

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

Verônica Maria Bastos Maciel Bispo

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

Orientador: Dr. Marcos Malta dos Santos

Coorientadora: Dra. Regina Geris dos Santos

VIRTUTE SPIRITUS

1808

SALVADOR-BA

Maio de 2022

VERÔNICA MARIA BASTOS MACIEL BISPO

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

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

Orientador: Dr. Marcos Malta dos Santos

Coorientadora: Dra. Regina Geris dos Santos

SALVADOR-BA

Maio de 2022

Para Maciel e Glória, meus pais, meu “ouro de mina”.
A todos e todas as pessoas negras que pavimentaram o caminho para que eu
tivesse o direito de existir e ocupar espaços de poder.
A todas e todos que lutaram e lutam incessantemente por uma educação pública,
gratuita, de qualidade, inclusiva e emancipatória.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por me capacitar, fortalecer e iluminar meus passos durante esta jornada.

Aos meus pais, Maciel e Glória, por todo amor, zelo constante, incentivo e apoio.

Ao meu companheiro, Rafael, por seu incentivo, compreensão e pela paciência nos meus momentos de angústia e ansiedade, por toda dedicação, apoio e por sempre me dar força para superar minhas dificuldades e lutar pelos meus sonhos.

Ao meu irmão, Ramon e a minha avó, Edite (*in memoriam*).

A todos os meus familiares e a família do meu companheiro por todo incentivo;

Eu agradeço de modo profundo ao meu orientador Dr. Marcos Malta por todos esses anos de orientação e formação científica. Sou muito grata não somente pela brilhante orientação, mas por ser um orientador no significado mais verdadeiro da palavra, que nos ensina sendo um exemplo de ser humano e de pesquisador. Obrigada pela confiança, aprendizado, paciência, amizade, dedicação, respeito e pela forte contribuição no meu crescimento pessoal e profissional. A sua existência torna o mundo um lugar verdadeiramente humano.

Agradeço à professora Dra. Regina Geris pela coorientação de excelência, por me acolher gentilmente em seu laboratório desde a época da iniciação científica e nunca medir esforços para garantir todo o apoio necessário, por todos os ensinamentos fundamentais para construção deste trabalho e discussões enriquecedoras sobre o extraordinário mundo dos fungos. Agradeço por toda dedicação, confiança, paciência e sempre nos impulsionar para sermos profissionais competentes e de caráter. Muito obrigada!

À Dra. Roberta Brayner, *in memoriam*, minha mentora no ITODYS-Université Paris Diderot, pelo acolhimento, confiança, por partilhar a sua mente brilhante, o seu laboratório, a sua sala e as refeições dominicais. Agradeço pelo profundo aprendizado sobre o mundo da integração de nanopartículas metálicas na superfície de microorganismos e sobre o verdadeiro sentido de a Ciência estar direcionada à contribuir com uma sociedade mais humana.

Ao professor Dr. Marcus Vinicius Santos da Silva da Universidade Federal da Bahia, por todo apoio, paciência e solicitude ao me acolher gentilmente em seu laboratório para a calcinação dos materiais e medidas de voltametria cíclica. Além disso, agradeço aos ensinamentos e discussões acerca da espectroscopia Raman, bem como o auxílio no desenvolvimento da metodologia para aplicação dos microtubos na espectroscopia Raman.

À professora Dra. Zênis Novais da Rocha da Universidade Federal da Bahia, pelas análises de voltametria cíclica e concessão de reagentes e materiais que tornaram o desenvolvimento desse trabalho possível.

A todos os meus alunos e alunas, que me entusiasma com suas existências, questionamentos e pensamentos brilhantes, impulsionando-me à prática de uma educação pública emancipatória e antirracista no IFBA.

À Pascale Fremeaux, por seu encorajamento, pensamento brilhante, por todos os vinhos, museus e risos que compartilhamos e pelo acolhimento familiar durante o meu período de estudos em Paris.

Aos amigos, Jaqueline, Jeferson e Luana, pelo apoio ao longo desses anos, ter vocês por perto fez essa trajetória ser mais tranquila e agradável.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, imprescindível para a realização das atividades acadêmicas durante o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, concedido por meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) para o desenvolvimento de parte da pesquisa em Paris.

À Université Paris Diderot por ter me acolhido entre 2018-2019 e ter proporcionado a infraestrutura necessária para a realização da pesquisa, pelos seminários, congresso de doutorandos, aulas, discussões e trocas de conhecimento com os colegas pesquisadores da instituição.

Agradeço ao Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo serviço de microscopia eletrônica e processamento das amostras prestados, sempre de forma solícita, nas pessoas de Dra. Maria Lúcia Vieira Moreno, Dra. Adriana Lanfredi Rangel e Dr. Cláudio Pereira Figueira.

Aos professores e professoras Dr. André Rosa Martins, Dr. Giuseppe Abíola Câmara da Silva, Dr. Luiza Amim Mercante, Dr. Guilherme Augusto Ferreira, Dr. Zênis Novais da Rocha, Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus e Dr. Antônio Ferreira da Silva, por terem gentilmente aceitado compor a banca avaliadora deste trabalho.

À todo corpo docente da UFBA pelo generoso compartilhamento de seus conhecimentos.

A todos os colegas, professores e funcionários do IQ-UFBA que ajudaram de alguma forma a construção dessa tese.

Sinto-me feliz e grata por todas as pessoas que ajudaram de algum modo, que acreditam e torcem no desenvolvimento humano e tecnológico pautado na Ciência.

A todos um sincero e forte abraço. Muito obrigada!

*Todas as manhãs junto ao nascente dia
ouço a minha voz-banzo,
âncora dos navios de nossa memória.*

*E acredito, acredito sim
que os nossos sonhos protegidos
pelos lençóis da noite
ao se abrirem um a um
no varal de um novo tempo
escorrem as nossas lágrimas
fertilizando toda a terra
onde negras sementes resistem
reamanhecendo esperanças em nós.*

(Conceição Evaristo)

RESUMO

Microtubos metálicos de ouro e platina foram sintetizados através do cultivo de espécies fúngicas filamentosas em nanopartículas de ouro e platina estabilizadas pelo íon citrato. Nesta estratégia, nanopartículas metálicas se depositam, pelo processo de automontagem na parede celular de células fúngicas de espécies fúngicas filamentosas (*Phialomyces macrosporus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus brasiliensis* e *Talaromyces pinophilus*), resultando na síntese de microestruturas biomiméticas. Os microtubos foram obtidos através da remoção do molde biológico via tratamento térmico. Os sistemas fungos/nanopartículas metálicas foram analisados através das técnicas de pH, potencial Zeta, Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível com o escopo de compreender a estabilidade das nanopartículas de ouro frente aos metabólitos primários e secundários produzidos pelos fungos, bem como o efeito da depleção de íons citrato no sistema. Os bio-híbridos e microtubos metálicos obtidos foram caracterizados através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), microanálise por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS), análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A análise conjunta das referidas técnicas ratificou a formação de estruturas microtubulares de ouro e platina, bem como permitiu elucidar os detalhes microestruturais dos microtubos de ouro. Tal como elucidou a quantidade de nanopartículas metálicas assimiladas na parede celular de cada espécie fúngica utilizada, especificamente, os resultados da ATG mostraram que as espécies fúngicas *Talaromyces pinophilus* e *Phialomyces macrosporus* assimilam, respectivamente, 36% e 40% de nanopartículas de ouro na parede celular. O escopo central do presente trabalho de doutoramento foi aplicar os microtubos biomiméticos de ouro. De modo que, as medidas de voltametria cíclica mostraram que a área superficial do eletrodo modificado de ouro microestruturado obtido da réplica de células fúngicas é 31 vezes superior à área do eletrodo polido de ouro. Enquanto as medidas de Espectroscopia Raman utilizando os microtubos plasmônicos como substrato, possibilitou a identificação de uma concentração traço de Rodamina B a uma concentração de 10^{-8} mol.L⁻¹, evidenciando o efeito de intensificação de espalhamento por meio de superfície (SERS) dos referidos microtubos plasmônicos. Por fim, as análises de MEV, MET e EDS

evidenciaram a síntese de bio-híbridos constituídos de fungo filamentoso e nanopartículas de platina. Para mais, constatou-se a formação de microtubos inéditos de óxido de platina.

Palavras-chave: Nanopartículas metálicas. Fungos filamentosos. Bio-híbridos. Biomimetismo.

ABSTRACT

Gold and platinum metallic microtubes were synthesized by cultivating filamentous fungal species on gold and platinum nanoparticles stabilized by the citrate ion. In this strategy, metallic nanoparticles are deposited by the process of self-assembly on the cell wall of fungal cells of filamentous fungal species (*Phialomyces macrosporus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus brasiliensis* and *Talaromyces pinophilus*), resulting in the synthesis of biomimetic microstructures. The metallic microtubes were obtained by removing the biological mold through a heat treatment process. The fungal/metal nanoparticles systems were analyzed using pH, Zeta potential, Dynamic Light Scattering (DLS) and Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy with the aim of understanding the stability of gold nanoparticles against primary and secondary effects produced by fungi, as well as the effect of citrate ion depletion in the system. The biohybrids and metallic microtubes obtained were characterized through the techniques of energy-dispersive X-ray (EDX) analysis, scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA) and transmission electron microscopy (TEM). The joint analysis of these techniques confirmed the formation of gold and platinum microtubular structures, as well as allowed to elucidate of the microstructural details of the gold microtubes. As explained the amount of metallic nanoparticles assimilated in the cell wall of each fungal species used, specifically, the TGA results showed that the fungal species *Talaromyces pinophilus* and *Phialomyces macrosporus* assimilate, respectively, 36% and 40% of gold nanoparticles in the cell wall. The central scope of the present doctoral work was to apply gold biomimetic microtubes. Then, the cyclic voltammetry measurements showed that the surface area of the modified microstructured gold electrode obtained from the fungal cell mimic is 31 times greater than the area of the polished gold electrode. While the Raman Spectroscopy measurements using plasmonic microtubes as substrate allowed the identification of a trace concentration of Rhodamine B at a concentration of 10^{-8} mol.L⁻¹, evidencing the effect of surface scattering enhancement (SERS) of said plasmonic microtubes. Finally, the SEM, MET and EDS analyzes showed the synthesis of biohybrids consisting of filamentous fungi and platinum nanoparticles. Furthermore, the formation of unique microtubes of platinum oxide was observed.

Keywords: Metallic nanoparticles. Filamentous fungi. Biohybrids. Biomimicry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração esquemática dos microtubos biomiméticos de ouro utilizados nos estudos de aplicações como eletrodo de elevada área superficial e substrato ativos ao SERS	24
Figura 2 – Contração relativística do orbital 6s dos elementos de número atômico 55 ao 100	29
Figura 3 – Espectro do ouro metálico.....	30
Figura 4 – (a) Ourives egípcios fundindo o ouro, (b) Ourives egípcios lavando, derretendo e pesando ouro em 1900 a.C no Egito Antigo	31
Figura 5 – Máscara mortuária do rei Tutancâmon da 18ª dinastia em 1323 a. C.....	32
Figura 6 - Artefatos produzidos ao longo dos séculos contendo nanopartículas de ouro	32
Figura 7 – Efeito das nanopartículas nas cores dos vitrais de igrejas medievais.....	33
Figura 8 – Tamanhos, formatos e composições de nanopartículas metálicas podem ser modificados sistematicamente para produzir materiais com diferentes propriedades de dispersão da luz	34
Figura 9 – Nanopartículas de ouro em vários tamanhos e formatos com potencial aplicação em biomedicina	35
Figura 10 - Comparação da atividade catalítica de diferentes formas geométricas de nanopartículas de ouro.....	37
Figura 11 – Variação da dispersão em função do número de átomos	38
Figura 12 - Variação do intervalo entre as bandas (<i>band gap</i>) e densidade de estados quando o número de átomos do sistema aumenta (da direita para a esquerda). δ é o intervalo entre níveis de energias consecutivos	40
Figura 13 – Nanopartículas de ouro em diferentes formas geométricas	41
Figura 14 - Origem de um dipolo elétrico induzido e efeito da força restauradora devido à separação de cargas nas nanopartículas metálicas.....	42
Figura 15 - (a) Espectro de absorção UV-Vis de nanopartículas de ouro de diferentes tamanhos.....	43
Figura 16 – Etapas de formação de nanopartículas de ouro.....	45

Figura 17 – Mecanismos propostos do crescimento e aglomeração de nanopartículas de ouro sintetizadas nas condições de pH (a) $\text{pH} < 5,0$, (b) $5,9 < \text{pH} < 7,2$, (c) $\text{pH} > 9,1$	47
Figura 18 - Representação esquemática da estabilização eletrostática de nanopartículas metálicas.....	49
Figura 19 - Ilustração esquemática das bandas de estiramento do carboxilato nas AuNPs e AgNPs sob o efeito plasmônico	49
Figura 20 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do fungo da espécie <i>Aspergillus niger</i> com aumento de 1000 X.....	50
Figura 21 – Processo de deposição das nanopartículas na superfície micelar do fungo	52
Figura 22 - Imagem digital das culturas cultivadas em meio nutritivo sólido BDA: a) <i>Aspergillus niger</i> , b) <i>Phialomyces macrosporus</i> , c) <i>Talaromyces pinophilus</i> e d) <i>Aspergillus brasiliensis</i>	65
Figura 23 - Imagem digital das suspensões de esporos das espécies <i>Aspergillus niger</i> (AN) e <i>Phialomyces macrosporus</i> (PM)	66
Figura 24 - Imagem digital dos bio-híbridos retirados da suspensão de nanopartículas de ouro, lavados e dispersos em água ultrapura esterilizada após 60 dias de crescimento a) <i>Talaromyces pinophilus</i> /NPs-Au e b) <i>Aspergillus brasiliensis</i> /NPs-Au	68
Figura 25 – Representação esquemática da síntese do bio-híbrido Fungo/Nps-Pt ..	69
Figura 26 – Fluxo de íons no crescimento da hifa.....	81
Figura 27 – Curvas de distribuição de classes de diâmetro em número obtidas pelo espalhamento de luz dinâmico das nanopartículas de ouro recém-preparadas e após 60 dias a 28°C.....	89
Figura 28 – Curvas de distribuição de classes de diâmetro em número obtidas pelo espalhamento de luz dinâmico das nanopartículas de ouro sob a ação do crescimento do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> (AB/NP-Au) durante um período de 60 dias	91
Figura 29 – Curvas de distribuição de classes de diâmetro em número obtidas pelo espalhamento de luz dinâmico das nanopartículas de ouro sob a ação do crescimento do fungo <i>Talaromyces pinophilus</i> (TM/NP-Au) durante um período de 60 dias	91

Figura 30 – Envelhecimento das nanopartículas de ouro e variação nos espectros de absorção.....	92
Figura 31 – Espectros de absorção na região do UV-Vis das nanopartículas de ouro sob a ação do crescimento do fungo <i>Talaromyces pinophilus</i> (TM/NP-Au) durante um período de 60 dias.....	93
Figura 32 – Espectros de absorção na região do UV-Vis das nanopartículas de ouro sob a ação do crescimento do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> (AB/NP-Au) durante um período de 60 dias.....	95
Figura 33 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do fungo da espécie a) <i>Phialomyces macrosporus</i> com aumento de 2120X e b) <i>Aspergillus niger</i> com aumento de 3000X	99
Figura 34 – Ilustração da estrutura da parede celular e da membrana plasmática dos fungos	100
Figura 35 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos bio-híbridos constituídos por nanopartículas de ouro e o fungos filamentosos <i>Aspergillus Niger</i> a) 322X e b) 4070X	102
Figura 36 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos bio-híbridos constituídos por nanopartículas de ouro e o fungo filamentosos da espécie <i>Phialomyces macrosporus</i> , a) 7900X, b) 43000X.....	103
Figura 37 – Representação da estrutura e síntese da parede celular. UDP: Enzimas sintases	104
Figura 38 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão dos bio-híbridos constituídos por nanopartículas de ouro e o fungo filamentosos da espécie <i>Aspergillus brasiliensis</i> a) 12000X (corte transversal da hifa) e b) 4000X (corte longitudinal da hifa)	109
Figura 39 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão dos bio-híbridos constituídos por nanopartículas de ouro e o fungo filamentosos da espécie <i>Talaromyces pinophilus</i> a) 12000X (corte transversal da hifa), b) 50000X (corte transversal da hifa) e c) Distribuição de tamanho de partículas processados pelo programa <i>ImageJ</i>	110
Figura 40 – Curva termogravimétrica do fungo filamentosos após secagem ao ponto crítico do CO ₂	112

Figura 41 – Curvas termogravimétricas dos materiais após secagem ao ponto crítico do CO ₂ : a) Fungo <i>Talaromyces pinophilus</i> /NPs-Au, b) Fungo <i>Phialomyces macrosporus</i> /NPs-Au e c) Fungo Filamentoso.....	113
Figura 42 – Imagens obtidas após a remoção do fungo filamentoso da espécie <i>Phialomyces macrosporus</i> via tratamento térmico a) Fotografia Digital e b) Obtida por microscopia eletrônica de varredura com aumento de 65X	116
Figura 43 – Imagens de mapa elementar e espectro obtidos por EDS dos microtubos de ouro obtidos utilizando o fungo da espécie <i>Phialomyces macrosporus</i> como modelo biológico. a) Microtubos de ouro com aumento de 500X, b) Distribuição de ouro no material microtubular e c) Espectro EDS dos microtubos de ouro	117
Figura 44 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos microtubos de ouro após a remoção do fungo filamentoso da espécie <i>Aspergillus niger</i> via tratamento térmico a) 1000X e b) 5000X	119
Figura 45 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos microtubos de ouro após a remoção do fungo filamentoso da espécie <i>Phialomyces macrosporus</i> via tratamento térmico a) 500X e b) 3000X.....	120
Figura 46 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos microtubos de ouro após a remoção do fungo filamentoso da espécie <i>Phialomyces macrosporus</i> via tratamento térmico a) 3500X e b) 3500X.....	121
Figura 47 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura dos microtubos de ouro após a remoção do fungo filamentoso da espécie <i>Phialomyces macrosporus</i> via tratamento térmico com aumento de 6500X.....	122
Figura 48 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das seções transversais de células fúngicas antes e após o processo de pirólise (600°C em nitrogênio).	124
Figura 49 – Espectro Raman da Rodamina 0,01 mol.L ⁻¹	129
Figura 50 – Espectro Raman da Rodamina 10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹ na réplica dos microtubos de <i>Phialomyces macrosporus</i>	131
Figura 51 – Espectro Raman da Rodamina 10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹ na réplica dos microtubos de <i>Aspergillus Niger</i> (com lavagem após a imersão na solução de Rodamina 6G)	131
Figura 52 – Espectro Raman da Rodamina 10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹ na réplica dos microtubos de <i>Aspergillus Niger</i> (sem lavagem após a imersão na solução de Rodamina 6G)	132

Figura 53 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos microtubos de ouro obtidos utilizando o fungo da espécie a) <i>Aspergillus niger</i> como modelo biológico com aumento de 3500X e b) <i>Phialomyces macrosporus</i> como modelo biológico com aumento de 3500X	134
Figura 54 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos microtubos de ouro obtidos utilizando o fungo da espécie a) <i>Aspergillus niger</i> com aumento de 500X e b) <i>Phialomyces macrosporus</i> com aumento de 500X.....	136
Figura 55 – Voltamograma cíclico do eletrodo de Au polido (padrão) em solução aquosa de H ₂ SO ₄ 1 mol.L ⁻¹ . V= (a) 100, (b) 50, (c) 25 e (d) 10 mV.s ⁻¹	139
Figura 56 – Voltamograma cíclico do eletrodo de Au microestruturado em solução aquosa de H ₂ SO ₄ 1 mol . L ⁻¹ . V= (a) 100, (b) 50, (c) 10, (d) 5 e (e) 2 mV.s ⁻¹	140
Figura 57 – Voltamograma cíclico do eletrodo de (a) polido (padrão) e (b) Au microestruturado em solução aquosa de H ₂ SO ₄ 1 mol . L ⁻¹ . v= 100 mV.s ⁻¹	141
Figura 58 – Voltamograma cíclico de solução aquosa 9,97 x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ³⁻ com eletrodo de Au polido em solução aquosa de H ₂ SO ₄ 1 mol L ⁻¹ . v= 250, 200, 150, 100, 50, 25 e 10 mV s ⁻¹	143
Figura 59 – Voltamograma cíclico de solução aquosa 9,97 x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ³⁻ com eletrodo de Au microestruturado em solução aquosa de H ₂ SO ₄ 1 mol L ⁻¹ . v= 250, 200, 150, 100, 50, 25 e 10 mV s ⁻¹	143
Figura 60 – Curva de I _p vs v ^{1/2} – Eletrodo de Au polido.....	145
Figura 61 - Curva de I _p vs v ^{1/2} – Eletrodo de Au microestruturado	145
Figura 62 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bio-híbrido constituído do fungo da espécie <i>Phialomyces macrosporus</i> e nanopartículas de platina. a) 250X e b) 450X.....	149
Figura 63 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bio-híbrido constituído do fungo da espécie <i>Phialomyces macrosporus</i> e nanopartículas de platina. a) 1900X e b) 1500X.....	150
Figura 64 – Imagens de mapa elementar e espectro obtidos por EDS do bio-híbrido formado por PM/Pt	151
Figura 65 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão do bio-híbrido constituído do fungo da espécie <i>Phialomyces macrosporus</i> e nanopartículas de platina. a) 8000X (corte transversal da hifa), b) 8000X (corte longitudinal da hifa), c) 25000X e d) 600000X	152

Figura 66 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bio-híbrido constituído do fungo da espécie *Phialomyces macrosporus* e nanopartículas de platina após calcinação. a) 150X, b) 1100X, c) 1800X e d) 9500X..... 154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de substâncias usadas no trabalho	63
Tabela 2 – pH das NPs-Au durante 2 meses de crescimento das espécies fúngicas	79
Tabela 3 – Variação do Potencial Zeta das NPs-Au durante 2 meses de crescimento das espécies fúngicas	85
Tabela 4 – Bandas de absorção da Rodamina 6G.....	137
Tabela 5 - Valores de I_p em função $v^{1/2}$ obtidos nos voltamogramas para $[Fe(CN)_6]^{3-}$	144

LISTA DE ABREVIATURAS

LBQM Laboratório de Biotecnologia e Química de Microrganismos

DNA Ácido Desoxirribonucleico

NPs-Au Nanopartículas de ouro

NPs-Pt Nanopartículas de platina.

NPs-Pd Nanopartículas de paládio.

NPs-AuPd Nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio.

CO₂ Dióxido de carbono

PM *Phialomyces macrosporus*

AN *Aspergillus niger*

AB *Aspergillus brasiliensis*

TM *Talaromyces pinophilus*

NPs Nanopartículas

Au Ouro

Pt Platina

PM/NPs-Pt Bio-híbrido constituído por nanopartículas de Pt e o fungo *Phialomyces macrosporus*.

PM/NPs-Au Bio-híbrido constituído por nanopartículas de Au e o fungo da espécie *Phialomyces macrosporus*.

TM/NPs-Au Bio-híbrido constituído por nanopartículas de Au e o fungo da espécie *Talaromyces pinophilus*

AB/NPs-Au Bio-híbrido constituído por nanopartículas de Au e o fungo da espécie *Aspergillus brasiliensis*

AN/NPs-Au Bio-híbrido constituído por nanopartículas de Au e o fungo da espécie *Aspergillus niger*

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

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

APA Área de Proteção Ambiental

MEV Microscopia eletrônica de varredura

MET Microscopia eletrônica de transmissão

DLS Espalhamento de Luz Dinâmico

pH Potencial hidrogeniônico

EDX/EDS Espectroscopia por energia dispersiva de raios-X

Uv-Vis Ultravioleta e visível

ATG Análise Termogravimétrica

UFBA Universidade Federal da Bahia

ITODYS O laboratório Interfaces Traitements Organization et DYnamique des Systèmes da Universidade de Paris Diderot

SERS Surface Enhanced Raman Scattering (Espalhamento Raman Intensificado por Superfície)

SERRS Espalhamento Raman Ressonante Intensificado por Superfície

DNA Ácido desoxirribonucleico

BDA Batata, dextrose e ágar

GABA Ácido gama-aminobutírico

MOF Redes Metal-orgânicas

Ln-MOFs Redes Metal-orgânicas de íons lantanídeos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	26
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	28
PARTE EXPERIMENTAL	62
4. PARTE EXPERIMENTAL	63
RESULTADOS E DISCUSSÕES	76
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	77
CONCLUSÕES, PERSPECTIVAS E REFERÊNCIAS	155
7. CONCLUSÕES	156
8. PERSPECTIVAS	158
9. REFERÊNCIAS	159
ANEXOS	172
ANEXO A) Dados de Análise Termogravimétrica do fungo filamentoso da espécie <i>Phialomyces macrosporus</i>	173
ANEXO B) Dados de Análise Termogravimétrica do bio-híbrido constituído por <i>Phialomyces macrosporus</i> e nanopartículas de ouro	174
ANEXO C) Dados de Análise Termogravimétrica do bio-híbrido constituído por <i>Talaromyces pinophilus</i> e nanopartículas de ouro	175

1. INTRODUÇÃO

Sistemas biológicos baseados em vírus, bactérias, algas e fungos têm sido frequentemente usados como moldes para a construção de novos materiais. Nessa estratégia, o modelo biológico suporta a automontagem de materiais micrométricos ou nanométricos, fundamentando-se no biomimetismo, o qual consiste na imitação da morfologia do micro-organismo (FAKHRULLIN, 2012). Em todos os casos, os modelos biológicos selecionados têm alto nível de complexidade estrutural, os quais os métodos de síntese química convencionais não são capazes de produzir, além disso, tais moldes biológicos são uniformes, amplamente disponíveis, possuem baixo custo e são biocompatíveis com materiais nanoparticulados (PRASAD, 2007; BIGALL, 2008; SAKIMOTO, 2018).

A fabricação de estruturas biomiméticas baseadas na integração de materiais nanoparticulados com células vivas tem possibilitado o desenvolvimento de novos materiais com propriedades químicas e físicas distintas apropriadas ao desenvolvimento de biossensores (FAKHRULLIN, 2012), marcadores biológicos para detecção de patologias fúngicas (ROSÁRIO, 2019), catalisadores mais eficientes e seletivos (BIGALL, 2008), dispositivos bioeletrônicos (LOVLEY, 2013; LOGAN, 2012), produção fotobiológica de hidrogênio (XIONG, 2015), híbridos com propriedades fotocatalíticas e fotovoltaicas para conversão de energia solar (NURAJE, 2012), bio-híbridos condutores adequados à fabricação de nanodispositivos eletrônicos (HE, 2006), fabricação de biosistema fotocatalisador de dióxido de carbono à produtos de maior valor agregado como o ácido acético (KORNIENKO, 2016), entre outros.

Atualmente vêm sendo realizadas algumas pesquisas relatando a integração de nanopartículas metálicas com células vivas de fungos filamentosos, os quais são os micro-organismos utilizados no desenvolvimento dessa tese. Por exemplo, o grupo do pesquisador Alexander Eychmuller, um dos grupos pioneiros na área de funcionalização de espécies de fungos filamentosos com nanopartículas metálicas, produziu diferentes classes de nanopartículas metálicas (Ag, Au, Pt e Pd) estabilizadas pelo ânion citrato. Esses autores verificaram que um fungo filamentoso cresceu em um meio rico em nanopartículas de platina, agregando as referidas nanopartículas na estrutura micelar e se tornando ativo em reações catalíticas (BIGALL, 2008). Em 2013, Sharma e Srivastava relataram a síntese de

microestruturas híbridas constituídas de hifas e nanopartículas de ouro estabilizadas com aminoácidos (L-lisina e L-asparagina). Esses autores construíram um biossensor de glicose através da modificação de um eletrodo de trabalho para transferência de elétrons entre enzimas e o eletrodo de superfície (SHARMA, 2013). Bhargava et al., demonstraram a aplicação catalítica de um bio-sistema constituído por nanopartículas de ouro imobilizadas na superfície do fungo da espécie *Aspergillus japonicus*. Este estudo mostra o potencial catalisador do bio-híbrido frente às reações de conversão do 4-nitrofenol à 4-aminifenol, do hexacianoferrato (III) à hexacianoferrato (II) e a bionocatálise da propargilamina com rendimento de 80 % (BHARGAVA, 2015).

Os trabalhos anteriormente citados mostram os avanços mais relevantes quanto à funcionalização de nanopartículas na superfície celular dos fungos filamentosos, os quais culminaram na aplicação dos bio-híbridos como biossensor e catalisadores. Contudo, a ênfase dessas pesquisas está no desenvolvimento de aplicações para o bio-híbrido constituído de nanopartículas metálicas suportadas na parede celular da célula fúngica. De modo que, muitos aspectos científicos relevantes ainda não foram investigados. Como por exemplo, quais aplicativos e tecnologias poderiam ser desenvolvidos se o foco de aplicação estivesse na estrutura biomimética obtida após a remoção do modelo biológico? Quando direcionamos o olhar para responder esse questionamento, o foco está na utilização da morfologia de micro-organismos como moldes para a construção de estruturas de maior área superficial com diferentes tamanhos, formatos, arranjos sofisticados e novas propriedades físicas e químicas, as quais os métodos convencionais da química não são capazes de produzir.

Uma das linhas de trabalho produzidas pelo nosso grupo, LBQM-UFBA, versou sobre a integração de nanopartículas de ouro estabilizadas em citrato na parede celular de fungos filamentosos para a produção de microtubos de ouro biomiméticos através da remoção do molde biológico via tratamento térmico em atmosfera oxidante (FONTES, 2014). Posto isso, a principal motivação dessa tese de doutoramento consiste na aplicação de microtubos de ouro obtidos utilizando fungos filamentosos como modelo biológico, pois avaliando as micrografias de MEV obtidas nessa pesquisa, verificou-se que a superfície dos microtubos possui elevada rugosidade (Figura 1). Ademais, tem sido citado na literatura, que superfícies porosas de ouro, nanoporos de ouro, contêm poros e sítios ativos, os quais são excelentes candidatos para aplicações espectroscópicas e eletroquímicas, devido à alta condutividade

elétrica, alta área superficial, nanoestrutura plasmônica e estabilidade química (KOYA, 2021; RUFFINO, 2020).

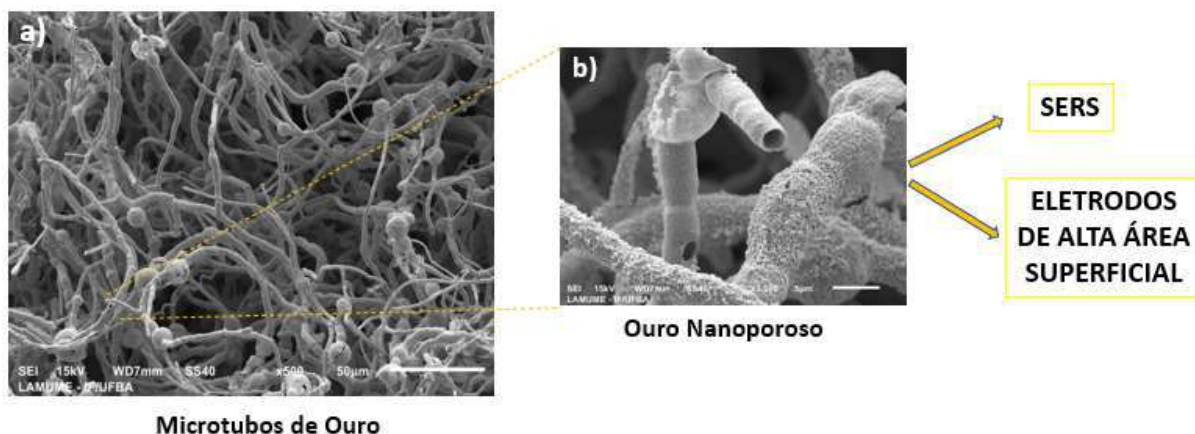


Figura 1 – Ilustração esquemática dos microtubos biomiméticos de ouro utilizados nos estudos de aplicações como eletrodo de elevada área superficial e substrato ativos ao SERS.

Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos microtubos de ouro obtidos utilizando o fungo da espécie *Phialomyces macrosporus* como modelo biológico com aumento de 500 X e b) 3500X.

Atualmente, as estratégias utilizadas para fabricação de estruturas nanoporosas de ouro, baseiam-se em três técnicas: eletrodeposição, ciclos sucessivos de redução-oxidação e através de métodos químicos (BHATTARAI, 2018). Entretanto, esses métodos apresentam desvantagens como por exemplo, dificuldade para controlar a espessura da superfície microestruturada, dificuldade para controlar o tamanho dos poros, uso de solventes tóxicos, contaminação dos eletrólitos e trocas sucessivas por soluções novas, complexidade na metodologia, produção de resíduos tóxicos, dispêndio de energia elétrica e uso de reagentes caros (BHATTARAI, 2018). Sendo assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de novos métodos para a produção de superfícies porosas de ouro de alta área superficial de modo mais sustentável, e que possibilite o controle adequado da porosidade do material produzido para aplicá-lo como eletrodo com alta relação área geométrica/área superficial ativa, catalisadores e substratos ativos ao SERS. Assim, tem sido um desafio para a Ciência dos Materiais, a construção de substratos nanoestruturados de ouro mais estáveis, seletivos, sensíveis, de elevada área superficial e com metodologia de síntese em consonância com a sustentabilidade.

Diante do exposto, delineou-se a presente tese de doutoramento aos estudos de síntese e aplicações de microtubos de ouro biomiméticos de ouro para o desenvolvimento de eletrodos de alta área superficial e substratos ativos ao SERS. Para essa finalidade, propõe-se a utilização de diferentes espécies de fungos filamentosos, pois o diâmetro e comprimento das células fúngicas microtubulares variam de espécie para espécie (Sugunan, 2007). Assim, utilizou-se as espécies fúngicas *Aspergillus niger*, *Phialomyces macrosporus* (fungos obtidos na Lagoa do Abaeté em Salvador-Bahia-Brasil), *Talaromyces pinophilus* e *Aspergillus brasiliensis* (fungos obtidos no Muséum national d'Histoire Naturelle em Paris-França) para imobilização de nanopartículas de metais nobres de forma a construir estruturas bio-híbridas, e após a remoção do molde biológico via tratamento térmico em atmosfera oxidante, obter os referidos microtubos biomiméticos de ouro adequados às aplicações supracitadas. Como adendo, investigou-se uma nova estratégia para imobilização de nanopartículas de platina na parede celular do fungo filamentoso *Phialomyces macrosporus* para a produção de microtubos biomiméticos de platina.

2. OBJETIVOS

O objetivo central dessa tese de doutorado foi sintetizar e caracterizar estruturas microtubulares constituídas de metal nanoporoso utilizando como estratégia de síntese, a funcionalização de células fúngicas vivas das espécies *Phialomyces macrosporus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus brasiliensis* e *Talaromyces pinophilus* com nanopartículas de ouro estabilizadas pelo íon citrato. Posteriormente, as estruturas tridimensionais nanoporosas de ouro foram aplicadas na fabricação de um eletrodo de alta área superficial e para a construção de substratos ativos ao Espalhamento Raman Intensificado por superfície. Especificamente, pretendeu-se:

- a) Estudar as propriedades químicas e físicas da dispersão coloidal de nanopartículas de ouro frente ao crescimento de fungos filamentosos de várias espécies, através das técnicas de pH, DLS, Potencial Zeta e Espectroscopia de absorção na região do UV-VIS;
- b) Estudar a deposição de nanopartículas metálicas de Au e Pt sobre a parede celular dos fungos filamentosos por meio do processo de automontagem;
- c) Otimizar o processo de calcinação do bio-híbrido fungo filamentoso/Nps-Au com o intuito de produzir microtubos biomiméticos de Au e Pt removendo a estrutura biológica;
- d) Caracterizar morfologicamente o material híbrido e os microtubos biomiméticos formados através das técnicas de MEV, TEM e EDS;
- e) Verificar a relação entre a quantidade de nanopartículas de ouro bioassimiladas e as espécies fúngicas utilizadas através da técnica de análise termogravimétrica (ATG);
- f) Aplicar os microtubos biomiméticos de Au como eletrodo de alta área superficial e como substrato ativo ao SERS.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Ouro: um recorte da civilização egípcia antiga à Ciência das nanopartículas

O ouro tem sido extraído da Natureza e moldado para diversas finalidades durante a história da humanidade, relacionando-se com a origem e desenvolvimento das civilizações. O ouro é um metal brilhante com uma coloração amarela típica, em decorrência da ampla refletividade interbandas na região do visível (TOMA, 2005). A configuração eletrônica para o ouro metálico é $[\text{Xe}] 4f^{14}5d^{10}6s^1$, a qual é uma exceção ao Princípio de Aufbau, em que os elétrons ocupam majoritariamente, o orbital de mais baixa energia, isso se deve a pequena diferença de energia entre os orbitais 5d e 6s de apenas 1,9 eV, e, devido aos efeitos de blindagem dos elétrons mais internos e as repulsões elétron-elétron dos 14 elétrons do orbital 4f frente aos orbitais 6s e 5d (TOMA, 2005; TOMA, 2010). De modo mais aprofundado, as referidas especificidades descritas para o átomo de ouro no estado fundamental, deve-se aos efeitos relativísticos. A Relatividade restrita prevê que corpos acelerados possuem maior massa que em repouso, isto é, objetos acelerados próximos à velocidade da luz ($299\,792\,458\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) ganham massa, descrito pela equação 1. Assim, átomos de maior número atômico possuem efeitos relativísticos mais acentuados, como é o caso do átomo de ouro, onde a contração relativística do orbital 6s é máxima como descrito na Figura 2 (PYYKKO, 1979).

Equação 1: $m_{relativa} = \frac{1}{\sqrt{[1-(\frac{v}{c})^2]}} * m_{repouso}$, onde $m_{relativa}$ é a massa relativa da

partícula, $m_{repouso}$ é a massa da partícula em repouso, v é a velocidade em que se encontra a partícula e c a velocidade da luz (o segundo termo da equação é o Fator de Lorentz).

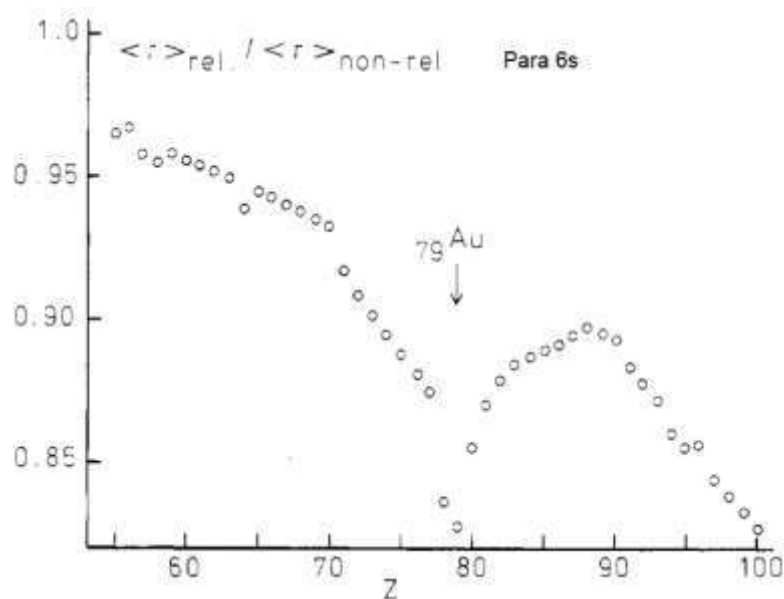


Figura 2 – Contração relativística do orbital 6s dos elementos de número atômico 55 ao 100 (PYYKKO, 1979).

O aumento da massa dos elétrons oriundo dos efeitos relativísticos, provoca a contração do orbital 6s conforme mencionado anteriormente, com isto, tem-se um orbital de menor energia. Além disso, a correção massa-velocidade (quando os elétrons estão próximos à velocidade da luz), a qual causa a contração dos orbitais 6s, tem um efeito de desestabilização no orbital 5d, de modo que a diminuição de energia traz a transição eletrônica para a região do visível (PYYKKO, 1988). Ademais, os efeitos relativísticos levam à desestabilização dos orbitais 5d reduzindo a diferença de energia entre os orbitais 6s e 5d, melhorando aspectos quanto à hibridização sd, de modo que as ligações covalentes com o ouro sejam possíveis, além de explicar a alta energia de ionização (9,225 eV), da afinidade eletrônica (2,309 eV) e a estabilidade das espécies monovalente e trivalente dos cátions de ouro (PYYKKO, 1979; WANG, 2010).

Diante do exposto, analisando a Figura 3, verifica-se a diferença entre o espectro de luz incidente e o espectro de luz refletida referente ao ouro metálico, de modo que a luz incidente é absorvida, principalmente, na região do espectro visível nos comprimentos de onda entre o azul e o verde (aproximadamente de 400 nm a 600 nm), conseqüentemente, a luz refletida é o espectro complementar, a qual é sensível aos olhos humanos na cor amarela do espectro visível (TOMA, 2010; FLINN SCIENTIFIC, 2016; TORRES, 2000).

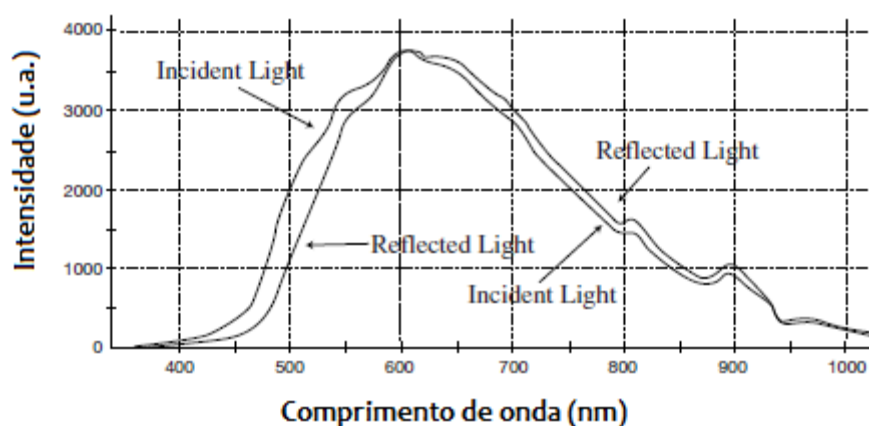
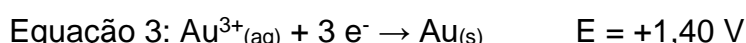
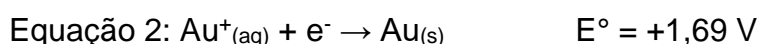


Figura 3 – Espectro do ouro metálico. Adaptado da referência (Flinn Scientific, 2016).

O ouro é considerado um metal nobre, devido às suas propriedades físicas únicas, tais como maleabilidade, ductibilidade, condutividade térmica e elétrica, além da alta resistência à oxidação. A baixa reatividade do ouro é devida à ineficiente blindagem dos elétrons nos orbitais e à intensa atração que o núcleo atômico exerce sobre os elétrons das camadas mais externas (efeitos relativísticos), de modo que as energias envolvidas para que ocorra uma reação com esse elemento químico é extremamente elevada em condições normais, como mostrado nas equações de potencial de redução abaixo (TOMA, 2010; ATKINS, 2001; CHANG, 2002):



À medida que a humanidade aprendeu a transformar os materiais quimicamente, as relações tornaram-se mais complexas no tocante da simbologia e agregação de valores tanto religiosos quanto comerciais aos materiais metálicos. De modo que, o ouro tem simbolizado beleza, poder, riqueza, materialização de culturas e religiões através dos milênios, além de dor no tocante histórico das premissas constitutivas colonizatórias do Brasil.

O ouro tem sido usado desde às civilizações mais antigas como à mesopotâmia e à egípcia. A antiga civilização egípcia, Chemet, foi uma das maiores e mais antigas civilizações constituídas de pessoas negras de toda a história (DIOP, 1974). Carlos Machado revela em seu livro “Ciência, Tecnologia e Inovação Africana e

Afrodescendente”, que a partir do desenvolvimento epistemológico e cultural dessa civilização, foi possível desenvolver diversas ciências e setores da economia atualmente conhecidas, como a Química, a Metalurgia, a Matemática, a Medicina, a indústria têxtil e marítima, sistema de comunicação, arquitetura, comércio, arte e a metalurgia. Na Figura 4, visualiza-se um dos procedimentos comuns no Egito Antigo para obtenção de ouro metálico em 1900 a.C. (MACHADO, 2014).



Figura 4 – (a) Ourives egípcios fundindo o ouro, (b) Ourives egípcios lavando, derretendo e pesando ouro em 1900 a.C no Egito Antigo. A origem química pode ser atribuída ao fenômeno amplamente observado de queima que levou à metalurgia – a arte e ciência do processamento de minérios para obter metais. Adaptado da referência (MACHADO, 2014).

Na Figura 5, visualiza-se um dos maiores achados da história da humanidade foi a tumba de Tutancâmon, descoberta em 1922, a qual continha uma máscara mortuária cunhada em ouro, que devido a sua característica química de alta resistência à oxidação, permanece intacta ao longo de mais de 3000 anos: uma verdadeira obra de arte dedicado ao Faraó Tutancâmon que reinou no Egito Antigo (Chemet) entre 1332 a 1323 a.C. Os artefatos egípcios eram cunhados em ouro, pois a civilização do Egito Antigo acreditava que a pele dos seus deuses era revestida desse nobre material metálico. Há muitos outros artefatos da produção cultural egípcia presentes nos museus da França, Itália, Estados Unidos e Londres, os quais foram expropriados durante expedições colonizadoras de espoliação (HISTORY MAGAZINE, 2008; DIOP, 1974).



Figura 5 – Máscara mortuária do rei Tutancâmon da 18ª dinastia em 1323 a. C. Adaptado da referência (EL-SAYED, 2012).

O ouro metálico apresenta-se em suas várias facetas no desenvolvimento histórico da humanidade, além disso, atualmente, o ouro metálico tem sido utilizado como reserva bancária como garantia de equilíbrio em transações comerciais, na joalheria e na produção de tecnologia. Contudo, o ouro pode se apresentar como nanopartículas dispersas formando colóides de colorações variadas, as quais dependem das dimensões geométricas da nanopartícula (AMENDOLA, 2017).

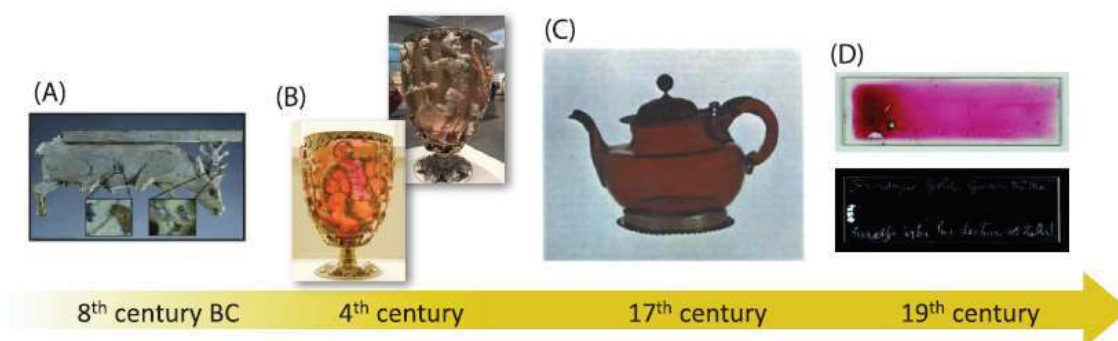


Figura 6 - Artefatos produzidos ao longo dos séculos contendo nanopartículas de ouro. (A) Artefato arqueológico do século VIII a.C, (B) O copo de Licurgus século IV, (C) Bule obtido por

Johannes Kunckel usando a técnica de 'Purple Cassius' (1680), (D) Amostras originais dos estudos do Faraday (1852). Adaptado da referência (AMENDOLA, 2017).

As nanopartículas de ouro têm sido encontradas em alguns artefatos históricos descobertos há milhares de anos como mostra a Figura 6. O objeto mais antigo o qual apresenta nanopartículas de ouro em sua estrutura é uma escultura egípcia que remonta ao século VIII a. C, constituído de marfim e banhado por uma película finíssima de ouro; a presença de nanopartículas de ouro foi identificada pela presença de uma mancha roxa causada pela difusão de ouro coloidal no substrato poroso de marfim (AMENDOLA, 2017; SPADAVECCHIA, 2014). Outro objeto importante na história das NPs-Au é o copo de Lycurgus, o qual apresenta dicroísmo devido a presença de nanopartículas de ouro com tamanho entre 50 -100 nm dispersas na matriz constituinte do vidro. Um efeito similar é verificado nos vitrais de igrejas medievais, as quais exibem belíssimas manifestações artísticas da arte sacra, oriundas da presença de nanopartículas de ouro e de prata de diferentes dimensões geométricas (Figura 7). Na Figura 6-D, visualiza-se as amostras originais dos estudos do Faraday com nanopartículas de ouro (AMENDOLA, 2017; BAYDA, 2020).

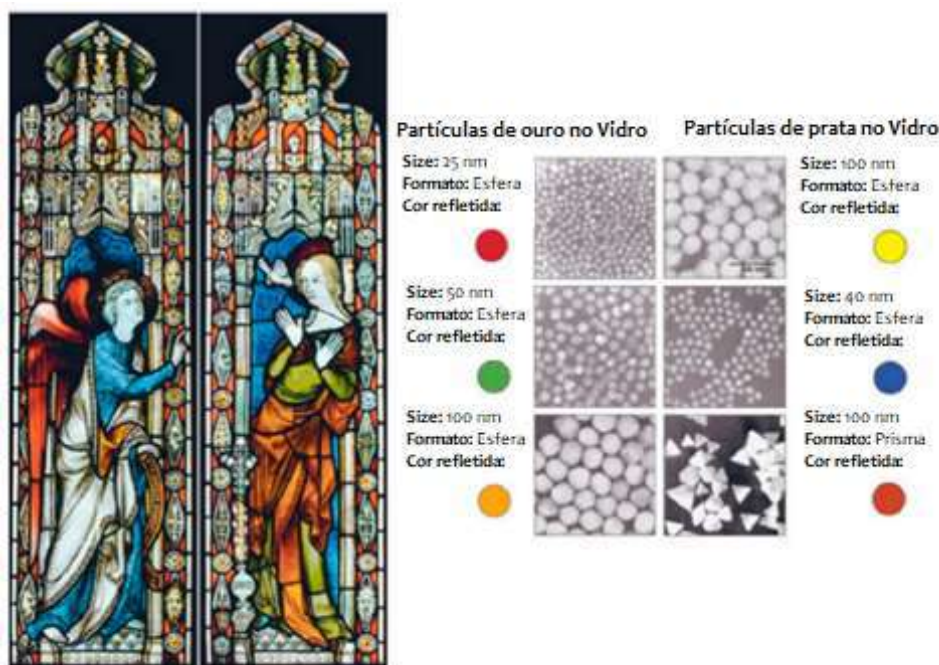


Figura 7 – Efeito das nanopartículas nas cores dos vitrais de igrejas medievais. Adaptado de [BAYDA, 2020).

As nanopartículas de ouro têm propriedades físicas e químicas diferenciadas quando comparadas aos seus precursores e o material massivo (*bulk*), as quais possibilitam o desenvolvimento de novos materiais aplicados em catálise, eletrônica, biomedicina e sensores químicos. Nesse âmbito, tem sido produzido um número expressivo de trabalhos relatando as funcionalidades de sistemas biológicos funcionalizados com nanopartículas de ouro.

Há algumas características únicas que favorecem a vasta aplicação das nanopartículas de ouro, tais como a compatibilidade em sistemas biológicos, a facilidade na funcionalização das nanopartículas com moléculas, macromoléculas como o DNA, células e micro-organismos, as propriedades óticas devido à ressonância dos plasmons de superfície e a facilidade em modelar o tamanho e o formato da nanopartícula, de modo a modificar as propriedades superficiais para modelagem catalítica ou aplicá-las em Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (SERS) (AMENDOLA, 2017).

Rosi et al, publicaram um estudo pioneiro na modelagem de interações do DNA e nanopartículas metálicas para aplicação em detecção colorimétrica de alvos biológicos. Nesse estudo, verifica-se a modelação sistemática de nanopartículas metálicas para a produção de nanomateriais com propriedades distintas como evidencia-se na Figura 8 (ROSI, 2005).

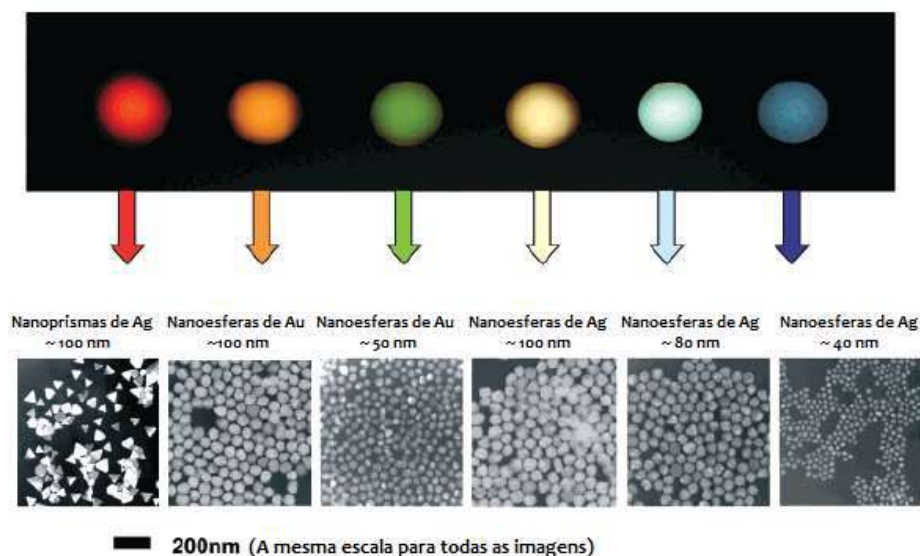


Figura 8 – Tamanhos, formatos e composições de nanopartículas metálicas podem ser modificados sistematicamente para produzir materiais com diferentes propriedades de dispersão da luz. Adaptado da referência (ROSI, 2005).

A Figura 9, mostra nanopartículas de ouro em vários formatos e tamanhos, as quais têm sido estudadas extensivamente para a aplicação em biomedicina. Verifica-se que as propriedades químicas e físicas das partículas coloidais de ouro podem ser controladas e modeladas com um objetivo específico de funcionalidade. Assim, torna-se imprescindível o conhecimento detalhado das propriedades das nanopartículas isoladas, bem como conhecer os componentes do sistema de modo aprofundado para desenvolver as potencialidades de aplicação das nanopartículas metálicas que constitui um dos objetos de estudo da Ciência de Nanopartículas (EL-SAYED, 2012).

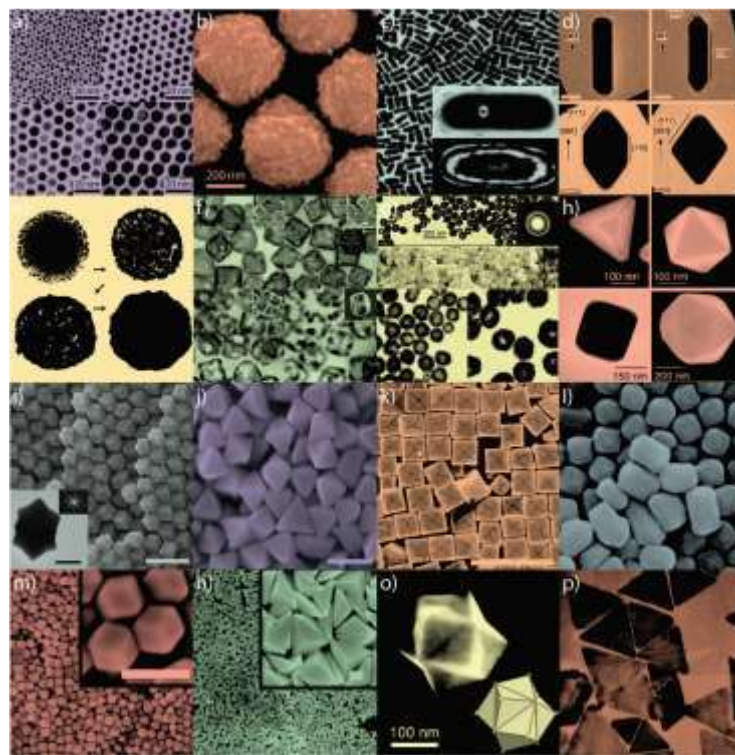


Figura 9 – Nanopartículas de ouro em vários tamanhos e formatos com potencial aplicação em biomedicina. (a) nanoesferas pequenas, (b) nanoesferas grandes, (c) nanotubos, (d) nanotubos de ponta delgada, (e) nanoconchas, (f) nanocubos, (g) nanoesferas côncavas, (h) tetraedro/octaedro/cubos/icosaedro, (i) docecaedro rômico, (j) octaedro, (k) nanocubos concâvos, (l) tetrahexaedro, (m) dodecaedro rômico, (n) bipiriâmide triangular, (o) trisoctaedro, e (p) nanoprismas. Adaptado da referência (EL-SAYED, 2012).

3.2 Propriedades das Nanopartículas metálicas

As mudanças nas propriedades físicas e químicas dos materiais está intrinsecamente ligada ao tamanho e formato das partículas as quais constituem um material. Tem sido definido, que um material cujas partículas constituintes têm suas dimensões em escala nanométrica (1-100 nm) é um nanomaterial (Zarbin, 2007). Contudo, por definição, um nanomaterial é um material cujas partículas possuem dimensões na escala nanométrica apreciáveis para que alguma de suas propriedades (ópticas, catalíticas, magnéticas, elétricas, mecânicas, entre outras) sejam alteradas quando comparadas ao material massivo (NATURE NANOTECHNOLOGY, 2019; ZARBIN, 2007). Salienta-se ainda que, as propriedades verificadas para um mesmo nanomaterial podem ser diferentes quando se modifica o formato, por exemplo, nanopartículas metálicas de mesmo tamanho, mas de formas geométricas diferentes (nanobastões, nanoprismas, nanoesferas, nanoconchas, nanopoliedros entre outros) podem exibir propriedades diferentes, pois as propriedades das nanopartículas metálicas relacionam-se com a relação área superficial/volume, de modo que quanto maior a relação área superficial/volume, maior o grau de confinamento espacial dos elétrons no material, e conseqüentemente, as propriedades físicas e químicas do material tornam-se sensíveis ao tamanho e ao formato das nanopartículas (ALEX, 2015). Por exemplo, os estudos de Chiu et al. mostraram que a atividade catalítica de algumas variedades geométricas de nanopartículas de ouro (nanocubos, octaedros e dodecaedros rômnicos) frente à reação de redução de p-nitroanilina à p-fenilenodiamina, apresentaram diferentes velocidades. De modo que as nanopartículas com forma geométrica de dodecaedros rômnicos apresentaram a melhor eficiência catalítica frente a reação de redução de p-nitroanilina estudada como mostra a Figura 10 (CHIU, 2012).

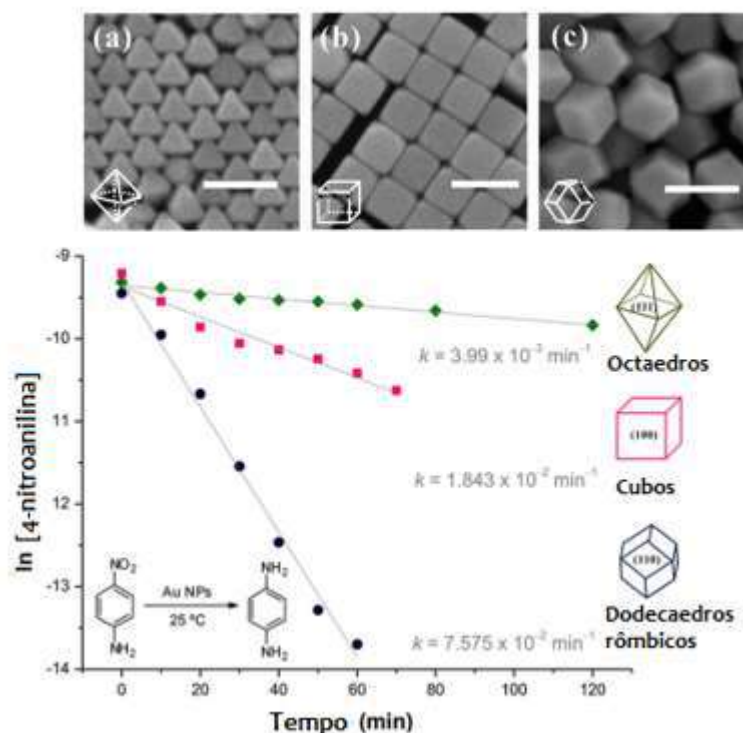


Figura 10 - Comparação da atividade catalítica de diferentes formas geométricas de nanopartículas de ouro (a) octaedros, (b) cubos e (c) dodecaedros frente a reação de redução da 4-nitroanilina. Adaptado da referência (CHIU, 2012).

Portanto, as propriedades dos materiais são intimamente dependentes do seu tamanho e forma geométrica, pois as dimensões das nanopartículas influenciam na extensão dos efeitos de superfície e de confinamento quântico, e conseqüentemente, na ressonância de plasmon de superfície localizado (RODUNER, 2006a e 2006b; ZARBIN, 2007).

3.2.1 Efeitos de Superfície

Os efeitos de superfície associados à uma nanopartícula depende do número da fração de átomos na superfície (dispersão). A dispersão é a razão entre a área superficial e o volume da nanopartícula. A Figura 11, ilustra a relação de dependência entre o tamanho da nanopartícula e a dispersão, para uma denominada partícula, nota-se que a dispersão se atenua à medida que o número de átomos do material aumenta. A princípio, os átomos na superfície de uma partícula possuem menor

número de coordenação direta com os átomos vizinhos quando comparados com os átomos internos do material, desse modo, os átomos da superfície formam menos ligações e são mais instáveis que aqueles encontrados no interior do material (RODUNER, 2006b). Nessa perspectiva, a fração de átomos na superfície aumenta com a diminuição do tamanho da partícula. Assim, a energia livre superficial de nanopartículas metálicas é maior quando comparada ao material em sua forma massiva (bulk), o que as tornam termodinamicamente instáveis (MUDUNKOTUWA, 2011). Em consequência da baixa estabilização, os átomos da superfície (os átomos dos vértices, das arestas e das superfícies planas) são candidatos preferenciais às reações catalíticas heterogêneas, as quais, a rigor, necessita de superfícies ativas à adsorção para que ocorra um mecanismo de diminuição da energia de ativação para uma reação específica. Assim, muitos materiais em nanoescala, adquirem propriedades catalíticas ausentes quando comparado ao material em sua forma massiva (*bulk*) (RODUNER, 2006b).

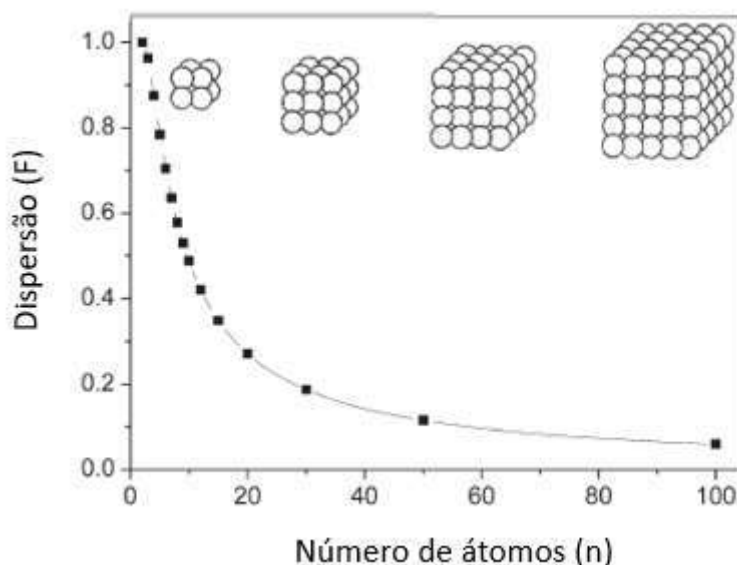


Figura 11 – Variação da dispersão em função do número de átomos para uma partícula hipotética cúbica. Adaptado da referência (RODUNER, 2006b).

3.2.2 Efeito do confinamento quântico

O efeito de confinamento quântico está relacionado com a dimensão espacial do material (RODUNER, 2006b). Os metais têm a propriedade física de serem excelentes condutores, devido às suas ligações metálicas no retículo cristalino (ATKINS, 2001). Segundo a Teoria de Bandas, os orbitais de valência de um átomo metálico se sobrepõem com vários orbitais atômicos de outros átomos vizinhos. A rigor, a sobreposição de orbitais atômicos origina a formação de orbitais moleculares e, o número de orbitais moleculares é igual ao número de orbitais atômicos que se sobrepõem (BROWN, 2004). Contudo, quando um número crescente de átomos se sobrepõe para formar orbitais moleculares, formam-se combinações de orbitais moleculares ligantes e anti-ligantes (BROWN, 2004).

As energias desses orbitais se encontram separadas por um espaço pequeno, de modo que, a interação de todos os orbitais atômicos de valência de cada átomo metálico adjacente dá origem à numerosos orbitais moleculares (bandas de energia) que se estendem por toda a estrutura do metal, e as diferenças de energia entre os orbitais são tão diminutas, que se considera que os orbitais formam uma banda contínua de estados energéticos permissíveis, onde os elétrons podem se mover livremente entre a banda de valência e a banda de condução (BROWN, 2004). Todavia, quando uma fração da matéria estendida é reduzida à escala nanométrica, os elétrons se tornam mais confinados, em consequência disso, as bandas contínuas se tornam discretas, tornam-se quantizadas, de modo que há uma separação entre a banda de valência e a banda de condução que adquirem valores menores ou maiores que kT , há um aumento na energia do band gap (RODUNER, 2006b).

A Figura 12, mostra a variação do intervalo entre as bandas e a densidade de estados quando há diminuição ou aumento do número de átomos que constitui o material. Verifica-se que quando a matéria estendida (bulk) se reduz do tamanho macroscópico ao microscópico, devido ao efeito de confinamento quântico, o material passa de condutor à semicondutor ou isolante (RODUNER, 2006b).

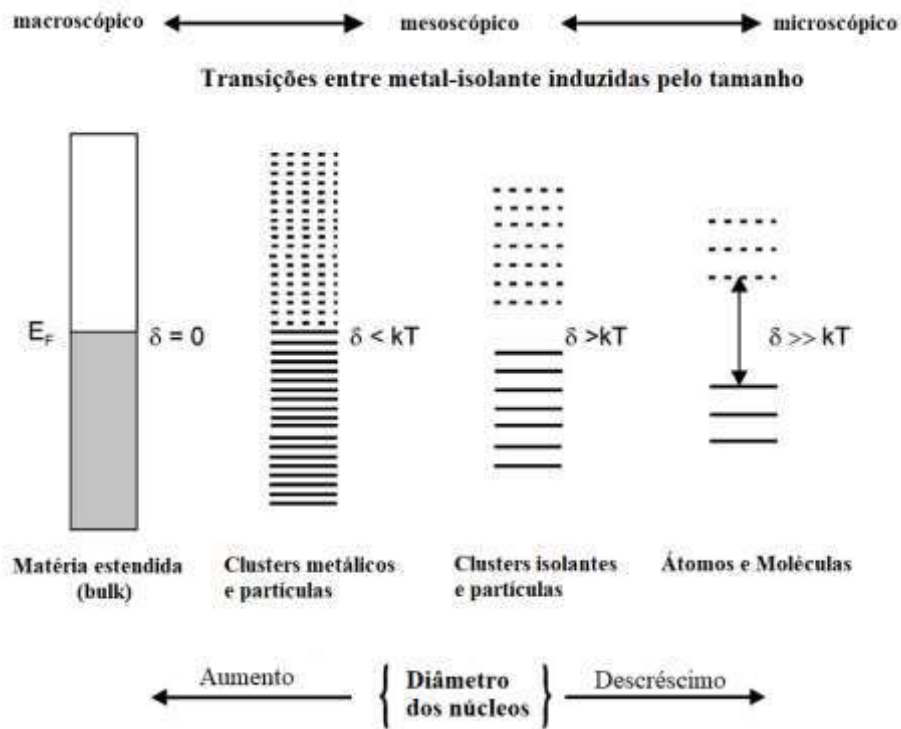


Figura 12 - Variação do intervalo entre as bandas (*band gap*) e densidade de estados quando o número de átomos do sistema aumenta (da direita para a esquerda). δ é o intervalo entre níveis de energias consecutivos. Adaptado da referência (RODUNER, 2006b).

3.2.3 Nanopartículas e a Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado

Outra característica óptica específica das nanopartículas metálicas é exibir cores nas suas soluções coloidais. Na Figura 13, verifica-se que nanopartículas de ouro com diferentes formas e tamanhos apresentam uma vasta quantidade de comportamento óptico expresso na formação de cores diferentes para o sistema coloidal (EL-SAYED, 2012).



Figura 13 – Nanopartículas de ouro em diferentes formas geométricas. (a) Nanobastões, (b) Nanoconchas, (c) Nanopoliedros. Adaptado da referência (de EL-SAYED, 2012).

Este fenômeno ocorre em nanopartículas de metais nobres, tais como Au, Ag, e Cu, devido à ressonância de plasmon (oscilação coletiva de elétrons livres) de superfície localizado. Quando um feixe de luz incide sobre uma nanopartícula metálica com comprimento de onda menor que o diâmetro da referida partícula, há uma interação da onda eletromagnética incidente com a nanopartícula, a qual resulta no deslocamento dos elétrons no sentido oposto ao campo elétrico da onda eletromagnética incidente (SANTOS, 2016; AMENDOLA, 2017). Esta separação de cargas evanescentes provoca a formação de um dipolo elétrico induzido, onde as cargas concentram-se nos polos quando se considera uma nanopartícula esférica, cujo formato foi considerado nas equações de Mie para explicar os pormenores do fenômeno de ressonância de plasmon (AMENDOLA, 2017). Contudo, o campo

elétrico do dipolo induzido produz uma força restauradora de natureza eletrostática oriunda das interações núcleo-elétron para retomar o equilíbrio oriundo do deslocamento dos elétrons confinados na nanopartícula. Assim, quando a indução do dipolo e a força restauradora sobrepõem-se, origina-se a ressonância plasmônica de superfície (SANTOS, 2016; AMENDOLA, 2017; EUTIS, 2006). A Figura 14, ilustra a origem da oscilação dos plasmons devido ao acoplamento do dipolo induzido e a força restauradora.



Figura 14 - Origem de um dipolo elétrico induzido e efeito da força restauradora devido à separação de cargas nas nanopartículas metálicas. Adaptado da referência (EUSTIS, 2006).

A ressonância plasmônica sobre a superfície de metais nobres em escala nanométrica está intimamente ligada a estrutura morfológica das nanopartículas frente ao tamanho, a forma geométrica e as constantes dielétricas do meio e do cluster metálico em dimensões nanométricas (TOMA, 2010; AMENDOLA, 2017). Em 1908, Mie deduziu uma resolução das equações de Maxwell estabelecendo condições de contorno específicas para uma onda eletromagnética e uma esfera em dimensões nanométricas cujo diâmetro é menor que o comprimento da radiação incidente. Suas contribuições, somadas aos estudos de Faraday sobre a dependência das cores de soluções coloidais com a dimensão das partículas e a quantidade de matéria por unidade de volume, propiciou o entendimento da dependência do espectro de absorção de uma nanopartícula com a sua dimensão nanométrica, através da expressão matemática da equação 4 (TOMA, 2010).

Equação 4:

$$\sigma_{ext} = 9 \frac{\omega}{c} \varepsilon_m^{3/2} V \frac{\varepsilon_2(\omega)}{[\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_m]^2 + \varepsilon_2(\omega)^2}$$

em que V é o volume da partícula, ω é a frequência angular da luz incidente, c é a velocidade da luz, e ε_m e $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$ são as funções dielétricas do meio e do nanomaterial, respectivamente. A condição de oscilação de plasmon de superfície é atingida quando $\varepsilon_1(\omega) = -2\varepsilon_m$ e somente se ε_2 for fracamente dependente de ω (TOMA, 2010). Assim, visualizando a Figura 15, em termos conceituais, o espectro de uma solução coloidal de uma nanopartícula metálica varia com o seu tamanho. Verifica-se que quando maior o diâmetro de uma nanopartícula mais intenso é o deslocamento dos máximos de absorção para frequência menos energéticas, evidenciando o efeito do tamanho de partícula sobre a ressonância de plasmon de superfície, isto porque, quando o dimensionamento geométrico da nanopartícula é modificado, há uma alteração na densidade do campo elétrico na superfície (LINK, 2000; SANTOS, 2016). Assim, os diferentes espectros de absorção das nanopartículas de ouro apresentadas na Figura 15, advêm dos efeitos de absorção e espalhamento acoplados às oscilações coletivas dos elétrons na banda de condução.

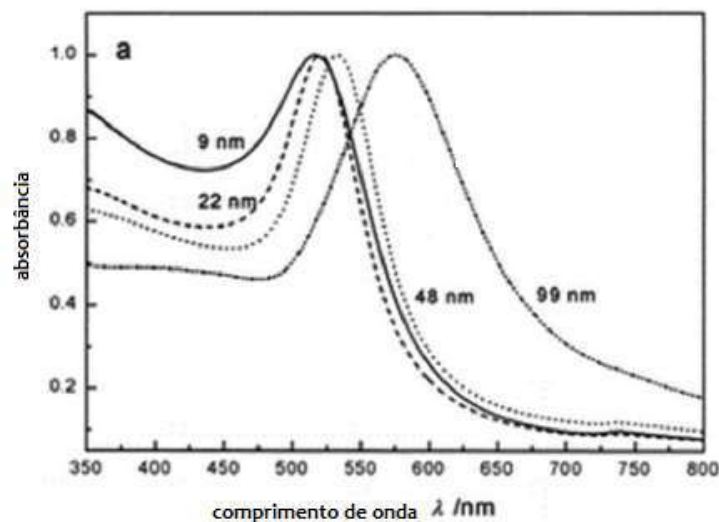


Figura 15 - (a) Espectro de absorção UV-Vis de nanopartículas de ouro de diferentes tamanhos. Os espectros de absorção foram normalizados para seus máximos, sendo em ordem do tamanho 517, 521, 533 e 575 nm, respectivamente. Adaptado da referência (LINK, 2000).

3.3 Síntese e estabilidade das Nanopartículas de Ouro

3.3.1 Síntese de Nanopartículas metálicas

Nanopartículas de ouro podem ser sintetizadas através de vários métodos de síntese, tais como rota sonoquímica, fotoquímica, eletroquímica, assistido por irradiação micro-ondas e métodos químicos de redução em meio líquido aquoso (GUDLUR, 2015; MA, 2004; TSUJI, 2005; POLTE, 2010).

O método de síntese *bottom up* de redução química, consiste em produzir nanopartículas metálicas mediante a inserção de um precursor de íons metálicos, um agente redutor e uma espécie química que estabilize as partículas por efeito estérico ou eletrostático, desse modo, várias formas geométricas de nanopartículas podem ser geradas, tais como esferas, bastões, prismas, cubos, discos, tubos, tetraedros, entre outros formatos (ALEX, 2015).

A estratégia de síntese de nanopartículas por redução química envolve duas etapas gerais: (i) a redução do íon Au^{+3} utilizando um agente redutor, como o borohidreto ou citrato para produzir ouro no estado de oxidação zero. (ii) estabilização das nanopartículas com agentes estabilizantes que isolam os núcleos de crescimento (ALEX, 2015).

A síntese de nanopartículas de ouro pelo método do citrato tem suas bases teóricas nos trabalhos do Turkevitch. O método desenvolvido por esse pesquisador é uma estratégia comumente utilizada para a produção de nanopartículas esféricas monodispersas. Nesse procedimento, utiliza-se a redução do ácido tetracloroaurico frente ao citrato de sódio, que também atua como o agente estabilizante das nanopartículas formadas, devido a alteração da energia livre na superfície da partícula. Nesse método, os íons citrato estão adsorvidos na superfície das nanopartículas de ouro, tornando essas partículas negativamente carregadas, de modo que a estabilização ocorre por repulsão eletrostática (TURKEVICH, 1951).

Verificou-se que o aumento da concentração do citrato no meio de redução química, provoca a diminuição no tamanho das nanopartículas formadas, devido ao processo de maior estabilização pelos íons citrato. O método de Turkevitch foi modificado nos trabalhos de vários autores (Kalimuthu et al, Wang et al, Shajkumar et al, Zhao et al, la bal et al, Kesik et al, Chaudhary et al) com o escopo de retirar a

necessidade de aquecimento requerida pelo método, de modo que uma solução recém-preparada de borohidreto de sódio de baixa concentração foi adicionada à metodologia (DE SOUZA, 2019).

Polte et al, propôs um mecanismo de formação das nanopartículas de ouro. O processo se inicia com a etapa de nucleação, uma etapa rápida de redução de íons Au^{+3} a Au^0 , em seguida, os pequenos núcleos formados se coalescem originando uma aglomeração dos núcleos iniciais, e conseqüentemente, provocando o aumento da partícula. A próxima etapa de crescimento compreende a difusão, onde os íons metálicos da solução são incorporados ao aglomerado, ocorrendo a redução química dos íons Au^{+3} a Au^0 de modo mais lento, além da formação da dupla camada elétrica. Na etapa final há a redução dos íons Au^{+3} residuais, crescimento final das nanopartículas e diminuição da polidispersão (POLTE, 2010; JI, 2007).

A Figura 16 apresenta as etapas de formação das nanopartículas de ouro pelos métodos supracitados.

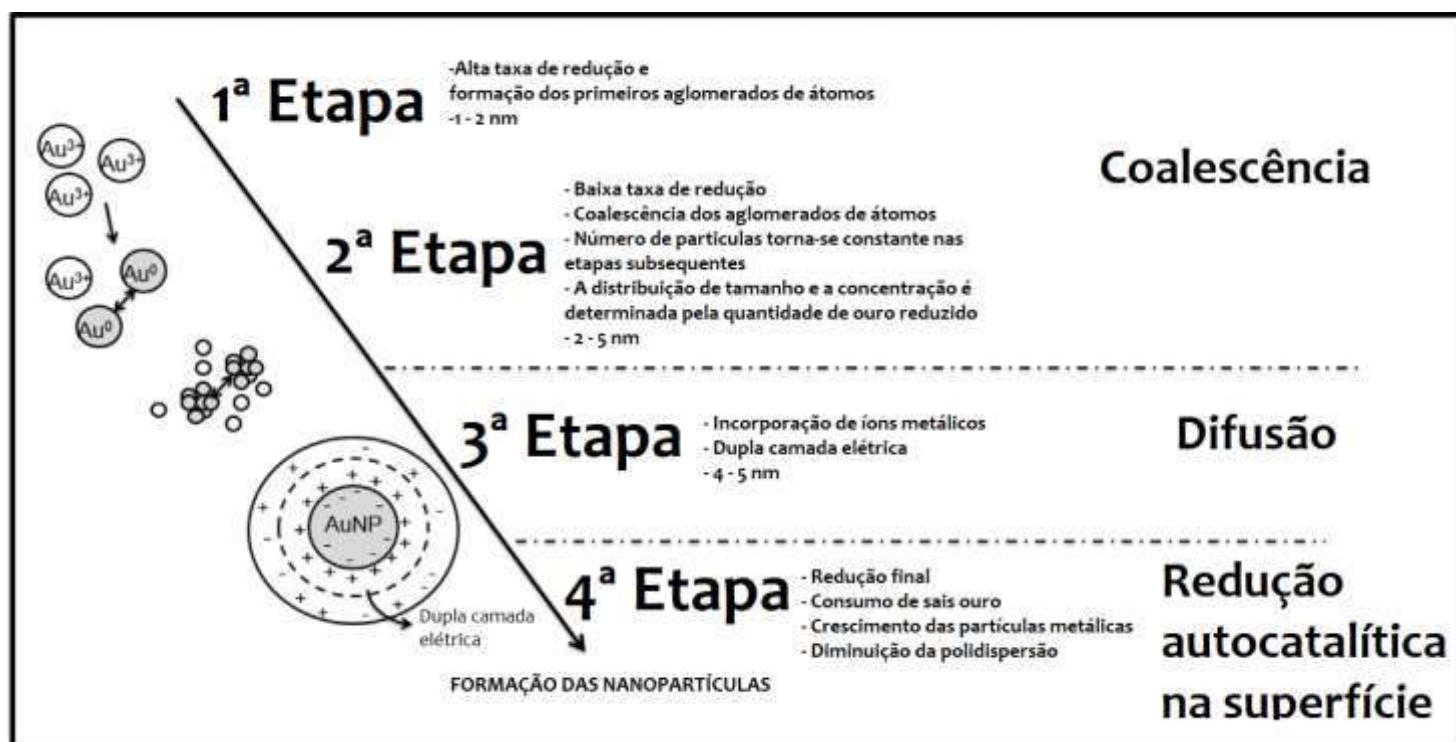


Figura 16 – Etapas de formação de nanopartículas de ouro. Adaptado da referência (DE SOUZA, 2019).

O estudo de Muangnapoh et al, mostrou o efeito da concentração do precursor no tamanho final das nanopartículas metálicas sintetizadas pelo método citrato. Verificou-se que a estabilidade das nanopartículas de ouro sintetizadas pelo processo de redução pode ser controlada pelo ajuste do potencial hidrogeniônico do meio (pH) (MUANGNAPOH, 2010). Assim, alguns mecanismos detalhados de crescimento e aglomeração de nanopartículas de ouro dependendo do potencial hidrogeniônico do meio foram propostos segundo a Figura 17. Por exemplo, na síntese de nanopartículas de ouro sintetizadas na faixa de pH entre 5,9 a 7,2, tem-se que as nanopartículas metálicas de ouro formadas pelo processo de redução química são estabilizadas por forças de repulsão eletrostáticas entre as nanopartículas de ouro estabilizadas pela ancoragem de ânions citrato na superfície das nanopartículas, tornando essas referidas partículas termodinamicamente mais estáveis, devido a diminuição da energia livre superficial. Assim, na fase da dispersão, prevalecendo os ânions citrato estabilizantes da nanopartícula, forma-se uma suspensão coloidal estável de ouro. De modo geral, a Figura 17 demonstra que a estabilidade das nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método citrato pode ser controlada através da padronização do pH do sistema reacional (MUANGNAPOH, 2010).

Uma técnica eficiente de obter nanopartículas esféricas monodispersas é utilizando o Método de Semente. Nesse método, pequeníssimas nanopartículas esféricas são geradas mediante a ação de um forte agente redutor, seguida da inserção de uma solução de crescimento contendo íons Au^{+3} e um estabilizante, de modo a induzir o crescimento anisotrópico das partículas (MURPHY, 2005).

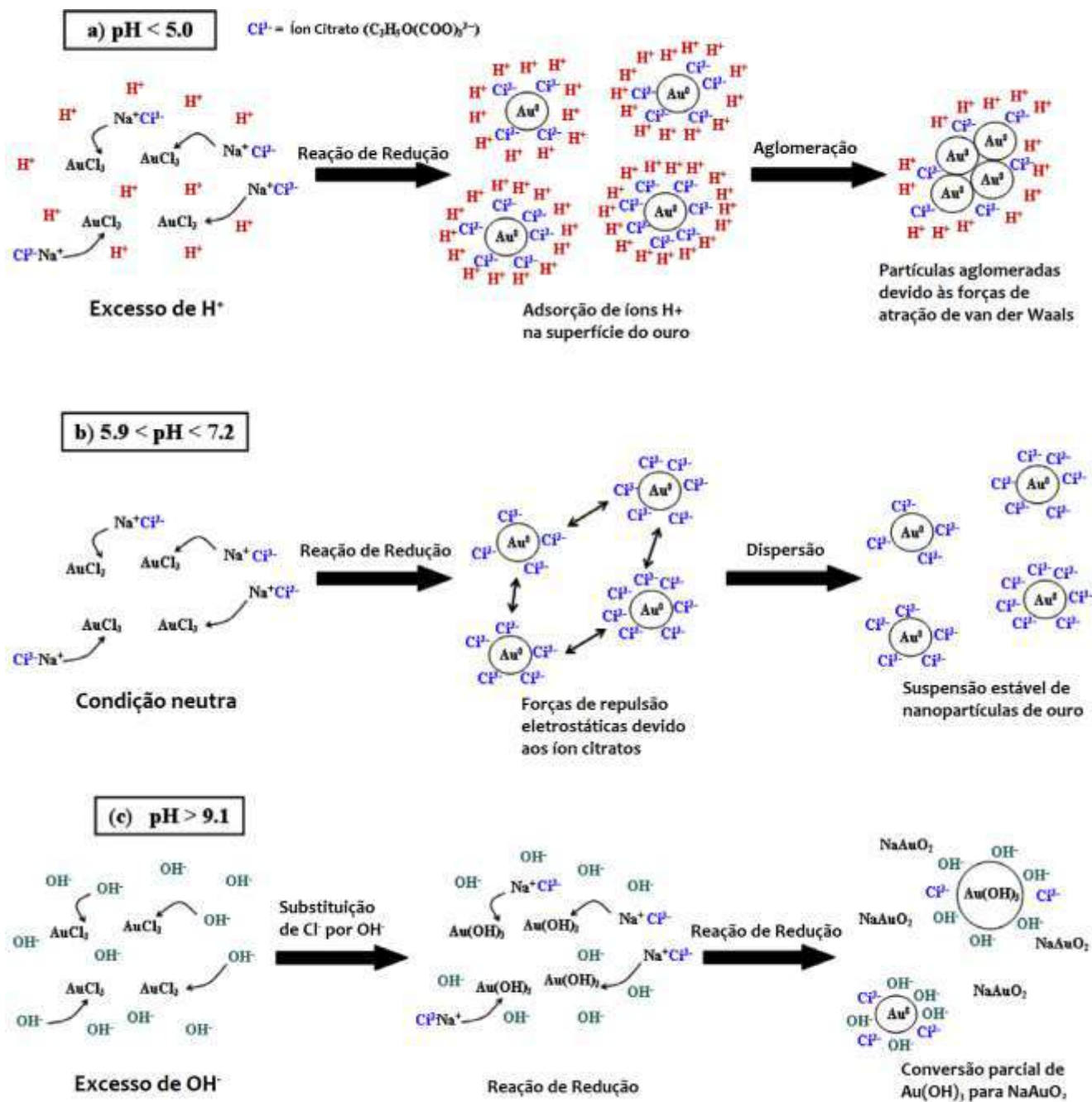


Figura 17 – Mecanismos propostos do crescimento e aglomeração de nanopartículas de ouro sintetizadas nas condições de pH (a) $pH < 5,0$, (b) $5,9 < pH < 7,2$, (c) $pH > 9,1$. Adaptado da referência (MUANGNAPOH, 2010).

3.3.2 Estabilização de Nanopartículas metálicas

A rigor, as nanopartículas de metálicas são termodinamicamente instáveis, devido à alta energia superficial oriunda dos efeitos de superfície e de confinamento quântico. Sendo assim, há uma tendência natural de agregação dessas partículas nanométricas. Dessa maneira, é necessário um efeito de estabilização dessas partículas coloidais em suspensão. O mecanismo de estabilização das nanopartículas metálicas é descrito pela teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeck (DLVO). Segundo essa teoria, o potencial de interação entre duas nanopartículas está relacionado com as forças de repulsão eletrostática e as forças de atração de van der Waals (TOMA, 2010; VERWEY, 1947).

Há quatro tipos de agentes de estabilização: (i) estabilização eletrostática pela adsorção de íons na superfície, (ii) estabilização por efeito estérico utilizando polímeros ou oligômeros, (iii) a combinação da estabilização por efeito eletrostático e o efeito estérico, como por exemplo, utilizando surfactantes, e (iv) estabilização com a utilização de ligantes como fosfinas e tióis. Aqui, será descrito apenas a estabilização eletrostática pela adsorção de ânions na superfície tal como o citrato (ROUCOUX, 2002).

A adsorção de íons citrato na superfície da partícula metálica em escala nanométrica, propicia a formação de uma dupla camada elétrica pelos efeitos de difusão no processo de formação da nanopartícula (Figura 18). Assim, há um efeito de repulsão colômbica entre as partículas que são contrárias às forças atrativas de van der Waals, as quais promovem a agregação irreversível das nanopartículas gerando a precipitação da suspensão coloidal. Quando há uma densidade de carga superficial na partícula suficiente para que as forças repulsivas sejam mais intensas que as forças atrativas de van der Waals, tem-se a estabilização da nanopartícula metálica por efeito eletrostático. A estabilização provoca uma diminuição da área superficial do sistema, diminuindo assim, a energia livre do sistema (ROUCOUX, 2002).

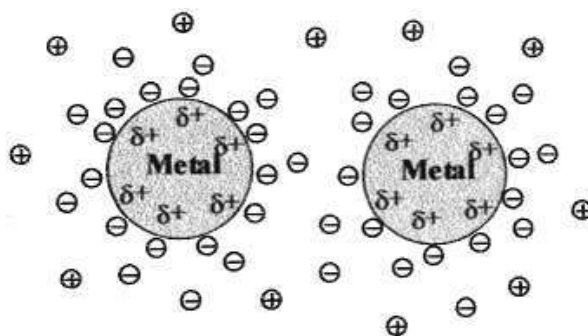


Figura 18 - Representação esquemática da estabilização eletrostática de nanopartículas metálicas. Adaptado da referência (ROUCOUX, 2002).

Wulandari et al, publicou um estudo sobre os processos de coordenação de nanopartículas de ouro e nanopartículas de prata com citrato utilizando a técnica espectroscópica de FTIR. Eles demonstraram que o modo de vibração do estiramento assimétrico da molécula de citrato (COO^-) exibe uma maior frequência que as moléculas de citrato coordenadas às nanopartículas de prata. De modo que, as moléculas de citrato adsorvem na superfície da nanopartícula metálica de ouro através de coordenação unidentada do carboxilato (ancorando apenas um oxigênio), enquanto o efeito de adsorção na superfície para nanopartículas de prata é de origem iônica (ancorando os dois oxigênios), conforme apresentado na Figura 19 (WALANDARI, 2008; WALANDARI, 2015).

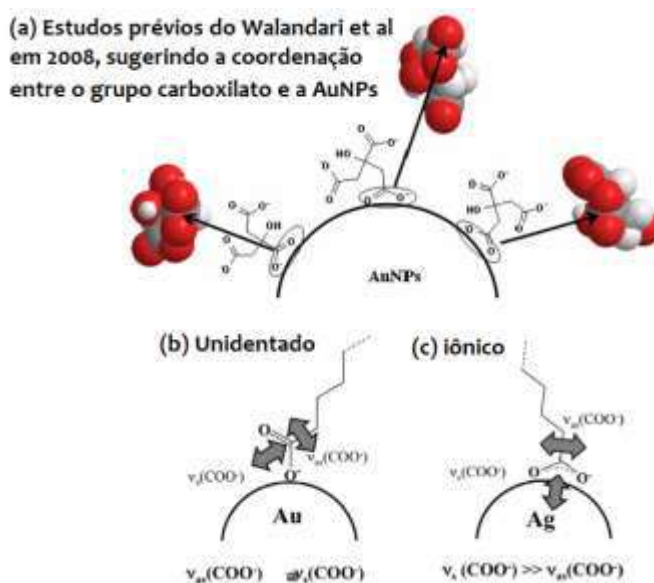


Figura 19 - Ilustração esquemática das bandas de estiramento do carboxilato nas AuNPs e AgNPs sob o efeito plasmônico. Adaptado da referência (WULANDARI, 2008; WULANDARI, 2015).

3.4 Utilização de fungos filamentosos para o desenvolvimento de novos materiais e tecnologias

Os fungos filamentosos são microrganismos morfologicamente complexos, onde a estrutura elementar de crescimento são elongações tubulares de crescimento axial, conhecidos como hifas (KAVANAGH, 2011). A Figura 20 mostra a micrografia do micélio da espécie *Aspergillus niger*, possibilitando visualizar as hifas tubulares formadas pelo crescimento do referido fungo.

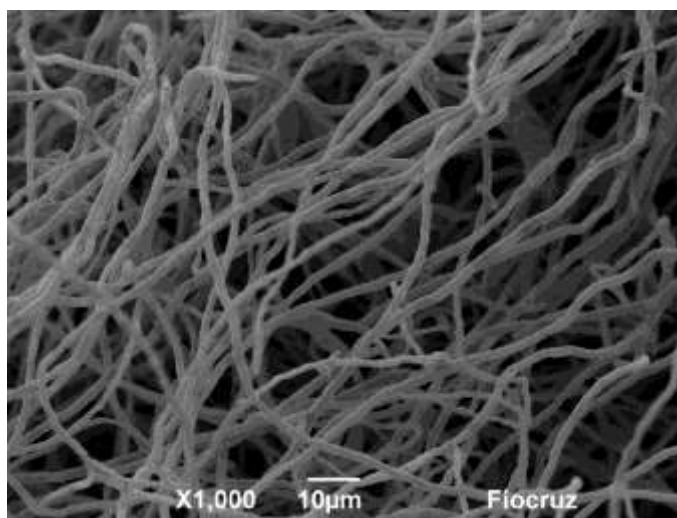


Figura 20 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do fungo da espécie *Aspergillus niger* com aumento de 1000 X.

Fungos filamentosos têm sido intensivamente utilizados em vários estudos de adsorção e biossíntese de nanopartículas metálicas e de compostos inorgânicos, além disso é o micro-organismo utilizado para conduzir **os estudos dessa tese que se baseia em produzir microtubos de ouro com finalidade de aplicação espectroscópica e eletroquímica.**

Recentemente, algumas publicações descreveram a habilidade de o fungo filamentoso assimilar partículas durante o crescimento em um meio rico de nanopartículas metálicas, produzindo biomateriais que exibem novas propriedades físico-químicas, tais como atividade catalítica e condutividade elétrica. Contudo, a aplicação de fungos de morfologia microtubular como moldes biológicos para deposição de nanopartículas metálicas foi investigada por poucos grupos de pesquisa em todo o mundo. A seguir, serão apresentados alguns trabalhos pioneiros no desenvolvimento de novos materiais utilizando a funcionalização de células fúngicas com nanopartículas metálicas.

O primeiro trabalho publicado sobre a integração de nanopartículas metálicas na superfície de fungos filamentosos foi publicado em 2003 por Mirkin et al. Os estudos conduzidos pelo grupo do Mirkin relataram a síntese de um biosistema híbrido constituído por hifas fúngicas e nanopartículas de ouro funcionalizadas com oligonucleotídeos. Nesta metodologia, esporos de várias espécies fúngicas são inoculados em um meio coloidal de nanopartículas de ouro pré-sintetizadas e estabilizadas por fragmentos de DNA. De modo que o crescimento axial do microrganismo possibilita a montagem *in vivo* de nanopartículas de ouro na parede celular fúngica, formando uma camada uniforme de NPs-Au sobre as referidas hifas. Além disso, foi relatado que tamanhos de nanopartículas diferentes podem ser automontadas na superfície do mesmo fungo, modificando apenas o tamanho das nanopartículas de ouro nos meios de cultivo. Assim, esse estudo inspirou outros grupos de pesquisa a investigar outras metodologias para integrar nanopartículas metálicas utilizando a superfície celular de fungos vivos, e a buscar aplicações para os novos materiais produzidos (MIRKIN, 2003).

Em 2007, o grupo de Dutta mostrou uma nova estratégia de auto-organização de nanopartículas de ouro sobre a superfície de uma espécie de fungo filamentoso durante o seu crescimento. Nesta metodologia, utiliza-se glutamato monossódico para o processo de redução do ácido cloroáurico em nanopartículas de ouro e como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento fúngico que permitem a formação das hifas microtubulares, de forma que as microestruturas sintetizadas possuem largura entre 1 a 2 μm e comprimento de vários milímetros. Esse trabalho foi o primeiro a descrever uma proposta de mecanismo para a formação dos bio-híbridos constituídos de nanopartículas metálicas suportadas na superfície de células vivas. Foi sugerido um processo de automontagem de nanopartículas de ouro sobre a superfície celular do fungo provocado pela depleção das moléculas estabilizadoras, as moléculas de glutamato, que também são a fonte nutricional do micro-organismo, de modo que as nanopartículas tendem a aglomerar-se na superfície micelar do fungo filamentoso, conforme apresentado na Figura 21-a. Além disso, essa pesquisa científica apresentou micrografias inéditas do biosistema constituído de nanopartículas de ouro e o fungo filamentoso. Contudo, analisando a Figura 21-b, verifica-se que a estrutura microtubular do micro-organismo fúngico não é preservada nas micrografias de MEV apresentadas no artigo, essas microestruturas estão colapsadas, resultando em uma

estrutura com morfologia parcialmente tubular. Os autores utilizaram ainda, um importante método de secagem, denominado método de secagem ao ponto crítico do dióxido de carbono, de modo a preservar a estrutura biológica. De modo que, o conhecimento sobre o referido método de secagem foi um fator importante no desenvolvimento de microtubos de ouro utilizados na presente tese (SUGUNAN, 2007).

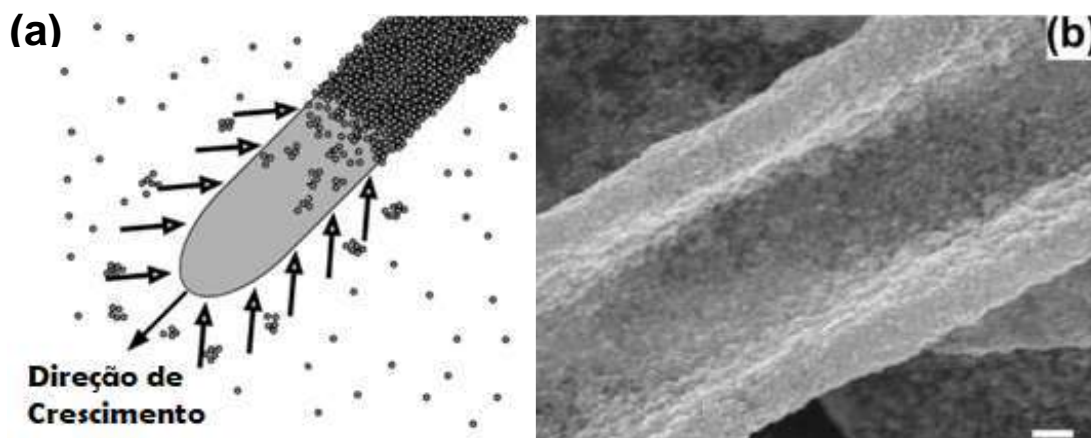


Figura 21 – Processo de deposição das nanopartículas na superfície micelar do fungo. Adaptado da referência (SUGUNAN, 2007).

Um ano após a publicação do trabalho do Sugunan et al., o grupo do professor Alexander Eychmuller, mostrou habilidade de várias espécies fúngicas (*Trichoderma viride*, *Penicillium citreonigrum*, *Neurospora crassa* e *Bjerkandera adusta*) em produzir diferentes biosistemas com a deposição de várias nanopartículas metálicas (Ag, Au, Pt e Pd) estabilizadas pelo ânion citrato sobre a superfície micelar do fungo. Apesar de todos os fungos estudados exibirem a habilidade de acumular nanopartículas em suas superfícies, essa pesquisa mostrou que a afinidade das nanopartículas metálicas sobre a superfície do fungo, varia com a espécie utilizada. Sugeriu-se que as referidas assimetrias, deve-se às diferenças na constituição da superfície celular e ao metabolismo de cada fungo utilizado no cultivo. Outro ponto importante nesse trabalho é que os fungos filamentosos têm uma maior afinidade por nanopartículas de ouro, nanopartículas de paládio, nanopartículas de platina e nanopartículas de prata, respectivamente. Contudo, a parte mais relevante dessa publicação versa sobre a aplicação do bio-híbrido produzido em estudos catalíticos. Em específico, o bio-híbrido constituído por fungo filamentoso e nanopartículas de platina, mostrou-se

cataliticamente ativo frente à reação de redução do hexacianoferrato (III) com tiosulfato de sódio (BIGALL, 2008).

Em 2011, Rehman et al. publicaram uma nova estratégia de imobilização de nanopartículas metálicas em fungo filamentoso no *Journal of Nanoparticle Research*. Esse trabalho, fundamentou-se nos princípios de Química Verde, o que significa utilizar uma rota de síntese com a redução de impacto ambiental. Assim, utilizou-se extrato de chá preto para sintetizar e estabilizar nanopartículas de ouro. Fragmentos do fungo filamentoso da espécie *Aspergillus niger* foram adicionados ao meio contendo nanopartículas de ouro durante 48-72 horas, após a formação do híbrido, os autores submeteram o material a um tratamento térmico à 550°C obtendo uma microestrutura porosa de ouro metálico. No entanto, as micrografias apresentadas mostraram que o material obtido após o tratamento térmico não preserva a estrutura mimética do modelo biológico, ou seja, as estruturas apresentadas estão colapsadas, não houve a formação de microtubos de ouro (REHMAN, 2011).

Numa linha cronológica, o próximo trabalho a apresentar o desenvolvimento de um biossistema baseado em células fúngicas e nanopartículas metálicas foi desenvolvido por Sabah et al., esse grupo desenvolveu um novo procedimento de síntese de bio-híbridos fungo/nanopartículas de ouro, utilizando glutamato monossódico como agente estabilizante das nanopartículas. Neste método, a deposição de nanopartículas de ouro nas células fúngicas foi controlada mediante a variação da concentração do glutamato monossódico e da temperatura de crescimento das células fúngicas com as nanopartículas metálicas, resultando em uma metodologia inédita que propicia o controle da arquitetura dos biossistemas formados, bem como a quantidade de matéria de partículas depositadas sobre a parede celular do fungo filamentoso (SABAH, 2012).

Sharma e Srivastava relataram a síntese de microestruturas híbridas constituídas de hifas e nanopartículas de ouro estabilizadas com aminoácidos (L-lisina e L-asparagina). Esses autores construíram um biossensor de glicose através da construção de um eletrodo de trabalho modificado com a implantação de híbrido fungo filamentoso/nanopartículas de ouro. Nesta metodologia, primeiramente, obteve-se o biossistema filamentos fúngicos/nanopartículas de ouro através do crescimento das células fúngicas em um meio rico de nanopartículas de ouro estabilizadas com aminoácidos. Esses biossistemas foram depositados na superfície do eletrodo de

trabalho com enzimas glicose oxidase imobilizando-as via ligação com a superfície micelar do fungo filamentoso recoberta com nanopartículas de ouro. Desse modo, construiu-se um biossensor capaz de detectar moléculas de glicose através da ação catalítica da enzima glicose oxidase que converte glicose à ácido glucônico com sensibilidade de $43,2 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$. Ademais, os autores propuseram uma explicação para o mecanismo de deposição de nanopartículas de ouro na superfície do fungo filamentoso. Sugeriu-se que, a superfície celular dos fungos filamentosos é carregada negativamente, devido à presença de grupos carboxílicos e fosfato. De modo que, a superfície celular do fungo interage com os aminoácidos que estabilizam as nanopartículas metálicas através de uma ligação peptídica com os grupos carboxílicos presentes na superfície das células fúngicas, propiciando assim, a deposição de nanopartículas metálicas na superfície das células vivas (SHARMA, 2013).

Em 2014, Fontes et al. realizou um estudo muito importante sobre a síntese de microtubos miméticos de ouro utilizando células fúngicas filamentosas como molde biológico. De modo mais detalhado, o grupo da Fontes *et al*, demonstrou êxito na formação de microestruturas constituídas por células fúngicas micelares (hifas) e nanopartículas de ouro estabilizadas pelo íon citrato, o qual também é utilizado como fonte de carbono para nutrição e crescimento do fungo. Estudos físico-químicos revelaram os efeitos da concentração de íons citrato no processo de automontagem de nanopartículas de ouro em quatro espécies de fungos filamentosos que produziram uma camada robusta de nanopartículas de ouro sobre a parede celular do fungo filamentoso, de modo que as referidas nanopartículas encontram-se embebidas na parede celular. Além disso, essa pesquisa revelou os parâmetros adequados para controlar a espessura de nanopartículas de ouro sobre a superfície celular e, conseqüentemente, a espessura dos microtubos obtidos, bem como a modulação das morfologias dos referidos microtubos com a variação da espécie fúngica utilizada. Nesse estudo, fez-se uma proposta de mecanismo, sugeriu-se que os componentes da parede celular, biopolímeros, tais como polissacarídeos baseados em 1,3- β -glucanas, estabilizam as nanopartículas de ouro através de interações intermoleculares durante o processo fisiológico, formando estruturas bioinspiradas de fungo/nanopartículas de ouro. As microestruturas híbridas obtidas foram calcinadas por uma rota simples de remoção da biomassa orgânica e as análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram a obtenção de inéditos microtubos de ouro

bioinspirados (FONTES, 2014), os quais são o foco de estudo para aplicação eletroquímica e espectroscópica dessa tese de doutorado.

No ano seguinte, 2015, Bhargava et al., demonstraram a aplicação catalítica de um bio-híbrido constituído por nanopartículas de ouro imobilizadas na superfície celular do fungo da espécie *Aspergillus japonicus*. Este estudo mostrou o potencial catalisador do bio-híbrido frente às reações de conversão do 4-nitrofenol à 4-amonifenol, do hexacianoferrato (III) à hexacianoferrato (II) e a bionanocatálise da propargilamina com rendimento de 80 % (BHARGAVA, 2015).

Em 2016, Zhu et al publicaram um artigo sobre uma estratégia universal para a produção de híbridos constituídos de macrosferas fúngicas e diversos materiais nanoparticulados. Esses autores mostraram a potencial aplicação dos bio-híbridos como materiais adsorventes, além de novas propriedades adquiridas, tais como propriedades magnéticas e fototérmicas, as quais são materiais atrativos para o desenvolvimento de sensores, entre outros (ZHU, 2016). No mesmo ano, Kubo e colaboradores desenvolveram um novo processo de obtenção de microtubos de ouro utilizando células fúngicas filamentosas como molde biológico através da inserção de fragmentos dos fungos das espécies *Penicillium brasilianum*, *Aspergillus aculeatus*, e *Xylaria sp.* numa suspensão formada por um meio de cultivo com alta concentração de dextrose (Czapek e BDA) e nanopartículas de ouro estabilizadas em citrato (13,1 nm). De modo que, a deposição de nanopartículas de ouro sobre a superfície da célula foi controlada através da troca da suspensão NP-Au/meio nutritivo a cada 5 dias. Essa metodologia melhorou significativamente a cinética de adsorção das nanopartículas de ouro, de modo que foi possível obter microestruturas de ouro com tempo máximo de 20 dias. Além disso, os estudos cinéticos evidenciaram que o metabolismo secundário dos fungos e o meio nutritivo utilizado durante o cultivo interferem, significativamente, no tempo de adsorção das NPs, no diâmetro, espessura e comprimento dos microtubos produzidos. Contudo, apesar dessa estratégia produzir uma melhoria no controle morfológico do microtubo em um tempo reduzido, verifica-se que a morfologia das microestruturas não preservam de modo fidedigno a morfologia do molde biológico, nota-se que os microtubos obtidos estão parcialmente deformados (KUBO, 2016). Ademais, não é possível identificar detalhes da estrutura fúngica, tais como esporos e esporângios, como demonstrado no trabalho da Fontes et al (FONTES, 2014).

Em 2019, o grupo do professor Ovidio Peña-Rodríguez publicou um trabalho sobre a funcionalização dos microtubos de ouro (2,0 - 4,0 µm de diâmetro) para o desenvolvimento de superfícies ativas ao SERS. O processo de síntese do material microtubular consiste no crescimento de fungos filamentosos das espécies *Trichoderma asperellum* e *Aspergillus sydowii* em nanopartículas de ouro formadas via redução com moléculas de D-Glucose e estabilização por moléculas D-Glucose e ácido D-glucônico. Assim, após 8 dias de inoculação, o material híbrido obtido tem o molde biológico removido por um processo de calcinação a 520°C, seguido de limpeza sonoquímica. A aplicação dos microtubos como substrato possibilitou a detecção de várias moléculas orgânicas em concentrações traço (1×10^{-9} mol L⁻¹) via fator de intensificação do SERS na ordem de 1×10^{10} . Os autores inferiram que os resultados obtidos se devem à superfície rugosa dos microtubos de ouro, os quais formam sítios ativos ao SERS e a quimissorção de moléculas orgânicas. Ademais, vale ressaltar que as micrografias de MEV apresentadas mostram microtubos de ouro isolados, mas não foram apresentadas imagens referentes ao mimetismo das estruturas complexas do molde biológico constituído pelos fungos filamentosos (PAL, 2019).

Recentemente, Fontes et al. publicaram um artigo na revista *Langmuir* intitulado “*Unveiling the Surface and the Ultrastructure of Palladized Fungal Biotemplates*”, o qual revela um importante avanço para a compreensão do processo de integração de materiais nanoparticulados com células de fungos filamentosos (FONTES, 2021). As autoras e autores realizaram uma caracterização criteriosa da morfologia de dois biosistemas constituídos por Fungos/NPs-Pd e Fungos/NPs-AuPd. De modo que, as imagens de MET revelaram um processo inédito de internalização de nanopartículas de paládio nos vacúolos da célula fúngica da espécie *Penicillium sp.*, formando um sistema promissor para reações catalíticas *in vivo*. Ademais, foi desenvolvido uma metodologia via técnica de redução de paládio sobre a superfície das nanopartículas de ouro previamente assimiladas pelo fungo filamentoso, culminando na produção de bio-híbridos constituídos de nanopartículas Au/Pd e células fúngicas, os quais são cataliticamente ativos na reação de hidrogenação de 3-metil-2-buten-1-ol. Adicionalmente, foi realizado um estudo minucioso da superfície do bio-híbrido, Fungo/NPs-AuPd, através de XPS, o qual indica a presença de íons Au⁺ e Pd²⁺ na parede celular do micro-organismo fúngico (FONTES, 2021).

3.5 Eletrodos de ouro com elevada área superficial

Eletrodos metálicos são materiais condutores que possuem alta estabilidade química (inertes) utilizados em processos de transferência de elétrons através da modulação da energia dos elétrons do eletrodo utilizando um potenciostato (ELGRISH, 2018). Assim, quando os elétrons no eletrodo possuem uma energia mais alta que o orbital molecular desocupado de energia mais baixa (LUMO) de uma espécie em solução, ocorre o processo de transferência heterogênea dos elétrons do eletrodo para a espécie, isto é, ocorre um processo de redução eletroquímica (ELGRISH, 2018).

A área superficial ativa de um eletrodo metálico é um fator determinante em muitas aplicações eletroquímicas (MORAG, 2016). Sendo assim, vários grupos de pesquisa têm desenvolvido metodologias com o escopo de produzir eletrodos de ouro com elevada área superficial (WITTSTOCK, 2012; JIA, 2007; JIA, 2009), uma vez que, segundo a equação de Randles-Sevcik (Equação 5), a intensidade de corrente para os sinais anódicos e catódicos é proporcional à área superficial do eletrodo (BARD, 2001).

$$\text{Equação 5: } i = 0,446nFAC \left(\frac{nFvD}{RT}\right)^{1/2}$$

Onde, i é a intensidade da corrente, v é a velocidade de varredura, n é o número de elétrons transferidos no processo redox, A é a área superficial do eletrodo, D é o coeficiente de difusão do analito submetido ao processo redox, T é a temperatura do sistema, R é a constante universal dos gases, F é a constante de Faraday e C é a concentração do analito na solução submetida ao processo eletroquímico (BARD, 2001).

Os eletrodos de ouro são utilizados em processos eletroquímicos devido à alta estabilidade química, excelente condutividade, ampla janela de potencial e região de dupla camada elétrica bem definida (PLOWMAN, 2011). À vista disso, alguns grupos de pesquisa têm dedicado atenção à produção de superfícies porosas de ouro, as quais possuem elevada área superficial, que propiciam uma taxa de transferência de elétrons maior que os eletrodos de ouro convencionais (superfície planar, onde a área

geométrica é igual a área superficial ativa). Assim, por definição, ouro nanoporoso é um material tridimensionalmente nanoestruturado, cujos poros possuem uma faixa de diâmetro entre 2 a 200 nm. Dessa maneira, os mesoporos possuem diâmetros entre 2 a 50 nm, e os macroporos, possuem tamanhos maiores, na faixa de 51 a 200 nm. Insta esclarecer, que os poros possuem aberturas interconectadas por ligamentos e não são perfeitamente circulares (WITTSTOCK, 2012; BHATTARAI, 2018). Ressalta-se que a técnica mais utilizada para caracterizar superfícies nanoporosas de ouro tem sido a voltametria cíclica, pois permite determinar a área superficial do eletrodo e compreender a cinética na interface do eletrodo (BHATTARAI, 2018; PLOWMAN, 2011).

Ouro nanoporoso vem sendo aplicado no desenvolvimento de catalisadores de alta performance (WITTSTOCK, 2012; SUKERI, 2018), biossensores enzimáticos, sensores de DNA (XIAO, 2016, CHEN, 2012), sensores de substâncias tóxicas, tais como nitrofenóis (LIU, 2009) e hidrazina (YAN, 2011), detecção de drogas ilícitas como a cocaína (TAVAKKOLI, 2019), detector eletroquímico de aminoácidos para diagnose de doenças como o câncer (LIU, 2012), desenvolvimento de materiais para armazenamento e conversão de energia em projetos de energias renováveis (GONÇALVES, 2021), e no desenvolvimento de eletrodos de alta área superficial (BHATTARAI, 2018), o qual é o um dos escopos dessa tese de doutoramento.

Em 2007, foi publicado um artigo no periódico *Chemical of Materials* sobre a fabricação de filmes de ouro nanoporoso para aplicação como eletrodo de alta área superficial. Jia *et al.* relataram um método eletroquímico de produção da superfície nanoestruturada, a qual consiste na aplicação de varreduras multicíclicas em potenciais definidos e velocidade de 10 mV s^{-1} à uma superfície de ouro planar imersa numa solução eletrolítica constituída por ZnCl_2 e álcool benzílico. A deposição eletroquímica de zinco metálico seguida de dissolução eletroquímica produz uma superfície nanoestruturada que possui alta área superficial, excelente atividade eletroquímica e seletividade à detecção de dopamina em concentração traço (JIA, 2007).

O grupo do professor Suresh Bhargava produziu um trabalho minucioso comparando o comportamento eletroquímico de eletrodos de ouro nanoporosos e eletrodos de ouro convencionais. Os autores demonstraram que os eletrodos porosos possuem sítios ativos os quais originam a atividade catalítica desses materiais e

possibilitam a formação de superfícies bimetálicas Au/Pt, Au/Pd e Au/Ag (PLOWMAN, 2011). Morag et al. também fabricaram eletrodos de ouro poroso utilizando uma rota de cristalização de tiocianato de ouro seguida por tratamento com plasma. Inicialmente, o complexo de ouro produz espontaneamente microfios através de um processo de automontagem. A submissão desses microfios ao plasma resulta em microfios nanoporosos de ouro com área superficial 340 vezes maior que o eletrodo planar (convencional) (MORAG, 2016).

Recentemente, uma superfície nanoporosa de ouro foi fabricada submetendo um eletrodo de ouro a um processo eletroquímico de anodização seguido de redução em ácido sulfúrico. O eletrodo produzido possui área superficial 15 vezes maior que o eletrodo de ouro convencional. Além disso, esses pesquisadores obtiveram resultados promissores na aplicação do eletrodo de alta área superficial fabricado frente à produção de um combustível sustentável, o gás hidrogênio, utilizando apenas uma solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (SUKERI, 2018).

3.6 Efeito SERS

Em 1928, Chandrasekhara Venkata Raman foi o primeiro a observar o fenômeno do espalhamento inelástico da luz, o qual possibilitou o desenvolvimento da Espectroscopia Raman (HOLLAS, 2004). A espectroscopia investiga a interação da radiação eletromagnética com a matéria com a finalidade de obter informações quantos aos níveis de energia de átomos e moléculas, bem como informações sobre simetria e ligações químicas (SALA, 2008).

A espectroscopia Raman fundamenta-se na detecção do espalhamento inelástico da luz quando uma molécula é irradiada por uma fonte monocromática de luz (SMITH, 2005). A rigor, o efeito Raman é oriundo da variação do momento de dipolo da molécula pelo campo elétrico da radiação incidente, de modo que a intensidade do espalhamento é proporcional a polarizabilidade da molécula (SALA, 2008; DE FARIA, 1999). Contudo, a espectroscopia Raman é uma técnica pouco sensível, devido a baixa secção de choque (SANT'ANA, 2006). Sendo assim, uma estratégia extraordinária tem sido aplicada para intensificar o espalhamento Raman e, conseqüentemente, melhorar a sensibilidade da técnica: O efeito SERS.

O efeito SERS – *Surface Enhanced Raman Scattering* – consiste na intensificação do espalhamento Raman de moléculas adsorvidas sobre uma superfície metálica (platina, ouro, cobre, prata ou paládio) rugosa (DE FARIA, 1999). Os mecanismos de intensificação são explicados por dois modelos principais, a) o modelo eletromagnético, e o b) modelo químico (DE FARIA, 1999).

- a) O modelo químico ou de transferência de carga, origina-se da interação do adsorbato com a superfície, de modo que são geradas modificações na polarizabilidade do adsorbato, devido ao processo de transferência de carga da superfície metálica para a espécie ligada à superfície (DE FARIA, 1999, SMITH, 2005). Contudo, insta esclarecer, que o modelo molecular contribui apenas em 2 ordens de magnitude para a intensificação total (SANT'ANNA, 2006);
- b) O modelo eletromagnético surge da intensificação do campo eletromagnético pela ressonância com o plasma de superfície (oscilação coletiva dos elétrons na estrutura metálica) (DE FARIA, 1999).

A rigor, o efeito SERS, deve-se à superfície nanoestruturada do substrato metálico, isto é, necessita-se que a superfície metálica possua poros com sítios ativos ao efeito de intensificação do espalhamento inelástico, de maneira mais detalhada, os sítios ativos, referem-se às lacunas com menos de 10 nm nas estruturas porosas de ouro ou prata (LEE, 2021). Quian et al. publicaram um trabalho que mostrou que quanto menor o tamanho dos poros na nanoestrutura metálica, maior o efeito de intensificação do espalhamento inelástico por SERS, especificamente, nanoporos com dimensões entre 5 - 10 nm (QUIAN, 2007). Assim essas nanoestruturas plasmônicas amplificam o espalhamento através de mecanismo de transferência de carga e/ou eletromagnético (LEE, 2021). A partir dessa premissa, muitos grupos de pesquisa vêm desenvolvendo metodologias para a fabricação de superfícies nanoestruturadas ativas ao efeito SERS, já que desenvolver um substrato ativo ao SERS, significa aumentar a sensibilidade da técnica à análises de substâncias em concentração traço (FANG, 2014), como por exemplo, poluentes ambientais, ou para o desenvolvimento de biossensores para detecção de câncer (ZHANG, 2018),

detecção de moléculas de interesse biológico como DNA (MIN, 2011), ATP ou para detecção de HIV (LIU, 2017), entre outros.

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

Na Tabela 1 estão listados os reagentes utilizados nos experimentos. Em todos os cultivos microbiológicos e de preparo dos materiais, utilizou-se água purificada (13 $\mu\text{S}/\text{cm}$) através de um sistema Milli-Q (Millipore Ultra-Pure Water System).

Tabela 2 – Lista de substâncias usadas no trabalho.

Substâncias	Marca
Ácido tetracloroáurico (HAuCl_4)	Aldrich
Ácido hexacloroplatínico (H_2PtCl_6)	Aldrich
Ácido cítrico	Synth
Citrato de sódio	Synth
Borohidreto de sódio (NaBH_4)	Aldrich
Ácido ascórbico	Merck
Rodamina B	Merck
Ácido Sulfúrico (H_2SO_4)	Merck
Ácido Clorídrico (HCl)	Aldrich
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Synth

]

4.1 PROCEDIMENTOS PARA SÍNTESE DOS BIO-HÍBRIDOS

4.1.1 Cultivo das culturas em meio sólido nutritivo de BDA

Os fungos selecionados para esse trabalho de tese foram os fungos das espécies *Phialomyces macrosporus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus brasiliensis* e *Talaromyces pinophilus*, pois estes micro-organismos formam micélios fibrilares de morfologia microtubular, os quais produzem microtubos de área superficial elevada após a deposição de nanopartículas metálicas sobre a superfície celular (FONTES, 2014). Além disso, os fungos *Phialomyces macrosporus* e *Aspergillus niger* são fungos filamentosos que o grupo de pesquisa LBQM-UFBA vem estudando desde o início de 2010. O *Aspergillus niger* foi comprado da Fundação André Toselo (linhagem ATCC), os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Talaromyces pinophilus* foram adquiridos do Muséum national d'Histoire Naturelle em Paris-França e o *Phialomyces macrosporus* foi isolado de folhas em decomposição da planta *Manilkara salmani* na APA Lagoas do Abaeté em Salvador, Bahia, Brasil.

As culturas de fungos armazenadas na micoteca do LBQM-UFBA e do ITODYS-Université Paris VII, foram reativadas fazendo-se repique em placas de Petri contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura BDA (30% de batata, 1,5% de Agar e 2,0% de dextrose) (GERIS, 2002). Os fungos filamentosos foram incubados a 28°C por 7 dias. Na figura 22, pode-se observar as culturas obtidas.

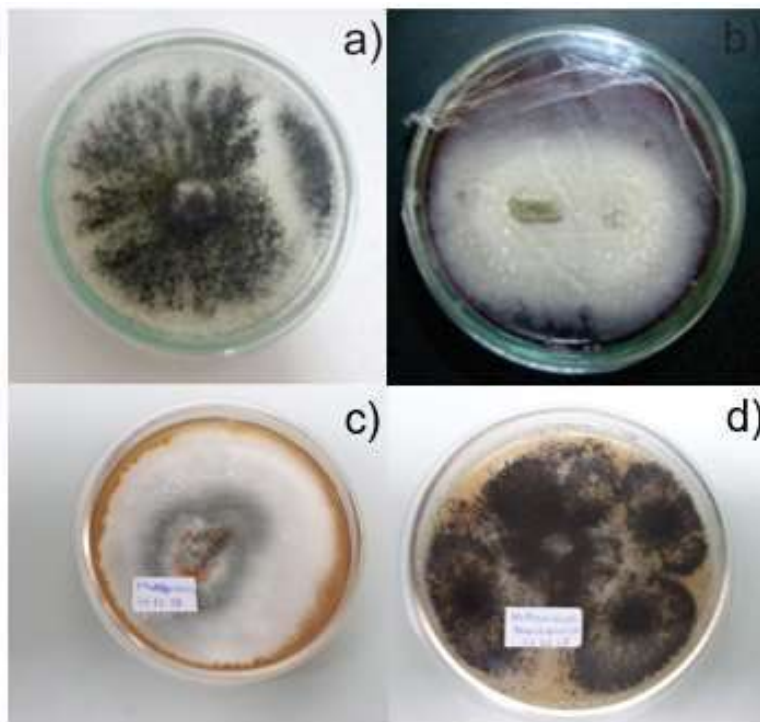


Figura 22 - Imagem digital das culturas cultivadas em meio nutritivo sólido BDA: a) *Aspergillus niger*, b) *Phialomyces macrosporus*, c) *Talaromyces pinophilus* e d) *Aspergillus brasiliensis*.

4.1.2 Pré-adaptação dos micro-organismos

Os fungos utilizados para síntese do bio-híbrido Fungo/NPs-Au foram cultivados de acordo com a metodologia descrita anteriormente por Bigall et al., 2008. Nesta metodologia, necessita-se de uma pré-adaptação do tecido micelial em um tampão de ácido cítrico e citrato de sódio, cujo pH é aproximadamente 5,7, seguida da inoculação na dispersão de nanopartículas de ouro estabilizadas em citrato recém-preparadas. Então, pequenos pedaços do tecido micelial foram separados e incubados em temperatura ambiente em meio líquido contendo 1% de citrato de sódio e 0,05% de ácido cítrico por um tempo médio de 30 dias sob condições estéreis para pré-adaptação (Bigall, 2008). Posteriormente, pequenos pedaços de micélio e /ou esporos foram coletados e adicionados a solução contendo nanopartículas de ouro em uma concentração específica de citrato de sódio, $\text{Citrato:Au} = 7,1$, (Fontes et al. relataram que a referida concentração é a melhor condição para deposição de nanopartículas de ouro no micro-organismo, formando assim, microtubos de ouro com paredes mais espessas e superfície irregular) (FONTES, 2014), e foram mantidas em uma incubadora em modo estático a 28°C por 60 dias. Após este período, as estruturas

híbridas de nanopartículas/microrganismos foram separadas, lavadas copiosamente com água ultrapura e armazenadas em propanona para secagem ao ponto crítico e caracterizações.

4.1.3 Preparo da suspensão de esporos

A suspensão de esporos foi utilizada no preparo dos bio-híbridos de Fungo/NPs-Pt. Esporos são as unidades de reprodução do fungo que em meio nutritivo germinará produzindo a elongação da parede celular fúngica originando assim, as hifas de morfologia microtubular. Então, na capela de fluxo laminar e com ambiente previamente esterilizado (etanol a 70% e radiação ultravioleta por 20 minutos), com o auxílio de um bisturi esterilizado e sob chama oxidante de um bico de Bünsen, os fungos foram repicados da cultura preparada previamente (item 4.1.1) e transferido para um tubo contendo 10 mL de água deionizada esterilizada. De modo a dispersar os esporos, submeteu-se o tubo tampado à agitação vigorosa utilizando um vortex. A Figura 23 mostra as suspensões de esporos obtidas.

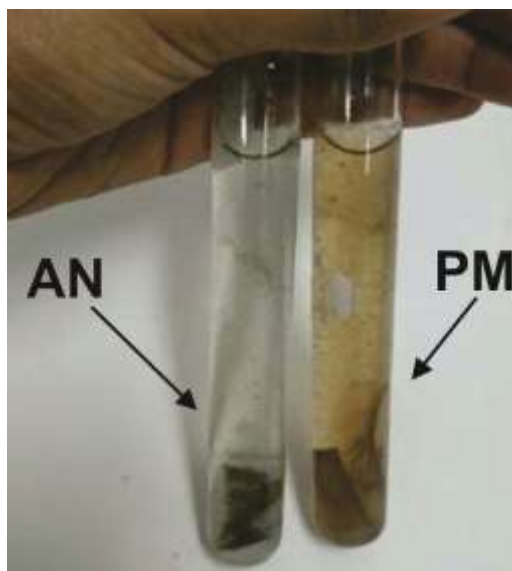


Figura 23 - Imagem digital das suspensões de esporos das espécies *Aspergillus niger* (AN) e *Phialomyces macrosporus* (PM).

4.1.4 Síntese de nanopartículas de ouro e platina

Antes da inoculação com o micélio fúngico, as soluções coloidais de ouro foram preparadas sob condições estéreis, de modo que a água deionizada, a solução de ácido cítrico e citrato de sódio, bem como as vidrarias a serem utilizadas foram todas esterilizadas por 20 minutos em autoclave sob 120°C e 2 atm. As nanopartículas de ouro foram preparadas através da redução química do ácido tetracloroáurico (HAuCl₄, Aldrich 99,999%) e do ácido hexacloroplatínico (H₂PtCl₆, Aldrich 99,999%), seguindo a metodologia descrita por Bigall *et al*, 2008 e Fontes *et al*, 2014 (BIGALL, 2008; FONTES, 2014). A solução utilizada em nossos experimentos foi preparada para obter 0,135 mmol do precursor de ouro (HAuCl₄) em um volume total de 500 mL. Assim, 1,135 mL de solução estoque de H₂PtCl₆ 0,1 mol. L⁻¹ ou de HAuCl₄ 0,1 mol L⁻¹ foi adicionada em água fervente sob intensa agitação magnética durante um minuto. Em seguida 1,1 mL da solução tampão contendo 1,0% de citrato de sódio dihidratado (Reagen) e 0,05% de ácido cítrico monohidratado (Merck) foram adicionados. Depois de 20 segundos, 2,75 mL solução de borohidreto de sódio a 0,08% recém-preparada (NaBH₄, Aldrich) contendo 1,0% de citrato de sódio e 0,05% de ácido cítrico foi adicionado. Logo após a adição do agente redutor a cor do sistema muda rapidamente de amarelo para vermelho vinho, o que é característico da formação de nanopartículas de ouro e de amarelo para marrom acinzentado para as nanopartículas de platina. A mistura foi mantida sob intensa agitação e fervura constante durante 15 minutos. Após esse período, a dispersão coloidal de ouro/platina foi arrefecida até a temperatura ambiente em repouso. Em seguida, adicionou-se 23,1 mL da solução tampão citrato de sódio 1%/ácido cítrico 0,05%.L A solução obtida apresentou razão final de [citrato]:[Au] = 7,1 e [citrato]:[Pt] = 7,1. Finalmente 50 mL destas soluções de NPs-Au e NPs-Pt foram dispensadas em frascos de Erlenmeyer de 125 mL para cultivar os fungos selecionados.

4.1.5 Síntese de dos bio-híbridos Fungo/NPs-Au.

Os fragmentos do tecido micelial pré-adaptado por 30 dias em solução tampão de citrato de sódio 1%/ácido cítrico 0,05 %, foram inoculados nos frascos erlermeyers de 125 mL contendo 50 mL das NPs-Au sob condições estéreis em fluxo laminar. Em

seguida, os fungos foram incubados durante 60 dias a 28°C em modo estático. Após o crescimento micelial durante este período, o bio-híbrido produzido foi lavado copiosamente com água deionizada esterilizada. Em seguida, os bio-híbridos foram transferidos para recipientes de penicilina de 15 mL previamente esterilizados contendo 10 mL de água deionizada esterilizada. Na Figura 24 pode-se observar alguns sistemas após o tempo de crescimento mencionado.

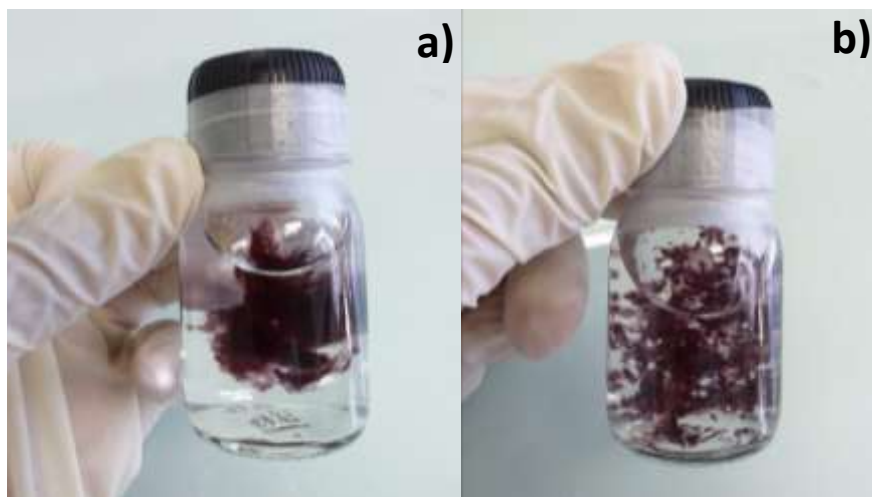


Figura 24 - Imagem digital dos bio-híbridos retirados da suspensão de nanopartículas de ouro, lavados e dispersos em água ultrapura esterilizada após 60 dias de crescimento a) *Talaromyces pinophilus* /NPs-Au e b) *Aspergillus brasiliensis*/NPs-Au.

4.1.6 Síntese de dos bio-híbridos Fungo/NPs-Pt.

Na capela de fluxo laminar, com o ambiente previamente esterilizado (etanol a 70% e radiação ultravioleta por 20 minutos) e sob chama oxidante de um bico de Bünsen, transferiu-se 25 mL de nanopartículas de platina recém-preparada e esterilizada para os Erlenmeyers esterilizados. Em seguida, os fungos foram inoculados, transferindo-se 100 µL da suspensão de esporos e 500 µL do meio nutritivo BD (extrato de batata e 2% de dextrose) para os referidos Erlenmeyers. Os sistemas foram armazenados a temperatura ambiente sob repouso por 5 dias. Após o período de crescimento mencionado, os materiais produzidos foram lavados copiosamente com água deionizada esterilizada e armazenados em frascos de penicilina contendo água deionizada esterilizada. Na Figura 25, pode-se observar a representação esquemática da síntese do bio-híbrido fungo/Nps-Pt. Insta esclarecer,

que no caso dos bio-híbridos de platina foi necessário a adição de BD (extrato de batata e 2% de dextrose), de modo a propiciar um meio de cultivo mais rico em fonte de carbono).



Figura 25 – Representação esquemática da síntese do bio-híbrido Fungo/Nps-Pt.

4.1.7 Secagem dos bio-híbridos ao ponto crítico do CO₂

De modo a preservar a estrutura tridimensional das células fúngicas, utilizou-se como método de secagem o ponto crítico. Este procedimento foi realizado no equipamento Leica EM CPD 030 em FIOCRUZ-BA.

Os bio-híbridos constituídos de fungo/NPs-Au e fungo/NPs-Pt foram desidratados previamente fazendo a imersão consecutiva dos mesmos em soluções contendo diferentes concentrações de etanol (50%, 70%, 90% e 100%) por 20 minutos. Os materiais foram transferidos para a câmara do equipamento de secagem ao ponto crítico do CO₂. Com a câmara vedada, em um volume de etanol, foi injetado o CO₂ líquido, fazendo-se 20 substituições para remoção total do etanol a temperatura abaixo de 9°C. Feito isso, elevou-se a temperatura dentro da câmara à 40°C (acima da temperatura crítica do CO₂) e, conseqüentemente, a densidade da fase líquida diminui. O aumento da pressão (para aproximadamente 70 atm) causa o aumento da densidade na fase gasosa, pois devido ao aumento gradual da temperatura, as moléculas adquirem energia cinética e se convertem em gás, o que aumenta a pressão interna na câmara. A proximidade da temperatura crítica significa que as densidades da fase gasosa e líquida são similares. Logo, quando o ponto crítico é

excedido, as fases gasosa e líquida apresentam a mesma densidade, garantindo que a temperatura está em torno de um valor crítico onde não há limites entre as fases (DEDAVID, 2007). Nessa situação, a tensão superficial é igual a zero e todo o líquido converteu-se em gás, evitando assim o efeito da tensão superficial sobre o bio-híbrido, de modo que a morfologia tridimensional do fungo filamentosos, bem como a parede celular, mantêm-se intactas. Insta esclarecer, que esse procedimento de secagem é fundamental para a obtenção dos microtubos de ouro biomiméticos.

4.2 SÍNTESE DOS MICROTUBOS METÁLICOS

4.2.1 Calcinação dos bio-híbridos Fungo/Nps-Au e Fungo/NPs-Pt

O procedimento de remoção do molde biológico foi otimizado em comparação ao procedimento de Fontes et al (FONTES, 2014). O referido artigo utilizou os resquícios do material obtido do estudo termogravimétrico. Na presente estratégia, utilizou-se um reator de calcinação constituído de quartzo, previamente limpo com água-régia recém-preparada para remoção de possíveis contaminantes. Em seguida, com o auxílio de uma pinça, os bio-híbridos secos ao ponto crítico do CO₂, foram colocados, cuidadosamente, no reator de quartzo e o sistema foi transferido para um forno de calcinação. Inicialmente, utilizou-se uma rampa de aquecimento de 6,67°C/minuto sob fluxo de nitrogênio de 30 mL/minuto até 800°C (2 horas). Em seguida, trocou-se o gás para ar sintético sob mesma vazão e foi mantido na mesma temperatura por 1 hora. O calcinado foi resfriado sob fluxo de ar sintético. Após o resfriamento à temperatura ambiente, os materiais foram removidos do reator e transferidos cuidadosamente para um frasco *ependorf* para posterior procedimento de limpeza dos microtubos.

4.2.2 Limpeza dos microtubos após a calcinação dos bio-híbridos de ouro

Os microtubos obtidos após a calcinação dos biohíbridos de Fungo/NPs-Au e Fungo/NPs-Pt foram imersos em HCl concentrado por 30 min. Seguido da lavagem dos microtubos em água deionizada, repetindo a lavagem por 10 vezes seguida de agitações sucessivas de 30 segundos. Depois deste tratamento, os microtubos foram imersos em uma solução 4 H₂SO₄: 1 H₂O₂ (solução piranha) a 0°C e em seguida,

foram aquecidos até 80°C durante 30 minutos. Após o arrefecimento, os microtubos foram lavados com água ultrapura por 10 vezes seguida de agitações sucessivas de 30 segundos. A secagem do material foi realizada em dessecador a vácuo por 3 dias. Salienta-se que a produção e manuseio da solução de H₂SO₄/H₂O₂ relatada acima, deve ser manuseada com extremo cuidado utilizando todos os EPIs.

4.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS BIO-HÍBRIDOS, MICROTUBOS METÁLICOS E NANOPARTÍCULAS DE OURO

A caracterização dos bio-híbridos Fungo/NPs-Au e Fungo/NPs-Pt foi realizada com o objetivo de comprovar a reprodutibilidade da formação dos bio-híbridos de ouro, constatar a formação inédita dos bio-híbridos de platina e analisar aspectos microestruturais que poderiam influenciar na produção dos microtubos metálicos. Além disso, em comparação ao trabalho de Fontes et al., novas espécies de fungos filamentosos foram utilizadas para a produção dos referidos bio-híbridos. Assim, caracterizou-se esses materiais utilizando MEV, EDS, MET e ATG. Após a remoção do molde biológico e limpeza dos microtubos, realizou-se a caracterização dos microtubos de ouro e platina obtidos através das técnicas de MEV e EDS. Realizou-se um estudo importante nesse trabalho, o qual foi analisar a estabilidade das nanopartículas de ouro frente aos metabólitos primários e secundários produzidos pelos fungos filamentosos das espécies *Talaromyces pinophilus* e *Aspergillus brasiliensis*, bem como avaliar o efeito da depleção de íons citrato no sistema durante o período de crescimento fúngico de sessenta dias. Assim, utilizou-se as técnicas de DLS, UV-Vis, pH e Potencial Zeta com as dispersões de nanopartículas de ouro estabilizadas em citrato a cada sete dias.

4. 3.1 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS BIO-HÍBRIDOS E MICROTUBOS METÁLICOS

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

Os bio-híbridos foram secos previamente utilizando o método de secagem ao ponto crítico do CO₂, empregando o equipamento Leica CPD 030, localizado no Serviço de Microscopia Eletrônica do centro de pesquisa Gonçalo Moniz-Fiocruz (item 5.6). Os microtubos metálicos foram obtidos previamente limpos e secos utilizando a metodologia descrita nos itens 4.9 e 4.10. As micrografias de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas utilizando o equipamento JEOL JSM-6610LV, localizado no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LAMUME), no Instituto de Física da UFBA. Os espectros de raios X e os mapas elementares foram obtidos utilizando o mesmo equipamento, o qual tem acoplado o detector de energia dispersiva de raios-X (EDS). Ademais, utilizou-se o equipamento de microscopia eletrônica de varredura Zeiss SEM-FEG (Zeiss SUPRA 40) no centro de pesquisa YTODYS da Université Paris VII em França.

4.3.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas no laboratório de microscopia eletrônica da FIOCRUZ-BA e no centro de pesquisa ITODYS-Université Paris VII, respectivamente com os equipamentos, microscópio eletrônico de transmissão JEOL modelo EM 12130 e microscópio de transmissão JEOL modelo 100CXII.

As amostras dos bio-híbridos Fungo/Pt e Fungo/Au foram submetidas ao processamento padrão de desidratação da amostra sem adição de fixadores (gluteraldeído) e pós-fixadores (tetróxido de ósmio) utilizando propanona, seguida de substituições sucessivas da mistura de propanona e resina Poly-Bed, até impregnação de 100% da resina na amostra sob agitação *overnight*, seguida de polimerização do bloco em eppendorf por 72 horas a 60°C. Após esse período, o bloco

contendo a amostra é desbastado utilizando uma lâmina até uma posição adequada para cortes ultrafinos no ultramicrótomo Leica EM UC6. Os cortes ultrafinos são dispostos em grades de cobre de 3 mm de espessura e 100 mesh.

4.3.1.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada com o sistema simultâneo TG/DTA da Labsys Evo da SETARAM no centro de pesquisas ITODYS na Université Paris VII. Os bio-híbridos e a massa micelial fúngica foram submetidos a uma curva de aquecimento controlada até 1000°C com taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, em fluxo de gás sintético a 100 mL.min⁻¹, utilizando cadinhos de platina como suporte para a termobalança.

4.3.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE DA SUSPENSÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

4.3.2.1 pH

O pH de todas as soluções de cultivo e das nanopartículas foi medido periodicamente a cada 7 dias ao longo de 2 meses do crescimento dos micro-organismos utilizando um pHmetro Hanna, modelo pH21.

4.3.2.2 Espalhamento de luz para análise do tamanho de partícula e Potencial Zeta

Analisou-se a distribuição do tamanho das nanopartículas de ouro, periodicamente a cada 7 dias durante 60 dias do crescimento fúngico. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur previamente esterilizada e sob fluxo laminar, foram retiradas pequenas alíquotas de nanopartículas de ouro dos sistemas em crescimento para análise do tamanho de partículas e do potencial Zeta, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZEN3500 no centro de pesquisas ITODYS – Université Paris VII, Paris – França.

4.3.2.3 Espectroscopia na região do UV-Vis

A obtenção dos espectros de UV-Vis das nanopartículas de ouro foi realizada periodicamente a cada 7 dias, durante 2 meses de crescimento dos fungos filamentosos. Uma pequena alíquota de nanopartículas de ouro foi transferida para uma cubeta para ser analisada utilizando o espectrofotômetro UV-Visível da PerkinElmer UV Winlab.

4. 4 TESTES DE APLICAÇÃO PARA OS MICROTUBOS DE OURO

4.4.1 Experimentos de aplicação dos microtubos de ouro como substrato para Espectroscopia Raman por Intensificação de Superfície (SERS)

Os microtubos de ouro obtidos foram utilizados como substrato para verificação do efeito SERS frente à Rodamina B em concentrações não detectadas pelo espectrômetro Raman sem efeito de amplificação por superfície, cuja concentração referida é de 10^{-8} mol L⁻¹. Assim, foram preparadas soluções de Rodamina B nas concentrações de 10^{-2} (padrão) e 10^{-8} mol L⁻¹. Os microtubos de ouro foram previamente limpos conforme a metodologia descrita no item 4.10. Em seguida, os microtubos foram imersos em 1 mL da solução de Rodamina B 10^{-8} mol.L⁻¹ por 2 h. Feito isso, os microtubos foram transferidos para uma lâmina de vidro e acoplado ao espectrômetro Raman para a realização das medidas.

As análises de espectroscopia Raman foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LAMUME) do Instituto de Física da UFBA. Os espectros foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Raman da JASCO, modelo NRS-5100 com fonte de laser emitindo radiação monocromática em 532 nm. O equipamento possui um microscópio ótico acoplado com três objetivas com aumentos de 50x, 200x e 1000x. Os materiais foram analisados no intervalo de 100 a 2000 cm⁻¹.

4.4.2 Experimentos de aplicação dos microtubos de ouro como eletrodos de alta área superficial

As medidas eletroquímicas de voltametria cíclica foram realizadas utilizando um potenciostato EG e G, modelo 273A da Princeton Applied Research. Para a realização dessas medidas fez-se uso de uma célula eletroquímica provida de uma tampa de teflon com quatro orifícios para adaptar a entrada de gás argônio e os três eletrodos: o eletrodo de referência, o eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho. Utilizou-se como eletrodo de trabalho os microtubos de ouro adaptados à pasta de grafite. Neste método, construiu-se um eletrodo constituído por um eletrodo modificado de teflon, pasta de grafite (gotas de óleo mineral homogeneizadas em grafite em pó) e adaptação minuciosa de microtubos de ouro na superfície da pasta de grafite. Como eletrodo de referência usou-se Ag/AgCl, como auxiliar, um fio de platina e como eletrodo comparativo frente às medidas realizadas com os microtubos de ouro, utilizou-se um eletrodo padrão de ouro com área física similar. O eletrólito de suporte utilizado foi uma solução de H_2SO_4 1 mol L^{-1} em 0,1 mol L^{-1} de sulfato de sódio. O eletrólito de suporte não apresenta nenhum processo redox na faixa de potencial avaliada. Todas as soluções foram submetidas ao borbulhamento de gás argônio de alta pureza.

As análises eletroquímicas foram realizadas no Laboratório coordenado pela professora Dra. Zênis Novais da Rocha do Instituto de Química – UFBA, utilizando o potenciostato EG e G, modelo 273A da Princeton Applied Research.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Muitos estudos têm sido dedicados à síntese de biosistemas constituídos por células fúngicas e nanopartículas de ouro (MIRKIN, 2003; SUGUNAN, 2007; BIGALL, 2008; SABAH, 2012; SHARMA, 2013; FONTES, 2014; BHARGAVA, 2015; KUBO 2016; PAL, 2019 e FONTES, 2021). De modo sucinto, o aproveitamento de células fúngicas como modelo biológico na síntese de bio-híbridos, constitui-se uma nova rota de obtenção de materiais os quais as nanopartículas metálicas são imobilizadas em superestruturas biológicas, de modo que as propriedades das nanopartículas metálicas são preservadas no novo material híbrido sintetizado, tais como propriedades plasmônicas e catalíticas (BIGALL, 2010). Apesar de as propostas desses trabalhos comprovarem a formação de uma superestrutura complexa de nanopartículas metálicas intimamente ligadas com a estrutura biológica, com propriedades físico-químicas diferenciadas, muitos aspectos científicos relevantes ainda não foram investigados. Por exemplo: (i) compreender a estabilidade das nanopartículas de ouro durante o crescimento fúngico à temperatura constante; (ii) o entendimento sobre a influência dos metabólitos produzidos pelo micro-organismo frente a dispersão das nanopartículas inicialmente sintetizadas, (iii) compreender o efeito da utilização das espécies *Talaromyces pinophilus* e *Aspergillus Brasiliensis* – espécies que não haviam sido estudadas frente à assimilação de nanopartículas de ouro – na produção de microestruturas de ouro, (iv) verificar como as nanopartículas de platina se dispõem sobre a superfície micelar utilizando uma metodologia inédita, bem como entender o efeito dessas nanopartículas de platina na estrutura final do microtubo biomimético.

À face do exposto, os resultados obtidos serão discutidos de modo a entender a estabilidade da suspensão de nanopartículas de ouro durante o cultivo das células fúngicas microtubulares ao longo de dois meses e comprovar a aplicação dos microtubos de ouro obtidos após a remoção do molde biológico como substrato SERS e eletrodo de alta área superficial. Adicionalmente, será comprovada a síntese de bio-híbridos constituídos de Fungo/NPs-Pt e microtubos de platina.

De modo mais específico, inicialmente serão apresentadas as análises de pH, potencial Zeta, Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Espectroscopia de absorção

na região do ultravioleta e visível das dispersões coloidais de ouro sob a influência do crescimento das células fúngicas, os quais compõem o estudo das suspensões das nanopartículas de ouro com o escopo de compreender a estabilidade das nanopartículas de ouro frente aos metabólitos primários e secundários produzidos pelos fungos filamentosos das espécies *Talaromyces pinophilus* e *Aspergillus brasiliensis*, bem como o efeito da depleção de íons citrato no sistema.

Uma nova estratégia de síntese de produção de microtubos de ouro foi desenvolvida. Dessa maneira, os aspectos microestruturais dos biosistemas Fungos/NPs-Au produzidos serão elucidados através das análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) no modo de elétrons secundários e retroespalhados.

Os resultados da análise termogravimétrica serão discutidos com o objetivo de avaliar a variação da massa dos bio-híbridos Fungo/NPs-Au, bem como comparar a quantidade de nanopartículas metálicas assimiladas por cada espécie. Após o tratamento térmico e limpeza dos materiais obtidos, utilizou-se a técnica de MEV com o intuito de elucidar os aspectos micromorfológicos dos microtubos de ouro sintetizados. Posteriormente, serão explanados os resultados dos estudos de aplicação dos microtubos de ouro como substrato para Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (SERS) utilizando Rodamina B em uma concentração traço. Em seguida, serão discutidos os resultados dos estudos realizados com o escopo de aplicar os microtubos de ouro como eletrodos de alta área superficial. Por fim, serão apresentados os dados de MEV, EDS e TEM os quais ratificam a síntese de bio-híbridos constituídos de Fungo/NPs-Pt utilizando a espécie *Phialomyces macrosporus*, através de um método otimizado de cultivo, o qual possibilitou a formação inédita de microtubos biomiméticos de platina.

5.1 ESTUDO DOS ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO SOB A INFLUÊNCIA DO CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO DURANTE O PROCESSO DE FORMAÇÃO DO BIO-HÍBRIDO FUNGO/NPsAu

5.1.1 Estudo da variação de pH nas suspensões de nanopartículas de ouro durante o crescimento das células fúngicas

Iniciou-se os estudos experimentais avaliando a estabilidade das dispersões coloidais de ouro mediante a análise de pH, potencial Zeta, tamanho de partícula e espectro Uv-Vis durante 2 meses de crescimento do fungo em nanopartículas de ouro estabilizadas em citrato, que ao final desse período, produziu o bio-híbrido Fungo/NPs-Au. Analisou-se a concentração de íons H_3O^+ nos sistemas estudados, de modo a avaliar a influência do crescimento do fungo sobre as nanopartículas de ouro. Avaliando a Tabela 2, evidencia-se os parâmetros utilizados na síntese dos bio-híbridos de ouro, bem como os valores de pH medidos durante 60 dias do crescimento do fungo das espécies *Talaromyces pinophilus* (TM) e *Aspergillus Brasiliensis* (AB) num meio rico em nanopartículas de ouro. Insta esclarecer que as referidas espécies foram selecionadas, pois são espécies de fungos filamentosos que ainda não haviam sido utilizadas para a produção de superestruturas híbridas.

Tabela 2 – pH das NPs-Au durante 2 meses de crescimento das espécies fúngicas

Amostra	pH inicial	pH (Dia 07)	pH (Dia 14)	pH (Dia 21)	pH (Dia 28)	pH (Dia 35)	pH (Dia 49)	pH (Dia 56)	pH (Dia 60)
NPs-Au	6,78	6,61	6,50	6,76	6,99	7,27	7,47	6,56	6,92
AB/Glicose	4,98	3,65	3,06	3,13	3,28	3,41	3,16	3,06	2,46
TM/Glicose	4,98	2,93	2,88	2,95	3,08	2,97	3,02	2,91	2,90
AB/NPs Au	6,78	6,73	6,58	6,66	7,08	7,27	7,61	7,52	7,30
TM/NPs Au	6,78	6,71	6,54	6,82	6,88	7,64	7,43	7,36	7,39

Constatou-se que nos sistemas que foram cultivados os fungos filamentosos em um meio nutritivo de glicose sem as nanopartículas de ouro, obteve-se uma diminuição gradual do pH ao longo dos 60 dias de incubação das espécies *Talaromyces pinophilus* e *Aspergillus brasiliensis*, indicando o aumento da concentração de espécies H_3O^+ nos sistemas. Os fungos filamentosos produzem uma ampla variedade de metabólitos durante o seu crescimento, sendo os de maior impacto biotecnológico, os metabólitos secundários incluindo antibióticos como a penicilina, antifúngicos, imunossuppressores, hormônios e promotores (PERKSEL, 2003; WEBSTER, 2007; TISCH, 2010). Além desses metabólitos secundários, durante o seu desenvolvimento, o fungo filamentoso produz várias substâncias durante o seu processo metabólico, denominadas metabólitos primários, tais como o ácido cítrico, ácido glucônico e aminoácidos (PERKSEL, 2003; TISCH, 2010). Logo, sugere-se que a variação do potencial hidrogeniônico nos sistemas em estudo, deve-se à produção de metabólitos primários acídicos que se ionizam na solução aquosa formando íons H_3O^+ , por conseguinte, provoca a elevação da concentração da referida espécie no sistema. De fato, o trabalho de Perksel e Kubicek, mostrou que a espécie *Aspergillus* produz elevadas concentrações de ácido cítrico como metabólito primário (PERKSEL, 2003; TISCH, 2010). Além disso, propõe-se que o fluxo de íons H_3O^+ (Figura 26) produzido durante o desenvolvimento das células fúngicas para o transporte ativo de nutrientes, pode ter um efeito contributivo para a acidificação dos sistemas em estudo (WEBSTER, 2007; MACIEL, 2016).

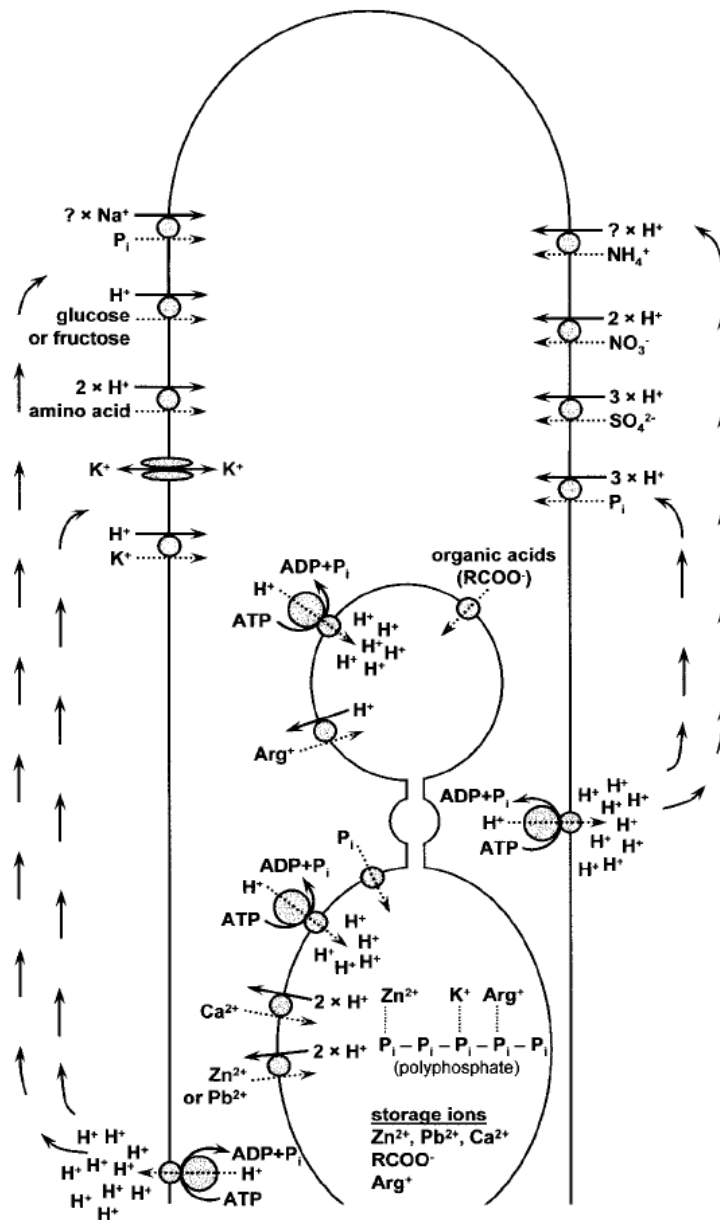


Figura 26 – Fluxo de íons no crescimento da hifa. O gradiente do próton (H⁺) através da membrana plasmática é gerado pela expulsão subapical ATP dirigente. É utilizado principalmente para o transporte ativo de nutrientes e o canal para K⁺ compensa os desequilíbrios de cargas. As setas tracejadas indicam o movimento de um soluto contra o gradiente de concentração; as setas cheias indicam o movimento do soluto de um meio concentrado para um meio diluído. Adaptado da referência (PERKSEL, 2003).

Entretanto, analisando a Tabela 2, verifica-se que os fungos filamentosos crescidos no meio coloidal de nanopartículas de ouro, sistemas AB/NPs-Au e TM/NPs-Au, não apresentaram variações bruscas de pH durante os 60 dias de crescimento do fungo filamentoso. De modo análogo, constatou-se que as dispersões coloidais de nanopartículas de ouro não exibiram variações de pH apreciáveis, manteve-se

praticamente constante ao longo dos 60 dias analisados. Essas inferências podem ser explicadas, devido à adição do tampão citrato/ácido cítrico oriundo da síntese e estabilização das nanopartículas metálicas de ouro. Sistemas tampões têm a capacidade de resistir às variações de pH quando são adicionadas pequenas quantidades de ácido ou base (CHANG, 2002). Sendo assim, apesar de ocorrer a produção de metabólitos primários ácidos durante o crescimento do fungo filamentosos, os quais se ionizam e produzem íons H_3O^+ no meio, a presença do tampão citrato/ácido cítrico provoca a estabilização do pH nos referidos sistemas. Além disso, o tampão é utilizado para manter o pH do meio neutro, pois a variação de potencial hidrogeniônico no meio altera o mecanismo de formação das nanopartículas de ouro, bem como a estabilidade das referidas nanopartículas (MUANGNAPOH, 2010).

Sabah et al. foi o único grupo que relatou um estudo com o objetivo de avaliar a variação de pH durante o crescimento de células fúngicas na suspensão de nanopartículas de ouro. Contudo, salienta-se que o processo de auto-organização das nanopartículas de ouro na superfície micelar utiliza uma suspensão de nanopartículas estabilizadas por glutamato sem adição de tampão no sistema. Os autores verificaram que há um aumento gradual do pH da suspensão de nanopartículas com o crescimento do micro-organismo fúngico (pH ~ 3 a > 7), ou seja, há uma tendência ao aumento da basicidade do meio de cultivo, ao contrário do que foi elucidado durante os estudos dessa tese. Segundo os autores, isto ocorre devido ao crescimento do micro-organismo que utiliza o estabilizante das nanopartículas, o íon glutamato, como nutriente, ocasionando assim, a redução de glutamato no sistema. O glutamato é quebrado em moléculas menores como aminoácidos (valina, metionina, isoleucina, leucina e GABA), que posteriormente são metabolizadas à moléculas menores, de modo que nesse processo ocorre a produção de íons hidroxila os quais conferem basicidade à suspensão de nanopartículas de ouro (SABAH, 2012).

Outro trabalho que relatou um estudo sobre a estabilidade de nanopartículas de ouro utilizando o pH como parâmetro foi desenvolvido por Basso et al. Os referidos autores e autora publicaram um artigo sobre o estudo da estabilidade das nanopartículas de ouro estabilizadas por citrato sem adição de um sistema tamponante durante um processo de envelhecimento da suspensão de 12 meses. Verificou-se que ao longo dos meses, o pH das suspensões à temperatura ambiente

aumentam gradativamente para valores básicos (8,3 – 8,8), conseqüentemente, ocorre o processo de agregação das referidas nanopartículas metálicas. Assim, constatou-se, que o ajuste do pH após a síntese das nanopartículas de ouro não garante a estabilidade e dispersão das nanopartículas de ouro (BASSO, 2020).

Diante do exposto, os estudos quanto à variação de pH nas suspensões de nanopartículas de ouro estabilizadas pelo íon citrato mostraram que, embora ocorra um processo de depleção do pH para os sistemas cultivados em glicose ocasionado pela produção de metabólitos acídicos, o pH das nanopartículas de ouro permanece praticamente inalterado durante os 60 dias de crescimento do fungo e durante o envelhecimento das nanopartículas de ouro, devido ao tampão citrato/ácido cítrico adicionado.

5.1.2 Estudo da variação de Potencial Zeta nas suspensões de nanopartículas de ouro durante o crescimento das células fúngicas

Efetua-se medidas referentes ao tamanho das partículas e potencial Zeta das nanopartículas de ouro para compreender a estabilidade das nanopartículas de ouro durante o crescimento das células fúngicas à temperatura constante. Para desenvolver uma interpretação adequada frente aos resultados obtidos, torna-se necessário compreender a formação e o processo de estabilização das nanopartículas de ouro. Inicialmente, utiliza-se um precursor de íons Au^{3+} numa solução aquosa que frente à forte ação redutora do borohidreto de sódio, reduz-se à Au no estado de oxidação zero em meio à uma solução rica em íons citrato, conforme a equação química balanceada abaixo.

Equação 6:



Os íons citrato adsorvem na superfície das nanopartículas de ouro, tornando-as carregadas negativamente, de modo que a estabilização ocorre por repulsão eletrostática (TURKEVICH, 1951). De modo mais detalhado, durante o mecanismo de crescimento das nanopartículas ocorre a formação de uma dupla camada elétrica pelos efeitos de difusão (POLTE, 2010). Assim, ocorre um efeito de repulsão coulombiana entre as partículas que são contrárias às forças atrativas de Van der Waals, as quais promovem a agregação irreversível das nanopartículas, gerando a precipitação da suspensão coloidal. Quando há uma densidade de carga superficial na partícula suficiente para que as forças repulsivas sejam mais intensas que as forças atrativas de Van der Waals, tem-se a estabilização das nanopartículas de ouro por efeito eletrostático (ROUCOUX, 2002).

Analisando a Tabela 3, verifica-se os valores das medidas de potencial Zeta dos sistemas durante 60 dias do crescimento das espécies *Talaromyces pinophilus* (TM) e *Aspergillus Brasiliensis* (AB) num meio rico em nanopartículas de ouro e ânions citrato. Nota-se que para todos os sistemas há uma diminuição gradual do potencial Zeta com o decorrer dos 60 dias analisados. A rigor, o potencial Zeta é a medida do potencial eletrostático da dupla camada elétrica ao redor da nanopartícula (MECNEIL,

2011), nanopartículas de ouro com valores de potencial Zeta abaixo de -20 e acima de 20 mV possuem repulsão eletrostática suficiente entre as nanopartículas para permanecerem estáveis na dispersão (DE SOUZA, 2019). Além disso, nanopartículas com valores menores que -30 mV são denominadas partículas fortemente aniônicas, enquanto nanopartículas com valores de potencial Zeta entre -10 mV e 10 mV são consideradas neutras. (MECNEIL, 2011). Sendo assim, pode-se inferir que todos os sistemas permaneceram estáveis frente ao crescimento do fungo durante os 60 dias, exceto o sistema TM/Au, o qual apresentou valores de potencial Zeta abaixo de -20 mV após 60 dias de crescimento fúngico.

Tabela 3 – Variação do Potencial Zeta das NPs-Au durante 2 meses de crescimento das espécies fúngicas

Amostra	P. Zeta (mV) Inicial	P. Zeta (mV) Dia 07	P. Zeta (mV) Dia 14	P. Zeta (mV) Dia 21	P. Zeta (mV) Dia 28	P. Zeta (mV) Dia 35	P. Zeta (mV) Dia 49	P. Zeta (mV) Dia 56	P. Zeta (mV) Dia 60
NPs-Au	-31,7 (± 7,12)	-35 (± 11,5)	-39,6 (± 9,24)	-40,6 (± 5,29)	-44,4 (± 4,79)	-37,8 (± 4,91)	-35,1 (± 5,6)	-32,7 (± 5,87)	-26,9 (± 8,36)
AB/NPAu	-31,7 (± 7,12)	-46 (± 5,72) Ct1	-43,1 (± 5,35)	-49,6 (± 4,61)	-32,7 (± 5,05)	-48,7 (± 4,48)	-41,8 (± 5,44)	-41,2 (± 7,1)	-32,2 (± 9,75)
TM/NPAu	-31,7 (± 7,12)	-25,6 (± 16,9)	-23,3 (± 12,9)	-21,2 (± 18,8)	-36,3 (± 11,7)	-39,7 (± 9,99)	-27,2 (± 11,1)	-22,4 (± 12,7)	-15,3 (± 14,6)

A alta estabilidade das nanopartículas de ouro se deve à elevada concentração de íons citrato no meio, especificamente, utiliza-se uma concentração de ânions citrato 7,1 vezes maior que a concentração de espécies de ouro. De acordo com Turkevich (TURKEVICH, 1951), o aumento da concentração de íons citrato no meio da redução química provoca a diminuição no tamanho das nanopartículas formadas, devido ao efeito de maior estabilização das nanopartículas oriundo das forças de repulsão eletrostática entre as partículas com ânions citrato adsorvidos na superfície plasmônica. Assim, constata-se que a suspensão coloidal de nanopartículas de ouro é fortemente aniônica (potencial Zeta igual a -31,7 mV) e estável. Em comparação, Zhu et al relataram que o potencial zeta das nanopartículas de ouro estabilizadas por citrato através do método de síntese de Frens (FRENS, 1973), também é negativo, cujo valor obtido é $-23,82 \pm 4,32$ (ZHU, 2016), corroborando os dados obtidos. Contudo, conforme descrito anteriormente, o sistema constituído pelo cultivo do fungo *Talaromyces pinophilus* em nanopartículas de ouro estabilizadas por citrato (sistema TM/NpAu) apresentou um valor de potencial Zeta de -17,6 (dia 56) e -15,3 (dia 60), o que significa que esses sistemas são instáveis, ou seja, que as forças de repulsão eletrostáticas entre as partículas estabilizadas por citrato são mais fracas que as forças de atração, de modo que as nanopartículas tendem à agregação irreversível e a precipitação da suspensão coloidal.

É importante ressaltar que as células fúngicas são micro-organismos dinâmicos capazes de suportar condições extremas de cultivo durante o crescimento, tais como variações bruscas de pH e baixa disponibilidade de nutrientes (SOLOMON, 2008). Além disso, sabe-se que os ânions citrato agem como estabilizante das nanopartículas de ouro e como fonte de nutrientes para o desenvolvimento das células fúngicas microtubulares (FONTES, 2014). Então, durante o crescimento fúngico, o citrato é consumido, de modo que a concentração dos ânions citrato na dispersão coloidal tende a diminuir gradualmente com o crescimento do fungo. Desse modo, quanto menor a concentração de íons citrato no meio, menor o número de ânions disponíveis para efetuar a estabilização das nanopartículas de ouro por efeito eletrostático, o que explica a tendência da diminuição do potencial Zeta com o decorrer dos 60 dias de crescimento das células fúngicas. Ademais, sabe-se que os fungos filamentosos produzem metabólitos primários e secundários durante o cultivo (ácidos orgânicos, álcoois, enzimas, antibióticos, pigmentos, hormônios, toxinas, entre outros)

(KAVANAGH, 2011), de modo que a presença dessas moléculas pode contribuir no processo de desestabilização das nanopartículas de ouro na dispersão coloidal, pois a superfície das nanopartículas de ouro têm a capacidade interagir com diversas espécies moleculares, tais como polímeros naturais, DNA, RNA, açúcares, peptídeos, vitaminas, dendrímeros, proteínas, lipídios, mercaptanas, entre outros (SPERLING, 2010). Por exemplo, grupos tiol têm uma alta afinidade com a superfície plasmônica de nanopartículas de ouro (aproximadamente 200 KJ.mol⁻¹) (LOVE, 2005). Além disso, Sugunan et al. efetuaram um experimento elucidando que a interação Au-S são tão intensas quando comparadas ao estabilizante glutamato e os constituintes da parede celular do micro-organismo fúngico, que fungos filamentosos crescidos num sistema de nanopartículas de ouro estabilizadas com grupos tióis não apresentaram processo de automontagem das referidas nanopartículas na superfície micelar do micro-organismo (SUGUNAN, 2007). Adicionalmente, é possível que as moléculas produzidas pelo metabolismo fúngico possuam maior afinidade frente à superfície plasmônica da nanopartícula de ouro, deslocando as moléculas de citrato adsorvidas na superfície (SPERLING, 2010). Nessa conformidade, sugere-se que a variação de moléculas adsorvidas na superfície, bem como sua quantidade, pode ocasionar a desestabilização das nanopartículas, favorecendo assim o aumento gradual do potencial zeta ao decorrer dos 60 dias do crescimento fúngico.

Em comparação com as análises inferidas, Sugunam et al relataram que durante o crescimento do fungo ocorre uma diminuição significativa de ânions glutamato que agem como estabilizantes das nanopartículas de ouro, pois o fungo utiliza o referido ânion como nutriente. Assim, ocorre a desestabilização da carga superficial das nanopartículas de ouro ao longo do crescimento do micro-organismo. Segundo esses autores as cargas das nanopartículas variam de -30 mV a +40 mV, causando a aglomeração das nanopartículas de ouro no sistema. Contudo, embora o sistema utilizado na presente tese seja constituído de nanopartículas de ouro estabilizadas por ânions citrato, o mecanismo de deposição das nanopartículas é análogo. Dessa maneira, verifica-se que os dados apresentados por Sugunam estão em desacordo com os dados apresentados acima para o sistema estudado nessa tese, pois o sistema do Sugunam et al, infere que a carga superficial final das nanopartículas é fortemente catiônica, positiva, com o valor de +40 mV. A rigor, nanopartículas de ouro com valores de potencial Zeta abaixo de -20 mV e acima de

20 mV, possuem repulsão eletrostática suficiente entre as nanopartículas para permanecerem estáveis na dispersão (DE SOUZA, 2019), frente ao exposto, não se compreende o porquê as referidas nanopartículas se desestabilizam ocasionando o processo de aglomeração com potencial zeta final de +40 mV (Sugunam, 2007)). Além disso, a análise dos dados de potencial zeta que compõem essa tese, mostraram que a depleção de ânions citrato, que assim como o glutamato é nutriente do fungo filamentoso, ocasiona o aumento do potencial zeta para valores menos negativos, devido ao processo de desestabilização anteriormente discutido. As medidas de DLS que serão discutidas a seguir, mostram que o processo de aglomeração é consistente com os dados de potencial zeta, contudo, os valores da carga superficial das nanopartículas de ouro mantêm-se negativos ao final do crescimento do fungo.

5.1.3 Estudo da variação do tamanho de partículas nas suspensões de nanopartículas de ouro (Espalhamento Dinâmico de luz - DLS)

O espalhamento dinâmico de luz é uma técnica que permite determinar o diâmetro das partículas coloidais de morfologia esférica pelo espalhamento da luz, devido ao movimento Browniano das partículas dispersas em fase líquida (BHATTACHARJEE, 2016). Partículas pequenas, movem-se rapidamente, enquanto partículas grandes, movem-se lentamente. De modo que o DLS relaciona o coeficiente de difusão oriundo do movimento browniano das partículas com a equação de Stokes-Einstein para determinar o diâmetro das partículas em um meio líquido (MALVERN, 2004; BHATTACHARJEE, 2016). À vista disso, mediu-se a distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico para o sistema controle (nanopartículas de ouro estabilizadas com ânions citrato) e as dispersões de nanopartículas de ouro sob a ação do crescimento das células fúngicas durante um período de 2 meses.

A Figura 27 mostra a distribuição do tamanho de nanopartículas de ouro recém-preparadas e após um período de 60 dias. Analisando as curvas de distribuição de diâmetros, nota-se que as nanopartículas metálicas passaram por um processo de agregação gradual durante o envelhecimento das nanopartículas de ouro, isto é, houve um sutil crescimento do diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas metálicas de ouro. O diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas de ouro recém-sintetizadas passa de 7,5 nm à 8,7 nm após 60 dias. Esse fenômeno ocorre

devido à alta energia superficial oriunda dos efeitos de superfície e confinamento quântico (quanto menor o tamanho da nanopartícula metálica, maior a energia livre Gibbs), os quais tornam as nanopartículas de ouro termodinamicamente instáveis (ROUCOUX, 2002). À vista disso, há uma tendência natural de as referidas nanopartículas sofrerem um processo de agregação.

Os diâmetros das nanopartículas de ouro medidos são menores que os valores relatados por Bigall et al. e Fontes et al., os quais são os trabalhos que fundamentam a metodologia de produção das nanopartículas de ouro da presente tese de doutorado. O grupo do professor Eychmüller determinou o diâmetro das nanopartículas de ouro através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, cuja distribuição de tamanho de nanopartículas foi de 23 nm. Ao passo que, Fontes et al. apresentaram através de cálculos utilizando o espectro UV-Vis das suspensões, que o diâmetro médio das nanopartículas de ouro possui 29,9 nm para a mesma razão Citrato/Au utilizada nessa tese ([citrato]:[Au] = 7,1).

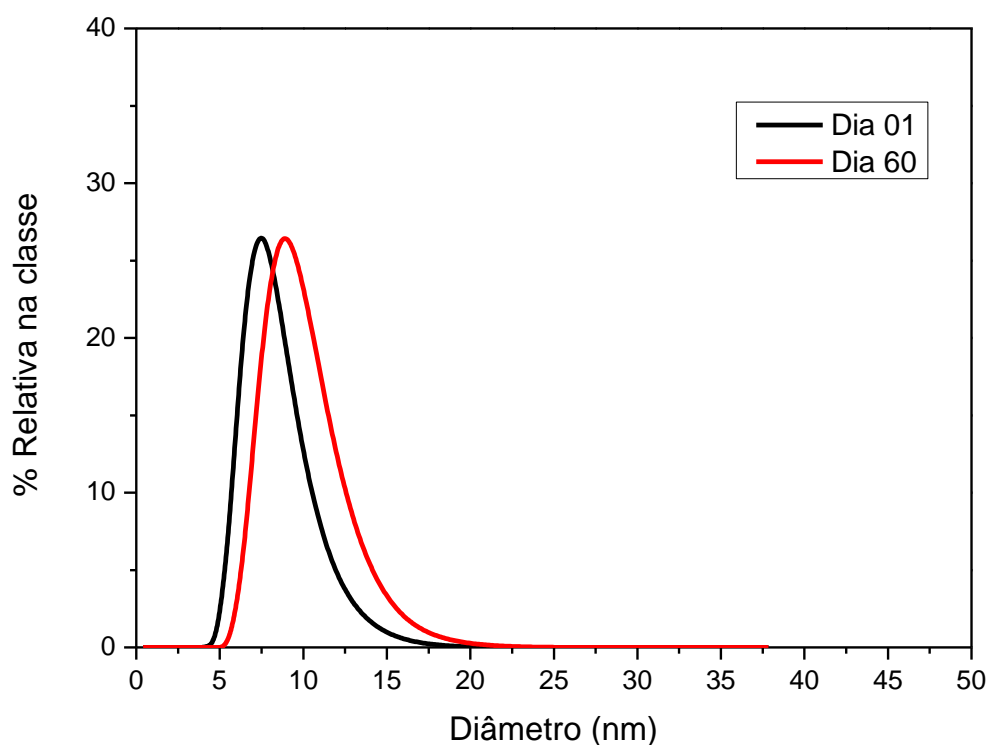


Figura 27 – Curvas de distribuição de classes de diâmetro em número obtidas pelo espalhamento de luz dinâmico das nanopartículas de ouro recém-preparadas e após 60 dias a 28°C.

A determinação do diâmetro médio das nanopartículas de ouro durante o cultivo do fungo permite analisar a influência do crescimento celular no tamanho das nanopartículas. Assim, observando as curvas de distribuição de diâmetros das nanopartículas de ouro sob a ação do crescimento do fungo *Aspergillus brasiliensis* (AB/NP-Au) durante um período de 60 dias (Figura 28), constata-se que as partículas nanométricas passam por uma leve dispersão, de modo que o diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas de ouro é de 8,7 nm ao final dos 60 dias de cultivo. De modo análogo, as curvas de distribuição de classes para as nanopartículas de ouro sob o cultivo do fungo *Taloromyces pinophilus* após 2 meses de cultivo (Figura 29) apresentaram uma dispersão mais acentuada com as curvas de distribuição de diâmetros médio das nanopartículas igual a 10,1 nm. Esses dados obtidos corroboram as análises de potencial Zeta realizadas, as quais indicam que há uma diminuição da estabilidade da dispersão coloidal de ouro com o decorrer dos 60 dias, devido à diminuição da concentração de citrato no meio ocasionada pelo consumo das células fúngicas que o metaboliza como nutriente. Consequentemente, se há uma menor concentração de ânions citrato no meio, menor é o efeito de estabilização das nanopartículas metálicas por efeito eletrostático e, se a estabilidade das nanopartículas diminui, a tendência à agregação aumenta, de modo que deve ser esperado um aumento progressivo no tamanho de nanopartículas concomitantemente ao desenvolvimento das células fúngicas.

Conforme descrito anteriormente, as células fúngicas produzem diversas substâncias durante o seu desenvolvimento, tais como ácidos carboxílicos, aminoácidos, entre outras macromoléculas (PEKSEL, 2003). Sabe-se que as referidas substâncias têm a capacidade de se adsorver na superfície de nanopartículas metálicas através de interações químicas, tais como interações intermoleculares e ligações Au-S e Au-N. (WANG, 2020). Ora, a interação de macromoléculas com a superfície plasmônica das nanopartículas de ouro ocasiona o aumento do diâmetro hidrodinâmico das referidas partículas (ARSALAN, 2021). Portanto, é importante considerar a produção fúngica de metabolitos primários e secundários como espécies que podem se agregar à superfície das nanopartículas de ouro, e dessa maneira, modificar o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas.

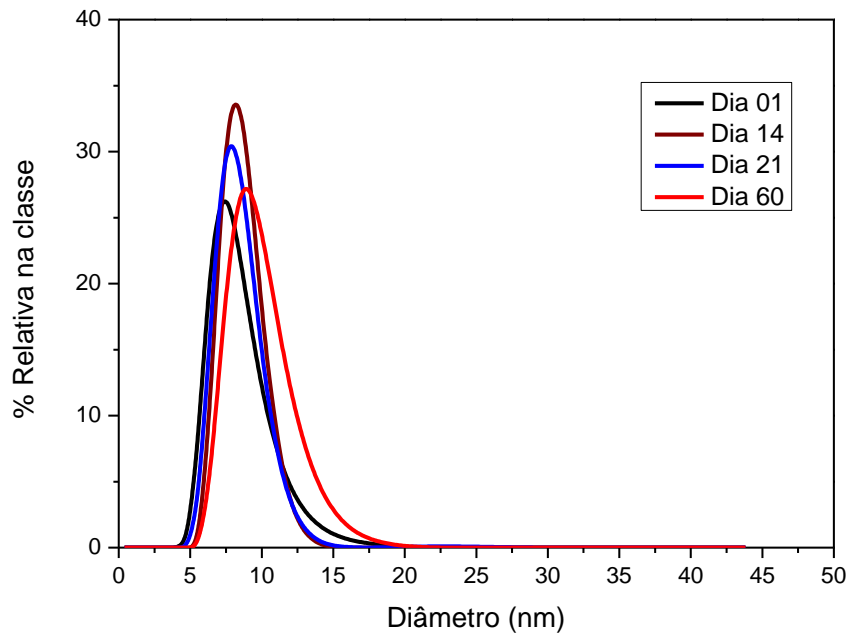


Figura 28 – Curvas de distribuição de classes de diâmetro em número obtidas pelo espalhamento de luz dinâmico das nanopartículas de ouro sob a ação do crescimento do fungo *Aspergillus brasiliensis* (AB/NP-Au) durante um período de 60 dias.

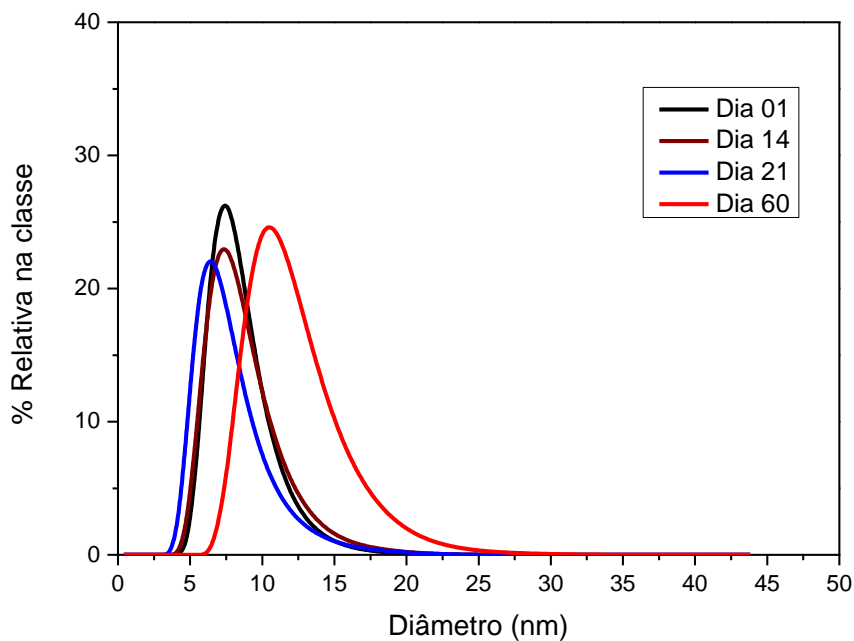


Figura 29 – Curvas de distribuição de classes de diâmetro em número obtidas pelo espalhamento de luz dinâmico das nanopartículas de ouro sob a ação do crescimento do fungo *Talaromyces pinophilus* (TM/NP-Au) durante um período de 60 dias.

5.1.4 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-VIS)

As propriedades ópticas de nanopartículas esféricas em dispersões aquosas podem ser analisadas através da espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível. Sendo assim, realizou-se um estudo da estabilidade das nanopartículas de ouro durante 2 meses. Analisando a Figura 30, verifica-se que a ressonância da superfície plasmônica das nanopartículas de ouro esféricas é claramente visível com um máximo de absorbância entre 514 nm e 518 nm (ARSALAN, 2021). Suplementarmente, nota-se que o comprimento de onda máximo de absorção e a absorbância da dispersão coloidal de ouro aumentam. Conforme descrito anteriormente, a rigor, nanopartículas metálicas são termodinamicamente instáveis, de modo que a alta densidade eletrônica na superfície (confinamento quântico) promove a formação de agregados mais estáveis, maiores, isto é, de menor energia livre de Gibbs. Por conseguinte, ocorre o deslocamento do máximo de absorbância para comprimentos de onda maiores (BROWN, 2000).

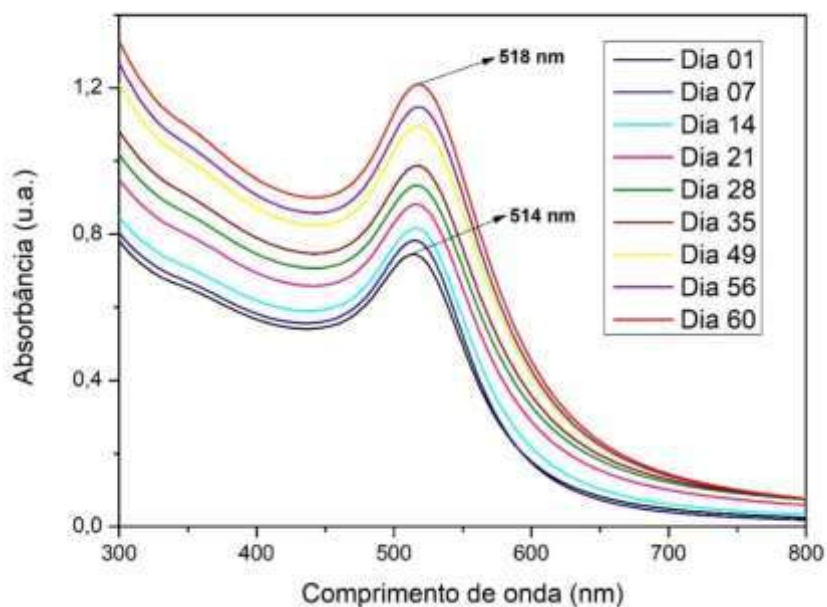


Figura 30 – Envelhecimento das nanopartículas de ouro e variação nos espectros de absorção na região do UV-Vis.

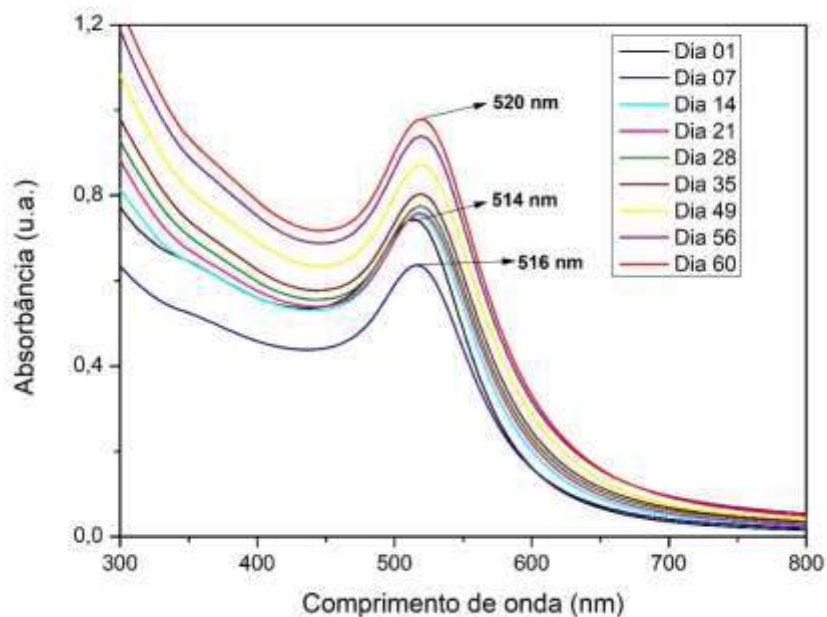


Figura 31 – Espectros de absorção na região do UV-Vis das nanopartículas de ouro sob a ação do crescimento do fungo *Talaromyces pinophilus* (TM/NP-Au) durante um período de 60 dias.

Li et al. caracterizou a suspensão de nanopartículas de ouro durante o crescimento da espécie fúngica *Aspergillus niger* utilizando a espectroscopia na região do UV-Vis. Nesse estudo foi verificado que a banda plasmônica referente às nanopartículas de ouro desaparece, devido à depleção de nanopartículas de ouro dispersas no meio aquoso, ocasionada pelo alto grau de assimilação de nanopartículas de ouro durante o crescimento do micro-organismo (LI, 2003). Contudo, analisando as Figuras 31 e 32 as quais mostram os espectros de absorção obtidos para as propriedades ópticas das nanopartículas de ouro antes e após o crescimento das novas espécies fúngicas *Talaromyces pinophilus* e *Aspergillus brasiliensis*, verificou-se que as propriedades ópticas das dispersões coloidais se comportam de maneira diferente frente ao crescimento das células fúngicas das espécies citadas anteriormente.

Na Figura 31, verifica-se que no dia 7 ocorre uma depleção acentuada da absorbância com deslocamento do máximo de absorção para 516 nm e, em seguida, a partir do dia 14, há um novo deslocamento do máximo de absorção para 518 e um aumento gradual da absorbância, finalizando com deslocamento do máximo de absorção para 520 nm ao final dos 60 dias de cultivo do fungo *Talaromyces pinophilus*.

Sabe-se que o crescimento do fungo é propiciado pela nutrição via moléculas de citrato, e durante o desenvolvimento das hifas ocorre a automontagem de nanopartículas de ouro na parede celular. Assim, a depleção da absorbância verificada no dia 7, deve-se à diminuição em quantidade de matéria das partículas coloidais de ouro na dispersão aquosa, ocasionada pelo processo de automontagem na parede celular. Adicionalmente, constatou-se a variação dos máximos de absorção no decorrer dos 2 meses de estudo. Ora, mudanças no máximo de absorção de nanopartículas de ouro indicam uma modificação na superfície plasmônica, o que indica uma modificação no estado de agregação das nanopartículas de ouro dispersas. Assim, sugere-se que o processo de agregação das nanopartículas de ouro seja ocasionado pelo consumo dos íons citrato durante o crescimento fúngico, ou seja, há menos íons citrato disponíveis para estabilizar as nanopartículas. Ademais, os metabólitos primários e secundários produzidos pelos micro-organismos fúngicos no sistema podem interagir com a superfície plasmônica da nanopartícula de ouro ou modificar as características da dispersão. De fato, segundo os estudos de Basso et al., Brown et al. e Haiss et al., a modificação do máximo de absorção para comprimentos de onda maiores, deve-se ao aumento das nanopartículas devido à diminuição da estabilização por efeito eletrostático (BROWN, 2000; HAISS, 2007; BASSO, 2020). Nanopartículas maiores propiciam uma menor força de restauração entre os íons da rede cristalina do nanomaterial e os elétrons e, por conseguinte, a uma menor frequência de ressonância do plasmon de superfície localizado. Além disso, o aumento nas dimensões da nanopartícula acelera a relaxação do plasmon de superfície, ou seja, diminui o tempo de existência do plasmon de superfície, o qual está relacionado ao aumento da largura da banda de ressonância do referido plasmon de superfície localizado (GRASSESCI, 2020).

A Figura 32 apresenta os espectros obtidos para as nanopartículas de ouro sob a ação do crescimento do fungo *Aspergillus brasiliensis* durante dois meses. Observa-se que os mesmos comportamentos são verificados quando se compara com o fungo *Talaromyces pinophilus*: depleção da absorbância no início do desenvolvimento das hifas (menos intensa, provavelmente devido à velocidade de crescimento das células fúngicas ser mais lenta) e aumento do máximo de absorção. E, portanto, têm as mesmas explicações descritas para o sistema TM/NP-Au.

Ressalta-se que os espectros apresentados corroboram os dados de potencial Zeta e dos diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas de ouro obtidos. De fato, verificou-se um aumento das referidas nanopartículas metálicas (aumento dos raios hidrodinâmicos) ao final dos 60 dias de cultivo e, conseqüentemente, uma menor estabilidade da nanopartícula (diminuição do potencial Zeta). Outro ponto importante a ser considerado na análise dos dados de UV-Vis obtidos é o fator evaporação da fase líquida aquosa a qual constitui todos os sistemas. Realizou-se o cultivo dos fungos filamentosos adaptando uma estufa de secagem de vidrarias para manter os fungos à temperatura constante (28°C) e protegidos da incidência de luz, pois a incidência de radiação em determinadas frequências, modifica o metabolismo fúngico (TISCH, 2010). Sendo assim, sugere-se que esse fator pode ser contributivo para o aumento da absorbância em todos os sistemas, visto que, os sistemas foram mantidos a 28°C durante 2 meses. Esses sistemas não foram isolados completamente, pois é importante garantir o fluxo de ar atmosférico para o crescimento do fungo. Sendo assim, se há a diminuição da fase aquosa por evaporação (depleção do volume), ocorre o aumento da concentração das nanopartículas de ouro, pois a concentração é inversamente proporcional ao volume e, segundo a lei de Lambert-Beer ($A=a.b.c$), a absorbância é diretamente proporcional à concentração das espécies cromóforas.

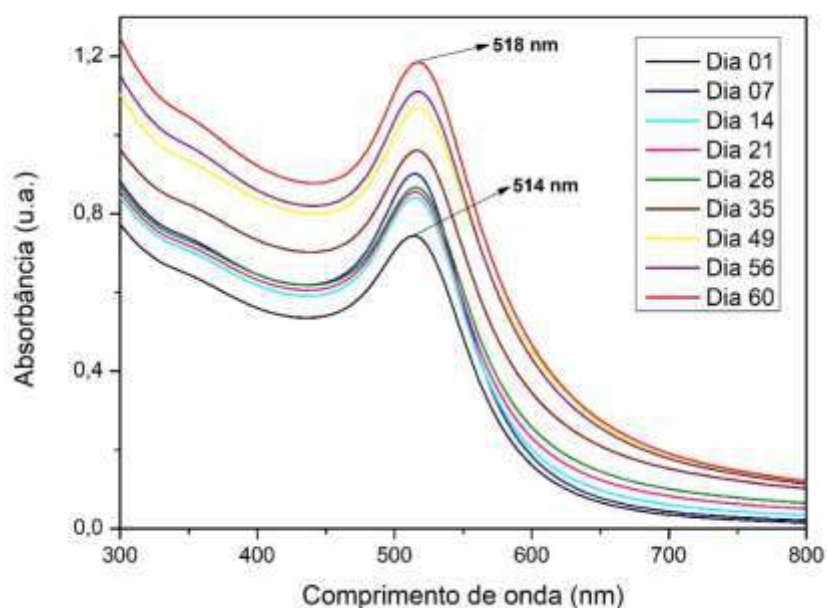


Figura 32 – Espectros de absorção na região do UV-Vis das nanopartículas de ouro sob a ação do crescimento do fungo *Aspergillus brasiliensis* (AB/NP-Au) durante um período de 60 dias.

À face do exposto, reitera-se que o objetivo da caracterização das nanopartículas de ouro através das técnicas de DLS, pH, Potencial Zeta e Espectroscopia de absorção UV-Vis foi compreender o efeito do crescimento do micro-organismo fúngico frente à estabilidade das nanopartículas de ouro. De modo geral, concluiu-se que o crescimento das células fúngicas causam a desestabilização das nanopartículas de ouro, devido à redução dos íons citrato, os quais são a fonte nutricional do fungo filamentosos, e possivelmente, devido aos metabólitos produzidos durante o crescimento fúngico.

Foi citado anteriormente, que Basso et al. publicaram um trabalho sobre o estudo da estabilidade das nanopartículas de ouro estabilizadas por citrato sem adição de um sistema tamponante. Verificou-se que ao longo dos meses, o pH das suspensões à temperatura ambiente aumentam gradativamente para valores básicos (8,3 – 8,8). Além disso, as curvas de absorbância sofrem um alargamento e depleção gradativa ao longo dos meses. Esses fatos foram justificados pela tendência natural de agregação das nanopartículas durante o processo de envelhecimento das suspensões. De fato, segundo as análises de microscopia eletrônica de transmissão apresentadas, ocorre o aumento expressivo no tamanho das nanopartículas de ouro. Por exemplo, para o sistema com pH inicial de 6,8, o mesmo pH das nanopartículas utilizadas nos experimentos dessa tese, obteve-se que o tamanho das nanopartículas de ouro sofre um aumento de 18,83 nm para 37,22 nm (BASSO, 2020). Portanto, constata-se que a utilização do sistema tamponante citrato/ácido cítrico nos sistemas coloidais de ouro utilizados para o desenvolvimento dessa tese, possibilita um menor efeito de desestabilização das nanopartículas de ouro (agregação das nanopartículas) durante o crescimento fúngico.

Manter a estabilidade das nanopartículas de ouro durante o crescimento das células fúngicas é importante para controlar o diâmetro das nanopartículas metálicas que se auto-organizam na parede celular do fungo para formar um novo material, o bio-híbrido fungo/NPs-Au. As propriedades das nanopartículas de ouro estão intimamente ligadas ao tamanho e ao formato (ROSI, 2005; CHIU, 2012), de modo que o processo de agregação ocasionado pela desestabilização do sistema diminui a área superficial das nanopartículas, de modo que ocasiona a diminuição da atividade catalítica e influência nas propriedades elétricas, fototérmicas e ópticas das

nanopartículas de ouro (BASSO, 2020). Para mais, manter a estabilidade das nanopartículas de ouro é importante para garantir a uniformidade superficial das partículas sobre a parede celular durante o processo de síntese do bio-híbrido, o qual influenciará na espessura e rugosidade dos microtubos de ouro obtidos, e conseqüentemente, na aplicação como substrato SERS e eletrodo de alta área superficial.

5.2 ESTUDO MICROMORFOLÓGICO DOS BIO-HÍBRIDOS FUNGO/NPS AU POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Com o escopo de investigar o perfil micromorfológico e as características microestruturais individuais do bio-híbrido Fungo/Nps-Au e dos microtubos obtidos a partir das novas espécies fúngicas *Talaromyces pinophilus* e *Aspergillus brasiliensis*, os materiais híbridos foram analisados através da técnica de microscopia eletrônica de varredura. Contudo, é importante evidenciar as características morfológicas do modelo biológico, do fungo filamentoso, bem como as especificidades da parede celular das espécies fúngicas utilizadas, pois as referidas características influenciam as particularidades morfológicas dos bio-híbridos de fungo/ nanopartículas de ouro e, conseqüentemente, dos microtubos de ouro obtidos após a remoção da biomassa fúngica. De fato, o diâmetro e comprimento das células fúngicas de morfologia microtubular variam de espécie para espécie (SUGUNAN, 2007).

Os fungos filamentosos são constituídos por um conjunto de células de morfologia microtubular (TORTORA, 2012). Esse conjunto de células são denominadas hifas, as quais possuem um modo peculiar no processo de crescimento e alongação da célula. Os fungos filamentosos se reproduzem através da germinação de esporos (unidade de reprodução), que envolve o entumescimento do esporo, surgimento do tubo germinativo e alongação do tubo germinado (TORTORA, 2012) e através do processo de anastomose celular (fusão das hifas mediado pelas vesículas de Spitzenkörper) (GLASS, 2004). Tipicamente, as hifas possuem diâmetros na ordem de 1 – 30 μm , dependendo da espécie e do meio de cultivo (ISLAM, 2017). A estruturação celular é

direcionada pelas vesículas apicais de Spitzenkörper, as quais polarizam o crescimento do tubo germinado e determinam o formato microtubular, além de orquestrar o processo de automontagem da parede celular fúngica (WEBSTER, 2007). Islam et al. publicaram um artigo sobre a caracterização morfológica da estrutura de um fungo filamentosos através de microscopia eletrônica de varredura, relatou-se que a distribuição de diâmetros das hifas que constituem o fungo filamentosos pode variar de 0,5 a 3µm (diâmetro médio = $1,3 \pm 0,6 \mu\text{m}$) (ISLAM, 2017).

A Figura 33 apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura do fungo *Phialomyces macrosporus*. Pode-se observar a morfologia microtubular das hifas, as quais possuem diâmetro médio de 2 µm e comprimento de centenas de micrômetros. Além disso, verifica-se estruturas esféricas na extremidade de algumas hifas. Essas estruturas se referem às unidades de reprodução do fungo *Phialomyces macrosporus*, especificamente, os esporangióforos: bolsa de esporos reprodutores (aplanósporos) de onde se inicia a germinação e alongação do microtubo celular (PELCZAR, 1996).

A Figura 33-b, mostra imagens em maior magnificação da estrutura fúngica, de modo que é possível visualizar detalhes da superfície das células microtubulares, as quais possuem largura de aproximadamente 2,5 µm. As hifas apresentam rugosidades e pequeníssimos filamentos sobre a sua superfície, provavelmente devido às macromoléculas (quitina, proteínas, lipídeos, entre outros) que constituem a parede celular e/ou dos metabólitos que são excretados pelo fungo (AN, 2005).

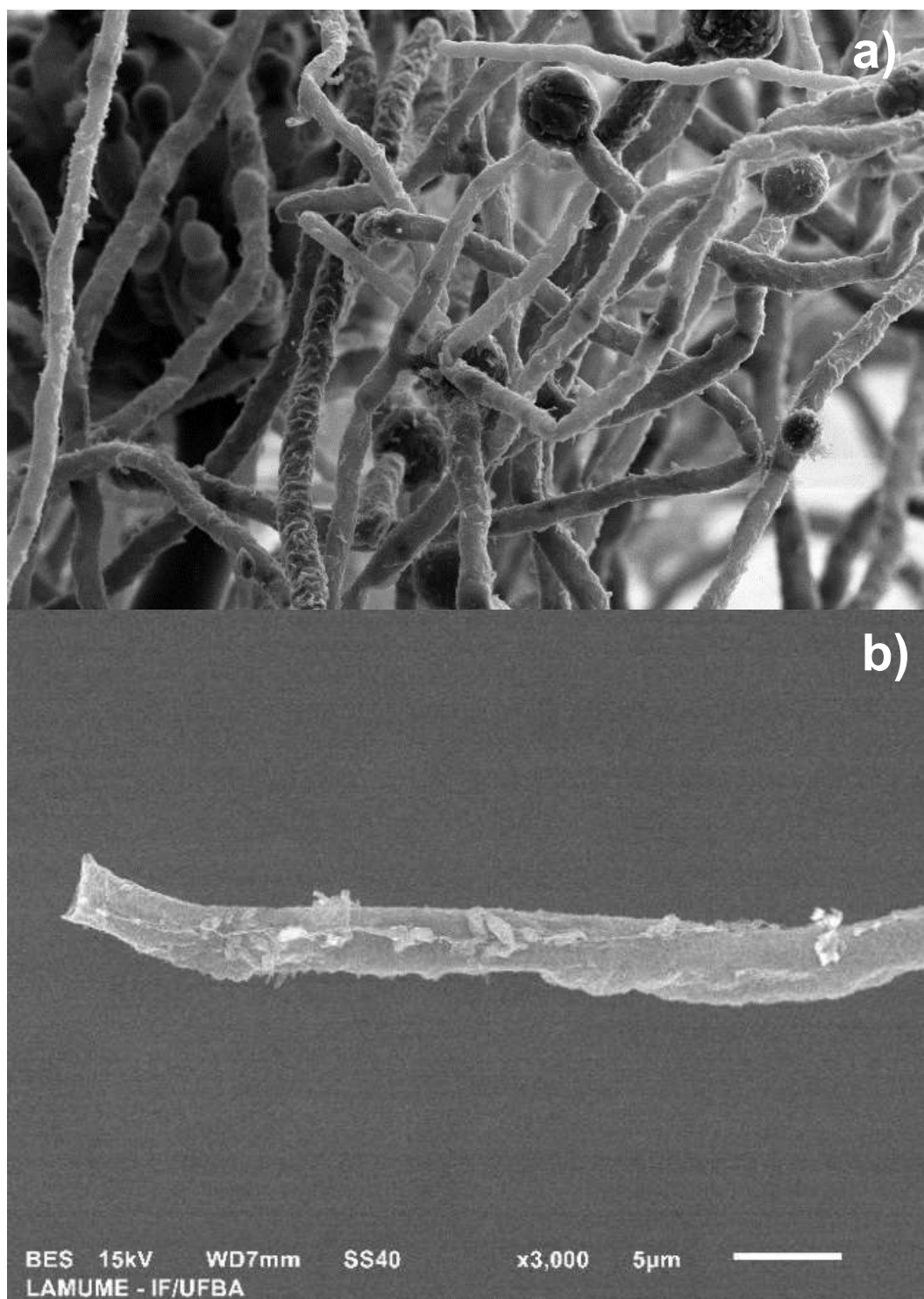


Figura 33 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do fungo da espécie a) *Phialomyces macrosporus* com aumento de 2120X e b) *Aspergillus niger* com aumento de 3000X.

A parede celular dos fungos filamentosos é uma estrutura singular e dinâmica que protege o constituinte intracelular do meio externo e permite a passagem de macronutrientes, micronutrientes e enzimas. É constituída por várias macromoléculas como quitina, lipídios, mananas, glucanas, ácido poliglucurônico, proteínas e glicoproteínas (GOZALBO, 1993; KAVANAGH, 2011), formando assim a parede celular conforme indicado na Figura 34.

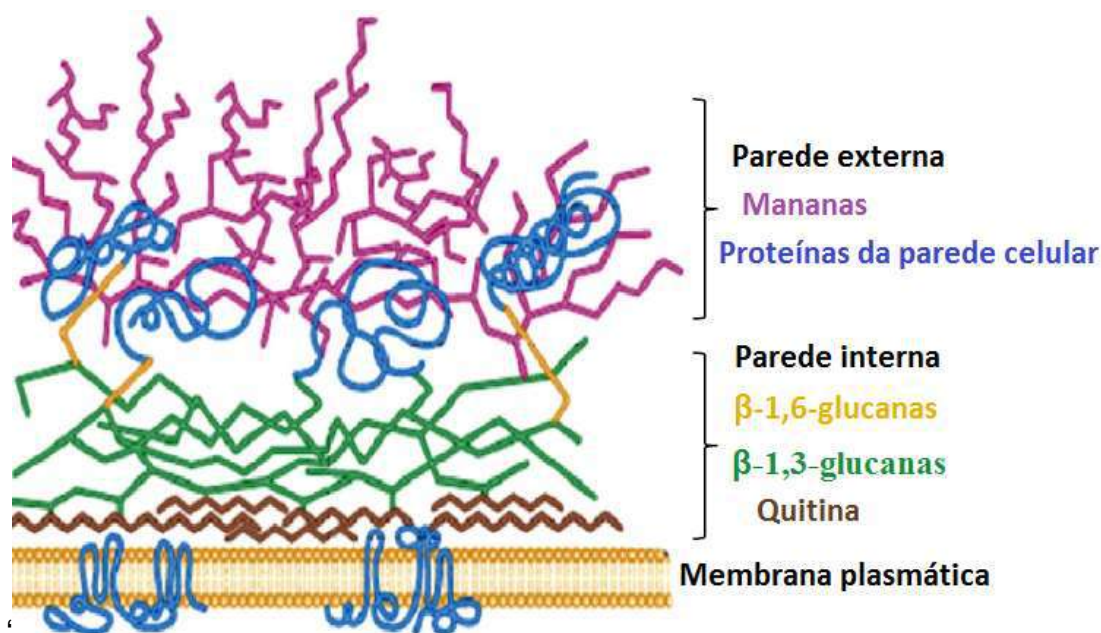


Figura 34 – Ilustração da estrutura da parede celular e da membrana plasmática dos fungos. Adaptado da referência BROWN, 2014.

De acordo com Kavanagh, além de a parede celular ser uma estrutura dinâmica, ocorrem diferenças quantitativas e qualitativas não apenas entre espécies fúngicas diferentes, mas ocorrem diferenças morfológicas na mesma espécie, devido às condições de estresse durante o crescimento celular. De fato, as hifas podem apresentar diâmetros de 1 a 30 μm (KAVANAGH, 2011). Então, sugere-se que as características micromorfológicas da superfície da hifa, sejam devido às macromoléculas constituintes da parede celular e que diferem de cada espécie de fungo.

A parede celular dos fungos filamentosos têm afinidade com nanopartículas de metais nobres como o ouro, prata e paládio (MIRKIN, 2003; SUGUNAN, 2007; BIGALL, 2008; REHMAN, 2011; SABAH, 2012; FONTES, 2014; BHARGAVA, 2015; KUBO, 2016). Especificamente, o Bigall et al. mostraram que a afinidade dos fungos

filamentosos é variável. Verificou-se que os fungos assimilam preferencialmente Au>>Pt>Pd>>Ag. Assim, utilizou-se o método de síntese desenvolvido por Fontes et al para sintetizar bio-híbridos constituídos de nanopartículas de ouro e células fúngicas das espécies *Aspergillus niger*, *Phialomyces macrosporus*, *Talaromyces pinophilus* e *Aspergillus brasiliensis*.

As Figuras 35 e 36 apresentam as micrografias obtidas por MEV dos fungos filamentosos decorados com nanopartículas de ouro. Analisando a Figura 35, verifica-se que a microestrutura formada pelas células fúngicas e as nanopartículas de ouro (Figura 35-a) preserva as propriedades morfológicas do micro-organismo: células microtubulares de diâmetro variável e comprimento de centenas de micrômetros. Analisando a Figura 35-b em maior magnificação, com aumento de 4070 vezes, verifica-se a distribuição uniforme de uma camada espessa de nanopartículas de ouro na superfície do micro-organismo. A Figura 36-a com 7900X, mostra em maior detalhe as características microestruturais de um microtubo isolado, verifica-se que o referido microtubo celular possui 1,259 μm de diâmetro e aproximadamente 1 μm de espessura referente às nanopartículas de ouro assimiladas pela parede celular fúngica, além disso verifica-se o alto grau de organização e uniformidade das nanopartículas aderidas à parede celular conferindo ao material sintetizado uma grande robustez estrutural. Por sua vez, a Figura 36-b mostra um maior detalhamento da Figura 36-a, de modo que se visualiza com riqueza de detalhes a camada homogênea de nanopartículas esféricas de tamanhos uniformes adsorvidas na parede celular da espécie *Phialomyces macrosporus*, além de ser uma evidência de que as nanopartículas de ouro se mantêm separadas nos sistemas híbridos.

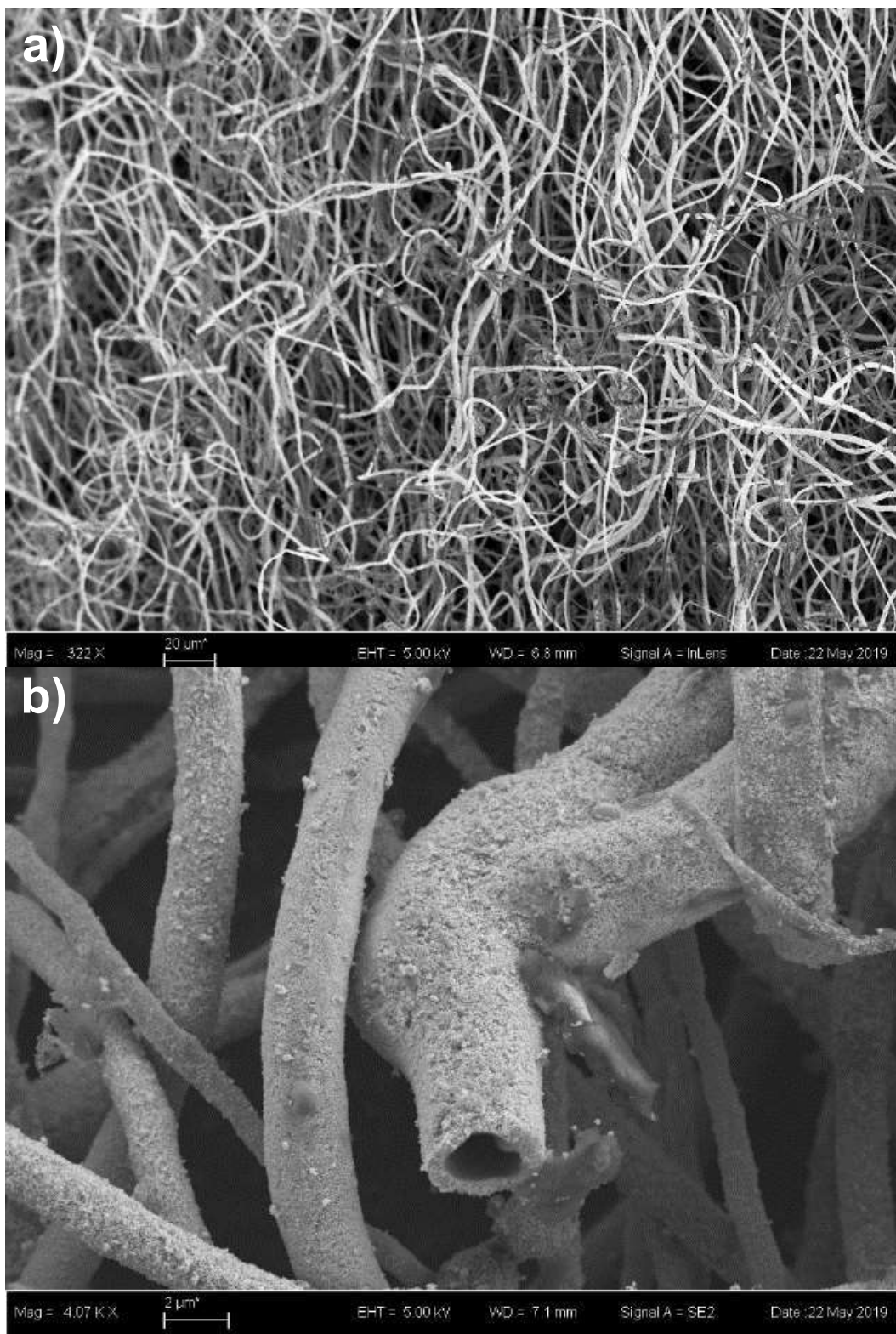


Figura 35 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos bio-híbridos constituídos por nanopartículas de ouro e o fungos filamentosos *Aspergillus Niger* a) 322X e b) 4070X.

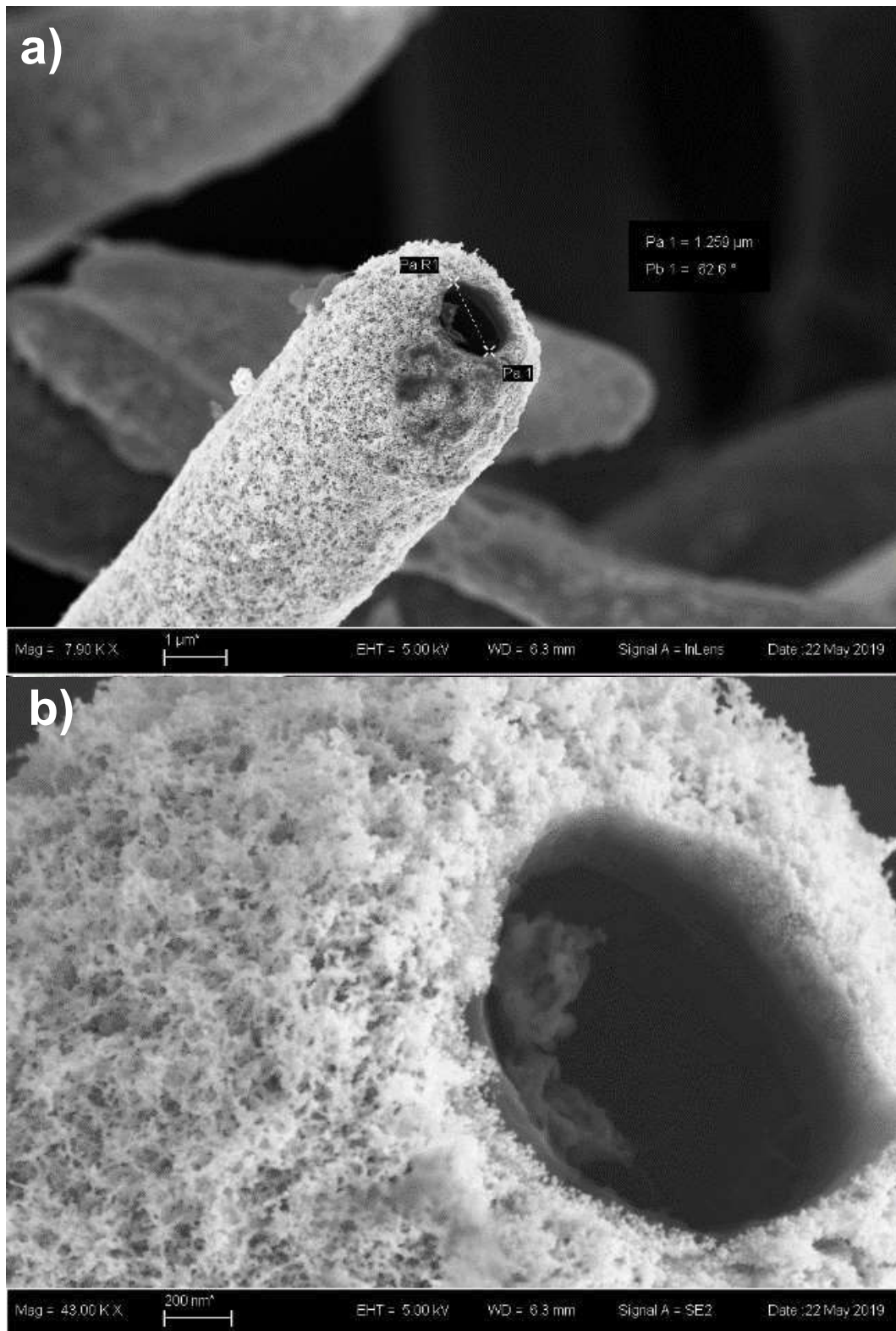


Figura 36 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos bio-híbridos constituídos por nanopartículas de ouro e o fungo filamentosso da espécie *Phialomyces macrosporus*, a) 7900X, b) 43000X.

O processo de crescimento da célula fúngica é direcionado pelas vesículas apicais as quais se encontram na extremidade da hifa durante o processo de alongação da célula fúngica microtubular. É durante esse dinamismo que a parede celular é construída através de um processo de automontagem orquestrado por enzimas sintases, principalmente as enzimas pirofosforilases, as quais catalisam as reações de formação dos constituintes da parede celular (KAVANAGH, 2011). Como citado anteriormente, a parede celular fúngica é formada por várias macromoléculas tais como lipídeos, quitina, mananas, glucanas, ácido poliglucurônico, proteínas e glicoproteínas (LIPKE, 1998; GOZALBO, 1993; KAVANAGH, 2011). Esses polissacarídeos são biossintetizados no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, e em seguida transportados pelas vesículas para o espaço extracelular, onde com o auxílio de enzimas sintases, ligam-se covalentemente aos outros constituintes da parede celular e/ou através de interações intermoleculares num processo dinâmico e contínuo de automontagem, formando assim a parede celular conforme indicado na Figura 37 (BOWMAN, 2006; MOORE, 2013; CABIB 2013; MACIEL, 2016).

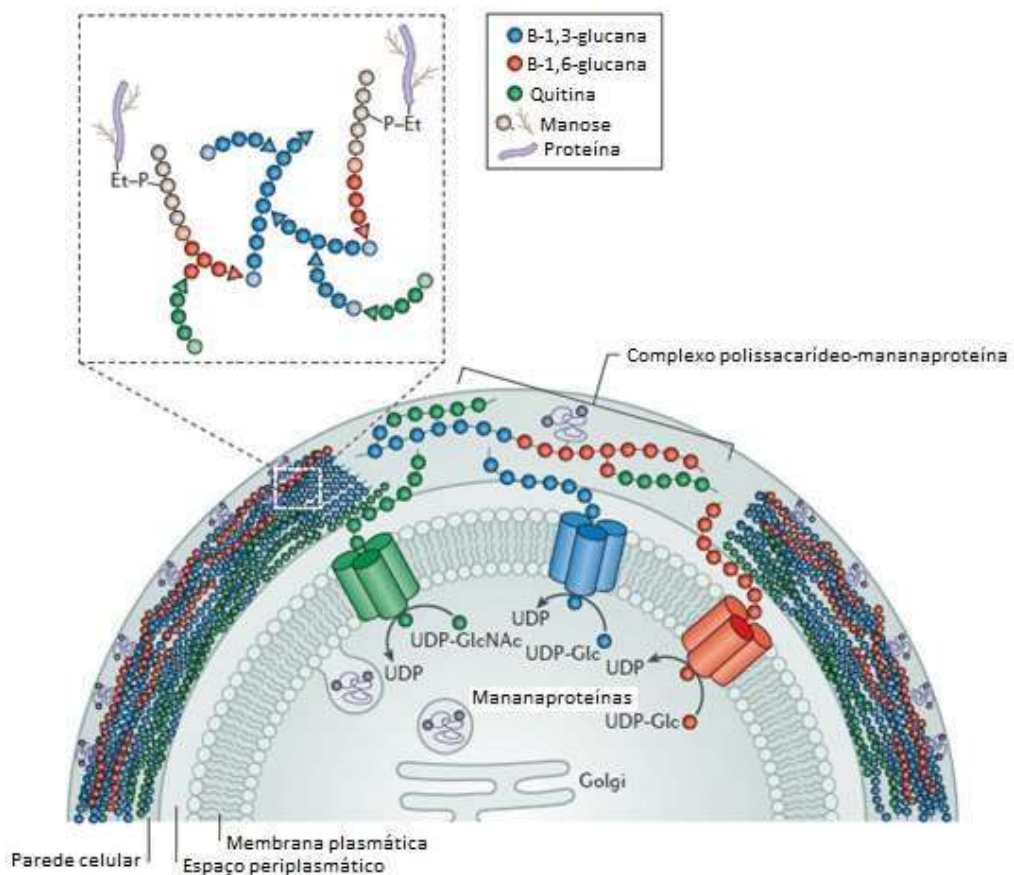


Figura 37 – Representação da estrutura e síntese da parede celular. UDP: Enzimas sintases. Adaptado da referência CABIB, 2013.

As proteínas presentes na parede celular determinam as propriedades da superfície como adsorção e adesão (WEBSTER, 2007). Assim, ao passo que a parede celular está sendo automontada durante o crescimento celular, ocorre o processo de automontagem das nanopartículas de ouro através da interação com as unidades funcionais tais como R-SH, R-NH₂, R-OH e -COO⁻ (PAL, 2019; SUGUNAN, 2007), as quais estabilizam as nanopartículas de ouro na parede celular. Uma possível evidência desse fato encontra-se na figura 36-b, a qual mostra que as nanopartículas esféricas de ouro se apresentam com diâmetros uniformes e permanecem separadas na parede celular, não ocorre o coalescimento das referidas partículas após a secagem por ponto crítico.

A rigor, para que nanopartículas metálicas permaneçam estáveis como as visualizadas na Figura 36-b, necessita-se de espécies estabilizadoras (ROUCOX, 2002). Sendo assim, as possíveis moléculas capazes de conferir estabilidade às nanopartículas de ouro sobre a superfície micelar são as macromoléculas que constituem a parede celular do fungo. Sugunan et al. efetuaram um experimento elucidando que a interação entre estabilizantes sulfurados são tão intensas quando comparadas ao estabilizante glutamato e os constituintes da parede celular do micro-organismo fúngico, que fungos filamentosos crescidos num sistema de nanopartículas de ouro com estabilizantes sulfurados não apresentaram processo de automontagem das referidas nanopartículas na superfície micelar do micro-organismo, ou seja, esse experimento foi uma evidência para suportar o mecanismo proposto pelo grupo, o qual versa sobre o processo de automontagem de nanopartículas de ouro estabilizadas por glutamato na superfície do micro-organismo através da interação com o espaço extracelular do fungo (SUGUNAN, 2007). À face do exposto, propõe-se que ocorre o deslocamento do citrato (estabilizante das nanopartículas de ouro por efeito de estabilização eletrostática) pela interação com as macromoléculas presentes na parede celular (JIA, 2013). Nessa hipótese, para que isso ocorra, a rigor, a interação e/ou ligação das macromoléculas da parede celular com as nanopartículas de ouro são mais intensas, isto é, confere uma maior estabilização das nanopartículas de ouro, de modo que a energia livre desse sistema diminui (processo termodinamicamente mais estável) (ROUCOX, 2002). De acordo com Koslovskaya et al. e Zhu et al, as medidas de potencial zeta mostraram que a carga inicial da superfície da membrana celular é negativa (KOSLOVSKAYA, 2011; ZHU, 2016). Conceitualmente, espécies

com cargas iguais, repelem-se. Dessa maneira, pode-se inferir que o processo de automontagem das nanopartículas metálicas de ouro sobre a superfície celular não ocorre simplesmente por atrações eletrostáticas, sugere-se que há um mecanismo induzido pelo metabolismo fúngico que ainda não foi explorado.

As micrografias de MET realizadas, mostram características morfológicas mais detalhadas quanto ao tamanho, formato e distribuição das nanopartículas de ouro, além de possibilitar uma maior compreensão quanto ao processo de automontagem das nanopartículas metálicas na parede celular fúngica. Para mais, essas micrografias referem-se à integração de nanopartículas na superfície da hifa microtubular de novas espécies fúngicas (*Talaromyces pinophilus* e *Aspergillus brasiliensis*).

As Figuras 38-a, 38-b, 38-c e 38-d apresentam imagens dos cortes transversais e longitudinais das células fúngicas com a inteligível assimilação de nanopartículas de ouro sobre a membrana celular. Contudo, analisando a figura 38-a minuciosamente, verifica-se que a formação de uma camada robusta de nanopartículas de ouro com espessura aproximada de 518 nm. Além disso, verifica-se que há regiões diferentes quanto ao modo de organização das nanopartículas na parede celular: a região próxima à membrana plasmática possui uma maior concentração de nanopartículas assimiladas (uma camada de aproximadamente 50 nm de espessura) do que as regiões mais externas da parede celular. Fundamentando-se no mecanismo de formação da parede celular de fungos filamentosos descrito por Cabib et al e Webster (WEBSTER, 2007; CABIB, 2013), sugere-se que as regiões mais próximas à membrana plasmática são as regiões que possuem uma maior atividade biológica em relação as enzimas sintases, as quais são responsáveis pelo processo de automontagem da parede celular, ou seja, é uma área onde a automontagem da parede celular ocorre de modo mais intenso e há uma maior concentração de vesículas transportadoras de moléculas que propiciam a automontagem da parede celular. Nessa perspectiva, há um maior número de moléculas disponíveis para se ligar/interagir com as nanopartículas de ouro, estabilizando-as e, conseqüentemente, ocorre a formação de uma região com uma maior concentração de nanopartículas metálicas. Ademais, salienta-se que as imagens de MET dos trabalhos de Fontes et al. (FONTES 2014, FONTES 2021) exibem a mesma característica de adsorver uma maior quantidade de nanopartículas metálicas na região próxima ao citoplasma. Analisando a Figura 38-b a qual é um recorte longitudinal da hifa com aumento de

4000 vezes, constatou-se outro aspecto interessante quanto à conformação das nanopartículas de ouro na parede celular: há uma maior concentração de nanopartículas de ouro nas extremidades (nas regiões próximas à membrana celular) das células. Ora, o processo de crescimento da hifa é direcionado pelas vesículas Spitzenkörper, as quais orquestram o formato microtubular da hifa e a constituição da parede celular (WEBSTER, 2007). Além disso, essas vesículas direcionadoras encontram-se exatamente na extremidade da hifa. Assim, de modo análogo ao que foi pontuado frente ao comportamento de distribuição desigual nas áreas próximas à membrana plasmática, essas extremidades possuem maior número de nanopartículas metálicas, devido à maior atividade biológica das vesículas de Spitzenkörper que direcionam o crescimento e favorece o processo de automontagem da parede celular. Um fato que pode orientar essa hipótese são os dados publicados pelo grupo do professor Emerson Camargo. De acordo com os autores e autoras, o processo de deposição de nanopartículas de ouro estabilizadas em citrato ocorre através de uma cinética de adsorção de pseudo-primeira ordem, dependendo apenas da concentração de nanopartículas de ouro na suspensão, a qual foi determinada através da técnica de Espectroscopia UV-Vis e a Lei de Lambert-Beer. Inicialmente, ocorre uma etapa rápida de adsorção, devido à alta concentração de nanopartículas de ouro no sistema. Essa primeira camada de NPs-Au interage fortemente com a superfície do fungo através de ligações covalentes entre as nanopartículas de ouro e os grupos funcionais que constituem o micélio fúngico. A espessura da camada de nanopartículas de ouro depositadas no fungo é proporcional ao tempo de exposição do micro-organismo à suspensão de NPs-Au. Então, o processo de adsorção gradual, diminui a concentração de NPs-Au no sistema. De maneira que, a velocidade de adsorção das camadas subsequentes é mais lenta, pois há uma menor concentração de nanopartículas de ouro no sistema (KUBO, 2016). Portanto, sugere-se que a maior concentração de nanopartículas de ouro nas regiões mais próximas a membrana plasmática seja, de fato, devido à maior atividade das vesículas de Spitzenkörper que propiciam maior concentração de macromoléculas que são capazes de estabilizar as nanopartículas de ouro.

A análise das Figuras 39-a e 38-b, mostram a distribuição das nanopartículas de ouro na superfície celular do micro-organismo *Talaromyces pinophilus*. A micrografia de MET em alta resolução revela que há uma camada espessa de

nanopartículas de ouro de morfologia predominantemente esférica, que se encontram separadas umas das outras e embebidas na matriz biopolimérica da parede celular. Utilizando o programa de processamento e análise de imagens *ImageJ*, determinou-se que a distribuição de tamanho das nanopartículas de ouro está entre 4,5 a 12 nm com tamanho médio de $6,4 \pm 1,1$ nm (vide Figura 39-c), o referido diâmetro é coerente com o valor médio do tamanho de partícula das suspensões coloidais de ouro medido através do método de DLS (7,5 nm, item 5.1.3),

Recentemente, os trabalhos de Fontes et al. e Rosario et al. mostraram que materiais em dimensões nanométricas, tais como Ln_MOFs e nanopartículas de paládio são internalizados e concentrados nos vacúolos durante o crescimento da hifa (ROSARIO, 2019; FONTES, 2021). Fontes et al. sugeriram que o processo de internalização verificado, deve-se aos processos de aquisição, transporte e assimilação de nutrientes do espaço extracelular ao interior da célula, devido à um tamanho crítico específico da membrana celular de determinadas espécies fúngicas, como por exemplo o *Penicillium sp.* À vista disso, verificou-se que embora o tamanho médio das nanopartículas de ouro seja menor quando comparado aos trabalhos que estudam a integração de nanopartículas metálicas e células fúngicas, as nanopartículas de ouro ficam retidas na superfície celular, ou seja, não ocorre o processo de internalização de nanopartículas metálicas nas organelas intracelulares nos sistemas estudados.

Por fim, através das micrografias de MEV e TEM realizadas verificou-se que as nanopartículas de ouro se depositam na superfície das novas espécies de fungos utilizados através de um processo de automontagem utilizando células biológicas como plataformas biomiméticas para o desenvolvimento de um novo material, cuja metodologia geral foi desenvolvida por Fontes et al (FONTES, 2014). Nessa perspectiva, realizou-se o estudo termogravimétrico dos bio-híbridos produzidos com o escopo de remover o molde biológico através de um processo de tratamento térmico otimizado para obtenção de microtubos de ouro que foram utilizados para aplicação como eletrodo de alta área superficial e como substrato para SERS, os quais são o escopo dessa tese de doutoramento.

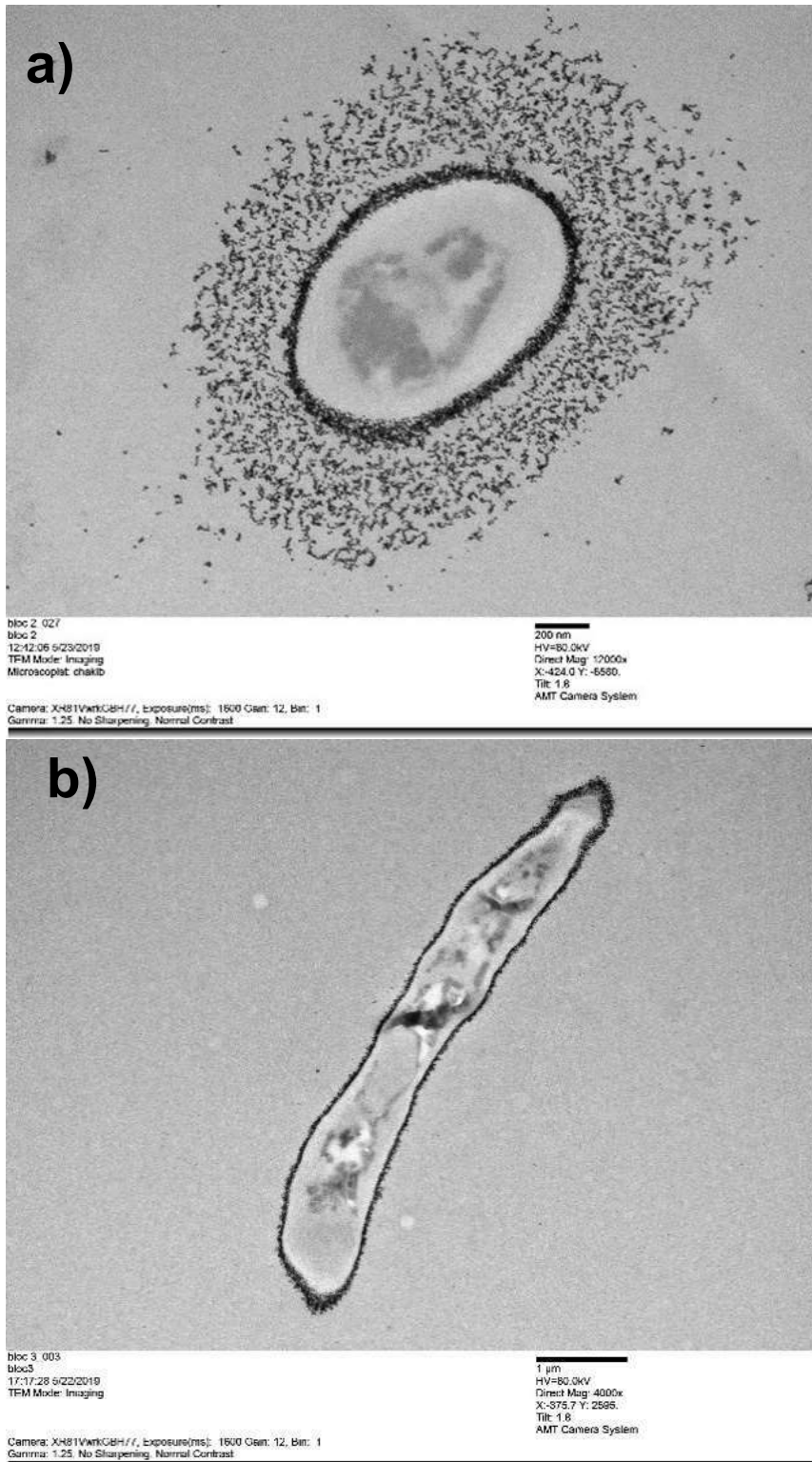


Figura 38 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão dos bio-híbridos constituídos por nanopartículas de ouro e o fungo filamentoso da espécie *Aspergillus brasiliensis* a) 12000X (corte transversal da hifa) e b) 4000X (corte longitudinal da hifa)

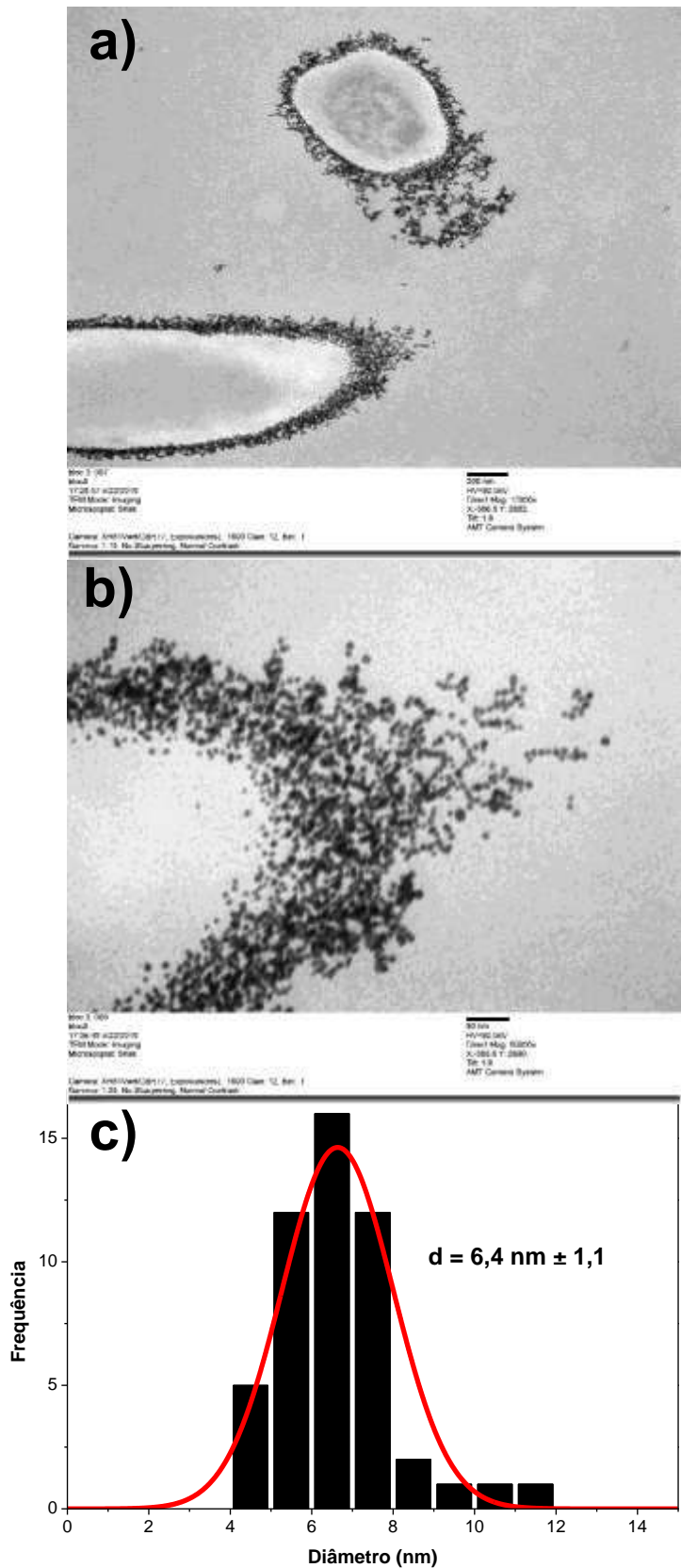


Figura 39 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão dos bio-híbridos constituídos por nanopartículas de ouro e o fungo filamentoso da espécie *Talaromyces pinophilus* a) 12000X (corte transversal da hifa), b) 50000X (corte transversal da hifa) e c) Distribuição de tamanho de partículas processados pelo programa *ImageJ*.

5.3 ESTUDO TERMOANALÍTICO DOS BIO-HÍBRIDOS FUNGO/NPsAu

O estudo termoanalítico (ATG) dos materiais teve como escopo analisar a variação de massa do bio-híbrido com o aumento da temperatura numa atmosfera oxidante (GABBOTT, 2007). Especificamente, a análise termogravimétrica permite investigar o comportamento dos bio-híbridos constituídos por fungos filamentosos e nanopartículas de ouro frente ao aumento da temperatura, além de determinar a massa de nanopartículas de ouro que foram assimiladas pelas espécies fúngicas *Talaromyces pinophilus* e *Phialomyces macrosporus*.

Inicialmente, analisou-se o comportamento do fungo filamentoso frente ao aumento da temperatura sob atmosfera oxidante. A Figura 40 mostra a curva termogravimétrica obtida para o modelo utilizado na produção dos bio-híbridos, o fungo filamentoso da espécie *Talaromyces pinophilus*, verificou-se que a amostra do fungo filamentoso foi 98,13 % degradada, restando apenas um pequeno resíduo de 0,039 mg, referente às cinzas da reação de combustão. A fim de que as curvas termogravimétricas possam ser interpretadas de forma mais precisa, utilizou-se os dados da derivada da variação de massa pela temperatura (Anexos A, B e C). Analisando a curva DTG apresentada no Anexo A, observam-se 3 regiões de perda mássica. Verifica-se um estágio de perda mássica endotérmica iniciando em 32°C e finalizando por volta de 134°C referente à perda de água superficial e fracamente adsorvida. Em seguida, ocorre uma perda acentuada de massa no intervalo de 256°C a 408°C, cujo evento é exotérmico, devido aos processos de combustão iniciais dos componentes orgânicos de baixa massa molecular que constituem o biotemplate orgânico (fungo). Por fim, entre 442 °C e 544°C ocorre a terceira perda mássica, um evento também exotérmico, referente aos processos de combustão dos componentes orgânicos da biomassa fúngica de maior massa molecular. De fato, Jones et al. efetuaram um estudo sobre as propriedades de combustão do micélio fúngico, cujos resultados são análogos aos obtidos. Verificou-se que a perda mássica inicial independe do consumo de oxigênio, pois a referida depleção mássica, atribui-se à perda de água adsorvida. De modo similar ao fungo *Talaromyces*, a segunda região de perda mássica inicia-se em 225°C, referente ao processo de reação de combustão dos compostos da biomassa fúngica de menor massa molecular. Esse evento térmico produz um resíduo de combustão, o qual age como um isolante, inibindo a migração

de oxigênio sobre a interface sólido (fungo)/gás (oxigênio), dessa maneira, a terceira perda mássica, referente aos compostos orgânicos de maior massa molecular, ocorre em uma temperatura mais elevada (JONES, 2018).

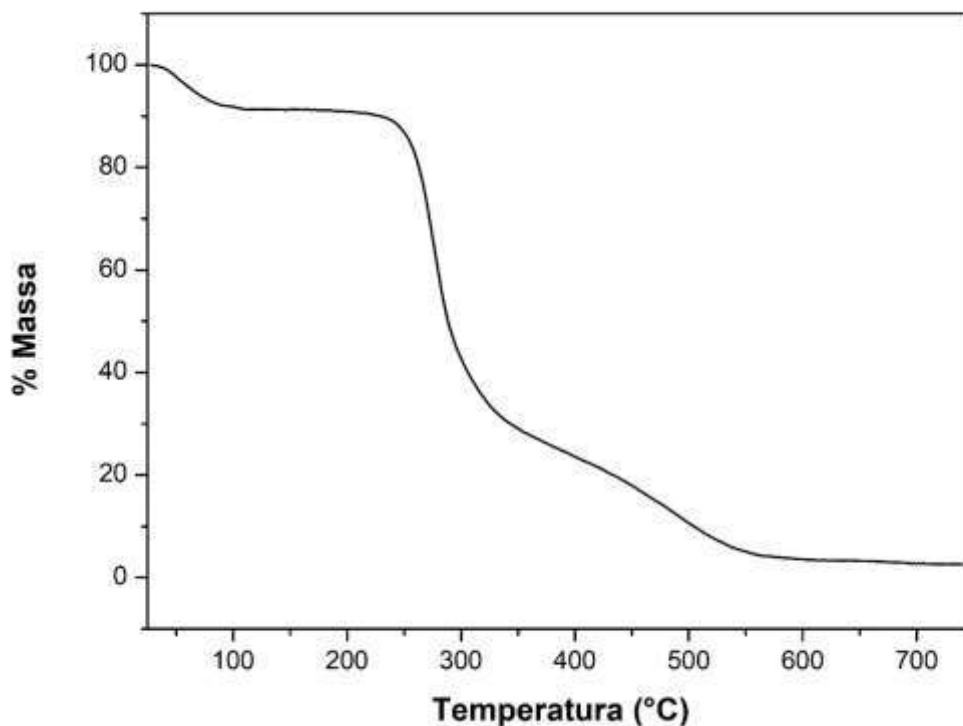


Figura 40 – Curva termogravimétrica do fungo filamentoso após secagem ao ponto crítico do CO₂.

A Figura 41 mostra as curvas termogravimétricas obtidas para o modelo biológico, o fungo filamentoso da espécie *Talaromyces pinophilus* e para os bio-híbridos Fungo/NPs-Au. Consta-se que os perfis das curvas termogravimétricas são similares. Além disso, observa-se que uma elevada quantidade de nanopartículas de ouro é bioassimilada pelos micro-organismos fúngicos (fungos PM e TM). Contudo, verifica-se uma menor perda de massa para os materiais bio-híbridos. De fato, verifica-se que os fungos utilizados assimilam uma quantidade expressiva de nanopartículas de ouro em suas hifas micelares: 36% para o bio-híbrido da espécie *Talaromyces pinophilus* e 40 % para o bio-híbrido da espécie *Phialomyces macrosporus*. Desta forma, ratifica-se que tanto a espécie fúngica *Phialomyces macrosporus* quanto a espécie *Talaromyces pinophilus* têm a capacidade de assimilar grandes quantidades

de nanopartículas de ouro com diâmetro de médio de $6,4 \pm 1,1$ nm na parede celular. Insta esclarecer, que as células fúngicas possuem uma parede celular rica em macromoléculas capazes de se ligarem e/ou interagirem eletrostaticamente via interações de van der Waals ou ligação de hidrogênio às nanopartículas de ouro (PAL, 2019). Dessa maneira, as células dos fungos filamentosos são utilizadas como modelos biológicos numa estratégia para produção de materiais nobres com morfologia única que não pode ser replicada por processos químicos convencionais.

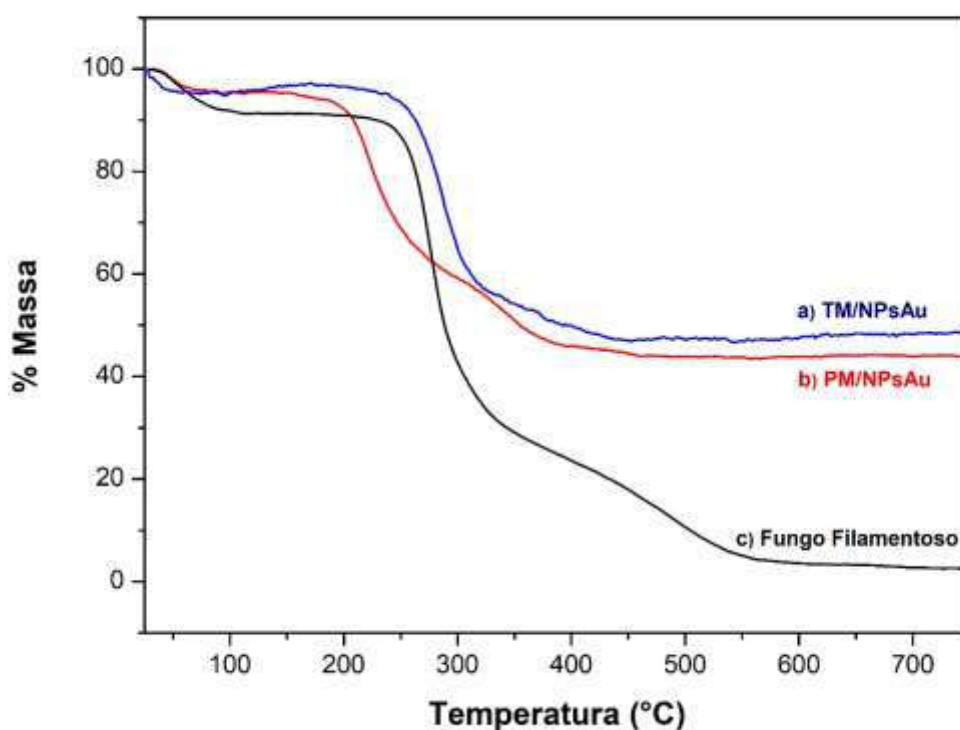


Figura 41 – Curvas termogravimétricas dos materiais após secagem ao ponto crítico do CO₂: a) Fungo *Talaromyces pinophilus*/NPs-Au, b) Fungo *Phialomyces macrosporus*/NPs-Au e c) Fungo Filamentoso.

Através dos dados termogravimétricos obtidos com a análise das amostras (Anexo B e C), pode-se inferir de modo mais preciso as regiões de temperatura as quais ocorrem as perdas mássicas para os bio-híbridos. Em ambas as curvas termogravimétricas dos bio-híbridos (Anexo B e C), verifica-se que as depleções mássicas são muito parecidas. Nota-se uma perda mássica expressiva no intervalo entre 187 °C e 409 °C para o bio-híbrido constituído do fungo *Phialomyces*

macrosporus, e de modo análogo, uma perda mássica intensa no intervalo entre 261,7 °C e 401,5 °C para o bio-híbrido constituído pelo fungo da espécie *Thalaromyces pinophilus*. Essas perdas termogravimétricas, referem-se aos processos de combustão explicados anteriormente. Analisando essas curvas termogravimétricas frente a curva termogravimétrica do fungo filamentososo, constata-se que a presença do ouro metálico no bio-híbrido acelera o processo de eliminação dos componentes orgânicos do fungo, conforme o sistema fungo/nanopartículas de ouro desenvolvido por Fontes et al. (FONTES, 2014).

5.3 OBTENÇÃO DOS MICROTUBOS BIOMIMÉTICOS DE OURO

As análises de MEV e MET em conjunto com a análise termogravimétrica dos bio-híbridos Fungo/NPsAu evidenciaram o alto potencial de assimilação de nanopartículas de ouro na parede celular dos fungos filamentosos utilizados. Além disso, outros trabalhos realizados anteriormente em nosso grupo LBQM-UFBA, revelaram algumas estratégias de automontagem sobre a superfície micelar de fungos filamentosos para a obtenção de microtubos de materiais constituídos por óxidos metálicos, ouro metálico, nanosilício e MOFs (FONTES, 2014; MACIEL, 2016, ROSARIO, 2019; ABREU, 2018). À vista disso, propôs-se o desenvolvimento de um tratamento térmico minucioso com o escopo de otimizar a remoção do molde biológico e obter microtubos biomiméticos de ouro com detalhes microestruturais fidedignos ao fungo filamentoso com uma menor contração da estrutura após o processo térmico. Ademais, o controle adequado da remoção térmica do biotemplate visou a produção de superfícies nanoestruturadas sensíveis ao SERS e candidatas a aplicação como eletrodos de alta área superficial.

A Figura 42-a mostra uma fotografia digital do produto de calcinação após eliminação do componente biológico e limpeza. O referido material tem um comprimento de aproximadamente 6 mm e coloração amarelo-escuro, a qual é característica do ouro metálico. Adicionalmente, a Figura 42-b revela a imagem de MEV de uma pequena fração do material obtido, de modo que pode ser verificado que toda a extensão da porção de matéria obtida após o tratamento térmico possui morfologia microtubular.

A fim de analisar qualitativamente e quantitativamente o material obtido quanto à composição dos elementos químicos que o constituem, realizou-se a microanálise por espectroscopia de dispersão de energia (EDS). A figura 43 (c), apresenta o espectro EDS dos microtubos de ouro. Analisando o espectro da figura supracitada, verifica-se a presença de linhas espectrais características do ouro. Os sinais intensos em 2,1205 KeV e 9,7135, referem-se às linhas espectrais características das transições do ouro, oriundas das camadas eletrônicas, $M\alpha_1$ e $L\alpha_1$, respectivamente. Ademais, o mapa de composição elementar apresentado na Figura 43-b ratifica, de modo inequívoco, que os microtubos são constituídos apenas de ouro. Salienta-se

ainda, que a presença do sinal de baixa intensidade do elemento carbono, refere-se à fita de carbono utilizada como suporte para a análise.

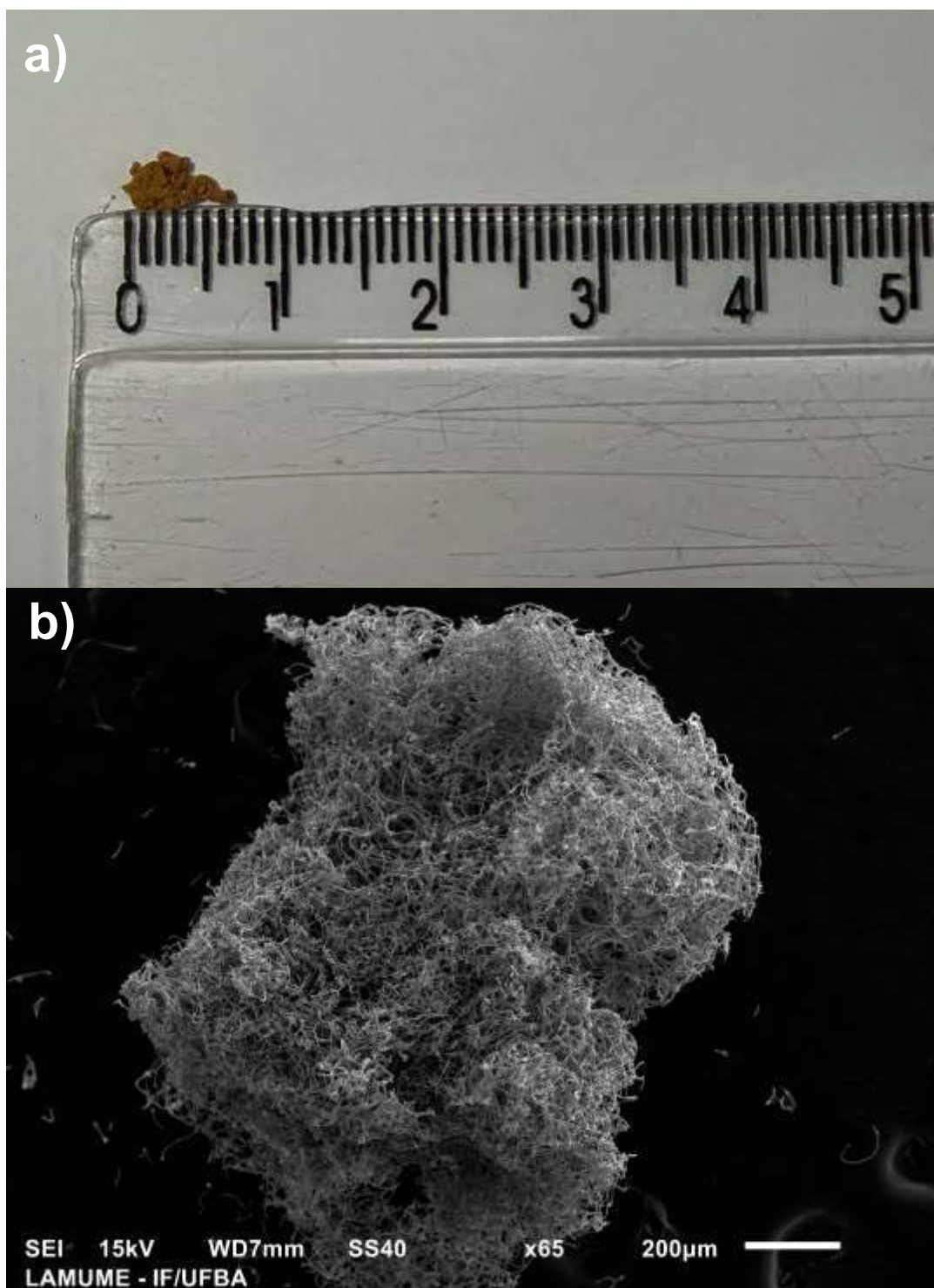


Figura 42 – Imagens obtidas após a remoção do fungo filamentosos da espécie *Phialomyces macrosporus* via tratamento térmico a) Fotografia Digital e b) Obtida por microscopia eletrônica de varredura com aumento de 65X.

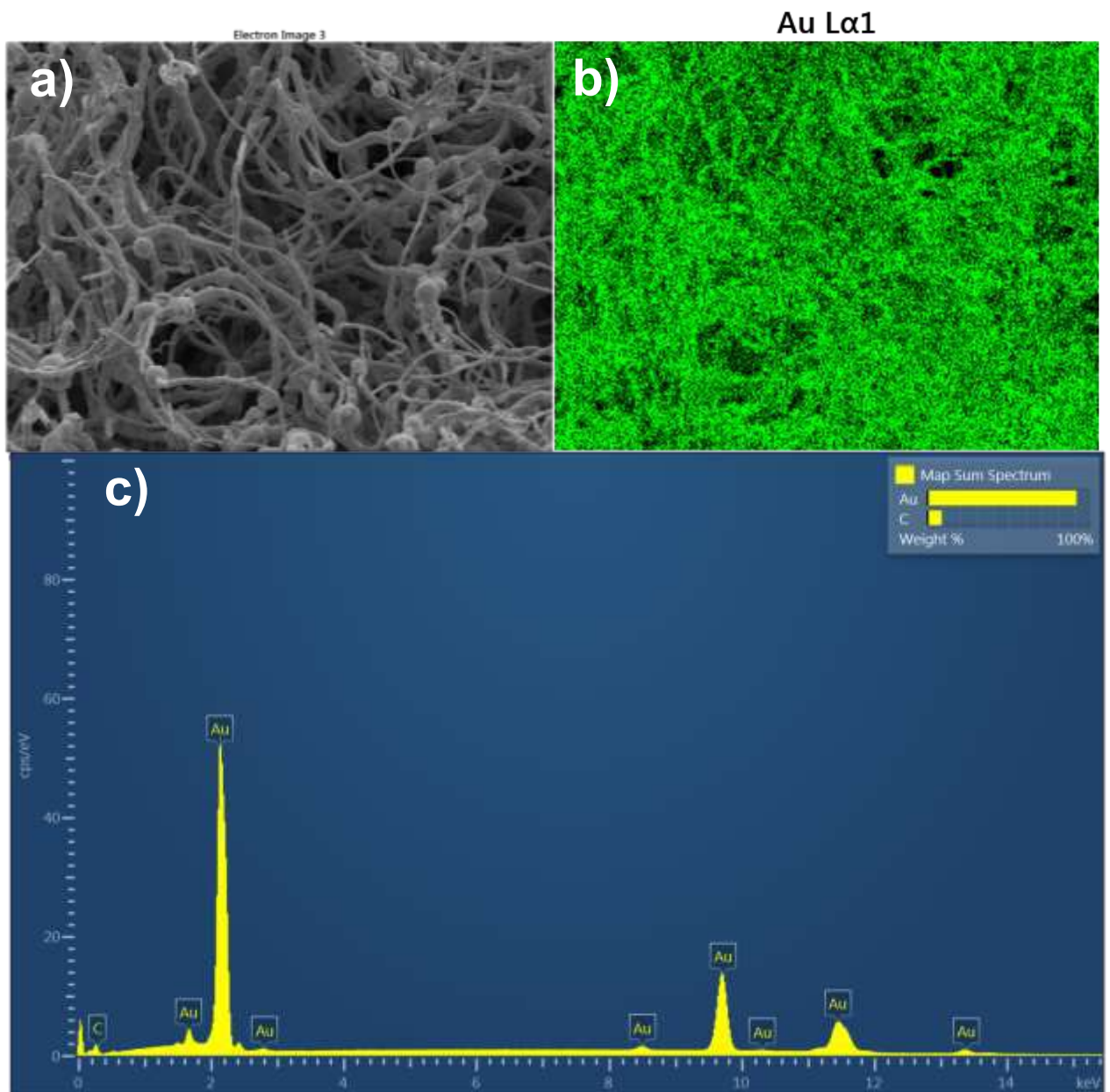


Figura 43 – Imagens de mapa elementar e espectro obtidos por EDS dos microtubos de ouro obtidos utilizando o fungo da espécie *Phialomyces macrosporus* como modelo biológico. a) Microtubos de ouro com aumento de 500X, b) Distribuição de ouro no material microtubular e c) Espectro EDS dos microtubos de ouro.

Realizou-se análises de MEV dos microtubos obtidos das espécies fúngicas *Aspergillus niger* e *Phialomyces macrosporus*, com o intuito de elucidar mais detalhes microestruturais. Dessa maneira, examinando as Figuras 44-a e 45-a, no modo de elétrons secundários (estes elétrons têm baixa energia e resultam em imagens topográficas de alta resolução (contraste em função do relevo), verifica-se a morfologia microtubular biomimética constituída por ouro obtida após a remoção do modelo biológico *Aspergillus niger* e *Phialomyces macrosporus* via tratamento térmico. Diante do exposto, evidencia-se claramente a formação de uma superestrutura microtubular de ouro. Assim, pode-se inferir que a manipulação de células fúngicas vivas de diferentes espécies permite a automontagem de nanopartículas de ouro e posterior formação de microtubos altamente organizados, robustos e uniformes.

Observando a Figura 44-b, verifica-se detalhadamente a morfologia de um microtubo de ouro isolado oriundo da espécie *Aspergillus niger*, cuja espessura é de aproximadamente 2,0 μm . Entretanto, ao compararmos as morfologias dos microtubos obtidos através das espécies *Aspergillus niger* (Figura 44) e *Phialomyces macrosporus* (Figura 45), nota-se que são diferentes. Os microtubos obtidos através da espécie *Phialomyces macrosporus* possui microesferas ao longo dos microtubos, devido ao processo de automontagem biomimético que preserva a estrutura esférica dos esporangióforos (bolsa de esporos reprodutores) (PELCZAR, 1996). Ademais, a Figura 45-b evidencia as minuciosidades estruturais da superfície dos microtubos, tais como a elevada rugosidade, regiões levemente côncavas, as quais são oriundas dos septos da espécie *Phialomyces macrosporus*. Ademais, nota-se que os microtubos de ambas as espécies fúngicas possuem comprimentos de dezenas de micrometros e diâmetros variáveis ao longo dos referidos comprimentos.

As Figura 45 revela especificidades microestruturais dos microtubos obtidos utilizando a espécie *Phialomyces macrosporus* como molde. Consta-se que os microtubos possuem uma rugosidade superficial aparente, devido aos processos de coalescimento das nanopartículas de ouro durante a remoção do modelo biológico via tratamento térmico. Para mais, utilizando o software ImageJ, a partir dos orifícios presentes nos microtubos da Figura 46, verificou-se que os microtubos produzidos pela espécie *Phialomyces macrosporus* possuem diâmetro médio de 1,9 μm e espessura de aproximadamente 409 nm.

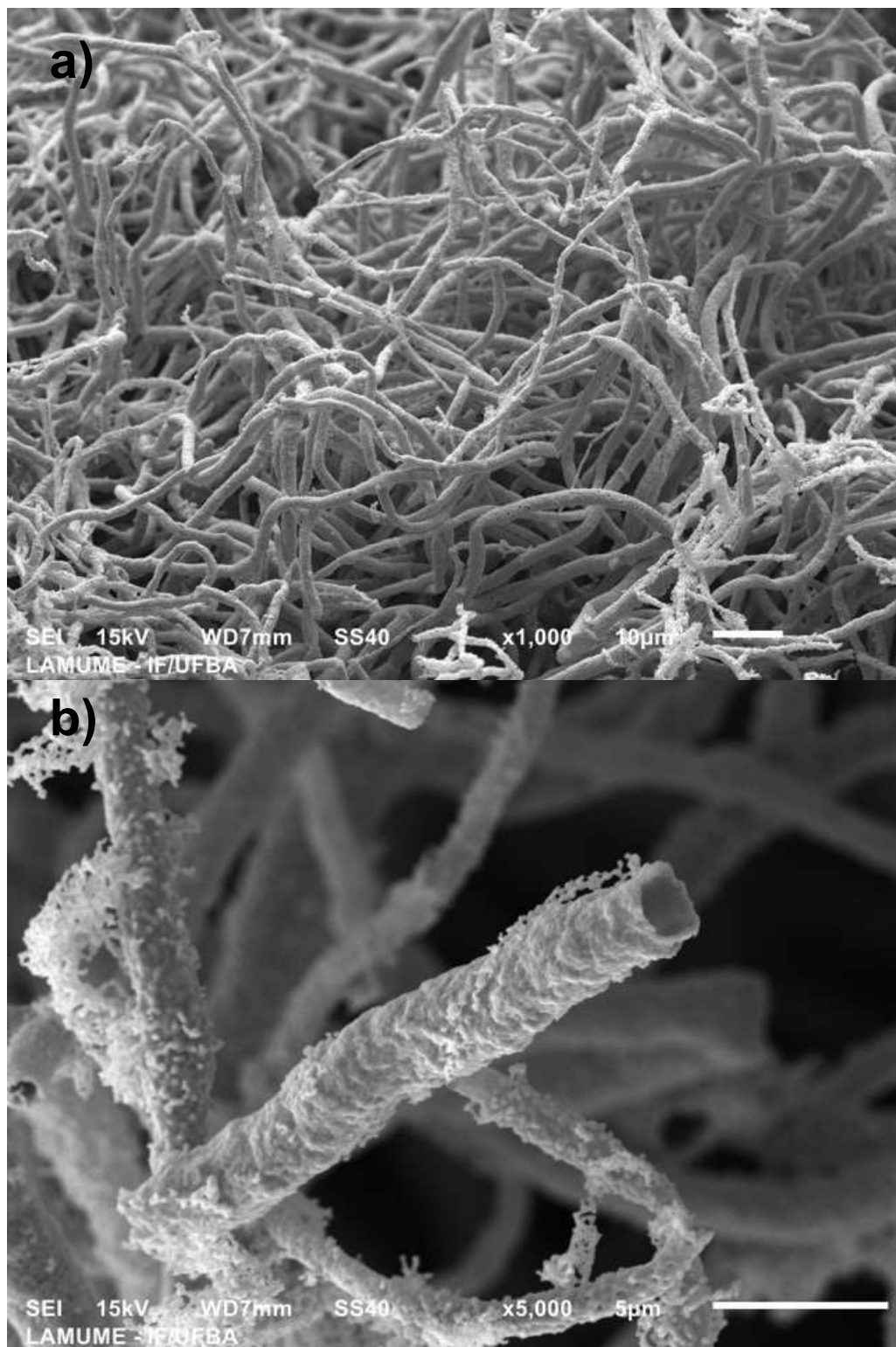


Figura 44 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos microtubos de ouro após a remoção do fungo filamentososo da espécie *Aspergillus niger* via tratamento térmico a) 1000X e b) 5000X.

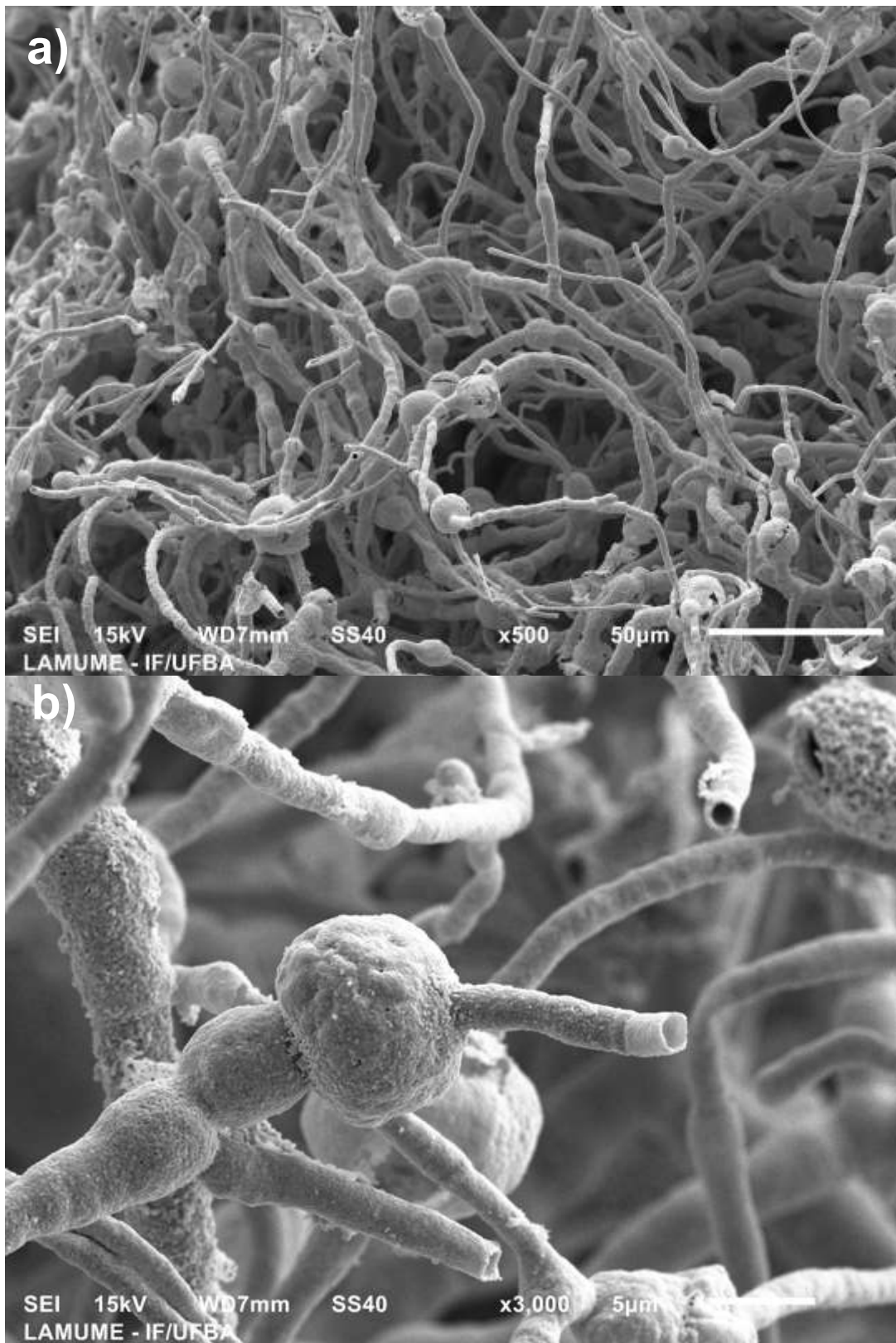


Figura 45 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos microtubos de ouro após a remoção do fungo filamentosso da espécie *Phialomyces macrosporus* via tratamento térmico a) 500X e b) 3000X.

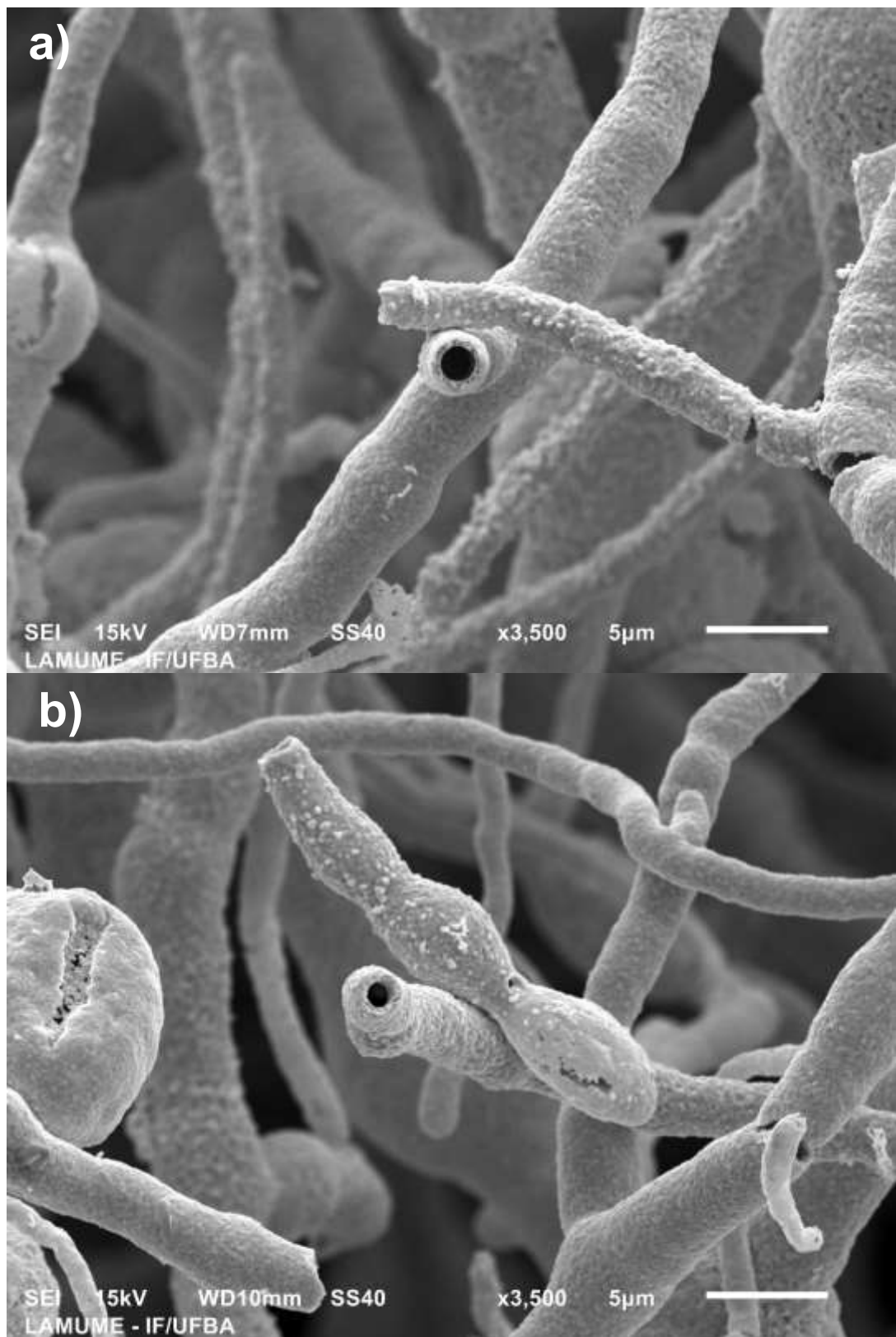


Figura 46 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos microtubos de ouro após a remoção do fungo filamentososo da espécie *Phialomyces macrosporus* via tratamento térmico a) 3500X e b) 3500X.

A Figura 47 possibilita uma maior compreensão quanto às minúcias estruturais internas dos materiais produzidos. Sendo assim, a referida figura refere-se a uma imagem inédita da estrutura eclodida da unidade reprodutora do micro-organismo (esporo) constituída de ouro. Essa imagem revela que a estrutura interna possui irregularidades superficiais, devido ao processo de coalescimento das nanopartículas de ouro, conferindo assim, porosidade à superfície. Ademais, verifica-se que a concavidade do esporo é biomimetizada, e que não há resíduos de biomassa no interior da estrutura. Com base nas referidas informações, bem como nos dados de análise termogravimétrica e EDS, pode-se inferir que o tratamento térmico e a metodologia de limpeza desenvolvidos são eficientes.



Figura 47 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura dos microtubos de ouro após a remoção do fungo filamentoso da espécie *Phialomyces macrosporus* via tratamento térmico com aumento de 6500X.

Os microtubos de ouro obtidos podem ser comparados aos materiais sintetizados por Fontes et al (FONTES 2014). Desse modo, verificou-se que a metodologia desenvolvida na presente tese de doutoramento produz microtubos de morfologia mais detalhada quanto à rugosidade superficial, detalhes microestruturais das estruturas fúngicas bioinspiradas, maior uniformidade superficial e robustez. Além disso, é importante salientar, que o método desenvolvido por Fontes et al. utilizou os resíduos da análise de TG para realizar as análises de MEV, ou seja, a referida metodologia não produz uma quantidade de massa suficiente para aplicações catalíticas, espectroscópicas ou eletroquímicas.

Em comparação com os dados apresentados, assim como Fontes et al. relataram, verificou-se uma contração na morfologia dos microtubos quando comparados com o molde biológico precursor (FONTES, 2014). De modo similar, Zhu et al. relataram a ocorrência na contração das estruturas biomiméticas de óxidos metálicos após a remoção do modelo biológico (asa de borboleta) após tratamento térmico (ZHU, 2008). De fato, utilizando o software ImageJ, evidenciou-se que a espessura média da camada de nanopartículas de ouro suportadas na parede celular mede aproximadamente 703 nm, enquanto a espessura média dos microtubos de ouro possui 409 nm. Jones et al. publicaram um artigo sobre a degradação térmica do micélio fúngico. Os referidos estudos mostraram que o processo de pirólise sob atmosfera de nitrogênio provoca a redução de 66% da espessura da parede celular, além de ocasionar a deformação da hifa. A Figura 48 mostra a evidência dessa constatação.

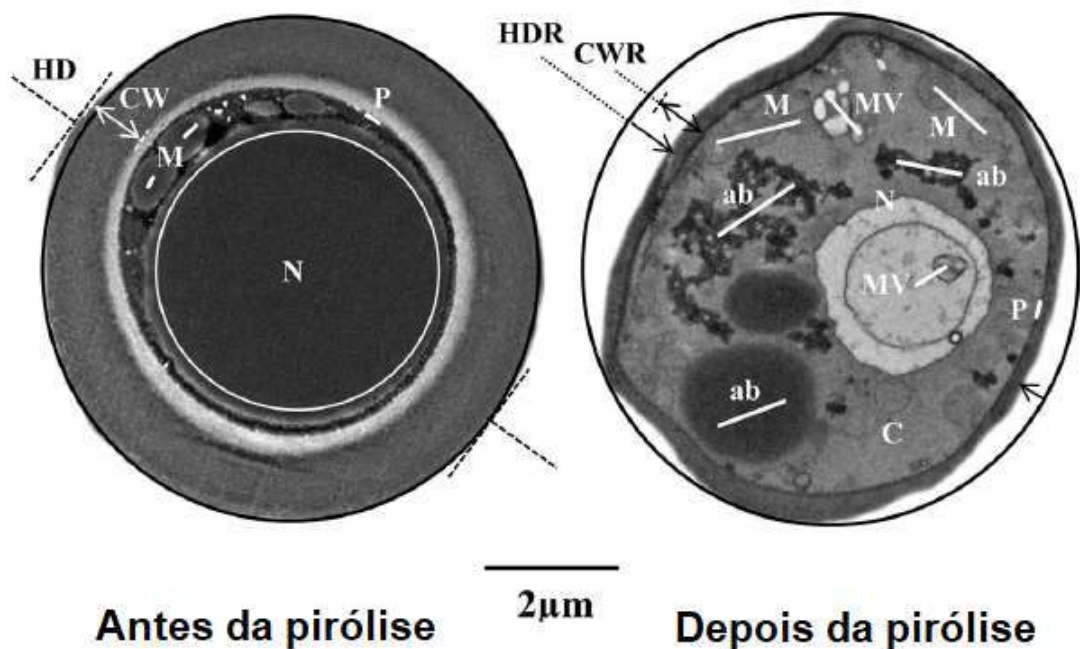


Figura 48 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das seções transversais de células fúngicas antes e após o processo de pirólise (600°C em nitrogênio).

HD: Diâmetro da hifa; HDR: Redução do diâmetro da hifa; CW: Parede celular; CWR: Redução da Parede Celular; M: Mitocôndria; P: Membrana plasmática; N: Núcleo; MV: Estrutura multivesicular; C: Citoplasma; ab: Corpos de acumulação. Adaptada de JONES, 2018.

À face do exposto, pode-se inferir que a contração evidenciada nos microtubos de ouro através das MEV, deve-se à redução da parede celular e do diâmetro da célula microtubular durante o processo de pirólise. Além disso, sabe-se que a parede celular fúngica constitui-se de macromoléculas, tais como glucanas, manose e quitina. A presença da quitina na constituição extracelular confere à parede celular uma maior resistência à transferência de energia térmica, de modo que a estrutura celular não colapsa completamente frente ao processo de pirólise em atmosfera inerte (JONES, 2018). Outro fator aditivo para explicar a contração dos microtubos de ouro, deve-se aos resíduos produzidos durante a degradação térmica, a qual produz um filme com propriedades isolantes sobre a superfície do material. Nessa conformidade, uma maior quantidade de energia é requerida para que os outros componentes orgânicos de maior massa molecular inicie o processo de transformação química denominado de combustão.

Portanto, delineou-se um tratamento térmico com o escopo de evitar o colapso da estrutura mimética constituída de ouro metálico e garantir a remoção completa do

molde biológico. Dessa maneira, a primeira etapa da pirólise consistiu na degradação da biomassa sob atmosfera inerte e baixa velocidade de aquecimento até 800°C. Contudo, conforme as evidências mostradas por Jones et al., as quais foram explanadas anteriormente, o referido processo não degrada completamente as células fúngicas. Assim, trocou-se o fluxo de gás nitrogênio por uma atmosfera oxidante de ar sintético, a qual possibilita a ocorrência de reações de combustão com as macromoléculas que não foram degradadas via procedimento de pirólise. De fato, as MEV e EDS evidenciam que o tratamento térmico utilizado é eficiente para a remoção completa do material biológico com a preservação da estrutura microtubular dos fungos filamentosos, a qual diferencia-se de espécie para espécie.

Através dos estudos efetuados, sugere-se um mecanismo do processo de obtenção dos microtubos de ouro suportado nos seguintes fatos:

- a) As nanopartículas de ouro são estabilizadas através da interação com as moléculas que constituem a parede celular, de modo que as nanopartículas de ouro se mantêm separadas na parede celular, não ocorre o coalescimento das referidas nanopartículas após a secagem por ponto crítico como foi evidenciado na Figura 36-b (MEV) e 38 (MET). De fato, os trabalhos de Bigall et al. e Bhargava et al. revelaram que os híbridos Fungo/NPs-Au possuem atividade catalítica, devido às nanopartículas de ouro imobilizadas na superestrutura biológica (BIGALL, 2008; BHARGAVA, 2015).
- b) A caracterização dos materiais evidenciou que ocorre uma contração nas estruturas miméticas de ouro metálico, de modo análogo ao trabalho de Fontes et al (FONTES, 2014).
- c) As análises termogravimétricas mostraram que a presença de nanopartículas de ouro modificou o perfil da curva termogravimétrica para o material bio-híbrido (Fungo/NPs-Au), de modo que as temperaturas as quais ocorrem os eventos de decomposição são mais baixas, indicando que a presença do metal acelera a eliminação dos componentes orgânicos no modelo biológico. Para mais, verificou-se que há duas regiões de perda mássica. Sabe-se que o processo de perda mássica associa-se à reação de combustão dos componentes orgânicos que constituem o fungo biológico e o oxigênio inserido no sistema (FONTES, 2014). Então, se há duas perdas

mássicas, sugere-se que a região onde ocorre a perda mássica em temperaturas mais elevadas, referem-se aos componentes orgânicos que sofrem combustão com uma maior energia de ativação.

À vista disso, sugere-se que à medida que a temperatura do sistema aumenta em atmosfera inerte, inicia-se um processo de pirólise da biomassa orgânica, o qual ocasiona a contração do diâmetro da célula até um limite, devido à presença de quitina na parede celular. Assim, como as nanopartículas de ouro são estabilizadas pelas moléculas da parede celular, ao passo que ocorre a transformação química da biomassa em produtos de combustão, e a rigor, sabe-se que as nanopartículas tendem ao processo de agregação na ausência de espécies que as estabilizem (ROUCOUX, 2002), inicia-se um processo de coalescimento das nanopartículas de ouro, de modo que as nanopartículas que antes estavam isoladas uma das outras numa disposição de maior área superficial, agregam-se paulatinamente, interconectando-se às nanopartículas das vizinhanças que também estão coalescendo, formando assim, uma estrutura metálica compacta de ouro, produzindo a contração estrutural verificada nas imagens de MEV dos microtubos. A inserção de oxigênio no sistema ocasiona a combustão dos resíduos da pirólise. Ademais, ocorre um processo de fusão parcial das nanopartículas de ouro (PAL, 2019). Uma evidência dessa proposta pode ser verificada através da análise da superfície dos microtubos obtidos (Figuras 44, 45 e 47), a qual apresenta aparentemente, elevada rugosidade superficial.

5.4 ESTUDOS DE APLICAÇÃO DOS MICROTUBOS DE OURO

5.4.1 Estudo da aplicação de microtubos de ouro como substrato para SERS

O espectro Raman é devido ao espalhamento inelástico com frequências ligeiramente modificadas de uma radiação eletromagnética monocromática (no espectrômetro utilizado as amostras foram excitadas com a linha em 532 nm) que incide em uma molécula. No efeito Raman, a atividade está ligada à variação do momento de dipolo induzido na molécula (variação da polarizabilidade, ou seja, da distorção da nuvem eletrônica da molécula) pelo campo elétrico da radiação incidente (SALA, 2008).

O espalhamento Raman é um processo muito pouco eficiente, devido à sua pequena seção de choque o que a torna uma técnica pouco sensível. Entretanto, o aumento da seletividade e elevação da intensificação do espalhamento Raman são adquiridos quando se utiliza substratos ativos. Existem dois efeitos de intensificação que melhoram a eficiência da técnica como o efeito Raman Ressonante (RR) e o efeito de intensificação de espalhamento por meio de superfície (SERS) (SANT'ANA, 2006).

O efeito SERS consiste em uma intensificação significativa do espalhamento Raman mediante à utilização de superfícies metálicas nanoestruturadas, o qual pode ser explicado por dois mecanismos de intensificação: o eletromagnético e o molecular (DE FARIA, 1999). O modelo eletromagnético considera a intensificação do espalhamento próximo à superfície nanoestruturada. A rigor, um material nanoestruturado metálico é constituído de elétrons confinados, os quais formam plasmons de superfície localizados, que oscilam a determinada frequência, capaz de formar campos coulômbicos de longo alcance. Deste modo, quando a radiação eletromagnética do laser incide sobre a superfície, esta radiação entra em ressonância com o plasmon da superfície nanoestruturada, ocasionando a intensificação do espalhamento Raman. Ao passo que, o modelo molecular considera as modificações na polarizabilidade da molécula gerados pela interação da molécula com a superfície nanoestruturada (SANT'ANA, 2006; OTTO, 1992).

Outro efeito de intensificação de espalhamento é o Raman ressonante. Este fenômeno ocorre quando o espectro de uma espécie é obtido com uma energia da radiação de excitação próxima à uma banda de transição eletrônica permitida. Além

disso, caso ocorra o efeito Raman ressonante utilizando uma superfície metálica nanoestruturada, além do efeito SERS, ocorre o efeito de espalhamento Raman ressonante amplificado por superfície (SERRS), o qual permite uma intensificação ainda maior do que o esperado para o efeito SERS (FARIA, 1999).

Nos últimos anos várias técnicas têm sido utilizadas para a fabricação de substratos SERS, tais como imobilização em superfícies, automontagem por técnicas eletroquímicas ou utilizando química de coordenação, entre outros. Contudo, a maioria das técnicas via métodos químicos e físicos têm custo elevado e requer metodologias complexas de síntese (FREEMAN, 1995; ZHANG, 2010; GREENELTCH, 2013; CINEL, 2015).

Nesse trabalho, desenvolveu-se uma técnica para fabricar superfícies porosas ativas ao SERS, manipulando células fúngicas *in vivo* para controlar o tamanho, o formato e a espessura de microtubos com as referidas superfícies ativas. A técnica biológica de automontagem de nanopartículas de ouro na parede celular através do método de estabilização e nutrição via método do citrato é simples, tem baixo custo e reproduzível (FONTES, 2014). Ademais, o método do citrato possibilita a produção de grandes quantidades de microtubos com a morfologia preservada de centenas de micrômetros sem a inserção de resíduos de carbono como o método utilizado por Pal et al. Além disso, mostra-se-á ao discorrer desse capítulo, que o efeito de intensificação do espalhamento por superfície dos microtubos plasmônicos produzidos na presente tese de doutoramento possui uma ordem de magnificação da ordem de 1000 vezes superior para a Rodamina 6G quando comparado com o trabalho de Pal et al (PAL, 2019).

A Figura 49 apresenta o espectro de espalhamento Raman da Rodamina 6G $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ que foi utilizada como padrão para o preparo da solução $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ em estudo. De acordo com a literatura (MAJOUBE, 1991; ZHANG, 2011; PAL, 2019), as bandas em 1647 cm^{-1} , 1567 cm^{-1} , 1506 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} e 1187 cm^{-1} , (Tabela 4) referem-se aos modos vibracionais das ligações C-C na molécula de Rodamina 6G. O sinal Raman em 763 cm^{-1} é característico do estiramento da ligação C-H, o sinal em 634 cm^{-1} refere-se aos modos vibracionais das ligações C-C-C do anel aromático. Ademais, as bandas em 1506 cm^{-1} e 1567 cm^{-1} , referem-se, respectivamente, ao estiramento C-N e N-H, e β (N-H). Insta esclarecer, que todas as bandas de absorção

das medidas realizadas com os substratos e as encontradas na literatura foram organizadas de modo detalhado na Tabela 4.

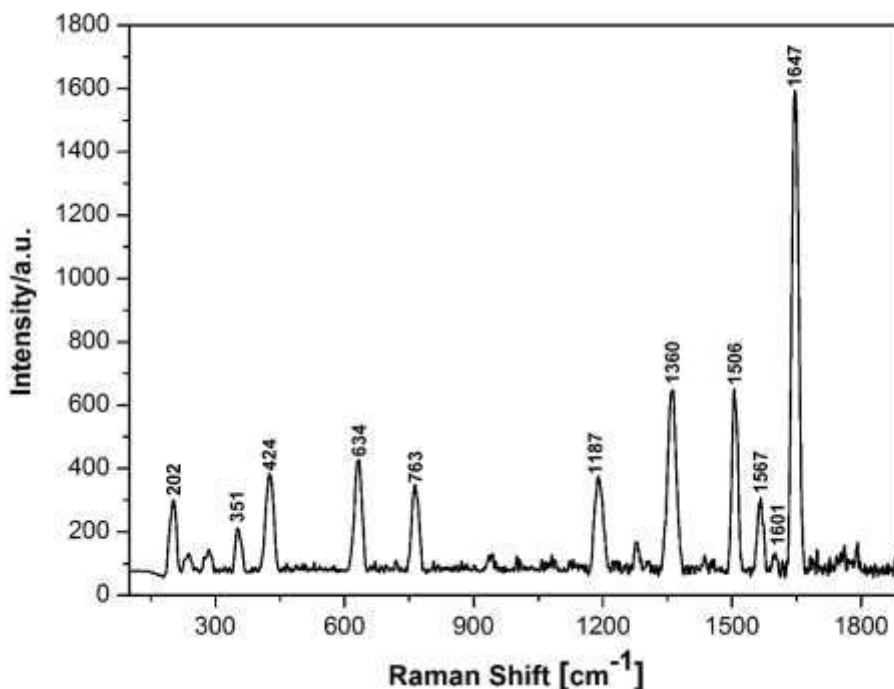


Figura 49 – Espectro Raman da Rodamina 0,01 mol.L⁻¹.

Analisando as Figuras 50 e 51, verifica-se claramente a presença de sinais intensos para a Rodamina 6G 10⁻⁸ mol.L⁻¹ utilizando microtubos biomiméticos nanoestruturados de ouro da réplica da espécie *Aspergillus niger* como superfície SERS ativa. Além disso, verifica-se a superposição de alguns sinais da Rodamina 6G 10⁻⁸ mol.L⁻¹ com o padrão de Rodamina 6G 0,01 mol.L⁻¹ utilizado. Assim, pode-se inferir a presença de atividade SERS da Rodamina 6G, devido aos microtubos biomiméticos microestruturados de ouro, sendo que a sensibilidade da técnica proporcionou observar o espectro do corante em concentração traço. A atividade SERS é dependente de dois fatores-chave: (a) Superfície ressonante do plasmon de excitação do um metal utilizado como substrato e por isso, a maioria dos substratos que apresentam atividade SERS são microestruturas metálicas e (b) Adsorção dos analitos sobre a superfície do metal (SANT'ANNA, 2006). Sendo assim, verifica-se que algumas energias envolvidas no estiramento das ligações da Rodamina 6G apresentadas nos espectros das Figuras 50 e 51, estão deslocadas para bandas de absorção menores. Tais mudanças, podem ser justificadas devido às modificações de

simetria relacionadas ao processo de adsorção, conforme sugerido por Li et al (LI, 1999) e as interações químicas da Rodamina 6G adsorvida na superfície do microtubo de ouro, de modo que essas interações modificam as energias envolvidas nos estiramentos supracitados. O deslocamento para bandas de absorção menores, indica um estiramento menos energético, pois as interações químicas específicas diminuem a energia do referido estiramento da ligação, devido à polarização e distorção das nuvens eletrônicas, modificando assim, as energias envolvidas em cada ligação, o qual é a evidência de quimissorção do adsorbato na superfície dos microtubos plasmônicos, conforme sugerido por Pal et al (PAL, 2019). Além disso, salienta-se que devido à grande amplitude de excitação, obteve-se um número elevado de modos vibracionais detectados (PAL, 2019).

A rigor, necessita-se que haja quimissorção nos *hot spots* ou nas proximidades dos referidos *hot spots*. Por sua vez, os referidos *hot spots* são regiões entre as nanopartículas, as quais possuem uma intensa localização de campo elétrico, devido à interação em fase entre modos plasmônicos de cada uma das nanopartículas (GRASSESCI, 2020). Entretanto, as regiões de alta amplificação de campo elétrico, anteriormente mencionadas, localizam-se em regiões ínfimas da superfície, de modo que, verificou-se intensas flutuações de intensidades para o efeito de intensificação do espalhamento por superfície (GRASSESCI, 2020); além de ter havido dificuldade quanto à localização dos *hot spots* nos microtubos de ouro para constatar o efeito de intensificação do espalhamento por superfície, de modo que, constitui-se uma evidência de que os microtubos obtidos têm apenas algumas regiões que propiciam o SERS. Todavia, sugere-se um processo de dissolução eletroquímica em ZnCl₂/álcool benzílico via método de deposição em vários ciclos voltamétricos com o escopo de aumentar a quantidade de regiões ativas ao SERS (JIA, 2007).

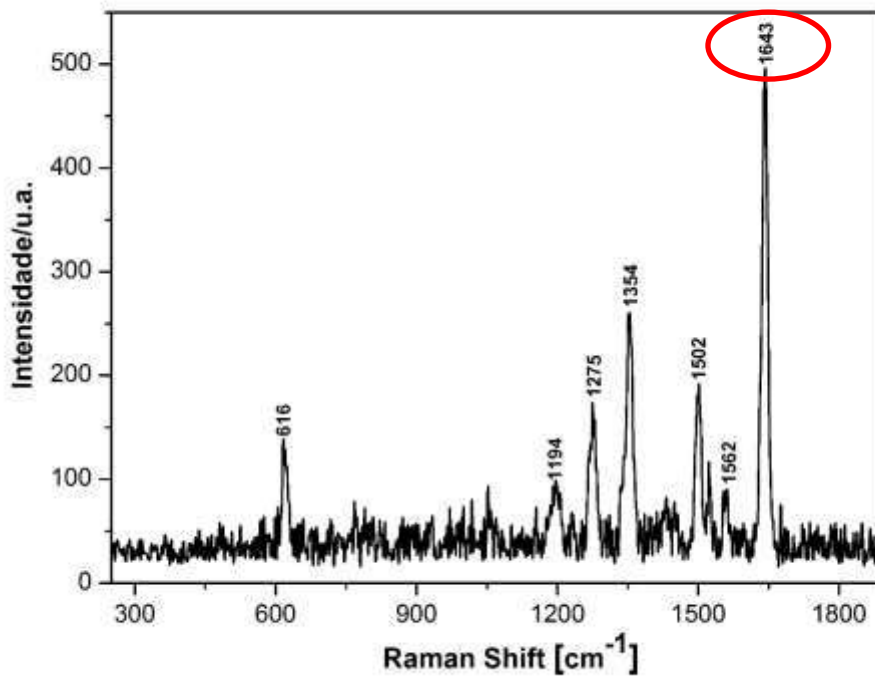


Figura 50 – Espectro Raman da Rodamina 10^{-8} mol.L⁻¹ na réplica dos microtubos de *Phialomyces macrosporus*.

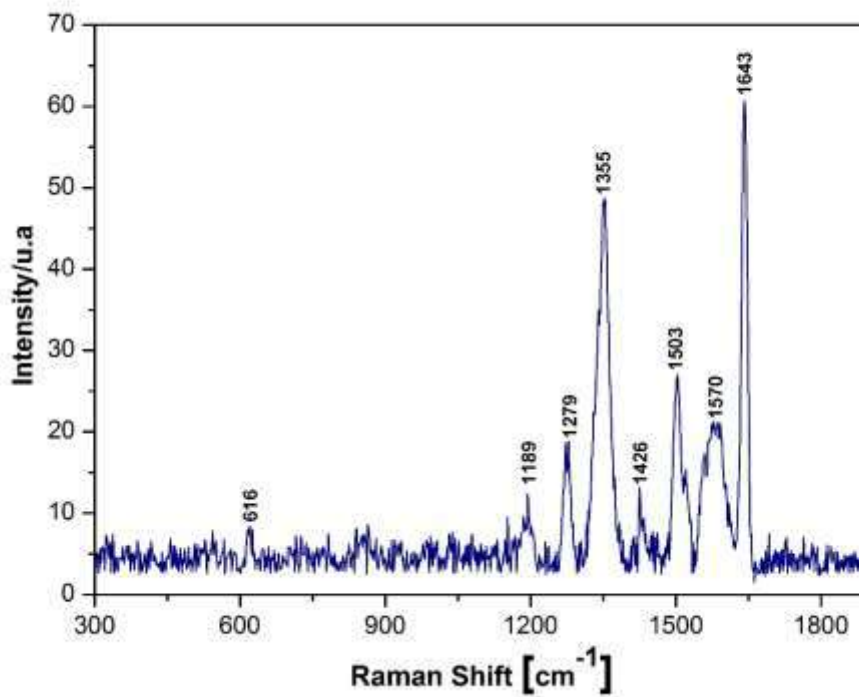


Figura 51 – Espectro Raman da Rodamina 10^{-8} mol.L⁻¹ na réplica dos microtubos de *Aspergillus Niger* (com lavagem após a imersão na solução de Rodamina 6G).

A Figura 52, mostra um segundo espectro da Rodamina 6G na concentração de rodamina 10^{-8} mol.L⁻¹ obtido por efeito de intensificação por superfície (SERS) utilizando microtubos biomiméticos nanoestruturados de ouro da réplica da espécie *Phialomyces macrosporus*, o qual evidencia bandas características da Rodamina 6G com intensidade considerável. Entretanto, verifica-se três bandas em 1001, cm^{-1} , 1295 cm^{-1} e 1444 cm^{-1} , as quais não estão presentes no espectro SERS obtido utilizando a réplica da espécie *Aspergillus niger* e nem no espectro padrão da Rodamina 6G utilizada nos experimentos, conforme apresentado na tabela 4. Segundo a literatura, essas referidas bandas são características de estiramentos da Rodamina 6G, a saber: 1001 cm^{-1} referente às deformações das ligações C-C-C do anel aromático, 1295 cm^{-1} referente à deformação C-H e em 1444 cm^{-1} às deformações dos grupos N-etil (MAJOUBE, 1991).

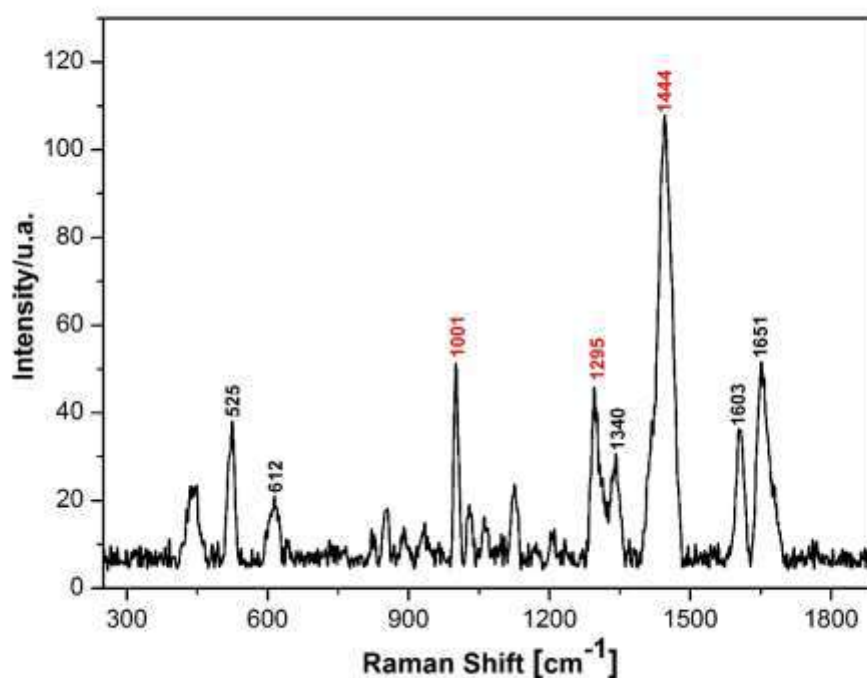


Figura 52 – Espectro Raman da Rodamina 10^{-8} mol.L⁻¹ na réplica dos microtubos de *Aspergillus Niger* (sem lavagem após a imersão na solução de Rodamina 6G).

A Rodamina 6G em solução aquosa apresenta uma banda de absorção intensa em 530 nm (MAJOUBE,1991). De modo similar, a energia da linha laser utilizada para a excitação dos espectros Raman tem um comprimento de onda igual a 532 nm. Logo, pode-se inferir que radiação eletromagnética incidente se encontra em ressonância com a banda de absorção do adsorbato (Rodamina 6G) e com o plasmon de superfície do ouro microestruturado. De modo que, o efeito de intensificação por superfície se combina ao efeito Raman ressonante. Nessas condições, a intensificação do espalhamento Raman é amplificado (SERRS) e a sensibilidade da técnica é aumentada para modos vibracionais específicos (cromóforo). Sendo assim, sugere-se que as bandas específicas do espectro Raman em questão (1001 cm^{-1} , 1295 cm^{-1} e 1444 cm^{-1}) é devido ao efeito SERRS.

A atividade SERS é dependente da superfície ressonante do plasmon de excitação do metal utilizado como substrato, e por isso, a maioria dos substratos que apresentam atividade SERS são nanopartículas metálicas. As estruturas nanométricas possuem uma frequência que depende da geometria e do tamanho da superfície, o qual está associado à rugosidade em dimensões nanométricas do material (SANTANA,2006). Analisando as Figuras 53-a e 53-b, evidencia-se a superfície rugosa dos substratos SERS ativos utilizados. Durante o processo de remoção do modelo biológico, ocorre a fusão parcial das nanopartículas metálicas de ouro, de modo que é formada uma superfície altamente porosa, as quais são superfícies plasmônicas, onde há *hot spots* distribuídos de modo não uniforme sobre a superfície dos referidos microtubos de ouro. Assim, a molécula alvo adsorve nas proximidades dos sítios ativos, e conseqüente, ocorre o efeito de amplificação do espalhamento por meio de superfície (PAL, 2019; KUDELSKI, 2005), possibilitando assim, a detecção de substâncias em concentrações traços como a da Rodamina 6G utilizada a $10^{-8}\text{ mol.L}^{-1}$.

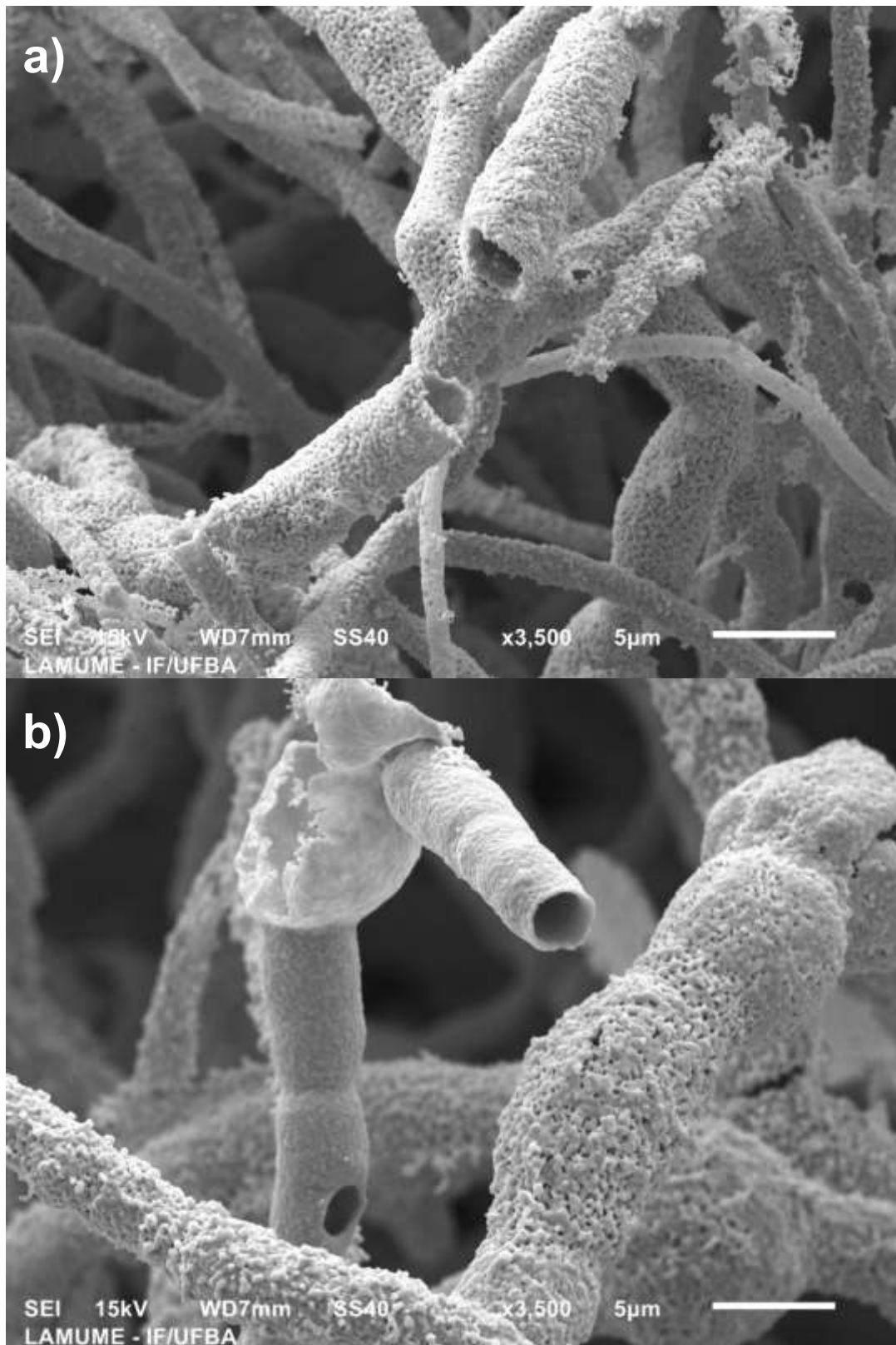


Figura 53 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos microtubos de ouro obtidos utilizando o fungo da espécie a) *Aspergillus niger* como modelo biológico com aumento de 3500X e b) *Phialomyces macrosporus* como modelo biológico com aumento de 3500X.

A Figura 54 mostra a comparação entre os microtubos de ouro obtidos com as mesmas condições de síntese, modificando-se apenas as espécies utilizadas como molde biológico (*Phialomyces macrosporus* e *Aspergillus niger*). As hifas utilizadas produzem microestruturas tubulares com o comprimento de dezenas de micrômetros, mas possuem diâmetros diferentes. Além disso, analisando a Figura 54-b, nota-se que o modo de síntese é preciso quanto à mimetização das células fúngicas: as estruturas em formatos esféricos na referida microscopia, são os phialósporos do fungo *Phialomyces macrosporus*, isto é, as unidades de reprodução do fungo. Assim, constata-se que o método desenvolvido possibilita a manipulação e controle da rugosidade da superfície, espessura do microtubo e formato, de acordo com a espécie do fungo selecionada (KUBO, 2016). Salienta-se que a intensidade dos sinais Raman obtidos para a Rodamina 6G são mais intensos para a espécie *Phialomyces macrosporus*, provavelmente, devido à maior porosidade da superfície, isto é, devido a maior quantidade de nanocristais de ouro distribuídos na superfície, a qual possibilita uma maior quantidade de sítios ativos, *hot spots*, para efeito de intensificação do espalhamento por superfície mediado pela microestrutura plasmônica.

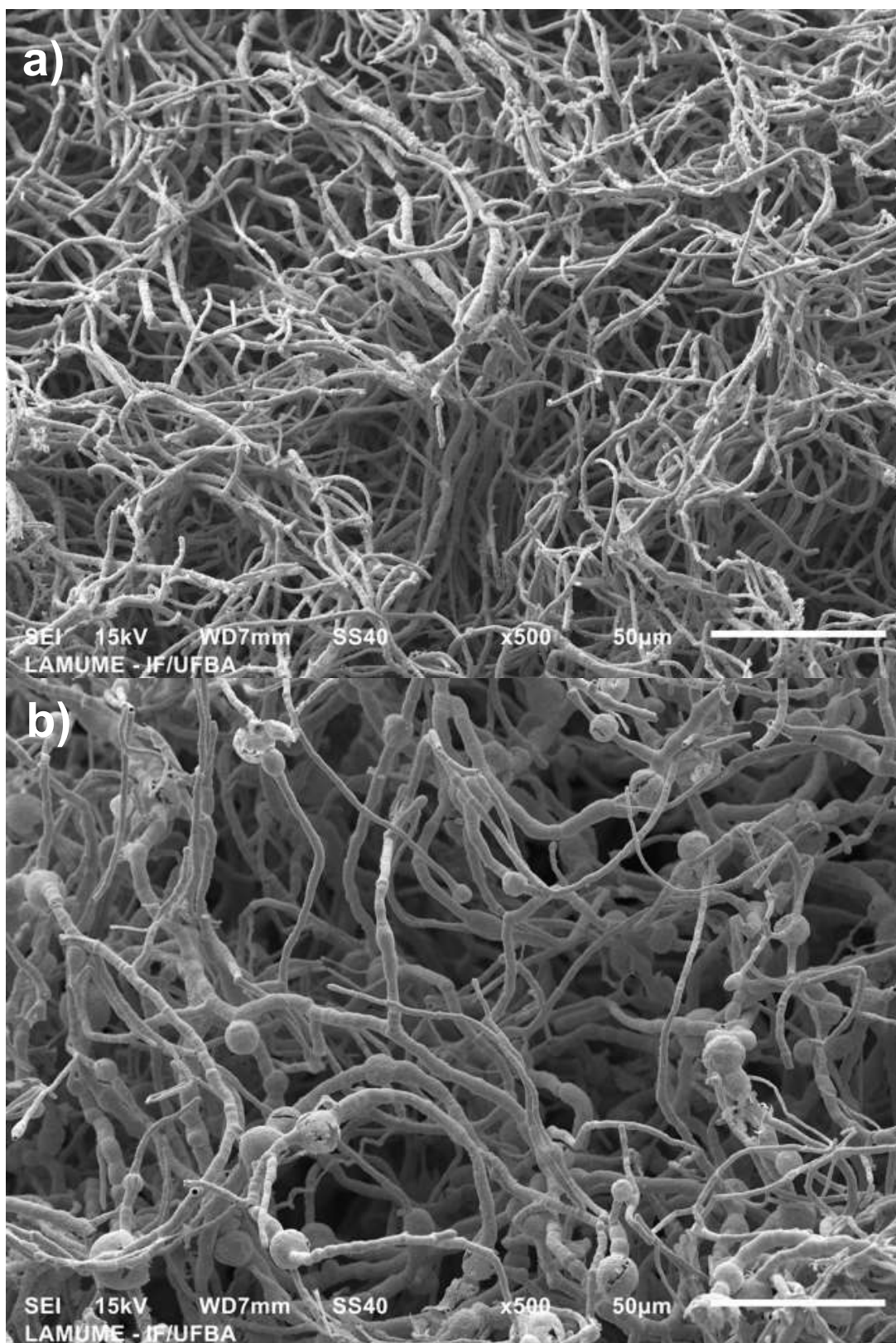


Figura 54 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos microtubos de ouro obtidos utilizando o fungo da espécie a) *Aspergillus niger* com aumento de 500X e b) *Phialomyces macrosporus* com aumento de 500X.

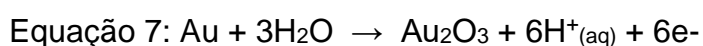
Tabela 4 – Bandas de absorção da Rodamina 6G.

Literatura (Zhang, 2011; MAJOUBE, 1991; MICHAELS, 1999; PAL, 2019) (cm ⁻¹)	Rodamina 6 G 0,01 mol.L ⁻¹ (cm ⁻¹)	Rodamina 6G 10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹ na réplica de Microtubo de <i>A. niger</i> (cm ⁻¹)	Rodamina 6G 10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹ na réplica de Microtubo de <i>P.</i> <i>macrosporus</i> (cm ⁻¹)	Rodamina 6G 10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹ na réplica de Microtubo de <i>A. niger</i> (Com lavagem) (cm ⁻¹)
1646	1647	1651	1643	1643
1601	1601	1603	-----	-----
1444	-----	1444	-----	-----
1567	1567	-----	1562	1570
1506	1506	-----	1502	1503
1360	1360	1340	1354	1355
1295	-----	1295	-----	1279
1274	1277	-----	1275	-----
1184	1187	-----	1194	1189
1013	-----	1001	-----	-----
772	763	-----	-----	-----
612	634	612	616	616
555	-----	525	-----	-----
403	424	-----	-----	-----
354	351	-----	-----	-----
266	202	-----	-----	-----

6.5 Estudo eletroquímico da aplicação dos microtubos de ouro como eletrodos de alta área superficial

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica utilizada em diversas aplicações, tais como, caracterizar o comportamento redox de compostos de coordenação e espécies em fases líquidas aquosas e não-aquosas; determinar processos químicos que precedem ou sucedem reações eletroquímicas; avaliar a cinética de transferência eletrônica; análises quantitativas e estudos exploratórios em geral (TICIANELLI, 2013). Na presente tese de doutoramento, utilizar-se-á a referida técnica para estudar o comportamento eletroquímico de microtubos biomiméticos de ouro frente ao eletrodo de ouro padrão com o objetivo de constatar uma maior área superficial dos microtubos biomiméticos que foram sintetizados.

Inicialmente, com o escopo de verificar o comportamento eletroquímico do eletrodo frente à solução de eletrólito suporte, H_2SO_4 1 mol.L^{-1} , realizou-se medidas eletroquímicas do eletrodo constituído de ouro polido e do eletrodo constituído de microtubos de ouro. A Figura 55 apresenta os voltamogramas referentes ao eletrodo de ouro polido, o qual é a referência utilizada nesse trabalho. Analisando o perfil das curvas, verifica-se que na varredura anódica há dois picos em $+1,2 \text{ V}$ e $+1,45 \text{ V}$ vs Ag/AgCl , referente ao processo de oxidação do ouro ao óxido Au_2O_3 (PLOWMAN, 2011), conforme descrito na equação 7. Sugere-se que a existência de mais de um sinal anódico, deve-se às formas hidratadas do óxido. Ademais, Sukeri et al. mostrou recentemente que esses duplos picos anódicos, relaciona-se com (i) a rugosidade da superfície e (ii) defeitos na estrutura cristalina, devido ao baixo índice de cristalinidade dos planos $\text{Au}(100)$, $\text{Au}(110)$ e $\text{Au}(111)$ (SUKERI, 2018). Na varredura catódica tem-se um sinal em $+0,95 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl e outro de baixa intensidade de corrente em $+0,8 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl , atribuídos às reduções em suas diferentes formas oriundas dos óxidos formados na varredura anódica.



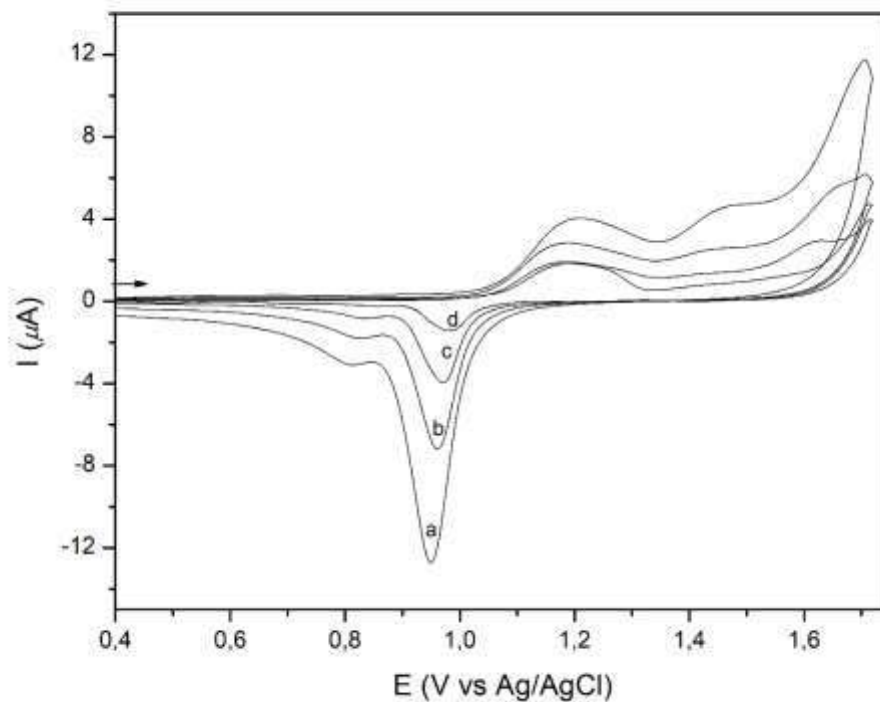


Figura 55 – Voltamograma cíclico do eletrodo de Au polido (padrão) em solução aquosa de H_2SO_4 1 mol.L⁻¹. V= (a) 100, (b) 50, (c) 25 e (d) 10 mV.s⁻¹

A Figura 56 apresenta os voltamogramas obtidos para o eletrodo de ouro microestruturado. Verifica-se que o perfil do voltamograma é análogo ao perfil dos voltamogramas obtidos para o eletrodo polido. Além disso, constatou-se sinais anódicos em +1,1 V e 1,25 V vs. Ag/AgCl, e na varredura catódica são verificados os picos em +0,94 e 0,8 V vs Ag/AgCl.

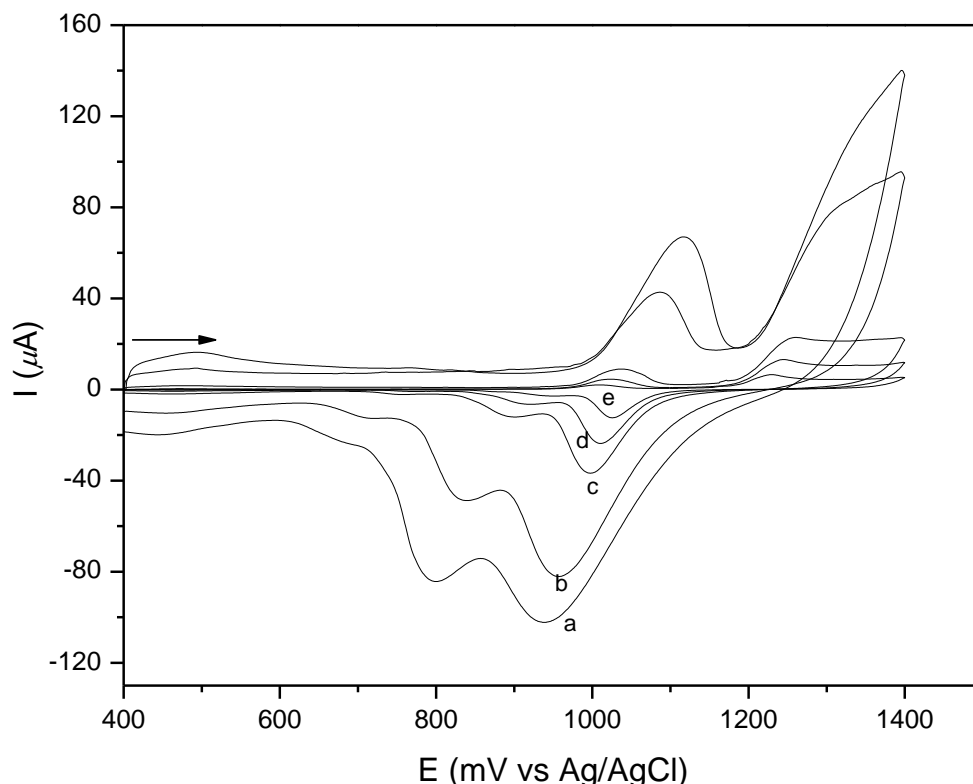


Figura 56 – Voltamograma cíclico do eletrodo de Au microestruturado em solução aquosa de H_2SO_4 1 mol . L⁻¹. V= (a) 100, (b) 50, (c) 10, (d) 5 e (e) 2 mV.s⁻¹.

Ao comparar os voltamogramas de ambos os eletrodos com a mesma velocidade de varredura (Figura 57), observou-se que as intensidades de corrente para os sinais anódicos e catódicos são mais intensos para o eletrodo constituído de ouro microestruturado, o qual é um indício de que a área superficial do referido eletrodo é superior ao do eletrodo polido. De fato, segundo a equação de Randles-Sevcik, a intensidade da corrente (i) aumenta linearmente com a velocidade de varredura (v), onde n é o número de elétrons transferidos no processo redox, A é a área superficial do eletrodo, D é o coeficiente de difusão do analito, e C é a concentração do analito na solução submetida ao processo eletroquímico (BARD, 2001).

$$\text{Equação 8: } i = 0,446nFAC \left(\frac{nFvD}{RT} \right)^{1/2}$$

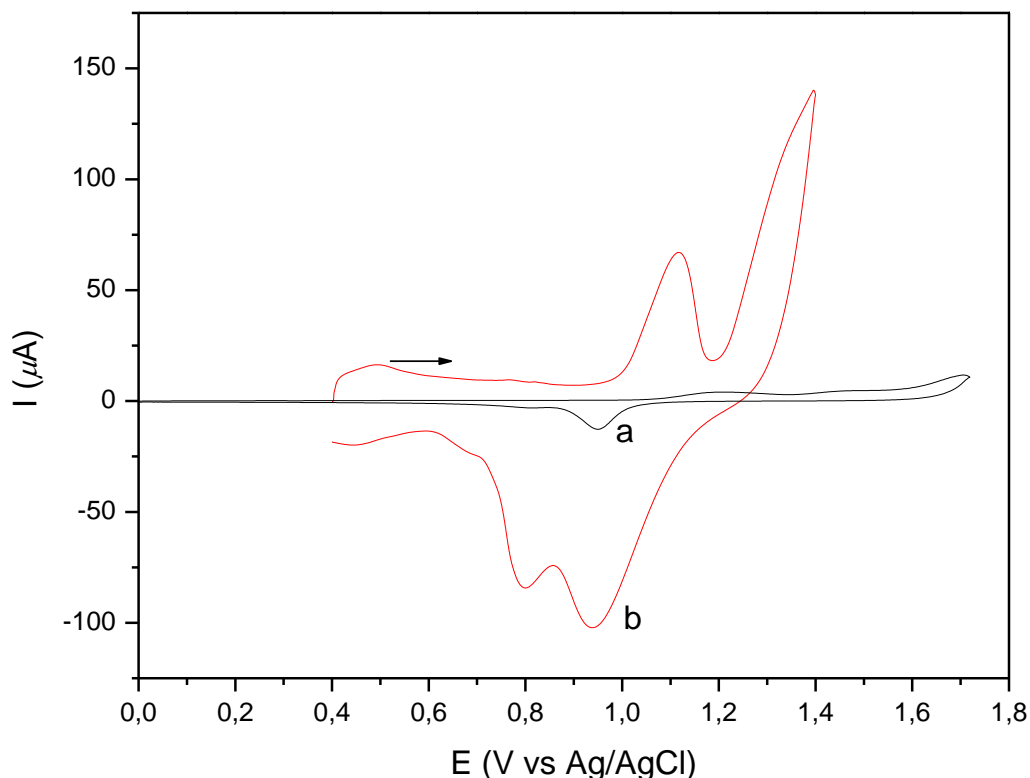


Figura 57 – Voltamograma cíclico do eletrodo de (a) polido (padrão) e (b) Au microestruturado em solução aquosa de H_2SO_4 1 mol . L^{-1} . $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Ressalta-se que antes das medidas voltamétricas as soluções foram submetidas ao borbulhamento com argônio de alta pureza durante 5 minutos. Esse processo é importante para a remoção do gás oxigênio dissolvido na solução, visto que a presença do oxigênio molecular pode provocar a oxidação da superfície do eletrodo e/ou reagir com os reagentes ou produtos da reação de eletrodo a ser estudada, ou mascarar a corrente produzida pela espécie eletroativa de interesse. Nas equações 9, 10, 11 e 12, verificam-se as semi-reações promovidas pela presença do oxigênio molecular, as quais promovem o surgimento de picos em $-0,05 \text{ V}$ vs. o eletrodo de calomelano (ECS) e a outra ao redor de $-1,0 \text{ V}$ vs. ECS (ALEIXO, 2018).

Equação 9: $\text{O}_2 + 2\text{H}^+(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$ (meio ácido - $E_{1/2} \approx -0,05 \text{ V}$ vs. ECS).

Equação 10: $\text{O}_2 + 2\text{H}^+(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ (meio alcalino ou neutro - $E_{1/2} \approx -0,05 \text{ V}$ vs. ECS)

Equação 11: $\text{O}_2 + 4\text{H}^+(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ (meio ácido - $E_{1/2} \approx -1,0 \text{ V}$ vs. ECS)

Equação 12: $O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^-$ (meio alcalino ou neutro - $E_{1/2} \approx -1,0$ V vs. ECS)

Realizou-se um estudo comparativo entre os eletrodos de ouro polido e ouro microestruturado mediante a análise voltamétrica de uma solução de hexacianoferrato (III), cujo processo redox é $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$. Os voltamogramas cíclicos obtidos se encontram nas Figuras 58 e 59 para Au polido e Au microestruturado, respectivamente. Inicialmente, é importante ressaltar que ambos os voltamogramas têm o mesmo perfil, mas com as intensidades dos picos diferentes. Verifica-se que na varredura anódica, tem-se um pico em +0,585 V vs. Ag/AgCl e na varredura catódica um pico em 0,436V vs. Ag/AgCl, atribuídos aos processos de redução e oxidação do hexacianoferrato III, respectivamente. O processo de redução eletroquímica utilizando um eletrodo metálico, deve-se à modulação da energia dos elétrons do eletrodo via aplicação de uma voltagem, de modo que quando os elétrons no eletrodo possuem um anergia maior do que a energia do orbital molecular mais baixo desocupado (LUMO) do $[Fe(CN)_6]^{3-}$ ocorre o processo redox, ou seja, um elétron do eletrodo é transferido para a referida espécie (ELGRISHI, 2018).

O movimento da espécie $[Fe(CN)_6]^{3-}$ para a superfície do eletrodo de ouro é controlado, majoritariamente, pelo transporte de massa via difusão. Sendo assim, analisando de modo mais detalhado as curvas voltamétricas, pontualmente a varredura anódica, o que ocorre é que durante essa varredura há a transferência da espécie $[Fe(CN)_6]^{3-}$ da região não interfacial da solução à superfície do eletrodo via difusão, resultando na redução da espécie para $[Fe(CN)_6]^{4-}$ e aumento da corrente medida com a variação do potencial. Nesse ínterim, a região fronteira denominada de dupla camada elétrica, enriquece-se de espécies reduzidas $[Fe(CN)_6]^{4-}$ e uma depleção gradual do transporte de espécies $[Fe(CN)_6]^{3-}$ do seio da solução à superfície do eletrodo, resultando na diminuição da corrente. Na varredura catódica, tem-se uma baixa concentração de espécies $[Fe(CN)_6]^{3-}$ na superfície do eletrodo, mas uma alta concentração de espécies $[Fe(CN)_6]^{4-}$ na referida superfície as quais serão oxidadas, satisfazendo a equação de Nernst e formando o pico referente à oxidação ao decorrer da varredura catódica (ELGRISHI, 2018).

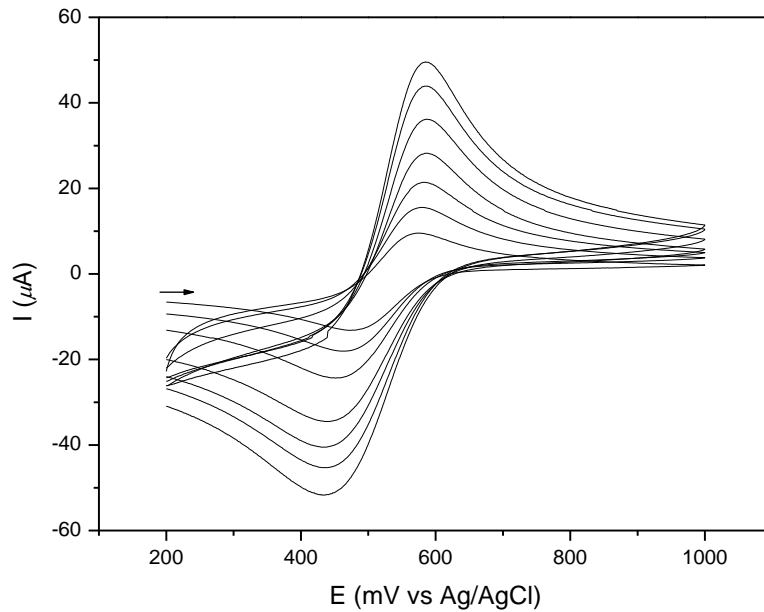


Figura 58 – Voltamograma cíclico de solução aquosa $9,97 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ com eletrodo de Au polido em solução aquosa de H_2SO_4 1 mol L^{-1} . $v = 250, 200, 150, 100, 50, 25$ e 10 mV s^{-1} .

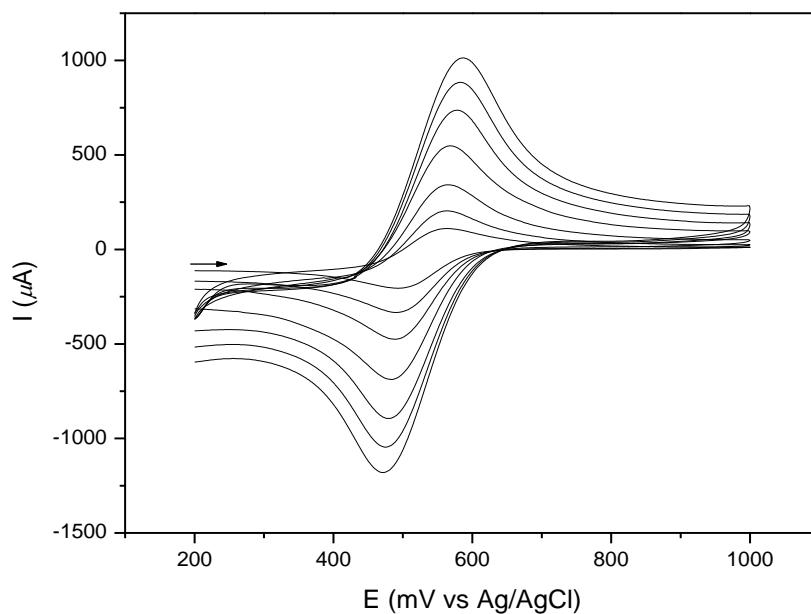


Figura 59 – Voltamograma cíclico de solução aquosa $9,97 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ com eletrodo de Au microestruturado em solução aquosa de H_2SO_4 1 mol L^{-1} . $v = 250, 200, 150, 100, 50, 25$ e 10 mV s^{-1} .

O processo eletroquímico é controlado, majoritariamente, pelo processo de transferência de massa via difusão, visto que os processos de convecção e migração são desprezíveis, devido a utilização de um sistema com alta concentração do eletrólito suporte e a ausência de baguetas agitadoras no sistema (ELGRISHI, 2018). O processo de transferência de carga para a espécie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ é orquestrado pela difusão a qual tem o valor de $7,63 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Ademais, o processo de transferência de carga apresenta uma relação linear da corrente de pico (I_p) com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), como indicado pela equação 13, a qual é a equação rearranjada de Randles-Sevcik (equação 5) para colocar $v^{1/2}$ em evidência (BARD, 2001).

Equação 13: $I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} D^{1/2} v^{1/2} A.C$

Utilizou-se os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades (Figuras 58 e 59) com o escopo de estimar a área dos eletrodos polido e microestruturado através de uma análise das curvas utilizando os dados de I_p e $v^{1/2}$ (Tabela 5) em conjunto com a equação de Randles-Sevcik, das tangentes das curvas das Figuras 60 e 61 e aplicação do coeficiente de difusão ($7,63 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e concentração da espécie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ($9,97 \times 10^{-4} \text{ L}^{-1}$). Dessa maneira, foram estimadas as áreas de $0,1 \text{ cm}^2$ e $3,1 \text{ cm}^2$, respectivamente, para os eletrodos de ouro polido e ouro microestruturado.

Tabela 5 - Valores de I_p em função $v^{1/2}$ obtidos nos voltamogramas para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.

$v^{1/2} (\text{ mV s}^{-1})^{1/2}$	I_p (polido)	I_p (microestruturado)
0,5	49,1	1013
0,45	44,14	889,7
0,387	36,02	745
0,316	28,80	548
0,224	21,13	341
0,158	15,72	207
0,1	9,40	114,4

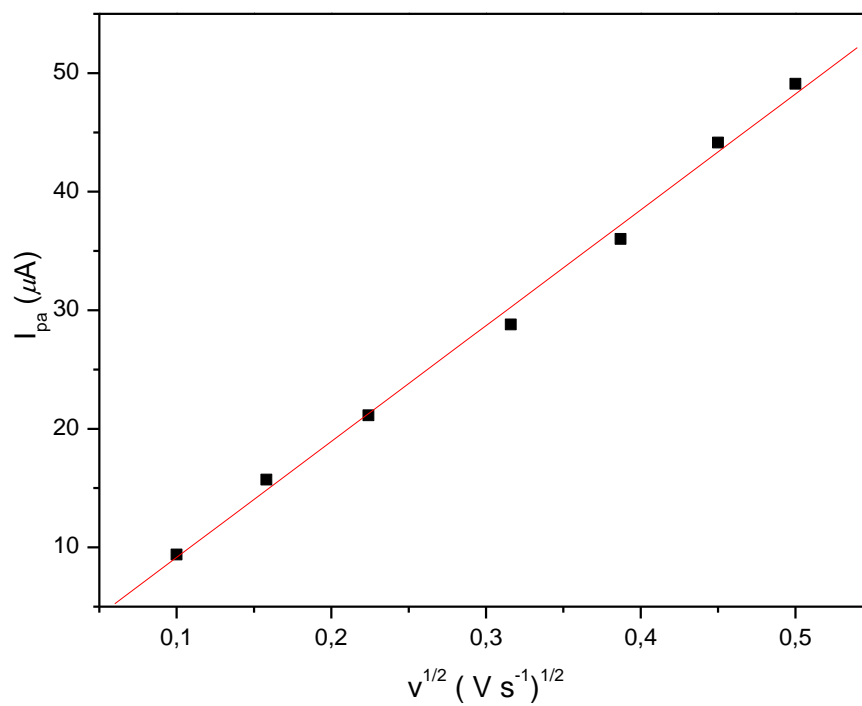


Figura 60 – Curva de I_p vs $v^{1/2}$ – Eletrodo de Au polido

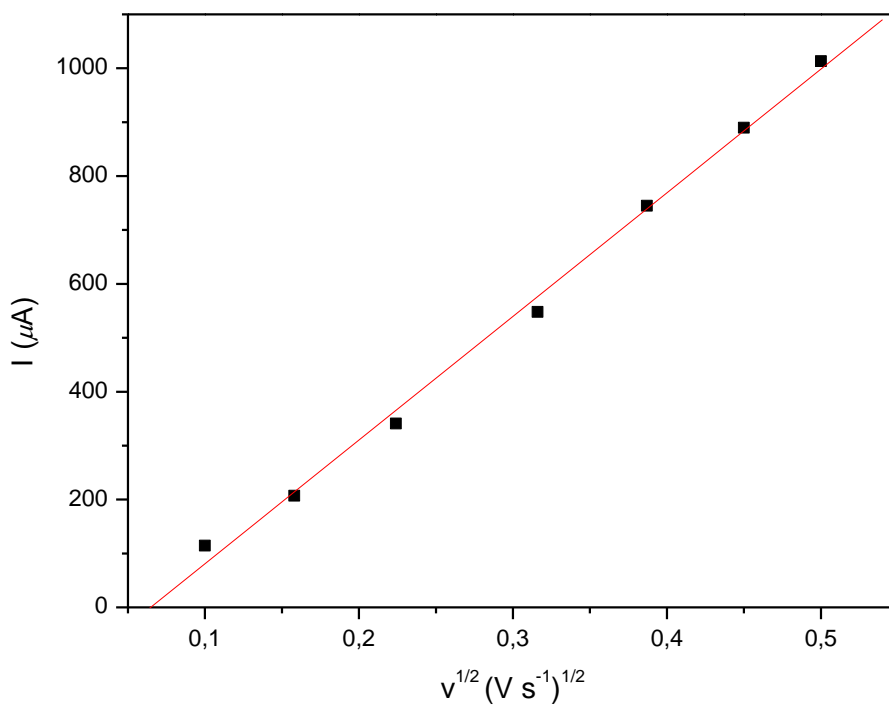


Figura 61 - Curva de I_p vs $v^{1/2}$ – Eletrodo de Au microestruturado

Portanto, a área real do eletrodo de ouro microestruturado obtido da réplica de células fúngicas filamentosas é 31 vezes superior à área do eletrodo polido, o que ratifica as intensidades de corrente obtidas nos voltamogramas cíclicos nas figuras 58 e 59, bem como os dados explicitados na Tabela 05. Sendo assim, infere-se que foi produzido um eletrodo de ouro de alta área superficial via um método inédito utilizando a manipulação de células fúngicas *in vivo* através da funcionalização de nanopartículas de ouro sobre a parede celular do fungo. Além disso, segundo a literatura (SUKERI, 2007; GE, 2007; XIAO, 2014), eletrodos com alta área superficial em comparação com os eletrodos convencionais possuem uma elevada taxa de transferência de elétrons entre a interface eletrodo-eletrólito, tornando-os candidatos ideais para aplicação em catálise e sensores.

6.6 Funcionalização de nanopartículas de platina na parede celular de fungos filamentosos para a produção de microtubos de platina

Os estudos de Bigall et al. mostraram que o crescimento de espécies fúngicas em nanopartículas de platina ou paládio, processam-se de modo lento, além de produzir uma camada de nanopartículas de platina menos espessa quando comparada com os biosistemas obtidos utilizando nanopartículas de ouro (BIGALL, 2008). Sendo assim, foi produzido um bio-híbrido constituído por células fúngicas e nanopartículas de platina utilizando um método inédito, enquanto que para a produção de microtubos de ouro foi utilizado citrato como nutriente, no presente método, utilizou-se extrato de batata e dextrose. Dessa maneira, obteve-se uma metodologia a qual produziu biosistemas híbridos constituídos por nanopartículas de platina e fungos filamentosos, os quais foram produzidos em apenas 5 dias de cultivo da espécie *Phialomyces macrosporus* sem necessidade de pré-adaptação em solução de citrato/ácido cítrico.

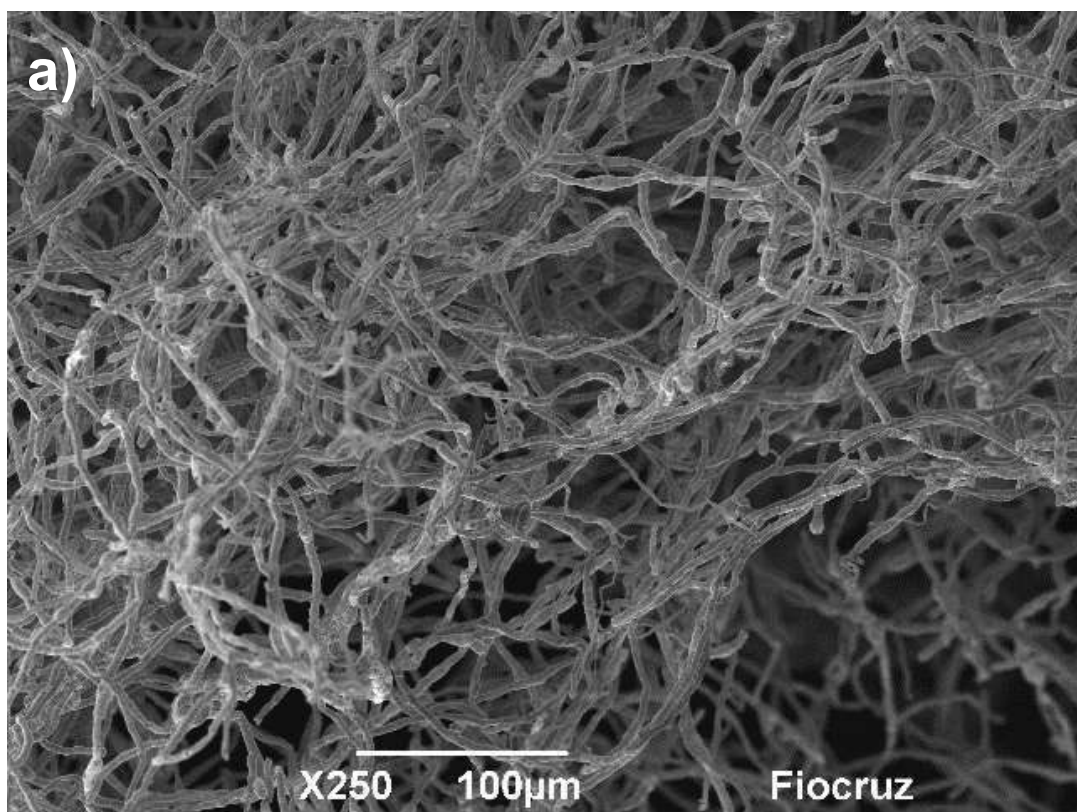
Inicialmente, realizou-se análises de microscopia eletrônica de varredura (sem metalização) que permitiram elucidar o perfil micromorfológico e as características microestruturais do híbrido constituído de células fúngicas e nanopartículas de platina.

As Figuras 62 e 63 apresentam as micrografias obtidas por MEV sem metalização do bio-híbrido constituído por hifas micelares e nanopartículas de platina. O material formado pelo fungo e as nanopartículas de platina, mostra que a morfologia microtubular das hifas é preservada após a formação do bio-híbrido. Além disso, verifica-se que, a parede celular do fungo possui uma distribuição aparentemente uniforme de nanopartículas de platina.

Com o intuito de comprovar a constituição química do bio-híbrido Fungo/NPs-Pt, os materiais foram analisados por espectroscopia de energia dispersiva de Raios X (EDS). As figuras 63-a e 63-b apresentam os mapas de composição do híbrido Fungo/NPs-Pt após a remoção do molde biológico, verifica-se que a superfície contém platina, carbono e oxigênio.

A figura 63-c, apresenta o espectro EDS dos microtubos de ouro. Analisando o espectro da figura supracitada, verifica-se a presença de sinais intensos em 2,0485 KeV e 9,4424 KeV, os quais referem-se às linhas espectrais características das transições da platina, oriundas das camadas eletrônicas, $M\alpha_1$ e $L\alpha_1$, respectivamente. Ademais, o sinal intenso em 0,526 KeV (camada eletrônica $K\alpha_1$), é característico do

elemento oxigênio. Sendo assim, sugere-se que o material microtubular formado é constituído de óxido de platina. A evidência para esta ratificação está no percentual dos elementos identificados na microanálise por dispersão de Raios-X, os quais são aproximadamente, 45 % para platina e 20 % para oxigênio. Insta esclarecer, que a presença do sinal do elemento carbono, refere-se à fita de carbono utilizada como suporte para a análise.



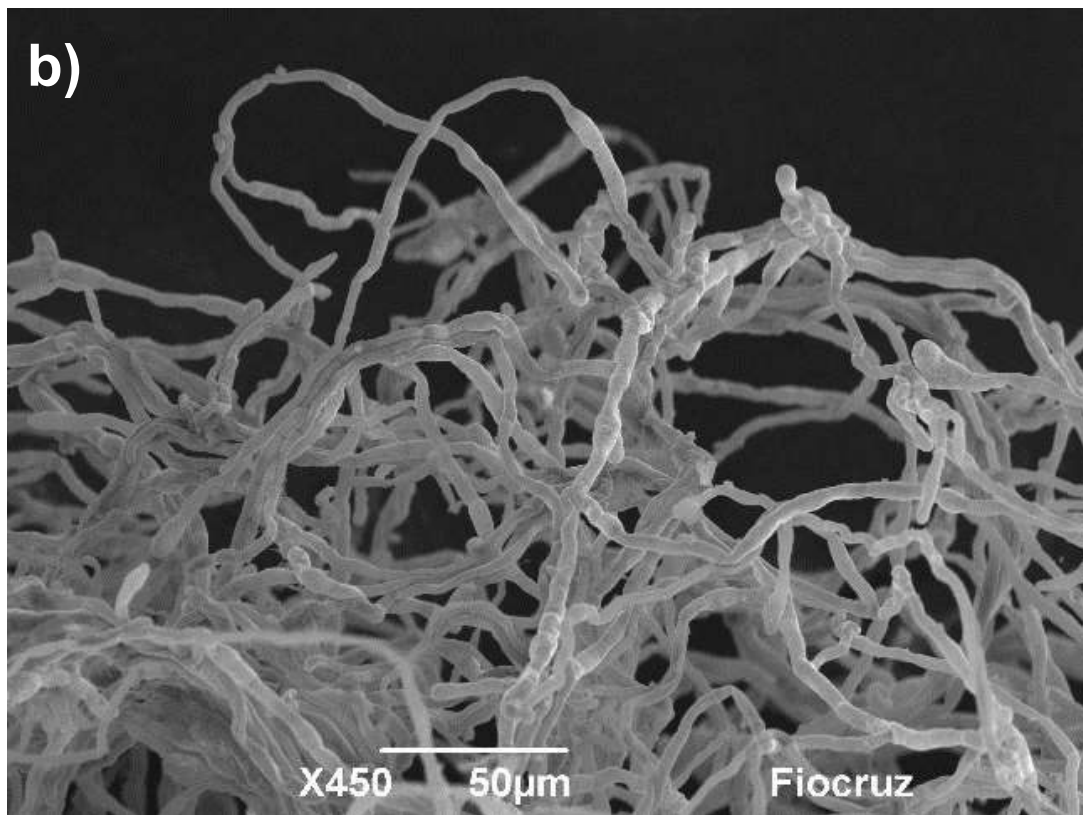


Figura 62 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bio-híbrido constituído do fungo da espécie *Phialomyces macrosporus* e nanopartículas de platina. a) 250X e b) 450X.

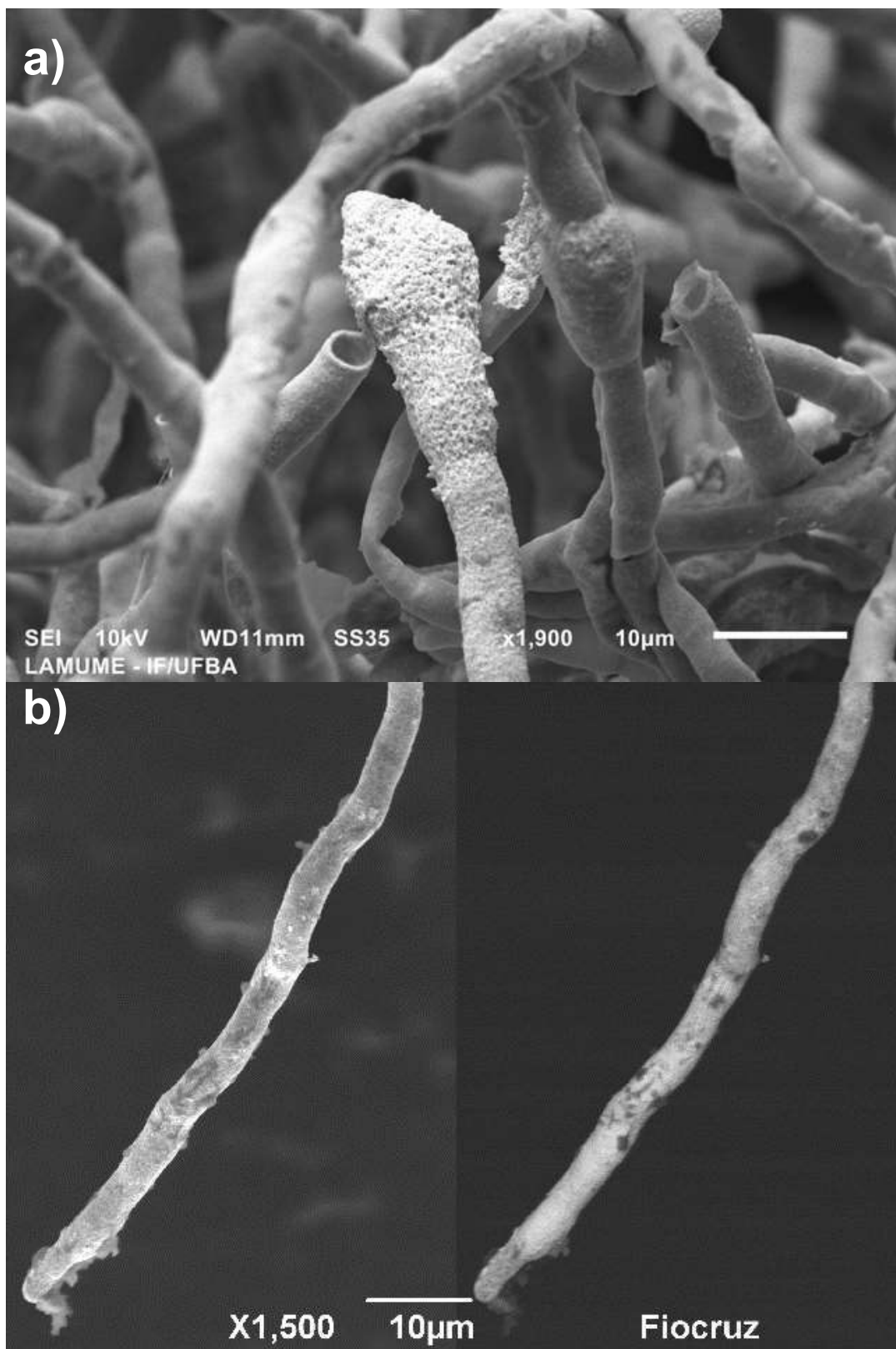


Figura 63 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bio-híbrido constituído do fungo da espécie *Phialomyces macrosporus* e nanopartículas de platina. a) 1900X e b) 1500X.

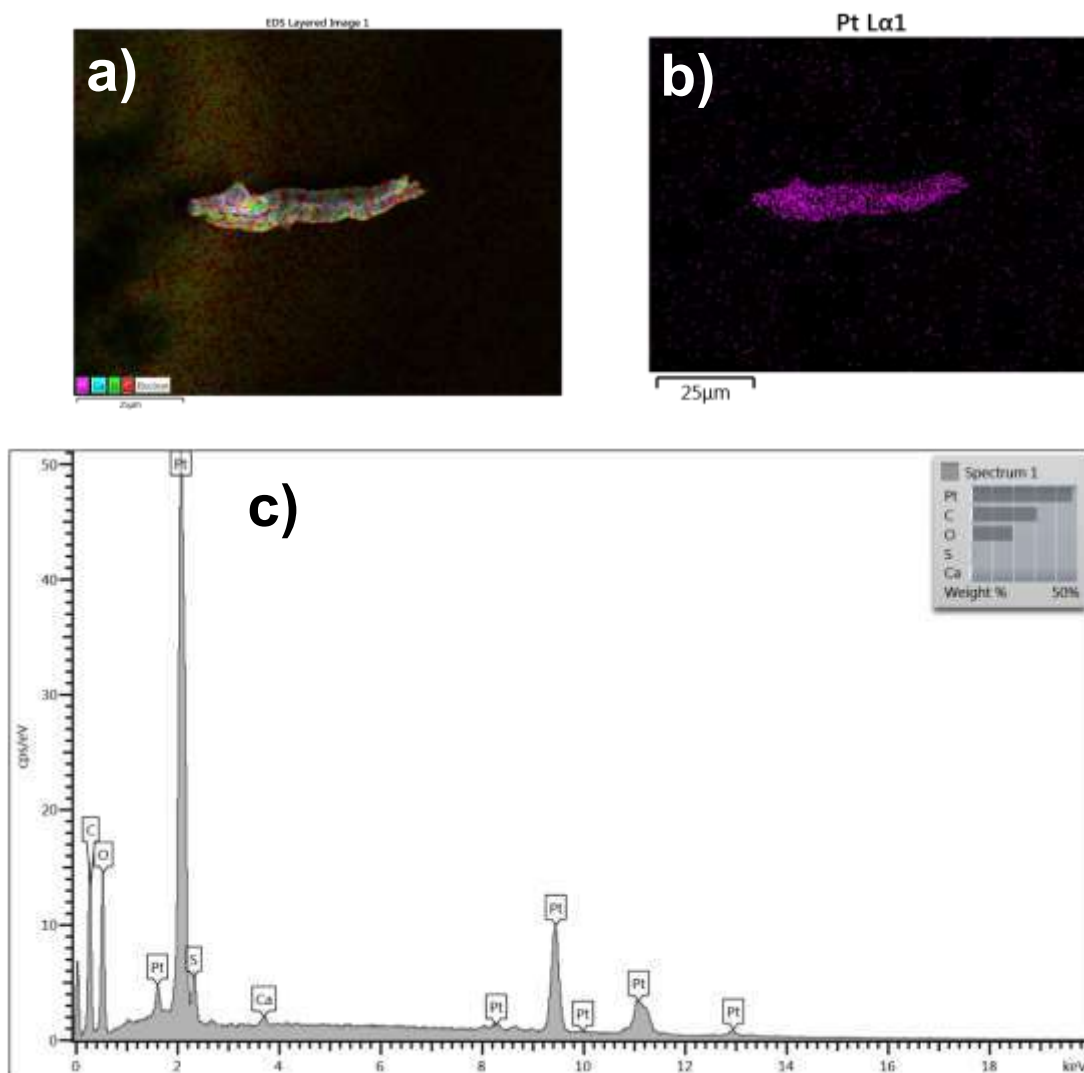


Figura 64 – Imagens de mapa elementar e espectro obtidos por EDS do bio-híbrido formado por PM/Pt.

Com o objetivo de investigar detalhadamente a deposição das nanopartículas de platina na parede celular do fungo, fez-se análises de MET. As Figuras 65-a, 65-b e 65-c, apresentam imagens dos cortes transversais e longitudinais das células fúngicas com a nítida deposição de nanopartículas de platina sobre a membrana celular formando um recobrimento uniforme e com alto grau de organização das nanopartículas de platina que foram assimiladas na parede celular das hifas, além de ser uma evidência de que as nanopartículas de platina se mantêm separadas nos sistemas híbridos. Ademais, observa-se que as nanopartículas têm tamanho aproximado de 5 nm.

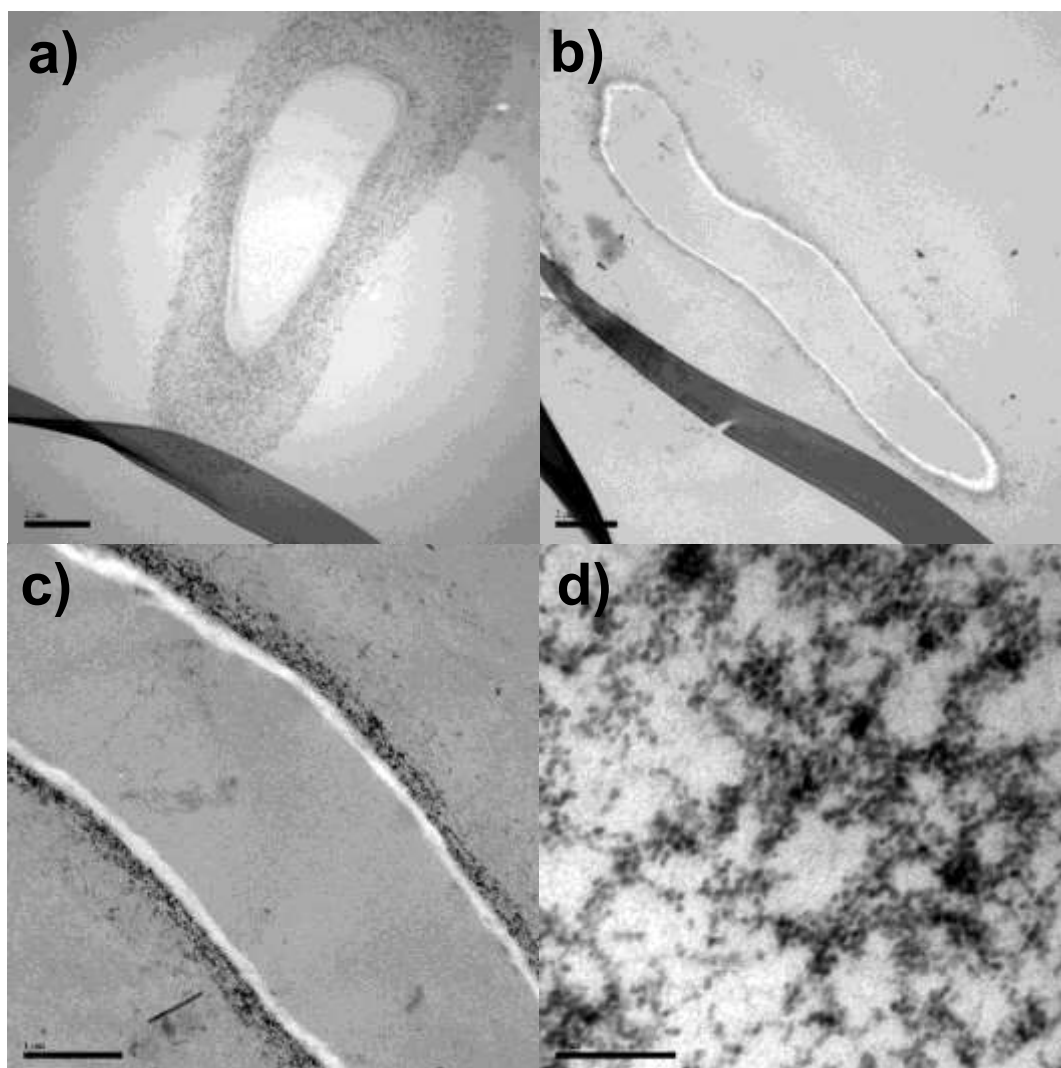


Figura 65 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão do bio-híbrido constituído do fungo da espécie *Phialomyces macrosporus* e nanopartículas de platina. a) 8000X (corte transversal da hifa), b) 8000X (corte longitudinal da hifa), c) 25000X e d) 600000X.

Verificou-se que os micro-organismos estudados têm a habilidade de assimilar nanopartículas de platina na parede celular produzindo materiais bio-híbridos constituídos de fungo filamentoso e nanopartículas de platina. O micro-organismo cresce em meio as nanopartículas e uma fonte de nutriente de C e N, enquanto uma camada uniforme de nanopartículas de platina é construída na parede celular do fungo (molde) por um processo denominado de automontagem. Neste processo, os componentes do sistema organizam-se espontaneamente através de interações eletrostáticas com a parede celular do modelo biológico (parede celular, vide Figura 35), formando uma unidade funcional (MANN, 2009; THORKESSON, 2015).

Salienta-se que o modelo biológico utilizado neste estudo para o processo de automontagem, são fungos filamentosos constituído por hifas, que por sua vez, são células de morfologia microtubular que constituem o micélio fúngico. Deste modo, pode-se inferir que se utiliza células biológicas como plataformas biomiméticas para o desenvolvimento de um novo biomaterial multifuncional (KONNOVA, 2013).

Com a constatação da formação do bio-híbrido biomimético de nanopartículas de platina e as evidências constatadas do alto potencial de assimilação das nanopartículas de platina na parede celular e, baseando-se nos trabalhos realizados anteriormente em nosso grupo com o sistema fungo/nanopartículas de ouro que possibilitou a obtenção de microtubos bioinspirados de Au (FONTES, 2014), propôs-se a calcinação desses bio-híbridos com o intuito de remover o molde orgânico e obter uma estrutura constituída de platina com a mesma morfologia microtubular das hifas utilizadas como modelo biológico.

A Figura 66 mostra as micrografias de MEV obtidas após o processo de tratamento térmico. Evidencia-se claramente a formação de uma superestrutura microtubular com a morfologia mimética das células fúngicas. Contudo, verifica-se uma contração em comparação à estrutura biológica mimetizada, conforme explanado anteriormente, sobre as contrações verificadas nos microtubos de ouro. A espessura desses microtubos é de aproximadamente 0,5 μm . Desta maneira, a utilização de células vivas fúngicas possibilitou manipular uma estrutura biológica para a construção de microtubos de nanopartículas de platina uniformes com design inédito, os quais possuem potencial aplicação como eletrodo de alta área superficial, além da aplicação do bio-híbrido fungo/NPs-Pt em reações de eletroxidação de álcoois e de monóxido de carbono (GE, 2007) e aplicação como substrato SERS para desenvolvimento de biossensores (WANG, 2008).

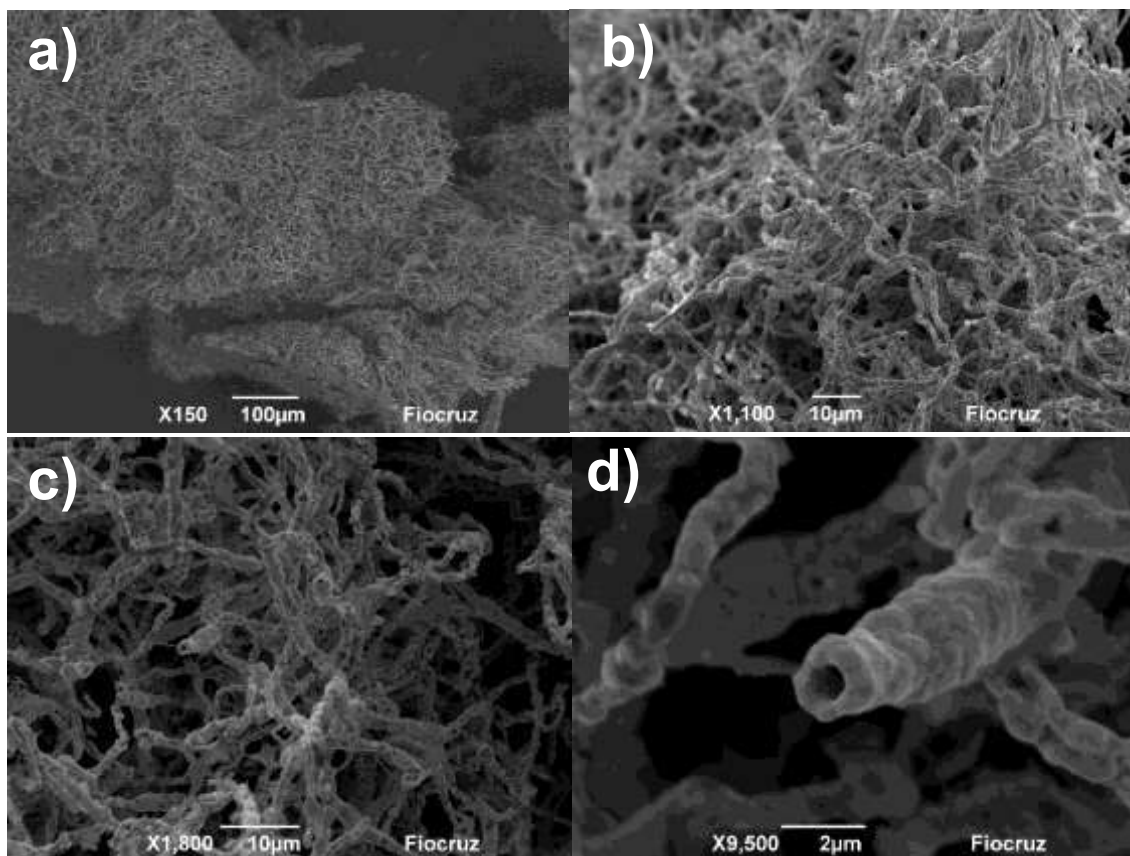


Figura 66 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bio-híbrido constituído do fungo da espécie *Phialomyces macrosporus* e nanopartículas de platina após calcinação. a) 150X, b) 1100X, c) 1800X e d) 9500X.

CONCLUSÕES, PERSPECTIVAS E REFERÊNCIAS

7. CONCLUSÕES

Nesta tese foram obtidos materiais bio-híbridos constituídos de nanopartículas metálicas de ouro e platina suportadas na parede celular de células fúngicas filamentosas das espécies *Talaromyces pinophilus* e *Aspergillus brasiliensis*. Os referidos materiais foram submetidos a um tratamento térmico com escopo de remover o molde biológico, de modo que foram obtidos microtubos biomiméticos de ouro e platina apropriados ao estudo de aplicação como substrato SERS e eletrodo de alta área superficial.

As análises de pH, potencial Zeta, Espalhamento de Luz Dinâmico e Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível realizadas com a dispersão coloidal das nanopartículas de ouro durante o crescimento fúngico, permitiu inferir que os metabolitos produzidos pelos fungos filamentosos e a depleção ocasionada pelo processo de nutrição via citrato, favorece a instabilidade das nanopartículas de ouro.

Os resultados da análise termogravimétrica mostraram que as espécies fúngicas *Talaromyces pinophilus* e *Phialomyces macrosporus* assimilam, respectivamente, 36% e 40% de nanopartículas de ouro na superfície celular. Ademais, verificou-se que a presença de ouro metálico durante o processo de tratamento térmico acelera o processo de remoção do molde biológico.

As imagens de MEV revelaram que a morfologia dos materiais híbridos é mimética aos fungos filamentosos em todas as espécies estudadas. Além disso, análises de MET evidenciaram que há regiões das hifas que têm maior concentração de nanopartículas metálicas, devido à maior atividade biológica nessas regiões e a presença de enzimas sintases. Ainda explorando os resultados de MEV e MET, verificou-se que as características microestruturais dos microtubos de ouro variam com a espécie fúngica que é utilizada para a construção do bio-híbrido, o que significa que as propriedades dos microtubos sintetizados tais como espessura e rugosidade podem ser controladas.

Os estudos de aplicação dos microtubos de ouro utilizando a Espectroscopia Raman evidenciaram o efeito de intensificação de espalhamento por meio de superfície (SERS) utilizando os referidos materiais microtubulares como substrato na identificação de uma concentração traço de Rodamina B (10^{-8} mol. L⁻¹). Ademais,

ressalta-se que o método desenvolvido possibilita a manipulação e controle da rugosidade da superfície do microtubo construído. Verificou-se que os sinais obtidos utilizando o substrato da réplica da espécie *Phialomyces macrosporus* são mais intensos que os sinais medidos com o substrato da réplica da espécie *Aspergillus niger*.

Obteve-se êxito na aplicação dos microtubos de ouro como eletrodos de alta área superficial. Constatou-se que a área do eletrodo modificado produzido com as superestruturas de ouro é 31 vezes superior à área do eletrodo polido. Sendo assim, infere-se que foi produzido um eletrodo de ouro de alta área superficial via um método inédito utilizando a manipulação de células fúngicas *in vivo* através da funcionalização de nanopartículas de ouro sobre a parede celular do fungo filamentoso.

As análises de MEV, TEM e EDS evidenciaram a síntese de bio-híbridos constituídos de fungo filamentoso e nanopartículas de platina. Para mais, constatou-se a formação de microtubos inéditos de platina.

8. PERSPECTIVAS

- a) Otimizar a relação nanopartículas metálicas/células fúngicas de forma a obter um microtubo de ouro com elevada área superficial para aplicação em reações eletroquímicas;
- b) Investigar a aplicação dos microtubos de ouro como substrato SERS para identificação de substâncias em concentração traço inferior a 10^{-8} mol.L⁻¹.
- c) Aplicar os microtubos biomiméticos de ouro em reações de identificação de substâncias tais como a hidrazina;
- d) Aplicar os microtubos biomiméticos de ouro como sensor de glucose, através da imobilização da enzima oxidase nos eletrodos de platina e de ouro.
- e) Investigar a variação da concentração do precursor de ouro e sua influência na atividade SERS e na área superficial do eletrodo modificado.
- f) Aplicar os microtubos biomiméticos de platina na promoção de reações de eletroxidação de álcoois e monóxido de carbono, bem como no desenvolvimento de biossensores;
- g) Comprovar a viabilidade de formação de diferentes estruturas microtubulares constituídas de partículas bimetálicas (Au e Pt) através do biomimetismo da morfologia de fungos filamentosos, com o intuito de aplicá-las como substratos ativos ao SERS.

9. REFERÊNCIAS

- FAKHRULLIN, R. F.; CHOI, I. S.; LVOV, Y. Cell Surface Engineering Fabrication of Functional Nanoshells. The Royal Society of Chemistry, 2014.
- PRASAD, K.; JHA, A. K.; KULKARNI, A. R. Lactobacillus assisted synthesis of titanium nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.*, 248, 2007.
- Fakhrullin, R. F. et al. Cyborg cells: functionalisation of living cells with polymers and nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.*, 41, 4189-4206, 2012.
- ROSÁRIO, J. et al. Photoluminescent organisms: how to make fungi glow through biointegration with lanthanide metal-organic frameworks. *Sci Rep* 9, 7302, 2019.
- XIONG, W. et al. Silicification-Induced Cell Aggregation for the Sustainable Production of H₂ under Aerobic Conditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 127, 2015.
- NURAJE, N. et al. Biotemplated synthesis of perovskite nanomaterials for solar energy conversion. *Advanced Materials*, 2012.
- HE, Y. et al. Bacillus subtilis Assisted Assembly of Gold Nanoparticles into Long Conductive Nodous Ribbons. *J. Phys. Chem. B*, 110, 17813-17818, 2006.
- KORNIENKO, N. et al. Spectroscopic elucidation of energy transfer in hybrid inorganic–biological organisms for solar-tochemical production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (42), 11750, 2016.
- LOVLEY, D. R. et al. Improved cathode materials for microbial electrosynthesis. *Energy Environ. Sci.*, 6, 217, 2013.
- LOGAN, B. E.; Rabaey, K. Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by Using Microbial Electrochemical Technologies. *Science*. v. 337, 2012.
- RUFFINO, F.; GRIMALDI, M. G. Nanoporous Gold-Based Sensing. *Coatings*, 10, 899, 2020.
- KOYA, A. N. et al. Nanoporous Metals: From Plasmonic Properties to Applications in Enhanced Spectroscopy and Photocatalysis. *ACS Nano*, 15, 6038–6060, 2021.
- SAKIMOTO, K. K. et al. Physical Biology of the Materials – Microorganism Interface. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 1978-1985, 2018.
- CHOI, I. S. et al. Nanocoating of single cells: From Maintenance of Cell Viability to Manipulation of Cellular Activities. *Adv. Mater.* 26, 2001-2010, 2014.

GERASOPOULOS, K. et al. Nanostructured nickel electrodes using the Tobacco mosaic virus for microbattery applications. *J. Micromech. Microeng.* 18, 2008.

SAKIMOTO, K. K.; WONG, A. B.; YANG, P. Self-photosensitization of nonphotosynthetic bacteria for solar-to-chemical production. *Science.* 351, 2016.

SAKIMOTO, K. K.; KORNIENKO, N.; YANG, P. Cyborgian Material Design for Solar Fuel Production: The Emerging Photosynthetic Biohybrid Systems. *Acc. Chem. Res.* 50, 476–481, 2017.

TOMA, H. E.; BONIFÁCIO, L. S.; ANAISSI, F. J. Da cor à cor inexistente: uma reflexão sobre espectros eletrônicos e efeitos cromáticos. *Química Nova*, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 897-900, 2005.

TOMA, H.E.; ZAMARION, V. M.; TOMA, S. H.; ARAKI, K. The Coordination Chemistry at Gold Nanoparticles. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 21, No. 7, 1158-1176, 2010.

PYYKKO, P., DESCLAUX, J. P. Relativity and the periodic system of elements. *Accounts of Chemical Research*, 12(8), 276–281, 1979.

PYYKKO, P. Relativistic effects in structural chemistry. *Chemical Reviews*, 88(3), 563–594, 1988.

WANG, L.-S. Covalent gold. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(31), 8694, 2010.

FLINN SCIENTIFIC. Why Copper Is Reddish in Color – Comparing Copper, Silver and Gold. No. 10307, 061616, 2016.

TORRES, N. M. Aspectos Qualitativos do Modelo Orbital. *Chemkeys*, 2000.

ATKINS, P.; JONES, L. *Princípios de Química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente.* Ed. 1, Bookman, 2001.

CHANG, R.; COLLEGE, W. *Química.* Ed.7, McGraw-Hill, 2002.

DIOP, C. A. *The African origin of civilization.* Lawrence Hill & Co., 1974.

MACHADO, C. E. D. *Ciência, Tecnologia e Inovação Africana e Afrodescendente.* Ed. 1, Brokess, 2014.

HISTORY MAGAZINE. The Discovery of King Tut's Tomb, 2008. Disponível online: https://www.history-magazine.com/HM_Sample.pdf. Acesso em 11 de junho de 2020.

SOUSA, Rafaela. "Impactos ambientais causados pela mineração"; Brasil Escola, 2016. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/geografia/os-problemas-gerados-pela-mineracao.htm>. Acesso em 06 de julho de 2020.

BALBI, C. Sebastião Salgado exhibe 56 imagens inéditas de Serra Pelada. Folha de São Paulo, 2019. Disponível em: <https://guia.folha.uol.com.br/exposicoes/2019/07/sebastiao-salgado-exibe-56-imagens-ineditas-de-serra-pelada.shtml>. Acesso em 06 de julho de 2020.

LANA, Z. M. O. A atividade mineradora em Minas Gerais e em ouro preto: impactos socioambientais e intervenções para a sustentabilidade. Sociedade e Território – Natal. Vol. 27, N. 3, p. 45 - 59. Jul./Dez. de 2015.

EL-SAYED, M. A. et al. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. Chem. Soc. Rev., 41, 2740–2779, 2012.

GOMES, Laurentino. Escravidão. Volume I, Globo Livros, 2019.

ALMEIDA, Silvio Luiz de. Racismo Estrutural. Coleção Feminismos Plurais, Pólen Livros, 2019.

AMENDOLA, V.; PILOT, R.; FRASCONI, M.; MARAGÒ, O.; LATÌ, M. A. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. J. Phys.: Condens. Matter, 29. 2030002, 2017.

BAYDA, S. et al. ADEEL, M.; TUCCINARDI, T.; CORDANI, M.; RIZZOLIO, F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. Molecules, 25, 112, 2020.

SPADAVECCHIA, J. et al. One-Step Synthesis of Collagen Hybrid Gold Nanoparticles and Formation on Egyptian-like Gold-Plated Archaeological Ivory. Angew. Chem. 126, 8503 – 8506, 2014.

ROSI, N. L.; MIRKIN, C. A. Nanostructures in Biodiagnostics. Chemical Reviews, Vol. 105, No. 4, 2005.

Editorial. Nanomaterials definition matters. Nature Nanotechnology, Vol. 14, 2019.

CHIU, C. et al. Facet-Dependent Catalytic Activity of Gold Nanocubes, Octahedra, and Rhombic Dodecahedra toward 4 Nitroaniline Reduction. J. Phys. Chem. C., 116, 23757–23763, 2012.

ZARBIN, A. J. G. Química de Nano(materiais). *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 6, 1469-1479, 2007.

RODUNER, E. *Nanoscopic Materials Size-dependent Phenomena*. RCS: Royal Society of Chemistry, 2006a.

RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews*, v. 35, n. 7, p. 583-592, 2006b.

MUDUNKOTUWA, I. A.; GRASSIAN, V. H. The devil is in the details (or the surface): impact of surface structure and surface energetics on understanding the behavior of nanomaterials in the environment. *J. Environ. Monit.*, 13, 1135–1144, 2011.

BROWN, T. *Química: La Ciencia Central*. Ed.9, Pearson Educación, México, 2004.

SANTOS, J. F. L. Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e Aplicação em Biossensores e Células Solares. *Quim. Nova*, Vol. 39, No. 9, 1098-1111, 2016.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *Int. Rev. Phys. Chem.*, 19, 409, 2000.

EUTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.*, 35, 209–217, 2006.

ABREU, Icaro Ferreira de. *Integração de nanosilício na estrutura de fungos filamentosos: estudo e caracterização de um novo material bio-híbrido*. 2018. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

GUDLUR, S. et al. Liposomes as nanoreactors for the photochemical synthesis of gold nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 456, p. 206-209, 2015.

MA, H. et al. Synthesis of silver and gold nanoparticles by a novel electrochemical method. *ChemPhysChem*, v.5, n. 1, p. 68-75, 2004.

TSUJI, M. et al. Microwave-assisted synthesis of metallic nanostructures in solution. *Chemistry – A European Journal*, v. 11, n. 2, p. 440-452, 2005.

POLTE, J. et al. Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation. *J. AM. CHEM. SOC.* v.132, p. 1296-1301, 2010.

ALEX, S.; TIWARI, A. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications—A Review. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, Vol. 15, No. 3, 2015.

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.

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

SANTOS, J. F. L. et al. Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e aplicação em biossensores e células solares. *Quim. Nova*, Vol. 39, No. 9, 1098-1111, 2016.

JI, X.; SONG, X.; LI, J.; BAI, Y.; YANG, W.; PENG, X. Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. *J. AM. CHEM. SOC.* n. 129, p. 13939-13948. 2007.

MUANGNAPOH, T.; SANO, N.; YUSA, S.; VIRIYA-EMPIKUL, N; CHARINPANITKUL, T. Facile strategy for stability control of gold nanoparticles synthesized by aqueous reduction method *Current Applied Physics*. n.10, p. 708–714, 2010.

MURPHY, C. J. et al. Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. *J. Phys. Chem. B*, n. 109, p. 13857-13870, 2005.

VERWEY, E. J. W. Theory of the stability of lyophobic colloids. *J. Phys. Chem.* 1947, 51, 3, 631–636, 1947.

ROUCOUX, A.; SCHULZ, J.; PATIN, H. Reduced Transition Metal Colloids: A Novel Family of Reusable Catalysts?. *Chem. Rev.*, 102, 3757-3778, 2002.

WULANDARI, P.; LI, X.; TAMADA, K.; HARA, M. Conformational study of citrates adsorbed on gold nanoparticles using fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Nonlinear Optical Physics & Materials*, Vol. 17, No. 2, 185–192, 2008.

WULANDARI, P.; NAGAHIRO, T.; FUKADA, N.; KIMURA, Y.; NIWANO, M.; TAMADA, K. Characterization of citrates on gold and silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 438, 244–248, 2015.

MIRKIN, C.A. et al. Living Templates for the Hierarchical Assembly of Gold Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed* , 42 , 2306 – 2309, 2003.

SUGUNAN, A. et al. Nutrition-Driven Assembly of Colloidal nanoparticles: Growing Fungi Assemble Gold Nanoparticles as Microwires. *Adv. Mater.* 19, 77-81, 2007.

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

BIGALL, N.C. et al. A. Fungal Templates for Noble-Metal Nanoparticles and Their Application in Catalysis. *Angew. Chem. Int.*, 47, 7876–7879, 2008.

REHMAN, A. et al. Living fungal hyphae-templated porous gold microwires using nanoparticles as building blocks. *J Nanopart Res*, 13, 6747-6754, 2011.

SHARMA, S; SRIVASTAVA, S. Gold microwires based amperometric biosensor exploiting microbial architecture. *Biosensors and Bioelectronics*, 50, 174-179, 2013.

BHARGAVA, A. et al. Development of gold nanoparticle-fungal hybrid based heterogeneous interface for catalytic applications. *V.* 50, Issue 8, 1293-1300, 2015.

FONTES, A. M. et al. Bio-inspired gold microtubes based on the morphology of filamentous fungi. *Biomaterials Science*, 7, 2014.

KUBO, A. M. et al. Kinetic Control of Microtubule Morphology Obtained by Assembling Gold Nanoparticles on Living Fungal Biotemplates. *Bioconjugate Chem.* 27, 2337-2345, 2016.

FONTES, A. M. et al. Unveiling the Surface and the Ultrastructure of Palladized Fungal Biotemplates. *Langmuir*, in press., 2021.

WITTSTOCK, A.; WICHMANN, A; BÄUMER, M. Nanoporous Gold as Platform for a Building Block Catalyst. *ACS Catalysis*, 2, 2199-2215, 2012.

JIA, F.; YU, C.; ZHANG, L. Hierarchical nanoporous gold film electrode with extra high surface area and electrochemical activity. *Electrochemistry Communications*, 11, 1944–1946, 2009.

BHATTARAI, J.K. et al. Preparation, Modification, Characterization, and Biosensing Application of Nanoporous Gold Using Electrochemical Techniques. *Nanomaterials*. 8, 171, 2018.

CHEN, L.Y.; FUJITA, T.; CHEN, M. W. Biofunctionalized nanoporous gold for electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*, 67, 1– 5, 2012.

LIU, Z. et al. Electrochemical sensor for detection of p-nitrophenol based on nanoporous gold. *Electrochemistry Communications*, 11, 1365–1368, 2009.

LIU, Z.; ZHANG, H.; HOU, S. Highly sensitive and selective electrochemical detection of L-cysteine using nanoporous gold. *Microchim Acta*, 177:427–433, 2012.

YAN, X. et al. Effective and rapid electrochemical detection of hydrazine by nanoporous gold. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 661, 44–48, 2011.

TAVAKKOLI, N.; SOLTANI, N.; MOHAMMADI, F. Nanoporous gold-based electrochemical aptasensor for sensitive detection of cocaine. *RSC Adv.*, 9, 14296–14301, 2019.

GONÇALVES, J. M. et al. Nanoporous Gold-Based Materials for Electrochemical Energy Storage and Conversion. *Energy Technol.*, 9, 2000927, 2021.

XIAO, X.; SI, P.; MAGNER, E. An overview of dealloyed nanoporous gold in bioelectrochemistry. *Bioelectrochemistry*, 109, 117–126, 2016.

HOLLAS, J. M. *Modern Espectrocopy*. 4 ed. John Wiley & Sons Ltd, 2004.

SMITH, E.; DENT, G. *Modern Raman Expectrocopy – A Practical Approach*. Wiley & Sons Ltd, 2005.

TISCH, D.; SCHMOLL M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(5), 1259-1277, 2010.

SANT'ANA, A. C.; CORIO, P.; TEMPERINI, M. L.A. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 4, 805-810, 2006.

DE FARIA, D. L.A.; TEMPERINI, M.L.A; SALA, O. Vinte Anos de Efeito SERS. *Química Nova*, 22, 541, 1999.

ZHANG, et al. Recent advances in gold nanostructures based biosensing and bioimaging. *Coordination Chemistry Reviews*, 370, 1-21, 2018.

MIN, H. et al. Nanoporous Gold: A High Sensitivity and Specificity Biosensing Substrate. *Procedia Engineering*, 25, 1469 – 1472, 2011.

LEE, E.; RYU, S. Nucleation and Growth-Controlled Facile Fabrication of Gold Nanoporous Structures for Highly Sensitive Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Applications. *Nanomaterials*, 11, 1463, 2021.

QUIAN. Et al. Surface enhanced Raman scattering of nanoporous gold: Smaller pore sizes stronger enhancements. *Appl. Phys. Lett.* 90, 153120, 2007.

LIU, R.; LI, S.; LIU, J. Self-assembly of plasmonic nanostructures into superlattices for surface-enhanced Raman scattering applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 97, 188-200, 2017.

FANG, C. et al. Electrochemically prepared nanoporous gold as a SERS substrate with high enhancement, *RSC Adv.*, 4, 19502–19506, 2014.

GERIS, R., Fo-R., Meroterpenes from *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, 61, 907-912, 2002.

DEDAVID, B.A; GOMES, C.I; MACHADO, G. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras*. Edição do CEMM: Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM), EDIPUCRS, 2007.

BIGALL, N.C.; EYCHMÜLLER, A. Synthesis of noble metal nanoparticles and their non-ordered superstructures. *Phil. Trans. R. Soc. A.*, 368, 1385-1404, 2010.

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

PERKSEL, A and KUBICEK, C.P. Effects of sucrose concentration during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Turk Journal Chemistry*, 27, 581-590, 2003.

MECNEIL, S. E (Ed). *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. *Methods in Molecular Biology* 697, Humana Press, Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2011.

MALVERN. *Zetasizer Nano Series User Manual*. User Manuals, England, 2004. Disponível

em: <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf>. Acesso em: 17/05/2021.

WANG, G. et al. Effects of gold nanoparticle morphologies on interactions with proteins. *Materials Science & Engineering. C*, 111,110830, 2020.

ARSALAN, A. et al. Activation of yeast alcohol dehydrogenase in the presence of citrate stabilized gold nanoparticles: An insight into its interaction and modulation mechanism. *Journal of Molecular Liquids*, 330, 115633, 2021.

SPERLING, R. A.; PARAK, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, v. 368, n. 1915, 2010.

FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science*, 241 (105), 20–22, 1973.

ZHU, W. et al. Coupling Microbial Growth with Nanoparticles: A Universal Strategy To Produce Functional Fungal Hyphae Macrospheres. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8, 12693–12701, 2016.

KOZLOVSKAYA, V. et al. Hydrogen-bonded LbL shells for living cell surface engineering. *Soft Matter*, 7, 2364-2372, 2011.

Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G. & Whitesides, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.* 105, 1103–1169, 2005.

BROWN, K. R.; WALTER, D. G.; NATAN, M. J. Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2.Improved Control of Particle Size and Shape. *Chem. Mater.*, Vol. 12, No. 2, 2000.

HAISS, W. et al. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Analytical Chemistry*, Vol. 79, No. 11, 2007.

BASSO, C. R. et al. A Study of the Effects of pH and Surfactant Addition on Gold Nanoparticle Aggregation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 20, 5458–5468, 2020.

GABBOTT, P. *Principles and Applications of Thermal Analysis*. Blzckwel. 1st ed, 2007.

CHANG, R.; COLLEGE, W. *Química*. Ed.7, McGraw-Hill, 2002.

TORTORA, G. J. *Microbiologia*. 10.ed. Atmed, 2012.

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

AN, Z. Handbook of industrial mycology, v.22, Marcel Dekker, 2005.

GOZALBO, D. Et al. Pharmac. Ther. Vol. 60, 337-345, 1993.

KAVANAGH, K. Fungi: Biology and Applications. Second Edition, Wiley-BlackWell, 2011.

GLASS, N. L. et al. Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. TRENDS in Microbiolog, Vol.12, No.3, 2004.

ISLAM, M.R. et al. Morphology and mechanics of fungal mycelium. Sci Rep 7, 13070, 2017.

BOWMAN, S. M.; FREE, S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. BioEssayS, 28, 799–808, 2006.

MOORE, D. Fungal biology in the origin and emergence of life. Cambridge University Press, pág. 19-41, 2013.

MACIEL, V. M. B. Funcionalização de células fúngicas com óxidos de metais de transição para o desenvolvimento de estruturas híbridas biomiméticas. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Bahia.

ZHU, S. et al. Precision Replication of Hierarchical Biological Structures by Metal Oxides Using a Sonochemical Method. Langmuir, 24, 6292-6299, 2008.

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

BROWN, A.J.P. Et Al. Metabolism impacts upon candida immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. CellPress, V.22, N.11, 614-622, 2014.

CABIB, E; ARROYO, J. How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the cell wall. Nature Reviews Microbiology, V.11, 648-655, 2013.

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.

GRASSESCHI, D.; SANTOS, D. P. Nanomateriais Plasmônicos: Parte I. Fundamentos da Espectroscopia de Nanopartículas e sua relação com o Efeito SERS. *Quim. Nova*, Vol. 43, No. 10, 1463-1481, 2020.

ROSARIO, J.; da Luz, L. L.; Geris, R.; Ramalho, J. G. S.; da Silva, A. F.; Junior, S. A.; Malta, M. Photoluminescent organisms: how to make fungi glow through biointegration with lanthanide metal-organic frameworks. *Sci. Rep.*, 9, 7302, 2019.

LIPKE, P.N; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure an new challenges. *Journal of Bacteriology*, V.180, N.15, 3735-3740, 1998.

PELCZAR JR., J.M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. Makron Books. 2.ed. Vol.1, 1996.

SALA, O. *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*. 2.ed. Editora UNESP, 2008.

SANT'ANA, A. C; CORIO, P; TEMPERINI, M. L. A. O efeito SERS na análise de traços: o papel das superfícies nanoestruturadas. *Química Nova*, Vol. 29, No. 4, 805-810, 2006.

SOLOMON; BERG; MARTIN. *Biology*. Eighth Edition, Thomson Brooks, 2008.

OTTO, A.; Mrozek, I.; Grabhorn, H.; Akermann, W.; Surface-enhanced Raman scattering. *J. Phys.: Cond. Matter*. 4, 1143, 1992.

FARIA, D. L. A; TEMPERINI, M. L. A; SALA, O. Vinte anos de efeito SERS. *Química Nova*, Vol. 22, No. 4, 541-552, 1999.

ZHANG Et al. Biosynthesis of gold nanoparticles using chloroplasts. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2899–2906, 2011.

MAJOUBE, M.; HENRY, M. Fourier transform Raman and infrared and surface-enhanced Raman spectra for rhodamine 6G. *Spectrochimica Acta*, Vol. 47A, No. 9/10, 1459-1466, 1991.

LI, W.; LI, X.; YU, N. Surface-enhanced resonance hyper-Raman scattering and surface-enhanced resonance Raman scattering of dyes adsorbed on silver electrode and silver colloid: a comparison study. *Chem. Phys. Lett.* 28, 312, 1999.

SANTANA, H Et al. Preparação e caracterização de substratos sers ativos: um estudo da adsorção do cristal violeta sobre nanopartículas de prata. *Química Nova*, Vol. 29, No. 2, 194-199, 2006.

MICHAELS, A. M.; NIRMAL, M.; BRUS, L. E. Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Individual Rhodamine 6G Molecules on Large Ag Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 9932-9939, 1999.

KUDELSKI, A. Raman studies of rhodamine 6G and crystal violet sub-monolayers on electrochemically roughened silver substrates: Do dye molecules adsorb preferentially on highly SERS-active sites?. *Chemical Physics Letters*, 414, 271–275, 2005.

PAL, U Et al. Nanoparticle-Assembled Gold Microtubes Built on Fungi Templates for SERS-Based Molecular Sensing. *ACS Appl. Nano Mater.* 2, 2533–2541, 2019.

JIA, F Et al. Fabrication of Nanoporous Gold Film Electrodes with Ultrahigh Surface Area and Electrochemical Activity. *Chem. Mater.*, 19, 3648-3653, 2007.

ZHANG, Q. Et al. Seed-mediated Synthesis of Ag Nanocubes with Controllable Edge Lengths in the range of 30–200 nm and Comparison of their Optical Properties. *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 11372–11378, 2010.

FREEMAN, R. G. Et al. Self-Assembled Metal Colloid Monolayers: An approach to SERS Substrates. *Science*, 267, 1629–1632, 1995.

GREENELTCH, N. G. Immobilized Nanorod Assemblies: Fabrication and Understanding of Large area Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates. *Anal. Chem.*, 85, 2297–2303, 2013.

CINEL, N. A. E-Beam Lithography designed Substrates for Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Photonics Nanostructures - Fundam.Appl.* 15, 109–115, 2015.

PLOWMAN, B. J. et al. The active site behaviour of electrochemically synthesised gold nanomaterial. *Faraday Discuss*, 152, 43-62, 2011.

JIA. F. et al. Fabrication of Nanoporous Gold Film Electrods with Ultrahigh Surface Area And Electrochemical Activity. *Chem. Mater.*, 19, 3648-3653, 2007.

TRASATTI, S.; PETRII, O. A. Real Surface Area Measurements in Electrochemistry. *Pure Appl. Chem.*, 63, 711, 1991.

TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. *Eletroquímica: Princípios e Aplicações*. 2. Ed. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SUKERI, A.; BERTOTTI, M. Nanoporous Gold Surface: Na Efficient Platform for Hydrogen Evolution Reaction at Very Low Overpotential. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 29, No 2, 226-231, 2018.

BARD, A. J.; FAULKNER, L.R. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, New York, 2001.

ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Jouurnaln of Chemical Education*, 95, 2, 197-206, 2018.

MORAG, A. et al. High Surface Area Electrodes by Template-free Self-Assembly Hierarchical Porous Gold Architecture. *Journal of Colloid and Interface*, 472, 84-89, 2016.

Ge, X. B., Wang, R. Y., Liu, P. P. & Ding, Y. Platinum-decorated nanoporous gold leaf for methanol electrooxidation. *Chem. Mater.* 19, 5827–5829, 2007.

Xiao, S., Xiao, F., Hu, Y. et al. Hierarchical Nanoporous Gold-Platinum with Heterogeneous Interfaces for Methanol Electrooxidation. *Sci Rep* 4, 4370, 2014.

ALEIXO, L. M. Voltametria: Conceitos e Técnicas. *Revista Chemkeys*, (3), 1-21, 2018.

MANN, S. Self-assembly and transformation of hybrid nano-objects and nanostructures under equilibrium and non-equilibrium conditions. *Nature Materials*, V.8, 781-792, 2009.

THORKESSON, K.; BAI, P.; XU, T. Self-assembly and applications of anisotropic nanomaterials: A review. *Nano Today*, 10, 48-66, 2015.

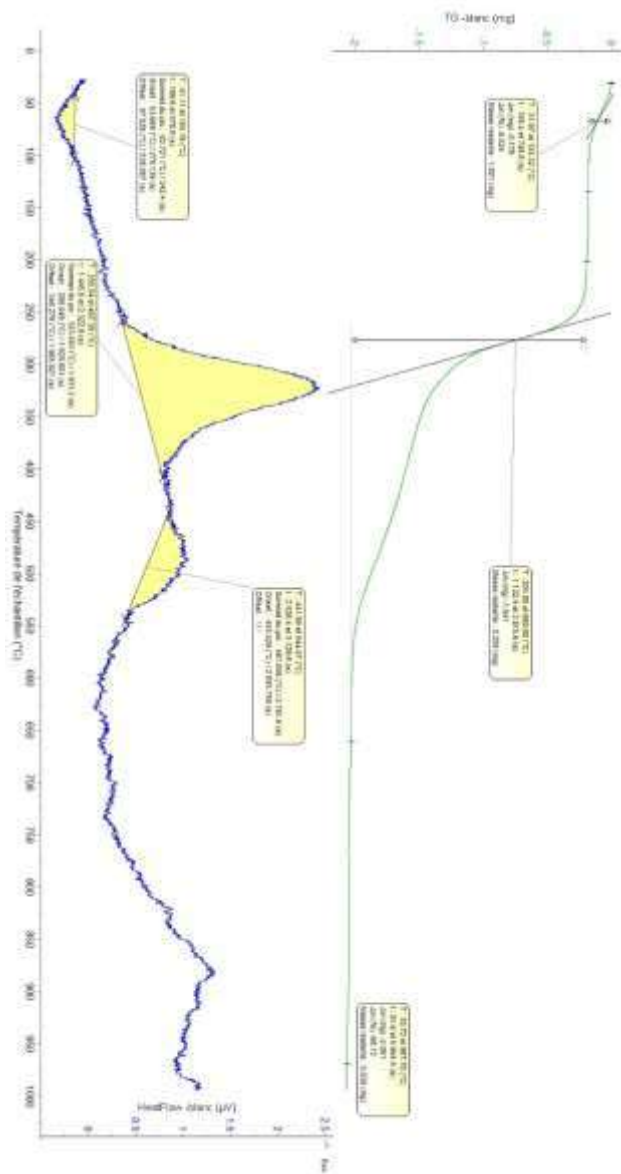
KONNOVA, S.A. Et Al. Biomimetic cell-mediated three-dimensional assembly of halloysite nanotubes. *Chem. Commun.*, 49, 4208-4210, 2013.

GE, X. et al. Platinum-Decorated Nanoporous Gold Leaf for Methanol Electrooxidation. *Chem. Mater.*, V. 19, No. 24, 5827–5829, 2007.

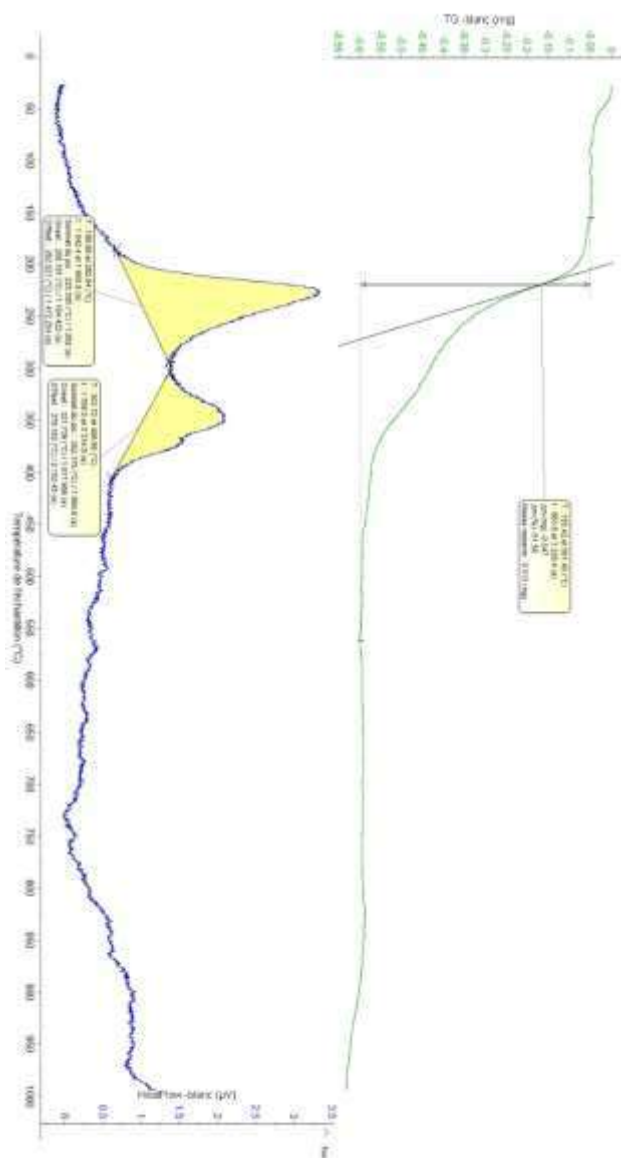
WANG, T.; HU, X.; DONG, S. A Renewable SERS Substrate Prepared by Cyclic Depositing and Stripping of Silver Shells on Gold Nanoparticle Microtubes. *Small*, 4, No. 6, 781–786, 2008.

ANEXOS

ANEXO A) Dados de Análise Termogravimétrica do fungo filamentoso da espécie *Phialomyces macrosporus*



ANEXO B) Dados de Análise Termogravimétrica do bio-híbrido constituído por *Phialomyces macrosporus* e nanopartículas de ouro



ANEXO C) Dados de Análise Termogravimétrica do bio-híbrido constituído por *Talaromyces pinophilus* e nanopartículas de ouro

