

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“MATERIAIS HÍBRIDOS OBTIDOS
PELA ADSORÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS SOBRE FUNGOS MICELARES
PELO EFEITO *BIOTEMPLATE*”**

Luiz Fernando Gorup*

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração: FÍSICO-QUÍMICA**

Orientador: Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo

* bolsista CNPq

São Carlos - SP
2014

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar

G675mh Gorup, Luiz Fernando.
Materiais híbridos obtidos pela adsorção de nanopartículas metálicas sobre fungos micelares pelo efeito *biotemplate* / Luiz Fernando Gorup. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
70 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Físico-química. 2. Nanopartículas metálicas. 3. Materiais híbridos. 4. *Biotemplates*. 5. Fungos miceliais. 6. Auto-organização. I. Título.

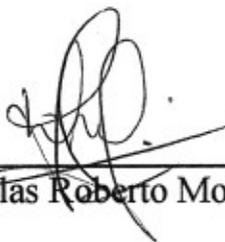
CDD: 541.3 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

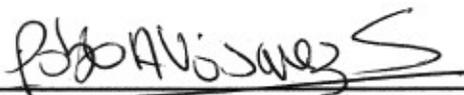
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutorado do candidato **Luiz Fernando Gorup**, realizada em 18 de fevereiro de 2014:*



Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo



Dr. Douglas Roberto Monteiro



Dr. Pablo Antonio Vásquez Salvador



Profa. Dra. Dayane Batista Tada



Profa. Dra. Vera Aparecida de Oliveira Tiera

Dedico este trabalho

À minha esposa Patrícia de Oliveira pelo amor, dedicação, paciência e companheirismo.

Aos meus pais Maria e Valdir, meus irmãos Laudinéia, Cristina, Daniel, Débora e Daiane, por todo amor, confiança, carinho e apoio.

Aos meus amigos da turma de 2004 do curso de bacharelado e do curso de licenciatura em química da UFSCar, em especial a Maria Manuela, Marcão, Daiane, Leilane, Boniek, Cyber e Emerson que estiveram sempre presentes.

A todas as pessoas que contribuíram e acreditaram na realização de meus sonhos, em especial à Profa. Marly Terciotti pelo apoio incondicional na fase inicial da minha jornada.

“A ciência é uma aventura de toda a raça humana para aprender a viver e talvez a amar o Universo onde se encontra. Ser uma parte dele é compreender, é conhecer-se a si próprio, é começar a sentir que existe dentro do Homem uma capacidade muito superior a que ele pensava ter e uma quantidade infinita de possibilidades humanas”.

Isidor Isaac Rabi

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo pela orientação, apoio, ajuda, dedicação, e principalmente pelas inúmeras oportunidades dadas, que me proporcionaram um enorme amadurecimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Elson Longo e ao Prof. Dr. Edson Roberto Leite pelas sugestões, discussões e disponibilização do LIEC para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Caio Marcio Paranhos da Silva e ao Prof. Dr. Daniel Souza Correia pelas discussões, sugestões e participação na banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Douglas Roberto Monteiro, à Profa. Dra. Dayane Batista Tada, à Profa. Dra. Vera Aparecida de Oliveira Tiera e Prof. Dr. Pablo Antonio Vásquez Salvador pelas discussões, sugestões e participação na banca de defesa de Tese.

A todos os colegas do LIEC cerâmica e eletroquímica, em especial aos colegas do grupo: Tatiana, Renata, Andre, Lilia, Francisco, Alan e Amanda.

A doutoranda Andressa M. Kubo pela parceria na execução dos experimentos de preparo, caracterização e análise dos materiais híbridos.

Aos amigos Julio, Laércio, Cleocir, Ricardo, Leilane, Paula, Tatiana e Içamira que auxiliaram tanto em questões técnicas quanto teóricas durante as atividades de laboratório.

Aos técnicos do LIEC: Madalena, Rori, Ana e Ricas pela ajuda com as medidas de difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e à aluna de Doutorado Luciana Silva Amaral do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos (LaBioMMi) da Universidade Federal de São Carlos, por todo apoio na inoculação e cultivo dos fungos.

Ao CNPq pela bolsa concedida e ao Auxílio Regular da FAPESP (Processo 12/07067-0).

Ao Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CEPID) (Processo 13/07296-2) e também ao apoio do Instituto Nacional de Ciências dos Materiais Funcionais (INCTMF) (Processo 08/57872-1).

A todos do Departamento de Química da UFSCar, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Química.

E meus agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – Classificação taxônomica dos fungos utilizados.....	17
TABELA 3.2 – Composição dos meios de cultivo.....	21

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1- Ilustração da oxidação da molécula de citrato..... 5
- FIGURA 1.2 - Processo de nucleação e crescimento. Quando a concentração do soluto aumenta em função do tempo, a nucleação não ocorre até que se alcance o equilíbrio de solubilidade. 7
- FIGURA 1.3 - Gráfico da dupla camada elétrica representando forças predominantemente: a) repulsivas; b) atrativas..... 10
- FIGURA 1.4 - Ilustração da germinação do esporo e crescimento da hifa gerando o micélio. Ao lado, imagem de microscopia de varredura eletrônica do *Penicillium* sp, em falsa cor, imagem do micélio com as hifas (verde), do esporângio (laranja) e dos esporos (azul (aumento de 1560 x))..... 11
- FIGURA 1.5 - Micrografia eletrônica da parede celular do fungo (*Candida albicans*), com camadas ricas em carboidratos da parede celular fúngica em destaque: manoproteínas (glicoproteínas+ Manoses) , β -glucana e quitina. 14
- FIGURA 1.6 – Ilustração dos monômeros: β -(1-3) glucana, β -(1-6) glucana e quitina. 15
- FIGURA 3.1- Resumo da preparação dos microtubos de ouro pelo efeito *biotemplate* de fungos filamentosos. Inoculação, crescimento das hifas, extração do meio de cultivo, adição de nanopartículas, adsorção, extração do sobrenadante, congelamento e liofilização..... 18
- FIGURA 3.2 - Síntese de nanopartículas de ouro. a) Aquecimento 1000mL de água destilada à 95°C; b) Adição de 20 mL de uma solução aquosa de HAuCl_4 a $5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; c) Adição de 10 mL de uma solução em citrato de sódio a $3,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$; d) Nucleação das primeiras partículas de ouro; e) Depois de doze minutos de reação o coloide é resfriado à temperatura de 23°C. 19
- FIGURA 3.3 - Síntese de nanopartículas de prata. a) Aquecimento de 1000mL de água destilada à 95°C e adição de 10 mL de uma solução aquosa de AgNO_3 a $1,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$; b) Adição de 10 mL de uma solução em citrato de sódio a $3,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$; c) Nucleação das primeiras partículas de prata em 7 minutos de reação; d) 10 minutos e) Após 13 minutos de reação, o coloide foi resfriado à temperatura de 23°C..... 20

- FIGURA 3.4 - a) Placa de agar com a colônia de fungos: na placa superior o fungo *Penicilium brasilianum*, na placa inferior direita o fungo *Aspergillus aculeatus* e na placa inferior esquerda o fungo *Xylaria sp*; b) suspensão com os esporos do fungo *Penicilium brasilianum*; c) suspensão com os esporos do fungo *Aspergillus aculeatus*. 22
- FIGURA 3.5 - Frascos de Erlenmeyer contendo o meio CZA-Lev e o fungo *Aspergillus aculeatus* em diferente tempos: a) primeiro dia após a inoculação, início do crescimento das hifas; b) segundo dia após a inoculação, crescimento das hifas por todo meio, principalmente na superfície; c) quarto dia após a inoculação, diluição do meio. 22
- FIGURA 3.6 - Frascos de Erlenmeyer contendo o fungo *Penicilium brasiliano* em diferentes meios: a) meio CZA-Lev; b) meio BD; c) meio CZA. 23
- FIGURA 3.7 - Frascos de Erlenmeyer contendo o fungo *Penicilium brasiliano*: a) massa micelial com 8 mL de meio de cultura CZA; b) massa micelial e coloide de ouro totalizando 100 mL..... 23
- FIGURA 3.8 - Frascos de Erlenmeyer contendo o micélio de *Penicilium brasilianum* e nanopartículas de ouro, de maneira que ocorre a adsorção das nanopartículas na superfície dos fungos em 5 dias. Entretanto, para os demais fungos esse processo pode demorar de 5 a 15 dias..... 24
- FIGURA 3.9 - Esquema ilustrativo da inativação do fungo pela radiação, no qual o Erlenmeyer contendo hifas dispersas é exposto a diferentes doses de radiação. Imagens da câmara de radiação e da piscina onde estão as varetas de aço inox rechedas de Co^{60} 26
- FIGURA 3.10 - Ilustração do preparo de uma amostra com a deposição dos fios de ouro na superfície do substrato de silício. 27
- FIGURA 3.11 - Ilustração dos passos para se obter os microtubos de ouro isentos de material orgânico, preparados com o fungo *Penicilium brasilianum* . Imagens de MEV dos microtubos queimados a 400°C em fluxo de oxigênio, mostrando alta homogeneidade morfológica do material. 28
- FIGURA 3.12 - Esquema ilustrativo do preparo de amostra para a análise de microscopia eletrônica de varredura: a) Coloide de nanopartículas de ouro com as hifas, b) Amostras contendo uma porção da hifas; c) Hifas dos fungos depositadas sobre substrato de silício..... 30

- FIGURA 4.1 - Espectro de UV-vis com máximo de absorção em 530 nm das nanopartículas de ouro sintetizadas a pH 3,4 e 95°C. A coloração do coloide e a banda plasmon indicam a presença de nanopartículas. Imagem de MET apresenta nanopartículas com tamanho médio de 25 nm. A difração de raios X das partículas indica estrutura cúbica de face centrada..... 33
- FIGURA 4.2 - Espectro de UV-vis com máximo de absorção em 420 nm das nanopartículas de prata sintetizadas a pH 8,2 e 95°C. A coloração do coloide e a banda *plasmon* indicam a presença de nanopartículas de prata. Imagem de MEV mostra nanopartículas com tamanho médio de 40nm. A difração de raios X das partículas indica estrutura cúbica de face centrada. 35
- FIGURA 4.3 - Frascos de Erlenmeyer contendo o micélio de *Penicillium brasilianum* e nanopartículas de ouro, nos quais ocorre a adsorção das nanopartículas na superfície dos fungos em 5 dias. Entretanto, para os demais fungos esse processo pode demorar de 5 a 15 dias..... 36
- FIGURA 4.4 – Ilustração do tempo de preparo do material híbrido. A imagem esquerda em verde mostra tempos de 10 a 22 dias. A imagem a direita ilustra do método descrito por Bigall *et al*¹⁴ nos quais o tempo de preparo do material é de 90 dias..... 38
- FIGURA 4. 5 - Imagem de MEV com diferentes magnificações da superfície dos microtubos depositados em substrato de silício (fungo *Penicillium brasilianum* + nanopartículas de ouro) com partículas de 25 nm sobre a superfície da hifa. 39
- FIGURA 4.6 - Imagem de MEV com diferentes magnificações da superfície dos microtubos compostos de fungo *Aspergillus aculeatus* + nanopartículas de prata de 40 nm, depositados em substrato de silício. 40
- FIGURA 4.7 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS dos elementos Si K_α e Au M_β em falsa cor do material híbrido composto pelo fungo *Penicillium brasilianum* + nanopartículas de ouro, formando os microtubos depositados em substrato de silício. 40
- FIGURA 4.8 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS dos elementos Si K_α e Ag L_{α1} em falsa cor do material híbrido composto pelo fungo *Aspergillus aculeatus* + nanopartículas de prata, formando os microtubos depositados em substrato de silício. 41

- FIGURA 4.9 - Gráfico em barras do diâmetro dos microtubos de ouro. Dados obtidos a partir de imagens de MEV da figura A1 anexo, com tempo de exposição mostrado na figura 4.4..... 43
- FIGURA 4.10 - Imagens de inúmeras drenagens e da adição de nanopartículas para obter microtubos com o controle da espessura da parede, composta de camadas de nanopartículas de ouro. Imagens de MEV das amostras de fungos *Penicillium brasilianum* depois de 110 dias no coloide com espessura de 500 nm. 44
- FIGURA 4.11 - Imagem de MEV da secção transversal dos microtubos constituídos pelo fungo *Penicillium brasilianum* e por nanopartículas de ouro. A espessura foi de 25 a 350 nm para um intervalo de 6 a 65 dias: a) 6 dias, b) 18 dias, c) 28 dias, d) 48 dias e e) 65 dias. Em f), gráfico da espessura da parede no tempo. 46
- FIGURA 4.12 - Gráfico com o aumento da espessura da parede composta de multicamadas de nanopartículas de ouro sobre a superfície do fungo *Aspergillus aculeatus*, sendo que a espessura foi de 60 a 140 nm para um intervalo de 10 a 130 dias, respectivamente. Imagem das hifas que cresceram e imagem de MEV das hifas..... 47
- FIGURA 4.13 - Gráfico com 5 amostras que absorveram diferentes doses de radiação depois de duas semanas. Em azul, as amostras em que o fungo foi inativado e, em vermelho, as amostras com o fungo ativo. No fungo ativo as hifas cresceram após receberem uma dose de 2 kGy. 49
- FIGURA 4.14 - Imagens de MEV do fungo *Penicillium brasilianum* exposto a diferentes doses de radiação. Não houve danos estruturais às hifas. 50
- FIGURA 4.15- a) Imagens do sistema de hifas irradiadas com 8 kGy e do coloide de ouro depois de 150 dias; b) Imagens de MEV das hifas do fungo *Aspergillus aculeatus* recobertas por nanopartículas de ouro; c) Imagens de MEV das hifas do fungo *Penicillium brasilianum* recobertas por nanopartículas de ouro..... 51
- FIGURA 4.16 - Esquema ilustrativo da adsorção da primeira camada e das camadas sucessivas de nanopartículas de ouro sobre a superfície da hifa.... 53
- FIGURA 4.17 - Esquema ilustrativo da adsorção de nanopartículas de ouro sobre a superfície do silício, influenciada pelos metabólitos produzidos pelo

- fungo. Imagens de MEV de placas de silício mergulhadas em solução por 20 dias; a1-b1) Placas de silício mergulhadas na solução contendo NPs de ouro + fungo *Aspergillus aculeatus*; a2-b2) Placas de silício mergulhadas em um coloide de NPs de ouro..... 54
- FIGURA 4.18 - Espectro de Raman da molécula de benzotiol sobre os microtubos de ouro em 632,8 nm, preparados utilizando fungo *Cladosporium sphaerospermum* como *biotemplate*: a) imagem do microscópio ótico indicando a área de análise ; b) SERS do benzotiol com os microtubos de ouro. 56
- FIGURA 4.19 - Espectro de Raman da molécula de benzotiol sobre os microtubos de prata em 632,8 nm, preparados utilizando fungo *Cladosporium sphaerospermum* como *biotemplate*: a) imagem do microscópio ótico indicando a área de análise ; b) SERS do benzotiol com os microtubos de prata. 56
- FIGURA 4.20 - Gráfico com os resultados do CHN das amostras com diferentes temperaturas, acompanhado da ilustração e da imagem de MEV da coalescência das nanopartículas de ouro na superfície do fungo, sob o efeito da temperatura do tratamento térmico..... 58
- FIGURA 4.21 - Imagens de MEV dos microtubos antes e depois do tratamento térmico a 400°C por 2 horas em fluxo de oxigênio: a1, b1 e c1) Imagens das hifas recobertas com nanopartículas de ouro; a2, b2 e c2) Imagens do material híbrido tratado a 400°C, mostrando a coalescência das partículas e a formação de estruturas tridimensionais organizadas..... 59
- FIGURA 4.22 - Comportamento elétrico dos microfios recobertos por nanopartículas de ouro: a) Gráfico com medidas de resistência dependentes da temperatura mostram o comportamento de transição do semicondutor metal, b) As curvas I x V em diferentes temperaturas demonstram condutividade ôhmica com baixa resistência ($\sim 10^{-2} \Omega$). 60

RESUMO

MATERIAIS HÍBRIDOS OBTIDOS PELA ADSORÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS SOBRE FUNGOS MICELARES PELO EFEITO *BIOTEMPLATE*. A utilização de conceitos de *bio-design* é uma promissora estratégia para a obtenção de materiais com propriedades de grande interesse científico e tecnológico. Há inúmeros exemplos de materiais obtidos pelo emprego de conceitos de biomimética, de engenharia bio-inspirada e a partir de *biotemplates*, que têm ganhado destaque na química dos materiais, principalmente quando são empregados sistemas estruturados com DNA, bactérias ou fungos. A variedade de estruturas biológicas disponíveis viabiliza alternativas inovadoras para contornar as limitações dos métodos de síntese convencionais. Neste contexto, a fusão da biotecnologia com a química dos materiais tem beneficiado diversas áreas de tecnologias estratégicas, como em catálise, saúde e no desenvolvimento de sensores. Assim, o projeto propõe utilizar o conceito de *biotemplate* e estabelecer um protocolo para a fabricação de estruturas nanoestruturadas pelo efeito *self-assembly* de nanopartículas metálicas. Neste trabalho foram utilizados três tipos de fungos e três tipos de meio de cultura. Foram analisados os parâmetros de fungos, meios de cultura e inativação por radiação. Analisou-se também o controle do diâmetro, espessura da parede, tratamento térmico, medida elétrica e a aplicação em SERS dos microtubos metálicos visando à identificação de moléculas simples de benzotiol. Foram obtidas nanopartículas esféricas de prata e de ouro estáveis e sintetizadas por via coloidal pelo método de Turkevich, com controle do tamanho e forma. E construiu-se estruturas tridimensionais nanoestruturadas na forma de tubos, utilizando nanopartículas e os fungos *Penicillium brasilianum*, *Aspergillus aculeatus* e *Xylaria sp* como *biotemplate*. Os microtubos obtidos são o resultado da adsorção nanopartículas metálicas de ouro e de prata em multicamadas com diâmetro do tubo variando de 2 a 3 μm , com espessura de parede controlada pelo tempo de exposição do fungo ao coloide. Foram obtidos microfios metálicos isentos de material orgânico por meio do tratamento térmico a 400 °C por duas horas e os materiais resultantes mantiveram a forma original de microfios, entretanto, apresentaram a superfície densa devido à coalescência das nanopartículas. Os resultados reforçam a hipótese proposta em nosso grupo de que as biomoléculas produzidas pelos fungos são responsáveis pelo efeito indutor de *self-assembly* de nanopartícula na formação de camada sucessivas na superfície do fungo.

ABSTRACT

HYBRID MATERIALS OBTAINED IN THE ADSORPTION OF METAL NANOPARTICLES ON SURFACE OF MICELLAR FUNGI BY EFFECT BIOTEMPLATE: the use of bio-design concepts is a promising strategy for obtaining materials with properties of great scientific and technological interest. There are numerous examples of materials obtained by employing concepts of biomimetic, bio- inspired engineering and from biotemplates, which has gained prominence in the chemistry of materials, especially when structured with DNA, bacteria or fungi systems are employed. A variety of biological structures available enables innovative alternatives to overcome the limitations of conventional synthetic methods. In this context, the merging of biotechnology to materials chemistry has benefited several areas of strategic technologies such as in catalysis, health and sensor development. Thus, the design concept proposed use biotemplate effect and establish a protocol for manufacturing nanostructured structures by self- assembly of metal nanoparticles. In this work, three kinds of fungi and three types of culture medium were used. Were analyzed the parameters type of fulgal, growth media and radiation inactivation. Were also analyzed to control the diameter, wall thickness, heat treating, electrical measurement and application in SERS microtubes of gold in order to identify single molecules benzothiol. Spheroidal nanoparticles of silver and gold were obtained and stable synthesized via colloidal method of Turkevich with controlled size and shape. Using nanoparticles obtained nanostructured three-dimensional structures were built in the form of tubes using *brasilianum Penicillium*, *Aspergillus aculeatus* and *Xylaria sp* as biotemplate. The microtubes obtained are the result of the adsorption of metal nanoparticles of gold and silver multilayered tube diameter ranging from 2 to 3 microns with a wall thickness controlled by the time of exposure to the fungus colloid. Metal - free organic material microwires were obtained by heat treatment at 400 ° C for two hours, the resulting materials maintained the original form of micro-wires, though showed dense surface due to coalescence of the nanoparticles. The results strengthen the hypothesis proposed in our group that the biomolecules produced by fungi are responsible for the promoting effect of nanoparticle self - assembly in the formation of successive layer on the surface of the fungus.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
1.2- Métodos de síntese	4
1.2.1- Método do citrato	4
1.3 - Desafios na estabilização de nanopartículas em sistema coloidal	6
1.3.1- Estabilidade dos coloides	7
1.3.2- Estabilização eletrostática	8
1.4- Fungos micelares	10
2 - METAS E OBJETIVOS	16
2.1 - Objetivos	16
2.2 - Metas	16
3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	17
3.1 - Síntese de nanopartículas metálicas	18
3.2 - Preparo dos meios de cultivo e crescimentos das hifas	20
3.3 - Preparo de microtubos de ouro pelo efeito <i>biotemplate</i> de fungos filamentosos	23
3.4 - Controle da espessura da parede dos microtubos	24
3.5 - Inativação do fungo com exposição à radiação	25
3.6 - Influência dos metabólitos no <i>self-assembly</i> de nanopartículas metálicas	26
3.7 - Preparo de amostra para espectroscopia SERS utilizando microtubos de ouro	27
3.8 - Tratamento térmico dos microtubos de ouro, eliminação do material orgânico e medidas elétricas	27
3.9 - Caracterização	29
3.9.1 - Difração de raios-X (DRX)	29
3.9.2 - Espectroscopia UV –Vis	29
3.9.3 - Microscopia eletrônica de transmissão	29
3.9.4 - Microscopia eletrônica de varredura	29
3.9.5 - Espectroscopia SERS	31
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
4.1- Preparo das dispersões coloidais de ouro e de prata	33
4.2- Preparo dos microtubos de ouro pelo efeito <i>biotemplate</i> de fungos filamentosos	35
4.3 - Controle da espessura da parede dos microtubos	43
4.4- Inativação do crescimento do fungo pela exposição à radiação	48
4.5- Influência dos metabólitos no <i>self-assembly</i> de nanopartículas metálicas	51
4.6- SERS utilizando microtubos de ouro e de prata	55
4.7- Tratamento térmico dos microtubos de ouro e eliminação do material orgânico	57
5- CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1- INTRODUÇÃO

Cada vez mais, a natureza oferece aos pesquisadores respostas para superar os desafios de *design* e de fabricação de novos materiais híbridos nanoestruturados, principalmente quando se aproveitam as vantagens encontradas nos sistemas biológicos advindos dos processos evolucionários, submetidos a milhões de anos de seleção natural^{1,2}. Por esta razão, o uso de *biotemplates* mostrou ser uma promissora estratégia para a obtenção de materiais com propriedades de grande interesse científico e tecnológico^{3,4}, inclusive com inúmeros exemplos de sistemas que foram desenvolvidos empregando conceitos de biomimética⁵ e de engenharia bio-inspirada^{6,7,8}.

A nanotecnologia é uma das bases para fabricação de estruturas tridimensionais inorgânicas por *biotemplates*⁹. Por outro lado, a utilização de conceitos de *bio-design* é um caminho em potencial para o desenvolvimento de materiais avançados¹⁰. A possibilidade de obter materiais micrométricos e nanométricos com morfologias complexas, desenvolvidos a partir de *biotemplates*, tem ganhado destaque na química dos materiais, principalmente quando são empregados sistemas estruturados com DNA^{11,12}, bactérias¹³ ou fungos¹⁴. A variedade de estruturas biológicas disponíveis viabiliza várias alternativas inovadoras para contornar as limitações dos métodos de síntese convencionais¹⁵, encontrados na fabricação de estruturas complexas com forma e tamanhos controlados, como por exemplo epitaxia, templates de alumina entre outros^{16,17,18,19}.

Contudo, muitos desses novos materiais só podem ser obtidos a partir de uma abordagem interdisciplinar envolvendo física, química e, principalmente, biologia, combinando a complexidade das estruturas biológicas com as características inerentes dos materiais sintéticos²⁰. Por exemplo, Sugunan *et al.*²¹ obtiveram estruturas tridimensionais de tubos micrométricos fazendo crescer fungos em dispersões coloidais de ouro, prata e de platina com grande

potencial para aplicações na construção de eletrodos, catalisadores e como substratos para espectroscopia SERS^{22,23}. Enquanto Yu *et al.*²⁴ utilizaram o fungo *Paraconiothyrium sp* na fabricação de estruturas tridimensionais com nanopartículas de óxido de manganês e lítio para baterias, ampliando o potencial de aplicação desses materiais nano-bioestruturados para além do uso de nanopartículas metálicas. Neste contexto, a fusão da biotecnologia com a química dos materiais tem aberto novas perspectivas no campo de materiais inteligentes e funcionais, beneficiando diversas áreas de tecnologias estratégicas, como em catálise, saúde, materiais inteligentes e desenvolvimento de sensores²⁵.

Sistemas biotecnológicos e supramoleculares costumam variar de poucos nanômetros até, no máximo, um micrômetro, o que viabiliza sua combinação para a fabricação de heteroestruturas de grande complexidade morfológica e funcional. Nanopartículas inorgânicas são particularmente úteis para serem utilizadas como blocos de construção de sistemas híbridos auto-organizados. Além disso, podem ser sintetizadas em grandes quantidades, com diferentes tamanhos e formas, empregando técnicas relativamente simples e bem estabelecidas^{26,27}.

Geralmente, pelo método de Turkevich, as nanopartículas de metais nobres podem ser sintetizadas em estado coloidal com propriedades, morfologias e distribuição de tamanho de partículas controlados²⁸. Isso permite a preparação de nanocompósitos poliméricos, com foco nas propriedades antimicrobianas, como por exemplo, pela combinação de PMMA e nanopartículas de prata para fins odontológicos^{29,30}. Esses novos materiais só puderam ser obtidos a partir de uma abordagem interdisciplinar, em um esforço de colaboração de diversos grupos de pesquisa, devido à complexidade das estruturas, experimentos e ensaios biológicos.

Nos últimos anos, tem crescido o interesse pela preparação de materiais nanoestruturados na forma de tubos que empregam fungos

filamentosos como *biotemplates* a partir da deposição e organização de nanopartículas coloidais na superfície de hifas de fungos micelares^{31,32,33,34,35,36}.

Ainda são poucos os trabalhos sobre os mecanismos que controlam a cinética de recobrimento e sobre a identificação dos metabólicos responsáveis para deposição das nanopartículas nos *biotemplates*. Mesmo dentro dos grupos de pesquisas que se dedicam a este tema, os primeiros resultados têm obedecido uma curva de aprendizado marcada pela superação de vários desafios, a começar pela seleção e cultivo das espécies de fungos filamentosos, pelo aperfeiçoamento das técnicas de caracterização e pela compreensão dos processos de auto-organização. Recentemente, vários resultados indicaram ser possível algum grau de controle e compreensão do uso de *biotemplates* em sistemas híbridos com fungos e nanopartículas. Como exemplo disto, uma efetiva reprodutibilidade dos resultados, o sucesso na obtenção de sistemas compostos de múltiplas camadas de diferentes nanopartículas ou a constatação da influência dos metabólicos sobre os processos de deposição.

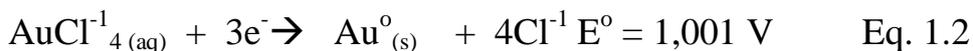
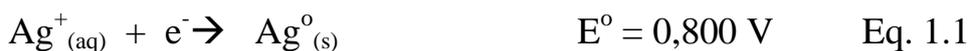
Deste modo, esta pesquisa tem como foco a compreensão dos fenômenos envolvidos na formação das microestruturas resultantes da deposição de nanopartículas de metais nobres, preparadas pelo método Turkevich, sobre a superfície de fungos filamentosos usados como *biotemplates*. Os microtubos foram caracterizados por difração de raios X e microscopias eletrônicas de varredura (MEV). Foram realizados testes SERS e tratamento térmico dos microtubos. Os resultados mostram a obtenção de microtubos de ouro homogêneos com controle do diâmetro e de espessura da parede e, além disso, foi possível obter materiais em um tempo menor que o descrito em estudos descritos por Bigall *et al*¹⁴. Para isso, foram realizados testes para inativar o fungo utilizando radiação gama. Os resultados evidenciam a obtenção de microtubos de ouro com controle do diâmetro e espessura da parede, ao mesmo tempo que comprovam que os metabólitos são os responsáveis pela formação

de camadas sucessivas na superfície das hifas e em diferentes superfícies, como substratos de silício e parede dos frascos. As estruturas tridimensionais obtidas resultam da interação de biomoléculas produzidas pelo fungo com a superfície das nanopartículas de metais nobres, formando microtubos de múltiplas camadas. A análise de SERS apresentou bons resultados e próximos aos relatados na literatura sobre o tema. O tratamento térmico possibilitou a obtenção de estruturas organizadas de tubos de ouro isentos de material orgânico.

1.2- Métodos de síntese

1.2.1- Método do citrato.

Dentre os métodos da rota *bottom up* aplicados na obtenção de nanopartículas metálicas de ouro, prata ou platina, que consiste no crescimento da partícula átomo a átomo, o mais utilizado é aquele conhecido como Método Citrato ou Método de Turkevich³⁷. Este método foi inicialmente proposto por Turkevich em 1951 e empregado no preparo de coloides de ouro, de modo que foi aplicado rapidamente para síntese de outros metais, tais como prata, ródio e platina. O Método de Turkevich se baseia em uma reação de óxido-redução em meio aquoso entre o citrato e o sal metálico. Para os sais de ouro, a reação pode ser realizada na temperatura ambiente, enquanto que para os demais sais, como prata e platina, é necessário um incremento na temperatura (Fig.1.1). Se comparada à síntese de nanopartículas de prata, a síntese de nanopartículas de ouro apresenta maior facilidade de ser realizada, pois os processos de nucleação e crescimento das nanopartículas de ouro ocorrem em tempos e temperaturas menores do que os processos de outros metais. Isto ocorre devido à maior reatividade do sal de ouro com o citrato, provavelmente associada aos fatores cinéticos como mecanismo de reação, o que também pode estar relacionado com o potencial de redução, já que a diferença de potencial de redução entre os sais metálicos é 0,201 V, como mostrado pelas equações 1.1 e 1.2



Comparando os potenciais dos sais de ouro e de prata, pode-se afirmar que o sal de ouro é energeticamente mais favorável sofrer redução pelo citrato do que o sal de prata. Contudo, vale ressaltar que a reatividade destes íons também depende de outros parâmetros, tais como temperatura, concentração, razão estequiométrica e pH. Os diferentes potenciais de redução do ouro e da prata fazem com que a síntese das nanopartículas, sob as mesmas condições experimentais, apresente resultados distintos quanto ao tempo de reação, rendimento e tamanho médio das partículas. Em geral, a fonte do elemento de metal nobre é um sal solúvel como o nitrato de prata (AgNO_3) ou um cloreto ácido (HAuCl_4).

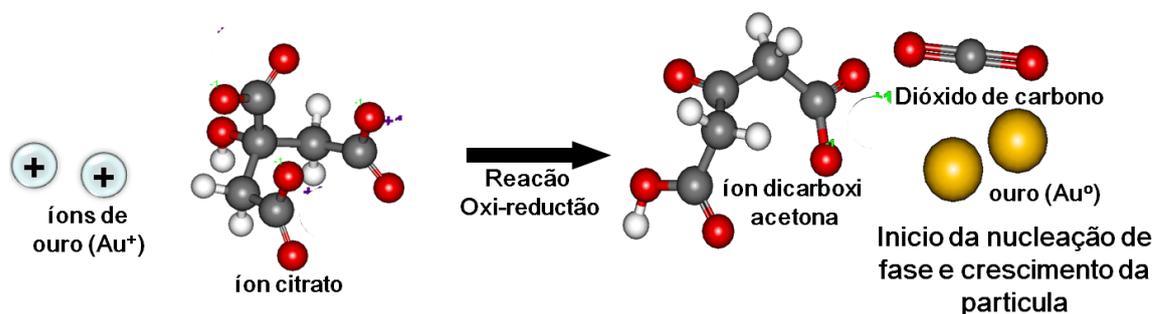


FIGURA 1.1- Ilustração da oxidação da molécula de citrato³⁸.

A síntese pelo Método do Citrato mostra vantagens sobre outras rotas de redução química por apresentar um procedimento simples, fácil, rápido, reproduzível, de baixo custo e seguro, pois a molécula de citrato é atóxica e a reação pode ser realizada em sistema aquoso. O Método do Citrato gera nanopartículas com boa homogeneidade e com tamanhos em cerca de 20 nm. É possível aumentar o diâmetro das nanopartículas formadas adicionando-as a outra solução, de modo que as nanopartículas geradas atuem como sementes de crescimento no início da reação. Esta técnica tem a capacidade de produzir nanopartículas de ouro ou prata com tamanho entre 20 e 100 nm de diâmetro^{39,40}.

1.3 - Desafios na estabilização de nanopartículas em sistema coloidal.

A síntese de nanopartículas deve ser feita com um controle preciso da forma, do tamanho, da composição e da estrutura do material, de maneira que garanta que as nanopartículas não estejam aglomeradas. As características das nanopartículas são determinadas pelas etapas de nucleação e crescimento, o estado de equilíbrio termodinâmico é atingido por meio da união dos átomos reduzidos, presentes no meio reacional, dando origem aos *clusters*. Uma vez formados, o soluto migra para a superfície do *cluster*, iniciando a etapa de crescimento⁴¹ (Fig. 1.2). Na síntese das nanopartículas, processos como a coalescência e a agregação podem competir com o crescimento, modificando a distribuição de tamanho das partículas no sistema⁴².

Podem ocorrer na reação dois tipos de nucleação: a nucleação heterogênea ou a nucleação homogênea. A nucleação heterogênea pode ser alcançada por meio da formação de sementes *in situ* que servirão de núcleo para o crescimento das partículas desejadas. Estas sementes são os agentes nucleantes, e podem ser utilizados para o crescimento de estruturas como nanofios, nanofitas e estruturas do tipo casca/caroço (*core/shell*)⁴³. Em uma nucleação homogênea, a nucleação acontece em uma única e rápida etapa: quando a concentração das espécies alcança a supersaturação crítica. Diante disto, os núcleos podem crescer uniformemente por difusão do soluto da solução para a superfície dos núcleos até que o tamanho final seja atingido.

Para a obtenção de amostras monodispersas, é necessário que as etapas de nucleação e crescimento ocorram separadamente e, ainda, é preciso evitar que novas etapas de nucleação possam ocorrer durante a etapa de crescimento, como é proposto pelo modelo clássico de LaMer e Dinegar⁴⁴.

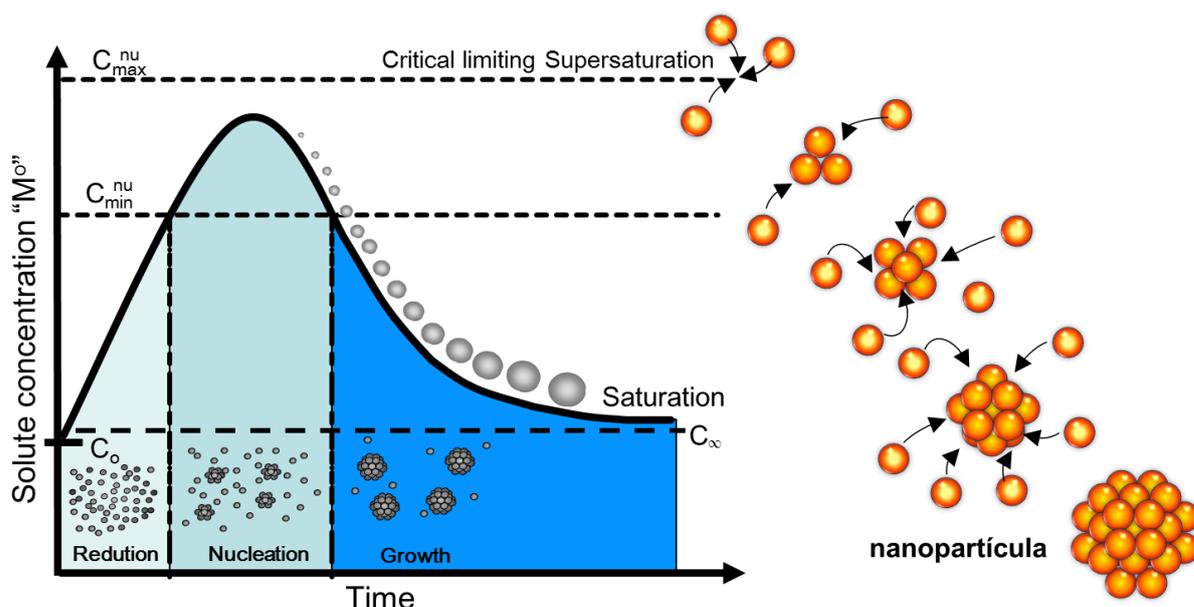


FIGURA 1.2 - Processo de nucleação e crescimento. Quando a concentração do soluto aumenta em função do tempo, a nucleação não ocorre até que se alcance o equilíbrio de solubilidade.

As nanopartículas monodispersas têm sido obtidas como resultado de agregação de nanopartículas menores em lugar de crescimento contínuo por difusão. Porém, é possível obter partículas monodispersas por meio de nucleações múltiplas. Neste caso, a monodispersividade pode ser alcançada através de um processo de crescimento por amadurecimento das nanopartículas, no qual as nanopartículas maiores crescem pelo consumo das menores, por meio da dissolução das menores e da deposição dos íons da solução na superfície das maiores no processo conhecido como *Ostwald ripening*⁸⁷.

1.3.1- Estabilidade dos coloides.

Pode-se observar que a aglomeração de pequenas partículas, precipitadas a partir de uma solução, é praticamente inevitável na ausência de um estabilizante, pois o crescimento visa à diminuição na energia total do sistema. As diferentes interações entre a fase sólida dispersa (partículas) e a fase líquida (solvente) constituem um dos pontos críticos do comportamento e da estabilidade do coloide. Para as nanopartículas metálicas como ouro, prata ou platina, a interação entre as fases não é direta. Sempre são adicionadas

moléculas que tem a finalidade de fazer uma interface entre os dois meios. As propriedades físicas e químicas de ambas as fases controlam essas interações. Tais interações da superfície incluem a repulsão eletrostática, interações de van der Waals, repulsão estérica e repulsão de solvatação. Forças hidrodinâmicas, como difusão e solubilidade da fase dispersa, também interferem na estabilidade do sistema.

O entendimento dessas interações entre as fases torna-se crucial para a obtenção de sistemas coloidais com estabilidade cinética e termodinâmica. E que para evitar o crescimento descontrolado das partículas e produzir nanopartículas com boa dispersão na fase contínua é necessário utilizar os mecanismos de estabilização eletrostático e impedimento estérico.

1.3.2- Estabilização eletrostática.

A estabilização eletrostática consiste na adsorção física de íons ou de moléculas que estabilizem as partículas na fase contínua (solvente)^{45,46}. Essa é a via mais comum de estabilização para sistemas coloidais aquosos. As partículas coloidais adquirem cargas elétricas na superfície através de diferentes mecanismos, ao serem postas em contato com solvente polar, como a adsorção de íons do meio ou de moléculas de surfactante carregadas. Tem-se como exemplo, as partículas de ouro ou de prata que acumulam cargas positivas na superfície. Essas cargas atraem os íons de carga negativa do meio, como íons de nitrato, cloreto e citrato, criando-se uma distribuição difusa de íons de carga contrária (neste caso, negativa) em volta da partícula metálica, dando origem à criação de uma dupla camada elétrica. É essa dupla camada elétrica que protege as partículas coloidais, uma vez que as vizinhanças das partículas coloidais têm carga do mesmo sinal, repelindo-se, além de funcionarem como barreiras físicas que evitam a aglutinação das partículas coloidais.

As interações entre partículas coloidais determinam as propriedades dos coloides e dependem da distância de separação e da quantidade de partículas dispersas. Essas forças de interação entre as superfícies das partículas coloidais advêm da natureza eletromagnética das interações entre a matéria. Nas dispersões coloidais aquosas pode haver: 1) interação repulsiva de duplas camadas de cargas, 2) interação atrativa de van der Waals, 3) interação estérica repulsiva das moléculas de citrato adsorvidos nas partículas, 4) interação atrativa das moléculas de citrato, 5) interação de moléculas de solvente (solvatação) com a molécula de citrato. A somatória de todas as contribuições é o que determina a estabilidade dos coloides. Se as partículas se agregam, facilita o processo de crescimento por coalescência, pois as interações entre elas fazem com que se agreguem em unidades maiores, que se sedimentam sob a ação do campo gravitacional.

A teoria foi desenvolvida no começo da década de 40 por dois grupos de cientistas, Boris Derjagin e Lev Landau na Rússia; Evert Verwey e Theo Overbeek na Holanda. Ambos os grupos publicaram as suas ideias após a Segunda Guerra Mundial e a teoria ficou conhecida como teoria de Derjagin-Landau-Verwey-Overbeek⁴⁷. A partir dos modelos e da formulação dessa teoria, o estudo dos coloides passou a ter um maior rigor científico.

As moléculas de citrato aderidas à superfície da partícula formam uma dupla camada elétrica denominada camada de Stern^{48,49}. São essas moléculas que interagem com o solvente e impedem a coalescência das partículas e sua precipitação.

A alteração na interação entre as partículas só ocorre se o citrato da superfície for substituído por outra molécula ou ânion. Em nosso trabalho, as moléculas que desestabilizam a dupla camada elétrica são produzida pelos fungos micelares. A substituição pode mudar as interações entre as partículas coloidais, podendo-se passar de predominantemente repulsivas para

predominantemente atrativas, e vice-versa (Fig.1.3). A estabilidade do coloide depende diretamente da força do agente estabilizante, esta força é máxima quando o coloide é cineticamente estável, ou seja, o agente estabilizante é eficiente, a partir do momento que os processos que geram desestabilização no coloide ocorram com uma velocidade tão baixa ao ponto de considerá-lo como estável.

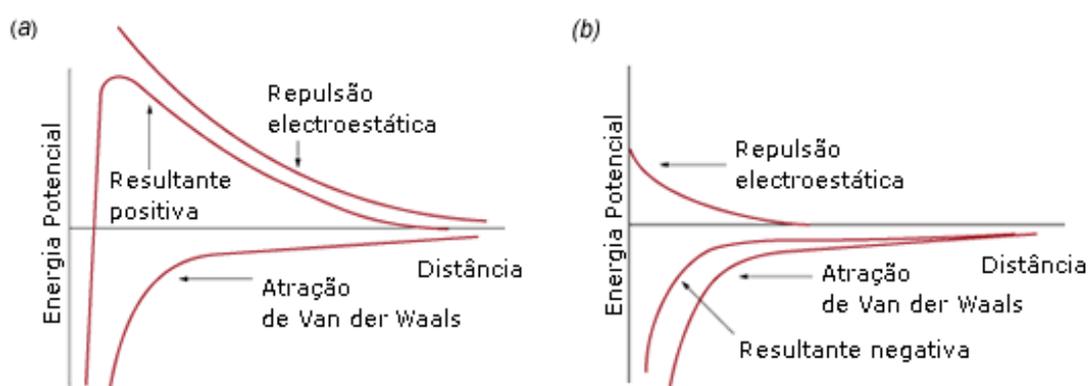


FIGURA 1.3 - Gráfico da dupla camada elétrica representando forças predominantemente: a) repulsivas; b) atrativas⁵⁰.

Dentre as inúmeras moléculas utilizadas para alterar a interação eletrostática, as que mais chamam a atenção são as moléculas orgânicas que possuem resíduos de hidroxila, tiol, amina, amida e carboxila. Diversos estudos relatam sistemas em que proteínas, polissacarídeos e moléculas orgânicas interagem diretamente com nanopartículas metálicas.

1.4- Fungos micelares.

Os fungos constituem um grupo de microorganismos de grande interesse prático e científico e são encontrados em todos os ambientes, na água, no solo, no ar, assim como nos organismos dos animais, do homem, dos vegetais, dos insetos, etc. Os fungos são divididos em unicelulares e multicelulares e podem se apresentar como duas unidades morfológicas básicas, a leveduriforme e a hifal. Os unicelulares são denominados leveduras, e são delimitados e pequenos, além de apresentarem células arredondadas ou ovais,

dividindo-se por brotamento, raramente por cissiparidade. Os multicelulares são chamados de filamentosos, miceliais ou bolores. O micélio é o conjunto de hifas ramificadas, estruturas tubulares, que se estendem continuamente em suas extremidades, onde o citoplasma é rodeado por uma parede rígida, que separa o fungo, física e funcionalmente, do ambiente externo⁵¹.

A maioria dos fungos desenvolve-se como hifas, estruturas filamentosas e cilíndricas, com dois a 10 μm de diâmetro, até vários centímetros de comprimento. As hifas crescem nas suas extremidades (ápices), depois disso, novas hifas formam-se tipicamente por meio da emergência de outras extremidades ao longo da hifa já existente, num processo designado “ramificação”. Ocasionalmente, as hifas também podem passar por um processo chamado bifurcação, no qual as extremidades de uma hifa em crescimento se bifurcam, dando origem a duas hifas com crescimento paralelo (Fig. 1.4)⁵². A combinação do crescimento apical com a ramificação/bifurcação conduz ao desenvolvimento de um micélio, uma rede interconectada de hifas⁵³.

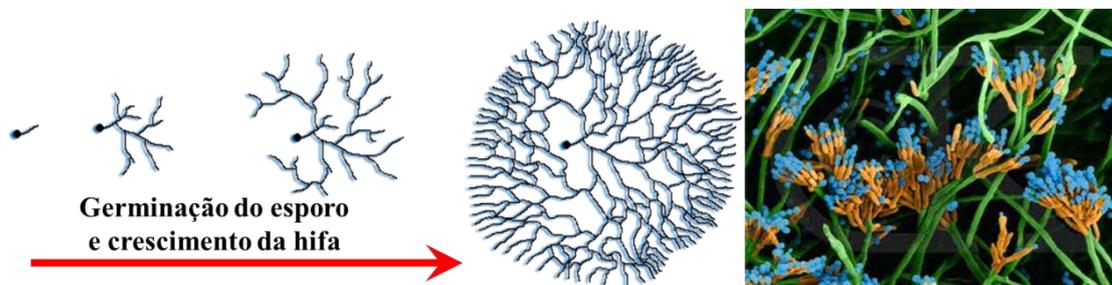


FIGURA 1.4 - Ilustração da germinação do esporo e crescimento da hifa gerando o micélio. Ao lado, imagem de microscopia de varredura eletrônica do *Penicillium* sp, em falsa cor, imagem do micélio com as hifas (verde), do esporângio (laranja) e dos esporos (azul com aumento de 1560 x)⁵⁴.

As hifas podem ser septadas ou cenocíticas: as septadas são divididas em compartimentos separados por paredes transversais, (paredes celulares internas, chamadas septos, que se formam perpendicularmente à parede celular, dando à hifa a sua forma) cada compartimento contendo um ou mais núcleos. Os septos têm poros que permitem a passagem de citoplasma,

organelas e, por vezes, núcleos. Muitas espécies desenvolveram estruturas hifais especializadas na absorção de nutrientes dos hospedeiros vivos.

O crescimento dos fungos como hifas, em substratos sólidos ou como células singulares em ambientes aquáticos, está relacionado à busca de mais nutrientes. Em diferentes ambientes o fungo se adapta para a extração eficiente de nutrientes, pois estas formas de crescimento têm uma razão bastante alta entre a área superficial e o volume. Adaptações morfológicas como estas são complementadas por enzimas hidrolíticas segregadas para o ambiente, como lipases, invertases, lactases, proteinases, amilases, etc. Para a digestão de grandes moléculas orgânicas, como polissacarídeos, proteínas, lípidos, e outros substratos orgânicos em moléculas menores que podem então ser absorvidas como nutrientes. Por diferentes processos, os fungos podem elaborar vários metabólitos secundários como antibióticos, dos quais a penicilina é o mais conhecido⁵⁵.

A vasta maioria dos fungos filamentosos cresce de um modo polar ao estender-se numa direção, através do alongamento no ápice da hifa. As formas alternativas de crescimento dos fungos incluem a extensão intercalar (por expansão longitudinal de compartimentos das hifas que estão abaixo do ápice), como é o caso em alguns fungos endófitos. O crescimento dos fungos como estruturas multicelulares que consistem em células somáticas e reprodutoras uma característica que evoluiu de modo independente nos animais e plantas tem várias funções, incluindo o desenvolvimento de corpos frutíferos para a disseminação dos esporos sexuais e de biofilmes para a colonização de substratos e comunicação intercelular.

Tradicionalmente, os fungos são considerados heterotróficos, ou seja, são organismos que, para o seu metabolismo, dependem exclusivamente do carbono fixado por outros organismos. Os fungos desenvolveram um grau elevado de versatilidade metabólica, o que lhes permite utilizar uma variedade

de substratos orgânicos para o seu crescimento, incluindo compostos simples como nitrato, amônia, acetato ou etanol⁵⁶.

A parede do fungo é constituída por material fibrilar de polissacarídeo e por proteínas, desempenhando função estrutural e fornecendo força mecânica, além de apresentar resistência às variações na pressão osmótica do meio. A parede possui poros que permitem à célula comunicar-se com o meio ambiente, permitindo também a reprodução, a liberação de metabolitos e a absorção de nutrientes. Ela é bastante versátil por causa de vários elementos constituintes da matriz, de modo que se adapta às condições do meio para garantir a sobrevivência da célula. A construção da parede ocorre principalmente no ápice da hifa. A parede é altamente plástica, mas com o tempo torna-se mais rígida devido à reticulação de polímeros, ao espessamento de fibrilas e à deposição de material na matriz interfibrilar. A composição da parede celular dos fungos varia de acordo com a classificação destes fungos, sendo assim, algumas classes, como a dos Ascomycetes, têm a parede constituída de 80 % de polissacarídeos. A maioria dos fungos dessa classe possui uma estrutura fibrilar em camadas sobre a parede celular, construída por quitina, beta-glucana (β -(1-3), β -(1-6)) e uma variedade de heteropolissacarídeos. As fibras são incorporadas numa matriz de gel, contituídas de Glicoproteínas, manoproteínas e α (1-3) Glucana (Fig. 1.5)⁵⁷.

As proteínas contidas na parede da hifa são unidas por ligação covalente aos polissacarídeos (quitina e beta-glucanas) que também estão presentes na parede da hifa. Essas manoproteínas são cadeias de manose+glicoproteínas unidas à proteínas por ligações tipo éster ou amida (tipo O ou tipo N)⁵⁸. O conjunto de manoproteínas representa uma pequena fração do peso seco da parede celular, raramente maior do que 20 % deste peso⁵⁹. Nem todas as proteínas possuem um papel estrutural, visto que outras proteínas são responsáveis pelo reconhecimento, pela modificação da parede e pela nutrição,

que envolve proteínas ligadas à parede da hifa. As paredes também contêm uma série de outros componentes menores, como por exemplo, os pigmentos e os sais.

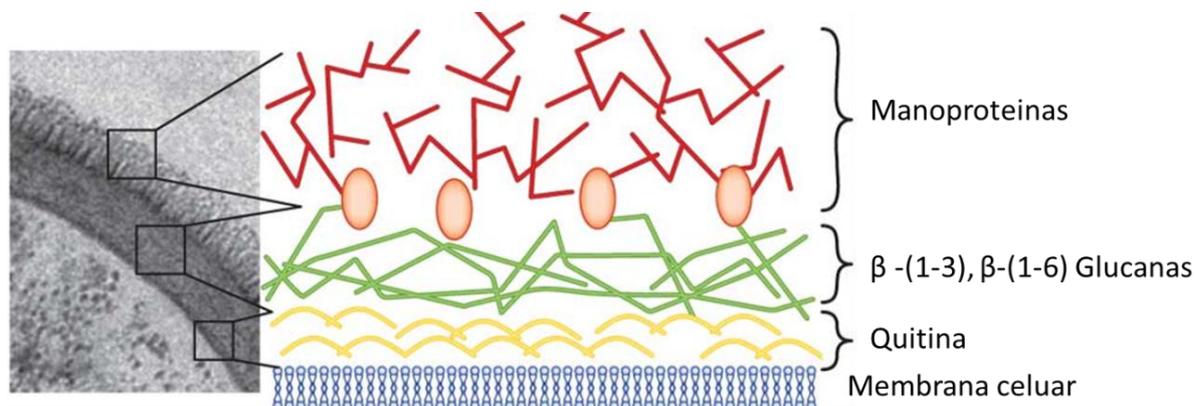


FIGURA 1.5 - Micrografia eletrônica da parede celular do fungo (*Candida albicans*), com camadas ricas em carboidratos da parede celular fúngica em destaque: manoproteínas (glicoproteínas+ Manoses) , β -glucana e quitina⁶⁰.

O fungo secreta para além de sua parede uma infinidade de substâncias, como proteínas, polissacarídeos, metabolitos primários e secundários. Essas substâncias secretadas são denominadas matriz extracelular, que possui estrutura de gel devido às substâncias mucilaginosas, que têm função de adesão em diferentes grupos de fungos e em diversas enzimas extracelulares⁶¹. Em certas situações, a matriz extracelular contém hidrofobinas – pequenas proteínas (cerca de 100 aminoácidos) que exibem a propriedade de auto-organização de interfaces hidrofílico/hidrofóbicas, formando películas anfipáticas⁶². Elas desempenham um importante papel ao criar uma camada impermeável, formando uma estrutura de proteção contra a desidratação e contra parasitas. Em casos de estresse, o fungo pode produzir e liberar ácido oxálico junto à matriz extracelular para a imobilização de metais pesados⁶³. Além disso, algumas proteínas são enzimas que digerem nutrientes extracelulares ou modificam estruturalmente a parede. Há ainda as glicoproteínas envolvidas nos processos de reconhecimento celular.

Os grupos funcionais de hidroxila (-OH) e amida (NH₂) presentes na quitina, os grupos -OH presentes na glucana e as proteínas da matriz

extracelular possuem elevada afinidade com a superfície das nanopartículas de ouro. As NPs-Au podem interagir com a quitina e com a glucana, mas também com as glicoproteínas, manoproteínas e demais componentes presentes na parede celular dos fungos através dos grupos funcionais (-OH, -NH₂, -COOH, -SH) que podem promover a adsorção das nanopartículas metálicas na superfície da hifas (Fig.1.6).

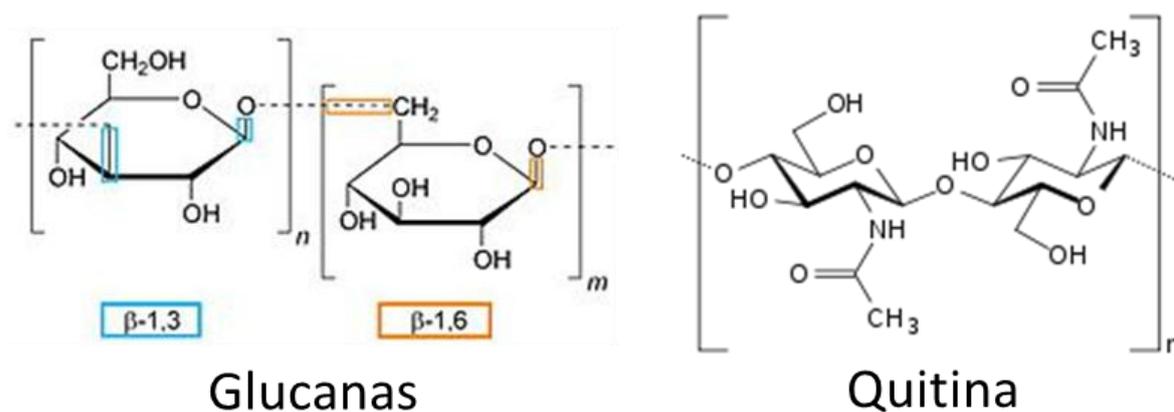


FIGURA 1.6 – Ilustração dos monômeros: β-(1-3) glucana, β-(1-6) glucana e quitina.

Nos últimos anos, tem crescido o interesse na preparação de microtubos com o emprego de fungos filamentosos a partir da deposição e organização de nanopartículas coloidais na superfície de hifas de fungos micelares. Isto porque as estruturas biológicas apresentam características como estrutura uniforme, fácil disponibilidade no ambiente, baixo custo de produção e facilidade de cultivo que tornam esses microorganismos excelentes *biotemplates* para a síntese de materiais híbridos nanoestruturados com interface orgânica-inorgânica, ou seja, superfície da hifa-nanopartículas metálicas. Ainda são poucos os trabalhos sobre os mecanismos que controlam a cinética de recobrimento ou sobre a identificação dos metabólitos responsáveis para deposição das nanopartículas sobre os *biotemplates*, o que torna o trabalho mais desafiador. Neste contexto, o presente trabalho visa controlar e compreender os sistemas híbridos com fungos e nanopartículas, através de uma efetiva reprodutibilidade dos resultados, a obtenção de microtubos compostos de múltiplas camadas de diferentes nanopartículas ou a constatação da influência dos metabólitos sobre os processos de deposição.

2 - METAS E OBJETIVOS

2.1 - Objetivos.

- i) Obter nanopartículas sintéticas de prata e de ouro sintetizadas por via coloidal pelo método de Turkevich, com controle do tamanho e da forma.
- ii) Caracterizar as nanopartículas e identificar a influência dos parâmetros na morfologia.
- iii) Construir microtubos recobertos de nanopartículas de ouro utilizando os fungos *Penicillium brasilianum*, *Aspergillus aculeatus* e *Xylaria sp* como *biotemplate*.
- iv) Correlacionar as propriedades físicas e químicas finais dos materiais: estabilidade e controle do diâmetro do tubo e diâmetro da parede com as características das interfaces formadas entre a fase orgânica (fungo) e a fase inorgânica (nanopartículas).

2.2 - Metas.

Este projeto de pesquisa tem como metas diretas e indiretas:

- i) Obter dispersões coloidais estáveis de nanopartículas de ouro e prata com rigoroso controle de tamanho médio de partícula e com estreita distribuição de tamanho de partícula.
- ii) Obter microtubos recobertos de nanopartículas de ouro utilizando os fungos micelares como *biotemplate* com o controle do diâmetro do tubo, espessura da parede do tubo e taxa de recobrimento. Ademais, testar as propriedades elétricas e aplicação em SERS.
- iii) Desvendar os mecanismos de formação de multicamadas, ou seja, a adsorção das nanopartículas metálicas na superfície das hifas.
- iv) Determinar a influência dos metabólitos na velocidade da formação das multicamadas.

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho abordou-se a construção dos microtubos recobertos de nanopartículas metálicas utilizando como *biotemplate* os fungos *Penicillium brasilianum*, *Aspergillus aculeatus* e *Xylaria sp*, depositados na micoteca do **LaBioMMi (Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos)** da UFSCar. A tabela 3.1 mostra a classificação taxônomica e a composição da parede celular dos fungos utilizados no trabalho

TABELA 3.1 – Classificação taxônomica dos fungos utilizados

Reino	Fungi	Fungi	Fungi
Filo	Ascomicota	Ascomicota	Ascomicota
Classe:	Eurotiomycetes	Eurotiomycetes	Sordariomycetes
Ordem:	Eurotiales	Eurotiales	Xylariales
Familia:	Trichocomaceae	Trichocomaceae	Xylariaceae
Genero:	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Xylaria</i>
Especie:	<i>A. aculeatus</i>	<i>P.brasilianum</i>	<i>Xylaria sp</i>
Comp.da parede	Quitina e glucanas	Quitina e glucanas	Quitina e glucanas

Um resumo do procedimento padrão de preparação é descrito na figura 3.2. A massa micelial foi preparada adicionando os esporos dos fungos misturados a 25 mL dos meios de cultura CZApek, CZApek-lev e BD (Fig.3.1). Após o período de crescimento a temperatura ambiente e protegido da luz, os micélios foram drenados, separados do meio de cultura e adicionados em 100 mL de coloide de ouro ou de prata. As nanopartículas aderem à superfície das hifas formando uma estrutura na forma de microtubos que são separados do líquido, congelados, liofilizados e caracterizados.

Ainda foram preparados experimentos com algumas variações como adição sucessivas de coloide de ouro, inativação do fungo, com intuito de verificar a formação de multicamadas, controle da espessura da parede, inativação do crescimento do fungo, tratamento térmico para eliminação do material orgânico e medida elétrica.

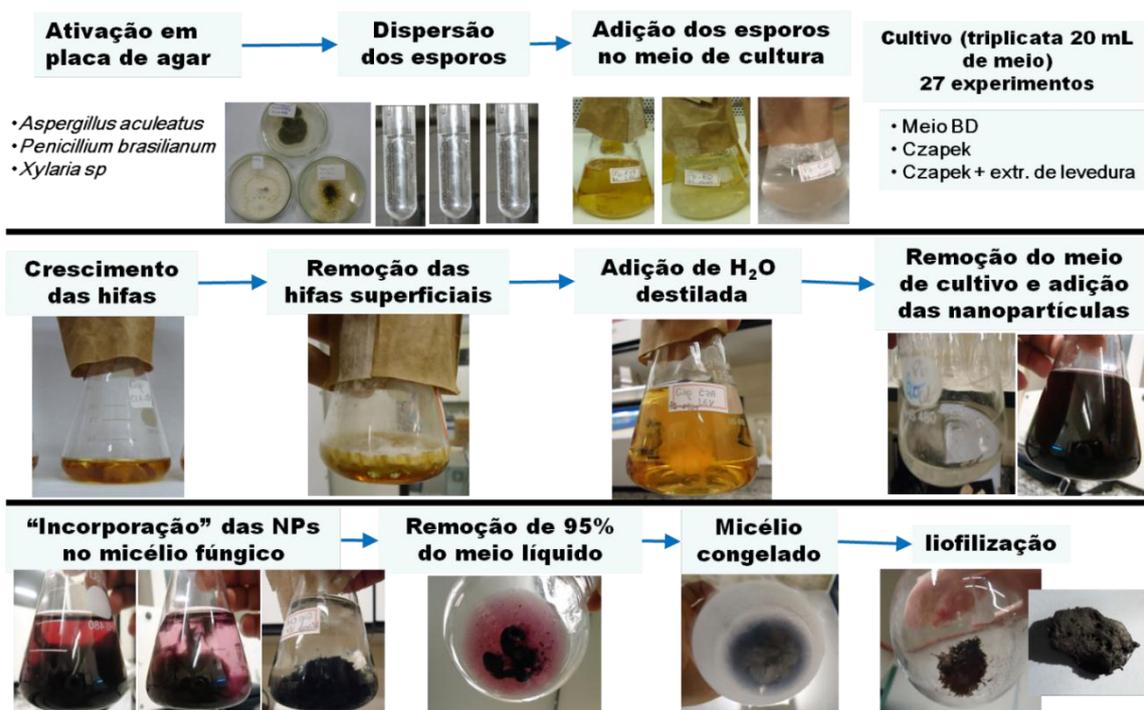


FIGURA 3.1- Resumo da preparação dos microtubos de ouro pelo efeito *biotemplate* de fungos filamentosos. Inoculação, crescimento das hifas, extração do meio de cultivo, adição de nanopartículas, adsorção, extração do sobrenadante, congelamento e liofilização.

3.1 - Síntese de nanopartículas metálicas.

As dispersões coloidais de ouro e de prata foram preparadas com a aplicação do método de síntese originalmente proposto por Turkevich¹⁰, igualmente conhecido como Método do Citrato. O sal de citrato foi utilizado como agente redutor e estabilizante. Os reagentes e solventes foram utilizados como recebidos. A água utilizada foi destilada e deionizada, com o uso de um equipamento Millipore Elix-3.

Todo o procedimento de síntese de nanopartículas de ouro foi realizado seguindo um protocolo a fim de evitar a contaminação dos colóides por bactérias ou fungos presentes no ar. Foram preparadas soluções estoque de ácido áurico e citrato de sódio com concentração de $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e $3,0 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente. As soluções estoque, bem como a água destilada, foram autoclavadas na temperatura de 120°C por 30 minutos. Confeccionaram-se rolhas de “algodão+tecido” (boneca) para vedar a boca dos frascos de

Erlenmeyer com o intuito de manter a solução aerada e evitar a contaminação por bactérias e esporos de outros fungos.

A síntese das nanopartículas de ouro foi realizada em uma capela de fluxo laminar e inicialmente todos os instrumentos (placa de aquecimento, frascos, etc.) foram limpos com etanol 70%, além de posicionados na capela com as soluções estoque. Todo o material utilizado na síntese das nanopartículas foi exposto à luz ultravioleta por 40 minutos.

Na sequência do procedimento de limpeza e esterilização, foram aquecidos em um frasco de Erlenmeyer 1000 mL de água destilada e auto-clavada a 95°C com auxílio de uma placa de aquecimento de agitação constante. Adicionou-se 20 mL de uma solução aquosa de HAuCl_4 a $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. Em seguida, foram adicionados 10 mL de uma solução em citrato de sódio a $3,0 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$. A relação estequiométrica é de 1:3 sal metálico e agente redutor, respectivamente, e o pH em torno de 3,0. Essa mistura foi mantida sob aquecimento e agitação durante 12 minutos. O coloide, então, foi resfriado com o auxílio de um banho de gelo até a temperatura de 23°C (Fig. 3. 2).



FIGURA 3.2 - Síntese de nanopartículas de ouro. **a)** Aquecimento 1000mL de água destilada à 95°C ; **b)** Adição de 20 mL de uma solução aquosa de HAuCl_4 a $5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; **c)** Adição de 10 mL de uma solução em citrato de sódio a $3,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$; **d)** Nucleação das primeiras partículas de ouro; **e)** Depois de doze minutos de reação o coloide é resfriado à temperatura de 23°C .

A síntese das nanopartículas de prata seguiu o mesmo procedimento realizado para as nanopartículas de ouro no que se refere às condições assépticas, concentração, tempo de reação e temperatura. A reação da prata foi realizada em pH 8,2 nos instantes iniciais da reação mostrados na figura 3.3 - c).

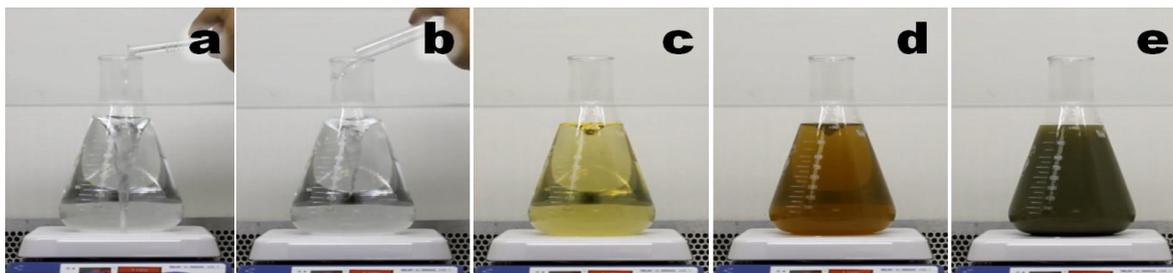


FIGURA 3.3 - Síntese de nanopartículas de prata. a) Aquecimento de 1000mL de água destilada à 95°C e adição de 10 mL de uma solução aquosa de Ag NO_3 a $1,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$; b) Adição de 10 mL de uma solução em citrato de sódio a $3,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$; c) Nucleação das primeiras partículas de prata em 7 minutos de reação; d) 10 minutos e) Após 13 minutos de reação, o coloide foi resfriado à temperatura de 23°C.

3.2 - Preparo dos meios de cultivo e crescimentos das hifas.

As hifas foram previamente crescidas no meio de cultura, que tem em sua constituição nutrientes e sais minerais para o crescimento do fungo e para que estes formem as hifas que servirão de suporte na adsorção de nanopartículas para formação de estruturas organizadas na forma de tubos.

A composição dos meios de cultivos CZA, CZA-lev e BD está descrita na tabela abaixo. Os meios CZA e CZA-Lev têm seu modo de preparo semelhante, consistindo na adição dos nutrientes e sais minerais em 500 mL de água destilada. O meio CZA-Lev é o mais rico em nutrientes, já que são adicionados dez gramas de extrato de levedura. Já o meio BD é constituído de 100 g de batata picada (*Solanum tuberosum L*), cozidas por 20 minutos no microondas com 200 mL de água. Após o cozimento, os pedaços foram amassados com um garfo de quatro dentes por 3 minutos, a pasta formada foi colocada em um filtro de pano e durante a filtragem passou mais água destilada sobre a pasta de batata. Ao líquido resultante foram adicionados 20g de dextrose e a mistura foi diluída até atingir 500 mL (Tabela 3.1).

TABELA 3.2 – Composição dos meios de cultivo

Czapek (CzA)		Czapek (CzA) + Lev		BD
K ₂ HPO ₄	0,005g	K ₂ HPO ₄	0,005g	100g de batata picada, cozida por 20 minutos no microondas com 200 mL de água, amassada e filtrada. Ao que foi filtrado é adicionado a dextrose e a solução é diluída até atingir 500mL
NaNO ₃	1,5 g	NaNO ₃	1 g	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25g	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25g	
KCL	0,25 g	KCL	0,25 g	
FeSO ₂ .7H ₂ O	0,005 g	FeSO ₂ .7H ₂ O	0,005 g	
Sacarose	15g	Sacarose	15g	
			10g de extrato de levedura	
volume final = 500mL		volume final = 500mL		Volume final = 500mL

Os experimentos foram realizados utilizando três espécies de fungo em três meios de cultura sempre em triplicata, totalizando 27 frascos de Erlenmyer de 125 mL. Os meios de cultura foram distribuídos nos frascos, resultando em nove frascos de cada meio de cultura. Cada frasco recebeu 25 mL de meio de cultura. Os 27 frascos foram autoclavados à temperatura de 120°C durante 30 minutos. As bocas dos frascos de Erlenmeyer foram fechadas com uma “boneca” de pano e algodão a fim de evitar a contaminação com esporos de outros fungos ou bactérias.

Depois de resfriar os frascos à temperatura ambiente, eles foram posicionados na capela de fluxo laminar e expostos à luz ultravioleta por 40 minutos. Foram preparadas suspensões de esporos dos fungos *Aspergillus aculeatus* e *Penicilium brasilianum* e os mesmos foram inoculados nos três meios de cultura (Fig.3.4). O fungo *Xylaria sp* não esporula, assim, sua inoculação nos meios de cultura ocorreu por meio do corte de pequenos pedaços da colônia dos fungos da placa de agar que foram adicionados aos meios de cultura. Após a inoculação dos meios de cultura, os frascos foram armazenados em local arejado a temperatura ambiente e protegido da luz. Depois de dois a três dias, a massa micelial cresceu na solução e na superfície (Fig. 3.5 a). Nessa etapa, a massa micelial da superfície foi retirada e o meio de cultura foi diluído com água destilada até o volume de 100 mL (Fig. 3.5 b).

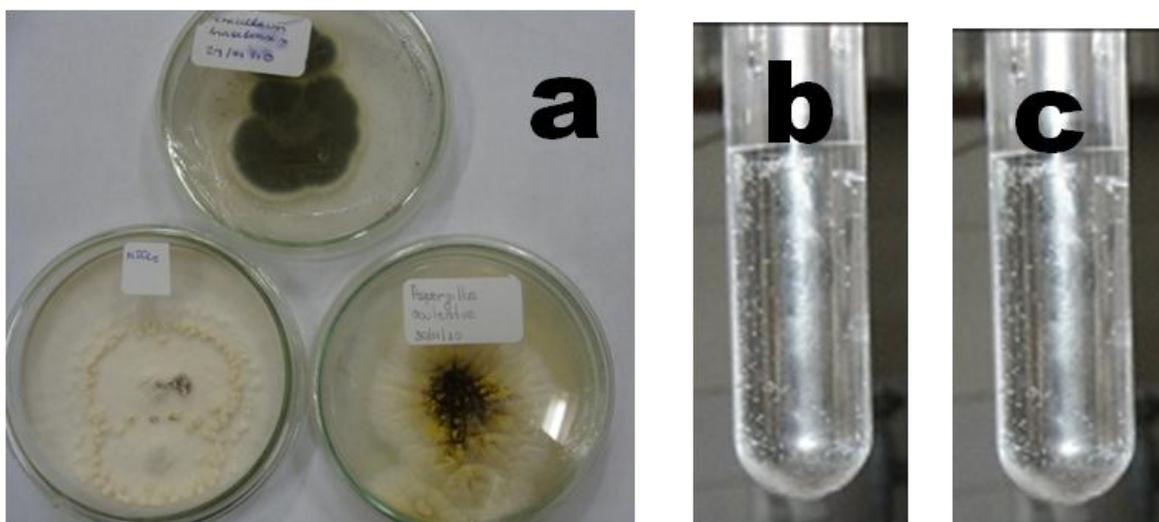


FIGURA 3.4 - a) Placa de agar com a colônia de fungos: na placa superior o fungo *Penicilium brasilianum*, na placa inferior direita o fungo *Aspergillus aculeatus* e na placa inferior esquerda o fungo *Xylaria sp.*; b) suspensão com os esporos do fungo *Penicilium brasilianum*; c) suspensão com os esporos do fungo *Aspergillus aculeatus*.

Os frascos foram armazenados por mais um período de um a três dias. Neste período, a massa micelial imersa no meio cresceu, formando uma estrutura que se assemelha a um maço de algodão (Fig.3.5 c). Na figura 3.6 pode-se observar os três tipos de meios de cultura após o processo de diluição.

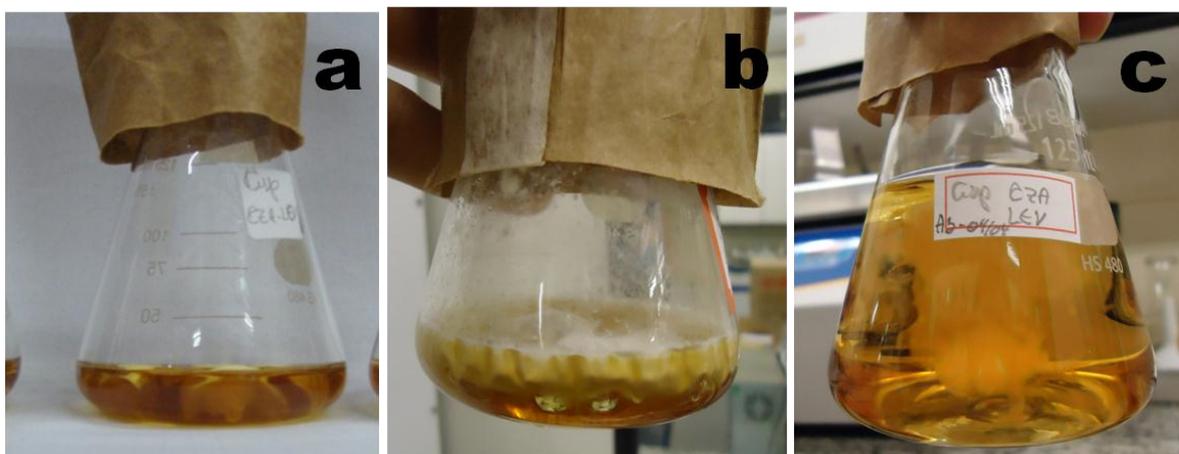


FIGURA 3.5 - Frascos de Erlenmeyer contendo o meio CZA-Lev e o fungo *Aspergillus aculeatus* em diferente tempos: a) primeiro dia após a inoculação, início do crescimento das hifas; b) segundo dia após a inoculação, crescimento das hifas por todo meio, principalmente na superfície; c) quarto dia após a inoculação, diluição do meio.

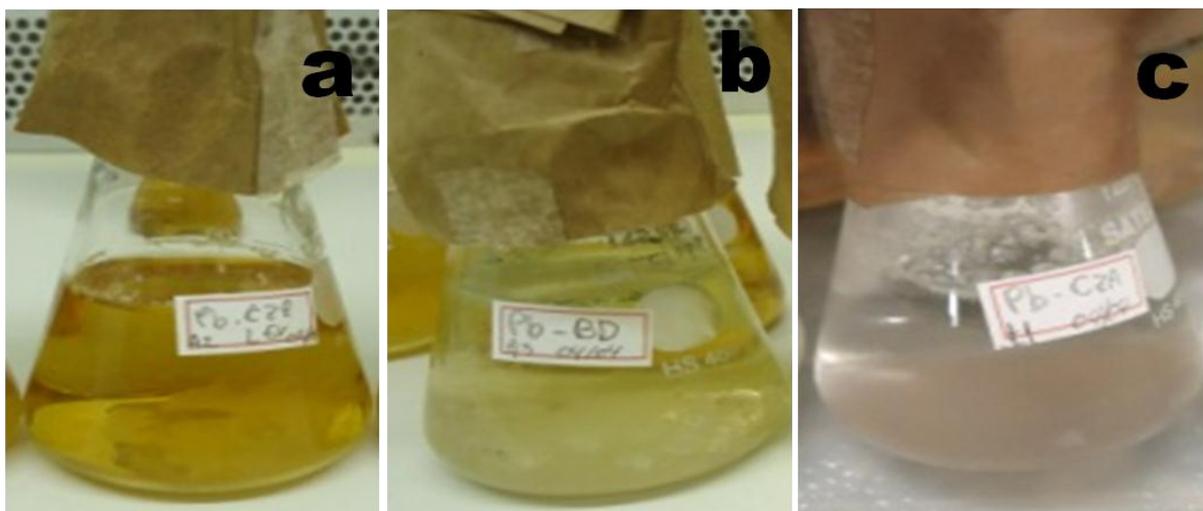


FIGURA 3.6 - Frascos de Erlenmeyer contendo o fungo *Penicilium brasiliense* em diferentes meios: a) meio CZA-Lev; b) meio BD; c) meio CZA.

3.3 - Preparo de microtubos de ouro pelo efeito *biotemplate* de fungos filamentosos.

Em um espaço de tempo de quatro a seis dias após a inoculação, os meios de cultura com os esporos e uma massa micelial foram formados, de modo que esse emaranhado de hifas teve o líquido drenado, restando um volume de 5 a 10 mL de líquido e de massa micelial. A essa massa micelial foram adicionados 100 mL de coloide de ouro (Fig.3.7).

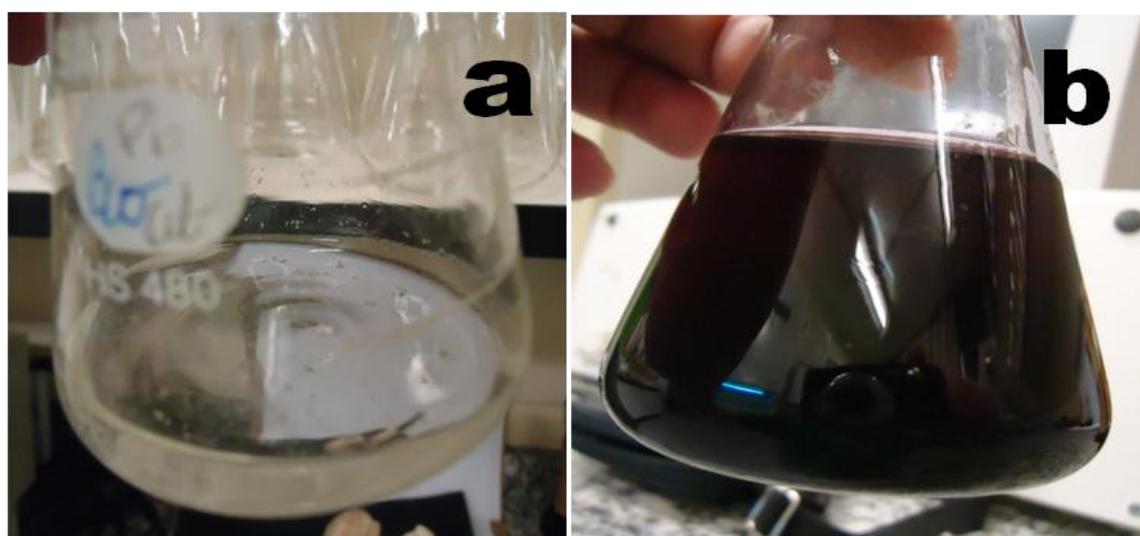


FIGURA 3.7 - Frascos de Erlenmeyer contendo o fungo *Penicilium brasiliense*: a) massa micelial com 8 mL de meio de cultura CZA; b) massa micelial e coloide de ouro totalizando 100 mL.

As nanopartículas contidas no meio aderiram à superfície das hifas, recobrando-a em inúmeras camadas, formando as estruturas de microtubos. Avaliou-se a influência das três espécies de fungos e dos meios de cultura sobre o tempo de adsorção das partículas, diâmetro do tubo, espessura da parede do tubo e comprimento dos fios (Fig.3.8). Neste experimento foram utilizados os fungos *Penicillium brasilianum*, *Aspergillus aculeatus* e *Xylaria sp*, crescidos nos meios de cultura CZApek, CZApek-lev e BD.

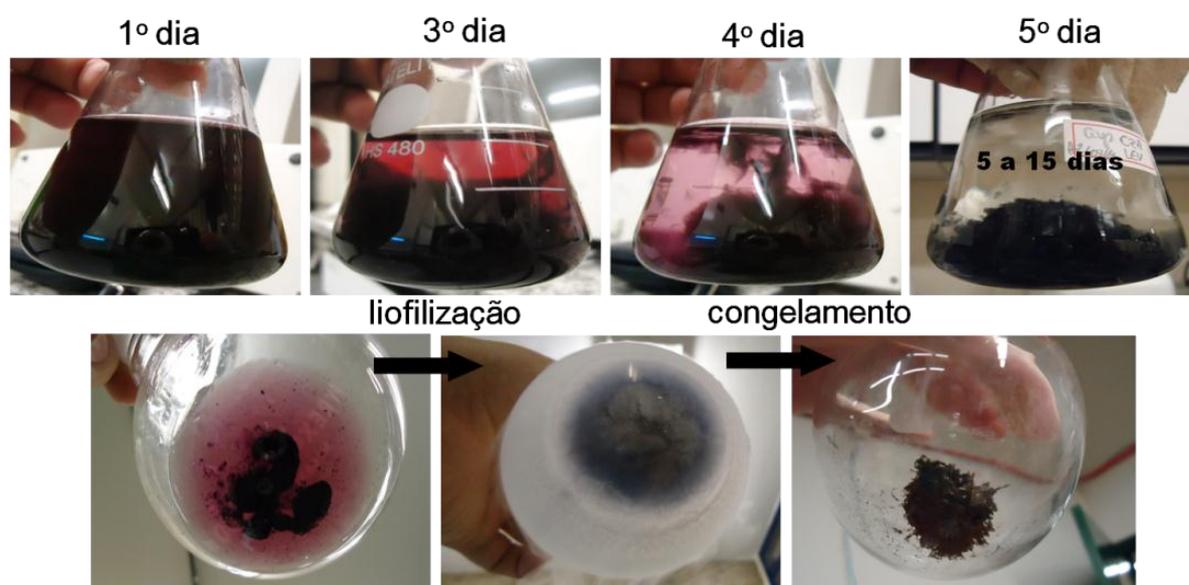


FIGURA 3.8 - Frascos de Erlenmeyer contendo o micélio de *Penicillium brasilianum* e nanopartículas de ouro, de maneira que ocorre a adsorção das nanopartículas na superfície dos fungos em 5 dias. Entretanto, para os demais fungos esse processo pode demorar de 5 a 15 dias.

3.4 - Controle da espessura da parede dos microtubos.

A espessura da parede depende da quantidade de nanopartículas adicionadas e da área superficial das hifas, entretanto, esse último é o único parâmetro que não pode ser controlado com mesmo rigor que se controla o tamanho e a concentração das nanopartículas de ouro. A adição de esporos não é padronizada, por isso, em cada frasco foram adicionadas quantidades distintas de esporos. Além disto, estruturas biológicas não possuem uniformidade na taxa de crescimento. Diante desse desafio, desenvolveu-se um procedimento que possibilitou o controle da espessura da parede do microtubo. Este procedimento

consiste em adicionar uma nova dispersão coloidal de ouro à massa micelar a cada cinco dias. Após esse período de cinco dias a dispersão coloidal apresentou uma diminuição da intensidade da coloração vermelha. O líquido foi drenado até atingir 90% do volume, restando apenas um pequeno volume contendo as hifas. A esse pequeno volume foi adicionado mais coloide de ouro recém-preparado. Esse processo foi repetido inúmeras vezes e a cada adição eram retiradas pequenas porções de hifas que foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, com o intuito de medir a espessura da parede do microtubo. Neste experimento, utilizou-se o fungo *Penicilium brasilianum* e o fungo *Aspergillus aculeatus* crescidos em meio CZApek e recobertos por multicamadas de nanopartículas de ouro (Fig. 4.10).

3.5 - Inativação do fungo com exposição à radiação.

As amostras foram expostas a 2, 4, 6, 8 e 10 kGy em um Irradiador Multipropósito de Cobalto-60; classificação: compacto, categoria IV da IAEA; atividade atual: ~ 130 kCi (4,81 PBq); taxa de dose: entre 1 e 12 kGy/h. A radiação absorvida foi estimada pelo sistema dosimétrico tipo PMMA da Harwell (modelos Red, Amber e Gammachrome). Gray (Gy) é a unidade do Sistema Internacional de Medidas que representa a quantidade de energia de radiação ionizante absorvida (ou dose) por unidade de massa, na qual: $1 \text{ Gy} = 1 \text{ m}^2 \text{ s}^{-2} = 1 \text{ J kg}^{-1}$ (1 megaeletronvolt = $1.60217646 \times 10^{-13}$ joules).

À esquerda da figura 3.9 ilustra-se o cobalto emitindo radiação gama, absorvida pelas hifas dos fungos acondicionados em frasco de Erlemmeyer. Os frascos foram posicionados paralelamente em linha, como mostrados à direita da figura 3.9. A exposição à radiação inicia-se depois do fechamento da câmara e depois da elevação das varetas de aço inox recheadas de Co^{60} do fundo da piscina até o anteparo que está posicionado entre as duas fileiras de frascos.

As amostras irradiadas com doses de 2, 4, 6 e 10 kGy foram analisadas por MEV para verificar se houve danos estruturais na superfície das hifas. As amostras submetidas à radiação de 8 kGy foram utilizadas na reprodução do experimento descrito no subitem 3.4. Nesse novo procedimento avaliou-se a formação de camadas sucessivas de partículas na superfície da hifa, utilizando o fungo inativado como *biotemplate* com intuito de obter um baixo desvio padrão na espessura da parede do microtubo. Nesse experimento, utilizou-se o fungo *Penicilium brasilianum* e o fungo *Aspergillus aculeatus* crescidos em meio CZApek e recobertos por multicamadas de nanopartículas de ouro.

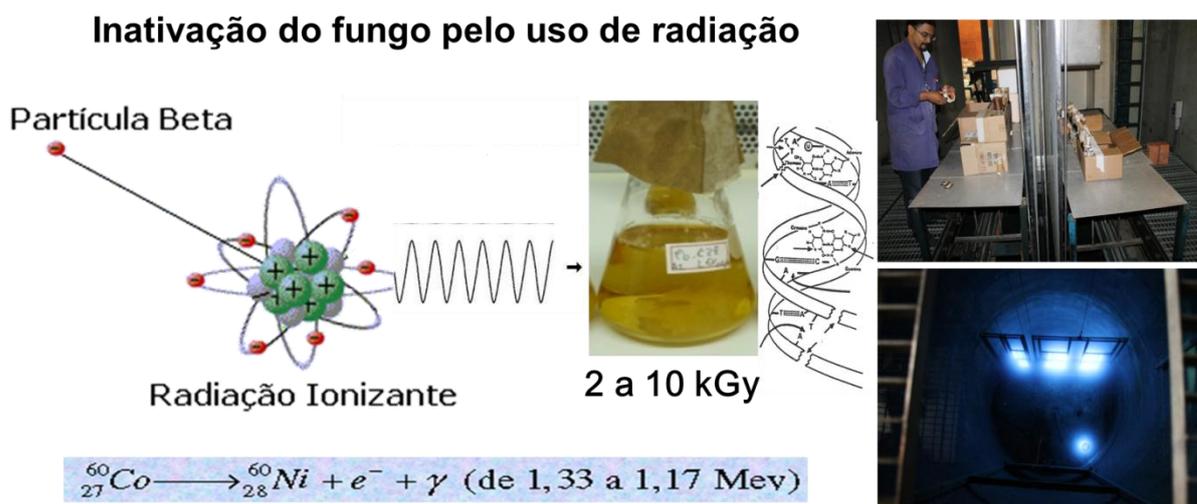


FIGURA 3.9 - Esquema ilustrativo da inativação do fungo pela radiação, no qual o Erlemmeyer contendo hifas dispersas é exposto a diferentes doses de radiação. Imagens da câmara de radiação e da piscina onde estão as varetas de aço inox rechedas de Co^{60} .

3.6 - Influência dos metabólitos no *self-assembly* de nanopartículas metálicas.

Um experimento foi preparado com placas de silício suspensas por um fio em contato com um sistema que continha nanopartículas de ouro e hifas de fungo há cinco dias. Este experimento teve o intuito de reforçar a hipótese de que a presença de biomoléculas produzidas pelos fungos é a responsável pela formação de camadas sucessivas através do efeito indutor de *self-assembly* de nanopartículas. Para o teste branco, placas de silício foram colocadas em uma

dispersão coloidal com a mesma concentração. Após cinco dias, as placas foram retiradas e caracterizadas por MEV.

3.7 - Preparo de amostra para espectroscopia SERS utilizando microtubos de ouro.

O fungo *Cladosporium sphaerospermum*, crescido em meio CZApek, recoberto por multicamadas de nanopartículas de ouro e de prata, foi escolhido para os testes com espectroscopia SERS, porque foi o primeiro material híbrido obtido. Inicialmente, os microfios de ouro foram adicionados em uma cuba contendo um litro de água destilada. Em seguida, o substrato de silício foi mergulhado nesta cuba e posicionado logo abaixo dos fios de ouro que já estavam na cuba (Fig. 3.10). O substrato de silício foi levantado lentamente com uma pinça, de modo que os fios de ouro ficassem espalhados sobre a superfície do substrato de silício.

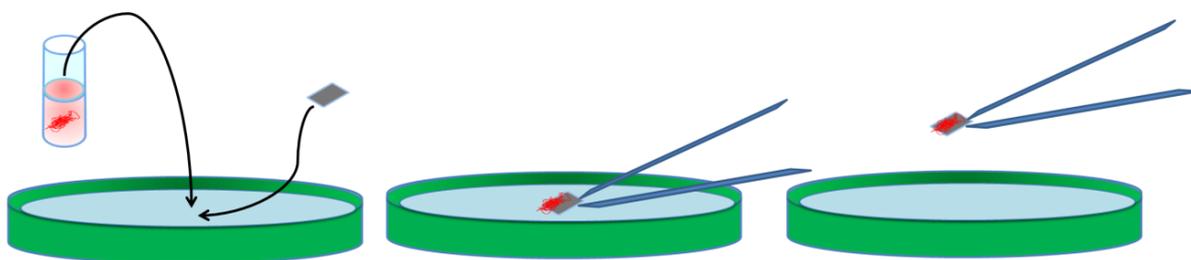


FIGURA 3.10 - Ilustração do preparo de uma amostra com a deposição dos fios de ouro na superfície do substrato de silício.

A amostra foi secada à temperatura ambiente e protegida da poeira ou outras impurezas que pudessem contaminar a sua superfície. Esse procedimento permitiu um recobrimento homogêneo da superfície do substrato e evitou a aglomeração dos fios de ouro.

3.8 - Tratamento térmico dos microtubos de ouro, eliminação do material orgânico e medidas elétricas.

As hifas do fungo *Penicilium brasilianum*, crescidas em meio CZApek, recobertas por multicamadas de nanopartículas de ouro, foram

escolhidas para os testes do tratamento térmico a fim de eliminar o material orgânico presente nos microtubos (fungo + metabólitos) porque havia maior número de amostras disponíveis. Esse procedimento poderia ser realizado com qualquer amostra liofilizada. Os microtubos tiveram o líquido drenado, a massa micelial congelada, liofilizada e submetida ao aquecimento em forno tubular EDG-FT-HI, às temperaturas de 300, 350 e 400°C, sob fluxo de oxigênio por 2 horas e com uma taxa de aquecimento e resfriamento de 5°Cmin⁻¹(Fig. 3.11).

Construiu-se um dispositivo elétrico de medida com microtubos de ouro obtidos pelo efeito *biotemplate* de fungo *Penicilium brasilianum*, crescido em meio CZApek sobre uma superfície de silício oxidada (camada de SiO₂ de 500 nm). Os eletrodos metálicos (Au / Ni, de 100 nm, com separação de 1 mm) foram micro fabricados usando um sistema de revestimento Eduards-306. As medições de transporte foram realizadas em diferentes temperaturas, usando um de ciclo fechado de hélio criostato Janis, CCS 350, sob uma pressão menor do que 5 x 10⁻⁶ Torr.

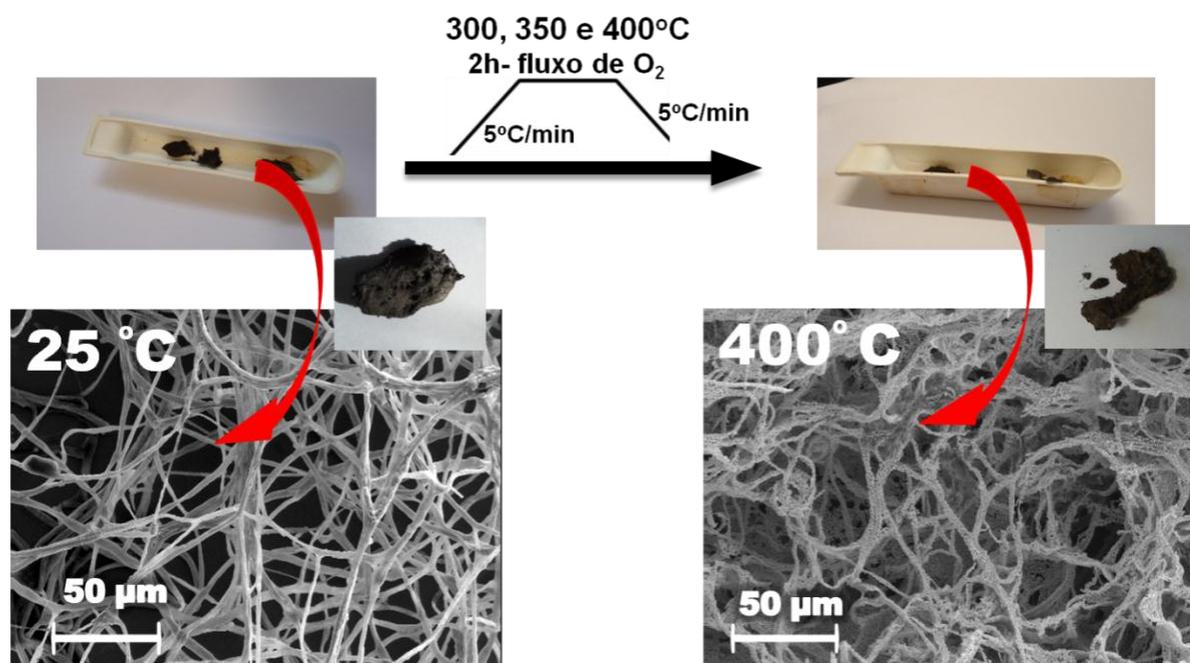


FIGURA 3.11 - Ilustração dos passos para se obter os microtubos de ouro isentos de material orgânico, preparados com o fungo *Penicilium brasilianum*. Imagens de MEV dos microtubos queimados a 400°C em fluxo de oxigênio, mostrando alta homogeneidade morfológica do material.

3.9 - Caracterização.

3.9.1 - Difração de raios-X (DRX).

As nanopartículas (NP) de prata e de ouro foram caracterizadas por difração de raios X, em um difratômetro Rigaku, modelo DMax 2500PC, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), operando com voltagem de 40 kV, corrente de 40 mA, fenda divergente 1,0 mm, fenda de coleta 0,2 mm, velocidade de varredura de $0,2^\circ\text{min}^{-1}$ em 2θ e acumulação para leitura a cada 0,02 segundos, operando na faixa de 2θ de 20 à 110 graus. As amostras das NP foram depositadas sobre o substrato de silício gota à gota, a partir da solução aquosa, com posterior evaporação do solvente.

3.9.2 - Espectroscopia UV-Vis.

Os espectros de UV-Vis das NP de ouro e prata foram obtidos a partir das soluções aquosas, no espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu Multspec 1501), na região de 190 a 800 nm, em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico, utilizando-se água como branco.

3.9.3 - Microscopia eletrônica de transmissão.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão, modo baixa resolução, foram obtidas usando um FEG-VP Zeiss Supra 35 (“Field Emission Electron Guns”) (LIEC-UFSCar-SP-Brasil). As amostras foram preparadas com a adição de uma gota de coloide sobre as grades de cobre recobertas com filme fino de carbono.

3.9.4 - Microscopia eletrônica de varredura.

A morfologia do fungo foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. Para esse efeito, utilizou-se um microscópio Zeiss Supra 35VP com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-SEM), trabalhando a

10 kV. Para preparar as amostras, adicionou-se com uma micropipeta, uma gota da suspensão das NP sobre o substrato de silício e, por último, as amostras foram secadas em estufa a 40°C por 12 horas (Fig. 3.12). Este procedimento permitiu uma melhor visualização dos detalhes morfológicos do fungo.

Realizaram ainda análises de EDS (energy dispersive x-ray detector, EDX ou EDS) com mapeamento em 2D. Este acessório foi essencial no estudo de caracterização microscópica dos microfios compostos por elementos metálicos de ouro e de prata. Quando o feixe de elétrons incide sobre o material, os elétrons mais externos dos átomos constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida, que é emitida em comprimento de onda no espectro de raios X. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais os elementos químicos estão presentes naquele local e identificar a composição química na área observada. As imagens em 2D são construídas pela análise da energia liberada da emissão Si K_{α} , $\text{Ag L}_{\alpha 1}$ e Au M_{β} . Nas imagens, atribui-se falsas cores: o verde para o silício, o vermelho para o ouro e o amarelo para a prata.

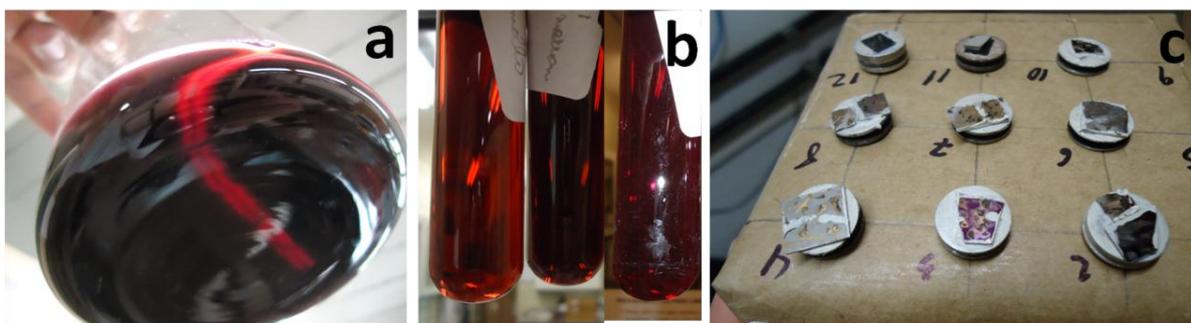


FIGURA 3.12 - Esquema ilustrativo do preparo de amostra para a análise de microscopia eletrônica de varredura: a) Coloide de nanopartículas de ouro com as hifas; b) Amostras contendo uma porção da hifas; c) Hifas dos fungos depositadas sobre substrato de silício.

3.9.5 - *Espectroscopia SERS.*

Os microtubos de ouro foram depositados sobre o substrato de silício metálico e a atividade SERS acerca deles foi estudada mergulhando-as em uma solução de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ benzotiol durante 3 minutos. Uma área da superfície foi selecionada para obter os espectros de SERS da molécula de benzotiol. Analisou-se as amostras com um micro-Raman Renishaw InVia, com laser de 633 nm e com potência de $245 \mu\text{W}$. As medidas foram realizadas em geometria *backscattering*, usando um aumento de 50 vezes no microscópio ótico com área de $2 \mu\text{m}^2$.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Devido à complexidade das estruturas, experimentos e ensaios biológicos, a preparação de materiais nanoestruturados na forma de microtubos, utilizando fungos micelares como *biotemplates*, só pôde ser obtida a partir de um esforço de colaboração. Além do esforço necessário para a execução dos experimentos, este projeto encontrou outras dificuldades, como por exemplo, a ausência de informações sobre o processo de deposição das nanopartículas na superfície das hifas. A contribuição científica desse trabalho está no preparo de estruturas microestruturadas em menor tempo com o controle da forma e espessura da parede dos microtubos e principalmente pelo estudo sobre a formação deste material.

Este trabalho teve como foco o aperfeiçoamento do procedimento de obtenção das estruturas tridimensionais a partir da deposição e organização de nanopartículas coloidais em superfícies de hifas dos fungos *Penicillium brasilianum*, *Aspergillus aculeatus* e *Xylaria sp.* Inicialmente, os experimentos visavam à obtenção das estruturas com reprodutibilidade, menor tempo, controle de diâmetro do tubo e diâmetro de parede do tubo. Entretanto, novos questionamentos foram sendo colocados, como por exemplo, quais seriam os mecanismos envolvidos na formação de multicamadas de partículas sobre a superfície das hifas.

Depois de muitos experimentos e reflexões, foi proposta a hipótese de que as estruturas tridimensionais resultam do acoplamento de biomoléculas produzidas pelo fungo com as nanopartículas de ouro e de prata, que se desestabilizam e se depositam sobre a superfície das hifas, formando múltiplas camadas que resultam em estruturas microtubulares. Realizou-se também os testes de aplicação em espectroscopia SERS, medidas elétricas e a eliminação do material orgânico que são necessárias para aplicação do material para construção de eletrodos sensores. Os resultados estão dispostos em itens e na ordem cronológica da evolução do trabalho.

4.1- Preparo das dispersões coloidais de ouro e de prata.

As dispersões coloidais de ouro e de prata foram preparadas utilizando o método do citrato. O sal de citrato foi utilizado como agente redutor e estabilizante. Depois de adicionado o sal de citrato de sódio na solução que continha os íons de $[\text{AuCl}_4]^{-1}$ à 95°C , os átomos de ouro reduzidos iniciaram a aglomeração e formação das primeiras nanopartículas. Nesse instante, a solução adquiriu uma coloração violeta que, com o passar do tempo, tornou-se vermelha intensa. A coloração vermelha é característica do coloide de ouro. O espectro de UV-vis da Figura 4.1, com o máximo de absorção em 530 nm, a posição e a forma da banda indica partículas de cerca de 20 nm⁶⁴ em boa concordância com a imagem de MET, na qual são observadas nanopartículas com diâmetro médio de 25 nm de estreita distribuição de tamanho (Fig.4.1). Os picos de difração foram medidos quanto à posição angular (2θ) e intensidade, os dados foram comparados com padrão de difração do banco de dados PDF e todos os picos de difração coincidiram com a ficha PDF 04-0784, que corresponde ao ouro metálico com estrutura cúbica de face centrada.

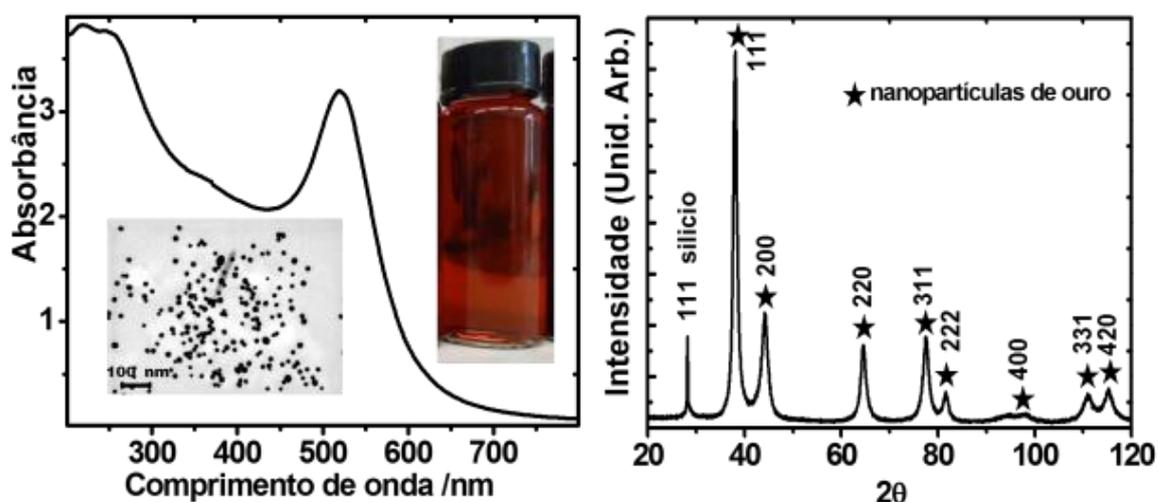


FIGURA 4.1 - Espectro de UV-vis com máximo de absorção em 530 nm das nanopartículas de ouro sintetizadas a pH 3,4 e 95°C . A coloração do coloide e a banda plasmon indicam a presença de nanopartículas. Imagem de MET apresenta nanopartículas com tamanho médio de 25 nm. A difração de raios X das partículas indica estrutura cúbica de face centrada.

Se comparada com a reação de formação das nanopartículas de ouro, a reação de síntese e formação das nanopartículas de prata difere no tamanho, na homogeneidade e no tempo de reação das partículas formadas, provavelmente, isto está associado a fatores cinéticos, como o mecanismo de reação, mas ainda pode estar relacionado com o potencial de redução, pois mesmo fora das condições padrão o potencial de redução da prata que o de ouro, respectivamente 0,800V e 1,001 V. Comparando os potenciais dos sais de ouro e prata, pode-se dizer que o sal de ouro é mais facilmente reduzido pelo íon citrato do que o sal de prata, contudo, lembrando que a reatividade também depende de outros parâmetros, como o mecanismo de reação e pH. Os diferentes potenciais de redução dos sais de ouro e de prata fazem com que a síntese das nanopartículas, sob as mesmas condições experimentais, apresente resultados distintos quanto ao tamanho médio e a homogeneidade de tamanho das partículas.

As primeiras alterações na coloração ocorreram cinco minutos após a adição de citrato de sódio na solução que continha os íons de Ag^+ a 95 °C. Nesse tempo, o coloide apresentou um tom amarelo claro que, com o passar do tempo, tornou-se amarelo âmbar intenso, tonalidade característica de nanopartículas de prata. O espectro de UV-Vis e a imagem da dispersão coloidal de prata retirados do aquecimento em um tempo de 10 minutos apresentaram banda plasmon centrada a 430 nm (Fig.4.2). A imagem de MEV e a difração de raios X na mesma figura mostram partículas com diâmetro médio de 40 nm. Os picos de difração foram medidos quanto à posição angular (2θ) e intensidade, os dados foram comparados com padrão de difração do banco de dados PDF e todos os picos de difração coincidiram com a ficha PDF 04-0783, que corresponde a prata metálica com estrutura cúbica de face centrada

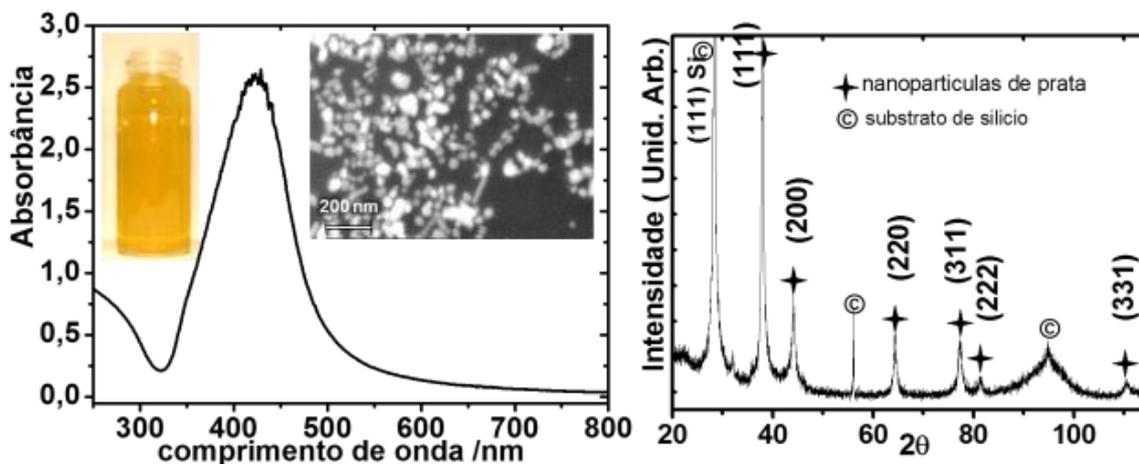


FIGURA 4.2 - Espectro de UV-vis com máximo de absorção em 420 nm das nanopartículas de prata sintetizadas a pH 8,2 e 95°C. A coloração do coloide e a banda *plasmon* indicam a presença de nanopartículas de prata. Imagem de MEV mostra nanopartículas com tamanho médio de 40nm. A difração de raios X das partículas indica estrutura cúbica de face centrada.

4.2- Preparo dos microtubos de ouro pelo efeito *biotemplate* de fungos filamentosos.

O preparo das estruturas tubulares iniciou-se com a ativação dos esporos, em placas de agar, dos fungos *Penicillium brasilianum*, *Aspergillus aculeatus* e *Xylaria sp* descritos no item 3.3. Os fungos foram crescidos para que esporulassem e seus esporos fossem recolhidos e utilizados na inoculação de meios de cultura para obtenção das estruturas que serviriam de *biotemplates* na preparação de microtubos metálicos. Esse procedimento é padrão e tem como objetivo assegurar que a cepa não esteja contaminada com bactérias ou outras espécies de fungos. Os novos esporos produzidos pelo fungo foram dispersos em água e adicionados em frascos Erlenmeyer contendo 25 mL de meio de cultura, sendo que utilizaram-se os meios de cultura BD, o Czapek (CzA) puro e CzA com extrato de levedura. Esses três meios são muito utilizados no crescimento de fungos para mais diferentes finalidades. Após quarenta e oito horas da adição dos esporos, os mesmos germinaram e as hifas cresceram na solução e na superfície do meio de cultura. As hifas cresceram por meio do alongamento das suas extremidades, o que propiciou a formação de estruturas que serviram de *biotemplate* no preparo dos microtubos. Após dois dias, uma etapa de remoção

das hifas superficiais e da diluição do meio de cultura foi realizada com o objetivo de que as hifas crescessem somente dentro da solução e formassem estruturas não agregadas, de modo que as nanopartículas pudessem recobrir toda a parede da hifa. Após o período de crescimento (2 a 5 dias), as hifas foram isoladas do meio de cultura por simples drenagem, separando a massa micelial do meio de cultura. A essa massa micelial foram adicionados 100 mL de dispersão coloidal de ouro para gerar os micro fios de ouro ou dispersão coloidal de prata para gerar os micro fios de prata. Neste instante, as partículas metálicas começaram a aderir sobre a superfície das hifas, formando um material macroscópico de cor escura no fundo do frasco de Erlenmeyer.

As imagens da figura 4.3 mostram a suspensão coloidal perdendo tonalidade depois de cinco dias da adição do coloide na massa micelial do fungo *Penicillium brasilianum*. A partir dessas imagens, é possível observar claramente a diminuição da intensidade da cor vermelha da suspensão de ouro e a formação do material híbrido, facilmente visualizado a olho nu e que pôde ser separado do meio aquoso, reduzindo a concentração do líquido.

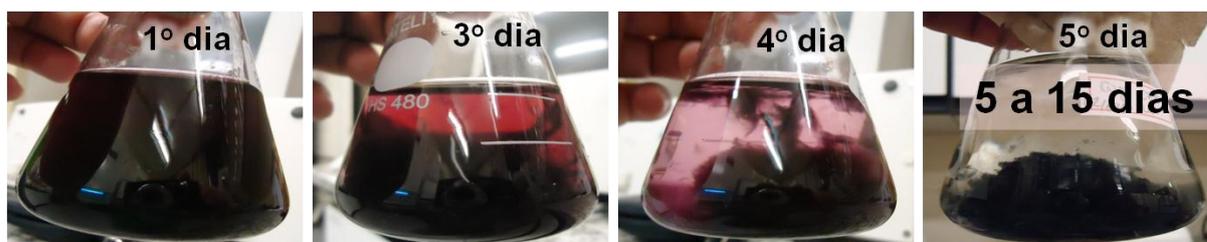


FIGURA 4.3 - Frascos de Erlenmeyer contendo o micélio de *Penicillium brasilianum* e nanopartículas de ouro, nos quais ocorre a adsorção das nanopartículas na superfície dos fungos em 5 dias. Entretanto, para os demais fungos esse processo pode demorar de 5 a 15 dias.

A metodologia desenvolvida neste estudo e empregada na obtenção dos microtubos reduziu significativamente o tempo de obtenção do material se comparado com a metodologia de Bigall *et al*¹⁴, já que as hifas foram inicialmente formadas em um meio de cultura rico em nutrientes e somente depois as nanopartículas foram adicionadas (tabela 3.2). A metodologia utilizada

mostrou a possibilidade de obter os microtubos de ouro de 10 a 22 dias. O tempo depende da espécie de fungo e do meio de cultura utilizado. Na figura 4.4, apresenta-se o gráfico em barras, o tempo de preparo do material híbrido, com ilustração das três etapas de obtenção deste material. Estas etapas consistem em: crescimento das hifas, adsorção das partículas à parede, congelamento e liofilização. O menor tempo de adsorção da nanopartícula na superfície da hifa, cinco dias, foi conseguido utilizando o *Penicillium brasilianum* e o maior tempo, quinze dias, utilizando o *Aspergillus aculeatus*. O tempo de adsorção foi diferente para cada espécie, o que já era esperado, pois fungos de famílias diferentes possuem metabolismos diferentes e, conseqüentemente, produção de diferentes metabólitos que afetam a adsorção das nanopartículas e a formação de múltiplas camadas. Ainda assim, o método desenvolvido permitiu a obtenção dos materiais em um tempo 75% menor se o compararmos com o método descrito por Bigall *et al.*¹⁴, no qual o tempo de preparo do material foi de 90 dias, tempo nove vezes maior que o obtido por nós (Fig. 4.4). Isso ocorre porque no método empregado por Bigall *et al.*¹⁴ os esporos foram adicionados diretamente no coloide de ouro e as hifas cresceram em um ambiente pobre em nutrientes (3,0 mmol L⁻¹ de citrato de sódio). Além do menor tempo de obtenção dos materiais, o que também chama a atenção em nosso trabalho é a homogeneidade das estruturas obtidas, como a forma e o diâmetro dos microtubos.

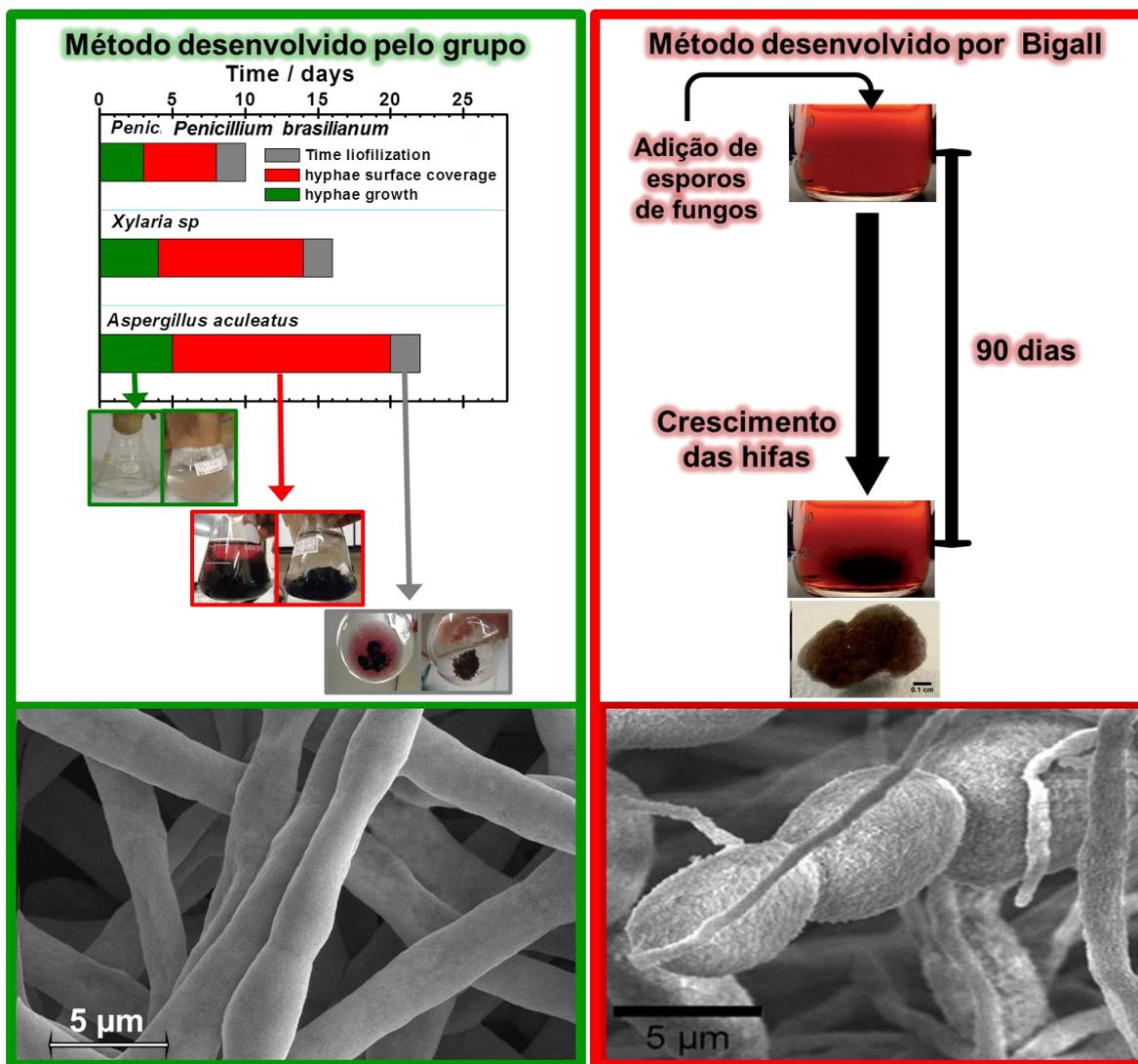


FIGURA 4.4 – Ilustração do tempo de preparo do material híbrido. A imagem esquerda em verde mostra tempos de 10 a 22 dias. A imagem a direita ilustra do método descrito por Bigall *et al*¹⁴ nos quais o tempo de preparo do material é de 90 dias.

A figura 4.5 apresenta nove imagens de MEV do material híbrido obtido pelo efeito *biotemplate* com o fungo *Penicillium brasilianum* que foi exposto ao coloide de ouro por um período de sessenta dias, como descrito no item 3.4. É possível ver detalhes da morfologia dos microtubos de ouro com homogeneidade de forma e com a parede do fungo recoberta de nanopartículas de ouro. Nas duas últimas imagens na base da figura, as nanopartículas de ouro de 25 nm são facilmente observadas na superfície do fungo.

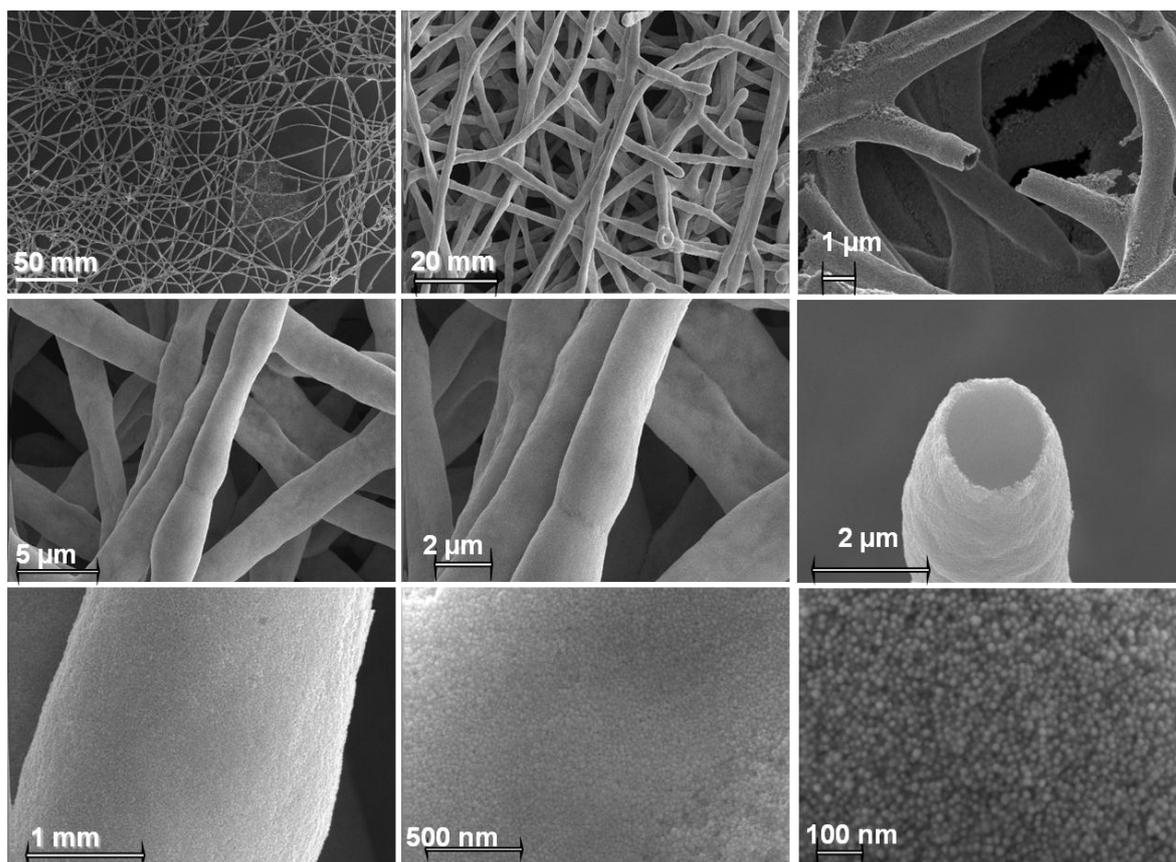


FIGURA 4. 5 - Imagem de MEV com diferentes magnificações da superfície dos microtubos depositados em substrato de silício (fungo *Penicillium brasilianum* + nanopartículas de ouro) com partículas de 25 nm sobre a superfície da hifa.

A utilização do fungo como *biotemplate* para a construção de microtubos metálicos é bastante abrangente, uma vez que foi possível construir estruturas pela adsorção de nanopartículas de ouro e de prata com diferentes tamanhos, tais como as apresentadas nas seis imagens das hifas do fungo *Aspergillus aculeatus*, recobertas por nanopartículas de prata com tamanho médio de 40nm (Fig.4.6). Curiosamente, é possível observar como dois tubos perpendiculares estão ligados formando uma teia de microtubos. Esta ramificação das hifas é o resultado da formação de septos na parede celular, que dão origem a outra hifa que cresce formando um longo filamento. É possível ver ainda como as nanopartículas de prata são espalhadas sobre a superfície do fungo, sem fendas, formando uma superfície uniforme sobre a parede celular das hifas. Convenientemente, esta estrutura possui uma aparente rigidez e

sustentação suficiente para ser manipulada com uma pinça de laboratório simples, sem danos mecânicos visíveis.

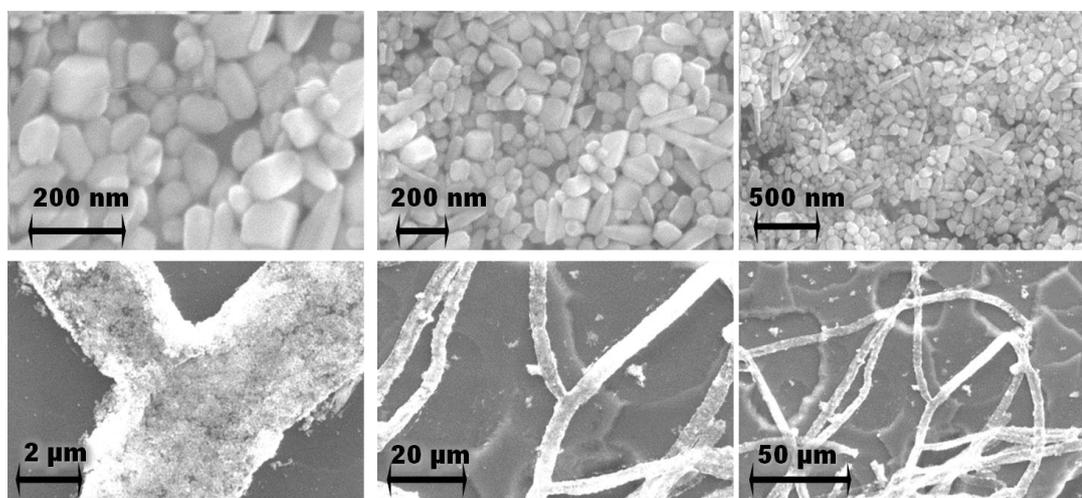


FIGURA 4.6 - Imagem de MEV com diferentes magnificações da superfície dos microtubos compostos de fungo *Aspergillus aculeatus* + nanopartículas de prata de 40 nm, depositados em substrato de silício.

Ademais, nas figuras 4.7 e 4.8 observa-se os mapas de composição química obtido por EDS. As imagens em 2D são construídas analisando a energia liberada da emissão Si K_{α} , $\text{Ag L}_{\alpha 1}$ e Au M_{β} , indicando a distribuição destes elementos sobre a área demarcada na micrografia. É possível observar claramente o traçado dos microfios de ouro em destaque na cor vermelha, o substrato de silício na cor verde e os microfios de prata na cor amarela. A análise do elemento silício, presente no substrato, permitiu obter as imagens com contraste do substrato e dos microtubos metálicos.

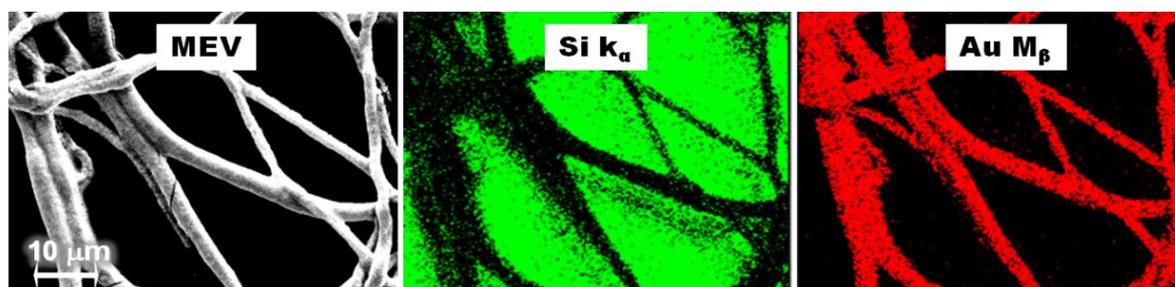


FIGURA 4.7 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS dos elementos Si K_{α} e Au M_{β} em falsa cor do material híbrido composto pelo fungo *Penicillium brasilianum* + nanopartículas de ouro, formando os microtubos depositados em substrato de silício.

A observação detalhada do mapeamento químico do silício indica a presença de zonas claras e escuras. As regiões verdes são regiões onde o feixe de elétrons incidu diretamente sobre o substrato, já as regiões escuras onde o feixe incidu sobre o material híbrido fungo + nanopartículas. Pode-se observar que as tonalidades das regiões escuras são distintas, o que indica diferentes densidades do material. Com base nestes resultados, é possível verificar uma distribuição não uniforme do elemento de ouro e de prata sobre a superfície do fungo ao longo da região analisada, levando à hipótese de que as hifas não formaram uma parede de espessura uniforme sobre todo o *biotemplate*. Este tema é abordado mais detalhadamente no tópico 4.3 deste trabalho.

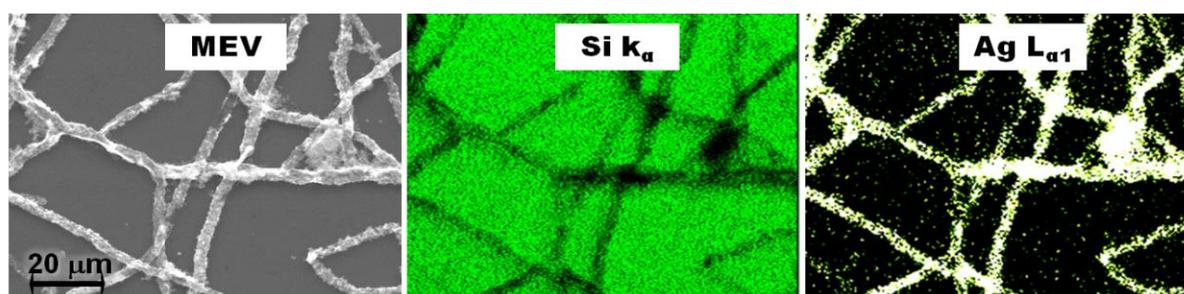


FIGURA 4.8 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS dos elementos Si K_{α} e Ag $L_{\alpha 1}$ em falsa cor do material híbrido composto pelo fungo *Aspergillus aculeatus* + nanopartículas de prata, formando os microtubos depositados em substrato de silício.

Esse alto grau de organização em escala nanométrica mostra a eficácia do *biotemplate* utilizado, fundamental para fabricação de dispositivos em escala nanométrica de alta eficiência e precisão, com potencial de aplicação nos campos da biomedicina, biologia molecular, bioquímica e catálise^{65,66,67}, além de ser um promissor candidato à espectroscopia SERS.

Como pode ser observado nas figuras 4.5 e 4.6, a primeira camada de nanopartículas de ouro na superfície do fungo é formada por efeito hidrofóbico⁶⁸ e pelas fortes ligações covalentes entre o metal e as funções hidroxila, amidas, aminas, carboxila, tiol de proteínas e polissacarídeos na parede celular⁶⁹. Normalmente, *self-assembly* molecular é caracterizado por ligações não covalentes, como ligações iônicas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals ou interações hidrofóbicas⁷⁰.

No entanto, curiosamente, as partículas de ouro continuaram formando camadas subsequentes, porque as nanopartículas metálicas coloidais sofreram desestabilização da dupla camada elétrica, causada por biomoléculas produzidas pelos fungos. Estes resultados nos levaram a propor a hipótese de que a formação das camadas subsequentes é o resultado do efeito *self-assembly* de nanopartículas induzidas por biomoléculas secretadas pelos fungos. Este tópico será tratado no subitem 4.5 desta tese.

Outro fator importante na preparação dos materiais híbridos é, sem dúvida, a padronização dos resultados obtidos, como a efetiva reprodutibilidade dos resultados, sendo que a obtenção de sistemas nanoestruturados com diâmetro do tubo controlado é importante para futuras aplicações. Seguindo esse princípio, os estudos foram direcionados à construção de experimentos que permitiram o controle do diâmetro do tubo, combinando a espécie de fungo e o meio de cultivo utilizado.

Desta forma, os microtubos preparados que apresentaram diâmetro entre 2 e 3 μm foram obtidos com estreita distribuição e comprimento que excede a 2 cm (Fig. 4.9 (Para mais detalhes ver figura A1 em anexos). É importante ressaltar que o diâmetro médio das hifas foi distinto para cada combinação de fungo e de meio de cultura. Isso ressalta mais uma vez que fungos de famílias diferentes possuem metabolismos distintos para cada meio de cultura e, conseqüentemente, afetam a formação e o crescimento das hifas que determinam a forma final dos microtubos (ver item 4.5). Ainda assim, o resultado individual de cada combinação de fungo e meio de cultura implicou em valores com estreita distribuição de diâmetro médio de tubo quando comparados com os resultados apresentados por Bigall *et al*¹⁴.

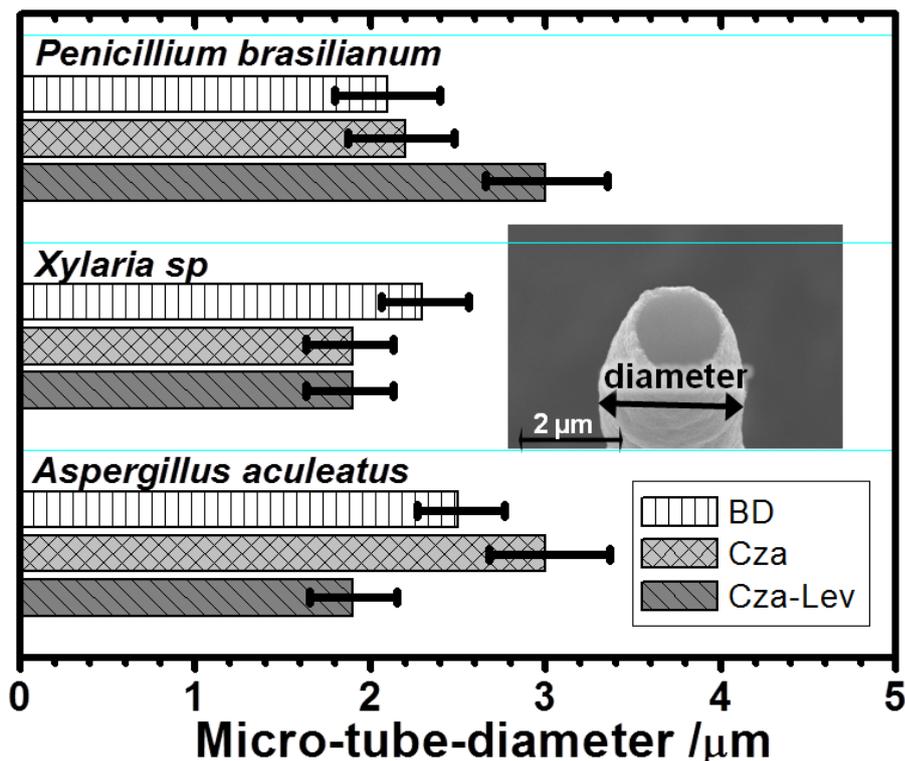


FIGURA 4.9 - Gráfico em barras do diâmetro dos microtubos de ouro. Dados obtidos a partir de imagens de MEV da figura A1 anexo, com tempo de exposição mostrado na figura 4.4.

4.3 - Controle da espessura da parede dos microtubos.

A espessura da parede depende exclusivamente da quantidade de nanopartículas adicionadas e da área superficial das hifas, entretanto, esse último é o único parâmetro que não pode ser controlado com mesmo rigor que se controla o tamanho e a concentração das nanopartículas de ouro. Isto se dá por que a adição de esporos não é padronizada, já que em cada frasco foram adicionadas quantidades distintas de esporos. Além disso, estruturas biológicas não possuem uma taxa de crescimento uniforme. Diante desse desafio, desenvolveu-se um procedimento que possibilitou o controle da espessura da parede do microtubo. O experimento consistiu em adicionar uma nova dispersão coloidal de ouro à massa micelar a cada cinco dias. Após esse período, a solução apresentou uma diminuição da intensidade da coloração vermelha, resultado da migração das nanopartículas em solução e adsorção sobre a superfície das hifas. Com o intuito de manter uma concentração das nanopartículas suficiente para o aumento constante da espessura da camada de NP na superfície, foram retirados

90% do volume da solução, restando apenas um pequeno volume contendo as hifas, no qual foram adicionados mais coloides de ouro recém preparados. Esse processo foi repetido inúmeras vezes e a cada adição eram retiradas pequenas porções de hifas, analisadas por microscopia eletrônica de varredura, para que a espessura da parede do microtubo fosse medida (Fig. 4.10).

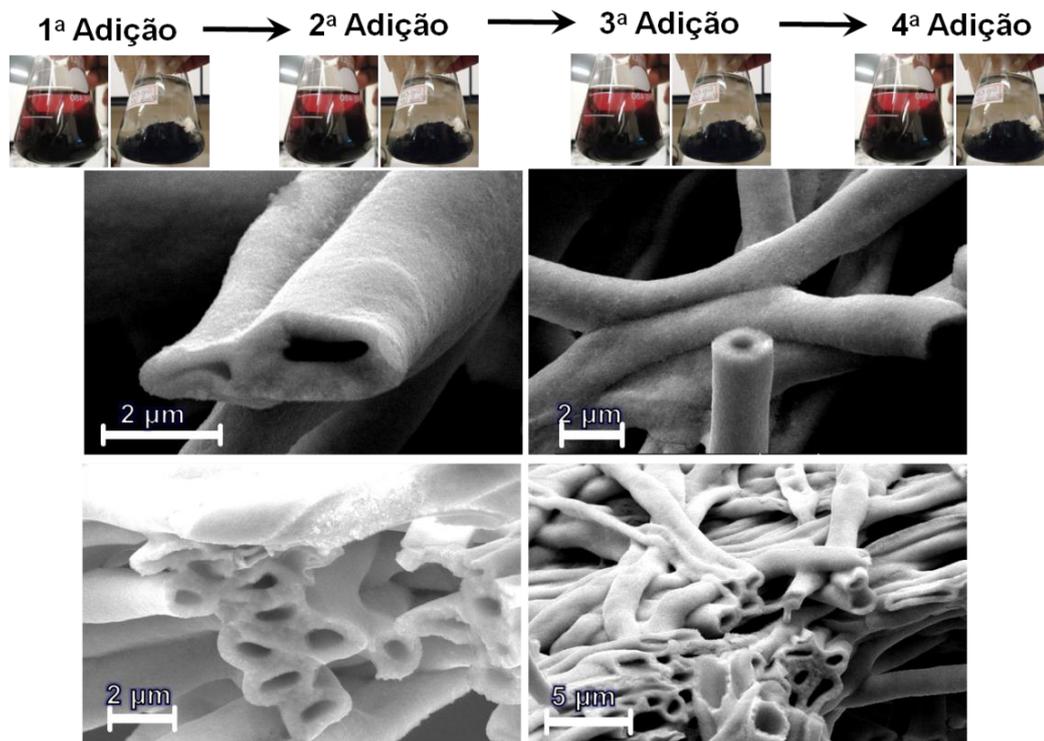


FIGURA 4.10 - Imagens de inúmeras drenagens e da adição de nanopartículas para obter microtubos com o controle da espessura da parede, composta de camadas de nanopartículas de ouro. Imagens de MEV das amostras de fungos *Penicillium brasilianum* depois de 110 dias no coloide com espessura de 500 nm.

Não é possível obter com facilidade as imagens de MEV da secção transversal dos microtubos constituídos pelo fungo *Penicillium brasilianum* e recobertos por nanopartículas de ouro, porque somente uma pequena fração das rupturas dos microtubos apresenta a secção na posição ideal para visualização. Entretanto, quando se consegue obter a imagem, como na figura 4.10, pode-se ver claramente a secção transversal do microtubo, o que permite a aferição da espessura de sua parede, já que a força que mantém as partículas unidas é suficientemente forte para formar uma estrutura de parede sólida que permite que o tubo seja seccionado. Deste modo, é possível ver as várias camadas de

partículas que formam uma parede de espessura que varia de 25 nm a 350 nm, em um intervalo de 6 a 65 dias, respectivamente (Fig. 4.11). Neste experimento, observou-se que a espessura da parede das amostras nas imagens “d” e “e” da Fig. 4.11, com tempo de recobrimento de 48 e 65 dias, respectivamente, apresentou uma alta variabilidade na espessura da parede ao analisar-se inúmeras hifas de uma mesma amostra. No gráfico na imagem 4.11-f não possui barras de erros porque essa observação só foi notada na análise das amostras do tempo 65 dias de exposição.

A alta variação da espessura da parede dos microtubos, preparados com fungo *Penicillium brasilianum* recoberto por nanopartículas de ouro, reforçou a hipótese de que as hifas continuavam crescendo depois da adição do coloide de ouro e não foi possível coletar muitas frações do micelio para análise. Diante disso, um novo experimento foi executado com o intuito de coletar dados mais precisos sobre a variação da espessura da parede do microtubo e, para isso, utilizou-se o fungo *Aspergillus aculeatus*, crescido em meio CZApek, porque esse fungo possui um crescimento mais lento e um tempo de adsorção de nanopartículas maior se comparado com o fungo *Penicillium brasilianum* (Fig. 4.4). Isso permite que o experimento seja conduzido com mais tempo para a análise. Durante o processo de repetidas adições de coloide de ouro à massa micelial, foi possível constatar visualmente o crescimento das hifas, pois a massa micelial aumentou de volume depois de alguns dias. Isto pode ser constatado na imagem do canto superior à direita da figura 4.12, na qual é possível visualizar as hifas escuras ao centro, recobertas por nanopartículas, e as hifas claras que cresceram ao entorno, sem nanopartículas na sua superfície. A imagem de MEV, no canto inferior à direita da figura 4.12, reforça nossa constatação, já que nesta imagem se destacam as hifas com quantidade inferior de nanopartículas de ouro em sua superfície, em comparação com as demais hifas ao entorno. Diante dessa observação inicial, as análises de MEV da secção transversal foram realizadas ao retirando amostras de cinco regiões diferentes da

massa micelial para cada tempo de exposição. Realizou-se este procedimento com o intuito de obter uma distribuição em torno da medida da espessura da parede do microtubo de ouro. Com o passar do tempo, há uma significativa diferença na evolução da espessura da parede dos fungos *Aspergillus aculeatus* e *Penicillium brasilianum* (Fig. 4.12 e 4.11), que está diretamente ligada à diferença de metabolismo dos dois microorganismos.

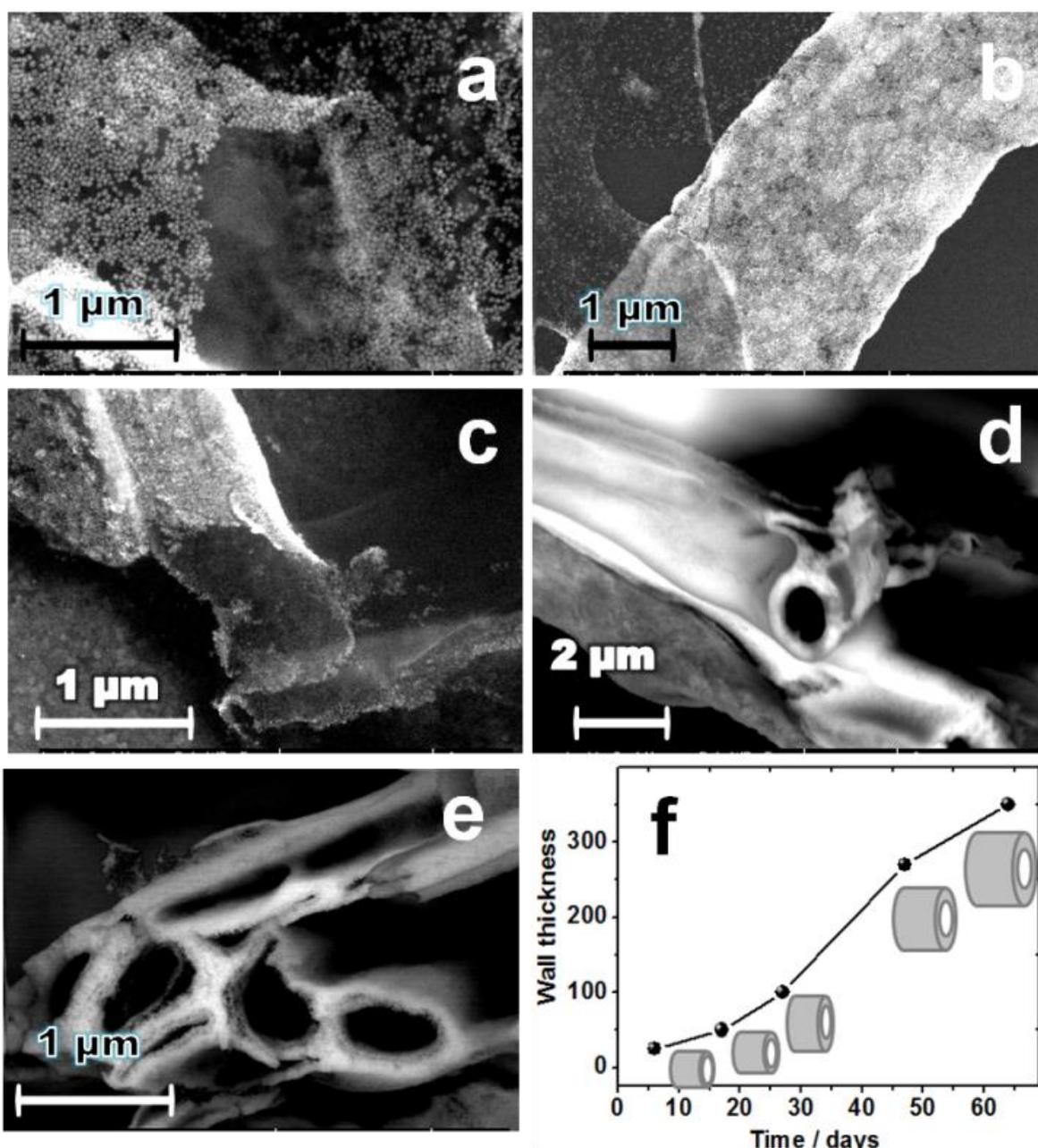


FIGURA 4.11 - Imagem de MEV da secção transversal dos microtubos constituídos pelo fungo *Penicillium brasilianum* e por nanopartículas de ouro. A espessura foi de 25 a 350 nm para um intervalo de 6 a 65 dias: a) 6 dias, b) 18 dias, c) 28 dias, d) 48 dias e e) 65 dias. Em f), gráfico da espessura da parede no tempo.

O gráfico de evolução da espessura da parede dos microtubos com o tempo de exposição ao coloide de ouro, utilizando o fungo *Aspergillus aculeatus*, foi obtido por uma série de imagens de MEV da secção transversal dos microtubos. A espessura da parede variou de 60 nm a 140 nm em um intervalo de 10 a 130 dias, respectivamente (Fig. 4.12).

A variação no valor da medida de espessura da parede foi maior para o tempo de exposição de 130 dias. Entretanto, observou-se que o desvio padrão aumenta progressivamente com o tempo de exposição das hifas ao coloide. Isso é decorrente do crescimento das hifas durante todo o período do processo de recobrimento, como mostra a imagem 4.12. Quando a hifa cresce, gera uma nova superfície que será recoberta por nanopartículas. Entretanto, a espessura da parede dessa nova superfície é menor que a espessura da superfície das hifas inicialmente formadas.

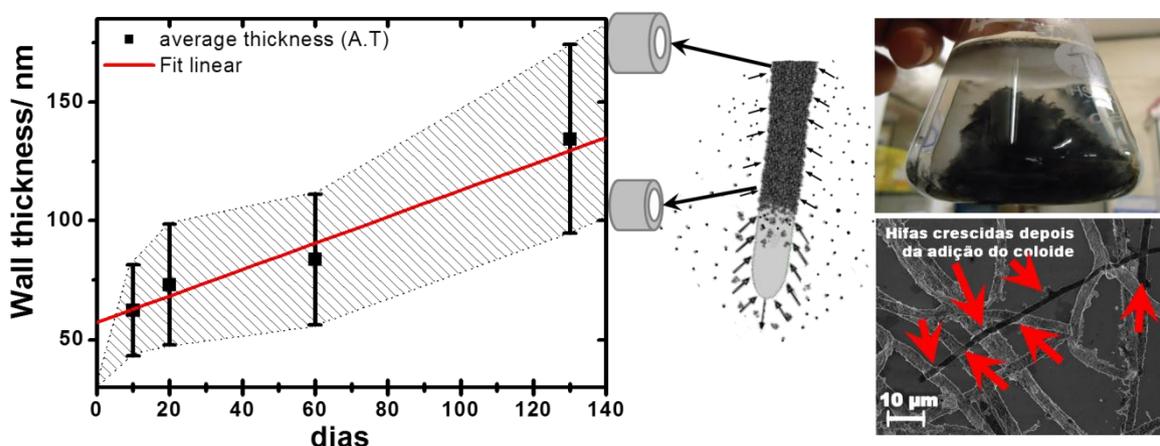


FIGURA 4.12 - Gráfico com o aumento da espessura da parede composta de multicamadas de nanopartículas de ouro sobre a superfície do fungo *Aspergillus aculeatus*, sendo que a espessura foi de 60 a 140 nm para um intervalo de 10 a 130 dias, respectivamente. Imagem das hifas que cresceram e imagem de MEV das hifas.

Para contornar esse problema, foi levantada a possibilidade de impedir o crescimento da hifa durante o período de recobrimento. Os métodos convencionais de esterilização por temperatura, adição de antibiótico e adição de metanol foram testados e descartados, já que todas estas metodologias poderiam alterar as condições do meio e influenciar na adsorção das nanopartículas na

superfície das hifas. A partir de um acordo firmado com o Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN, teve-se a oportunidade de inativar o fungo por irradiação, utilizando radiação gama.

4.4- Inativação do crescimento do fungo pela exposição à radiação.

Em comparação com tecnologias alternativas de esterilização de material biológico, como o óxido de etileno (EtO), a autoclavagem (vapor d'água) e a adição de antibióticos, e realizar o processo por radiação apresenta as seguintes grandes vantagens: é realizado à temperatura ambiente; provoca um aumento desprezível na temperatura do material em tratamento; não deixa resíduos, não libera agentes poluentes, os produtos podem ser processados em frascos e o principal benefício é que mantém as estruturas tridimensionais biológicas intactas.

A radiação gama emitida por rádioisótopos transfere sua energia através de interações com os elétrons das órbitas dos átomos que constituem o material. Essas interações provocam a excitação desses elétrons para níveis de energia superiores ou os arrancam de suas órbitas (ionização), com energia suficiente para interagirem com elétrons orbitais de outros átomos. Os produtos da ionização (íons, elétrons secundários, átomos e moléculas excitadas) são responsáveis pelos efeitos físicos, químicos e biológicos nos materiais irradiados, efeitos como a fragmentação de pedaços do DNA do fungo. Este processo acarreta à inativação de funções vitais do fungo, tais como a reprodução, crescimento e produção de metabólitos. Para que a inativação do fungo ocorra é necessário que o material absorva uma dose mínima de radiação, medidas em kGy. Essa energia mínima depende de uma série de fatores, como: dimensões do frasco de armazenamento, tipo de fungo, volume de massa micelial, entre outros. Neste contexto, a inativação do crescimento do fungo pela exposição a radiação foram realizados por testes preliminares para determinar a dose mínima de radiação para inativação das hifas dos fungos,

utilizando uma massa micelial, crescida por quatro dias em solução, na etapa após a diluição. Cada frasco de Erlenmeyer continha um volume de 100 mL. As amostras receberam cinco diferentes doses de radiação (Fig. 4.13). Nas doses que absorveram acima de 4 kGy, constatou-se que os fungos foram inativados, ou seja, não houve crescimento das hifas do fungo nas amostras irradiadas com intensidades maiores que 4kGy (Fig.4.13). Na dose de 2 kGy os fungos não foram inativados porque houve o aumento do volume do micélio e a formação de esporos duas semanas após receber a dose de radiação.

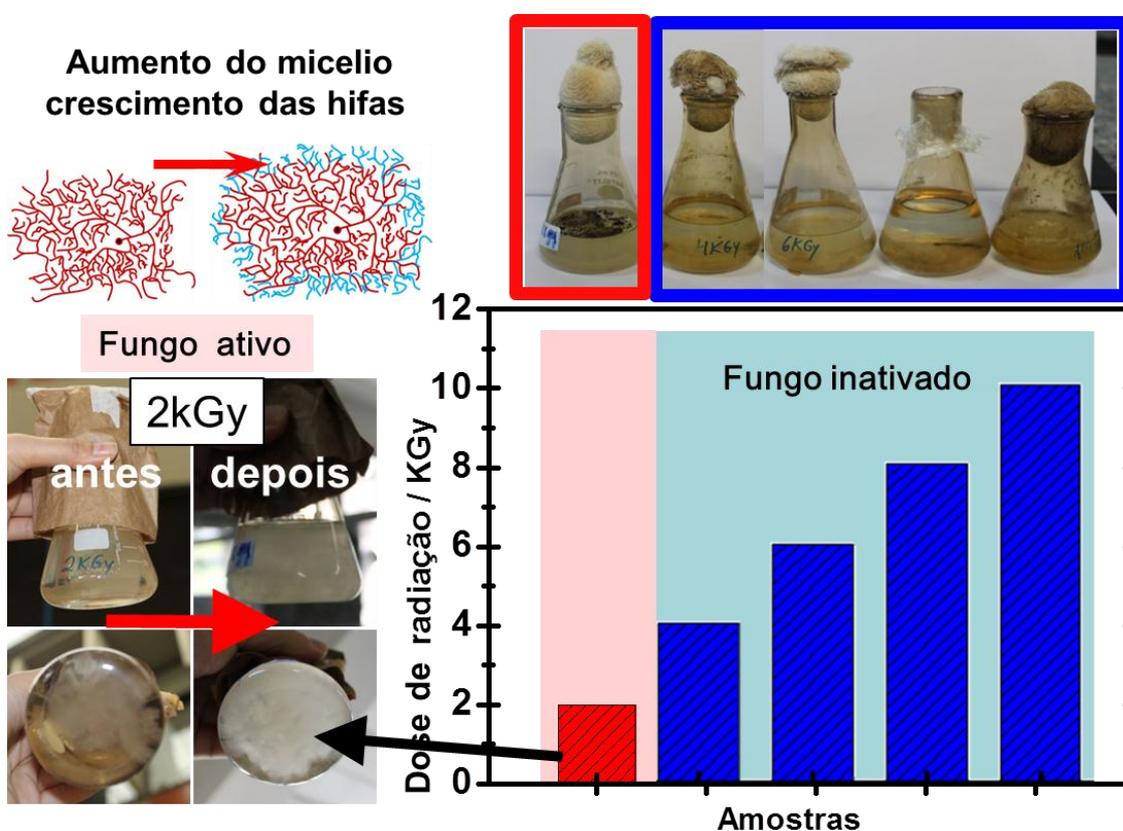


FIGURA 4.13 - Gráfico com 5 amostras que absorveram diferentes doses de radiação depois de duas semanas. Em azul, as amostras em que o fungo foi inativado e, em vermelho, as amostras com o fungo ativo. No fungo ativo as hifas cresceram após receberem uma dose de 2 kGy.

As doses utilizadas nesse teste preliminar são consideradas médias, uma faixa de dosagem em que a maioria do materiais não sofre danos estruturais, o que foi possível constatar pelas imagens das hifas das cinco amostras (Fig.4.14). Para garantir que os fungos seriam inativados, os experimentos de preparo de microtubos de ouro foram utilizados fungos inativados por radiação

gama de 8 kGy. O objetivo destes experimentos era obter microtubos com espessura de parede com baixo desvio padrão, de modo que a hifa não cresceria durante o processo de recobrimento de sua superfície.

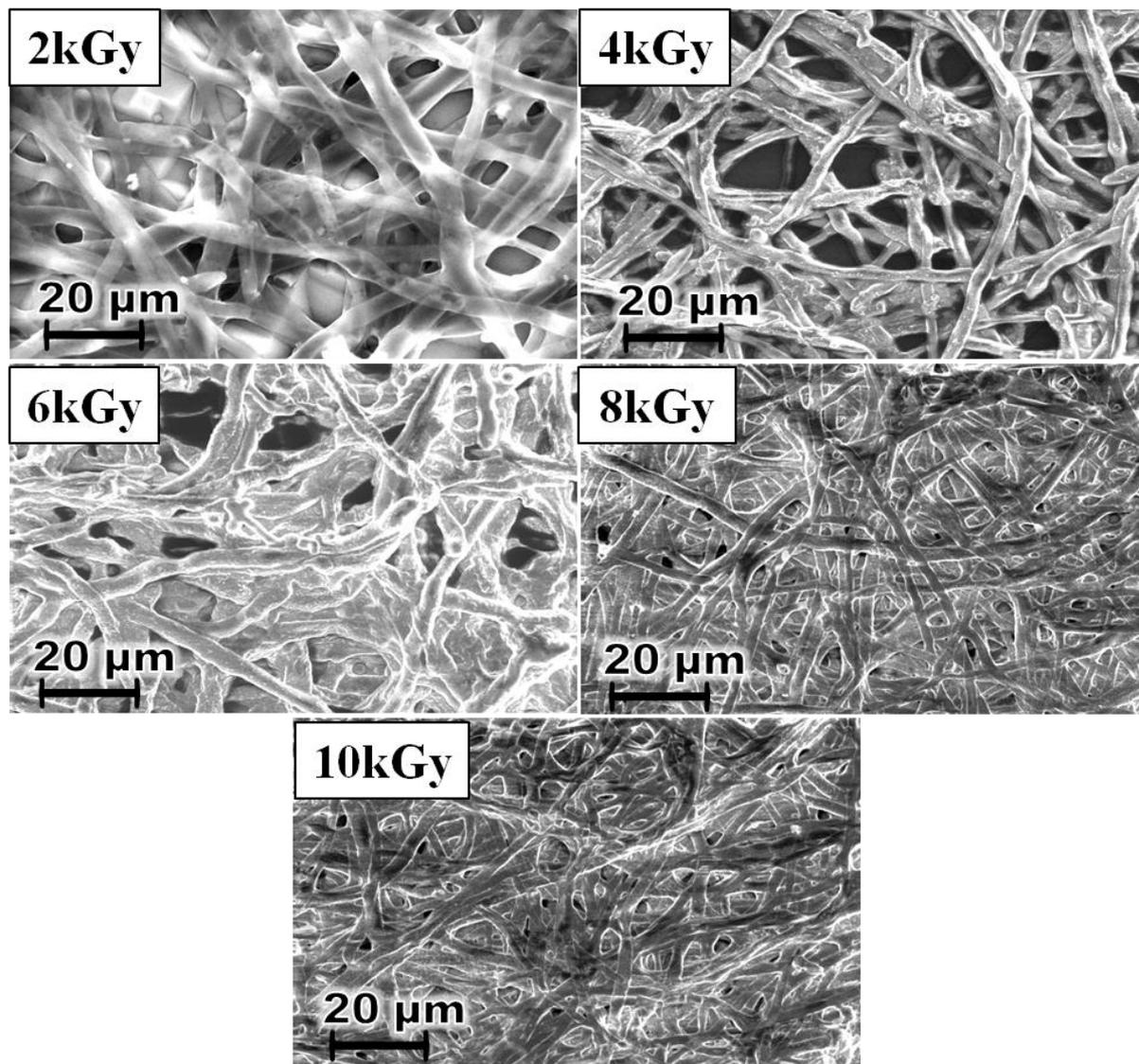


FIGURA 4.14 - Imagens de MEV do fungo *Penicillium brasiliense* exposto a diferentes doses de radiação. Não houve danos estruturais às hifas.

Entretanto, para nossa surpresa, o processo de adsorção das nanopartículas de ouro na superfície da hifa não prosseguiu para além da primeira adição do coloide de ouro. Na figura 4.15 a), pode-se constatar que a dispersão coloidal manteve a tonalidade vermelha rubra depois de 150 dias em contato com as hifas. A expectativa era de que esse coloide se tornasse

translúcido depois de 5 a 10 dias devido a adsorção das nanopartículas sobre as hifas. As imagens MEV da figura 4.15 a) e b) mostraram que as hifas dos fungos *Aspergillus aculeatus* e *Penicillium brasilianum*, inativados por radiação, estão recobertas por duas ou três camadas de nanopartículas, quantidade muito menor do que a observada nas hifas que não foram inativadas (Fig. 4.5).

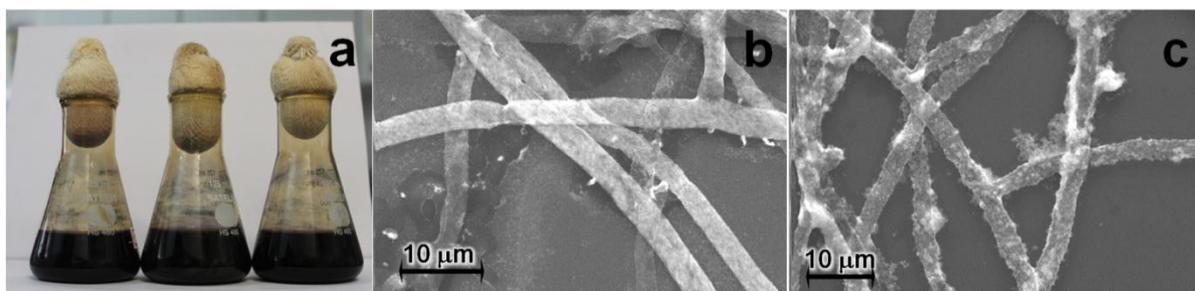


FIGURA 4.15- a) Imagens do sistema de hifas irradiadas com 8 kGy e do coloide de ouro depois de 150 dias; b) Imagens de MEV das hifas do fungo *Aspergillus aculeatus* recobertas por nanopartículas de ouro; c) Imagens de MEV das hifas do fungo *Penicillium brasilianum* recobertas por nanopartículas de ouro.

O experimento não atingiu o resultado esperado, que consistia na obtenção de um microtubo metálico com espessura de parede homogênea. Contudo, os resultados reforçaram a hipótese de que a adsorção das nanopartículas metálicas na superfície das hifas é resultado da desestabilização das nanopartículas pela presença dos metabólitos produzidos pelos fungos. Sendo assim, os esforços se dirigiram para a execução de experimentos que pudessem confirmar esta hipótese.

4.5- Influência dos metabólitos no *self-assembly* de nanopartículas metálicas.

A despeito do enorme potencial tecnológico destes materiais, ainda são poucos os trabalhos sobre a preparação de microtubos utilizando fungos como *biotemplate* e, dentre os trabalhos existentes, poucos discutem os mecanismos que controlam a cinética de recobrimento, responsáveis pela deposição das nanopartículas sobre a superfície dos fungos.

Normalmente, *self-assembly* molecular é caracterizado por ligações não covalentes, como as ligações iônicas, a ligação de hidrogênio, as forças de

van der Waals e as interações hidrofóbicas. A primeira camada de nanopartículas de ouro na superfície do fungo, como observado na imagem 4.16, é formada por efeito hidrofóbico⁴³ e pela formação de fortes ligações covalentes entre o metal e as funções tiol de proteínas e a interação eletrostáticas de amidas, carboxilas, hidroxilas e aminas dos polissacarídeos presentes na parede celular. No entanto, curiosamente, as partículas de ouro se depositam sobre a primeira camada de partículas, formando camadas sucessivas. Isso ocorre devido à desestabilização da dupla camada elétrica de nanopartículas, já que, por meio da presença de metabólitos produzidos pelos fungos, as partículas recobertas com moléculas orgânicas apresentam interações atrativas que resultam na sedimentação das mesmas (Fig. 4.16). Essa hipótese foi formulada através da observação de vários comportamentos que corroboram com a suposição de que as biomoléculas produzidas pelos fungos são responsáveis pelo efeito indutor de *self-assembly* de nanopartícula na formação de camadas sucessivas na superfície do fungo. Os comportamentos que corroboram com a suposição são:

- Cada espécie de fungo apresentou distintos tempos de adsorção das nanopartículas.
- A formação de camadas sucessivas de nanopartículas de ouro na parede do frasco de Erlemmeyer.
- No sistema de nanopartículas de “ouro+hifas”, a coloração da dispersão se tornou translúcida entre 5 e 20 dias. Entretanto, em um sistema com hifas pré tratadas com metanol, a tonalidade não se alterou por meses.
- Os fungos inativados por radiação apresentaram poucas camadas após meses de exposição às nanopartículas.

Reunindo todas essas informações, pode-se concluir que as três espécies de fungos possuem tempos de recobrimento distintos, já que o tipo e a quantidade de metabólitos produzidos em cada fungo são diferentes. As biomoléculas produzidas pelos fungos induzem também à deposição das nanopartículas na

superfície dos frascos que contém o sistema fungo+nanopartículas. Quando o metabolismo do fungo sofreu interferência com a adição de metanol, notou-se que o tempo de adsorção das nanopartículas foi maior, diferentemente do tempo das hifas que não tiveram a adição de metanol.

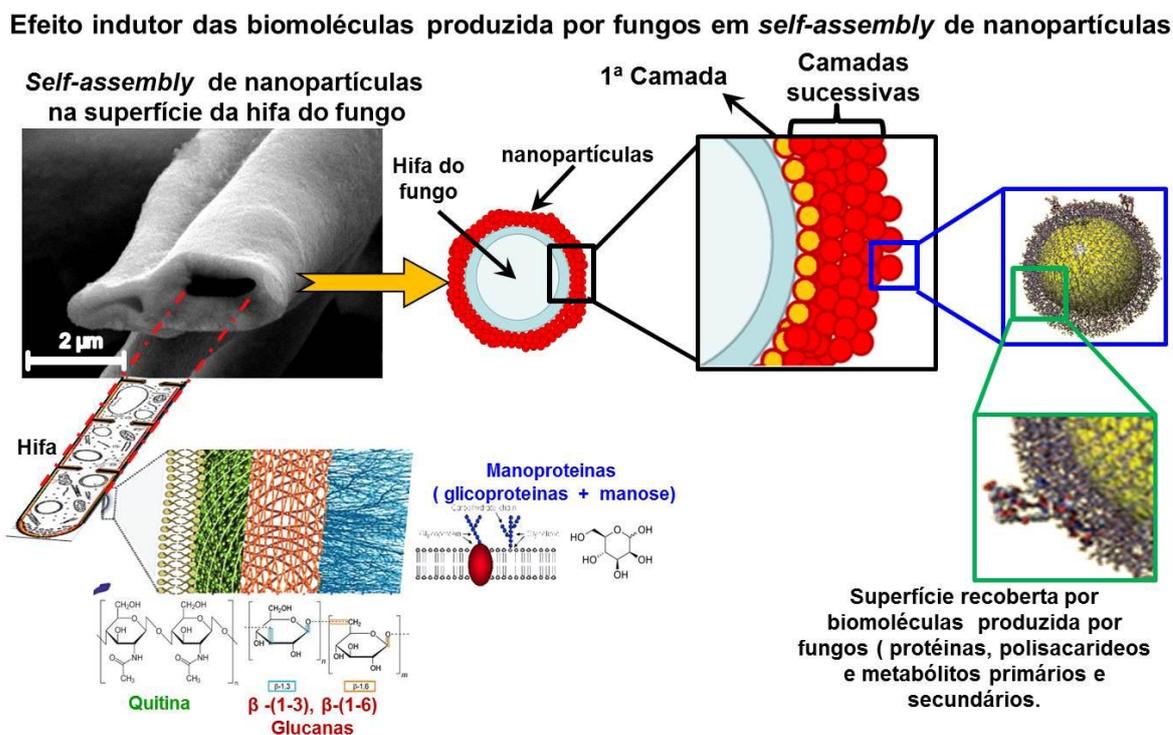


FIGURA 4.16 - Esquema ilustrativo da adsorção da primeira camada e das camadas sucessivas de nanopartículas de ouro sobre a superfície da hifa.

Nossa hipótese sobre o papel dos metabólitos ganhou mais força, pois quando foram preparados microtubos de ouro, os fungos inativados por radiação apresentaram formação de camadas delgadas e sucessivas, ou seja, poucas camadas em meses de exposição às nanopartículas. A inativação do fungo utilizando metanol e radiação gama foi executada com intuito de obter maior homogeneidade da espessura da parede dos microtubos, mas também forneceu mais indícios a respeito do mecanismo de formação de múltiplas camadas de partículas que são influenciadas pela presença de biomoléculas que induzem o efeito *self-assembly* das nanopartículas.

Diante de todos esses indícios, preparou-se um experimento que acabou confirmando a hipótese de que a presença de biomoléculas produzidas

pelos fungos são as responsáveis pela formação de camadas sucessivas. O experimento consistiu em colocar placas de silício, suspensas por um fio, em contato com um sistema contendo nanopartículas de ouro e hifas do fungo por cinco dias, (Fig.4.17 (mais detalhes figura A2 em anexos)). Para o teste branco, placas de silício foram colocadas em uma dispersão coloidal com a mesma concentração, como discutido no item 3.6 da secção experimental. O experimento indicou que os metabólitos produzidos pelos fungos atuam diretamente sobre as nanopartículas na suspensão coloidal, provocando sua deposição sobre as superfícies disponíveis, sejam biológicas ou inorgânicas.

No sistema placas+nanopartículas+fungo ocorreu a adsorção das nanopartículas em camadas sucessivas tanto na superfície do fungo, como na superfície da placa de silício. Isto se deu porque a formação de camadas sucessivas é o resultado da desestabilização da dupla camada elétrica das nanopartículas pelos metabólitos que envolvem as mesmas e atuam como uma espécie de cimento que impede que as partículas se desprendam facilmente das multicamadas.

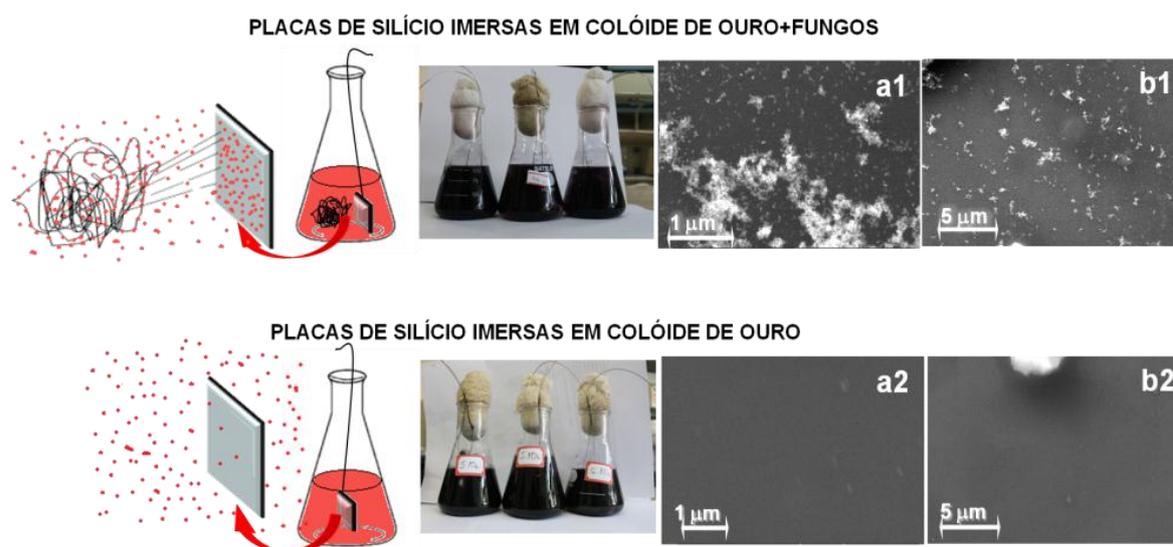


FIGURA 4.17 - Esquema ilustrativo da adsorção de nanopartículas de ouro sobre a superfície do silício, influenciada pelos metabólitos produzidos pelo fungo. Imagens de MEV de placas de silício mergulhadas em solução por 20 dias; a1-b1) Placas de silício mergulhadas na solução contendo NPs de ouro + fungo *Aspergillus aculeatus*; a2-b2) Placas de silício mergulhadas em um coloide de NPs de ouro.

Mesmo que as nanopartículas estejam depositadas de modo desorganizado sobre a superfície do substrato de silício, é possível notar a diferença entre as placas dos dois sistemas (Fig.4.17). Fica evidente a interferência dos metabólitos na estabilização das nanopartículas e sua formação de camadas sucessivas que permite a obtenção de microtubos com o controle da espessura da parede (Fig.4.11 e 4.12).

É preciso ressaltar que não se trata de uma simples precipitação de nanopartículas, uma vez que a superfície do frasco e as placas de silício foram mantidas na vertical. Os metabólitos aderem em todas as superfícies (do substrato de silício e da nanopartícula), por interação eletrostática e ligação de hidrogênio. Devido às funções orgânicas presentes na matriz complexa chamada de metabólito, formam-se camadas sucessivas de partículas estáveis o suficiente para manipulação.

4.6- SERS utilizando microtubos de ouro e de prata.

A espectroscopia Raman tem sido explorada para várias aplicações biomédicas⁷¹. No entanto, a magnitude de Raman é inerentemente fraca. Ao longo dos anos, uma grande variedade de alvos moleculares tem sido investigada por espectroscopia Raman de superfície realçada (SERS), usando nanopartículas de metais nobres, principalmente nanopartículas de ouro⁷². As moléculas analisadas sobre essas partículas tem seu sinal aumentado até milhões de vezes. A origem do fenômeno ainda não é completamente compreendida, mas uma das considerações importantes para a formação de um SERS é a rugosidade da superfície. As Figuras 4.18- a) e 4.19-a) mostra claramente que a superfície dos fungos está coberta com nanopartículas de ouro e prata, respectivamente, oferecendo as características morfológicas necessárias de um substrato SERS.

Para avaliar o potencial dos micro tubos metálicos na utilização como sensor ou biossensor através de espectroscopia SERS, pequenas quantidades de tiofenol foram utilizadas como moléculas de sonda⁷³. Comparando o espectro de Raman do benzotiol com o espectro da Figura 4.18 foi possível mostrar que os picos em 1575 e 420 cm^{-1} são semelhantes aos observados por Carron⁷⁴, indicando forte interação do benzotiol com a superfície das nanopartículas de ouro.

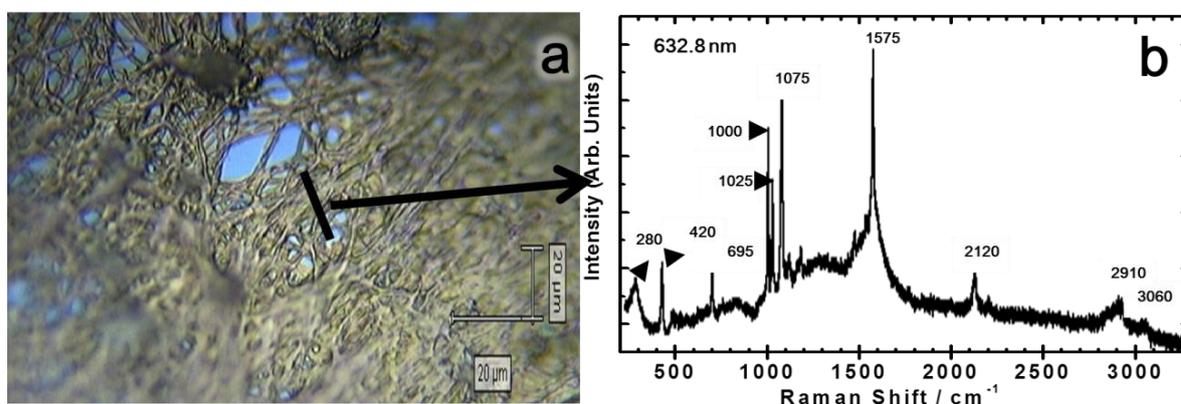


FIGURA 4.18 - Espectro de Raman da molécula de benzotiol sobre os microtubos de ouro em 632,8 nm, preparados utilizando fungo *Cladosporium sphaerospermum* como *biotemplate*: a) imagem do microscópio óptico indicando a área de análise ; b) SERS do benzotiol com os microtubos de ouro.

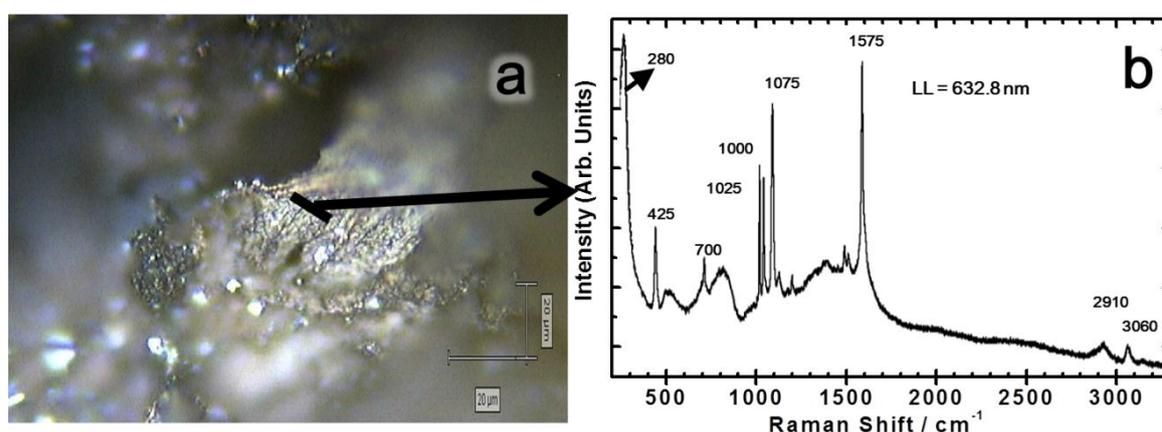


FIGURA 4.19 - Espectro de Raman da molécula de benzotiol sobre os microtubos de prata em 632,8 nm, preparados utilizando fungo *Cladosporium sphaerospermum* como *biotemplate*: a) imagem do microscópio óptico indicando a área de análise ; b) SERS do benzotiol com os microtubos de prata.

Os resultados preliminares mostram que os microtúbulos de ouro apresentaram boa intensificação do sinal SERS e o aumento do sinal está

próximo àqueles relatados na literatura que utilizam somente nanopartículas de ouro e de prata⁷⁵. A maior vantagem na utilização dos microtubos é a presença de uma matriz na forma de gel que envolve as nanopartículas compostas de biomoléculas produzida pelos fungos que facilitam a adsorção de moléculas orgânicas hidrofílicas. Testes ainda serão realizados para confirmar essa observação.

4.7- Tratamento térmico dos microtubos de ouro e eliminação do material orgânico.

Outra importante propriedade dos materiais híbridos que abrirá um leque de aplicação é a possibilidade de eliminação do material orgânico (corpo do fungo+metabólitos) com a manutenção das estruturas tridimensionais. Para investigar a eliminação do material orgânico (fungo+metabólitos) e a estabilidade térmica da estrutura tridimensional do material constituído de hifas recobertas de nanopartículas de ouro, foram realizados tratamentos térmicos das amostras nas temperaturas de 300, 350 e 400° C durante 2h, sob o fluxo de oxigênio. O material resultante foi analisado por MEV e CHN.

Os resultados da análise elementar de C, H e N mostraram que os microtubos de ouro secos por liofilização, constituídos de nanopartículas de ouro+hifa do fungo *Penicillium brallisianum*, possuem 20% em massa de carbono. O aumento da temperatura do tratamento térmico acarretou em uma maior perda de carbono, que foi acompanhada pela coalescência das partículas presentes na superfície da hifa. No tratamento térmico em 400°C, os microtubos apresentaram 0,4 % de carbono, ou seja, foram eliminados 98% da massa de carbono inicial. Nessa temperatura não foi mais possível visualizar partículas, pois todas coalesceram, formando uma superfície mais densa (Fig. 4.19 mais detalhe figura A3 anexos). Embora os tubos apresentem uma morfologia típica de metal derretido, o aspecto geral de microtubo foi preservado. É notável que os poros formam uma superfície irregular com uma área superficial

relativamente alta e com elevado potencial de atividade catalítica. Naturalmente, a área de superfície específica diminuiu após o tratamento térmico, mas a estrutura formada revela características interessantes, como por exemplo, um formato macroscópico que se assemelha a uma esponja com aparente resistência mecânica a manipulação.

Evolução da coalescência com o aumento da temperatura

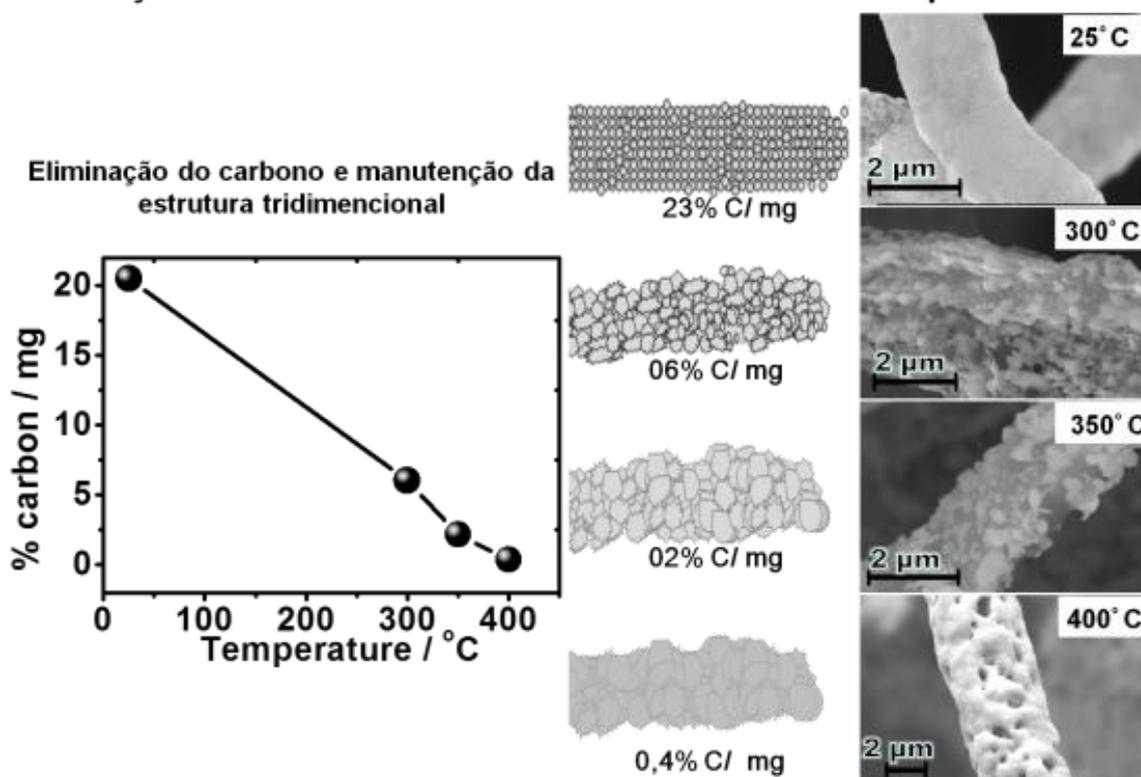


FIGURA 4.20 - Gráfico com os resultados do CHN das amostras com diferentes temperaturas, acompanhado da ilustração e da imagem de MEV da coalescência das nanopartículas de ouro na superfície do fungo, sob o efeito da temperatura do tratamento térmico.

Sabe-se que pequenas partículas têm uma temperatura de fusão menor do que a do elemento na forma de bulk, isso é uma consequência da energia livre de superfície da partícula⁷⁶. As imagens de MEV da figura 4.20, mostraram alterações substanciais na morfologia da superfície, se comparada ao material híbrido original antes do tratamento térmico. Em vez de uma camada uniforme de nanopartículas de ouro bem caracterizada, é possível observar uma superfície rugosa de fios consolidados em substituição dos microtubos originais.

O material híbrido composto por nanopartículas de ouro adsorvidas na superfície das hifas do fungo *Penicillium brallisianum* possui um comportamento semicondutor durante o aumento da temperatura de 298 até 550 K. Esse comportamento pode ser associado à progressiva coalescência das nanopartículas através da eliminação dos compostos orgânicos (fungo+metabólitos), que protege as nanopartículas de se tocarem e permite que elas iniciem a coalescência

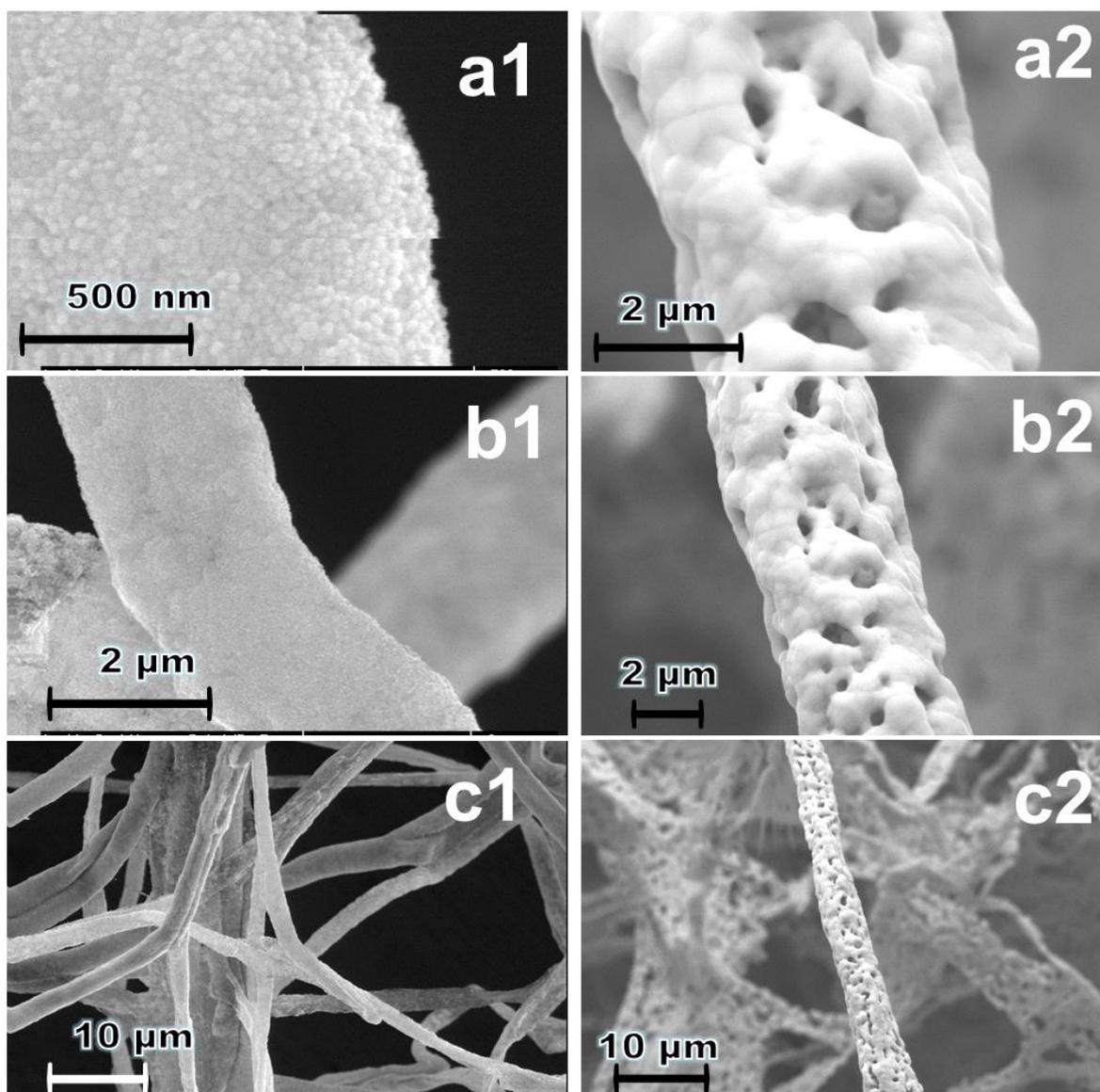


FIGURA 4.21 - Imagens de MEV dos microtubos antes e depois do tratamento térmico a 400°C por 2 horas em fluxo de oxigênio: a1, b1 e c1) Imagens das hifas recobertas com nanopartículas de ouro; a2, b2 e c2) Imagens do material híbrido tratado a 400°C, mostrando a coalescência das partículas e a formação de estruturas tridimensionais organizadas.

Em temperaturas superiores a 550 K, o material possui um comportamento de resistência elétrica típico de metal, a partir do que se observa um aumento da resistência com o aumento da temperatura. O mesmo comportamento típico de metal foi observado com a diminuição da temperatura de 800 a 298 K. No processo de resfriamento o material orgânico já havia sido eliminado, restando somente os microtubos metálicos.

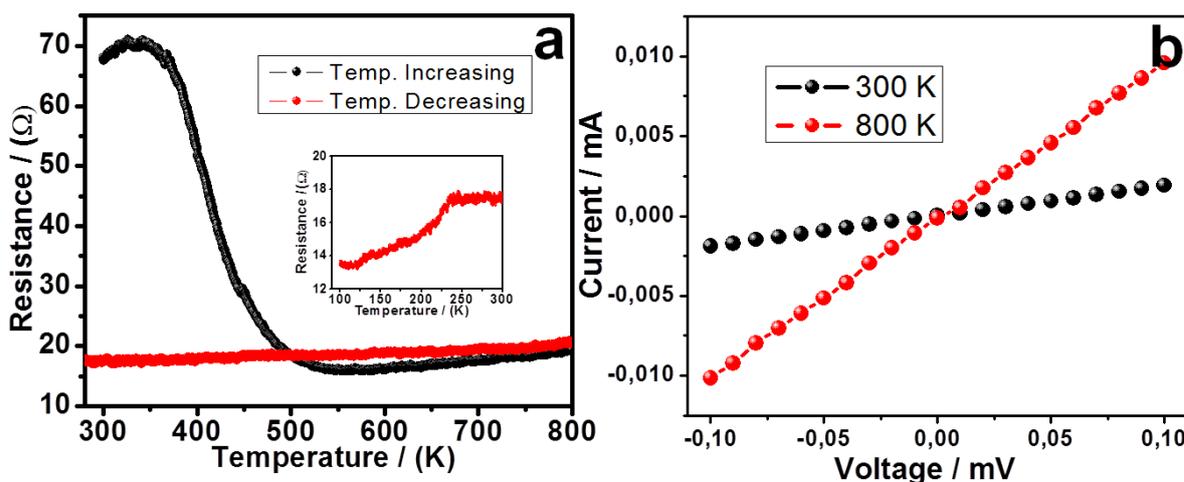


FIGURA 4.22 - Comportamento elétrico dos microfios recobertos por nanopartículas de ouro: a) Gráfico com medidas de resistência dependentes da temperatura mostram o comportamento de transição do semiconductor metal, b) As curvas I x V em diferentes temperaturas demonstram condutividade ôhmica com baixa resistência ($\sim 10^{-2} \Omega$).

Neste experimento também foram avaliados os contatos elétricos através das medidas das curvas I x V em 300 K e 800 K, antes e após o aumento da temperatura, respectivamente. O gráfico da figura 4.21 b) indica a resposta ôhmica de ligações metálicas contínuas, através da amostra. A baixa resistência é esperada para o transporte de grãos em um metal policristalino⁷⁷. A eliminação do material orgânico e o comportamento elétrico dos microfios abrem caminho para a preparação de materiais com potencial de aplicação como suporte para a eletrocatalise e para sensores em eléto-analítica.

5- CONCLUSÕES

Pelo método de Turkevich, nanopartículas de prata e de ouro estáveis foram obtidas e sintetizadas por via coloidal, com controle do tamanho e da forma. A partir das nanopartículas obtidas, construímos estruturas tridimensionais nanoestruturadas em forma de tubos, utilizando os fungos *Penicillium brasilianum*, *Aspergillus aculeatus* e *Xylaria sp* como *biotemplate*. Os microtubos foram obtidos pela adsorção das nanopartículas metálicas de ouro e de prata em multicamadas, com diâmetro do tubo variando de 2 a 3 μm , com espessura da parede controlada pelo tempo de exposição do fungo ao coloide. Por meio do tratamento térmico a 400°C, obteve-se microfios metálicos livres de material orgânico e os materiais que resultaram deste processo mantiveram a forma original de microfios. Todavia, , apresentaram a superfície densa, devido à coalescência das nanopartículas. A eliminação do material orgânico e o comportamento elétrico dos microfios abrem caminho para a preparação de materiais com potencial de aplicação como suporte para a eletrocatalise e para sensores em elétrico-analítica. Os micro tubos apresentaram também uma boa resposta na utilização de substrato para espectroscopia SERS. Os resultados comprovam a hipótese de que as biomoléculas produzidas pelos fungos são responsáveis pelo efeito indutor de *self-assembly* de nanopartícula na formação de camadas sucessivas na superfície do fungo. Esse resultado vislumbra novas perspectivas para trabalhos futuros em que as biomoléculas produzida pelos fungos podem ser utilizadas para induzir o *self-assembly* de nanopartículas em superfícies com formas singulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SINGH, A. V.; RAHMAN, A.; SUDHIR KUMAR, N. V. G.; ADITI, A. S.; GALLUZZI, M.; BOVIO, S.; BAROZZI, S.; MONTANI, E. & PARAZZOLI, D. "Bio-inspired approaches to design smart fabrics". *Mater. Design*, **36**: 829, 2012.
2. SANCHEZ, C.; SOLER-ILLIA, G. J. D. A. A.; RIBOT, F.; LALOT, T.; MAYER, C. R. & CABUIL, V. "Designed hybrid organic–inorganic nanocomposites from functional nanobuilding blocks". *Chem. Mater.*, **13**: 3061, 2001.
3. XIA, Y.; XIONG, Y.; LIM, B. & SKRABALAK, S. E. "Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics". *Angew. Chem. Int. Edit.*, **48**: 60, 2008.
4. KNEZ, M.; BITTNER, A. M.; BOES, F.; WEGE, C.; JESKE, H.; MAIB, E.; KERN, K. "Biotemplate synthesis of 3-nm nickel and cobalt nanowires". *Nano Letters* **3**(8): 1079, 2003.
5. BENYUS, J. M. *Biomimicry: Innovation Inspired by Nature*. New York, Nature Publishing Group, 1997. p. 50.
6. JOSÉ, N. M. & PRADO, L. A. S. D. A. "Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações". *Quim. Nova*, **28**: 281, 2005.
7. COBLEY, C. M.; CHEN, J. Y.; CHO, E. C.; WANG, L. V. & XIA, Y. N. "Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications". *Chem. Soc. Rev.*, **40** (1): 44, 2011.
8. DANIEL, M. D. & ASTRUC, D. "Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology". *Chem. Inform.* **35** (16): 234, 2004.
9. LI, Z.; CHUNG, S.W.; NAM, J.M.; GINGER, D.S. & MIRKIN, C.A. "Living templates for the hierarchical assembly of gold nanoparticles". *Angew. Chem. Int. Edit.*, **42** (20): 2306, 2003.
10. XIA, Y. & LIM, B. "Nanotechnology: beyond the confines of templates". *Nature*, **467** (7318): 923, 2010.
11. MIRKIN, C. A. "Programming the assembly of two- and three-dimensional architectures with DNA and nanoscale inorganic building blocks". *Inorg. Chem.*, **39** (11): 2258, 2000.
12. ROSI, N. L.; THAXTON, C. S. & MIRKIN, C. A. "Control of nanoparticle assembly by using DNA-modified diatom templates". *Angew. Chem. Int. Edit.*, **43** (41): 5500, 2004.
13. ZHOU, J. C.; GAO, Y.; MARTINEZ-MOLARES, A. A.; JING, X.; YAN, D.; LAU, J.; HAMASAKI, T.; OZKAN, C. S.; OZKAN, M.; HU, E. & DUNN, B. "Microtubule-based gold nanowires and nanowire arrays". *Small*, **4**(9): 1507, 2004.
14. BIGALL, N. C.; REITZIG, M.; NAUMANN, W.; SIMON, P.; VAN PÉE, K.-H. & EYCHMÜLLER, A. "Fungal templates for noble-metal

-
- nanoparticles and their application in catalysis”. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **47** (41): 7876, 2004.
15. HUCZKO A. “Template-based synthesis of nanomaterials”. **70**(4): 365, 2002.
 16. HULTEEN, J.C. & MARTIN, C.R.”A general template-based method for the preparation of nanomaterials”. *J. Mater. Chem.* **7**: 1075, 1997.
 17. BAKKERS, E. P. A. M.; BORGSTROM, M. & VERHEIJEN, M. “Epitaxial growth of nanowires on group substrates”. *MRS Bulletin*, **32**(2): 117, 2007.
 18. BAUER, J.; FLEISCHER, F.; BREITENSTEIN, O.; SCHUBERT, L.; WERNER, P.; GÖSELE, U. & ZACHARIAS, M. “Electrical properties of nominally undoped silicon nanowires grown by molecular-beam epitaxy”. *Appl. Phys. Lett.*, **90**: 012105, 2007.
 19. BOOR, J.; GEYER, N.; WITTEMANN, J. V.; GÖSELE, U. & SCHMIDT, V. “Sub-100 nm silicon nanowires by laser interference lithography and metal-assisted etching”. *Nanotechnology*, **21**: 095302, 2010.
 20. NARAYANAN, K. B. & SAKTHIVEL, N. “Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes”. *Adv. Colloid Interfac.*, **156** (2): 1, 2010.
 21. SUGUNAN, A.; MELIN, P.; SCHNÜRER, J.; HILBORN, J. G. & DUTTA, J. “Nutrition-driven assembly of colloidal nanoparticles: growing fungi assemble gold nanoparticles as microwires”. *Adv. Mater.*, **19** (1): 77, 2007.
 22. AROCA, R. *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*. Chichester, John Wiley & Sons, 2006. p. 74
 23. CSAKI, A.; SCHNEIDER, T.; WIRTH, J.; JAHR, N.; STEINBRUCK, A.; STRANIK, O.; GARWE, F.; MULLER, R. & FRITZSCHE, W. “Molecular plasmonics: light meets molecules at the nanoscale”. *Philos. T. R. Soc. A*, **369** (1950): 3483, 2011.
 24. YU, Q.; SASAKI, K. & HIRAJIMA, T. “Bio-templated synthesis of lithium manganese oxide microtubes and their application in Li⁺ recovery”. *J. Hazard. Mater.*, **262**: 38, 2013.
 25. NIEMEYER, C. M. “Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science”. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **40** (22): 4128, 2001.
 26. ARANTES, T. M.; MAMBRINI, G. P.; STROPPA, D. G.; LEITE, E. R.; LONGO, E.; RAMIREZ, A. J. & CAMARGO, E. R. “Stable colloidal suspensions of nanostructured zirconium oxide synthesized by hydrothermal process”. *J. Nanopart. Res.*, **12** (8): 3105, 2010.
 27. RIBEIRO, C.; BARRADO, C. M.; CAMARGO, E. R.; LONGO, E. & LEITE, E. R. “Phase transformation in titania nanocrystals by the oriented attachment mechanism: the role of the pH value”. *Chem. Eur. J.*, **15** (9): 2217, 2009.
 28. GORUP, L. F.; LONGO, E.; LEITE, E. R. & CAMARGO, E. R. “Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-

- monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method". J. Colloid Interf. Sci.,**360** (2): 355, 2011.
29. MONTEIRO, D. R.; GORUP, L. F.; TAKAMIYA, A. S.; RUVOLLO, A. C.; CAMARGO, E. R. & BARBOSA, D. B. "The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver". Int. J. Antimicrob. Ag.,**34** (2): 103, 2013.
30. MONTEIRO, D. R.; GORUP, L. F.; TAKAMIYA, A. S.; CAMARGO, E. R.; FILHO, A. C. R. & BARBOSA, D. B. "Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles". J. Prosthodont., **21** (1): 7, 2012.
31. KUBO, A. M.; GORUP, L. F.; AMARAL, L. S.; FILHO, E. R.; LEITE, E. R.; LONGO, E. & CAMARGO, E. R. "Self-organization of colloidal gold nanoparticles on living filamentous fungi aiming to make stable mesostructures". Livro de resumos do XI Encontro da SBPMat, 2012, Florianópolis-SC.
32. CASTRO-LONGORIA, E.; VILCHIS-NESTOR, A. R. & AVALOS-BORJA, M. "Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*". Colloid Surface B, **83**: 42, 2011.
33. NARAYANAN, K.B. & SAKTHIVEL, N. "Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes". Adv. Colloid. Interf. **156**: 1, 2011.
34. REHMAN, A.; RAZA, Z. A.; SAIF-UR-REHMAN; KHALID, Z.M.; SUBRAMANI, C.; ROTELLO, V.M. & HUSSAIN, I. "Synthesis and use of self-assembled rhamnolipid microtubules as templates for gold nanoparticles assembly to form gold microstructures. J. Colloid. Interface. Sci. **347**(2):332, 2010.
35. REHMAN, A.; MAJEED, M.I.; IHSAN, A.; HUSSAIN, S.Z.; SAIF-UR-REHMAN; GHOURI, M.A.; KHALID, Z.M. & HUSSAIN, I. "Living fungal hyphae-templated porous gold microwires using nanoparticles as building blocks" I. J. Nanopart. Res. **13**:6747, 2011.
36. SABAH, A.; DAKUA, I.; KUMAR, P.; MOHAMMED, W.S. & DUTTA, J. "Growth of templated gold microwires by self-organization of colloids on *Aspergillus niger*". Dig. J. Nanomater. Bios. **7**(2): 583, 2012.
37. TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C. & HILLER, S. "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold" J. Discuss. Faraday Soc., **11**: 55, 1951.
38. KIMLING, J.; MAIER, M.; OKENVE, B.; KOTAIDIS, V.; BALLOT, H. & PECH, A. "Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited", J. Phys. Chem. B., **110**: 15700, 2006.
39. RIVAS, L.; SANCHEZ-CORTES, S.; GARCIA-RAMOS, J. V. & MORCILLO, G. "Growth of silver colloidal particles obtained by citrate reduction to increase the Raman enhancement factor". Langmuir, **17**: 574, 2001.

-
40. EL-BROLOSSY, T.A.; BDALLAH, T.; MOHAMED, M.B.; ABDALLAH, S.; EASAWI, K.; NEGM, S. & TALAAT, H. "Shape and size dependence of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles studied by Photoacoustic technique". *Eur. Phys. J. Special Topics* **153**: 361, 2008.
 41. EASTOE, J.; HOLLAMBY, M. J. & HUDSON, L. "Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles", *Adv. Colloid Interfac.*, **128**: 5, 2006.
 42. OSKAM, G.; HU, Z.; PENN, R. L.; PESIKA, N. & SEARSON, P. C. "Coarsening of metal oxide nanoparticles", *Phys. Rev. E*, **66**: 011403, 2002.
 43. VIAU, G.; TONEGUZZO, P.; PIERRARD, A.; ARCHER, O.; FIEVET-VINCENT, F. & FIEVET, F. "Heterogeneous nucleation and growth of metal nanoparticles in polyols", *Scripta Mater.*, **44**: 2263, 2001.
 44. LAMER, V. K. & DINEGAR, R. H. "Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols", *J. Am. Chem. Soc.*, **72**: 4847, 1950.
 45. LAIDLER, K. J. *The World of Physical Chemistry*, Oxford, Oxford University Press, 1993, p. 292.
 46. SHAW, D. J. *Introdução à Química de Colóides e de Superfícies*. São Paulo: Edgard Blucher/Edusp, 1975. p. 23.
 47. MORALES, V.; ANTA, J. A. & LAGO, S. "Integral equation prediction of reversible coagulation in charged colloidal suspensions". *Langmuir*, **19** (2): 475, 2003
 48. BOLT, G.H. *Surface Interaction Between The Soil Solid Phase and the Soil Solution*. Amsterdam, Elsevier, 1978. cap.3.
 49. BELL, L. C. & GILLMAN, G. P. *Surface Charge Characteristics and Soil Solution Composition of Highly Weathered Soils*. Melbourne, CSIRO, 1978. cap.2.
 50. JAFELICCI JÚNIOR, Miguel & VARANDA, L. C. "O mundo dos colóides. *Quím. N. Escola*, **9**: 9, 1999.
 51. SIEVERS, N.; BERTSCH, E. & FISCHER, R. "Isolation of nuclear migration mutants of *Aspergillus nidulans* using GFP expressing strains". *Mycol. Res.*, **103** (8): 961, 999.
 52. Australian National Botanic gardens. Centre for Australian National Biodiversity Research – CANBR. The mycelium. Disponivel em: <<http://www.anbg.gov.au/fungi/mycelium.html>>. acessado em: fev. 2014.
 53. WENDLAND, J.. "Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast". *Fungal Genet. Biol.*, **34**: 63, 2001.
 54. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Fungos. Disponivel em: <http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/fungos.htm>. acessado em: fev. 2014.
 55. BALDWIN, J. E.; BYFORD, M. F.; CLIFTON, I.; HAJDU, J.; HENSGENS, C.; ROACH, P. & SCHOFIELD, C. J. "Proteins of the penicillin biosynthesis pathway". *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **7**(6): 857, 1997.

-
56. MARZLUF, G.A. "Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi". *Microb. Reviews* **45** (3):61, 1981.
57. WEBSTER, J. & WEBER, R. *Introduction to fungi* London, Cambridge University Press. 2007, pg 59.
58. KITAGI, H.; SHIMOI, H. & ITOH, K. "Identification and analysis of a static culture-specific cell wall protein., TirlplSrplp in *Saccharomyces cerevisiae*". *Eur. J. Biochem.*, **249** (1); 343, 1997
59. KLIS, F. M. "Review: cell wall assembly in yeast". *Yeast*. **10**(7); 851, 1994.
60. HARDISON, S.E & BROWN, G. D. "C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity". *Nat. Immunol.*, **13**(9): 817, 2012.
61. MOORE-LANDECKER, E. "Fundamentals of the Fungi". 4th ed. New Jersey, USA, Prentice Hall, 1996, p.574.
62. WESSELS, J. G. H. "Tansley Review No 45 – Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi". *New Phytologist*, **123**: 397, 1993.
63. BALDRIAN, P. "Interactions of heavy metals with white-rot fungi". *Enzyme and Microb. Tech.*, **32**: 78, 2003.
64. AMENDOLA, V. & MENEGHETTI, M. "Size evaluation of gold nanoparticles by uv–vis spectroscopy". *J. Phys. Chem. C*, **113** (11): 4277, 2009.
65. WOHLTJEN, H. & SNOW, A. W. "Colloidal metal–insulator–metal ensemble chemiresistor sensor". *Anal. Chem.*, **70** (14): 2856, 1998.
66. WANG, Y.; PLUMMER, E. W. & KEMPA, K. "Foundations of plasmonics". *Adv. Phys.*, **60** (5): 799, 2011.
67. WANG, S.; HUANG, X.; SHAN, X.; FOLEY, K. J. & TAO, N. "Electrochemical surface plasmon resonance: basic formalism and experimental validation", *Anal. Chem.*, **82** (3): 935, 2010.
68. SUHENDI, A.; NANDIYANTO, A. B. D.; MUNIR, M. M.; OGI, T.; GRADON, L. & OKUYAMA, K. "Self-assembly of colloidal nanoparticles inside charged droplets during spray-drying in the fabrication of nanostructured particles". *Langmuir*, **29**(43): 13152, 2013.
69. FAKHRULLIN, R. F.; ZAMALEEVA, A. I.; MOROZOV, M. V.; TAZETDINOVA, D. I.; ALIMOVA, F. K.; HILMUTDINOV, A. K.; ZHDANOV, R. I.; KAHRAMAN, M. & CULHA, M. "Living fungi cells encapsulated in polyelectrolyte shells doped with metal nanoparticles". *Langmuir*, **25** (8), 4628, 2009.
70. ZHANG, S. "Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly", *Nat. Biotechnol.*, **21**(10): 1171, 2003.
71. OLIVEIRA, P.Q.; TOSATO, M. G.; ALVES, R. S.; MARTIN, A. A.; FÁVERO, P.P. & RANIERO, R. "Skin biochemical composition analysis by Raman spectroscopy". *Rev. Bras. Eng. Bioméd.* **28**(3):55, 2012.
72. ZHANG, Y.; HONG, H.; MYKLEJORD, D. V. & CAI, W. "Molecular imaging with SERS-active nanoparticles". *Small*, **7** (23): 3261, 2011.

-
73. GUNNARSSON, L.; BJERNELD, E. J.; XU, H.; PETRONIS, S.; KASEMO, B. & KALL, M. "Interparticle coupling effects in nanofabricated substrates for surface-enhanced Raman scattering". *Appl. Phys. Lett.*, **78**: 802, 2001.
74. CARRON, K. T. & HURLEY, G. "Axial and azimuthal angle determination with surface-enhanced Raman spectroscopy: thiophenol on copper, silver, and gold metal surfaces". *J. Phys. Chem.*, **95** (24): 9979, 1991.
75. LUO, W.; VAN DER VEER, W.; CHU, Y.; MILLS, D. L.; PENNER, R. M. & HEMMINGER, J. C. "Polarization-dependent surface enhanced raman scattering from silver 1d nanoparticle arrays". *J. Phys. Chem. C.*, **112** (31): 11609, 2008.
76. GÜLSEREN, O.; ERCOLESSI, F. & TOSATTI, E. "Premelting of thin wires". *Phys. Rev. B*, **51** (11): 7377, 1995.
77. SCHEIBEL, T.; PARTHASARATHY, R.; SAWICKI, G.; LIN, X.; JAEGER, H. & LINDQUIST, S. L. "Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition". *Biophysics*, **100** (8): 4527, 2003.

Anexos

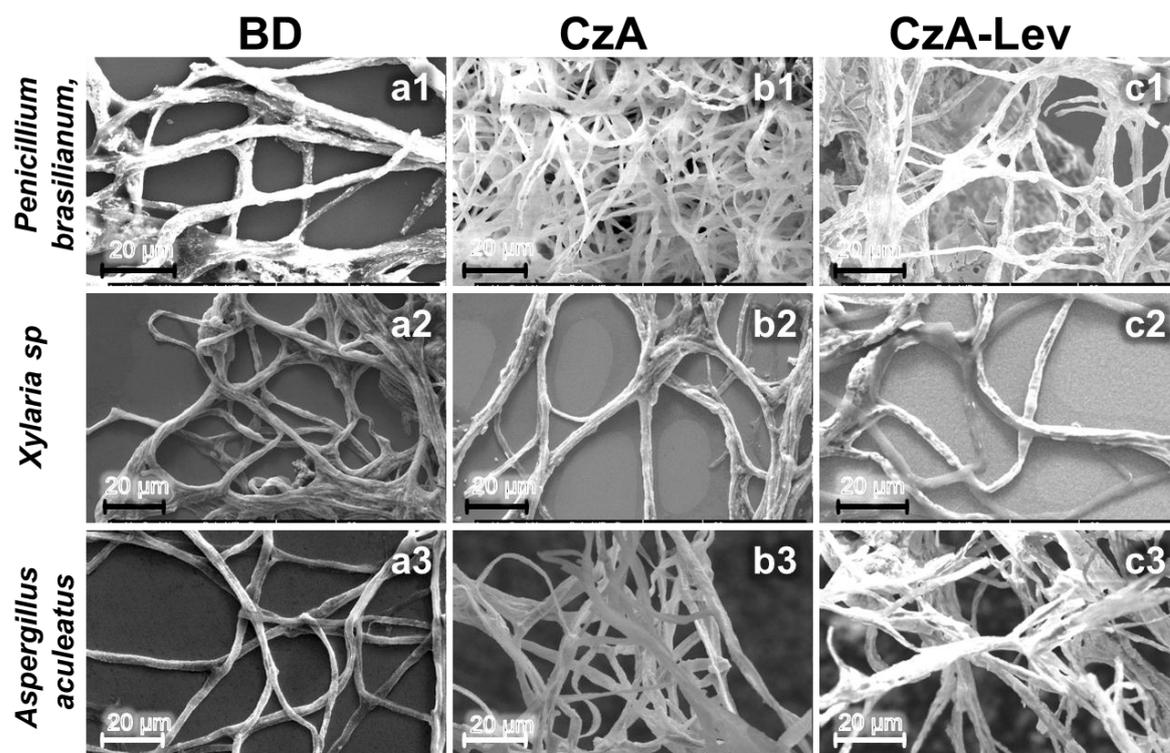


Figure A1 : MEV dos microtubos revestidos com nanopartículas de ouro. Os materiais híbridos foram preparados utilizando micélio dos do fungos *Penicillium brasilianum*, *Aspergillus aculeatus* and *Xylaria sp* em meio de cultura de CZA, CZA-lev e BD

Adsorção de nanopartículas sobre placas de silício induzido pela presença de metabólitos produzidos pelo fungo

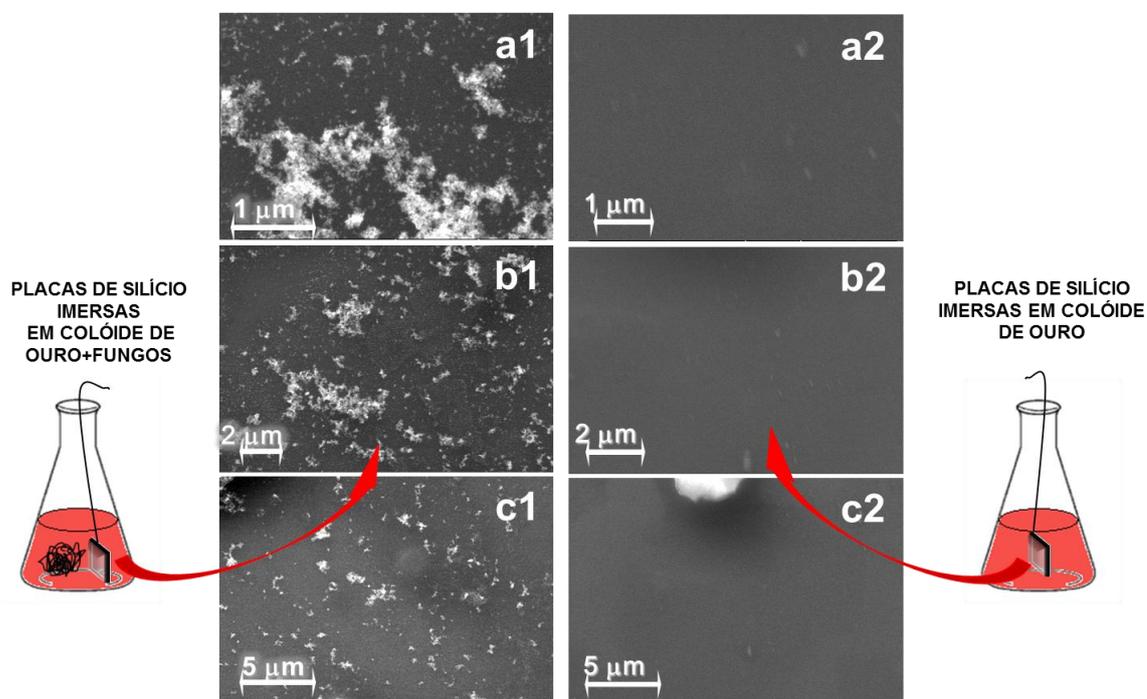


Figura A2 : Imagens de MEV de placas de silício mergulhadas em solução por 20 dias ; a1-b1-c1) Placas de silício mergulhadas na solução contendo NPs de ouro + fungo *Aspergillus aculeatus* a2-b2-c2 b) placa de silício mergulhada em um colóide de NPs de ouro

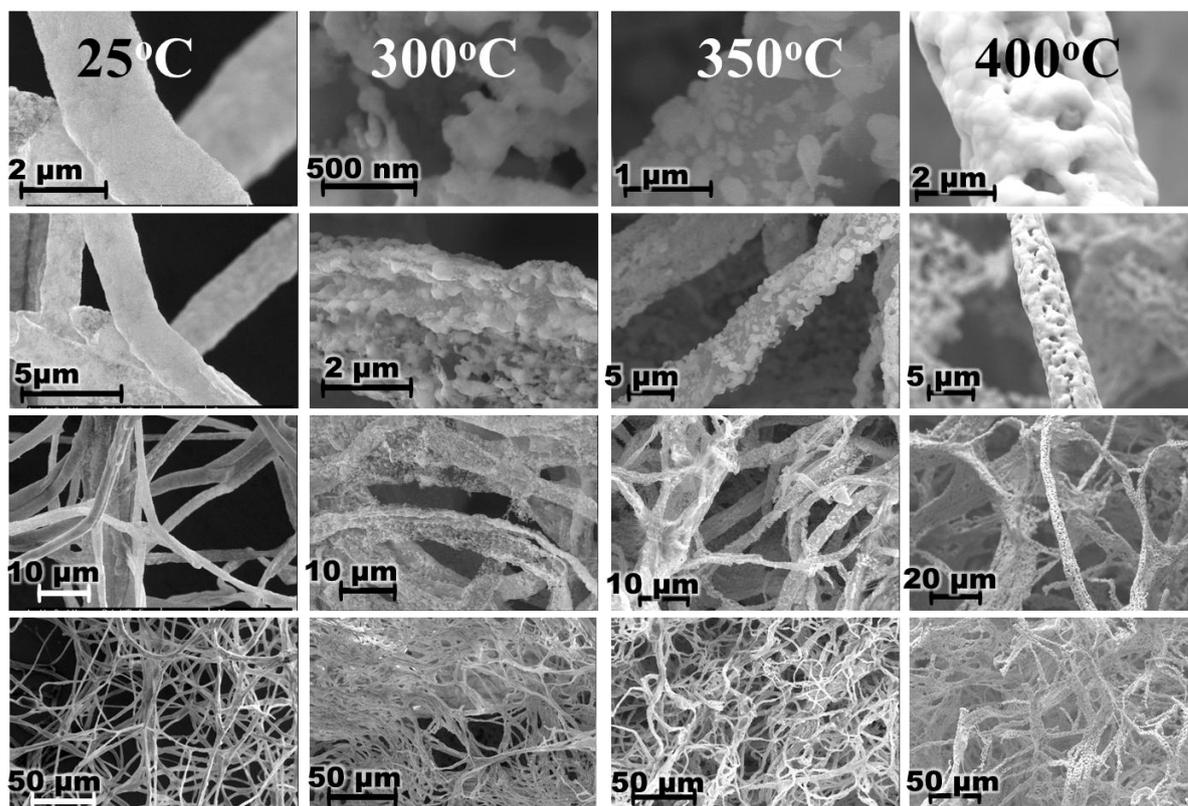


Figura A3 :Imagens de MEV dos micro-ubos depois do tratamento térmico a 300°C , 350°C, 400°C por 2 horas em fluxo de oxigênio. As nanopartículas iniciam a coalescência formando uma estrutura compacta