



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

SARAH MARIANA FERREIRA SANTANA

**A UTILIZAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NA OBTENÇÃO DE
MATERIAIS HÍBRIDOS E PRECURSOR NA SÍNTESE DE PONTOS
QUÂNTICOS DE CARBONO**

Salvador

2024

SARAH MARIANA FERREIRA SANTANA

**A UTILIZAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NA OBTENÇÃO DE
MATERIAIS HÍBRIDOS E PRECURSOR NA SÍNTESE DE PONTOS
QUÂNTICOS DE CARBONO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Malta

Coorientadora: Profa. Dra. Regina Maria Geris

Salvador

2024




TERMO DE APROVAÇÃO
SARAH MARIANA FERREIRA SANTANA


"A UTILIZAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NA OBTENÇÃO DE MATERIAIS HÍBRIDOS
E PRECURSOR NA SÍNTESE DE PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO"

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

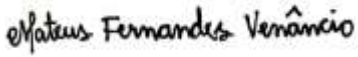

Prof. Dr. Marcos Malta dos Santos
Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia


Profa. Dra. Regina Maria Geris dos Santos
Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Universidade Federal da Bahia


Prof. Dr. Arnaud Victor dos Santos
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade do Estado da Bahia


Prof. Dr. Maurício Brandão dos Santos
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia


Profa. Dra. Elisângela Fabiana Boffo
Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Universidade Federal da Bahia


Prof. Dr. Mateus Fernandes Venâncio
Doutorado em Química, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 24 de maio de 2024.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

S232 Santana, Sarah Mariana Ferreira

A utilização de fungos filamentosos na obtenção de materiais híbridos e precursor na síntese de pontos quânticos de carbono/ Sarah Mariana Ferreira Santana. – Salvador, 2024.

189 f.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Malta

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Química, 2024.

1. Fungos. 2. Nanopartículas. 3. Ouro. 4. Carbono. I. Malta, Marcos. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 682.2

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata á Deus, meu Pai Celestial, pelo Seu profundo amor, graça e misericórdia. Por me amparar nos momentos de angústia e dificuldades. Pelas orações atendidas e por me conceder sempre força e coragem diante dos meus temores. Por abençoar a minha vida com pessoas especiais que me ajudaram a prosseguir nessa jornada. À Ele toda honra e glória para sempre! Amém!

Aos meus pais, Nilza e Lourival, por todo amor, apoio e incentivo.

Á todos os meus familiares e em especial minha vó Diva por suas orações em meu favor e pelas suas palavras de ânimo que tanto me ajudaram a não desistir dos meus sonhos.

Ao meu esposo, Jeferson, por todo o seu amor, carinho e cuidado. Por sua paciência nos meus momentos de ansiedade e desânimo. Por seu constante incentivo e força em prol do meu desenvolvimento.

Eu agradeço muito ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Malta, pela sua excelente orientação, por me acolher e me permitir fazer parte do maravilhoso grupo de pesquisa LBQM. Pela sua atenção, dedicação e paciência. Obrigada por ser um professor amigo, pela sua compreensão e respeito, sempre apoiando o desenvolvimento acadêmico e profissional dos seus orientandos.

Sou grata à professora Dra. Regina Geris pela sua coorientação, acolhimento, atenção, dedicação e amizade. Por sua preocupação em sempre disponibilizar o necessário para o desenvolvimento das pesquisas. Obrigada pelos seus ensinamentos e por me apresentar o incrível mundo dos fungos.

Á professora Dra. Verônica Maciel (IFBA) pelos ensinamentos, apoio e incentivo. Por sua amizade e companheirismo. Sou imensamente grata por me ensinar e auxiliar nos experimentos, com todo carinho e atenção. Pela realização de análises e medidas no DLS durante os seus estudos em Paris. Muito Obrigada, Vê!

Aos colegas do grupo de pesquisa LBQM: Jeferson, Camila, Messias e Marina, pelo acolhimento, amizade e trocas de conhecimentos. Agradeço por fazer do laboratório um ambiente repleto de harmonia, união e alegria. Aos colegas do IQ: Luana, Paulinha, Juli e Gabi, por todo incentivo e apoio. Agradeço também à Miguel, um excelente aluno de iniciação científica, por toda a sua dedicação, companheirismo e trocas de ideias e conhecimentos.

À minhas amigas, Lidi, Kelly e Samira, pelo apoio e incentivo. Pelo carinho, cuidado e companheirismo. Agradeço pela atenção e paciência nos meus momentos de desabafo e preocupações. Sempre me dando forças e torcendo pelas minhas vitórias. Agradeço muito também ao casal de amigos, Eliz e Manuzão, por me pressionarem de forma carinhosa a finalizar a escrita da tese.

Ao professor Hélio Pimentel (IQ-UFBA) pela amizade e conselhos. Sou grata pelo seu incentivo e força que me ajudaram a não desistir dessa jornada acadêmica.

Ao programa de Pós-graduação em Química da UFBA, Michel e Luciana por todo apoio, carinho e atenção e ao corpo docente do Instituto de Química, pela contribuição dada na minha formação.

Agradeço ao Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo serviço de microscopia eletrônica e processamento das amostras, pela solicitude e atenção de Dra. Adriana Lanfredi Rangel e Dr. Cláudio Pereira Figueira. Sou grata também aos técnicos Márcio e Arlene, pela paciência e amizade. Muito obrigada, vocês tornaram o desenvolvimento desse trabalho possível.

À professora Dra. Zênis Novais da Rocha (IQ-UFBA) por disponibilizar gentilmente o espectrofotômetro para as medidas de absorção na região do UV-vis. Agradeço às colegas Juli e Tamires pelo suporte no uso do equipamento.

Agradeço ao professor Dr. Leonardo Sena Teixeira pelas análises no espectrofluorímetro, e à professora Dra. Isabel Rigoli pelo apoio nas medidas no equipamento e auxílio na interpretação dos espectros de fluorescência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro que contribuiu para o desenvolvimento das atividades acadêmicas durante o doutorado.

Aos professores e professoras Dr. Elisângela Boffo, Dr. Valéria Fernandes, Dr. Arnaud Santos, Dr. Maurício Brandão, Dr. Soraia Brandão, Dr. Mateus Venâncio e Dr. Antônio Ferreira da Silva por terem gentilmente aceitado a compor a banca de avaliação da minha defesa de doutorado.

A todos os colegas, professores e funcionários do IQ-UFBA que contribuíram de alguma forma no desenvolvimento dessa tese.

Muito obrigada!

SANTANA, Sarah Mariana Ferreira. A utilização de fungos filamentosos na obtenção de materiais híbridos e precursor na síntese de pontos quânticos de carbono. 2024. Orientador: Prof. Dr. Marcos Malta. 188 f. il. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2024.

RESUMO

Os fungos filamentosos devido a sua característica morfológica tubular, tem sido utilizado como suporte biológico para obtenção de materiais híbridos com estrutura microtubular com alto potencial para aplicação em catálise. Estes microrganismos são capazes de assimilar nanopartículas metálicas em sua parede celular durante o seu desenvolvimento em um meio contendo os referidos nanomateriais. Nanopartículas de ouro estabilizadas por íons citrato são facilmente aderidas às células fúngicas filamentosas de diferentes espécies. Por outro lado, nanopartículas de platina, de paládio e de prata possuem baixa afinidade com os referidos fungos, de modo a comprometer o seu crescimento e assimilação simultânea destes nanomateriais. Como estratégia para contornar este impasse, nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio com estrutura do tipo núcleo-casca, Au_{núcleo} e Pd_{casca} (NPs-Au@Pd), foram obtidas por meio da adição controlada do metal paládio, para posterior integração em fungos filamentosos. As nanopartículas de ouro (NPs-Au) pré-sintetizadas atuaram como sementes para redução e nucleação do paládio metálico. Desta forma, foram obtidas nanopartículas bimetálicas esféricas com tamanho aproximadamente $12,7 \pm 9,7$ nm. Espectros de absorção na região do UV-visível mostraram uma diminuição da intensidade da banda plasmônica das nanopartículas de ouro com aumento da quantidade de íons Pd²⁺ acrescentadas. Pela primeira vez, bio-híbridos constituídos por nanopartículas bimetálicas e fungos filamentosos foram obtidos pela deposição de NPs-Au@Pd em células fúngicas da espécie *Phialomyces macrosporus* (Pm). Os bio-híbridos foram caracterizados através das técnicas de microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microanálise por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Imagens de MO mostraram mudança na coloração das hifas fúngicas após o cultivo das mesmas em soluções contendo NPs-Au@Pd. Micrografias dos bio-híbridos obtidas pelo MEV revelaram que a morfologia tubular das células fúngicas foi preservada mesmo após a deposição das NPs-Au@Pd com 50%(m/m) de íons Pd²⁺. Micrografias obtidas pelo MET comprovaram a assimilação das NPs-Au@Pd pelos fungos filamentosos. Ademais, as imagens obtidas pelo MET mostraram com mais detalhes a distribuição das referidas nanopartículas na camada mais externa da parede celular do microrganismo. Análises destas imagens revelaram também a formação de uma camada metálica robusta com espessura de ~260 nm. Mapas elementares obtidos por EDS evidenciaram a presença e distribuição dos metais ouro e paládio nos referidos bio-híbridos. Por fim, foi proposta uma metodologia de síntese de pontos quânticos de carbono (PQCs) utilizando fungos filamentosos como

precursor. Para obtenção dos PQC's foi realizado tratamento hidrotérmico da biomassa fúngica sob temperatura constante de 180 °C por 4 h. Os pontos quânticos de carbono derivados de fungos filamentosos apresentaram intensa fluorescência na cor verde-clara sob a exposição de radiação UV de 254 nm. A emissão máxima dos referidos PQC's foi exibida quando excitados no comprimento de onda de 370 nm, e sua fluorescência mostrou-se dependente do comprimento de onda de excitação.

Palavras-chaves: fungos filamentosos, nanopartículas bimetálicas, ouro, paládio, bio-híbridos e pontos quânticos de carbono.

SANTANA, Sarah Mariana Ferreira. The use of filamentous fungi to obtain hybrid materials and precursors in the synthesis of carbon quantum dots. 2024. Thesis advisor: Prof. Dr. Marcos Malta. 188 s. ill. Thesis (Doctorate degree in Chemistry) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2024.

ABSTRACT

Filamentous fungi, due to their tubular morphological characteristic, have been used as biological support to obtain hybrid materials with a microtubular structure with high potential for application in catalysis. These microorganisms are capable of assimilating metallic nanoparticles into their cell wall during their development in a medium containing these nanomaterials. Gold nanoparticles stabilized by citrate ions are easily adhered to filamentous fungal cells of different species. On the other hand, platinum, palladium and silver nanoparticles have low affinity with these fungi, compromising their growth and simultaneous assimilation of these nanomaterials. As a strategy to overcome this impasse, bimetallic gold and palladium nanoparticles with a core-shell structure, Au_{core} and Pd_{shell} (NPs-Au@Pd), were obtained through the controlled addition of palladium metal, for subsequent integration into filamentous fungi. The pre-synthesized gold nanoparticles (NPs-Au) acted as seeds for reduction and nucleation of metallic palladium. In this way, spherical bimetallic nanoparticles with a size of approximately 12.7 ± 9.7 nm were obtained. Absorption spectra in the UV-visible region showed a decrease in the intensity of the plasmonic band of gold nanoparticles with an increase in the amount of Pd²⁺ ions added. For the first time, biohybrids consisting of bimetallic nanoparticles and filamentous fungi were obtained by deposition of NPs-Au@Pd in fungal cells of the species *Phialomyces macrosporus* (Pm). The biohybrids were characterized using the techniques of optical microscopy (OM), scanning electron microscopy (SEM), microanalysis by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and transmission electron microscopy (TEM). MO images showed changes in the color of fungal hyphae after culturing them in solutions containing NPs-Au@Pd. Micrographs of the biohybrids obtained by SEM revealed that the tubular morphology of the fungal cells was preserved even after deposition of the NPs-Au@Pd with 50% (w/w) of Pd²⁺ ions. Micrographs obtained by TEM confirmed the assimilation of NPs-Au@Pd by filamentous fungi. Furthermore, the images obtained by TEM showed in more detail the distribution of these nanoparticles in the outermost layer of the microorganism's cell wall. Analysis of these images also revealed the formation of a robust metallic layer with a thickness of ~260 nm. Elemental maps obtained by EDS showed the presence and distribution of gold and palladium metals in these biohybrids. Finally, a methodology for the synthesis of carbon quantum dots (PQCs) using filamentous fungi as a precursor was proposed. To obtain the PQCs, hydrothermal treatment of the fungal biomass was carried out at a constant temperature of 180 °C for 4 h. The carbon quantum dots derived from filamentous fungi showed intense light green fluorescence under exposure to 254 nm UV radiation. The maximum emission of these PQCs was

exhibited when excited at a wavelength of 370 nm, and their fluorescence was shown to be dependent on the excitation wavelength.

Keywords: filamentous fungi, bimetallic nanoparticles, gold, palladium, biohybrids and carbon quantum dots.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Esquema proposto para a formação de bio-híbrido fungo/NPs-Au com cobertura de paládio (A). Imagens do MET do bio-híbrido *A.niger*/NPs-Au paladizado (B) e das nanopartículas de ouro e paládio com aumento de 400 000X (C).....31
- Figura 2.** Variação do intervalo entre as bandas eletrônicas (band gap δ) e densidade de estados com o aumento do número de átomos no sistema (da direita para esquerda).....34
- Figura 3.** Variação da dispersão em função do número total de átomos de uma partícula cúbica hipotética.....35
- Figura 4.** Número de mols de 4-nitrofenol reduzido em um sítio ativo por unidade de tempo (TOF), em função da cobertura superficial (sc %) de Pd em NPs-Au@Pd. ...37
- Figura 5.** Representação ilustrativa das bandas de condução e de valência e do nível de Fermi de um metal hipotético.38
- Figura 6.** Gráfico das taxas de decomposição do ácido fórmico monitoradas por RMN C13 sobre diferentes nanocatalisadores M@Pd, M = núcleo e Pd = invólucro metálico de Pd, na proporção 1:1, versus função trabalho do núcleo M, onde M = Ru, Rh, Pt, Ag e Au.39
- Figura 7.** Estruturas de nanopartículas bimetálicas: (A) Liga aleatória, (B) Liga ordenada, (C) Pequenos aglomerados com uma interface, (D) com três interfaces, (E) com menor número de ligações na interface, (F) Core-shell, (G) Core-shell com múltiplas camadas, (H) NPs com pequenos núcleos de um metal revestido por uma camada de outro metal e (I) NPs com núcleo móvel em um invólucro oco.....40
- Figura 8** Nanopartículas bimetálicas com diferentes formas e estruturas: (A) Nanoliga esféricas de Au-Ag. (B) Nanoplacas de Ag@Au Core-shell. (C) Nanobastões Au@Pd Core-shell. (D) Nano-caixas ocas e nanotubos. (E) Nano-molduras octaédricos de Au-Ag. (F) Nano-caixas de parede dupla de Au-Ag.....41
- Figura 9.** Representação esquemática do mecanismo de formação de nanopartículas esféricas de ouro.....44
- Figura 10.** Curva de LaMer descrevendo três estágios de formação de nanocristais metálicos coloidais. Estágio I: Produção de átomos, II: Nucleação e III: Formação de sementes e crescimento.....45

| | |
|--|----|
| Figura 11. Esquema do mecanismo de formação de nanopartículas bimetálicas via redução química. (A) Co-redução e (B) Redução sucessiva..... | 47 |
| Figura 12. Procedimento geral de síntese de nanopartículas bimetálicas coloidais utilizando a abordagem do crescimento mediado por sementes..... | 48 |
| Figura 13. Gráfico mostrando a variação na energia livre de Gibbs (ΔG) em função do tamanho da partícula (r) para nucleação homogênea (linha amarela) e nucleação heterogênea (linha azul)..... | 49 |
| Figura 14. Nanopartículas de ouro em diferentes formas geométricas e tamanhos. a) Nanobastões, b) Nanoconchas e c) Nanopoliedros. | 51 |
| Figura 15. Esquema do fenômeno de ressonância plasmônica de superfície em uma esfera metálica. | 52 |
| Figura 16: Espectro de absorção na região do UV-vis de nanopartículas de Au@Pd em função da espessura da camada de Pd metálico..... | 54 |
| Figura 17. Esquema ilustrativo da síntese de nanopartículas A@Pd com diferentes concentrações de íons Pd ²⁺ em massa..... | 59 |
| Figura 18. Imagem digital da solução coloidal de nanopartículas de ouro estabilizadas com íons citrato (A) e espectro de absorção na região do visível da referida solução (B). | 62 |
| Figura 19. Imagem digital das soluções coloidais de nanopartículas (da esquerda para direita): Au puras, Au@Pd 0,5, 2, 5, 20, 50 e 70 %(m/m) de metal Pd e Pd puras. .. | 66 |
| Figura 20. Espectro de absorção na região do UV-vis de nanopartículas de Au com diferentes porcentagens em massa do metal Pd. | 67 |
| Figura 21. Imagem digital de solução coloidal de nanopartículas bimetálicas Au@Pd com 0.5% (m/m) de Pd ⁰ recém-preparada e após 24 h (da esquerda para direita). . | 69 |
| Figura 22. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas (A) Au, (B) Au@Pd 5%, (C) Au@Pd 20% e (D) Au@Pd 50%, com aumento de 200.000X. | 70 |
| Figura 23. Imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de transmissão de (a) NPs-Au e NPs-Au@Pd com adição de (b) 20 mL, 5 mL (c) e (d) 0,5 mL de suspensão de NPs-Au..... | 71 |
| Figura 24. Micrografias obtidas pelo MET e histogramas do tamanho de partícula correspondentes (A) NPs-Au, (B) NPs-Au@Pd 20% e (C) NPs-Au@Pd 50%, com aumento de 100.000X..... | 72 |

| | |
|---|----|
| Figura 25. Curvas de distribuição de classes de diâmetro de partícula em número obtidas pelo espalhamento dinâmico da luz das nanopartículas de Au e de Au@Pd com diferentes concentrações de Pd ⁰ (em massa). | 74 |
| Figura 26. Representação esquemática das estruturas dos fungos filamentosos...81 | |
| Figura 27. Imagem digital de uma placa de fungo da espécie <i>Phialomyces macrosporus</i> e uma imagem obtida pelo microscópio ótico das suas hifas. | 81 |
| Figura 28. Representação da estrutura química da β -1,3-glucana ligada à uma cadeia de β -1,6-glucana. A unidade básica das β -glucanas presentes nos fungos é β -D-glicose. | 83 |
| Figura 29. Representação esquemática básica da estrutura da parede celular de fungos filamentosos. A parede celular é composta pela membrana celular, por uma matrix quitina/glucana e a uma camada externa rica em glicoproteínas. | 84 |
| Figura 30. Representação de uma nanopartícula metálica esférica ligada em uma macro-molécula de β -1,3-glucana por interação eletrostática..... | 85 |
| Figura 31. Imagem digital mostrando o efeito do micélio fúngico em uma suspensão de amianto. (A) Solução aquosa com amianto e (B) sem amianto dispersos em solução, após assimilação do mesmo pelo fungo. | 86 |
| Figura 32. Integração de nanopartículas de Au em fungos filamentosos. a) Imagem digital do meio de cultura com suspensão de nanopartículas de Au e esporos do fungo <i>Aspergillus niger</i> . b) Micélio fúngico de coloração vermelho intenso formado com a montagem das nanopartículas de Au nas hifas do fungo durante o seu crescimento. | 87 |
| Figura 33. Integração de nanopartículas de ouro na superfície de hifas fúngicas: (A) Ilustração esquemática do processo de automontagem das nanopartículas em fungos filamentosos em crescimento, (B) Imagem de MEV mostrando uma hifa densamente revestida por NPs-Au (barra de escala 20 μ m). | 89 |
| Figura 34. Imagens digitais de (a) estrutura híbrida ouro- <i>Penicillium citreonigrum</i> em uma suspensão de nanopartículas de ouro e (b) após a secagem por ponto crítico (barra da escala, 0,1 cm)..... | 90 |
| Figura 35. Gráfico mostrando as diferentes afinidades metálicas de sete fungos diferentes. Os resultados das frações atômicas metal:(carbono+metal) foram obtidas por espectroscopia de raios X por energia dispersiva..... | 91 |

| | |
|---|-----|
| Figura 36. Ilustração da formação de microtubos de ouro. (A) Os fungos são cultivados em meio de NPs-Au estabilizado com citrato. (B) O material híbrido é colhido e seco usando secagem por ponto crítico (SPC). (C) A calcinação de bio-híbridos fungo/NPs- Au produz microtubos de ouro..... | 93 |
| Figura 37. Esquema ilustrativo das diferentes regiões de composição das hifas. O centro das hifas é composto por NPs-Ag, em uma região intermediária, NPs-Ag e NPs-Au, e nas extremidades, apenas NPs-Au..... | 94 |
| Figura 38. Ilustrações esquemáticas da formação de ligação de hidrogênio entre D-glucoses ligadas à nanopartículas de Au e constituintes da parede celular fúngica: a) fragmento de proteína, b) quitina e c) glucanas. | 96 |
| Figura 39. Micrografia colorida falsa de MEV com alta resolução da superfície do bio-híbrido fungo/NPs-Au paladizado. As nanopartículas vermelhas correspondem às NPs-Au e as azuis são as NPs-AuPd..... | 98 |
| Figura 40. Imagem digital da cultura do fungo <i>Phialomyces macrosporus</i> em meio nutritivo sólido de BDA – Batata, Dextrose e Ágar. | 102 |
| Figura 41. Sistemas de cultivo do fungo Pm em suspensões de NPs-Au (I), NPs-Au@Pd (II) e sistema controle (III) composta por água ultrapura e esporos fúngicos. | 107 |
| Figura 42. Imagens digitais dos sistemas de cultivo contendo fungo <i>P. macrosporus</i> e NPs-Au@Pd, com 8 dias de incubação (A) e com 15 dias de incubação (B). Sistema controle contendo NPs-Au e dextrose (C) e sistema de cultivo de fungo <i>P. macrosporus</i> em suspensão de NPs-Au, com 8 dias de incubação (D)..... | 108 |
| Figura 43. Imagens digitais de amostras do fungo filamentosso <i>P. macrosporus</i> cultivado na ausência (A) e na presença (B) de NPs-Au. | 109 |
| Figura 44. Imagens obtidas por microscópio óptico do fungo sem NPs (A) e com NPs-Au@Pd com 50% (massa) de Pd (B) com ampliação de 1000X..... | 111 |
| Figura 45. Micrografias obtidas pelo MEV do fungo <i>P. macrosporus</i> (A) e (B), dos bio-híbridos fungo/NPs-Au (C) e (D), e fungo/NPs-Au@Pd (E) e (F), com aumento de 500 X (A, C e E) e 2.000 X (B, D e F). | 114 |
| Figura 46. Micrografia (A), mapa elementar do ouro (B) e espectro (C) obtidos por MEV-EDS do bio-híbrido formado pelo fungo Pm/NPs-Au no aumento de 7.500X. | 117 |

| | |
|---|-----|
| Figura 47. Micrografia (A), mapa elementar do ouro (B) e do carbono (C), e espectro (D) obtidos por MEV-EDS do bio-híbrido formado pelo fungo Pm/NPs-Au@Pd com 10% (m/m) de íons Pd ²⁺ no aumento de 7.500X..... | 119 |
| Figura 48. Micrografia (A), mapa elementar do ouro (B) e do paládio (C), e espectro (D) obtidos por MEV-EDS do bio-híbrido formado pelo fungo Pm/NPs-Au@Pd 50% (m/m) no aumento de 7.500X..... | 120 |
| Figura 49. Micrografias obtidas por MET de cortes transversais das hifas do fungo P. macrosporus após o cultivo em solução coloidal de NPs-Au@Pd com 50% (m/m) de íons Pd ²⁺ , nos aumentos de 15.000X (A), 50.000X (B) e 100.000X (C) e (D)..... | 122 |
| Figura 50. Micrografias obtidas por MET do micélio fúngico decorado com nanopartículas de ouro, nos aumentos de 50.000X (A) e 100.000X (B). I: Citoplasma; II: Camada interna da parede celular fúngica; III: Camada externa da parede celular, matriz composta polissacarídeos, glucanas e enzimas..... | 124 |
| Figura 51. Micrografias obtidas pelo MET de cortes longitudinais das hifas do fungo P. macrosporus após cultivo em solução coloidal de NPs-Au@Pd com 50%(m/m) de íons Pd ²⁺ , com magnificação de (a) 50.000X (B) 100.000X e (C) 15.000X. Distribuição de tamanho de partículas referente à imagem B (D)..... | 127 |
| Figura 52. Ilustração do ápice da hifa fúngica com destaque nas vesículas de Spitzenkörper envolvidas na síntese da parede celular e no crescimento apical dos fungos filamentosos. | 128 |
| Figura 53. Esquema ilustrativo da estrutura dos pontos quânticos de carbono. | 136 |
| Figura 54. Diagrama de energia simplificado mostrando o mecanismo de absorção e de fluorescência de um sistema fotoluminescente..... | 137 |
| Figura 55. Representação esquemática que mostra como transição a partir de um material contínuo qualquer para nanoescala muda os níveis de energia e o <i>band gab</i> (E_{bg}) em função do tamanho..... | 139 |
| Figura 56. Mecanismo de fluorescência dependente da excitação devido aos estados de superfícies originados pela hibridização dos níveis de energia dos grupos funcionais com os níveis dos átomos de carbono do núcleo dos pontos quânticos de carbono. | 141 |
| Figura 57. Esquema ilustrativo de obtenção de uma mistura de PQC's com emissão de fluorescência distintos, via síntese hidrotérmica (A), Oito amostras de PQC's | |

| | |
|---|-----|
| coletadas durante a purificação em coluna cromatográfica de sílica, sob radiação UV (365 nm) (B), e espectros de emissão de fluorescência das oito amostras (C). | 142 |
| Figura 58. Esquema ilustrativo mostrando o mecanismo de fluorescência dos pontos quânticos de carbono baseado no grau de oxidação superficial. | 143 |
| Figura 59. Os principais mecanismos de fotoluminescência dos pontos quânticos de carbono: A) Fotoluminescência induzida pelo núcleo grafítico, B) Estados de superfície e C) Fluorescência molecular. | 144 |
| Figura 60. Principais abordagens para produção de pontos quânticos de carbono: Top-down envolve quebra ou esfoliação de materiais de carbono para produzir pontos quânticos de carbono (PQCs) e de grafeno (PQGs), e bottom-up produção de pontos quânticos de carbono, de grafeno e poliméricos (PQPs) a partir de moléculas orgânicas ou polímeros. | 145 |
| Figura 61. Representação esquemática do mecanismo de formação de pontos quânticos de carbono pelo processo hidrotérmico. | 147 |
| Figura 62. Curva de pressão de vapor da água e condições de reações de diferentes conversões hidrotérmicas. | 148 |
| Figura 63. Esquema do mecanismo de formação de pontos quânticos de carbono a partir da molécula 4-aminoantipirina proposto por Mohammed e colaboradores. ... | 149 |
| Figura 64. Esquema ilustrativo da síntese hidrotérmica de pontos quânticos de carbono a partir da biomassa fúngica. | 154 |
| Figura 65. Biomassa obtida a partir do fungo filamentososo da espécie <i>P. macrosporus</i> antes (A) e após (B) a filtração a vácuo. | 156 |
| Figura 66. Estruturas químicas dos principais componentes presentes nas hifas fúngicas. | 157 |
| Figura 67. Imagem digital da amostra de pontos quânticos de carbono obtidos a partir do tratamento hidrotérmico da biomassa fúngica. | 157 |
| Figura 68. Esquema ilustrativo de um mecanismo de formação de pontos quânticos de carbono pelo método hidrotérmico proposto por Song e colaboradores. | 158 |
| Figura 69. Micrografia obtida pelo MET (A) e gráfico de distribuição de tamanho de partícula (B) dos pontos quânticos de carbono sintetizados a partir do fungo <i>Pm.</i> . | 160 |
| Figura 70. Imagem digital da suspensão de pontos quânticos de carbono sintetizados a partir da biomassa fúngica (a) sob luz visível e (b) radiação UV ($\lambda=254$ nm). | 160 |

| | |
|---|-----|
| Figura 71. Espectro de absorção na região do UV-vis dos pontos quânticos de carbono obtidos pelo método hidrotérmico da biomassa fúngica..... | 161 |
| Figura 72. Diagrama de energia com as principais transições eletrônicas envolvidas em compostos orgânicos..... | 163 |
| Figura 73. Espectro de absorção na região do UV-vis de pontos quânticos de carbono derivados do fungo <i>Boletus speciosus</i> obtido por Tu e colaboradores. | 164 |
| Figura 74. Espectros de fluorescência dos pontos quânticos de carbono derivados da biomassa fúngica, com excitação em diferentes comprimentos de onda..... | 165 |
| Figura 75. Mecanismo de emissão dos pontos quânticos de carbono induzido pelos estados de superfície. | 166 |
| Figura 76. Pontos quânticos de carbono obtidos com diferentes graus de passivação por grupo amino (-NH ₂). | 168 |
| Figura 77. Efeito do tamanho de partícula em relação à fotoluminescência dos PQC's. (a) variação do Gap de energia em função do número de anéis aromáticos e (b) variação do comprimento de onda de emissão em função do diâmetro dos pontos quânticos de grafeno..... | 170 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LBQM Laboratório de Biotecnologia e Química de Microrganismos

DNA Ácido desoxirribonucleico

NPs-Au Nanopartículas de ouro

NPs-Pd Nanopartículas de paládio

NPs-Au@Pd Nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio *core-shell*

Pm *Phialomyces macrosporus*

Bs *Boletus speciosus*

NPs Nanopartículas

Pm/NPs-Au Bio-híbrido constituído por nanopartículas de Au e o fungo

Phialomyces macrosporus

Pm/NPs-Au@Pd Bio-híbrido constituído por nanopartículas bimetálicas de Au e Pd

e fungo *Phialomyces macrosporus*

Fungos/NPs-Au Bio-híbrido constituído por nanopartículas de Au e fungos filamentosos

Fungos/NPs-Au@Pd Bio-híbrido constituído por nanopartículas bimetálicas de

Au@Pd e fungos filamentosos

MEV Microscopia eletrônica de varredura

MO Microscopia óptica

MET Microscopia eletrônica de transmissão

DLS Espalhamento de luz dinâmico

pH Potencial hidrogeniônico

EDX/EDS Espectroscopia por energia dispersiva de raios X

XPS Espectroscopia de fotoelétrons por raios X

FTIR Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

UV-vis Ultravioleta e visível

UFBA Universidade Federal da Bahia

BDA Batata, dextrose e ágar

MOFs Estruturas metal-orgânicas

PQCs Pontos quânticos de carbono

SPZ Vesículas de Spitzenkörper

d Diâmetro de partícula

sc Cobertura superficial

HOMO Orbital molecular preenchido de mais alta energia

LUMO Orbital molecular vazio de mais baixa energia

TOM Teoria do orbital molecular

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| JUSTIFICATIVA | 22 |
| CAPÍTULO I | 26 |
| SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS PARA INTEGRAÇÃO EM FUNGOS FILAMENTOSOS | 26 |
| 1.1 INTRODUÇÃO | 27 |
| 1.2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 32 |
| 1.2.1 NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS | 32 |
| 1.2.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS | 42 |
| 1.2.3 PROPRIEDADES ÓPTICAS DAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS | 51 |
| 1.3 OBJETIVOS..... | 57 |
| 1.3.1 OBJETIVO GERAL | 57 |
| 1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 57 |
| 1.4 PARTE EXPERIMENTAL | 58 |
| 1.4.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS Au@Pd..... | 58 |
| 1.4.1.1 REAGENTES..... | 58 |
| 1.4.1.2 PROCEDIMENTOS..... | 58 |
| 1.4.2 CARACTERIZAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS Au@Pd | 60 |
| 1.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 61 |
| 1.5.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS Au@Pd E ESTUDO DO EFEITO DA ADIÇÃO DO METAL Pd SOBRE AS PROPRIEDADES ÓPTICAS DAS NANOPARTÍCULAS DE Au..... | 61 |
| 1.5.2 AVALIAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DAS NPs-Au@Pd COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO METAL Pd | 69 |

| | |
|--|-----|
| 1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 75 |
| CAPÍTULO II | 77 |
| USO DE FUNGOS FILAMENTOSOS COMO SUPORTE BIOLÓGICO PARA O PREPARO DE MATERIAIS HÍBRIDOS | 77 |
| 2.1 INTRODUÇÃO | 78 |
| 2.2 REVISÃO DA LITERATURA | 79 |
| 2.2.1 USO DE FUNGOS COMO SUPORTE BIOLÓGICO PARA SÍNTESE DE MATERIAIS HÍBRIDOS | 79 |
| 2.2.2 MATERIAIS HÍBRIDOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS | 85 |
| 2.3 OBJETIVOS | 100 |
| 2.3.1 OBJETIVO GERAL | 100 |
| 2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 100 |
| 2.4 PARTE EXPERIMENTAL | 101 |
| 2.4.1 PROCEDIMENTO DE SÍNTESE DE BIO-HÍBRIDOS FUNGO/NPs-Au@Pd 101 | |
| 2.4.2 CARACTERIZAÇÕES DE AMOSTRAS DE BIO-HÍBRIDOS FUNGO/NPs-Au@Pd E FUNGO/NPs-Au | 103 |
| 2.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 106 |
| 2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 130 |
| CAPÍTULO III | 132 |
| USO DE FUNGOS FILAMENTOSOS COMO PRECURSOR PARA SÍNTESE DE PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO..... | 132 |
| 3.1 INTRODUÇÃO | 133 |
| 3.2 REVISÃO DA LITERATURA | 135 |
| 3.2.1 PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO: SÍNTESE, BIOMASSA FÚNGICA E PROPRIEDADES ÒPTICAS | 135 |
| 3.3 OBJETIVOS | 151 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.3.1 | OBJETIVO GERAL | 151 |
| 3.3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 151 |
| 3.4 | PARTE EXPERIMENTAL | 152 |
| 3.4.1 | SÍNTESE DE PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO A PARTIR DA BIOMASSA FÚNGICA..... | 152 |
| 3.5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 155 |
| 3.6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 171 |
| 4. | CONCLUSÕES GERAIS | 172 |
| 5. | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 174 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 176 |

JUSTIFICATIVA

A nanotecnologia tem ganhado especial atenção com relação à pesquisa e desenvolvimento nos últimos anos, devido ao seu grande impacto em diversos setores, como na indústria petroquímica, farmacêutica, alimentícia, de cosméticos; na área da saúde, no diagnóstico e tratamento de doenças, como o câncer, e também no setor ambiental (SHARMA *et al.*, 2017). A nanotecnologia é uma ciência com engenharia e tecnologia capazes de observar, medir, manipular, montar, controlar e fabricar matéria em escala nanométrica (10^{-9}m). Esta matéria, cujas dimensões se encontram na nanoescala, é definida como nanomaterial (BAYDA *et al.*, 2020).

A ampla aplicação dos nanomateriais se deve ao fato de suas características serem bem distintas do seu respectivo material macroscópico; diante disso, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas com intuito de aperfeiçoar cada vez mais o desempenho das nanopartículas metálicas (RODUNER, 2006). Além disso, dentre as espécies de nanopartículas mais estudadas atualmente, encontram-se em destaque as nanopartículas bimetálicas (ZALESKA-MEDYNSKA *et al.*, 2015).

As nanopartículas bimetálicas são partículas com tamanho menor que 100 nm, cuja composição apresenta dois elementos metálicos diferentes (TOSHIMA; YONEZAWA, 1998). A combinação de dois átomos de elementos químicos diferentes na estrutura das nanopartículas pode resultar na melhoria das suas propriedades catalíticas e eletrônicas (ZHAO *et al.*, 2013; PRETZER *et al.*, 2016; SRISOMBAT *et al.*, 2017). Fatores como composição química, tamanho de partícula, forma e estrutura influenciam diretamente nas propriedades físico-químicas das nanopartículas bimetálicas (RODUNER, 2006).

A simples adição de um segundo metal na estrutura de uma nanopartícula metálica pode provocar uma alteração significativa na sua distribuição eletrônica, que por sua vez contribui para o surgimento de novos efeitos somente observáveis nas nanopartículas bimetálicas (STRASSER *et al.*, 2016). Uma compreensão clara da influência da interação de átomos de elementos metálicos diferentes sobre as propriedades das nanopartículas bimetálicas é de suma importância, visto que a

aplicabilidade das mesmas está diretamente relacionada com as características apresentadas por estes nanomateriais.

A síntese de nanomateriais para integração em sistemas biológicos tem aberto um caminho para o surgimento de uma nova classe de materiais, os bio-híbridos (BIGALL; EYCHMÜLLER, 2010; SABAH *et al.*, 2013; FONTES *et al.*, 2014). Esses biosistemas são geralmente formados pelo cultivo de microrganismos, como, por exemplo, fungos filamentosos, em um meio contendo nanomateriais que são assimilados na estrutura extracelular do organismo durante o seu crescimento através do metabolismo do carbono (SUGUNAN *et al.*, 2007). Logo, esta combinação sinérgica de células vivas com nanomateriais pode formar materiais híbridos com propriedades interessantes que podem ser empregados em aplicações úteis.

Uma das principais razões para a construção e estudo dos bio-híbridos é a possibilidade de melhorar ou até mesmo criar características que não são encontradas nos microrganismos. Por exemplo, o grupo do pesquisador Alexander Eychmuller mostrou que os fungos filamentosos podem se tornar ativos em reações catalíticas após adquirir uma cobertura de metal nobre em toda a sua superfície (BIGALL *et al.*, 2008). Por outro lado, o nosso grupo de pesquisa LBQM mostrou que fungos filamentosos podem emitir luz vermelha ou verde quando são incorporadas partículas metalorgânicas de lantanídeos (Ln-MOFs) na parede celular (ROSÁRIO *et al.*, 2019).

No entanto, existem algumas limitações que ainda precisam ser melhoradas para essa classe de materiais; como exemplo, a baixa afinidade frente às nanopartículas formadas por alguns elementos metálicos, como platina, paládio e prata (BIGALL *et al.*, 2008; FONTES *et al.*, 2021). Diante desse desafio, em um dos trabalhos científicos publicados pelo nosso grupo de pesquisa, foi apresentada uma estratégia de deposição do metal paládio sobre fungos filamentosos. Para isso, Fontes e colaboradores (2021) realizaram a deposição de metal paládio sobre superfície de nanopartículas de ouro previamente incorporadas na parede celular de fungos, pois, com base nas pesquisas anteriormente realizadas em nosso grupo, as nanopartículas de ouro são facilmente assimiladas pelos mesmos (FONTES *et al.*, 2014). Com este mecanismo, foi obtido bio-híbridos constituídos de fungos filamentosos com uma combinação de nanopartículas de ouro e de paládio, com capacidade de catalisar reações de hidrogenação em temperatura ambiente (FONTES *et al.*, 2021).

Os trabalhos científicos citados acima mostram que a replicação de estruturas biológicas complexas pelos materiais inorgânicos utilizando-se fungos filamentosos como molde pode resultar em materiais avançados com multifuncionalidades. As características estruturais dos fungos filamentosos, como morfologia tubular uniforme, com diâmetro de 1-30 μm e comprimentos que variam de alguns microns a vários metros, dependendo da espécie e do meio de crescimento, podem formar materiais com alta área superficial interessante para aplicação em catálise (BIGALL *et al.*, 2008; ISLAM *et al.*, 2017; ULLAH *et al.*, 2017). Além disso, com a funcionalização da superfície de fungos filamentosos com nanopartículas, é possível obter facilmente microtubos inorgânicos por meio de uma simples remoção da matéria orgânica, a fim de utilizá-los como sensores químicos (KUBO *et al.*, 2017; PAL *et al.*, 2019).

Com base nos trabalhos científicos anteriormente citados, pode-se perceber que a ênfase dessas pesquisas está na funcionalização da superfície de fungos filamentosos com nanopartículas de metais nobres e sua aplicação em catálise e sensores, de modo que muitos aspectos científicos relevantes ainda não foram investigados, como por exemplo, o quanto de nanopartículas de metais nobres podem ser incorporados nas células fúngicas sem inibir o seu desenvolvimento, especificamente o metal paládio que é tóxico para o microrganismo. Desta forma, abre-se um novo caminho para estudos sobre os efeitos das nanopartículas de paládio sobre o ciclo de vida do fungo. Diante disso, como uma das motivações desta pesquisa de doutorado, tem-se pela primeira vez, o uso do metal paládio para o preparo de suspensão de nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio para posterior integração em fungos filamentosos.

Nos últimos anos, a busca de metodologias de síntese verde de nanomateriais tem despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores. O uso de microrganismos (bactérias, algas e fungos) como fonte de carbono na produção de pontos quânticos de carbono (PQCs) tem se tornado uma alternativa aos métodos de sínteses tradicionais que empregam, geralmente, reagentes tóxicos e dispendiosos (LIU *et al.*, 2019). Por ter uma composição rica em água, proteínas, lipídios, entre outros componentes, os microrganismos são considerados um precursor ideal para a produção de PQCs com excelentes propriedades fluorescentes (DINÇ; KARA; YAVUZ, 2022). No que diz respeito aos fungos filamentosos, há poucos trabalhos publicados que utilizam este microrganismo como biomassa para produção de PQCs.

Diante do exposto, o presente trabalho de doutorado propôs a síntese e a caracterização de materiais híbridos formados por fungos filamentosos e nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio, bem como uma nova metodologia de síntese de pontos quânticos de carbono a partir da biomassa obtida por fungos filamentosos. Esta tese de doutorado está dividida em três capítulos, sendo que o primeiro capítulo abordará uma fundamentação teórica sobre as nanopartículas bimetálicas, mostrando os principais métodos de preparo, os tipos de estruturas e as suas propriedades físico-químicas. Além disso, será apresentado a síntese de nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio, com adição controlada do metal paládio sobre a superfície de nanopartículas de ouro, e o efeito da variação de concentração do metal Pd sobre o comportamento óptico das nanopartículas de ouro.

O segundo capítulo desta tese abordará uma revisão da literatura a respeito da síntese de materiais híbridos constituídos por fungos filamentosos e nanopartículas metálicas pelo processo de auto-montagem e também será apresentado um método inédito de síntese de materiais híbridos constituído por células vivas fúngicas e nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio, bem como suas caracterizações. No terceiro capítulo será abordada uma revisão da literatura sobre os pontos quânticos de carbono, as metodologias usadas no seu preparo e a origem da sua propriedade fotoluminescente. Por fim, será apresentada uma nova proposta de síntese de pontos quânticos de carbono obtidos a partir da biomassa fúngica.

CAPÍTULO I

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS PARA INTEGRAÇÃO EM FUNGOS FILAMENTOSOS

1.1 INTRODUÇÃO

Basicamente, a nanociência consiste no estudo de fenômenos e de materiais na faixa da escala nanométrica. O prefixo 'nano' refere-se a um prefixo grego que significa 'anão' ou algo muito pequeno e representa 10^{-9} m (RAMSDEN, 2005; BAYDA *et al.*, 2020). Os materiais que possuem pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica são conhecidos como nanomateriais (SHARMA *et al.*, 2017). A nanotecnologia por sua vez é a capacidade de converter o conhecimento da nanociência em aplicação útil por meio da fabricação de nanomateriais e da sua integração em sistemas maiores (NASROLLAHZADEH *et al.*, 2019; BAYDA *et al.*, 2020). Por isso, a nanotecnologia vem ganhando especial atenção devido ao seu grande impacto em diversos setores (outrora citados), como a indústria petroquímica, farmacêutica, de cosméticos, de alimentos e na medicina (ABBAS *et al.*, 2009; PENG *et al.*, 2018; AL-NEMRAWI, ABUALSAMEN, ALZOUBI, 2020; ANGELOPOULOU, GIAOURIS, GARDIKIS, 2022; DHANJAL *et al.*, 2022).

Os nanomateriais apresentam propriedades bem distintas do seu respectivo material massivo de mesma composição química. Isso porque existe um tamanho crítico abaixo do qual as propriedades físico-químicas do material são alteradas (ZARBIN, 2007). Por exemplo, o ouro metálico possui um brilho único e coloração amarelada, alta condutividade térmica ($3,1 \text{ J cm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e baixa reatividade (SCHWERDTFEGGER, 2002; JUNQUEIRA; SILVA; GUERRA, 2012). Por outro lado, as nanopartículas coloidais de ouro (NPs-Au) com tamanho de ~ 5 nm apresentam coloração vermelho rubi e alta fração de átomos na superfície pelo volume, o que as torna bastante reativas e por isso são utilizadas como catalisadores frente a algumas reações químicas, como hidrogenação de aldeídos insaturados e oxidação de CO (GRISEL *et al.*, 2002; DANIEL; ASTRUC, 2004; MCEWAN *et al.*, 2010).

Os materiais apresentam uma estrita dependência com o tamanho de suas partículas, ou seja, todas as suas propriedades óticas, elétricas, catalíticas, magnéticas são modificadas quando é ultrapassado o tamanho crítico deste material (RODUNER, 2006). Segundo Zarbin (2007), "só existe um nanomaterial se existir uma propriedade que se manifesta exclusivamente devido ao tamanho reduzido, e esta propriedade é diferente do material massivo" (ZARBIN, 2007). Desta forma, mais uma característica pode ser acrescentada à definição de nanomateriais: materiais que

possuem pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica, abaixo do tamanho crítico capaz de alterar alguma de suas propriedades (ZARBIN, 2007). Essas alterações nas propriedades dos nanomateriais ocorrem devido ao surgimento dos efeitos de confinamento quântico e de superfície, que são observados somente em partículas com tamanho em escala nanométrica. Por esta razão, esses materiais são considerados como espécies intermediárias entre o material macroscópico e os átomos e as moléculas (RODUNER, 2006; MARTINS; TRINDADE, 2012).

Os nanomateriais podem ser divididos em diferentes classes, de acordo com a sua composição e propriedades, os quais pode-se citar: nanotubos de carbono, nanocompósitos, nanopartículas metálicas, materiais poliméricos, cerâmicos e biomateriais (KHAN, SAEED, KHAN, 2017). Dentre estes materiais, os mais estudados atualmente encontram-se as nanopartículas metálicas, que são partículas com tamanhos menores que 100 nm originadas a partir de precursores metálicos (CUENYA, 2010; KHAN, SAEED, KHAN, 2017).

As nanopartículas de metais nobres, como Au, Ag e Cu, apresentam propriedades ópticas exclusivas devido ao fenômeno da ressonância plasmônica de superfície característico desta classe de nanomateriais (RODUNER, 2006; KHAN, SAEED, KHAN, 2017). Por causa destas propriedades, as nanopartículas metálicas vêm sendo amplamente utilizadas na fabricação de sensores eletroquímicos, equipamentos eletrônicos, catalisadores e no diagnóstico e tratamento de doenças, como o câncer (GU *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2019; ISLAM *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2022).

As nanopartículas metálicas podem ser constituídas por um (monometálicas), dois (bimetálicas) ou mais (multi-metálicas) elementos metálicos diferentes. As nanopartículas bimetálicas têm sido bastante investigadas nos últimos anos devido às alterações observadas nas propriedades físico-químicas causadas pela interação de dois metais distintos (ZALESKA-MEDYNSKA *et al.*, 2015; GILROY *et al.*, 2016). Estudos mostram que a combinação de dois tipos de metais na estrutura das nanopartículas resulta na melhoria das suas propriedades catalíticas e eletrônicas, podendo até causar o surgimento de novas propriedades que não são manifestadas nas partículas monometálicas (TOSHIMA & YONEZAWA, 1998; ZALESKA-MEDYNSKA *et al.*, 2015).

Além da composição química das nanopartículas metálicas, o seu tamanho, forma e estrutura influenciam diretamente nas suas propriedades físico-químicas, que

por sua vez estão intimamente relacionadas com o método e as condições de preparo das mesmas (RODUNER, 2006; KHAN, SAEED, KHAN, 2017). A depender do tipo de metodologia usada no processo de síntese, pode-se obter nanopartículas bimetálicas com variados arranjos estruturais, formas e tamanhos, que por sua vez irá refletir em um produto final com propriedades distintas (RODUNER, 2006; GILROY *et al.*, 2016; LOZA; HEGGEN; EPPLE, 2020). Desta forma, a investigação por melhores metodologias de síntese de nanopartículas bimetálicas tornou-se uma necessidade devido à importância de obter um nanomaterial com características de interesse.

Nas últimas décadas, uma nova classe de materiais híbridos constituído por fungos filamentosos e nanopartículas metálicas tem estado em evidência devido à possibilidade de combinar as propriedades dos nanomateriais com as funções biológicas dos microrganismos (LI *et al.*, 2003; SUGUNAN *et al.*, 2007; BIGALL, EYCHMÜLLER, 2010). Os bio-híbridos são formados por um suporte biológico, como por exemplo fungos filamentosos, e uma camada extracelular constituída por nanomateriais que envolve toda a superfície do microrganismo (SUGUNAN *et al.*, 2007; FONTES *et al.*, 2014). A morfologia tubular uniforme dos fungos filamentosos e a facilidade de incorporar nanopartículas de diferentes metais têm sido uma das grandes vantagens para utilização destes microrganismos como suporte biológico para o preparo de bio-híbridos (BIGALL *et al.*, 2008; ULLAH *et al.*, 2017).

A integração de nanopartículas metálicas na parede celular de fungos filamentosos pode conferir propriedades físico-químicas diferentes a dos nanomateriais do que se os mesmos estivessem dispersos em uma solução (LI *et al.*, 2003). Por exemplo, as nanopartículas de paládio (NPs-Pd) possuem excelentes propriedades catalíticas, por esta razão são bastante utilizadas em reações químicas complexas, como reações de acoplamento C – C (LI *et al.*, 2005; SALDAN *et al.*, 2015). Por outro lado, a atividade catalítica das NPs-Pd pode aumentar consideravelmente se as mesmas fossem depositadas sobre a parede celular de fungos filamentosos, pois aumentaria a área superficial do material e consequentemente o número de sítios ativos disponíveis para catálise (BIGALL *et al.*, 2008; FONTES, 2016). Além disso, a microestrutura tubular composta pelo metal paládio pode ser facilmente utilizada em reações catalíticas tanto na fase líquida quanto em fase gasosa (BIGALL, EYCHMÜLLER, 2010).

Diferentes tipos de metais nobres podem ser depositados na superfície da parede celular dos fungos filamentosos, por exemplo, Bigall e demais pesquisadores (2008) mostraram que diferentes espécies de fungos filamentosos apresentaram afinidade por nanopartículas de ouro, de prata, de platina e de paládio estabilizadas por ânion citrato. Por meio de medidas de EDS/EDX (espectroscopia de raios X por energia dispersiva) das amostras de bio-híbridos, os pesquisadores verificaram que o crescimento do micélio fúngico foi 10 vezes maior para o sistema contendo nanopartículas de ouro se comparado com os sistemas contendo nanopartículas de paládio ou de platina (BIGALL *et al.*, 2008). A toxicidade do metal paládio frente a células e microrganismos já tem sido relatada em diversos trabalhos científicos (MALLIKARJUNA *et al.*, 2013; IAVICOLI *et al.*, 2017; RABIEE *et al.*, 2020), o que justifica a baixa afinidade dos fungos filamentosos frente a este metal.

Na tentativa de contornar essa baixa afinidade dos fungos filamentosos com nanopartículas de paládio, o nosso grupo de pesquisa LBQM desenvolveu um trabalho onde bio-híbridos fúngicos paladizados foram obtidos pela deposição do paládio metálico sobre nanopartículas de ouro previamente integradas na superfície dos fungos, já que os mesmos apresentam alta afinidade com NPs-Au, como foi mostrado pelo trabalho de Bigall e colaboradores (2008) citado anteriormente. Este bio-híbrido fúngico com superfície rica em paládio mostrou-se ser cataliticamente ativo em reações de hidrogenação à temperatura ambiente (FONTES, 2016; FONTES *et al.*, 2021).

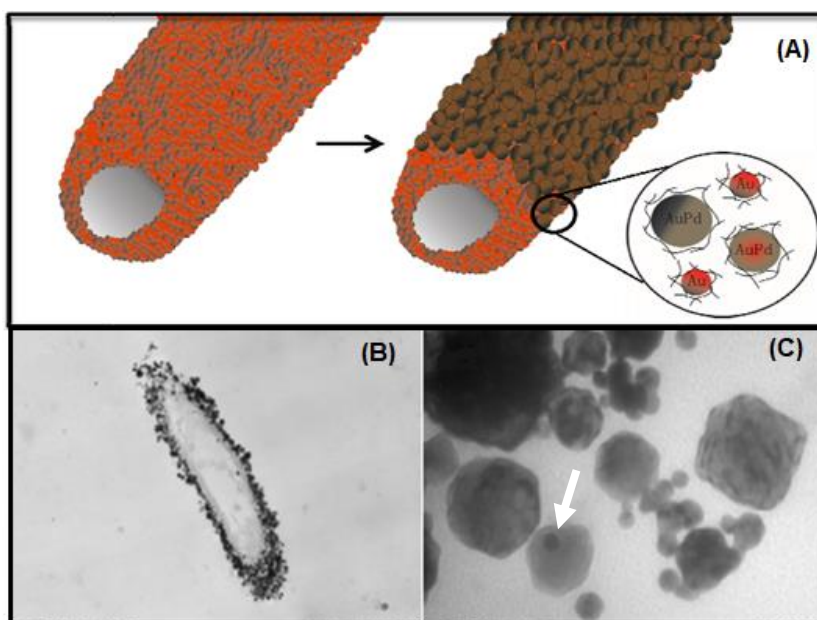
No preparo destes bio-híbridos fungo/NPs-Au paladizados, segundo os pesquisadores, as nanopartículas de ouro decoradas na parede celular do fungo atuaram como “sementes” no processo de deposição do metal Pd⁰ sobre a sua superfície, após a redução dos íons Pd²⁺ com ácido ascórbico (FONTES, 2016; FONTES *et al.*, 2021). Assim, neste processo, foram formadas nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio (NPs-Au@Pd) sobre o micélio fúngico, como é mostrado no esquema ilustrativo da Figura 1(A).

Com base nas micrografias do bio-híbrido fungo/NPs-Au@Pd obtidas no microscópio eletrônico de transmissão, as quais foram retiradas do trabalho científico publicado por Fontes e colaboradores (2021), observa-se na imagem representada pela Figura 1B uma seção transversal do fungo revestido com uma camada densa de nanopartículas metálicas. Nesta imagem foi possível confirmar a formação de

nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio sobre a superfície do fungo (FONTES *et al.*, 2021). No entanto, na Figura 1C é mostrada uma micrografia das nanopartículas com detalhes com um aumento de 400 000X, onde é possível perceber irregularidades na forma das nanopartículas (não-esféricas) e não uniformidade na cobertura da camada de paládio nas NPs-Au (conforme indicado pela seta na Fig. 1C) (FONTES *et al.*, 2021).

Como as propriedades das nanopartículas bimetálicas são estritamente dependentes da composição e espessura da camada metálica externa, é de suma importância a obtenção de nanopartículas bimetálicas com formas e estruturas regulares, e com uma cobertura uniforme de metal paládio sobre as NPs-Au; já que, esses fatores (forma, estrutura e espessura da camada externa) influenciam diretamente nas características dos bio-híbridos fúngicos, e por fim na sua aplicabilidade (KUBO *et al.*, 2017; FONTES *et al.*, 2021).

Figura 1. Esquema proposto para a formação de bio-híbrido fungo/NPs-Au com cobertura de paládio (A). Imagens do MET do bio-híbrido *A.niger*/NPs-Au paladizado (B) e das nanopartículas de ouro e paládio com aumento de 400 000X (C).



Fonte: Adaptado de FONTES, 2016 e FONTES *et al.*, 2021.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho de doutorado consiste na síntese e caracterização de nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio com adição

controlada do metal Pd sobre a superfície das nanopartículas de ouro, para posterior integração em fungos filamentosos. Além disso, a intenção de produzir nanopartículas de ouro revestidas com metal paládio para deposição em células fúngicas consiste na aplicação deste bio-material em reações químicas para o estudo de uma possível atividade catalítica.

Neste primeiro capítulo será apresentado uma revisão da literatura sobre as nanopartículas bimetálicas, as metodologias comumente utilizadas para a sua síntese, os tipos de estruturas obtidas, bem como as suas propriedades físico-químicas. Além disso, serão abordados também os diferentes efeitos que podem surgir com a adição de um segundo metal na composição de uma nanopartícula monometálica. Por fim, será mostrado o procedimento de preparo de suspensões de nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio com estrutura do tipo *core-shell* (NPs-Au@Pd), ou seja, nanopartículas com núcleo formado de Au e envolto em uma camada de metal Pd; e as caracterizações realizadas nestas soluções coloidais. Será apresentado também os resultados do estudo da influência da adição do metal paládio sobre o comportamento óptico das nanopartículas de ouro.

1.2 REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1 NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS

As nanopartículas bimetálicas têm sido bastante investigadas, devido a possibilidade de aplicações em diversos ramos científicos e tecnológicos, como em catálise, fotocatalise, energia solar e na fabricação de sensores (NUTT *et al.*, 2006; LI, CHEN, 2015; LUO *et al.*, 2018; URZÚA *et al.*, 2022). Estudos mostram que a sua ampla aplicabilidade se deve ao fato das propriedades físico-químicas exclusivas deste nanomaterial, as quais são resultantes da combinação de dois tipos de metais distintos e a possibilidade de formação de diferentes formas estruturais (LIU, WECHSLER, ZHANG, 2008; GILROY *et al.*, 2016).

A interação de dois elementos químicos metálicos diferentes na estrutura das nanopartículas pode melhorar as propriedades catalíticas e eletrônicas, e até mesmo favorecer o aparecimento de novas propriedades ausentes nas nanopartículas

monometálicas (TOSHIMA & YONEZAWA, 1998). Um exemplo que pode ser citado refere-se ao aumento da atividade catalítica de nanopartículas de ouro recobertas por átomos de Pd frente à reação de redução do *p*-nitrofenol com borohidreto de sódio, mostrando-se ser mais eficiente do que as nanopartículas de ouro e de paládio puras (SRISOMBAT *et al.*, 2017).

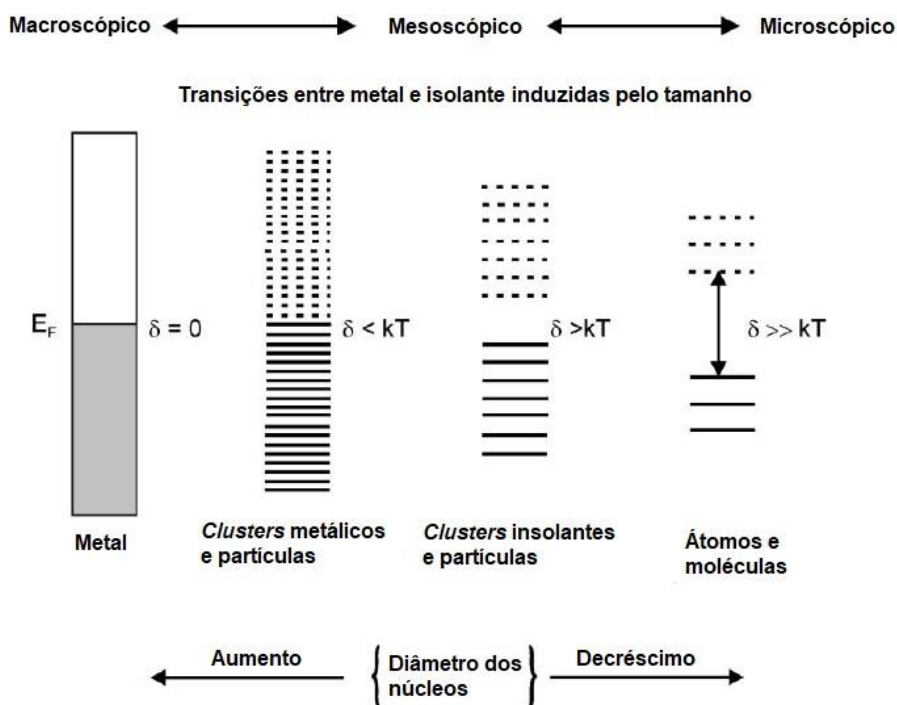
Para entender o motivo dessas alterações é preciso conhecer os fatores que contribuem para o surgimento das propriedades das nanopartículas monometálicas, para então compreender o que acontece em sistemas mais complexos, como é o caso das nanopartículas bimetálicas. O comportamento de átomos e elétrons em materiais com tamanhos nanométricos é bem diferente daqueles em nível macroscópico, e quanto menor o tamanho da partícula mais evidente são os efeitos quânticos e de superfície (MELO & PIMENTA, 2004; ZARBIN, 2007). Tais fatores são responsáveis pelas mudanças observadas nas propriedades das nanopartículas metálicas (RODUNER, 2006).

As propriedades físico-químicas de um material são resultantes do grau de mobilidade dos seus elétrons, que por sua vez está relacionado com o espaço que os mesmos estão confinados, ou seja, com a dimensão espacial do material (RODUNER, 2006). Segundo a teoria de bandas, os orbitais atômicos de valência de um átomo de um metal se sobrepõem com outros orbitais atômicos de átomos vizinhos, para formar orbitais moleculares. Essa combinação dos orbitais atômicos originam os orbitais moleculares ligantes (de menor energia) e antiligantes (de maior energia) e, o número de orbitais moleculares formados é igual ao número de orbitais atômicos que se sobrepõem (BROWN *et al.*, 2016).

À medida que o número de átomos metálicos aumenta, o número de orbitais moleculares também aumenta, e a interação entre eles dá origem às bandas de energia, as quais se estendem por toda a estrutura do metal. A diferença energética entre os orbitais moleculares é tão pequena, que o agrupamento desses orbitais resulta em uma banda contínua de estados energéticos permissíveis. Os elétrons deste metal podem se mover livremente entre a banda de valência (totalmente preenchida pelos elétrons) e a banda de condução (não preenchida, ou seja, vazia), como está representada pela estrutura de bandas, no lado esquerdo da Figura 2 (BROWN *et al.*, 2016).

Portanto, de acordo com a teoria de bandas, em um metal macroscópico devido a sua estrutura de bandas, os seus elétrons podem se mover livremente por todo material. Desta forma, pode-se dizer que os elétrons estão menos confinados nesta estrutura eletrônica. Logo, o movimento dos elétrons de um metal não é quantizado, ou seja, uma pequena quantidade de energia absorvida é suficiente para perturbar o sistema, já que não existe uma separação energética entre as bandas de valência e de condução, como é mostrado na Figura 2. Por esta razão, os metais apresentam propriedades condutoras mesmo em baixas temperaturas (EL- SAYED, 2001).

Figura 2. Variação do intervalo entre as bandas eletrônicas (*band gap* δ) e densidade de estados com o aumento do número de átomos no sistema (da direita para esquerda).



Fonte: Adaptado de RODUNER, 2006.

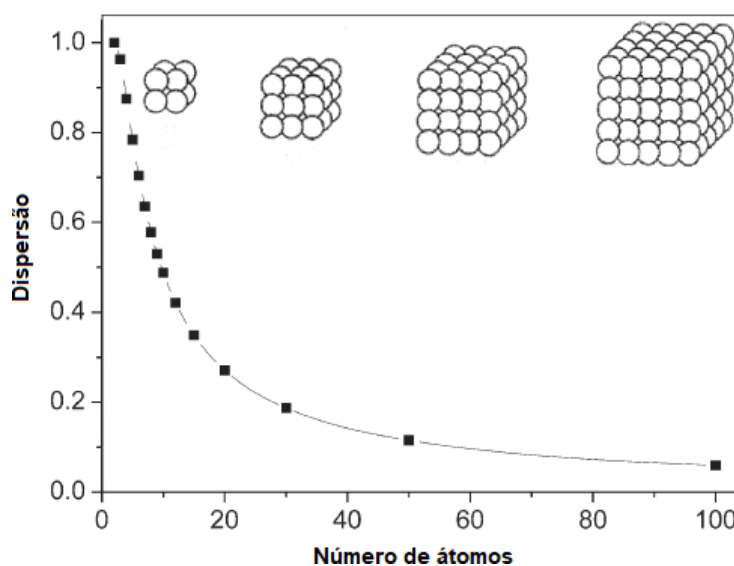
Ao reduzir as dimensões físicas deste mesmo material a nível nanométrico, aumenta-se o confinamento dos elétrons e o seu movimento torna-se quantizado, já que os níveis energéticos deixam de ser contínuos para torna-se discretos. Além disso, surge uma pequena separação energética entre as bandas de valência e de condução, denominada de *band gap* δ , cujo valor é igual ou maior que a energia térmica, kT (Figura 2). Desta forma, o metal com características condutoras torna-se um metal semiconductor. Ao passo que, aumenta-se cada vez mais o confinamento

eletrônica, observa-se um aumento no *band gap* ($\delta \gg kT$), tornando o material semiconductor em um isolante (EL-SAYED, 2001). Deste modo, as nanopartículas metálicas apresentam propriedades químicas e físicas diferentes dos seus respectivos materiais macroscópicos devido ao maior confinamento eletrônico resultante do seu tamanho reduzido.

Já, o efeito de superfície está relacionado com a dispersão de uma partícula, que é definida como fração de átomos na superfície em relação ao número de total de átomos. A dispersão pode ser medida pela razão entre área superficial e o volume da partícula (RODUNER, 2006). Segundo Roduner (2006), quanto menor o número total de átomos de uma partícula, ou seja, quanto menor o seu tamanho, maior é a fração de átomos situados em sua superfície (dispersão), como pode ser observado na curva de dispersão em função número total de átomos de uma dada partícula cúbica hipotética representada pela Figura 3.

Os átomos localizados na superfície apresentam comportamento diferente daqueles localizados no interior da partícula. Os átomos da superfície apresentam um menor número médio de coordenação, isto é, têm menor número de átomos vizinhos próximos se comparado com os átomos situados no interior da partícula. Por esta razão, os átomos internos são mais estáveis do que aqueles situados na superfície, devido ao maior número de ligações entre os átomos vizinhos (RODUNER, 2006).

Figura 3. Variação da dispersão em função do número total de átomos de uma partícula cúbica hipotética.



Fonte: Adaptado de RODUNER, 2006.

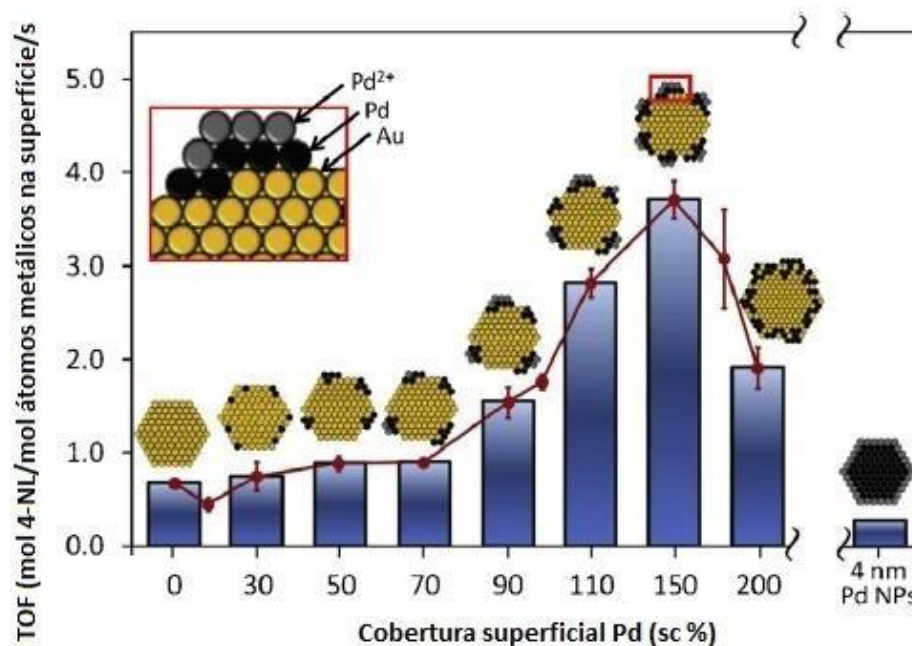
Considerando-se uma partícula hipotética com estrutura cúbica, os átomos localizados nos vértices são menos coordenados do que os átomos das arestas, seguido daqueles situados na superfície plana; assim, os átomos dos vértices têm uma maior disponibilidade para interagir com moléculas adsorvidas, ou seja, são mais reativos. Devido ao efeito de superfície, as nanopartículas de ouro de poucos nanômetros, por exemplo, apresentam uma excelente atividade catalítica frente a diversas reações, ao passo que o ouro em nível macroscópico é considerado um material inerte (RODUNER, 2006).

No que tange às nanopartículas bimetálicas, a adição de um segundo metal na composição de uma nanopartícula monometálica pode ocasionar o surgimento de novos efeitos, cujo o entendimento ainda está em debate devido a sua ampla complexidade. Segundo Strasser e colaboradores (2016), existem três efeitos que podem contribuir para a mudança nas propriedades físico-químicas das nanopartículas bimetálicas, são eles: o efeito *ensemble* (de conjunto), efeito ligante e geométrico.

O efeito de conjunto se deve a presença de agrupamentos isolados de poucos átomos de outro tipo de elemento metálico na superfície de uma nanopartícula. Esse conjunto de átomos atua como um sítio ativo em uma reação catalítica, apresentando uma melhor atividade catalítica se comparado às nanopartículas com átomos da superfície distribuídos de forma contínua (CHEN *et al.*, 2005; STRASSER *et al.*, 2010).

Por exemplo, Pretzer e colaboradores (2016) realizaram um estudo da influência da presença de átomos de Pd na superfície de nanopartículas de Au (NPs-Au) sobre a atividade catalítica da reação de redução do 4-nitrofenol. As NPs-Au@Pd foram preparadas com diferentes coberturas superficiais de Pd (10 a 200%). Os resultados de conversão mostraram uma atividade catalítica máxima para NPs-Au@Pd com cobertura superficial de 150%, como mostra o gráfico representado na Figura 4. Os autores atribuíram o aumento da atividade catalítica para NPs-Au@Pd com 150 % de cobertura superficial de paládio à presença de conjuntos de átomos de Pd parcialmente oxidados sobre a superfície das nanopartículas de ouro (efeito de conjunto), que consiste em 4 a 5 átomos de Pd, em média, identificados por espectroscopia de absorção de raios X (PRETZER *et al.*, 2016).

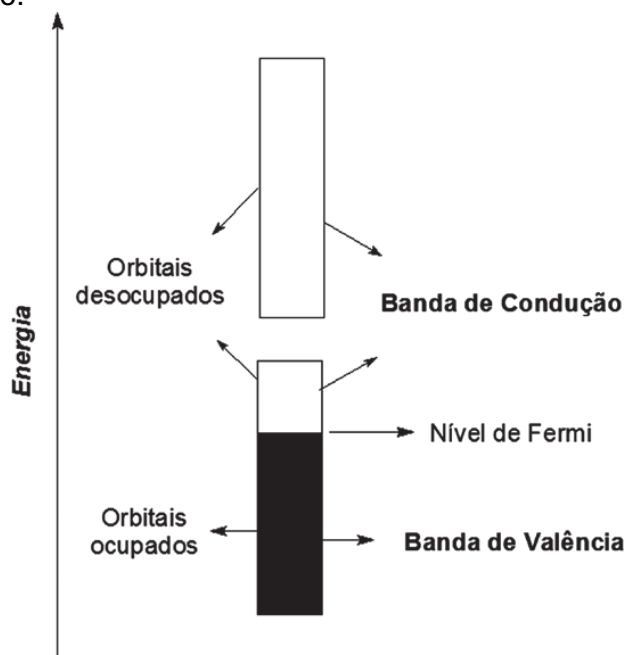
Figura 4. Número de mols de 4-nitrofenol reduzido em um sítio ativo por unidade de tempo (TOF), em função da cobertura superficial (sc %) de Pd em NPs-Au@Pd.



Fonte: Adaptado de PRETZER et al., 2016.

Já, o efeito ligante corresponde a transferência de carga eletrônica entre átomos vizinhos de elementos metálicos diferentes devido a diferença de eletronegatividade ou função trabalho (energia necessária para remover um elétron de um metal sólido) (TEDSREE *et al.*, 2011; GILROY *et al.*, 2016). Na Figura 5 estão representadas as bandas de valência (semipreenchida) e de condução (vazia) de um metal hipotético. O último nível de energia ocupado em uma banda de valência é chamado de nível de Fermi, como está indicado na Figura 5. Segundo Tedsree e colaboradores (2011), quando dois átomos metálicos com diferentes níveis de Fermi interagem entre si, ocorre uma transferência de carga do metal com nível de Fermi mais alto para o mais baixo. Este processo ocasiona uma modificação na estrutura eletrônica dos átomos, resultando assim, em uma mudança nas propriedades químicas do nanomaterial (TEDSREE *et al.*, 2011).

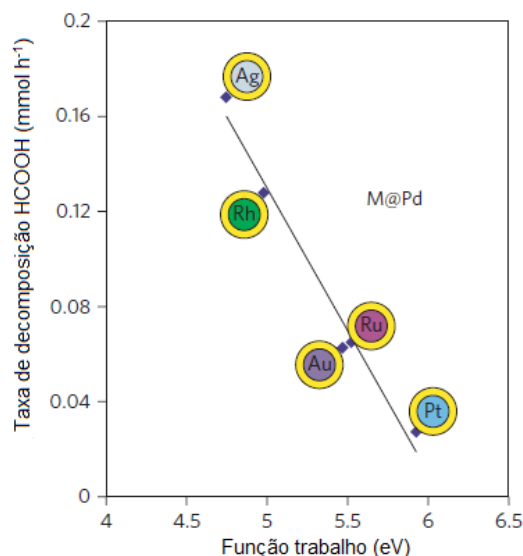
Figura 5. Representação ilustrativa das bandas de condução e de valência e do nível de Fermi de um metal hipotético.



Fonte: Adaptado de Prado, Farias, 2015.

Tedsree e demais pesquisadores (2011) realizaram um estudo catalítico para a reação de decomposição de ácido fórmico utilizando nanopartículas bimetálicas (M@Pd) com camada superficial de Pd e um núcleo constituído pelo metal M, onde M = Ru, Rh, Pt, Ag e Au. Neste estudo, avaliou-se o efeito do núcleo interno constituído por diferentes elementos metálicos sobre a atividade catalítica das nanopartículas bimetálicas M@Pd. Os pesquisadores verificaram uma correlação linear entre a atividade catalítica do metal Pd e a função trabalho do núcleo, M, formado por diferentes metais (Figura 6). Com base no gráfico mostrado na Figura 6, à medida que diminui a função trabalho dos metais do núcleo das nanopartículas, maior é a taxa de decomposição do ácido fórmico, ou seja, há um aumento da atividade catalítica das nanopartículas bimetálicas M@Pd com o núcleo composto por metais com valores baixos de função trabalho (TEDSREE *et al.*, 2011).

Figura 6. Gráfico das taxas de decomposição do ácido fórmico monitoradas por RMN C13 sobre diferentes nanocatalisadores M@Pd, M = núcleo e Pd = invólucro metálico de Pd, na proporção 1:1, versus função trabalho do núcleo M, onde M = Ru, Rh, Pt, Ag e Au.



Fonte: Adaptado de TEDSREE *et al.*, 2011.

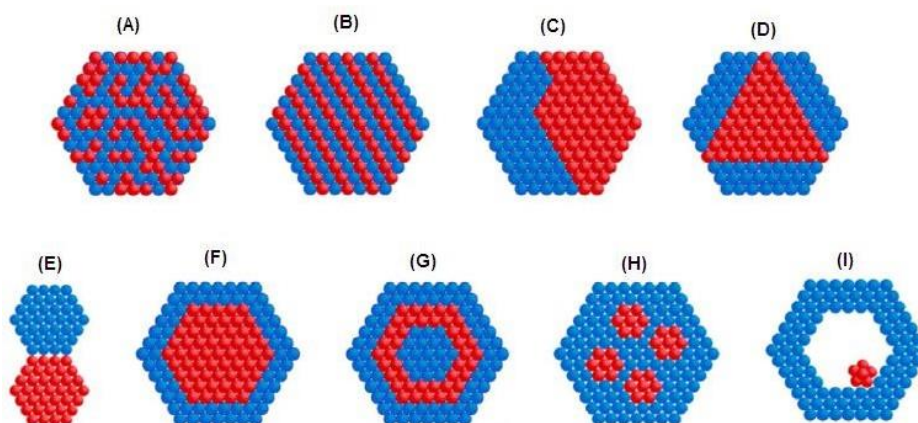
Os pesquisadores atribuíram como fator predominante para este comportamento a redistribuição de carga entre os metais do núcleo e da camada externa de paládio metálico, ou seja, ao efeito ligante. Para os autores, há uma transferência de carga da maioria dos núcleos de metal para o invólucro de Pd devido à diferença líquida na função de trabalho (a função trabalho do Pd é 5,6 eV). A prata metálica (função trabalho da Ag é 4,73 eV), com a menor diferença na função de trabalho em relação ao Pd, resulta em uma promoção de elétrons mais forte para a camada de Pd se comparado com os outros tipos de metais. Logo, a atividade catalítica mais alta é exibida pelas nanopartículas bimetálicas Ag@Pd. (TEDSREE *et al.*, 2011).

Por outro lado, o efeito geométrico está relacionado com o arranjo espacial dos átomos situados na superfície, o qual é afetado pela tensão de rede, geometria e tamanho das nanopartículas (GILROY *et al.*, 2016). Segundo Wu e colaboradores (2012), a adição de um segundo átomo metálico diferente em uma nanopartícula monometálica provoca uma deformação na sua geometria. Esta alteração gera uma tensão de compressão ou de estiramento sobre os átomos, a depender do tamanho do átomo adicionado. A tensão de rede gerada, por sua vez, promove uma modificação nos níveis eletrônicos dos átomos.

Segundo Strasser e colaboradores (2016), é difícil separar esses efeitos. Em alguns casos, os efeitos de ligante e geométrico ocorrem simultaneamente, ou até mesmo os três podem estar presentes. Com base no que foi discutido a respeito dos fatores que podem contribuir na mudança das propriedades das nanopartículas bimetálicas, nota-se que os parâmetros físicos (tamanho, forma e arranjo estrutural) das nanopartículas influenciam diretamente na redistribuição dos elétrons nos níveis eletrônicos (ZALESKA- MEDYNSKA *et al.*, 2015; GILROY *et al.*, 2016). Desta forma, o conhecimento detalhado sobre as variadas estruturas das nanopartículas bimetálicas é essencial para entender as suas propriedades, e conseqüentemente pode favorecer para o aumento da sua aplicabilidade.

As nanopartículas bimetálicas no que se refere ao seu arranjo estrutural podem ser classificadas basicamente em três tipos: ligas, aglomerados metálicos e caroço-casca (*core-shell*). Com base na literatura, variações destes tipos de estruturas de nanopartículas podem ser obtidas a depender da metodologia utilizada na síntese, da distribuição de cada metal no material e de sua organização (ZALESKA- MEDYNSKA *et al.*, 2015). Deste modo, as nanopartículas bimetálicas podem adquirir diversas formas estruturais como: ligas misturadas aleatoriamente ou ordenada, *core-shell*, *core-shell* com múltiplas camadas, aglomerados metálicos com duas ou três interfaces, que são representadas na Figura 7.

Figura 7. Estruturas de nanopartículas bimetálicas: (A) Liga aleatória, (B) Liga ordenada, (C) Pequenos aglomerados com uma interface, (D) com três interfaces, (E) com menor número de ligações na interface, (F) *Core-shell*, (G) *Core-shell* com múltiplas camadas, (H) NPs com pequenos núcleos de um metal revestido por uma camada de outro metal e (I) NPs com núcleo móvel em um invólucro oco.

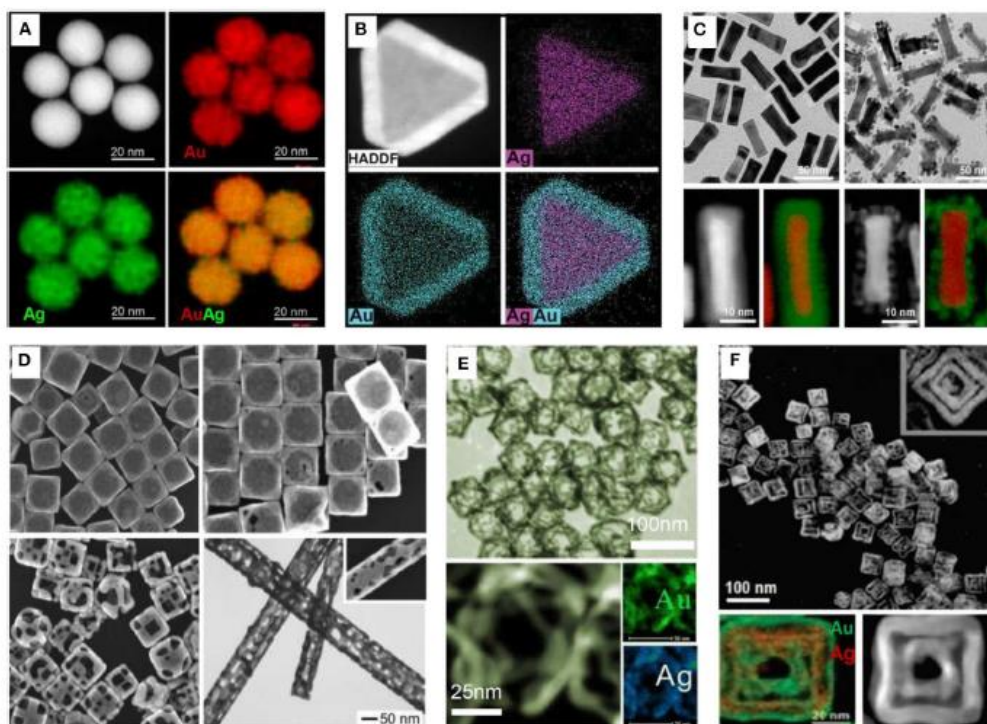


Fonte: ZALESKA-MEDYNSKA *et al.*, 2015.

As nanoligas são formadas por misturas de dois tipos de metais A (vermelho) e B (azul) de forma aleatória (Fig. 7A) ou homogênea (Fig. 7B). Quando a ligação A-A e B-B é mais forte que a ligação A-B, pequenos aglomerados são formados, o qual pode apresentar uma ou três interfaces (Fig. 7C e 7D) ou com um número menor de ligações A-B na interface (Fig. 7E). Já, as nanopartículas com estrutura do tipo *core-shell* consistem em um núcleo formado por um metal A que é revestido por uma camada de um outro tipo de metal B (Fig. 7F). Diferentes classes da estrutura *core-shell* podem ser obtidas, como são mostradas na Figura 7G-I (ZALESKA-MEDYNSKA *et al.*, 2015).

Na Figura 8 é mostrado várias nanopartículas bimetálicas com diferentes formas e estruturas, as quais podem ser obtidas por meio do controle de alguns parâmetros de síntese e pelo tipo de metodologia empregada na síntese (co-redução e redução sequencial) (MIN; WANG, 2020), que será abordada detalhadamente no próximo sub-tópico.

Figura 8 Nanopartículas bimetálicas com diferentes formas e estruturas: (A) Nanoliga esféricas de Au-Ag. (B) Nanoplasmas de Ag@Au *Core-shell*. (C) Nanobastões Au@Pd *Core-shell*. (D) Nano-caixas ocas e nanotubos. (E) Nano-molduras octaédricas de Au-Ag. (F) Nano-caixas de parede dupla de Au-Ag.



Fonte: MIN; WANG, 2020.

As nanopartículas bimetálicas tipo *core-shell* tem mostrado uma maior aplicabilidade em diversas áreas da nanotecnologia, como catálise, eletrocatalise e biomedicina se comparado com os demais nanomateriais (ZHONG, MAYE, 2001; CHATTERJEE *et al.*, 2014; GAWANDE *et al.*, 2015). Isso se deve ao fato da capacidade de aprimoramento das propriedades dessas nanopartículas, como a reatividade, modificando-se a sua superfície por meio de um simples recobrimento com outro tipo de metal (NUTT *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2013; PRETZER *et al.*, 2016). Outra vantagem da utilização da estrutura *core-shell* em relação às demais, está no menor consumo de metais caros. Por exemplo, o núcleo constituído por um metal mais abundante é revestido por um metal nobre, resultando em um menor custo comparado com o material nobre puro de mesmo tamanho (CHAUDHURI, PARIA, 2012). Assim, para a obtenção de nanopartículas bimetálicas com o arranjo estrutural esperado e com propriedades desejáveis, são necessários o estudo aprofundado e o aprimoramento dos métodos utilizados para a síntese desses nanomateriais.

1.2.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS

As nanopartículas metálicas podem ser preparadas por meio de duas metodologias gerais: abordagem *top-down* (de cima para baixo) e *bottom-up* (de baixo para cima). A abordagem *top-down*, consiste em um método onde um material macroscópico tem seu tamanho reduzido por uma técnica destrutiva a fim de obter partículas em escala nanométrica. As técnicas mais utilizadas nesta abordagem são: decomposição térmica de complexos de metais de transição, pulverização e vaporização a laser (FERRANDO, JELLINEK, JOHNSTON, 2008). Já, a abordagem *bottom-up* é um método que consiste na construção de pequenas partículas a partir de suas unidades básicas (átomos e moléculas). As principais metodologias que seguem esta abordagem são: redução química, precipitação, método sol-gel e redução eletroquímica (TOSHIMA, YONEZAWA, 1998; SHARMA *et al.*, 2017).

As nanopartículas bimetálicas podem ser sintetizadas tanto pela metodologia *top-down* como pela *bottom-up*. No entanto, a abordagem *bottom-up* é a mais utilizada devido a facilidade de controlar o tamanho e a forma das nanopartículas a serem

preparadas (GILROY *et al.*, 2016). Vale ressaltar que, a maior parte das metodologias empregada na síntese de nanopartículas bimetálicas é a mesma utilizada no preparo das nanopartículas monometálicas (GAWANDE *et al.*, 2015).

Diversas metodologias têm sido empregadas para a síntese de nanopartículas bimetálicas com diferentes formas e arranjos estruturais, tais como síntese por microondas, método sonoquímica, síntese por microemulsão e síntese biológica (MIZUKOSHI *et al.*, 2000; HARPENESS & GEDANKEN, 2004; WU; CHEN; HUANG, 2001). No entanto, a redução dos precursores metálicos por agentes redutores químicos em meio aquoso é a metodologia mais comumente utilizada devido a sua simplicidade e baixo custo (GILROY *et al.*, 2016).

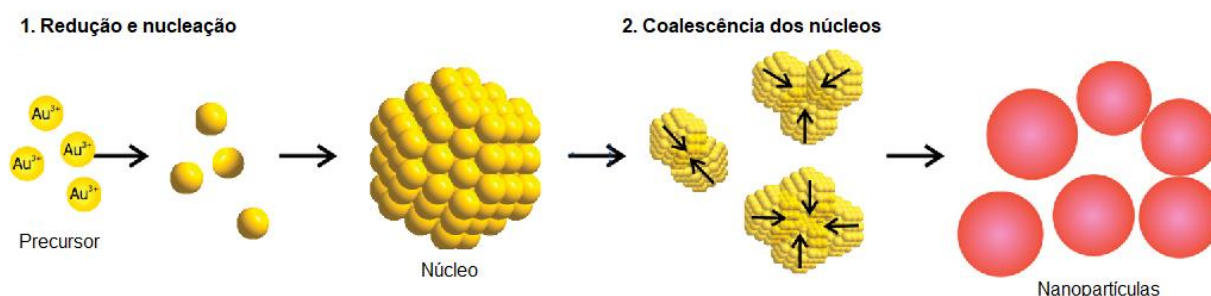
A síntese de nanopartículas por redução química consiste em uma reação de transferência de elétrons do agente redutor (doador de elétrons) para os íons metálicos (receptor de elétrons) na presença de agentes estabilizantes, como íons citrato, alguns surfactantes (por exemplo, triton X-100) ou ligantes poliméricos (por exemplo, polivinilpirrolidona, PVP), os quais atuam de modo a evitar a precipitação das nanopartículas formadas (FERRANDO, JELLINEK, JOHNSTON, 2008).

Diferentes agentes redutores químicos podem ser utilizados na síntese de nanopartículas metálicas, tais como o ácido ascórbico, ácido cítrico, citrato de sódio e hidrazina. No entanto, o agente redutor mais comumente utilizado é o borohidreto de sódio (NaBH_4) devido ao seu alto poder de redução com potencial de redução de -1,24 V em pH 14 e -0,48 V em pH 0, fornecendo 8 elétrons por mol e tem a capacidade de reduzir sais metálicos em meio aquoso e solventes orgânicos (LU, 1995; ZALESKA-MEDYNSKA *et al.*, 2015).

As nanopartículas metálicas são termodinamicamente instáveis, devido à alta energia superficial proveniente dos efeitos de superfície e de confinamento quântico. Diante disso, há uma tendência natural de agregação dessas partículas. Para evitar a agregação e, por conseguinte a formação de precipitados, é necessário o uso de agentes estabilizantes, como o íon citrato, por exemplo, durante a síntese das nanopartículas em suspensão. Os íons citrato propiciam a formação da dupla camada elétrica, quando os mesmos adsorvem na superfície das nanopartículas de Au, tornando as carregadas negativamente, de modo que a estabilização ocorre por meio da repulsão eletrostática (ZHAO, ASTRUC, 2013; DE SOUZA, NOGUEIRA, ROSTELATO, 2019).

As nanopartículas bimetálicas podem ser preparadas via redução química, que é um processo similar aos das nanopartículas monometálicas. A formação de nanopartículas metálicas ocorre em duas etapas, nucleação e crescimento. Na Figura 9 é mostrado um esquema ilustrativo do mecanismo de formação de nanopartículas de ouro. O processo inicia-se com uma etapa rápida de redução química dos íons Au^{3+} a Au^0 , em seguida, ocorre a coalescência dos pequenos núcleos de Au formados originando partículas com tamanhos maiores. Na segunda etapa tem-se o crescimento por difusão, onde íons Au^{3+} são reduzidos mais lentamente na superfície das partículas de ouro recém-formadas; além disso, ocorre também a formação da dupla camada elétrica. Por fim, as nanopartículas crescem rapidamente até o seu tamanho final, onde todas as espécies precursoras são consumidas por completo (POLTE et al., 2010).

Figura 9. Representação esquemática do mecanismo de formação de nanopartículas esféricas de ouro.



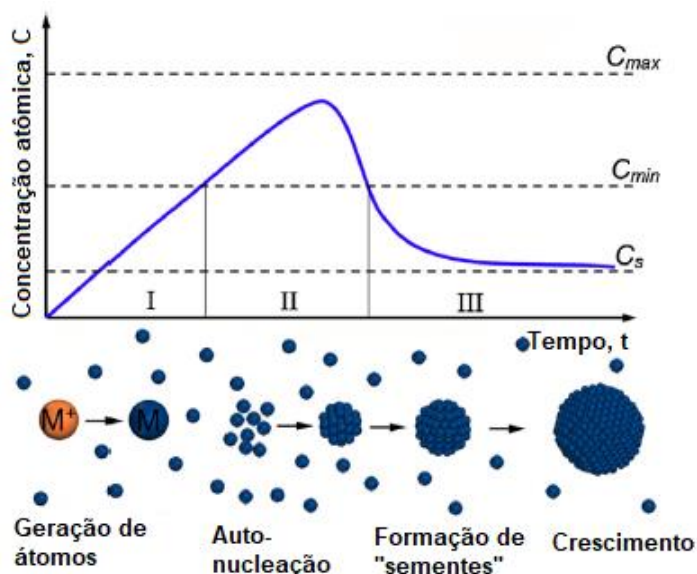
Fonte: Adaptado de THANH, MACLEAN, MAHIDDINE, 2014.

O mecanismo de formação de nanopartículas de metais coloidais pode ser explicado pelo modelo de LaMer, o qual foi estabelecida pelos pesquisadores LaMer e Dinegar em 1950 (LAMER, DINEGAR, 1950; PAIVA *et al.*, 2021). Na Figura 10 é mostrada a curva de LaMer, a qual descreve a evolução da concentração atômica durante as etapas de síntese de nanopartículas metálicas em função do tempo. De acordo com esta curva, o mecanismo de formação dos nanocristais para a síntese via redução química, compreende dois processos básicos: nucleação e crescimento, que de modo mais detalhado pode ser dividido em três etapas: I) Produção de átomos, II) Nucleação e III) Crescimento dos nanocristais (YOU; FANG, 2016).

Na primeira etapa do mecanismo de síntese de nanocristais metálicos segundo a curva de LaMer, os precursores do metal são transformados em átomos metálicos zero-valente por meio de uma redução química ou decomposição. À medida que os átomos neutros são gerados, ocorre um aumento na concentração atômica até atingir o ponto de supersaturação (C_{min}). O ponto de supersaturação pode ser definido como a concentração mínima necessária para iniciar o processo de aglomeração dos átomos para formação dos núcleos, ou seja, a etapa de nucleação (YOU; FANG, 2016).

Uma vez que a concentração atômica excede este ponto de supersaturação, inicia-se a segunda etapa, a nucleação, processo onde os átomos começam a se agregar para formar pequenos aglomerados estáveis denominados de núcleos (YOU; FANG, 2016; PAIVA *et al.*, 2021). À medida que os núcleos se formam, os átomos disponíveis na solução são consumidos rapidamente, e o processo de nucleação cessará quando a concentração atômica cair abaixo do ponto de supersaturação, conforme indicado na curva de LaMer (Figura 10).

Figura 10. Curva de LaMer descrevendo três estágios de formação de nanocristais metálicos coloidais. Estágio I: Produção de átomos, II: Nucleação e III: Formação de sementes e crescimento.



Fonte: Adaptado de YOU; FANG, 2016.

Na terceira etapa, o tamanho dos núcleos aumenta gradativamente devido à adição contínua de átomos metálicos em sua superfície, formando desta forma aglomerados maiores e estáveis (sementes). Estes aglomerados crescem para formar

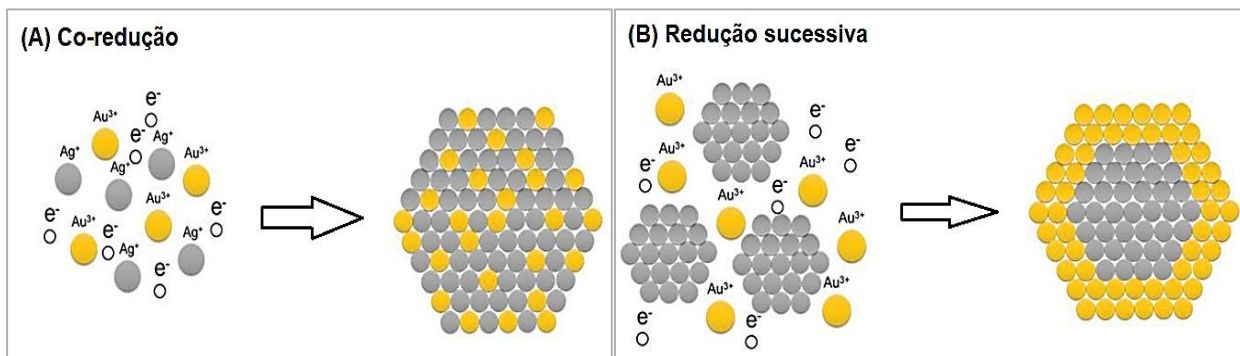
os nanocristais com estrutura definida até que a concentração atômica diminua para o ponto Cs, concentração de solubilidade de nanocristais. Neste ponto a concentração torna-se constante e o crescimento dos nanocristais é encerrado (YOU; FANG, 2016; XIA *et al.*, 2016).

O modelo de LaMer é baseado na teoria clássica de nucleação de partículas, desenvolvida por Becker e Döring na década de 1930. Essa teoria descreve a condensação de líquido da fase de vapor, e foi ampliada para processos de cristalização de sólido a partir de uma solução supersaturada, cujo princípio foi utilizado no desenvolvimento do modelo de LaMer (POLTE, 2015). É importante ressaltar que existem dois tipos de nucleação, a nucleação homogênea e a heterogênea. A nucleação homogênea (ou auto-nucleação) ocorre quando o núcleo é formado de maneira espontânea e uniforme em meio a solução coloidal. Já, a nucleação heterogênea, o núcleo se forma sobre superfícies sólidas na interface com a fase líquida, como por exemplo, na própria superfície interna da vidraria onde ocorre a reação, nas impurezas sólidas ou em nanopartículas pré-formadas (PAIVA *et al.*, 2021).

No que tange a formação das nanopartículas bimetálicas, a redução química e as etapas subsequentes de nucleação e crescimento podem ser realizada através de dois mecanismos: co-redução e redução sucessiva (GILROY *et al.*, 2016). A co-redução é um método simples e direto para formar ligas metálicas M-N. Neste método, dois precursores contendo metais M e N são reduzidos, na presença de um agente redutor, simultaneamente, em átomos neutros, M^0 e N^0 . Estes átomos se aglomeram para formar núcleos e crescem juntos gerando nanoligas M-N, como mostrado no esquema ilustrativo na Figura 11A (GILROY *et al.*, 2016).

O mecanismo de co-redução pode formar nanopartículas bimetálicas com estrutura *core-shell*, a depender da diferença de potencial de redução entre os íons metálicos envolvidos na reação. Espécies metálicas com potenciais de redução similares tendem a formar ligas; já para íons metálicos com valores de potencial de redução diferentes, aquele que apresenta o maior potencial precipita primeiro formando o núcleo (*core*), em seguida ocorre deposição do segundo metal sobre a superfície do núcleo, formando assim a camada externa (*shell*) (Figura 11A) (ZALESKA-MEDYNSKA *et al.*, 2015; GILROY *et al.*, 2016).

Figura 11. Esquema do mecanismo de formação de nanopartículas bimetálicas via redução química. (A) Co-redução e (B) Redução sucessiva.



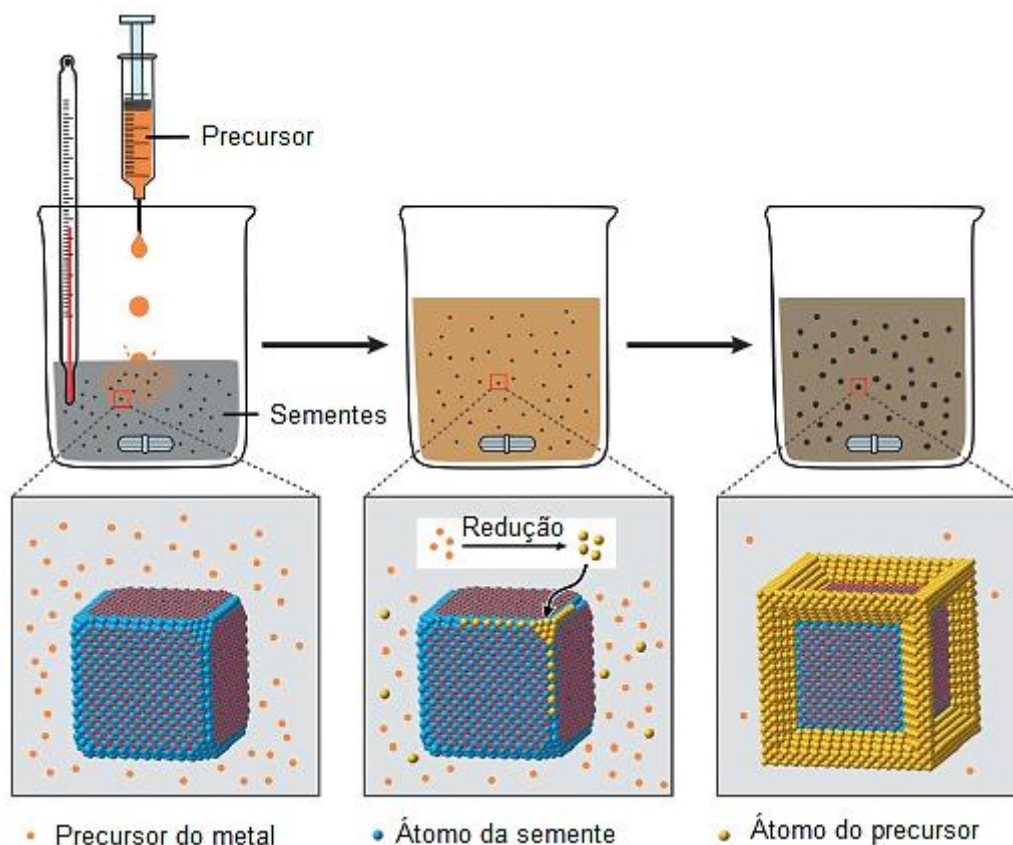
Fonte: Adaptado de Loza; Heggen; Epple, 2020.

A redução sucessiva é o método mais utilizado para sintetizar nanopartículas bimetálicas com estrutura *core-shell*; esta abordagem também é chamada de síntese mediada por sementes. Neste processo, nanopartículas do metal M pré-formadas (sementes) com características bem definidas atuam como sítio para nucleação heterogênea de átomos do metal N gerados a partir da redução de um precursor contendo N. Ou seja, átomos metálicos N recém-formados por redução química são depositados sobre a superfície de nanopartículas de um outro tipo de metal, M, já existentes para formar nanopartículas, ao invés de formar novos núcleos no meio, formando, assim, nanopartículas bimetálicas *core-shell* M@N, como é mostrado na Figura 11B (XIA *et al.*, 2016; GILROY *et al.*, 2016).

Geralmente, o processo de redução e nucleação heterogênea ocorrem de forma lenta a fim de favorecer a formação de um revestimento do núcleo mais uniforme (XIA *et al.*, 2016). A síntese mediada por sementes possibilita a transformação de sementes em nanopartículas com composição, tamanho e forma bem controlados (CHAUDHURI, PARIJA, 2012). Na Figura 12 encontra-se representado um esquema ilustrativo mostrando um procedimento geral de síntese de nanopartículas bimetálicas coloidais utilizando a abordagem da síntese mediada por sementes. Neste procedimento, uma solução precursora é injetada em um recipiente contendo uma mistura de sementes e um agente redutor (XIA *et al.*, 2016). O precursor de metal é reduzido para formar átomos de valência zero, que então são depositados na superfície das sementes, em um processo de nucleação heterogênea. O crescimento

contínuo das sementes pelo processo de coalescência, ou seja, pela junção dos aglomerados formados, acontece até chegar no tamanho final da partícula, resultando, assim, na formação de nanopartículas com estrutura bem definida (Figura 10) (XIA *et al.*, 2016).

Figura 12. Procedimento geral de síntese de nanopartículas bimetálicas coloidais utilizando a abordagem do crescimento mediado por sementes.



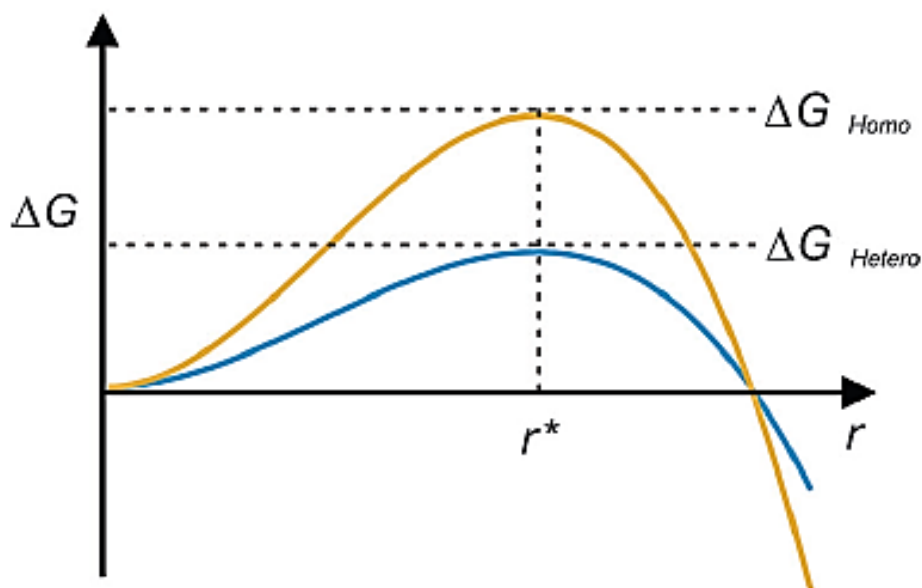
Fonte: Adaptado de XIA *et al.*, 2016.

O processo de nucleação pode ser analisado segundo a termodinâmica, como é mostrado no gráfico de variação da energia livre de Gibbs (ΔG) em função do raio da partícula (r), representado na Figura 13. Neste gráfico é possível observar duas curvas, uma de cor amarela que indica o processo de nucleação homogênea e a curva de cor azul que indica a variação da energia livre de Gibbs no processo de nucleação heterogênea (XIA *et al.*, 2016). Verifica-se que tanto a nucleação homogênea quanto a heterogênea apresentam um mesmo raio crítico (r^*), o qual corresponde ao tamanho mínimo da partícula para que ocorra o processo de crescimento do núcleo. Por outro

lado, observa-se diferentes máximos de ΔG para o mesmo valor de r^* para a nucleação homogênea (ΔG_{homo}) e heterogênea (ΔG_{hetero}). Esse ΔG máximo, conhecido como energia de ativação, representa a energia livre crítica necessária para formação de núcleos estáveis dispersos em solução (POLTE, 2015; PAIVA *et al.*, 2021).

Ainda sobre o gráfico da Figura 13, nota-se que a barreira energética para iniciar a nucleação heterogênea (ΔG_{hetero}) consiste na metade do que é necessário para a nucleação homogênea (ΔG_{homo}), como mostra as curvas de variação da energia livre de Gibbs. Portanto, uma menor concentração atômica (concentração do precursor do metal N) é requerida para a nucleação heterogênea, ou seja, para ocorrer a nucleação heterogênea não é necessário uma solução supersaturada, ao contrário da nucleação homogênea (XIA *et al.*, 2016; GILROY *et al.*, 2016). Logo, para prevenir a formação de sementes do metal N através da auto-nucleação durante o processo de síntese mediada por sementes, o precursor deste metal deve ser adicionado em concentração abaixo da supersaturação. Se a concentração dos átomos do metal N exceder o limite da supersaturação, tanto a nucleação homogênea quanto a heterogênea podem ocorrer ao mesmo tempo, resultando na formação de nanopartículas com diferentes tamanhos e formas (XIA *et al.*, 2016).

Figura 13. Gráfico mostrando a variação na energia livre de Gibbs (ΔG) em função do tamanho da partícula (r) para nucleação homogênea (linha amarela) e nucleação heterogênea (linha azul).



Fonte: Adaptado de XIA *et al.*, 2016.

O primeiro trabalho publicado utilizando o método de síntese mediada por sementes para o preparo de nanopartículas bimetálicas foi desenvolvido por Sun e colaboradores em 2002. Neste trabalho, foi produzido nanofios de prata com diâmetro na faixa de 30-40 nm e comprimento de até 50 μm , com condutividade elétrica comparável à prata massiva ($\sim 0.8 \times 10^5 \text{ S/cm}$). A primeira etapa da síntese consistiu na formação de nanopartículas de Pt com diâmetro na ordem de $\sim 5 \text{ nm}$ pela redução do precursor de platina (PtCl_2) com etileno glicol (EG) aquecido a 160°C . Na segunda etapa, átomos de prata formados pela redução de AgNO_3 com EG na presença de poli (vinilpirrolidona) (PVP). As nanopartículas de Pt pré-formadas serviram como sementes para a nucleação heterogênea e crescimento da prata sobre sua superfície. Com auxílio do PVP, as nanopartículas bimetálicas de Pt e Ag foram capazes de crescer em forma de hastes com dimensões na faixa de 30-40 nm (SUN *et al.*, 2002).

No mesmo ano, Lu e colaboradores relataram um método simples de preparo de nanopartículas bimetálicas *core-shell* Au@Ag utilizando abordagem da síntese mediada por sementes. O procedimento consiste na síntese das sementes de Au com tamanho de $12 \pm 2 \text{ nm}$ pela redução dos íons Au^{3+} a Au^0 com íons citrato como agente redutor. Na etapa seguinte da reação, foram preparados cinco conjuntos de soluções (A, B, C, D, E) contendo precursor de Ag, ácido ascórbico (agente redutor) e CTAB (agente estabilizante). Diferentes quantidades da suspensão das nanopartículas de Au (2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 mL) foram adicionadas a cada uma das soluções A, B, C, D e E, respectivamente. O processo de redução e nucleação heterogênea ocorreram em meio básico; e após 10 min de reação foi observado uma mudança de coloração das soluções de vermelho para marrom, a depender da concentração das sementes de Au, sugerindo, então, a formação de nanopartículas bimetálicas *core-shell* de Au@Ag. Nesse trabalho, os autores mostraram que é possível preparar nanopartículas metálicas com estrutura *core-shell* com diferentes concentrações do metal que reveste o núcleo de Au, e exibindo assim propriedades ópticas similar ao da prata metálica (LU *et al.*, 2002).

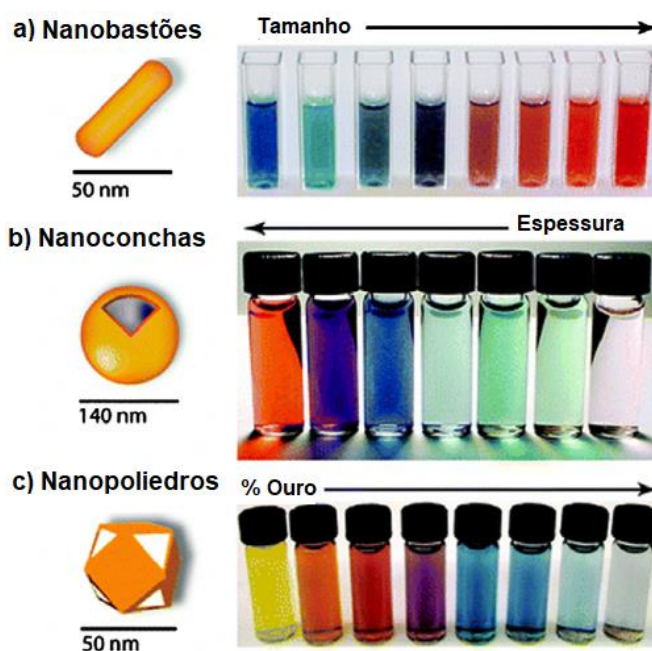
Diante dos trabalhos anteriormente citados, pode-se notar que fatores como, composição química, a distribuição dos átomos na estrutura do nanomaterial e as condições do seu preparo refletem diretamente nas suas propriedades finais. Logo, é

necessário um controle preciso da espessura da camada do segundo metal que reveste o núcleo e a sua uniformidade (GILROY *et al.*, 2016). Diante disso, o estudo das propriedades físico-químicas das nanopartículas bimetálicas é de suma importância para melhorar o desempenho deste nanomaterial para uso, por exemplo, em sensores biológicos e células solares (SANTOS *et al.*, 2016); e assim, expandir a sua aplicabilidade em diversas áreas da ciência.

1.2.3 PROPRIEDADES ÓPTICAS DAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS

Suspensões de nanopartículas metálicas de diferentes tamanhos e formas apresentam diversas cores, como por exemplo, nanopartículas de ouro com formas de bastões, conchas e poliedros em diferentes tamanhos e espessuras exibem colorações que podem variar do vermelho ao violeta e do azul ao verde claro, como é mostrado na Figura 14. Tal comportamento óptico das nanopartículas de ouro difere muito do seu respectivo material massivo, o qual apresenta uma cor amarelo brilhante (KHAN; SAEED; KHAN, 2017).

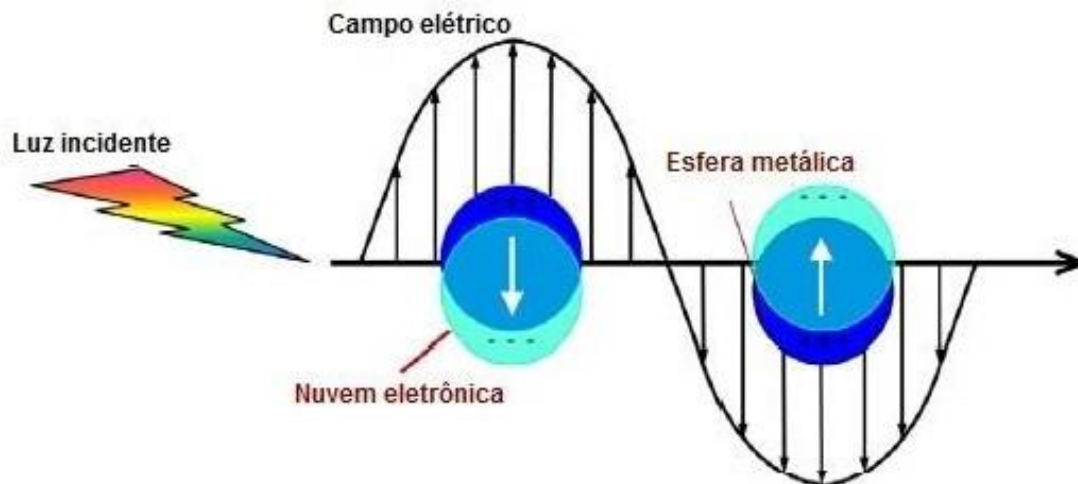
Figura 14. Nanopartículas de ouro em diferentes formas geométricas e tamanhos. a) Nanobastões, b) Nanoconchas e c) Nanopoliedros.



Fonte: Adaptado de KHAN; SAEED; KHAN, 2017.

Estas propriedades ópticas exclusivas das nanopartículas são resultantes de um fenômeno chamado de ressonância plasmônica de superfície, o qual está diretamente relacionado ao tamanho, forma e natureza química desses nanomateriais (CRUZ *et al.*, 2012). Em virtude do pequeno tamanho das nanopartículas, a maior parte dos átomos está localizada na superfície, ou seja, a proporção dos átomos na superfície em relação ao volume é muito maior do que no seu respectivo material massivo. Quando uma radiação eletromagnética com comprimento de onda menor que o diâmetro de uma dada nanopartícula, incide sobre a mesma, os elétrons livres dos átomos da superfície interagem com esta radiação, e são deslocados no sentido oposto ao do campo elétrico da luz incidente (ZALESKA-MEDYNSKA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2016). Na Figura 15 está representada um esquema ilustrativo que mostra a origem das oscilações dos elétrons devido ao acoplamento do dipolo elétrico com a força restauradora.

Figura 15. Esquema do fenômeno de ressonância plasmônica de superfície em uma esfera metálica.



Fonte: Adaptado de ZALESKA-MEDYNSKA *et al.*, 2015.

Esta separação de cargas provoca a formação de um dipolo elétrico, cujo campo elétrico dá origem a uma força restauradora de natureza eletrostática. Esta força restauradora, proveniente da atração núcleo-elétrons, tem a função de restaurar a posição de equilíbrio, fazendo com que os elétrons se distribuam de maneira uniforme pela partícula. Quando esta força é acoplada ao deslocamento dos elétrons dá origem

a ressonância plasmônica de superfície (KELLY *et al.*, 2003; MOORES; GOETTMANN, 2006; SANTOS *et al.*, 2016). Essas oscilações dos elétrons livres da superfície apresentam uma frequência característica, que depende da densidade eletrônica, da forma e do tamanho das nanopartículas (CRUZ *et al.*, 2012). No caso das nanopartículas de Au, Ag e Cu apresentam uma banda plasmônica na região do visível do espectro eletromagnético; já as nanopartículas de Pd e Pt exibem uma banda plasmônica na região do ultravioleta (GILROY *et al.*, 2016).

A condição para o surgimento da banda plasmônica para as nanopartículas metálicas foi apresentada por Mie em 1908, por meio da resolução das equações de Maxwell, na qual considerou a interação da onda eletromagnética com uma esfera condutora (KELLY *et al.*, 2003). De acordo com a teoria de Mie, considerando uma partícula esférica e com tamanho muito menor que o comprimento de onda da luz incidente, tem-se que a condição de oscilação de *plasmons* de superfície é dada pela expressão matemática:

$$C_{ext} = \frac{24\pi^2 R^3 \epsilon_m^{3/2}}{\lambda} \frac{\epsilon_i}{(\epsilon_r + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon_i^2} \quad (1)$$

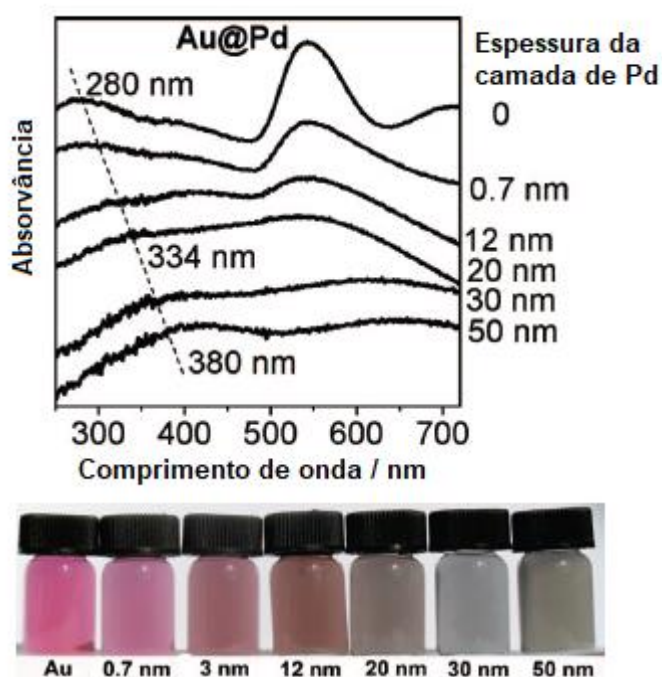
Onde o primeiro membro representa o espalhamento da luz, o qual depende do raio da partícula R , da constante dielétrica do meio ϵ_m e do inverso do comprimento de onda da radiação λ . Já, o segundo membro representa a absorção resultante da ressonância plasmônica, a qual depende da parte real ϵ_r e imaginária ϵ_i da constante dielétrica da partícula, e da constante dielétrica do meio. Com base na equação 1, a banda de absorção plasmônica aparece quando $\epsilon_r = -2\epsilon_m$. Nesta condição, o denominador tende a zero, contribuindo para o aumento do segundo termo da equação, resultando assim em um espectro de absorção observado experimentalmente para partículas esféricas (JAIN *et al.*, 2007).

No que tange às nanopartículas bimetálicas, tanto a coloração da suspensão quanto a posição da banda plasmônica são dependentes da forma e tamanho das nanopartículas, bem como da sua composição e da distribuição dos metais em sua estrutura. Para a estrutura *core-shell* (núcleo-casca), o metal que constitui a camada externa da nanopartícula determina a coloração da dispersão coloidal, e, por

consequente a posição da banda plasmônica (ZALESKA-MEDYNSKA *et al.*, 2015).

A influência da composição química e da espessura da camada externa de nanopartículas bimetalicas Au@Pd sobre suas propriedades ópticas foi estudada por Cui e colaboradores em 2008. Neste trabalho, as nanopartículas bimetalicas Au@Pd foram sintetizadas seguindo o método de crescimento mediado por sementes. Nanopartículas de ouro pré-preparadas foram usadas como sementes para a nucleação heterogênea do metal Pd formado pela redução de diferentes quantidades do precursor Pd por ácido ascórbico à temperatura ambiente (CUI *et al.*, 2008). Na Figura 16 é mostrado o comportamento óptico das soluções de Au@Pd em diferentes espessuras da camada de Pd metálico a partir do espectro de absorção na região do UV-vis, e a imagem digital das suas respectivas soluções coloidais.

Figura 16: Espectro de absorção na região do UV-vis de nanopartículas de Au@Pd em função da espessura da camada de Pd metálico.



Fonte: CUI *et al.*, 2008.

Com base nos espectros de absorção na região do UV-vis, é possível perceber que a intensidade da banda plasmônica da nanopartícula de Au diminui à medida que se aumenta a espessura da camada de Pd metálico. Para a nanopartícula Au@Pd com 20 nm de espessura, a banda plasmônica desaparece devido à presença do

metal Pd, o qual não exibe nenhuma banda de absorção na região do visível, indicando assim que houve uma eficiente deposição do Pd metálico sobre a superfície da nanopartícula de Au (CUI *et al.*, 2008). A mudança no comportamento óptico das nanopartículas de ouro em função da espessura da camada de revestimento de paládio é visivelmente perceptível em virtude da alteração da coloração rósea da suspensão de nanopartículas de Au para marrom em suspensão de nanopartículas Au@Pd com 12 nm de espessura da camada de Pd, até chegar a uma coloração acinzentada com nanopartículas Au@Pd com 50 nm de espessura de Pd (CUI *et al.*, 2008).

Segundo Gilroy e colaboradores (2016), o metal que constitui a camada externa passa a dominar as propriedades ópticas da nanopartícula metálica *core-shell*, já que o fenômeno da ressonância plasmônica é resultante da interação dos elétrons situados na interface entre a nanopartícula e meio dielétrico com a radiação incidente. Como não existe uma frequência de ressonância na região do visível para as nanopartículas de Pd puras, as propriedades ópticas das nanopartículas de Au@Pd são determinadas pelo comportamento dos elétrons do metal Pd recobre a superfície das nanopartículas de Au, demonstrado pela diminuição da intensidade da banda plasmônica das nanopartículas de Au e pela mudança da coloração rósea da suspensão de nanopartículas de Au para acinzentada (coloração característica da suspensão de NPs-Pd) da suspensão de nanopartículas de Au com 20 nm de espessura de revestimento de Pd (GILROY *et al.*, 2016).

Diante do exposto, tem-se que o conhecimento das propriedades ópticas das nanopartículas bimetálicas, bem como o estudo dos fatores que contribuem para o surgimento dessas novas propriedades, é de extrema importância para o desenvolvimento de nanomateriais mais eficientes, e assim aumentar a sua aplicabilidade em variados setores tecnológicos e científicos.

Como apresentado na Introdução deste capítulo, a motivação para estudar as nanopartículas bimetálicas Au@Pd parte do interesse de integrar nanopartículas de paládio puras em estruturas de fungos filamentosos, para obter um material híbrido com alta atividade catalítica. No entanto, de acordo com os trabalhos publicados pelo nosso grupo de pesquisa LBQM e pelo grupo da pesquisadora Bigall, o paládio metálico é tóxico frente aos fungos, o que impede o seu desenvolvimento e simultânea

assimilação das nanopartículas de paládio (BIGALL *et al.*, 2008; FONTES *et al.*, 2021).

Na tentativa de contornar a toxicidade do paládio frente aos fungos filamentosos, este trabalho de doutorado propõe o uso de nanopartículas de ouro esféricas, que segundo Bigall e colaboradores (2008) apresenta boa afinidade com os fungos, para servir de núcleo para a deposição de pequenas quantidades de paládio metálico; e assim, pela combinação desses dois metais (Au e Pd) favorecer a assimilação dessas nanopartículas bimetálicas pelo microrganismo. Diante disso, tem-se a necessidade de sintetizar nanopartículas de Au@Pd por meio da adição controlada do íon Pd²⁺ sobre a superfície de nanopartículas de ouro (NPs-Au) para o cultivo subsequente de fungos filamentosos em soluções coloidais contendo NPs-Au@

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio com estrutura *core-shell*, por meio da adição controlada de íons Pd²⁺ sobre a superfície das nanopartículas de ouro, para posterior integração em fungos filamentosos.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio do tipo *core-shell* variando-se a concentração do metal Pd depositado sobre a superfície das nanopartículas de ouro;
- Estudar o efeito da adição controlada do metal Pd sobre as propriedades ópticas das suspensões de nanopartículas de ouro;
- Caracterizar as suspensões de nanopartículas bimetálicas de Au@Pd com diferentes concentrações do metal Pd usando a microscopia eletrônica de transmissão;
- Determinar o tamanho médio de partícula das nanopartículas bimetálicas de Au@Pd com diferentes concentrações do metal Pd.

1.4 PARTE EXPERIMENTAL

1.4.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS Au@Pd

1.4.1.1 REAGENTES

Para a síntese de nanopartículas bimetálicas de Au@Pd foram utilizados os seguintes reagentes: água purificada (13 $\mu\text{S}/\text{cm}$) pelo o sistema Milli-Q (Millipore Ultra-Pure Water System), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, $\geq 99,99\%$), $\text{PdCl}_2 \cdot \text{HCl}$ (1:2) (Aldrich, $\geq 99,99\%$), ácido cítrico monohidratado (Merck, $\geq 99,99\%$), citrato de sódio dihidratado (Reagen, $\geq 99,99\%$), NaBH_4 (Aldrich, $\geq 99,99\%$) e ácido ascórbico (Synth, $\geq 99,99\%$).

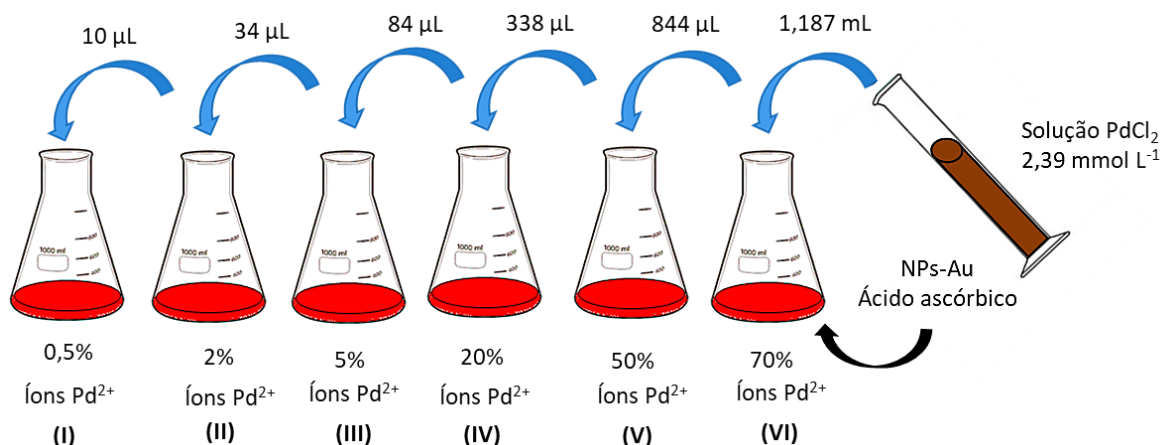
1.4.1.2 PROCEDIMENTOS

Primeiramente, foi preparada uma solução contendo nanopartículas de Au pela redução química do precursor HAuCl_4 , seguindo a metodologia inicialmente proposta pelo grupo de pesquisa de Natan (1996) e adaptada por Fontes et al. (2014), onde o íon citrato atua somente como agente estabilizante. Em um frasco de Erlenmeyer contendo 70 mL de água ultrapura fervente foram adicionados 176 μL da solução estoque de HAuCl_4 $0,0873 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (0,0154 mmol de Au^{3+}) sob agitação vigorosa por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 154 μL da solução de citrato de sódio/ácido cítrico (1% / 0,05% (m/v)), que corresponde a razão molar [íon citrato]: $[\text{Au}^{3+}]$ igual à 0,3. Após 20 segundos, foram adicionados 385 μL da solução recém preparada de 0,08% (m/v) de NaBH_4 contendo 1% (m/v) de citrato de sódio e 0,05% (m/v) de ácido cítrico. Imediatamente após a adição do agente redutor (NaBH_4), a coloração da suspensão mudou de amarelo para vermelho vinho, a qual é característica da formação de nanopartículas de ouro. Por fim, a suspensão foi vigorosamente agitada e fervida por 10 minutos. Durante esse tempo foi adicionada aos poucos 2,67 mL da solução de citrato de sódio/ácido cítrico (1% / 0,05% (m/v)) a fim de obter uma solução coloidal na razão molar [íon citrato]: $[\text{Au}^{3+}]$ igual à 7,1. Por fim, a solução coloidal de nanopartículas de ouro foi resfriada à temperatura ambiente.

A síntese das nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio com estrutura *core-shell* (Au@Pd) foi realizada através da redução química sucessiva, seguindo a metodologia proposta por Nutt e colaboradores, 2005. Em um frasco de Erlenmeyer contendo 15 mL de água ultrapura foram adicionados 9,79 mL da suspensão de nanopartículas de ouro (massa de ouro = 0,431 mg) anteriormente preparada. Em seguida, foram adicionados 9,68 mL da solução de ácido ascórbico 0,5 mol.L⁻¹, sob agitação constante e em temperatura ambiente.

A adição controlada de paládio nas dispersões aquosas de nanopartículas de ouro foi realizada utilizando-se seis frascos de Erlenmeyer, em todos eles manteve-se fixa a massa de ouro, porém variando-se a quantidade de paládio em cada sistema, como é mostrado o esquema ilustrativo do procedimento de síntese das referidas nanopartículas na Figura 17. Para isso, foram acrescentadas diferentes alíquotas solução de PdCl₂ 2,39 mmol.L⁻¹ (10, 34, 84,0, 338, 844 μL, 1,187 mL) que correspondem às porcentagens teóricas de 0,5%, 2%, 5%, 20% e 50% de Pd, tomando como base a massa total de Au. Os volumes do reagente ácido ascórbico (0,5 mol.L⁻¹) também foram calculados para diferentes porcentagens de paládio, a fim de garantir a completa redução dos íons Pd²⁺ presentes no meio reacional. Logo após adição do precursor de paládio, a suspensão permaneceu sob agitação vigorosa por 30 minutos.

Figura 17. Esquema ilustrativo da síntese de nanopartículas A@Pd com diferentes concentrações de íons Pd²⁺ em massa



Fonte: Própria autoria.

1.4.2 CARACTERIZAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS Au@Pd

Para a caracterização das suspensões de nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio foram utilizadas as seguintes técnicas:

- Espectroscopia de Absorção na Região do UV-vis

Os espectros de absorção na região do UV-vis das amostras das dispersões coloidais de nanopartículas bimetálicas de Au@Pd foram obtidos em um período de 24 h após a síntese, a fim de garantir a completa reação de redução dos íons Pd²⁺ e a deposição do Pd⁰ sobre as nanopartículas de ouro. Para o registro dos espectros foi utilizado um espectrofotômetro de absorção da marca Rigol, modelo Ultra – 3560, e cubeta de quartzo com o caminho óptico de 1 cm. Foi realizado a leitura de 400 a 700 nm. Não foi necessário diluir as amostras para realizar as medidas.

- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Imagens de microscopia eletrônica das nanopartículas bimetálicas de Au@Pd com diferentes concentrações de Pd⁰ foram obtidas para verificar a forma e o tamanho destes nanomateriais. Para realizar esta análise, colocou-se uma alíquota de 10 µL de cada amostra sobre grades de cobre revestidas com Formvar®, e em seguida as grades foram colocadas para secar em temperatura ambiente. Não foi necessário diluir as amostras e também foi dispensado o uso de contrastantes para a visualização no MET.

Após a completa secagem das grades, as imagens dos nanomateriais foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão marca JEOL, modelo JEM-1230 do laboratório de microscopia da FIOCRUZ.

- Espalhamento Dinâmico de Luz

A técnica espalhamento dinâmico de luz, também conhecida como DLS (do inglês, *dynamic light scattering*) foi utilizada para medir o tamanho das nanopartículas pela determinação do seu raio hidrodinâmico. As medidas de tamanho de partícula

foram realizadas no equipamento *ZetaSizer Nano series – Nano ZS da Malvern Instruments*, no laboratório *Itodys, Université Paris Cité*.

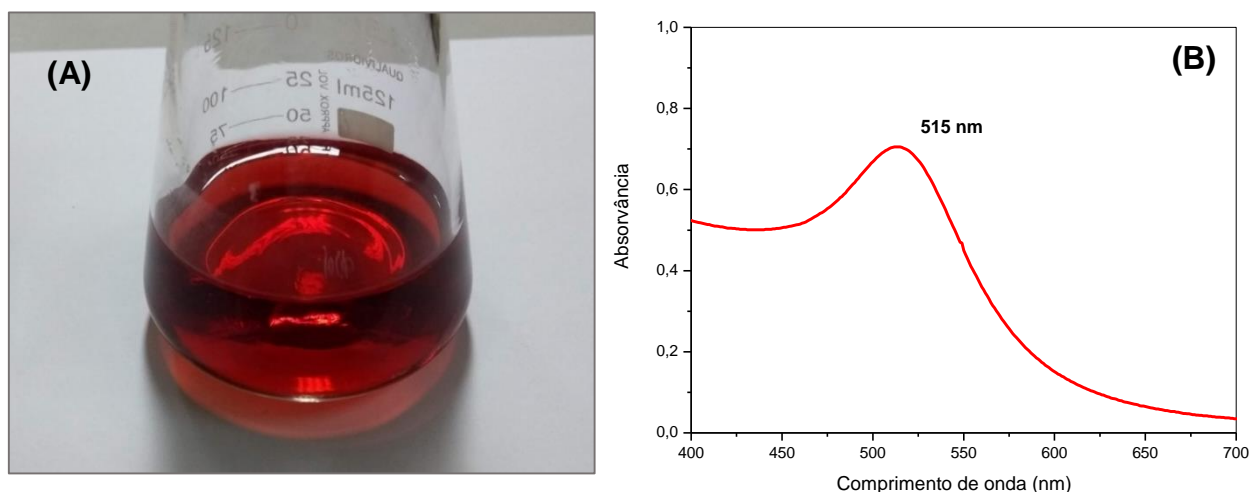
1.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

1.5.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS Au@Pd E ESTUDO DO EFEITO DA ADIÇÃO DO METAL Pd SOBRE AS PROPRIEDADES ÓPTICAS DAS NANOPARTÍCULAS DE Au

A síntese das nanopartículas de Au estabilizadas por ânions citrato como descrito no item 1.3.3, foi realizada segundo a metodologia proposta por Natan e colaboradores. (1996) e adaptada por Fontes e colaboradores (2014), a qual tem como base o método tradicional de Turkevich para a síntese de nanocristais de Au (BROWN, FOX, NATAN, 1996; ZHAO, ASTRUC, 2013). O método Turkevich utiliza o íon citrato tanto para efeito de estabilização quanto para redução dos íons Au³⁺, todavia o íon citrato é um agente redutor fraco ($E^{\circ}_{red} = -0,180$ V em pH 0), o que explica a necessidade de altas temperaturas na redução química do ouro (TURKEVICH, 1951; PACIONI *et al.*, 2015). Já, o ânion borohidreto é um agente redutor forte ($E^{\circ}_{red} = -0,480$ V em pH 0) se comparado com íon citrato, o grupo do pesquisador Natan adicionou o borohidreto de sódio em baixa concentração (0,075%) ao método de Turkevich para síntese de nanopartículas de ouro, sem o uso de aquecimento do sistema reacional (BROWN, FOX, NATAN, 1996; LU, 1995). Basicamente, a síntese de nanopartículas de ouro compõe-se de uma solução aquosa contendo o precursor ácido tetracloroáurico (III) (HAuCl₄), com o ouro em seu estado de oxidação Au³⁺, o qual é reduzido para Au⁰ na presença do agente redutor borohidreto de sódio, conforme é indicado na equação química balanceada representada na equação 2 (DE SOUZA, NOGUEIRA, ROSTELATO, 2019; TEIXEIRA *et al.*, 2021).



Figura 18. Imagem digital da solução coloidal de nanopartículas de ouro estabilizadas com íons citrato (A) e espectro de absorção na região do visível da referida solução (B).



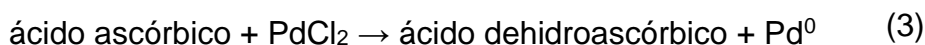
O aspecto visual da solução coloidal aquosa de nanopartículas de ouro obtida pelo procedimento descrito no item 1.3.3, é mostrado na Figura 18A. É possível perceber que esta dispersão coloidal apresenta uma coloração vermelho rubi, a qual é característica de nanopartículas de ouro esféricas, segundo a literatura (TURKEVICH, 1951; DE SOUZA, NOGUEIRA, ROSTELATO, 2019). A razão para esta coloração característica das suspensões de NPs-Au é devido a interação da luz na faixa do visível do espectro eletromagnético com os elétrons da superfície das nanopartículas de ouro, conforme descrito anteriormente. Quando uma radiação eletromagnética com frequência igual à dos *plasmons* (oscilação coletiva dos elétrons do metal em nanoescala) das nanopartículas metálica, incide sobre as mesmas, provoca uma excitação plasmônica dos elétrons da banda de condução. Essa excitação dos *plasmons* pelo campo elétrico da luz incidente ocorre devido a absorção de energia, que no caso das NPs-Au, promove transições eletrônicas da banda de valência 5d ocupada para os níveis desocupados da banda de condução 6s-6p (AMENDOLA *et al.*, 2017).

Soluções aquosas coloidais de NPs-Au aproximadamente esféricas, absorvem energia nos comprimentos de onda da região do visível do espectro eletromagnético, especificamente em torno da região da cor verde (~500 a 565 nm), e por esta razão as dispersões coloidais de NPs-Au refletem a cor complementar correspondente, que é o vermelho (AMENDOLA *et al.*, 2017; DE SOUZA, NOGUEIRA, ROSTELATO,

2019). A frequência necessária para excitação dos *plasmons* de superfície das NPs-Au, e, por conseguinte a coloração observada das suas dispersões coloidais, varia conforme o tamanho, forma e o meio em que se encontram estas partículas (GRASSESCHI; DOS SANTOS, 2020).

As propriedades ópticas das nanopartículas de ouro estabilizadas com íons citrato dispersas em soluções aquosas podem ser analisadas através da espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível. Ao analisar o espectro de absorção na região do UV-vis da dispersão coloidal (Figura 18B), verifica-se a presença de uma única banda plasmônica, com o máximo de absorção no comprimento de onda em torno de 515 nm, a qual é oriunda das excitações plasmônicas das nanopartículas de ouro dispersas em solução aquosa. Esta banda individual indica que as nanopartículas de ouro possuem uma forma aproximadamente esférica, que é resultante de um só modo de oscilação dos *plasmons* superficiais (AMENDOLA *et al.*, 2017; OGAREV; RUDOJ; DEMENT'EVA, 2018).

Tais nanopartículas de ouro estabilizadas com íons citrato foram utilizadas no preparo de nanopartículas bimetálicas formadas por um centro de ouro e certas quantidades do metal paládio em sua superfície. O método de síntese utilizado para o preparo destas partículas foi a metodologia da redução sucessiva, especificamente a abordagem da síntese mediada por sementes, a fim de obter nanopartículas com estrutura do tipo *core-shell* com o controle da adição do metal paládio sobre a superfície das nanopartículas de ouro. Para tanto, as nanopartículas esféricas de Au foram introduzidas no sistema de síntese para servirem de sementes, ou seja, de centros de deposição de átomos de Pd⁰ recém-formados pela redução lenta dos íons Pd²⁺ mediante a ação redutora do reagente ácido ascórbico, conforme é mostrado na equação química representada abaixo:



No trabalho de Nutt e colaboradores (2005) foi relatado que nanopartículas de ouro não são capazes de reduzir os íons Pd²⁺ para formar uma camada metálica de Pd⁰ sobre a sua superfície em um processo de síntese de nanopartículas bimetálicas com estrutura do tipo *core-shell*. Os pesquisadores observaram que não houve

diferença significativa no perfil do espectro de absorção na região do UV-vis da dispersão coloidal de nanopartículas esféricas de ouro com o aumento da quantidade do precursor do Pd, na ausência do reagente ácido ascórbico. Com base nos valores de potenciais padrão de redução (E°) das espécies envolvidas, é de se esperar tal resultado pois o par $\text{Au}^{3+}/\text{Au}^0$ ($E^\circ = +1,50 \text{ V}$, pH 0) tem um potencial de redução padrão mais positivo do que o par $\text{PdCl}_4^{2-}/\text{Pd}^0$ ($E^\circ = +0,59 \text{ V}$), logo o Pd^{2+} não pode ser reduzido pelos átomos de Au^0 da superfície dos NPs-Au. Por outro lado, o ácido ascórbico pode reduzir Pd^{2+} porque o par ácido dehidroascórbico /ácido ascórbico tem um E° mais baixo (+0,47 V) do que o do par $\text{PdCl}_4^{2-}/\text{Pd}^0$.

O modelo de Frinke-Watsky propõe uma explicação plausível para o mecanismo de formação das nanopartículas bimetálicas com estrutura *core-shell* utilizando-se a abordagem da síntese mediada por sementes, como método de síntese. Segundo este modelo, a etapa da nucleação heterogênea ocorre de forma lenta e contínua, à medida que ocorre o processo de crescimento do núcleo de forma rápida na superfície de outro tipo nanopartícula metálica (PAIVA *et al.*, 2021). Sendo assim, o sítio de nucleação, ou seja, a nanopartícula *core* atua como semente e catalisador para a obtenção casca (*shell*). Diferente do modelo clássico de LaMer, a etapa de crescimento descrita pelo modelo Frinke-Watsky não depende da difusão dos átomos metálicos recém-gerados da solução para a semente, devido ao crescimento autocatalítico que favorece a formação da casca pela redução química dos íons metálicos na própria superfície da semente, seguida de uma rápida deposição do metal gerado (THANH; MACLEAN; MAHIDDINE, 2014).

A teoria de nucleação e crescimento de nanopartículas de Frinke-Watsky, contudo, não explica a deposição preferencial dos átomos de Pd^0 , por exemplo, sobre a superfície das nanopartículas de Au. Para Hu e colaboradores (2005), a presença das sementes no meio reacional não garante a formação de nanopartículas com estrutura *core-shell*, ou seja, processos de auto-nucleação podem ocorrer favorecendo a formação de novos núcleos de paládio metálico, ao invés da nucleação heterogênea deste metal nas nanopartículas de ouro. Como discutido anteriormente no item 1.2.2, a barreira energética para iniciar o processo de nucleação heterogênea equivale à metade da energia necessária para a auto-nucleação (XIA *et al.*, 2017). Para isso, a concentração do precursor do segundo metal adicionado deve ser mantida baixa para evitar a auto-nucleação, porém alta o suficiente para superar a

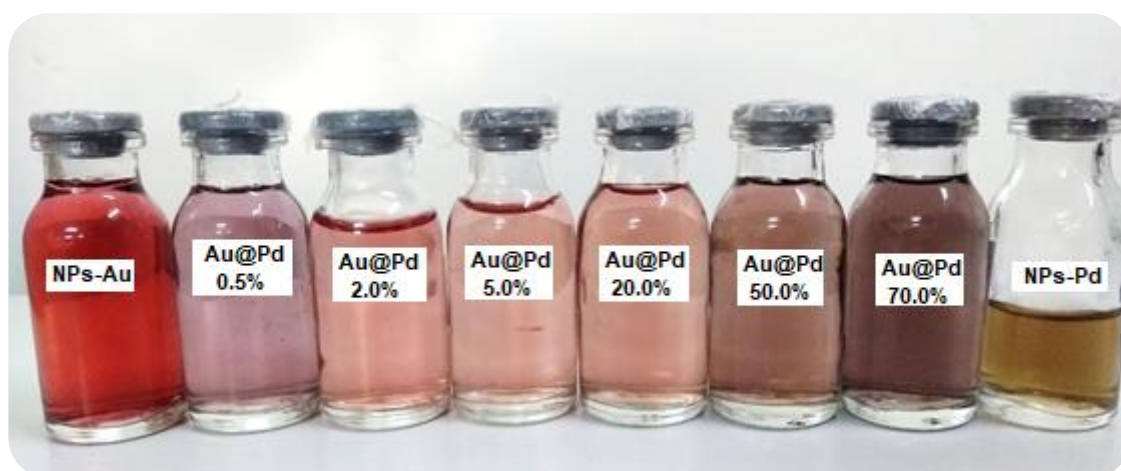
energia de ativação da nucleação heterogênea, do contrário uma elevada concentração de íons Pd²⁺ em suspensão pode atingir o estado de supersaturação e dá início a formação de núcleos de Pd metálico estáveis, ao invés da formação de uma camada de Pd⁰ sobre a superfície das NPs-Au (POLTE, 2015; XIA *et al.*, 2017; PAIVA *et al.*, 2021). Desse modo, a concentração do precursor de paládio utilizada neste trabalho de pesquisa foi mantida sempre abaixo da concentração do precursor de ouro, sendo o máximo utilizado foi cerca de 70% de paládio em relação a massa total de ouro teoricamente presente no meio reacional.

Outra suposição para a nucleação preferencial do paládio metálico na superfície de nanopartículas de ouro dispersas, é a similaridade entre as energias de superfícies dos monômeros recém-formados de paládio e das sementes de ouro. Termodinamicamente, partículas maiores apresentam menor energia de superfície se comparado com as partículas menores, em virtude da menor fração de átomos na superfície em relação ao volume da partícula (efeito de superfície) (RODUNER, 2006; ZHANG, LIU, 2014). Desta forma, é mais provável do ponto de vista energético, ocorrer a nucleação heterogênea do paládio nas nanopartículas de ouro do que a formação de novos núcleos de paládio, devido a menor energia superficial das partículas de ouro, o que contribui para diminuição da barreira de energia para o processo de nucleação heterogênea (THANH, MACLEAN, MAHIDDINE, 2014; POLTE, 2015). Além disso, para evitar o processo de auto-nucleação do paládio na síntese de nanopartículas Au@Pd, é imprescindível também o controle cinético da reação de redução dos íons Pd²⁺ com o uso de uma temperatura amena, em torno de 26 °C, e o emprego de um agente redutor fraco (ácido ascórbico). Tais fatores contribuem para uma taxa de reação lenta, o que impossibilita um aumento na frequência de colisões entre os monômeros de Pd⁰ e a junção entre si para formar núcleos de Pd indesejáveis, como recomenda os pesquisadores HU *et al.* (2005) e CHAUDHURI e PARIA (2012).

A aparência das soluções coloidais de NPs-Au com adição de diferentes quantidades de Pd metálico, obtidas através do procedimento descrito no item 1.3.3, é mostrada na Figura 19. Pela imagem digital destas dispersões coloidais, é possível notar a nítida variação de cor à medida que aumenta-se a concentração do metal paládio adicionada. A dispersão coloidal com apenas 0,5% (m/m) de Pd apresenta uma coloração próxima ao violeta, a qual é bem distinta do tom avermelhado da

solução contendo NPs-Au. Ao observar as suspensões coloidais com 2,0% e com 5,0% (m/m) de Pd, verifica-se que as mesmas exibem uma coloração de tonalidade rosácea. Já na suspensão de NPs-Au com 20% (m/m) de Pd, a coloração segue afastando-se do tom rosáceo, se aproximando de um tom amarronzado bem sutil, se comparado às suspensões anteriores.

Figura 19. Imagem digital das soluções coloidais de nanopartículas (da esquerda para direita): Au puras, Au@Pd 0,5, 2, 5, 20, 50 e 70 %(m/m) de metal Pd e Pd puras.

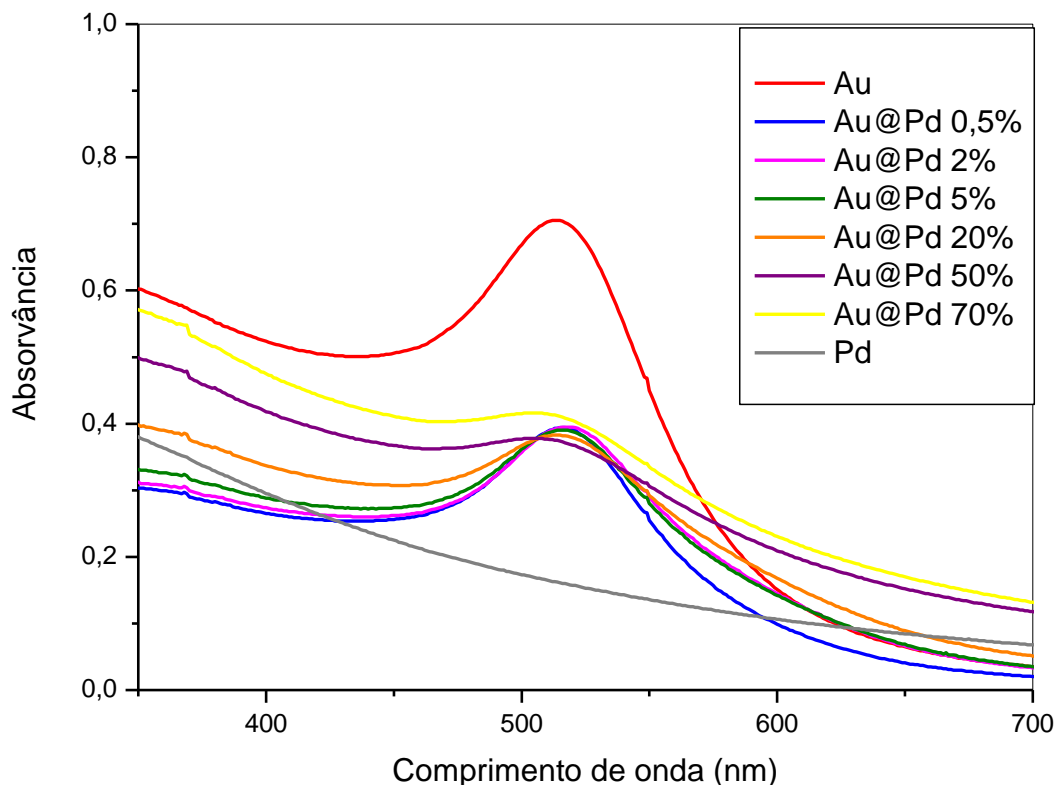


Fonte: Própria autoria.

Em seguida, a suspensão com 50% (m/m) de Pd já se difere de tons rosáceos, estando mais próxima de um tom amarronzado. Tal proximidade ao marrom será ainda mais notável na suspensão com 70% (m/m) de Pd. Para efeito de comparação, a coloração da dispersão coloidal de nanopartículas de Pd puras (NPs-Pd) pode ser vista também na Figura 19. De acordo com a literatura, a coloração amarronzada é característica das soluções coloidais contendo nanopartículas de Pd (CUI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2015; LOZA; HEGGEN; EPPLE, 2020), o que explica a mudança gradativa para tons amarronzado nas dispersões contendo concentrações maiores do metal Pd.

O efeito da adição controlada do metal Pd sobre o comportamento óptico de nanopartículas de Au pode ser analisado através dos espectros de absorção na região do ultravioleta e visível das suspensões de nanopartículas de Au puras e de nanopartículas bimetálicas de Au@Pd preparadas com diferentes concentrações de íons Pd²⁺. Desta forma, foram obtidos os espectros de absorção na região do UV-vis das suspensões descritas anteriormente, os quais são mostrados na Figura 20.

Figura 20. Espectro de absorção na região do UV-vis de nanopartículas de Au com diferentes porcentagens em massa do metal Pd.



Na Figura 20 é possível notar que a banda plasmônica das NPs-Au apresenta um máximo de absorção em aproximadamente 515 nm, o que indica a formação de nanopartículas com morfologia esférica (AMENDOLA *et al.*, 2017; OGAREV; RUDOI; DEMENT'EVA, 2018). É observado também que a intensidade da banda plasmônica das NPs-Au diminui à medida que aumenta a concentração de Pd⁰ na composição das nanopartículas bimetálicas. Observa-se que a banda plasmônica das NPs-Au com 50%(m/m) do metal Pd diminui drasticamente de intensidade; além disso, o perfil levemente inclinado do seu espectro se assemelha muito ao espectro das NPs-Pd. Esse comportamento óptico é devido a maior cobertura superficial de átomos Pd sobre as nanopartículas de ouro (NUTT *et al.*, 2005; CUI *et al.*, 2008).

Como já discutido anteriormente no item 1.2.3, a interação com a radiação eletromagnética incidente se dá por meio dos elétrons livres situados na superfície das nanopartículas, promovendo a oscilação coletiva dos mesmos. Devido ao maior número de átomos de Pd na superfície das NPs-Au, e como este metal não exhibe

banda de absorção na região do visível (GILROY *et al.*, 2016), uma pequena fração de átomos de Au encontram-se disponíveis para interagir com a radiação. Deste modo, ocorre uma diminuição na frequência de ressonância plasmônica na região do visível para as NPs-Au@Pd com 50 e 70% (m/m) do metal Pd. Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho publicado pelo pesquisador Hu e colaboradores (2005), onde o espectro de absorção exibe uma banda plasmônica das NPs-Au com intensidade máxima próximo de 500 nm que desaparece com uma cobertura metálica de Pd de apenas 10 nm de espessura. Diante disso, nota-se que a variação na concentração do metal Pd influencia significativamente na propriedade óptica das nanopartículas de Au, o que está coerente com a literatura (HU *et al.*, 2005; CUI *et al.*, 2008; PRETZER *et al.*, 2013; SRISOMBAT *et al.*, 2017).

Todo o procedimento de síntese empregado no preparo das nanopartículas metálicas é estritamente dependente do tipo de aplicação pela qual se destina, já que as propriedades finais, como tamanho, forma e composição química destas partículas podem ser facilmente projetadas conforme as estratégias utilizadas em sua produção. Por exemplo, neste trabalho de pesquisa, nanopartículas bimetálicas Au@Pd foram produzidas com adição de diferentes concentrações de paládio metálico, com o intuito de incorporar estes nanomateriais em estruturas do micélio fúngico de para formar materiais híbridos de alta área superficial constituído por fungo filamentosos e NPs-Au@Pd. Para esse objetivo, é necessário que as nanopartículas bimetálicas sejam estáveis durante o desenvolvimento das células fúngicas microtubulares e simultânea automontagem destes nanomateriais nestas estruturas biológicas, a fim de preservar as suas características físico-químicas.

Neste sentido, foi observado uma alteração na coloração da amostra NPs-Au@Pd com 0,5% (m/m) de Pd⁰ após um período de 24 h, como mostrado na Figura 21. Esta mudança de cor é resultante da aglomeração das nanopartículas, indicando deste modo, uma baixa estabilidade. Diante deste fato, foi decidido a exclusão da suspensão de NPs-Au@Pd com esta concentração de paládio para os próximos experimentos e caracterizações. O mesmo foi feito com a solução coloidal contendo NPs-Au@Pd com 70% (m/m) de Pd⁰, porém, por apresentar um alto conteúdo de paládio na dispersão, o que levaria a inibição do crescimento do fungo devido a toxicidade deste metal; impedindo assim, a formação do bio-híbrido fungo/NPs-Au@Pd.

Figura 21. Imagem digital de solução coloidal de nanopartículas bimetálicas Au@Pd com 0.5% (m/m) de Pd⁰ recém-preparada e após 24 h (da esquerda para direita).



Fonte: Própria autoria.

1.4.2 AVALIAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DAS NPs-Au@Pd COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO METAL Pd

A morfologia e o tamanho das nanopartículas de Au puras e das nanopartículas bimetálicas Au@Pd com 5%, 20% e 50% (m/m) de Pd são mostradas nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão com magnificação de 200.000X na Figura 22. Como evidenciado pela Figura 22A, as nanopartículas de Au apresentam uma morfologia esférica. Ao observar as Figuras 22B – D, pode-se notar que as nanopartículas de Au@Pd perdem o seu formato esférico à medida que aumenta a concentração do metal Pd. Além disso, percebe-se nitidamente que os tamanhos das nanopartículas bimetálicas Au@Pd aumentam gradualmente com o aumento da concentração do metal Pd, se comparado com os tamanhos das nanopartículas de Au puras (Fig. 22A).

Um comportamento semelhante foi observado por Hu et al (2005) em seu trabalho, o qual abordou a síntese de nanopartículas de Au@Pd com adição de diferentes quantidades de nanopartículas de Au. Ao comparar as micrografias de MET das nanopartículas de Au puras e das nanopartículas de Au@Pd com diferentes concentrações de Au⁰, os pesquisadores verificaram que as nanopartículas de Au@Pd apresentaram um aumento significativo no tamanho das partículas para

aquelas com maiores proporções de paládio (Figura 23); além disso, foi observado uma maior rugosidade na superfície das nanopartículas de Au@Pd à medida que diminui a quantidade de ouro no núcleo, se comparado com as nanopartículas de Au puras. Segundo Hu et al, essa diferença na morfologia pode ser atribuída à formação da camada de Pd sobre a superfície das nanopartículas de Au.

Figura 22. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas (A) Au, (B) Au@Pd 5%, (C) Au@Pd 20% e (D) Au@Pd 50%, com aumento de 200.000X.

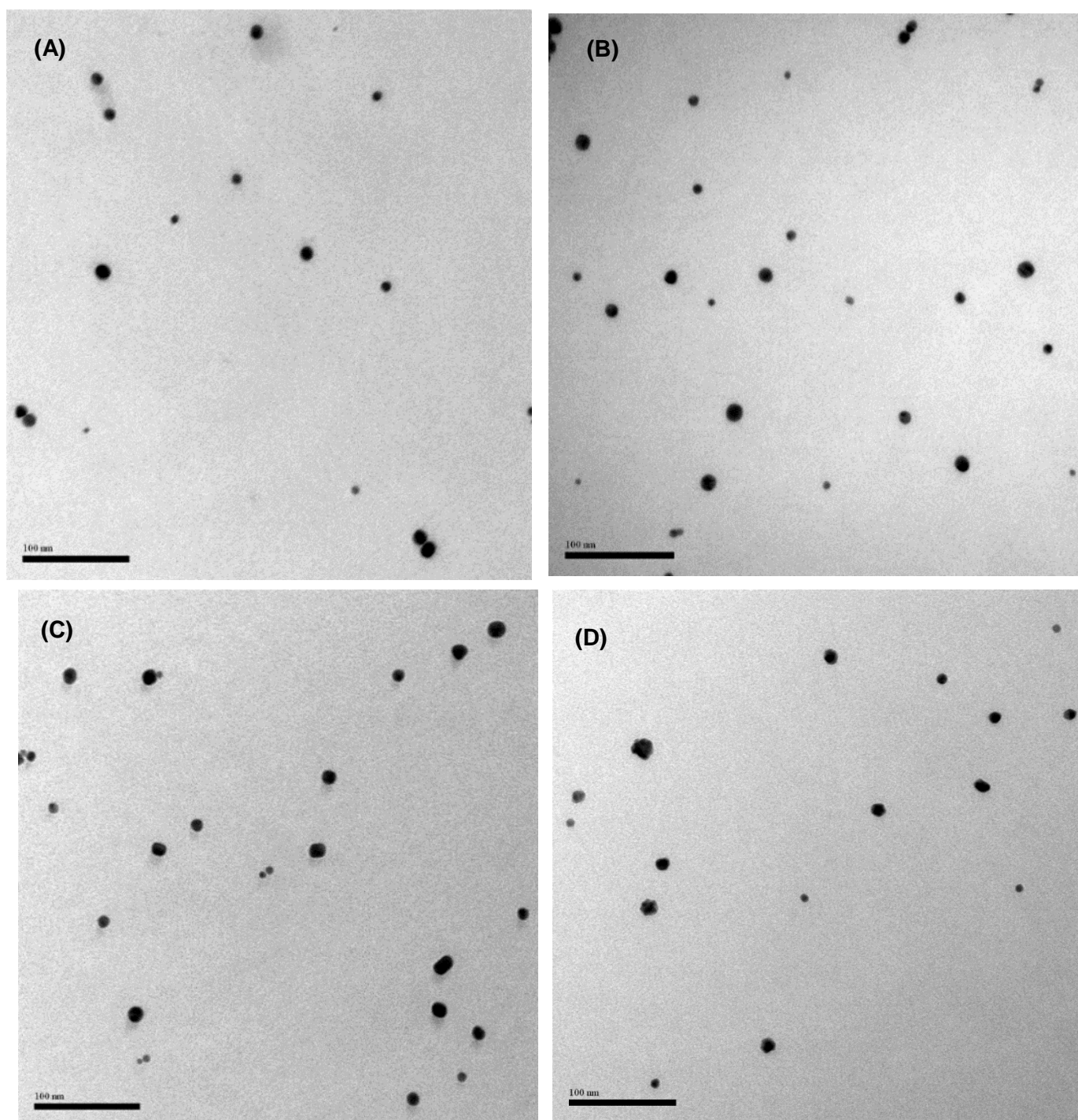
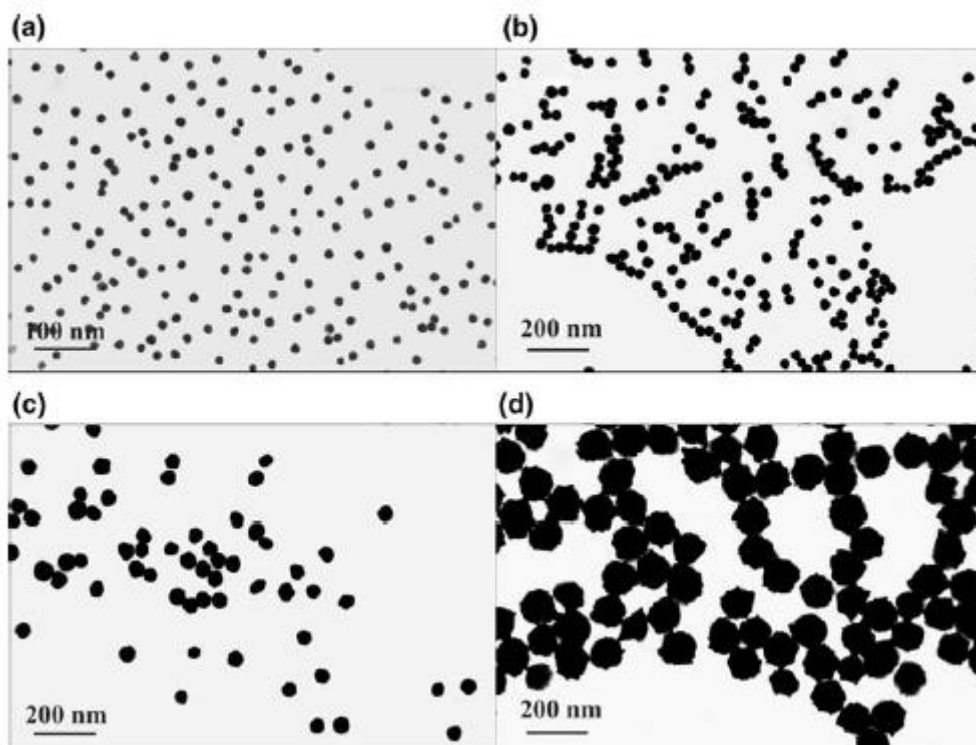


Figura 23. Imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de transmissão de (a) NPs-Au e NPs-Au@Pd com adição de (b) 20 mL, 5 mL (c) e (d) 0,5 mL de suspensão de NPs-Au.

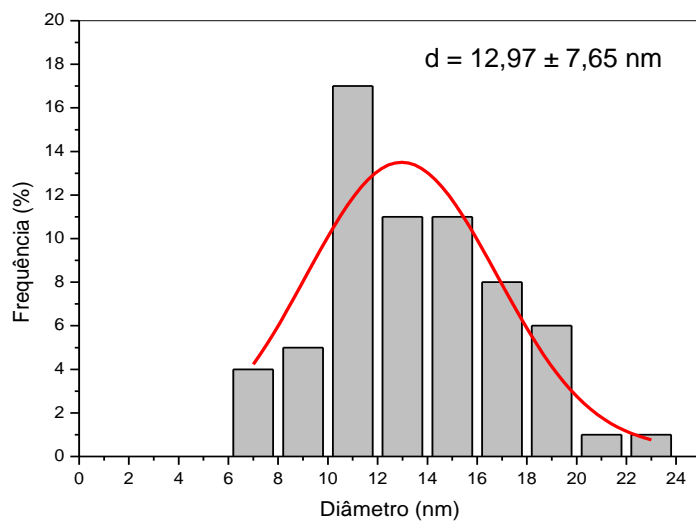
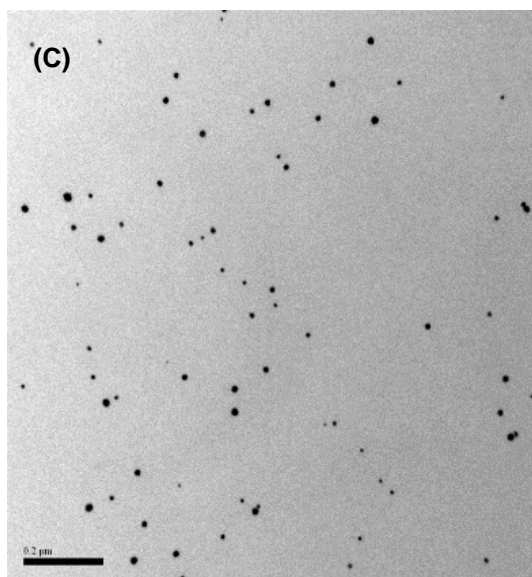
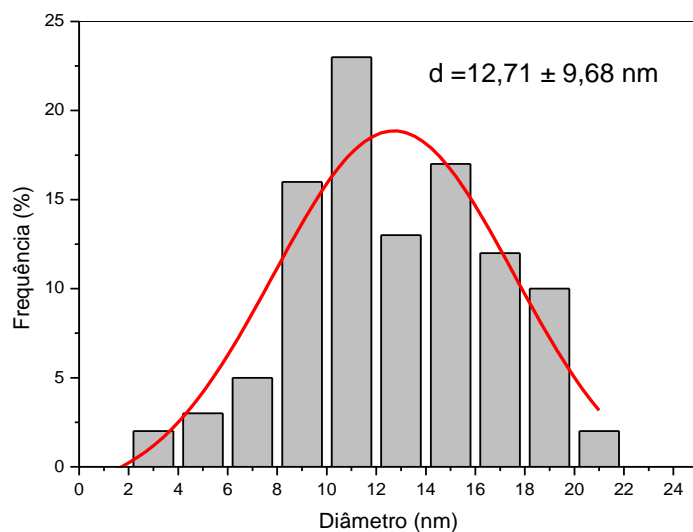
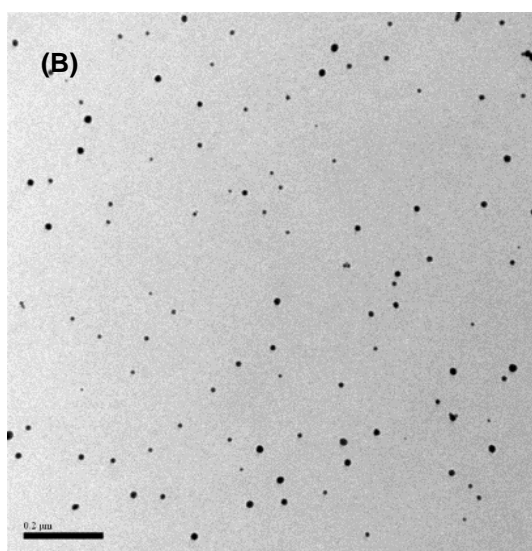
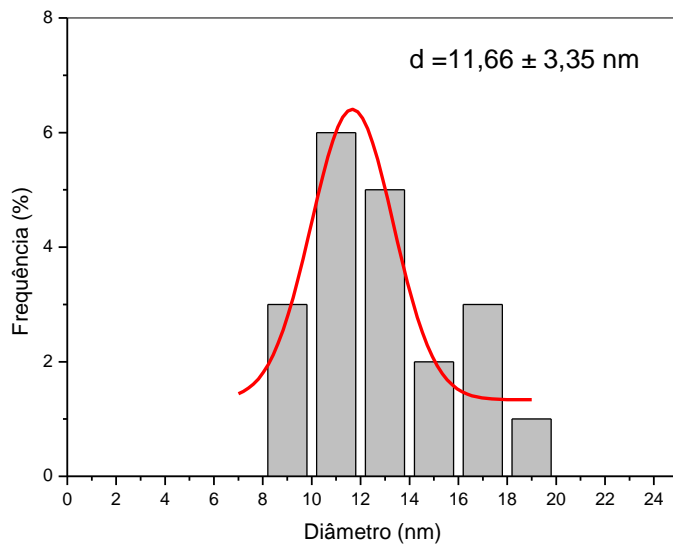
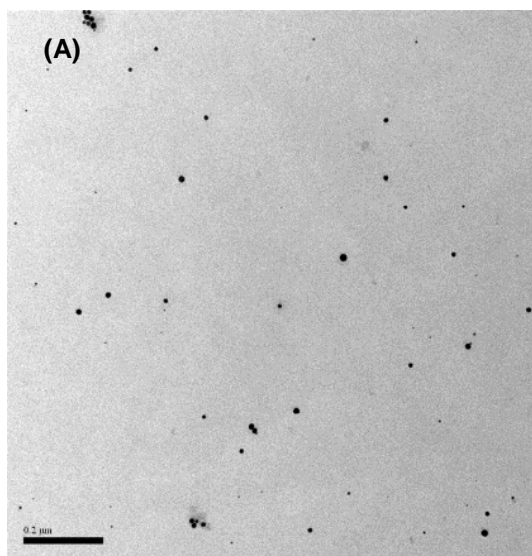


Fonte: HU et al., 2005.

Em comparação com os resultados apresentados por Hu et al. e somados com o efeito observado nos espectros de absorção na região do UV-vis (Fig.20), os quais foram descritos anteriormente, pode-se inferir que houve a formação de uma camada do metal Pd sobre a superfície das nanopartículas de Au, evidenciado pelo aumento no tamanho das nanopartículas de Au@Pd com maiores porcentagens do metal Pd. Além disso, pode-se inferir também que o aumento do tamanho das nanopartículas bimetálicas, resulta em uma camada de superficial de Pd⁰ mais espessa.

A distribuição de tamanho dos nanomateriais é uma informação simples, porém muito importante pois as propriedades dos materiais são dependentes da dimensão da partícula, como já discutido anteriormente (ZARBIN, 2007). A partir das imagens obtidas pelo MET é possível fazer uma estimativa do tamanho médio das nanopartículas dispersas em solução. Na Figura 24 são mostrados os histogramas de tamanho de partícula e suas respectivas micrografias com magnificação 100.000X. Imagens de MET foram escolhidas para serem a mais representativa possível para as amostras de nanopartículas bimetálicas.

Figura 24. Micrografias obtidas pelo MET e histogramas do tamanho de partícula correspondentes (A) NPs-Au, (B) NPs-Au@Pd 20% e (C) NPs-Au@Pd 50%, com aumento de 100.000X.



A contagem das partículas presentes nas imagens de MET foi realizada usando-se o programa *Image J*, onde foi possível obter também os valores da área e do diâmetro de cada nanopartícula. A partir dos dados de diâmetro de partícula, foram construídos os histogramas e feita a análise estatística com auxílio do programa *Origin 7.0*. Ao observar os histogramas de distribuição de tamanho de partícula, percebe-se um aumento no diâmetro das nanopartículas, à medida que aumenta a cobertura superficial do metal Pd sobre as nanopartículas de Au. O tamanho médio das nanopartículas de ouro (Fig. 24A) é de $11,66 \pm 3,35$ nm, já os o tamanho das nanopartículas bimetálicas de Au@Pd com 20% (Fig. 24B) e com 50% (Fig. 24C) de Pd⁰ apresentam diâmetro médio de $12,71 \pm 9,68$ nm e $12,97 \pm 7,65$ nm, respectivamente.

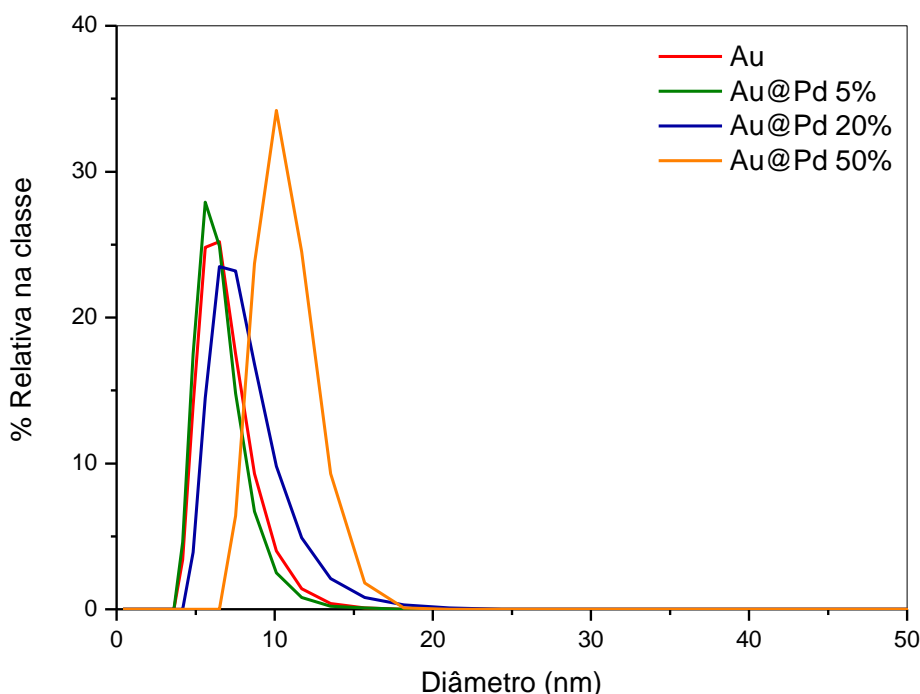
A partir dos histogramas apresentados na Figura 24, é possível notar também um alargamento na distribuição de tamanho para as nanopartículas bimetálicas de Au@Pd (Figuras 24B e C). Percebe-se que o histograma para as nanopartículas de ouro apresenta uma faixa estreita de tamanho de partícula, de aproximadamente 9 a 13 nm; já as nanopartículas bimetálicas de Au@Pd com 20% e com 50% de Pd⁰ apresentam uma faixa mais larga de diâmetro, em torno de 9 a 19 nm e 11 a 19 nm, respectivamente. Uma faixa ampla de tamanho na distribuição de partículas é indicativo de formação de nanopartículas polidispersas, isto é, com uma maior variabilidade de tamanhos de partículas. Então, pode-se inferir que as NPs-Au@Pd com 20% e 50% são polidispersas.

Na imagem da amostra de NPs-Au, percebe-se que as nanopartículas estão mais dispersas, ou seja, estão mais afastadas uma das outras. Já nas imagens das amostras das NPs bimetálicas, as partículas parecem estar mais próximas umas das outras dando uma ideia de uma quantidade maior de partículas por área se comparado com a imagem da amostra de NPs de Au. Por esta razão, há um número maior de nanopartículas na microrregião selecionada no microscópio para as nanopartículas bimetálicas Au@Pd 20% e 50%(m/m) do que para as nanopartículas de Au puras. Provavelmente, é por este motivo que há uma maior variabilidade nos tamanhos das nanopartículas bimetálicas, ou seja, uma faixa mais ampla de partículas com diferentes diâmetros.

Para efeito de comparação foram realizadas medidas de tamanho de partículas das nanopartículas em suspensão utilizando-se a técnica de espalhamento dinâmico

da luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*). Esta técnica consiste na medida da flutuação da intensidade da luz espalhada devido ao movimento Browniano de partículas de morfologia esféricas dispersas em fase líquida (BHATTACHARJEE, 2016). O tamanho da partícula está relacionado com a velocidade do movimento Browniano, que por sua vez é definido pelo coeficiente de difusão da partícula. Partículas menores se difundem mais rápido, enquanto partículas maiores movimentam-se mais lentamente (MALVERN INSTRUMENTS LTD., 2013; BHATTACHARJEE, 2016). Logo, as partículas menores apresentam um coeficiente de difusão maior do que as partículas grandes. No DLS, o tamanho hidrodinâmico da partícula coloidal é determinado a partir do coeficiente de difusão da partícula por meio da equação de Stokes-Einstein (MALVERN INSTRUMENTS LTD., 2013). Na Figura 25 é mostrada a distribuição de classes de tamanho de partículas para as suspensões de nanopartículas de Au e para as suspensões de nanopartículas bimetálicas Au@Pd em diferentes concentrações de paládio.

Figura 25. Curvas de distribuição de classes de diâmetro de partícula em número obtidas pelo espalhamento dinâmico da luz das nanopartículas de Au e de Au@Pd com diferentes concentrações de Pd⁰ (em massa).



Ao analisar as curvas de distribuição de tamanho, nota-se que não houve mudança significativa no diâmetro hidrodinâmico das NPs-Au após adição de 5%

(m/m) de paládio metálico, de maneira que as curvas referentes às suspensões de NPs-Au e de NPs-Au@Pd 5% encontram-se praticamente na mesma posição do gráfico. No entanto, ao comparar os valores de diâmetro hidrodinâmico médio das NPs-Au (5,87nm) com NPs-Au@Pd 20% (7,05 nm) e com NPs-Au@Pd 50% (10,07 nm), percebe-se um aumento considerável do tamanho das nanopartículas à medida que aumenta-se a concentração de Pd⁰ adicionada nas suspensões.

Portanto, pode-se inferir que o diâmetro hidrodinâmico das NPs-Au aumenta significativamente com adição de maiores concentrações de um segundo metal sobre sua superfície para formar nanopartículas bimetálicas do tipo *core-shell*. Diante desses resultados, observa-se que os valores dos diâmetros hidrodinâmicos são comparáveis às medidas de tamanho de partícula obtida através do MET, pois conforme se aumenta a quantidade de Pd metálico adicionada nas suspensões de nanopartículas esféricas de ouro, se verifica um deslocamento da curva de distribuição para valores maiores de diâmetro.

1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste primeiro capítulo foi apresentada uma visão geral sobre nanopartículas bimetálicas, os tipos de estruturas e as principais metodologias de síntese, tendo como destaque as nanopartículas bimetálicas com estrutura *core-shell*, as quais foram estudadas nesta presente pesquisa de doutorado. Também foi mostrado como a presença de um segundo metal na composição química de uma nanopartícula altera as suas propriedades físico-químicas, em especial as propriedades ópticas.

Um estudo do efeito da adição controlada de íons Pd²⁺ sobre o comportamento óptico de nanopartículas de Au foi apresentado, a fim de avaliar a melhor concentração do metal Pd em nanopartículas bimetálicas de Au@Pd para o posterior cultivo de fungos filamentosos nestas soluções coloidais. Por meio dos espectros de absorção na região do UV-vis das suspensões das NPs-Au antes e após adição de íons paládio, foi possível notar uma diminuição da intensidade da banda plasmônica das nanopartículas de ouro conforme aumenta-se a concentração de íons Pd²⁺ nas nanopartículas bimetálicas. Essa alteração na propriedade óptica das NPs-Au é evidenciada também pela nítida mudança de coloração das soluções coloidais dessas nanopartículas com aumento da

concentração de paládio.

Foi mostrado também a estrutura morfológica e o tamanho médio das nanopartículas de Au puras e das nanopartículas bimetálicas Au@Pd preparadas com 20% e 50% (m/m) de íons Pd²⁺. Com base na distribuição de tamanho de partícula, verificou-se que as nanopartículas de ouro apresentaram um diâmetro médio de 11,66 ± 3,35 nm e as nanopartículas Au@Pd com 20% e 50% de íons Pd²⁺ exibiram diâmetro médio de 12,71 ± 9,68 nm e 12,97 ± 7,65 nm, respectivamente. Os valores de diâmetro hidrodinâmico médio obtidos por DLS foram: 5,87 nm para as NPs-Au, 7,05 nm para as NPs-Au@Pd com 20% e 10,07 nm para as NPs-Au@Pd com 50% de íons Pd²⁺. Os resultados mostraram que o tamanho das nanopartículas bimetálicas aumenta à medida que é adicionado maiores quantidades de paládio metálico na superfície deste nanomaterial, o que corrobora com os dados obtidos por MET. Os resultados obtidos pela caracterização destes nanomateriais são de extrema importância para a etapa seguinte da pesquisa, que é a integração das nanopartículas bimetálicas de Au@Pd em fungos filamentosos para formação de um novo bio-material com um grande potencial de aplicação em diversas áreas da ciência.

CAPÍTULO II

**USO DE FUNGOS FILAMENTOSOS COMO SUPORTE
BIOLÓGICO PARA O PREPARO DE MATERIAIS HÍBRIDOS**

2.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, uma nova classe de biomateriais constituída por fungos filamentosos e nanopartículas de metais nobres vem ganhando relevância devido à possibilidade de se combinar as propriedades de nanopartículas inorgânicas (como condutividade elétrica e atividade óptica) com estruturas biológicas de microrganismos (Li *et al.*, 2003; BIGALL *et al.*, 2008; BIGALL, EYCHMÜLLER, 2010). Estes materiais híbridos são obtidos através do crescimento de filamentos fúngicos em soluções contendo nanopartículas de metais nobres e uma fonte de carbono. Durante o crescimento dos fungos, ocorre simultaneamente a deposição de nanopartículas na parede celular, formando uma espessa camada metálica sobre os filamentos fúngicos (KUBO *et al.*, 2016).

Devido à sua morfologia tubular uniforme, fácil cultivo, disponibilidade e baixo custo, os fungos filamentosos são considerados suportes biológicos ideais para a produção em larga escala de materiais híbridos (ULLAH *et al.*, 2017). O uso de fungos filamentosos como molde biológico para deposição de nanopartículas metálicas pode formar materiais estáveis e com alta área superficial, características estas favoráveis para potencial aplicação como catalisadores e sensores eletroquímicos (FONTES *et al.*, 2014).

No entanto, existem algumas desvantagens que ainda precisam ser elucidadas para essa classe de materiais. Por exemplo, Bigall e colaboradores (2008) revelaram que os microrganismos apresentam afinidades diferentes para nanopartículas monometálicas. Por meio de medidas de EDX, verificou-se que o fungo filamentoso identificado como T07AS foi capaz de assimilar cerca de 10 vezes mais nanopartículas de ouro na sua estrutura do que nanopartículas de paládio e de platina.

De fato, existem relatos na literatura sobre a toxicidade de nanopartículas de platina, de paládio e de prata sobre diferentes tipos de microrganismos e células (ELDER *et al.*, 2007; ADAMS *et al.*, 2014; PAŘIL *et al.*, 2017). Assim, uma alternativa para melhorar a assimilação dessas nanopartículas em fungos filamentosos seria o preparo de nanopartículas de ouro revestidas por uma fina camada de outros tipos de metais. Para testar esta hipótese nesta presente pesquisa, foi escolhido o metal paládio para o preparo, pela primeira vez, de suspensão de nanopartículas bimetálicas

de ouro e paládio com estrutura *core-shell* para integração em estrutura de fungos filamentosos.

Diante disso, como um dos objetivos deste trabalho de doutorado tem-se, a síntese e caracterização de materiais híbridos constituídos por fungos filamentosos e nanopartículas bimetálicas de Au@Pd. Neste capítulo será apresentada uma revisão da literatura sobre a formação de materiais híbridos constituídos por fungos filamentosos e nanopartículas de metais nobres, as diferentes metodologias utilizadas para sua síntese, e os tipos de pré-tratamento realizados para a caracterização do bio-híbrido. Por fim, será mostrado o procedimento de preparo dos materiais híbridos de fungos filamentosos e nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio pelo processo de automontagem, bem como a caracterização desses bio-híbridos.

2.2 REVISÃO DA LITERATURA

2.2.1 USO DE FUNGOS COMO SUPORTE BIOLÓGICO PARA SÍNTESE DE MATERIAIS HÍBRIDOS

Nas últimas décadas, pesquisadores da área de nanotecnologia têm buscado na natureza inspiração para desenvolver uma nova classe de materiais com grande potencial de aplicação em diversos segmentos da ciência e da tecnologia. Os sistemas biológicos com sua intrigante complexidade e perfeição, mecanismos e formas únicas, vem sendo utilizados como suporte biológico para a fabricação de materiais micro e nano estruturados (SELVAKUMAR *et al.*, 2014; RIPLEY; BHUSHAN, 2016).

Um suporte biológico pode ser definido como um molde ou modelo de origem biológica; que pode ser utilizado na síntese de nano e micro materiais com controle de formas geométricas bem definidas, usando uma abordagem de síntese do tipo *bottom up* (SELVAKUMAR *et al.*, 2014). Na literatura é possível encontrar diversos trabalhos que utilizam suporte biológico obtidos a partir de microrganismos como vírus, bactérias, fungos e algas, e biomoléculas como o DNA, para o desenvolvimento de materiais nano/micro materiais (BIGALL *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2015; IJIRO; MITOMO, 2017). Nesta revisão da literatura será abordado o uso de

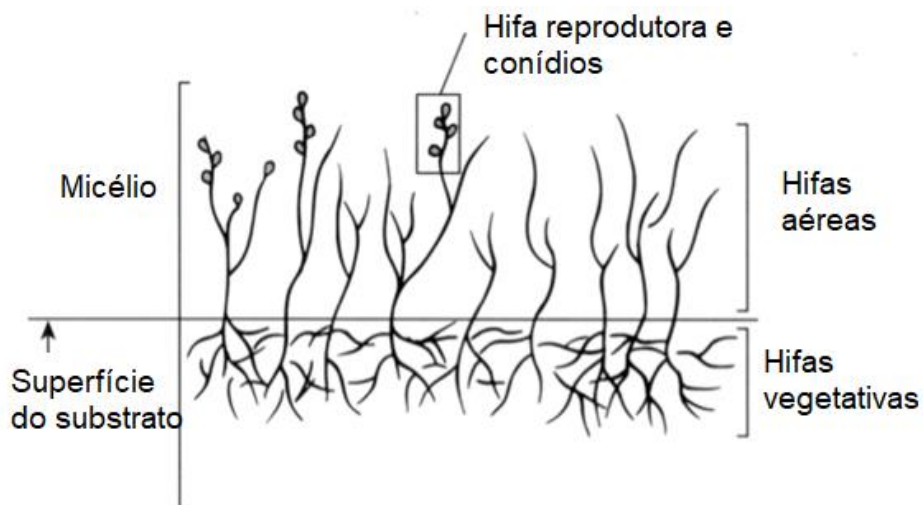
fungos como suporte biológico, já que este é o foco da presente pesquisa.

Os fungos são organismos que ocupam praticamente todos os compartimentos terrestres (ROSÁRIO *et al.*, 2019). Eles podem ser encontrados no solo, na água, no ar, em vegetais e animais vivos, em alimentos em decomposição, em medicamentos e em setores alimentícios nos supermercados. Por esta razão, os fungos são tão importantes para a manutenção da vida de um modo geral (MORAES, PAES, HOLANDA, 2009). Os fungos são microrganismos eucarióticos, ou seja, possui um núcleo bem definido envolto por uma membrana; e podem ser unicelulares (leveduras) ou multicelulares (filamentosos) (MORAES, PAES, HOLANDA, 2009).

Estes organismos são seres heterotróficos pois não produzem seu próprio alimento, e têm o papel muito importante para a natureza atuando como “lixeiros”, decompondo todo tipo de matéria orgânica e transformando-a em nutrientes assimiláveis pelo ecossistema (SPOONER, ROBERTS, 2005; MORAES, PAES, HOLANDA, 2009). Os fungos utilizados como suporte biológico para síntese de materiais híbridos neste trabalho de doutorado, são fungos filamentosos isolados de plantas coletadas na área de proteção ambiental da Lagoa de Abaeté em Salvador-BA. Por esta razão, a presente revisão bibliográfica terá como ênfase os fungos filamentosos.

A maior parte dos fungos filamentosos se reproduzem produzindo esporos, que em contato com um meio rico em nutrientes e em condições favoráveis como calor e umidade, germinam produzindo milhares de filamentos finos simples ou ramificados denominados de hifas (SPOONER, ROBERTS, 2005; MORAES, PAES, HOLANDA, 2009). O conjunto de hifas é chamado de micélio, como é mostrado na Figura 26. Cada hifa possui em média 5 a 20 μm de largura, e por isso só é possível a sua visualização com auxílio de um microscópio. Já o micélio que é um aglomerado de hifas é facilmente visível a olho nu (SPOONER, ROBERTS, 2005).

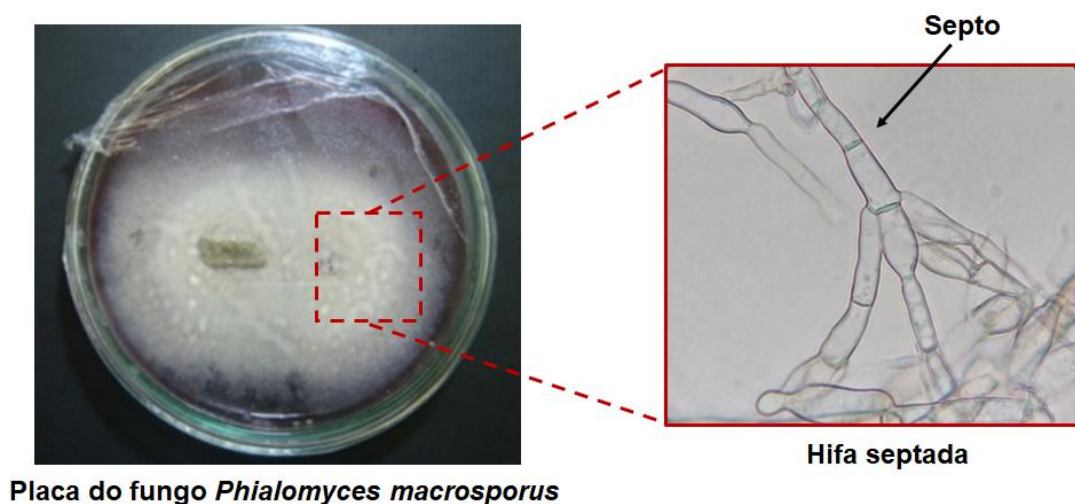
Figura 26. Representação esquemática das estruturas dos fungos filamentosos.



Fonte: FORTUNA, 2020.

As hifas podem ser divididas em compartimentos celulares (hifas septadas) que contêm núcleos e citoplasma. Cada compartimento é separado por um septo, uma parede porosa que permite a passagem de água e nutrientes de um compartimento para outro (SPOONER, ROBERTS, 2005). Na Figura 27 é mostrada uma placa do fungo *Phialomyces macrosporus*, onde é possível observar o micélio (região de coloração branca) e na imagem ampliada, as suas hifas septadas. (SPOONER, ROBERTS, 2005).

Figura 27. Imagem digital de uma placa de fungo da espécie *Phialomyces macrosporus* e uma imagem obtida pelo microscópio óptico das suas hifas.



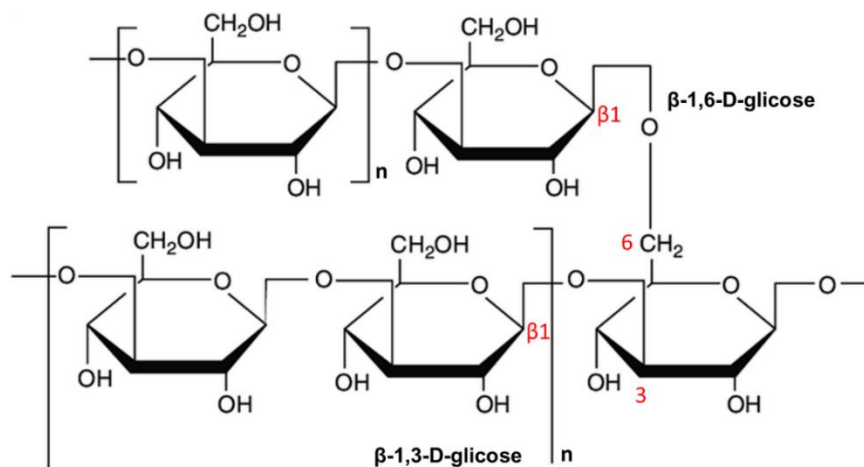
Fonte: Própria autoria.

Os fungos filamentosos são capazes de crescer de forma unidirecional a partir das extremidades das suas hifas. Cada hifa cresce e se ramifica a partir da sua extremidade (ponta), se espalhando indefinidamente enquanto houver uma fonte de alimento. Por causa das suas hifas, o fungo pode dar origem a um novo organismo, simplesmente por meio da retirada de um pequeno fragmento que é posicionado em um substrato nutritivo. Os fungos são considerados seres heterotróficos, necessitando de compostos orgânicos já formados, que servem como fonte de energia e como constituintes celulares. Por causa da rigidez da parede celular, sua nutrição ocorre por meio da absorção de nutrientes. A parede celular secreta enzimas que digerem o material orgânico no ambiente, e os nutrientes resultantes do processo enzimático são absorvidos através desta parede celular fúngica especializada (MORAES, PAES, HOLANDA, 2009; SYKES; RANKIN, 2013).

Desempenhando importante função para a manutenção da vida dos fungos filamentosos, a parede celular destes microrganismos consiste em uma estrutura dinâmica que fornece resistência a variações na pressão osmótica do ambiente e protege o fungo de compostos tóxicos. Além disso, permite interações das células fúngicas com o ambiente e determina a sua forma e estrutura (FEOFILOVA, 2010).

A parede celular dos fungos filamentosos é composta em sua maior parte por glucanas, glicoproteínas, manoproteínas e quitina (LATGÉ, 2010). Cerca de 50 a 60% da massa seca da parede celular fúngica é formada por glucanas (polissacarídeos altamente ramificados), sendo o principal componente o polissacarídeo β -1,3-glucana, que consiste em longas cadeias lineares formada por D-glicose ligadas via ligação glicosídica β 1 \rightarrow 3. Na Figura 28 é mostrada a estrutura química de uma cadeia de β -1,3-glucana com ramificação glicosídica β 1 \rightarrow 6. Outros tipos de glucanas podem ser encontradas em várias paredes celulares fúngicas, a depender da espécie, como β -1,6-glucana, α -1,3-glucana e β -1,4-glucana (BOWMAN; FREE, 2006).

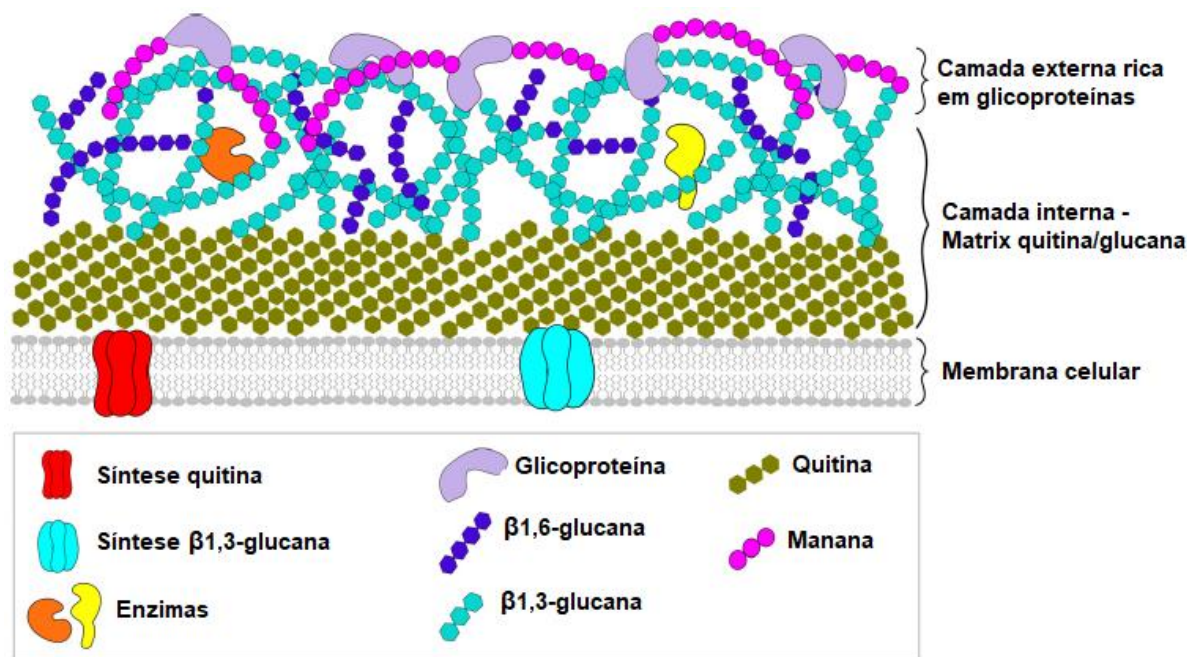
Figura 28. Representação da estrutura química da β -1,3-glucana ligada à uma cadeia de β -1,6-glucana. A unidade básica das β -glucanas presentes nos fungos é β -D-glicose.



Fonte: ABUAJAH, 2017.

A parede celular de fungos filamentosos é constituída por três camadas, como mostra a Figura 29; a primeira é formada pela membrana celular, logo acima desta encontra-se microfibrilas de quitina, que são cadeias lineares β -(1,4)-N-acetilglucosamina. Este polissacarídeo estrutural confere uma certa rigidez à parede celular, o qual contribui para a integridade do microrganismo (GEOGHEGAN; STEINBERG; GURR, 2017). Em seguida, tem-se a camada interna formada por β -glucanas e enzimas que junto com a quitina forma uma estrutura reticular com característica mais fibrosa. E por último, tem-se a camada externa, a qual é rica em glicoproteínas. Nesta camada, as glicoproteínas (principalmente galactomanoproteínas) e β -glucanas formam uma rede tridimensional, que ao contrário da camada interna, consiste em uma matriz gelatinosa (BOWMAN; FREE, 2006; LATGÉ, 2010; GEOGHEGAN; STEINBERG; GURR, 2017).

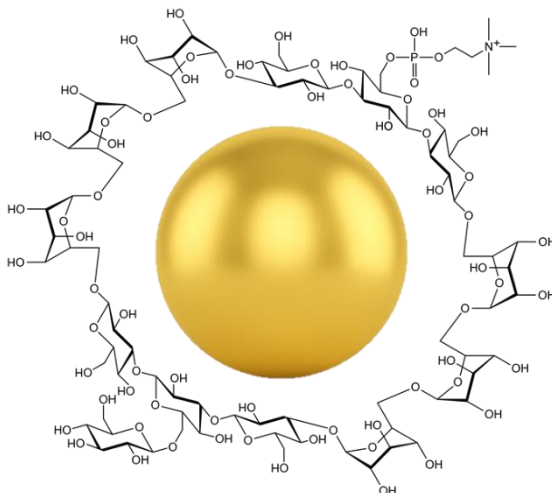
Figura 29. Representação esquemática básica da estrutura da parede celular de fungos filamentosos. A parede celular é composta pela membrana celular, por uma matrix quitina/glucana e a uma camada externa rica em glicoproteínas.



Fonte: Adaptada de GEOGHEGAN; STEINBERG; GURR, 2017.

Ao observar a estrutura molecular da β -1,3-glucanas na Figura 28, nota-se a presença de grupos hidroxilas (-OH) e átomos de oxigênio ao longo da cadeia carbônica. Estes grupos funcionais podem interagir com nanopartículas metálicas por meio de interações eletrostáticas (Figura 30). Os átomos de oxigênio com carga parcial negativa desses grupamentos químicos interagem fortemente com a superfície eletricamente positiva das nanopartículas metálicas. Essas interações eletrostáticas contribuem para que as nanopartículas fiquem ancoradas na estrutura reticular formada pelas β -glucanas ligadas covalentemente com proteínas e demais componentes da parede celular de fungos filamentosos (FONTES, 2012; FONTES *et al.*, 2021). É por esta razão, que estes microrganismos apresentam afinidade com nanopartículas metálicas, em especial com as nanopartículas de ouro. Por isso, os fungos filamentosos são considerados como suporte biológico ideal para construção de materiais micro-estruturados através de processos de automontagem (FONTES *et al.*, 2014). Diante disso, no próximo subitem será apresentada uma revisão da literatura sobre os variados materiais híbridos desenvolvidos com a integração de nanomateriais em estruturas celulares de fungos filamentosos.

Figura 30. Representação de uma nanopartícula metálica esférica ligada em uma macromolécula de β -1,3-glucana por interação eletrostática.



Fonte: Adaptado de ROLIN *et al.*, 1992.

2.2.2 MATERIAIS HÍBRIDOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Um dos primeiros exemplos de formação de materiais híbridos a partir de fungos filamentosos foi demonstrado por Martino e colaboradores em 2003. Apesar dos autores estarem investigando o efeito da descontaminação do amianto por fungos filamentosos, perceberam que além de diminuir a toxicidade desse material particulado, os fungos tiveram a capacidade de assimilar essas nanopartículas no tecido micelar. A Figura 31 mostra a imagem de uma solução aquosa com amianto em suspensão ($1,5 \mu\text{m}$). Após o cultivo do fungo MUT 840, as fibras de amianto são removidas da suspensão e assimiladas pelo micélio do fungo.

Figura 31. Imagem digital mostrando o efeito do micélio fúngico em uma suspensão de amianto. (A) Solução aquosa com amianto e (B) sem amianto dispersos em solução, após assimilação do mesmo pelo fungo.



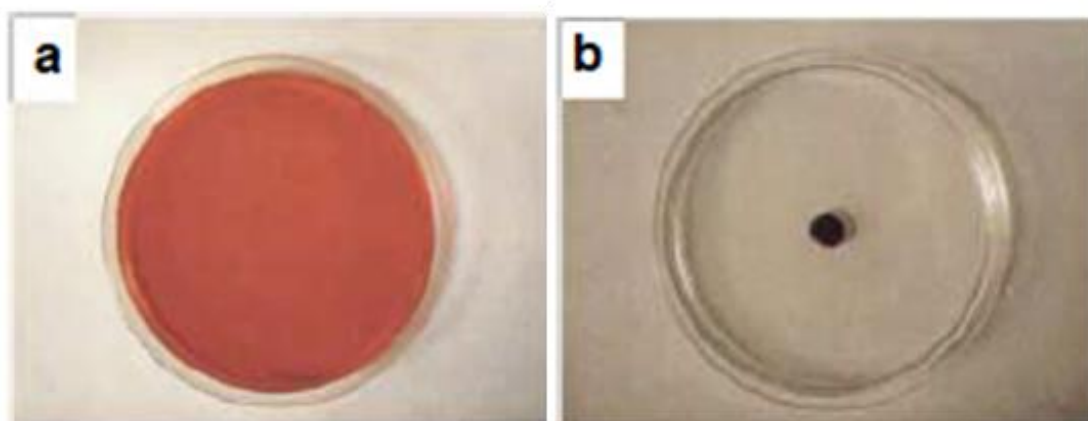
Fonte: MARTINO *et al.*, 2003.

É importante perceber que o principal objetivo dos pesquisadores foi buscar uma forma de minimizar a toxicidade das fibras de amianto, através da liberação de substâncias quelantes que sequestram íons de ferro por fungos filamentosos. O ferro é reconhecido como um elemento que contribui para a toxicidade do amianto e, sua remoção, reduz o dano celular em experimentos *in vitro*. De fato, a crocidolita, um dos carcinógenos fibrosos mais potentes, possui até 29% de Fe em sua estrutura cristalina. Originalmente, os autores investigaram a capacidade de alguns fungos do solo crescerem na presença de fibras de crocidolita para modificar a superfície das fibras inorgânicas e então reduzir a toxicidade. Assim, sem querer, os autores mostraram um dos primeiros exemplos de assimilação de nanopartículas por fungos filamentosos (MARTINO *et al.*, 2003).

No mesmo ano, Li e colaboradores (2003) demonstraram a síntese de um material híbrido constituído de hifas de fungos filamentosos e nanopartículas de ouro funcionalizadas com oligonucleotídeos. O primeiro passo desta síntese consistiu no preparo de nanopartículas de ouro funcionalizadas com fragmentos de DNA. Em seguida, estas nanopartículas foram dispersas em um meio nutritivo, onde posteriormente, esporos do fungo filamentoso *Aspergillus niger* foram adicionados. Após algum tempo, os esporos do fungo germinaram, e as hifas cresceram, enquanto a coloração avermelhada do meio foi cada vez diminuindo até torna-se transparente,

como mostra as imagens da Figura 32A e B. Por fim, foram obtidos micélios fúngicos com coloração roxa avermelhado, devido a presença de nanopartículas de ouro na superfície das hifas. A montagem das nanopartículas de ouro nas hifas fúngicas são favorecidas pela interação dos oligômeros de DNA adsorvidos na superfície das referidas partículas com os componentes da parede celular do fungo filamentoso. Essa interação se dar pelos grupos funcionais presentes nos fragmentos de DNA, como os grupos aminas e amidas das bases nitrogenadas e os grupamentos fosfatos, que podem formar ligações de hidrogênios com as hidroxilas presentes nas β -1,3-glucanas da parede celular do fungo.

Figura 32. Integração de nanopartículas de Au em fungos filamentosos. a) Imagem digital do meio de cultura com suspensão de nanopartículas de Au e esporos do fungo *Aspergillus niger*. b) Micélio fúngico de coloração vermelho intenso formado com a montagem das nanopartículas de Au nas hifas do fungo durante o seu crescimento.



Fonte: LI *et al.*, 2003.

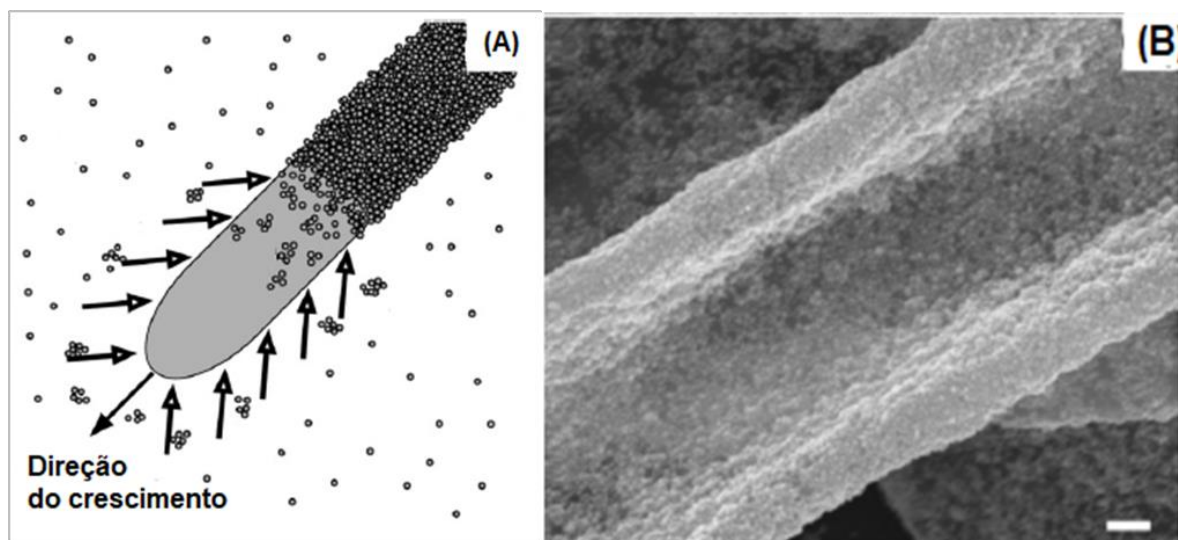
O trabalho de Li e colaboradores foi o primeiro a utilizar fungos filamentosos como suporte biológico para automontagem de nanopartículas metálicas para produção de materiais bio-híbridos. Este estudo serviu de inspiração para o desenvolvimento de novos métodos de integração das nanopartículas metálicas na superfície de células de fungos vivos para produção de materiais microscópicos com diversas aplicabilidades. Como exemplo, tem-se o trabalho publicado por Sugunan e colaboradores em 2007, o qual mostrou um método mais simples de obtenção de bio-híbridos constituídos por fungos e nanopartículas metálicas; visto que a

funcionalização de nanopartículas metálicas com DNA, proposta por Li e colaboradores, é dispendiosa e complicada. Nesse sentido, os pesquisadores mostraram uma metodologia de produção de materiais híbridos utilizando NPs-Au estabilizadas com íons glutamato e fungos filamentosos vivos (SUGUNAN *et al.*, 2007).

No estudo realizado por Sugunan e colaboradores foi utilizado o reagente glutamato monossódico como agente redutor e estabilizador na síntese de NPs-Au. Em seguida, esporos de diferentes espécies de fungos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* ou *Neurospora crassa*) foram adicionados à solução coloidal de NPs-Au, sem adição de nutrientes. No processo de cultivo do fungo na solução coloidal de NPs-Au, o glutamato atuou como fonte de carbono e nitrogênio para o desenvolvimento do microrganismo. Este trabalho foi o primeiro a propor um mecanismo para o processo de montagem das nanopartículas metálicas sobre a superfície de hifas de fungos. Os autores sugeriram que no processo de automontagem das partículas no suporte biológico ocorre uma aglomeração das nanopartículas ao redor das hifas, induzida pelo consumo de íons glutamato pelo metabolismo do fungo em crescimento. Esses aglomerados movem-se para superfície da hifa através do movimento Browniano, formando uma camada espessa e uniforme de nanopartículas de ouro, como é ilustrado na Figura 33A.

A micrografia obtida pelo MEV dos bio-híbridos constituído de nanopartículas de ouro e micélio de fungos filamentosos foi apresentada nesse artigo científico, como é mostrado na Figura 33B. Por meio desta micrografia, os pesquisadores observaram que a morfologia tubular da hifa não foi preservada, e além disso, nota-se a presença de uma densa camada metálica em toda a superfície das microestruturas. Provavelmente, estas microestruturas tubulares foram colapsadas durante a etapa de secagem ao ar, ou seja, as nanopartículas de ouro aderidas na parede celular fúngica se aglomeraram de tal maneira a ponto de formar ouro massivo. Para preservar a forma tubular, o material orgânico do bio-sistema foi removido pelo processo de extração de CO₂ supercrítico, um importante método de secagem, por meio do qual foi possível obter de forma inédita, microtubos de ouro (SUGUNAN *et al.*, 2007).

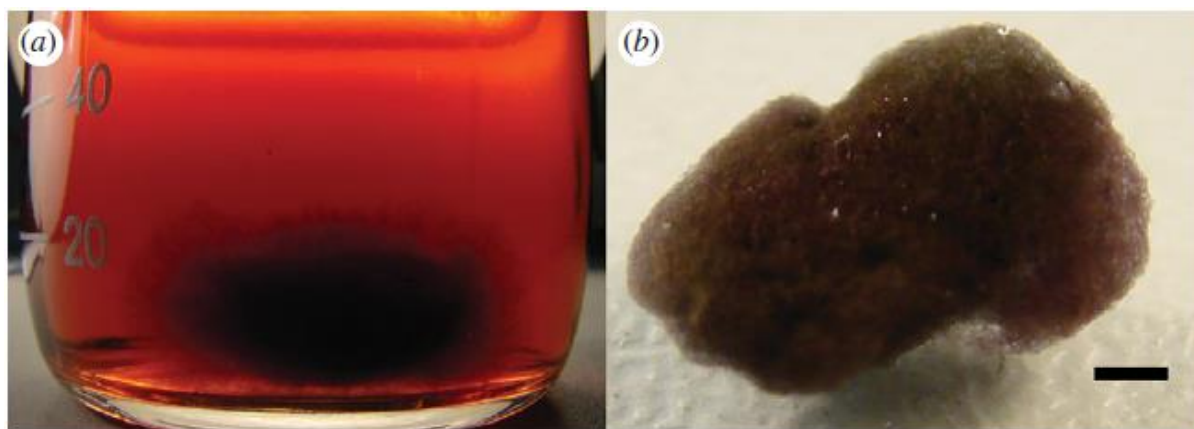
Figura 33. Integração de nanopartículas de ouro na superfície de hifas fúngicas: (A) Ilustração esquemática do processo de automontagem das nanopartículas em fungos filamentosos em crescimento, (B) Imagem de MEV mostrando uma hifa densamente revestida por NPs-Au (barra de escala 20 μm).



Fonte: Adaptado de SUGUNAN *et. al.*, 2007.

No ano seguinte, Bigall e colaboradores (2008) publicaram um trabalho científico que mostra a habilidade de diferentes espécies de fungos filamentosos em crescer diretamente em soluções coloidais de nanopartículas metálicas estabilizadas por íons citrato. Na Figura 34A é mostrado o cultivo do fungo *Penicillium citreonigrum* em suspensão de NPs-Au estabilizadas por íons citrato. O material híbrido metal-fungo foi desidratado por meio da secagem ao ponto crítico de CO_2 , o mesmo processo de secagem utilizado no trabalho de Sugunan *et al.*, preservando assim, as formas tridimensionais do bio-sistema. Na Figura 34B é possível observar o material híbrido obtido após a secagem.

Figura 34. Imagens digitais de (a) estrutura híbrida ouro-*Penicillium citreonigrum* em uma suspensão de nanopartículas de ouro e (b) após a secagem por ponto crítico (barra da escala, 0,1 cm).



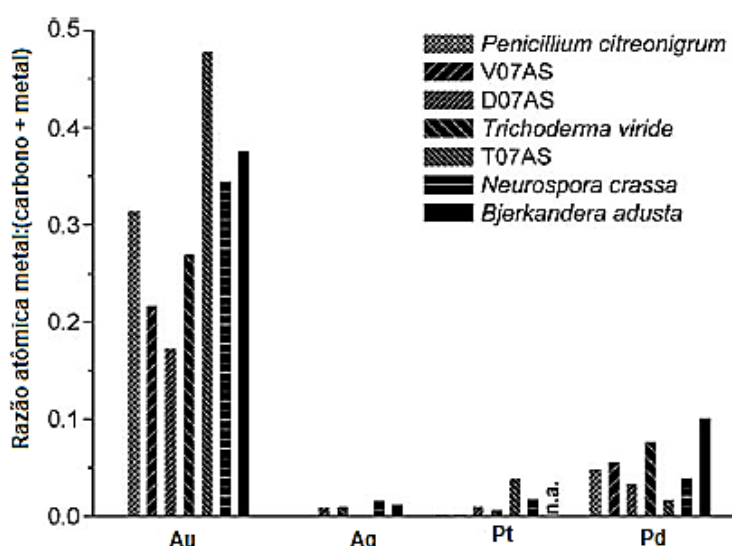
Fonte: BIGALL; EYCHMÜLLER, 2010.

A pesquisa de Bigall e colaboradores também mostrou que a afinidade por diferentes nanopartículas de metais, como ouro, prata, platina e paládio, varia conforme a espécie do fungo utilizada no cultivo. Neste estudo foram utilizadas sete espécies de fungos filamentosos (*P. citreonigrum*, *C. virescens* var. *Chlamydosporum*, *T. viride*, *P. herbarum* Westendorp, *N. crassa* e *B. adusta*), os quais foram cultivados durante um período de dois meses, em soluções coloidais de nanopartículas de ouro, de prata, de platina e de paládio estabilizadas por ânion citrato. Não foi adicionado nenhum meio nutritivo nos sistemas de cultura, já que o citrato residual da síntese das nanopartículas serviu como nutriente para o crescimento dos fungos. Os resultados do teste de afinidade foram obtidos a partir da análise de espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) das amostras de bio-híbridos de nanopartículas e fungos (Figura 35).

O melhor crescimento dos fungos foi observado em suspensões de nanopartículas de ouro, seguido de platina e de paládio. O crescimento em solução coloidal de nanopartículas de prata foi observado apenas para *B. adusta*. Pelo gráfico apresentado pela Figura 35, verifica-se que todas as espécies de fungos estudadas apresentaram maior afinidade pelas nanopartículas de ouro, se comparado com as nanopartículas constituídas pelos demais metais. Com base nesse resultado, optou-se, neste presente trabalho de doutorado, por utilizar o metal ouro como semente para

nucleação heterogênea de paládio metálico para formar nanopartículas com o núcleo rico em ouro e uma tênue camada de paládio para posterior integração em fungos filamentosos, como uma estratégia para contornar a baixa afinidade dos fungos com o metal paládio. Testes catalíticos foram realizados para investigar se os sítios metálicos permaneceriam cataliticamente ativos nessas micro-estruturas tubular. Os resultados indicaram que as nanopartículas apresentam atividade catalítica mesmo quando assimiladas pelo microrganismo (BIGALL *et al.*, 2008).

Figura 35. Gráfico mostrando as diferentes afinidades metálicas de sete fungos diferentes. Os resultados das frações atômicas metal:(carbono+metal) foram obtidas por espectroscopia de raios X por energia dispersiva.



Fonte: BIGALL *et al.*, 2008.

Em 2014, Fontes e colaboradores divulgaram uma metodologia de síntese de microtubos de ouro que imitam a morfologia de fungos filamentosos através da automontagem de nanopartículas de ouro sobre o microrganismo. Primeiramente, foi escolhido espécies de fungos de filamentosos com maior afinidade por nanopartículas de ouro para atuarem como modelo biológico (*Phialomyces macrosporus*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.* e *Aspergillus niger*). Os microrganismos foram cultivados em soluções contendo nanopartículas de ouro estabilizadas com íons citrato e com razões molares entre citrato e ouro variáveis (0,3; 2,0; 3,7; 7,1 e 17,3). Este estudo possibilitou a investigação da condição ótima para a deposição das

nanopartículas nas hifas dos fungos. Para o cultivo do fungo, não foi adicionado nenhum nutriente no sistema de cultura, pois o citrato presente na solução, além de servir como agente estabilizante eletrostático para as nanopartículas, atuou como uma fonte de carbono para favorecer o crescimento do fungo.

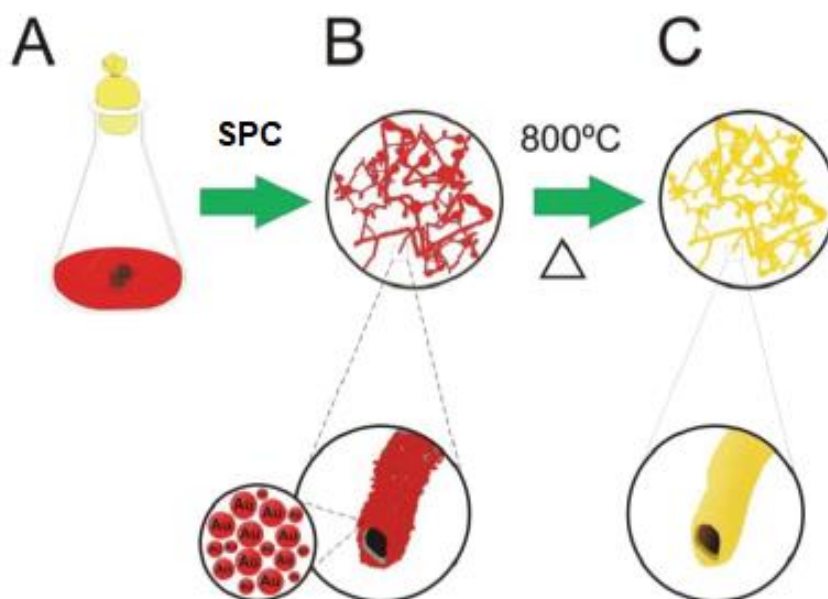
A partir de imagens obtidas pelo MET, os pesquisadores verificaram que a concentração dos ânions citrato no meio de cultura influencia significativamente no processo de automontagem das nanopartículas de ouro na parede celular fúngica. Por exemplo, verificou-se que a melhor condição para a obtenção do bio-híbrido *Phialomyces macrosporus*/ NPs-Au foi em soluções com [cit]:[Au³⁺] = 7,1). (FONTES *et al.*, 2014). O conhecimento a respeito do fungo que possui maior afinidade com nanopartículas de ouro e a proporção ideal de citrato e ouro para a deposição destas partículas sobre o microrganismo foram de extrema importância para o desenvolvimento desta presente tese.

Por meio desta síntese, foram obtidos materiais híbridos com uma espessa camada de nanopartículas de ouro, as quais encontram-se embebidas na parede celular do fungo filamentoso. Posteriormente, o híbrido fungo/NPs-Au foi submetido ao processo de secagem por ponto crítico, para evitar aglomeração das nanopartículas e destruição da estrutura tubular; em seguida, uma eliminação da biomassa orgânica foi realizada por uma etapa de calcinação simples para obter estruturas microtubulares de ouro, como mostra a ilustração representada pela Figura 36 (FONTES *et al.*, 2014).

Este trabalho científico foi o primeiro a propor um mecanismo para o processo de automontagem de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato sobre micélio fúngico. Os autores sugeriram que durante o crescimento do fungo ocorre um consumo de íons citrato devido aos processos fisiológicos do microrganismo. O uso metabólico desses íons provoca uma exaustão dos mesmos na região próxima à parede celular, causando desta forma uma desestabilização das nanopartículas. Os componentes da parede celular do fungo (como resíduos de aminoácidos e cadeias de 1,3-β-glucanas) deslocam os íons citrato residuais e ligam-se diretamente na superfície das nanopartículas via interações eletrostáticas. De modo que, as nanopartículas de ouro são estabilizadas estericamente pelos bio-polímeros da parede celular durante o crescimento apical da hifa fúngica, formando assim uma

estrutura microtubular bioinspirada de fungo e nanopartículas de ouro (FONTES *et al.*, 2014).

Figura 36. Ilustração da formação de microtubos de ouro. (A) Os fungos são cultivados em meio de NPs-Au estabilizado com citrato. (B) O material híbrido é colhido e seco usando secagem por ponto crítico (SPC). (C) A calcinação de bio-híbridos fungo/NPs- Au produz microtubos de ouro.



Fonte: FONTES *et al.*, 2014.

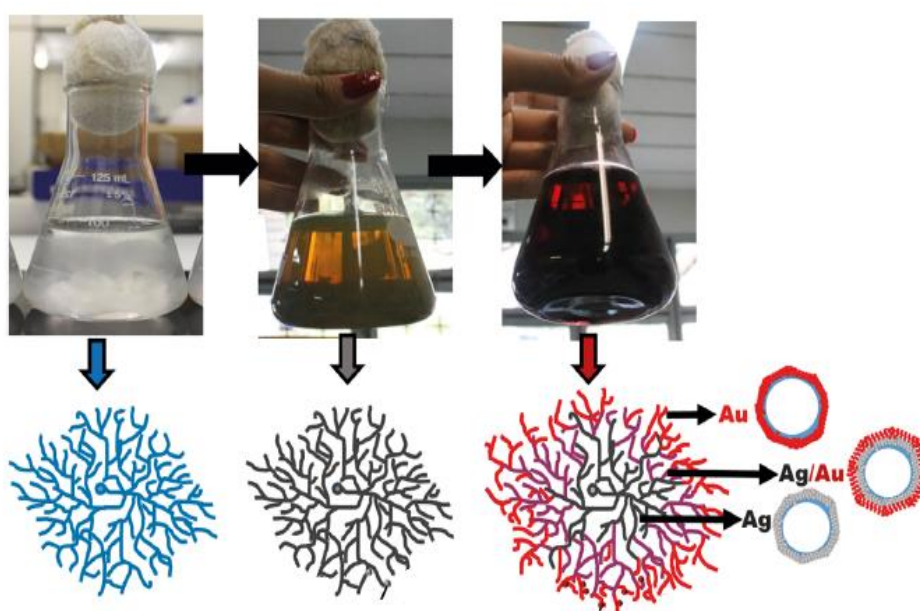
No trabalho de Kubo e colaboradores (2016), o foco foi avaliar os fatores que afetam o processo de automontagem de NPs-Au na parede celular de fungos filamentosos. Neste estudo, os pesquisadores investigaram a influência da espécie do fungo e do meio de cultura no tempo de assimilação das nanopartículas, no comprimento, diâmetro do tubo e espessura da camada de partículas do material híbrido obtido. Na metodologia, nanopartículas de ouro estabilizadas por ânions citrato foram adicionadas em frascos contendo fungos filamentosos previamente cultivados em diferentes meios de cultura. Os resultados deste estudo mostraram que as espécies de fungos utilizadas como suporte biológico e o meio de cultura influenciam no processo de automontagem das nanopartículas e a reprodutibilidade da produção dos bio-híbridos (KUBO *et al.*, 2016).

Em outro trabalho, Kubo e colaboradores (2018) prepararam microtubos heterogêneos de nanopartículas de ouro e de prata, pelo processo de automontagem, no fungo *Aspergillus aculeatus*, previamente cultivado em meio nutritivo. Na

preparação do material híbrido, o micélio fúngico ficou em contato com a solução coloidal de NPs-Ag por 7 dias, então essa dispersão coloidal foi removida e o material híbrido obtido foi lavado com água deionizada. A solução coloidal de NPs-Au foi adicionada e o híbrido fungo/NPs-Ag foi mantido em contato com esta dispersão por mais 7 dias. Por fim, obteve-se um material híbrido com três regiões distintas contendo diferentes combinações de nanopartículas de prata e de ouro. Com base nos resultados obtidos por EDS, o centro do micélio é constituído por NPs-Ag, a região intermediária é formada por uma camada interna de NPs-Ag e uma camada externa de NPs-Au, e as extremidades das hifas são formadas por apenas de NPs-Au, como é mostrado o esquema representado na Figura 37.

Segundo os autores, a heterogeneidade na camada metálica do micélio surgiu devido à presença de íons citrato nas soluções coloidais, o que favoreceu o crescimento das hifas e a simultânea deposição de nanopartículas sobre o micélio. Os pesquisadores também mostraram que os metabólitos secundários produzidos pelo fungo influenciam no processo de automontagem das nanopartículas no microrganismo. Isso explica a impossibilidade de formar microtubos de nanopartículas em fungos mortos (KUBO *et al.*, 2018).

Figura 37. Esquema ilustrativo das diferentes regiões de composição das hifas. O centro das hifas é composto por NPs-Ag, em uma região intermediária, NPs-Ag e NPs-Au, e nas extremidades, apenas NPs-Au.



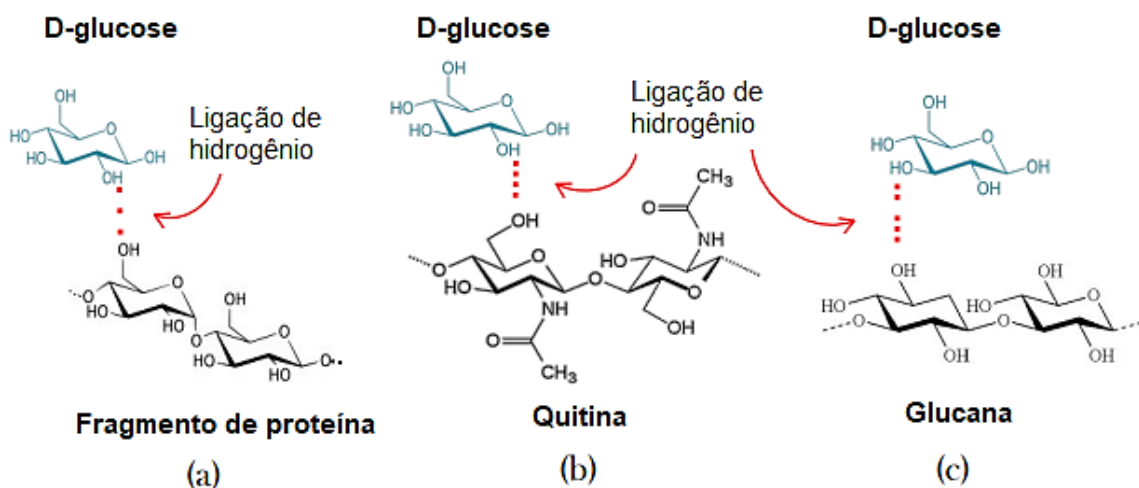
Fonte: Adaptado de KUBO *et al.*, 2018.

No ano seguinte, Pal e colaboradores (2019) demonstraram a construção de microtubos de ouro preparados pelo processo de automontagem de NPs-Au em fungos filamentosos, para aplicação em um sensor molecular baseado em SERS (Espalhamento Raman Intensificado por Superfície). O processo de síntese deste material consiste no crescimento de fungos filamentosos das espécies *Trichoderma asperellum* e *Aspergillus sydowii* em soluções contendo nanopartículas de ouro estabilizadas com D-glicose, cuja molécula atua como nutriente para o crescimento do micélio fúngico. Após 8 dias de inoculação, obteve-se o bio-híbrido constituído de fungo e NPs-Au; em seguida realizou-se a remoção cuidadosa do modelo biológico por calcinação a 520°C (PAL *et al.*, 2019).

Ademais, os autores propuseram uma explicação para o mecanismo de deposição de nanopartículas de ouro estabilizadas com moléculas D-glucose na superfície de hifas fúngicas. Sugeriu-se que a camada externa da parede celular dos fungos filamentosos possui poros de alguns nanômetros de diâmetro, que na verdade são pequenos espaços formados pelas cadeias de bio-polímeros e macro-moléculas (como 1,3-β-glucanas e proteínas) entrelaçadas que formam uma extensa rede tridimensional. As nanopartículas de ouro migram para o interior da parede celular através de movimentos Browniano e são introduzidas nestes poros, onde se fixam por meio de ligações de hidrogênio intermoleculares entre os grupos hidroxilas (-OH) das moléculas de glucose adsorvidas na superfície das nanopartículas de ouro e grupos -OH dos polissacarídeos da parede celular fúngica, como demonstrado nas representações das estruturas químicas da Figura 38. Quando o interior da parede celular encontra-se saturado pelas nanopartículas, uma camada de nanopartículas de ouro é formada sobre toda a extensão da parede celular da hifa do fungo por meio da deposição e fixação das mesmas (PAL *et al.*, 2019).

A microestrutura tubular formada após o tratamento térmico apresentou 8–60 μm de comprimento, espessura média da camada metálica de 180 nm e diâmetro de 2–4 μm. Esses microtubos de ouro foram utilizados como substrato para a detecção de moléculas orgânicas dissolvidas em água com concentrações baixas (1×10^{-9} M). Os resultados experimentais mostraram que os microtubos de ouro com superfície porosa, apresentaram um aumento no sinal SERS, indicando sua boa homogeneidade da resposta Raman (PAL *et al.*, 2019).

Figura 38. Ilustrações esquemáticas da formação de ligação de hidrogênio entre D-glucoses ligadas à nanopartículas de Au e constituintes da parede celular fúngica: a) fragmento de proteína, b) quitina e c) glucanas.



Fonte: PAL *et al.*, 2019.

Em 2021, Fontes e colaboradores publicaram um outro artigo sobre a integração de nanopartículas metálicas em células de fungos filamentosos; porém desta vez, foi apresentado resultados de uma caracterização minuciosa da estrutura do bio-híbrido fungo/NPs de modo a compreender as interações entre os nanomateriais e os bio-polímeros da parede celular fúngica. Dois bio-sistemas constituídos por fungo/NPs-Pd e fungo/NPs-AuPd foram sintetizados e estudados. Micrografias obtidas pelo MET revelaram uma internalização inédita de nanopartículas de paládio (diâmetro médio = $7,7 \pm 2,9$ nm) no vacúolo de células fúngicas da espécie *Penicillium sp.*, tornando-se um bio-sistema promissor para reações catalíticas *in vivo*. Foi relatado também uma nova estratégia de síntese de bio-híbridos de fungos filamentosos com cobertura rica em paládio. Nesta metodologia, foi realizada uma redução sequencial de íons Pd^{2+} sobre nanopartículas de ouro previamente assimiladas na parede celular do fungo da espécie *Aspergillus niger* (FONTES *et al.*, 2021).

A estratégia de depositar nanopartículas de ouro na superfície de fungos filamentosos para em seguida recobri-las com uma camada de Pd^0 foi adotada devido aos efeitos tóxicos do metal Pd para as células fúngicas, o qual inibe o desenvolvimento do microrganismo. O processo de paladização da superfície do bio-

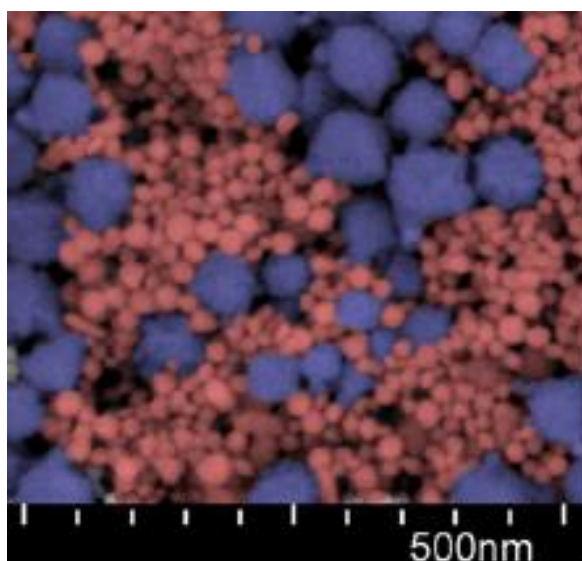
hídrido fungo/NPs-Au consiste na deposição do metal Pd⁰, proveniente da redução de íons Pd⁺² pelo ácido ascórbico, sobre as NPs-Au, as quais atuam como sementes para o crescimento dos cristais, formando desta forma nanopartículas bimetálicas AuPd na superfície do bio-híbrido. O bio-sistema resultante mostrou-se cataliticamente ativo nas reações de hidrogenação de 2-metil-3-buten-2-ol em temperatura ambiente (FONTES *et al.*, 2021).

Uma caracterização da superfície do bio-sistema fungo/NPs-AuPd por espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS) foi realizada com o intuito de investigar detalhadamente o estado químico das nanopartículas ancoradas na parte mais externa da parede celular do fungo *A. niger*. Conforme os resultados de XPS, foi observado que os principais componentes químicos da superfície fúngica mais externa foram carbono, oxigênio, nitrogênio, Au e Pd. As concentrações metálicas de Au e Pd foram de 3,6% e 8,2%, respectivamente. Além disso, foi verificado também a presença de íons Au⁺ e Pd²⁺ na parede celular do microrganismo. Os autores atribuíram a presença de Au⁺ (na forma de Au-O, por exemplo) ao processo de transferência de carga dos átomos superficiais das NPs-Au (doam elétrons) para os grupos funcionais dos bio-polímeros (aceitam elétrons) que compõem a parede celular fúngica. Em relação à espécie química Pd²⁺, a sua presença deve-se à formação de óxido de paládio (PdO) sobre a superfície das nanopartículas bimetálicas AuPd pois as mesmas encontram-se mais expostas ao ar, causando assim a oxidação do paládio (FONTES *et al.*, 2021).

Na Figura 39 mostra uma imagem de cor falsa obtida pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) da superfície da parede celular do bio-híbrido fungo/NPs-AuPd. Observa-se a presença de nanopartículas pequenas (em vermelho) que correspondem as nanopartículas de Au, e nanopartículas de tamanho maiores (em azul) que são as nanopartículas de AuPd (FONTES *et al.*, 2021). Por esta imagem, é possível notar que não houve uma deposição uniforme do metal Pd⁰ sobre a superfície do bio-híbrido, de modo a formar uma camada mais externa com nanopartículas de diferentes estruturas morfológicas (umas são monometálicas e outras bimetálicas) e de espessura da cobertura de Pd⁰ variável. É importante ressaltar que, a diferença nos tamanhos das partículas, na espessura da camada que recobre a superfície das nanopartículas de Au, bem como a heterogeneidade da forma

estrutural dos nanomateriais presentes na superfície do bio-sistema *A.niger*/NPs-AuPd influencia significativamente nas propriedades finais do bio-material, como por exemplo, na sua performance como catalisador em reações químicas ou como sensores analíticos (ZALESKA-MEDYNSKA *et al.*, 2015; GILROY *et al.*, 2016).

Figura 39. Micrografia colorida falsa de MEV com alta resolução da superfície do bio-híbrido fungo/NPs-Au paladizado. As nanopartículas vermelhas correspondem às NPs-Au e as azuis são as NPs-AuPd.



Fonte: FONTES *et al.*, 2021.

Diante do exposto, tem-se a necessidade de preparar nanopartículas bimetálicas a partir de uma deposição uniforme e controlada de metal Pd sobre as nanopartículas de Au para posterior integração na parede celular fúngica; além disso, otimizar a quantidade ótimo de íons Pd²⁺ a serem reduzidos e depositados sobre os nanomateriais de Au, a fim de diminuir se possível, os efeitos tóxicos do metal Pd sobre o fungo filamentoso, impedindo desta forma a inibição do seu crescimento apical e a simultânea automontagem das partículas sobre o microrganismo. Diante disso, o presente trabalho de doutorado tem como foco principal o preparo de materiais híbridos constituídos de nanopartículas bimetálicas de Au@Pd com estrutura *core-shell* e fungos filamentosos, que é algo inédito até então.

Destarte, nos próximos itens, serão apresentadas a síntese e caracterização de materiais híbridos de fungo filamentoso e nanopartículas bimetálicas, os resultados

e a discussão dos mesmos. No presente trabalho de doutorado foi utilizado o fungo filamentoso *Phyalomices macrosporus* para integração de nanopartículas bimetálicas *core-shell* de ouro (*core*) e paládio (*shell*), a fim de obter um material híbrido, material este que pode apresentar propriedades interessantes para diversas aplicações, com por exemplo, fabricação de microtubos bimetálicos com propriedades catalíticas.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar materiais híbridos constituídos por nanopartículas bimetálicas de Au@Pd e fungos filamentosos.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a deposição das nanopartículas bimetálicas de Au@Pd na superfície das células dos fungos filamentosos por meio do processo de automontagem;
- Caracterizar os bio-híbridos formados pela integração entre nanopartículas bimetálicas de Au@Pd e fungos filamentosos.
- Verificar a afinidade do microrganismo com nanopartículas de Au@Pd preparadas com diferentes concentrações de íons Pd²⁺.

2.4 PARTE EXPERIMENTAL

2.4.1 PROCEDIMENTO DE SÍNTESE DE BIO-HÍBRIDOS FUNGO/NPs-Au@Pd

2.4.1.1 REAGENTES

Para as etapas de cultivo do fungo, pré-adaptação do mesmo e síntese do material híbrido fungo/NPs-Au@Pd foram utilizados os seguintes reagentes: água purificada (13 μ S/cm) pelo o sistema Milli-Q (Millipore Ultra-Pure Water System), ácido cítrico monohidratado (Merck, \geq 99,99%), citrato de sódio dihidratado (Reagen, \geq 99,99%), dextrose (Synth, \geq 99,99%), ágar em pó bacteriológico puro (Vetec, \geq 99,99%) e batata inglesa adquirida em um supermercado local.

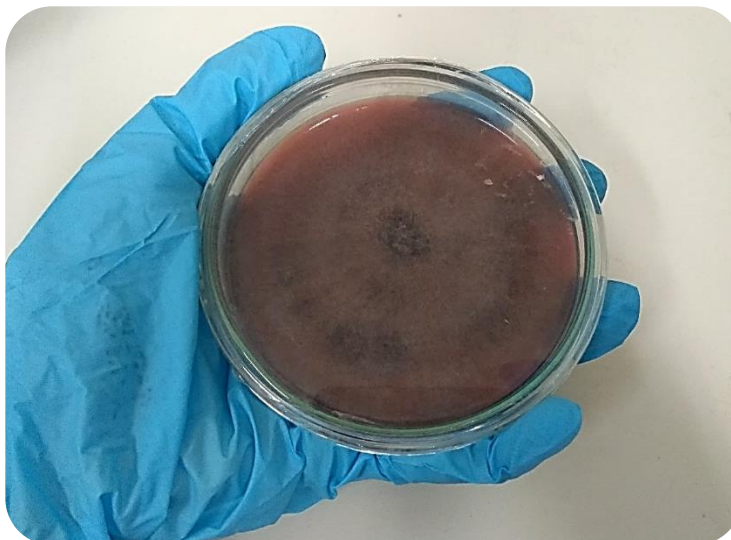
2.4.1.2 CULTIVO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM MEIO SÓLIDO

Para a funcionalização de células fúngicas com nanopartículas bimetálicas Au@Pd foi selecionado o fungo filamentoso da espécie *Phialomyces macrosporus* (Pm) com o escopo de formar microestruturas tubulares de NPs-Au@Pd que imitam a morfologia tridimensional do microrganismo. Esta espécie de fungo foi escolhida com base nos estudos anteriores realizados no laboratório do nosso grupo de pesquisa LBQM-UFBA, que mostrou um bom crescimento das hifas fúngicas em soluções contendo diferentes tipos de nanomateriais, como nanopartículas de ouro e MOFs (Estruturas metalorgânicas) (FONTES *et al.*, 2014; ROSÁRIO *et al.*, 2019; FONTES *et al.*, 2021).

O fungo *P. macrosporus* foi isolado de folhas em decomposição da planta *Manilkara salmani* nas Lagoas do Abaeté em Salvador, Bahia, Brasil. Para reativação do microrganismo, uma cultura foi realizada em placas de Petri contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura de BDA – Batata, Dextrose e Ágar (30% m/v de caldo de batata, 2,0% mv de dextrose e 1,5% m/v de ágar) e, em seguida foi

incubado a 28 °C por mínimo 7 dias (GERIS, 2002). Na Figura 40 é mostrada a cultura em meio nutritivo sólido do fungo *Phialomyces macrosporus* obtida.

Figura 40. Imagem digital da cultura do fungo *Phialomyces macrosporus* em meio nutritivo sólido de BDA – Batata, Dextrose e Ágar.



Fonte: Própria autoria.

2.4.1.3 PRÉ-ADAPTAÇÃO DO FUNGO FILAMENTOSO *P. MACROSPORUS*

Uma etapa de pré-adaptação do fungo Pm foi realizada em solução tampão de ácido cítrico e citrato de sódio (pH = 5,7) para seguir com a etapa de inoculação do fungo em suspensão de nanopartículas estabilizadas por íons citrato, a fim de favorecer o crescimento das hifas fúngicas e assimilação das nanopartículas. Essa etapa de pré-adaptação do fungo foi realizada conforme a metodologia anteriormente descrita por Fontes (2012) e Eychmuller e colaboradores (2008). Nesta metodologia, pequenos pedaços do micélio foram retirados cuidadosamente da placa de Petri e transferidos para um frasco de Erlenmeyer contendo 30 mL da solução de 1% (m/v) de citrato de sódio e 0,05% (m/v) ácido cítrico. Esta suspensão ficou reservada por um período de 30 dias.

2.4.1.4 INTEGRAÇÃO DE NPs-Au E NPs-Au@Pd EM FUNGOS FILAMENTOSOS

Após o período de pré-adaptação, 80 µL da suspensão contendo micélio e esporos do fungo Pm foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 20 mL da suspensão de NPs-Au@Pd ou NPs-Au previamente sintetizadas e 400 µL da solução de dextrose 10% (m/v) (meio nutritivo), sob condições estéreis em fluxo laminar. Em seguida, o fungo foi incubado por um período de 15 dias a 28 °C em modo estático. Após o período de crescimento do micélio fúngico, os bio-híbridos formados foram lavados com água ultrapura esterilizada e armazenados em frascos de penicilina contendo água ultrapura esterilizada. Todo o procedimento foi realizado na capela de fluxo laminar, com ambiente esterilizado com etanol a 70% e radiação ultravioleta por 20 minutos e sob chama oxidante de um bico de Bunsen.

2.4.2 CARACTERIZAÇÕES DE AMOSTRAS DE BIO-HÍBRIDOS FUNGO/NPs-Au@Pd E FUNGO/NPs-Au

A caracterização dos bio-híbridos fungo/NPs-Au e fungo/NPs-Au@Pd foram realizadas com o intuito de comprovar a assimilação das nanopartículas de Au e de Au@Pd pelo fungo *P. macrosporus*, e verificar como as referidas nanopartículas foram montadas e arrançadas na superfície das células fúngicas. Além disso, verificar de forma qualitativa a composição química elementar dos bio-híbridos obtidos. Para isso, foram empregadas as técnicas MEV, MET, EDS e MO para a caracterização das amostras dos referidos materiais híbridos.

- Microscopia Óptica (MO)

Para o estudo morfológico dos bio-híbridos Pm/NPs-Au e Pm/NPs-Au@Pd, as amostras de fungos cultivados com e sem a presença das nanopartículas foram analisadas no microscópio óptico (marca Zeiss, modelo Primo Star). Foram retirados pequenos fragmentos de micélio previamente lavados com água ultrapura esterilizada, e depositados sobre lâminas de vidro para observação no microscópio. Nesta análise,

foram feitas capturas das imagens das amostras com aumento de 400 e 1000 vezes.

- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para o estudo morfológico dos bio-híbridos Pm/NPs-Au e Pm/NPs-Au@Pd por meio da microscopia eletrônica de transmissão, as amostras de fungo decorados pelas nanopartículas e do fungo puro foram submetidas ao processamento padrão de material para análise no MET. O processamento do material híbrido formado por fungo e NPs-Au@Pd foi efetuado nas seguintes etapas: 1- desidratação em acetona; 2- substituição: mistura 1:1 de acetona 100% e resina *Poly-Bed*® (no mínimo 6 horas) em temperatura ambiente. 3- impregnação: resina pura por 6-8 horas em temperatura ambiente. 4- emblocamento: em molde específico, coloca-se o número de registro do material, preenche-o com resina e em seguida coloca-se o fragmento. 5- Polimerização: coloca-se o material para polimerizar em estufa a 60 °C por 6 dias.

O processamento do fungo puro foi efetuado nas seguintes etapas: 1- fixação em glutaraldeído 2% + paraformaldeído 4%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4, por 1h em temperatura ambiente; 2- lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4 (3 banhos de 10 minutos em temperatura ambiente); 3- pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% + ferricianeto de potássio 0,8% + cloreto de cálcio 5 mmol.L⁻¹ em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, por 1h 46 min em temperatura ambiente; 4- lavagem utilizando tampão cacodilato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4 (3 banhos de 10 minutos em temperatura ambiente); 5- desidratação em acetona; e as demais etapas que seguiram foram descritas anteriormente (2-5 para o material híbrido) que é a mesma para todos os materiais. Em seguida, os blocos de resina foram desengrossados utilizando-se uma lixa e então cortados utilizando um Ultramicrótomo (marca: Leica, modelo: EM UC6).

Cortes ultrafinos foram efetuados em formato de trapézios com espessura de 70 a 80 nm. Estes cortes foram então dispostos sobre grades de cobre de 3 mm de espessura e 200 *mesh*. Todo o processamento das amostras foi efetuado através do serviço de microscopia eletrônica da FIOCRUZ-BA, as imagens dos materiais híbridos Pm/NPs-Au e Pm@NPs-Au@Pd e do fungo puro foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão (marca: JEOL, modelo EM 12130) também da FIOCRUZ-BA.

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

Para observação no MEV e microanálise por EDS, foi necessária uma etapa prévia de secagem das amostras de bio-híbridos utilizando-se o método de secagem ao ponto crítico de CO₂. Este método consiste em uma secagem cuidadosa do material a fim de preservar a morfologia tridimensional do suporte biológico fúngico. O procedimento foi realizado conforme o protocolo padrão de processamento de amostras para secagem ao ponto crítico elaborado pela FIOCRUZ-BA. O aparelho utilizado para a secagem das amostras de bio-híbridos foi o equipamento Ponto Crítico da marca Leica e modelo CPD 030, do laboratório de Microscopia Eletrônica da mesma instituição.

O procedimento de preparo das amostras para secagem ao ponto crítico consiste na desidratação das amostras de bio-híbridos em série crescente de solução de etanol absoluto em diferentes concentrações (30, 50, 70, 90 e 100%) em temperatura ambiente, por 10 min cada solução, sendo que a última etapa de desidratação (em etanol a 100%) foi repetida por três vezes.

As amostras desidratadas foram transferidas para a câmara do equipamento de secagem ao ponto crítico do CO₂, preenchida por etanol absoluto. Com a câmara fechada, foi injetado o CO₂ líquido para realizar a substituição do etanol pelo CO₂ em uma temperatura de 9°C. Foram necessárias 20 trocas para remoção total do etanol. Em seguida, aqueceu-se o interior da câmara até uma temperatura de 40 °C, acima da temperatura crítica do CO₂ (-31°C). Com o aumento gradual da temperatura, as moléculas de CO₂ passam da fase líquida para a fase gasosa, ou seja, todo o CO₂ líquido é convertido em gás, o que causa um aumento da pressão interna na câmara. Nesta condição, o CO₂ atinge o ponto crítico, onde não há limites entre as fases líquida e gasosa e a tensão superficial é igual a zero (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007). Desta forma, todo o líquido é convertido em gás, secando assim o bio-híbrido, sem danificar a estrutura microtubular do fungo com os efeitos da tensão superficial. O resultado é uma amostra de bio-híbrido seca com a parede celular fúngica totalmente preservada.

As amostras secas de bio-híbridos foram depositadas sobre *stubs* de alumínio para observação no microscópio eletrônico de varredura com detector de EDS (marca: JEOL, modelo: JSM-6390LV), operando em uma aceleração de voltagem de 10 kV. As

micrografias dos bio-híbridos foram obtidas empregando-se o equipamento MEV-EDS, localizado no laboratório de Serviço de Microscopia Eletrônica da FIOCRUZ-BA. Para a observação e captura das imagens das amostras de fungo sem nanopartículas, foi necessário submetê-las a um processo de metalização com ouro. Essa etapa de revestimento com ouro metálico torna o material biológico condutor de eletricidade, e capaz de espalhar os elétrons gerados pelo equipamento por toda a superfície da amostra, de modo a formar imagens com excelente resolução.

Já para as amostras de bio-híbridos não foi necessária a etapa de metalização devido a presença das nanopartículas metálicas na superfície do fungo, que auxilia no contraste da imagem. As micrografias do MEV foram obtidas com magnificação de 500X e 2000X. Mapas elementares das amostras de bio-híbridos foram obtidos através do sistema de microanálise por EDS associado ao MEV, empregando-se o mesmo equipamento.

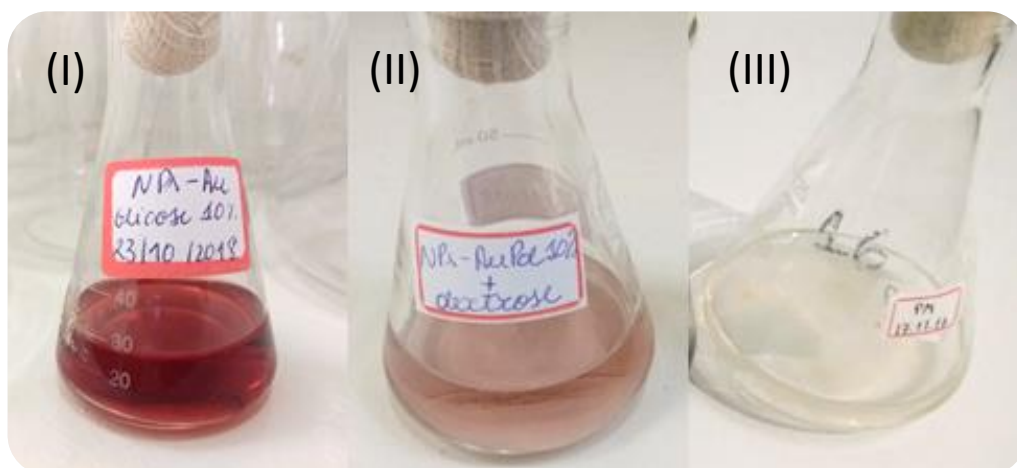
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para o estudo da integração de NPs-Au@Pd em fungos filamentosos, primeiramente foi selecionado uma espécie de fungo que apresenta uma boa capacidade de assimilação de nanomateriais e que se desenvolve em condições extremas de cultivo, como variações bruscas de pH e baixa disponibilidade de nutrientes (SOLOMON, 2008). Diante disso, a espécie *Phialomyces macrosporus* foi a escolhida para atuar como suporte para deposição de nanopartículas; já que em estudos anteriores realizados no laboratório do grupo LBQM-UFBA, esta espécie de fungo filamentoso apresentou uma maior afinidade com as nanopartículas de ouro se comparada com as outras espécies trabalhadas pelo nosso grupo (FONTES *et al.*, 2014).

Atualmente, o único método empregado para integração de nanopartículas na superfície celular de fungos filamentosos consiste no cultivo de fragmentos de micélio ou esporos de fungos em uma solução contendo nanopartículas pré-formadas e uma fonte de alimento para o crescimento do microrganismo (ROSÁRIO *et al.*, 2019). Na Figura 41 são mostrados os sistemas de cultivo do fungo Pm em soluções contendo NPs-Au estabilizadas com íons citrato (I), NPs-Au@Pd estabilizadas com íons citrato (II)

e solução aquosa de íons citrato, como sistema controle (III).

Figura 41. Sistemas de cultivo do fungo Pm em suspensões de NPs-Au (I), NPs-Au@Pd (II) e sistema controle (III) composta por água ultrapura e esporos fúngicos.

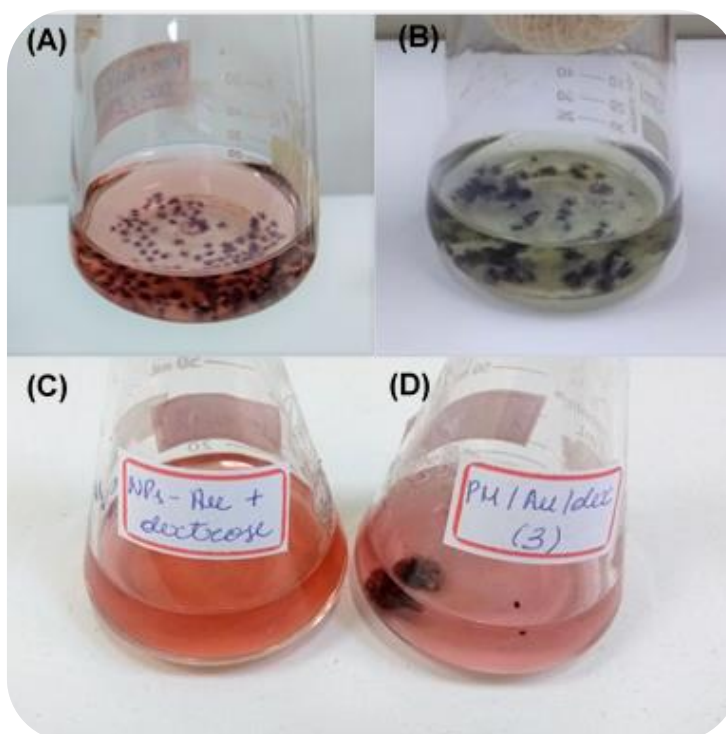


Fonte: Própria autoria.

Insta esclarecer que, além de ser um agente estabilizante eletrostático para as nanopartículas e um agente tampão, o ânion citrato atua como uma fonte de carbono para o crescimento do fungo (FONTES *et al.*, 2014). Além disso, a adição de dextrose no meio de cultivo contribui para favorecer ainda mais o desenvolvimento do microrganismo diante da presença de um metal tóxico, o paládio. É importante ressaltar, que para o cultivo dos fungos, foi utilizado suspensões de nanopartículas de Au e de Au@Pd com proporção [citrato]:[Au³⁺] = 7,1. Por meio de imagens obtidas pelo MET, Fontes e colaboradores (2014) verificaram que a força iônica do meio de cultivo influencia significativamente na organização das nanopartículas na parede celular fúngica. De modo que, em solução com alta concentração de citrato observa-se a formação de uma camada metálica compacta devido a presença de nanopartículas aglomeradas na parede celular do fungo. Em contraste, o cultivo do fungo em solução com baixa concentração de citrato, verifica-se que as nanopartículas se encontram espaçadas uma das outras, dispostas em forma de cadeias lineares na superfície celular fúngica (FONTES *et al.*, 2014). Portanto, a razão [citrato]:[Au³⁺] = 7,1 foi indicada como a melhor concentração de citrato para montagem de nanopartículas nas hifas fúngicas, e por esta razão foi utilizada suspensões de NPs-Au com a referida proporção [citrato]:[Au³⁺] para o cultivo do fungo Pm.

Sabe-se que adição do metal Pd sobre as nanopartículas de Au pode modificar a estrutura eletrônica das referidas nanopartículas, de modo a provocar uma alteração nas suas propriedades físico-químicas (STRASSER *et al.*, 2016). Logo, é plausível supor que a combinação dos metais Au e Pd pode influenciar no mecanismo de interação do paládio metálico com as células fúngicas, devido a presença do metal Au, pelo qual o microrganismo tem maior “afinidade”; de modo a favorecer a diminuição dos tóxicos da nanopartícula Au@Pd frente ao fungo. Por esta razão, a solução contendo NPs-Au@Pd com 50% de Pd²⁺ foi escolhida para iniciar os experimentos de deposição de nanopartículas bimetálicas Au@Pd sobre as células de fungos filamentosos. Os fungos foram incubados sob uma temperatura de 28°C e em um meio levemente ácido (pH = 3). Na Figura 42 é apresentado sistemas de cultivo contendo o fungo *P. macrosporus* em suspensões de NPs-Au@Pd e de NPs-Au durante o processo de automontagem das referidas nanopartículas metálicas.

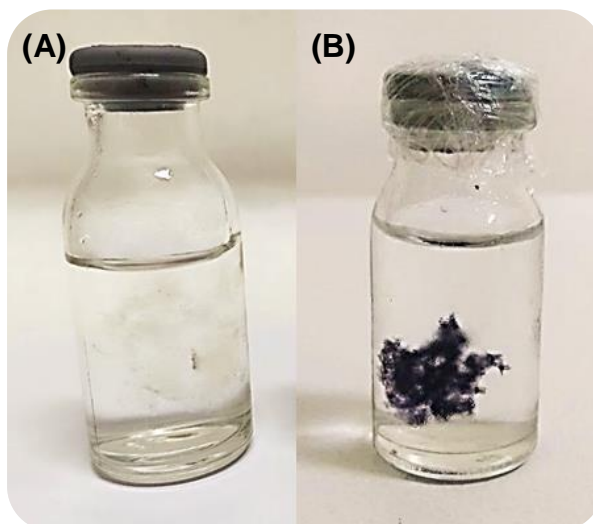
Figura 42. Imagens digitais dos sistemas de cultivo contendo fungo *P. macrosporus* e NPs-Au@Pd, com 8 dias de incubação (A) e com 15 dias de incubação (B). Sistema controle contendo NPs-Au e dextrose (C) e sistema de cultivo de fungo *P. macrosporus* em suspensão de NPs-Au, com 8 dias de incubação (D).



Fonte: Própria autoria.

Após um período de 15 dias de incubação, foram observados a formação de pequenos micélios fúngicos no meio de cultivo dos sistemas I e II. Na Figura 42A e D é possível perceber a formação de micélios com apenas 8 dias de incubação. Ao fim de 15 dias, percebe-se que houve alteração na coloração das culturas contendo as nanopartículas, as quais tornaram-se translúcidas, como pode ser vista na Figura 42B. A partir deste resultado, pode-se inferir que, provavelmente, as nanopartículas de Au e de Au@Pd foram depositadas sobre os micélios fúngicos formados, pois houve perda da cor característica das suspensões dos referidos nanomateriais. Além disso, foi observado também que os fungos cultivados na presença de NPs-Au e NPs-Au@Pd foram corados, porém o fungo crescido no sistema de cultura sem nanopartículas não os foram, como é mostrado nas imagens da Figura 43. Nestas imagens é possível notar a ausência de coloração do fungo Pm cultivado no sistema contendo apenas água ultrapura esterilizada e dextrose (Fig. 43A) e o mesmo microrganismo cultivado na presença de NPs-Au (Fig. 43B).

Figura 43. Imagens digitais de amostras do fungo filamentoso *P. macrosporus* cultivado na ausência (A) e na presença (B) de NPs-Au.



Fonte: Própria autoria.

Comparando-se os micélios fúngicos obtidos com a inoculação do fungo nas soluções coloidais de NPs-Au e de NPs-Au@Pd (Figura 42A e D), nota-se uma diferença na quantidade de biomassa fúngica obtida nos referidos sistemas de cultura. A quantidade de biomassa no sistema contendo NPs-Au@Pd foi limitada em comparação com o fungo crescido na presença de NPs-Au e na ausência de NPs.

Diante disso, pode-se inferir que houve uma inibição do crescimento do fungo cultivado na presença de NPs-Au@Pd com 50% de íons Pd²⁺. O baixo desenvolvimento micelar em um meio de cultura com alta concentração de paládio é devido aos efeitos tóxicos do metal Pd, fato que já havia sido relatado por Eychmuller e colaboradores (2008) e Fontes e colaboradores (2021).

Estudos realizados por Athie-García e colaboradores (2018) mostraram os efeitos tóxicos das nanopartículas de paládio (NPs-Pd) nas células dos fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Os pesquisadores verificaram que a exposição dos fungos às NPs-Pd causou uma inibição do crescimento dos microrganismos. Essa inibição foi observada para *C. albicans* e *A. niger* a uma concentração de NPs-Pd de 150 ppm e 250 ppm, respectivamente. Além disso, verificou-se também que a inibição do crescimento é diretamente proporcional a concentração de NPs-Pd. Imagens obtidas por microscopia confocal revelaram danos na parede celular induzidos por NPs-Pd. Foi verificado um acúmulo de nanopartículas e alterações morfológicas por meio de análises no MEV. Os autores sugerem que os principais efeitos tóxicos das NPs-Pd envolvem danos à parede celular do fungo e geração de espécies de oxigênio reativas nas células (ATHIE-GARCÍA *et al.*, 2018). As informações sobre citotoxicidade das nanopartículas de paládio em microrganismos são escassas, e o mecanismo de interação deste nanomaterial com células vivas ainda não são claros. À vista disso, é necessário um estudo minucioso sobre a interação de metais tóxicos, como o paládio, com os componentes da parede celular fúngica, especificamente em bio-sistemas híbridos.

O crescimento dos fungos por meio das hifas está relacionado com a busca de nutrientes em um substrato sólido ou em solução. Em condições favoráveis, as hifas fúngicas estendem-se em uma única direção, através do alongamento das suas extremidades (ápices) (RIQUELME, 2013a). Durante o crescimento apical do fungo, os íons citrato adsorvidos na superfície das nanopartículas são consumidos pelo microrganismo, de modo a provocar uma desestabilização das nanopartículas localizadas próximas às hifas. Estes nanomateriais migram através de movimento Browniano para a superfície das células do fungo, e se depositam entre os espaços formados pela interconexão dos bio-polímeros da parede celular fúngica (ROSÁRIO *et al.*, 2019).

O mecanismo de deposição de nanopartículas sobre fungos filamentosos é desconhecido e ainda está em debate. A proposta que melhor descreve a montagem de

nanomateriais em células fúngicas foi apresentada por Dutta e colaboradores (2007) que consiste em um processo denominado de *Nutrition-Driven Assembly*. Os pesquisadores sugerem que a deposição de nanopartículas na parede celular do fungo é impulsionada pela nutrição (SUGUNAN *et al.*, 2007). O crescimento do fungo pelo alongamento do ápice das hifas, o qual é favorecido pela absorção de nutrientes presentes no meio de cultura, coincide com a montagem das nanopartículas na superfície das células fúngicas (FONTES *et al.*, 2021). É de se esperar que os trabalhos científicos discutidos anteriormente (item 2.2.2), utilizaram espécies químicas, como fragmentos de DNA, D-glicose, íons glutamato e íons citrato, como agentes estabilizantes para as nanopartículas metálicas, já que tais agentes contêm átomos de carbono, nitrogênio e enxofre em sua estrutura química, os quais são elementos essenciais para o crescimento para o microrganismo.

Um estudo morfológico dos bio-híbridos fungo/NPs-Au e fungo/NPs-Au@Pd obtidos foi realizado utilizando-se, inicialmente, a técnica de microscopia óptica, com a finalidade de investigar as características microestruturais das referidas amostras. Ademais, é relevante também analisar o perfil morfológico do suporte biológico fúngico utilizado na montagem das nanopartículas, isto é, do fungo *P. macrosporus*; já que tais características influenciam diretamente na morfologia dos bio-híbridos construídos. Na Figura 44 são apresentadas imagens obtidas no MO das amostras de fungo Pm sem e com NPs-Au@Pd sintetizado com adição de 50% (m/m) de íons Pd²⁺.

Figura 44. Imagens obtidas por microscópio óptico do fungo sem NPs (A) e com NPs-Au@Pd com 50% (massa) de Pd (B) com ampliação de 1000X.



O aglomerado de micélio fúngico formado na cultura submersa na ausência de nanomateriais foi visualizado no microscópio óptico, cuja imagem encontra-se apresentada na Figura 44A. Nesta imagem é possível observar as hifas fúngicas que são longos filamentos que se ramificam e se aglomeram à medida que o microrganismo cresce. É possível perceber também a presença de septos regularmente espaçados nas hifas. Esse septo consiste em uma parede transversal que divide as células da hifa em compartimentos, mantendo as organelas separadas. O septo possui pequenos poros que permite a passagem de nutrientes e água de uma unidade celular para outra (WEBSTER, WEBER, 2007). Nota-se ainda a presença de organelas no interior das hifas. Outra característica importante encontrada nesta espécie de fungo é a ausência de pigmentação das hifas, como pode ser visto na Figura 44A.

Na observação da biomassa obtida no cultivo do fungo Pm na presença de nanopartículas bimetálicas de Au@Pd sintetizadas com 50% (m/m) de íons Pd²⁺, verificou-se a preservação da morfologia tubular das hifas após a deposição dos nanomateriais na superfície das células fúngicas (Figura 44B). Verifica-se que as células microtubulares encontram-se emaranhadas formando uma biomassa fúngica compacta. Outro aspecto nitidamente observável é a presença de pigmentação das hifas do fungo crescido na suspensão aquosa das nanopartículas bimetálicas (Fig. 44B). Comparando-se com a imagem do fungo cultivado sem as nanopartículas, nota-se que o fungo crescido na presença de NPs-Au@Pd adquire uma coloração amarronzada característica da solução coloidal de nanopartículas de ouro e paládio *core-shell* com 50% (m/m) de íons Pd²⁺. Diante desta análise, pode-se inferir que houve uma assimilação das referidas nanopartículas pelo o fungo filamentoso durante o seu crescimento. A solução coloidal de NPs-Au@Pd de coloração amarronzada torna-se incolor devido ao esgotamento das nanopartículas dispersas em solução, que ficam embebidas na parede celular do microrganismo.

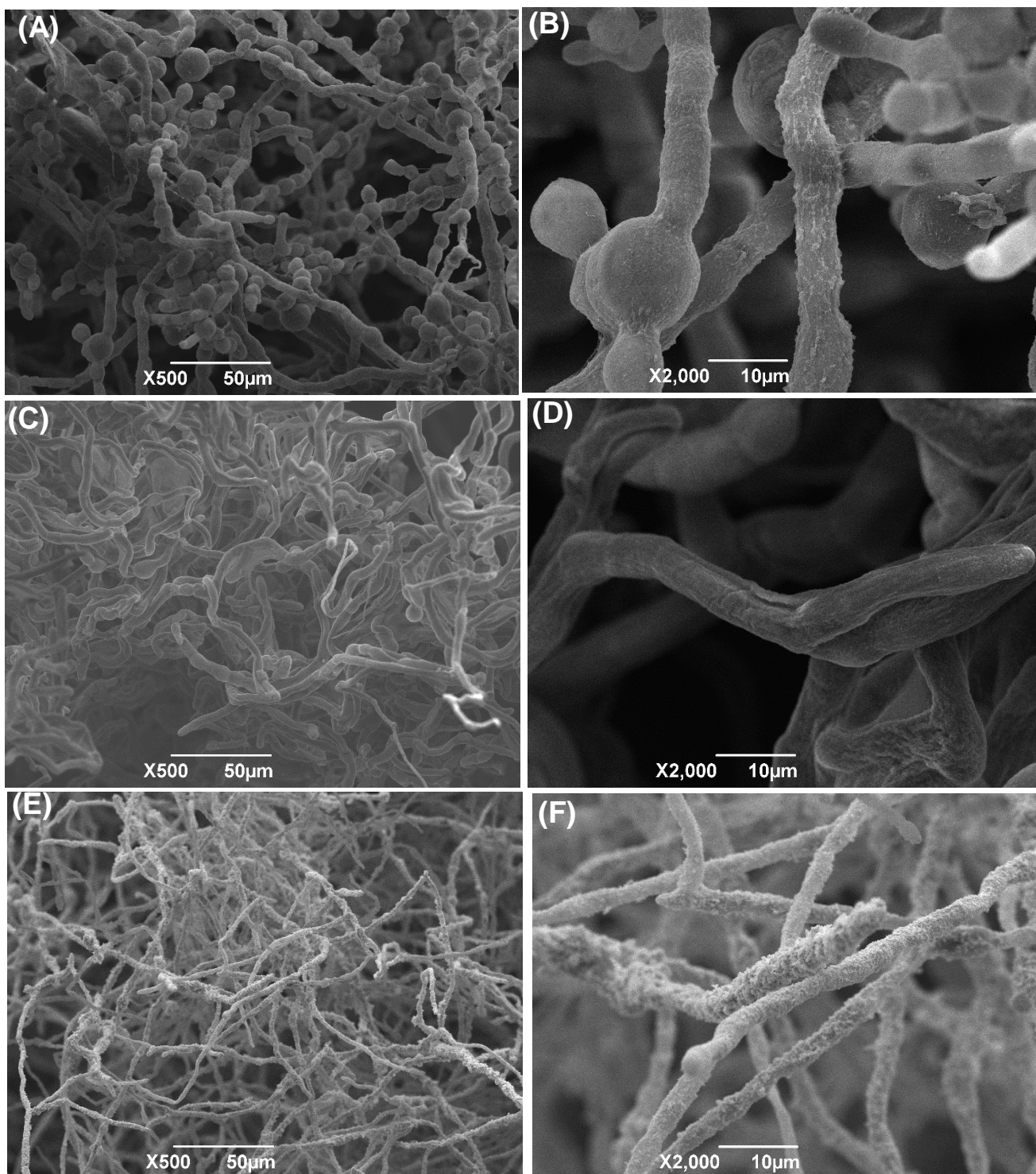
Li e colaboradores publicaram em um artigo científico sobre a funcionalização de células fúngicas com nanopartículas de ouro. O cultivo do fungo *A. niger* em uma solução coloidal aquosa de nanopartículas de ouro resultou na formação de um material macroscópico de coloração roxo-avermelhado. Segundo os autores, a diminuição da cor do meio contendo as nanopartículas após o período de tempo necessário para o crescimento do fungo, deve-se a montagem das nanopartículas de ouro na parede celular do microrganismo, de modo que quase todas as partículas são assimiladas pelo

fungo, resultando assim na perda da cor do meio. Uma imagem de microscopia óptica da borda do micélio fúngico corado foi mostrado neste artigo, onde é possível observar as hifas do fungo *A. niger* com uma cor púrpura- avermelhada, coloração esta característica da suspensão de nanopartículas de ouro (LI *et al.*, 2003). Tais observações corroboram com os resultados obtidos pela microscopia óptica para o cultivo do fungo *P. macrosporus* em suspensão de NPs-Au@Pd.

Com intuito de investigar de forma mais detalhada as características de morfológicas das amostras de bio-híbridos constituídos por fungos e nanopartículas, especificadamente a parede celular do modelo biológico e a superfície do material híbrido, foram obtidas micrografias das referidas amostras utilizando-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura. Na Figura 45 são apresentadas as micrografias do fungo *P. macrosporus* e dos bio-híbridos fungo/NPs-Au e fungo/NPs-Au@Pd obtidas pelo MEV no modo elétrons secundários e com aumento de 500X e 2.000X.

Ao analisar as imagens de MEV dos materiais híbridos e do fungo, percebe-se que a estrutura microtubular do suporte biológico fúngico foi mantida intacta após o processo de secagem ao ponto crítico de CO₂ das referidas amostras. De fato, o equipamento microscópio eletrônico de varredura é operado sob alto vácuo, e para evitar que as hifas fúngicas sejam danificadas durante a observação, é necessário realizar a secagem cuidadosa do material como uma etapa prévia de preparação da amostra. Nas micrografias (A) e (B) apresentadas na Figura 45, mostram o fungo *P. macrosporus* crescido em uma cultura submersa contendo íons citrato e moléculas de dextrose, na ausência de nanomateriais. Nestas imagens é possível observar um conjunto de hifas entrelaçadas formando uma densa rede fúngica. As hifas do fungo apresentam largura em torno de 4 a 7 µm e comprimento de centenas de micrômetros. Fontes e colaboradores publicaram um artigo sobre a caracterização do fungo *Phialomyces macrosporus* utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura, onde foi relatado que a distribuição do diâmetro das hifas do fungo varia de 2 a 8 µm (FONTES *et al.*, 2014).

Figura 45. Micrografias obtidas pelo MEV do fungo *P. macrosporus* (A) e (B), dos bio-híbridos fungo/NPs-Au (C) e (D), e fungo/NPs-Au@Pd (E) e (F), com aumento de 500 X (A, C e E) e 2.000 X (B, D e F).



Na micrografia obtida pelo MEV do fungo *P. macrosporus* (Figura 45 A) verifica-se também estruturas esféricas nas extremidades das hifas, bem como regiões arredondadas localizadas nos segmentos formados pelos septos. Na Figura 46B mostra a imagem em maior magnificação dessa estrutura fúngica denominadas de clamidósporos, cujo diâmetro encontra-se na faixa de 11 a 18 μm . Os clamidósporos são estruturas de resistência do fungo formadas pelo arredondamento e alargamento do interior de um segmento intercalar ou terminal da hifa (FORTUNA, 2020). O cultivo submerso do fungo *P. macrosporus* foi realizado com adição de esporos e fragmentos do micélio fúngico pré-adaptado em uma solução rica em íons citrato. Os esporos foram dispersos em uma solução aquosa de concentração baixíssima de dextrose (fonte de carbono para crescimento do fungo), cerca de 0,2% (m/v). A formação dos clamidósporos no fungo *P. macrosporus* deve-se provavelmente ao mecanismo de sobrevivência do microrganismo em um meio de cultura pobre em nutrientes.

Ademais, na micrografia do fungo *P. macrosporus* em magnitude de 2000X (Figura 45B), é possível observar com detalhes a superfície das hifas fúngicas, que possui um aspecto rugoso. Além disso, verifica-se a presença de pequenos filamentos sobre a superfície das células. A rugosidade das hifas e os seus filamentos provavelmente deve-se às macromoléculas que constituem a camada externa da parede celular do microrganismo, como por exemplo glucanas, glicoproteínas e enzimas, bem como os metabólitos secundários excretados pelo fungo (WEBSTER, WEBER, 2007).

As micrografias obtidas por MEV dos fungos decorados com nanopartículas de ouro são apresentadas nas Figuras 45C e D. Analisando a Figura 45C, observa-se que a microestrutura formada pelas células fúngicas e as nanopartículas de ouro preserva as características morfológicas do fungo filamentososo após a deposição do nanomaterial, com estruturas microtubulares uniforme de diâmetro variável e comprimento de centenas de micrômetros. Ao comparar com a micrografia do fungo *P. macrosporus* sem as nanopartículas (Figura 45A), nota-se que a superfície das hifas decoradas com nanopartículas de ouro mostram-se mais lisas. Já, na Figura 45D mostra uma imagem em maior magnificação de uma hifa isolada do fungo decorado com nanopartículas de ouro, onde é possível observar com detalhes a superfície lisa das hifas devido a presença das nanopartículas de ouro depositadas na parede celular fúngica.

Além disso, na Figura 45D verifica-se também a ausência das estruturas de resistência do microrganismo (clamidósporos). Para funcionalização de células fúngicas

com nanopartículas de ouro, esporos do fungo *P. macrosporus* foram dispersos em uma suspensão aquosa contendo nanopartículas de ouro, íons citrato (agente estabilizante) e moléculas de dextrose (nutriente). Os íons citrato além de ser um agente estabilizante para as nanopartículas, podem servir também como fonte de carbono para o crescimento do fungo. Desta forma, os esporos fúngicos germinaram, as hifas cresceram e se ramificaram em um meio rico em nutrientes. Assim, o microrganismo se desenvolveu em um ambiente com condições favoráveis para o seu crescimento, e por esta razão não é observado a formação dos clamidósporos nas hifas do fungo cultivado no referido meio de cultura.

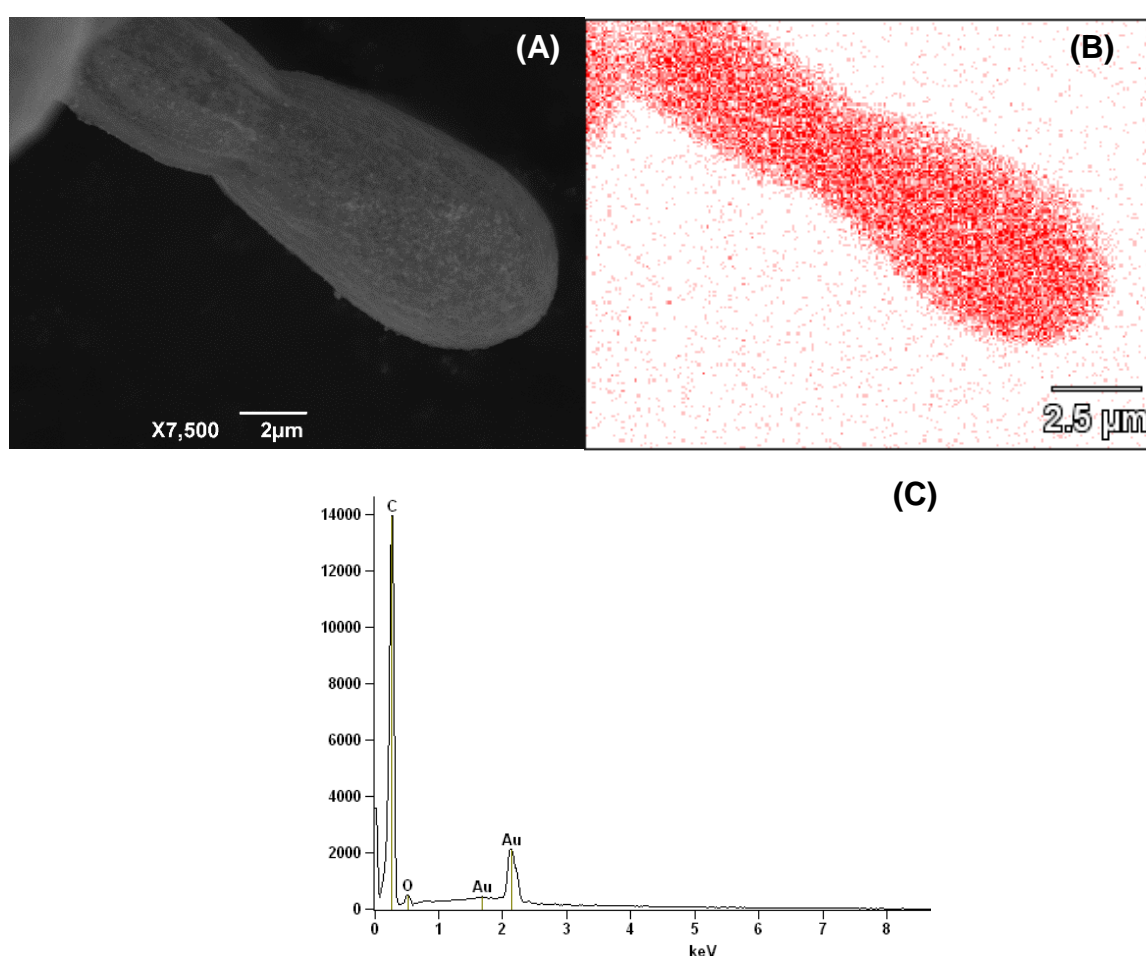
As micrografias obtidas pelo MEV dos fungos filamentosos decorados com nanopartículas bimetálicas Au@Pd preparadas com 50% (m/m) de íons Pd²⁺ são apresentadas nas Figuras 46E e F. Analisando a Figura 45E, verifica-se que a superfície das hifas fúngicas mostram-se com uma maior rugosidade se comparado com o fungo decorado com nanopartículas de Au. Por sua vez, a Figura 45F mostra com maior detalhamento a Figura 45E, a imagem de uma hifa isolada do fungo *P. macrosporus* decorado com as nanopartículas Au@Pd. É possível visualizar com mais detalhes o aspecto rugoso da superfície dos microtubos formados por células fúngicas e nanopartículas bimetálicas de Au@Pd, referente às nanopartículas Au@Pd montadas na parede celular e aos filamentos de bio-polímeros da matriz extracelular fúngica. Ademais, verifica-se a uniformidade da camada formada pelos nanomateriais aderidas à parede celular do fungo, que se estende por toda a extensão das hifas micelares.

A presença de um metal tóxico, o metal paládio, no meio de cultura do fungo filamentoso, provoca um aumento na produção de metabólitos secundários, enzimas e macromoléculas excretados pela célula fúngica, como um sistema de defesa do microrganismo (FONTES *et al.*, 2021). Supõe-se que a matriz extracelular fúngica formada nestas condições podem atuar como âncoras para deposição e fixação das nanopartículas de Au e de Au@Pd, conferindo, assim, ao material sintetizado estabilidade e robustez.

Com intuito de comprovar a constituição química dos bio-híbridos obtidos, uma microanálise foi realizada nestes materiais através da técnica de EDS (espectroscopia de energia dispersiva de raios X). Esta técnica permite realizar um mapeamento elementar de áreas microscópicas da superfície da amostra reveladas por MEV. A microanálise eletrônica por EDS consiste na medida de raios X emitidos pela interação

do feixe de elétrons incidente com os átomos de elementos químicos presentes na superfície da amostra. As linhas espectrais de raios X são específicas para os átomos de cada tipo de elemento químico, ou seja, são característicos de cada elemento químico presente na amostra. À vista disso, o comprimento de onda ou a energia dos raios X característicos podem ser empregados para identificar o elemento químico que está emitindo a referida radiação (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007).

Figura 46. Micrografia (A), mapa elemental do ouro (B) e espectro (C) obtidos por MEV-EDS do bio-híbrido formado pelo fungo Pm/NPs-Au no aumento de 7.500X.



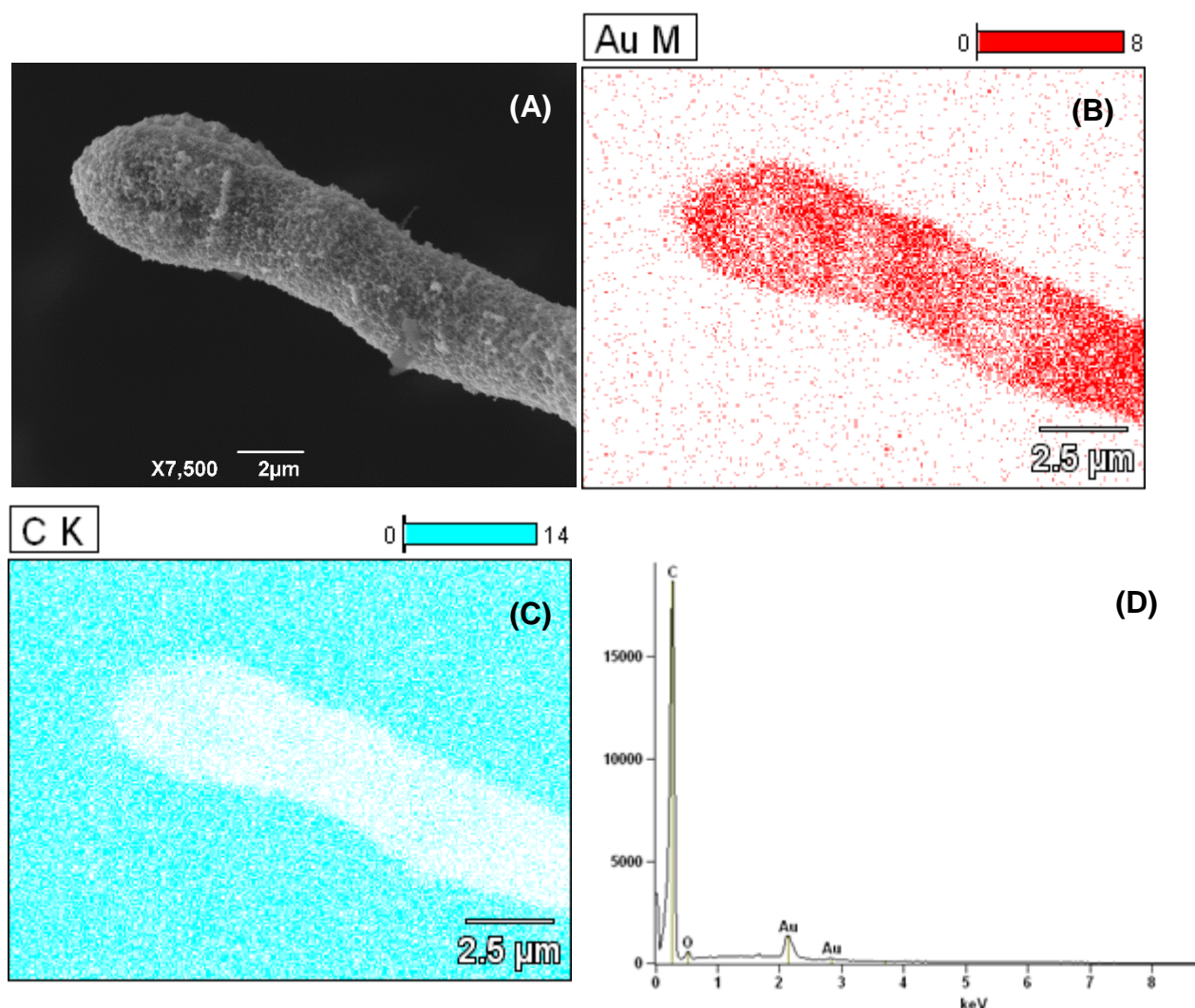
Para fins de comparação, as micrografias das amostras de bio-híbridos fungo/NPs-Au e fungo/NPs-Au@Pd preparadas com 10% e 50% (m/m) de íons Pd²⁺ foram efetuadas no modo elétrons secundários e com a magnificação de 7.500X. Na Figura 46A é apresentada a micrografia da extremidade do microtubo celular formado por fungo e nanopartículas de ouro. Uma microanálise por dispersão de raios X foi realizada nesta região do microtubo celular, e o mapa elemental referente ao elemento Au deste bio-

material é mostrado na Figura 46B. Verifica-se pelo mapa elementar, a presença do elemento químico Au nas células fúngicas, e a distribuição do referido metal em toda a área do microtubo celular analisada, o que indica que houve assimilação das nanopartículas de ouro pelo fungo filamentoso.

Na Figura 46C encontra-se o espectro obtido por EDS da região do ápice da hifa fúngica decorada com NPs-Au. Ao analisar o espectro de EDS, nota-se picos referentes aos elementos químicos carbono (C), oxigênio (O) e ouro (Au). Em todos espectros por dispersão de raios X das amostras de bio-híbrido formado por fungo e nanopartículas, apresentadas nas Figuras 46C, 47D e 48D, verifica-se a presença de um sinal de alta intensidade, o qual refere-se ao elemento carbono. O intenso sinal do elemento carbono está relacionada à fita de carbono usada no suporte da amostra para análise no MEV-EDS. É observado também, um pico em 2,12 KeV referente aos sinais emitidos pelos elétrons da camada eletrônica M dos átomos do elemento Au, indicando que o ouro está presente em uma quantidade considerável em relação ao elemento oxigênio.

Na Figura 47A é apresentada a micrografia obtida por MEV do ápice de uma hifa fúngica isolada corada com nanopartículas bimetálicas de Au@Pd preparadas com 10% (m/m) de íons Pd²⁺ com aumento de 7.500X. A referida imagem mostra com detalhes a superfície rugosa do microtubo celular, devido a presença das nanopartículas aderidas na parede celular do microrganismo. Já, na Figura 47B é apresentado o mapa elementar referente ao elemento químico Au. Nota-se pelo mapa elementar (Fig. 47B), a presença do elemento Au na superfície das células fúngicas, e que o mesmo encontra-se distribuído uniformemente por toda a extensão da estrutura microtubular do fungo. Deste modo, pode-se inferir que as nanopartículas de Au dispersas no meio de cultura foram montadas na parede celular durante o crescimento do microrganismo.

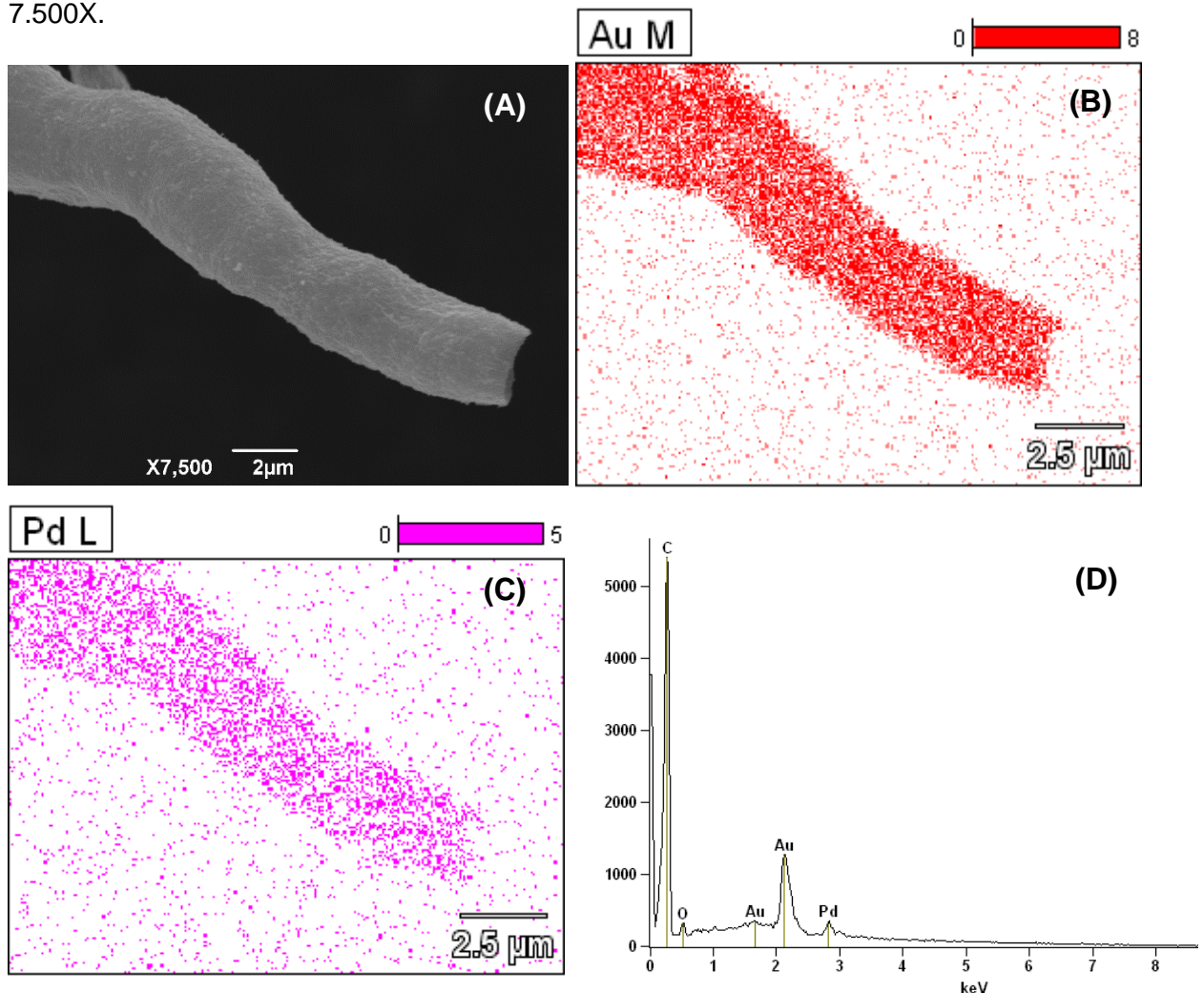
Figura 47. Micrografia (A), mapa elementar do ouro (B) e do carbono (C), e espectro (D) obtidos por MEV-EDS do bio-híbrido formado pelo fungo Pm/NPs-Au@Pd com 10% (m/m) de íons Pd²⁺ no aumento de 7.500X.



Ao analisar o mapa elementar do carbono (Figura 47C), verifica-se que onde foi detectado a presença do elemento ouro, não há sinais claros do elemento carbono presente nesta região. É provável que os raios-X emitidos pelos átomos de carbono presentes no material híbrido não sejam detectados em maiores intensidades devido a presença das nanopartículas ouro em grande quantidade sobre a superfície das células fúngicas, as quais impedem a referida radiação serem capturadas pelo detector de energia dispersiva. Analisando o espectro apresentado na Figura 47D, não foi possível detectar o sinal do elemento químico paládio, possivelmente por estar presente em uma concentração relativamente baixa na região analisada, de maneira que, a sensibilidade do detector de energia dispersiva não foi suficientemente alta para detectar o sinal do metal.

Por outro lado, na Figura 48 são apresentadas uma micrografia obtida por MEV do bio-híbrido formado pelo fungo *P. macrosporus* e nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio preparadas com 50% (m/m) de íons Pd^{2+} , os mapas elementares do ouro e do paládio, e o espectro obtidos por EDS. Na micrografia (Figura 48A) é mostrada a extremidade de uma hifa isolada do material híbrido Pm/NPs-Au@Pd 50% (m/m). É possível notar que, a imagem da região observada (Fig. 48A) se sobrepõe ao mapa elementar do ouro (Fig. 48B); o que indica a presença do elemento ouro em toda a superfície da hifa fúngica analisada. Já no mapa elementar do paládio verifica-se que, o referido elemento químico se encontra presente em toda a extensão do microtubo do bio-híbrido. Portanto, pode-se inferir que houve assimilação das nanopartículas Au@Pd com elevada concentração de metal Pd pelo microrganismo.

Figura 48. Micrografia (A), mapa elementar do ouro (B) e do paládio (C), e espectro (D) obtidos por MEV-EDS do bio-híbrido formado pelo fungo Pm/NPs-Au@Pd 50% (m/m) no aumento de 7.500X.



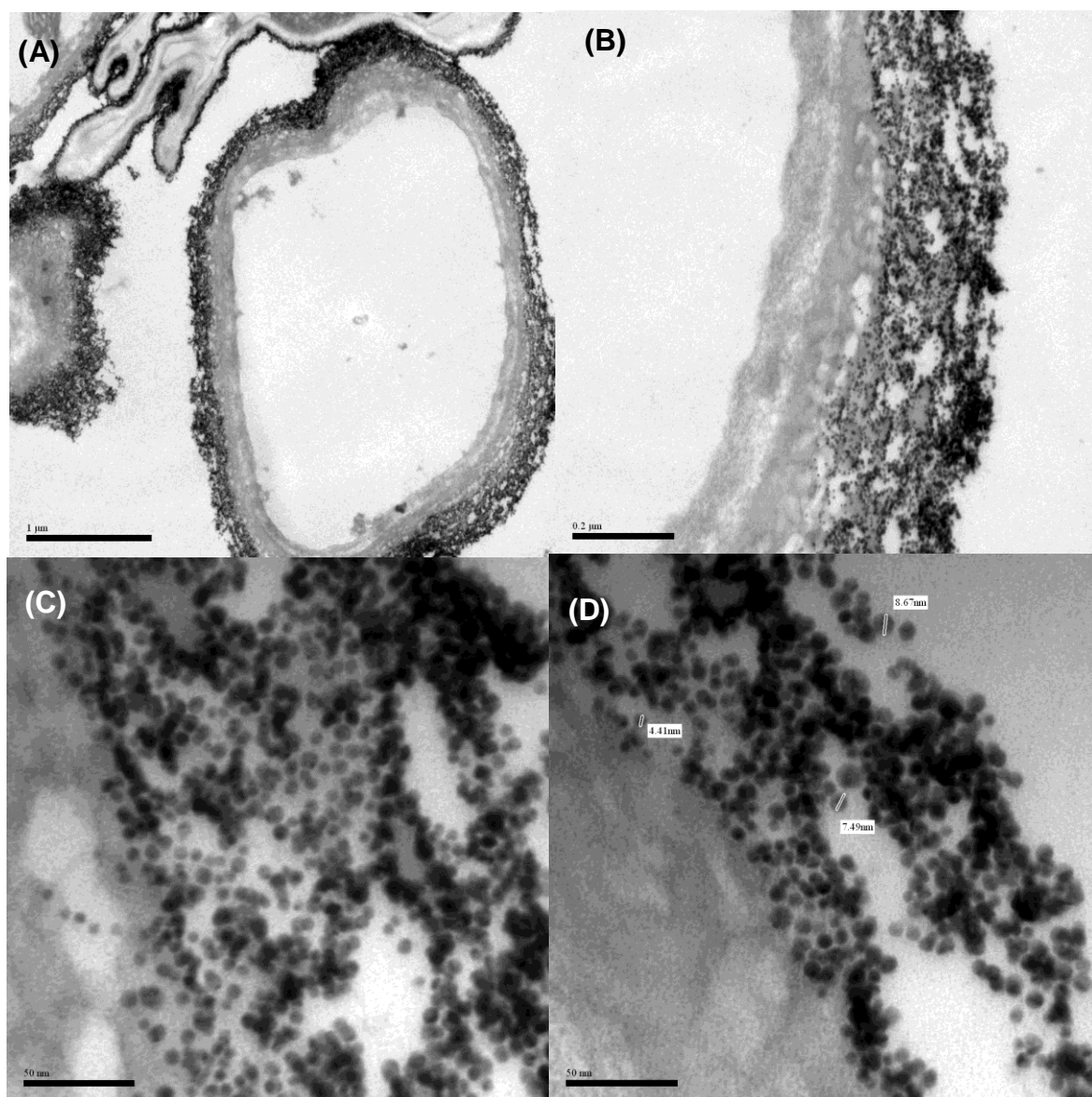
No espectro obtido por EDS, apresentado na Figura 48D, é observado um sinal mais intenso do elemento Au se comparado com o sinal do elemento Pd. Essa diferença na intensidade dos sinais, apesar da proporção mássica de ouro e de paládio serem iguais nas nanopartículas bimatálicas, é resultante da camada de origem dos elétrons emitidos nos átomos do elemento Au e Pd. O sinal do elemento Pd em 2,838 KeV é referente aos elétrons da camada L, a qual se encontra mais próxima ao núcleo do que a camada M (sinal em 2,123 KeV), camada de origem dos elétrons emitidos pelos átomos de ouro. Os elétrons da camada L são mais fortemente atraídos pelo núcleo se comparado aos elétrons da camada M, e conseqüentemente uma maior energia é necessária para promover os elétrons da camada L para níveis energéticos mais altos. Por esta razão, um menor número de elétrons é promovido, e conseqüentemente uma menor intensidade do sinal de raios X para o elemento Pd é verificada no espectro em relação ao elemento Au.

Com o escopo de verificar como as nanopartículas bimetálicas são distribuídas sobre as células fúngicas, as amostras do bio-híbrido formado por fungo *P. macrosporus* e nanopartículas bimetálicas foram analisadas por MET. Esta caracterização permite obter informações mais detalhada das características morfológicas do bio-material, do tamanho, forma e da distribuição das nanopartículas bimetálicas de Au e Pd na parede celular fúngica. Esta análise pode possibilitar uma maior compreensão sobre o processo de montagem das nanopartículas bimetálicas nas estruturas microtubulares do microrganismo.

Na Figura 49 são apresentadas micrografias de cortes transversais ultrafinos das hifas fúngicas decoradas com NPs-Au@Pd preparadas com 50%(m/m) de íons de Pd²⁺. Na preparação das referidas amostras para análise no MET não foi utilizado o pós-fixador tetróxido de ósmio para preservação das organelas do fungo, por esse motivo não é possível observar as organelas celulares do microrganismo. De modo que, apenas é possível visualizar a distribuição dos nanomateriais nas células do fungo filamentoso. Analisando a imagem da Fig. 49A, verifica-se a formação de uma camada robusta de nanopartículas de Au@Pd com espessura de aproximadamente 260 nm. Além disso, na micrografia apresentada na Fig. 49B com aumento de 50 000X, é possível verificar com mais detalhes a distribuição dos nanomateriais na parede celular do fungo. Nesta

imagem (Fig. 49B) nota-se que as nanopartículas foram depositadas exclusivamente na camada externa da parede celular. As Figuras 49C e D revelam minuciosamente a organização das nanopartículas de morfologia esférica com diâmetro ~ 7 nm. É possível perceber, por meio destas imagens, que as nanopartículas encontram-se separadas umas das outras e ancoradas na camada mais externa da parede celular fúngica

Figura 49. Micrografias obtidas por MET de cortes transversais das hifas do fungo *P. macrosporus* após o cultivo em solução coloidal de NPs-Au@Pd com 50% (m/m) de íons Pd²⁺, nos aumentos de 15.000X (A), 50.000X (B) e 100.000X (C) e (D).



Segundo Latgé (2010) a maioria das espécies de fungos filamentosos possui uma parede celular composta por duas camadas distintas, como discutido anteriormente no item 2.2.1, a camada interna formada por quitina e a camada externa que é constituída basicamente por proteínas e β -glucanas. Esses bio-polímeros da camada externa formam uma extensa rede tridimensional por meio de ligações cruzadas de natureza covalente entre as cadeias dos bio-polímeros. Fontes e colaboradores, sugerem que as nanopartículas metálicas migram para o interior dos poros da rede polimérica fúngica, e se fixam por meio de interações eletrostáticas entre os grupos funcionais presentes nas macromoléculas da parede celular e a superfície das nanopartículas. Os átomos de oxigênios parcialmente carregados negativamente, os quais se encontram presentes nos grupos hidroxilas (-OH) e ao longo da cadeia polimérica, interagem fortemente com a superfície eletricamente positiva das nanopartículas metálicas por meio de forças eletrostáticas. Desta forma, as nanopartículas metálicas são estabilizadas estericamente pelos bio-polímeros que constituem a parede celular do fungo, impedindo assim a desestabilização e agregação desses nanomateriais (FONTES *et al.*, 2021)

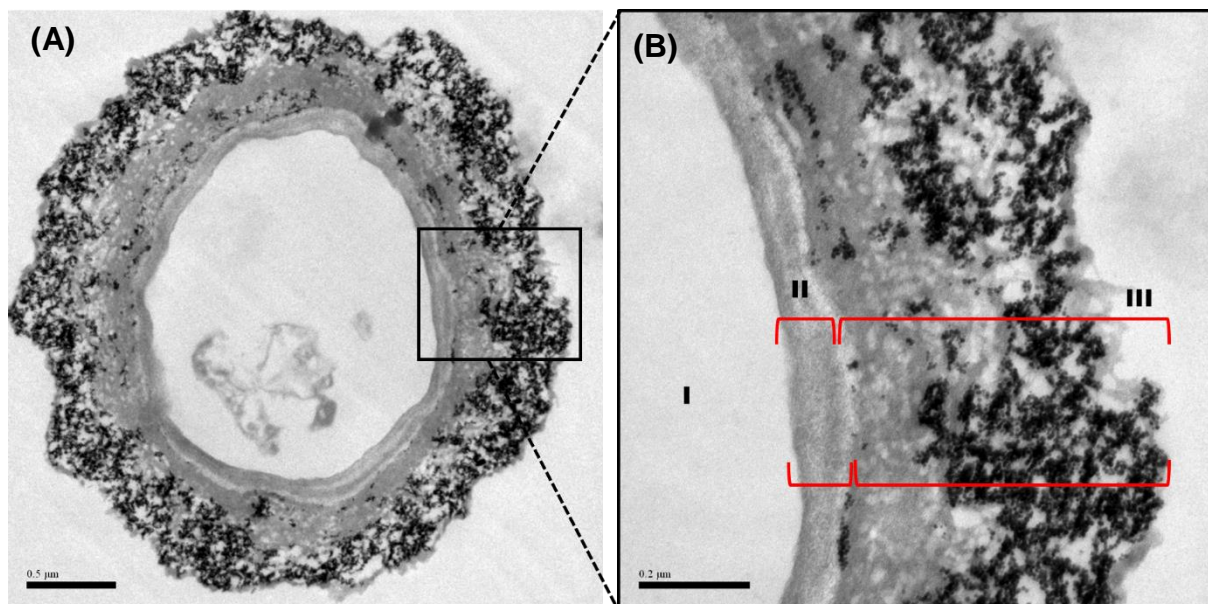
Dutta e colaboradores foram os primeiros a propor uma explicação plausível sobre a espontaneidade do processo de automontagem das nanopartículas metálicas na parede celular de fungos filamentosos. Em um experimento, esporos do fungo *A. nidulans* foram dispersos em uma solução contendo nanopartículas de Au estabilizadas com polímeros sulfurados. Os pesquisadores verificaram que não houve a montagem das referidas nanopartículas sobre a superfície das células fúngicas. Por outro lado, nanopartículas de Au estabilizadas com íons glutamato foram assimiladas pelo microrganismo, formando uma camada metálica na parede celular do fungo. Sugere-se que a interação dos átomos de enxofre presente no agente estabilizante sulfurado com a superfície do Au (S-Au) é mais intensa se comparado com a interação entre os grupos funcionais dos componentes da parede celular fúngica e a nanopartícula de Au, o que explica ausência de nanopartículas de Au nas hifas do microrganismo. Esses resultados mostram que é necessária uma fraca interação entre os agentes estabilizantes e as nanopartículas metálicas, como é o caso dos íons glutamato adsorvidos nas NPs-Au (agente estabilizante por efeito eletrostático), para favorecer o processo de automontagem das nanopartículas nos fungos filamentosos (SUGUNAN *et al.*, 2007).

Diante disso, propõe-se que a automontagem das nanopartículas bimetálicas Au@Pd estabilizadas por íons citrato ocorre devido a fraca interação do citrato com a

superfície das nanopartículas metálicas, de modo a favorecer o deslocamento do citrato pelos componentes da parede celular (proteínas e polissacarídeos, como 1,3- β -glucanas), os quais interagem mais fortemente com as nanopartículas bimetálicas do que o referido agente estabilizante (BREWER *et al.*, 2005; JIA, XU, ZHANG, 2013). Desta forma, a intensa interação das macromoléculas presentes na parede celular fúngica com as nanopartículas confere uma maior estabilização das mesmas, de modo a contribuir para diminuição da energia livre do sistema, tornando o processo espontâneo (FONTES *et al.*, 2014).

A Figura 50 apresenta imagens obtidas por MET de cortes transversais do bio-híbrido formado por micélio fúngico e nanopartículas de ouro. Analisando a Fig. 50A com aumento de 50.000X, é possível observar detalhadamente a parede celular do fungo filamentososo e as nanopartículas de Au embebidas na matriz polimérica. Nota-se que a maior concentração de NPs-Au se encontra na região mais externa da parede celular,

Figura 50. Micrografias obtidas por MET do micélio fúngico decorado com nanopartículas de ouro, nos aumentos de 50.000X (A) e 100.000X (B). I: Citoplasma; II: Camada interna da parede celular fúngica; III: Camada externa da parede celular, matriz composta polissacarídeos, glucanas e enzimas.



de modo que poucos agrupamentos de nanomateriais são observados na região mais interna da mesma. Além disso, na Figura 50B é apresentada uma imagem em maior magnificação da parede celular fúngica, onde é possível observar com nitidez três

regiões distintas do *bio-template*: região I- citoplasma celular, região II- parte interna da parede celular, rica em quitina e β -glucanas e região III- área externa da parede celular, rica em glicoproteínas e α -glucanas (GEOGHEGAN; STEINBERG; GURR, 2017).

Ao analisar minuciosamente a imagem apresentada na Figura 50B, verifica-se a presença de espaços na região mais externa da camada extracelular (região III), os quais são formados por longas cadeias de 1,3- α -glucanas ligadas covalentemente com as macromoléculas de glicoproteínas. A presença de glicoproteínas, como as manoproteínas (ou mananas) nesta área confere à parede celular fúngica uma importante propriedade de superfície, a adesão (GOW; LATGE; MUNRO, 2017). É razoável supor que a maior parte das nanopartículas são depositadas e aderidas na área mais externa da região III devido a presença desses poros na matriz polimérica. Sabe-se que, no interior desses poros encontra-se um maior número de moléculas disponíveis para interagir com as referidas nanopartículas, estabilizando-as, de modo a favorecer a formação de uma camada mais densa de nanopartículas metálicas nesta região. Já, na região mais interna da camada extracelular, localizada em uma área mais próxima à região II (Fig. 50B), observa-se uma área mais densa e compacta devido à presença de microfibras de quitina, os quais são responsáveis por conferir uma estrutura rígida à matriz. À vista disso, supõe-se que, apenas nanopartículas de ouro com diâmetros menores (5,54 nm a 6,03 nm) são capazes de penetrar nesta região mais interna da parede celular, de modo a formar uma área com menor concentração de nanomateriais se comparado com a região mais externa da parede celular.

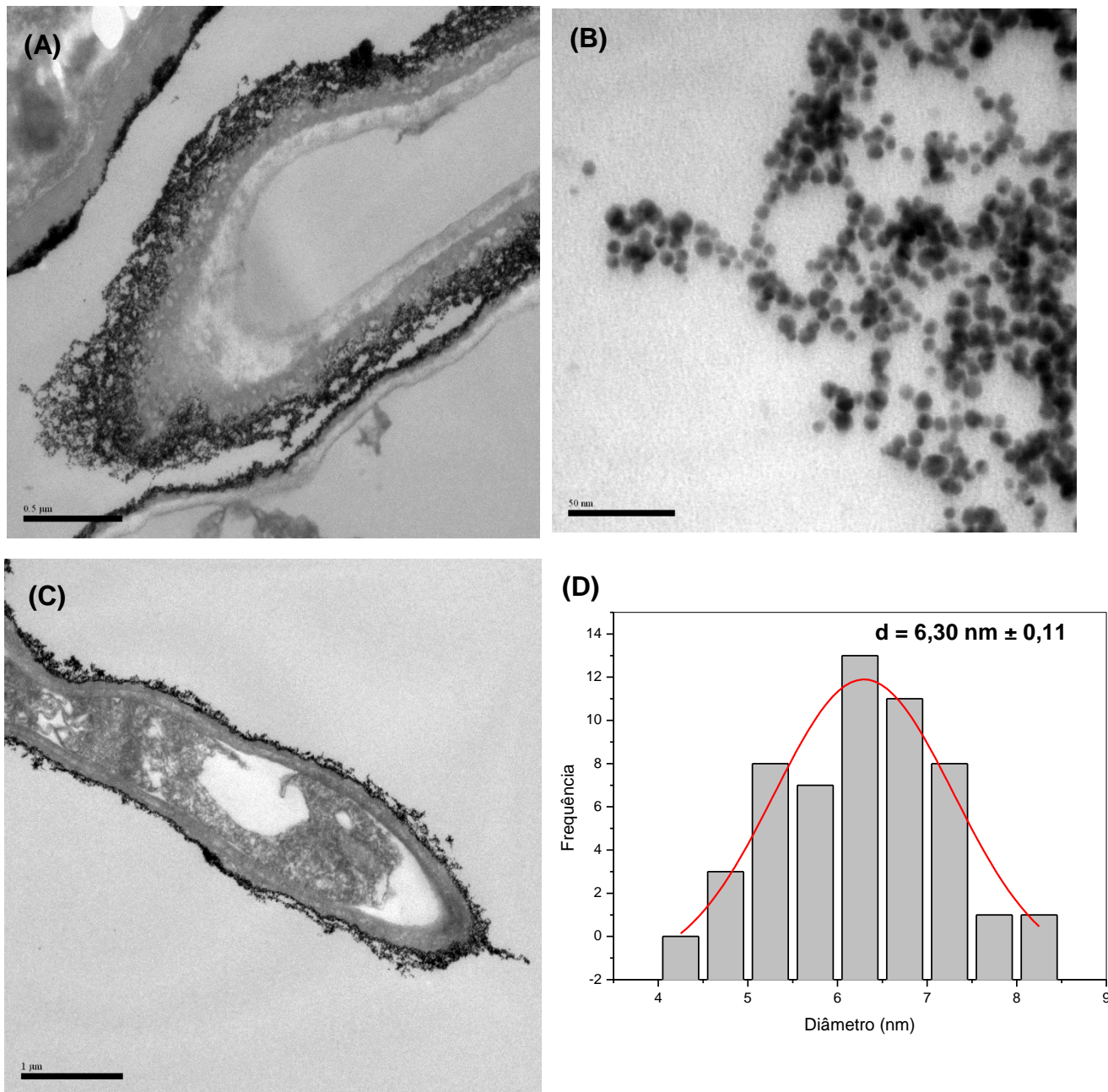
Recentemente, os trabalhos de Fontes e colaboradores e Rosário e colaboradores mostraram que diferentes nanomateriais, como nanopartículas de paládio e estruturas metal-orgânicas de lantanídeos (Ln-MOFs), podem ser internalizados e acumulados em vacúolos durante o crescimento de fungos filamentosos (ROSÁRIO *et al.*, 2019; FONTES *et al.*, 2021). Por meio da análise de micrografias obtidas pelo MET, Fontes e col. verificaram a presença de nanopartículas de Pd no interior de células fúngicas, com diâmetro médio de $7.7 \text{ nm} \pm 2.9$. Os autores sugeriram que, durante o crescimento das hifas do fungo da espécie *Penicillium sp.*, as nanopartículas de Pd foram internalizadas pelos processos fisiológicos de aquisição, transporte e assimilação de nutrientes do meio ambiente. Além disso, salienta-se que a permeação das nanopartículas através da membrana plasmática das referidas células depende do tamanho da partícula, cujo valor deve ser menor do que um tamanho específico (FONTES *et al.*, 2021).

Diante disso, verifica-se que, apesar do tamanho das nanopartículas de Au seja menor quando comparado com o diâmetro médio das nanopartículas de Pd internalizadas pelos fungos, as nanopartículas empregadas neste trabalho de doutorado, ficaram acumuladas apenas na superfície das células fúngicas. Ora, o fungo *P. macrosporus* possui hifas pigmentadas, o que indica a presença de melanina na sua parede celular. A melanina associada à quitina confere uma maior rigidez à parede fúngica, o que impede a permeação das nanopartículas para o interior das células (NOSANCHUK, 2015). Por esta razão, que o processo de internalização de nanopartículas metálicas nos vacúolos intracelulares não foi observado no fungo *P. macrosporus*.

Na Figura 51 são apresentadas micrografias de cortes ultrafinos longitudinais das hifas fúngicas decoradas com NPs-Au@Pd preparadas com 50%(m/m) de íons de Pd²⁺. Analisando as imagens obtidas por MET nas Figuras 51A e C, verifica-se a formação de uma camada densa de nanopartículas metálicas adsorvidas por toda extensão da superfície celular. Além disso, observa-se uma maior concentração de nanopartículas de Au@Pd na região localizada na ponta das hifas do fungo *P. macrosporus*, como pode ser observado nitidamente na imagem com aumento 50.000X da Fig. 51A. Com auxílio do *software ImageJ* determinou-se a distribuição de tamanho de partículas das nanopartículas bimetálicas localizadas no ápice da hifa fúngica apresentadas na Figura 51B. De acordo com o histograma apresentado na Figura 51D, a distribuição de tamanho das referidas nanopartículas está entre 1,23 a 1,53 nm, com tamanho médio de 6,30 nm ± 0,11. Verifica-se que o valor do tamanho médio das nanopartículas acumuladas no ápice da hifa é relativamente menor do que o diâmetro das nanopartículas Au@Pd 50% em suspensão obtido pelo método DLS (10,06 nm, vide item 1.4.2).

Ora, sabe-se que os fungos filamentosos crescem por alongação das células a partir das extremidades das hifas, por mecanismos complexos de montagem de uma nova parede celular, os quais ainda não são bem compreendidos (BORGNE *et al.*, 2023). O crescimento das células microtubulares fúngicas é definido pela expansão e montagem da parede celular, que ocorrem exclusivamente no ápice das hifas. Os componentes necessários para construção de uma nova parede protetora, como proteínas, açúcares e enzimas, são produzidos dentro da célula fúngica, especificamente no Gogí, na membrana plasmática e na própria parede celular. Estas moléculas são

Figura 51. Micrografias obtidas pelo MET de cortes longitudinais das hifas do fungo *P. macrosporus* após cultivo em solução coloidal de NPs-Au@Pd com 50%(m/m) de íons Pd²⁺, com magnificação de (a) 50.000X (B) 100.000X e (C) 15.000X. Distribuição de tamanho de partículas referente à imagem B (D).

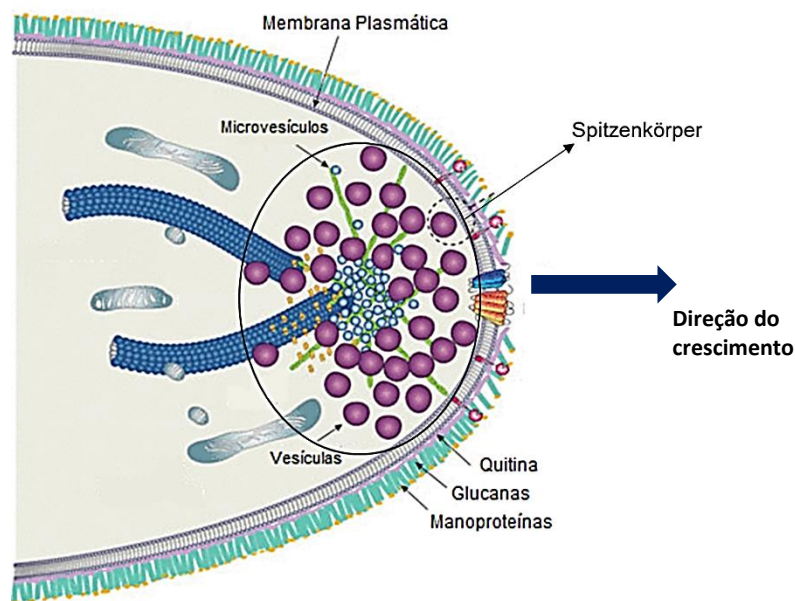


transportadas pelas vesículas secretoras para a ponta da hifa em crescimento, e são liberadas no meio externo quando as referidas vesículas se fundem com a membrana plasmática, de modo a depositar as moléculas na parede celular em construção (RIQUELME, 2013; GOW; LATGE; MUNRO, 2017). Por exemplo, as glicoproteínas da matriz polimérica são sintetizadas na membrana plasmática e transportadas pelas

vesículas secretoras em direção a região apical, onde são incorporadas à parede celular durante a sua montagem (RIQUELME *et al.*, 2018).

O crescimento apical e a morfologia das hifas, na maioria dos fungos filamentosos, dependem de um conjunto formado de organelas e vesículas denominado de Spitzenkörper (SPZ), que se encontra na região apical de uma hifa em desenvolvimento, como é mostrado na Figura 52 (RIQUELME, 2013; RIQUELME *et al.*, 2018). O SPK é considerado um centro de fornecimento de vesículas, pois durante o processo de alongação da célula hifal, o SPK se desloca linearmente enquanto libera as vesículas secretoras na superfície celular apical, de forma a promover a montagem de uma nova parede celular. Assim, o SPK direciona o crescimento da hifa fúngica ao mover as vesículas em direção ao ápice, fornecendo as espécies químicas necessárias para a síntese da parede celular (GOW; LATGE; MUNRO, 2017; RIQUELME *et al.*, 2018; BORGNE *et al.*, 2023).

Figura 52. Ilustração do ápice da hifa fúngica com destaque nas vesículas de Spitzenkörper envolvidas na síntese da parede celular e no crescimento apical dos fungos filamentosos.



Fonte: Adaptado de STEINBERG *et al.*, 2017.

Nesta perspectiva, sugere-se que, ao passo que a parede está sendo montada durante a alongação das células fúngicas, ocorre o processo de deposição das nanopartículas de Au e de Au@Pd através da interação com os grupos funcionais (R-

NH₂, R-O-R, R-OH e -COO⁻) presentes nas macromoléculas secretadas pelas vesículas de SPK. Com base no referido mecanismo de construção da parede celular fúngica, tem-se que a região da extremidade das hifas, precisamente na ponta das mesmas, consiste em uma área onde há uma intensa atividade biossintética e um maior fluxo de moléculas devido a presença das vesículas de SPK. Assim, as extremidades das hifas fúngicas possuem um número maior de bio-moléculas disponíveis para interagir com as nanopartículas metálicas por meio de ligações covalentes e/ou forças intermoleculares, estabilizando-as, e conseqüentemente, ocorre a formação de uma região com uma maior concentração de nanopartículas metálicas, como mostra a micrografia do bio-híbrido fungo/NPs-Au@Pd 50% (Figura 51A).

Foi realizado também um estudo da concentração ótima de paládio nas NPs-Au@Pd, para obtenção dos materiais híbridos constituídos de fungos filamentosos e NPs-Au@Pd. Neste estudo, foi inoculado o fungo *Phialomyces macrosporus* em diferentes suspensões de NPs-Au@Pd, NPs-Au e dextose. A inoculação foi feita em suspensões de NPs-Au@Pd com concentração dos íons Pd²⁺ em 2, 10, 20 e 50 %(m/m). Após o tempo de incubação, verificou-se que o processo de automontagem das nanopartículas bimetálicas sobre as células fúngicas nos sistemas contendo NPs-Au@Pd preparadas com 20 e 50 %(m/m) de íons Pd²⁺ foi mais lento, ou seja, foi necessário um período de crescimento do fungo maior para observar a presença de micélio decorado com as nanopartículas bimetálicas. Além disso, a massa micelar obtida nos referidos sistemas foi relativamente menor se comparado com o sistema contendo NPs-Au. Devido à toxicidade inerente do metal Pd presente nas nanopartículas bimetálicas que inibe o desenvolvimento do microrganismo, e, por conseguinte inviabiliza a automontagem das referidas nanopartículas. Somente foi observado um bom crescimento do fungo e a formação de micélio decorado nos sistemas contendo NPs-Au@Pd com adição de 2% e 10% (m/m) de íons Pd²⁺ na suspensão de NPs-Au.

Desta forma, a utilização do fungo filamentoso *P. macrosporus* como molde biológico possibilitou a construção inédita de estruturas microtubulares constituídas de células vivas fúngicas e nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio *core-shell*, as quais apresentam potencial aplicação como catalisadores heterogêneos em reações de oxidação de álcoois (MARX, BAIKER, 2009) e hidrogenação do *p*-nitrofenol (VENKATESAN; SANTHANALAKSHMI, 2012), além da aplicação para o

desenvolvimento de sensores e eletrodos de alta área superficial (FANG *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012).

2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta presente pesquisa de doutorado foi utilizado o fungo filamentososo da espécie *Phialomyces macrosporus* como suporte biológico para o desenvolvimento inédito de um material híbrido constituído de células fúngicas e nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio com estrutura *core-shell*, através da automontagem das nanopartículas metálicas sobre a superfície das hifas micelares. Desta maneira, obteve-se uma metodologia pela qual foi produzida biosistemas fungo/NPs-Au@Pd, em apenas 8 dias de cultivo do fungo com adição de dextrose como nutriente.

As micrografias obtidas pelo MEV revelaram que a morfologia microtubular das hifas fúngicas foram preservadas após a deposição das NPs-Au e NPs-Au@Pd, resultando em uma estrutura altamente uniforme quanto a cobertura dos referidos nanomateriais sobre as células fúngicas. A composição elementar dos bio-híbridos fungo/NPs-Au e fungo/NPs-Au@Pd com 50% (m/m) de metal Pd obtida pela microanálise por energia dispersiva de raios X comprovou a presença de Au e Pd na superfície dos respectivos materiais.

Embora o metal paládio seja tóxico para o microrganismo, foi constatado pelas imagens de MET, que houve a deposição das NPs-Au@Pd preparadas com com 50% (m/m) de íons Pd²⁺. As análises de MET mostraram que as nanopartículas metálicas ficam embebidas na região mais externa da parede celular fúngica, devido a presença de um maior número de macromoléculas disponíveis para interação e fixação das referidas nanopartículas. Além disso, as imagens de MET de cortes longitudinais dos bio-híbridos evidenciaram que a região da ponta das hifas tem uma maior concentração de nanomateriais, devido à maior atividade biológica pela presença das vesículas de SPK que liberam os componentes para a síntese da parede celular, durante o crescimento apical dos fungos filamentosos.

O estudo do efeito da concentração de paládio nas nanopartículas bimetálicas de Au@Pd sobre o crescimento do fungo *P. macrosporus* e a automontagem das referidas

nanopartículas constatou que o cultivo do microrganismo em suspenções com elevada quantidade de metal Pd inibe o crescimento do fungo, e, por conseguinte desfavorece a montagem das nanopartículas sobre as células fúngicas. Sendo que, a maior massa micelar decorada com as nanopartículas bimetálicas foi obtida com sistemas de cultivo contendo 2% e 10% (em massa de Au) de íons Pd²⁺.

Diante do exposto, tem-se que, apesar da toxicidade inerente do metal Pd, foi possível obter bio-híbridos constituído de células vivas fúngicas e NPs-Au@Pd estabilizadas com íons citrato, através da deposição simultânea das nanopartículas e o crescimento apical do microrganismo, em um meio rico em nutrientes. Ademais, o fungo *P. macrosporus* além de atuar como suporte biológico, o mesmo pode servir como precursor na síntese verde de nanomateriais de carbono, pois a biomassa proveniente do microrganismo é rica em moléculas orgânicas. Desta forma, propõe-se uma metodologia de síntese de pontos quânticos de carbono utilizando fungos filamentosos como precursores. No próximo capítulo, será apresentado o uso do fungo *Phialomyces macrosporus* como biomassa para síntese de pontos quânticos de carbono, como uma alternativa ao método tradicional.

CAPÍTULO III

**USO DE FUNGOS FILAMENTOSOS COMO PRECURSOR
PARA SÍNTESE DE PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO**

3.1 INTRODUÇÃO

Uma nova classe de nanomateriais de carbono tem despertado o interesse de pesquisadores nos últimos anos, devido a sua incrível propriedade luminescente e potenciais aplicações. Com tamanho menor que 10 nm, os pontos quânticos de carbono (PQCs), também conhecidos como *carbon dots*, foram descobertos acidentalmente por Xu e colaboradores em 2004, durante o processo de purificação de nanotubos de carbono de folha única (LIU *et al.*, 2019). Os PQCs surgiram como uma alternativa ao *quantum dots*, nanopartículas inorgânicas fluorescentes constituídos por metais pesados, como o cádmio, cuja toxicidade é bastante relatada academicamente (MACHADO *et al.*, 2015).

Os PQCs, ao contrário do *quantum dots* tradicionais, são biocompatíveis e biodegradáveis, solúveis em água e não tóxicos; o que possibilita o seu uso em aplicações biológicas como no desenvolvimento de sondas de bioimagem, biossensores e transportadores de substâncias (WANG *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2015; BHATT *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2021). Devido às suas propriedades ópticas, os PQCs possuem amplas aplicações em fotocatalise, dispositivos fotovoltaico e sensores analíticos (MACHADO *et al.*, 2015; TUERHONG; XU; YIN, 2017; HAN *et al.*, 2018; LIM *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2020).

A característica mais explorada pelos cientistas é a propriedade de fluorescência das nanoestruturas de carbono, ou seja, a capacidade de emitir luz em diferentes comprimentos de ondas (WANG; LU, 2022). A origem da fluorescência nos pontos quânticos de carbono ainda não é completamente compreendida, porém existem três fatores aceitos pela comunidade científica, que são utilizados para explicar o mecanismo da fotoluminescência dos PQCs, são estes: o efeito do confinamento quântico, estado de superfície e fluorescência molecular (LIU *et al.*, 2019).

As propriedades físico-químicas dos PQCs são diretamente influenciadas pela estrutura química, tamanho de partícula e presença de grupos funcionais em sua superfície, que por sua vez são afetados pela rota de síntese utilizada em seu preparo (TUERHONG; XU; YIN, 2017; YAN *et al.*, 2019; OZYURT *et al.*, 2023; YUE *et al.*, 2023). Os PQCs podem ser sintetizados por meio de diversas metodologias. Frequentemente, os métodos de síntese desses materiais são classificados em duas abordagens: *top-down* e *bottom-up* (OZYURT *et al.*, 2023). Na abordagem *top-down*, os PQCs são sintetizados

a partir de estruturas macroscópicas ou pré-formadas de carbono como por exemplo, grafite, óxido de grafite e nanotubos de carbono. Já na abordagem *bottom-up*, os PCQs são sintetizados a partir de moléculas orgânicas ou poliméricas (glicose, ácido cítrico, ácido ascórbico, proteínas, etc), por meio de reações químicas de carbonização ou polimerização (RANJAN *et al.*, 2022; OZYURT *et al.*, 2023; YUE *et al.*, 2023).

A abordagem *bottom-up* é a mais utilizada na produção de Pontos Quânticos de Carbono, devido a sua facilidade em ajustar as propriedades do produto final alterando alguns parâmetros da metodologia, bem como pela sua simplicidade e baixo custo (SHARON, M; MEWADA, 2018; SUN, 2020). Nesta abordagem de síntese, diversos tipos de materiais orgânicos naturais podem ser empregados para a obtenção de PQC's, como alimentos, resíduos domésticos, plantas e microrganismos, diferentemente dos métodos convencionais que utiliza reagentes tóxicos (DIAS *et al.*, 2019; KANG *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2020; MEWADA *et al.*, 2013; HUA *et al.*, 2017).

Recentemente, tem-se utilizado microrganismos como algas, bactérias e fungos, como precursores verdes para a síntese de PQC's. Dentre as classes de fungos usadas para a preparação dos PQC's estão as leveduras, os cogumelos e outros fungos comestíveis (YANG *et al.*, 2017; VENKATESWARLU *et al.*, 2018; JI *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2021; TU *et al.*, 2022; XIANG *et al.*, 2022). Xiang e colaboradores (2022) utilizaram uma espécie de fungo silvestre comestível, *L. hatsudake*, como fonte de carbono para produção de pontos quântico de carbono, utilizando-se o método hidrotérmico sob uma temperatura de 200 °C e tempo de reação de 12 h. Segundo os autores, a biomassa fúngica é rica em proteínas, polissacarídeos e aminoácidos, o que torna um precursor ideal para obtenção de PQC's com intensa luminescência devido a presença de heteroátomos (como átomos de nitrogênio e oxigênio) em sua composição. À face do exposto, tem-se que ainda existem poucos trabalhos publicados a respeito do uso de biomassa fúngica como precursor para preparação de pontos quânticos de carbono.

Com relação ao emprego de fungos filamentosos como biomassa para a produção PQC's, até o momento, ainda não se encontra disponível na literatura científica trabalhos que aborde tal temática. Diante disso, faz-se necessário o desenvolvimento de método de síntese de pontos quânticos de carbono empregando-se fungos filamentosos como precursor. Como um dos objetivos desta pesquisa de doutorado tem-se, propor uma metodologia de síntese de pontos quânticos de carbono produzidos a partir da biomassa obtida por fungos filamentosos da espécie *Phyalomices macrosporus*, com o intuito de

obter nanopartículas a base de carbono com elevado efeito fotoluminescente para aplicação em procedimentos de bio-imagem e desenvolvimento de sensores para análise e detecção de espécies químicas.

3.2 REVISÃO DA LITERATURA

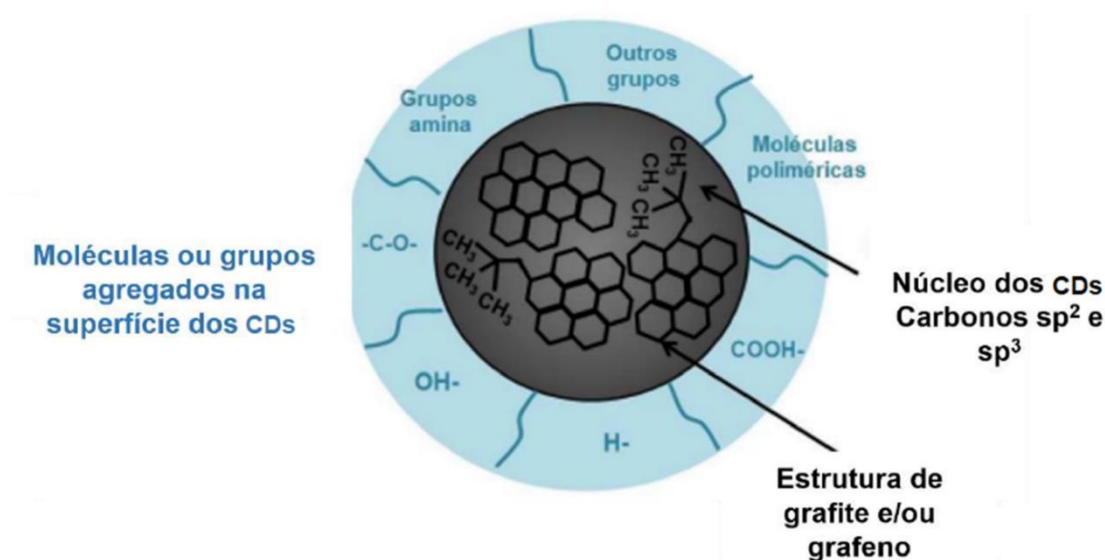
3.2.1 PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO: SÍNTESE, BIOMASSA FÚNGICA E PROPRIEDADES ÓPTICAS

Basicamente, os materiais a base de carbono de formato semi-esférico, com ao menos uma dimensão abaixo de 10 nm e com propriedades fluorescentes, são denominados de pontos quânticos de carbono (PQCs) ou simplesmente pontos de carbono, do inglês *carbon dots* (SHARON, M; MEWADA, 2018; OZYURT *et al.*, 2023). Os PQCs são formados por um núcleo constituído por átomos de carbono com hibridização sp^2 e sp^3 , formando assim um extenso sistema com conjugação elétrons π . Além disso, o núcleo dos PQCs possui alto grau de cristalinidade devido a presença das múltiplas folhas de grafeno, as quais se encontram sobrepostas uma sobre as outras (TUERHONG; XU; YIN, 2017). Na superfície do núcleo grafítico encontram-se moléculas orgânicas e diferentes grupos funcionais como carbonilas, hidroxilas, carboxilas e amidas, os quais se ligam diretamente à superfície do núcleo, como é mostrado na Figura 53. Logo, os PQCs apresentam uma estrutura do tipo *core-shell*, onde *core* é o núcleo de carbono e o *shell* consiste no invólucro formado pelos grupos químicos superficiais (SHARON, M; MEWADA, 2018; LIU *et al.*, 2019).

No ano 2004, Xu e colaboradores relataram a descoberta de nanomateriais fluorescentes formados pelo processo de purificação de nanotubos de carbono de folha única utilizando a técnica de eletroforese em gel (XU *et al.*, 2004). Os pesquisadores verificaram que estes nanomateriais de carbono apresentavam propriedades luminescentes semelhantes aos *quantum dots* inorgânicos. Diferentemente, destes *quantum dots*, os quais são produzidos a partir de metais pesados tóxicos como o elemento cádmio, os pontos quânticos de carbono apresentam baixa toxicidade e são solúveis em água a depender dos grupamentos químicos presentes na superfície do

núcleo; além disso, são biodegradáveis e biocompatíveis, o que possibilita a aplicação destes nanomateriais em sistemas biológicos (HIMAJA; KARTHIK; SINGH, 2015; SHARON; MEWADA, 2018).

Figura 53. Esquema ilustrativo da estrutura dos pontos quânticos de carbono.



Fonte: Adaptado de Park *et al.*, 2016.

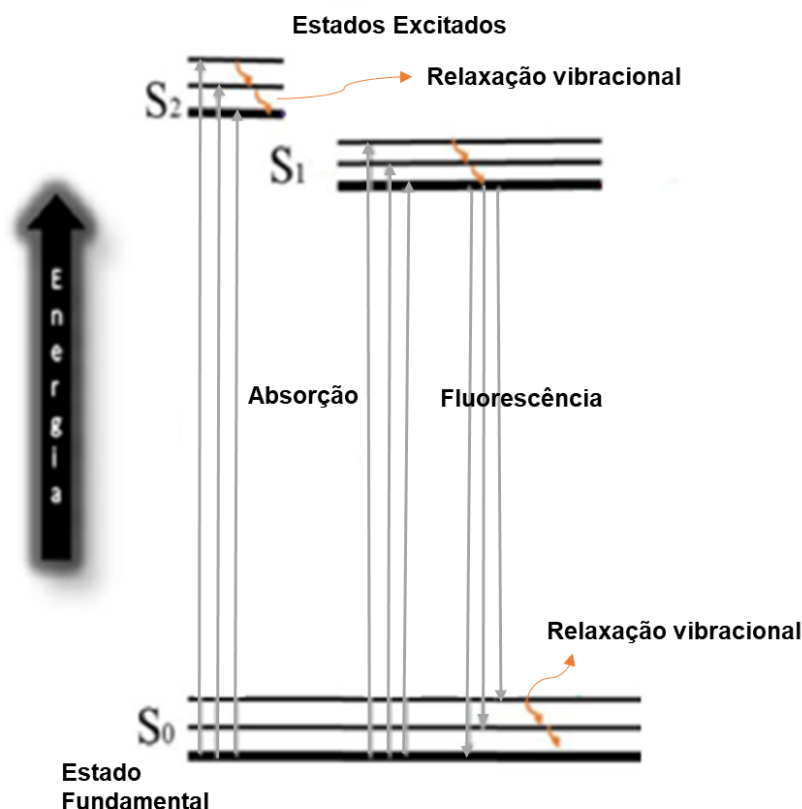
Os pontos quânticos de carbono possuem outras vantagens em relação aos *quantum dots* incluindo a facilidade no preparo e o baixo custo de produção devido a grande variedade de materiais a base de carbono que podem ser utilizados para obtenção desses nanomateriais, além de empregar uma metodologia de síntese menos agressiva ao meio ambiente, por não exigir o uso de reagentes tóxicos (RANJAN *et al.*, 2022; OZYURT *et al.*, 2023). Dentre as características dos pontos quânticos de carbono que chama mais atenção dos pesquisadores, está a intensa emissão de fluorescência, uma propriedade óptica inerente aos PQCs. A fluorescência consiste na emissão de luz na faixa do visível (400 a 700 nm) do espectro eletromagnético em consequência de transições eletrônicas (VAZ *et al.*, 2015).

Para que ocorra o fenômeno de fluorescência, inicialmente, as moléculas luminescentes são excitadas pelo processo de absorção de um fóton de uma radiação eletromagnética incidente. Por conseguinte, há uma transição de elétrons do estado fundamental para o estado excitado. Essas transições ocorrem somente mediante a absorção de uma quantidade discreta de energia, a qual deve ser suficiente para

promover os elétrons do orbital molecular preenchido de mais alta energia (HOMO) para o orbital molecular vazio de mais baixa energia (LUMO) de uma molécula (SKOOG, WEST, HOLLER, 2002; VAZ *et al.*, 2015).

Na Figura 54 encontra-se representado um diagrama de energia mostrando o mecanismo de absorção e de fluorescência em um sistema luminescente. As linhas grossas horizontais S_0 representa o estado fundamental, sendo que as linhas S_1 e S_2 representam os estados energeticamente excitados. As linhas finas horizontais acima dos estados representam os níveis vibracionais. A absorção de radiação em uma faixa de comprimento de onda, implica na promoção dos elétrons do estado fundamental para qualquer um dos vários níveis de energia vibracional do estado excitado, este processo é indicado pelas setas verticais à esquerda da Fig. 54. Todavia, a molécula permanece no estado excitado em um período de tempo muito pequeno, com duração na ordem de 10^{-18} segundos, e volta para o estado fundamental novamente por meio de processos de desativação (SKOOG, WEST, HOLLER, 2002; VAZ *et al.*, 2015).

Figura 54. Diagrama de energia simplificado mostrando o mecanismo de absorção e de fluorescência de um sistema fotoluminescente.



Fonte: Adaptado de Vaz *et al.*, 2015.

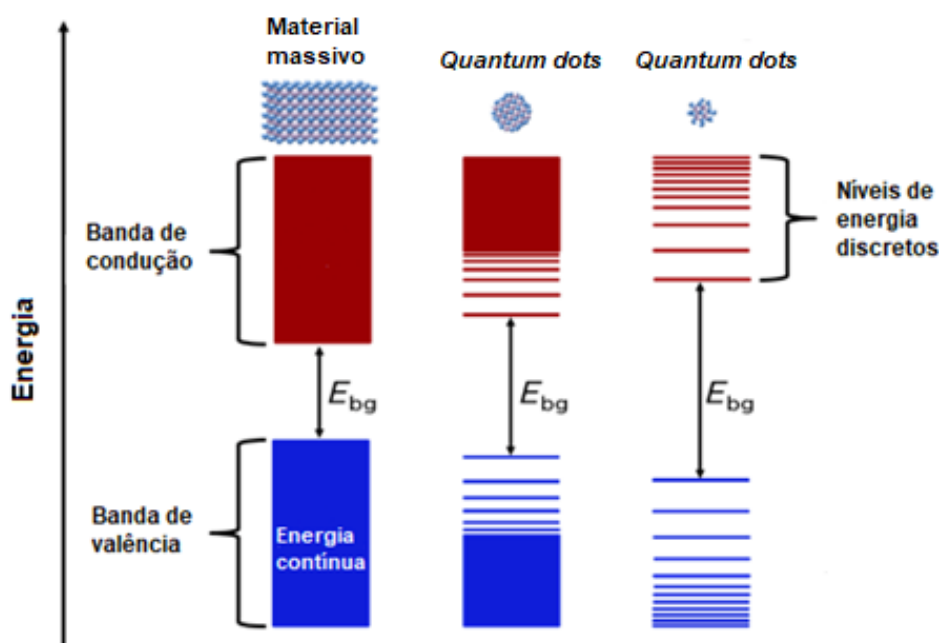
O processo de desativação ocorre quando os elétrons nos diferentes níveis vibracionais do estado excitado retornam para os níveis vibracionais de mais baixa energia do estado fundamental. Este processo envolve o decaimento de elétrons de diferentes níveis de energia vibracionais do estado excitado para os níveis vibracionais subsequentes até atingir o nível de mais baixa energia do estado excitado. Estas transições eletrônicas entre os níveis vibracionais do mesmo estado eletrônico consistem em um processo denominado de relaxação vibracional (indicado pelas setas alaranjadas da Fig. 54). Este processo de relaxação não promove emissão de luz, porém ocorre perdas de energia através de outros mecanismos, como por exemplo a perda de energia por colisões entre as moléculas (SKOOG, WEST, HOLLER, 2002; VAZ *et al.*, 2015).

A continuidade do processo de decaimento ocorre pelo processo de fluorescência, que envolvem transições eletrônicas a partir do nível vibracional de energia mais baixa de um estado excitado para qualquer um dos níveis vibracionais do estado fundamental, a partir do qual ocorre o decaimento eletrônico para os níveis vibracionais subsequentes até atingir o nível de mais baixa energia do estado fundamental, como está indicado pelas setas verticais à direita da Fig. 54. Durante o processo de fluorescência ocorre a emissão de luz, com comprimento de onda maior, ou seja, com energia menor do que a radiação usada no processo de excitação, devido ao gasto energético envolvidos nos processos de relaxação (SKOOG, WEST, HOLLER, 2002; VAZ *et al.*, 2015). A origem da fotoluminescência dos pontos quânticos de carbono ainda se encontra em debate e o seu mecanismo não é completamente compreendido pelos pesquisadores. Todavia, há três modelos aceitos pela comunidade científica, os quais explicam de modo plausível o mecanismo da luminescência dos PQC's, são eles: efeito de confinamento quântico, o estado de superfície e a fluorescência molecular (LIU *et al.*, 2019).

Em um material macroscópico, os elétrons movem-se livremente nas três dimensões do espaço (3D) devido a sua estrutura de bandas contínua, como mostra o diagrama esquemático representada na Figura 55. Nesta configuração, a transferência de elétrons excitados no material contínuo ocorre através de vários níveis energéticos, favorecendo assim a liberação de energia em forma de calor (ZHU *et al.*, 2015; SHARON; MEWADA, 2018). Mas quando o mesmo material é reduzido fisicamente nas três dimensões do espaço (0D), a nuvem eletrônica não pode mover-se livremente devido ao confinamento espacial e, conseqüentemente, a sua distribuição eletrônica é modificada, de modo que os estados eletrônicos se tornam poucos e amplamente separados entre

si (níveis de energia discretos), se assemelhando à estrutura eletrônica de uma pequena molécula (SHARON; MEWADA, 2018).

Figura 55. Representação esquemática que mostra como transição a partir de um material contínuo qualquer para nanoescala muda os níveis de energia e o *band gap* (E_{bg}) em função do tamanho.



Fonte: Adaptado de Marta, 2017.

Como é mostrado no esquema representado pela Figura 55, à medida que diminui o tamanho do ponto quântico de carbono, o confinamento quântico torna-se maior, e conseqüentemente mais energia é necessária para promover elétrons para os níveis de mais alta energia através da barreira energética (E_{bg}). Esse intervalo energético (*band gap*) consiste na diferença entre o nível preenchido de mais alta energia (HOMO) para o nível vazio de mais baixa energia (LUMO). Isso significa que, quanto menor o ponto quântico de carbono, maior o *band gap* e maior a energia emitida na forma de luz durante o processo de fluorescência. Portanto, pode-se dizer que, PQC's maiores emitem luz no comprimento de onda maiores (região do vermelho de baixa energia) e PQC's menores emitem luz no comprimento de onda menores (região do azul de alta energia) (WAREING; GENTILE; PHAN, 2021).

Geralmente, nanomateriais de carbono com núcleo gráfitico, com um amplo sistema de conjugação de elétrons π e com poucas espécies ligadas na sua superfície,

apresentam propriedade de fotoluminescência dependente do tamanho da partícula, devido ao efeito de confinamento quântico (OZYURT *et al.*, 2023). Ou seja, à medida que o tamanho dos PQC's diminui, maior é o confinamento dos elétrons π conjugados, resultando no aumento do intervalo entre as bandas eletrônicas (*band gap*), e conseqüentemente, uma energia maior é necessária para promover as transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ nos anéis aromáticos; resultando, assim, no desvio da banda de emissão para a região do azul (menores comprimentos de onda) da faixa do visível do espectro eletromagnético (ZHU *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2019). Este comportamento óptico indica que a emissão de fluorescência do PQC's é proveniente do seu núcleo formado por átomos de carbono com hibridização sp^2 , que por sua vez forma um amplo domínio de elétrons π conjugados (PARK *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2019). O sistema π -conjugado consiste em um conjunto de orbitais π conectados com elétrons deslocalizados (LIMA, 2023). No entanto, este mecanismo não é aplicável para todos os pontos quânticos de carbono estudados; por esta razão, outros mecanismos estão sendo investigados (YUE *et al.*, 2023).

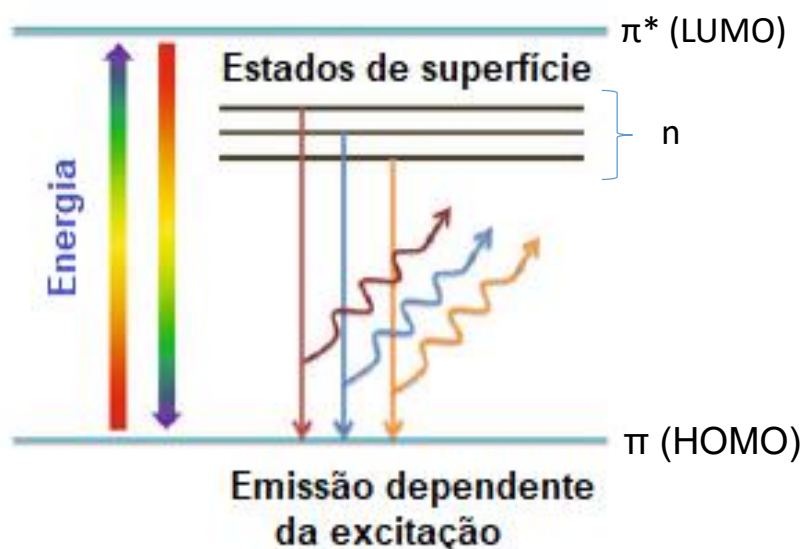
O mecanismo de fluorescência mais comum e mais aceito para os nanomateriais a base de carbono consiste na emissão induzida por estados de superfície. Os estados de superfícies estão relacionados com a presença de grupos químicos na superfície do núcleo de carbono (LIU *et al.*, 2019; YUE *et al.*, 2023). Dependendo do método de síntese utilizado no preparo dos PQC's, grupos funcionais contendo átomos de oxigênio (C=O, C-O-C, O=C-OH, C-OH) podem ser incorporados à superfície do núcleo. Tais grupos funcionais possuem vários níveis de energia que atuam como armadilhas de energia, a depender da sua capacidade de doar ou retirar elétrons (PARK *et al.*, 2016; OZYURT *et al.*, 2023). Por exemplo, o grupo carbonila (C=O) apresenta uma ligação polarizada, onde o átomo de carbono encontra-se carregado positivamente devido a alta eletronegatividade do átomo de oxigênio. Este átomo de carbono com a carga positiva atrai os elétrons- π do núcleo, de modo a retirar os referidos elétrons por efeito de indução (VOLLHARDT, SCHORE, 2013). Por causa desta habilidade de retirar elétrons, o grupo carbonila é considerado um defeito de superfície, já que o mesmo contribui para a diminuição da intensidade de fluorescência (BARMAN; PATRA, 2018).

Os estados de superfície são originados pela hibridização da estrutura eletrônica dos carbonos do núcleo com os átomos dos grupos funcionais ligados na superfície do mesmo, como mostra o diagrama de energia simplificado de um ponto quântico de

carbono hipotético apresentado na Figura 57 (ZHU *et al.*, 2015). O processo de fluorescência pelo mecanismo de estados de superfície ocorre pelo processo de relaxação radioativa dos elétrons dos níveis de energia localizados entre as bandas eletrônicas (indicadas pelas linhas horizontais pretas na Fig. 56) para o estado fundamental (ZHU *et al.*, 2015; YAN *et al.*, 2019).

No processo de excitação, após absorver uma energia em um comprimento de onda específico, os elétrons, cuja energia satisfaz o *band gap*, são transferidos para os diferentes níveis de energia dos defeitos de superfícies. Ou seja, esses elétrons são transferidos do nível de mais alta energia (estados π do núcleo) para os níveis de mais baixa energia (estados n dos grupos funcionais) (YAN *et al.*, 2019). Ao retornar para o estado fundamental, os referidos elétrons emitem luz visível de diferentes comprimentos de onda, indicadas pelas setas sinuosas da Fig.56, resultando desta forma em uma luminescência multicolorida. A fluorescência induzida pelos estados de superfície é caracterizada pela emissão dependente do comprimento de onda de excitação (ZHU *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2019).

Figura 56. Mecanismo de fluorescência dependente da excitação devido aos estados de superfícies originados pela hibridização dos níveis de energia dos grupos funcionais com os níveis dos átomos de carbono do núcleo dos pontos quânticos de carbono.

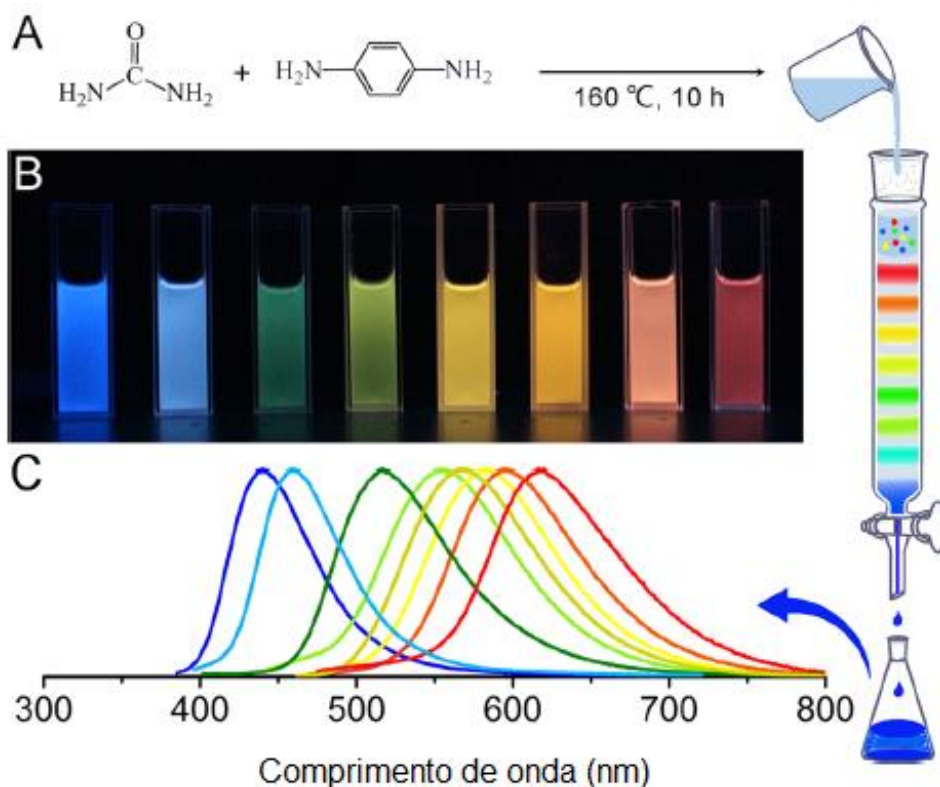


Fonte: Adaptado de Jelinek, 2017.

Ding e colaboradores (2016) relataram a obtenção de uma mistura de PQC's pela reação hidrotérmica dos precursores uréia e *p*-fenilenodiamina. Os PQC's obtidos foram

separados via coluna cromatográfica de sílica, pois tinham polaridades diferentes (Figura 57A). Nesta purificação, oito amostras foram coletadas, e apresentaram um gradiente de cores do azul para o vermelho, sob a luz UV (365 nm), como é mostrado na Figura 57B. Os autores verificaram um desvio da fluorescência para o vermelho, com o aumento do grau de oxidação na superfície do núcleo de carbono dos PQC's, como mostra os espectros de emissão das amostras representados na Figura 57C. Diante deste resultado, constatou-se que esse comportamento óptico das amostras de PQC's não é devido aos efeitos de tamanho da partícula (efeito de confinamento quântico), pois as amostras exibiram tamanhos semelhantes. Logo, inferiram que a fluorescência era atribuída à superfície dos núcleos de carbono, e que os estados de superfície seriam o fator dominante para a origem da fluorescência dessas amostras de PQC's.

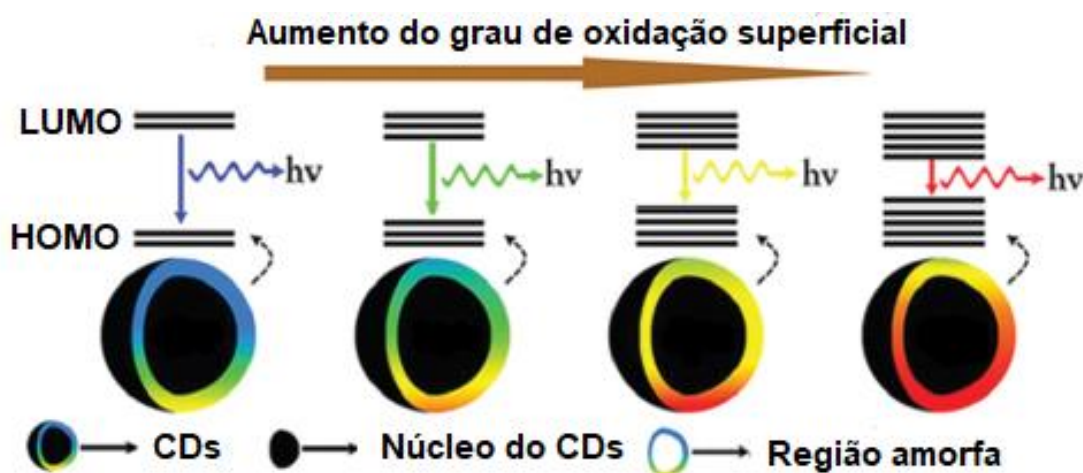
Figura 57. Esquema ilustrativo de obtenção de uma mistura de PQC's com emissão de fluorescência distintos, via síntese hidrotérmica (A), Oito amostras de PQC's coletadas durante a purificação em coluna cromatográfica de sílica, sob radiação UV (365 nm) (B), e espectros de emissão de fluorescência das oito amostras (C).



Fonte: Adaptado de Ding *et al.*, 2016.

Neste mesmo trabalho, os pesquisadores Ding e colaboradores propuseram um mecanismo para fotoluminescência, exemplificado pelo esquema mostrado na Figura 58. Segundo, os autores o *band gap* é reduzido à medida que cresce o número de átomos de oxigênio na superfície do núcleo de carbono, devido a presença de grupos funcionais contendo oxigênio como C=O e COOH. Com o aumento do grau de oxidação superficial, níveis eletrônicos são acrescentados entre o HOMO (orbital molecular de maior energia ocupado) e o LUMO (orbital molecular de menor energia desocupado), diminuindo assim o *band gap*; resultando, desta forma, um desvio do comprimento de onda de fluorescência para o vermelho de baixa energia no espectro de emissão, como mostrado na Figura 58C (DING *et al.*, 2016).

Figura 58. Esquema ilustrativo mostrando o mecanismo de fluorescência dos pontos quânticos de carbono baseado no grau de oxidação superficial.



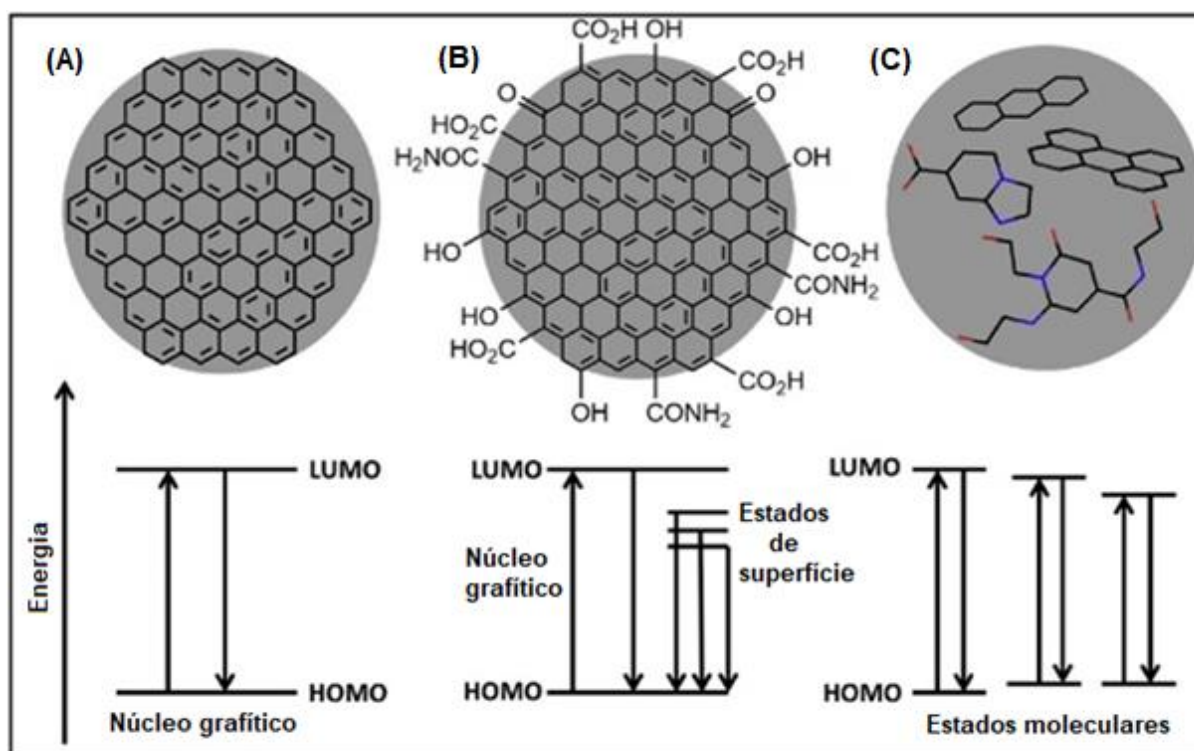
Fonte: Adaptado de Ding *et al.*, 2016.

Como discutido anteriormente, os defeitos de superfície são gerados em sua maior parte pela oxidação da superfície do núcleo de carbono (região amorfa da Fig. 58). Richard e colaboradores, verificaram que a intensidade de fluorescência dos pontos quânticos de carbono reduzidos quimicamente é mais alta se comparado com os oxidados. Segundo os autores, os grupos funcionais oxigenados presentes na superfície do núcleo de carbono podem atuar como supressores fluorescentes, devido a capacidade de retenção dos elétrons excitados nos seus vários níveis de energia. Logo, a redução química é uma alternativa para a remoção parcialmente ou totalmente dos

átomos de oxigênio superficiais de modo aprimorar a fotoluminescência desses PQC's (DAS *et al.*, 2014).

A fluorescência molecular também contribui para a emissão dos PQC's. Nesse tipo de fluorescência estão incluídas moléculas orgânicas fluorescentes formadas pela carbonização de moléculas pequenas durante a síntese dos pontos quânticos de carbono. Essas moléculas fluorescentes emitem luz diretamente, e podem estar ligadas à superfície do núcleo e/ou no interior do mesmo (LIU *et al.*, 2019). Na Figura 59 é mostrado os diagramas de energia simplificados dos principais mecanismos de fotoluminescência nos pontos quânticos de carbono discutidos acima.

Figura 59. Os principais mecanismos de fotoluminescência dos pontos quânticos de carbono: A) Fotoluminescência induzida pelo núcleo grafítico, B) Estados de superfície e C) Fluorescência molecular.

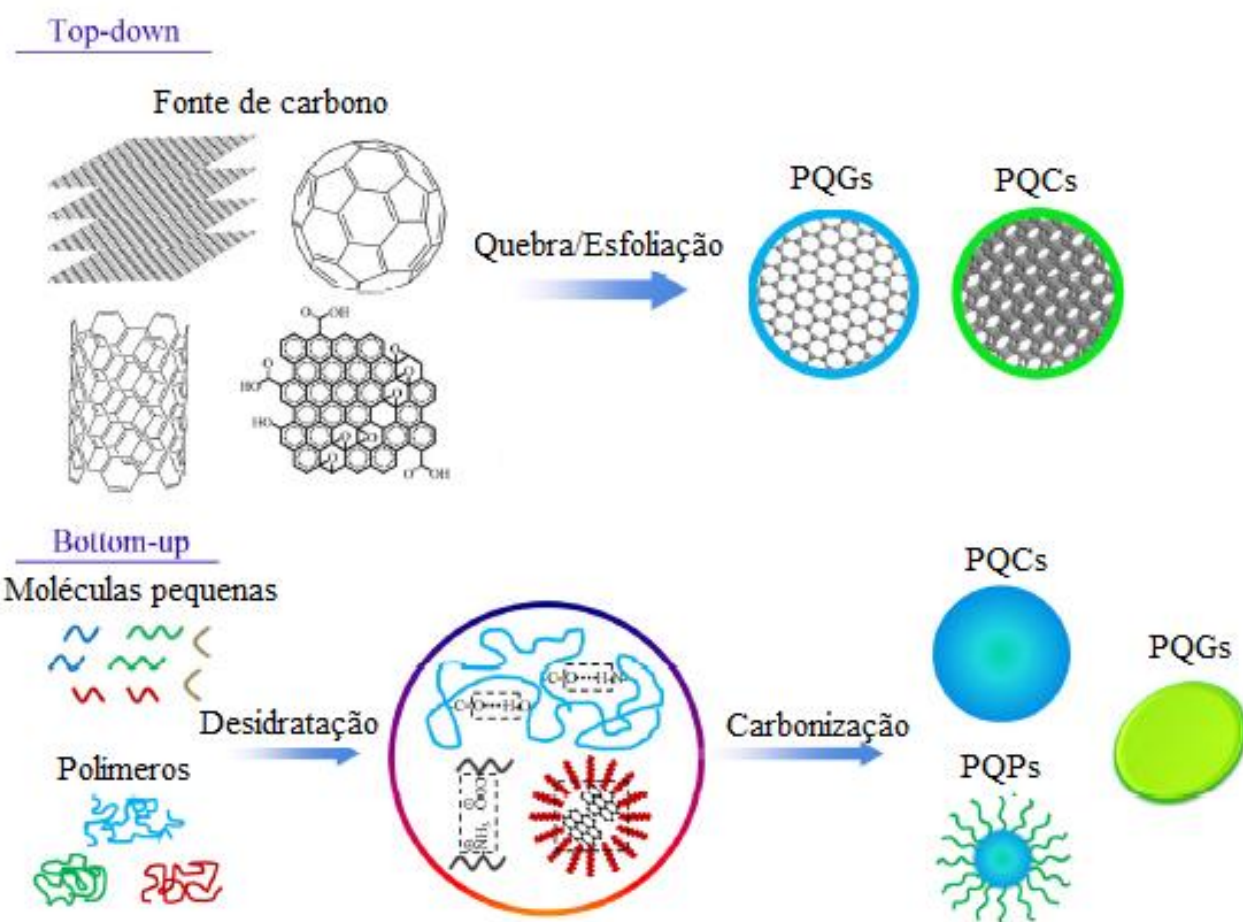


Fonte: BARMAN; PATRA, 2018.

Com base no que foi discutido anteriormente, nota-se que as propriedades ópticas dos pontos quânticos de carbono são estritamente dependentes da composição química da superfície do seu núcleo, do tamanho das partículas, dos precursores e da

rota de síntese empregada (OZYURT *et al.*, 2023). Por isso, é de extrema importância a investigação de metodologias adequadas de síntese e a melhor matéria-prima a ser empregada para obtenção de PQC's com boa fotoluminescência a fim de ampliar a sua aplicação nas áreas de bio-imagem e sensores químicos, por exemplo. Os PQC's podem ser sintetizados utilizando-se diferentes métodos, os quais são classificados pelas abordagens *top-down* e *bottom-up* (Figura 60), semelhantes à síntese das nanopartículas metálicas (OZYURT *et al.*, 2023).

Figura 60. Principais abordagens para produção de pontos quânticos de carbono: *Top-down* envolve quebra ou esfoliação de materiais de carbono para produzir pontos quânticos de carbono (PQC's) e de grafeno (PQG's), e *bottom-up* produção de pontos quânticos de carbono, de grafeno e poliméricos (PQP's) a partir de moléculas orgânicas ou polímeros.



Fonte: ZHU *et al.*, 2015.

Na abordagem *top-down*, os pontos quânticos de carbono são sintetizados a partir de grandes estruturas de carbono, como por exemplo, grafite, nanotubos de carbono e

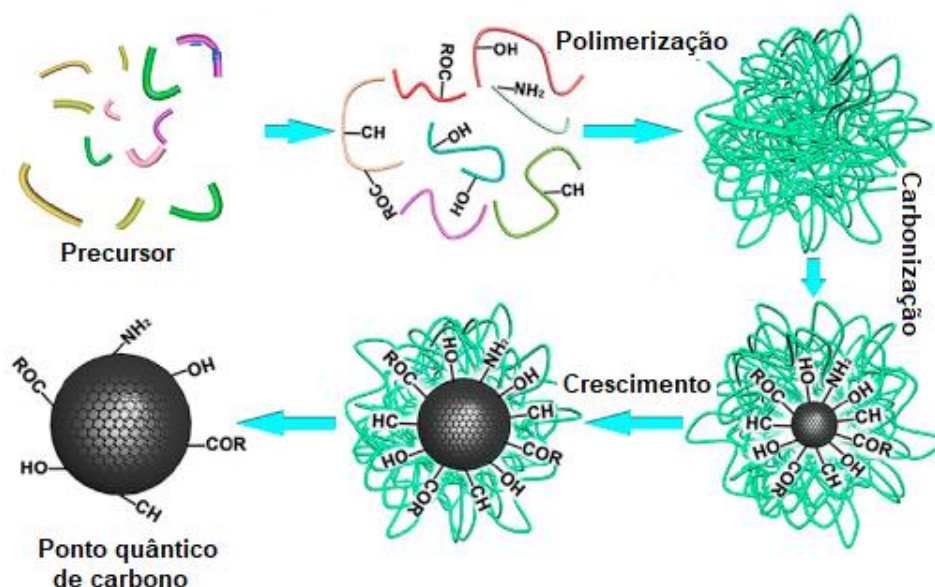
óxido de grafite. Os métodos de síntese podem ser químicos ou físicos, tais como, ablação a laser, síntese eletroquímica, descarga de arco voltaico e tratamento com plasma (SHARON, M; MEWADA, 2018; OZYURT *et al.*, 2023; YUE *et al.*, 2023). Já na abordagem *bottom-up*, os PQC's são sintetizados a partir de moléculas orgânicas ou poliméricas (glicose, ácido cítrico, ácido ascórbico, proteínas, etc), por meio de reações químicas de carbonização ou polimerização (ZHU *et al.*, 2015). Os métodos de síntese utilizados nesta abordagem são: tratamento hidrotérmico ou solvotérmico, sonoquímica, irradiação de microondas, entre outros (MACHADO *et al.*, 2015; RANJAN *et al.*, 2022; OZYURT *et al.*, 2023).

Entre os métodos da abordagem *bottom-up* mais comumente utilizados nos trabalhos científicos sobre síntese de pontos quânticos de carbono é o tratamento hidrotérmico, devido a sua simplicidade e baixo custo (OZYURT *et al.*, 2023). Nessa metodologia, é adicionado água e o precursor de carbono em um reator de Teflon® revestido com uma camada espessa de aço inox. Após o sistema ser lacrado, ele é aquecido entre 100 a 200°C, nestas condições vapores são gerados ocasionando uma elevação da pressão interna de até 33 bar (MELVIN NG; LIM; LEO, 2021). O tempo de duração da síntese é decidida pela mudança de coloração da solução reacional, geralmente utiliza-se um tempo de reação de 4h a 12h, ou até a suspensão de PQC's apresentar uma coloração amarelada, alaranjada ou amarronzada (LIU *et al.*, 2019; MELVIN NG; LIM; LEO, 2021; OZYURT *et al.*, 2023). Geralmente, é necessário realizar um estudo para otimização da temperatura e tempo de reação a fim de obter de PQC's com intensa emissão de fluorescência (OZYURT *et al.*, 2023).

O mecanismo de formação dos pontos quânticos de carbono ainda não foi elucidado, devido a complexidade da reação, porém considera-se que o processo geral é composto por três estágios principais: polimerização, nucleação e passivação (RANJAN *et al.*, 2022; OZYURT *et al.*, 2023). Na primeira etapa ocorre o processo de polimerização do precursor de carbono, formado pequenos fragmentos poliméricos contendo carbono, os quais são carbonizados na etapa seguinte, levando a formação de núcleos cristalinos, que crescem gradualmente (Figura 61). Por último, os grupos funcionais residuais provenientes do precursor migram para a superfície do núcleo formando uma camada amorfa, que pode conferir ao PQC's propriedades ópticas exclusivas e boa solubilidade em água (RANJAN *et al.*, 2022). Após a síntese, é necessário realizar a purificação dos PQC's obtidos a fim de descartar as partículas

grandes e aglomeradas. Geralmente, é feita uma centrifugação, seguida de uma filtração por membrana ou diálise para remoção das impurezas (MELVIN NG; LIM; LEO, 2021).

Figura 61. Representação esquemática do mecanismo de formação de pontos quânticos de carbono pelo processo hidrotérmico.

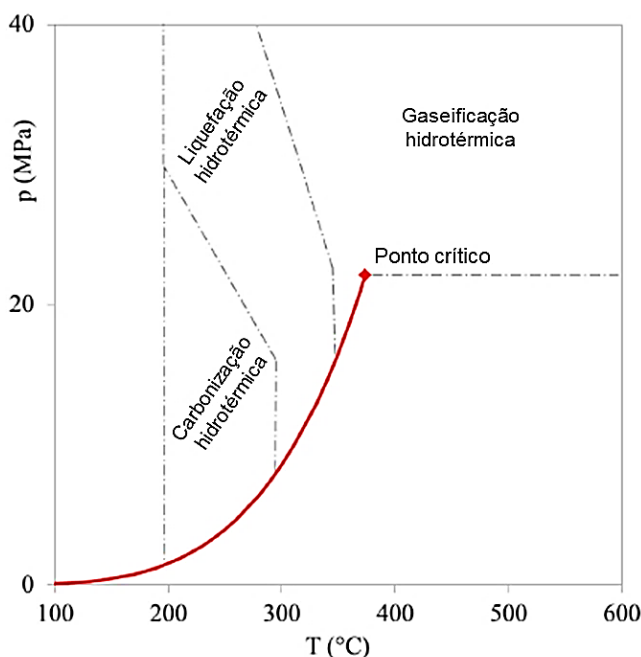


Fonte: Adaptado de Wang e Lu, 2022.

Na síntese hidrotérmica de pontos quânticos de carbono, a reação crucial é a reação de carbonização. Segundo Suwelack (2016), a água atua como um solvente e também como um reagente no processo de carbonização, e por esta razão a temperatura de síntese deve ser mantida na curva de pressão de vapor (estado de equilíbrio líquido-vapor) para garantir que a água permaneça no estado líquido durante todo o processo. Na Figura 62 é mostrada a curva de pressão de vapor da água, onde é possível observar que existe uma faixa de temperatura e pressão específica na curva de pressão de vapor da água, a qual corresponde a condição ideal de síntese de PQC's por carbonização hidrotérmica. De acordo com o gráfico da Fig. 62, esta condição ideal consiste na temperatura de 200°C a 300°C e pressão de 2 a 4 Mpa (SUWELACK, 2016). Mas, como a pressão não é monitorada durante o processo, a pressão autogerada deve ser controlada através da temperatura da reação que corresponde à pressão de vapor saturada da água (DUTTA, 2015). Nestas condições, a água torna-se mais reativa, devido ao elevado produto iônico, ou seja, elevada concentração das espécies iônicas

H⁺ e OH⁻ no meio reacional provenientes da auto-ionização da água. Estas espécies participam das reações de hidrólise, atuando na desprotonação e ataque nucleofílico de carbonilas, por exemplo (HASAN *et al.*, 2021).

Figura 62. Curva de pressão de vapor da água e condições de reações de diferentes conversões hidrotérmicas.

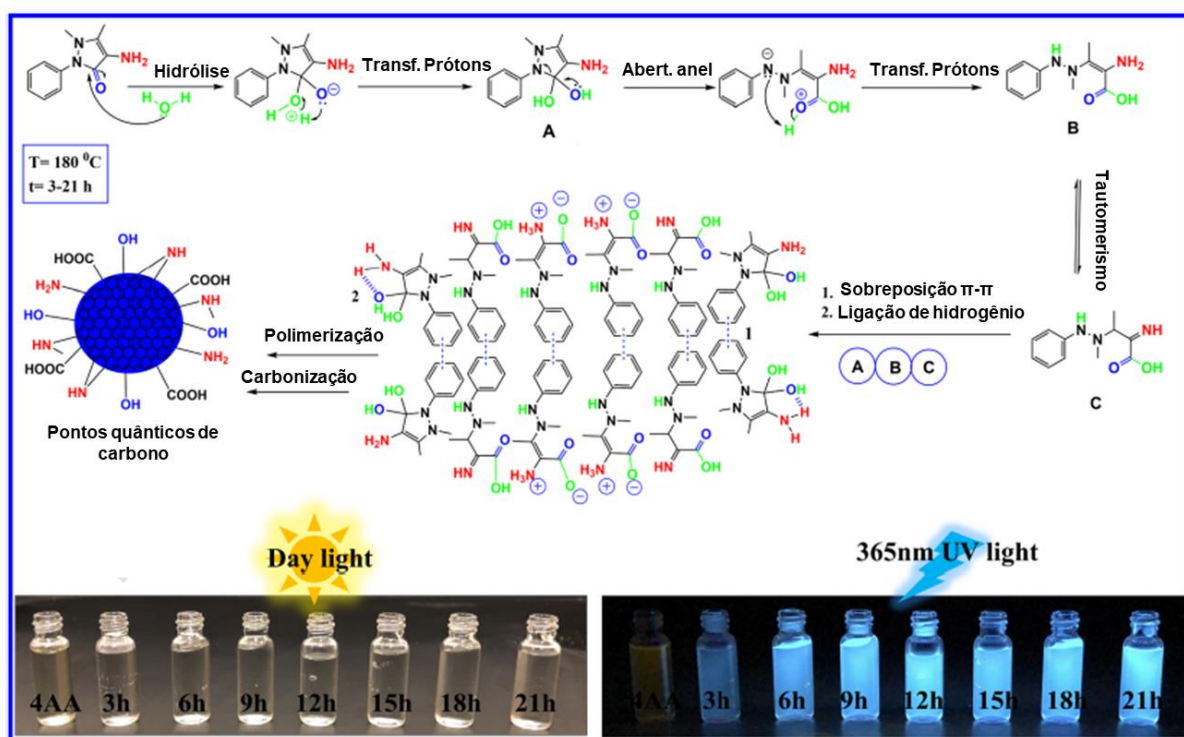


Fonte: Suwelack, 2016.

Mohammed e colaboradores (2023) propuseram um mecanismo de formação de pontos quânticos de carbono usando o método hidrotérmico. Para melhor compreensão da rota de síntese foi utilizado uma substância pura 4-aminoantipirina como precursor. Neste mecanismo destaca-se a função da molécula da água como solvente e reagente da reação hidrotérmica. Na Figura 63 encontra-se o esquema do referido mecanismo de formação dos PQC's a partir da molécula 4-aminoantipirina. Segundo os autores, na etapa inicial, o grupo carbonila da 4-aminoantipirina é atacado pelo par de elétrons isolados dos átomos de oxigênio na molécula de água, atuando assim como um nucleófilo. Em seguida, ocorre a transferência de um átomo de hidrogênio neutralizando a carga negativa do átomo do oxigênio da carbonila, formando por sua vez o intermediário diol geminal (composto A). Na próxima etapa, devido a instabilidade do diol geminal, o anel pirazol se abre, seguido de uma transferência de prótons para produzir uma enamina com ácido carboxílico (composto B). Por sua vez, o composto B

sofre tautomerismo ceto–enol para formar imina com ácido carboxílico (composto C). Por fim, devido à presença do anel aromático do benzeno na estrutura dos compostos A, B e C, a estrutura do núcleo de carbono pode ser formada por meio da sobreposição dos orbitais π e interações de ligação de hidrogênio seguindo de uma sequência de reações de polimerização e carbonização (Mohammed *et al.*, 2023).

Figura 63. Esquema do mecanismo de formação de pontos quânticos de carbono a partir da molécula 4-aminoantipirina proposto por Mohammed e colaboradores.



Fonte: Mohammed *et al.*, 2023.

No processo hidrotérmico, qualquer tipo de fonte de carbono pode ser empregado para produção dos pontos quânticos de carbono (MENG *et al.*, 2019; WAREING; GENTILE; PHAN, 2021). Recentemente, materiais naturais vêm sendo usados como uma alternativa para obtenção de precursores para síntese dos PQC's, tornando a síntese deste nanomateriais sustentável e ecologicamente correta (KANG *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2020). Diversos tipos de biomassa podem ser empregados para a síntese de PQC's tais como, alimentos, resíduos domésticos, plantas e microrganismos. Essas alternativas se destacam pelas vantagens que apresentam em sua produção, se comparadas ao método convencional, que utiliza materiais orgânicos geralmente

tóxicos, como é o caso dos hidrocarbonetos aromáticos. (DIAS *et al.*, 2019; KANG *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2020; MEWADA *et al.*, 2013; HUA *et al.*, 2017).

Em suas vantagens, vê-se que a biomassa é mais segura, de baixo custo e de ampla disponibilidade, sendo esta renovável e sustentável. A presença de heteroátomos (N, O, P, S, etc) em sua composição faz da biomassa uma excelente opção no que diz respeito à matéria-prima para produção de PQC's, ao passo que os estes nanomateriais produzidos a partir de fontes de carbono sintético necessitam de uma etapa específica de adição de heteroátomos para tornar as nanoestruturas de carbono fluorescentes (MENG *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2019). Tal presença implica em economia de energia, redução do tempo de síntese e diminuição da geração de resíduos, características estas que se encontram em conformidade com os princípios da Química Verde. Como consequência, a produção de PQC's a partir de biomassa possibilita a conversão de um resíduo de baixo valor em materiais valiosos e úteis (LIU *et al.*, 2019).

Recentemente, tem-se utilizado microrganismos como fonte de carbono para o preparo de pontos quânticos de carbono devido à facilidade de obtenção da biomassa e a sua abundância (THANGARAJ *et al.*, 2021). Os microrganismos incluindo bactérias, algas e fungos são considerados uma biomassa apropriada, já que os mesmos são constituídos basicamente por água, proteínas, lipídeos e polissacarídeos em menores quantidades. Essa composição rica em carbono e heteroátomos contribui para a formação de PQC's com excelentes propriedades luminescentes (CHAHAL *et al.*, 2021; DINÇ; KARA; YAVUZ, 2022). No que diz respeito aos fungos, há poucos trabalhos publicados que utiliza este microrganismo como biomassa para produção de PQC's. Dentre as classes de fungos mais empregadas na síntese de PQC's encontradas na literatura estão as leveduras (quatro artigos científicos) e os cogumelos (dez artigos) (YANG *et al.*, 2017; JI *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2021).

Porém, o uso de fungos filamentosos como fonte de carbono para síntese de pontos quânticos ainda não foi constatado na literatura até então. Diante disso, a presente pesquisa de doutorado propõe um método de síntese de PQC's a partir da biomassa obtida por fungos filamentosos da espécie *Phyalomices macrosporus*, a fim de ampliar o uso de biomassa fúngica para o preparo de PQC's com possível potencial de aplicação em diversos campos da ciência e tecnologia.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 OBJETIVO GERAL

Propor uma rota para síntese de pontos quânticos de carbono utilizando fungos filamentosos como precursores, e realizar uma caracterização físico-química preliminar dos produtos de síntese.

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar a biomassa para a produção de pontos quânticos de carbono utilizando fungos filamentosos;
- Sintetizar pontos quânticos de carbono a partir da biomassa fúngica;
- Caracterizar os pontos quânticos de carbono obtidos pela carbonização hidrotérmica da biomassa fúngica.

3.4 PARTE EXPERIMENTAL

3.4.1 SÍNTESE DE PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO A PARTIR DA BIOMASSA FÚNGICA

3.4.1.1 REAGENTES

Para as etapas de cultivo e reativação do fungo, obtenção da biomassa fúngica e síntese dos pontos quânticos de carbono foram utilizadas água purificada (13 $\mu\text{S}/\text{cm}$) pelo o sistema Milli-Q (Millipore Ultra-Pure Water System), dextrose (Synth, $\geq 99,99\%$), ágar em pó bacteriológico puro (Vetec, $\geq 99,99\%$) e batatas inglesas adquiridas em um supermercado local.

3.4.1.2 PROCEDIMENTO

A metodologia proposta para a síntese de pontos quânticos de carbono consistiu em três etapas: 1) Preparação da biomassa fúngica, 2) Processo de síntese hidrotérmico e 3) Separação da mistura reacional obtida. A primeira etapa da síntese consistiu na obtenção da biomassa fúngica por meio do processo de fermentação submersa com o micélio do fungo *P. macrosporus*. Este processo consiste na transformação química do substrato (amido presente no caldo de batata e dextrose) pela ação do microrganismo (ISAZA-PÉREZ *et al.*, 2020).

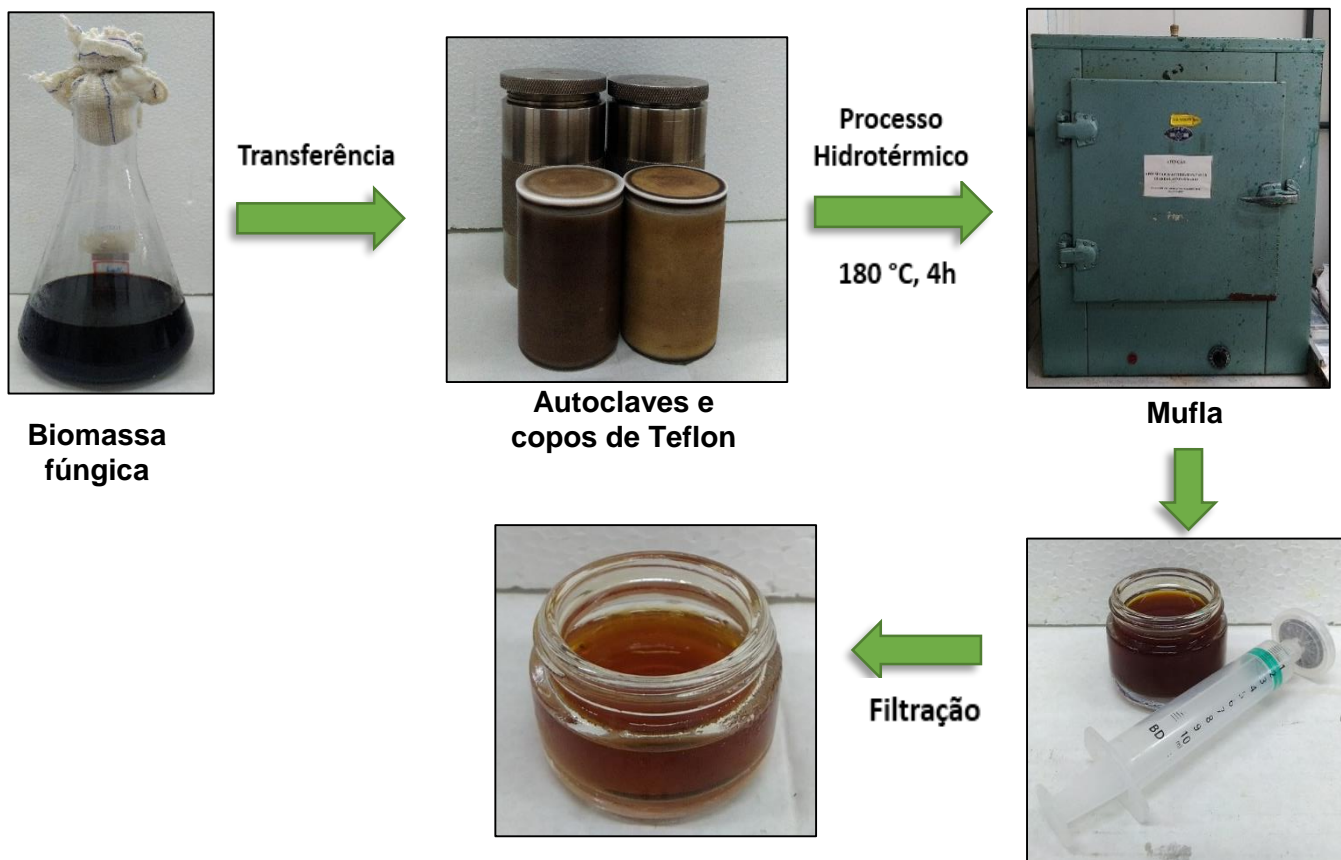
Inicialmente, foi realizado a reativação do fungo filamentoso da espécie *Phialomyces macrosporus*. Este microrganismo foi escolhido como fonte de carbono para a produção de pontos quânticos de carbono no presente trabalho de pesquisa, devido aos seguintes aspectos: fonte de carbono de fácil obtenção, baixo custo e ampla disponibilidade. O cultivo do fungo foi feito por meio da inoculação de um pequeno fragmento do micélio mantido em um frasco de Castellani em uma placa de Petri com 20 mL de meio de cultura (30% caldo de batata, 2% dextrose e 1,5% ágar) durante 7 dias à temperatura de 28°C. Após a reativação do microrganismo, um pequeno fragmento do micélio em torno de 0,5 cm foi retirado da placa de Petri e transferido para

4 frascos de Erlenmeyer contendo 250 mL do meio nutritivo (30% caldo de batata e 2% dextrose). Após o período de incubação de 21 dias à 28°C, os frascos contendo o micélio fúngico e o meio nutritivo fermentado foram levados à autoclave para inativação celular por um período de 40 min e temperatura de 70°C. Por fim, foram produzidos 4 frascos de Erlenmeyer contendo micélio e caldo fermentado esterilizado.

O conteúdo dos frascos de Erlenmeyer (micélio e caldo fermentado) foi reunido em um único recipiente, e adicionado 100 mL de água purificada. Em seguida, foi realizada a trituração do material a 18 000 rpm com auxílio de um triturador (marca: Turratec, modelo: TE-102). O material triturado foi filtrado à vácuo obtendo-se o filtrado e resíduo micelial, sendo que o filtrado foi utilizado como biomassa para síntese dos pontos quânticos de carbono.

Para o preparo dos pontos quânticos de carbono a partir da biomassa fúngica foi utilizado a abordagem *bottom up*, tendo como método de síntese o tratamento hidrotérmico. O método hidrotérmico envolve o uso de água como solvente e a temperatura como o principal agente transformador em um sistema fechado sob pressão gerada pelos vapores desprendidos durante o aquecimento (SONG *et al.*, 2016). Na Figura 64 encontra-se ilustrado o esquema da síntese dos pontos quânticos de carbono derivados de fungos filamentosos. Cerca de 25 mL do filtrado foi transferido para o reator autoclave em aço inoxidável (volume total de 100 mL) o qual foi tampado e lacrado. Em seguida, o reator foi colocado em uma estufa à temperatura de 180°C por um período de 4 h. Após o tempo de reação, o reator foi retirado da estufa e resfriado à temperatura ambiente. O material obtido pelo processo hidrotérmico foi filtrado com auxílio de um filtro de seringa com membrana hidrofílica com poros de 0,22 µm. O material filtrado foi armazenado em frascos de penicilina para posterior caracterização.

Figura 64. Esquema ilustrativo da síntese hidrotérmal de pontos quânticos de carbono a partir da biomassa fúngica.



Fonte: Própria autoria.

3.4.1.3 CARACTERIZAÇÕES DOS PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO

Para a caracterização dos pontos quânticos de carbono produzidos a partir da biomassa fúngica, foram utilizadas as seguintes técnicas:

- Espectroscopia de Absorção na Região do UV-vis

Os espectros de absorção na região do UV-vis das amostras de PQC's produzidos a partir da biomassa fúngica foram obtidos com o espectrofotômetro de absorção da marca Cary, modelo 50 Conc, e cubeta de quartzo de 2 faces polidas com 1 cm de caminho óptico. Não foi necessário a diluição das amostras.

- Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência dos PQCs foram obtidos a partir da utilização de um espectrofluorímetro da marca Varian e modelo Cary Eclipse, empregando uma cubeta de quartzo de 4 faces polidas com 1 cm de caminho óptico.

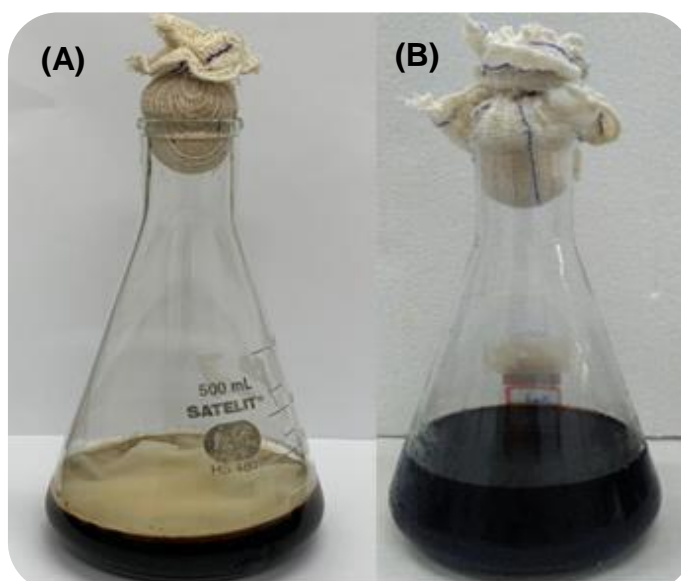
- Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens de microscopia eletrônica dos pontos quânticos de carbono foram obtidas para verificar a morfologia destes nanomateriais. Para realizar esta análise, colocou-se uma alíquota de 10 μ L da amostra sobre grades de cobre de 3 mm de espessura e 200 *mesh*, revestidas com Formvar®, e em seguida as grades foram colocadas para secar em temperatura ambiente. Após a completa secagem das grades, as imagens dos pontos quânticos de carbono foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão com 80 kV de voltagem, marca JEOL, modelo JEM-1230 do laboratório de microscopia da FIOCRUZ – BA.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nanomateriais a base de carbono fluorescentes foram facilmente obtidos via abordagem *bottom up*, utilizando-se o método de síntese hidrotérmico, conforme a metodologia descrita no item 3.4.1.2. Na Figura 65 é mostrada a biomassa obtida a partir do fungo *P. macrosporus* antes (Fig. 65A) e após (Fig. 65B) a filtração. Nota-se que a biomassa fúngica consiste em um líquido de coloração escura. A biomassa fúngica compreende uma mistura complexa formada por metabólitos primários e secundários, componentes da própria célula fúngica (β -glucanas, quitina e glicoproteínas) e moléculas de glicose e água. Por meio da fermentação microbiana do caldo de batata e dextrose, são produzidos diversos tipos de biopolímeros como os metabólitos primários e secundários. Esses metabólitos são substâncias sintetizadas no interior das células fúngicas e posteriormente secretadas pelo fungo durante o seu desenvolvimento (ISAZA-PÉREZ *et al.*, 2020).

Figura 65. Biomassa obtida a partir do fungo filamentososo da espécie *P. macrosporus* antes (A) e após (B) a filtração a vácuo.

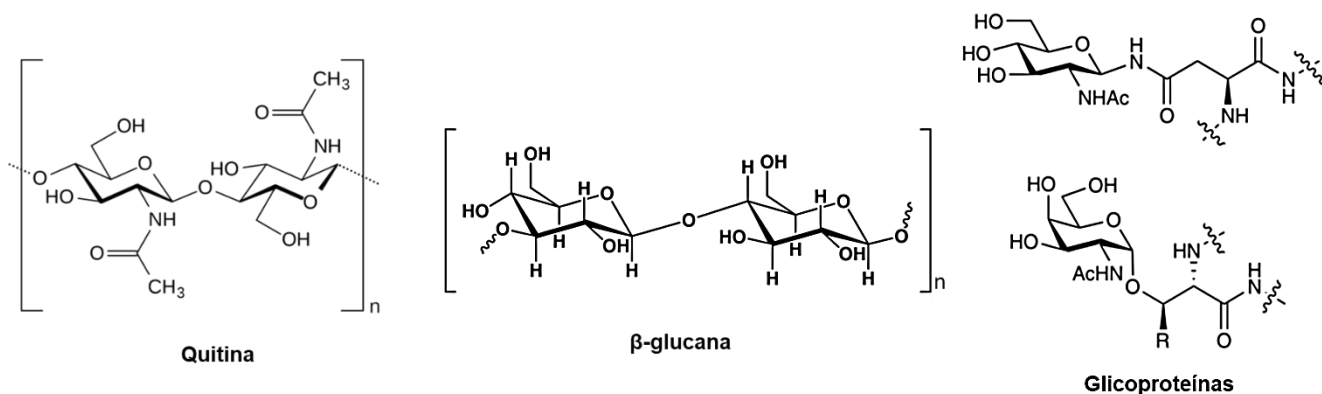


Fonte: Própria autoria.

Dentre os principais metabólitos primários produzidos pelos fungos filamentosos estão: álcoois (etanol), aminoácidos (lisina, treonina, triptofano), nucleotídeos, ácidos orgânicos (ácido acético, fumárico, láctico) polióis (glicerol, manitol, xilitol), polissacarídeos (xantana) e açúcares (frutose, ribose). Já os metabólitos secundários incluem os derivados de aminoácidos, peptídeos, policetídeos e derivados de ácidos graxos (LOPES, 2011).

Além dos produtos da fermentação microbiana, os componentes do micélio fúngico também foram utilizados no preparo da biomassa para a síntese dos PQC's. Como discutido anteriormente no item 2.2.1 do capítulo 2, as células fúngicas são constituídas principalmente por polissacarídeos 50-80% a exemplo das α - e β -glucanas, proteínas 3-20%, quitina 1-20% e lipídeos 1-10% (ISAZA-PÉREZ *et al.*, 2020). Na Figura 67 são mostradas as estruturas químicas dos principais biopolímeros presentes nos fungos filamentosos. Como mostrado na Fig. 66, as macromoléculas β -glucanas, quitina e glicoproteínas apresentam grupos funcionais como -OH, -NH₂, -NHC=O, R'-O-R, os quais podem favorecer na obtenção de PQC's autopassivados, ou seja, PQC's com diferentes grupos funcionais na superfície do núcleo de carbono, os quais contribuem para aperfeiçoar as suas propriedades fotoluminescentes (PARK *et al.*, 2016; WAREING; GENTILE; PHAN, 2021).

Figura 66. Estruturas químicas dos principais componentes presentes nas hifas fúngicas.



Fonte: Adaptado de Rich, 2009 e Costa, 2021.

Na etapa do tratamento hidrotérmico, a biomassa quando submetida ao aquecimento e a pressão, ocorre inicialmente, reações de hidrólise das macromoléculas produzindo moléculas menores, seguida de reações de condensação onde as referidas moléculas orgânicas são transformadas em intermediários poliméricos. Essas unidades poliméricas se agregam através da formação de ligações covalentes e eletrostáticas para formar polímeros, os quais são carbonizados e transformados em nanopartículas de carbono (JORNS; PAPPAS, 2021; BRESSI *et al.*, 2023). Ao fim do tempo de reação, foi obtida uma suspensão de coloração amarrojada com partículas dispersas de coloração escura, as quais foram removidas por filtração, obtendo-se uma suspensão de coloração marrom-amarelada, como mostrado na Figura 67.

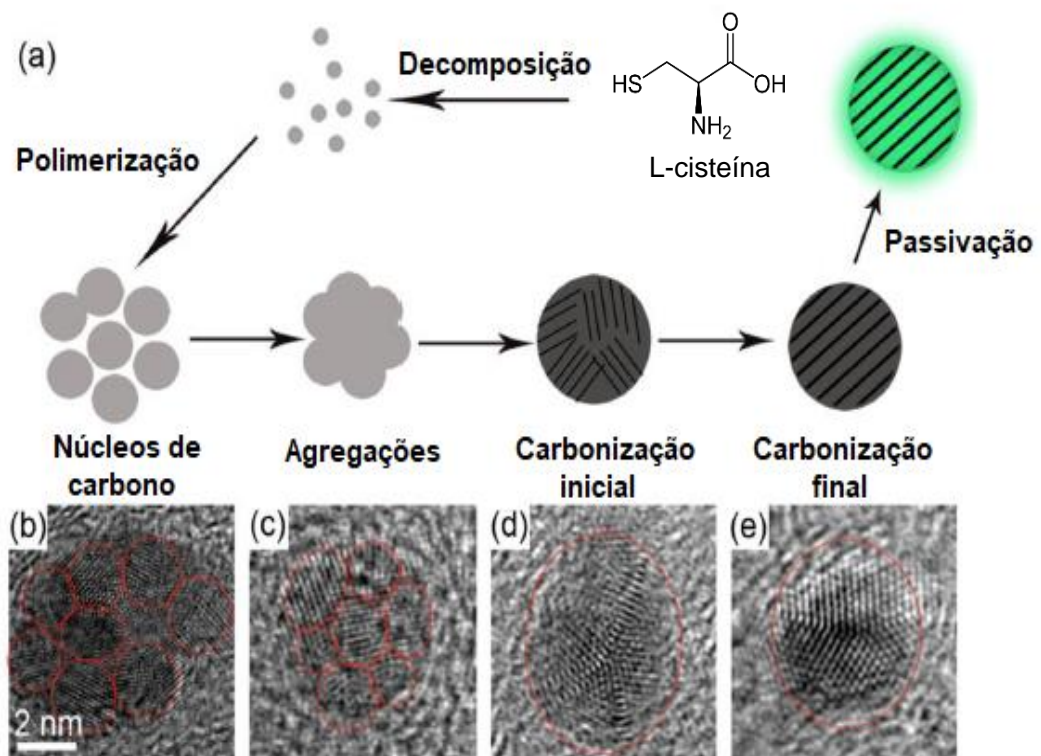
Figura 67. Imagem digital da amostra de pontos quânticos de carbono obtidos a partir do tratamento hidrotérmico da biomassa fúngica.



Fonte: Própria autoria.

Como o material de partida para a síntese de pontos quânticos de carbono consiste em uma mistura complexa de compostos orgânicos, é extremamente difícil compreender o mecanismo de formação dos PQC's pelo método hidrotérmico, onde os processos de carbonização e crescimento do núcleo de carbono ocorrem de forma rápida. Por conseguinte, a compreensão a respeito da formação dos PQC's pelo referido método de síntese é muito limitada. Song e colaboradores (2016) propuseram um mecanismo de formação de pontos quânticos de carbono pela rota sintética hidrotermal utilizando cisteína como precursor. O mecanismo foi desenvolvido a partir da análise de imagens obtidas por MET de alta resolução da mistura reacional em diferentes tempos. Os autores utilizaram a teoria de nucleação de Lamer para explicar as reações envolvidas na síntese dos nanomateriais de carbono (SONG *et al.*, 2016). Na Figura 68 é mostrada um esquema ilustrativo do mecanismo proposto e as respectivas micrografias de MET estudadas.

Figura 68. Esquema ilustrativo de um mecanismo de formação de pontos quânticos de carbono pelo método hidrotérmico proposto por Song e colaboradores.

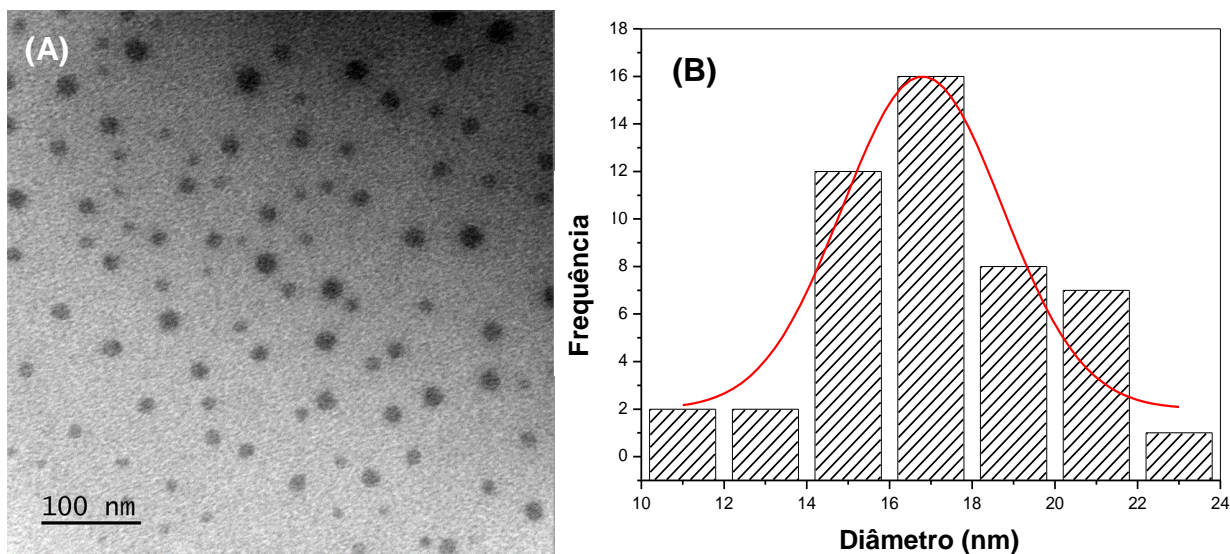


Fonte: Adaptado de Song *et al.*, 2016.

Segundo Song e colaboradores o mecanismo de formação dos pontos quânticos de carbono abrange cinco estágios principais: decomposição, polimerização, agregação, carbonização e passivação. O precursor de carbono é decomposto através de reações de hidrólise, desidratação e descarboxilação, gerando desta forma moléculas menores sob alta temperatura. Posteriormente, essas moléculas são agregadas via polimerização resultando em pequenos núcleos. À medida que os núcleos são produzidos, aumenta-se a concentração dos mesmos no meio reacional até atingir o ponto de supersaturação. A partir deste ponto, os referidos núcleos de carbono coalescem de modo a formar aglomerados, conforme é mostrado na Fig. 68C. Os aglomerados gerados passam por um processo de carbonização, resultando desta forma em nanomateriais de carbono. Geralmente, o último estágio compreende o processo de passivação, onde a superfície dos PQC's é modificada pela inserção de grupos funcionais provenientes da matéria-prima. Esses grupos químicos ligam-se diretamente à superfície dos pontos quânticos de carbono, de modo a torná-las mais luminescentes, melhorando assim suas propriedades ópticas (SONG *et al.*, 2016).

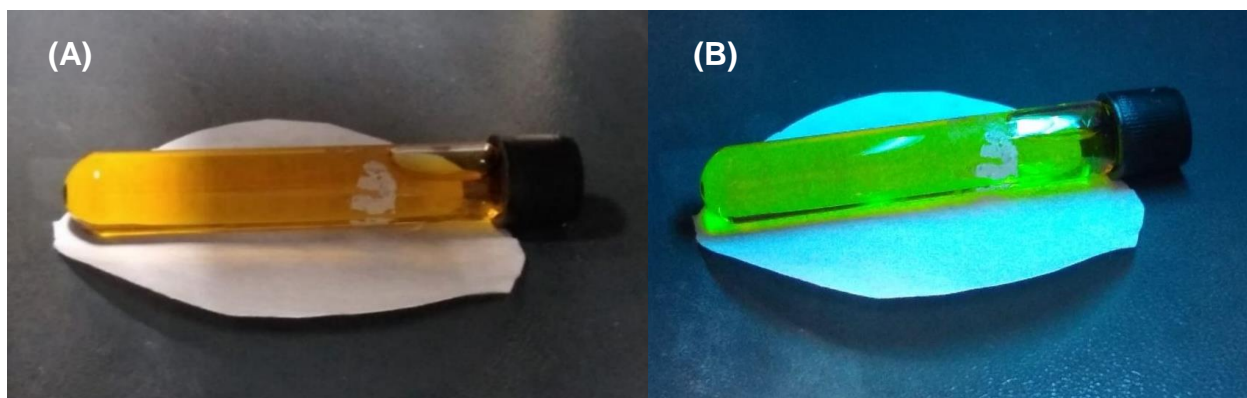
Sabendo da importância do tamanho da partícula sobre as propriedades de fotoluminescência dos pontos quânticos de carbono, foi realizada uma análise das amostras de PQC's derivados do fungo *P. macrosporus* por MET, cuja micrografia é apresentada na Figura 69. Analisando a imagem mostrada na Figura 69A, verifica-se que os pontos quânticos de carbono derivados do fungo Pm apresentam morfologia quase esférica, formato regular e nenhuma aglomeração foi observada. Utilizando-se a referida micrografia, foi construído um gráfico de distribuição do tamanho de partícula com auxílio do programa de processamento e análise de imagens *ImageJ*, o qual é mostrado na Figura 69B. Ao analisar o gráfico da Fig. 69B, observa-se que os PQC's apresentaram uma distribuição de tamanho de partícula na faixa de 10 a 25 nm, e um diâmetro médio em torno de $16,8 \pm 3,9$ nm. Insta esclarecer que, o microscópio utilizado nesta análise possibilitou visualizar apenas nanopartículas de tamanho maiores que 10 nm, devido a baixa resolução do referido equipamento (voltagem de 80 kV). Sabemos que, as nanopartículas de carbono responsáveis pela fluorescência apresentam diâmetro abaixo de 10 nm; e, para visualizá-las é necessário um MET com voltagem de 200 kV.

Figura 69. Micrografia obtida pelo MET (A) e gráfico de distribuição de tamanho de partícula (B) dos pontos quânticos de carbono sintetizados a partir do fungo Pm.



Para a compreensão das propriedades ópticas dos pontos quânticos de carbono sintetizados a partir do tratamento hidrotérmico da biomassa fúngica foram registrados espectros de absorção na região do UV-vis e espectros de fluorescência. A suspensão aquosa obtida na síntese apresentou uma coloração marrom-amarelada sob a incidência de luz visível, e ao ser exposta à radiação ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm, uma forte luminescência na cor verde claro foi observada, como é mostrado na Figura 70. A emissão de luz visível em presença de luz UV evidencia a presença de partículas fluorescentes na referida amostra.

Figura 70. Imagem digital da suspensão de pontos quânticos de carbono sintetizados a partir da biomassa fúngica (a) sob luz visível e (b) radiação UV ($\lambda=254$ nm).

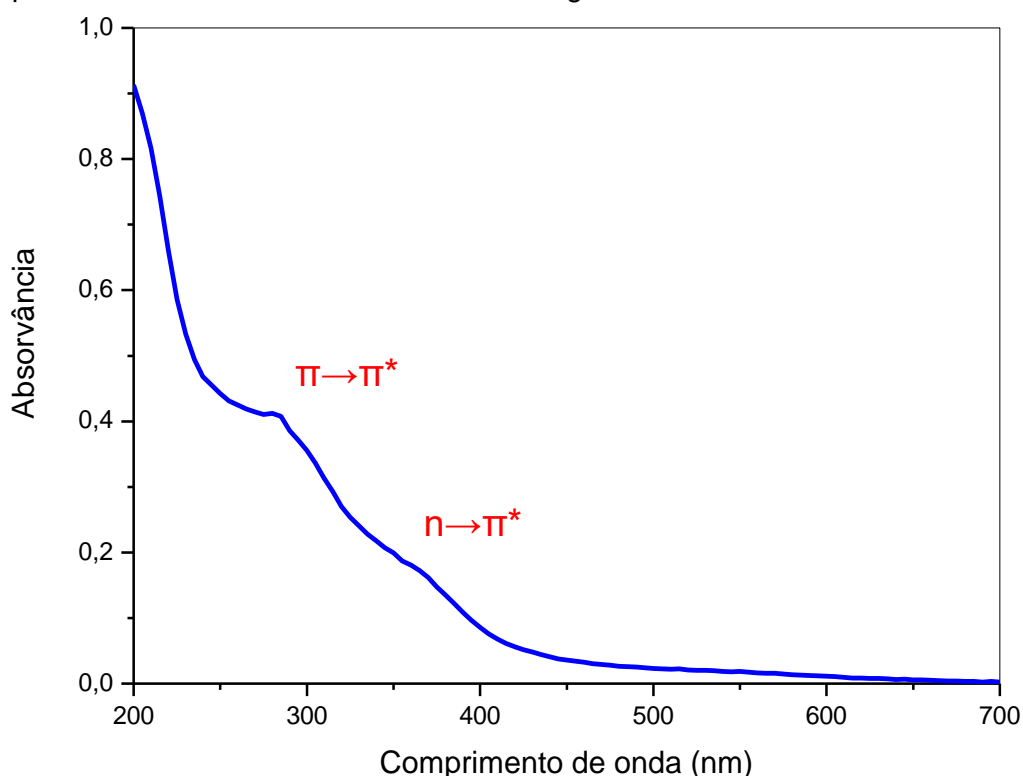


De acordo com a literatura, os pontos quânticos de carbono apresentam absorção

de luz na região ultravioleta (200 – 400 nm), estendendo-se para a faixa do visível (400 – 700 nm) do espectro eletromagnético (VAZ *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2016; SHARON, M; MEWADA, 2018; OZYURT *et al.*, 2023). Como os PQC's são compostos principalmente por elementos de carbono, oxigênio e nitrogênio, suas estruturas eletrônicas assemelham-se com as moléculas orgânicas. Deste modo, assim como as referidas moléculas, as nanopartículas de carbono possuem diversos agrupamentos químicos, que por sua vez podem apresentar vários estados eletrônicos, ou seja, vários orbitais moleculares preenchidos por elétrons em diferentes níveis de energia (PARK *et al.*, 2016).

Espectro de absorção na região do UV e visível da suspensão de pontos quânticos de carbono obtida pelo tratamento hidrotérmico da biomassa fúngica foi obtido, para ter informações a respeito da estrutura eletrônica destes nanomateriais. Na Figura 71 é mostrado o espectro de absorção UV-vis da amostra de PQC's obtidos a partir da biomassa fúngica. As bandas de absorção estão relacionadas com as transições eletrônicas, e conseqüentemente com o tipo de ligações químicas presentes no nanomaterial dependendo do comprimento de onda de máxima absorção (PARK *et al.*, 2016).

Figura 71. Espectro de absorção na região do UV-vis dos pontos quânticos de carbono obtidos pelo método hidrotérmico da biomassa fúngica.



No espectro apresentado na Figura 71, verifica-se a presença de duas bandas de absorção no espectro da amostra de PQC's. A primeira banda de absorção localizada no comprimento de onda de 280 nm corresponde à transição eletrônica do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, a qual pode ser observada na faixa de 200 a 400 nm no espectro de absorção de PQC's (PARK *et al.*, 2016). A transição $\pi \rightarrow \pi^*$ pode ser atribuída às transições nas ligações duplas de carbono (C=C) em compostos aromáticos presentes no núcleo de carbono dos PQC's (OZYURT *et al.*, 2023). Já, a banda de absorção observada na faixa de comprimento de onda de 348 a 400 nm está relacionada com a transição eletrônica do tipo $n \rightarrow \pi^*$, que normalmente é observada na faixa de 400 a 700 nm no espectro de absorção de compostos orgânicos (PARK *et al.*, 2016). Esta transição eletrônica pode ser atribuída aos grupos funcionais contendo átomos com pares de elétrons isolados, como por exemplo os átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre das carbonilas (C=O), aminas (-NH₂), amidas (O=C-NH₂) e tióis (-SH). Quando os referidos grupos funcionais se encontram ligados diretamente aos carbonos sp² aromáticos, podem ocorrer transições dos elétrons n dos grupos funcionais para os estados π^* dos carbonos aromáticos do núcleo dos PQC's (PARK *et al.*, 2016).

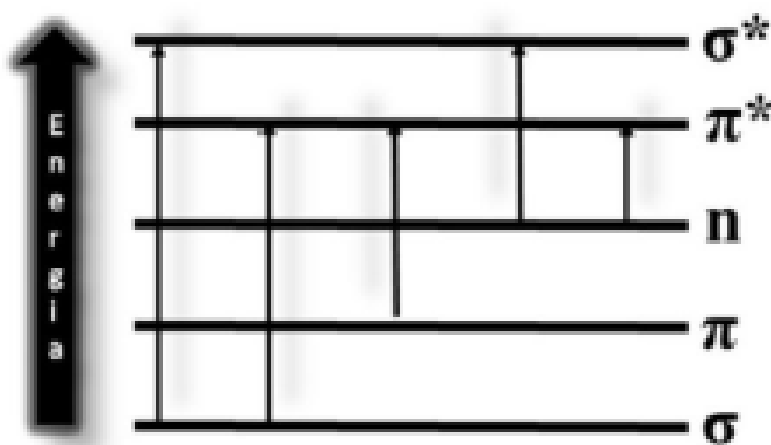
Assim como as moléculas orgânicas, os pontos quânticos de carbono podem apresentar as seguintes transições eletrônicas: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\sigma \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$. Cada tipo de transição corresponde absorção de uma faixa de comprimento de onda na região UV e visível do espectro eletromagnético, que por sua vez está relacionado com o tipo de ligação química presente nos PQC's (VAZ *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2016). Por exemplo, a transição do tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$ envolve a transição de elétrons do orbital molecular sigma ligante σ para o orbital molecular vazio sigma antiligante σ^* , que corresponde absorção de energia no comprimento de onda de 125 nm, o qual está fora do espectro UV-vis. Por outro lado, a transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ envolve a transferência de elétrons do orbital molecular pi ligante π para o orbital molecular vazio pi antiligante π^* , o qual corresponde a absorção de energia no comprimento de onda na faixa de 200 a 400 nm, região UV do espectro eletromagnético (PARK *et al.*, 2016).

Quando um fóton de energia da radiação UV e visível é absorvido pelos pontos quânticos de carbono, ocorre transições eletrônicas entre os diferentes níveis energéticos da nanopartícula, ou seja, elétrons no estado de energia mais baixo (estado fundamental) são promovidos para estado de mais alta energia pela absorção de luz (SKOOG, 2006). Geralmente, a transferência de elétrons ocorre entre o orbital molecular

de mais alta energia (HOMO) e o orbital molecular de mais baixa energia (LUMO). Todavia, este processo somente ocorre quando a radiação incidente possui energia necessária para romper com a barreira energética (*band gap*) que separa o HOMO e o LUMO (VAZ *et al.*, 2015).

Na Figura 72 é apresentado um diagrama com as principais transições eletrônicas em compostos orgânicos, e, por conseguinte em nanopartículas de carbono. De acordo com o diagrama, verifica-se que a energia das transições segue a ordem: $\sigma \rightarrow \sigma^* > n \rightarrow \sigma^* > \pi \rightarrow \pi^* > n \rightarrow \pi^*$. Portanto, as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ requerem menos energia se comparado com as demais, e por esta razão são identificadas na região UV-vis do espectro eletromagnético em análise espectroscópica de amostras de pontos quânticos de carbono (VAZ *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2016).

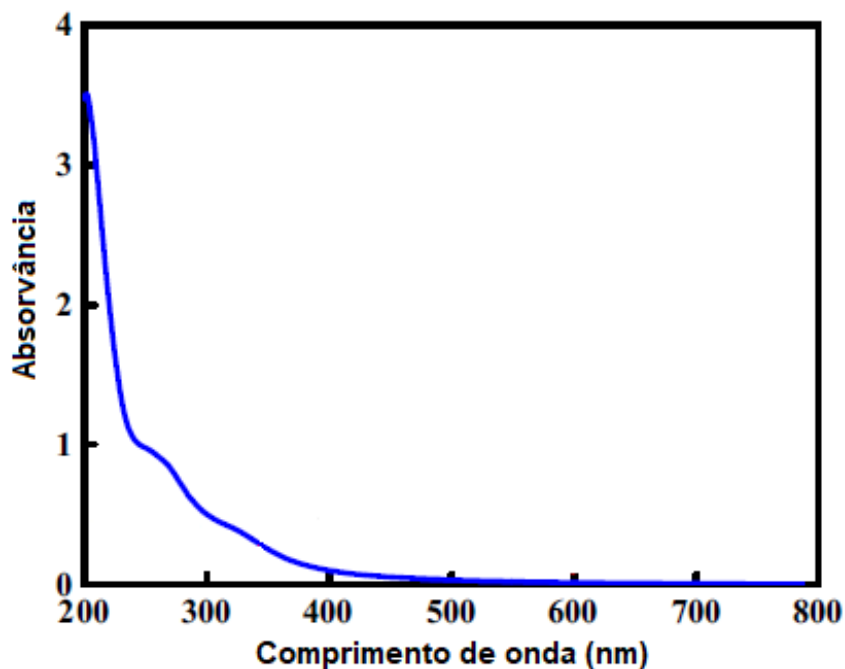
Figura 72. Diagrama de energia com as principais transições eletrônicas envolvidas em compostos orgânicos.



Fonte: Vaz *et al.*, 2015.

Recentemente, Tu e colaboradores (2023) relataram a caracterização das propriedades ópticas de pontos quânticos de carbono sintetizados pelo método hidrotérmico a 200°C por 12 h, utilizando como fonte de carbono o fungo comestível da espécie *Boletus speciosus* (Bs). Na Figura 73 é mostrado o espectro de absorção na região do UV-vis da amostra de PQC's derivados do fungo Bs. Verifica-se que o perfil do referido espectro, assemelha-se muito com o espectro de absorção da amostra de PQC's obtida neste trabalho de doutorado (Fig. 71).

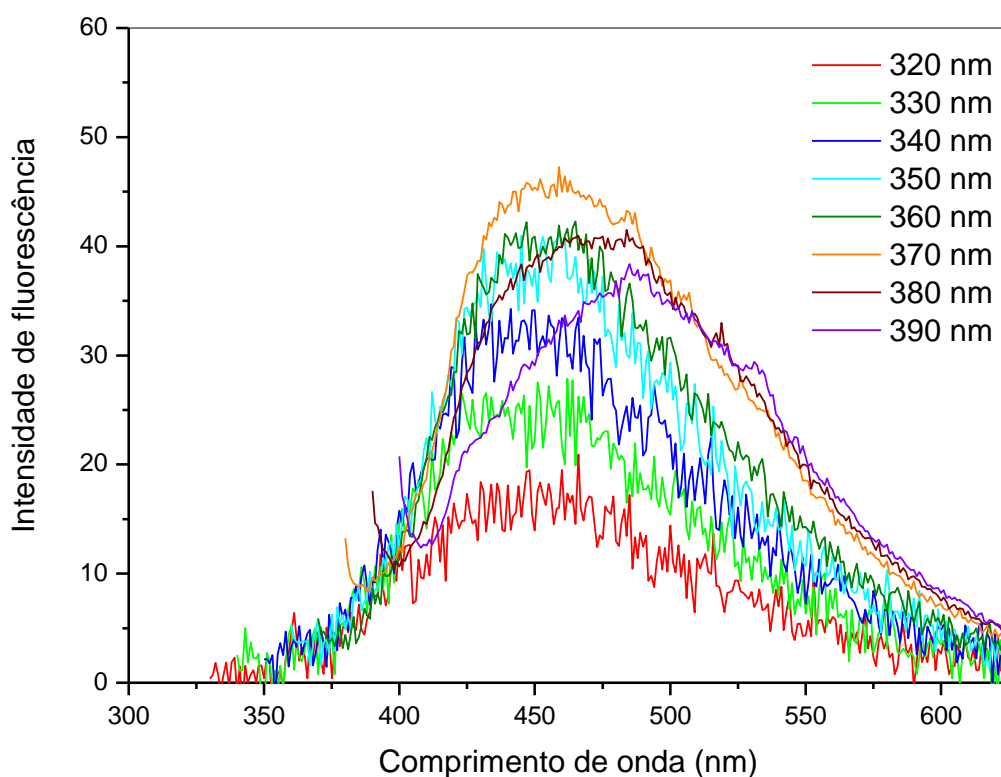
Figura 73. Espectro de absorção na região do UV-vis de pontos quânticos de carbono derivados do fungo *Boletus speciosus* obtido por Tu e colaboradores.



Fonte: TU *et al.*, 2023.

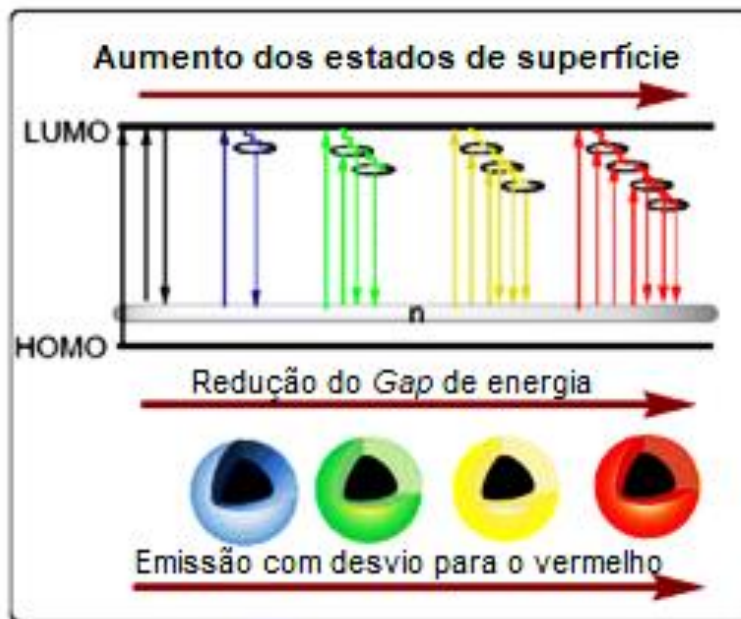
As propriedades fotoluminescentes dos pontos quânticos de carbono derivados de fungos filamentosos foram estudadas através dos espectros de emissão apresentados na Figura 74. A amostra dos referidos PQC's foi excitada em diferentes comprimentos de onda na faixa de 320 a 390 nm, com incrementos de 10 nm. No espectro de emissão da amostra, é possível observar um pico de emissão máxima em 459 nm, quando a amostra é excitada no comprimento de onda de 370 nm. Verifica-se também que a intensidade de fotoluminescência diminui, à medida que aumenta o comprimento de onda de excitação nos valores acima de 370 nm. Além disso, nota-se um deslocamento do pico de emissão para comprimentos de onda maiores, isto é, ocorre um desvio para o vermelho na região do visível do espectro eletromagnético, quando a amostra de PQC's é excitada com comprimento de onda maiores que 370 nm.

Figura 74. Espectros de fluorescência dos pontos quânticos de carbono derivados da biomassa fúngica, com excitação em diferentes comprimentos de onda.



Quando a posição do pico de emissão em um espectro de emissão se desloca com o comprimento de onda de excitação diz-se que a emissão dos pontos quânticos de carbono é dependente do comprimento de onda de excitação, o qual pode estar relacionado com a distribuição ampla de tamanho de partícula e/ou presença de variados grupos químicos na superfície do núcleo dos PQC's (ZHU *et al.*, 2015). Segundo Vaz e colaboradores (2015), a presença de vários tipos de grupos funcionais na superfície dos pontos quânticos de carbono como C-O, C=O e COOH, podem tornar a emissão destes nanomateriais dependente do comprimento de onda de excitação. Este comportamento deve-se à adição de diferentes níveis de energia entre os orbitais HOMO e LUMO, os quais são introduzidos pelos grupos químicos. Os referidos níveis de energias adicionais (estados de superfície) capturam e retêm os elétrons excitados atuando como armadilhas, a partir dos quais ocorre emissão de luz com diferentes comprimentos de onda durante o processo de fluorescência, conforme é mostrado na Figura 75 (VAZ *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2015).

Figura 75. Mecanismo de emissão dos pontos quânticos de carbono induzido pelos estados de superfície.



Fonte: Adaptado de Yan *et al.*, 2019.

Conforme discutido anteriormente, à medida que aumenta o grau de oxidação superficial, ou seja, grupos funcionais contendo átomo de oxigênio na superfície dos pontos quânticos de carbono, diversos estados de superfície são introduzidos na estrutura eletrônica dos PQC's, como é mostrado na ilustração da Figura 75 (BARMAN; PATRA, 2018). Com a adição de novos níveis de energia entre os orbitais HOMO e LUMO, ocorre a redução do *band gap*, de modo que a radiação emitida torna-se cada vez menos energética, de comprimento de onda cada vez mais longos, resultando assim no desvio do pico de emissão para a faixa do vermelho do espectro de absorção (YAN *et al.*, 2019). Diante do resultado, pode-se inferir que provavelmente, os PQC's derivados de biomassa fúngica podem conter diversos grupos funcionais como -C=O, -OH e -COOH na sua superfície, os quais podem contribuir para origem da fotoluminescência das referidas nanopartículas. Para uma melhor compreensão do mecanismo de fluorescência nos PQC's é imprescindível a elucidação dos agrupamentos químicos presentes na superfície dos mesmos por meio das técnicas espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS).

Conceitualmente, o rendimento quântico de fotoluminescência consiste na razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos (OZYURT *et al.*, 2023). O rendimento quântico é considerado um índice da eficiência de emissão de fótons por meio da fluorescência. Os pontos quânticos de carbono que possuem um alto rendimento quântico, apresentam uma forte intensidade de luminescência, ou seja, são mais brilhantes pois emitem uma maior quantidade de fótons. Os fatores que determinam o rendimento quântico dos PQC's são: passivação, dopagem e tamanho da partícula. Tais fatores são diretamente influenciados pelo material precursor e pela rota de síntese dos referidos nanomateriais de carbono (PARK *et al.*, 2016; OZYURT *et al.*, 2023).

A dopagem consiste na introdução de heteroátomos na superfície e/ou na estrutura química do núcleo dos PQC's, como por exemplo nitrogênio, fósforo, enxofre, boro, etc (PARK *et al.*, 2016; OZYURT *et al.*, 2023). Já, a passivação consiste na modificação da superfície dos PQC's durante (auto-passivação) ou após a sua síntese, com o intuito de aprimorar as suas propriedades ópticas. Diferentes tipos de moléculas podem ser empregados na passivação das nanopartículas de carbono, como por exemplo moléculas orgânicas e inorgânicas, polímeros e íons (SUN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017; GENCER, ÇEVEN, ÜNLÜ, 2022).

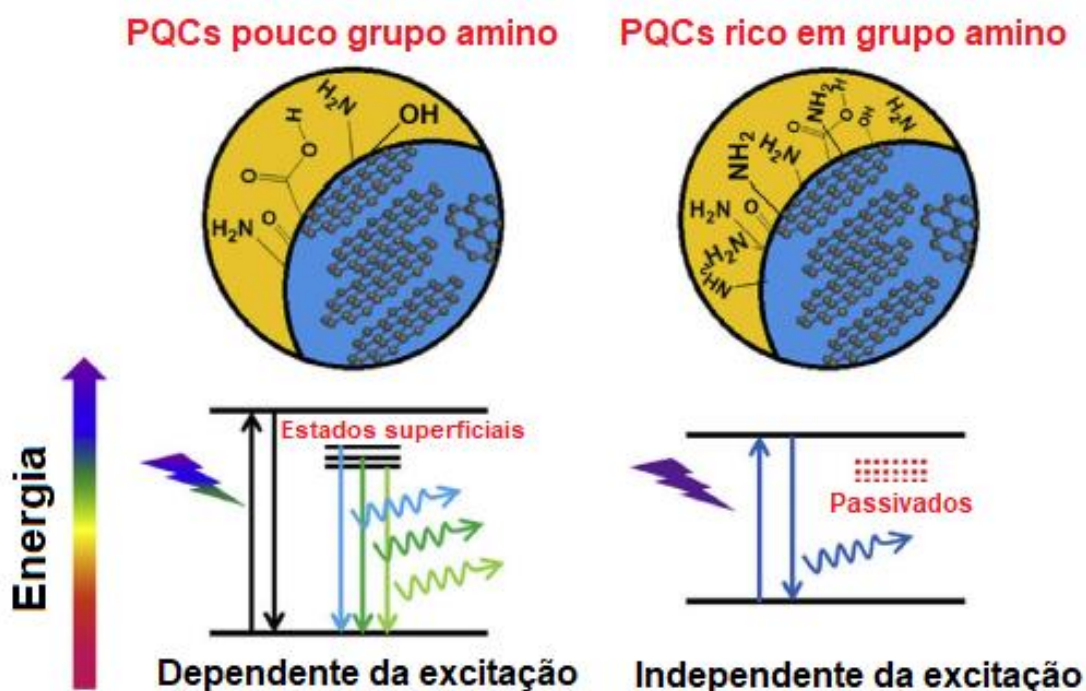
Estudos mostram que, os PQC's sem a sua superfície passivada apresentam rendimento quântico muito baixo, menor que 1 % (SUN *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2015; SHARON, MEWADA, 2018). Como já discutido anteriormente, os estados de superfície gerados pelos grupos funcionais contribuem significativamente para a origem da fotoluminescência dos referidos nanomateriais. Portanto, a passivação é considerada um método de funcionalização indispensável para obtenção de PQC's altamente emissivos (PARK *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2019; OZYURT *et al.*, 2023).

A passivação dos pontos quânticos de carbono também pode ser utilizada para remover os estados de superfície gerados na estrutura eletrônica, devido a presença de diferentes grupos químicos na superfície dos referidos nanomateriais. Como descrito anteriormente, os níveis de energia criados são introduzidos entre o HOMO e o LUMO, de modo a reduzir o intervalo energético entre os referidos orbitais, contribuindo desta forma, na emissão de luz com energia cada vez menor durante o processo de fluorescência (ZHENG *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014; MINTZ, ZHOU, LEBLANC, 2019). No artigo publicado por Li e colaboradores foi relatado um

procedimento de passivação controlada de pontos quânticos de carbono com grupos amino (-NH₂), a fim de avaliar a influência da presença dos grupos químicos na superfície dos PQC's sobre sua fotoluminescência. Os pesquisadores variaram o grau de passivação durante a síntese dos pontos quânticos de carbono pelo método hidrotérmico, utilizando uréia e ácido cítrico como precursores. Durante a reação, a uréia não apenas atuou como fonte de carbono, mas também forneceu grupos amino (-NH₂) para passivação dos PQC's produzidos. O grau de passivação foi controlado variando-se a temperatura de síntese, já que os grupos amino são instáveis e são facilmente eliminados da superfície em altas temperaturas (LI *et al.*, 2014).

Li e colaboradores verificaram que PQC's preparados com menor concentração de grupos amino na superfície exibiram emissão dependente do comprimento de onda de excitação. Por outro lado, os PQC's rico em grupos amino na superfície exibiram emissão independente da excitação, como mostra a Figura 76. No caso dos pontos de carbono contendo poucos grupos amino, a sua cobertura superficial apresentou diferentes grupos funcionais contendo átomo de oxigênio, como C=O, C-O-C, O=C-OH (LI *et al.*, 2014).

Figura 76. Pontos quânticos de carbono obtidos com diferentes graus de passivação por grupo amino (-NH₂).



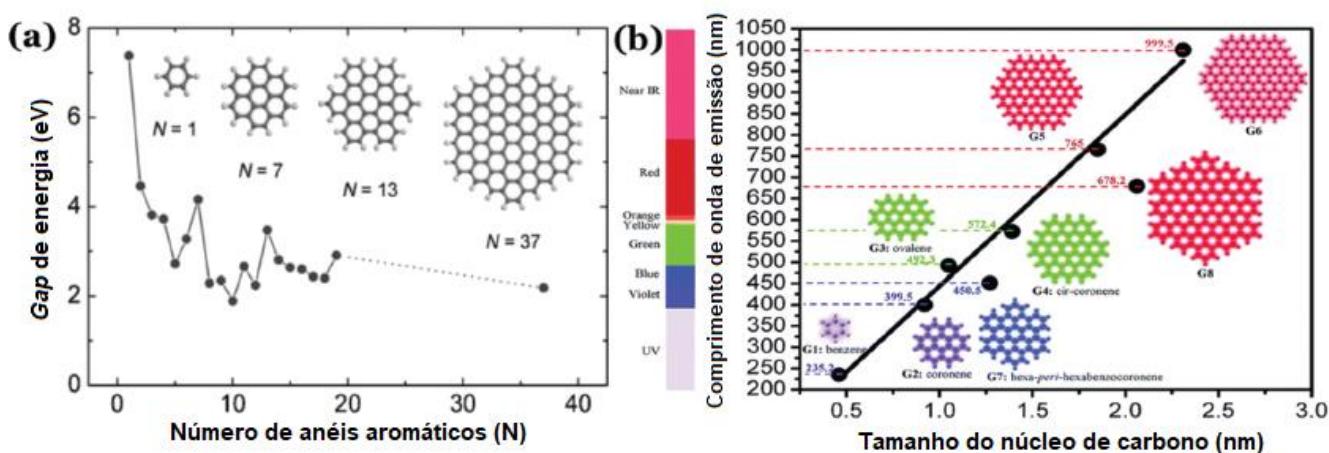
Fonte: Adaptado de Li *et al.*, 2014.

Sabe-se que, os diferentes grupos funcionais superficiais geram diferentes níveis de energia (estados de superfície) na estrutura eletrônica dos PQC's. Esses vários estados de superfície capturam os elétrons excitados durante o processo de decaimento para o estado fundamental; resultando na emissão de luz com diferentes comprimentos de onda, oriundos dos vários estados de superfície de diferentes energias, que por sua vez torna a propriedade de fotoluminescência dos PQC's dependente do comprimento de onda de excitação (LI *et al.*, 2014).

A funcionalização dos pontos quânticos de carbono com grupos amino (-NH₂) durante o processo de síntese sob baixa temperatura, resultou na formação de PQC's com superfície rica em nitrogênio, o que favoreceu para aumento do seu rendimento quântico de 20,8% para 44,7% em relação aos PQC's com menor teor de nitrogênio (LI *et al.*, 2014). Os autores sugerem que essa mudança no rendimento quântico é devido a remoção dos estados de superfície de diferentes energias advindos dos grupos funcionais contendo átomos de oxigênio, os quais promovem a emissão de radiação em diferentes comprimentos de onda (Figura 76). Desta forma, após passivação completa da superfície, os PQC's rico em nitrogênio apresentam apenas um estado de emissão gerado pelo grupo amino, resultando assim na emissão independente do comprimento de onda de excitação. Além disso, átomos de nitrogênio ligados à sistemas aromáticos conjugados tendem a fornecer elétrons por indução para o núcleo de carbono, contribuindo para o aumento da densidade eletrônica no sistema elétrons- π conjugado, que por sua vez favorece as transições eletrônicas, melhorando a sua fotoluminescência (LI *et al.*, 2014).

O gráfico da Fig. 77A mostra uma redução da energia do *band gap* com o aumento do número de anéis aromáticos conjugados, e, por conseguinte com o tamanho da nanopartícula de carbono. Em decorrência do efeito do confinamento quântico, à medida que aumenta o diâmetro da partícula, ocorre uma redução do *band gap*, devido ao acréscimo dos orbitais moleculares π e π^* na estrutura eletrônica em função da quantidade de carbonos com hibridização sp^2 (C=C) adicionados ao sistema π conjugado do núcleo dos PQC's (EDA *et al.*, 2010).

Figura 77. Efeito do tamanho de partícula em relação à fotoluminescência dos PQC. (a) variação do *Gap* de energia em função do número de anéis aromáticos e (b) variação do comprimento de onda de emissão em função do diâmetro dos pontos quânticos de grafeno.



Fonte: Adaptado de Eda *et al.*, 2010 e Sk *et al.*, 2014.

Já, com base no gráfico da Fig. 77B, verifica-se que a redução da energia do *band gap* com o aumento do tamanho da partícula, modifica o comportamento óptico dos pontos quânticos de carbono. Ao analisar o referido gráfico, observa-se que à medida que aumenta o diâmetro da partícula, o máximo de emissão muda para comprimento de onda mais longos, ou seja, desloca-se para faixa do vermelho na região do visível do espectro eletromagnético. Isso sugere que, quanto maior a extensão do domínio dos orbitais π do núcleo de carbono dos PQC, menor será o *band gap*, e, por conseguinte menor será a energia dos fótons emitidos na fluorescência, observado pelo desvio do comprimento de onda de emissão para o vermelho; e resultando assim na redução do seu rendimento quântico (SK *et al.*, 2014).

Logo, entende-se que os pontos quânticos de carbono, cuja fotoluminescência é proveniente do efeito do confinamento quântico, podem ter seu rendimento quântico melhorado pelo controle do tamanho da partícula, já que o confinamento quântico está estritamente relacionado com a extensão do sistema de anéis aromáticos conjugados no núcleo dos PQC (EDA *et al.*, 2010; SK *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2015). O controle do tamanho dos PQC pode ser realizado ajustando-se a temperatura de síntese no caso do método hidrotérmico, a fim de obter nanomateriais de carbono com diâmetro abaixo do seu tamanho crítico (< 10 nm) (YE *et al.*, 2015; SARKAR *et al.*, 2016).

Diante do exposto, conclui-se que a rota sintética, proposta nesta presente tese, foi capaz de produzir de forma inédita pontos quânticos de carbono a partir da biomassa fúngica, com potencial em posterior aplicação em imageamento e sensores químicos.

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste terceiro capítulo da tese foi abordada uma revisão da literatura sobre os pontos quânticos de carbono, abrangendo a sua definição, estrutura química e as vantagens em relação ao *quantum dots* inorgânicos. Além disso, foi apresentada uma abordagem sobre a propriedade fluorescente dos PQC's, descrevendo os fatores que determinam a origem da fotoluminescência destes nanomateriais, a saber: o efeito de confinamento quântico e os estados de superfície. Foi discutido também como o tamanho da partícula e a composição química da superfície dos PQC's influenciam diretamente nas suas propriedades ópticas, que por sua vez são influenciadas pela metodologia de síntese e o tipo de matéria-prima empregada na sua produção.

Uma abordagem geral sobre os métodos de síntese mais utilizados no preparo dos PQC's foi apresentada, dando ênfase no tratamento hidrotérmico, metodologia esta empregada na presente pesquisa de doutorado. Foi descrito uma proposta de mecanismo de formação de PQC's pela rota sintética hidrotérmica, descrevendo-se as etapas de hidrólise, condensação, polimerização e carbonização. Com relação a matéria-prima, foi mostrado os diferentes tipos de biomassa que podem ser utilizadas como fonte de carbono na síntese hidrotérmica dos referidos nanomateriais. Para mais, foi discutido a utilização de microrganismos como biomassa para o preparo de PQC's, tendo como destaque os fungos filamentosos. Diante disso, foi proposto uma rota de síntese de pontos quânticos de carbono utilizando uma biomassa fúngica produzida a partir do fungo filamentoso *Phialomyces macrosporus*, com o intuito de aplicá-los na fabricação de sensores analíticos e em procedimentos de bio-imagem.

Uma suspensão aquosa de nanomateriais carbonáceo foi obtida pelo método hidrotérmico à 180°C e por 4 h utilizando-se biomassa fúngica como precursor, a qual mostrou-se luminescente sob luz UV. Por causa da limitação do MET, somente foi possível visualizar nanopartículas de carbono com tamanho maiores que 10 nm. O

espectro de absorção na região do UV-vis do referido nanomaterial exibiu duas bandas de absorção de baixa intensidade, em 280 nm e na faixa de 400 a 348 nm, que correspondem as transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente. Estas transições eletrônicas podem está relacionada as transições de anéis aromáticos e de grupos carbonilas (C=O). Para confirmar a presença do grupo carbonila e de outros grupos funcionais nos PQC's é necessário a identificação dos mesmos através das técnicas de caracterização FTIR e XPS.

No que tange à propriedade de fluorescência, os espectros de emissão dos nanomateriais de carbono obtidos a partir da biomassa fúngica exibiu um pico de emissão em 459 nm, sob excitação de 370 nm. Os espectros de fluorescência também mostraram que a emissão dos referidos nanomateriais é dependente do comprimento de onda excitação. Diante disso, pode-se concluir que a rota sintética possibilitou a produção inédita de pontos quânticos de carbono utilizando fungos filamentosos como precursor; e além disso, os referidos nanomateriais apresentam luminescência possivelmente devido aos estados de superfície derivados por grupos funcionais e/ou moléculas orgânicas fluorescentes presentes na superfície dos mesmos.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Nesta tese de doutorado foi discutida a síntese e caracterização de nanomateriais partindo de nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio, bem como sua integração na estrutura de fungos filamentosos para formação inédita de materiais híbridos fungo/NPs-Au@Pd. Além disso, foi demonstrado a viabilidade da produção de pontos quânticos de carbono a partir de fungos filamentosos. Cabe ressaltar, que existem poucos trabalhos publicados a respeito do uso de biomassa fúngica na preparação de nanomateriais de carbono.

Soluções coloidais de nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio foram obtidas por meio de adições controladas do precursor de paládio. A análise do espectro de absorção na região UV-visível mostrou uma mudança significativa no comportamento óptico das nanopartículas de ouro com o aumento da adição de íons Pd^{2+} . Distribuições de tamanho de partículas por DLS mostraram que houve um acréscimo

no diâmetro das nanopartículas de ouro à medida que aumenta a concentração de íons Pd²⁺ adicionadas durante a síntese das nanopartículas bimetálicas.

Bio-híbridos constituídos de NPs-Au@Pd e fungos filamentosos foram obtidos pela deposição das referidas nanopartículas metálicas na parede celular do fungo da espécie *P. macrosporus*. Apesar do metal paládio ser nocivo ao microrganismo, foi possível obter células fúngicas funcionalizadas com NPs-Au@Pd preparadas com 50% (m/m) de metal Pd. As imagens de MEV mostraram a formação de uma cobertura metálica por toda a extensão da hifa e a preservação da sua característica microtubular mesmo após a deposição das nanopartículas de ouro e de ouro/paládio. Além disso, constatou-se que as características dos materiais híbridos como rugosidade varia conforme o tipo do metal presente nas nanopartículas empregadas na funcionalização das células fúngicas.

Micrografias do MET revelaram a distribuição das nanopartículas em sua maior parte na região mais externa da parede celular do fungo devido a presença de uma rede gelatinosa formada por macromoléculas que permite a interação e fixação das nanopartículas bimetálicas. Além disso, análise das imagens de MET evidenciou a existência de regiões das hifas do fungo com maior concentração de nanopartículas bimetálicas devido à maior atividade biológica na região apical e o intenso fluxo de enzimas e macromoléculas durante o desenvolvimento do microrganismo. Foi proposto uma metodologia de síntese de pontos quânticos de carbono utilizando biomassa fúngica como fonte de carbono. Por meio desta rota sintética, foi obtido nanopartículas de carbono fluorescentes.

5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

a) Síntese e caracterização de nanopartículas bimetálicas para integração em fungos filamentosos:

- Avaliar a estabilidade das suspensões de nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio ($\text{Au}_{\text{núcleo}} \text{Pd}_{\text{casca}}$) com diferentes concentrações de paládio por meio de medidas de potencial zeta;
- Avaliar o efeito do pH sobre a carga superficial das NPs-Au@Pd com diferentes concentrações do metal Pd na camada externa através da medida dos seus respectivos potenciais zeta;
- Realizar um estudo morfológico mais detalhado das nanopartículas bimetálicas por meio da microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, a fim de confirmar a formação da estrutura núcleo-casca nas nanopartículas e determinar a espessura da camada externa de paládio;
- Investigar o estado de oxidação do ouro e do paládio presentes na superfície das nanopartículas bimetálicas por meio da técnica de XPS, bem como determinar a proporção destes metais;
- Sintetizar diferentes nanopartículas bimetálicas do tipo núcleo-casca, variando-se o elemento metálico a ser depositado sobre a superfície das NPs-Au.

b) Fungos filamentosos como suporte biológico para produção de materiais híbridos:

- Avaliar a biotoxicidade das NPs-Au@Pd com diferentes concentrações do metal Pd em relação ao fungo *P. macrosporus*;
- Preparar materiais híbridos através da deposição de NPs-Au@Pd sobre as células de diferentes espécies de fungos filamentosos;
- Realizar testes catalíticos com os bio-híbridos constituídos por fungo Pm e NPs-Au@Pd em reação de redução do *p*-nitrofenal;

- Preparar materiais híbridos com diferentes nanopartículas bimetálicas de Au_{core} e X_{shell} (X=, Pt, Ag, Ni, etc) usando o fungo *P. macrosporus* como suporte biológico.

c) Uso de fungos filamentosos como precursor para produção de pontos quânticos de carbono:

- Otimizar os parâmetros de síntese hidrotérmica (volume do solvente e da biomassa, tempo e temperatura de reação) para obtenção de pontos quânticos de carbono auto-passivados;
- Investigar a presença de grupos funcionais sobre a superfície dos pontos quânticos de carbono através das técnicas de FTIR e XPS;
- Avaliar se a estrutura dos PQC's é cristalina ou amorfa por meio das técnicas de espectroscopia Raman e difração de raios X (DRX);
- Calcular o rendimento quântico de fluorescência dos PQC's;
- Realizar testes catalíticos com os PQC's em reações fotocatalíticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K. A. et al. The recent advances in the nanotechnology and its applications in food processing: a review. **Journal Food Agric Environ**, v. 7, n. 3-4, p. 14-17, 2009.

ADAMS, C. P. et al. Size-dependent antimicrobial effects of novel palladium nanoparticles, **PLOS One**, vol. 9, n. 1, 2014.

AL-NEMRAWI, N. K.; ABUALSAMEN, M. M.; ALZOUBI, K. H. Awareness about nanotechnology and its applications in drug industry among pharmacy students. **Currents in Pharmacy Teaching and Learning**, v. 12, n. 3, p. 274-280, 2020.

AMENDOLA, V. et al. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. **Journal of Physics Condensed Matter**, v. 29, n. 20, 2017.

ANGELOPOULOU, P.; GIAOURIS, E.; GARDIKIS, K. Applications and prospects of nanotechnology in food and cosmetics preservation. **Nanomaterials**, v. 12, n. 7, p. 1196, 2022.

ATHIE-GARCÍA, M. S. et al. Cell wall damage and oxidative stress in *Candida albicans* ATCC10231 and *Aspergillus niger* caused by palladium nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, v. 48, p. 111–120, 2018.

BARMAN, M. K.; PATRA, A. Current status and prospects on chemical structure driven photoluminescence behaviour of carbon dots. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 37, p. 1–22, 2018.

BHATT, M. et al. Water-Dispersible Fluorescent Carbon Dots as Bioimaging Agents and Probes for Hg²⁺ and Cu²⁺ Ions. **ACS Applied Nano Materials**, v. 3, n. 7, p. 7096–7104, 2020.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not. **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

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.

BIGALL, N. C.; EYCHMÜLLER, A. Synthesis of noble metal nanoparticles and their non-ordered superstructures, **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 368, n. 1915, p. 1385–1404, 2010.

BISPO, V. M. B. M. **Funcionalização de células fúngicas com nanopartículas metálicas para o desenvolvimento de eletrodos de alta área superficial e substratos ativos ao Espalhamento Raman Intensificado por Superfície**. 2022,

p. 175, (Tese de doutorado). Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador- Bahia-Brasil.

BORGNE, L. et al. Cell wall dynamics stabilize tip growth in a filamentous fungus. **PLOS Biology**, p. 1–26, 2023.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799–808, 2006.

BRESSI, V. et al. Recent advances in the synthesis of carbon dots from renewable biomass by high-efficient hydrothermal and microwave green approaches. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 40, p. 100742, 2023.

BROWN, K. R.; FOX, A. P.; NATAN, M. J. Morphology-dependent electrochemistry of cytochrome c at Au colloid-modified SnO₂ electrodes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 5, p. 1154-1157, 1996.

BROWN, T et al. **Química: A ciência central**. Ed.13, Pearson Education do Brasil, São Paulo, 2016.

CHATTERJEE, K. et al. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. **Advances in colloid and interface science**, v. 209, p. 8-39, 2014.

CHAUDHURI, R. G.; PARIA, S. Core / Shell Nanoparticles : Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 2373–2433, 2012.

CHEN, M. et al. The promotional effect of gold in catalysis by palladium-gold. **Science**, v. 310, p. 291–293, 2005.

CRUZ, D. A. et al. Metallic nanoparticles and surface plasmons: a deep relationship. **Avances en Ciencias e Ingeniería**, v. 3, n. 2, p. 67-78, 2012.

CUENYA, B. R. Synthesis and catalytic properties of metal nanoparticles: Size, shape, support, composition, and oxidation state effects. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 12, p. 3127–3150, 2010.

CUI, L. et al. Shaping and Shelling Pt and Pd Nanoparticles for Ultraviolet Laser Excited Surface-Enhanced Raman Scattering. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 45, p. 17618–17624, 2008.

CUI, X. et al. Dual functional N-and S-co-doped carbon dots as the sensor for temperature and Fe³⁺ ions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 242, p. 1272-1280, 2017.

DANIEL, M. C. M.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 293–346, 2004.

DAS, S. K. et al. Single-particle fluorescence intensity fluctuations of carbon nanodots. **Nano Letters**, v. 14, n. 2, p. 620–625, 2014.

DEDAVID, B.A., C.I. GOMES, G. MACHADO. **Microscopia Eletrônica de Varredura. Aplicações e preparação de amostras**. 2007: Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálise (CEMM) do IDEIA-PUCRS.

DE SOUZA, C.; NOGUEIRA, B.; ROSTELATO, M. E. C. M. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 798, p. 714–740, 2019.

DHANJAL, D. S., et al. Mycology-Nanotechnology Interface: Applications in Medicine and Cosmetology. **International Journal of Nanomedicine**, v. 17, p. 2505-2533, 2022.

DIAS, C. et al. Biocompatibility and bioimaging potential of fruit-based carbon dots. **Nanomaterials**, v. 9, n. 2, 2019.

DINÇ, S.; KARA, M.; YAVUZ, E. Synthesis of carbon dots from biomass resources. In: **Carbon Dots in Agricultural Systems**, KHAN, R.; MURALI, S. GOGOI, S. Academic Press, p.69-116, 2022.

DING, H. et al. Full-color light-emitting carbon dots with a surface-state-controlled luminescence mechanism. **ACS Nano**, v. 10, n. 1, p. 484–491, 2016.

DUAN, S.; WANG, R. Review: Bimetallic nanostructures with magnetic and noble metals and their physicochemical applications. **Progress in Natural Science: Materials International**, v.23, n.2, p.113–126, 2013.

EDA, G. et al. Blue photoluminescence from chemically derived graphene oxide. **Advanced Materials**, v. 22, n. 4, p. 505–509, 2010.

ELDER, A. et al., Testing nanomaterials of unknown toxicity: An example based on platinum nanoparticles of different shapes, **Advanced Materials**, vol. 19, no. 20, pp. 3124–3129, 2007.

EL SAYED, M. A. Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes, **Accounts of chemical research**, v.34, n. 4, p. 257 - 264, 2001.

FEOFILOVA, E. P. The fungal cell wall: Modern concepts of its composition and biological function. **Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 711–720, 2010.

FERRANDO, R.; JELLINEK, J.; JOHNSTON, R. L. Nanoalloys: From theory to applications of alloy clusters and nanoparticles, **Chemical Reviews**, v. 108, n. 3, p. 845–910, 2008.

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.

FONTES, A. M. **Bio-híbrido de fungos recobertos com nanopartículas de ouro e paládio (NPs-AuPd) para aplicações na catálise heterogênea**. 2016, p. 149, (Tese de doutorado). Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador- Bahia-Brasil.

FONTES, A. M. et al. Unveiling the Surface and the Ultrastructure of Palladized Fungal Biotemplates. **Langmuir**, v. 37, p. 12961–12971, 2021.

FORTUNA, J. L. Apostila da Disciplina de Biologia dos Fungos. **Teixeira de Freitas: Projeto Fungus Extremus**, UNEB, Campus X. p. 27, 2020.

GAWANDE, M. B. et al. Core–shell nanoparticles: synthesis and applications in catalysis and electrocatalysis, **The Royal Society of Chemistry**, v. 44, p. 7540-7590, 2015.

GENCER, O.; ÇEVEN, Ö.; ÜNLÜ, C. Triggering excitation independent fluorescence in zinc (II) incorporated carbon dots: Surface passivation of carbon dots with zinc (II) ions by microwave assisted synthesis methods. **Diamond and Related Materials**, v. 123, p. 108874, 2022.

GEOGHEGAN, I.; STEINBERG, G.; GURR, S. The Role of the Fungal Cell Wall in the Infection of Plants. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 12, p. 957–967, 2017.

GILROY, K. D. et al. Bimetallic Nanocrystals: Syntheses, Properties, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 116, p. 10414–10472, 2016.

GOW, N. A. R.; LATGE, J.; MUNRO, C. A. The Fungal Cell Wall : Structure , Biosynthesis , and Function. **American Society for Microbiology Press**, n. 5, 2017.

GRISEL, Ruud et al. Catalysis by gold nanoparticles. **Gold Bulletin**, v. 35, p. 39-45, 2002.

GU, S. et al. Kinetic analysis of the catalytic reduction of 4-nitrophenol by metallic nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 32, p. 18618-18625, 2014.

HAN, M. et al. Recent progress on the photocatalysis of carbon dots: Classification, mechanism and applications. **Nano Today**, v. 19, p. 201–218, 2018.

HARPENESS, R.; GEDANKEN, A. Microwave Synthesis of Core-Shell Gold/Palladium Bimetallic Nanoparticles. **Langmuir**, v. 20, n. 8, 2004.

HASAN, M. R. et al. Formation of carbon quantum dots via hydrothermal carbonization: Investigate the effect of precursors. **Energies**, v. 14, n. 4, p. 1–10, 2021.

HIMAJA, A. L.; KARTHIK, P. S.; SINGH, S. P. Carbon Dots: The Newest Member of the Carbon Nanomaterials Family. **Chemical Record**, v. 15, n. 3, p. 595–615, 2015.

HU, J. W. et al. Synthesis of Au@Pd core-shell nanoparticles with controllable size and their application in surface-enhanced Raman spectroscopy. **Chemical Physics Letters**, v. 408, n. 4–6, p. 354–359, 2005.

HUA, Xian-Wu et al. Bacteria-derived fluorescent carbon dots for microbial live/dead differentiation. **Nanoscale**, v. 9, n. 6, p. 2150-2161, 2017.

IAVICOLI, I. et al. In vitro evaluation of the potential toxic effects of palladium nanoparticles on fibroblasts and lung epithelial cells. **Toxicology in vitro**, v. 42, p. 191-199, 2017.

IJIRO, K.; MITOMO, H. Metal nanoarchitecture fabrication using DNA as a biotemplate. **Polymer Journal**, v. 49, n. 12, p. 815–824, 2017.

ISAZA-PÉREZ, F. et al. Potential of residual fungal biomass: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 12, p. 13019–13031, 2020.

ISLAM, T. et al. Metal nanoparticles for electrochemical sensing: Progress and challenges in the clinical transition of point-of-care testing. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5787, 2020.

JAIN, P. K. et al. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. **Plasmonics**, v. 2, n. 3, p. 107–118, 2007.

JIA, X; XU, X; ZHANG, L. Synthesis and Stabilization of Gold Nanoparticles Induced by Denaturation and Renaturation of Triple Helical β -Glucan in Water. **Biomacromolecules**, 14, 6, 1787-1794, 2013.

JI, X. et al. Yeast *Cryptococcus Podzolicus* derived fluorescent carbon dots for multicolour cellular imaging and high selectivity detection of pollutant. **Dyes and Pigments**, v. 182, 2020.

JIANG, W. et al. Carbon Dot- Based Biosensors. **Advanced NanoBiomed Research**, v. 1, n. 6, p. 2000042, 2021.

JORNS, M.; PAPPAS, D. and Chemical Characteristics, and Applications. **Nanomaterials**, v. 11, n. 6, 2021

JUNQUEIRA, J. S. S.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Ouro. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p. 45–46, 2012.

KAMBO, H. S.; DUTTA, A. A comparative review of biochar and hydrochar in terms of production, physico-chemical properties and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 359–378, 2015.

KANG, C. et al. A Review of Carbon Dots Produced from Biomass Wastes. p. 1–24,

2020.

KELLY, K. L. et al. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, p. 668–677, 2003.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles : Properties , applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.

KRYSMANN, M. J. et al. Formation mechanism of carbogenic nanoparticles with dual photoluminescence emission. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 2, p. 747–750, 2012.

KUBO, A. M. et al, Kinetic Control of Microtubule Morphology Obtained by Assembling Gold Nanoparticles on Living Fungal Biotemplates, **Bioconjugate Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 2337–2345, 2016.

KUBO, A. M. et al. Nanostructured assemblies of gold and silver nanoparticles for plasmon enhanced spectroscopy using living biotemplates. **Colloids and Interfaces**, v. 1, n. 1, p. 1–11, 2017.

KUBO, A. M. et al. Heterogeneous microtubules of self-assembled silver and gold nanoparticles using alive biotemplates. **Materials Research**, v. 21, n. 4, p. 1–7, 2018.

LAMER, V. K.; DINEGAR, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, n. 11, p. 4847 – 4854, 1950.

LATGÉ, J. P. Tasting the fungal cell wall. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 863–872, 2010.

LI, H. et al. Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 26, p. 4430–4434, 2010.

LI, X. et al. Engineering surface states of carbon dots to achieve controllable luminescence for solid-luminescent composites and sensitive Be²⁺ detection. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–8, 2014.

LI, Y. et al. Metal-catalyzed cross-coupling reactions. **Choice Reviews Online**, v. 43, n. 01, p. 43- 0331-43–0331, 2005.

LI, W.; CHEN, F. Alloying effect on performances of bimetallic Ag–Au cluster sensitized solar cells. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 632, p. 845-848, 2015.

LI, Z. et al. Living templates for the hierarchical assembly of gold nanoparticles, **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 42, n. 20, p. 2306–2309, 2003

LI, W. et al. Fluorescent paper – based sensor based on carbon dots for detection of

folic acid. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, p. 2805–2813, 2020.

LI, Xi. et al. Metal ions-doped carbon dots: Synthesis, properties, and applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 430, p.133-101, 2022.

LIM, H. et al. Facile synthesis and characterization of carbon quantum dots and photovoltaic applications. v. 660, p. 672–677, 2018.

LIU, F.; WECHSLER, D.; ZHANG, P. Alloy-structure-dependent electronic behavior and surface properties of Au-Pd nanoparticles. **Chemical Physics Letters**, v. 461, n. 4–6, p. 254–259, 2008.

LIU, X.; WANG, D.; LI, Y. Review: Synthesis and catalytic properties of bimetallic nanomaterials with various architectures. **Nano Today**, v. 7, p. 448-466, 2012.

LIU, M. L. et al. Carbon dots: Synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications. **Green Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 449–471, 2019.

LIU, M. Optical Properties of Carbon Dots: A Review. **Nanoarchitectonics**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2020.

LOPES, F. C. **Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos**. 2011, p. 130, (Dissertação de mestrado). Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Univerdidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS-Brasil.

LOZA, K.; HEGGEN, M.; EPPLE, M. Synthesis , Structure , Properties , and Applications of Bimetallic Nanoparticles of Noble Metals. **advanced functional materials**, v. 30, p. 1909260–1909274, 2020.

LU, J. **Cobalt precipitation by reduction with sodium borohydride**.1995, p. 133, (Tese de mestrado). Departamento de engenharia de metais e materiais, Universidade da Columbia Britânica, Vancouver-Canadá.

LU, L. et al. Seed-mediated growth of large, monodisperse core-shell gold-silver nanoparticles with Ag-like optical properties. **Chemical Communications**, v. 2, n. 2, p. 144–145, 2002.

LUO, Q. et al. An ultrasensitive fluorescent sensor for organophosphorus pesticides detection based on RB-Ag/Au bimetallic nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 263, p. 517-523, 2018.

MACHADO, C. E. et al. Carbon quantum dots: Chemical synthesis, properties and applications. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1306–1346, 2015.

MALLIKARJUNA, K. et al. Palladium nanoparticles: single-step plant-mediated green chemical procedure using Piper betle leaves broth and their anti-fungal studies. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v. 4, n. 1, p. 14-18, 2013.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. Zetasizer Nano User Manual: Size theory. **Zetasizer Nano User Manual**, v. MAN0485, n. 11, p. 250, 2013.

MANIOUDAKIS, John et al. Effects of nitrogen-doping on the photophysical properties of carbon dots. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 7, n. 4, p. 853-862, 2019.

MARTA, R. Quantum dots: Harnessing the nanoscopic rainbow. **Chem 13 News Magazine**. University of Waterloo, Waterloo, Ontario. November, 2017. Disponível em: www.uwaterloo.ca/chem13-news-magazine/november-2017/feature/quantum-dots-harnessing-nanosopic-rainbow. Acessado em: Novembro de 2022.

MARTINO, E. et al. Soil Fungal Hyphae Bind and Attack Asbestos Fibers. **Angew. Chem. Int. Ed.**, n. 2, v. 42, p. 219–222, 2003.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.

MCEWAN, Lynsey et al. A review of the use of gold catalysts in selective hydrogenation reactions. **Gold Bulletin**, v. 43, n. 4, 2010.

MELVIN NG, H. K.; LIM, G. K.; LEO, C. P. Comparison between hydrothermal and microwave-assisted synthesis of carbon dots from biowaste and chemical for heavy metal detection: A review. **Microchemical Journal**, v. 165, p.106 -116, 2021.

MEWADA, A. et al. Green synthesis of biocompatible carbon dots using aqueous extract of *Trapa bispinosa* peel. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 5, p. 2914–2917, 2013.

MENG, W. et al. Biomass-Derived Carbon Dots and Their Applications. **Energy and Environmental Materials**, v. 2, n. 3, p. 172–192, 2019.

MELO, C. P. de; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias estratégicas**, n.18, 2004.

MIAO, Shihai et al. Hetero-atom-doped carbon dots: Doping strategies, properties and applications. **Nano Today**, v. 33, p. 100-879, 2020.

MIN, Y.; WANG, Y. Manipulating Bimetallic Nanostructures With Tunable Localized Surface Plasmon Resonance and Their Applications for Sensing. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 1–10, 2020.

MINTZ KJ., ZHOU Y., LEBLANC RM. Recent development of carbon quantum dots regarding their optical properties, photoluminescence mechanism, and core structure. **Nanoscale**, v.11, p.4634–4652, 2019.

MIZUKOSHI, Y. et al. Characterization and Catalytic Activity of Core-Shell Structured Gold/Palladium Bimetallic Nanoparticles Synthesized by the Sonochemical Method.

The Journal of Physical Chemistry B, v. 104, n. 25, 2000.

MOHAMMED, S. J.; OMER, K. M.; HAWAIZ, F. E. Deep insights to explain the mechanism of carbon dot formation at various reaction times using the hydrothermal technique: FT-IR, ¹³C-NMR, ¹H-NMR, and UV-visible spectroscopic approaches. **RSC Advances**, v. 13, n. 21, p. 14340–14349, 2023.

MORAES, Aurea Maria Lage de; PAES, Rodrigo de Almeida; HOLANDA, Verônica Leite de. Capítulo 4 – Micologia. In: **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 4**, Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira (Org.). Rio de Janeiro, EPSJV,IOC, 2009. p. 400 – 496. Disponível em: <https://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/cap4.pdf>. Acesso em: Maio de 2022.

MOORES, A.; GOETTMANN, F. The plasmon band in noble metal nanoparticles: An introduction to theory and applications. **New Journal of Chemistry**, v. 30, n. 8, p. 1121–1132, 2006.

MOURA, C.W.N., RAMOS, G.J.P., SANTOS, M.F. Protocolo de Preparação de Amostras de Desmídias (*Desmidiaceae*, *Zygnematophyceae*) para Estudos Morfológicos por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura. *Hoehnea* 48: e1342020, 2021.

NASROLLAHZADEH, M. et al. Chapter 1 - An Introduction to Nanotechnology. **Interface Science and Technology**, v. 28, p. 1 -27, 2019.

NOSANCHUK, J. D. Fungal Melanin : What do We Know About Structure ? **Frontiers Microbiology**, v. 6, p. 1–7, 2015.

NUTT, M. O.; HUGHES, J. P.; WONG, M. S. Designing Pd-on-Au Bimetallic Nanoparticle Catalysts for Trichloroethene Hydrodechlorination. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 5, p.1346-1353, 2005.

NUTT, M. O. et al. Improved Pd-on-Au bimetallic nanoparticle catalysts for aqueous-phase trichloroethene hydrodechlorination. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 69, n. 1-2, p. 115-125, 2006.

OGAREV, V. A.; RUDOI, V. M.; DEMENT'EVA, O. V. Gold Nanoparticles: Synthesis, Optical Properties, and Application. **Inorganic Materials: Applied Research**, v. 9, n. 1, p. 134–140, 2018.

OZYURT, D. et al. Properties, synthesis, and applications of carbon dots: A review. **Carbon Trends**, v. 12, p. 100276, 2023.

PACIONI, N. L. et al. Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles: A Mechanistic Perspective. **Silver Nanoparticle Applications, Engineering Materials**, 2015.

PAL, U. et al. Nanoparticle-Assembled Gold Microtubes Built on Fungi Templates for SERS-Based Molecular Sensing. **ACS Applied Nano Materials**, v. 2, n. 4, p. 2533–

2541, 2019.

PAPPALARDO, J. et al. Effects of polydopamine-passivation on the optical properties of carbon dots and its potential use in vivo. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 22, n. 29, p. 16595-16605, 2020.

PAŘIL, P. et al., Antifungal effects of copper and silver nanoparticles against white and brown-rot fungi. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 5, p. 2720–2729, 2017.

PARK, Y. et al. Improving the functionality of carbon nanodots: Doping and surface functionalization. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 4, n. 30, p. 11582–11603, 2016.

PENG, B. et al. Applications of nanotechnology in oil and gas industry: Progress and perspective. **The Canadian journal of chemical engineering**, v. 96, n. 1, p. 91-100, 2018.

PRETZER, L. A. et al. Improving gold catalysis of nitroarene reduction with surface Pd. **Catalysis Today**, v. 264, p. 31–36, 2016.

POLTE, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles - a new perspective. **CrystEngComm**, v. 17, n. 36, p. 6809–6830, 2015.

POLTE, J. et al. Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation. **Journal of the American Chemical Society**, n. 4, v. 132, p.1296–1301, 2010.

QIN, K. et al. Applications of hydrothermal synthesis of: Escherichia coli derived carbon dots in in vitro and in vivo imaging and p -nitrophenol detection. **Analyst**, v. 145, n. 1, p. 177–183, 2020.

RABIEE, N. et al. Rosmarinus officinalis directed palladium nanoparticle synthesis: investigation of potential anti-bacterial, anti-fungal and Mizoroki-Heck catalytic activities. **Advanced Powder Technology**, v. 31, n. 4, p. 1402-1411, 2020.

RAMSDEN, J. What is nanotechnology ? **Nanotechnology Perceptions**, v. 1, p. 3–17, 2005.

RANJAN, P. et al. Carbon dots — an overview. In: KHAN, R., MURALI, S., GOGOI, S. **Carbon Dots in Agricultural Systems: Strategies to enhance plant productivity**, Academic Press, p. 1–19, 2022.

REDONDO-FERNANDEZ, G. et al. Functionalized heteroatom-doped carbon dots for biomedical applications: A review. **Analytica Chimica Acta**, p. 341-874, 2023.

RIPLEY, R. L.; BHUSHAN, B. **Bioarchitecture: Bioinspired art and architecture-a perspective**. Phil. Trans. R. Soc. A, v. 374, 2016.

RIQUELME, M. Tip growth in filamentous fungi: A road trip to the apex. **Annual**

Review of Microbiology, v. 67, p. 587–609, 2013.

RIQUELME, M. et al. Fungal Morphogenesis , from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. **American Society for Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 1–47, 2018.

RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are different. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 7, p. 583, 2006.

ROLIN, D.B. et al. Structural studies of a phosphocholine substituted beta-(1,3);(1,6) macrocyclic glucan from Bradyrhizobium japonicum USDA 110. **Biochim Biophys Acta**, p. 215-25, 1992.

ROSÁRIO, J. et al. Photoluminescent organisms : how to make fungi glow through biointegration with lanthanide metal-organic frameworks. **Scientific Reports**, v.9, p. 1–10, 2019.

SABAH, A. et al. Growth of templated gold microwires by self organisation of colloids on Aspergillus niger. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 7, n. 2, p. 583–591, 2012.

SALDAN, I. et al. Chemical synthesis and application of palladium nanoparticles. **Journal of Materials Science**, v. 50, n. 6, p. 2337–2354, 2015.

SANTOS, J. F. L. et al. Ressonância de plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1098–1111, 2016.

SARKAR, S. et al. Size dependent photoluminescence property of hydrothermally synthesized crystalline carbon quantum dots. **Journal of Luminescence**, v. 178, p. 314-323, 2016.

SCHWERDTFEGER, P. Relativistic effects in properties of gold. **Heteroatom Chemistry**, v. 13, n. 6., p. 578–584, 2002.

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.

SHARON, M; MEWADA, A. Carbon Dots: Discovery, Synthesis and Characterization. In: **Carbon Dots as Theranostic Agents**. USA: Wiley-Scrivener, p. 1–45, 2018.

SK, M. A. et al. Revealing the tunable photoluminescence properties of graphene quantum dots. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, n. 34, p. 6954–6960, 2014.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

SONG, Z. et al. Multifunctional N,S co-doped carbon quantum dots with pH- and thermo-dependent switchable fluorescent properties and highly selective detection of

glutathione. **Carbon**, v. 104, p. 169–178, 2016.

SRISOMBAT, L. et al. Simple preparation Au/Pd core/shell nanoparticles for 4-nitrophenol reduction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 512, p. 17–25, 2017.

STRASSER, P. et al. Lattice-strain control of the activity in dealloyed core-shell fuel cell catalysts. **Nature Chemistry**, v. 2, p.454–460, 2010.

SUGUNAN, A. et al. Nutrition-driven assembly of colloidal nanoparticles: Growing fungi assemble gold nanoparticles as microwires. **Advanced Materials**, v. 19, n. 1, p. 77–81, 2007.

SUN, Y.-P. Carbon Dots: The Classical Synthesis and Properties. In:**Springer Nature Switzerland AG**, p. 69–107, 2020.

SYKES, J. E.; RANKIN, S. C. Isolation and identification of fungi. **Canine and Feline Infectious Diseases**, p. 29–36, 2013.

STEINBERG, G. et al. Cell Biology of Hyphal Growth. **American Society for Microbiology Press**, p. 1–34, 2017.

SUN, Y. et al. Uniform silver nanowires synthesis by reducing AgNO₃ with ethylene glycol in the presence of seeds and poly(vinyl pyrrolidone). **Chemistry of Materials**, v. 14, p. 4736–4745, 2002.

SUWELACK, K. A unified appraisal framework for the assessment of biorefinery technologies: An approach and first steps to application, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade de Hohenheim, p. 136, 2016.

TAN, H. W. et al. Metallic nanoparticle inks for 3D printing of electronics. **Advanced Electronic Materials**, v. 5, n. 5, p. 1800831, 2019.

TEDSREE, K. et al. Hydrogen production from formic acid decomposition at room temperature using a Ag–Pd core–shell nanocatalyst. **Nature nanotechnology**, v. 6, p. 302 – 307, 2011.

TEIXEIRA, Wanderson SR et al. Nanomateriais Plasmônicos: Parte III: Mecanismos de formação e métodos de síntese. 2021.

THANH, N. T. K.; MACLEAN, N.; MAHIDDINE, S. Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 15, p. 7610–7630, 2014.

TU, Y. et al. Synthesis of Fluorescent Carbon Quantum Dots based on *Boletus speciosus* and Analysis of Metronidazole. **Current Nanoscience**, v. 19, n. 5, p. 715–725, 2023.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and

growth Processes in the synthesis of Colloidal gold. **Disc. Faraday Soc.**, 55, 1951.

TUERHONG, M.; XU, Y.; YIN, X. B. Review on Carbon Dots and Their Applications. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 139–150, 2017.

ULLAH, M. W. et al. Microbes as Structural Templates in Biofabrication: Study of Surface Chemistry and Applications. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 12, p. 11163–11175, 2017.

URZÚA, E. et al. Ag@ Au bimetallic nanoparticles: an easy and highly reproducible synthetic approach for photocatalysis. **Nanoscale Advances**, v. 4, n. 22, p. 4789-4797, 2022.

VAZ, R. et al. Preparação de pontos de carbono e sua caracterização óptica: um experimento para introduzir nanociência na graduação. **Química Nova**, v.38, n. 10, p. 1366-1373, 2015.

WANG, Z. et al. Surface passivation of carbon dots with ethylene glycol and their high-sensitivity to Fe³⁺. **RSC advances**, v. 7, n. 5, p. 2810-2816, 2017.

WANG, B.; LU, S. The light of carbon dots: From mechanism to applications. **Matter**, v. 5, n. 1, p. 110–149, 2022.

WANG, Q. et al. Hollow luminescent carbon dots for drug delivery. **Carbon**, v. 59, p. 192–199, 2013.

WAREING, T. C.; GENTILE, P.; PHAN, A. N. Biomass-Based Carbon Dots : Current Development and Future Perspectives. **ACS Nano**, v. 15, p. 15471–15501, 2021.

WEBSTER, J and WEBER, R. **Introduction to Fungi**. Third Edition, Cambridge University Press, 2007.

XIA, Y. et al. Seed-Mediated Growth of Colloidal Metal Nanocrystals. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 55, n. 1, p. 2-38, 2016.

XU, X. et al. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 40, p. 12736–12737, 2004.

XU, J. et al. Metal nanoparticles as a promising technology in targeted cancer treatment. **Drug Delivery**, v. 29, n. 1, p. 664-678, 2022.

YAN, F. et al. The fluorescence mechanism of carbon dots, and methods for tuning their emission color: a review. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 8, 2019.

YANG, K. et al. Carbon dots derived from fungus for sensing hyaluronic acid and hyaluronidase. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 251, p. 503–508, 2017.

YE, R. et al. Bandgap engineering of coal-derived graphene quantum dots. **ACS**

Applied Materials and Interfaces, v. 7, n. 12, p. 7041–7048, 2015.

YOU, H.; FANG, J. Particle-mediated nucleation and growth of solution-synthesized metal nanocrystals: A new story beyond the LaMer curve. **Nano Today**, v. 11, n. 2, p. 145–167, 2016.

YUE, J. S. et al. A review of fluorescent carbon dots: synthesis, photoluminescence mechanism, solid-state photoluminescence and applications in white light-emitting diodes. **Xinxing Tan Cailiao/New Carbon Materials**, v. 38, n. 3, p. 478–495, 2023.

ZENG, Q; FENG, T; TAO, S; ZHU, S; YANG, B. Precursor-dependent structural diversity in luminescent carbonized polymer dots (CPDs): the nomenclature. **Light Science & Applications**, v.10, p. 1-13, 2021.

ZHANG, B.-Xi. et al. One-step hydrothermal synthesis and optical properties of PEG-passivated nitrogen-doped carbon dots. **RSC Advances**, v. 5, n. 10, p. 7395-7400, 2015.

ZHANG, T. H.; LIU, X. Y. Experimental Modelling of Single-Particle Dynamic Processes in Crystallization by Controlled Colloidal Assembly. **Chemical Society Ver**, v.43, p. 2324–2347, 2014.

ZHANG, Q. et al. Core–shell nanostructured catalysts. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 8, p. 1816-1824, 2013.

ZHAO, P.; LI, N.; ASTRUC, D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 3–4, p. 638–665, 2013.

ZHAO, Z. et al. Degrading perchloroethene at ambient conditions using Pd and Pd-on-Au reduction catalysts. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 140–141, p. 468–477, 2013.

ZHENG, H et al. Enhancing the luminescence of carbon dots with a reduction pathway, **Chemical Communication**, v.47, p. 10650–10652, 2011.

ZHONG, C.; MAYE, M. M. Core–shell assembled nanoparticles as catalysts. **Advanced Materials**, v. 13, n. 19, p. 1507-1511, 2001.