidência da internalização de MOFs na célula fúngica traz, como perspectiva, investigações na área de tratamentos de fungos infecciosos.

Já o Capítulo 2 discorre sobre a transformação química do dióxido de titânio integrado na parede celular de fungos. Nesse capítulo serão discutidas as propriedades de óxidos de metais de transição nanoestruturados, ressaltando os titanatos nanoestruturados. Além disso, será apresentado como óxido de titânio é transformado em titanatos nanoestruturados. A motivação dessa parte da pesquisa surge de indagações sobre o que ocorre quando óxido de titânio embebido na parede celular de fungos é submetido ao mesmo tratamento químico empregado para obter titanatos nanoestruturados. Assim, será detalhado como os biohíbridos de fungo-TiO₂ originam titanatos nanoestruturados biomiméticos e como a parede celular fúngica influencia na mudança da morfologia dos titanatos nanoestruturados produzidos quando um dos parâmetros da síntese é alterado.

REFERÊNCIA

BERRY, V.; SARAF, R. F. Self-Assembly of Nanoparticles on Live Bacterium: An avenue to fabricate electronic devices. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 44, n. 41, p. 6668-6673, 2005.

BIGALL, N. C. et al. Fungal Templates For Noble-metal Nanoparticles and Their Application in Catalysis. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 47, n. 41, p. 7876-7879, 2008.

CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Fundamental of Materials Science and Engineering: An Integrated Approach**. 3, 2008.

CURLEE, T. R.; DAS, S. Advanced Materials - Information And Analysis Needs. **Resources Policy**, v. 17, n. 4, p. 316-331, 1991.

DOBRZANSKI, L. A. Significance Of Materials Science For The Future Development Of Societies. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 175, n. 1-3, p. 133-148, 2006.

DUJARDIN, E.; MANN, S. Bio-Inspired Materials Chemistry. **Advanced Materials**, v. 14, n. 11, p. 775-788, 2002.

DUJARDIN, E. *et al.* Organization Of Metallic Nanoparticles Using Tobacco Mosaic Virus Templates. **Nano Letters**, v. 3, n. 3, p. 413-417, 2003.

FAKHRULLIN, R. F.; LVOV, Y. M. "Face-Lifting" and "Make-Up" For Microorganisms: Layer-by-Layer Polyelectrolyte Nanocoating. **Acs Nano**, v. 6, n. 6, p. 4557-4564, 2012.

FLYNN, C. E. et al. Viruses As Vehicles For Growth, Organization And Assembly Of Materials. **Acta Materialia**, v. 51, n. 19, p. 5867-5880, 2003.

FONTES, A. M. et al. Bio-Inspired Gold Microtubes Based On The Morphology Of Filamentous Fungi. **Biomaterials Science**, v. 2, n. 7, p. 956-960, 2014.

HWANG, K.-J. et al. Synthesis And Characterization Of Hollow Tio₂ Fibers Using Ceiba Pentandra (L.) Gaertn. (Kapok) As A Natural Template. **Materials Letters**, v. 115, p. 265-267, 2014.

INGOLD, C. T.; HUDSON, H. J. The Biology of Fungi. 6th. **Springer Netherlands**, 1993.

- JUNG, J. H.; LEE, J. H.; SHINKAI, S. Functionalized Magnetic Nanoparticles As Chemosensors And Adsorbents For Toxic Metal Ions In Environmental And Biological Fields. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 9, p. 4464-4474, 2011.
- LI, D.; MATHEW, B.; MAO, C. Biotemplated Synthesis of Hollow Double-Layered Core/Shell Titania/Silica Nanotubes under Ambient Conditions. **Small**, v. 8, n. 23, p. 3691-3697, 2012.
- LI, L. et al. Entrapment Of Radioactive Uranium From Wastewater By Using Fungus-Fe₃O₄ Bio-Nanocomposites. **Rsc Advances**, v. 5, n. 52, p. 41611-41616, 2015.
- LI, Z. A. C. S.-W. A. N. J.-M. A. G. D. S. A. M. C. A. Living Templates for the Hierarchical Assembly of Gold Nanoparticles. **Angewandte Chemie**, v. 115, n. 20, p. 2408--2411, 2003.
- LIN, Y.; MAO, C. Bio-Inspired Supramolecular Self-Assembly Towards Soft Nanomaterials. **Frontiers of Materials Science**, v. 5, n. 3, p. 247-265, 2011.
- LIU, X. et al. Synthesis Of MnO₂ Nanorods From Sawdust Natural Template And Their Electrochemical Capacitive Behaviors. **Materials Letters**, v. 79, p. 39-41, 2012.
- MEYERS, P.-Y. C., LOPEZ, M. I., SEKI, Y., LIN, A. Y.M. Biological Materials: A Materials Science Approach. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 5, p. 626 - 657, 2011.
- MARTIN, M. *et al.* Artificial Magnetic Bacteria: Living Magnets at Room Temperature. **Advanced Functional Materials**, v. 24, n. 23, p. 3489-3493, 2014.
- MATHAPA, B. G.; PAUNOV, V. N. Fabrication Of Viable Cyborg Cells With Cyclodextrin Functionality. **Biomaterials Science**, v. 2, n. 2, p. 212-219, 2014.
- MEI, J. *et al.* The Interactions Between Cdse Quantum Dots And Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*: Adhesion Of Quantum Dots To The Cell Surface And The Protection Effect Of Zns Shell. **Chemosphere**, v. 112, p. 92-99, 2014.
- MOSKOWITZ, S. L. The Advanced Materials Revolution: Tecnology and Economic Growth in the Age of Globalization. **John Wiley & Sons Inc.**, 2008.
- RISPAIL, N. *et al.* Quantum Dot and Superparamagnetic Nanoparticle Interaction with Pathogenic Fungi: Internalization and Toxicity Profile. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 12, p. 9100-9110, 2014.
- ROONEY, M. A. R. J. C. A. M. G. M. A. R. B. M. Advanced Materials: Challenges and Opportunities. **Johns Hopkins Apl Technical Digest**, v. 21, n. 4, 2000.

- SABAH, A. *et al.* Growth Of Templated Gold Microwires By Self Organization Of Colloids On *Aspergillus Niger*. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 7, n. 2, p. 583-591, 2012.
- SABAH, A. *et al.* Visible-Light-Induced Directed Gold Microwires by Self-Organization of Nanoparticles on *Aspergillus Niger*. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 30, n. 5, p. 473-480, 2013.
- SANCHEZ, C.; ARRIBART, H.; GUILLE, M. M. G. Biomimetism And Bioinspiration As Tools For The Design Of Innovative Materials And Systems. **Nature Materials**, v. 4, n. 4, p. 277-288, 2005.
- SASS, S. L. The Substance of Civilization: Materials and Human History from the Stone Age to the Age of Silicon. **Skyhorse Publishing Company, Incorporated**, 2011.
- SHARMA, S.; SRIVASTAVA, S. Gold Microwires Based Amperometric Biosensor Exploiting Microbial Architecture. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 50, p. 174-179, 2013.
- SOBOYEJO, W. O.; SRIVATSAN, T. S. Advanced Structural Materials: Properties, Design Optimization, and Applications. **CRC Press**, 2006.
- VALIULIS, A. V. A History of Materials and Technologies Development. **Vilnius, Lithuania: VGTU leidykla Technika**, 2014.
- WANG, H. *et al.* Nano-Functionalized Filamentous Fungus Hyphae With Fast Reversible Macroscopic Assembly & Disassembly Features. **Chemical Communications**, v. 51, n. 40, p. 8524-8527, 2015.
- WEGST, U. G. K. *et al.* Bioinspired Structural Materials. **Nature Materials**, v. 14, n. 1, p. 23-36, 2015.
- XIA, F.; JIANG, L. Bio-Inspired, Smart, Multiscale Interfacial Materials. **Advanced Materials**, v. 20, n. 15, p. 2842-2858, 2008.
- XU, M. *et al.* Novel Fungus-Titanate Bio-Nanocomposites As High Performance Adsorbents For The Efficient Removal Of Radioactive Ions From Wastewater. **Nanoscale**, v. 6, n. 2, p. 722-725, 2014.
- YU, Q.; SASAKI, K.; HIRAJIMA, T. Bio-Templated Synthesis Of Lithium Manganese Oxide Microtubes And Their Application In Li⁺ Recovery. **Journal of Hazardous Materials**, v. 262, p. 38-47, 2013.
- ZHANG, B. On Typical Materials Acting As the Dividing Standard of the Development Stages of Human Substance Civilization. **Interdisciplinary Description of Complex Systems**, v. 10, n. 2, p. 114-126, 2012.

ZHANG, D. *et al.* Bio-Inspired Functional Materials Templated From Nature Materials. **Kona Powder and Particle Journal**, n. 28, p. 116-130, 2010.

MARTIN, M. *et al.* Artificial Magnetic Bacteria: Living Magnets at Room Temperature. **Advanced Functional Materials**, v. 24, n. 23, p. 3489-3493, 2014.

2 ESTRUTURAS METAL-ORGÂNICAS E BIOHÍBRIDOS LUMINESCENTES

2.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1.1 Redes Metal-Orgânicas

Dentro da gama de materiais avançados, as redes metal-orgânicas (*metal organic frameworks* (MOFs), em inglês) vêm atraindo considerável atenção devido às diferentes configurações de materiais com estrutura cristalina porosa permanente ou ajustável que podem ser obtidas (ROWSELL; YAGHI, 2004; FÉREY, 2008), possibilitando diferentes aplicações industriais (CZAJA *et al.*, 2009; GANGU *et al.*, 2016; GIMENEZ-MARQUES *et al.*, 2016). As MOFs são materiais constituídos por uma extensa rede de centros metálicos (componente inorgânico) coordenados à moléculas orgânicas multidentadas (ROWSELL; YAGHI, 2004; DANTAS *et al.*, 2014). As combinações quase infinitas dos componentes inorgânicos e orgânicos possibilitam a produção de diversos tipos de MOFs com diferentes propriedades dependentes das composição da unidades inorgânicas e orgânicas (FÉREY *et al.*, 2004; MELLOTT-DRAZNIIEKS *et al.*, 2004; ROWSELL; YAGHI, 2004). A organização dos componentes orgânicos e inorgânicos contribuem para que as MOFs apresentem estruturas geométricas bem definidas com elevada área superficial e com tamanho de poros correspondente à faixa de micro e mesoporos (ROWSELL; YAGHI, 2004; ZHOU *et al.*, 2012).

Os estudos das redes metal-orgânicas, também chamadas de redes de coordenação híbridas, têm como marco inicial a síntese de um polímero de coordenação produzidos por Hoskin e Robson em 1989 (HOSKINS; ROBSON, 1989). Desde então, mais de 10 000 diferentes tipos de MOFs foram produzidas (YAGHI *et*

al., 2003; KASKEL, 2016). As MOFs são materiais obtidos a partir de síntese reticular de substâncias orgânicas (bases de Lewis) e inorgânicas (ácido de Lewis), que interagem fortemente um com o outro através de ligações coordenadas metal-ligante para formar sólidos estendidos (YAGHI *et al.*, 2003; ROBIN; FROMM, 2006; FÉREY, 2008; COOK *et al.*, 2013) com arranjos supramoleculares que podem ter uma (1D), duas (2D) ou três (3D) dimensões (ver Figura 2.1.1) (CHEETHAM *et al.*, 2006).

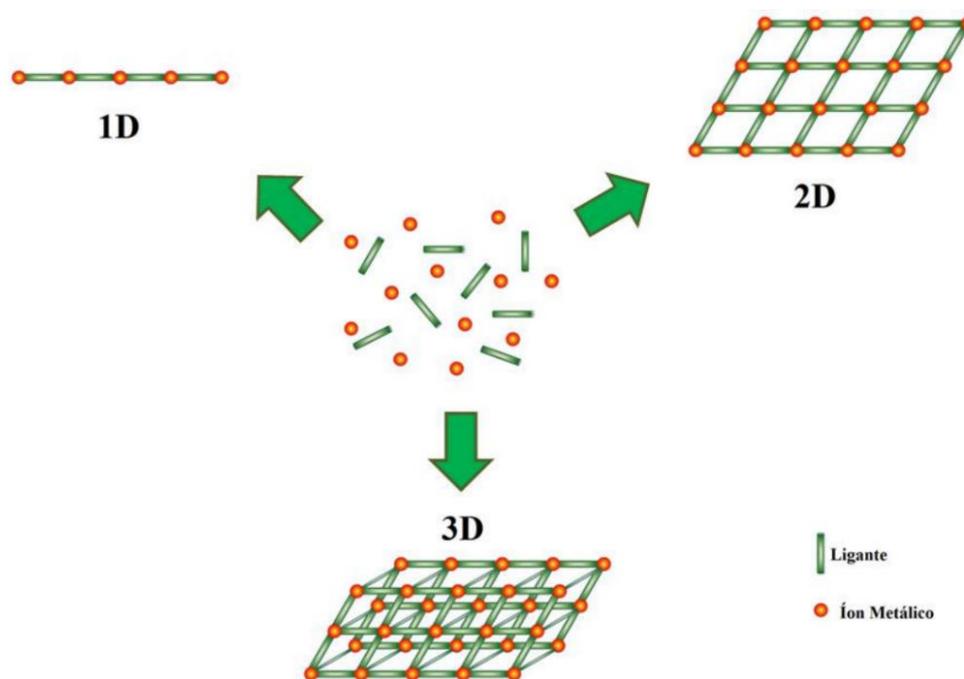


Figura 2.1.1 - Representação esquemática da formação de redes metal-orgânicas com 1, duas e 3 dimensões. Fonte: DA LUZ, 2018.

Os componentes inorgânicos são cátions ou aglomerados metálicos (YAGHI *et al.*, 2003; ROBIN; FROMM, 2006; FÉREY, 2008; COOK *et al.*, 2013). Segundo Frérey (2008), quase todos os metais descritos na tabela periódica, que apresentem cátions di, tri ou tetravalentes, podem ser utilizados no preparo das MOFs. Já o constituinte orgânico são moléculas que contém, na sua estrutura, átomos doadores de elevada densidade de carga como oxigênio e/ou nitrogênio (YAGHI *et al.*, 2003; FÉREY, 2008; COOK *et al.*, 2013). A Figura 2.1.2 apresenta vários exemplos de ligantes orgânicos.

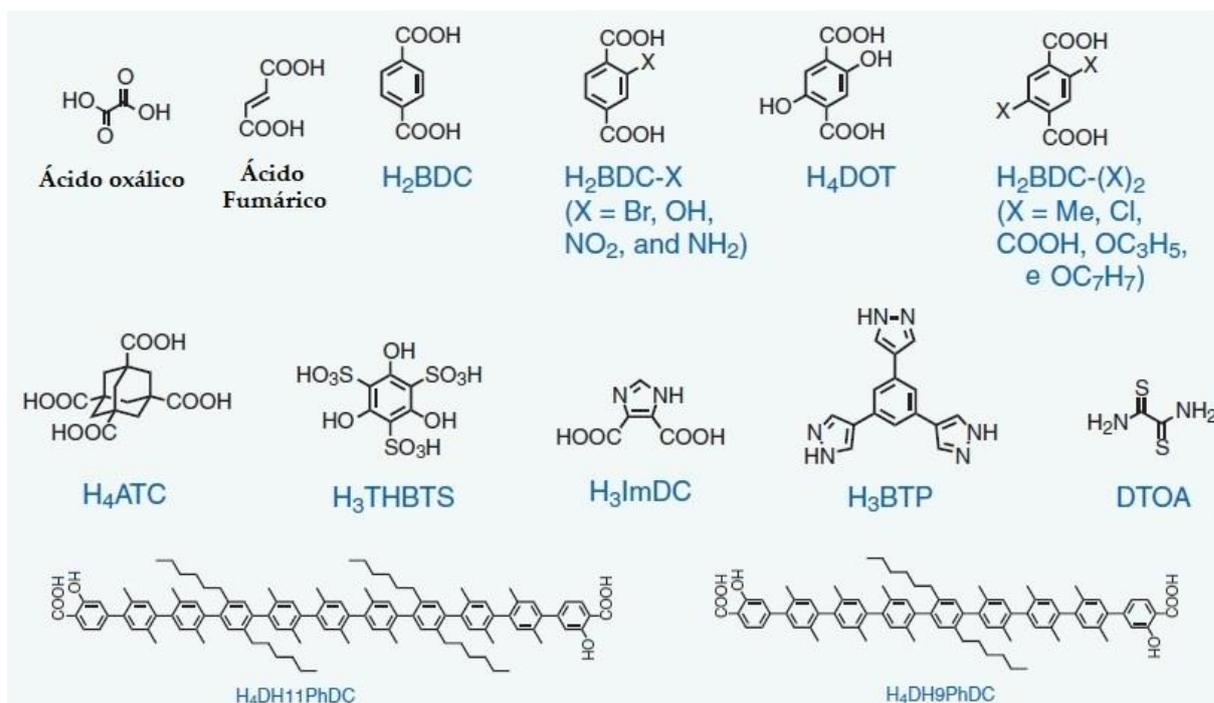


Figura 2.1.2 – Exemplos de componentes orgânicos utilizados na síntese de MOFs.

Fonte: FURUKAWA *et al.*, 2013.

A organização estrutural das MOFs pode ser facilmente compreendida a partir da interação de blocos construtores inorgânicos e orgânicos, chamados de unidades de construção secundárias (SUBs – *secondary unity builindings*, em inglês) (ROWSELL; YAGHI, 2004; FERREY, 2008). A ideia de unidades de construção secundárias como bloco de construção de sólidos estendidos é derivada dos estudos de materiais zeolíticos (SMITH, 1988). As SBU's inorgânicas são definidas como agregados inorgânicos contendo dois ou mais átomos metálicos (TRANCHEMONTAGNE *et al.*, 2009; O'KEEFFE; YAGHI, 2012). Já as SBU's orgânicas são ligantes orgânicos multidentados que ligam dois ou mais blocos de construção secundário inorgânico. Uma forma de representar as SUBs e os ligantes é utilizando figuras geométricas simples (polígonos e poliedros) (YAGHI *et al.*, 2003). A Figura 2.1.3 mostra exemplos de unidades secundárias de construção inorgânicas e orgânicas e suas representações geométricas. A forma das SUBs inorgânicas depende dos pontos de extensão, os quais permitem a ligação com o componente orgânico (O'KEEFFE; YAGHI, 2012). Por exemplo, como pode ser visto na Figura 2.1.3(a), a forma triangular dessa SUBs é

devido à presença de três pontos de extensão. Tal raciocínio é estendido para os outros blocos inorgânicos. Da mesma forma, as SUBs orgânicas podem ser classificadas como di (Figura 2.1.3(f)), tri (Figura 2.1.3(g)), tetra (Figura 2.1.3(h)) ou politópicas a depender dos pontos de extensão dessas unidades.

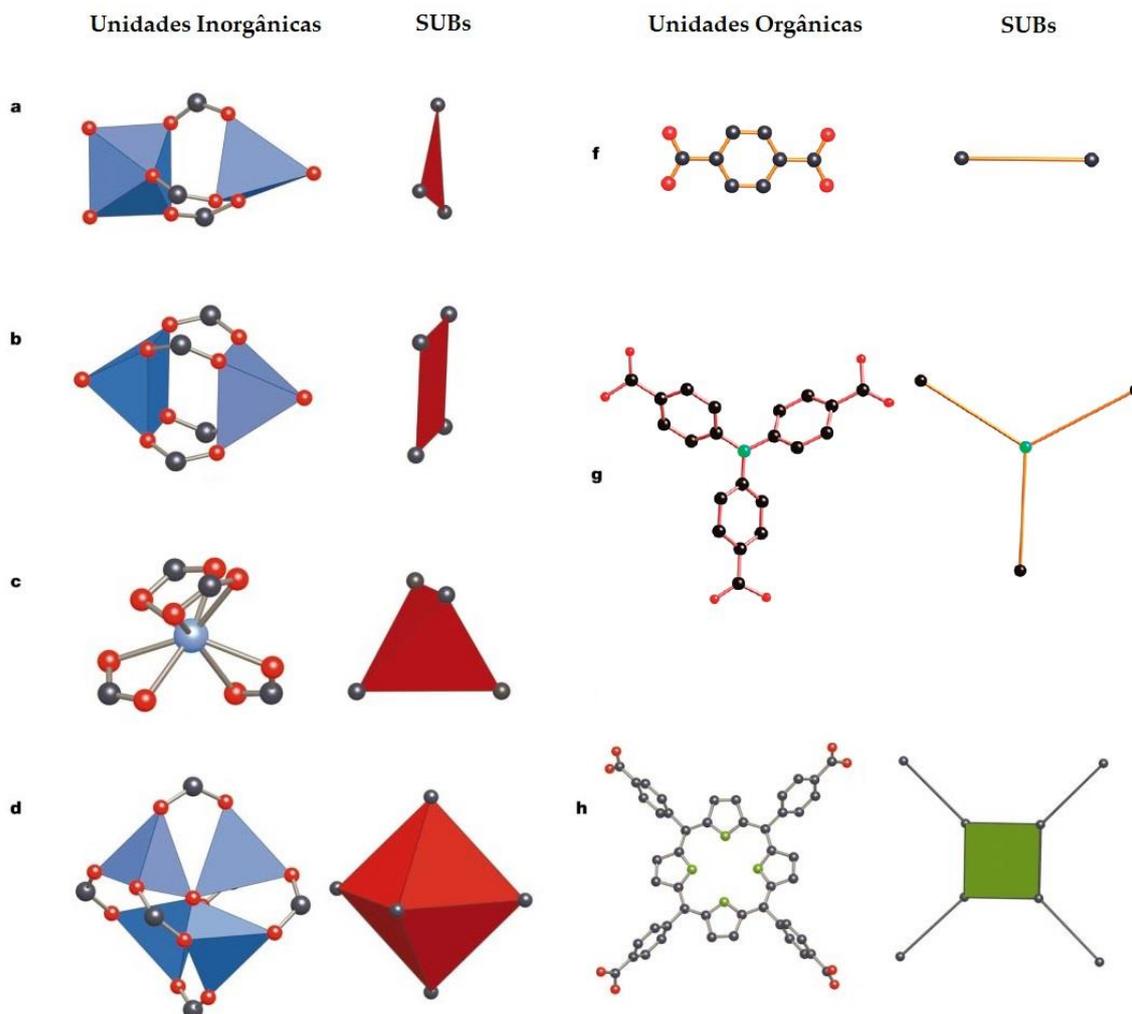


Figura 2.1.3 – Exemplos de unidades de construção secundárias. As esferas de cor preta, vermelha, verde representam os átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio, respectivamente. Os poliedros de cor azul indicam as unidades inorgânicas de metais ligados a átomos de oxigênio.

Fonte: YAGHI *et al.*, 2003.

As SUBs inorgânicas são consideradas blocos rígidos, enquanto os ligantes orgânicos podem apresentar estruturas flexíveis e rígidas (como pôde ser visto na Figura 2.3) (EDDAOUDI *et al.*, 2001). Essa versatilidade da unidade orgânica propicia modificações na topologia das MOFs, ou seja, no arranjo geométrico de uma rede

levando em consideração os nós (íon ou aglomerado metálico) e as linhas de conexão (os ligantes) (EDDAOUDI *et al.*, 2001; FÉREY, 2008). Por exemplo, quando os ligantes orgânicos alifáticos são utilizados, por serem mais flexíveis levam à formação de MOFs mais densas, enquanto que os ligantes mais rígidos produzem MOFs com topologias mais abertas e robustas (EDDAOUDI *et al.*, 2001). Além das espécies inorgânicas e orgânicas, moléculas do solvente e contra-íons também podem fazer parte da constituição das redes metal-orgânica (EDDAOUDI *et al.*, 2001; ROBIN; FROMM, 2006). A Figura 2.1.4 mostra a obtenção da MOF-5 a partir da interação dos blocos construtores inorgânicos e orgânicos com sua representação topológica (EDDAOUDI *et al.*, 2001).

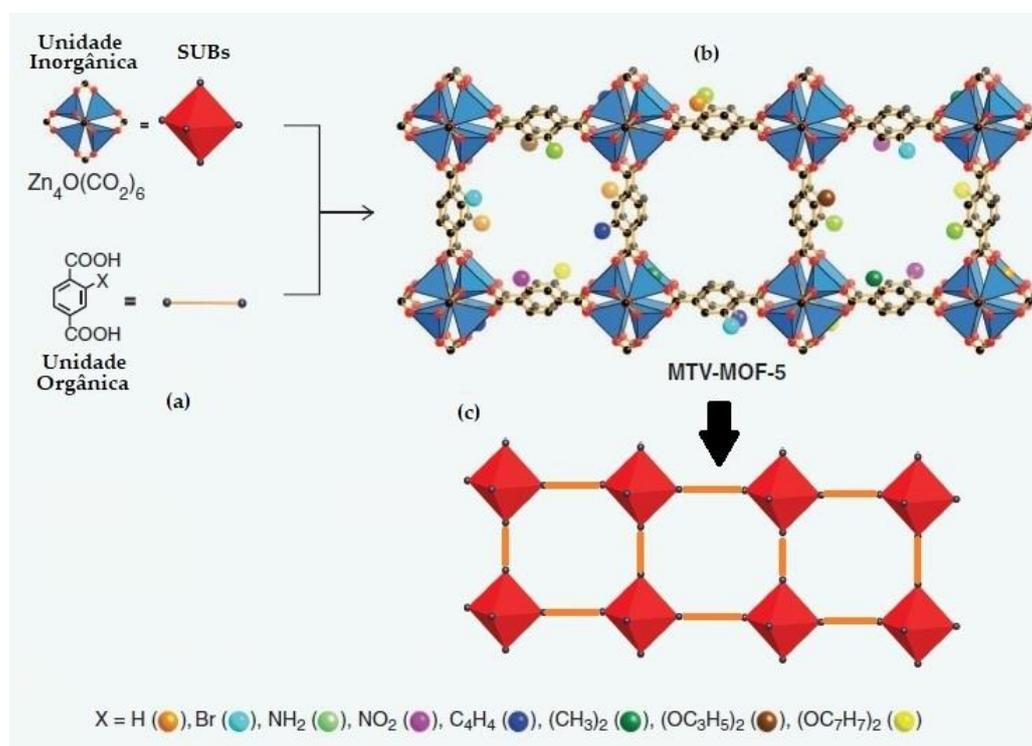


Figura 2.1.4 - Combinação ente $Zn_4O(CO_2)_6$ SBU e ligante ácido 1,4-benzendicarboxílico com diferentes substituições para formar a MTV-MOF-5. (a) SUBs, (b) representação molecular e (c) topológica em duas dimensões. Adaptado da referência (FURUKAWA *et al.*, 2013).

De uma maneira geral, a síntese das MOFs é relativamente simples e envolve a mistura dos reagentes em solução (STOCK; BISWAS, 2012). As reações geralmente ocorrem em temperaturas abaixo de 250 °C (FÉREY, 2008; DANTAS *et al.*, 2014). Vários

métodos são empregados, incluindo os convencionais hidro e solvotermiais, juntamente com novas rotas como eletroquímicas, mecânico-química e mediadas por micro-ondas e por ondas ultrassônicas (STOCK; BISWAS, 2012; ZHOU *et al.*, 2012).

Figura 2.1.5 apresenta as rotas mais utilizadas na síntese de redes metal-orgânicas.

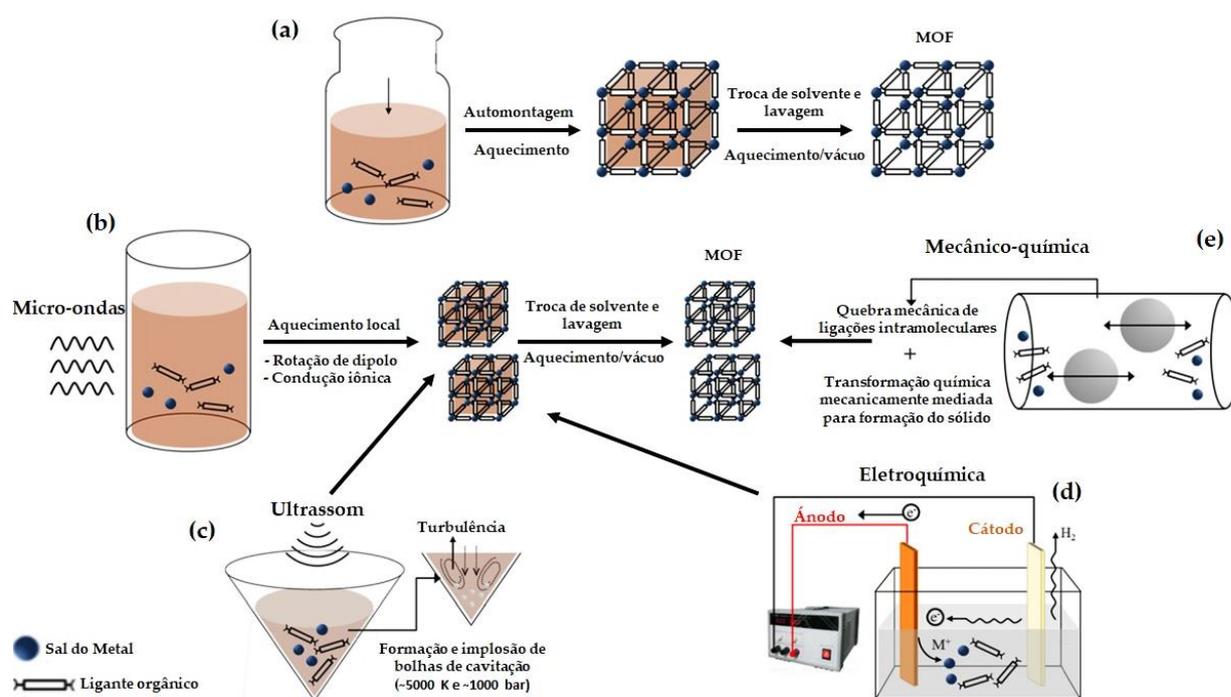


Figura 2.1.5 - Diferentes métodos de preparação de MOFs. (a) Método hidro ou solvotermal, (b) método mediado por micro-ondas, (c) método sonoquímico, (d) método eletroquímico e (e) método mecânico-químico. Adaptado referência (LEE *et al.*, 2013).

Os métodos via micro-ondas, ultrassom, eletroquímico e mecânico-químico permitem uma redução significativa de tempo síntese e do tamanho dos sólidos quando comparados com os métodos hidro e solvotérmicos. Com o uso de micro-ondas e ultrassom, o rápido aquecimento se distribui de maneira homogênea por todo sistema e proporciona uma maior taxa de nucleação, diminuindo o tempo de cristalização das MOFs (STOCK; BISWAS, 2012; KHAN; JHUNG, 2015). Da mesma forma, o método eletroquímico também permite o controle da nucleação (STOCK; BISWAS, 2012; LEE *et al.*, 2013). Já o método mecânico-químico o solvente pode ser ou não utilizado e as reações sólido-sólido são promovidas através de choques mecânicos

(com temperaturas que alcançando valores maiores que 1000 °C em períodos de tempo na faixa de 10^{-4} a 10^{-3} s) entre as partículas dos reagentes (STOCK; BISWAS, 2012; LEE *et al.*, 2013). Além dos métodos citados, outras abordagens como sistema de injeção em fluxo e conversão de gel-seco também vêm sendo desenvolvidas para produção de MOFs de interesse industrial e comercial (LEE *et al.*, 2013).

Diante do extenso grupo de redes metal-orgânicas que vem sendo estudado, o presente trabalho de tese tem um particular interesse pelas MOFs contendo íons de metais lantanídeos em sua composição. Mais detalhes sobre esse tipo de material será visto a seguir.

2.1.2 Redes Metal-Orgânicas de Lantanídeos – Ln-MOFs

As MOFs constituídas por íons metálicos do grupo dos lantanídeos (Ln-MOFs) têm recebido considerável atenção em virtude de uma série de propriedades oriundas da configuração eletrônica intrínseca desses metais, atrelada a estrutura porosa das redes metal-orgânica (ELISEEVA; BUNZLI, 2010; CUI, *et al.*, 2012a). Os lantanídeos apresentam o subnível 4f e podem formar íons com diferentes estados de oxidação (2+, 3+ e 4+), sendo Ln^{3+} o mais estável (COTTON, 2013). Essas características permitem que os lantanídios apresentem uma variedade de níveis eletrônicos de energia bem definidos (COTTON, 2013). Associado a isso, transições do tipo 4f-4f dos íons Ln^{3+} , consideravelmente blindadas pelos subníveis 5s e 5p, fazem com que esses íons apresentem propriedades luminescentes, quando excitados com radiação ultravioleta, emitindo radiações que variam desde à região do visível até o infravermelho próximo do espectro eletromagnético (BINNEMANS, 2009; ELISEEVA; BUNZLI, 2010; CUI *et al.*, 2012).

Os íons lantanídeos possuem um grande deslocamento Stokes e emissões de cores relativamente puras (ELISEEVA; BUNZLI, 2010; CUI *et al.*, 2012a). Por exemplo,

o térbio (Tb^{3+}) é verde, o európio (Eu^{3+}) é vermelho, o samário (Sm^{3+}) é laranja e o túlio (Tm^{3+}) é azul (BINNEMANS, 2009; CUI *et al.*, 2012a). Por outro lado, o itérbio (Yb^{3+}), o neodímio (Nd^{3+}) e érbio (Y^{3+}) emitem radiação na região do infravermelho próximo (ELISEEVA; BUNZLI, 2010; CUI *et al.*, 2012a). No entanto, a luminescência desses íons é relativamente fraca em virtude de transições f-f proibidas (ALLENDORF *et al.*, 2009; MOORE *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2012a). Para contornar essa situação, se faz necessário interagir os íons Ln^{3+} com espécies químicas que participem de processos de transferência de energia (ALLENDORF *et al.*, 2009; MOORE *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2012a). Esse papel é executado pelos ligantes orgânicos que interagem com íons Ln^{3+} para formar as redes metal-orgânicas (ALLENDORF *et al.*, 2009; MOORE *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2012a).

Como já foi falado, as MOFs são formadas por unidades orgânicas e inorgânicas gerando uma estrutura cristalina com geometria bem definida. Nesse caso, tanto a unidade inorgânica quanto o ligante orgânico podem gerar luminescência (CUI *et al.*, 2012a; CHENG, 2015). Da mesma maneira, a interação dos componentes orgânico e inorgânico pode resultar em transferência de energia entre eles, melhorando o tempo de vida, rendimento quântico da radiação emitida e aumentando a largura do deslocamento Stokes (MOORE *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2012a). Além disso, com a presença de poros permanentes, as Ln-MOFs são capazes de absorver e imobilizar espécies químicas próximas dos centros luminescentes, o que também pode provocar alterações no deslocamento dos comprimentos de onda e/ou mudanças significativas na intensidade da radiação emitida (MOORE *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2012a). Essas propriedades são chamadas de luminescência colaborativa (MOORE *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2012a). A superfície das MOFs ainda podem ser funcionalizadas o que contribui para controlar o comportamento óptico desses materiais (ALLENDORF *et al.*, 2009; MOORE *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2012a).

Dentro do grupo dos metais lantanídeos, o presente trabalho de tese tem interesse pelas MOFs luminescentes constituída pelos íons európio e térbio

coordenados ao ligante ácido melítico. O ácido melítico é composto por um anel benzênico e seis grupos carboxilatos (ver Figura 2.1.6) (CHUI *et al.*, 2001). Esse tipo de ligante leva a formação de sólidos estendidos 3D com estruturas rígidas com elevada estabilidade térmica (CHUI *et al.*, 2001). A presença dos grupos carboxilatos possibilita diferentes modos de coordenação (ver Figura 2.1.6) que dependem das condições de síntese, como por exemplo, pH e temperatura (CHUI *et al.*, 2001; JANICKI *et al.*, 2017). O pKas para a desprotonação dos seis grupos carboxílicos são 6,96 (1); 5,89(2); 4,78(3); 3,31(4); 2,19(5); 1,40(6) (MAXWELL; PARTINGTON, 1937; CERAR; PODLIPNIK, 2008). A espécie mais comumente encontrada, em sistemas metal-orgânicos, é a espécie totalmente desprotonada ($C_{12}O_{12}^{6-}$) (CHUI *et al.*, 2001).

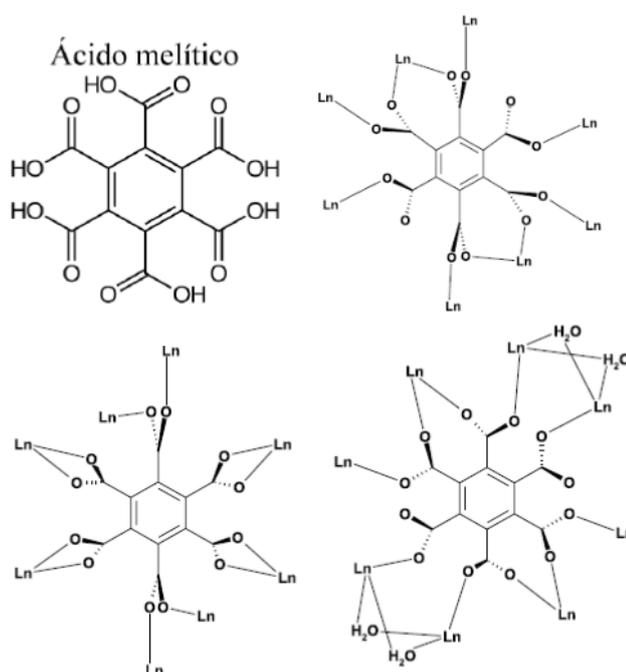


Figura 2.1.6 - Ácido melítico e ânion melitato exibindo modos de coordenação observados em compostos metal-melitato. Adaptado da referência (CHUI *et al.*, 2001).

Os mecanismos de luminescência comumente observado nas Ln-MOFs são descritos na Figura 2.1.7. Como foi comentado, o ligante pode ser o centro absorvedor ou emissor de radiação. Quando o ligante absorve radiação, com energia apropriada, ocorre uma transição eletrônica do estado fundamental (S_0) para o estado excitado (S_1).

A partir daí, uma série de eventos fotofísicos podem ser observados: emissão de radiação, pelo ligante, devido à transição eletrônica entre estados singletos ($S_1 \rightarrow S_0$); transferência de energia não radioativa, no ligante, para um estado tripleto de menor energia ($S_1 \rightarrow T_1$), seguida de uma emissão de radiação em virtude da transição eletrônica ($T_1 \rightarrow S_0$); transferência de energia do ligante para o íon lantanídeo ($(S_0 \rightarrow Ln^{3+})$ ou $(T_1 \rightarrow Ln^{3+})$), seguida de emissão de radiação pelo íon metálico ($4f \rightarrow 4f$). A transferência de carga do ligante para o cátion metálico é normalmente chamada de efeito antena (ALLENORF *et al.*, 2009; MOORE *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2012a). Eu-MOF apresenta bandas de emissão bem estreitas ($^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ ($J = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ e 6)), exibindo cor vermelha. Já Tb-MOF emite radiação cor verde e possui as seguintes transições eletrônicas $^5D_4 \rightarrow ^7F_J$ ($J = 0, 1, 2, 3,$ e 4). Essas transições são indicadas na Figura 2.1.7(b).

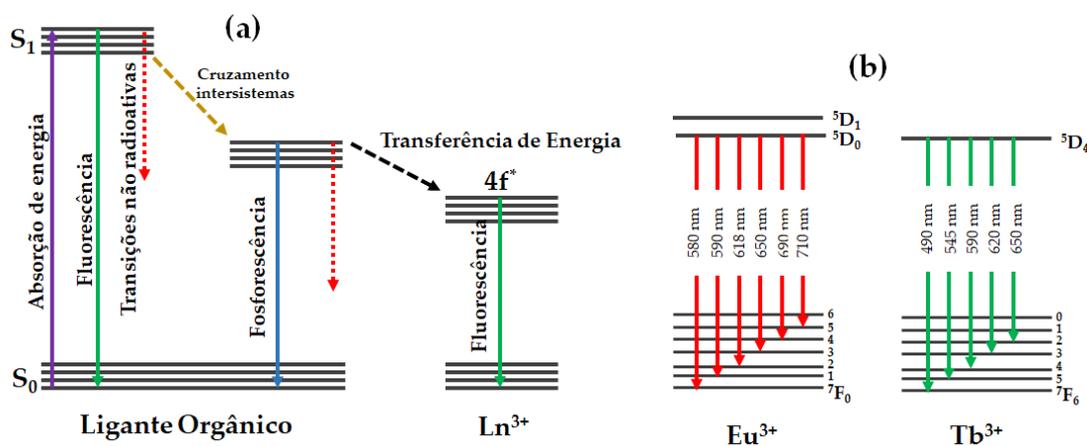


Figura 2.1.7 – Diagrama de Jablonski da representação esquemática de processos fotofísicos observados (a) nas redes metal-orgânicas íons lantanídeos e (b) as transições observadas na emissões de MOFs de európio e térbio. Adaptado da referência (BINNEMANS, 2009).

Com essas características, as Ln-MOFs luminescentes apresentam uma ampla gama de aplicações que vai desde (bio)sensores fluorescentes (ELISEEVA E BUNZLI, 2010; XU *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2018), dispositivos emissores de luz (DA LUZ *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2014), termômetros luminescentes (CUI *et al.*, 2012b), tintas luminescentes (DA LUZ *et al.*, 2015) até imagens biomédicas (GUO *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2012; DANTAS *et al.*, 2014). A aplicação das Ln-MOFs em imagens biomédicas

ocorre porque os grupos funcionais dos ligantes orgânicos podem interagir com sistemas biológicos (CUI *et al.*, 2012a). Tal fato abre um campo de possibilidades de interagir as MOFs com materiais biológicos, como por exemplo, microrganismos, viabilizando a produção de materiais biohíbridos. Esse tipo de sistema será discutido logo adiante.

2.1.3 Materiais Biohíbridos

Os materiais biohíbridos são constituídos pela junção de materiais biológicos e materiais não-biológicos (GAO; MARUYAMA, 2014). Essa combinação tem por objetivo a obtenção de um material multifuncional com contribuições significativas de ambos os componentes (FAKHRULLIN; LVOV, 2012; MATHAPA; PAUNOV, 2014). Quando o componente biológico é um organismo ou uma célula viva, esses materiais biohíbridos são chamados de células ciborgs (FAKHRULLIN e LVOV, 2012; MATHAPA e PAUNOV, 2014). Nas células ciborgs, o material biológico adquire as propriedades físico-químicas dos componentes não-biológicos que o recobre, enquanto que, os materiais não-biológicos podem ou não fazer parte das funções biológicas das células vivas (FAKHRULLIN; LVOV, 2012; MATHAPA; PAUNOV, 2014). Outra questão fundamental na interação entre os componentes biológicos e não-biológicos é que os materiais não-biológicos ao recobrirem as entidades biológicas podem funcionar como uma carapaça que atua na proteção da célula biológica (KROL *et al.*, 2003).

Muitos materiais biológicos vêm sendo utilizados para a produção de sistemas biohíbridos, com um pronunciado destaque para àqueles em que microrganismos são empregados (FAKHRULLIN; LVOV, 2012; MATHAPA; PAUNOV, 2014).

Microorganismos como vírus, bactérias, fungos e algas apresentam um leque extraordinário de arquiteturas naturalmente hierarquizadas com diferentes formas e tamanhos (SOTIROPOULOU *et al.*, 2008). Essas características estruturais permitem o controle espacial da montagem de nanopartículas (inorgânica ou orgânica) sobre a matriz orgânica da entidade biológica (FLYNN *et al.*, 2003; FAKHRULLIN *et al.*, 2012).

A união entre os componentes biológicos e não-biológicos se dá através de interações entre os grupos funcionais localizados na superfície dos microrganismos e das partículas a serem depositadas (FLYNN *et al.*, 2003; FAKHRULLIN *et al.*, 2012). A depender da carga e da estabilidade das entidades biológicas e não-biológicas, etapas de pré-tratamento de um ou de ambos os constituintes podem ser requeridas para viabilizar a interação entre esses componentes (FLYNN *et al.*, 2003; FAKHRULLIN *et al.*, 2012).

Vários tipos de nanopartículas, como nanopartículas metálicas (ouro, prata, platina, paládio) (DUJARDIN *et al.*, 2003), quantum-dots (RISPAIL *et al.*, 2014), nanomateriais à base de carbono (nanotubos de carbono, grafeno) (ZHU *et al.*, 2016), polímeros condutores nanoestruturados (nanofios de polianilina) (WANG *et al.*, 2015), óxidos nanoestruturados (nanotubos de titanato, óxido de ferro) (MARTIN *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2014; DING *et al.*, 2015), rede metal orgânicas (JI *et al.*, 2018), entre outros, têm sido empregados como material não biológico para a obtenção de materiais biohíbridos. Alguns exemplos de materiais biohíbridos podem ser vistos na Figura 2.1.9. Na Figura 2.1.9(a) Dujardin e colaboradores (2003) prepararam um biohíbrido à base do vírus do mosaico do tabaco recoberto com nanopartículas de ouro. Já na Figura 2.1.9(b), o grupo de Martin (2014), inspirado pela bactéria magnetotática, funcionalizou a bactéria *Lactobacillus fermentum* com nanopartículas de magnetita para produzir um biohíbrido com propriedades magnéticas. Por outro lado, a Figura 2.1.9 (c) exibe imagens de esferas fúngicas decoradas com nanopartículas de ouro e de magnetita utilizadas em reações de decomposição catalítica (ZHU *et al.*, 2016).

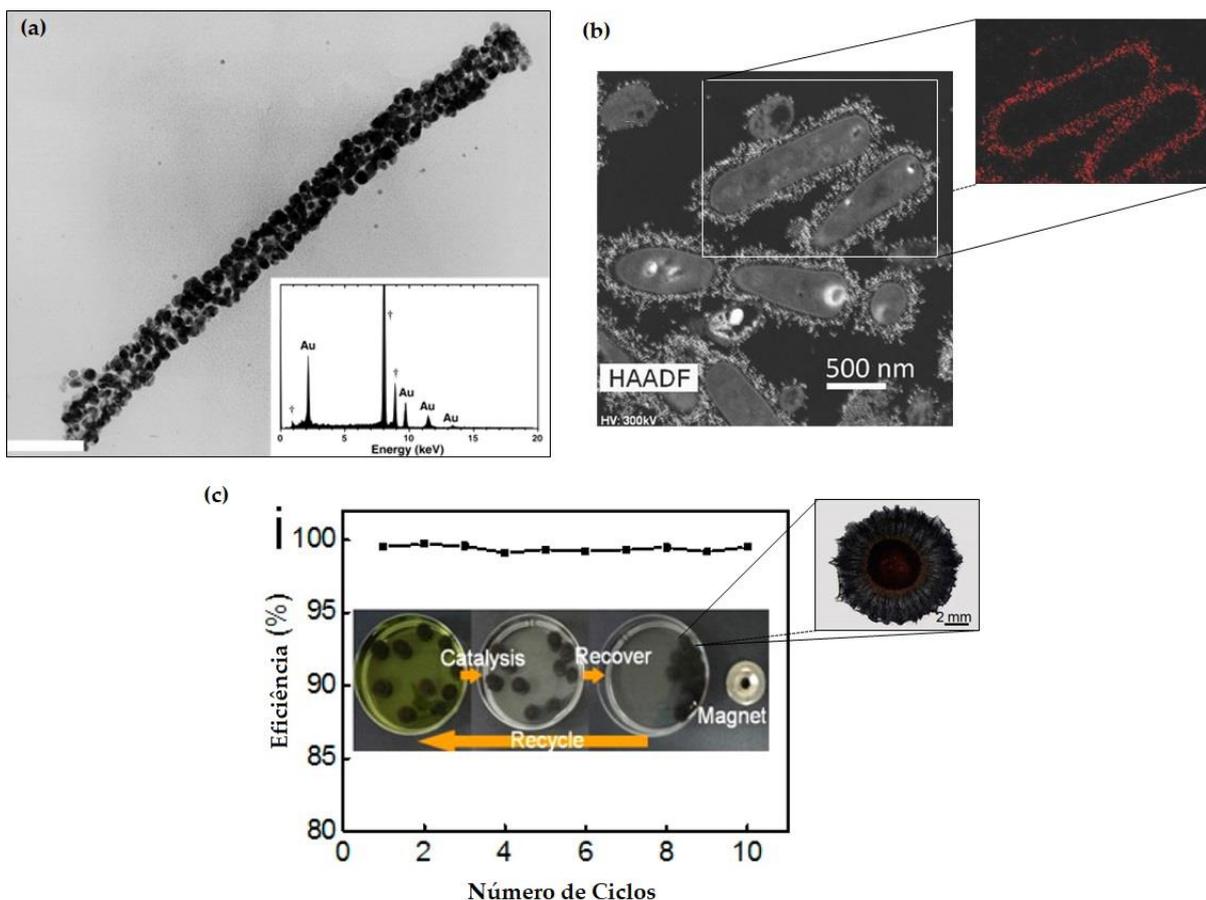


Figura 2.1.8 - Exemplos de materiais biohíbridos (a) vírus do mosaico do tabaco recoberto com nanopartículas de ouro (Fonte: DUJARDIN *et al.*, 2003) , (b) bactéria *Lactobacillus fermentum* recoberta com nanopartículas de magnetita (Fonte: MARTIN *et al.*, 2014) e (c) esferas fúngicas decoradas com nanopartículas de ouro e de magnetita empregadas em reações de decomposição catalítica (Fonte: ZHU *et al.*, 2016).

A funcionalização de microrganismos com diferentes materiais não-biológicos traz como uma das principais vantagens a possibilidade de gerar biohíbridos com propriedades semelhantes á de microrganismos naturais. Como citado acima, bactérias que não apresentam propriedades magnéticas podem, através da deposição de nanopartículas magnéticas, exibirem propriedades magnéticas (MARTIN *et al.*, 2014). Outro exemplo, explorado pelo grupo de Kornienko e colaboradores (2016) é o de tornar bactérias, que normalmente não são fotossintetizantes, em fotossintetizantes a partir da deposição nanopartículas. Nesse caso, as nanopartículas absorvem radiação solar que é utilizada para transformar água e CO₂, via metabolismo microbiano, em

produtos de valor agregado como, por exemplo, ácidos orgânicos (KORNIENKO *et al.*, 2016) ou combustível como metano (NICHOLS *et al.*, 2015).

A produção de materiais biohíbridos empregando MOFs é uma realidade ainda pouco explorada. No momento, o único trabalho publicado que segue essa linha é o do grupo de Ji e colaboradores (2018). Eles produziram um biohíbrido constituído pela bactéria anaeróbica *Morella thermoacetica* recoberta com a MOF $[Zr_6O_4(OH)_4(BTB)_2(OH)_6(H_2O)_6]$, em que BTB é o 1,3,5-tribenzoato (JI *et al.*, 2018). Como a bactéria é anaeróbica, as MOFs atuam como um invólucro catalítico que protege a célula microbiana da decomposição de produtos nocivos contendo oxigênio reativo gerados pelo próprio metabolismo celular (JI *et al.*, 2018). Além disso, o biohíbrido também atua como um sistema fotossintético artificial, transformando CO₂ em acetato sob stress oxidativo (JI *et al.*, 2018). Embora vários trabalhos estejam interagindo Ln-MOFs com células vivas, por exemplo, na área de bioimagem, até o momento não se tem nenhum relato da produção de materiais biohíbridos composto de microrganismos e Ln-MOFs. Tal fato abre um horizonte de estudos a ser explorado, principalmente em virtude da passibilidade de melhorar e direcionar alguns tipos de processos bioquímicos mediados pelos microrganismos.

Dos microrganismos citados mais acima, a presente Tese tem um interesse particular pelos fungos filamentosos. Os motivos da especial atenção aos fungos filamentosos, como componente biológico na produção de materiais biohíbridos, estão associados ao grande número de espécies de fungos (filamentosos e não-filamentosos) existentes, à facilidade de manipulação desses seres vivos e ao tipo de crescimento das unidades básicas que compõem os fungos filamentosos. Por outro lado, o processo de deposição de redes metal-orgânicas luminescentes, na parede celular dos fungos filamentosos, deve viabilizar a conversão de fungos filamentosos não-luminescentes em luminescentes. Para se ter uma ideia, dentro das 120.000 mil espécies de fungos conhecidos, somente 71 espécies são luminescentes. Assim, a conversão de fungos em não-luminescentes em luminescentes, devido à integração de L-MOFs, pode conferir

aos fungos filamentosos funcionalidades adicionais além daquelas normalmente observadas para esses microrganismos. Assim, mais detalhes das características dos fungos filamentosos serão vistos logo a seguir.

2.1.4 Fungos Filamentosos

Os fungos são “velhos” conhecidos dos seres humanos em função da importância na produção de alguns alimentos e da biotecnologia que proporciona prospecção de vários medicamentos (MOORE *et al.*, 2011). Esses microrganismos compõem um grande grupo organizados no reino Fungi (BORKOVICH; EBBOLE, 2010; MOORE, 2013). Eles são seres vivos eucariontes, quimio-heterotróficos que obtêm seus nutrientes por digestão extracelular (WEBSTER; WEBER, 2007; BORKOVICH; EBBOLE, 2010; MOORE, 2013). Os fungos são cosmopolitas, como afirma Webster e Weber (2007), podendo ser encontrados em diversos ambientes como no solo, no ar e na água (mares, rios e lagos) (WEBSTER; WEBER, 2007; MOORE, 2013). Recentemente, Hawksworth e Luchking (2017) estimaram a existência de 2,2 a 3,8 milhões de espécies de fungos (filamentosos e não-filamentosos). Desses números são conhecidos aproximadamente 120.000 mil espécies (HAWKSWORTH; LUCKING, 2017). Sendo assim, existe um leque gigantesco de possibilidades de produção de materiais biohíbridos utilizando os fungos filamentosos como matriz biológica.

Os fungos filamentosos são constituídos de estruturas tubulares ou filamentos ramificados com a ponta levemente afinada (WEBSTER; WEBER, 2007; MOORE, 2013; RIQUELME, 2013). Cada filamento individual é chamado de hifa e o conjunto das mesmas é denominado de micélio (WEBSTER; WEBER, 2007; MOORE, 2013). A Figura 2.1.9(a) mostra a representação esquemática de um micélio. As hifas geralmente são uniformes nos diferentes grupos taxonômicos (WEBSTER; WEBER, 2007). Elas podem ser septadas ou não-septadas, como apontado na Figura 2.1.9(b) e Figura 2.1.9(c), respectivamente (WEBSTER; WEBER, 2007). Os septos isolam uma região da hifa de

outra região (WEBSTER; WEBER, 2007). Contudo, esse isolamento não é completo já que os septos possuem poros que permitem a troca de citoplasma ou organelas entre as regiões separadas (WEBSTER; WEBER, 2007). As hifas no corpo micelar são classificadas como vegetativas (responsáveis pela captação de nutrientes) e reprodutivas ou aérea (contendo os esporos reprodutivos) (WEBSTER; WEBER, 2007; CORADIN *et al.*, 2011), como indicada na Figura 2.1.9.

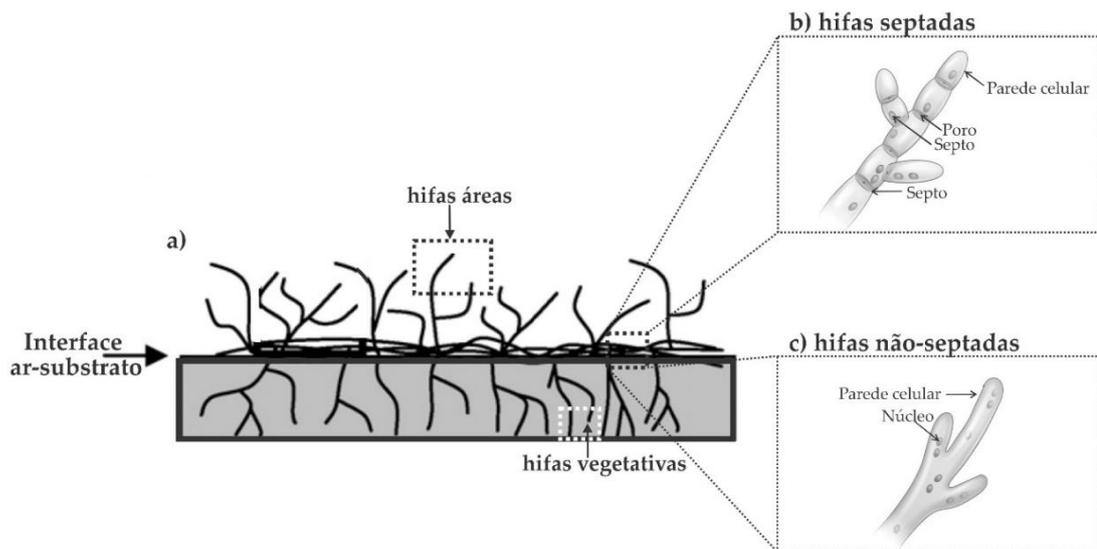


Figura 2.1.9 – Representação esquemática do (a) micélio fungo, b) e c) de hifas septadas e não-septadas, respectivamente. Adaptada das referências (CASE, 2009; CORADIN *et al.*, 2011).

Como já foi comentado, na confecção de materiais biohíbridos a parte biológica empresta sua morfologia para a organização estrutural do material final. Dessa forma, como o componente biológico em questão são fungos filamentosos, e o biohíbrido apresentará a morfologia microtubular do micélio fúngico, se faz necessário o entendimento da maneira pela qual as hifas são formadas. Todo o processo de formação das hifas pode ser acompanhado avaliando como se dá a reprodução desses microrganismos.

De uma maneira geral, os fungos filamentosos, exibem reprodução assexuada e sexuada (INGOLD; HUDSON, 1993; WEBSTER; WEBER, 2007; BORKOVICH; EBBOLE, 2010). Nos dois processos, o desenvolvimento do fungo ocorre a partir da

germinação de esporos. A Figura 2.1.10 indica as etapas envolvidas nos dois tipos de reprodução. Na reprodução sexuada até o processo de germinação propriamente dito, várias etapas preliminares ocorrerem, como mostrado na Figura 2.1.10. A reprodução assexuada é bastante utilizada em laboratório, uma vez que, um pequeno fragmento do micélio fúngico, contendo núcleo, pode dar origem a um novo organismo. Nesse tipo de reprodução, o crescimento ocorre por alongamento de forma radial das extremidades do fragmento (MOMANY, 2002; BIZUKOJC; LEDAKOWICZ, 2006; MOORE, 2013).

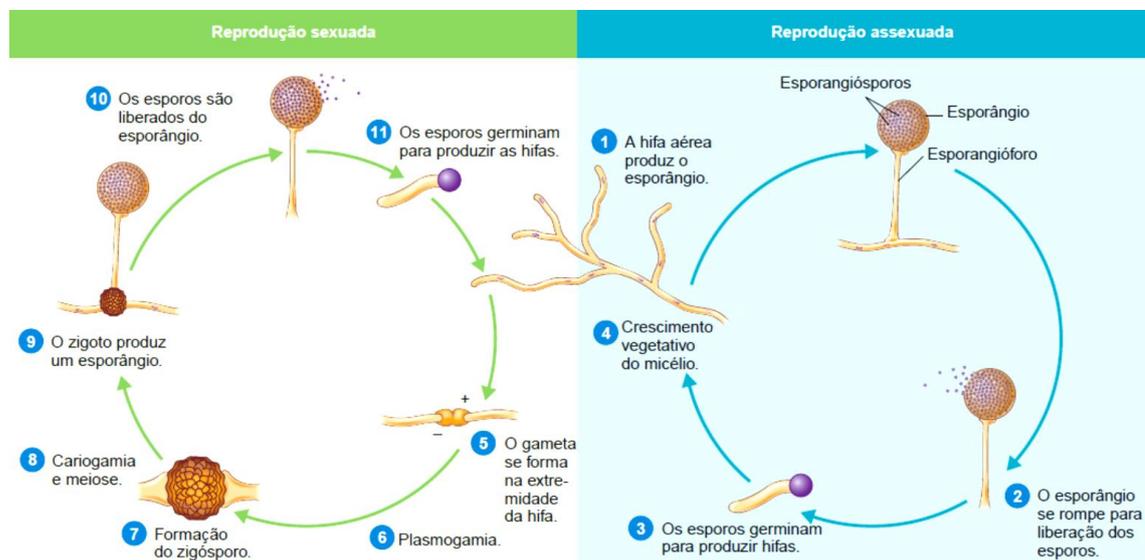


Figura 2.1.10 - Representação esquemática mostrando de uma forma geral a reprodução sexuada e assexuada de fungos. Adaptado da referência (CASE, 2009).

O esporo do fungo dá o ponto de partida para o desenvolvimento das hifas e conseqüentemente do corpo micelar. Todo o desenvolvimento do fungo ocorre quando o esporo é colocado em um ambiente com condições favoráveis (água, nutrientes, temperatura, pH e oxigênio) para o crescimento do microrganismo (ALLEN, 1965; GERVAIS *et al.*, 1988; CASE, 2009; MOORE *et al.*, 2011). Para se ter uma ideia, os fungos possuem uma versatilidade incomum. Eles podem crescer em uma ampla faixa de temperatura (0-50 °C) e pH (2-9) (INGOLD; HUDSON, 1993). Assim, o processo de desenvolvimento do fungo inicia com germinação dos esporos. A germinação é dividida em três partes: turgência ou inchaço do esporo, surgimento e

crescimento apical polarizado do tubo germinativo (ALLEN, 1965; INGOLD; HUDSON, 1993; LEW, 2011).

De maneira bem simples, na etapa de turgência, o esporo absorve água e nutrientes aumentando o seu diâmetro (expansão isotrópica) (MOMANY, 2002; LEW, 2011). Concomitante à absorção, o esporo produz internamente substâncias que romperão a membrana celular e que formarão uma nova membrana plasmática e uma nova parede celular. Logo depois, ocorre o estabelecimento e manutenção de uma expansão polarizada que dará origem ao tubo germinativo (ALLEN, 1965; MOMANY, 2002).

Na etapa de expansão polarizada todas as substâncias precursoras, bem como as enzimas necessárias para formar novas membranas plasmáticas e parede celular, são redirecionadas para a ponta do tubo emergente (ALLEN, 1965; MOMANY, 2002). O crescimento polarizado, sempre ocorrendo a partir da parte apical do tubo germinativo, viabiliza o aumento do comprimento do tubo germinativo (ALLEN, 1965; MOMANY, 2002). Logo depois, é iniciada a ramificação a partir da escolha de um ponto do tubo já desenvolvido em que substâncias são direcionadas para estabelecer e manter o regime de crescimento apical polarizado (ALLEN, 1965; PAUL *et al.*, 1993; LEW, 2011). As hifas desenvolvidas podem apresentar diâmetros que variam de entre 1 e 30 μm ou até maiores, a depender da espécie de fungo (KAVANAGH, 2017). Além disso, o comprimento das hifas pode ocorrer de forma ilimitada desde que exista um controle adequado das condições do desenvolvimento do fungo (MOMANY, 2002; RIQUELME, 2013). Todo processo descrito pode ser acompanhado na Figura 2.1.11(a). Nesse sentido, vários autores têm buscado propor modelos cinéticos para acompanhar o crescimento dos fungos (Figura 2.1.11(b)) (PAZOUKI; PANDA, 2000; ALLEN, 1965; GERVAIS *et al.*, 1988; INGOLD; HUDSON, 1993; OSHEROV; MAY, 2001; BIZUKOJC; LEDAKOWICZ, 2006; LEW, 2011; MOORE *et al.*, 2011).

Além da morfologia dos microrganismos, outra parte de interesse fundamental para a produção de biohíbridos é a parede celular do fungo. Ela é formada durante o

crescimento das hifas e em virtude da presença de vários grupos funcionais -SH, -OH, -COOH, -NH₂ e espécies desprotonadas RCOO⁻ permitem, através de mecanismos de bioadsorção, a união dos componentes biológicos e não-biológico (GADD, 2009). Vários tipos de interação podem viabilizar a interação do fungo com a parte não-biológica como interações de van der Waals, ligações de hidrogênio e complexação (GADD, 2009). Assim, é necessário compreender a composição e organização dos principais constituintes da parede celular fungíca.

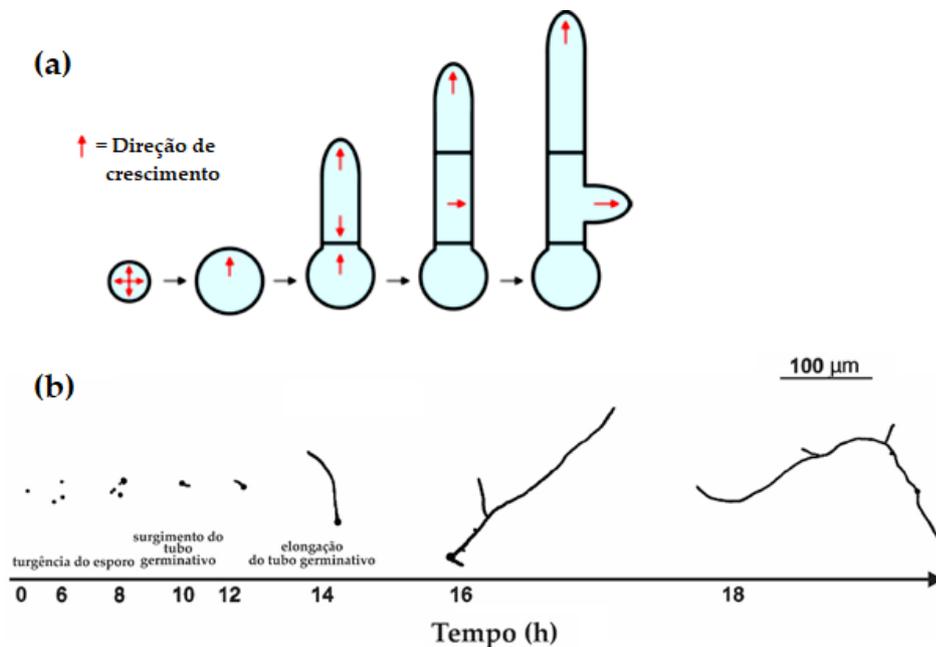


Figura 2.1.11 - Etapas da germinação em fungos filamentosos. (a) Etapas de expansão isotrópica e polarizada durante o desenvolvimento das hifas. (b) gráfico mostrando o surgimento das hifas em função do tempo. Adaptado de BIZUKOJC; LEDAKOWICZ, 2006; STEINBERG *et al.*, 2017.

A parede celular do fungo apresenta diversas funções que permitem a interação do fungo com a sua vizinhança. Ela oferece proteção contra as ações de enzimas e outros compostos nocivos ao microrganismo (BOWMAN; FREE, 2006; MOORE *et al.*, 2011; RUIZ-HERRERA, 2012); fornece ao fungo suporte estrutural que resiste às mudanças de pressão hidrostática estabelecidas pelo meio ambiente (BOWMAN; FREE, 2006; RUIZ-HERRERA, 2012); acumula enzimas que atuam na quebra de diferentes compostos impermeáveis, tais como polissacarídeos e proteínas (BOWMAN; FREE, 2006; RUIZ-HERRERA, 2012); e está associada à fisiologia do

fungo, mediando a entrada de nutrientes e saída de enzimas e metabólitos (BOWMAN; FREE, 2006; RUIZ-HERRERA, 2012). Outra característica observada é atuação da parede celular como um centro de sinalização. Ela transmite informações ao núcleo da célula viabilizando a síntese de substância específicas, envolvidas na taxa de crescimento do microrganismo e em outras reações características como respostas aos diferentes estímulos provocados pelo ambiente (BOWMAN; FREE, 2006; RUIZ-HERRERA, 2012).

A composição química da parede celular dos fungos, de uma forma geral, exibe um design universal básico constituído de polissacarídeos, glicoproteínas, proteínas e outros componentes em menores proporções como pigmentos e sais inorgânicos, formando uma multicamada complexa (BOWMAN; FREE, 2006; WEBSTER; WEBER, 2007; RUIZ-HERRERA, 2012). A Figura 2.1.12 apresenta a estrutura da parede celular típica de fungos filamentosos. Os principais polissacarídeos constituintes da parede celular são glucana e quitina (BOWMAN; FREE, 2006).

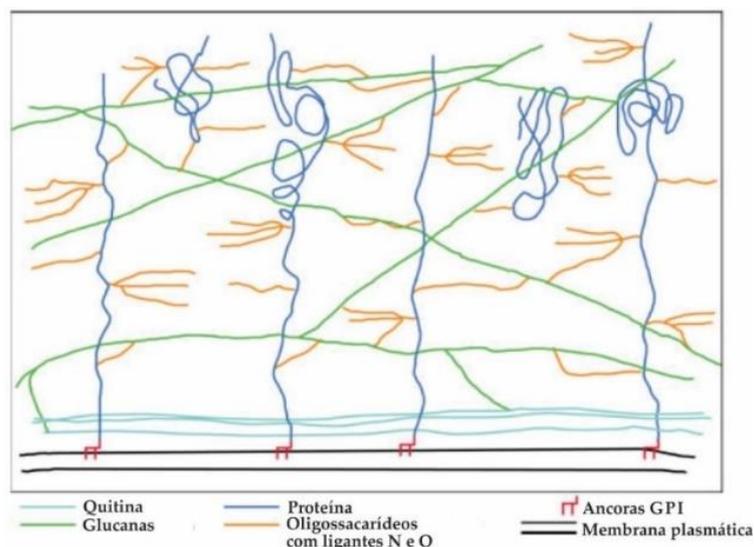


Figura 2.1.12 - Disposição esquemática da estrutura da parede celular de fungos filamentosos. Adaptado da referência (BOWMAN; FREE, 2006).

As camadas de glucana, quitina juntamente com proteínas estão interligadas através de ligações cruzadas estabelecidas por oligossacarídeos contendo átomos de

nitrogênio e oxigênio (BOWMAN; FREE, 2006; RUIZ-HERRERA, 2012; MOORE, 2013). Como indicado na Figura 2.1.12, a parede celular ainda possui grupos glicoproteicos contendo ancoras de glicosilfosfatidilinositol que se liga às proteínas da membrana plasmática (BOWMAN; FREE, 2006; RUIZ-HERRERA, 2012; MOORE, 2013).

Diante do que foi discutido, o objetivo geral dessa primeira parte da tese é o de sintetizar e caracterizar materiais biohíbridos luminescentes compostos pelos fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Trichoderma spp* e *Phialomyces macrosporos* e redes metal-orgânicas à base de íons lantanídeos (Térbio e európio). Especificamente, pretendeu-se:

- a) Produzir biohíbridos à base de fungos filamentosos-Ln (Tb) MOFs e Ln (Eu) MOFs;
- b) Analisar a morfologia dos biohíbridos utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- c) Investigar a luminescência dos biohíbridos com o auxílio das técnicas de espectroscopia de fotoluminescência e microscopia óptica de fluorescência;
- d) Avaliar a toxicidade das MOFs sobre os fungos filamentosos.

2.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.2.1 Reagentes

As MOFs de térbio e európio foram sintetizadas e cedidas pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Severino Alves Junior da Universidade Federal de Pernambuco para a produção do trabalho de pesquisa em conjunto utilizando fungos/MOFs de lantanídeos. Os reagentes utilizados para síntese das mesmas foram o ácido melítico (ácido-1,2,3,4,5,6-benzeno-hexacarboxílico, 99%) (Aldrich), óxidos de lantanídeos de térbio e európio (Aldrich, 99%) e Ácido nítrico (Dinâmica), ambos utilizados sem purificação prévia. Para o cultivo das espécies fúngicas foram utilizados Agar (Himedia), Czapeck (Kasvi) e D-dextrose (Synth) sem nenhum tratamento prévio.

2.2.2 Produção de Biohíbridos com Ln-MOFs

As MOF de térbio e európio foram sintetizadas a partir da mistura de 0,5 mmol de ácido melítico (marca) e 0,5 mmol de nitrato de térbio (ou európio) hexahidratado ($\text{Ln}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em um recipiente contendo 5 mL de água deionizada. Após a mistura, o sistema foi mantido em agitação constante durante 5 min. Em seguida, a solução foi transferida para um tubo do tipo falcon de 15 mL e, após a adição lenta de 1,5 mL de solução de álcool etílico 30% v/v, obteve-se a MOF cristalina. O material foi filtrado e secado a vácuo.

Depois, 60 mg do sólido foi disperso em 50 mL de água deionizada, e esse sistema foi submetido a um tratamento ultrassônico, com um auxílio de uma sonda

ultrassônica de 20 kHz (Vibracell VC 130, Sonics Instruments, utilizando uma ponta de titânio de 0,6 cm de diâmetro), durante 2 h, para diminuir o tamanho das partículas. A solução sonicada foi filtrada com o auxílio de um filtro hidrofóbico de tamanho de poros de 0,8 μm . Em seguida, separou-se um frasco de penicilina de 20 mL. Nesse frasco, foram adicionados 4 mL de água deionizada e 5,0 mL de suspensão de Ln-MOF (de térbio ou de európio). O frasco foi vedado com uma tampa feita de atadura e algodão hidrofóbico. O sistema foi esterilizado.

Após a esterilização do frasco, em uma autoclave, durante 20 min numa temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm, 1,0 mL de uma solução de glicose 2% e 100 μL de uma solução de esporos dos fungos *Phialomyces macrosporus* ($3,75 \times 10^4$ esporos/mL), foram introduzidos no frasco de penicilina. Todo esse procedimento foi realizado numa capela de fluxo laminar, previamente higienizada. Depois, o frasco foi colocado numa incubadora a 28 °C para crescimento do fungo durante 7 dias. Após esse período, os sistemas foram lavados várias vezes com água deionizada esterilizada e armazenados em frascos de penicilina contendo água deionizada esterilizada.

O mesmo procedimento foi utilizado para cultivar as espécies de fungo *Trichoderma spp* ($1,16 \times 10^7$ esporos/mL) e *Aspergillus niger* ($9,50 \times 10^5$ esporos/mL). Todo o experimento foi realizado em triplicata juntamente com um experimento controle, que consistiu apenas no cultivo dos fungos nativos, utilizando um frasco de penicilina de 20 mL contendo 9 mL de água deionizada e 1,0 mL de solução de glicose 2%, para efeito de comparação.

2.2.3 Secagem de Ponto Crítico

Para a realização das medidas de difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de luminescência, as amostras dos materiais biohíbridos foram secas em uma câmara de ponto crítico (Leica EM CPD 030, FIOCRUZ-Ba). Para isso, o material biohíbrido foi gradualmente desidratado, substituindo a água por

etanol. Para a completa desidratação, o micélio foi mergulhado em uma solução de etanol 30% (v/v) por 15 minutos. Depois, a fração volumétrica de etanol foi aumentada para 50, 75, 90 e 100% em intervalos sucessivos de 15 minutos para cada passo. Em seguida, o micélio foi colocado na câmara de secagem contendo etanol 100%. Dentro da câmara, com temperatura em torno de 8-9 °C, o etanol foi gradativamente sendo substituído por CO₂ líquido. Após a completa substituição do etanol por CO₂ líquido, a temperatura da câmara de secagem foi aumentada para 40 °C, permitindo a passagem do CO₂ do estado líquido para o estado gasoso e, com isso, secando os biohíbridos.

2.2.4 Propriedades Luminescentes das Ln-MOFs em Solução Salina e Contendo Aminoácidos

Para avaliar a influência da luminescência das Ln-MOFs dispersadas em meio aquoso contendo sais e/ou aminoácidos, 300 µL de suspensão de Eu-MOFs e Tb-MOFs (2,4 mg mL⁻¹) foram misturados com água deionizada e uma mistura de sais (MgCl₂ (2,5 mM), KH₂PO₄ (0,7 mM) and NaCl (1,5 mM)) e/ou aminoácidos arginina (13,6 mM), histidina (1,9 mM) e lisina (1,8 mM). A luminescência de diferentes conjuntos da mistura foi medida em um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC equipado com uma lâmpada de arco de Xe (150 W) contínua. Para a realização das medidas utilizou-se a abertura da fenda de excitação e emissão, ambos no valor de 3 nm.

2.2.5 Ensaio de Viabilidade Celular

Testes de toxicidade das Ln-MOFs sobre os fungos foram monitorados a partir de ensaios de crescimento radial de fragmentos de biohíbridos em meio sólido. Em placas de Petri de 9 cm, previamente esterilizadas, foram adicionados 20 mL de meio de cultura composto de dextrose (20 g L⁻¹) e agar (15 g L⁻¹). As placas foram mantidas

dentro da capela de fluxo laminar sob radiação ultravioleta até a solidificação do meio de cultura. Depois, um pequeno fragmento dos biohíbridos, constituídos pelas três espécies de fungos e pelas MOFs de térbio e európio, foi colocado no centro da placa de Petri. As placas foram incubadas em uma faixa de temperatura que variou de 28° a 30°C durante 216 h. Medidas do diâmetro da placa foram realizadas ao longo de quatro eixos estabelecidos na placa de Petri. Cada medida foi tomada a cada 12 h nos dois primeiros dias e a cada 24 h a partir do terceiro dia. Todos os experimentos foram realizados em triplicata juntamente com o experimento controle de crescimento radial dos fungos nativos para efeito de comparação.

2.3 CARACTERIZAÇÕES

2.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Imagens de MEV foram adquiridas em um equipamento JEOL JSM-6610LV, localizado no Laboratório Multiusuário de Microscopia-LAMUME, no instituto de Física da UFBA, equipados com dispositivo EDS Link ISIS300 para análise química de micro-áreas. Os espectros de raios-X de Energia dispersiva (EDS) foram obtidos utilizando regiões de micrografias com magnificação de 500x.

2.3.2 Microscopia Óptica de Luminescência

As análises de microscopia de fotoluminescência foram realizadas em um microscópio Olympus BX51, equipado com uma câmera CCD monocromática Retiga 2000R. as amostras foram iluminadas com uma lâmpada de vapor de mercúrio usando um filtro de excitação BP380-385 e um filtro de emissão BA420. Imagens adicionais também foram feitas utilizando um microscópio de varredura confocal a laser Leica TCS SP8 equipado com uma objetiva de 63X de magnificação e uma fonte de laser com comprimento inicial de 405 nm.

2.3.3 Espectroscopia de Luminescência de Estado Sólido

As medidas de fotoluminescência dos materiais biohíbridos secos foram realizadas utilizando um espectrofluorímetro Horiba Jobin-Yvon Fluorolog-3 com fontes de excitação de lâmpadas de xenônio (450 W) contínua e pulsada para sólidos equipado de monocromadores de excitação e emissão duplo, para a região do UV-VIS, com fotomultiplicadora Hamamatsu R928P, e um monocromador simples para

emissões no infravermelho próximo, com fotomultiplicadora Hamamatsu H10330A-75, localizado no instituto de química da Universidade Federal de Pernambuco.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O trabalho de produção de materiais biohíbridos luminescentes discutido neste capítulo também fez parte da tese do estudante Leonis Lourenço da Luz, do Programa de Pós-graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. O referido estudante foi o responsável pela síntese das Ln-MOFs, pelas medidas de difração de raios-X e pelas medidas de espectroscopia de luminescência de estado sólido dos biohíbridos. O presente autor ficou responsável pela realização das medidas de tamanho de partículas e potencial zeta, pelo cultivo das espécies fúngicas e produção dos biohíbridos, pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura e de microscopia óptica de fluorescência, pelas medidas de espectroscopia de luminescência em meio líquido e pelos ensaios de viabilidade celular. As medidas de tamanhos de partículas, potencial zeta, DRX, e espectroscopia de luminescência dos biohíbridos já foram discutidos na tese do Leonis, defendida no ano de 2018, e serão citadas como Da Luz, 2018.

Os trabalhos descritos na literatura indicam que os materiais não-biológicos mais utilizados para a obtenção de sistema biohíbridos são aqueles com dimensões que se encontram na escala nanométrica (FAKHRULLIN *et al.*, 2012). Isso se deve ao fato de os materiais biológicos, de maneira particular os microrganismos, apresentarem uma morfologia, com arquiteturas complexas e únicas, adequada para a montagem controlada de nanopartículas (FAKHRULLIN *et al.*, 2012). Dessa forma, para integrar materiais com dimensões diferentes daquelas requisitadas para a formação de materiais biohíbridos, uma etapa adicional é necessária para adequar as partículas à faixa de tamanho requerida.

No caso das partículas de Ln-MOFs, a síntese empregada permite que esses materiais cristalizem na forma de microcristais (DA LUZ *et al.*, 2014). Com isso, uma etapa de redução do tamanho das partículas obtidas, utilizando uma sonda

ultrassônica, foi necessária. Mesmo após a sonicação, os microcristais não foram completamente fragmentados, como pode ser visto na Figura 2.4.1 para as partículas de Eu-MOF. Dessa forma, após sonicação, a suspensão preparada ainda foi filtrada, com um auxílio de filtro com poros de 0,8 μm , para evitar a inserção de partículas muito grandes no meio de cultivo microbial. Medidas de distribuição de tamanho das partículas mostraram que as Ln-MOFs apresentaram tamanhos que variam de 70 a 900 nm (DA LUZ, 2018). Além disso, foi observado que a partir de valores de percentual de distribuição acumulada, 90% das partículas de Tb-MOF e Eu-MOF apresentaram dimensões abaixo de 600 nm e 400 nm, respectivamente (DA LUZ, 2018). Esses valores são bem menores do que o diâmetro médio (10-30 μm) das hifas fúngicas, fato que ajuda na montagem dessas partículas sobre a superfície da estrutura microbiológica.

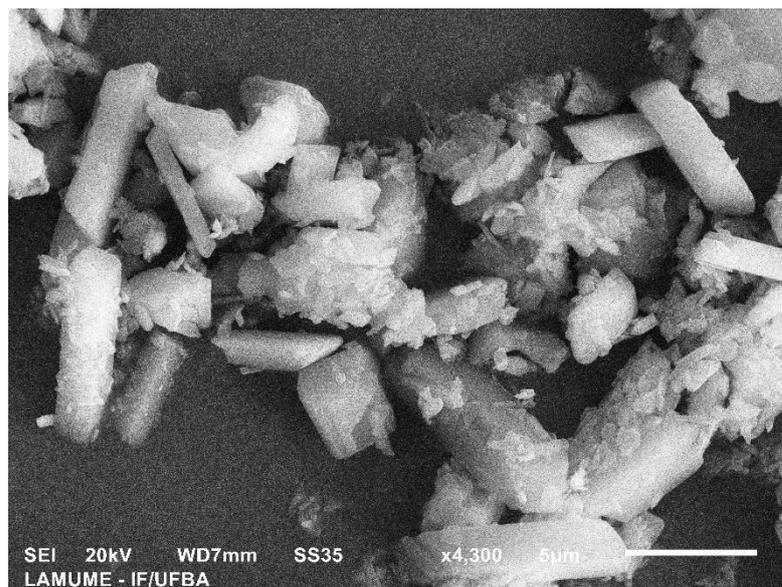


Figura 2.4.1 - Micrografias de MEV das partículas de Eu-MOF após sonicação durante 2 h.

A integração das partículas do componente não-biológico ocorre na superfície de microrganismos e pode ser facilmente monitorada através da mudança de aspectos texturais que ocorrem nessa região. A Figura 2.4.2 exibe imagens de MEV de hifas do fungo *Aspergillus niger* (*A. niger*) cultivadas na ausência (2.4.2(a)) e na presença (2.4.2(b)) de uma solução nutritiva contendo cristais de Tb-MOF. Comparando as

imagens, verifica-se, claramente, a diferença na região superficial dos sistemas investigados. Para o fungo *A. niger* nativo, as hifas são lisas e, para fungo crescido, no meio contendo as Tb-MOFs, a hifa selecionada está uniformemente recoberta. Já a Figura 2.4.2(c e d) se referem aos biohíbridos *Phialomyces macrosporus* (*P. macrosporus*)/Eu-MOF e *Trichoderma spp* (*Trich*)/Tb-MOF, respectivamente. As imagens indicam a manutenção das estruturas morfológica do componente biológico, o que é fundamental na preparação de materiais biohíbridos. Além disso, na Figura 2.4.2(d) também é observado a presença de hifas não funcionalizadas, algo verificado em todos os sistemas preparados. Isso pode estar atrelado à estabilidade da suspensão de Ln-MOFs preparadas, que precipitam lentamente ao longo de todo o processo de ramificação das hifas durante a etapa de desenvolvimento das espécies fúngicas. De maneira geral, foi constatado que a deposição das Ln-MOFs ocorre com leves diferenças nas três espécies estudadas (DA LUZ, 2018), o que pode estar relacionado com as diferenças na composição da parede celular das espécies estudadas.

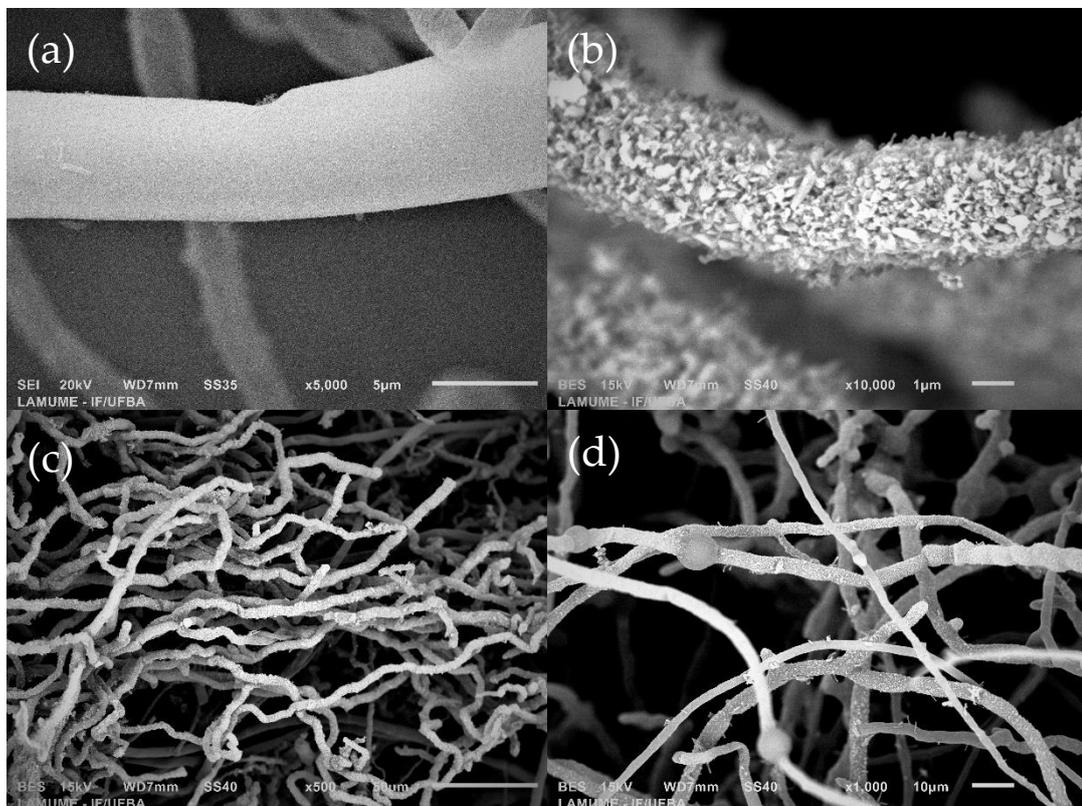


Figura 2.4.2 - Micrografias de MEV do fungo *A. niger* nativo (a) com 5000X de aumento e do seu biohíbrido *A. niger*/Tb-MOF (b) com 10000X de aumento, (c) *P. macrosporus*/Eu-MOF com 500X de aumento e (d) *Trich*/Tb-MOF com 1000X de aumento.

A Figura 2.4.3 mostra a imagem de MEV do biohíbrido *P. macrosporus*/Eu-MOF apresentado na Figura 2.4.2(c) com magnificação de 10 000X. A imagem destaca os diferentes tamanhos de partículas de Eu-MOFs integradas na superfície do fungo. Além disso, é observado a presença de substâncias com aspecto semelhante à de teias recobrendo as Eu-MOFs, fato verificado em todos os sistemas preparados. Esses materiais são substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos fungos (EPSTEIN; NICHOLSON, 2016). A Figura 2.4.3 ainda permite inferir que a integração das partículas de MOFs sobre as hifas fúngicas é reforçada por esses biopolímeros, que ajudam a manter os componentes biológicos e não-biológicos mais fortemente ligados (mais detalhes serão apresentados à frente).

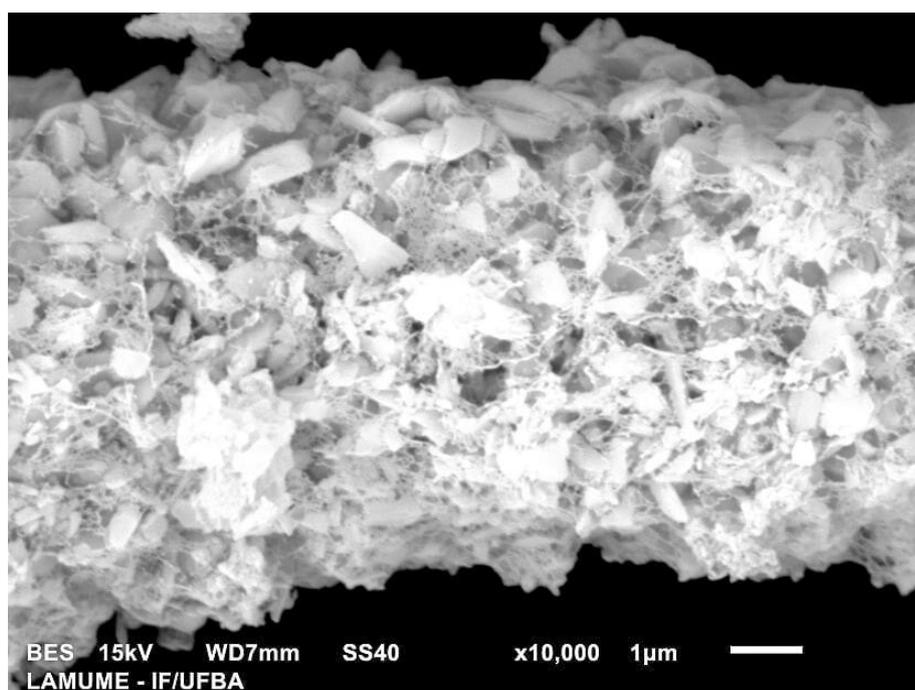


Figura 2.4.3 - Micrografias de MEV do fungo *P. macrosporus*/Eu-MOF com 10 000X de aumento.

Durante a aquisição das imagens de MEV dos biohíbridos, medidas de espectroscopia de energia dispersiva de raios-x (EDS) indicaram que as partículas integradas à parede celular fúngica apresentam átomos de térbio e európio (DA LUZ, 2018). No entanto, como um dos objetivos é a produção de fungos filamentosos com luminescência artificial é necessário avaliar se a luminescência das partículas de Ln-

MOFs não é afetada pelo processo de integração na parede celular dos fungos. Tal preocupação se deve ao fato de que durante a deposição das Ln-MOFs, os fungos naturalmente liberam enzimas no meio extracelular para degradar macro e micromoléculas que podem ser utilizadas como fonte de carbono, nitrogênio e oxigênio necessários para o seu crescimento e produzem metabólitos também dispersados no meio extracelular. Como a luminescência dos íons lantanídeos trivalentes é fortemente dependente da simetria da primeira esfera de coordenação (BINNEMANS, 2015; BUNZLI, 2015), a interação das Ln-MOFs com as substâncias produzidas pelos fungos e/ou até mesmo com os componentes da parede celular pode alterar os mecanismos de absorção e emissão de energia desses materiais. Como apontado por Da Luz (2018), os dados de DRX dos biohíbridos mostraram a preservação da estrutura cristalina da Ln-MOFs sem a formação de outras fases cristalinas (DA LUZ, 2018).

Da Luz (2018) ainda mostrou que os biohíbridos exibem excelentes propriedades luminescentes, com intensa emissão de radiação na região do visível sob exposição à radiação UV e grandes deslocamentos Stokes. O perfil espectral obtido para os biohíbridos é o mesmo das Ln-MOFs isoladas (DA LUZ, 2018). Assim, as bandas estreitas de emissão observadas para os híbridos à base Eu-MOFs, têm a luminescência centrada nos íons Eu^{3+} relacionada às transições ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_j$ ($J = 0, 1, 2, 3$ e 4), o que confere ao biohíbrido uma cor vermelha, determinada através do diagrama de cromaticidade CIE (Comissão Internacional de Iluminação) (DA LUZ, 2018). Da mesma forma, para os híbridos à base de Tb-MOFs, as bandas de emissão são típicas das transições eletrônicas ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_j$ ($J = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ e 6) que ocorrem no íon Tb^{3+} , fazendo com que os biohíbridos tenham uma cor verde (DA LUZ, 2018). Variáveis importantes para a caracterização de sistemas luminescentes como tempo de vida do estado excitado (τ), eficiência quântica (η) e razão de intensidade dos sistemas híbridos foram investigadas e demonstraram que os componentes da parede celular não

influenciaram no mecanismo de luminescência dos íons Ln^{3+} das Ln-MOFs embebidas na parede celular das espécies de fungos filamentosos estudadas (DA LUZ, 2018).

Confirmada a manutenção da estrutura cristalina e das propriedades luminescentes das Ln-MOFs localizadas na superfície dos fungos filamentosos, é importante tentar compreender como as partículas de Ln-MOFs são depositadas na parede celular desses microrganismos. Como já foi descrito, a parede celular fúngica é complexa e apresenta muitos grupos funcionais que ampliam a possibilidade de interações entre os componentes biológico e não-biológico. Geralmente os grupos funcionais, tais como -SH, -OH, -COOH, -NH e ligantes desprotonados como RCOO^- atuam majoritariamente em processos de bioadsorção, por exemplo, de cátions metálicos quando o microrganismo já está desenvolvido (VOLESKY, 2007; GADD, 2009). No entanto, o processo de integração de partículas, aqui considerado, ocorre concomitante ao desenvolvimento da hifa (crescimento do microrganismo e formação da parede celular durante o crescimento). Dessa forma, além da ação dos grupos funcionais, a carga superficial e as características hidrofóbicas de ambos os componentes, devem ser levados em consideração para se tentar compreender como as partículas de Ln-MOFs aderem à superfície dos fungos filamentosos.

De forma geral, tanto os esporos, quanto as hifas dos fungos filamentosos apresentam uma densidade de carga superficial negativa, pelo menos nos estágios iniciais de desenvolvimento das hifas (ZHU *et al.*, 2016), e podem ter características hidrofóbicas (SMITS *et al.*, 2003; CHAU *et al.*, 2009). A superfície carregada negativamente se origina em virtude da presença de moléculas contendo grupos facilmente ionizáveis como carboxila (-COOH) e espécies de fosfato em uma ampla faixa de pH (2-10) (DOUGLAS *et al.*, 1959; JONES *et al.*, 1988). Enquanto que as propriedades hidrofóbicas são oriundas da presença de proteínas chamadas de hidrofobinas e/ou metabolitos secundários localizadas na superfície dos esporos e das hifas (SMITS *et al.*, 2003; CHAU *et al.*, 2009).

Vários trabalhos têm mostrado a interação de fungos filamentosos com partículas com densidade de cargas superficial negativa e positiva (LIU *et al.*, 2008; RISPAIL *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2016). Liu e colaboradores (2008) estudaram o cultivo do fungo *Aspergillus niger* (hidrofóbico e com superfície carregada negativamente) em uma solução contendo derivados catiônicos do politiofeno (composto anfipático, ou seja, apresenta regiões hidrofílicas e hidrofóbicas na estrutura molecular). Eles inferiram que tanto, interações hidrofóbicas quanto atrações eletrostáticas (a presença de carga positiva no politiofeno e a negativa do fungo) contribuem para a interações do polímero com a parede celular fúngica (LIU *et al.*, 2008). Por outro lado, Zhu e colaboradores (2016) interagiram vários tipos de nanopartículas (com carga superficial negativa) com o fungo filamentoso *Xylaria striata* (com carga superficial negativa que lentamente muda para positiva após 70 h de cultivo). Segundo os autores, durante a mudança da carga superficial de negativa para positiva das hifas, atrações eletrostáticas ocorrem, viabilizando a interação entre os componentes biológicos e não-biológicos (ZHU *et al.*, 2016).

No caso das Ln-MOFs, os dados de luminescência indicaram a ausência de interação cooperativa com os fungos (DA LUZ, 2018). Como a simetria de coordenação dos íons Ln³⁺ não é afetada após a integração das Ln-MOFs na parede celular do fungo, isso sugere que as interações entre os componentes biológicos e não-biológicos não se dá através de ligações covalentes. As medidas de potencial zeta mostraram que a superfície das MOFs é carregada negativamente (-30 mV) (DA LUZ, 2018). Considerando que, para os fungos estudados, situação semelhante à aquela reportada por Zhu e colaboradores (2016) esteja acontecendo (mudança gradual da carga superficial dos fungos), atrações eletrostáticas das cargas positivas na superfície dos fungos e negativa das Ln-MOFs propiciam a união dos componentes biológicos e não-biológicos. Além disso, como já foi comentado, substâncias poliméricas secretadas pelo fungo, geralmente polissacarídeos e proteínas, possuem propriedades adesivas,

intensificando a integração das Ln-MOFs superfície dos fungos (EPSTEIN; NICHOLSON, 2016).

Considerando as propriedades luminescentes dos biohíbridos, imagens de microscopia óptica de fluorescência também foram realizadas para investigar a luminescência artificial dos materiais biohíbridos vivos constituídos pelos fungos filamentosos/Ln-MOFs. Essa técnica é simples, rápida e permite monitorar eventos a nível celular e subcelular (KUBITSCHECK, 2013). Como já comentado, as Ln-MOFs exibem intensa emissão de radiação na região do visível sob exposição a luz UV, permitindo a aquisição de imagens dos biohíbridos *in vivo*, com fácil distinção entre o alvo e as emissões de fundo (DA LUZ, 2018).

A Figura 2.4.4 exhibe as micrografias dos bio-híbridos constituídos pelos fungos *Aspergillus niger*/Ln-MOF (a e b) e *Trichoderma spp*/Ln-MOFs (c e d). Para a realização das imagens, fragmentos de micélio fúngico dos biohíbridos armazenados em frascos com água deionizada foram fixados em uma lâmina histológica e iluminados com o auxílio de uma lâmpada de vapor de Hg utilizando um filtro de excitação na faixa 340-390 nm e emissão partir de 420 nm. Como pode ser visto, as hifas dos biohíbridos à base Tb-MOFs e Eu-MOFs emitem radiação na cor verde e vermelha, respectivamente. Nas imagens, também é observado uma clara diferença na intensidade da radiação emitida pelos biohíbridos compostos pelas MOFs de térbio e európio. Enquanto, para os sistemas contendo térbio (Fig. 2.4.4 (a e b)), a luminescência no verde é facilmente observada, para aqueles à base de Eu-MOF a luminescência no vermelho é mais difícil de ser notada. Este comportamento, verificado nos Fungos/Eu-MOF, é devido à interação com moléculas de água. Quando o biohíbrido está no meio aquoso, moléculas de água se coordenam ao íon Eu^{3+} promovendo a formação de outro caminho para desativação do estado excitado do íon európio (HORROCKS; SUDNICK, 1979). Nesse caso, a maior parte da energia do elétron no estado excitado é transferida na forma de energia não-radiativa, energia vibracional, utilizada para oscilar as ligações O-H de moléculas de água ligadas aos íons Eu^{3+} (HORROCKS;

SUDNICK, 1979). Assim, apesar de existir uma grande quantidade de Eu-MOF na superfície dos fungos, o sinal de fotoluminescência é bastante atenuado. Vale ressaltar que, para as amostras secas, tal efeito não é observado (DA LUZ, 2018).

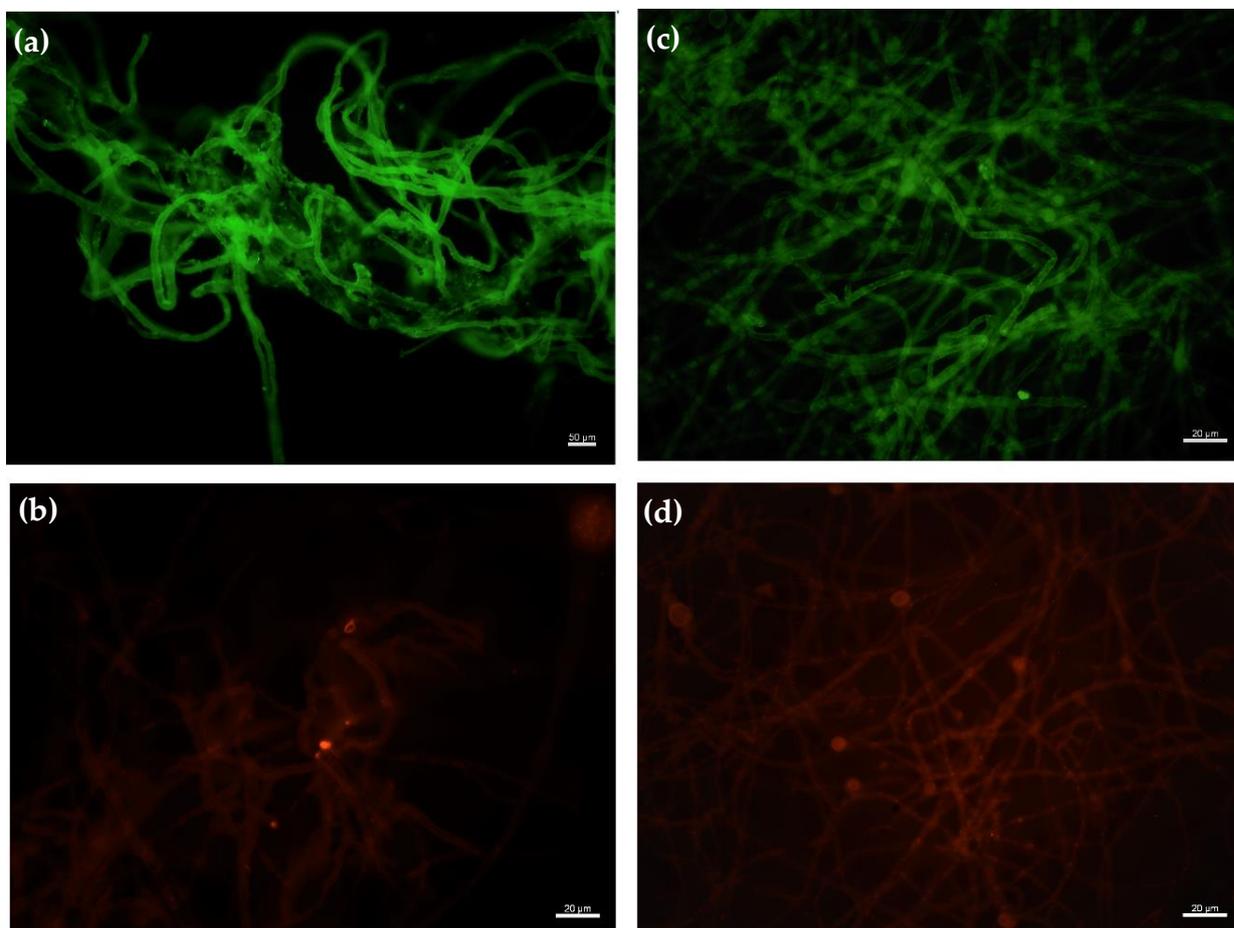


Figura 2.4.4 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência para (a) *A.n./Tb-MOF*, (b) *A.n./Eu-MOF*, (c) *Trich/Tb-MOF* e (d) *Trich/Eu-MOF*.

Micrografias de fluorescência dos sistemas híbridos também foram obtidas em maiores magnificações mostradas na Figura 2.4.5. Como pode ser visto na imagem, além de acumular Ln-MOFs na parede celular, é possível considerar que os fungos filamentosos estudados também conseguem internalizar partículas luminescentes e armazená-las no citosol ou ligá-las a componentes celulares da região intercelular. As partículas aparentemente internalizadas, estão depositadas em diferentes regiões ao longo das hifas formando agregados com diferentes tamanhos e formatos e, para o caso

dos híbridos à base de Eu-MOFs, a luminescência dessas partículas é facilmente observada. Como apontado por Da Luz (2018), a visualização das Ln-MOFs foi possível devido à fina camada de MOFs que recobriam as hifas na região investigada. Assim, como os resultados apresentados por Whiteside e colaboradores (2009) sobre a internalização de pontos quânticos pelo fungo da espécie *Penicillium solitum*, o acúmulo das partículas de Ln-MOFs, provavelmente, acontece dentro dos vacúolos dos fungos, sendo facilmente identificados na região intracelular dos microrganismos mesmo com a utilização de luz branca.

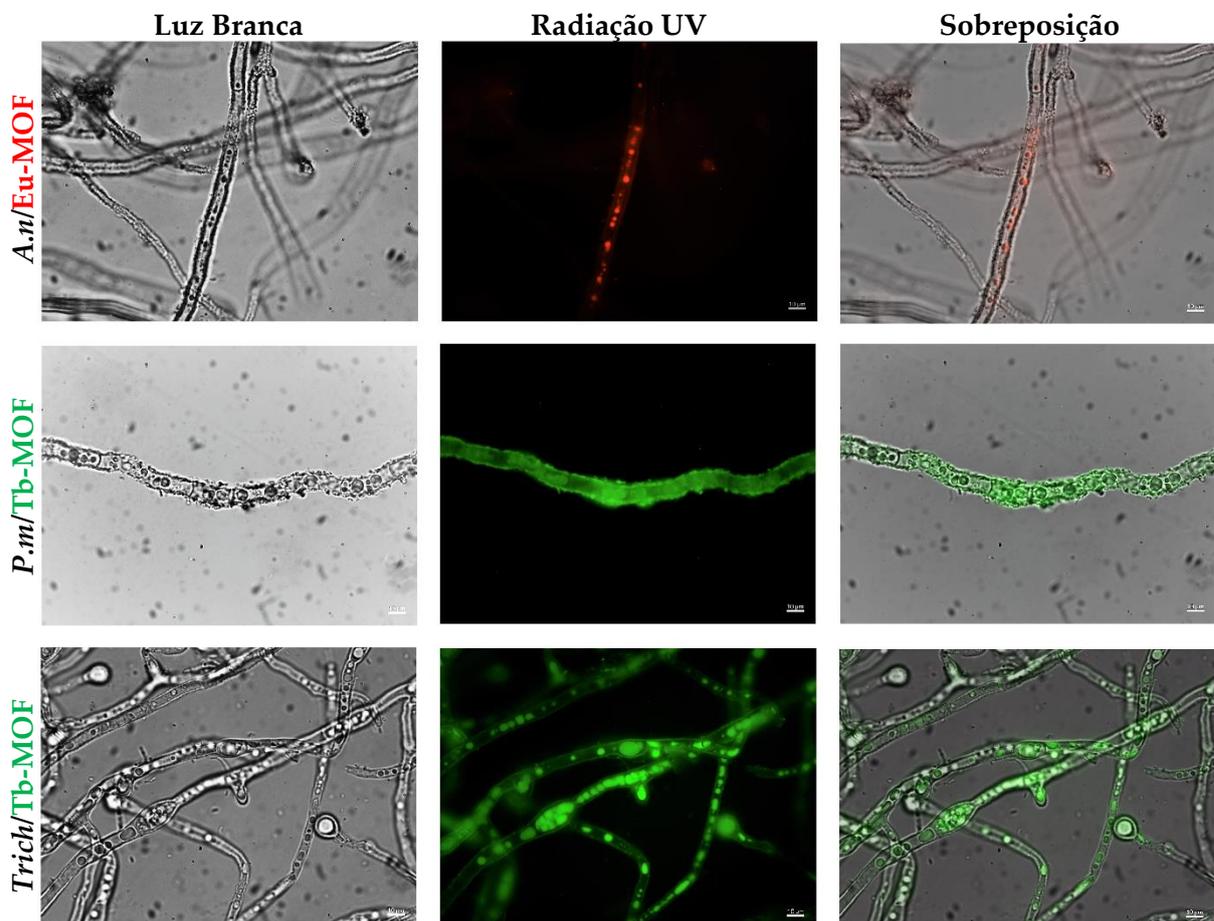


Figura 2.4.5 - Micrografias dos biohíbridos Fungos/Ln-MOFs em campo claro, fluorescência e sobreposição das duas primeiras imagens. Magnificação de 100x e barra de 10 µm.

Nos fungos, os vacúolos são considerados como um centro de armazenamento de substância e íons como, por exemplo, aminoácidos, enzimas hidrolítica e íons Ca^{2+} (WEBER, 2002; BORKOVICH; EBBOLE, 2010). Além disso, essas organelas também

atuam na captura e degradação de componentes celulares ou de espécies químicas que possam afetar a homeostase celular (KLIONSKY *et al.*, 1990; WEBER, 2002; BORKOVICH; EBBOLE, 2010; RICHARDS *et al.*, 2012). Os vacúolos se distribuem por várias regiões das hifas, apresentam uma variedade de formas estruturais (pequenas vesículas esféricas, ovais ou tubulares com tamanho variável) e são facilmente deformáveis (processo reversível), em virtude da intrínseca plasticidade podendo, portanto, serem estendidos e retraídos (WEBER, 2002; BORKOVICH; EBBOLE, 2010; RICHARDS *et al.*, 2010). Eles podem se movimentar ao longo de curtas distâncias (10-50 µm) no citosol e se fundir para originar vacúolos maiores (WEBER, 2002; DARRAH *et al.*, 2006; BORKOVICH; EBBOLE, 2010; RICHARDS *et al.*, 2010). Por exemplo, para o biohíbrido Trich/Tb-MOF submetido à radiação ultravioleta, claramente é visualizado as diferentes formas estruturais dos vacúolos e regiões em que aparentemente ocorrem a fusão de dois ou mais vacúolos.

Assim, a fim de sustentar a ideia de que o sinal de fluorescência observado surge das Ln-MOFs estocadas nas organelas dos fungos, experimentos adicionais de microscopia confocal de fluorescência com varredura de laser e espectroscopia de luminescência foram realizados (Figuras 2.4.6 e 2.4.7). As imagens de microscopia confocal foram feitas iluminando uma lâmina histológica contendo fragmentos de biohíbridos com laser no comprimento de onda de 405 nm. Na Figura 2.4.6(a) é observado a luminescência do sistema *A. niger*/Tb-MOF. A região escolhida para a aquisição da imagem apresenta hifas com a superfície não recoberta com partículas de Tb-MOFs (Fig. 2.4.6(b)), no entanto, verifica-se a presença de objetos ligeiramente esféricos, de vários tamanhos, possivelmente localizados no interior da hifa que emitem luz na cor verde. Além da emissão de radiação na cor verde, a excitação dos biohíbridos no comprimento de onda de 405 nm, também excitou componentes da estrutura fúngica proporcionando a emissão de radiação na cor azul, o que contribuiu para auxiliar na localização das partículas de cor verde. Assim, através de um processo de reconstrução 3D da imagem em (b), como indicado nas Figuras 2.4.6(c e d)). Na

Figura 2.4.6(d), é mostrado uma visão longitudinal (imagem na parte superior) e axial (imagem inferior), atestando que os objetos luminescentes estão no interior da estrutura tubular do fungo.

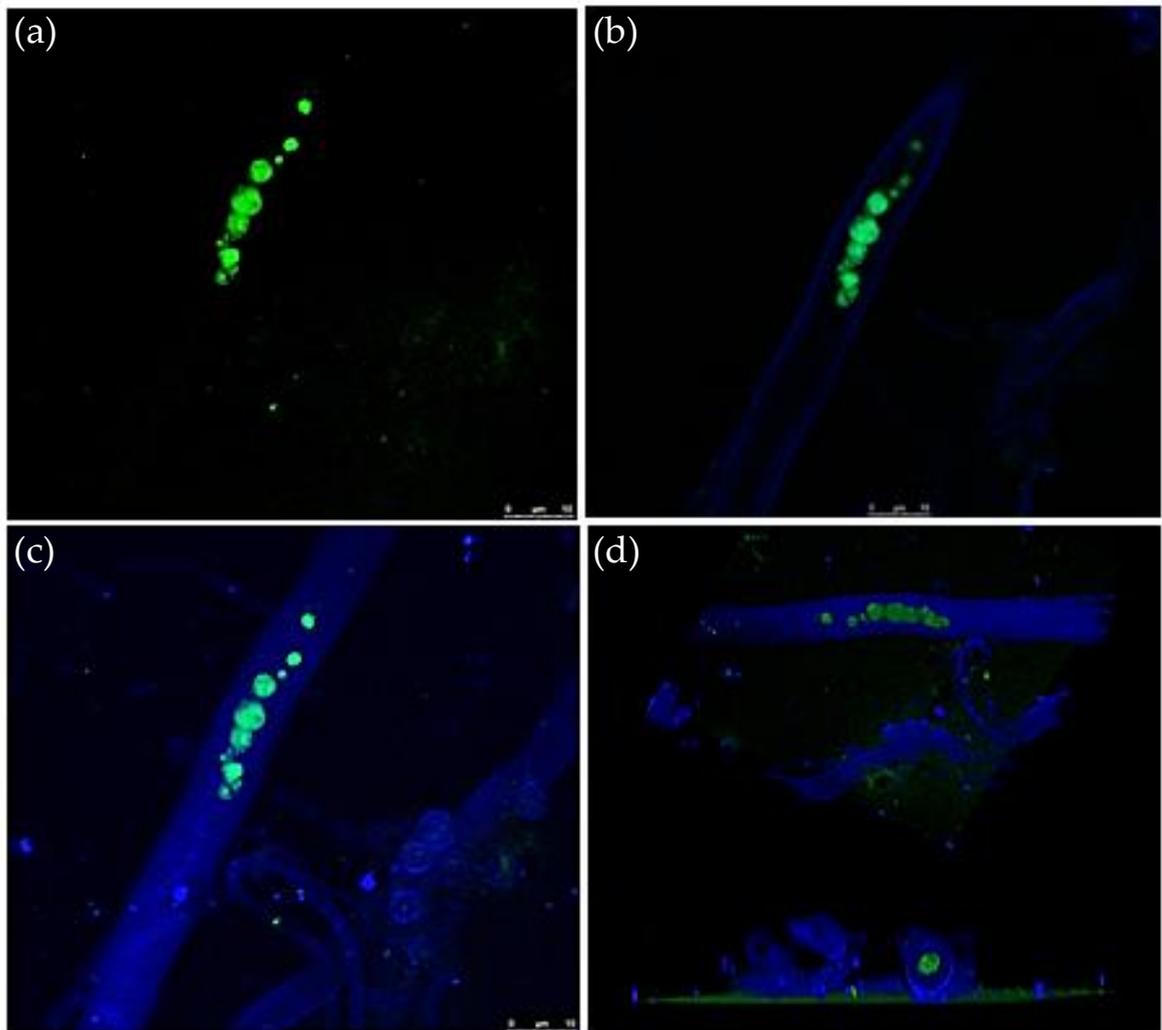


Figura 2.4.6 - Imagem confocal de varredura a laser do An/Tb-MOF: (a) hifa não recoberta contendo partículas de Tb-MOF internalizada e armazenadas em vários vacúolos, (b) destaque para os vacúolos fluorescentes, (c) e (d) reconstrução 3D de (b) destacando a localização interior de objetos luminescentes na estrutura tubular do fungo, escala de 10 μm .

Com o intuito de verificar se a cor verde observada é realmente devida à emissão de partículas Ln-MOFs internalizadas, medidas de luminescência, tanto das Ln-MOFs quanto dos biohíbridos, foram realizadas no comprimento de excitação de 405 nm. A Figura 2.4.7(a) se refere ao espectro de emissão das Tb-MOF após excitação em 312 nm (linha verde) e 405 nm (linha azul). Como pode ser visto, os espectros, nos

dois comprimentos de onda indicados, exibem as mesmas bandas de emissão, que são características das transições eletrônicas que ocorrem dentro do subnível f do íon Tb^{3+} . Já a Figura 2.4.7(b) mostra o espectro de emissão do biohíbrido *A. niger*/Tb-MOF em 312 nm (linha verde) e 405 nm (linha azul). Embora o espectro de emissão de estado estacionário (SS) também tenha exibido a emissão de radiação do fungo, o espectro de emissão resolvido no tempo (linha cinza) é idêntico ao o espectro em 312 nm (TR), o que significa a existências apenas de transições f-f do íon térbio. Tais resultados permitem concluir que as partículas internalizadas realmente são Ln-MOFs.

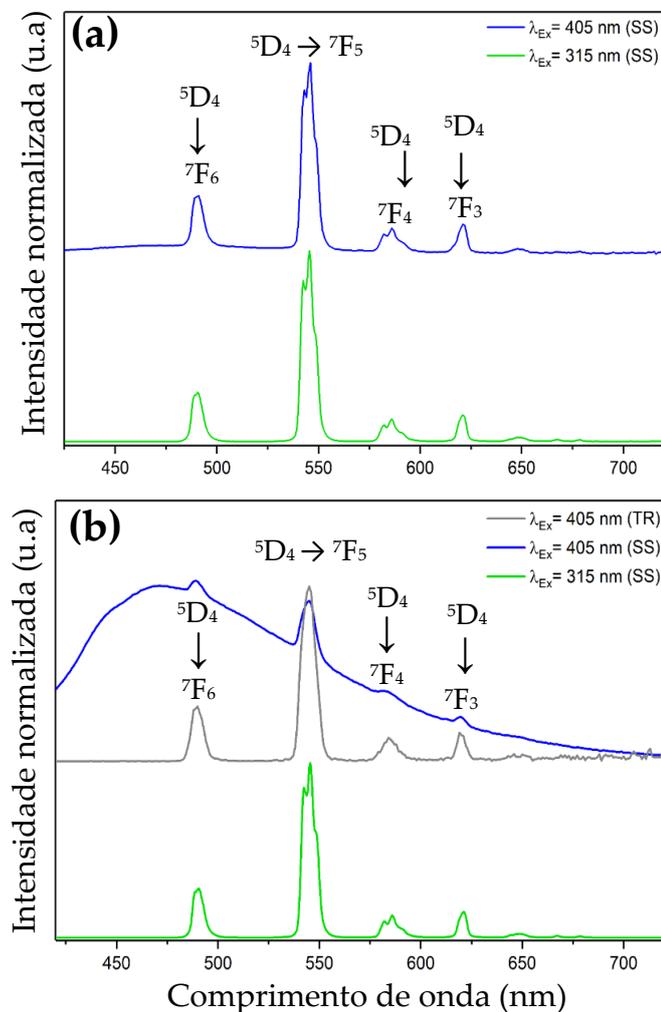


Figure 2.4.7 - Espectros de emissão de (a) estado estacionário (SS) para Tb-MOF em 312 e 405 nm e (b) SS para An/Tb-MOF em 312 nm, em 405 nm e resolvido no tempo (TR) em 405 nm. Para a aquisição do espectro resolvido no tempo, o intervalo do flash foi de 0.05 ms, com a janela da amostra de 0.2 ms, sendo considerado a contagem de 100 flashes.

Vale ressaltar que a excitação das Ln-MOFs no comprimento de onda de 405 nm traz uma importante vantagem para a utilização desses materiais como marcadores biológicos, por exemplo, para o estudo de organismos vivos. Como se sabe, o emprego de radiação ultravioleta é prejudicial a organismos vivos e, assim, efeitos danosos que, porventura poderiam ocorrer com células vivas ao interagir com a radiação ultravioleta é minimizado ao se utilizar o comprimento de onda em 405 nm para excitar a amostra.

A Figura 2.4.5 revelou a internalização de partículas de Ln-MOFs na região intracelular dos fungos filamentosos. Outro fato também verificado na Fig. 2.4.5 está associado à luminescência das partículas de Ln-MOFs internalizadas quando comparadas com aquelas localizadas na parede celular dos fungos. Como já comentado, a luminescência dos biohíbridos à base de MOFs de európio, fortemente reduzida devido à interação com moléculas de água, foi facilmente observada para as partículas estocadas no vacúolo fúngico. Então, para entender tal comportamento, foram realizadas medidas de luminescência das Ln-MOFs dispersadas em uma solução que simulava meio líquido do compartimento interno dos vacúolos (Figura 2.4.8). Estudos com extratos de vacúolos isolados do fungo *Neurospora crassa* encontrou concentrações de alguns aminoácidos como ornitina (18,1 mM), arginina (13,6 mM), histidina (1,9 mM), lisina (1,8 mM) e cátions como Na⁺ (1,5 mM), K⁺ (0,7 mM) e Mg²⁺ (2,7 mM) e, polifosfato (36,7 mM) (BORKOVICH; EBBOLE, 2010).

A Figura 2.4.8 (a) exhibe, para as medidas envolvendo a MOF de térbio, um histograma da razão entre a intensidade de emissão integrada das Tb-MOFs nas diferentes soluções. Notadamente, tanto os sais quanto os aminoácidos induziram um aumento significativo da luminescência das Tb-MOFs, principalmente para o caso da arginina e da lisina que exibiram uma melhoria acima de 150%. Para a solução contendo histidina, o menor aumento na intensidade da luminescência está relacionado ao efeito de filtro interno, uma vez que, este aminoácido absorve radiação na faixa do comprimento de excitação das Ln-MOFs como indicado Figura 2.4.8(b). A

manutenção do perfil espectral de emissão das Tb-MOFs, sugere que o aumento da intensidade da luminescência observada é devido a uma melhor coordenação estabelecida entre os íons metálicos e os ligantes melitato em função das interações supramoleculares dos aminoácidos localizados na superfície das MOFs (LI *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018; SU *et al.*, 2018). Essas interações bloqueiam a superfície de extinção da luminescência, comumente verificado em nanopartículas luminescentes (CHEN *et al.*, 2018).

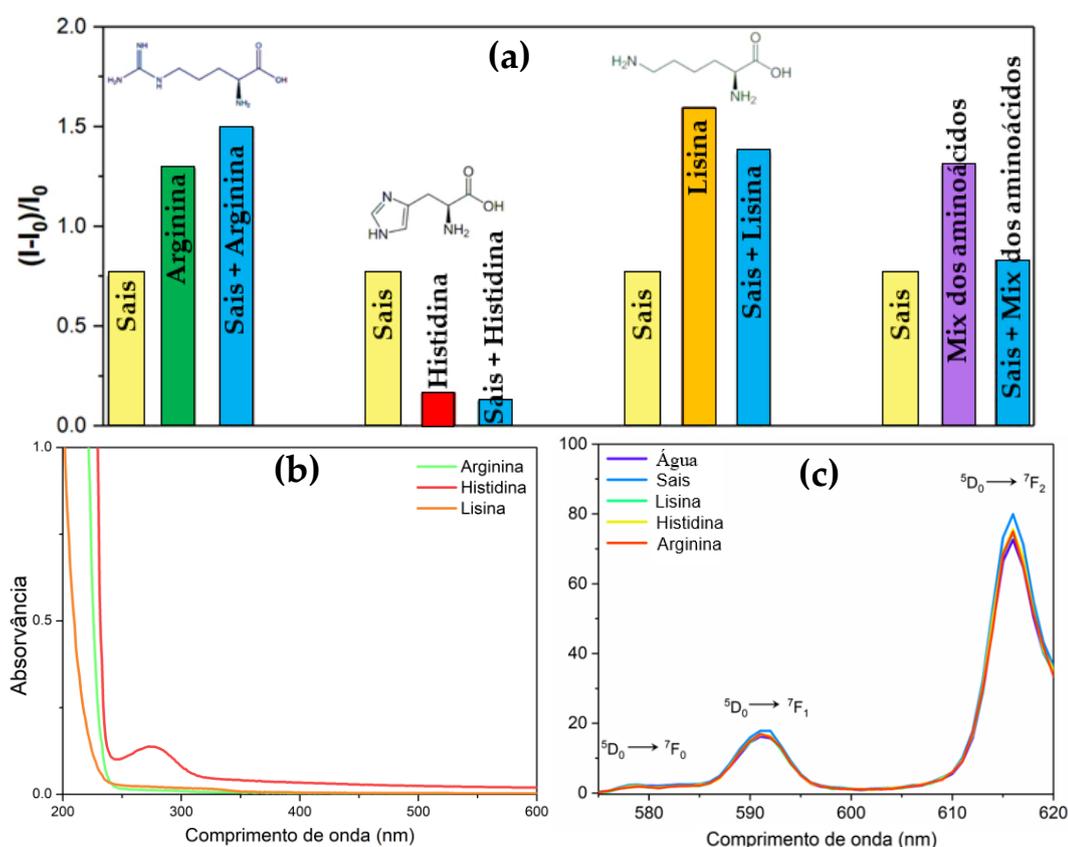


Figura 2.4.8 - (a) Intensidade de emissão integrada relativa de Tb-MOF na presença de sais e aminoácidos. I_0 e I representam a intensidade da emissão integrada da suspensão de Tb-MOF em água e com os sais e/ou aminoácidos, respectivamente. b) Espectro de absorção das soluções de aminoácidos e c) Espectro de emissão da Eu-MOF na presença de sais e aminoácidos.

Diante disto, Ln-MOFs foram dispersadas em uma solução aquosa contendo os sais cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio (MgCl₂) e dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) juntamente com os aminoácidos lisina, arginina e histidina simulando as respectivas concentrações indicadas acima. Alguns conjuntos de

experimentos de luminescência das Ln-MOFs foram investigados: em água, na solução aquosa contendo os sais, na solução contendo cada um dos aminoácidos, na solução salina e cada um dos aminoácidos, na solução constituída pela mistura dos três aminoácidos e na solução salina juntamente com os três aminoácidos. Os espectros de emissão (ver no Apêndice I os espectros dos sistemas com térbio) foram obtidos empregando o comprimento de onda de excitação de 312 nm.

Por outro lado, quando são considerados os experimentos com as MOFs de európio nenhuma mudança foi observada, como pode ser visto na Figura 2.4.8(c), apesar da facilidade de observar a emissão das partículas localizadas no vacúolo dos fungos. A razão desse comportamento ainda não está clara. Um ponto a ser destacado é que a composição do lúmem vacuolar é muito mais complexa do que aquela utilizada nos experimentos simulados. Nesse sentido, uma explicação para a melhoria na emissão da Eu-MOF seria existência de biomoléculas e íons dentro do vacúolo (enzimas, proteínas, entre outras) que poderiam evitar o efeito de extinção devido à coordenação de moléculas de água aos íons Eu^{3+} , como anteriormente mencionado.

Uma vez confirmada a internalização das partículas de Ln-MOFs na região intracelular dos fungos filamentosos, é necessário tentar entender a natureza dos mecanismos de internalização. Investigações relacionadas à internalização de nanopartículas em células biológicas têm mostrado que o processo de captura e inserção dessas partículas na região intracelular é dependente de vários fatores, tais como tamanho, forma, carga superficial e características hidrofóbicas dos componentes a serem internalizados (GENG *et al.*, 2007; GRATTON *et al.*, 2008; ALBANESE *et al.*, 2012). Em se tratando de células fúngicas, Rispaill e colaboradores (2014) estudaram a interação do fungo *Fusarium oxysporum* com pontos quânticos e nanopartículas magnéticas com diâmetro de 13,5 nm e 100-150 nm, respectivamente. Os autores verificaram que as partículas de pontos quânticos com uma superfície negativamente carregada (~ -30 mV) eram facilmente internalizadas (RISPAIL *et al.*, 2014). Por outro lado, para as nanopartículas magnéticas com uma superfície

carregada positivamente ($\sim +25$ mV), não foi observado internalização, mas apenas uma deposição não uniforme na parede celular do fungo (RISPAIL *et al.*, 2014). Assim, a justificativa para a internalização dos pontos quânticos está diretamente ligada ao tamanho das partículas. Como já discutido, o tamanho das partículas de Ln-MOFs foi restringido à faixa de 70 a 900 nm, ou seja, essas partículas são relativamente grandes para serem introduzidas na região interna do fungo. Nesse sentido duas questões foram levantadas para tentar explicar a internalização das partículas de Ln-MOFs.

A primeira questão leva em consideração a capacidade dos fungos degradarem moléculas orgânicas que são fontes de carbono e oxigênio necessárias para o seu crescimento. Nesse sentido, foi imaginado que os fungos poderiam degradar as moléculas do íon melitato, componente orgânico das Ln-MOFs, fazendo com que os íons térbio e európio liberados no meio aquoso fossem internalizados e, após interação com aminoácidos e/ou proteínas localizados no citosol ou no vacúolo (BORKOVICH; EBBOLE, 2010), precipitassem na forma de partículas de Ln-MOFs (YANG *et al.*, 2014; ANDERSON; STYLIANOU, 2017). Para avaliar tal hipótese, os esporos dos fungos estudados foram cultivados em um meio nutritivo contendo íons de térbio e európio. Como pôde ser observado por DA LUZ (2018), o desenvolvimento dos fungos foi comprometido na presença de íons térbio e európio livres na solução nutritiva. Isso significa que esses íons em solução apresentam um certo grau de toxicidade que afeta o crescimento do microrganismo. Diante desse fato, a hipótese em questão deve ser descartada.

A segunda hipótese admite que partículas com tamanhos menores que 70 nm foram produzidas durante o tratamento ultrassônico. No entanto, após a estocagem para análise das medidas de tamanho de partícula, pode ter ocorrido uma agregação levando a formação de partículas maiores. Tal ideia é sustentada pelo aparecimento de partículas com tamanhos maiores que 800 nm nos dados de distribuição de tamanho de partículas (DA LUZ, 2018). Como as suspensões preparadas foram filtradas utilizando um filtro de 0,8 μm , o tamanho das partículas deveria se limitar a

800 nm. Diante dessa questão, futuros experimentos serão realizados utilizando Ln-MOFs nanométricas.

O fato de as Ln-MOFs serem internalizadas pelos fungos filamentosos e de interagirem com biomoléculas que, de certo modo, podem melhorar a intensidade da radiação emitida, abre um campo de potenciais aplicações como marcadores biológicos e na área de liberação controlada de drogas (HORCAJADA *et al.*, 2010) e, também como componentes de sensores On-Off (CHEN *et al.*, 2017). No entanto, para serem empregados nessas áreas é necessário avaliar o grau de toxicidade dessas partículas quando interagem com células biológicas. Análises de toxicidade das Ln-MOFs com relação às espécies de fungos aqui utilizadas foram determinadas usando o ensaio AlamarBlue, bem como, medidas de crescimento radial em placas de Petri. Inicialmente os ensaios empregando o reagente AlamarBlue foi executado a fim de encontrar a toxicidade relativa das Ln-MOFs.

O ensaio AlamarBlue envolve a detecção da atividade biológica através da assimilação de um indicador redox que muda sua cor de azul (forma oxidada) para rosa (forma reduzida) durante o crescimento do fungo. AlamarBlue é amplamente utilizada para detectar quantitativamente a proliferação de células eucarióticas (humana e animal), de bactérias e fungos (REPP *et al.*, 2007; RAMPERSAD, 2012). Por exemplo, Santos e colaboradores (2018) reportaram a atividade celular, usando o AlamarBlue, de microelétrodos constituídos de peletes esféricos do *Aspergillus fumigatus* depois de experimentos de degradação eletroquímica do peróxido de hidrogênio. No entanto, para a avaliação da atividade biológica dos fungos e dos biohíbridos discutidos no presente trabalho, só foi possível realizar as medidas qualitativas (simplesmente a mudança de cor do sistema), como pode ser visto na Figura 2.4.9. A principal razão para o insucesso das medidas quantitativas foi devido ao crescimento estático dos microrganismos, resultando na dificuldade da coleta de fragmentos de fungos com a mesma massa. Dessa forma, conclusões baseadas em

medidas comparativas dos percentuais de redução do indicador redox realizados pelos fungos nativos e dos fungos decorados com Ln-MOFs, não foram possíveis.

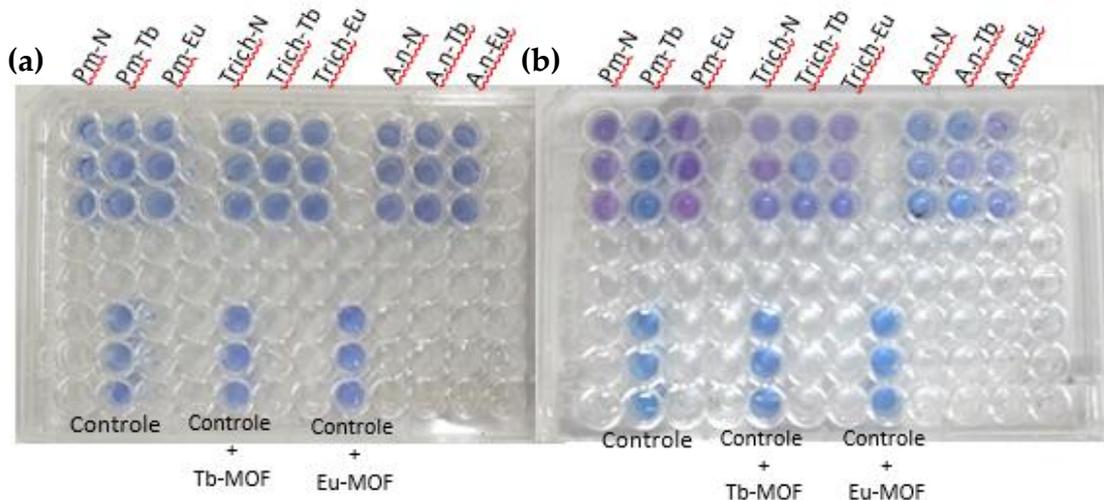


Figure 2.4.9 - Imagens das placas de 96 poços para a realização dos ensaios de atividade biológica. (a) Placas no início da incubação dos sistemas e (b) após 24 h de incubação. P.m-N = *Phialomyces macrosporus* nativo, Trich-N = *Trichoderma spp* nativo e A.n-N = *Aspergillus niger* nativo.

Para contornar as dificuldades apontadas, um teste mais fácil que permite avaliar a viabilidade celular, a partir do monitoramento do crescimento radial dos microrganismos em placas de Petri contendo um meio nutritivo sólido constituído por ágar-ágar e dextrose 1% (m/v), foi realizado. Para isso, foi assumido que uma diminuição na taxa de crescimento dos biohíbridos em comparação com a taxa dos fungos nativos seria uma direta indicação do efeito fungicida das Ln-MOFs sobre os microrganismos. Para esse experimento, pequenos fragmentos do micélio foram colocados no centro das placas de Petri, contendo o meio nutritivo sólido. O diâmetro do crescimento radial das culturas foi medido ao longo de 4 eixos de referência (Figura 2.4.10(a)). As medidas, feitas com o auxílio de um paquímetro, foram realizadas a cada 12 h nos dois primeiros dias e a cada 24 h a partir do terceiro dia.

A Figura 2.4.10(b) mostra o gráfico de barras da média do diâmetro do crescimento radial das colônias depois de nove dias de cultivo. As médias dos diâmetros obtidas foram comparadas estatisticamente utilizando o teste T-pareado, com

nível de confiança de 95%, para verificar se existia alguma diferença significativa entre os biohíbridos e os fungos nativos. Após aplicação do teste (ver Apêndice II), nenhuma diferença significativa foi observada para os fungos *Trichoderma ssp* e *Aspergillus niger* e seus biohíbridos. Para o fungo o *Phialomyces macrosporus* e seus biohíbrido ocorreu uma pequena diferença na curva de crescimento somente para aqueles à base de Tb-MOF. Apesar dessa ligeira diferença constatada para os biohíbridos de Tb-MOF, não é possível considerar a existência de um efeito tóxico, uma vez que, tal sistema cresceu mais do que o fungo nativo (ver Fig. 2.4.10(b)).

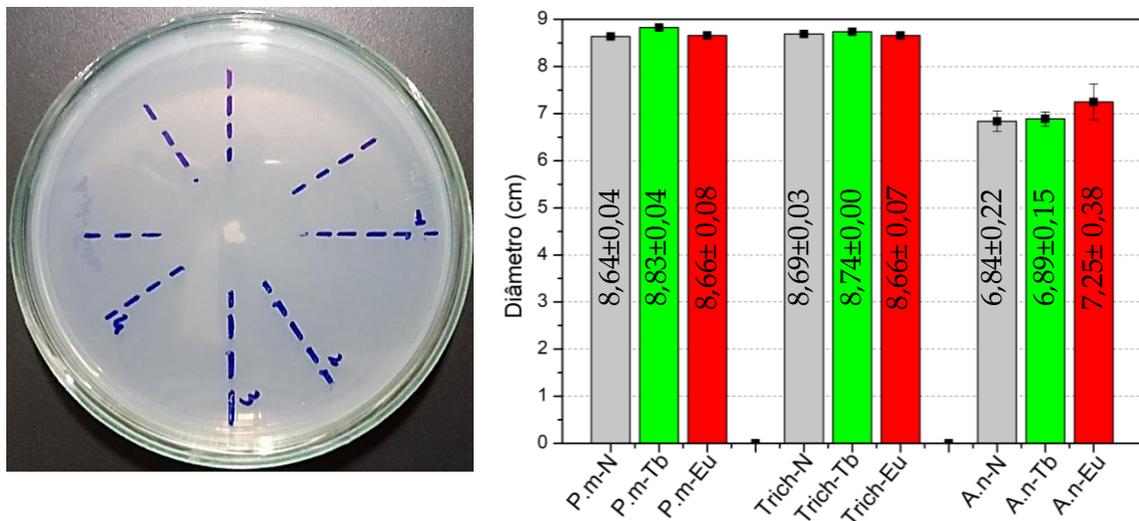


Figure 2.4.10 - (a) Imagem da placa de Petri usada para os ensaios de crescimento radial dos fungos. As linhas tracejadas e numeradas de cor azul indicam os eixos utilizados na coleta das medidas. (b) Gráfico de barras do diâmetro de crescimento radial das colônias de fungos durante 9 dias. Os números no centro das barras indicam a média do diâmetro medido durante os 9 dias.

O acompanhamento do crescimento radial das três espécies de fungo, como indicado, foi realizado em um meio contendo 1% dextrose. Esse meio de cultivo é um meio em que a quantidade de nutrientes é limitada, o que inibe, por exemplo, a produção natural de pigmentos encontrado nas espécies de fungo estudadas. Para avaliar, visualmente, tal característica, foram realizadas medidas de crescimento radial de fragmentos do fungo *Trichoderma ssp* com e sem Ln-MOFS integradas na parede celular no meio nutritivo BDA (batata, dextrose e ágar). A Figura 2.4.11 exibe as fotografias digitais do fungo *Trichoderma ssp* e dos seus biohíbridos em que se verifica,

através de aspectos macroscópicos como raio de crescimento e cor dos pigmentos produzidos pelo fungo, que ocorreu o desenvolvimento semelhante para os sistemas considerados. Então, diante dos resultados de crescimento radial, pode se concluir que a presença das Ln-MOFs não apresenta efeitos tóxicos aparente para o desenvolvimento do fungo.

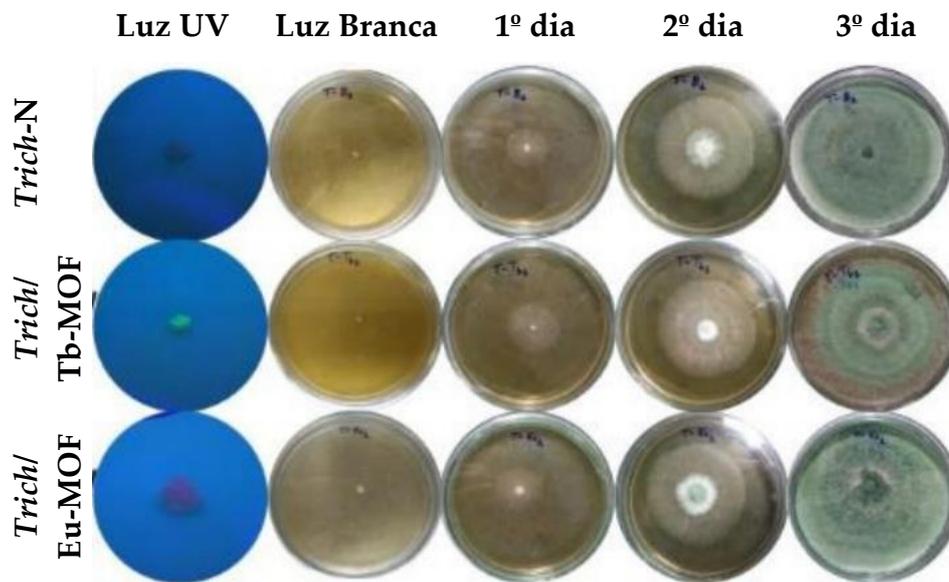


Figure 2.4.11 - Imagem digital do crescimento radial das colônias de *Trichoderma spp* e dos seus biohíbridos em placas de Petri durante três dias mostrando o crescimento similar das três amostras. As imagens obtidas através da luz UV foram aumentadas para melhor visualização.

Conjunto de resultados discutidos no presente capítulo e na tese de Leonis Lourenço da Luz deu origem a um artigo publicado Scientific Report (ver ANEXO I).

2.5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente capítulo da Tese demonstrou a deposição controlada de Ln-MOFs sobre fungos filamentosos proporcionado a conversão dos microrganismos nativos em entidades vivas luminescentes. A integração das partículas de Ln-MOFs na parede celular dos fungos foi confirmada através de medidas de DRX, MEV e espectroscopia de fluorescência. As Ln-MOFs recobriram as hifas de maneira uniforme indicando o sucesso do processo de funcionalização das espécies fúngicas utilizadas. Além disso, partículas de Ln-MOFs, provavelmente, como tamanhos menores que 15 nm (RISPAIL *et al.*, 2014), foram internalizadas pelos fungos. Essas partículas foram depositadas em regiões específicas da célula fúngica, fazendo dessa situação uma relevante estratégia para análise de imagens de organismos vivos.

A integração das Ln-MOFs tanto na região externa quanto na interna da estrutura dos fungos estudados, não apresenta qualquer dano aparente para as funções vitais dos microrganismos, cujo desenvolvimento é similar a aquele das células nativas. Experimentos controles de simulação dos componentes encontrados no meio aquoso dos vacúolos revelaram que a internalização das Ln-MOFs pode intensificar os processos de luminescência, especialmente para as Tb-MOFs, facilitando a visualização das organelas.

Para concluir, importantes aplicações podem ser imaginadas para os biohíbridos. Por exemplo, a incorporação das Ln-MOFs no micélio fúngico, pode conferir, em adição às propriedades luminescentes, uma incomum atividade catalítica ao material biohíbrido. Uma vez que, as hifas são organizadas na forma de redes de microtubos que apresentam uma grande área superficial apropriada para reações catalíticas e fotocatalíticas (CHOI *et al.*, 2010; PAGIS *et al.*, 2016). Finalmente, os achados aqui discutidos podem ser relevantes para pesquisadores envolvidos com tratamentos de fungos infecciosos. Infecções causada por fungos são difíceis de tratar já que a parede

celular do fungo funciona como uma barreira que pode impedir a entrada de drogas na região intracelular do microrganismo (YUAN *et al.*, 2014). Eventualmente, a captura de agentes antifúngicos encapsulados na cavidade das MOFs pelos microrganismos poderia ser uma estratégia promissora para o tratamento de tais infecções (HORCAJADA *et al.*, 2010).

Com o objetivo de tentar elucidar o mecanismo de deposição da Ln-MOFs, tem-se como perspectivas:

- Realizar medidas de espectroscopia de infravermelho com o intuito de avaliar a existência de ligações químicas entre a MOF e os componentes da parede celular;
- Monitorar as cargas superficiais tanto das Ln-MOFs quanto dos fungos, em diferentes valores de pH;
- Utilizar nanoMOFs para verificar se o efeito da redução do tamanho é preponderante na internalização dessas partículas, bem como o acompanhamento das cargas superficiais de ambos os componentes do biohíbrido.

REFERÊNCIAS

- ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. W. The Effect Of Nanoparticle Size, Shape, And Surface Chemistry On Biological Systems. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Vol 14, v. 14, p. 1-16, 2012.
- ALLEN, P. J. Metabolic Aspects of Spore Germination In Fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 3, p. 313+, 1965.
- ALLENDORF, M. D. et al. Luminescent Metal-Organic Frameworks. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 5, p. 1330-1352, 2009.
- ANDERSON, S. L.; STYLIANOU, K. C. Biologically Derived Metal Organic Frameworks. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 349, p. 102-128, 2017.
- BINNEMANS, K. Lanthanide-Based Luminescent Hybrid Materials. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 9, p. 4283-4374, 2009.
- BINNEMANS, K. Interpretation Of Europium(III) Spectra. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 295, p. 1-45, 2015.
- BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. A Kinetic Model To Predict Biomass Content For Aspergillus Niger Germinating Spores In The Submerged Culture. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1063-1071, 2006.
- BORKOVICH, K. A.; EBBOLE, D. J. Cellular And Molecular Biology Of Filamentous Fungi. **ASM Press**, 2010.
- BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The Structure And Synthesis Of The Fungal Cell Wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.
- BUNZLI, J. C. G. On The Design Of Highly Luminescent Lanthanide Complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 293, p. 19-47, 2015.
- CASE, G. J. T. B. R. F. C. L. Microbiologia. **Artmed Editora**, 2009.
- CERAR, J.; PODLIPNIK, C. Relationships Between Aqueous Acidities Of Benzene Polycarboxylic Acids And Computed Surface-Electrostatic Potentials And Charges. **Acta Chimica Slovenica**, v. 55, n. 4, p. 999-1008, 2008.
- CHAU, H. W. et al. A Novel Method For Identifying Hydrophobicity On Fungal Surfaces. **Mycological Research**, v. 113, p. 1046-1052, 2009.
- CHEETHAM, A. K.; RAO, C. N. R.; FELLER, R. K. Structural Diversity And Chemical Trends In Hybrid Inorganic-Organic Framework Materials. **Chemical Communications**, n. 46, p. 4780-4795, 2006.

- CHEN, S.; YU, Y. L.; WANG, J. H. Inner Filter Effect-Based Fluorescent Sensing Systems: A Review. **Analytica Chimica Acta**, v. 999, p. 13-26, 2018.
- CHEN, X. et al. Luminescent Lanthanide-Based Organic/Inorganic Hybrid Materials For Discrimination Of Glutathione In Solution And Within Hydrogels. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 15, p. 13554-13563, 2017.
- CHENG, P. Lanthanide Metal-Organic Frameworks. **Springer Berlin Heidelberg**, 2015.
- CHENG, Y. et al. Highly Efficient Fluorescence Sensing Of Phosphate By Dual-Emissive Lanthanide Mofs. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 35, p. 12273-12283, 2018.
- CHOI, J. R. et al. Europium-Based Metal-Organic Framework As A Photocatalyst For The One-Electron Oxidation Of Organic Compounds. **Langmuir**, v. 26, n. 13, p. 10437-10443, 2010.
- CHUI, S. S. Y. et al. Hydrothermal Synthesis Of Three New 3-D Framework Rare-Earth Mellitates. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 4, n. 9, p. 467-470, 2001.
- COOK, T. R.; ZHENG, Y. R.; STANG, P. J. Metal-Organic Frameworks And Self-Assembled Supramolecular Coordination Complexes: Comparing And Contrasting The Design, Synthesis, And Functionality Of Metal-Organic Materials. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 1, p. 734-777, 2013.
- CORADIN, J. H. et al. A Three-Dimensional Discrete Lattice-Based System For Modeling The Growth Of Aerial Hyphae Of Filamentous Fungi On Solid Surfaces: A Tool For Investigating Micro-Scale Phenomena In Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, n. 3, p. 164-171, 2011.
- COTTON, S. Lanthanide And Actinide Chemistry. **Wiley**, 2013.
- CUI, Y. J. et al. A Luminescent Mixed-Lanthanide Metal-Organic Framework Thermometer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 9, p. 3979-3982, 2012.
- CUI, Y. J. et al. Luminescent Functional Metal-Organic Frameworks. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 2, p. 1126-1162, 2012.
- CZAJA, A. U.; TRUKHAN, N.; MULLER, U. Industrial Applications Of Metal-Organic Frameworks. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 5, p. 1284-1293, 2009.
- DA LUZ, L. L. et al. Inkjet Printing Of Lanthanide-Organic Frameworks For Anti-Counterfeiting Applications. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 49, p. 27115-27123, 2015.

- DA LUZ, L. L. et. al. Controlling The Energy Transfer In Lanthanide-Organic Frameworks For The Production Of White-Light Emitting Materials. **Crystengcomm**, v. 16, n. 30, p. 6914-6918, 2014.
- DA LUZ, L. L. Impressos E Bio-Híbridos Luminescentes Baseados Em Ln-MOF. 2018. 220 f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.
- DANTAS, R. A. L.; TANASE, S.; ROTHENBERG, G. Metal-Organic Frameworks And Their Applications In Catalysis. **Quimica Nova**, v. 37, n. 1, p. 123-133, 2014.
- DARRAH, P. R. *et al.* The Vacuole System Is A Significant Intracellular Pathway For Longitudinal Solute Transport In Basidiomycete Fungi. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 7, p. 1111-1125, 2006.
- DING, C. C. et al. Novel Fungus-Fe₃O₄ Bio-Nanocomposites As High Performance Adsorbents For The Removal Of Radionuclides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 295, p. 127-137, 2015.
- DOUGLAS, H. W.; COLLINS, A. E.; PARKINSON, D. Electric Charge And Other Surface Properties of Some Fungal Spores. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 33, n. 2, p. 535-538, 1959.
- DUJARDIN, E. *et al.* Organization of Metallic Nanoparticles Using Tobacco Mosaic Virus Templates. **Nano Letters**, v. 3, n. 3, p. 413-417, 2003.
- EDDAOUDI, M. et al. Modular Chemistry: Secondary Building Units As A Basis For The Design Of Highly Porous And Robust Metal-Organic Carboxylate Frameworks. **Accounts of Chemical Research**, v. 34, n. 4, p. 319-330, 2001.
- ELISEEVA, S. V.; BUNZLI, J. C. G. Lanthanide Luminescence For Functional Materials And Bio-Sciences. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 189-227, 2010.
- EPSTEIN, L.; NICHOLSON, R. Adhesion And Adhesives Of Fungi And Oomycetes. In: A., S. (Ed.). **Biological Adhesives**. Switzerland: Springer, Cham, 2016.
- FAKHRULLIN, R. F.; LVOV, Y. M. "Face-Lifting" And "Make-Up" For Microorganisms: Layer-by-Layer Polyelectrolyte Nanocoating. **Acs Nano**, v. 6, n. 6, p. 4557-4564, 2012.
- FAKHRULLIN, R. F. et al. Cyborg Cells: Functionalisation Of Living Cells With Polymers And Nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 11, p. 4189-4206, 2012.
- FÉREY, G. Hybrid Porous Solids: Past, Present, Future. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 1, p. 191-214, 2008.

- FÉREY, G. et al. A Hybrid Solid With Giant Pores Prepared By A Combination Of Targeted Chemistry, Simulation, And Powder Diffraction. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 43, n. 46, p. 6296-6301, 2004.
- FLYNN, C. E. et al. Viruses As Vehicles For Growth, Organization And Assembly Of Materials. **Acta Materialia**, v. 51, n. 19, p. 5867-5880, 2003.
- FURUKAWA, H. et al. The Chemistry And Applications Of Metal-Organic Frameworks. **Science**, v. 341, n. 6149, p. 974+, 2013.
- GADD, G. M. Biosorption: Critical Review Of Scientific Rationale, Environmental Importance And Significance For Pollution Treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 13-28, 2009.
- GAO, J.; MARUYAMA, A. Biohybrid Materials. In: KOBAYASHI, S. e MÜLLEN, K. (Ed.). **Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p.1-5, 2014.
- GANGU, K. K. et al. A Review On Contemporary Metal-Organic Framework Materials. **Inorganica Chimica Acta**, v. 446, p. 61-74, 2016.
- GENG, Y. *et al.* Shape Effects Of Filaments Versus Spherical Particles In Flow And Drug Delivery. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 4, p. 249-255, 2007.
- GERVAIS, P.; FASQUEL, J. P.; MOLIN, P. Water Relations Of Fungal Spore Germination. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 586-592, 1988.
- GIMENEZ-MARQUES, M. et al. Nanostructured Metal-Organic Frameworks And Their Bio-Related Applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 307, p. 342-360, 2016.
- GRATTON, S. E. A. *et al.* The Effect Of Particle Design On Cellular Internalization Pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 33, p. 11613-11618, 2008.
- GUO, H. et al. Coordination Modulation Induced Synthesis of Nanoscale $\text{Eu}_{(1-x)}\text{Tb}_x$ -Metal-Organic Frameworks for Luminescent Thin Films. **Advanced Materials**, v. 22, n. 37, p. 4190+, 2010.
- HAWKSWORTH, D. L.; LUCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, 2017.
- HORCAJADA, P. *et al.* Porous Metal-Organic-Framework Nanoscale Carriers As A Potential Platform For Drug Delivery And Imaging. **Nature Materials**, v. 9, n. 2, p. 172-178, 2010.

HORROCKS, W. D.; SUDNICK, D. R. Lanthanide Ion Probes Of Structure In Biology - Laser-Induced Luminescence Decay Constants Provide A Direct Measure Of The Number Of Metal-Coordinated Water-Molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, n. 2, p. 334-340, 1979.

HOSKINS, B. F.; ROBSON, R. Infinite Polymeric Frameworks Consisting Of 3 Dimensionally Linked Rod-Like Segments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 15, p. 5962-5964, 1989.

INGOLD, C. T.; HUDSON, H. J. The Biology of Fungi. 6th. **Springer Netherlands**, 1993.

JANICKI, R.; MONDRY, A.; STARYNOWICZ, P. Carboxylates Of Rare Earth Elements. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 340, p. 98-133, 2017.

Jl, Z. et al. Cytoprotective Metal-Organic Frameworks For Anaerobic Bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 42, p. 10582-10587, 2018.

JONES, P.; MOORE, D.; TRINCI, A. P. J. Effects Of Junlon And Hostacerin On The Electrokinetic Properties Of Spores Of *Aspergillus-Niger*, *Phanerochaete-Chrysosporium* And *Geotrichum-Candidum*. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 235-240, 1988.

KASKEL, S. The Chemistry Of Metal-Organic Frameworks, 2 Volume Set: Synthesis, Characterization, And Applications. **Wiley**, 2016.

KAVANAGH, K. Fungi: Biology and Applications. **Wiley**, 2017.

KHAN, N. A.; JHUNG, S. H. Synthesis Of Metal-Organic Frameworks (MOFs) With Microwave Or Ultrasound: Rapid Reaction, Phase-Selectivity, And Size Reduction. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 285, p. 11-23, 2015..

KLIONSKY, D. J.; HERMAN, P. K.; EMR, S. D. The Fungal Vacuole - Composition, Function, And Biogenesis. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 3, p. 266-292, 1990.

KORNIENKO, N. et al. Spectroscopic Elucidation Of Energy Transfer In Hybrid Inorganic-Biological Organisms For Solar-To-Chemical Production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 42, p. 11750-11755, 2016.

KROL, S. et al. Encapsulated Yeast Cells Inside *Paramecium Primaurelia*: A Model System For Protection Capability Of Polyelectrolyte Shells. **Journal of Microscopy-Oxford**, v. 212, p. 239-243, 2003.

KUBITSCHECK, U. Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications. **Wiley**, 2013.

- LEE, Y. R.; KIM, J.; AHN, W. S. Synthesis Of Metal-Organic Frameworks: A Mini Review. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 9, p. 1667-1680, 2013.
- LEW, R. R. How Does A Hypha Grow? The Biophysics Of Pressurized Growth In Fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 509-518, 2011.
- LI, H. W. et al. A Malonitrile-Functionalized Metal-Organic Framework For Hydrogen Sulfide Detection And Selective Amino Acid Molecular Recognition. **Scientific Reports**, v. 4, 2014.
- LIU, L. B. *et al.* Microorganism-Based Assemblies Of Luminescent Conjugated Polyelectrolytes. **Chemical Communications**, n. 45, p. 5999-6001, 2008.
- LONG, L. S. pH Effect On The Assembly Of Metal-Organic Architectures. **Crystengcomm**, v. 12, n. 5, p. 1354-1365, 2010.
- MARTIN, M. et al. Artificial Magnetic Bacteria: Living Magnets At Room Temperature. **Advanced Functional Materials**, v. 24, n. 23, p. 3489-3493, 2014.
- MATHAPA, B. G.; PAUNOV, V. N. Fabrication Of Viable Cyborg Cells With Cyclodextrin Functionality. **Biomaterials Science**, v. 2, n. 2, p. 212-219, 2014.
- MAXWELL, W. R.; PARTINGTON, J. R. The Dissociation Constants Of Some Polybasic Acids.—Part III. **Transactions of the Faraday Society**, v. 33, n. 0, p. 670-678, 1937.
- MELLOT-DRAZNIIEKS, C.; DUTOUR, J.; FÉREY, G. R. Hybrid Organic-Inorganic Frameworks: Routes For Computational Design And Structure Prediction. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 43, n. 46, p. 6290-6296, 2004.
- MOMANY, M. Polarity In Filamentous Fungi: Establishment, Maintenance And New Axes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 580-585, 2002.
- MOORE, D. Fungal Biology in the Origin and Emergence of Life. **Cambridge University Press**, 2013.
- MOORE, D.; ROBSON G. D.; TRINCI, A. P. J. 21st Century Guidebook to Fungi with CD. **Cambridge University Press**, 2011.
- MOORE, E. G.; SAMUEL, A. P. S.; RAYMOND, K. N. From Antenna To Assay: Lessons Learned In Lanthanide Luminescence. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 4, p. 542-552, 2009.
- NICHOLS, E. M. et al. Hybrid Bioinorganic Approach To Solar-To-Chemical Conversion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 37, p. 11461-11466, 2015.

- O'KEEFFE, M.; YAGHI, O. M. Deconstructing The Crystal Structures Of Metal-Organic Frameworks And Related Materials Into Their Underlying Nets. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 2, p. 675-702, 2012.
- OSHEROV, N.; MAY, G. S. The Molecular Mechanisms Of Conidial Germination. **Fems Microbiology Letters**, v. 199, n. 2, p. 153-160, 2001.
- PAGIS, C. *et al.* Lanthanide-Based Metal Organic Frameworks: Synthetic Strategies And Catalytic Applications. **Acc Catalysis**, v. 6, n. 9, p. 6063-6072, 2016.
- PAUL, G. C.; KENT, C. A.; THOMAS, C. R. Viability Testing And Characterization Of Germination Of Fungal Spores By Automatic Image-Analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 1, p. 11-23, 1993.
- PAZOUKI, M.; PANDA, T. Understanding The Morphology Of Fungi. **Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 2, p. 127-143, 2000.
- RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications Of Alamar Blue As An Indicator Of Metabolic Function And Cellular Health In Cell Viability Bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347-12360, 2012.
- REPP, K. K.; MENOR, S. A.; PETTIT, R. K. Microplate Alamar Blue Assay For Susceptibility Testing Of Candida Albicans Biofilms. **Medical Mycology**, v. 45, n. 7, p. 603-607, 2007.
- RICHARDS, A.; GOW, N. A. R.; VESES, V. Identification Of Vacuole Defects In Fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 1, p. 155-163, 2012.
- RICHARDS, A.; VESES, V.; GOW, N. A. R. Vacuole Dynamics In Fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 93 - 105, 2010.
- RIQUELME, M. Tip Growth in Filamentous Fungi: A Road Trip To The Apex. **Annual Review of Microbiology**, Vol 67, v. 67, p. 587-609, 2013.
- RISPAIL, N. *et al.* Quantum Dot and Superparamagnetic Nanoparticle Interaction with Pathogenic Fungi: Internalization and Toxicity Profile. **Acc Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 12, p. 9100-9110, 2014.
- ROBIN, A. Y.; FROMM, K. M. Coordination Polymer Networks With O- And N-Donors: What They Are, Why And How They Are Made. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 250, n. 15-16, p. 2127-2157, 2006.
- ROWSELL, J. L. C.; YAGHI, O. M. Metal-Organic Frameworks: A New Class Of Porous Materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 73, n. 1-2, p. 3-14, 2004.
- RUIZ-HERRERA, J. **Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly, Second Edition**. Taylor & Francis, 2012.

- SANTOS, C. S. et al. Monitoring H₂O₂ Inside *Aspergillus Fumigatus* With An Integrated Microelectrode: The Role Of Peroxiredoxin Protein Prx1. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 2587-2593, 2018.
- SMITH, J. V. Topochemistry Of Zeolites And Related Materials .1. Topology And Geometry. **Chemical Reviews**, v. 88, n. 1, p. 149-182, 1988.
- SMITS, T. H. M. et al. Characterization Of The Surface Hydrophobicity Of Filamentous Fungi. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 85-91, 2003.
- SOTIROPOULOU, S. et al. Biotemplated Nanostructured Materials. **Chemistry of Materials**, v. 20, n. 3, p. 821-834, 2008.
- STEINBERG, G. et al. Cell Biology of Hyphal Growth. In: (Ed.). **The Fungal Kingdom: American Society of Microbiology**, 2017.
- STOCK, N.; BISWAS, S. Synthesis Of Metal-Organic Frameworks (MOFs): Routes To Various MOF Topologies, Morphologies, And Composites. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 2, p. 933-969, 2012.
- TANG, Q. et al. Color Tuning and White Light Emission Via In Situ Doping Of Luminescent Lanthanide Metal-Organic Frameworks. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 289-293, 2014.
- TRANCHEMONTAGNE, D. J. *et al.* Secondary Building Units, Nets And Bonding In The Chemistry Of Metal-Organic Frameworks. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 5, p. 1257-1283, 2009.
- VOLESKY, B. Biosorption And Me. **Water Research**, v. 41, n. 18, p. 4017-4029, 2007.
- WANG, H. et al. Nano-Functionalized Filamentous Fungus Hyphae With Fast Reversible Macroscopic Assembly & Disassembly Features. **Chemical Communications**, v. 51, n. 40, p. 8524-8527, 2015.
- WEBER, R. W. S. Vacuoles And The Fungal Lifestyle. **Mycologist**, v. 16, n. 1, p. 10 - 20, 2002.
- WEBSTER, J.; WEBER, R. Introduction To Fungi. **Cambridge University Press**, 2007.
- WHITESIDE, M. D.; TRESEDER, K. K.; ATSATT, P. R. The Brighter Side Of Soils: Quantum Dots Track Organic Nitrogen Through Fungi And Plants. **Ecology**, v. 90, n. 1, p. 100-108, 2009.
- XU, H. et al. Lanthanide-Based Metal-Organic Frameworks As Luminescent Probes. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 45, p. 18003-18017, 2016.

XU, M. et al. Novel Fungus-Titanate Bio-Nanocomposites As High Performance Adsorbents For The Efficient Removal Of Radioactive Ions From Wastewater. **Nanoscale**, v. 6, n. 2, p. 722-725, 2014.

YAGHI, O. M. et al. Reticular Synthesis And The Design Of New Materials. **Nature**, v. 423, n. 6941, p. 705-714, 2003.

YANG, E. et al. Zeolitic Metal-Organic Frameworks Based On Amino Acid. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 10027-10029, 2014.

YUAN, H. X. et al. Conjugated-Polymer-Based Energy-Transfer Systems For Antimicrobial And Anticancer Applications. **Advanced Materials**, v. 26, n. 40, p. 6978-6982, 2014.

ZHANG, Q. S. et al. Multifunctional Ln-MOF Luminescent Probe For Efficient Sensing of Fe^{3+} , Ce^{3+} , And Acetone. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 28, p. 23976-23986, 2018.

ZHOU, H. C.; LONG, J. R.; YAGHI, O. M. Introduction To Metal-Organic Frameworks. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 2, p. 673-674, 2012.

ZHU, W. K. et al. Coupling Microbial Growth With Nanoparticles: A Universal Strategy To Produce Functional Fungal Hyphae Macrospheres. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 20, p. 12693-1270, 2016.

3 TITANATOS NANOESTRUTURADOS E MATERIAIS BIOMÓRFICOS

3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1.1 Derivados de Óxido de Titânio Nanoestruturado

Os óxidos de metais de transição (OMT) são materiais que vêm sendo exaustivamente estudados e aplicados em diferentes áreas do conhecimento como química, física, engenharia e ciências de materiais (KUNG, 1989). A importância tecnológica desses materiais se deve à grande diversidade de compostos que podem ser formados, adotando diferentes classes estruturais (corindo, rocksalt, wurtzite, espinélio, perovskita, rutilo e estrutura lamelares são comumente encontradas) (KUNG, 1989; LEE, 1999). Além disso, a estrutura eletrônica dos OMT podem ser modificadas, fazendo com que eles apresentem caráter metálico, semicondutor ou isolante (CAO; LIMMER, 2004). Diante dessas características, os OMT vêm sendo largamente empregados como catalisadores, adsorventes, em componentes de sensores, em dispositivos piezoeletrônicos, células a combustível, entre outros (KUNG, 1989; NIEDERBERGER; PINNA, 2009; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ; MEDINA-RAMÍREZ, 2014).

Com o advento da nanotecnologia, o interesse na produção de óxidos de metais de transição em escala nanométrica passou a ser o foco de muitos pesquisadores (LEE *et al.*, 2009; M; JA, 2011; WU *et al.*, 2012; MAAZA *et al.*, 2015). Isso porque os materiais nanométricos exibem propriedades diferentes dos materiais em escala micro ou macroscópica (BURDA *et al.*, 2005; RODUNER, 2006). Então, quando os óxidos de metais de transição são sintetizados em tamanhos nanométricos, assim como qualquer outro material, a redução do tamanho pode provocar modificações na estrutura

cristalina, na estrutura eletrônica e na área superficial, o que influenciam diretamente nas propriedades físico-químicas desses materiais (RODRIGUEZ; FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2007; O'BRIEN *et al.*, 2012).

Dentro da grande quantidade de óxidos de metais de transição que vêm sendo produzidos em escala nanométrica, aqueles derivados do óxido de titânio (TiO₂) vêm atraído considerável atenção por uma série de motivos. Um deles está diretamente ligado ao conhecimento bem estabelecido do comportamento físico-químico das diferentes fases do óxido de titânio e de titanatos lamelares (WU *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2015). O emprego na composição de vários produtos comerciais utilizados no dia-a-dia, como pasta de dentes, protetores solares e tintas associados à biocompatibilidade, pequena ou nenhuma toxicidade e baixo custo, incrementam ainda mais essa lista (WU *et al.*, 2012; BAI; ZHOU, 2014). Nesse sentido, diferentes metodologias têm sido utilizadas para a síntese de nanoestruturas derivadas do óxido de titânio com diferentes morfologias. Assim, nanopartículas esféricas (PAL *et al.*, 2007), nanotubos (KASUGA *et al.*, 1998; GONG *et al.*, 2001), nanofios (ZHANG *et al.*, 2002), nanofitas (MA *et al.*, 2005; MORGAN *et al.*, 2010), nanobastões (ZHANG; GAO, 2003), nanofolhas (YANG *et al.*, 2009), nanocubos (HU *et al.*, 2019), bem como superestruturas, vêm sendo largamente explorados (BIAN *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2015) (ver Figura 3.1.1).

Os materiais nanoestruturados derivados do óxido de titânio têm propriedades análogas às do óxido de titânio (as diferentes fases do óxido de titânio). Eles são semicondutores (band gap que varia de 2,7 a 3,87 eV (HONG *et al.*, 2003; SAKAI *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2015). A estrutura eletrônica desses materiais pode ser facilmente alterada através de processos de dopagem e/ou sensibilização, ambos viabilizando a diminuição do band gap (CHANG *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2016). Esse fato, atrelado à arquitetura nanoestruturada de elevada área superficial (que varia de 100 a 400 m² g⁻¹) (ANASTASESCU *et al.*, 2016), faz com que os derivados nanoestruturados do óxido de titânio já venham sendo aplicados como catalisadores,

tanto como fase ativa ou como suporte (LIN *et al.*, 2002; AKITA *et al.*, 2005; BAVYKIN, LAPKIN, *et al.*, 2005; IDAKIEV *et al.*, 2005; KLEINHAMMES *et al.*, 2005); fotocatalisadores (BIAN *et al.*, 2012; SHAHID *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2014; MAHMOUD *et al.*, 2017; SANDOVAL *et al.*, 2017); como componentes de sensores de gases (BAI E ZHOU, 2014; BERTUNA *et al.*, 2016), células solares (BAI *et al.*, 2014) e células a combustível (ANASTASESCU *et al.*, 2016); como dispositivos eletrocromicos (TOKUDOME; MIYAUCHI, 2005; YE *et al.*, 2016); como adsorventes para aplicações ambientais (ZHANG *et al.*, 2015); catodos de baterias ion-lítio (ORTIZ *et al.*, 2009; XIONG *et al.*, 2011; BRUTTI *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2014); e como supercapacitores (ZHOU *et al.*, 2015; FUKUHARA *et al.*, 2016).

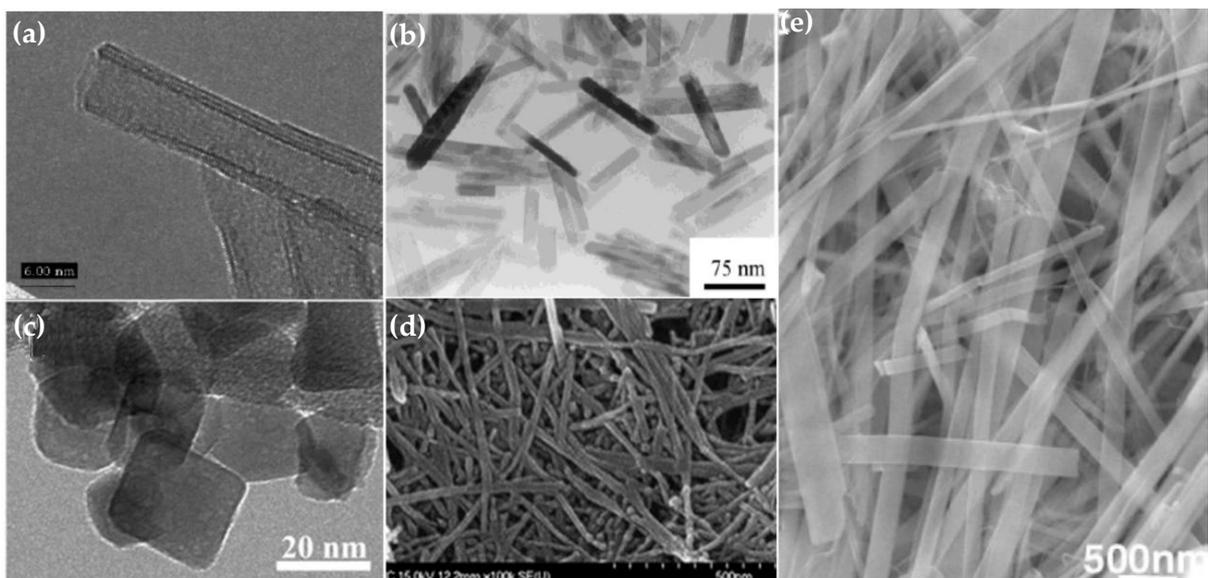


Figura 3.1.1 - Diferentes morfologias de materiais derivados do óxido de titânio. (a) nanotubos de titanato de hidrogênio (Fonte: DU *et al.*, 2001) (b) nanobastões de óxido de titânio (rutilo) (Fonte: ZHANG; GAO, 2003), (c) nanocubos de óxido de titânio (anatase) (Fonte: DO *et al.*, 2018), (d) nanofios de polititanato de potássio (Fonte: SHAHID *et al.*, 2014) e (e) nanofitas de titanato de hidrogênio (Fonte: MA *et al.*, 2005).

Os derivados de óxido de titânio nanoestruturados podem ser obtidos na forma de algum dos alótropos do TiO_2 (anatase, rutilo, brookita etc.) ou como titanatos lamelares. O interesse do presente trabalho é na produção de titanatos lamelares nanoestruturados. Esses materiais, assim como as diferentes fases TiO_2 , são compostos

de unidades octaédricas de TiO_6 (KORDAS *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). Os octaedros de TiO_6 são conectadas através dos vértices, faces e arestas, formando estruturas lamelares anisotrópicas (KORDAS *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). As folhas apresentam uma carga líquida negativa sendo compensada pela presença de cátions na região interlamelar (KORDAS *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015) (Ver Figura 3.1.2). A escolha dos titanatos se deve à facilidade de obtenção desses materiais com diferentes morfologias como nanofitas, nanotubos, nanofios e nanobastões através de pequenas alterações nas condições de síntese (YUAN; SU, 2004). Além disso, esses materiais com formas distintas podem ser utilizados para obter materiais de diferentes fases do óxido de titânio com manutenção, ou não, das morfologias dos materiais de partida, simplesmente através do aquecimento controlado de tais materiais (YOSHIDA *et al.*, 2005; MORGADO *et al.*, 2006).

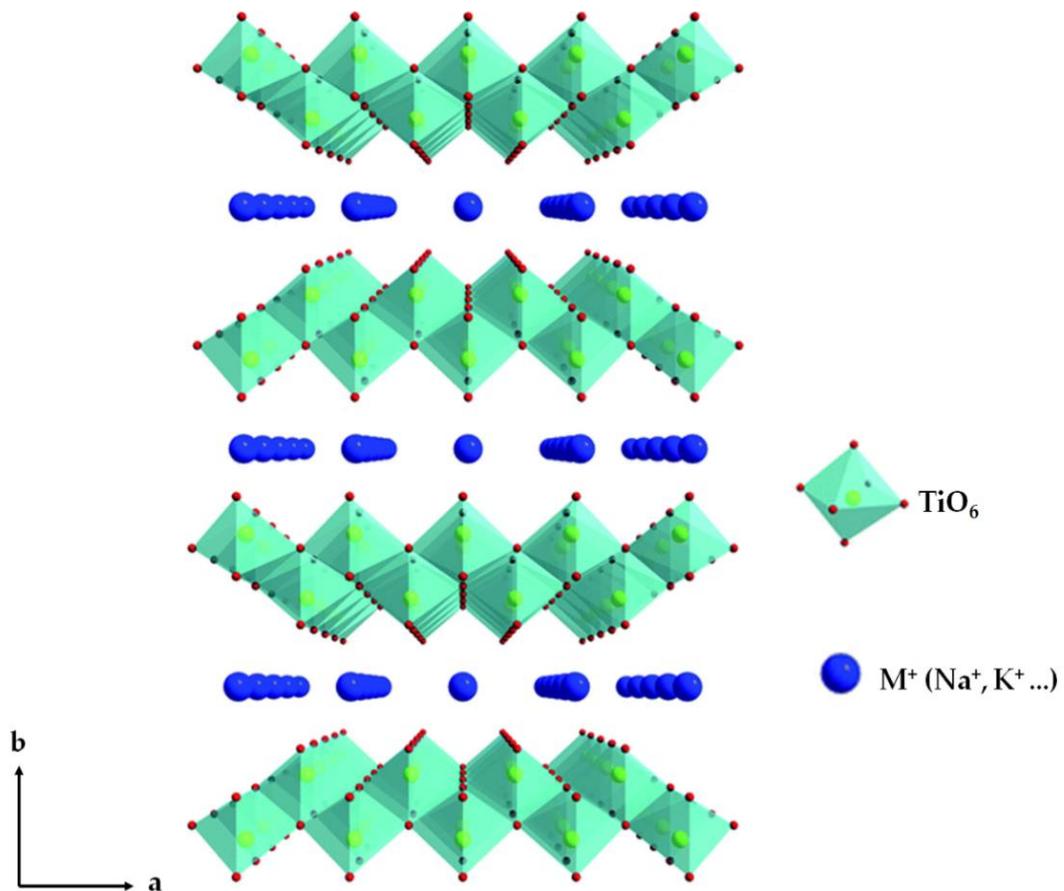


Figura 3.1.2 – Exemplo de estrutura lamelar dos titanatos. Adaptado de GAO *et al.*, 2009b.

3.1.1.1 Síntese de Titanatos Nanoestruturados

Os titanatos nanoestruturados são obtidos através de reações químicas processadas em solução alcalina em temperaturas moderadas. O primeiro grupo a reportar tal síntese foi o de Kasuga e colaboradores, em 1998, para a obtenção de nanotubos de titanato (KASUGA *et al.*, 1998). A síntese pode ser realizada sob pressão ambiente, utilizando um condensador de refluxo ligado ao sistema reacional (WANG *et al.*, 2004) ou pode ser administrada em pressões ligeiramente maiores do que a pressão ambiente através do uso de um reator hidrotérmico (KASUGA *et al.*, 1998).

Para a fabricação de titanatos nanoestruturados, a fase anatase, rutilo e brookita (MENG *et al.*, 2004), óxido de titânio amorfo (YUAN; SU, 2004), folhas de titânio metálico (INOUE *et al.*, 2010), dissulfeto de titânio (CHEN *et al.*, 2003) e titanato de sódio (WANG *et al.*, 2003) vêm sendo utilizados como precursores na síntese de titanatos lamelares nanoestruturados. Esses materiais devem ser dispersados em uma solução concentrada de hidróxido de sódio (2,5-20 mol L⁻¹) e, em seguida, a mistura é aquecida numa faixa de temperatura que varia de 100-280°C, durante algumas horas (ANASTASESCU *et al.*, 2016). Depois, o produto obtido é filtrado, lavado com água ou com uma solução ácida diluída e secado. Através desse método podem ser obtidos nanotubos, nanofolhas, nanofitas, nanofios e nanobastões (ANASTASESCU *et al.*, 2016). A Equação química (1) mostra a reação do óxido de titânio com o hidróxido de sódio (ZHANG *et al.*, 2015).



Uma dada morfologia pode ser obtida mediante o controle de alguns parâmetros de síntese como o tipo e tamanho dos cristalitos dos precursores, o tipo e concentração da solução alcalina, temperatura de síntese e duração do processo. Os efeitos gerados pelo tipo e tamanho dos precursores, concentração da solução e temperatura de síntese podem ser visualizados através do diagrama morfológico de

fases elaborado por Morgan e colaboradores (2010), ver Figura 3.1.3. Eles avaliaram três diferentes amostras comerciais de óxido de titânio, anatase (112 nm), rutilo (320 nm) e Degussa P25 (25 nm) (75% anatase e 25% rutilo) submetidas à tratamentos hidrotérmicos em solução alcalina de concentrações de 5, 7,5, 9 e 10 mol L⁻¹ e, em temperaturas de 100 a 220 °C por 20 h. No diagrama, a presença de três fases distintas pode ser observada: nanopartículas que se referem às partículas dos precursores utilizados, nanotubos e nanofitas, que são os produtos gerados durante o tratamento hidrotérmico em diferentes condições de temperatura e concentração da solução de hidróxido de sódio. Assim, avaliando o diagrama das amostras estudadas, algumas informações podem ser obtidas:

- a transformação de nanopartículas para nanotubos e nanofitas ocorre para todos os precursores analisados;
- verifica-se um aumento da concentração do material nanoestruturado com o aumento da concentração da solução alcalina e da temperatura de síntese, independente do precursor;
- observa-se que a temperatura necessária para que ocorra a transformação das nanopartículas em nanotubos e nanofitas diminui com a diminuição do tamanho médio dos cristalitos dos precursores investigados;
- as nanofitas são obtidas em temperaturas maiores que as dos nanotubos.

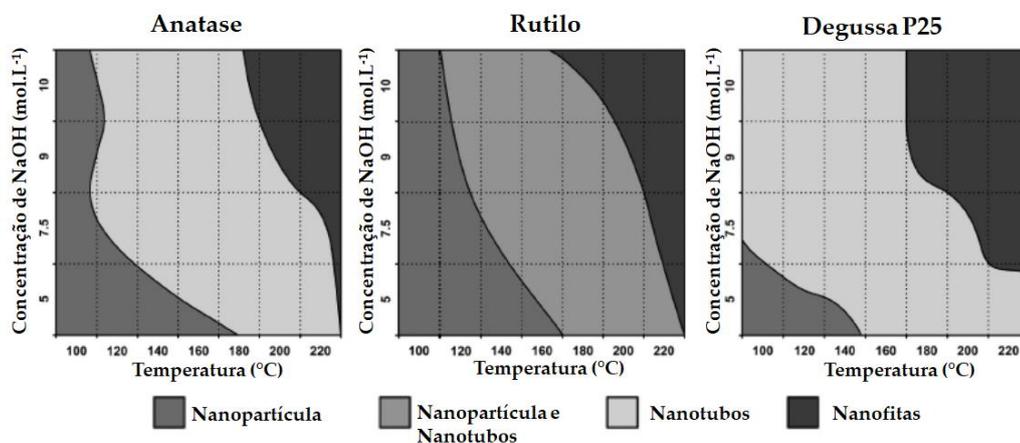


Figura 3.1.3 - Diagrama de fase morfológico do óxido de titânio nas fases anatase, rutilo e da mistura das fases anatase (75%) e rutilo (25%) (Degussa P25). Fonte: MORGAN *et al.*, 2010.

O ponto chave para compreender as observações destacadas acima é a solubilidade dos precursores nas condições investigadas. A concentração de nanotubos cresce com o aumento da concentração e da temperatura devido à maior solubilidade dos precursores, o que implica em um maior número de quebras das ligações Ti-O-Ti, proporcionada por essas condições (BAVYKIN *et al.*, 2007; MORGAN *et al.*, 2011). Além disso, a solubilidade aumenta com a diminuição das dimensões das partículas precursoras (BAVYKIN *et al.*, 2007; MORGAN *et al.*, 2011). É por isso que o precursor Degussa P25, que apresenta partículas de menores tamanhos, é mais facilmente solubilizado em soluções com menor concentração de hidróxido de sódio e em uma temperatura mais baixa.

O efeito do tipo de solução alcalina também foi investigado e verificou-se que a substituição do hidróxido de sódio, pelo hidróxido de potássio ou de lítio, altera a morfologia dos materiais produzidos (MASAKI *et al.*, 2002; DU *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2007). Nesse caso do hidróxido de potássio, nanofios de titanato são obtidos em temperaturas acima 160°C. Além disso, Bavykin e colaboradores (2007) observaram que os nanotubos de titanato podem ser produzidos com o hidróxido de potássio em menores temperatura (56-106 °C). No entanto, o rendimento dos nanomateriais produzidos por essa rota é em torno 40% e um longo tempo de síntese é requerido (BAVYKIN *et al.*, 2008). A Figura 3.1.4 exibe as faixas de temperatura necessárias para a obtenção dos titanatos nanoestruturados com diferentes morfologias, quando são empregados o hidróxido de sódio e o hidróxido de potássio.

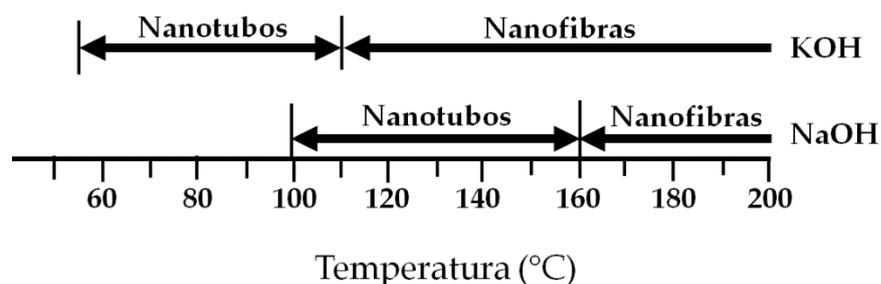


Figure 3.1.4 - Faixa de temperatura para a formação de nanotubos e nanofibras obtidas com soluções de hidróxido de sódio e hidróxido de potássio. Adaptado de BAVYKIN, 2007.

Como a presença do hidróxido de potássio reduz a temperatura de síntese dos titanatos nanoestruturados, o grupo de Bavykin também estudou a síntese de titanatos nanoestruturados a partir da mistura do hidróxido de sódio e hidróxido de potássio com diferentes frações molares (BAVYKIN *et al.*, 2008). Esses autores verificaram que, quando a razão molar é de NaOH/KOH = 50:1, ocorre uma completa transformação do óxido de titânio em nanotubos de titanato na temperatura de 100 °C em um período de 48 h (BAVYKIN *et al.*, 2008). O motivo de os nanotubos e nanofios serem produzidos em temperaturas diferentes será discutido a seguir juntamente com o mecanismo de formação dos titanatos nanoestruturados.

3.1.1.2 Mecanismo de Formação dos Titanatos Nanoestruturados

Como já foi comentado acima, a morfologia dos titanatos nanoestruturados pode ser controlada ajustando as condições reacionais, como temperatura e concentração da solução alcalina. O esquema indicado na Figura 3.1.5 mostra as condições necessárias para a obtenção de uma dada morfologia. Para entender como essas morfologias são geradas, vários mecanismos vêm sendo propostos ao longo desses anos. Todos, no entanto, compartilham de um “mecanismo” geral de formação que é o 3D→2D→1D (Figura 3.1.8) (WANG *et al.*, 2002). Ou seja, partículas de óxido de titânio (com estrutura tridimensional), sob condições hidrotérmicas alcalinas, são transformadas em materiais com estruturas lamelar (bidimensional), e por fim, essas estruturas podem ser dobradas ou empilhadas gerando estruturas unidimensionais como nanotubos e nanofios (MORGAN *et al.*, 2010).

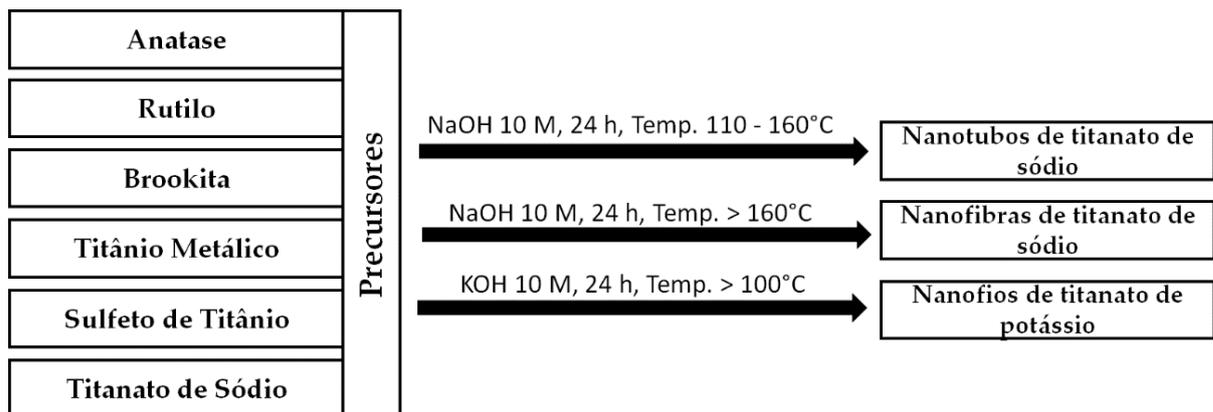


Figura 3.1.5 - Rotas de síntese para a obtenção de titanatos nanoestruturados.

3.1.1.2.1 Nanotubos

Nanotubos de titanatos produzidos via rota hidrotérmica alcalina são cilindros ocos com comprimentos que variam de algumas dezenas de nanômetros a dezenas de micrômetros (ANASTASESCU *et al.*, 2016). Eles são constituídos de multicamadas e apresentam diâmetro interno e externo que variam de 3 a 5 nm e de 5 a 15 nm, respectivamente (ANASTASESCU *et al.*, 2016). Além disso, os lados dos nanotubos apresentam diferentes números de camadas (ANASTASESCU *et al.*, 2016). Diante dessas características, vários mecanismos foram propostos por diferentes grupos de pesquisas, como Kasuga e colaboradores (1999), Wang e colaboradores (2002), Yang e colaboradores (2003), Wang e colaboradores (2004), Bavykin e colaboradores (2004), Kukovecz e colaboradores (2005). De maneira geral, quando as partículas de TiO₂ são colocadas em uma solução de hidróxido de sódio, nas condições indicadas na Figura 3.1.5, as ligações Ti-O-Ti, entre octaedros que compõem a estrutura do TiO₂ sólido, são quebradas (KASUGA *et al.*, 1999). Esse processo leva à formação de espécies de Ti⁴⁺ na forma de íons TiO₆ livres, monotitanatos (TiO₃²⁻, TiO₂(OH)²⁻) e de íons polititânicos (Ti_nO_{2n+m}^{2m-1}) (WU *et al.*, 2006). Através de reações de condensação e polimerização, esses íons recristalizam na forma de nanofolhas que, através de ligações de van der Waals, se organizam formando um material de estrutura lamelar (BAVYKIN *et al.*,

2004). As nanofolhas podem permanecer unidas ou podem sofrer exfoliação (YAO *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2004). Assim, os nanotubos podem ser formados a partir do enrolamento de uma única folha, ou através do curvamento de nanofolhas empilhadas (YAO *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2003; BAVYKIN *et al.*, 2004; MA *et al.*, 2004).

A força motriz que proporciona o enrolamento ou curvamento das folhas se deve à existência de íons de titânio com ligações coordenadas insaturadas na superfície das nanofolhas. Saponjic e colaboradores (2005) verificaram a presença de sítios superficiais de titânio coordenativamente insaturados. Segundo eles, esses sítios contêm titânio penta-coordenado que controlam a forma e a cristalinidade dos nanomateriais derivados de óxido de titânio (SAPONJIC *et al.*, 2005). Assim, os sítios superficiais coordenativamente insaturados provocam um desequilíbrio da carga superficial das nanofolhas (SAPONJIC *et al.*, 2005; MORGAN *et al.*, 2011), fazendo que as nanofolhas se enrolem em nanotubos com o objetivo de minimizar esse efeito (MORGAN *et al.*, 2011).

3.1.1.2.2 Nanofibras (nanofios e nanofitas)

Com indicado Figura 3.1.5, as nanofibras são obtidas em temperaturas maiores do que os nanotubos. Bavykin e colaboradores (2007) verificaram um aumento da concentração de espécies de titânio (IV) na solução com o aumento da temperatura. Ainda segundo Bavykin e colaboradores (2007), esse aumento na concentração de titânio na solução leva a uma maior taxa de crescimento das nanofitas, quando comparada com a taxa de crescimento das nanofolhas nas condições em que são obtidos os nanotubos. Isso faz com que a espessura das folhas aumente, impedindo o curvamento das folhas, levando à formação de nanofitas (BAVYKIN *et al.*, 2007). Para a formação de nanofios, a solução alcalina utilizada é a de hidróxido de potássio

(KOH). Bavykin e colaboradores (2007) verificaram que o óxido de titânio é mais solúvel na solução de KOH. Com isso, situação semelhante àquela descrita para a formação das nanofitas também é seguida para o caso dos nanofios.

3.1.1.2.3 Estrutura Cristalina dos Titanatos Nanoestruturados

Vários pesquisadores têm designado estruturas cristalinas monoclinica e ortorrômbica com diferentes composições para os titanatos nanoestruturados. A Figura 3.1.6 exibe essas duas diferentes estruturas. Assim, fórmulas moleculares do tipo Na(ou H)₂Ti₃O₇, Na_xH_{2-x}Ti₃O₇ e H₂Ti₄O₉.H₂O representam as estruturas monoclinicas comumente indicadas em diversos trabalhos (CHEN *et al.*, 2002; BAVYKIN *et al.*, 2004; NAKAHIRA *et al.*, 2004; NOSHEEN *et al.*, 2009). Já para as estruturas ortorrômbicas, são atribuídas às seguintes fórmulas químicas: Na(ou H)₂Ti₂O₅.H₂O, Na(ou H)Ti₂O₄(OH)₂, Na_xH_{2-x}Ti₂O₄.H₂O, H_xTi_{2-x/4}□_{x/4}O₄ (x ~ 0,7, □ = vacância) (MA *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2003; TSAI; TENG, 2008; GAO *et al.*, 2009a). Além dessas estruturas, em 2011 o grupo de Andrusenko publicou um trabalho sobre a estrutura cristalina de nanobastões de titanato de sódio utilizando a técnica de termografia de difração automontada. De acordo com esse trabalho, os nanobastões, com fórmula química NaTi₃O₆(OH).2H₂O, fazem parte do grupo espacial monoclinico C2/m (ANDRUSENKO *et al.*, 2011). Dessa forma, alguns pesquisadores adotaram esse tipo de estruturas nas suas publicações (KOLL *et al.*, 2013; SHIRPOUR *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2017).

A falta de unanimidade para uma aceitação de um certo tipo de estrutura em detrimento de outras se deve a fatores apontado por Bavykin e colaboradores (2006). A grande possibilidade de modificações estruturais que os titanatos podem sofrer durante a síntese, bem como, o tamanho dos cristais dos nanotubos de titanatos, acabam contribuindo para o alargamento das reflexões dos feixes de raios-X e, como

consequência, é obtida uma menor área de coerência nos padrões de DRX desses materiais (BAVYKIN *et al.*, 2006). Além disso, a curvatura dos nanotubos reforçam ainda mais o aumento da largura e deslocamento de picos, fazendo com que seja mais difícil indexar a estrutura correta desses materiais (BAVYKIN *et al.*, 2006).

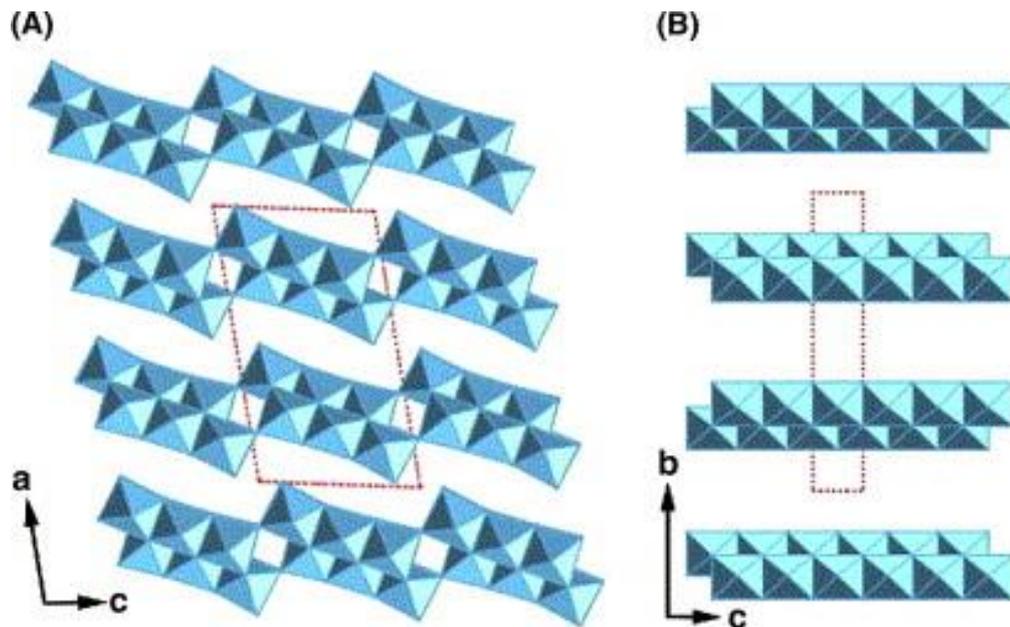


Figure 3.1.6 - Estrutura cristalina de titanatos nanoestruturados (a) monoclinica do trititanato de sódio e (b) ortorrômbica da lepidocracita. Fonte: MA *et al.*, 2003.

3.1.2 Síntese de Materiais Biomórficos

Como pôde ser visto no Capítulo 1, a interação de materiais biológicos e não-biológicos é capaz de originar materiais biohíbridos com propriedade bastante interessantes. No entanto, um outro caminho a ser seguido é o de “tomar emprestado” a forma do material biológico com o objetivo de apenas reproduzir as suas características morfológicas (SOTIROPOULOU *et al.*, 2008). Nesse caso, o material biológico atua como biotemplate e normalmente é eliminado após a deposição ou a

montagem do material de interesse guiado pela estrutura biológica (SOTIROPOULOU *et al.*, 2008).

A utilização de “templates” ou moldes para a replicar materiais de diversos tipos com forma previamente desejada, é uma prática desenvolvida a muitos anos (HULTEEN; MARTIN, 1997). Empregar materiais biológicos como template traz algumas vantagens em comparação com os materiais inorgânicos empregados como moldes. Por exemplo, os materiais biológicos possuem morfologias bastante complexas, no entanto, existe uma sofisticada organização estrutural que é facilmente repetida dentro das espécies biológicas (CARUSO, 2004). A grande variedade de materiais biológicos implica em uma grande diversidade de formas que podem ser exploradas (CARUSO, 2004). Além disso, os processos de obtenção dos moldes biológicos se enquadram na chamada química verde, ou seja, todos os reagentes empregados não geram prejuízos ao meio ambiente e a produção é considerada de baixo custo (ZHOU *et al.*, 2007; ZAN; WU, 2016). Por outro lado, os moldes inorgânicos sintéticos tradicionalmente utilizados, sempre requerem várias etapas de síntese, além do alto custo de produção e da dificuldade de remoção do template no final do processo (XIE *et al.*, 2016).

Vários materiais biológicos já vêm sendo empregados como biotemplates como vírus, bactérias, algas, fungos, plantas, partes de insetos, fios de cabelo humano e pelos de animais, células vivas, entre outros (CARUSO, 2004). A Figura 3.1.7 exhibe alguns materiais biomórficos. Por exemplo, na Figura 3.1.7(a), Zhou e colaboradores (2007) obtiveram esferas ocas de óxido de zinco (ZnO), usando bactérias esféricas como biotemplates. Já na Figura 3.1.7(b), frústulas de algas diatomáceas foram empregadas por Payne e colaboradores (2005) para produzir réplicas desse material com a composição de prata metálica. Na Figura 3.1.7(c), Fontes e colaboradores (2014) interagiram fungos filamentosos com nanopartículas de ouro para a síntese de microtubos de ouro.

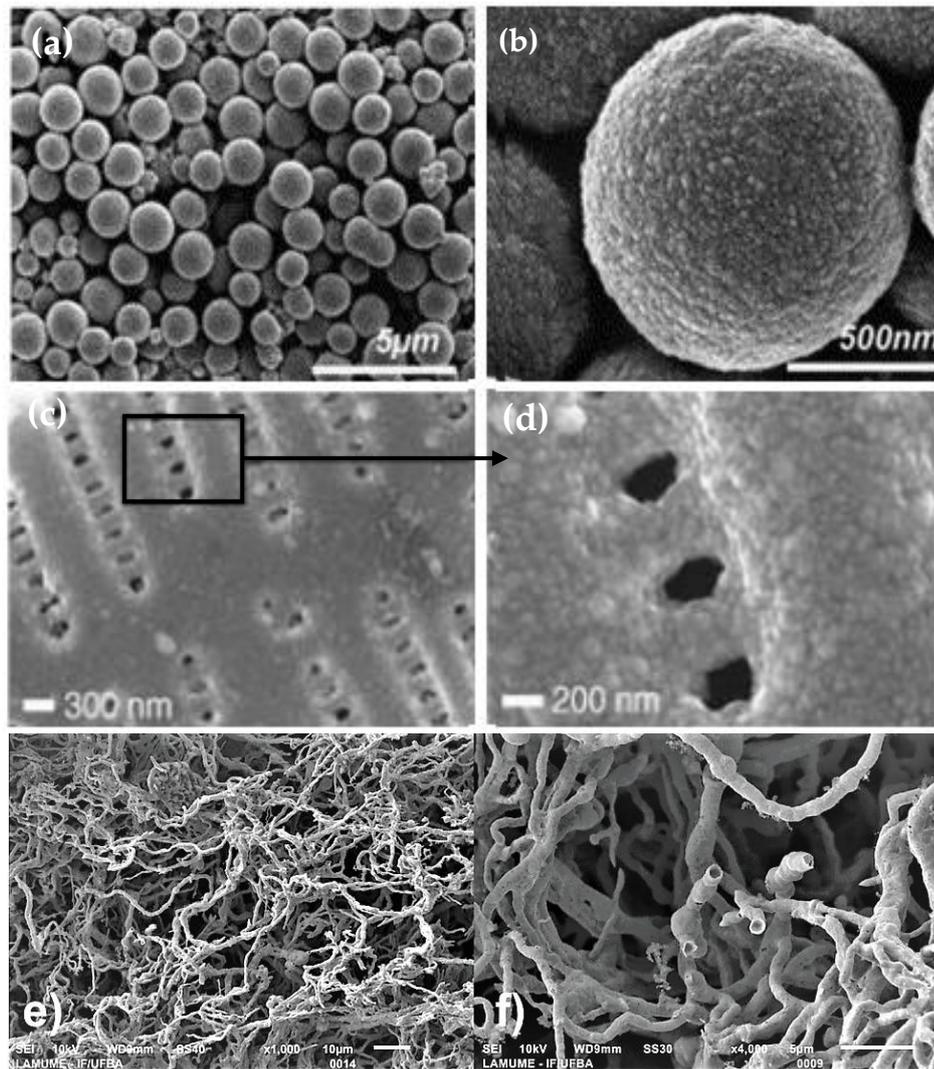


Figure 3.1.7 – Exemplos de materiais biomórficos. (a, b) esferas de óxido de zinco obtidas via calcinação da bactéria *Streptococcus thermophilus* decorado de ZnO (Fonte: ZHOU *et al.*, 2007). (c, d) frústulas de prata metálica preparadas via calcinação das frústulas da diatomácea *Synedra spp* revestida de Ag(s) (Fonte: PAYNE *et al.*, 2005). (e, f) microtubos de ouro produzidos via calcinação do fungo *Phialomyces macrosporus* recobertos com nanopartículas de ouro (Fonte: FONTES *et al.*, 2014).

A produção de materiais biomórficos segue um padrão geral, que consiste na imobilização de materiais inorgânicos na superfície do componente biológico (vivo ou não) a ser imitado (CARUSO, 2004). Após esse processo, uma etapa adicional é requerida para eliminação do biotemplate e obtenção do material inorgânico biomórfico. Um dos procedimentos mais empregados para a remoção do componente biológico é o aquecimento controlado dos biohíbridos em temperaturas elevadas (300-800 °C) (ZHOU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2010; REHMAN *et al.*, 2011; SHIM *et al.*, 2011;

LI *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2013; FONTES *et al.*, 2014; SELVAKUMAR *et al.*, 2014). Os processos de calcinação, além de degradar o componente biológico, podem promover mudanças de fase, ou alterações na morfologia do material inorgânico de partida (ZHANG *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2013; HWANG *et al.*, 2014). Apesar das vantagens na utilização desse método, alguns inconvenientes com agregação e/ou sinterização das partículas podem acabar influenciando nas propriedades inicialmente desejadas (GU *et al.*, 2014).

Recentemente Bispo (2016) e Xu (2014) reportaram a integração de dióxido de titânio e de nanotubos de titanato, respectivamente, na parede celular de fungos filamentosos para produção de materiais biohíbridos. Como já discutido, quando o óxido de titânio é dispersado em uma solução de hidróxido verifica-se a transformação desse material em titanatos nanoestruturados. No entanto, não se sabe, por exemplo, o que ocorreria se a transformação química do óxido de titânio acontecesse na parede celular de fungos filamentosos. Assim, diante do exposto, o objetivo geral desta parte da tese é o de investigar o que ocorre quando dióxido de titânio embebido na parede celular do fungo filamentoso *Phialomyces macrosporus* (biohíbrido *P.m-TiO₂*) é submetido a um tratamento hidrotérmico em meio básico. Especificamente, pretendeu-se:

- a. Preparar biohíbridos de *P.m/TiO₂*;
- b. Submeter biohíbridos de *P.m-TiO₂* a tratamento hidrotérmico em meio básico;
- c. Investigar a estrutura cristalina dos biohíbridos e dos materiais biomórficos através da técnica de difração de raios-X (DRX);
- d. Analisar a morfologia dos biohíbridos, utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e dos materiais biomórficos, produzidos usando MEV e microscopia eletrônica de Transmissão (MET);

- e. Investigar, qualitativamente, a composição dos materiais biomórficos, empregando a técnica de espectroscopia de absorção de raios-X por energia dispersiva (EDS), acoplada ao MEV;
- f. Avaliar, com o auxílio das técnicas de MEV, DRX, espectroscopia na região do infravermelho, se os biohíbridos constituídos pela mistura de óxidos de titânio/pentóxido de vanádio e óxido de titânio/trióxido de tungstênio afetam as características estruturais e/ou morfológicas dos materiais biomórficos;
- g. Propor um mecanismo de formação dos titanatos nanoestruturados na formação dos materiais biomórficos.

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Reagentes

O dióxido de titânio (Ridel-de Haën), hidróxido de sódio (F. Maia), pentóxido de vanádio (Aldrich), trióxido de tungstênio (Merck), Czapek (Kasvi) foram utilizados sem nenhum tratamento prévio.

3.2.2 Produção de Biohíbridos com Óxidos de Titânio (*P.m*-TiO₂)

A produção de biohíbridos fungo/TiO₂ foi feita dispersando 100 mg do TiO₂ (fase anatase) em 25 mL de água deionizada, com um auxílio de uma sonda ultrassônica de 20 kHz, durante 20 min. Em seguida, separou-se 1 frasco Erlenmeyer de 120 mL. Nesse frasco, foram adicionados 25 mL da suspensão do TiO₂. O frasco foi vedado com uma tampa feita de atadura e algodão hidrofóbico. Depois, o sistema e um frasco Erlenmeyer de 120 mL, contendo uma solução de Czapeck (contém sacarose (30g L⁻¹), nitrato de sódio (2,0 g L⁻¹), sulfato de magnésio (0,5 g L⁻¹), cloreto de potássio (0,5 g L⁻¹), sulfato ferroso (0,01 g L⁻¹) e difosfato de potássio (1,0 g L⁻¹)) foram previamente esterilizados em uma autoclave vertical.

Após a esterilização dos frascos, em uma autoclave, 25 mL da solução de Czapeck foram adicionados ao frasco Erlenmeyer, contendo 25 mL da suspensão de TiO₂. Depois, 100 µL de uma suspensão de esporos do fungo *Phialomyces macrosporos* foram introduzidos no frasco sistema contendo TiO₂. Todo esse procedimento foi realizado numa capela de fluxo laminar, previamente higienizada. Depois, o frasco foi colocado numa incubadora para crescimento do fungo durante 4 dias.

Após o quarto dia, o biohíbrido *P.m*-TiO₂ foi retirado do meio de crescimento e lavado várias vezes com água deionizada para retirar as partículas de óxido

fracamente ligada à parede celular do fungo. O biohíbrido produzido ficou armazenado em um frasco de penicilina contendo água deionizada esterilizada. Esse experimento foi realizado em triplicata, juntamente com os experimentos controles (fungo puro e suspensão de TiO_2 em Czapeck) para efeito de comparação.

3.2.3 Produção de Materiais Biomórficos a partir do Biohíbrido *P.m-TiO₂*

Para preparar os materiais biomórficos, aproximadamente 4,0 g de *P.m-TiO₂* foram colocados em um frasco de teflon e, depois foram adicionados 30 mL de uma solução de hidróxido de sódio 10 mol L^{-1} . O frasco de teflon foi inserido em uma autoclave e levado a uma estufa, onde permaneceu por 72 horas em temperatura controlada na faixa de $100^\circ\text{-}140^\circ \text{C}$. Após o tratamento hidrotérmico, o sólido branco resultante foi lavado com uma água ultrapura até a solução de lavagem atingir o pH 8. O sólido obtido foi congelado e, depois, liofilizado.

3.2.4 Produção de Biohíbridos com TiO_2/WO_3 e de Biohíbridos com $\text{TiO}_2/\text{V}_2\text{O}_5$ com Diferentes Quantidades de Pentóxido de Vanádio

Inicialmente, foi proposto a realização de um processo de dopagem, misturando o óxido de tungstênio e o óxido de vanádio ao óxido de titânio, integrando a mistura à parede celular do fungo. No entanto, como será visto mais adiante, a mistura aparentemente levou a uma mudança da morfologia dos materiais biomórficos produzidos.

Para a obtenção dos biohíbridos com TiO_2/WO_3 (ou com $\text{TiO}_2/\text{V}_2\text{O}_5$), 100 mg de TiO_2 e 25 mg de trióxido de tungstênio (ou de pentóxido de vanádio) foram misturados em 25 mL de água deionizada e sonicados durante 20 min. Depois, o procedimento seguiu as mesmas etapas descritas para a produção do biohíbrido *P.m-TiO₂*.

Como o sistema constituído por $\text{TiO}_2/\text{V}_2\text{O}_5$ se mostrou mais interessante, a produção de biohíbridos foi repetida, variando as quantidades de V_2O_5 . Assim, sistemas biohíbridos foram preparados utilizando 100 mg de TiO_2 , misturando 5 mg e 10 mg, respectivamente, para gerar os sistemas denominados de *P.m-TiO₂/V₂O₅* (5%), *P.m-TiO₂/V₂O₅* (10%).

3.2.5 Produção de Materiais Biomórficos a partir do Biohíbrido *P.m-TiO₂/WO₃* (ou *P.m-TiO₂/V₂O₅*)

Para preparar os materiais biomórficos, aproximadamente 4,0 g de *P.m-TiO₂/WO₃* (ou *P.m-TiO₂/V₂O₅* com as diferentes quantidades de pentóxido de vanádio) foram colocados em um frasco de teflon e, depois, foram adicionados 30 mL de uma solução de hidróxido de sódio 10 mol L⁻¹. O frasco de teflon foi inserido em uma autoclave e levado a uma estufa, onde permaneceu por 72 horas em temperatura controlada na faixa de 100-140 °C. Após o tratamento hidrotérmico, o sólido branco resultante foi lavado com uma água ultrapura até a solução de lavagem atingir o pH 8. O sólido obtido foi congelado e, depois, liofilizado.

3.2.6 Produção de Materiais Biomórficos a partir do Biohíbrido *Pm-TiO₂* e *P.m-TiO₂/V₂O₅* Empregando Diferentes Concentrações da Solução de NaOH

Para preparar os materiais biomórficos utilizando diferentes concentrações da solução de NaOH, aproximadamente 4,0 g de *P.m-TiO₂* ou de *P.m-TiO₂/V₂O₅* (25%, ou 10% ou 5% de pentóxido de vanádio com relação ao óxido de titânio) foram colocados em um frasco de teflon e, depois, foram adicionados 30 mL de uma solução de hidróxido de sódio 6,5 mol L⁻¹. O frasco de teflon foi inserido em uma autoclave e levado a uma estufa, onde permaneceu por 72 horas em temperatura controlada na faixa de 100-140 °C. Após o tratamento hidrotérmico, o sólido branco resultante foi

lavado com uma água ultrapura até a solução de lavagem atingir o pH 8. O sólido obtido foi congelado e, depois, liofilizado.

O mesmo procedimento foi repetido para os biohíbridos empregando soluções de hidróxido de sódio de concentrações 7,5 e 8,0 mol L⁻¹, respectivamente.

3.3 CARACTERIZAÇÕES

3.3.1 Difração de Raios X - DRX

Os difratogramas de raios X foram obtidos utilizando-se um equipamento Shimadzu XRD-7000, com feixe de radiação monocromática de 1,5406 Å (Cu-K α). Os parâmetros de análise foram: voltagem de 40 kV, corrente de 30 mA, intervalo de varredura de 5° a 60° e velocidade de varredura de 2,0000 (deg.min⁻¹). As análises de DRX foram realizadas no Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, campus Catu. Para a realização das medidas de DRX, as amostras foram secadas em uma câmara de ponto crítico (Leica EM CPD 030, FIOCRUZ-Ba).

3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de absorção de raios-X por energia dispersiva

As imagens de microscopia eletrônica de varredura e os espectros de raios-X e os mapas elementares foram obtidos, utilizando equipamento JEOL JSM 6610LV com o detector de energia dispersiva de raios-X. As medidas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LAMUME) do Instituto de Física da UFBA. Para aquisição das imagens, as amostras foram secas em uma câmara de ponto crítico (Leica EM CPD 030, FIOCRUZ-Ba).

3.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas, utilizando o equipamento JEOL EM 1230 operado em 100 kV. As medidas foram realizadas na central de Microscopia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em Salvador.

3.3.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

Espectros de infravermelho com transformada de Fourier dos materiais produzidos, sob a forma de pastilhas composta com KBr, foram obtidos usando um espectrômetro de FTIR Perkin-Elmer-100. A região de 400-4000 cm^{-1} foi utilizada para a realização das medidas.

3.3.5 Espectroscopia Raman

As análises de espectroscopia Raman foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LAMUME) do Instituto de Física da UFBA. Os espectros foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Raman da JASCO, modelo NRS-5100 com fonte de laser, emitindo radiação monocromática em 532 nm. O equipamento possui um microscópio ótico acoplado com três objetivas de 50x, 200x e 1000x. Os materiais foram analisados no intervalo de número de onda de 87 a 1000 cm^{-1} .

3.4 RESULTADO E DISCUSSÕES

Seguindo a investigação do processo químico de transformação do dióxido de titânio (fase anatase) na parede celular do fungo *Phialomyces macrosporus* (*P.m*), biohíbridos constituídos de *P.m*-TiO₂ foram preparados a partir da metodologia estabelecida por Bispo (2016). A escolha do fungo *P. macrosporus* foi motivada por sua capacidade em assimilar uma grande quantidade de materiais na parede celular (FONTES *et al.*, 2014; BISPO, 2016). A Figura 3.4.1(a) exibe o difratograma do TiO₂ (1) e do *P.m*/TiO₂ (2). O padrão de DRX dos dois sistemas apresentam os mesmos picos em 25,23° (hkl: 101), 37,74° (004), 48,05° (200), 53,92° (105) e 55,06° (211) correspondentes à fase anatase do óxido de titânio, fato já verificado por Bispo (2016). Nas Figuras 3.4.1(b e c), as imagens de MEV do sistema *P.m*-TiO₂ revelam que as hifas fúngicas estão completamente revestidas por partículas de óxido, formando uma camada relativamente espessa de partículas de TiO₂, integradas na parede celular do fungo *P. macrosporus*.

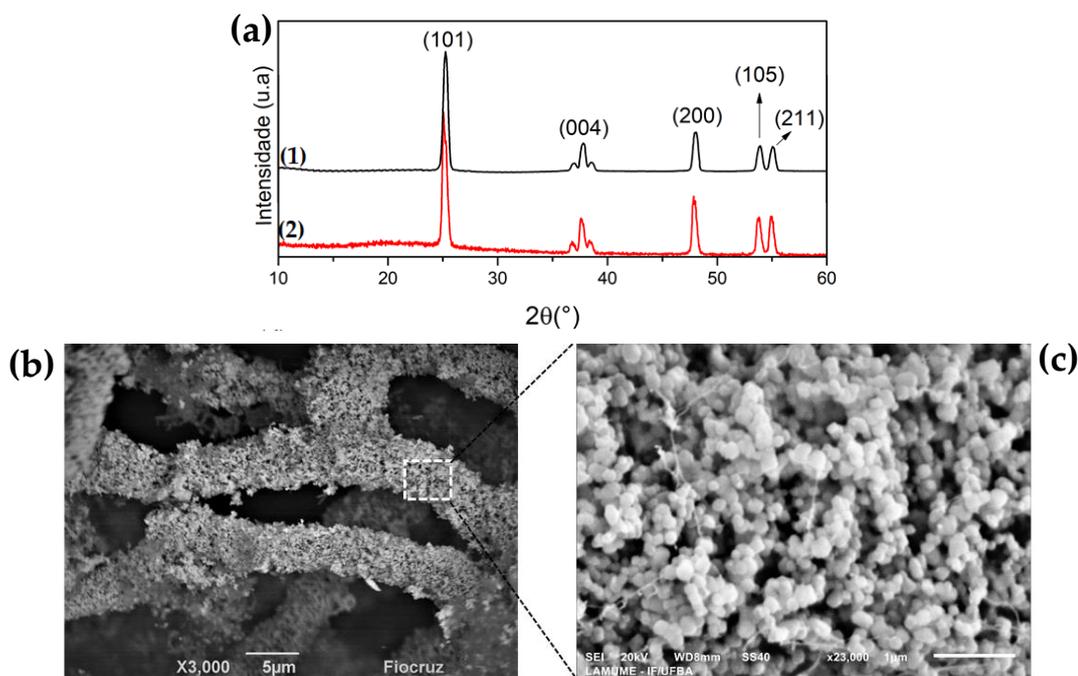


Figura 3.4.1 - (a) Difratograma de raios -X de (1) TiO₂ e (2) *P.m*-TiO₂. Micrografias eletrônicas de varredura do *P.m*-TiO₂ (b) 3000x de aumento e (c) 23000x de aumento.

A Figura 3.4.2 apresenta o difratograma de raio-X do biohíbrido *P.m*-TiO₂ submetido ao tratamento hidrotérmico em meio alcalino (solução de NaOH 10 mol L⁻¹), na faixa de temperatura de 110 a 140°C, durante 72 h. Quatro picos de difração 2θ = 9,62°, 24,17°, 28,16° e 48,28° são observados depois da tratamento em meio básico. Comparando o difratograma de raios-X do biohíbrido, antes e após o tratamento hidrotérmico (ver Tabela 3.4-1), verifica-se que o perfil indicado na Figura 3.4.2 é completamente diferente daquele observado para a fase anatase do TiO₂ (ver Fig. 3.4.1(a)).

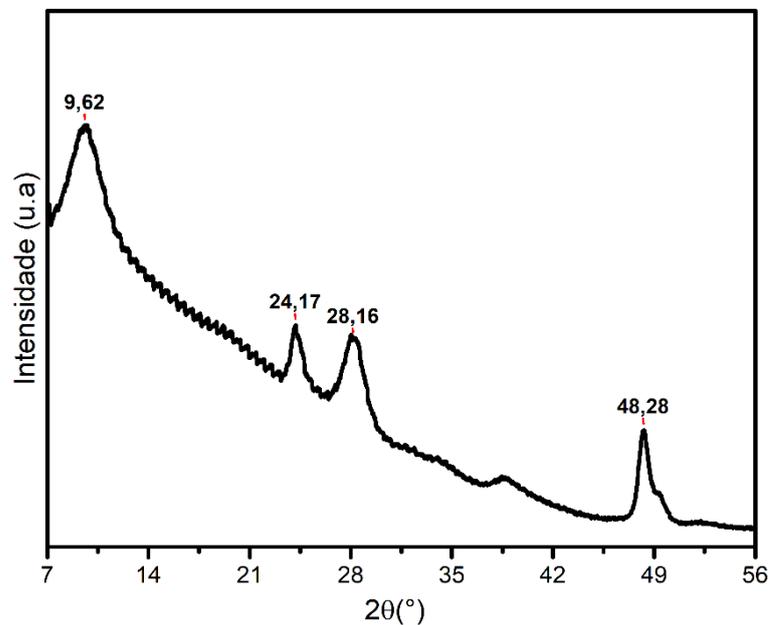


Figura 3.4.2 - Difratograma de raios-X do biohíbrido *P.m*-TiO₂ após tratamento hidrotérmico em meio alcalino.

A diferença nos picos de reflexão de biohíbrido *Pm*-TiO₂, após o tratamento hidrotérmico, indica uma completa mudança da estrutura do material. Como se sabe, nas condições de síntese adotadas, o óxido de titânio é transformado em nanotubos de titanato (KASUGA *et al.*, 1998). Os nanotubos possuem quatro picos de difração largos posicionados em 2θ ~ 10°, 24°, 28°, 48°. Os valores dos picos de reflexão encontrados para os biohíbridos, após o tratamento químico, estão bem próximos dos valores indexados para os nanotubos de titanato. Isso aponta para conversão do óxido de titânio, depositado no fungo, em nanotubos de titanato. O pico em 2θ ~ 10° se refere

ao espaçamento interlamelar dos nanotubos de titanatos (CHEN, *et al.*, 2002). Os valores de espaçamento basal estão dentro da faixa 0.8-0.9 nm (ANASTASESCU *et al.*, 2016). A distância interplanar encontrada para os biohíbridos após o tratamento hidrotérmico em meio básico foi de 0,918 nm. As pequenas variações na distância interlamelar entorno da faixa indicada, normalmente acontecem em função da quantidade de moléculas de água e de íons sódio intercalados na estrutura lamelar dos nanotubos titanatos (MORGADO *et al.*, 2006). Vale ressaltar que a faixa de distância interplanar foi estabelecida para nanotubos de titanato de hidrogênio, o que pode justificar o maior valor de distância observado para o biohíbrido após o tratamento hidrotérmico.

Tabela 3.4-1 - Ângulos de difração e distância interplanar do P.m-TiO₂ antes e depois do tratamento hidrotérmico em meio básico.

P.m-TiO ₂ antes do tratamento hidrotérmico		P.m-TiO ₂ depois do tratamento hidrotérmico	
2θ (°)	Distância (Å)	2θ (°)	Distância (Å)
25,30	3,51	9,62	9,18
37,79	2,37	24,17	3,68
48,04	1,89	28,16	3,16
53,88	1,79	48,28	1,88
55,07	1,66	-	-

A Figura 3.4.3 exibe as imagens de MEV dos biohíbridos após o tratamento hidrotérmico em meio alcalino. A micrografia apresentada na Figura 3.4.3(a), em baixa magnificação, indica a formação de estruturas com formatos tubulares ou ligeiramente tubulares. Já as Figuras 3.4.3(b e c) mostram que os microtubos apresentam tamanhos com diversos comprimentos, na faixa de 30 a 100 μm, e diâmetros interno e externo com valores aproximados de 4-9 e 20 μm, respectivamente. A morfologia microtubular

está associada à forma do fungo filamentoso utilizado como biotemplate. Além disso, é possível observar que os microtubos possuem um dos lados abertos, o que permite inferir que a maior parte do template biológico foi degradado durante o processo hidrotérmico. A presença da abertura dos microtubos pode ser reflexo de quebras ocasionadas durante o processo reacional ou no momento de preparar as amostras para a realização das caracterizações.

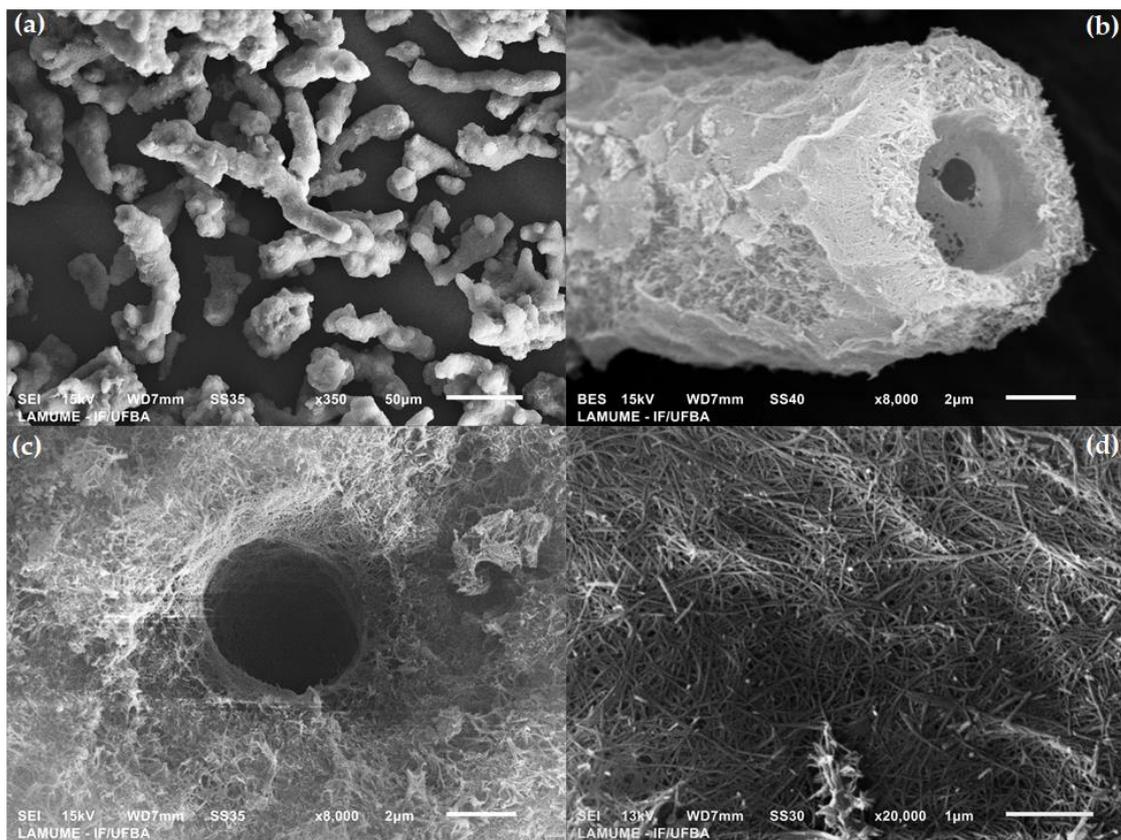


Figure 3.4.3 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do biohíbrido tratado hidrotérmicamente em meio alcalino. (a) aumento de 350x, (b) 6000x (c) 8000x e (d) 23000x.

Na Figura 3.4.3(d), para a imagem em uma maior magnificação, pode ser visto que os microtubos são constituídos de estruturas fibrilares. Essas estruturas estão distribuídas ao longo de toda região microtubular, não apresentam uma direção preferencial e ainda possuem comprimentos maiores que 1 µm. Esses resultados, juntamente com os dados de espectroscopia de energia dispersiva na forma de mapa

elementar, exibidos na Figura 3.4.4, indicam que os microtubos e, conseqüentemente as estruturas fibrilares, são compostos por átomos de titânio, oxigênio e sódio.

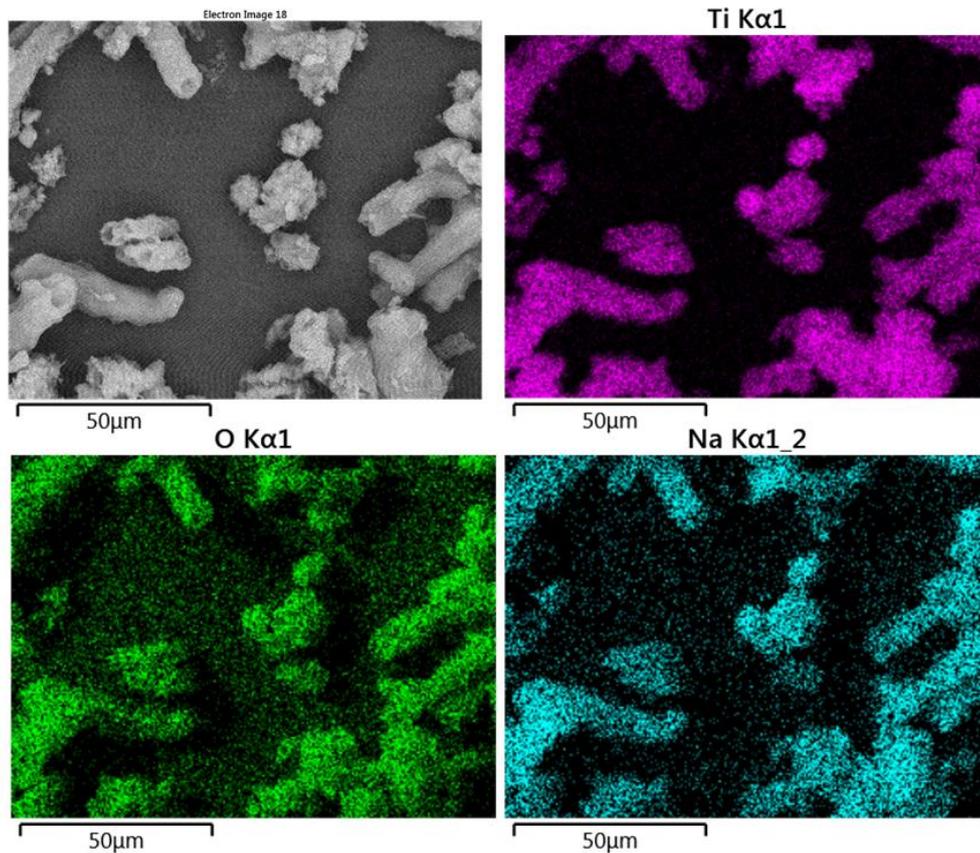


Figure 3.4.4 - Imagens do mapa elemental dos biohíbridos tratados hidrotermicamente em meio alcalino obtidos via espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

Detalhes dos materiais nanoestruturados organizados para formar os microtubos podem ser vistos nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) exibidos na Figura 3.4.5. Na Figura 3.4.5(a), é mostrado um corte transversal dos microtubos. Nesse tipo de imagem é possível verificar que os nanofios se distribuem ao longo de toda a região radial do microtubo. Com a ampliação da imagem (Figura 3.4.5(b)), pode ser observado a organização aleatória das estruturas semelhante a fios, confirmando mais uma vez a ausência de uma ordem direcional desses materiais. Para uma ampliação ainda maior da região estudada (Figura 3.5.5(c)), é visto que os materiais nanoestruturados apresentam morfologia nanotubular. Infelizmente, não foi possível realizar imagens que destacasse um nanotubo

individualmente em maior magnificação. Apesar disso, a micrografia da Figura 3.4.5(c) apresenta algumas características comumente encontrada em nanotubos de titanato como abertura nas extremidades (ver seta amarela na Fig.(3.4.5 c)), presença de multicamadas, fruto de um processo de enrolamento de folhas de titanato para a formação das estruturas tubulares (ANASTASESCU *et al.*, 2016).

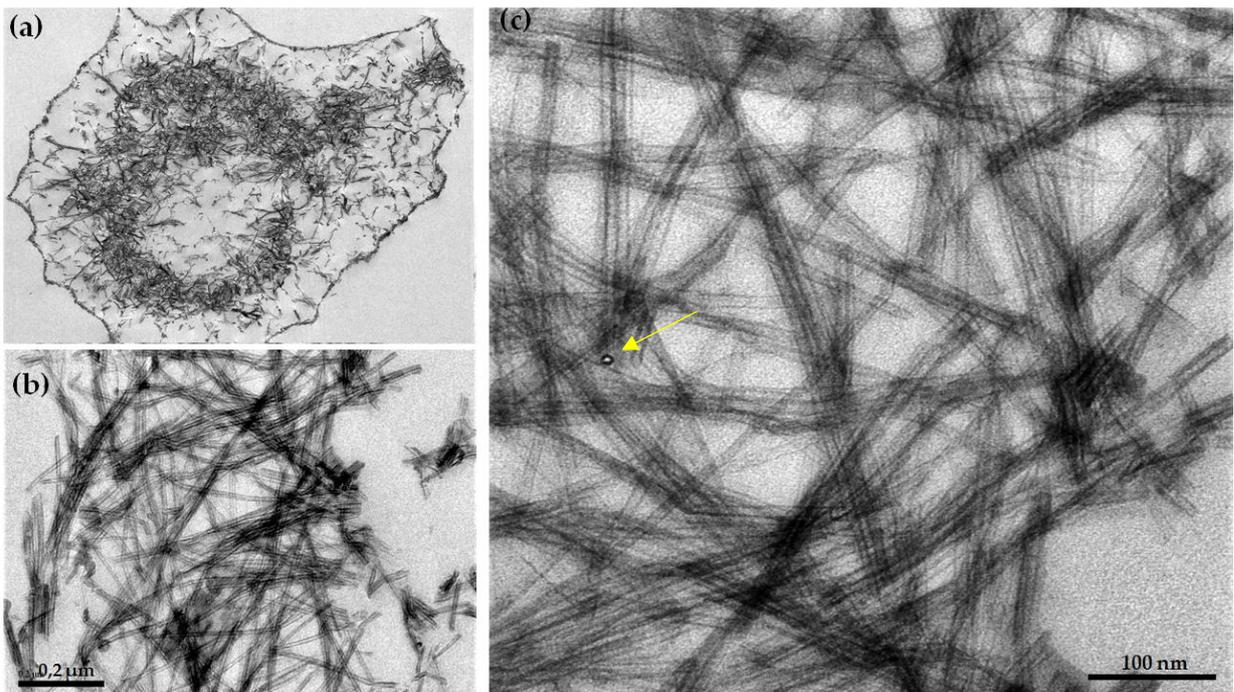


Figure 3.4.5 - Micrografias eletrônicas de transmissão do corte transversal de microtubos (a) com aumento de 8 000x, (b) com aumento de 150 000x e (c) com 250 000x.

Os microtubos de nanotubos de titanato de sódio serão, a partir de agora, abreviados como Pm-NaTiNTs. Para avaliar as propriedades vibracionais do sistema P.m-NaTiNTs, medidas de espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas. A Figura 3.4.6 exibe o espectro de infravermelho (FT-IR) do (a) do Pm-TiO₂ e (b) do P.m-NaTiNTs. Os dois sistemas apresentam perfis ligeiramente diferentes em função da organização estrutural do octaedro TiO₆ quando é formado o titanato nanoestruturado. Para ambos os materiais, as vibrações das ligações dentro da faixa 400-800 cm⁻¹ correspondem às ligações Ti-O (SUN; LI, 2003). A banda mais fina, localizada em 473 cm⁻¹ para o P.m-NaTiNTs, é observada no trititanato de sódio e se

refere ao dobramento simétrico da ligação O-Ti-O (SILVA *et al.*, 2018). As bandas localizadas em 1630 cm^{-1} e aquela próxima de 3400 cm^{-1} são referentes à vibração das ligações O-H de moléculas de água adsorvidas na superfície dos materiais. Para os nanotubos de titanato de sódio, esse pico é mais largo e indica a presença de água co-intercalada (SUZUKI; YOSHIKAWA, 2004). Por fim, a banda em 910 cm^{-1} é devida ao estiramento vibracional de ligações Ti-O mais curtas e o oxigênio está coordenado com íons sódio (SUN; LI, 2003).

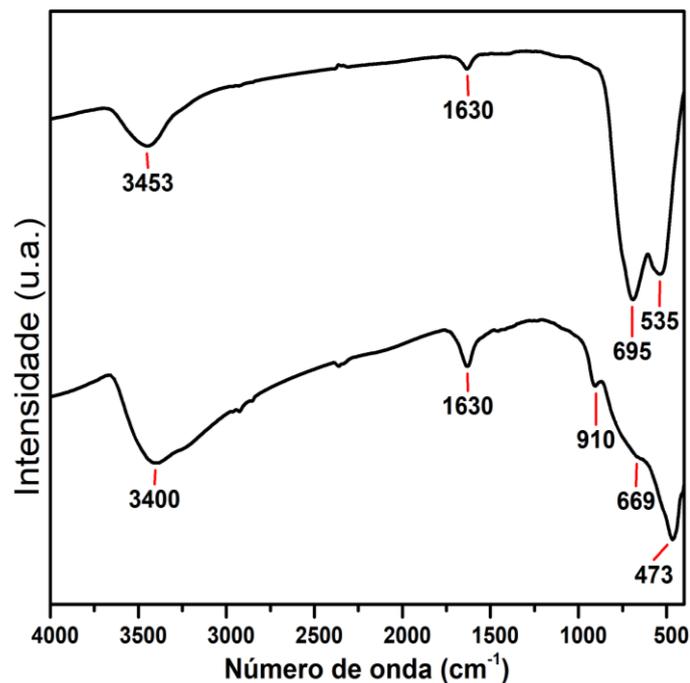


Figure 3.4.6 - Espectro de infravermelho do $P.m\text{-TiO}_2$ (a) e $P.m\text{-NaTiNTs}$ (b).

Assim, o conjunto de resultados discutidos até agora indica que o óxido de titânio integrado à parede celular do fungo, nas condições de síntese utilizadas, é convertido em nanotubos de titanato de sódio. Isso significa que, para as condições adotadas, a parede celular do fungo não influencia na transformação do TiO_2 em nanotubos. Ademais, a metodologia empregada leva à produção de um material biomórfico inédito, em que microtubos (a estrutura primária) são constituídos pela agregação de nanotubos de titanato de sódio (a estrutura secundária). Os nanotubos são mais longos do que aqueles obtidos via método convencional e contêm moléculas

de água e íons Na^+ localizados na região interlamelar. Nesse sentido, o tratamento químico empregado desempenha duas importantes funções: a transformação da fase do óxido de titânio em nanotubos de titanato de sódio e a degradação do biotemplate levando à formação do material biomórfico. Como foi discutido na revisão bibliográfica, geralmente, a remoção do componente biológico se dá através da calcinação do material biohíbrido. Por outro lado, tratamentos químicos empregando soluções aquosas de ácidos, como ácido fosfórico, ácido nítrico ou ácido fórmico ou tratamento com bases, por exemplo, o hidróxido de sódio (MUMM *et al.*, 2010; GU *et al.*, 2014) também são utilizados. Como os processos químicos de remoção podem ser empregados em temperaturas mais baixas, tais métodos podem evitar os efeitos indesejados que podem ser produzidos quando a calcinação é utilizada para decompor o template biológico.

Algumas considerações à cerca do comprimento dos nanotubos podem ser feitas ao comparar aqueles obtidos via biohíbrido e via método convencional, que empregam óxidos como material de partida. Em ambos os procedimentos, os precursores são inseridos no meio reacional e mantidos em repouso durante todo o processo. Para os nanotubos produzidos através do método hidrotérmico convencional, foi verificado que os comprimentos obtidos estão na ordem de centenas de nanômetros até $1 \mu\text{m}$ (ANASTASESCU *et al.*, 2016), muito menores do que aqueles preparados utilizando o biohíbrido como material precursor (ver Fig 3.4.3). A taxa de formação dos nanotubos é governado por processos de difusão do óxido de titânio e do hidróxido de sódio no meio reacional (BAVYKIN *et al.*, 2006; BAVYKIN *et al.*, 2008; MORGAN *et al.*, 2010). Com isso, nas condições estáticas observadas no método convencional, ocorre um lento processo de dissolução do óxido de titânio e de recristalização na forma de titanato de sódio, gerando nanotubos mais curtos (BAVYKIN *et al.*, 2006; BAVYKIN *et al.*, 2008; MORGAN *et al.*, 2010). Para contornar essa situação, o grupo de Tang (2014) acoplou, ao sistema reacional, um agitador magnético que garantiu o controle da rotação do sistema, aumentando, com isso, a taxa

de difusão dos reagentes e, conseqüentemente, as taxas de dissolução/recristalização, o que levou à produção de nanotubos com comprimentos maiores que 1 μm (TANG *et al.*, 2014). Segundo Tang e colaboradores, baseado no modelo proposto por Kukovecz e colaboradores (2005), o aumento do comprimento pode ser compreendido através de um mecanismo de “anexação orientado” em que nanofitas ou nanotubos previamente produzidos atuam como sementes. Como o sistema se encontra sobre a ação de uma força centrípeta devido à agitação empregada, a deposição de nanocristais ao longo do eixo de crescimento do nanotubos é acelerada, levando, com isso, ao aumento do comprimento do tubo (TANG *et al.*, 2014).

No caso dos biohíbridos, os processos de dissolução e recristalização devem ocorrer no mesmo ritmo daquele observado no método convencional. No entanto, como o óxido de titânio se encontra embebido na estrutura do fungo, verifica-se que as partículas (estão muito mais próximas umas das outras (ver Fig. 3.4.1(c)). Além disso, como foi visto para biohíbridos luminescentes, o *P. macrosporus* secreta substâncias adesivas no meio extracelular que reforçam ainda mais a união das partículas de óxido na parede celular do fungo. Isso pode garantir um aumento da taxa de interação entre os blocos TiO_6 gerados durante a reação com o hidróxido de sódio e, portanto, facilitar a anexação de mais blocos nas folhas ou nos nanotubos de titanato previamente formadas (KUKOVECZ *et al.*, 2005). Assim, a estrutura do fungo atua como direcionador de crescimento dos nanotubos, controlando o comprimento dos mesmos a partir do tamanho da estrutura tubular dos fungos.

O processo de crescimento das hifas fúngicas é polarizado (LI; BOWERMAN, 2010; GOEHRING; GRILL, 2013). Esse tipo de crescimento também é observado em alguns tipos de células como neurônios, raízes de cabelo e tubo de pólen (GOEHRING E GRILL, 2013; RIQUELME, 2013). No entanto, somente nas hifas fúngicas, é possível um crescimento ilimitado do comprimento da estrutura microtubular, desde que exista um controle adequado das condições do desenvolvimento do fungo (MOMANY, 2002; RIQUELME, 2013). Assim, como os fungos podem crescer

“indefinidamente”, é possível, através da estratégia de produção de biohíbrido, seguida do tratamento químico em meio alcalino, obter nanotubos ainda mais longos.

O trabalho do grupo de Tang (2014) ainda mostrou que, durante o processo de síntese sob rápida agitação, os nanotubos formados se apresentam levemente dobrados. Esses autores verificaram que esses nanotubos se mostraram adequados na construção de eletrodos de bateria íons lítio, os quais apresentaram um desempenho muito melhor dos nanotubos, quando comparado com os nanotubos obtidos via método convencional (TANG *et al.*, 2014). Como pôde ser visto na Figura 3.4.3, os nanotubos distribuído ao longo da estrutura microtubular biomimética também estão levemente dobrados. Seguindo esse raciocínio, talvez, os nanotubos obtidos via precursor biohíbrido, possam apresentar propriedades semelhantes. Futuros experimentos nessa linha serão testados para avaliar a viabilidade desses materiais com eletrodos de baterias íon lítio.

Os nanotubos de titanatos são semicondutores com um band gap maior do que aqueles observados nas principais fases do óxido de titânio, o que naturalmente compromete na aplicação desses materiais como fotocatalisadores, por exemplo. Para contornar essa situação, são empregados processos de dopagem e/ou sensibilização dos nanotubos de titanato (SOUZA *et al.*, 2016). A dopagem viabiliza o surgimento de níveis de energia localizados no band gap (CHANG *et al.*, 2011), enquanto que a sensibilização facilita os processos de transferência de elétrons entre os nanotubos e a espécie química sensibilizadora através de um caminho alternativo que requer menor energia (ALVES *et al.*, 2011). Tanto o processo de dopagem quanto o de sensibilização geralmente ocorrem após a síntese dos nanotubos. Inicialmente, foi pensando em alterar, de alguma forma, as propriedades ópticas dos nanotubos produzidos via biohíbrido. Nesse sentido, foi proposto misturar outros óxidos com o óxido de titânio durante o processo de obtenção dos biohíbridos. Os óxidos selecionados foram o pentóxido de vanádio (V_2O_5) e trióxido de tungstênio (WO_3), que apresentam band gaps menores que o do óxido de titânio e são bastante empregados com suportes

catalíticos em associação com a fase anatase do óxido de titânio (LEE, 1999; NOWOTNY, 2016). A escolha desses óxidos também foi fundamentada em resultados de trabalhos do grupo, ainda não publicados, que demonstraram que os fungos filamentosos interagem com os óxidos citados, proporcionando a produção de biohíbridos com esses diferentes tipos de óxido.

Nesse sentido, os biohíbridos constituídos pela mistura de óxido de titânio com os óxidos de vanádio e tungstênio foram preparados e submetidos ao tratamento hidrotérmico em meio básico. A quantidade de óxido de vanádio e molibdênio utilizada correspondeu a 25% da massa do óxido de titânio. As imagens de MEV para os dois sistemas são mostradas na Figura 3.4.7. A Figura 3.4.7(a) se refere ao sistema P.m-NaTiNTs/V₂O₅, enquanto a Figura 3.4.7(b) é relativo ao P.m-NaTiNTs/WO₃. Como pode ser visto Figura 3.4.7, após o tratamento hidrotérmico em meio alcalino, os dois sistemas investigados também retiveram a estrutura microtubular do fungo. Supreendentemente, os materiais nanoestruturados obtidos exibiram morfologias completamente diferentes daquela previamente esperada. Para o sistema em que o biohíbrido continha V₂O₅, houve a formação de nanofitas bem definidas, com comprimentos maiores que 1 µm e com larguras que variam de 60 a 250 nm (Fig. 3.4.7(a-II)). Por outro lado, para sistema com WO₃, a morfologia obtida se assemelha a folhas enrugadas contendo, provavelmente, partículas de TiO₂ encrustadas (Fig. 3.4.7(b-II)). Ambos os resultados indicam uma possível ação dos óxidos (V₂O₅ e WO₃) na modelagem dessas nanoestruturas.

Os dados de microanálise por EDS, de ambos os sistemas, indicam a presença de titânio, oxigênio, sódio, vanádio e tungstênio (Ver Apêndice III). Os espectros de espalhamento Raman (ver Figura 3.4.7 a-III e b-III), para ambos os sistemas, indicaram a existência de picos característicos de titanatos nanoestruturados (indicados por TN). No entanto, apesar da formação de nanoestruturas com morfologias distintas daquela observada para o biohíbrido contendo apenas o óxido de titânio, também foi observado a presença de picos da fase anatase do óxido de titânio (indicado pela letra

A). Isso indica que o TiO_2 não foi completamente convertido em titanato nanoestruturado. Os espectros Raman também não apresentaram nenhum pico correspondente ao V_2O_5 e nem ao WO_3 . Ambos os óxidos reagem facilmente em meio básico, formando espécies iônicas solúveis (VO_4^{3-} e WO_4^{2-}) (LIVAGE, 1991; WOOD, 1992).

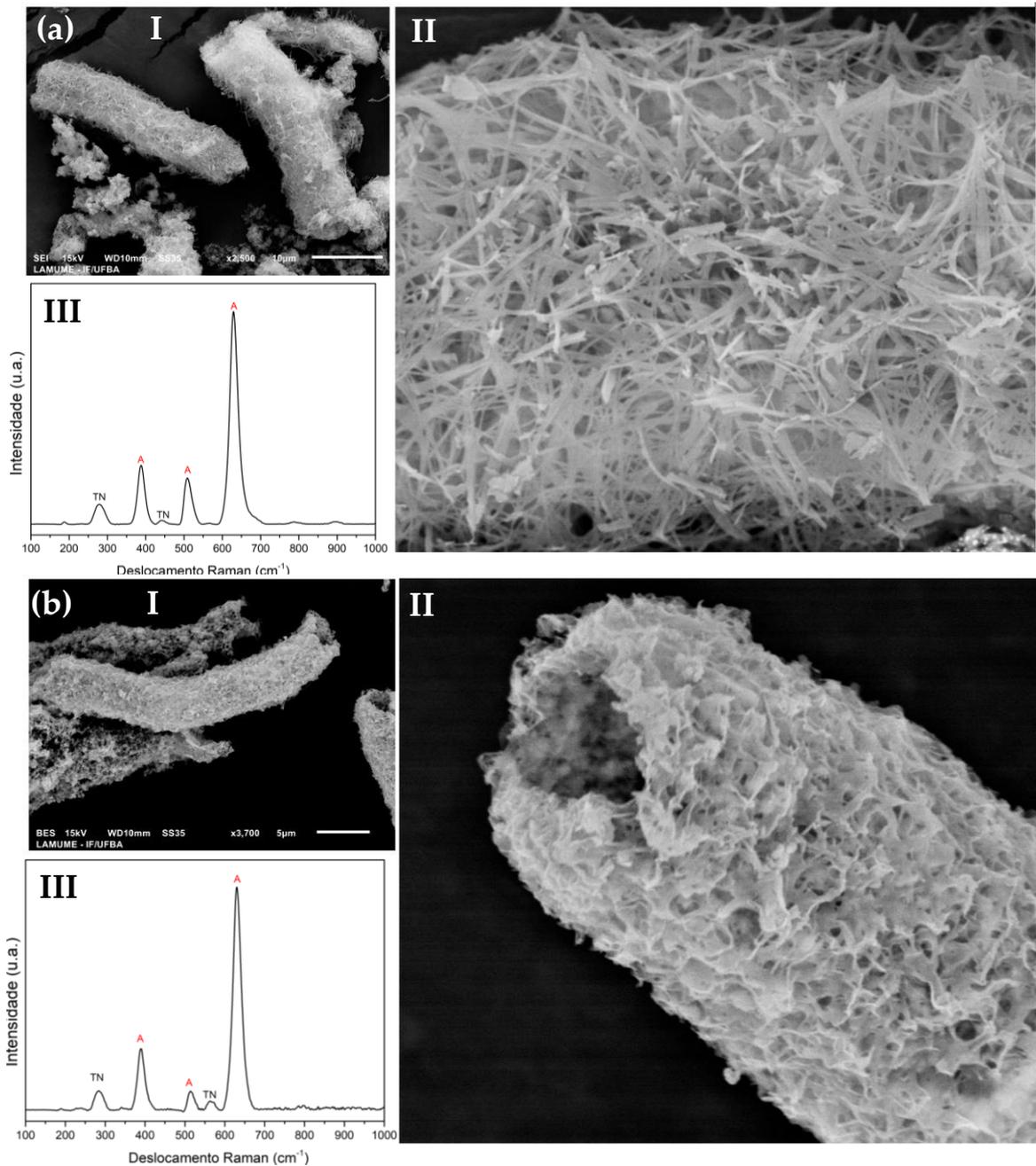


Figure 3.4.7 – (a) P.m-NaTiINTs/ V_2O_5 , (I e II) imagens de MEV em aumentos de 2 500x e 10 000x, respectivamente e (III) espectro Raman. (b) P.m-NaTiINTs/ WO_3 , (I e II) imagens de MEV do tratado em aumentos de 2 500x e 10 000x, respectivamente e (III) espectro Raman. A = anatase e TN = Titanto nanoestruturado.

O sistema constituído por óxido de vanádio despertou um interesse particular em virtude da formação de nanofitas. Geralmente, as nanofitas são obtidas empregando temperaturas acima de 160 °C (MA *et al.*, 2005). Dessa maneira, a estratégia empregada possibilita a produção de titanatos nanoestruturados com a morfologia de fitas em menores temperaturas de síntese (100-140 °C). Assim, para avaliar a extensão da influência do V₂O₅ na produção das nanofitas, biohíbridos contendo a mistura do óxido de titânio com 5%, 10% e 25% de massa de V₂O₅ em relação à massa do TiO₂ foram preparados. Os dados de DRX (somente para a amostra com 25% de V₂O₅) e FT-IR dos biohíbridos são exibidos na Figura 3.4.8.

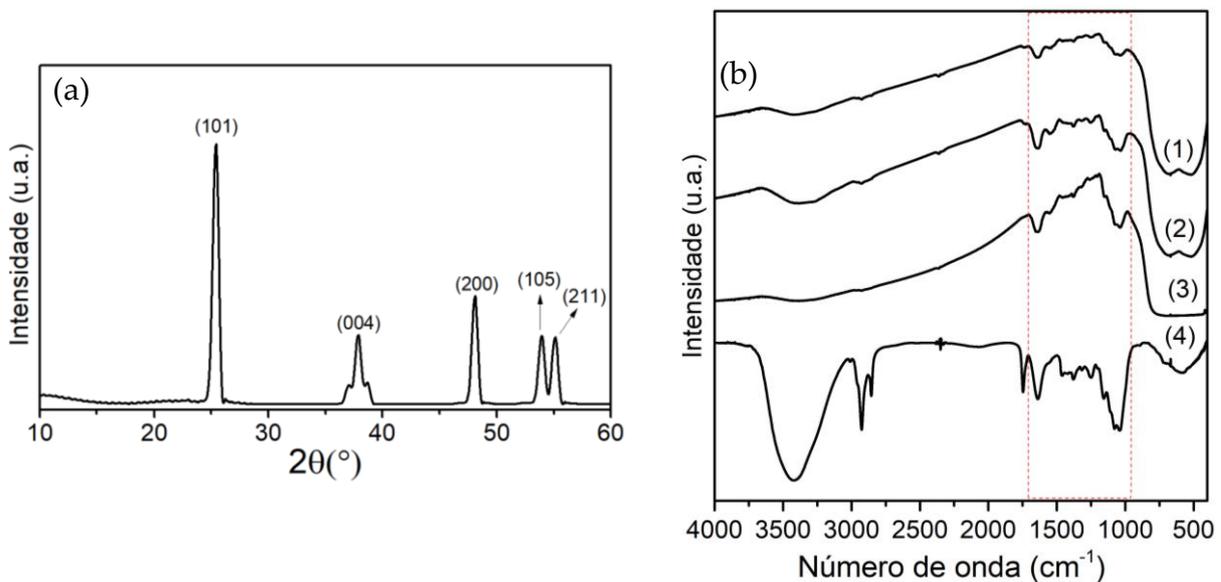


Figure 3.4.8 - (a) difratograma do *P.m*-TiO₂/V₂O₅(25%) e (b) espectro de infravermelho de (1) *P.m*-TiO₂-V₂O₅(5%), (2) *P.m*-TiO₂-V₂O₅(10%), (3) *P.m*-TiO₂-V₂O₅(25%) e (4) *P.m* nativo.

A Figura 3.4.8(a) mostra o DRX do sistema *P.m*-TiO₂/V₂O₅ (25%). Verifica-se que todos os picos observados são característicos da fase anatase do TiO₂. A falta de picos de reflexão do V₂O₅ pode estar associada à quantidade de partículas remanescente na estrutura do biohíbrido. Após o tempo pré-definido de crescimento do biohíbrido, um processo de lavagem é requerido para a remoção de partículas de TiO₂ fracamente ligadas à estrutura do fungo. Então, além do TiO₂, partículas de V₂O₅ também são retiradas do fungo durante o processo de lavagem. Assim, acredita-se que após essa etapa, as partículas de V₂O₅ estejam em menores quantidades e finamente dispersas na

matriz biológica e por isso, não são detectadas pelo DRX. Da mesma forma, o espectro de infravermelho dos sistemas com 5% (1), 10% (2) e 25% (3) de V_2O_5 exibidos na Figura 3.4.8(b), apresentam bandas relativas às ligações Ti-O do óxido de titânio localizados na faixa 400-1000 cm^{-1} e as bandas na faixa de 1000 a 1700 cm^{-1} , são referentes aos estiramentos dos componentes da parede celular do fungo (GALICHET *et al.*, 2001; BEEKES *et al.*, 2007). Dentro dessa faixa podem ser destacados os picos em 1036, 1080 e 1155 cm^{-1} relacionados aos estiramentos das ligações C-O-C e C-O do anel D-glicose e o estiramento assimétrico da ligação C-O-C da ponte que liga dois anéis D-glicose, respectivamente (BEEKES *et al.*, 2007). As bandas referentes aos estiramentos do V_2O_5 estão na faixa de 400 a 1100 cm^{-1} (WONG *et al.*, 1998), e estão sobrepostos pelos sinais do TiO_2 . Como para o biohíbrido $P.m-TiO_2$, as bandas dos componentes da parede celular não são observadas (ver Figura 3.4.6), isso pode sugerir que a presença do V_2O_5 na parede celular leva a formação de uma cobertura mais fina dos óxidos sobre algumas hifas, que durante o processo de maceração para produção de pastilhas de KBr, expõem tais hifas, possibilitando a detecção de grupos da parede celular do fungo.

As imagens de MEV e o difratograma dos três sistemas, após o tratamento hidrotérmico, são apresentadas na Figura 3.4.9. Como pode ser visto, em todos os sistemas houve a preservação da estrutura microtubular das hifas. As imagens em maiores magnificações revelam, para todos os sistemas, a presença de nanofitas compondo os microtubos. No entanto, a disposição das fitas ao longo dos microtubos são bem diferentes daquelas observadas na Figura 3.4.7 (a-II). As fitas estão mais agregadas e, além disso, nanotubos também são observados em menor quantidade, por exemplo, para o sistema contendo 5% de V_2O_5 . Outro fato completamente diferente daquele reportado acima, são aos perfis dos padrões de DRX dos sistemas estudados. A Tabela 3.5-4 exibe os valores dos ângulos de reflexão e as distâncias interplanares. Todos os picos de reflexão são característicos de titanatos nanoestruturados, evidenciando a completa conversão do óxido de titânio.

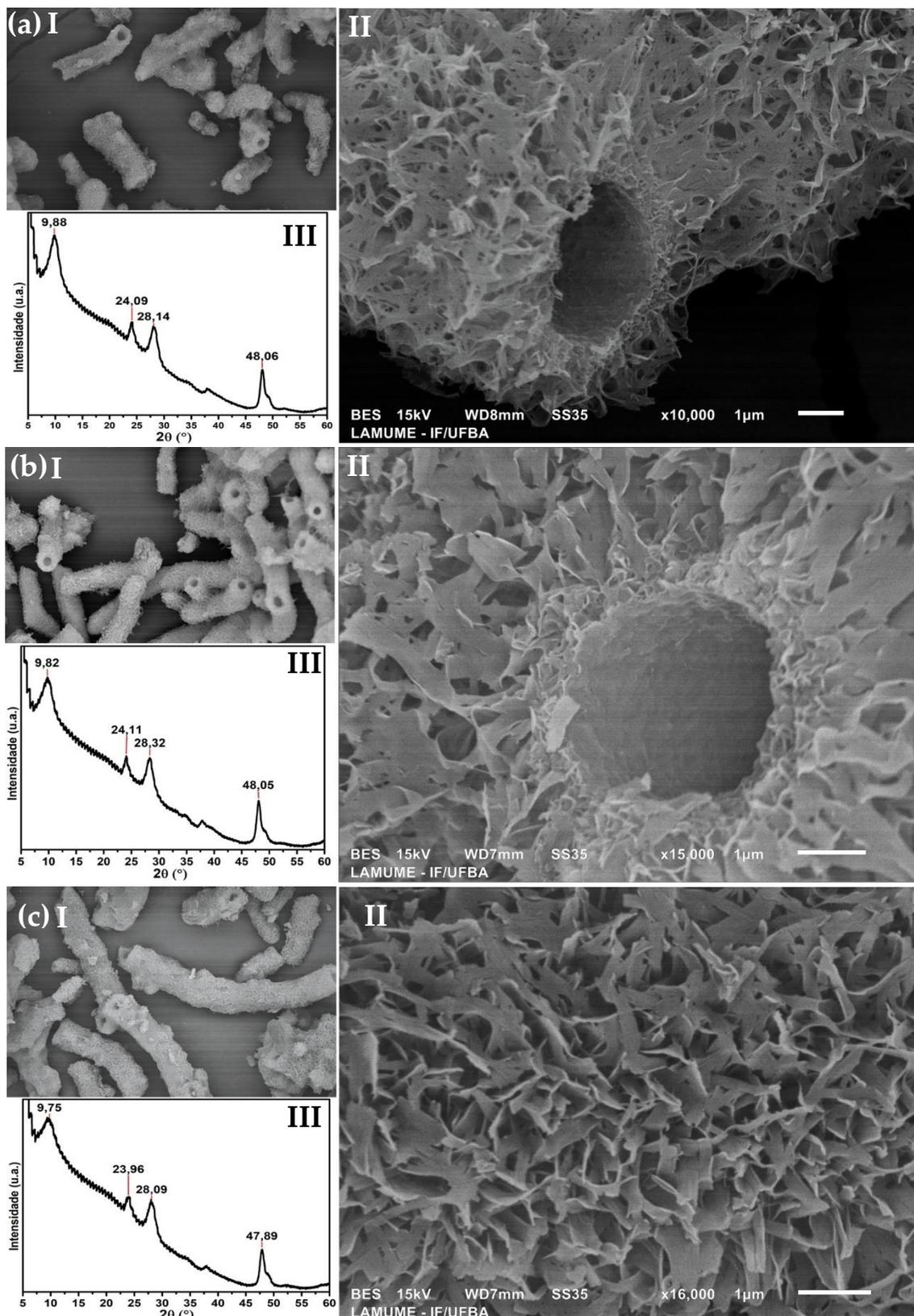


Figure 3.4.9 - (a) P.m-NaTiNTs/V₂O₅(5%) (I e II) imagens de MEV em aumentos de 1100x e 10000x, respectivamente e (III) difratograma de raios-X. (b) P.m-NaTiNTs/V₂O₅(10%), (I e II) imagens de MEV em aumentos de 1100x e 15000x, respectivamente e (III) difratograma de raios-X. (c) P.m-NaTiNTs/V₂O₅(25%), (I e II) imagens de MEV em aumentos de 1200x e 16000x, respectivamente e (III) difratograma de raios-X.

Tabela 3.4-2 - Ângulos de reflexão e distancia interplanares dos sistemas P.m-NaTiNTs/V₂O₅(5%), P.m-NaTiNTs/V₂O₅(10%), P.m-NaTiNTs/V₂O₅(25%).

P.m-NaTiNTs/V ₂ O ₅ (5%)		P.m-NaTiNTs/V ₂ O ₅ (10%)		P.m-NaTiNTs/V ₂ O ₅ (25%)	
2θ = 9,88°	d = 8,94 Å	2θ = 9,82°	d = 9,00 Å	2θ = 9,75°	d = 9,05 Å
24,09°	3,69 Å	24,11°	3,68 Å	23,96°	3,71 Å
28,14°	3,16 Å	28,32°	3,15 Å	28,09°	3,17 Å
48,06°	1,89 Å	48,05°	1,89 Å	47,89°	1,89 Å

Para tentar explicar as mudanças morfológicas observadas nos sistemas P.m-NaTiNTs-V₂O₅(5%), P.m-NaTiNTs-V₂O₅(10%) e P.m-NaTiNTs-V₂O₅(25%), quando comparado com aquele mostrado na Fig. 3.4.7(a), foi necessário revisitar o protocolo de síntese. Uma das primeiras indagações se concentrou na forma do hidróxido de sódio sólido utilizado no preparo da solução. Para os sistemas mostrados na Figura 3.4.7, foi empregado o NaOH sólido na forma de lentilhas. Assim, um teste simples do preparo da solução apontou que o volume da solução final foi aproximadamente 12% maior do que aquele previamente estabelecido. Isso se deve a adsorção de vapor de água na superfície do NaOH sólido. Com isso, a concentração da solução de NaOH, que deveria ser de aproximadamente 10 mol L⁻¹, apresentou um valor menor e em torno de 6,0 mol L⁻¹. Isso, por exemplo, ajuda a entender o motivo da conversão incompleta do óxido de titânio em titanato nanoestruturado para os sistemas indicados na Figura 3.4.7. Para o sistema P.m-TiO₂ e aqueles descritos na Fig. 3.4.9, o NaOH usado foi o com formato de micropérolas que, como pôde ser visto nas caracterizações realizadas, viabilizou a transformação total do TiO₂ em titanato nanoestruturado, indicando que a concentração da base foi suficiente para o sucesso do tratamento químico empregado.

Considerando que a mudança da morfologia poderia ser fruto da influência do óxido de vanádio, um experimento controle foi elaborado para testar a hipótese levantada. O controle testado consistiu em uma suspensão formada pela mistura do

TiO₂ e V₂O₅ (25% da massa do TiO₂), sem a presença do fungo. Esse sistema foi submetido a um tratamento hidrotérmico em meio básico, com temperatura na faixa de 100 a 140°C. A solução de hidróxido de sódio de concentração 10 mol L⁻¹ foi preparada utilizando o NaOH na forma de micropérolas. As imagens de MEV, juntamente com perfil de DRX, são exibidos na Figura 3.4.10. As micrografias indicam a formação de titanatos nanoestruturados com morfologia predominantemente nanotubular. Da mesma forma, os picos de DRX confirmam a completa transformação do TiO₂/V₂O₅ em titanato nanoestruturado. Assim, como foi observado para o sistema P.m-NaTiNTs/V₂O₅(25%) (ver Fig. 3.4.9(c)), nenhum pico referente à estrutura cristalina do V₂O₅ foi identificado, provavelmente em virtude da formação de espécies solúveis no meio reacional.

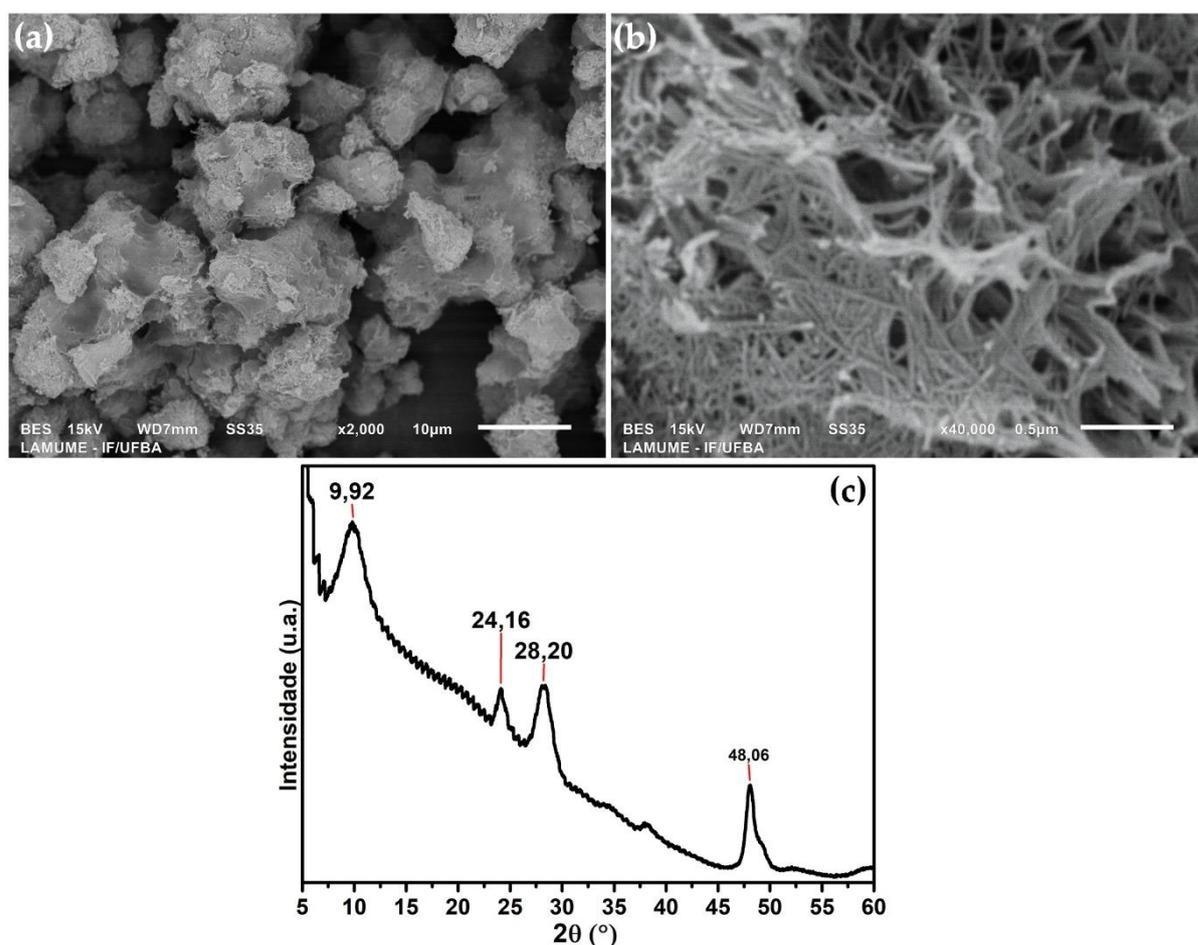


Figure 3.4.10 - Micrografia de MEV de NaTiNTs-V₂O₅(25%) em (a) em aumento de 2000x e (b) em aumento de 40000x. (c) Difratograma de raios-X de NaTiNTs-V₂O₅(25%).

O espectro de EDS do sistema (ver Apêndice VI) confirma a existência de átomos de vanádio, através das linhas de emissão características desse elemento químico. No entanto, a linha $K\alpha$ mais intensa utilizada para identificar tal elemento é muito próxima da linha $K\beta$ do titânio, o que pode gerar interpretações questionáveis com relação à presença de vanádio na composição dos microtubos. Dessa maneira, outras formas de caracterização deverão ser empregadas para constatar se o vanádio faz parte da composição dos titanatos produzidos.

Diante dos resultados do experimento controle, pode se concluir que somente o V_2O_5 não é suficiente para a obtenção de titanatos com morfologia de nanofitas. O que significa que o fungo pode exercer um papel importante para a formação desse tipo de nanoestrutura. Com isso, uma segunda hipótese foi aventada, focada na concentração da solução de hidróxido de sódio. Assim, foi organizado três conjuntos de experimentos em que a concentração da solução de NaOH foi variada. O tratamento hidrotérmico de biohíbridos de *P.m*- TiO_2 em soluções de concentrações aproximadas de 6,5, 7,5 e 8,0 mol L^{-1} foram investigadas e os resultados são mostrados na Figura 3.4.11. A Figura 3.5.14(a) exibe as imagens de MEV do sistema tratado com a solução de hidróxido de sódio de em torno de 6,5 mol L^{-1} . As imagens revelam a presença microtubos constituído de nanofitas. As nanofitas obtidas estão relativamente mais soltas quando comparadas com aquelas fabricadas a partir das amostras com diferentes quantidades de V_2O_5 . No entanto, o perfil de DRX (ver Fig. 3.4.11(a-III)) exibe tanto os picos relativos ao titanato nanoestruturado quanto as reflexões referentes à fase anatase do óxido de titânio ($2\theta \sim 25, 37, 53$ e 54), indicando, mais uma vez, a conversão parcial do TiO_2 em titanato. Quando, a concentração da solução aumenta para próximo de 7,5 mol L^{-1} , as nanofitas continuam sendo formadas (ver Fig. 3.5.10(b - I e III)). Além disso, as medidas de difração de raios-X (ver Fig. 3.5.10(b - III)), para essa amostra, indica somente os picos característicos dos titanatos nanoestruturados. Isso aponta que a concentração da solução de NaOH em torno de 7,5 mol L^{-1} , é suficiente para a completa transformação do TiO_2 em nanofitas.

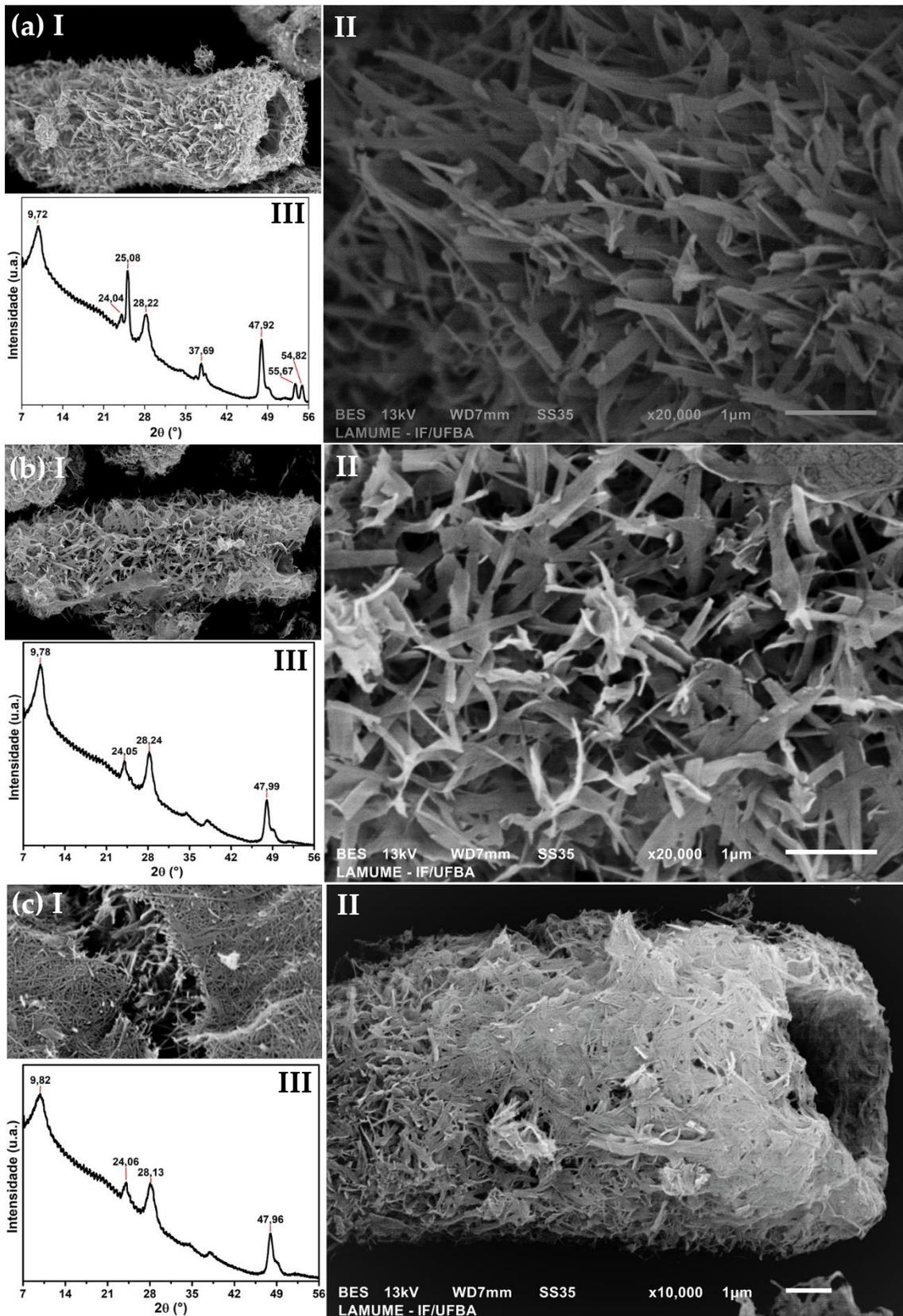


Figure 3.4.11 - (a) *P.m*-NaTiNTs – 6,5 M (I e II) imagens de MEV em aumentos de 6500x e 20000x, respectivamente e (III) difratograma de raios-X. (b) *P.m*-NaTiNTs-7,5 M, (I e II) imagens de MEV em aumentos de 6000x e 20000x, respectivamente e (III) difratograma de raios-X. (c) *P.m*-NaTiNTs-7,5 M, (I e II) imagens de MEV em aumentos de 6000x e 20000x, respectivamente e (III) difratograma de raios-X.

Por fim, para o sistema adicionado à solução de NaOH de concentração próxima de 8,0 M, os dados de DRX, indicados na Figura 3.5.10 (c – III), como era de se esperar, possuem somente os picos dos titanatos nanoestruturados. Por outro lado, as imagens de microscopia eletrônica de varredura (ver Fig. 3.5.10(c- I e II) mostram a presença de microtubos constituídos de nanofitas e de microtubos composto de nanotubos. A Tabela 3.4-3 apresenta todos os picos de difração destacados nos difratogramas, bem como, as distâncias interplanares associadas à essas reflexões. Assim, a análise desse conjunto de experimentos permite concluir que, para a formação de nanofitas, nas condições de síntese empregadas, é crucial a presença do fungo filamentososo.

Tabela 3.4-3 - Ângulos de reflexão e distância interplanares dos sistemas Pm-NaTiNTs preparados com soluções de NaOH 6,5, 7,5 e 8,0 mol L⁻¹.

P.m-NaTiNTs – 6,5 mol L ⁻¹		P.m-NaTiNTs – 7,5 mol L ⁻¹		P.mNaTiNTs – 8,0 M mol L ⁻¹	
2θ = 9,72°	d = 9,09 Å	2θ = 9,78°	d = 9,03 Å	2θ = 9,83°	d = 8,98 Å
24,04°	3,70 Å	24,05°	3,69 Å	24,06°	3,70 Å
25,08°	3,55 Å	-	-	-	-
28,22°	3,16 Å	28,24°	3,16 Å	28,18°	3,16 Å
37,69°	2,38 Å	-	-	-	-
47,92°	1,89 Å	47,99°	1,89 Å	47,96°	1,89 Å
53,67°	1,70 Å	-	-	-	-
54,82°	1,67 Å	-	-	-	-

Os resultados dos últimos experimentos indicaram que para obter nanofitas de titanato de sódio, é necessário, simplesmente, submeter o biohíbrido a um tratamento hidrotérmico empregando uma solução de hidróxido de sódio de concentração dentro da faixa de 6,5-8,0 mol L⁻¹. Assim, um mecanismo de produção de nanofitas,

empregando biohíbridos constituídos de fungo filamentosos/óxido de titânio como precursores, pode ser proposto a partir da análise das etapas que viabilizam a formação de nanofitas empregando o método convencional. Os trabalhos dos grupos de Bavykin (2007) e Morgan (2010) demonstraram, claramente, que, para a formação de nanofibras (nanofitas, nanobastões), qualquer fase do TiO_2 tem de ser submetida a um tratamento hidrotérmico em solução de hidróxido de sódio de concentração entre 9,0 e 10 mol L^{-1} e temperaturas acima de 160°C são requeridas. O aumento da temperatura contribui para uma maior taxa de dissolução do óxido de titânio, gerando uma concentração muito maior de espécies iônicas na solução contendo o titânio (TiO_6 , TiO_3^- , $\text{TiO}_2(\text{OH})_2^{2-}$). Essas espécies recristalizam na forma de titanato lamelar originando folhas mais espessas e, portanto, mais rígidas (BAVYKIN *et al.*, 2007; MORGAN *et al.*, 2010). A rigidez alcançada pelas nanofolhas proporciona uma estabilidade que impede o enrolamento necessário para gerar os nanotubos de titanato.

No caso dos biohíbridos, óxido de titânio se encontra embebido na parede celular do fungo e nenhuma alteração que aumente a taxa de dissolução é observada nas condições da faixa de temperatura (100-140 °C) utilizada. Isso pode ser facilmente identificado verificando-se que uma grande parte do óxido de titânio depositado na parede celular microbiana é transformada em nanotubos de titanato de sódio quando a solução de NaOH 10 mol L^{-1} é empregada. De forma geral, os íons hidroxila possuem uma dupla função quando os biohíbridos são utilizados como precursores de titanatos nanoestruturados: eles têm que quebrar as ligações do óxido de titânio e degradar o template biológico. Assim, para a solução de NaOH de concentração 6,5 mol L^{-1} , a quantidade de hidroxila no meio é menor do que na solução de 10 mol L^{-1} . Com isso, os íons hidroxila presentes no meio não são suficientes para dissolver o TiO_2 e destruir toda a estrutura orgânica do fungo. É por isso, que o TiO_2 depositado na estrutura do fungo não é completamente transformado em titanato de sódio quando a concentração da solução de NaOH é 6,5 mol L^{-1} . No entanto, nessa situação, nanofitas são facilmente obtidas.

Para entender a formação das nanofitas de titanato de sódio nessas condições oferecidas pela solução de NaOH 6,5 mol L⁻¹, um olhar especial é voltado para o papel desempenhado pela estrutura do fungo filamentosos. Acredita-se que os componentes da parede celular juntamente com as substâncias adesivas produzidas pelo fungo que estão interagindo com óxido de titânio, são degradados mais lentamente, proporcionando que nanofolhas, com dimensões ideais para o enrolamento, sejam estabilizadas, aumentem de comprimento e de espessura até alcançarem a rigidez necessária para se manterem com nanofitas. Para a solução de NaOH 7,5 mol L⁻¹, a quantidade de íons hidroxila é aproximadamente 1,2 vezes maior do que na solução de 6,5 mol L⁻¹. Contudo, foi verificado, além da formação de nanofitas, a transformação completa do TiO₂. Isso significa que para essa concentração, ainda é observado uma degradação lenta dos componentes da parede celular do fungo, o que contribui para uma maior estabilização das fitas previamente formadas, garantido, com isso, o crescimento das fitas na forma de microtubos. Portanto, a quantidade de hidroxila no meio é suficiente para dissolver todo óxido depositado nas hifas e degradar a matriz orgânica do fungo. Finalmente quando a concentração de NaOH passa para 8,0 mol L⁻¹, a quantidade de hidróxido de sódio no meio consegue degradar mais rapidamente algumas hifas do que outras, deixando mais visível o misto de microestruturas compostas majoritariamente por nanotubos de titanato ou por nanofitas de titanato (ver Fig. 3.4.11).

3.5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho de Tese estudou o processo químico de transformação de óxido de titânio na parede celular do fungo filamentoso *Phialomyces macrosporus*. Materiais biohíbridos compostos pelo fungo filamentoso *Phialomyces macrosporus* decorado com óxido de titânio (anatase) foi submetido a um tratamento hidrotérmico em meio básico numa faixa de temperatura de 100 a 140 °C. Constatou-se a conversão de óxido de titânio em titanato de sódio nanoestruturado, sendo reportado, pela primeira vez, a produção de materiais biomórficos constituídos de titanatos nanoestruturados. Imagens de MEV revelaram que os materiais obtidos possuem morfologia microtubular com comprimentos na faixa de 30 a 100 µm e diâmetros internos variáveis. As medidas de DRX e espectroscopia na região do infravermelho confirmaram a mudança da estrutura cristalina da fase anatase do óxido de titânio. Ainda explorando os resultados de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, juntamente com as medidas EDS, foi verificado que os microtubos, obtidos a partir do uso de uma solução de NaOH de 10 mol L⁻¹, são constituídos de titanato de sódio nanoestruturados com morfologia nanotubular.

Alterações na morfologia dos titanatos nanoestruturados também foram alcançadas utilizando biohíbridos contendo a mistura de TiO₂/V₂O₅ e TiO₂/WO₃. Os sistemas compostos pelo biohíbrido P.m-TiO₂/V₂O₅ tratados hidrotermicamente originaram titanatos nanoestruturados na forma de nanofitas. Experimentos controles ajudaram a concluir que a morfologia obtida é dependente da concentração da solução de hidróxido de sódio na faixa de 6-8 mol L⁻¹ e não da quantidade de pentóxido de vanádio. A relevância desse resultado reside no fato de que os titanatos nanoestruturados na forma de nanofitas normalmente são produzidos em temperaturas maiores do que 160° em concentrações de NaOH maiores do que 8 mol L⁻¹.

Um mecanismo foi proposto para explicar a formação das nanofitas admitindo que, nas condições alcalinas proporcionadas na faixa de concentração de 6,5-8,0 mol L⁻¹, a degradação mais lenta do fungo permite que nanofolhas de titanato previamente sintetizadas sejam estabilizadas e tenham com isso, seu comprimento e sua espessura aumentadas alcançado uma rigidez que inviabiliza o enrolamento para forma nanotubos até a completa destruição do fungo.

Como perspectiva tem-se:

- Realizar experimentos que viabilizem a transformação completa do TiO₂ na parede celular de fungos, empregando tratamento hidrotérmico e solução de NaOH 6,5 mol L⁻¹;
- Desenvolver um estudo comparativo de materiais biomórficos obtidos partir de biohíbridos constituídos por diferentes espécies de fungos filamentosos;
- Investigar os biohíbridos constituídos por fungos/TiO₂/WO₃ submetidos a um tratamento hidrotérmico em soluções de NaOH na faixa de 6,5 a 8,0 mol L⁻¹;
- Estudar a aplicação dos materiais biomórficos obtidos a partir dos biohíbridos P.m-TiO₂, P.m-TiO₂/V₂O₅ e P.m-TiO₂/WO₃ como adsorventes, fotocatalisadores, sensores e eletrodos.

REFERÊNCIAS

- AKITA, T. et al. Transmission Electron Microscopy Observation Of The Structure Of TiO₂ Nanotube And Au/TiO₂ Nanotube Catalyst. **Surface and Interface Analysis**, v. 37, n. 2, p. 265-269, 2005.
- ALVES, W. et al. Quenching Of Photoactivity In Phthalocyanine Copper(II)-Titanate Nanotube Hybrid Systems. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 24, p. 12082-12089, 2011.
- ANASTASESCU, C. et al. 1D Oxide Nanostructures Obtained By Sol-Gel And Hydrothermal Methods. **Springer International Publishing**, 2016.
- ANDRUSENKO, I. et al. Structure Analysis Of Titanate Nanorods By Automated Electron Diffraction Tomography. **Acta Crystallographica Section B-Structural Science**, v. 67, p. 218-225, 2011.
- BAI, J.; ZHOU, B. X. Titanium Dioxide Nanomaterials For Sensor Applications. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 19, p. 10131-10176, 2014.
- BAI, Y. et al. Titanium Dioxide Nanomaterials For Photovoltaic Applications. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 19, p. 10095-10130, 2014.
- BAVYKIN, D. V. et al. An Aqueous, Alkaline Route To Titanate Nanotubes Under Atmospheric Pressure Conditions. **Nanotechnology**, v. 19, n. 27, 2008.
- BAVYKIN, D. V.; CRESSEY, B. A.; WALSH, F. C. Low-Temperature Synthesis Of Titanate Nanotubes In Aqueous Koh. **Australian Journal of Chemistry**, V. 60, n. 2, p. 95-98, 2007.
- BAVYKIN, D. V.; Friedrich, J. M.; Walsh, F. C. Protonated Titanates And Tio₂ Nanostructured Materials: Synthesis, Properties, And Applications. **Advanced Materials**, v. 18, n. 21, p. 2807-2824, 2006.
- BAVYKIN, D. V. et al. Apparent Two-Dimensional Behavior Of TiO₂ Nanotubes Revealed By Light Absorption And Luminescence. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 18, p. 8565-8569, 2005.
- BAVYKIN, D. V. et al. Tio₂ Nanotube-Supported Ruthenium(Iii) Hydrated Oxide: A Highly Active Catalyst For Selective Oxidation Of Alcohols By Oxygen. **Journal of Catalysis**, v. 235, n. 1, p. 10-17, 2005.
- BAVYKIN, D. V. et al. The Effect Of Hydrothermal Conditions On The Mesoporous Structure Of TiO₂ Nanotubes. **Journal of Materials Chemistry**, V. 14, N. 22, P. 3370-3377, 2004.

BEEKES, M.; LASCH, P.; NAUMANN, D. Analytical Applications Of Fourier Transform-Infrared (FT-IR) Spectroscopy In Microbiology And Prion Research. **Veterinary Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 305-319, 2007.

BERTUNA, A. et al. Titanium Dioxide Nanostructures Chemical Sensor. **Proceedings Of The 30th Anniversary Eurosensors Conference - Eurosensors 2016**, v. 168, p. 313-316, 2016.

BIAN, Z. F.; TACHIKAWA, T.; MAJIMA, T. Superstructure Of TiO₂ Crystalline Nanoparticles Yields Effective Conduction Pathways For Photogenerated Charges. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 3, n. 11, p. 1422-1427, 2012.

BISPO, V. M. B. M. Funcionalização De Células Fúngicas Com Óxidos De Metais De Transição Para O Desenvolvimento De Estruturas Híbridas Biomiméticas. 2016. 121 f. Dissertação (Mestrado Em Química) - Instituto De Química, Universidade Federal Da Bahia, Salvador, 2016.

BRUTTI, S. et al. TiO₂-(B) Nanotubes As Anodes For Lithium Batteries: Origin And Mitigation Of Irreversible Capacity. **Advanced Energy Materials**, v. 2, n. 3, p. 322-327, 2012.

BURDA, C. et al. Chemistry And Properties Of Nanocrystals Of Different Shapes. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1025-1102, 2005.

CAO, G.; LIMMER, S. J. Oxide Nanowires And Nanorods. **Encyclopedia Of Nanoscience and Nanotechnology**. Nalwa, H. S. University Of Washington, Seattle, Washington, Usa: American Scientific Publishers. 8: 377-396 p. 2004.

CARUSO, R. A. Micrometer-To-Manometer Replication Of Hierarchical Structures By Using A Surface Sol-Gel Process. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 43, n. 21, p. 2746-2748, 2004.

CHANG, J. C. et al. Chemistry In A Confined Space: Characterization Of Nitrogen-Doped Titanium Oxide Nanotubes Produced By Calcining Ammonium Trititanate Nanotubes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 4605-4614, 2011.

CHEN, J. et al. Low-Temperature Synthesis Of Titanium Disulfide Nanotubes. **Chemical Communications**, n. 8, p. 980-981, 2003.

CHEN, Q. et al. The Structure Of Trititanate Nanotubes. **Acta Crystallographica Section B-Structural Science**, v. 58, p. 587-593, 2002.

CHEN, Q. et al. Trititanate Nanotubes Made Via A Single Alkali Treatment. **Advanced Materials**, v. 14, n. 17, p. 1208-+, 2002.

DU, G. H. Et Al. Preparation And Structure Analysis Of Titanium Oxide Nanotubes. **Applied Physics Letters**, v. 79, n. 22, p. 3702-3704, 2001.

- DU, G. H. *Et Al.* Potassium Titanate Nanowires: Structure, Growth, And Optical Properties. **Physical Review B**, v. 67, n. 3, 2003.
- FONTES, A. M. et al. Bio-Inspired Gold Microtubes Based On The Morphology Of Filamentous Fungi. **Biomaterials Science**, V. 2, N. 7, P. 956-960, 2014.
- FUKUHARA, M.; KURODA, T.; HASEGAWA, F. Amorphous Titanium-Oxide Supercapacitors. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.
- GAO, T.; FJELLVAG, H.; NORBY, P. Crystal Structures Of Titanate Nanotubes: A Raman Scattering Study. **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1423-1432, 2009a.
- GAO, T.; FJELLVAG, H.; NORBY, P. Protonic Titanate Derived From $Cs_xTi_{2-x/2}Mg_{x/2}O_4$ ($x=0.7$) With Lepidocrocite- Type Layered Structure. **Journal of Materials Chemistry**, V. 19, N. 6, P. 787-794, 2009b.
- GALICHET, A. et al. Ftir Spectroscopic Analysis Of *Saccharomyces Cerevisiae* Cell Walls: Study Of An Anomalous Strain Exhibiting A Pink-Colored Cell Phenotype. **Fems Microbiology Letters**, v. 197, n. 2, p. 179-186, 2001.
- GOEHRING, N. W.; Grill, S. W. Cell Polarity: Mechanochemical Patterning. **Trends In Cell Biology**, v. 23, n. 2, p. 72-80, 2013.
- GONG, D. et al. Titanium Oxide Nanotube Arrays Prepared By Anodic Oxidation. **Journal Of Materials Research**, V. 16, N. 12, P. 3331-3334, 2001.
- GU, J.; ZHANG, D.; TAN, Y. Metallic Butterfly Wing Scales: Superstructures With High Surface-Enhancement Properties For Optical Applications. **Springer International Publishing**, 2014.
- HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, A.; MEDINA-RAMÍREZ, I. Photocatalytic Semiconductors: Synthesis, Characterization, And Environmental Applications. **Springer International Publishing**, 2014.
- HONG, J. et al. Electronic Structure Of Titanium Oxide Nanotubules. **Chemical Physics Letters**, v. 380, n. 3-4, p. 366-371, 2003.
- HU, S. et al. In-Situ Platinum Plasmon Resonance Effect Prompt Titanium Dioxide Nanocube Photocatalytic Hydrogen Evolution. **Chemistry-An Asian Journal**, v. 14, n. 4, p. 592-596, 2019.
- HULTEEN, J. C., MARTIN, C. R. A General Template-Based Method For The Preparation Of Nanomaterials. **J Mater Chem**, v. 7, 1997.
- HWANG, K.-J. et al. Synthesis And Characterization Of Hollow TiO_2 Fibers Using *Ceiba Pentandra* (L.) Gaertn. (Kapok) As A Natural Template. **Materials Letters**, v. 115, p. 265-267, 2014.

- IDAKIEV, V. et al. Titanium Oxide Nanotubes As Supports Of Nano-Sized Gold Catalysts For Low Temperature Water-Gas Shift Reaction. **Applied Catalysis A-General**, v. 281, n. 1-2, p. 149-155, 2005.
- INOUE, Y. et al. TiO₂ Nanotube, Nanowire, And Rhomboid-Shaped Particle Thin Films Fixed On A Titanium Metal Plate. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 183, n. 1, p. 57-64, 2010.
- KASUGA, T. et al. Formation Of Titanium Oxide Nanotube. **Langmuir**, v. 14, n. 12, P. 3160-3163, 1998.
- KASUGA, T. et al. Titania Nanotubes Prepared By Chemical Processing. **Advanced Materials**, v. 11, n. 15, p. 1307+, 1999.
- KLEINHAMMES, A. et al. Decontamination Of 2-Chloroethyl Ethylsulfide Using Titanate Nanoscrolls. **Chemical Physics Letters**, v. 411, n. 1-3, p. 81-85, 2005.
- KOLL, D. et al. Snapshots Of The Formation Of NaTi₃O₆(OH).2H₂O Nanowires: A Time-Resolved XRD/HRTEM Study. **Zeitschrift Fur Anorganische Und Allgemeine Chemie**, v. 639, n. 14, p. 2521-2526, 2013.
- KORDAS, K. et al. Layered Titanate Nanostructures: Perspectives For Industrial Exploitation. **Translational Materials Research**, v. 2, n. 1, 2015.
- KUKOVECZ, A. et al. Oriented Crystal Growth Model Explains The Formation Of Titania Nanotubes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 38, p. 17781-17783, 2005.
- KUNG, H. H. **Transition Metal Oxides: Surface Chemistry And Catalysis**. Elsevier Science, 1989.
- LEE, J. D. **Química Inorgânica Não Tão Concisa**. 5^a. Ed. Edgard Blucher, 1999.
- LEE, S. H. et al. Metal Oxide Nanoparticles For Advanced Energy Applications. **Thin Solid Films**, v. 517, n. 12, p. 3591-3599, 2009.
- LI, D.; MATHEW, B.; MAO, C. Biotemplated Synthesis Of Hollow Double-Layered Core/Shell Titania/Silica Nanotubes Under Ambient Conditions. **Small**, v. 8, n. 23, p. 3691-3697, 2012.
- LI, L. D. et al. Sub-10 Nm Rutile Titanium Dioxide Nanoparticles For Efficient Visible-Light-Driven Photocatalytic Hydrogen Production. **Nature Communications**, v. 6, 2015.
- LI, R.; BOWERMAN, B. Symmetry Breaking In Biology. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 2, n. 3, 2010.
- LIN, C. H. et al. The synthesis of sulfated titanium oxide nanotubes. **Catalysis Letters**, v. 80, n. 3-4, p. 153-159, 2002.

- LIVAGE, J. Vanadium Pentoxide Gels. **Chemistry of Materials**, v. 3, n. 4, p. 578-593, 1991.
- M, F.-G.; JA, R. **Metal Oxide Nanoparticles**. Encyclopedia Of Inorganic And Bioinorganic Chemistry. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd. 2011.
- MA, R. Z.; BANDO, Y.; SASAKI, T. Nanotubes Of Lepidocrocite Titanates. **Chemical Physics Letters**, v. 380, n. 5-6, p. 577-582, 2003.
- MA, R. Z.; BANDO, Y.; SASAKI, T. Directly Rolling Nanosheets Into Nanotubes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 7, p. 2115-2119, 2004.
- MA, R. Z. et al. Structural Features Of Titanate Nanotubes/Nanobelts Revealed By Raman, X-Ray Absorption Fine Structure And Electron Diffraction Characterizations. **Journal Of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 13, p. 6210-6214, 2005.
- MAAZA, M. et al. Functional Nanostructured Oxides. **Vacuum**, v. 114, p. 172-187, 2015.
- MAHMOUD, W. M. M.; RASTOGI, T.; KUMMERER, K. Application Of Titanium Dioxide Nanoparticles As A Photocatalyst For The Removal Of Micropollutants Such As Pharmaceuticals From Water. **Current Opinion In Green And Sustainable Chemistry**, v. 6, p. 1-10, 2017.
- MASAKI, N. et al. Characterization Of A New Potassium Titanate, $\text{KTiO}_2(\text{OH})$ Synthesized Via Hydrothermal Method. **Chemistry of Materials**, n. 14, n. 1, p. 419-424, 2002.
- MENG, X. D. et al. Preparation And Characterization Of Sodium Titanate Nanowires From Brookite Nanocrystallites. **Materials Research Bulletin**, v. 39, n. 14-15, p. 2163-2170, 2004.
- MOMANY, M. Polarity In Filamentous Fungi: Establishment, Maintenance And New Axes. **Current Opinion In Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 580-585, 2002.
- MORGADO, E. et al. A Study On The Structure And Thermal Stability Of Titanate Nanotubes As A Function Of Sodium Content. **Solid State Sciences**, v. 8, n. 8, p. 888-900, 2006.
- MORGAN, D. L. et al. Implications Of Precursor Chemistry On The Alkaline Hydrothermal Synthesis Of Titania/Titanate Nanostructures. **Journal Of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 1, p. 101-110, 2010.
- MORGAN, D. L. et al. Alkaline Hydrothermal Kinetics In Titanate Nanostructure Formation. **Journal Of Materials Science**, v. 46, n. 2, p. 548-557, 2011.

- MUMM, F. et al. A Bio-Originated Porous Template For The Fabrication Of Very Long, Inorganic Nanotubes And Nanowires. **Bioinspiration & Biomimetics**, v. 5, n. 2, 2010.
- NAKAHIRA, A. et al. Synthesis Of Nanotube From A Layered $H_2Ti_4O_9$ Center Dot H_2O In A Hydrothermal Treatment Using Various Titania Sources. **Journal of Materials Science**, v. 39, n. 13, p. 4239-4245, 2004.
- NIEDERBERGER, M.; PINNA, N. **Metal Oxide Nanoparticles In Organic Solvents: Synthesis, Formation, Assembly And Application**. Springer London, 2009.
- NOSHEEN, S.; GALASSO, F. S.; SUIB, S. L. Role Of Ti-O Bonds In Phase Transitions Of TiO_2 . **Langmuir**, v. 25, n. 13, p. 7623-7630, 2009.
- NOWOTNY, J. Oxide Semiconductors For Solar Energy Conversion: Titanium Dioxide. **Crc Press**, 2016.
- ORTIZ, G. F. et al. Alternative Li-Ion Battery Electrode Based On Self-Organized Titania Nanotubes. **Chemistry of Materials**, v. 21, n. 1, p. 63-67, 2009.
- PAL, M. et al. Size-Controlled Synthesis Of Spherical TiO_2 Nanoparticles: Morphology, Crystallization, And Phase Transition. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 1, p. 96-102, 2007.
- PAYNE, E. K. et al. Sacrificial Biological Templates For The Formation Of Nanostructured Metallic Microshells. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 44, n. 32, p. 5064-5067, 2005.
- REHMAN, A. et al. Living Fungal Hyphae-Templated Porous Gold Microwires Using Nanoparticles As Building Blocks. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 12, p. 6747-6754, 2011.
- RIQUELME, M. Tip Growth In Filamentous Fungi: A Road Trip To The Apex. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 587-609, 2013.
- RODRIGUEZ, J. A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. **Synthesis, Properties, And Applications Of Oxide Nanomaterials**. Wiley, 2007.
- RODUNER, E. Size Matters: Why Nanomaterials Are Different. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 7, p. 583-592, 2006.
- RODUNER, E.; CHEMISTRY, R. S. O. Nanoscopic Materials: Size-Dependent Phenomena. **Springer Verlag Ny**, 2006.
- SAKAI, N. et al. Electronic Band Structure Of Titania Semiconductor Nanosheets Revealed By Electrochemical And Photoelectrochemical Studies. **Journal of The American Chemical Society**, v. 126, n. 18, p. 5851-5858, 2004.

- SANDOVAL, A.; HERNANDEZ-VENTURA, C.; KLIMOVA, T. E. Titanate Nanotubes For Removal Of Methylene Blue Dye By Combined Adsorption And Photocatalysis. **Fuel**, v. 198, p. 22-30, 2017.
- SAPONJIC, Z. V. et al. Shaping Nanometer-Scale Architecture Through Surface Chemistry. **Advanced Materials**, v. 17, n. 8, p. 965-+, 2005.
- SELVAKUMAR, R. Et Al. Recent Advances In The Synthesis Of Inorganic Nano/Microstructures Using Microbial Biotemplates And Their Applications. **Rsc Advances**, v. 4, n. 94, p. 52156-52169, 2014.
- SHAHID, M. et al. Synthesis And Characterisation Of Potassium Polytitanate For Photocatalytic Degradation Of Crystal Violet. **Journal Of Environmental Sciences-China**, v. 26, n. 11, p. 2348-2354, 2014.
- SHIM, H. W. et al. Highly Reversible Lithium Storage In Bacillus Subtilis-Directed Porous Co₃O₄ Nanostructures. **Acs Nano**, v. 5, n. 1, p. 443-449, 2011.
- SHIRPOUR, M.; Cabana, J.; Doeff, M. New Materials Based On A Layered Sodium Titanate For Dual Electrochemical Na And Li Intercalation Systems. **Energy & Environmental Science**, v. 6, n. 8, p. 2538-2547, 2013.
- SILVA, F. et al. Polarized Raman, Ftir, And Dft Study Of Na₂Ti₃O₇ Microcrystals. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 49, n. 3, p. 538-548, 2018.
- SOTIROPOULOU, S. et al. Biotemplated Nanostructured Materials. **Chemistry of Materials**, v. 20, n. 3, p. 821-834, 2008.
- SOUZA, J. S. et al. Visible-Light Photocatalytic Activity Of NH₄NO₃ Ion-Exchanged Nitrogen-Doped Titanate And TiO₂ Nanotubes. **Journal Of Molecular Catalysis A-Chemical**, v. 394, p. 48-56, 2014.
- SOUZA, J. S. et al. Dye Degradation Mechanisms Using Nitrogen Doped And Copper(Ii) Phthalocyanine Tetracarboxylate Sensitized Titanate And TiO₂ Nanotubes. **Journal Of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 21, p. 11561-11571, 2016.
- SUN, X. M.; LI, Y. D. Synthesis And Characterization Of Ion-Exchangeable Titanate Nanotubes. **Chemistry-A European Journal**, v. 9, n. 10, p. 2229-2238, 2003. Suresh, S. **Semiconductor Nanomaterials, Methods And Applications: A Review**. Chembarambakkam, Chennai: *Nanoscience And Nanotechnology*, 2013.
- SUZUKI, Y.; YOSHIKAWA, S. Synthesis And Thermal Analyses Of TiO₂-Derived Nanotubes Prepared By The Hydrothermal Method. **Journal of Materials Research**, v. 19, n. 4, p. 982-985, 2004.
- TANG, Y. X. et al. Mechanical Force-Driven Growth Of Elongated Bending TiO₂-Based Nanotubular Materials For Ultrafast Rechargeable Lithium Ion Batteries. **Advanced Materials**, v. 26, n. 35, p. 6111-+, 2014.

- TOKUDOME, H.; MIYAUCHI, M. Electrochromism Of Titanate-Based Nanotubes. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 44, n. 13, p. 1974-1977, 2005.
- TSAI, C. C.; TENG, H. Nanotube Formation From A Sodium Titanate Powder Via Low-Temperature Acid Treatment. **Langmuir**, v. 24, n. 7, p. 3434-3438, 2008.
- WANG, B. L. et al. Synthesis And Characterization Of $K_2Ti_6O_{13}$ Nanowires. **Chemical Physics Letters**, v. 376, n. 5-6, p. 726-731, 2003.
- WANG, B. X.; SHI, Y.; XUE, D. F. Large Aspect Ratio Titanate Nanowire Prepared By Monodispersed Titania Submicron Sphere Via Simple Wet-Chemical Reactions. **Journal Of Solid State Chemistry**, v. 180, n. 3, p. 1028-1037, 2007.
- WANG, W. Z. et al. A Study On The Growth And Structure Of Titania Nanotubes. **Journal Of Materials Research**, v. 19, n. 2, p. 417-422, 2004.
- WANG, Y. Q. et al. Microstructure And Formation Mechanism Of Titanium Dioxide Nanotubes. **Chemical Physics Letters**, v. 365, n. 5-6, p. 427-431, 2002.
- WONG, H. P. et al. Synthesis And Characterization Of Polypyrrole Vanadium Pentoxide Nanocomposite Aerogels. **Journal of Materials Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 1019-1027, 1998.
- WOOD, S. A. Experimental-Determination Of The Solubility Of $WO_{3(s)}$ And The Thermodynamic Properties Of $H_2WO_4(Aq)$ In The Range 300-600-Degrees-C At 1-Kbar - Calculation Of Scheelite Solubility. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 56, n. 5, p. 1827-1836, 1992.
- WU, D. et al. Sequence Of Events For The Formation Of Titanate Nanotubes, Nanofibers, Nanowires, And Nanobelts. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 2, p. 547-553, 2006.
- WU, H. B. et al. Nanostructured Metal Oxide-Based Materials As Advanced Anodes For Lithium-Ion Batteries. **Nanoscale**, v. 4, n. 8, p. 2526-2542, 2012.
- XIE, Y. D. et al. Review Of Research On Template Methods In Preparation Of Nanomaterials. **Journal of Nanomaterials**, 2016.
- XIONG, H. et al. Amorphous TiO_2 Nanotube Anode For Rechargeable Sodium Ion Batteries. **Journal Of Physical Chemistry Letters**, v. 2, n. 20, p. 2560-2565, 2011.
- XU, M. et al. Novel Fungus-Titanate Bio-Nanocomposites As High Performance Adsorbents For The Efficient Removal Of Radioactive Ions From Wastewater. **Nanoscale**, v. 6, n. 2, p. 722-725, 2014.
- YAN, C. Y. et al. Photocatalytic Degradation Of Rhodamine B By Microwave-Assisted Hydrothermal Synthesized N-Doped Titanate Nanotubes. **Journal of Environmental Sciences-China**, v. 26, n. 7, p. 1505-1512, 2014.

- YANG, H. G. et al. Solvothermal Synthesis And Photoreactivity Of Anatase TiO_2 Nanosheets With Dominant {001} Facets. **Journal of The American Chemical Society**, v. 131, n. 11, p. 4078-4083, 2009.
- YANG, J. J. et al. Study On Composition, Structure And Formation Process Of Nanotube $\text{Na}_2\text{Ti}_2\text{O}_4(\text{OH})_2$. **Dalton Transactions**, n. 20, p. 3898-3901, 2003.
- YAO, B. D. et al. Formation Mechanism Of TiO_2 Nanotubes. **Applied Physics Letters**, v. 82, n. 2, p. 281-283, 2003.
- YE, T. et al. Electrodeposition-Based Electrochromic Devices With Reversible Three-State Optical Transformation By Using Titanium Dioxide Nanoparticle Modified Fto Electrode. **Rsc Advances**, v. 6, n. 37, p. 30769-30775, 2016.
- YOSHIDA, R.; SUZUKI, Y.; YOSHIKAWA, S. Effects Of Synthetic Conditions And Heat-Treatment On The Structure Of Partially Ion-Exchanged Titanate Nanotubes. **Materials Chemistry And Physics**, v. 91, n. 2-3, p. 409-416, 2005.
- YU, Q.; SASAKI, K.; HIRAJIMA, T. Bio-Templated Synthesis Of Lithium Manganese Oxide Microtubes And Their Application In Li^+ Recovery. **Journal of Hazardous Materials**, v. 262, p. 38-47, 2013.
- YUAN, Z. Y.; SU, B. L. Titanium Oxide Nanotubes, Nanofibers And Nanowires. **Colloids And Surfaces A-Physicochemical And Engineering Aspects**, v. 241, n. 1-3, p. 173-183, 2004.
- ZAN, G. T.; WU, Q. S. Biomimetic And Bioinspired Synthesis Of Nanomaterials/Nanostructures. **Advanced Materials**, v. 28, n. 11, p. 2099-2147, 2016.
- ZHANG, D. et al. Bio-Inspired Functional Materials Templated From Nature Materials. **Kona Powder And Particle Journal**, n. 28, p. 116-130, 2010.
- ZHANG, H. Z.; BANFIELD, J. F. Understanding Polymorphic Phase Transformation Behavior During Growth Of Nanocrystalline Aggregates: Insights From TiO_2 . **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 15, p. 3481-3487, 2000.
- ZHANG, Q. et al. Removing Structural Water From Sodium Titanate Anodes Towards Barrier-Free Ion Diffusion For Sodium Ion Batteries. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 5, n. 35, p. 18691-18697, 2017.
- ZHANG, Q. H.; Gao, L. Preparation Of Oxide Nanocrystals With Tunable Morphologies By The Moderate Hydrothermal Method: Insights From Rutile TiO_2 . **Langmuir**, v. 19, n. 3, p. 967-971, 2003.
- ZHANG, Y. Y. et al. Titanate And Titania Nanostructured Materials For Environmental And Energy Applications: A Review. **Rsc Advances**, v. 5, n. 97, p. 79479-79510, 2015.

ZHANG, Y. X. et al. Hydrothermal Synthesis And Photoluminescence Of TiO₂ Nanowires. **Chemical Physics Letters**, v. 365, n. 3-4, p. 300-304, 2002.

ZHOU, H.; FAN, T. X.; ZHANG, D. Hydrothermal Synthesis Of ZnO Hollow Spheres Using Spherobacterium As Biotemplates. **Microporous and Mesoporous Materials**, V. 100, N. 1-3, P. 322-327, 2007.

ZHOU, M. Q. et al. Titanium Dioxide Nanotube Films For Electrochemical Supercapacitors: Biocompatibility And Operation In An Electrolyte Based On A Physiological Fluid. **Journal of the Electrochemical Society**, V. 162, N. 5, P. A5065-A5069, 2015.

APÊNDICE I

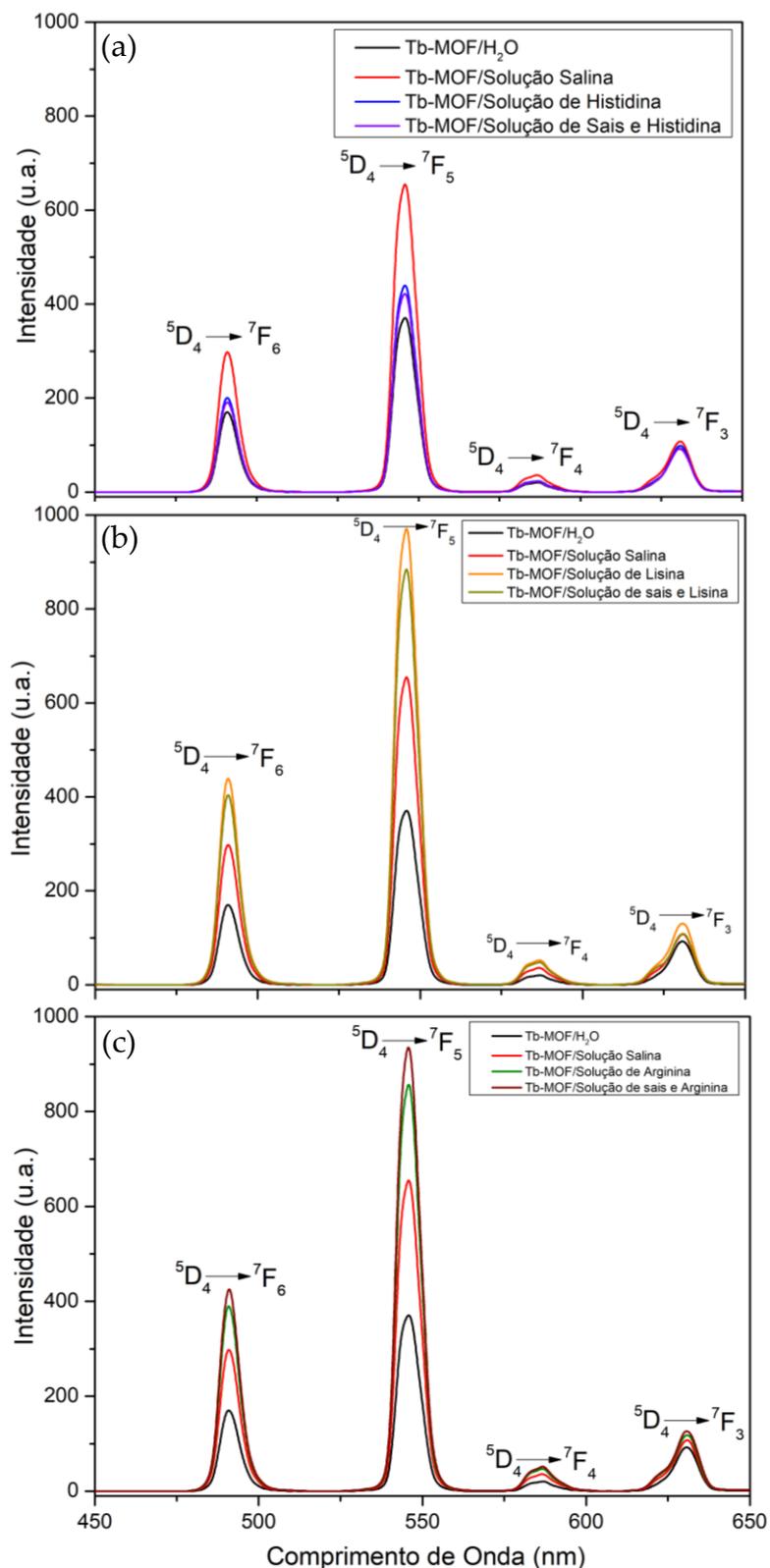


Figura 1 – Espectros de emissão das amostras de Tb-MOF em água, em uma solução salina, em solução de aminoácidos e em uma solução de sais e aminoácidos. (a) espectro contendo o aminoácido histidina, (b) espectro contendo o aminoácido lisina e (c) o espectro contendo o aminoácido arginina.

APÊNDICE II

Teste T, para o intervalo de confiança de 95%. Para ter diferença entre as médias $P(T \leq t)$ bicaudal, em que P é o nível de significância, T é o valor medido através da análise das amostras e t é o valor tabelado. O P de referência é 0,05 ou 5%, logo os valores não apresentarão diferença significativa quando os valores das medidas de $P(T \leq t)$ bicaudal forem maiores que 0,05.

Tabela 01- Diâmetro médio da colônia fúngica em (cm) após 216 h de crescimento em Placas de dextrose e ágar cultivados na faixa de temperatura de 25-28°C.

Strains	Wild-type	Tb-MOF	Eu-MOF
P.M	8.64± 0.04	8.83± 0.04	8.66± 0.08
TC	8.69± 0.03	8.74± 0.00	8.66± 0.07
A.N	6.84± 0.22	6.89± 0.15	7.25 ± 0.38

Teste-t: duas amostras em par para médias

	<i>P.m-Nativo</i>	<i>P.m-Tb</i>
Média	8.64	8.83
Variância	0.0007	0.0016
Observações	3	3
Correlação de Pearson	0.755928946	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	2	
Stat t	-12.43841974	
P(T<=t) uni-caudal	0.003200764	
t crítico uni-caudal	2.91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0.006401529	Existe diferença significativa entre as medidas
t crítico bi-caudal	4.30265273	

	<i>P.m-Nativo</i>	<i>P.m-Eu</i>
Média	8.64	8.656666667
Variância	0.0007	0.006633333
Observações	3	3
Correlação de Pearson	0.742514693	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	2	
Stat t	0.449013255	
P(T<=t) uni-caudal	0.348693117	
t crítico uni-caudal	2.91998558	
	Não existe diferença significativa entre as medidas	

P(T<=t) bi-caudal	0.697386234
t crítico bi-caudal	4.30265273

	<i>Trich-Wild</i>	<i>Trich-Tb</i>
Média	8.69	8.74
Variância	0.000677083	2.08333E-06
Observações	3	3
Correlação de Pearson	0.970725343	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	2	
Stat t	-3.86898852	
P(T<=t) uni-caudal	0.030388853	
t crítico uni-caudal	2.91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0.060777706	Não existe diferença significativa entre as medidas
t crítico bi-caudal	4.30265273	

	<i>Trich-Nativo</i>	<i>Trich-Eu</i>
Média	8.69	8.66
Variância	0.000677083	0.00429375
Observações	3	3
Correlação de Pearson	-0.870570992	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	2	
Stat t	0.550756261	
P(T<=t) uni-caudal	0.31855244	
t crítico uni-caudal	2.91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0.637104879	Não existe diferença significativa entre as medidas
t crítico bi-caudal	4.30265273	

	<i>AN-Nativo</i>	<i>A.N-Tb</i>
Média	6.84	6.89
Variância	0.04974375	0.02139375
Observações	3	3
Correlação de Pearson	0.252320812	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	2	
Stat t	-0.388888889	
P(T<=t) uni-caudal	0.367428047	
t crítico uni-caudal	2.91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0.734856093	Não há diferença significativa entre as amostras
t crítico bi-caudal	4.30265273	

	<i>A-N -Nativo</i>	<i>AN-Eu</i>
Média	6.84	7.25
Variância	0.04974375	0.142758333
Observações	3	3
Correlação de Pearson	-0.496547275	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	2	
Stat t	-1.378730716	
P(T<=t) uni-caudal	0.15096648	
t crítico uni-caudal	2.91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0.301932961	Não há diferença significativa entre as amostras
t crítico bi-caudal		4.30265273

	<i>T.C-Nativo - BDA</i>	<i>T.C-Tb – BDA</i>
Média	8.67	8.46
Variância	0.000852083	0.150527083
Observações	3	3
Correlação de Pearson	-0.863206467	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	2	
Stat t	0.900716986	
P(T<=t) uni-caudal	0.231400346	
t crítico uni-caudal	2.91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0.462800692	Não há diferença significativa entre as amostras
t crítico bi-caudal	4.30265273	

	<i>T.C-Nativo -BDA</i>	<i>T.C-Eu – BDA</i>
Média	8.67	8.70
Variância	0.000852083	0.0084
Observações	3	3
Correlação de Pearson	0.48591765	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	2	
Stat t	-0.442425907	
P(T<=t) uni-caudal	0.350713674	
t crítico uni-caudal	2.91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0.701427348	Não há diferença significativa entre as amostras
t crítico bi-caudal	4.30265273	

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Photoluminescent organisms: how to make fungi glow through biointegration with lanthanide metal-organic frameworks

Received: 26 January 2018

Accepted: 2 May 2019

Published online: 13 May 2019

Jeferson Rosário¹, Leonis L. da Luz², Regina Geris¹, Jéssica G. S. Ramalho³, Antônio F. da Silva³, Severino Alves Júnior² & Marcos Malta¹

We show that filamentous fungi can emit green or red light after the accumulation of particulate lanthanide metal-organic frameworks over the cell wall. These new biohybrids present photoluminescence properties that are unaffected by the components of the cell wall. In addition, the fungal cells internalise lanthanide metal-organic framework particles, storing them into organelles, thereby making these materials promising for applications in living imaging studies.

Bioluminescence is a fascinating characteristic that some organisms present in emitting visible light through a biochemical reaction¹. Typically, biological systems produce light through the oxidation of light-emitting substrates, known as luciferins, in conjunction with enzymes, known as luciferases². Recently, Purto and co-workers elucidated the chemical mechanism of bioluminescence in fungal species through the identification of the luciferin, 3-hydroxyhispidin³. Furthermore, it has been proposed that the bioluminescence of some fungal species plays an important role in biological functions. For instance, Oliveira and co-workers have found that light emission by *Neonothopanus gardneri* mushrooms obeys a temperature compensated circadian rhythm⁴. Consequently, as the fungus maximises light emission at night, it can attract several types of insects that are responsible for enhancing fungal propagation through spore dispersal. Nevertheless, it is relatively rare to find fungal species with a luminous ability. From Hawksworth's estimation of 1.5 million fungi species on Earth, there are only 71 species (less than 0.005%) that have been described as luminescent^{5,6}.

Converting non-luminescent microorganisms into glowing ones could provide them with additional functions beyond their original purposes, therefore acting as a huge biotechnological potential that can be applied in areas, such as photo- and biocatalysis and sensing. In addition, luminescent microorganisms hold great promise for applications in *in vivo* imaging that improve the observation of fungal morphology and structure, assisting in the elucidation of hyphae physiology. A promising strategy to produce luminous microorganisms lies in the integration of fungal cells with photoluminescent materials, such as fluorescent conjugated polymers or semiconducting quantum dots. For instance, Wang's group developed luminescent conducting polymers that are self-assembled on filamentous fungi through electrostatic/hydrophobic interactions⁷. The authors found that water-soluble polythiophene backbones can only be accumulated on the fungal surface, yielding luminescent cells. Alternatively, Rispail and co-workers observed that hydrophilic CdSe/ZnS quantum dots functionalised with 3-mercaptopropanoic acid are internalised by *Fusarium oxysporium* fungus, which can be used for the rapid and sensitive detection of this phytopathogen⁸.

At present, there is considerable interest in the artificial introduction of abiotic materials in the structure of living organisms to form biohybrid entities^{9–15}. The expectation is that these biohybrids can enable new or have improved properties when compared to the native counterparts. For instance, Giraldo and co-workers reported that the integration of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) within plant chloroplasts led to the rise of the solar energy conversion for both *in vivo* (leaves) and *ex vivo* ones (extracted plant chloroplasts)¹⁶. The authors suggested that an enhancement in the photosynthetic activity of chloroplasts may occur

¹Institute of Chemistry, Federal University of Bahia, Campus Ondina, Salvador, BA, Brazil. ²Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil. ³Institute of Physics, Federal University of Bahia, Campus Ondina, Salvador, BA, Brazil. Jeferson Rosário and Leonis L. da Luz contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.A.J. (email: juniorbstr@gmail.com) or M.M. (email: marcosmalta@ufba.br)

due to the change in absorption profile by SWCNTs, resulting in light capture in the range of ultraviolet, green and near-infrared spectra. In another example, the integration of the electroactive conducting polymer poly (3,4-ethylenedioxythiophene) by the vascular network of *Rosa floribunda* (garden rose), reported by Stavrinidou and co-workers, provided a new strategy for developing plants with electronic functionalities, such as transistor modulation, digital logic function and electronic conductivity¹².

Among a myriad of functional materials suitable for biohybrid production, metal-organic frameworks (MOFs) are rapidly emerging as an exceptional class of porous materials. MOFs can be defined as a coordination network built by a large number of metal ions, metal-containing clusters and organic ligands^{17–19}. Compared to other porous materials, such as zeolites, active carbon or mesoporous silica, MOFs exhibit better chemical flexibility due to the diverse functional groups of their frameworks^{20–23}. These characteristics make MOFs one of the most promising materials for potential applications beyond the traditional areas of porous materials, such as molecular storage, separation and catalysis^{19,20,24–27}. Luminescent lanthanide metal-organic frameworks (Ln-MOFs, where Ln = Eu³⁺, Tb³⁺, Gd³⁺ or Nd³⁺) were successfully used as a platform for the production of white-light emitting materials²⁸. In addition, Ln-MOFs have been printed as photoluminescent inks onto plastic and paper foils to produce invisible security labelling/encoding²⁹. Of particular interest, MOF-eukaryotic cell (yeasts) biohybrids have been described as promising biosystems because they can survive in harsh conditions when compared to native cells^{30,31}. Initially, the production of a MOF exoskeleton over single cells occurs through the concentration of MOF precursors at the cell wall. Subsequently, crystallisation takes place, recovering the whole cell with an artificial carapace. For instance, Liang *et al.* reported the preparation of a crystalline MOF protective coating for living cells³⁰. The main characteristic of this biosystem is that the MOF exoskeleton controls the molecular trafficking to the cell cytoplasm and prevents cell multiplication by inducing an artificial hibernation state. Then, after removal of the MOF shell, the cells can recover full functionality.

Here, we report our findings of the ability of common filamentous fungi to accumulate Ln-MOFs over their cell walls, thereby forming new classes of luminescent biohybrid cells. When microorganisms are cultivated in solutions containing a carbon source and discrete particulate Ln-MOFs, they deposit these non-biological objects over mycelia during the physiological process, forming a robust layer on the cellular wall of the fungi. Moreover, we have also observed the preferential accumulation of Ln-MOFs on fungal organelles, demonstrating their ability for the internalisation of luminescent particles. The implications of these observations could be very relevant to various areas of chemistry, physics and biology. First, we demonstrate that the integration of Ln-MOFs onto fungal mycelia is a quite general process, producing microorganisms that emit visible light when excited with ultraviolet radiation (i.e. photoluminescence). Second, the utilisation of fungi as scaffolds to reach hybrid structures with complex morphologies presents clear advantages in the development of new materials, such as size uniformity, broad bioavailability, renewability, low costs and so on. Finally, the modification of the cell surface with Ln-MOFs also led to an uptake of luminescent particles to the cytoplasmic region, making this strategy potentially useful for living imaging applications in filamentous fungi.

Results and Discussion

Filamentous fungi are morphologically complex microorganisms, in which the primary structure of growth consists of a tubular filament known as a hypha. Different from single-cell organisms, such as bacteria and yeasts, filamentous fungi develop through the elongation of the hypha at the tip, to explore different regions in the search for nutrients. Currently, the only method for the deposition of artificial materials on filamentous fungi consists of the cultivation of fragments of mycelia or fungal spores in the presence of particulate nanomaterials. That is, the presence of pre-formed nanomaterials dispersed in a solution is a *sine qua non* condition to form an exoskeleton over the tubular cells. In a typical experiment, fungal spores of *Phialomyces macrosporus*, *Trichoderma* sp. or *Aspergillus niger* were inoculated in a sterile solution containing glucose and a previously sonicated Ln-MOF dispersion. Tb- and Eu-MOFs were prepared using mellitic acid as the organic linker and their corresponding metal salt, Ln(NO₃)₃, as discussed in the ESI. Mellitic acid (1,2,3,4,5,6-benzenhexacarboxylic acid) was chosen in our experiments to prepare the Ln-MOFs, in order to facilitate the interaction with the fungal wall through intermolecular hydrogen bonds. Fig. S1 depicts the coordination environment of mellitate and Ln³⁺ ions in the Ln-MOFs and their structure along the b axis. After sonication, an aqueous dispersion containing particulate Ln-MOFs had a measured size varying from 70 to 900 nm (ESI, Figs S2 and S3) and a negatively charged surface estimated from the zeta potential equal to -30 mV. Fungi were cultured for two weeks in the dark in ambient conditions. After growth of the microorganisms, fungal mycelia decorated with Ln-MOFs were copiously rinsed with deionised water and divided in two sets for analysis. In the first set of samples, fungal mycelia were dehydrated with ethanol and dried using critical point drying for further physicochemical characterisation. In the second set, mycelial tissue was stored in deionised water at 4 °C for fluorescence microscopy analysis.

Figure 1 shows representative scanning electron microscopy (SEM) micrographs highlighting the morphological differences between fungal hyphae cultivated in the absence of and exposed to a nutritive solution containing Tb-MOF particles. Native *A. niger* hyphae (Fig. 1(a)) present a tubular morphology with a homogenous smooth surface. Alternatively, the presence of any particulate material in solution leads to drastic changes in the microorganism ultrastructure, with a controlled overall deposition of block-like Ln-MOFs on the hyphae wall (Fig. 1(b,c)). The SEM images reveal that particulate Ln-MOFs are accumulated uniformly along the whole tubular cell, with no favoured sites for deposition of the biological material. Higher magnification images (ESI, Fig. S4) show that Ln-MOFs are found to be entrapped in a biopolymer matrix, which firmly binds these materials over the fungal surface.

From a chemical perspective, the mechanism of deposition of abiotic particles over filamentous fungi is unknown and is still under debate. In principle, there is a clear link between fungal growth and the deposition of nanoparticles. The best description of the integration of nanomaterial on the cell wall structure is the nutrition driven deposition presented by Sugunan and co-workers³². In this article, the authors cultured fungi species in

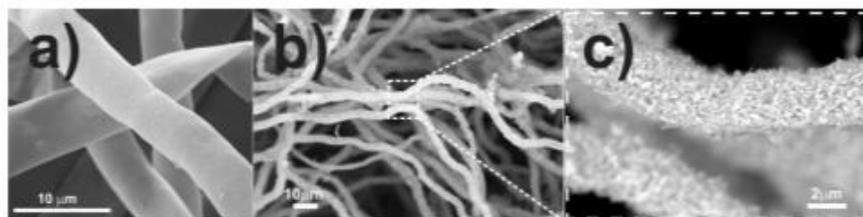


Figure 1. SEM micrographs of native *A. niger* (a) and the *A. niger*/Tb-MOF biohybrid (b, c).

colloidal solutions containing glutamate-stabilised gold nanoparticles. According to the experiments, the hyphal growth coincides with the deposition of particles around the fungal cell. It was suggested that the fungal growth consumes glutamate ions (which serve as capping agents for nanoparticles and a carbon source for the microorganisms), following the depletion of these ions in the vicinity of fungal hyphae. Thus, the decline of glutamate ions due to the fungal metabolism could cause destabilisation of the charge arrangement on the nanoparticle surface, inducing the agglomeration and coating of particles over hypha. Regarding the interaction microorganism/nanomaterial, we later proposed a scenario based on the cultivation of fungi in solutions of citrate-stabilised gold nanoparticles³³. Transmission electron microscopy studies of *P. macrosporus*/Au-NP biohybrids revealed that the metal nanoparticles remain isolated from each other, probably stabilised by steric effects of major components of the fungal cell. Therefore, the deposition of nanomaterials may be attributed to the substitution of the weak interaction of citrate-NPs in solution with a stronger bind between functional groups of the cell wall and the nanoparticles. In addition, other aspects should be considered to explain the deposition of nanomaterials onto fungal hyphae. For instance, Zhu *et al.* emphasised the importance of extracellular polymeric substances (EPS) as being beneficial to the process of deposition of nanoparticles at the fungal cell wall³⁴. EPS are biopolymers constituted by proteins and carbohydrates secreted by the microorganisms, which perform particularly important biological processes as assistance to the colonisation of new niches, cellular adhesion in living and inanimate substrates, as well as function as a protective layer around the cell^{35,36}. Thus, it is plausible to suppose that EPS secreted by filamentous fungi could functionalise the surface of the suspended solids in solution, enriching its surface with carbonyl and hydroxyl groups, facilitating the adherence of nanoparticles on the fungal wall.

A complementary physicochemical characterisation was carried out to confirm the integration of Ln-MOFs on microorganisms through energy-dispersive X-ray (EDX) analysis (ESI, Fig. S5) and X-ray diffraction (XRD). Moreover, photoluminescence was used to measure the eventual interaction and/or decomposition of the Ln-MOFs near to the interface between fungal hyphae and Tb- and Eu-MOFs, since the photoluminescence of trivalent lanthanide ions is extremely dependent on the symmetry of the first coordination sphere^{37,38}. The XRD patterns of the *A. niger*/Ln-MOF, *Trichoderma sp.*/Ln-MOF and *P. macrosporus*/Ln-MOF biohybrids indicate the presence of more intense diffraction peaks indexed to Ln-MOF structures at 13.4° (hkl; 020), 14.5° (101), 19.1° (12-1), 20.0° (121) and 23.0° (022) (Fig. 2(c-f))^{28,29,39}.

Photoluminescence measurements of the critical point dried biohybrids were carried out at room temperature. Figure 2(a,d) show the emission spectra obtained upon excitation at 312 nm ($\pi^* \leftarrow \pi$) of the mellitate ligand for Ln-MOFs and fungi/Ln-MOF biohybrids. These emission spectra display narrow bands characteristic of Eu^{3+} (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_j$; $J = 0, 1, 2, 3$ and 4) and Tb^{3+} (${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_j$; $J = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ and 6) ions for Eu-MOFs and fungi/Eu-MOFs, and Tb-MOFs and fungi/Tb-MOFs, respectively. In both cases, the suppression of ligand emission is suggestive of the effective energy transfer from ligand absorption to f levels of Eu^{3+} and Tb^{3+} ions. This behaviour leads to a photoluminescence colour and respective chromaticity coordinates (x; y) in the International de l'Éclairage (CIE) diagram in the red for Eu-MOF (0.680, 0.319), *A. niger*/Eu-MOFs (0.680, 0.319), *Trichoderma sp.*/Eu-MOFs (0.681, 0.318) and *P. macrosporus*/Eu-MOFs (0.681, 0.318); and green for the Tb-MOFs (0.303, 0.589), *A. niger*/Tb-MOFs (0.300, 0.588), *Trichoderma sp.*/Tb-MOFs (0.318, 0.591) and *P. macrosporus*/Tb-MOFs (0.307, 0.590), as illustrated by the CIE chromaticity diagrams in Fig. 2(b,e)⁴⁰.

The relative intensities and the number of Stark components are dependent upon the extent to which the $(2J + 1)$ degeneracy is removed by the symmetry of the first coordination sphere. Thus, they can be used as a probe of symmetry sites in europium-based compounds^{37,38}. Thereby, the same spectral profiles of the emission and excitation spectra (Fig. 2(a,b), ESI Figs S6 and S7) between the as-prepared Ln-MOFs are consistent with no structural alterations or significant defects caused by interactions between Ln-MOF nanocrystals and the components of the cell wall. In particular, no substantial changes have been observed in the lifetime of the excited state (τ), quantum efficiency (η) and intensity ratio $I({}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2)/I({}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1)$ data of fungi/Eu-MOF derivatives (ESI Table S1, Figs S8–S10). This suggests that cell wall components do not affect the luminescence mechanism of the Ln^{3+} ions in the biohybrids^{37,38}. Additionally, the maintenance of the spectral profile of the excitation for all biohybrids (Figs S6 and S7) corroborates with the hypothesis of the absence of a cooperative interaction between the fungal cell wall and Ln-MOF microcrystals, in the dynamics of the luminescence process involving the electronic states of the mellitate ligand and Ln^{3+} ions^{37,38,40}.

Fluorescent imaging techniques present inherent advantages, such as sensitivity, simplicity and fast response, for studying events at the cellular and subcellular levels. However, traditional organic dye probes, such as green protein fluorescent and small organic dyes, present some limitations, including low photostability, low signal-to-noise ratio, phototoxicity and hydrophobicity⁴¹. Alternatively, inorganic quantum dots require a laborious and time-consuming step of surface functionalisation to become biocompatible⁴². The Ln-MOFs studied

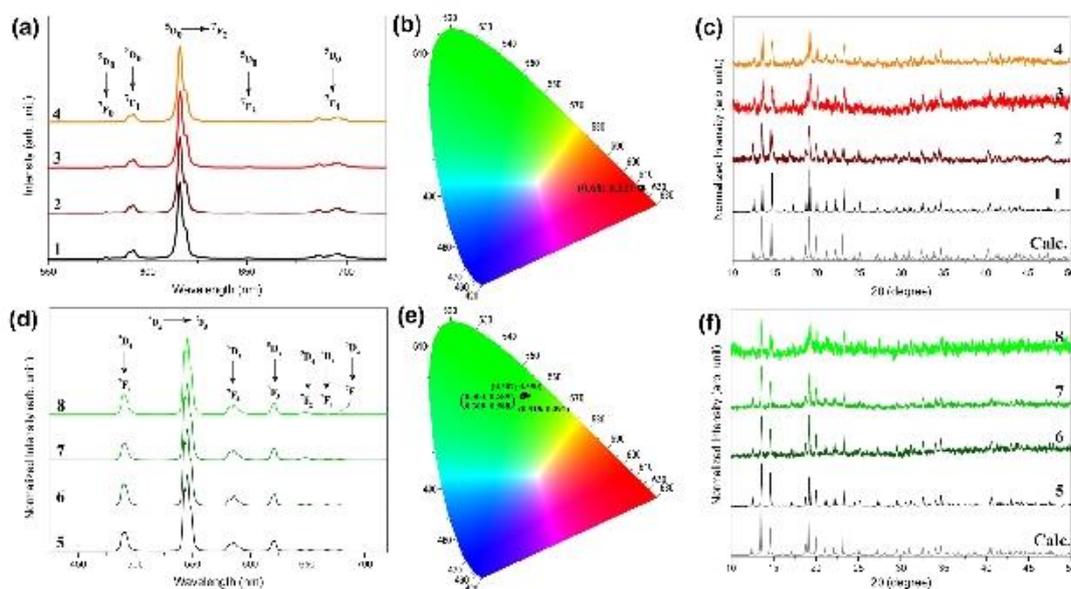


Figure 2. Emission spectra ($\lambda_{\text{Ex}} = 312 \text{ nm}$) and CIE chromaticity diagram containing the photoluminescence colours corresponding to each emission spectra of the Eu-MOF (a,b) and Tb-MOF (d,e) based materials, and experimentally calculated PXRD diffraction patterns (c,f) of Eu-MOF (1), *A. niger*/Eu-MOF (2), *Trichoderma sp.*/Eu-MOF (3), *P. macrosporus*/Eu-MOF (4), Tb-MOF (5), *A. niger*/Tb-MOF (6), *Trichoderma sp.*/Tb-MOF (7) and *P. macrosporus*/Tb-MOF (8).

in this work possess excellent properties that can be useful for *in vivo* fungal images as they do not require any surface modification to be biologically compatible and possess intense photoemission that permits easy discrimination between the target and the background emissions. Biohybrid fungi/Ln-MOFs were examined under a conventional fluorescent microscope to display their luminescent properties. Figure 3 shows representative green and red emissions for *P. macrosporus*/Tb-MOF and Eu-MOF, respectively. In Fig. 3(a,b), luminescence is undoubtedly observable, due to the thick layer of green emitter attached to the fungal surface.

Although both Ln-MOFs present similar emission intensities for dried biohybrids, we observed a low intensity of the red light when analysing living fungi/Eu-MOF investigated under the microscope. This observation results from the efficient non-radiative deactivation of luminescence through coupling between the hydroxyl group of water (O-H strength) and the f electronic levels of the Eu^{3+} ions²³. Therefore, despite the presence of chromophore species deposited on the fungal surface, the photoluminescence signal is quite low for living fungus/Eu-MOFs in aqueous environments.

Considering the ability of filamentous fungi in accumulating different particulate materials over the cell wall^{22–24,43,44}, we also hypothesised whether these microorganisms would be able to internalise luminescent particles and store them in the cytosol or bind them to specific cellular components. Initially, we were intrigued by some results of fluorescent microscopy of the fungi/Eu-MOF, where it was possible to observe bright red spheres located along the hyphae (see Fig. 3(c)). For example, despite the difficulty in observing a luminous signal at the outer surface of the *A. niger*/Eu-MOF hypha (see ESI, Fig. S12), it was relatively easy to observe these bright spheres that followed the tubular structure of the hyphae. We concluded, therefore, that Ln-MOFs could concentrate at organellar lumen in the inner fungal cells, evidencing fluorescence even for Eu-MOF.

By selecting arbitrary regions at the periphery of the fungal biohybrid mycelia, the uptake of Tb-MOF improved the visualisation of spherical and tubular organelles within cells (Fig. 3(d,f)). These experimental findings confirm that Ln-MOFs play a role as photoluminescent probes, which were concentrated, apparently, at the fungal vacuoles of *Trichoderma sp.* biohybrids (see Figs S11–13 for other examples). Vacuoles are large organelles with multiple cellular functions, including reservoir and decontaminating the cytoplasm by sequestering toxic substances⁴⁵. To verify the ability of microorganisms in the internalisation of Ln-MOFs instead of luminescent Tb^{3+} or Eu^{3+} ions, fungal cultures were grown under the same conditions, but by adding $\text{Ln}(\text{NO}_3)_3$ ($\text{Ln} = \text{Eu}$ or Tb) during cultivation. We observed growth inhibition for all species studied in this work, because lanthanides ions are not essential nutrients and, apparently, the $\text{Ln}(\text{NO}_3)_3$ is a poor source of nitrogen for the fungi. The microorganisms cultivated in the presence of Ln^{3+} ions revealed only fungal intrinsic fluorescence (see ESI, Fig. S14 for $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$).

In order to confirm that the fluorescent signal arises from internalised Ln-MOFs stored in the fungal organelles, we then performed additional experiments using confocal scanning laser microscopy (CSLM, Fig. 3(g–j)). Upon excitation at 405 nm, the Tb- and Eu-MOFs showed emission spectra that coincide with the data obtained by using UV light as the excitation source (ESI Fig. S15). Although the steady-state emission of the biohybrids

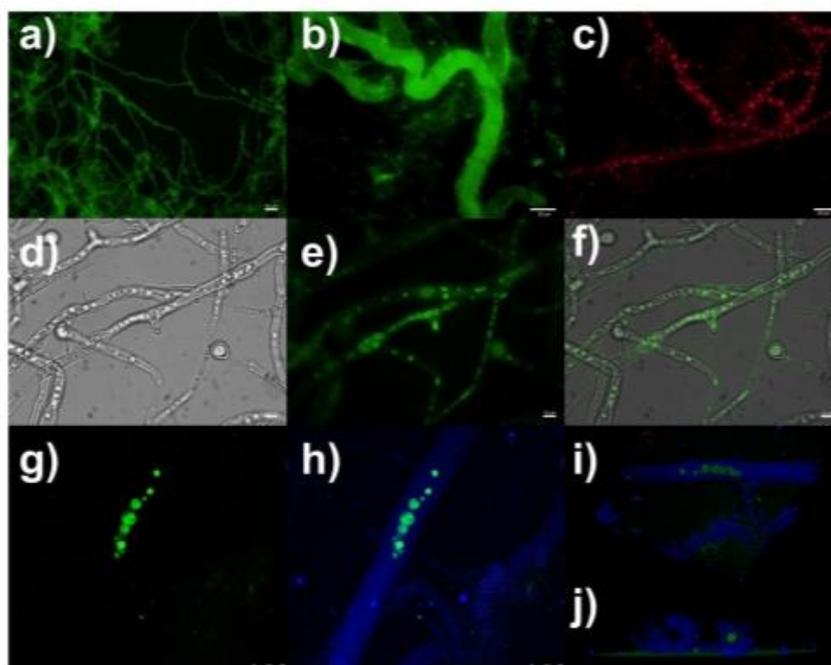


Figure 3. Fungal species labelled with Ln-MOFs. Fluorescence images of (a,b) *P. macrosporus*/Tb-MOF and (c) *Trichoderma sp.*/Eu-MOF. Vacuolar system of the *Trichoderma sp.*/Tb-MOF biohybrids in (d) bright field, (e) fluorescence and (f) composite images. The false colours are red and green for Eu-MOF and Tb-MOF, respectively. Confocal scanning laser images of *A. niger*/Tb-MOF: (g) fluorescently labelled organelles and (h) processed image emphasising the colocalisation of the organelles in the hyphal compartment. 3D cell reconstruction of CLSM images in a (i) longitudinal view and an (j) axial view, highlighting the inner localisation of the luminescent organelles in the hyphae.

displays co-fluorescence of fungal hyphae and Ln-MOFs (Fig. S16), the time-resolved emissions are composed of only *f-f* transitions. Since UV light is known to be prejudicial to the microorganisms, we substitute the excitation source in our experiments by using a low-energy microscope with a wavelength at 405 nm to study these bio-systems. Specifically, Fig. 3(g) emphasises the fluorescent vacuoles of the *A. niger*/Tb-MOF while Fig. 3(h) shows a representative processed image also taking into account the fungal autofluorescence. Thereby, based on analysis of 3D cell reconstruction (Fig. 3(h-j)), it is possible to confirm that the fluorescence emission of Ln-MOFs originates from organelles within the hyphal compartment. Up to now, the exact nature of the internalisation mechanism of nanosized materials by fungi is currently an unknown process^{8,16,47}. In one of few studies regarding fungal uptake of nanoparticles, Whiteside *et al.* speculated that glycine, arginine or chitosan conjugated CdSe/ZnS quantum dots can incidentally be acquired by *Penicillium solitum* fungus through biological transporters for amino acids, peptides, proteins and polysaccharides⁴⁸. Our next step is to better understand the assimilation of Ln-MOFs by microorganisms, particularly, whether an enzymatic breakdown of crystals near the hyphal body could facilitate the uptake of small particles by fungi.

The affinity of microorganisms to the crystals of Eu or Tb-MOF was evaluated by growing the fungal cultures in a media with an equimolar mixture of Eu-MOF and Tb-MOF during cultivation. XRD patterns (shown in ESI Fig. S17) display peaks indexed to a physical mixture of Ln-MOFs, indicating the integration of both Tb and Eu-MOFs at fungal hyphae. In line with this, the emission spectra of *P. macrosporus*/EuTb-MOFs and *Trichoderma sp.*/EuTb-MOF biohybrids (ESI, Fig. S18(a)) exhibited a spectral profile composed of both Eu and Tb emission ($^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ and $^5D_4 \rightarrow ^7F_1$; $J = 0, 1, 2, 3$ and 4 , and $J' = 6, 5, 4, 3, 2, 1$ and 0), corroborating the incorporation of Eu- and Tb-MOFs at the fungal hyphae. Moreover, the colour coordinate of photoluminescence exhibited by *P. macrosporus*/EuTb-MOFs and *Trichoderma sp.*/EuTb-MOFs biohybrids are very close, (0.368; 0.539) and (0.369; 0.539), respectively (ESI, Fig. S18(b)). Owing to the energy transfer pathways between Eu (acceptor) and Tb (donor) centres being blocked in the physical mixture of the adjacent Eu- and Tb-MOFs particles, the spectral profile (relative emission band amplitude or colour coordinate) can be used to estimate the relative molar ratio between Ln-MOFs^{8–30}. Thus, we can infer that the amounts of Eu- and Tb-MOFs incorporated by the *P. macrosporus* and *Trichoderma sp.* are quite similar, as expected (see ESI, Fig. S18(c,d)). To corroborate this assumption, we carried out a control experiment mixing Eu and Tb-MOFs at molar ratios (Eu-MOF:Tb-MOF) of 1:9, 1:3, 1:1 and 3:1. According to the emission spectral profile exhibited by the solid physical mixture of Ln-MOFs (see Fig. S19 (a) in ESI), we can notice that the maximum intensity of the $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (Eu³⁺) and $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ (Tb³⁺) transitions changed with the molar ratio, in which they are equal at the molar ratio of 1:1, which confirms that

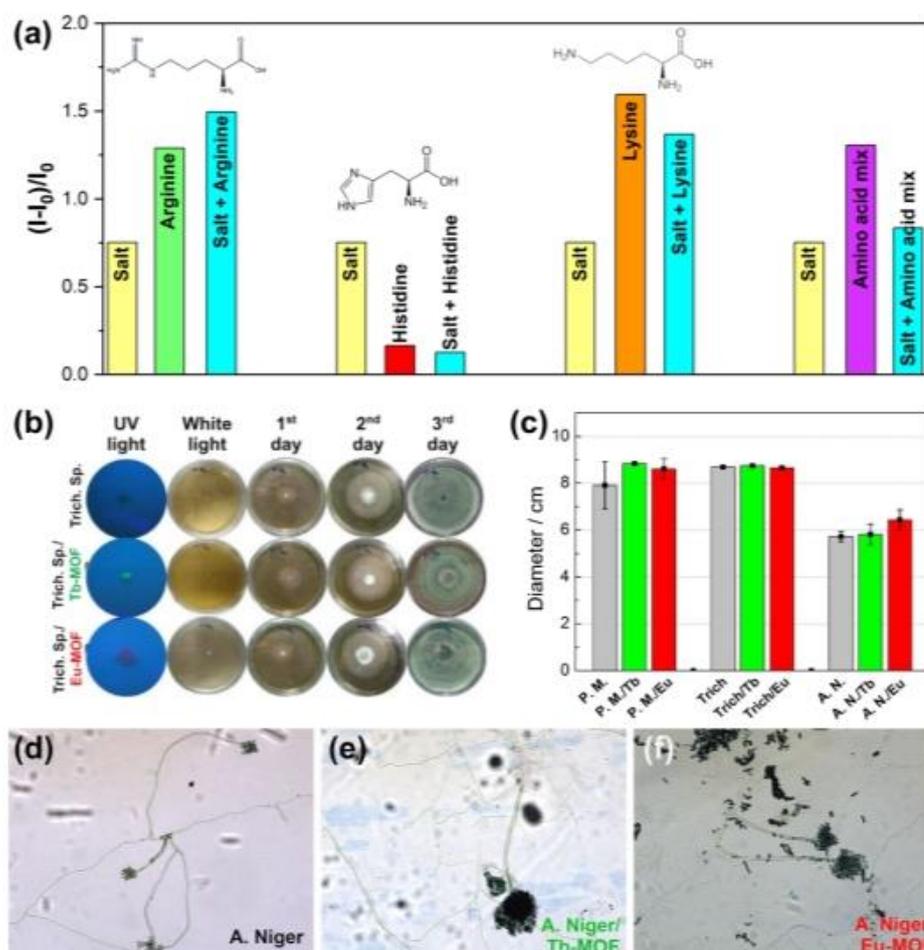


Figure 4. (a) Relative enhancement in the integrated emission intensity (from 478 to 600 nm) of Tb-MOF in the presence of salts and amino acids. I_0 and I are the integrated emission intensities of the aqueous suspension of Tb-MOF without and with salts and/or amino acids, respectively. (b) Digital image of the diameter of *Trichoderma* sp. and *Trichoderma* sp. biohybrid colonies after three days of growing in Petri dishes. Note that the development of the colonies was similar for the three samples. The images obtained under ultraviolet light were enlarged for greater clarity. (c) Comparative radial growth after seven days of cultivation of *P. macrosporus*, *Trichoderma* sp. and *A. niger*. and their respective Eu and Tb-MOFs biohybrids. Filamentous cells grown from the native (d) *A. niger* fungus and its (e) *A. niger*/Tb-MOF and (f) *A. niger*/Eu-MOF biohybrids, respectively.

fungi assimilated the same amount of Eu and Tb MOFs. This evidence is clarified through the observation of a linear relationship between the intensity ratios of the transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (Eu^{3+})/ $^6D_4 \rightarrow ^7F_5$ (Tb^{3+}) and the molar ratio $n(\text{Eu-MOFs})/n(\text{Tb-MOFs})$ in the Ln-MOFs physical mixture (ESI, Fig. S19(b)).

Moreover, we observed in the images of fluorescence microscopy that the luminescence intensity of Tb-MOF-based biohybrids is more intense than those of Eu-MOF-based biohybrids. Thus, to understand this behaviour, we perform one additional experiment, acquiring the emission spectra of the Ln-MOFs in a simulated vacuolar medium. Within this line, to evaluate the high luminescence intensity of Ln-MOFs inside of fungal vacuoles and whether it is correlated to a concentration effect, we evaluate the luminescence properties of MOFs in aqueous suspensions in the presence of some metal salts (MgCl_2 , KH_2PO_4 and NaCl) and amino acids (arginine, histidine and lysine), according to the composition of a typical extract of isolated fungal vacuoles³¹. Remarkably, the metal salts and amino acids induce a significantly increased luminescence of the Tb-MOF, mainly for arginine and lysine, in which an enhancement above 150% is displayed (see histogram displayed in Fig. 4(a)). The weak increase caused by the histidine is correlated to an inner filter effect, due to absorption of this amino acid in the region of the excitation source, 312 nm (see Fig. S20)^{32,33}. Due to the maintenance of the spectral profile of the Tb-MOF (see Fig. S21), we assign this luminescence enhancement to coordination and supramolecular interactions, respectively, of the metal ions and amino acids to mellitate ligands at the surface of the MOF nanoparticles^{34–37}. These interactions block the surface luminescence quenching, commonly verified in luminescent

nanoparticles^{54,59}. In contrast, there is no change in the emission intensity of the Eu-MOF (see Fig. S22 in ESI). In spite of this, we see an intense red-light emission from the fungal vacuoles (see for instance Fig. S12 in ESI). The reason for this is not clear yet. One point to be highlighted is that the intravacuolar composition of the fungi is much more complex than the simulated composition of vacuoles in our experiments. Therefore, a possible explanation would be the existence of unknown biomolecules and ions inside the vacuoles which, when interacting on the surface with the mellitate ligands of the Eu-MOFs nanoparticles, could avoid the quenching effect due to the O-H oscillator strength of the coordinated water molecules at the Eu³⁺ ions, as aforementioned.

The biotoxicity of Ln-MOFs on fungal species was evaluated based on the analysis of cell survival after assimilation of the abiotic components by these microorganisms. Initially, we executed the alamarBlue test, which involves the detection of metabolic activity through the assimilation of a redox indicator that changes its colour from blue (oxidised form) to pink (reduced form) during the cell growth. AlamarBlue is widely used to detect quantitatively the proliferation of eukaryotic cell lines (human and animal), bacteria and fungi^{55,56}. For instance, Santos and co-workers reported cellular activity using an alamarBlue assay of spherical pellets of *Aspergillus fumigatus* after experiments of electrochemical degradation of hydrogen peroxide using integrated microelectrode in the mycelium clumps⁵⁷. Although we observed changes in absorbance values, indicating cell viability of fungal species and their biohybrids (pink color), it was not possible to obtain quantitative measurements since those fungi were grown in submerged static cultures, forming a dispersed micellar network. Thus, it is not possible to standardise the amount of mycelium in the replicates, leading to large errors in the absorbance values.

An additional approach was also carried out by evaluating the total radial growth of microorganisms on a solid surface containing an agar-dextrose medium and their phenotypic characteristics after Ln-MOF deposition. In this case, we assumed that the direct evidence of an inhibitory effect from Tb- and Eu-MOFs over microorganisms would be the absence of their mycelial growth. For this experiment, small fragments of each mycelium were inoculated in Petri dishes containing a mixture of agar and 1.0% dextrose (w/v). The native fungi and the biohybrids were cultivated under the same environmental conditions, and the radii of colonies were daily measured using a caliper (see Fig. 4(b) for growth profile of the fungus *Trichoderma sp.* and its biohybrids for three days). Figure 4(c) shows the diameter of colonies after seven days of cultivation for the all biosystems studied in this work. As can be observed, the profiles of fungal growth are quite similar for the biohybrids and native fungi, evidencing similar radial growth rates in all phases of the growth curve. We also examined the aspects of the macroscopic appearance of the colonies, such as colour, texture and the production of pigments. These observations have shown that there were no significant differences between the colony growth by native fungi and their biohybrid counterparts, suggesting that Ln-MOFs would not produce any permanent modification in the fungal structures.

To complement the biotoxicity investigation, the micromorphology of the filamentous cells originating from native fungi and the biohybrid counterparts were compared using Riddell's slide cultures technique⁶⁰. Succinctly, mycelial fragments of each species and their biohybrids were inoculated in a sterile potato dextrose agar (PDA) placed on a sterile microscopy slide. Subsequently, the mycelium-PDA set was protected with a coverslip, and the whole set was incubated in a Petri dish for seven days. For comparison purposes, careful observation of morphological characteristics of hyphal cells was carried out. As a result, we determine that there is no difference between cells originating from native fungi and fungi/Ln-MOF biohybrids (see Fig. 4(d,f) for filamentous cells growth from native *A. niger* and their biohybrids). Thus, we conclude that the presence of Ln-MOFs on the fungal ultrastructure does not bring apparent toxic effects to the microorganisms being. Therefore, this methodology is promising for the bioimaging of fungi.

Conclusions

This work has demonstrated that controlled deposition of Ln-MOFs on filamentous fungi converts native microorganisms into photoluminescent living entities. We have confirmed the integration of Ln-MOFs onto microorganisms through SEM, XRD and fluorescence spectroscopy. Tb- and Eu-MOFs form a fluorescent carapace over the cell and, most importantly, tiny Ln-MOFs particles were internalised in specific cellular components, making this strategy relevant for living imaging analysis. The integration of Ln-MOF nanoparticles to the fungal structure does not present any apparent damage to the vital functions of the microorganisms, whose development is similar to that of native cells. Control experiments simulating components found in the vacuolar medium revealed that the internalisation of Ln-MOFs could intensify the luminescence process, especially for the Tb-MOF, facilitating the visualisation of the organelles. To conclude, we believe that our findings may be relevant for research involved with the treatment of fungal infections. Fungal diseases are difficult to treat since their rigid cell wall presents a barrier to drug penetration. Eventually, the uptake of antifungal agents encapsulated in the MOF cavities by the microorganisms would be a promising strategy in the treatment of such infections⁶¹.

Methods

Chemicals. Mellitic acid and lanthanide oxides (99.99%, where Ln³⁺ = Eu³⁺ or Tb³⁺) were purchased from Aldrich and used without further purification. The lanthanide salts (Ln(NO₃)₃·5H₂O) were obtained by reaction of nitric acid with the corresponding lanthanide oxide at 60–80 °C. The pH was adjusted to 6.0 by water vaporisation and the solid salts were collected by vacuum drying at 60 °C.

Synthesis of Ln-MOF (Ln = Eu or Tb). Lanthanide metal-organic frameworks (Ln-MOFs or [Ln₂(Mell)₆·6H₂O]) were synthesised by adding 171 mg of mellitic acid (0.5 mmol) and 223 mg of lanthanide salt (0.5 mmol) into 5.0 mL of deionised water under constant magnetic stirring for 5 min. Then, 1.5 mL of ethanol (30% in volume) was slowly added to the solution maintained at rest to induce rapid crystal nucleation. White microcrystals were obtained in a yield of 53%.

These crystals were submitted to high intensity ultrasound irradiation (VibraCell VC 130, Sonics Instruments) using a titanium tip (0.6 cm in diameter) immersed approximately 2.0 cm in the liquid to reach smaller particles sizes. For this purpose, 0.06 g of Ln-MOFs were sonicated in 50 mL of deionised sterile water for 2 h, passed through a syringe filter (pore size of 0.8 µm) and used immediately for microorganism cultivation.

Preparation of biological samples. The fungi *Phialomyces macrosporus* and *Trichoderma* sp. were isolated from dead leaves from plants of the Environmental Protection Area of Lagoa e Dunas do Abaeté, Salvador, Bahia, Brazil, and deposited in the culture collection of the Laboratory of Biotechnology and Chemistry of Microorganisms (LBQM - UFBA). *Aspergillus niger* (ATCC-16404) was acquired from Fundação André Tosello, Campinas, São Paulo, Brazil.

These fungi were subcultured from their stock water flasks (Castellani method) on potato dextrose agar and the inoculum suspensions were prepared from the fresh cultures (seven-day old) by rubbing the colonies with a sterile loop and transferred to a sterile tube that was shaken vigorously with a Vortex mixer. The inoculum size was determined by microscopic enumeration with a cell-counting hemacytometer (Neubauer chamber), where the *Trichoderma* sp. spore suspension was 1.16×10^7 spores/mL, *Phialomyces macrosporus* was 3.75×10^4 spores/mL, and *Aspergillus niger* exhibited 9.50×10^5 spores/mL.

Fungi/Ln-MOF biohybrids were cultivated through the following protocol. In a penicillin flask was added 4.0 mL of deionised sterile water, 5.0 mL of a solution containing sonicated Ln-MOFs (1.2 mg/mL) and 1.0 mL of a sterile solution containing 2.0% glucose. Then, 100 µL of a spore suspension were added to the growing medium and allowed to grow at 25–28 °C for 120 h in the dark. Experiments were done in triplicate. After cultivation, the mycelial mass of fungi/Ln-MOF biohybrids were copiously rinsed with deionised water to remove any weakly bonded particulate Ln-MOFs. For XRD, SEM and photoluminescence measurements, the biohybrids were dried using critical point drying, as described in the literature³⁵. Fluorescence microscopy analyses were carried out in small fragments of mycelium stored in deionised water without any other treatment.

Preparation of fungi/Ln-MOF biohybrid samples in Petri dishes. To evaluate the fungi/Ln-MOF biohybrid viability, the radial growth of these samples was monitored. Sterile Petri dishes were prepared with ~20 mL of the culture medium of dextrose (20 g.L⁻¹) and agar (15 g.L⁻¹), and kept in a sterile laminar flow chamber under UV light until culture media solidification. A small fragment of fungi/Ln-MOF biohybrids and native-type ones were transferred to test Petri dishes and placed in the centre. The dishes were incubated at 25–28 °C for 168 h. The culture radial diameters were measured along four axes. Each evaluation was made every 12 h in the first two days, and every 24 h from the third day. All experiments were performed in triplicate. The statistical analysis of the mean and the standard deviation of the triplicates was achieved using Student's t-test at the 0.05 level with a confidence interval of 95%.

General instrumentation. SEM images were acquired on a JEOL JSM5400 (LAMUME, IF-UFBA). Energy-dispersive X-ray (EDS) spectra were obtained using a SEM microscope by selecting regions with 500× magnification. The X-ray diffraction (XRD) patterns were performed on a Bruker D8 Advanced diffractometer over a 2θ range from 5° to 50°, a velocity of 5°/min and increments of 0.02°. Simulated powder X-ray diffraction patterns (PXRD) were measured through the single crystal X-ray diffraction data (CIF file) as an input and the Mercury 3.8 software. Particle size distribution and zeta potential were obtained in a Zetatracc Legacy equipment (at CETENE – Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife – PE). Photoluminescence measurements were carried out on a spectrofluorimeter HORIBA-JOBIN YVON FLUOROLOG-3 equipped with a continuous 450 W xenon lamp and UV xenon flash tube for excitation. All emission spectra were corrected by spectral response of the monochromators using a silicon photodiode reference detector, to monitor and compensate for variation in the xenon lamp output, using typical correction spectra provided by the manufacturer. For fluorescence microscopy, fragments of fungal mycelium were copiously rinsed with deionised water and held between a coverslip and a microscope glass slide without any other treatment. The samples were viewed using an Olympus BX51 microscope equipped with a 100× magnification oil-immersion objective and a Retiga 2000R monochrome CCD camera. Samples were illuminated with a 100 W Hg vapor source using a BP380-385 excitation filter and a BA420 emission filter. The images obtained were processed using a Leica LAS X software. Confocal scanning laser microscopy analyses were performed using a Leica TCS SP8 microscope, equipped with a 63× magnification objective and a laser source at 405 nm. The luminescence properties of aqueous suspensions of Ln-MOFs influenced by salts and amino acids were studied as follows: 300 µL of a sonicated aqueous suspension of Eu or Tb-MOF (2.4 mg/mL) were added to a 3.5 mL quartz cuvette containing deionised water and a mixture of salts (MgCl₂ (2.7 mM), KH₂PO₄ (0.7 mM) and NaCl (1.5 mM)) and/or amino acids arginine (13.6 mM), histidine (1.9 mM) and lysine (1.8 mM). Luminescence analyses were performed using a Shimadzu RF-5301PC spectrofluorophotometer equipped with a continuous 450 W xenon lamp. For morphological analyses, we used the well-established Riddell methodology for the preparation of coverslips containing cells grown from native fungi and their respective biohybrid. The samples were investigated in an inverted Leica DMi8 microscope at Gonçalo Moniz Research Center - Fiocruz/BA.

References

1. Hastings, J. W. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: A review. *Gene* **173**, 5–11, [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00676-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00676-1) (1996).
2. Paley, M. A. & Prescher, J. A. Bioluminescence: a versatile technique for imaging cellular and molecular features. *Medchemcomm* **5**, 255–267, <https://doi.org/10.1039/c3md00288h> (2014).
3. Partov, K. V. et al. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. *Angewandte Chemie-International Edition* **54**, 8124–8128, <https://doi.org/10.1002/anie.201501779> (2015).
4. Oliveira, A. G. et al. Circadian Control Sheds Light on Fungal Bioluminescence. *Current Biology* **25**, 964–968, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.021> (2015).

5. Oliveira, A. G., Carvalho, R. P., Waldenmaier, H. E. & Stevani, C. V. Fungi bioluminescence: distribution, function and mechanism of light emission. *Quimica Nova* **36**, 314–U 148, <https://doi.org/10.1590/s0100-40422013000200018> (2013).
6. Hawksworth, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* **105**, 1422–1432, <https://doi.org/10.1017/s0953756201004725> (2001).
7. Liu, L. B., Duan, X. R., Liu, H. B., Wang, S. & Li, Y. L. Microorganism-based assemblies of luminescent conjugated polyelectrolytes. *Chemical Communications*, 5999–6001, <https://doi.org/10.1039/b814518k> (2008).
8. Rispaill, N. et al. Quantum Dot and Superparamagnetic Nanoparticle Interaction with Pathogenic Fungi: Internalization and Toxicity Profile. *ACS Applied Materials & Interfaces* **6**, 9100–9110, <https://doi.org/10.1021/am501029g> (2014).
9. Geng, W. et al. Single cells in nanoshells for the functionalization of living cells. *Nanoscale* **10**, 3112–3129, <https://doi.org/10.1039/c7nr08556g> (2018).
10. Richardson, J. J. & Liang, K. Nano-Biohybrids: In Vivo Synthesis of Metal-Organic Frameworks inside Living Plants. *Small* **14**, <https://doi.org/10.1002/smll.201702958> (2018).
11. Chen, W., Wang, G. C. & Tang, R. K. Nanomodification of living organisms by biomimetic mineralization. *Nano Research* **7**, 1404–1428, <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0509-9> (2014).
12. Stavrinou, E. et al. Electronic plants. *Science Advances* **1**, <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501136> (2015).
13. Guo, J. L. et al. Light-driven fine chemical production in yeast biohybrids. *Science* **362**, 81–3–+, <https://doi.org/10.1126/science.aar9777> (2018).
14. Ji, Z., Zhang, H., Liu, H., Yaghi, O. M. & Yang, P. D. Cytoprotective metal-organic frameworks for anaerobic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, 10582–10587, <https://doi.org/10.1073/pnas.1808829115> (2018).
15. Chu, Y. Y. et al. Biomimetic synthesis of coordination network materials: Recent advances in MOFs and MPNs. *Applied Materials Today* **10**, 93–105, <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.12.009> (2018).
16. Giraldo, J. P. et al. Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing. *Nature Materials* **13**, 400–408, <https://doi.org/10.1038/nmat3890> (2014).
17. Li, S. Z. & Huo, F. W. Metal-organic framework composites: from fundamentals to applications. *Nanoscale* **7**, 7482–7501, <https://doi.org/10.1039/c5nr00518c> (2015).
18. Sanchez, C., Belleville, P., Popall, M. & Nicole, L. Applications of advanced hybrid organic-inorganic nanomaterials: from laboratory to market. *Chemical Society Reviews* **40**, 696–753, <https://doi.org/10.1039/c0cs00136h> (2011).
19. Jiang, J. C. & Yaghi, O. M. Bronsted Acidity in Metal-Organic Frameworks. *Chemical Reviews* **115**, 6966–6997, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00221> (2015).
20. Zhu, Q. L. & Xu, Q. Metal-organic framework composites. *Chemical Society Reviews* **43**, 5468–5512, <https://doi.org/10.1039/c3cs60472a> (2014).
21. Falcaro, P. et al. MOF positioning technology and device fabrication. *Chemical Society Reviews* **43**, 5513–5560, <https://doi.org/10.1039/c4cs00089g> (2014).
22. Chaemchuen, S., Kabir, N. A., Zhou, K. & Verpoort, F. Metal-organic frameworks for upgrading biogas via CO₂ adsorption to biogas green energy. *Chemical Society Reviews* **42**, 9304–9332, <https://doi.org/10.1039/c3cs60244c> (2013).
23. DeCoste, J. B. & Peterson, G. W. Metal-Organic Frameworks for Air Purification of Toxic Chemicals. *Chemical Reviews* **114**, 5695–5727, <https://doi.org/10.1021/cr4006473> (2014).
24. Li, J. R., Sculley, J. & Zhou, H. C. Metal-Organic Frameworks for Separations. *Chemical Reviews* **112**, 869–932, <https://doi.org/10.1021/cr200190s> (2012).
25. Liu, J. W. et al. Applications of metal-organic frameworks in heterogeneous supramolecular catalysis. *Chemical Society Reviews* **43**, 6011–6061, <https://doi.org/10.1039/c4cs00094c> (2014).
26. Silva, P., Vilela, S. M. F., Tome, J. P. C. & Paz, E. A. A. Multifunctional metal-organic frameworks: from academia to industrial applications. *Chemical Society Reviews* **44**, 6774–6803, <https://doi.org/10.1039/c5cs00307e> (2015).
27. Wang, C. H., Liu, X. L., Demir, N. K., Chen, J. P. & Li, K. Applications of water stable metal-organic frameworks. *Chemical Society Reviews* **45**, 5107–5134, <https://doi.org/10.1039/c6cs00362a> (2016).
28. da Luz, L. L. et al. Controlling the energy transfer in lanthanide-organic frameworks for the production of white-light emitting materials. *Crysoengcom* **16**, 6914–6918, <https://doi.org/10.1039/c4ce00538d> (2014).
29. da Luz, L. L. et al. Inkjet Printing of Lanthanide-Organic Frameworks for Anti-Counterfeiting Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces* **7**, 27115–27123, <https://doi.org/10.1021/acsami.5b06301> (2015).
30. Liang, K. et al. Metal-Organic Framework Coatings as Cytoprotective Exoskeletons for Living Cells. *Advanced Materials* **28**, 7910–7914, <https://doi.org/10.1002/adma.201602335> (2016).
31. Liang, K. et al. An Enzyme-Coated Metal-Organic Framework Shell for Synthetically Adaptive Cell Survival. *Angewandte Chemie-International Edition* **56**, 8510–8515, <https://doi.org/10.1002/anie.201704120> (2017).
32. Sugunan, A., Melin, P., Schürer, J., Hilbom, J. G. & Dutta, J. Nutrition-driven assembly of colloidal nanoparticles: Growing fungi assemble gold nanoparticles as microwires. *Advanced Materials* **19**, 77–+, <https://doi.org/10.1002/adma.200600911> (2007).
33. Fontes, A. M. et al. Bio-inspired gold microtubes based on the morphology of filamentous fungi. *Biomaterials Science* **2**, 956–960, <https://doi.org/10.1039/c4bm00030g> (2014).
34. Zhu, W. K. et al. Coupling Microbial Growth with Nanoparticles: A Universal Strategy To Produce Functional Fungal Hyphae Macrospheres. *ACS Applied Materials & Interfaces* **8**, 12693–12701, <https://doi.org/10.1021/acsami.6b03399> (2016).
35. Cao, F. S. et al. Alteration of the characteristics of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from the fungus *Phanerochaete chrysosporium* when exposed to sub-toxic concentrations of nickel (II). *International Biodeterioration & Biodegradation* **129**, 179–188, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.02.009> (2018).
36. Flemming, H. C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 563–575, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94> (2016).
37. Bunzli, J. C. G. On the design of highly luminescent lanthanide complexes. *Coordination Chemistry Reviews* **293**, 19–47, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.10.013> (2015).
38. Binnemans, K. Interpretation of europium(III) spectra. *Coordination Chemistry Reviews* **295**, 1–45, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.02.015> (2015).
39. Wu, L. P., Munakata, M., KurodaSowa, T., Maekawa, M. & Suenaga, Y. Synthesis, crystal structures and magnetic behavior of polymeric lanthanide complexes with benzenehexacarboxylic acid (mellitic acid). *Inorganica Chimica Acta* **249**, 183–189 (1996).
40. Teles, E. S. & Santa-Cruz, P. A. Spectra Lux Software v.2.0, Ponto Quântico Nanodispositivos, UFPE (2003).
41. Chen, M. et al. Inorganic fluorescent nanopores for cellular and subcellular imaging. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **58**, 120–129, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.03.003> (2014).
42. Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R. & Nann, T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods* **5**, 763–775, <https://doi.org/10.1038/nmeth.1248> (2008).
43. Bigall, N. C. et al. Fungal templates for noble-metal nanoparticles and their application in catalysis. *Angewandte Chemie-International Edition* **47**, 7876–7879, <https://doi.org/10.1002/anie.200801802> (2008).
44. Kubo, A. M., Gorup, L. E., Amaral, L. S., Filho, E. R. & Camargo, E. R. Kinetic Control of Microtubule Morphology Obtained by Assembling Gold Nanoparticles on Living Fungal Biotemplates. *Bioconjugate Chemistry* **27**, 2337–2345, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00340> (2016).

45. Klionsky, D. J., Herman, P. K. & Emr, S. D. The fungal vacuole - composition, function, and biogenesis. *Microbiological Reviews* **54**, 266–292 (1990).
46. Whiteside, M. D., Treseder, K. K. & Atsatt, P. R. The brighter side of soils: Quantum dots track organic nitrogen through fungi and plants. *Ecology* **90**, 100–108, <https://doi.org/10.1890/07-2115.1> (2009).
47. Whiteside, M. D., Dignan, M. A., Gratton, E. & Treseder, K. K. Organic nitrogen uptake by arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal forest. *Soil Biology & Biochemistry* **55**, 7–13, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.06.001> (2012).
48. Kerbellec, N. *et al.* An Unprecedented Family of Lanthanide-Containing Coordination Polymers with Highly Tunable Emission Properties. *Inorganic Chemistry* **48**, 2837–2843, <https://doi.org/10.1021/ic801616y> (2009).
49. Lu, Y. & Yan, B. Luminescent lanthanide barcodes based on postsynthetic modified nanoscale metal-organic frameworks. *Journal of Materials Chemistry C* **2**, 7411–7416, <https://doi.org/10.1039/c4tcQ1077a> (2014).
50. Yang, Q. Y. *et al.* Linear Dependence of Photoluminescence in Mixed Ln-MOFs for Color Tunability and Barcode Application. *Inorganic Chemistry* **54**, 5707–5716, <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b00271> (2015).
51. BORKOVICH, K. A. & EBBOLE, D. J. *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. (ASM Press, 2010).
52. Omary, M. A. A. P. & Howard, H. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* 1372–1391 (Academic Press, 2017).
53. Chen, S., Yu, Y. L. & Wang, J. H. Inner filter effect-based fluorescent sensing systems: A review. *Analytica Chimica Acta* **999**, 13–26, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.026> (2018).
54. Cheng, Y. *et al.* Highly efficient fluorescence sensing of phosphate by dual-emissive lanthanide MOFs. *Dalton Transactions* **47**, 12273–12283, <https://doi.org/10.1039/c8dt01515e> (2018).
55. Chen, X. *et al.* Luminescent Lanthanide-Based Organic/Inorganic Hybrid Materials for Discrimination of Glutathione in Solution and within Hydrogels. *ACS Applied Materials & Interfaces* **9**, 13554–13563, <https://doi.org/10.1021/acsami.7b02679> (2017).
56. Su, Y. *et al.* Versatile bimetallic lanthanide metal-organic frameworks for tunable emission and efficient fluorescence sensing. *Communications Chemistry* **1**, <https://doi.org/10.1038/s42004-018-0016-0> (2018).
57. Li, H. W. *et al.* A malonitrile-functionalized metal-organic framework for hydrogen sulfide detection and selective amino acid molecular recognition. *Scientific Reports* **4**, <https://doi.org/10.1038/srep04366> (2014).
58. Zheng, X., Shikha, S. & Zhang, Y. Elimination of concentration dependent luminescence quenching in surface protected upconversion nanoparticles. *Nanoscale* **10**, 16447–16454, <https://doi.org/10.1039/c8nr03121e> (2018).
59. Xue, M. *et al.* Highly Enhanced Cooperative Upconversion Luminescence through Energy Transfer Optimization and Quenching Protection. *ACS Applied Materials & Interfaces* **8**, 17894–17901, <https://doi.org/10.1021/acsami.6b05609> (2016).
60. Riddell, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia* **42**, 265–270, <https://doi.org/10.2307/3755439> (1950).
61. Horcajada, P. *et al.* Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nature Materials* **9**, 172–178, <https://doi.org/10.1038/nmat2608> (2010).

Acknowledgements

The authors thank the CNPq/Fapesb (Pronem: PNE0012/2011 and Pronex: PNX0007/2011) and CNPq/Fapece (Pronex: APQ-0675-1.06/14) for financial support. We would like to thank the technical staff of the Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz/BA, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste CETENE – LMNano/PE and LAMUME-IF/UFBa for the support with the characterisations during the execution of this work.

Author Contributions

J. Rosário, L.L. da Luz and J.G.S. Ramalho performed the experiments; R. Geris, A.F. da Silva, J. Rosário, L.L. da Luz, S.A. Júnior and M. Malta analysed the data; S.A. Júnior and M. Malta designed the study; L.L. da Luz, S.A. Júnior and M. Malta wrote the manuscript. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43835-x>.

Competing Interest: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

APÊNDICE III

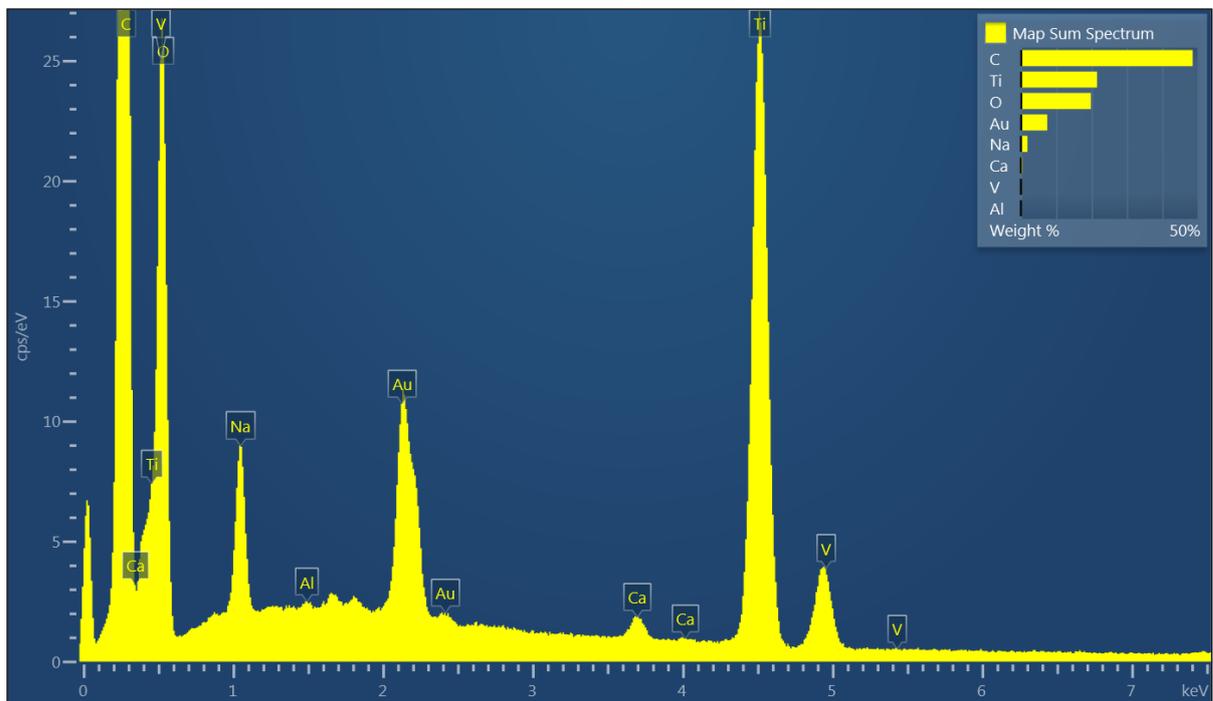


Figura 1 – Espectro de EDS do biohíbrido P.m-NaTiNTs/V₂O₅.

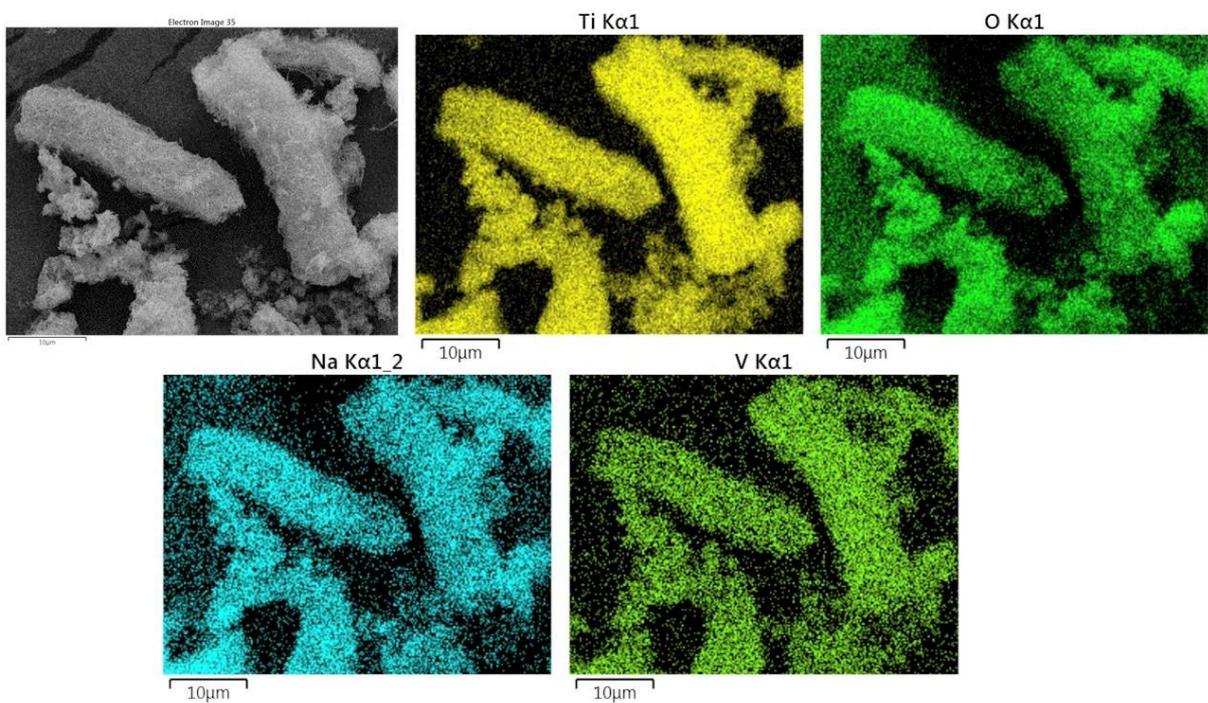


Figure 2 – Imagem na forma de mapa elemental do biohíbrido P.m-NaTiNTs/V₂O₅ obtidos via espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

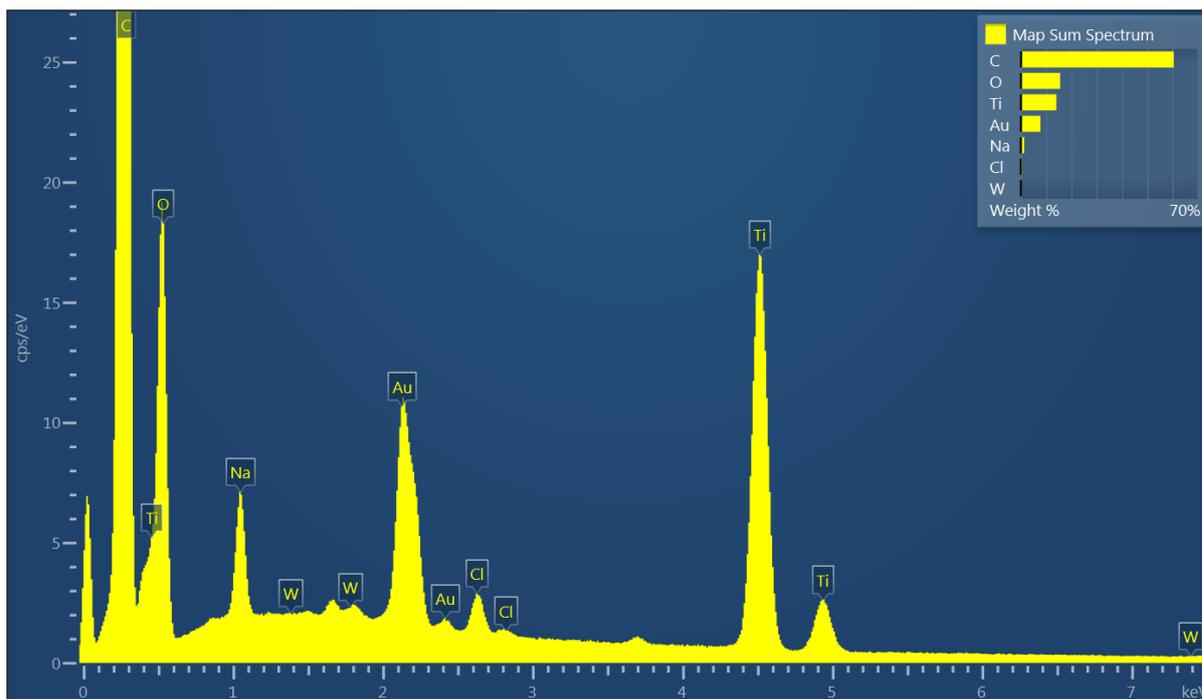


Figura 3 – Espectro de EDS do biohíbrido P.m-NaTiNTs/WO₃.

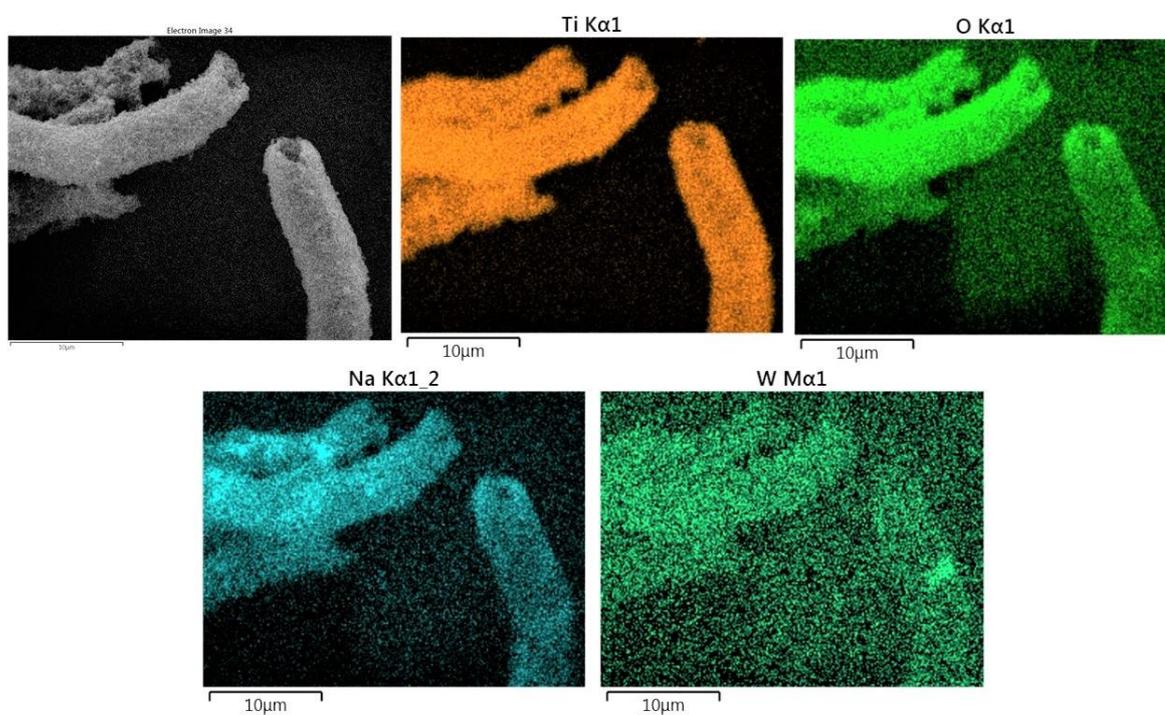


Figure 4 – Imagem na forma de mapa elemental do biohíbrido P.m-NaTiNTs/WO₃ obtidos via espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

APÊNDICE IV

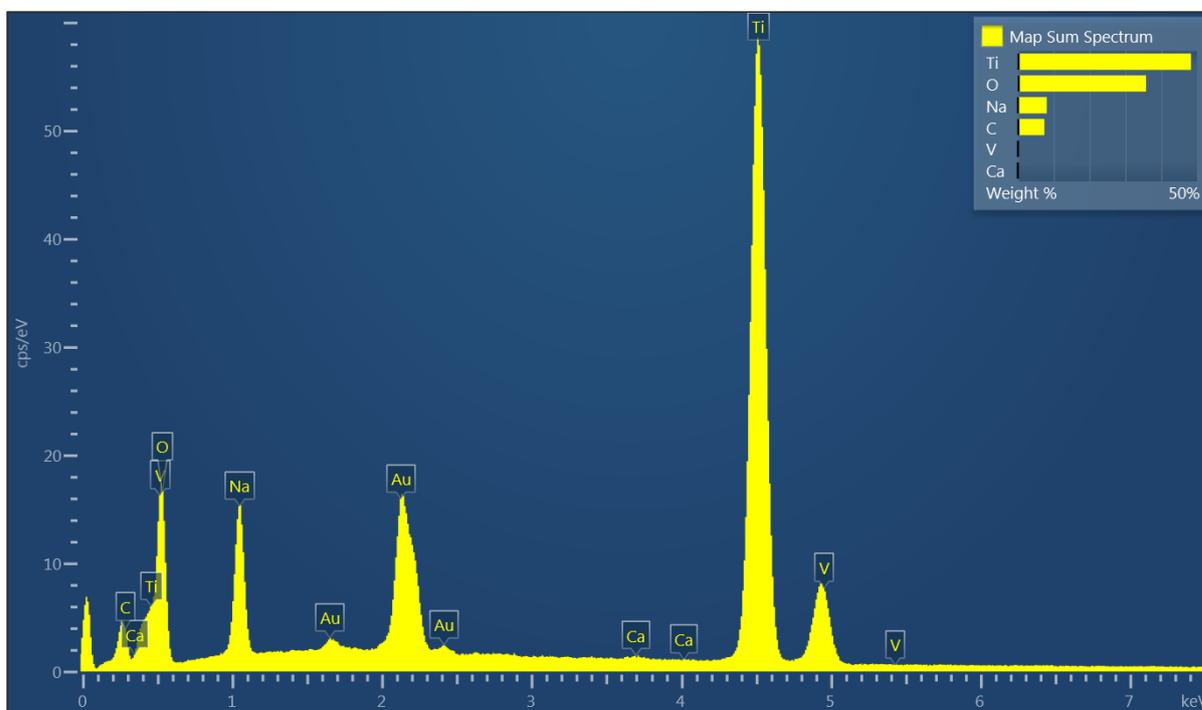


Figura 1 – Espectro de EDS de NaTiNTs/V₂O₅.