

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

**“USO DE BIOTEMPLATES NA OBTENÇÃO DE  
MICROTUBOS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO”**

**Andressa Mayumi Kubo\***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: FÍSICO-QUÍMICA.

**Orientador: Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo**

**\* bolsista FAPESP – Processo Número 2011/15075-0**

**São Carlos - SP**  
**2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

K95bo Kubo, Andressa Mayumi.  
Uso de *biotemplates* na obtenção de microtubos com nanopartículas de ouro / Andressa Mayumi Kubo. -- São Carlos : UFSCar, 2014.  
68 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Físico-química. 2. *Biotemplates*. 3. Nanopartículas metálicas. 4. Fungos filamentosos. 5. Multicamadas metálicas. I. Título.

CDD: 541.3 (20<sup>a</sup>)

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

---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata Andressa Mayumi Kubo, realizada em 14 de fevereiro de 2014:*



---

Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo



---

Dr. Daniel Souza Corrêa



---

Prof. Dr. Pedro Henrique Cury Camargo

“É fundamental que o estudante adquira compreensão e percepção nítida dos valores. Ele deve aprender a ter um sentido bem definido do belo e do moralmente bom.”

Albert Einstein

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico essa Dissertação de Mestrado:*

*À minha família, que com tanto amor e carinho me ensinou valores que levo para minha vida inteira. Que por muitas vezes abriram mão de seus sonhos para que os meus pudessem se tornar realidade. Obrigada mamãe Iaiko, papai Luiz e minha irmã, Jessica. Sem vocês, eu não seria nada do que sou hoje;*

*Aos meus grandes amigos, Bruna Scatena, Jean Carlos, Renan Vandr e e Sarah Stradioto, que, apesar de todas as intemperies da vida, a amizade sempre se manteve intacta;*

*Ao Bruno Lima, pelo amor e paciência que teve em todos os momentos, pelas contribui es acad micas e por estar ao meu lado nas decisões tomadas;*

*Aos meus amigos de Gradua o em Licenciatura Plena em Química, turma de 2007, em especial ao Renato Iezzi e ao Bruno Bravin, por todos os momentos que compartilhamos juntos;*

*A todos os companheiros e amigos do LIEC, UFSCar e EMBRAPA em especial, Liliam, Júlio, Ivo, Lucas, Renata, Alexandre, Tatiane, Francisco, Ciro, Alan, André, Amanda Giroto, Amanda Donatti, Lázaro e Thales, pelos conhecimentos científicos compartilhados, pelas muitas ajudas durante esses anos juntos, pela grande amizade e momentos de descontra o;*

*E aos amigos e familiares, todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realiza o desse trabalho, por todo o apoio dado, por todo o carinho e amor que me proporcionaram e que me fizeram seguir adiante.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo, pelas inúmeras discussões científicas, por contribuir imensamente à minha formação profissional e pela amizade construída e consolidada ao longo da orientação;

Ao Prof. Dr. Elson Longo e Prof. Dr. Edson Roberto Leite por disponibilizar toda a infraestrutura e equipamentos do Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica;

Aos professores Dr. Daniel Souza Corrêa e Dr. Pedro Henrique Cury Camargo pelas discussões, sugestões e participação na banca de defesa de Dissertação;

Ao Grupo do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos (LaBioMMi), em especial ao prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e a doutoranda Luciana da Silva Amaral, pelas contribuições a essa dissertação de Mestrado;

Ao doutorando Luiz Fernando Gorup, pelas imagens de MEV e microanálise e discussões científicas;

Aos técnicos e funcionários do LIEC, Rorivaldo, Ana Lucia, Madalena, seu Barbosa, Cíntia, Dona Ana, Daniela e Luma;

À FAPESP, Processo 2011/15075-0, pela bolsa concedida e pelos Projetos 2007/58891-7 e FAPESP–CMDMC/ CEPID 98/ 14324-0, CAPES e INCT de Ciências dos Materiais em Nanotecnologia.

## Lista de Tabelas

TABELA 1.1 - Valores limites e ótimos das exigências fisiológicas/nutritivas dos fungos.....	24
TABELA 3.1 - Composição química do meio de cultura CZAPEK, utilizado no cultivo e crescimento do fungo <i>Aspergillus aculeatus</i> .....	33

## Lista de Figuras

FIGURA 1.1 - Cronograma da evolução dos materiais com a ciência. Imagens retiradas da web e de própria autoria. ....	2
FIGURA 1.2 - Representação 2-D das forças atuantes em uma unidade (átomos, moléculas etc., em vermelho) no interior de uma fase. a) igual à zero, na fase ‘bulk’ e b) com uma resultante na superfície. Adaptado de Myers <sup>4</sup> .....	7
FIGURA 1.3 - Resumo das etapas de síntese de nanopartículas metálicas. Adaptado de Bönneman <sup>24</sup> .....	12
FIGURA 1.4 - Imagens de materiais estruturados que utilizam sistemas biológicos em alguma etapa da sua produção. a) e b) exemplo de material bioinspirado, a concha e os materiais cerâmicos de alta dureza; c) e d) exemplos de biomateriais como a pele artificial e a lente de contato, e por fim, e) e f) exemplos da classe dos materiais biomiméticos. Imagens retiradas da web. ....	15
FIGURA 1.5 - Número de espécies de fungos no Brasil em que a) refere-se ao número de espécies de fungo por Estado e b) número de espécies de fungos registrados em cada região do país. Ambos retirados do Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil <sup>68</sup> .....	20
FIGURA 1.6 - Fotografia digital e esquema do micélio e esporos do fungo <i>Aspergillus aculeatus</i> . Adaptado de STEVENSON <sup>70</sup> .....	22
FIGURA 3.1 - Imagens das etapas de preparo dos inóculo. a) Placa de Petri antes da adição dos esporos para desenvolvimento do inóculo; b) placa de Petri após o crescimento dos esporos e c) suspensão de esporos preparados a partir da placa de Petri.....	34
FIGURA 3.2 - Frasco de Erlenmeyer de 125 mL fechado com a) ‘boneca’ de pano e algodão e o ‘chapéu’ de papel pardo; b) separadamente a ‘boneca’ de pano e algodão e o ‘chapéu’ de papel pardo. ....	34

FIGURA 3.3 - Desenvolvimento das hifas no meio de cultura. a) hifas visíveis a olho nu após dois dias e b) massa micelar final com formato semelhante a um maço de algodão.....	35
FIGURA 3.4 - Esquema ilustrativo e fotos das etapas de formação do material híbrido composto por multicamadas de nanopartículas de ouro e de prata. ....	37
FIGURA 5.1 - Ilustração dos microtubos contendo diferentes nanopartículas metálicas. a) compostos de multicamadas de ouro e prata; b) multicamadas de prata e ouro e c) mistura de nanopartículas de ouro e prata.....	41
FIGURA 5.2 - Imagens de MEV das nanopartículas de ouro com diferentes condições experimentais utilizadas para preparação dos microtubos de ouro. a) nanopartícula sintetizada pela relação citrato:ouro 4,5:1 e b) nanopartícula sintetizada pela relação citrato:ouro 3,5:1.....	43
FIGURA 5.3 - Imagens de MEV do material híbrido contendo nanopartículas de 14,4 nm em várias magnificações, mostrando a homogeneidade de forma, diâmetro do microtubo e comprimento. ....	44
FIGURA 5.4 - Espectro de absorção na região UV-Vis das nanopartículas de ouro sintetizadas em 40 °C (vermelho), 60 °C (verde) e 80 °C (preto).....	45
FIGURA 5.5 - Difractogramas de raios X das nanopartículas de ouro sintetizadas a 40 °C, 60 °C e 80 °C. ....	46
FIGURA 5.6 - Imagens de MEV das nanopartículas de ouro preparadas em diferentes temperaturas. a) 40 °C, c) 60 °C e e) 80 °C. ....	47
FIGURA 5.7 - Espectro de absorção na região do UV-Vis das nanopartículas de ouro (vermelho) e de prata (cinza) sintetizadas a 90 °C. ....	49
FIGURA 5.8 - Imagens de MEV e os respectivos histogramas das nanopartículas sintetizadas a 90 °C, utilizadas para preparar o material híbrido, sobre substrato de silício. a) nanopartículas de prata e b) nanopartículas de ouro.....	50

FIGURA 5.9 - Difratoograma de raios X das nanopartículas de ouro (vermelho) e prata (preto) sintetizadas a 90 °C. ....	51
FIGURA 5.10 - Imagens de MEV do material híbrido composto por camadas alternadas de nanopartículas de ouro e de prata no fungo <i>Aspergillus aculeatus</i> . ....	53
FIGURA 5.11 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS do material híbrido composto por camadas de ouro e prata, respectivamente, formando os microtubos. a) MEV do material híbrido. Imagem do mapeamento em 2D por EDS de b) Si Ka, c) Ag La1 e d) Au Mb. ....	54
FIGURA 5.12 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS do material híbrido composto de camadas de prata/ouro formando os microtubos. a) MEV do material híbrido, b) Imagem em 2D de EDS do Si Ka, c) Imagem em 2D de EDS do Ag La1, d) Imagem em 2D de EDS do Au Mb. ....	55
FIGURA 5.13 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS do material híbrido composto de camadas de prata/ouro formando os microtubos. a) MEV do material híbrido, b) Imagem em 2D de EDS do Si Ka , c) Imagem em 2D de EDS do Ag La1 , d) Imagem em 2D de EDS do Au Mb. ....	56
FIGURA 5.14 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS do material híbrido composto de camadas de prata/ouro formando os microtubos. a) MEV do material híbrido, b) Imagem em 2D de EDS do Si Ka, c) Imagem em 2D de EDS do Ag La1, d) Imagem em 2D de EDS do Au Mb. ....	57
FIGURA 5.15 - Esquema ilustrativo do recobrimento das hifas pelas nanopartículas de prata/ouro e imagens de MEV desses recobrimentos. ....	58
FIGURA 5.16 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS do material híbrido formado pela adição de uma dispersão coloidal contendo uma mistura de nanopartículas de ouro e de prata. a) MEV do material híbrido. Imagem em 2D de EDS de b) Si Ka, c) de Ag La e d) de Au. ....	60

## RESUMO

USO DE *BIOTEMPLATES* NA OBTENÇÃO DE MICROTUBOS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO. Recentemente, os estudos na área de materiais híbridos compostos de estruturas biológicas têm sido de grande interesse, uma vez que são considerados *biotemplates* versáteis no que se refere à organização de materiais funcionais nanoestruturados, principalmente visando atribuições tecnológicas. Assim, o objetivo desta dissertação de Mestrado foi a construção de microtubos formados por multicamadas combinadas de nanopartículas de ouro e de prata utilizando como *biotemplate* o fungo *Aspergillus aculeatus*, originando, portanto, mesoestruturas híbridas estáveis com alto potencial de aplicação a sensores e biossensores. O fungo foi cultivado em um ambiente rico em citrato e após o desenvolvimento das hifas, foi adicionada a dispersão coloidal de nanopartículas. Foram feitos estudos com relação ao efeito da temperatura de síntese e da concentração de citrato no tamanho médio das nanopartículas de ouro, e posteriormente caracterizados por difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de absorção na região do UV-visível. Também, foi avaliada a formação de multicamadas compostas de diferentes nanopartículas metálicas. Os materiais híbridos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura com microanálise por EDS (MEV- EDS). Os resultados obtidos mostraram que tanto a concentração de citrato quanto a temperatura afetam diretamente o tamanho das nanopartículas com resultados expressivos para a temperatura. No que tange a formação de microtubos com diferentes nanopartículas metálicas, três distintas regiões foram identificadas, a saber, contendo somente nanopartículas de ouro, contendo nanopartículas de ouro e de prata e contendo somente nanopartículas de prata, fato discutido nessa Dissertação de Mestrado pela diferenciação de crescimento das hifas dentro da dispersão coloidal.

## ABSTRACT

USE OF THE *BIOTEMPLATES* TO OBTAIN MICROTUBULES WITH GOLD NANOPARTICLES. Recently, the studies in the area of hybrid materials composed by biological structures have been of great interest, since they are considered versatile *biotemplates* in which referred to the organization of nanostructured functional materials, mainly aiming technological attributions. Therefore, the central objective of this Master's Dissertation was the construction of microtubules formed by multilayers combined of gold and silver nanoparticles using as *biotemplates* the fungus *Aspergillus aculeatus*, which originated, thus, stable hybrid mesostructures with high potential of application to sensors and biosensors. The fungus was cultivated in a rich environment of citrate and, after the development of the hyphae, the colloidal dispersion of nanoparticles was added. Studies were done with relation to the effect of the synthesis temperature and the concentration of citrate in the average size of the gold nanoparticles and, posteriorly characterized by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and spectroscopy of absorption in the UV-Vis region. The formation of multilayer composed by different metal nanoparticles was evaluated too. The hybrid materials were characterized by scanning electron microscopy with microanalysis by EDX (SEM-EDS). The obtained results showed that the either concentration of citrate or the temperature directly affect the average size of the gold nanoparticles with expressive results to the temperature. In which referred the formation of the microtubules with different metal nanoparticles, three distinct regions were identified, namely, containing just gold nanoparticles, containing gold and silver nanoparticles and containing just silver nanoparticles, fact discussed in this Master's Dissertation by the differentiation of hyphae growth inside the colloidal dispersion.

## Sumário

1	- INTRODUÇÃO .....	1
1.1	- Nanotecnologia e Nanomateriais: Uma Abordagem Histórica ....	1
1.2	- Formação de Nanopartículas .....	3
1.2.1	- Superfície e Tamanho da Nanopartícula .....	3
1.2.2	- Nucleação e Crescimento .....	5
1.3	- Estabilidade Coloidal.....	8
1.3.1	- Estabilização Eletrostática.....	8
1.3.2	- Estabilização Estérica .....	9
1.4	- Síntese de Nanopartículas Metálicas .....	10
1.4.1	- Método Citrato.....	13
1.5	- Interdisciplinaridade: Química, Ciência de Materiais e Biotecnologia e o Uso de <i>Biotemplates</i> .....	14
1.6	- Fungos: Breve Histórico Mundial e a Pesquisa no Brasil .....	18
1.7	- Fungos: Classificação Filogenética, Estrutura e Desenvolvimento .....	21
1.8	- O Gênero <i>Aspergillus</i> .....	25
1.9	- A Espécie <i>Aspergillus aculeatus</i> Lizuka do LaBioMMi.....	25
2	- OBJETIVOS .....	27
3	- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	29
3.1	- Síntese e Caracterização das Dispersões Coloidais de Ouro.....	29
3.1.1	- Síntese de Nanopartículas de Ouro: Efeito da Concentração de Sal de Citrato .....	30
3.1.2	- Síntese de Nanopartículas de Ouro: Efeito da Temperatura.	31
3.1.3	- Síntese de Nanopartículas de Ouro: Formação de Camadas.	31
3.2	- Síntese e Caracterização das Dispersões Coloidais de Prata.....	32
3.3	- Cultivo e Crescimento dos Fungos .....	32

3.4	- Preparação e Caracterização das Mesoestruturas Híbridas .....	36
4	- MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO .....	38
4.1	- Difração de Raios X.....	38
4.2	- Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Vis .....	38
4.3	- Microscopia Eletrônica de Varredura.....	39
5	- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
5.1	- Microtubos com Nanopartículas de Ouro de Diferentes Tamanhos.....	41
5.1.1	- Efeito da Concentração de Citrato.....	41
5.1.2	- Influência da Temperatura no Tamanho das Nanopartículas de Ouro.....	44
5.2	- Formação de Multicamadas .....	48
5.2.1	- Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Ouro e de Prata Utilizadas no Preparo dos Microtubos .....	48
5.2.2	- Microtubos Compostos de Multicamadas .....	52
5.2.2.1	- Microtubos Formados por Nanopartículas de Ouro e de Prata.....	52
5.2.2.2	- Microtubos Formados por Nanopartículas de Prata e de Ouro.....	55
6	- CONCLUSÕES.....	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

# **1 - INTRODUÇÃO**

## **1.1 - Nanotecnologia e Nanomateriais: Uma Abordagem Histórica**

O cenário mundial em que a humanidade está inserida mostra claramente que mudanças são necessárias para a sobrevivência. Nunca antes as transformações foram tão dinâmicas, a ponto de afetar diretamente a economia de pequenos e grandes países, os avanços tecnológicos e o progresso da ciência. É nesse contexto de buscas por grandes inovações e abrangência mundial que se insere a nanotecnologia.

Desde a “Idade da Pedra”, seja por curiosidade ou acidente, a humanidade tem descoberto novos materiais, como a argila para o armazenamento e transporte de alimentos. Mais tarde, a manipulação de metais e ligas, tais como o bronze, cobre, ferro e outros, alavancou o desenvolvimento de grandes civilizações; entretanto, as pesquisas ainda eram empíricas e sem metodologia científica<sup>1</sup>.

Na medida em que progrediam as pesquisas em ciência, os estudos na área de materiais foram se tornando indispensáveis, uma vez que foi possível identificar novos materiais, caracterizá-los e manipulá-los de tal forma com que levassem à formação de materiais com propriedades completamente diferentes dos materiais de partida (Figura 1.1).

O ponto inicial das pesquisas em nanotecnologia, no entanto, ocorreu em 29 de dezembro de 1959, no encontro da Sociedade Americana de Física em uma conferência no Instituto de Tecnologia da Califórnia, intitulada “There is a

Plenty of Room at the Bottom”, proferida pelo físico norte-americano Richard Feynman, ganhador do Prêmio Nobel de Física em 1985. Nessa palestra, Feynman compartilhou suas ideias quanto ao arranjo e manipulação de átomos, conforme fosse desejado, para a produção de novos materiais. Para ele, todas essas possibilidades ocorreriam apenas por uma questão de conhecimento, tempo e tecnologia disponível, o que ele realmente estava correto. Devido a esse pensamento visionário, Richard Feynman é considerado o pai da nanotecnologia.

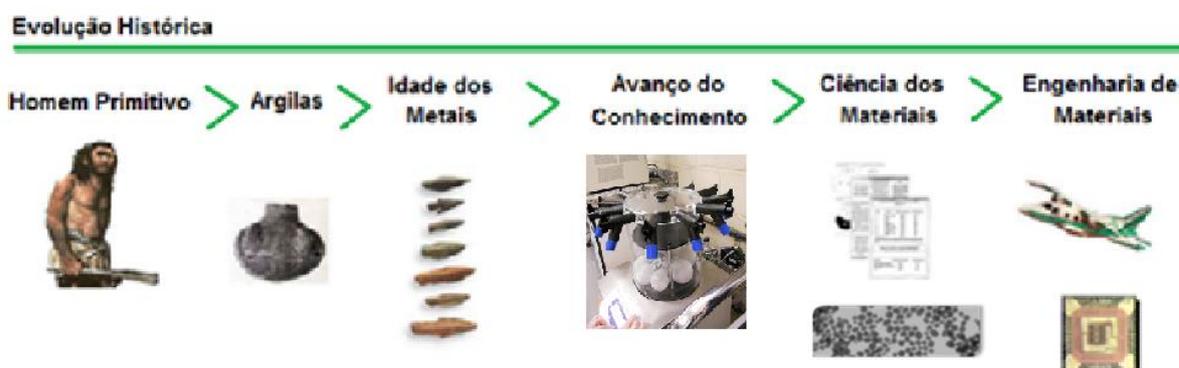


FIGURA 1.1 - Cronograma da evolução dos materiais com a ciência. Imagens retiradas da web e de própria autoria.

No ano de 1974, a palavra “nanotecnologia” foi usada pela primeira vez pelo professor da Universidade de Ciência de Tóquio, Norio Tanigushi, relacionando-a ao conjunto de estudos e aplicações de objetos e processos em escala nanométrica. *Nano* vem do grego “anão” e cientificamente é usado como notação para expressar um bilionésimo ( $10^{-9}$ ). Assim, um nanômetro significa um bilionésimo de metro. ( $10^{-9}$  m ou nm). Tecnologia, de acordo com DURÁN et al.<sup>2</sup>, remete à atuação do conhecimento, estudo ou ciência em situações práticas e comerciais. Assim, nanotecnologia, pode ser definida hoje como a capacidade de manipular átomos em escala nanométrica, visando a formação de novos materiais.

Desde o surgimento do microscópio de varredura por tunelamento (STM), em 1981 por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer no laboratório da IBM em Zurich, Suíça, muitos trabalhos foram desenvolvidos no campo da nanotecnologia. Um exemplo é a descoberta dos nanotubos de carbono em 1991 pelo professor Sumio Iijama, da NEC, Tsukuba<sup>3</sup>. Os estudos voltados para a área deu início a uma nova classe de materiais, os nanomateriais, em que pelo menos uma de suas dimensões é obtida em escala nanométrica. Diferentemente dos sólidos cristalinos e das moléculas, os nanomateriais apresentam propriedades distintas devido aos efeitos de tamanho e de superfície.

## **1.2 - Formação de Nanopartículas**

Wolfgang Ostwald descreveu, em 1915, os estudos de coloides e ciência de superfícies como sendo um “mundo de dimensões negligenciáveis”, uma vez que na época, os pesquisadores não possuíam técnicas experimentais e teorias que embasassem as observações das superfícies, interfaces e fenômenos coloidais<sup>4</sup>. Hoje, sabe-se que a superfície de um nanomaterial, em especial, as nanopartículas, exerce um papel fundamental no que tange praticamente quaisquer propriedades de um material, abrangendo de transformações estruturais até propriedades ópticas<sup>5,6</sup>.

### **1.2.1 - Superfície e Tamanho da Nanopartícula**

Diferentemente dos átomos que estão no interior do material, os átomos presentes na superfície não possuem vizinhos em todas as direções, portanto,

existe pelo menos uma região em que não há interação com seu semelhante<sup>7</sup>. Dessa forma, infere-se que nanopartículas possuam uma desordem atribuída à superfície, devido à elevada quantidade de átomos presentes nela, o que torna ainda mais necessário o estudo de seus efeitos.

A relação entre área superficial e tamanho é bem expressa no que se refere às propriedades das nanopartículas<sup>6</sup>. Considerando uma partícula esférica, essa relação pode ser determinada como:

$$\frac{\text{Área}}{\text{Volume}} = \frac{4\pi R_p^2}{4/3\pi R_p^3} = \frac{3}{R_p} \quad (\text{Eq. 1.1})$$

Onde  $R_p$  é o raio da partícula. Já que nanopartículas não são esferas ideais, derivam-se expressões geométricas relacionando o número de átomos em uma forma *quasi*-esférica:

$$N = \frac{R_p^3}{r_a^3} \quad (\text{Eq. 1.2})$$

Onde  $r_a$  é o raio hipotético de um átomo deduzido pelo volume atômico. Se o volume da nanopartícula é proporcional a  $N$  e analogamente, o número de átomos na superfície depende de  $R_p$  ao quadrado, pode-se comparar assim, o número de átomos na superfície com o número de átomos no volume total. E, portanto, a equação 1.1 pode ser entendida como a proporção entre os átomos na superfície da partícula<sup>6</sup>. Um exemplo de propriedades associadas ao tamanho da nanopartícula é a transferência de calor para o ambiente no passo final do processo de relaxação. A dinâmica de resfriamento das nanopartículas metálicas

não é exponencial e depende do tamanho e da forma. No trabalho, foi observado claramente que a taxa de arrefecimento das nanopartículas menores foi muito mais rápida<sup>8</sup>. Visto que os átomos da superfície não possuem vizinhos e quanto menor a nanopartícula, maior a área superficial total do sistema nanoparticulado, a transferência de energia para o ambiente torna-se muito mais rápida.

### 1.2.2 - Nucleação e Crescimento

Geralmente, deseja-se obter nanopartículas com tamanho controlado, homogêneo e bem disperso, evitando a formação de aglomerados. Os métodos utilizados para a formação de nanopartículas se baseiam em grande maioria em etapas de coprecipitação ou nucleação e crescimento em meios reacionais<sup>9, 10</sup>. As etapas acontecem simultaneamente, e paralelamente ocorre a aglomeração dessas partículas e o processo difusional<sup>11</sup>, sendo um método ainda pouco elucidado, o que faz com que seja necessária a compreensão dos processos de formação inicial da nanopartícula.

A natureza da nanopartícula é determinada pelas etapas de nucleação e crescimento. O processo de formação de nanopartículas ocorre a partir de uma série de fases metaestáveis até atingir um estágio termodinamicamente mais estável. Nesse momento, átomos reduzidos no meio reacional dão origem aos *clusters*, até atingirem determinado tamanho de um núcleo estável. O menor raio para a formação de um núcleo estável é dado pelo raio crítico:

$$R_{\text{crit}} = \frac{2\gamma}{\Delta G_v} \quad (1.3)$$

Onde  $\gamma$  é o produto da energia livre de superfície e a área superficial e  $\Delta G_v$  é a energia livre de formação. A equação 1.3 mostra que quanto maior o valor de  $\gamma$ , maior o tamanho do núcleo crítico estável. A origem da energia livre pode ser explicada pela localização do átomo na matéria. A Figura 1.2 ilustra as forças que influem um átomo em duas regiões de um material.

A energia livre e a reatividade de uma unidade, seja ela um átomo, molécula ou qualquer outra espécie, que está na superfície, são significativamente diferentes daquela que se encontra no ‘bulk’ (unidade localizada na matéria estendida). Considerando uma unidade localizada no ‘bulk’, as forças atuantes, atrativas ou repulsivas, na média, são uniformes e, portanto, a força resultante é zero. Supondo que o ‘bulk’ seja clivado ao longo de um plano no vácuo, isotermicamente e reversivelmente, as forças atuantes não serão uniformes e, portanto, as forças resultantes em uma unidade não serão mais iguais à zero. Com a formação dessa nova superfície, a unidade possuirá uma energia diferente, assim a energia total deve alterar. Uma vez que a interação no ‘bulk’ resulta em uma diminuição da energia livre das unidades, a remoção dessas interações para a formação de uma nova superfície causa um aumento na energia livre das unidades componentes<sup>4</sup>, sendo um dos motivos pelos quais a superfície da partícula é altamente reativa.

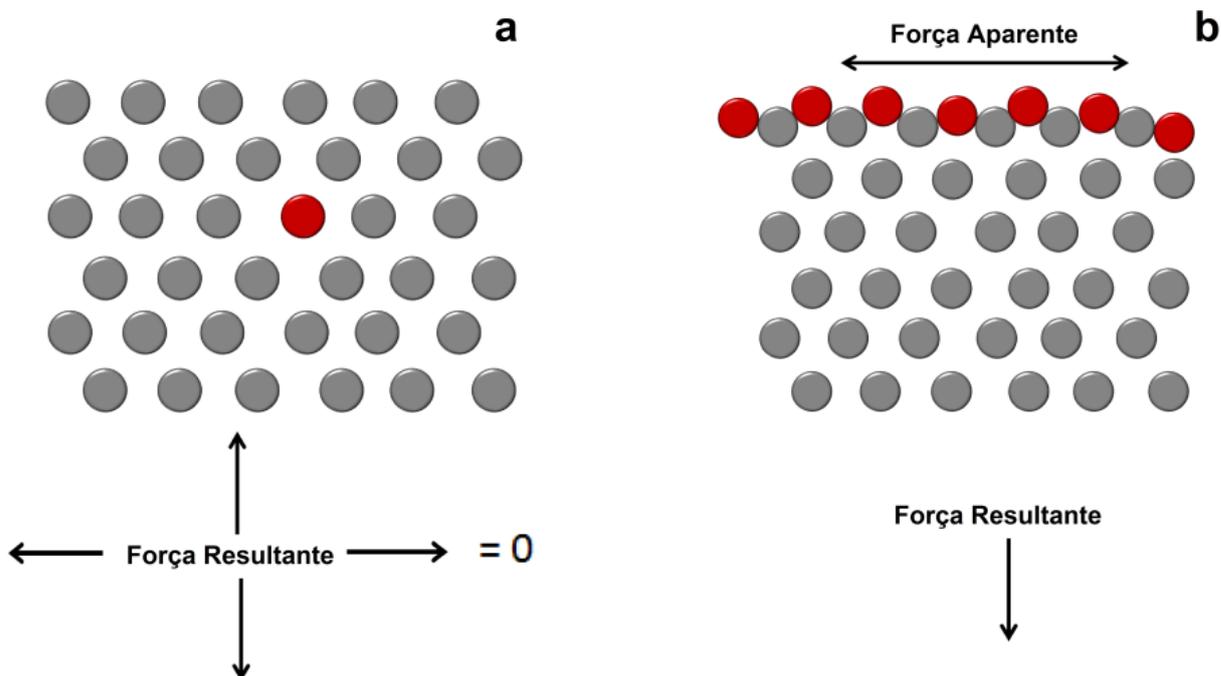


FIGURA 1.2 - Representação 2-D das forças atuantes em uma unidade (átomos, moléculas etc., em vermelho) no interior de uma fase. a) igual à zero, na fase 'bulk' e b) com uma resultante na superfície. Adaptado de Myers<sup>4</sup>.

Dois tipos de nucleação são possíveis: a nucleação homogênea e a nucleação heterogênea. A nucleação homogênea ocorre em uma única etapa. Nela, a concentração atinge uma condição de supersaturação crítica, o que permite um crescimento uniforme por difusão dos átomos reduzidos para o núcleo formado. Já para a nucleação heterogênea, com a formação de núcleos *in situ* (agentes nucleantes) sendo promotores do crescimento das partículas.

Depois da etapa de nucleação, dá-se início a etapa de crescimento, em que o soluto migra para a superfície do *cluster*<sup>12</sup>. É digno de nota que fatores como transporte de espécies reativas para a superfície da partícula, coalescência e agregação podem ocorrer competitivamente com a etapa de nucleação e crescimento das nanopartículas, fazendo com que se tenha uma larga distribuição de tamanho de partícula<sup>13-15</sup>. No entanto, esses fatores podem ser neutralizados por meio de uma variação de proporção de reagentes, por exemplo<sup>16</sup>.

Também, a busca por uma distribuição estreita de tamanho pode ser possível utilizando-se da maturação *de Ostwald* (ou *Ostwald ripening*), em que partículas menores são consumidas pelas partículas maiores por meio da dissolução daquelas em solução, com posterior redução do íon e migração para a superfície das grandes partículas<sup>17, 18</sup>.

### **1.3 - Estabilidade Coloidal**

As nanopartículas dentro de um meio líquido interagem frequentemente umas com as outras e a estabilidade da dispersão é determinada por essas interações<sup>4</sup>. Tendências comuns como agregação e coagulação podem ser observadas nas dispersões coloidais, uma vez que o sistema busca minimizar sua energia livre total (conforme comentado na seção anterior)<sup>19</sup>. Não havendo a presença de um estabilizante, por exemplo, devido principalmente às forças atrativas de van der Waals), as nanopartículas tendem a se agregarem. Forças contrárias a essas buscam promover a estabilidade da dispersão como forças repulsivas de mesma intensidade<sup>20</sup>. Para evitar a agregação, há a necessidade de se estabilizar a superfície da nanopartícula, que pode ser basicamente de forma eletrostática ou estérica<sup>21</sup>.

#### **1.3.1 - Estabilização Eletrostática**

Baseada na repulsão coulômbica entre partículas carregadas, a estabilização eletrostática é formada por uma dupla camada elétrica na superfície da nanopartícula. As nanopartículas adquirem cargas elétricas em sua superfície de

diferentes formas, seja pela alteração de algum parâmetro como a intensidade iônica do meio dispersivo, ou quando estão em contato com um meio líquido que pode conter um solvente polar, íons de surfactantes ou do meio<sup>4, 6, 19, 22</sup>. A presença de cargas elétricas, positivas ou negativas, na superfície da nanopartícula, faz com que sejam atraídas cargas elétricas opostas a essas, formando uma dupla camada elétrica, que é a responsável por proteger as partículas de aglomeração, uma vez que possuirão cargas iguais a camada elétrica mais exposta ao meio.

A teoria quantitativa desenvolvida independentemente por Deryagin e Landau, e Verwey e Overbeek, que mais tarde ficou conhecida como Teoria de Deryagin-Landau e Verwey-Overbeek (DLVO), envolve estimativas de energia de acordo com a sobreposição das duplas camadas elétricas (geralmente repulsão) e das energias de van der Waals (atrativas) em termos de distância interpartícula. A somatória resulta na energia total de interação em termos de distância interpartícula. Os seja, enquanto a força de repulsão de caráter eletrostático for maior que a de atração, as nanopartículas se mantêm estáveis e consequentemente, não agregam.

### **1.3.2 - Estabilização Estérica**

Uma segunda maneira de estabilizar as nanopartículas na dispersão coloidal é por meio da estabilização estérica. O impedimento espacial provocado pelo volume de macromoléculas (geralmente orgânicas como polímeros e copolímeros) ligadas as nanopartículas, promove a estabilização dessas na dispersão coloidal<sup>4</sup>. A estabilização estérica pode ocorrer de diferentes formas, dentre elas<sup>19</sup>:

- i) *O encontro de duas partículas envolvendo a dessorção do agente estabilizante no ponto de contato.* Dessorção é um processo que envolve energia livre positiva e corresponde a repulsão partícula- partícula e aumento de estabilidade;
- ii) *Colisão de partículas em que não há penetração de suas cadeias.* Este mecanismo reduz as configurações disponíveis para as moléculas do polímero adsorvidas, o que diminui a entropia e aumenta a energia livre e, por conseguinte, a estabilidade;
- iii) *Colisão entre partículas causa interpenetração de camadas adsorvidas, o que aumenta a quantidade de segmentos de macromoléculas.* Dependendo desta interpenetração, pode haver repulsão ou atração das cadeias. A longo-alcance, geralmente impera a repulsão e concomitantemente, a repulsão elástica.

Apesar das contribuições repulsivas, essas não garantem que as nanopartículas não agreguem. A somatória de todas as contribuições de repulsão e atração de partículas de natureza diferente ou igual é o que conferirá a estabilidade da dispersão coloidal.

## **1.4 - Síntese de Nanopartículas Metálicas**

Nanopartículas de metais de transição podem ser sintetizadas de duas formas: por métodos de decomposição ou por redução de sais.

Dando enfoque ao segundo método, a redução química de sais de metais de transição, visando à formação de dispersões coloidais em meio aquoso ou

orgânico, foi proposto pela primeira vez por Faraday<sup>23</sup> em 1857 e até hoje é o método mais empregado para síntese de nanopartículas metálicas<sup>24</sup>. Um sal metálico é reduzido utilizando um agente quelante em água ou em soluções orgânicas. O uso de agentes redutores em solvente não-redutores é uma rota sintética bem estabelecida. A síntese de nanopartículas de ouro<sup>25-27</sup> e platina (Pt)<sup>28</sup>, por exemplo, utiliza de diferentes agentes redutores e, variando parâmetros da síntese, como concentração de reagentes, temperatura e tempo, foi possível obter diferentes morfologias para as nanopartículas de Pt.

Nanopartículas metálicas podem ser sintetizadas por uma rota sintética subdividida em cinco etapas, conforme ilustrado na Figura 1.3<sup>6</sup>:

*Etapa 1:* Redução do precursor metálico (geralmente um sal), formando átomos reduzidos;

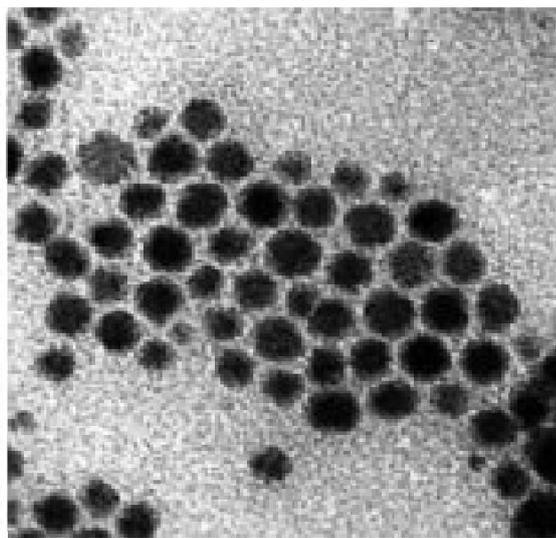
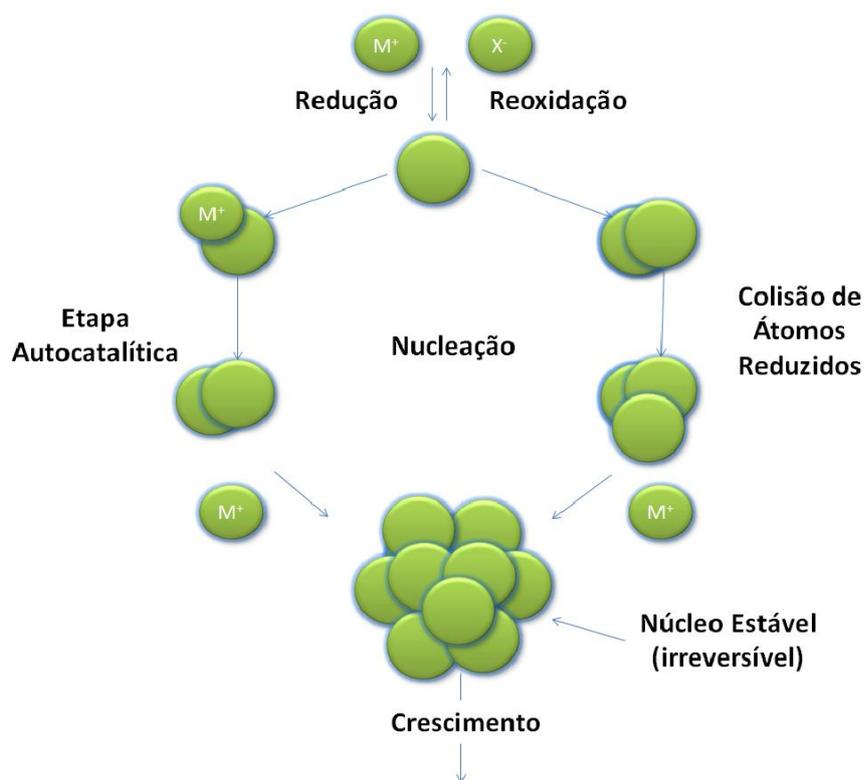
*Etapa 2:* Os átomos reduzidos interagirão com íons e *clusters* metálicos, etapa que o crescimento dos *clusters*; (Etapas 1 e 2 são reversíveis)

*Etapa 3:* Quando o *cluster* atinge o tamanho crítico, inicia-se a etapa de crescimento do núcleo formado;

*Etapa 4:* O tamanho de partícula pode ser controlado com o uso de agentes estabilizantes. O uso de um estabilizante torna as partículas isotrópicas, pois diminui a energia livre de superfície. No entanto, dois ou mais estabilizantes, pode ocorrer a formação de estruturas anisotrópicas pela adsorção preferencial de um dos estabilizantes;

*Etapa 5:* Pode-se evitar a agregação pela inserção de macromoléculas orgânicas na superfície.

Após a síntese das nanopartículas, essas podem ser utilizadas como blocos construtivos (*building blocks*) para diversas aplicações tecnológicas<sup>29, 30</sup>.



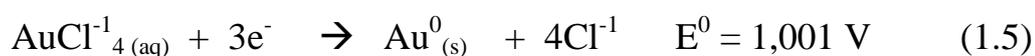
Dispersão Coloidal de nanopartículas metálicas  
Imagens de MET

FIGURA 1.3 - Resumo das etapas de síntese de nanopartículas metálicas.  
Adaptado de Bönneman<sup>24</sup>.

### 1.4.1 - Método Citrato

A primeira rota sintética controlada e reprodutível para nanopartículas de ouro foi estabelecida por TURKEVICH et al.<sup>25</sup>. Conhecida também como Método Citrato, o Método de Turkevich foi proposto em 1951 para a síntese de nanopartículas de ouro e, mais tarde, foi amplamente utilizada para a síntese de outras nanopartículas metálicas<sup>24</sup>.

Nessa reação de oxirredução em meio aquoso, íons ouro (III) são reduzidos pelo citrato, que atua como agente redutor e estabilizante. Pode-se utilizar como precursor um sal de ouro, como o tetracloreto ácido de ouro (HAuCl<sub>4</sub>). Para a síntese de nanopartículas de ouro, não é necessário altas temperaturas (embora seja utilizada), entretanto, para platina e prata é necessário temperaturas próximas a de ebulição da água. Isso porque comparativamente, o potencial de redução do ouro é maior que a da prata, por exemplo.



Geralmente, o sal precursor para a síntese de nanopartículas de prata é o nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>).

O amplo uso do Método de Turkevich está associado ao fato dele ser atóxico, de simples manipulação, fácil execução, baixo custo, rápido, seguro e reprodutível<sup>9, 27, 31-37</sup>. Também, as nanopartículas formadas possuem boa

homogeneidade no tamanho e dispersão das nanopartículas, com tamanho em torno de 20 nm.

## **1.5 - Interdisciplinaridade: Química, Ciência de Materiais e Biotecnologia e o Uso de *Biotemplates***

A Química é considerada a ciência central para o desenvolvimento de ciências aplicadas como a Ciência de Materiais e a Biotecnologia. A Ciência de Materiais, por sua vez, baseada no campo de ciências aplicadas e de tecnologia, levou a grandes avanços na área de materiais modernos e inteligentes. A fusão da Biotecnologia com a Química e Ciência de Materiais, abriu novas perspectivas no campo de materiais considerados inteligentes e funcionais, auxiliando áreas como o setor de comunicação, sensores, catálise e de saúde<sup>38-40</sup>.

Dentre esses materiais funcionais e inteligentes estão os materiais estruturados utilizando sistemas biológicos, que podem ser basicamente de quatro tipos (Figura 1.4):

1. Biomiméticos: Imitação da natureza pelo uso de métodos tradicionais e sintéticos;
2. Bioinspirados: Utilização de estruturas biológicas originando uma nova classe de materiais;
3. Biomateriais: Materiais biológicos/sintéticos que interagem com o organismo humano;
4. Materiais Híbridos: orgânico-orgânico, orgânico-inorgânico, inorgânico-inorgânico.

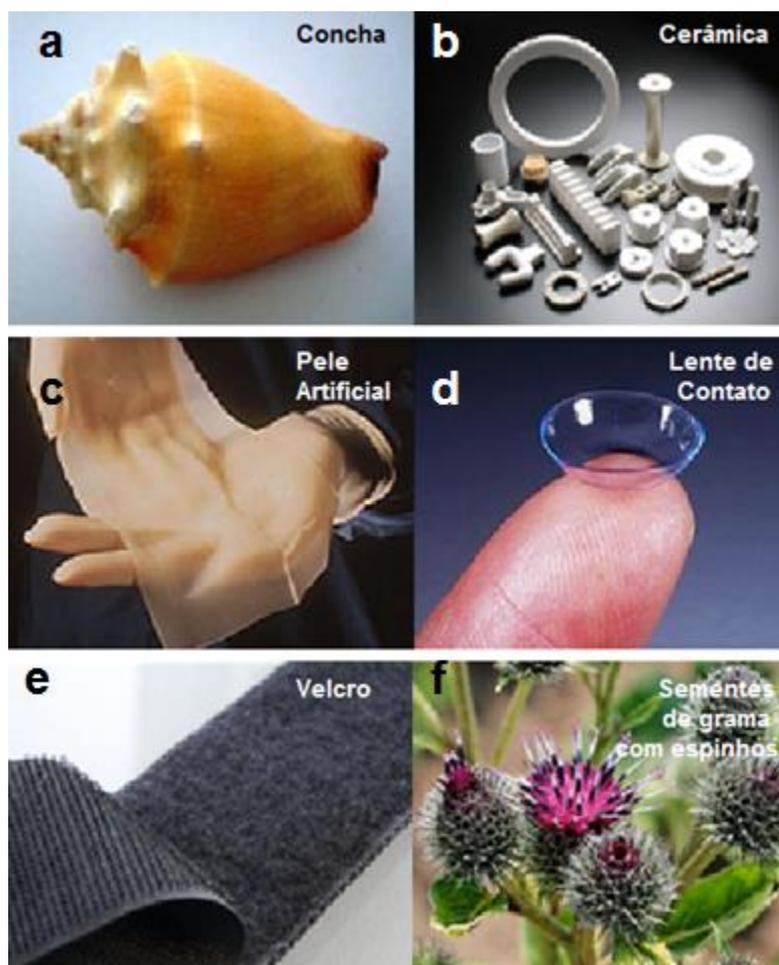


FIGURA 1.4 - Imagens de materiais estruturados que utilizam sistemas biológicos em alguma etapa da sua produção. a) e b) exemplo de material bioinspirado, a concha e os materiais cerâmicos de alta dureza; c) e d) exemplos de biomateriais como a pele artificial e a lente de contato, e por fim, e) e f) exemplos da classe dos materiais biomiméticos. Imagens retiradas da web.

Existem muitos trabalhos na área de biomimética<sup>41-44</sup> e engenharia bioinspirada<sup>45-47</sup>; referentes à formação de sistemas estruturados inorgânicos utilizando materiais orgânicos aplicados em campos da engenharia e tecnologia para desenvolvimento de materiais que inicialmente, em alguma etapa da sua construção, remetem à natureza<sup>48</sup>.

A nanotecnologia é considerada base para a construção de estruturas tridimensionais inorgânicas que utilizam *biotemplates*<sup>49</sup>. E cada vez mais,

pesquisadores nessa área encontram na natureza um modelo útil para superar os desafios de design e fabricação, uma vez que essas estruturas biológicas são o resultado de milhões de anos de evolução, seus formatos possuem méritos únicos.

Um dos campos da ciência que vem atraindo a atenção é o de materiais micrométricos e nanométricos construídos a partir de *biotemplates*. *Biotemplates*, como o próprio nome diz, são modelos, gabaritos que utilizam estruturas orgânicas. O potencial uso desses materiais associado a sua morfologia complexa e não usual, colocam esses materiais em posição de destaque na química de materiais com especial destaque para os materiais estruturados a partir de DNA<sup>50</sup>, bactérias<sup>51</sup> e fungos<sup>38</sup>. A boa reprodutibilidade, associada à elevada variedade de estruturas e ao alto controle morfológico, tornam esses materiais uma alternativa para suprir as limitações dos materiais convencionais.

Sistemas biotecnológicos, nanotecnológicos e supramoleculares podem variar de alguns nanômetros até cerca de um micrômetro, o que torna possível a compatibilidade 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 auto-organizados híbridos, podendo ser sintetizados em grandes quantidades, com diferentes tamanhos e formas, empregando técnicas simples e bem estabelecidas na literatura<sup>52-54</sup>. Contudo, o acoplamento de biomoléculas ou sistemas biológicos à superfície das nanopartículas inorgânicas ainda é uma tarefa difícil e limitada a poucas metodologias. Geralmente, a síntese das nanopartículas ocorre na presença de agentes estabilizantes como citratos, fosfatos ou tióis, responsáveis pela estabilidade coloidal das nanopartículas, prevenindo a agregação e o crescimento descontrolado. Nos casos das nanopartículas estabilizadas por

ligantes aniônicos, a estabilização das nanopartículas ocorre por meio de interações eletrostáticas de tal forma que a adição de outros eletrólitos pode resultar na floculação devido à modificação na dupla camada elétrica<sup>40</sup>.

Existem vários trabalhos nos quais cadeias poliméricas sintéticas, fibras naturais ou DNA foram empregados como *templates* para a preparação de materiais híbridos usando nanopartículas coloidais sintéticas como unidades de construção, todavia, ainda são poucos os estudos sobre o uso de sistemas biológicos vivos como *templates*<sup>40, 55-58</sup>. Microorganismos como vírus, bactérias ou fungos exibem estruturas extremamente complexas e definidas que podem ser reproduzidas fácil e rapidamente a um custo relativamente baixo quando comparado a outras tecnologias, o que os tornam atrativos para serem utilizados como *templates* na preparação de materiais avançados<sup>49</sup>. Nestes sistemas, é possível combinar a uniformidade das estruturas biológicas com as propriedades funcionais das nanopartículas inorgânicas (condutividade elétrica, atividade óptica ou características magnéticas) para construir macroestruturas híbridas funcionais de grande apelo tecnológico<sup>59</sup>.

LI et al.<sup>49</sup> empregaram com sucesso fungos da espécie *Aspergillus niger* como *templates* para a obtenção de estruturas ordenadas de nanopartículas de ouro (aproximadamente 13 nm) cuja superfície foi funcionalizada com uma sequência de DNA, inoculando os esporos dos fungos em um meio de cultivo com a presença das nanopartículas. Segundo estes autores, após a germinação dos esporos, as nanopartículas em suspensão se depositaram sobre a parede celular dos fungos, formando monocamadas sobre as hifas em crescimento, o que foi acompanhado pela visível descoloração do meio aquoso. Em outro trabalho, SUGUNAN et al.<sup>59</sup> sintetizaram nanopartículas de ouro usando glutamato monossódico ao invés de citrato de sódio, seguido da inserção de esporos de diferentes fungos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* e

*Neurospora crassa*). O crescimento dos fungos foi garantido pela presença de um excesso de glutamato de sódio, que veio servir tanto para a estabilização das nanopartículas quanto como nutriente para os fungos. O mecanismo de auto-organização observado ocorreu pela formação de aglomerados de nanopartículas devido à desestabilização do meio coloidal por meio da modificação da concentração de eletrólitos, o que ocasionou uma alteração na dupla camada elétrica das nanopartículas. Esses aglomerados se depositaram sobre a parede celular dos fungos em crescimento, mostrando a importância do controle sobre o meio coloidal no mecanismo de formação de sistemas auto-organizados. Ao que parece, a primeira camada de nanopartículas depositadas sobre a superfície dos fungos resultou da contribuição entrópica dos efeitos hidrofóbicos das nanopartículas de ouro e dos fungos<sup>60</sup>, contudo os mecanismos de formação da primeira camada e das camadas posteriores ainda não foram totalmente elucidados. Por outro lado, BIGALL et al.<sup>38</sup> mostraram a habilidade de diversos fungos crescerem em um ambiente rico em citrato e testaram a afinidade das nanopartículas de ouro, prata, paládio e platina pela parede celular dos fungos sem a presença de qualquer tipo de funcionalização, tendo sido observado que o sistema híbrido fungo-platina exibiu a capacidade de catalisar a reação redox do hexacianoferrato(I).

## **1.6 – Fungos: Breve Histórico Mundial e a Pesquisa no Brasil**

Há muito tempo, foi reconhecida a importância de se ter uma lista contendo as espécies de fungos e plantas conhecidas pela ciência<sup>61</sup>. Em meados do século XVIII, o interesse em estimar a flora mundial instigou Linnaeus (1753)<sup>62</sup> que estimou em 10.000 o número de espécies de plantas no planeta.

Uma vez que a dificuldade de compilar os dados registrados de espécies de plantas e fungos era grande, aliada a falta de informações sólidas, o número de espécies registradas e as estimadas (espécies que ainda seriam descritas), até então, variou bastante até o início do século XXI.

Grande parte da biodiversidade mundial concentra-se nas regiões tropicais. No final da década de 1980, o conceito de “países megadiversos” foi difundido para esses países que embora fossem poucos, possuíam uma alta biodiversidade. Países como República Democrática do Congo, Colômbia, México, Madagascar, Indonésia e o Brasil estão inclusos nessa lista. Hoje, 17 países são considerados megadiversos<sup>63, 64</sup>.

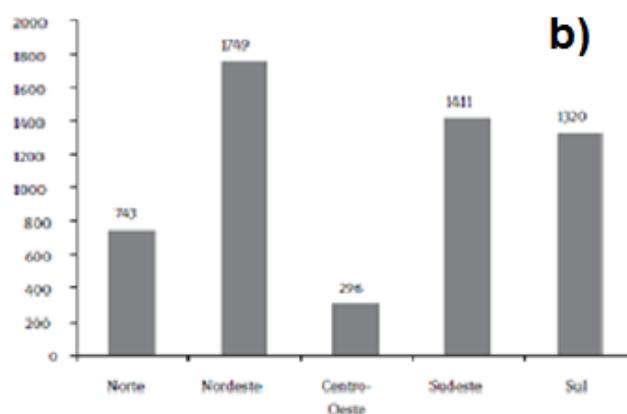
Estima-se que hoje existam 1.500.000 espécies de fungos no mundo<sup>65, 66</sup> sendo que dentre esses, aproximadamente 99.000 estão descritas, representando 6,6 % da quantidade total<sup>65</sup>. Dentre os descritos, LEWINSOHN & PRADO<sup>67</sup> estimam que cerca de 13.800 espécies de fungos existam no Brasil, representando 14 % da diversidade mundial. No entanto, devido à dificuldade ainda existente de se organizar os dados de registro e descrição dos fungos encontrados na flora brasileira, bem como a sincronização dos dados dos inúmeros pesquisadores brasileiros, o Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil<sup>68</sup>, obra produzida por pesquisadores de diferentes regiões do Brasil, tem registrado e descrito apenas 3.608 espécies de fungos, o que significa que apenas 3,7 % da quantidade mundial compõe esse catálogo, porcentagem bem distante dos 14 % que foram estimados por LEWINSOHN & PRADO<sup>67</sup>.

A Figura 1.5 mostra, em termos de unidades de Federação e região, a quantidade de espécies de fungos registrada e descrita. Lideram em número de espécies os estados de São Paulo (1.161), Pernambuco (937) e Rio Grande do Sul (856). Com as menores quantidades, tem-se Maranhão (52), Espírito Santo (45) e Tocantins (5). Em termos de região, observa-se que as regiões Norte e Centro-

Oeste possuem a menor quantidade de espécies descritas (743 e 296, respectivamente). De acordo com os autores do Catálogo, essas diferenças remetem a baixa quantidade de coletores e estudiosos na área de fungos dessas regiões.

ESTADO	NUMERO DE ESPÉCIES
São Paulo	1.161
Pernambuco	937
Rio Grande do Sul	856
Bahia	584
Paraná	529
Santa Catarina	482
Rio de Janeiro	443
Amazonas	408
Minas Gerais	399
Pará	302
Alagoas	290
Paraíba	261
Sergipe	215
Rio Grande do Norte	148
Piauí	139
Mato Grosso	135
Rondônia	116
Ceará	106
Goiás	104
Amapá	88
Mato Grosso do Sul	82
Distrito Federal	77
Roraima	75
Acre	61
Maranhão	52
Espírito Santo	45
Tocantins	5

a)



b)

FIGURA 1.5 - Número de espécies de fungos no Brasil em que a) refere-se ao número de espécies de fungo por Estado e b) número de espécies de fungos registrados em cada região do país. Ambos retirados do Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil<sup>68</sup>.

## 1.7 – Fungos: Classificação Filogenética, Estrutura e Desenvolvimento

A classificação mais recente dos fungos, proposta por HIBBETT et al.<sup>69</sup> é baseada em estudos filogenéticos e divide o reino *Fungi* nos seguintes filos: Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota, não reconhecendo Zygomycota como sendo filo e, portanto, separam-no em quatro subfilos, a saber, Mucoromycotina, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina e Entomophthoromycotina. Dessa forma, atualmente são considerados sete filos, 10 subfilos, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens.

A versatilidade de adaptação desses organismos os torna capaz de viver desde ambientes aquáticos a terrestres, dos trópicos quentes às regiões árticas e antárticas mais frias, podendo ser microscópicos ou visíveis a olho nu e reconhecidos facilmente devido às suas características bem peculiares, como por exemplo, no formato de bolor, mofo, cogumelos etc.<sup>68</sup>.

Fungos são microrganismos eucarióticos (DNA envolto por uma membrana nuclear) que podem ser unicelulares ou pluricelulares. Os fungos pluricelulares possuem estruturas filamentosas, as hifas. As hifas podem ser septadas ou não-septadas (cenocíticas). Os septos são paredes transversais que derivam das estruturas filamentosas. No caso das hifas septadas, há vários núcleos dispersos no citoplasma. Já as hifas não-septadas, estas podem ser de dois tipos: mononucleadas ou multinucleadas. As mononucleadas possuem apenas um núcleo separado por um septo transversal e as multinucleadas possuem dois ou mais núcleos. Todavia, embora haja essa divisão, existe um orifício central em cada septo que permite a troca de material citoplasmático e

de núcleos entre os compartimentos, portanto, mesmo as hifas septadas podem ser consideradas cenocíticas. Vale ressaltar que a maioria dos fungos possuem núcleos haploides. A livre ramificação e entrelaçamento das hifas formam o corpo do fungo chamado de micélio. Durante a fase reprodutiva, o micélio forma estruturas assexuadas e/ou sexuadas que originarão os esporos, responsáveis pela propagação das espécies. A grande maioria dos fungos se reproduz através de esporos, sendo que um pequeno fragmento do fungo é capaz de formar um novo indivíduo<sup>70, 71</sup>. O micélio e os esporos podem ser observados na Figura 1.6.

O sentido de crescimento das hifas, de acordo com a morfologia de desenvolvimento do micélio, ocorre somente em uma direção e partindo das extremidades das hifas. As células presentes no interior do micélio geralmente não contribuem diretamente para um novo crescimento, embora elas forneçam nutrientes para as células periféricas. Portanto, o crescimento não é em função do número de células, tal como em bactérias, mas do número de extremidades de hifas e de nutrientes fornecidos<sup>72</sup>.

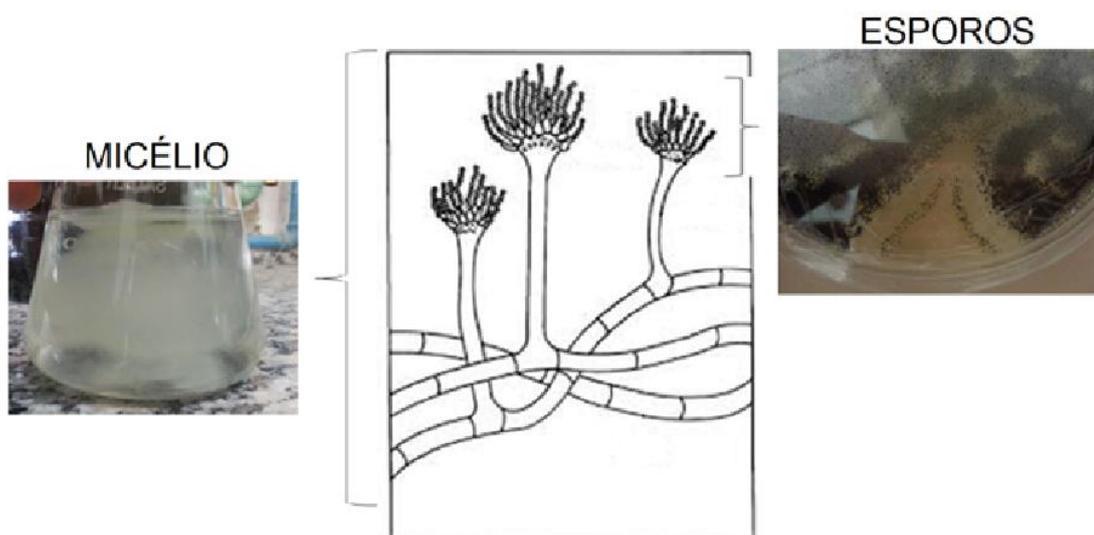


FIGURA 1.6 - Fotografia digital e esquema do micélio e esporos do fungo *Aspergillus aculeatus*. Adaptado de STEVENSON<sup>70</sup>.

A parede da hifa é uma estrutura altamente dinâmica às mudanças constantes as quais está exposta e desempenha um papel de destaque no crescimento e manutenção do fungo, visto que é a responsável por prover a resistência mecânica necessária ao sofrer grandes variações de pressão osmótica, bem como a plasticidade adequada para a germinação dos esporos, a ramificação das hifas e a formação dos septos nos fungos filamentosos<sup>73, 74</sup>. Basicamente, a parede celular fúngica é composta de camadas de fibras (principalmente glucana e quitina) que podem estar dispostas na forma de longas cadeias retas ou ramificadas (tipicamente quitina e 1,3-β- e 1,6- β-glucana), e de uma matriz do tipo ‘gel’ ou material cristalino (tais como manoproteínas e glicoproteínas)<sup>70, 74</sup>. Vale ressaltar que há evidências de *cross-linking* entre quitina, glucana e outros componentes da parede celular, o que confere maior rigidez na parede celular<sup>75, 76</sup>. Essa estrutura complexa pode variar entre os tipos de fungo<sup>73</sup>. Os filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota, por exemplo, possuem a parede celular composta em sua maior parte de quitina, diferentemente do filo Oomycota, em que é praticamente ausente em sua composição, constituído em sua maior parte de glucanas<sup>77</sup>.

Todos os fungos são heterotróficos, isto é, não produzem seu próprio alimento, sendo que a forma comum de nutrição é por meio de absorção, seja essa por osmose ou difusão. A obtenção do alimento se dá principalmente de duas formas: ao infectar organismos vivos como parasitas ou por uma relação mutualística simbiótica (interação entre dois organismos em que ambos são beneficiados), ou ao decompor matéria orgânica morta, conhecido como organismos saprófitos<sup>71, 78</sup>.

Uma característica importante dos fungos é que são capazes de se desenvolver e reproduzir em meios de culturas artificiais. Havendo disponível uma fonte de carboidrato, tais como glicose, sacarose, maltose etc., nitrogênio

(inorgânico ou orgânico) e sais minerais relacionados a seu crescimento, os fungos podem sintetizar suas próprias proteínas. A maioria dos fungos utilizam C, O, H, N, K, Mg, P, B, Mn, S, Fe, Zn, Cu e Mo como elementos principais de necessários para seu crescimento.

Há uma faixa de temperatura ideal para o desenvolvimento e crescimento do fungo, sendo para maioria das espécies entre 22 °C e 30 °C. O pH ótimo para o desenvolvimento da maioria das espécies está em torno de 5,6. A Tabela 1.1 mostra valores limites e ótimos para pH, temperatura, gases, luz, carboidrato e fonte de carbono para fungos. Embora esses valores abranjam uma alta faixa, nota-se que há um valor considerado ideal para cada exigência<sup>72,78</sup>.

TABELA 1.1 - Valores limites e ótimos das exigências fisiológicas/nutritivas dos fungos.

<b>Exigências</b>		<b>Fungos</b>
<b>pH</b>	Limite	2 – 9
	Ótimo	5,6
<b>Temperatura</b>	Limite	0 – 62 °C
	Ótimo	22 – 30 °C
<b>Gases</b>		Aeróbios estritos
<b>Luz</b>		Não há
<b>% Carboidrato</b>		4 %
<b>Fonte de Carbono</b>		Heterotrófico

## 1.8 - O Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* faz parte do filo Ascomycetes que contém cerca de 150 espécies catalogadas. Possui coloração branca amarelada cujos esporos são marrons ou pretos e foi catalogado pelo padre italiano e biólogo Pier Antonio Micheli em 1729<sup>79</sup>.

As espécies do gênero *Aspergillus* são aeróbicas, assim, desenvolvem-se em ambientes que contém oxigênio em grande quantidade. São importantes agentes decompositores, atuando como saprófitas do solo e de alimentos, embora também sejam encontrados como parasitas de animais, plantas e do homem (cerca de 20 espécies podem ser prejudiciais ao homem, podendo desenvolver doenças como a aspergilose, causada pelo *Aspergillus fumigatus*). Apesar de alguns aspectos negativos, como por exemplo, a produção de toxinas em alimentos e de espécies patogênicas, algumas espécies são importantes economicamente, uma vez que atuam na produção comercial de ácido cítrico e glucônico, produção de alimentos fermentados e como fontes de enzimas<sup>79, 80</sup>.

## 1.9 - A Espécie *Aspergillus aculeatus* Lizuka do LaBioMMi

Na presente dissertação de mestrado, foi utilizada como *biotemplate* a espécie de fungo *Aspergillus aculeatus*, isolada previamente como um endófito das folhas espécie de planta *Melia azedarach* (Meliaceæ), codificado como LaBioMi-001, constituindo a micoteca do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos, Departamento de Química da

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob responsabilidade do Prof.  
Dr. Edson Rodrigues Filho<sup>80</sup>.

## 2 - OBJETIVOS

Nesta Dissertação de Mestrado, foi realizado um estudo da influência da temperatura e da concentração de citrato no tamanho médio das nanopartículas de ouro. Também, foram preparados microtubos compostos de nanopartículas de ouro e de prata com tamanho controlado e sintetizados pelo Método de Turkevich a partir do uso de fungos filamentosos como *biotemplates*. Estas mesoestruturas complexas foram caracterizadas em relação ao tamanho das partículas e em relação à formação de multicamadas.

O *Objetivo Central* dessa Dissertação de Mestrado é formar dois tipos de microtubos contendo multicamadas de diferentes nanopartículas, isto é: microtubos contendo multicamadas de tamanhos diferentes de nanopartículas de ouro e microtubos contendo multicamadas combinadas de nanopartículas metálicas de ouro e de prata: multicamadas com primeiramente nanopartículas de ouro e depois prata, multicamadas com primeiramente nanopartículas de prata e depois ouro, e uma mistura coloidal de ambas as nanopartículas metálicas.

Desta forma, é possível definir os seguintes *Objetivos Específicos*:

2.1. Obter dispersões coloidais estáveis de nanopartículas de ouro e de prata com tamanho de partícula controlado e estreita distribuição de tamanho de partículas empregando o Método de Turkevich utilizando o citrato de sódio como agente de estabilização e redutor. Caracterizar as dispersões coloidais por meio de espectroscopia de absorção UV-Visível, difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura;

2.2. Avaliar o efeito da temperatura e da concentração de citrato no tamanho médio das nanopartículas de ouro. Caracterizar as dispersões coloidais por espectroscopia de absorção UV-Visível, difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura;

2.3. Obter microtubos compostos de nanopartículas metálicas com espessura e diâmetro controlados a partir das suspensões de nanopartículas de ouro e de prata utilizando fungos filamentosos crescidos em diferentes meios de cultura como *biotemplates*. Caracterizar os microtubos empregando microscopia eletrônica de varredura com microanálise por EDS.

### **3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

As dispersões coloidais de ouro e de prata foram preparadas utilizando o método de síntese originalmente proposto por Turkevich<sup>25</sup>. Todos os reagentes e solventes foram utilizados conforme recebidos. A água utilizada foi destilada e deionizada utilizando um equipamento Millipore Elix-3. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Todos os materiais utilizados (placa de aquecimento, frascos de Erlenmeyers, provetas, pipetas, dentre outros) para a síntese das dispersões coloidais foram previamente esterilizados utilizando álcool etílico 70 % com posterior exposição à luz ultravioleta por 40 minutos. Os procedimentos de preparação do material híbrido, incluindo os procedimentos de preparo das dispersões coloidais de ouro e de prata foram realizados em capela de fluxo laminar rigorosamente esterilizada com hipoclorito de sódio, álcool etílico 70 % e luz ultravioleta visível por 30 minutos com o intuito de evitar a contaminação por outros fungos e bactérias presentes no ar atmosférico, garantindo a presença de apenas um microorganismo dentro do fluxo laminar.

Dois tipos de microtubos foram propostos nessa Dissertação de Mestrado. Para a construção desses microtubos, foram avaliadas três condições de síntese de nanopartículas de ouro. Para as nanopartículas de prata, a síntese deu-se pela rota convencional do Método de Turkevich.

#### **3.1 - Síntese e Caracterização das Dispersões Coloidais de Ouro**

Foram preparadas soluções-estoque de tetracloreto ácido de ouro e citrato de sódio com concentração de  $5,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> e  $3,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>,

respectivamente. As duas soluções-estoque bem como 2100 mL de água destilada e deionizada foram autoclavadas na temperatura de 120 °C por 30 minutos.

As dispersões coloidais de ouro foram sintetizadas sem a adição de nenhuma outra biomolécula para a funcionalização da superfície das nanopartículas.

Foram avaliadas três condições de síntese de nanopartículas de ouro, sendo essas: o efeito da concentração de citrato no tamanho médio das nanopartículas, o efeito da temperatura no tamanho médio das nanopartículas (essas duas primeiras condições visando à formação de microtubos contendo multicamadas de tamanho diferente de nanopartículas) e a síntese de nanopartículas de ouro visando a formação de multicamadas combinadas de nanopartículas metálicas de ouro e de prata. Dessa forma, três diferentes procedimentos foram realizados para a síntese das nanopartículas de ouro, em que diferentes parâmetros foram adequados para a realização de cada uma.

### **3.1.1 - Síntese de Nanopartículas de Ouro: Efeito da Concentração de Sal de Citrato**

Para avaliar o efeito da concentração do sal de citrato no tamanho médio das nanopartículas de ouro, a relação do sal de citrato e do  $\text{HAuCl}_4$  utilizada foi de 4,5:1 e 3,5:1. Essas variações foram estabelecidas, pois estão acima do valor considerado ótimo para a formação de nanopartículas de ouro de 20 nm (relação de 3:1, bem estabelecido na literatura<sup>81</sup>). A fim de formar tamanhos menores de nanopartículas, a hipótese dessa Dissertação seria aumentar a concentração de

citrato no meio. Portanto, após 4 minutos, a dispersão coloidal foi resfriada com auxílio do banho de gelo até a temperatura de 25 °C.

### **3.1.2 - Síntese de Nanopartículas de Ouro: Efeito da Temperatura**

Para avaliar o efeito da temperatura no tamanho das nanopartículas de ouro, foi realizado o procedimento descrito para a síntese de nanopartículas de ouro visando a formação de multicamadas, entretanto, as temperaturas de síntese dessa etapa foram 40 °C, 60 °C e 80 °C.

### **3.1.3 - Síntese de Nanopartículas de Ouro: Formação de Camadas**

Nesse experimento, foi realizada a síntese convencional do Método de Turkevich, em que 300 mL de água destilada e deionizada, previamente autoclavada (condições de autoclavagem já descritas no início dessa seção), foram aquecidas a temperatura de 90 °C, sob agitação mecânica constante, utilizando uma barra magnética. Em seguida, foram adicionadas 6 mL de HAuCl<sub>4</sub> (concentração  $5,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>). Instantes depois da adição do precursor de ouro (III), 3 mL de citrato de sódio (concentração  $3,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>) foi adicionado. Após 4 minutos, a reação foi retirada do aquecimento e resfriada até 25 °C utilizando um banho de gelo.

### **3.2 - Síntese e Caracterização das Dispersões Coloidais de Prata**

Todos os devidos procedimentos de assepsia mencionados no procedimento 3.1 foram cuidadosamente tomados para que não houvesse a contaminação das dispersões coloidais por microorganismos afins.

Soluções estoque de nitrato de prata e citrato de sódio foram previamente preparados com concentração de  $1,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup> e  $3,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. O procedimento de síntese das dispersões coloidais de prata é o mesmo descrito para a síntese de dispersões coloidais de ouro, no entanto, a temperatura de síntese foi de 95 °C e não houve variação na concentração do citrato de sódio e da temperatura.

### **3.3 - Cultivo e Crescimento dos Fungos**

O fungo utilizado nesse trabalho, *Aspergillus aculeatus*, foi analisado em estudos preliminares e apresentou bons resultados em relação à formação de macroestruturas, sendo este fornecido pelo Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos (LaBioMMi – Departamento de Química – UFSCar). O fungo selecionado para este Projeto de Pesquisa foi previamente isolado e depositado na micoteca do LaBioMMi. Foi preparado o inóculo do fungo em uma placa de Petri contendo como meio de cultura o PDA (batata-dextrose-ágar) sob condições assépticas (Figura 3.1 a) e b)). Após o crescimento do inóculo, foram preparados 12 frascos de Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio de cultura, cada. O meio de cultura utilizado, CZAPECK (DSMZ

130 modificado, sem ágar), foi preparado sob condições ideais de assepsia, cuja composição está descrita na Tabela 3.1.

Todos os frascos de Erlenmeyer contendo 25 mL do meio de cultura foram autoclavados a temperatura de 120 °C por 30 minutos. As bocas dos frascos de Erlenmeyer foram fechados com uma “boneca”, confeccionada utilizando pano e algodão, e um ‘chapéu’ feito de papel pardo, para evitar possíveis contaminações (Figura 3.2).

TABELA 3.1 - Composição química do meio de cultura CZAPEK, utilizado no cultivo e crescimento do fungo *Aspergillus aculeatus*.

<b>CZAPEK</b>	
<i>Composto</i>	<i>Massa (g)</i>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,005
NaNO <sub>3</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25
KCl	0,25
FeSO <sub>2</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,005
Sacarose	15,0
Volume 500 mL	



FIGURA 3.1 - Imagens das etapas de preparo dos inóculo. a) Placa de Petri antes da adição dos esporos para desenvolvimento do inóculo; b) placa de Petri após o crescimento dos esporos e c) suspensão de esporos preparados a partir da placa de Petri.



FIGURA 3.2 - Frasco de Erlenmeyer de 125 mL fechado com a) ‘boneca’ de pano e algodão e o ‘chapéu’ de papel pardo; b) separadamente a ‘boneca’ de pano e algodão e o ‘chapéu’ de papel pardo.

Depois dos frascos serem resfriados à temperatura ambiente, esses foram posicionados na capela de fluxo laminar e expostos a luz ultravioleta por 40

minutos. Passado esse tempo, foi preparada uma suspensão de esporos do fungo *Aspergillus aculeatus* em água deionizada previamente autoclavada e resfriada (Figura 3.2) e inoculado 150  $\mu$ L dessa suspensão de esporos no meio de cultura CZAPECK.

Após a inoculação dos esporos do fungo no meio de cultura, os frascos foram armazenados em local arejado e protegido da luz. Depois de dois a três dias, a massa micelial cresceu dentro da solução e na superfície. Nessa etapa essa massa micelial da superfície foi retirada e o meio de cultura foi diluído com água destilada até o volume de 100 mL. Os frascos foram armazenados por cerca de três dias. Nesse período, o fungo imerso no meio cresceu formando uma estrutura semelhante a uma maço de algodão (Figura 3.3).

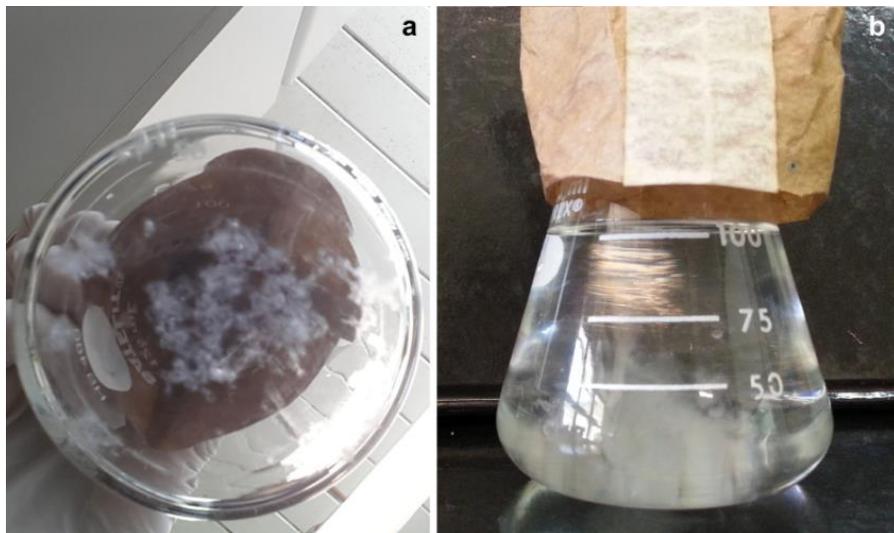


FIGURA 3.3 - Desenvolvimento das hifas no meio de cultura. a) hifas visíveis a olho nu após dois dias e b) massa micelar final com formato semelhante a um maço de algodão.

### **3.4 - Preparação e Caracterização das Mesoestruturas Híbridas**

Em um período de quatro a seis dias após a inoculação dos esporos no meio de cultura, foi removido praticamente todo o meio de cultura diluído, restando de 5 a 10 mL desse meio e a massa micelial do fungo.

Foi analisada a influência da concentração do citrato de sódio e da temperatura no tamanho médio de nanopartículas de ouro. Na segunda etapa dos experimentos, foram avaliados os microtubos construídos com múltiplas camadas, sendo a primeira de nanopartículas de ouro e recobertas com uma segunda camada de prata. Também foram preparadas amostras com a primeira camada de nanopartículas de prata recobertas com nanopartículas de ouro e, por fim, microtubos contendo multicamadas de uma mistura de nanopartículas de ouro e de prata.

Para analisar a influência da concentração do citrato de sódio, em cada frasco de Erlenmeyer contendo a massa micelial, foram adicionados 100 mL da dispersão coloidal de ouro já descrita no procedimento (Seção 3.1.). Após quinze dias da massa micelial estar em contato com a dispersão coloidal de nanopartículas de ouro, o meio foi removido e caracterizado. O procedimento foi o mesmo para ambas as dispersões coloidais sintetizadas com diferentes concentrações de citrato.

Para o experimento de formação de multicamadas, nos frascos de Erlenmeyer contendo a massa micelial do fungo foram adicionados 100 mL da dispersão coloidal de ouro previamente preparada (descrito no procedimento 3.1) em cada frasco de Erlenmeyer (foram feitos em triplicata), iniciando a etapa de recobrimento das hifas pelas nanopartículas de ouro. Após um período de

quinze dias, as nanopartículas de ouro foram retiradas e foram adicionadas 100 mL da dispersão coloidal de prata. O procedimento para recobrimento iniciando pelas nanopartículas de prata foi realizado da mesma forma, sendo que após quinze dias, foram adicionados 100 mL da dispersão coloidal de ouro. Também, foi realizado o mesmo procedimento para os microtubos formados pela mistura coloidal das duas nanopartículas. Para ambos os experimentos, após quinze dias de adição da segunda dispersão coloidal, essa foi retirada e caracterizada por MEV e microanálise (EDS). O tempo de quinze dias foi estabelecido, uma vez que por estudos prévios, esse era o tempo necessário para que houvesse um bom recobrimento das hifas. O esquema abaixo (Figura 3.4) apresenta ilustrativamente as etapas de recobrimento das hifas pelas nanopartículas. O mesmo se aplica no procedimento em que o primeiro recobrimento é de nanopartículas de prata.

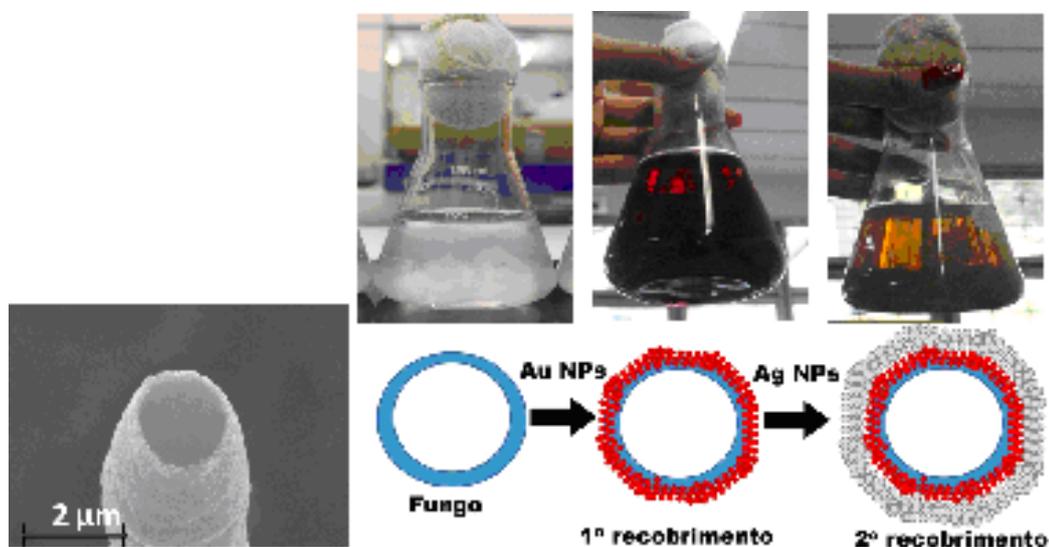


FIGURA 3.4 - Esquema ilustrativo e fotos das etapas de formação do material híbrido composto por multicamadas de nanopartículas de ouro e de prata.

Foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (Zeiss FEG Supra 35 e Zeiss MEV DSM 940A com EDS para microanálise) os microtubos contendo nanopartículas de ouro e prata e nanopartículas de ouro com tamanhos diferentes.

## **4 - MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO**

### **4.1 - Difração de Raios X**

As nanopartículas de ouro e de prata foram caracterizadas por difração de raios X com o objetivo de caracterizar as estruturas cristalinas. Para tal, foi utilizado 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  $0,2 \text{ min}^{-1}$  em  $2\theta$  e acumulação para leitura a cada 0,02 segundos, operando na faixa de  $2\theta$  de 35 a 85 graus. As amostras das nanopartículas foram depositadas gota-a-gota no substrato de silício a partir da dispersão coloidal, com posterior evaporação do solvente a temperatura ambiente.

### **4.2 - Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Vis**

A banda plasmon das nanopartículas de ouro e de prata são bem definidas. Assim, para caracterizar as dispersões coloidais das nanopartículas metálicas

foram obtidos os espectros de UV-Vis das nanopartículas de ouro e de prata a partir dos respectivos coloides utilizando o espectrofotômetro de duplo feixe JASCO, na região de 250 a 800 nm em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico, tendo a água destilada e deionizada como solvente.

### **4.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura**

As características morfológicas das nanopartículas metálicas bem como as dos microtubos foram verificadas por microscopia eletrônica de varredura. Foi utilizado um microscópio Zeiss Supra 35VP com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-SEM) trabalhando a 10 kV. As amostras foram preparadas depositando parte da massa micelial no substrato de silício, sendo desidratadas a temperatura ambiente, sem auxílio de agentes dessecadores. A amostra desidratada colocada diretamente no microscópio, sem qualquer preparação especial prévia para análise.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de síntese de nanopartículas metálicas escolhido para esse trabalho foi o Método de Turkevich, também conhecido como Método Citrato, proposto originalmente por Turkevich, em 1951<sup>25</sup>. Nesse método, já bem estabelecido, íons de ouro (III) e de prata (I) são reduzidos pelo citrato, em meio aquoso, que também atua como agente estabilizante da reação. Muito embora haja diversos trabalhos que utilizam dessa estratégia como síntese de nanopartículas de ouro, o estudo da influência de alguns parâmetros que possam interferir no tamanho médio das nanopartículas, tais como a concentração de citrato e a temperatura de síntese, ainda é bem escasso.

Assim, os resultados da primeira parte desse trabalho foram dedicados ao estudo da influência da concentração de citrato no meio reacional e da temperatura no tamanho médio das nanopartículas de ouro. Foram determinadas como material de estudo dos parâmetros selecionados as nanopartículas de ouro, uma vez que a síntese é bem consolidada na literatura e essas possuem um melhor controle de tamanho.

A segunda parte do trabalho atentou-se para a formação de microtubos utilizando materiais biológicos, como *biotemplates*, interagindo com dois diferentes tipos de nanopartículas de metais nobres, que são elas, nanopartículas de ouro e nanopartículas de prata. Três tipos de microtubos foram estudados, a saber, microtubos compostos por multicamadas de nanopartículas de ouro e posteriormente prata, microtubos contendo multicamadas de nanopartículas de prata e depois ouro e microtubos recobertos com uma mistura de ambas as nanopartículas metálicas.

A Figura 5.1 mostra um esquema ilustrativo do recobrimento de cada tipo de microtubo formado pela interação das nanopartículas com a parede do fungo. Em vermelho, é representado as nanopartículas de ouro e em cinza, as nanopartículas de prata.

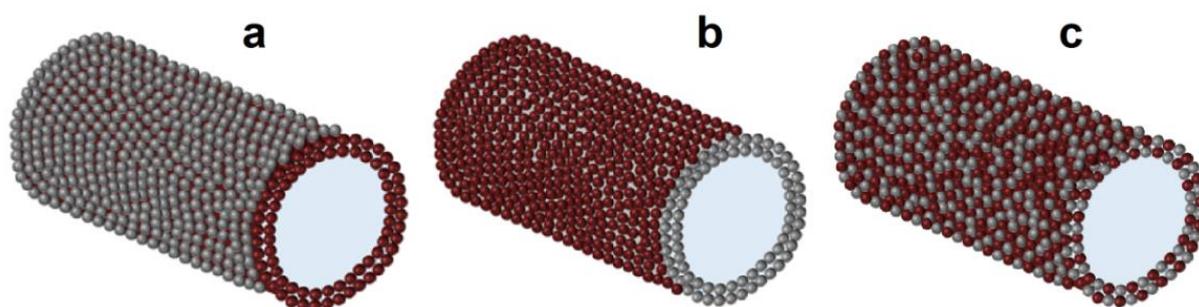


FIGURA 5.1 - Ilustração dos microtubos contendo diferentes nanopartículas metálicas. a) compostos de multicamadas de ouro e prata; b) multicamadas de prata e ouro e c) mistura de nanopartículas de ouro e prata.

## 5.1 - Microtubos com Nanopartículas de Ouro de Diferentes Tamanhos

### 5.1.1 - Efeito da Concentração de Citrato

De acordo com o Método de Turkevich, a relação estequiométrica agente redutor:sal metálico de 3:1 não promove grande mudanças no tamanho final das nanopartículas, sendo que no trabalho de GORUP et al.<sup>52</sup> o tamanho das nanopartículas nessas condições foi de 22 nm. Assim, essa relação

estequiométrica foi escolhida como a relação base para a formação das nanopartículas. Foi determinada a concentração do íon ouro (III) como sendo  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , uma vez que o sal citrato de ouro possui baixa solubilidade. O efeito da concentração de citrato no tamanho médio das nanopartículas de ouro foi avaliado, visto que ele é o agente estabilizante e redutor da reação de oxirredução. A relação do sal de citrato e do  $\text{HAuCl}_4$  utilizada para o estudo foi de 4,5:1 e 3,5:1, respectivamente. Estas relações foram estabelecidas partindo do pressuposto de que quanto maior a concentração de citrato no meio reacional, menor o tamanho das nanopartículas, devido a sua capacidade de redução.

A formação de nanopartículas de ouro foi observada pela mudança de coloração do sistema reacional. A solução contendo os íons ouro (III) possui coloração amarelo translúcido. Instantes após a adição da solução-estoque de citrato de sódio, a solução passou da cor amarelo-translúcido para incolor. Cerca de um minuto após o início da reação, a coloração passou a ser violeta-escuro e, à medida que a reação avançava, a cor passou a tender ao vermelho. Foi observado que a dispersão coloidal contendo a menor concentração de citrato apresentava coloração em tons de violeta e aquela contendo a maior concentração de citrato, tons de vermelho.

As hifas do fungo foram recobertas com as nanopartículas e, após quinze dias, foram realizadas as imagens de MEV visando calcular o tamanho médio das nanopartículas sintetizadas nas diferentes condições.

Pelas imagens de MEV e seus respectivos histogramas (Figura 5.2) foi possível observar a formação de nanopartículas esferoidais com tamanho médio de 14,4 nm e 18,0 nm nas condições de maior e menor concentração de citrato, respectivamente. As nanopartículas formadas mostraram alta homogeneidade de forma e distribuição estreita de tamanho médio. As hifas recobertas pelas

nanopartículas de ouro com tamanho médio de 14,4 nm apresentaram, de acordo com a Figura 5.3, microtubos com diâmetro e comprimento homogêneo.

Sob as condições experimentais estudadas, a variação do tamanho das nanopartículas foi pequena. Um fator que pode ter influenciado nessa pequena variação de tamanho é a formação de núcleos. A presença de maior quantidade de citrato no meio reacional pode ter influenciado a quantidade de núcleos formados no início da reação, isto é, o citrato teria reduzido muitos íons ouro (III) no início da reação, formando, portanto, grande quantidade de núcleos. Para a menor concentração de citrato, essa quantidade de núcleos formada pode ter sido menor. Como a quantidade de íons reduzidos disponíveis é a mesma para ambos os casos, quanto maior a quantidade de núcleos, menor o tamanho da nanopartícula, pois haverá menor quantidade de íons reduzidos disponíveis para a etapa de crescimento da partícula.

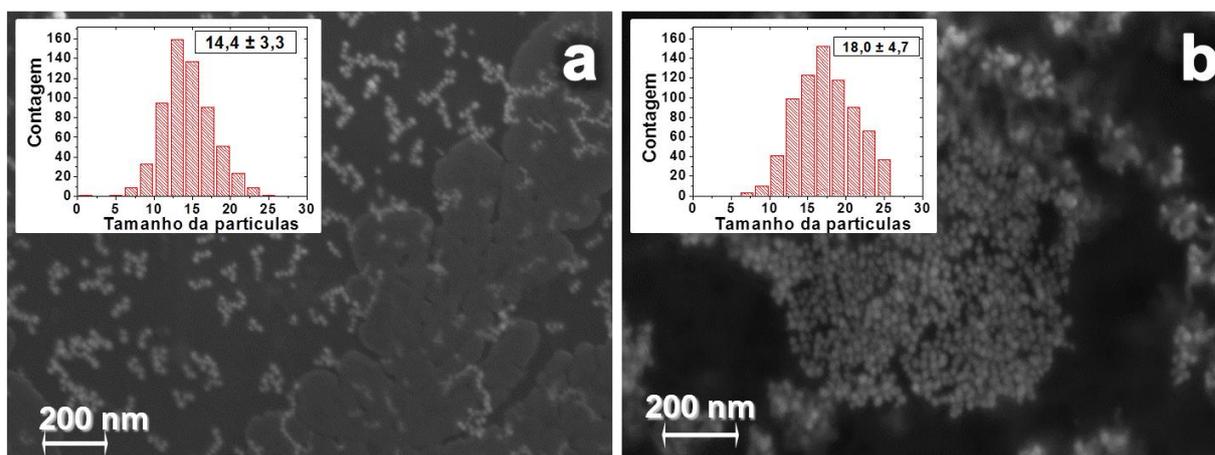


FIGURA 5.2 - Imagens de MEV das nanopartículas de ouro com diferentes condições experimentais utilizadas para preparação dos microtubos de ouro. a) nanopartícula sintetizada pela relação citrato:ouro 4,5:1 e b) nanopartícula sintetizada pela relação citrato:ouro 3,5:1.

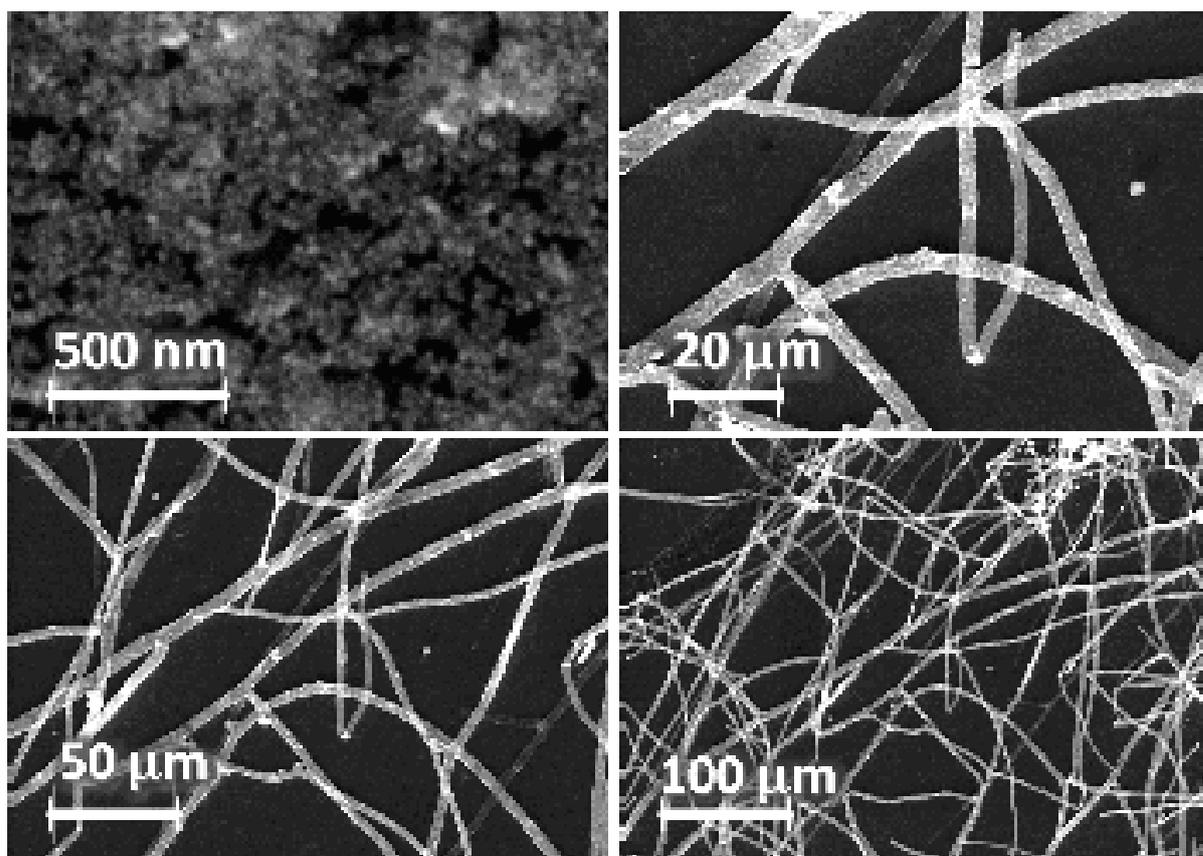


FIGURA 5.3 - Imagens de MEV do material híbrido contendo nanopartículas de 14,4 nm em várias magnificações, mostrando a homogeneidade de forma, diâmetro do microtubo e comprimento.

Como a condição estudada não obteve nanopartículas de expressivos tamanhos diferentes, outro fator foi avaliado visando observar diferentes tamanhos médio de nanopartículas de ouro, a saber, temperatura de síntese.

### **5.1.2 - Influência da Temperatura no Tamanho das Nanopartículas de Ouro**

As sínteses das nanopartículas de ouro foram realizadas em três diferentes temperaturas: 40 °C, 60 °C e 80 °C. Essas temperaturas foram escolhidas por

estarem próximas da temperatura de síntese utilizada no Método de Turkevich, por serem abaixo da temperatura de ebulição da água e por abrangerem a região de início da síntese. O espectro de absorção na região do UV-Vis, conforme é mostrado na Figura 5.4, apresenta as bandas plasmon encontradas para as nanopartículas de ouro sintetizadas nessas temperaturas, sendo que todas situaram em torno de 525 nm, região característica das nanopartículas de ouro.

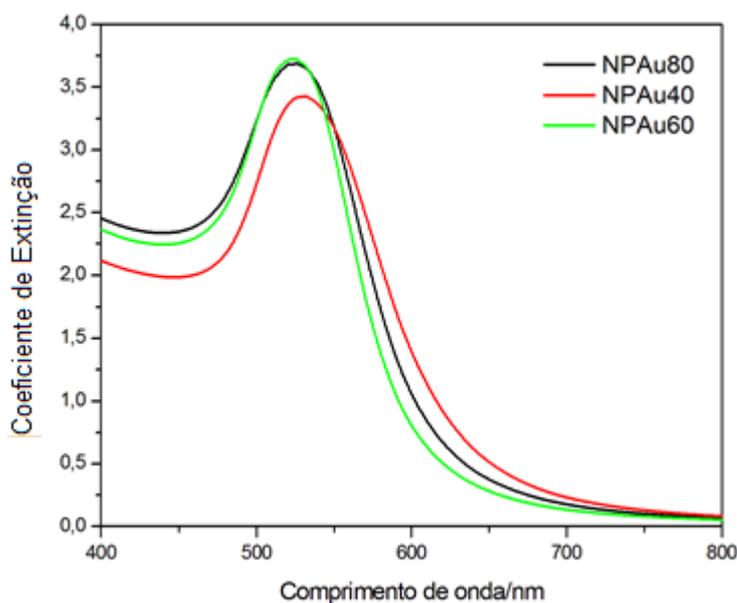


FIGURA 5.4 - Espectro de absorção na região UV-Vis das nanopartículas de ouro sintetizadas em 40 °C (vermelho), 60 °C (verde) e 80 °C (preto).

Os difratogramas de raios X (Figura 5.5) das nanopartículas de ouro sintetizadas nas diferentes temperaturas confirmaram a estrutura cristalina como sendo cúbica de face centrada para todas as temperaturas.

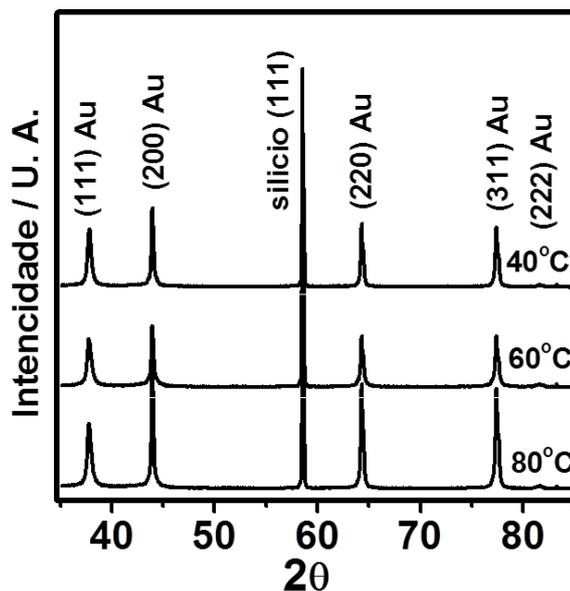


FIGURA 5.5 - Difratoformas de raios X das nanopartículas de ouro sintetizadas a 40 °C, 60 °C e 80 °C.

As imagens de MEV apresentaram nanopartículas de ouro com formato regular e homogêneo (Figura 5.6). Pelos respectivos histogramas, é possível verificar a distribuição do tamanho dessas nanopartículas, bem como determinar o tamanho médio. Observa-se que para as nanopartículas sintetizadas a 40 °C, o tamanho médio encontrado foi de 21,3 nm, tendo um alargamento basal na distribuição do tamanho. Para a síntese em 60 °C, o tamanho médio das nanopartículas foi de 15,8 nm e para 80 °C, foram encontradas nanopartículas de tamanho médio de 11,5 nm, sendo que nessa temperatura foi observada uma menor faixa de distribuição de tamanho de partículas.

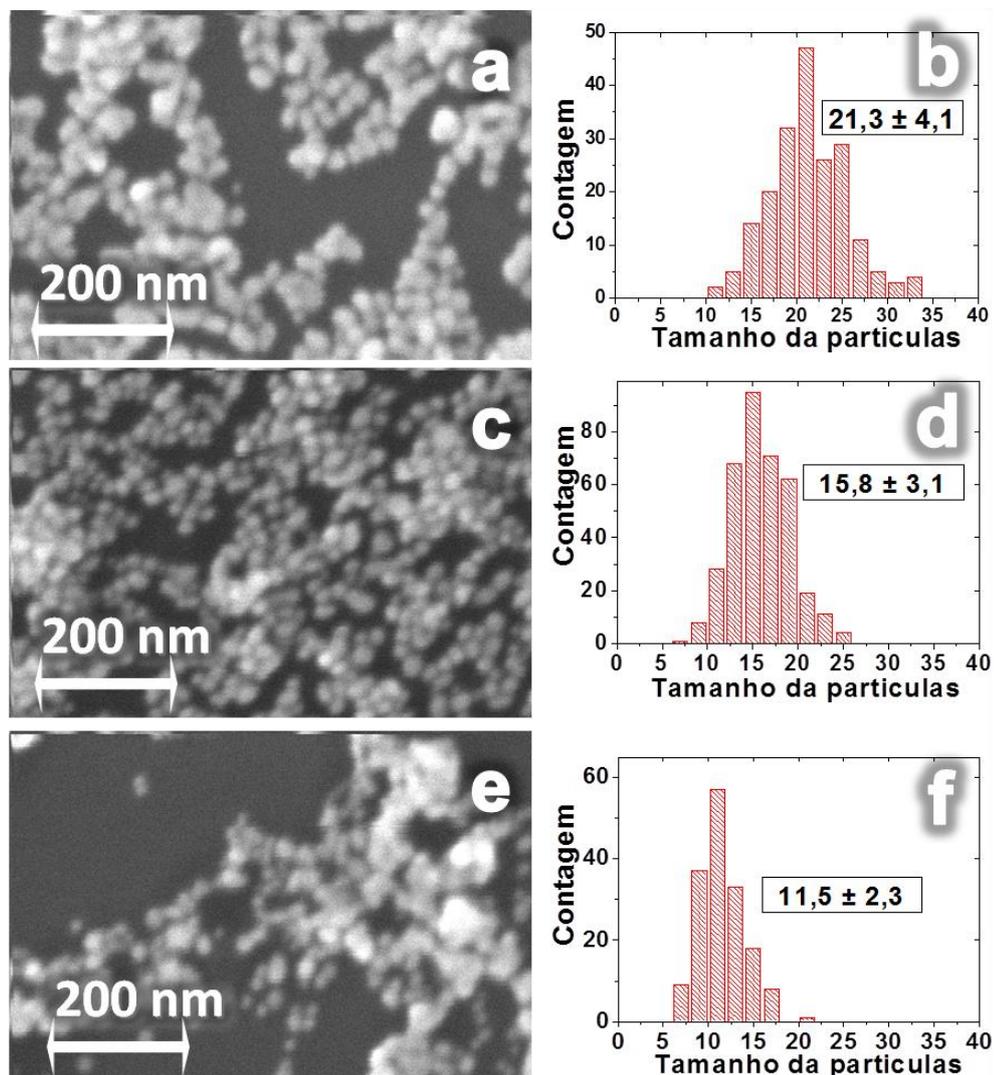


FIGURA 5.6 - Imagens de MEV das nanopartículas de ouro preparadas em diferentes temperaturas. a) 40 °C, c) 60 °C e e) 80 °C.

Considerando a maior temperatura de síntese, 80 °C, determinado número de núcleos foi formado pela redução dos íons ouro (III) e, à medida que a reação avançava, esses núcleos foram crescendo, consumindo os íons presentes no meio reacional. No entanto, para baixas temperaturas, como no caso de 40 °C para esse experimento, a quantidade de núcleos formados foi menor, o que fez com que os íons ainda não reduzidos fossem consumidos por esses poucos núcleos,

formando partículas de maiores tamanhos, uma vez que a concentração de íons ouro (III) era a mesma em todas as sínteses.

## **5.2 - Formação de Multicamadas**

A segunda parte do trabalho foi direcionada à formação de microtubos contendo multicamadas de nanopartículas de ouro e de prata sobre as hifas do fungo *Aspergillus aculeatus*, originando três diferentes tipos de microtubos, conforme já descritos nessa Dissertação em seções anteriores.

### **5.2.1 - Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Ouro e de Prata Utilizadas no Preparo dos Microtubos**

A solução-estoque contendo íons ouro (III) possui uma coloração amarela bem característica. Após a adição do sal de citrato, o meio reacional adquiriu uma coloração violeta escuro e, à medida que a reação prosseguia, o meio reacional tornou-se vermelho intenso, o que indica a formação de nanopartículas de ouro. Já para a prata, a solução-estoque era incolor e, à medida que a reação avançava, a coloração amarela âmbar que se torna visível a aproximadamente 4 minutos de reação, tornava-se mais intensa. Ao final de 12 minutos, a dispersão estava com uma coloração amarela opaca. Nesse momento, pode-se observar a formação de pequenos aglomerados de coloração prata, cor característica da formação desses aglomerados.

Foram feitas as caracterizações das dispersões coloidais de ouro e de prata. O espectro de absorção na região do UV-Vis das nanopartículas de ouro sintetizadas a temperatura de 90 °C apresenta uma banda *plasmon* em 523 nm. A banda *plasmon* em 421 nm é referente à formação das nanopartículas de prata. Ambas as bandas são bem definidas para as nanopartículas de metais nobres, no caso, ouro e prata, sendo um dos métodos mais amplamente utilizados para identificação desse tipo de nanopartícula (Figura 5.7).

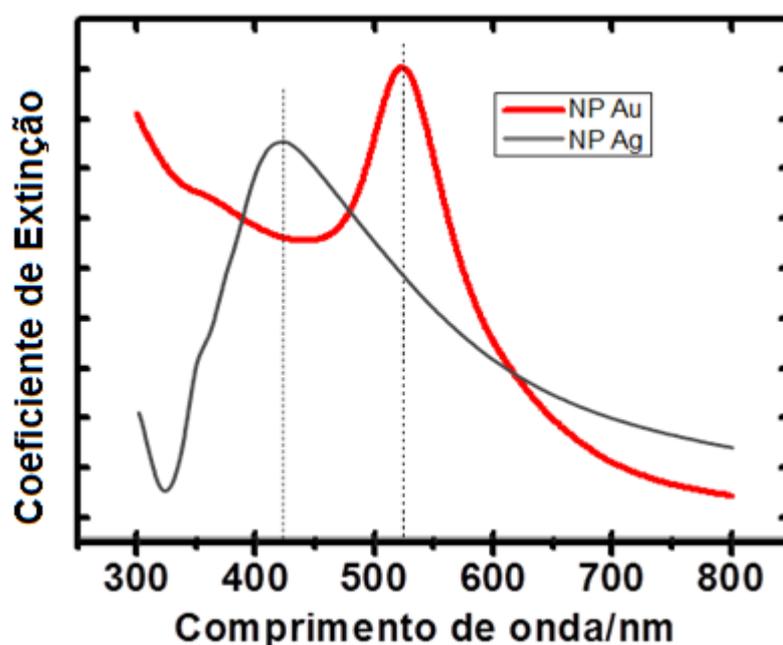


FIGURA 5.7 - Espectro de absorção na região do UV-Vis das nanopartículas de ouro (vermelho) e de prata (cinza) sintetizadas a 90 °C.

Para análise do tamanho e morfologia das nanopartículas de ouro e de prata, antes de colocá-las em contato com o fungo, foram feitas caracterizações utilizando microscopia eletrônica de varredura. As dispersões coloidais das nanopartículas foram depositadas gota-a-gota no substrato de silício e secadas à temperatura ambiente. Para a nanopartícula de prata, o tamanho médio das partículas foi de 32,4 nm. Já para as nanopartículas de ouro, o tamanho médio

encontrado foi de 14,9 nm. (Figura 5.8) Embora a temperatura e o tempo de síntese sejam os mesmos, a divergência do tamanho das nanopartículas está na redução dos íons metálicos. Cerca de 50 % dos íons prata (I) reduzem durante a reação, formando poucos núcleos. Assim, à medida que os íons vão reduzindo, esses poucos núcleos formados tendem a crescer, o que não ocorre com o ouro. Os íons são reduzidos durante a reação, portanto, vários núcleos podem ser formados, gerando partículas de menores tamanhos. A alta reatividade do sal de ouro com o citrato pode estar associada aos potenciais de redução, conforme foi apresentado nas equações 1.4 e 1.5 (Seção 1.4.1).

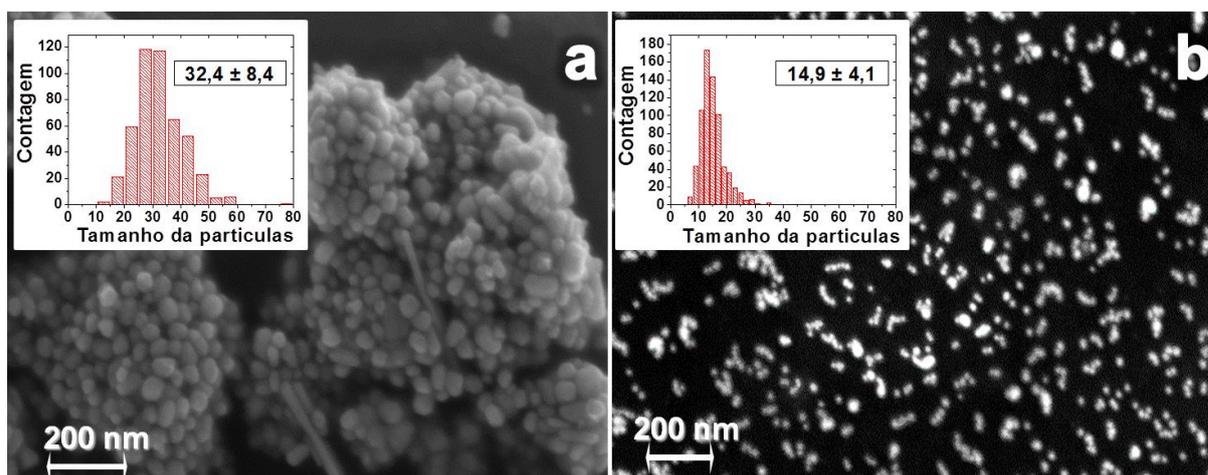


FIGURA 5.8 - Imagens de MEV e os respectivos histogramas das nanopartículas sintetizadas a 90 °C, utilizadas para preparar o material híbrido, sobre substrato de silício. a) nanopartículas de prata e b) nanopartículas de ouro.

Observa-se que o sal de ouro é mais facilmente reduzido pelo citrato que o de prata, ao comparar as equações 1.4 e 1.5, e essa diferença de potencial entre os dois sais, muito embora estejam nas mesmas condições de síntese, os resultados são diferentes quanto ao tamanho de partícula, tempo de reação e rendimento. Vale ressaltar que outros parâmetros devem ser levados em

consideração no que tange à reatividade, tais como concentração, temperatura, mecanismos de reação, pH.

Os difratogramas de raios X das nanopartículas de ouro e de prata (Figura 5.9) confirmam a estrutura cristalina como sendo cúbica de face centrada para ambas. O substrato de silício, utilizado para depositar as nanopartículas, era recoberta por uma fina camada de platina, o que foi suficientemente expressiva para gerar um pico intenso no difratograma. Pelo difratograma, pode-se observar que os picos referentes às nanopartículas de ouro e de prata estão praticamente na mesma posição, pois possuem a mesma estrutura cristalina. Dessa forma, pode-se concluir que a técnica não é eficiente para distinguir a presença de ambas as nanopartículas em um material.

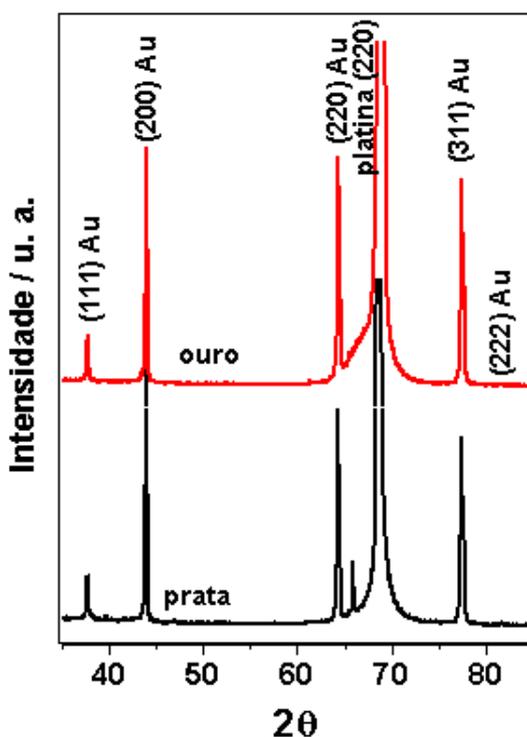


FIGURA 5.9 - Difratograma de raios X das nanopartículas de ouro (vermelho) e prata (preto) sintetizadas a  $90^\circ\text{C}$ .

## **5.2.2 - Microtubos Compostos de Multicamadas**

As estruturas filamentosas que originaram os microtubos foram formadas pela germinação dos esporos e crescimento das hifas. Após as etapas apresentadas no procedimento experimental (Seção 3), o meio de cultura foi retirado e foram adicionadas as dispersões coloidais.

Os microtubos foram preparados com multicamadas de diferentes nanopartículas, sendo variada a ordem dessas. Primeiramente, foi adicionada a dispersão coloidal de ouro e depois, de prata. Outro experimento foi realizado com adição da dispersão coloidal de prata e depois, de ouro e por fim, a mistura de ambas.

### **5.2.2.1 - Microtubos Formados por Nanopartículas de Ouro e de Prata**

Após a etapa de crescimento do fungo, foi adicionada a dispersão coloidal de ouro e o sistema foi deixado em repouso à temperatura ambiente por quinze dias. Passados os quinze dias, o líquido, que continha uma baixa quantidade de nanopartículas dispersa (pois grande parte recobriu as hifas), foi retirado. Em seguida, foi adicionada a dispersão coloidal de prata e deixado nas mesmas condições anteriores por mais quinze dias. O material híbrido formado foi caracterizado por MEV e microanálise (Figuras 5.10 e 5.11).

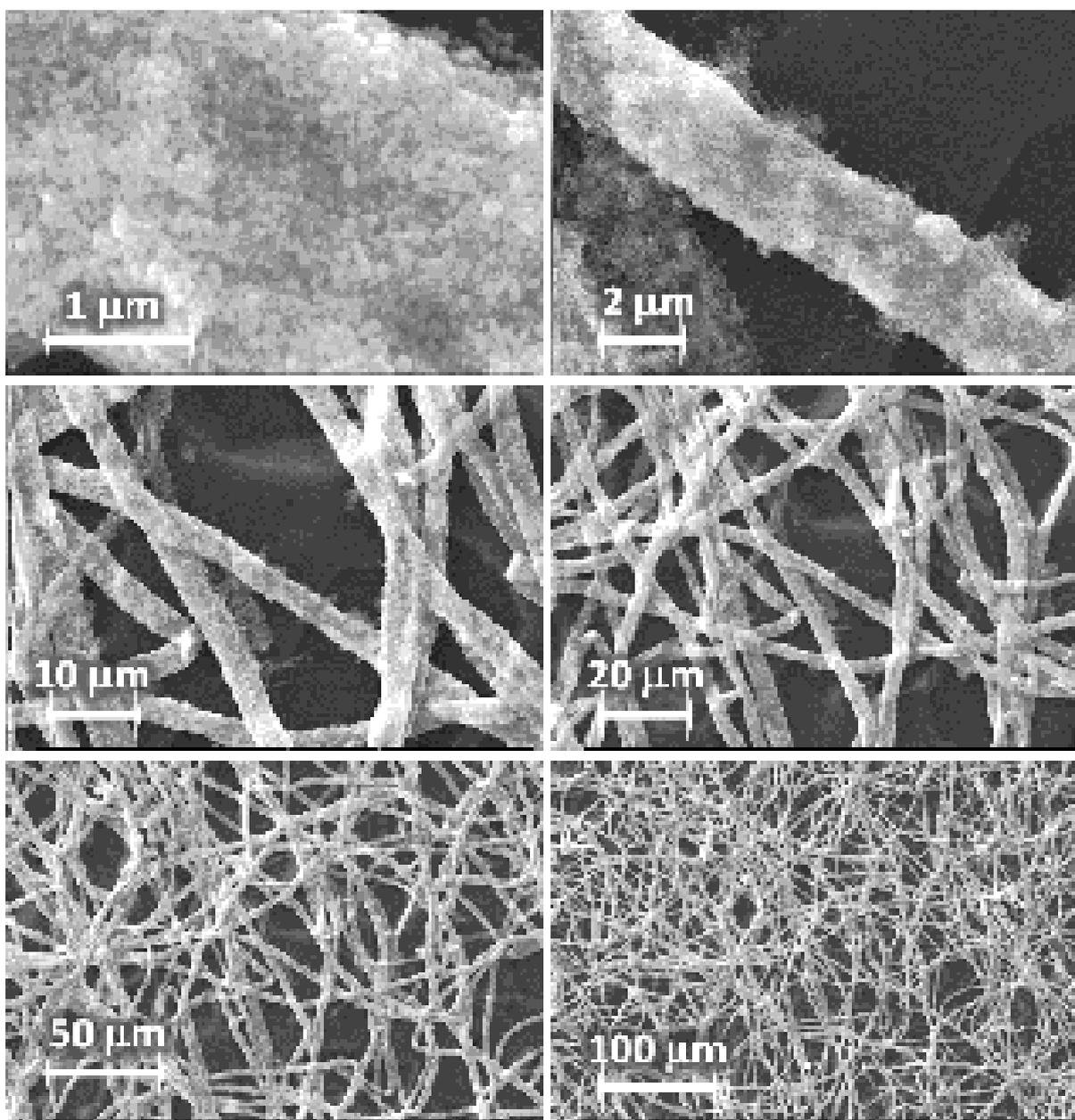


FIGURA 5.10 - Imagens de MEV do material híbrido composto por camadas alternadas de nanopartículas de ouro e de prata no fungo *Aspergillus aculeatus*.

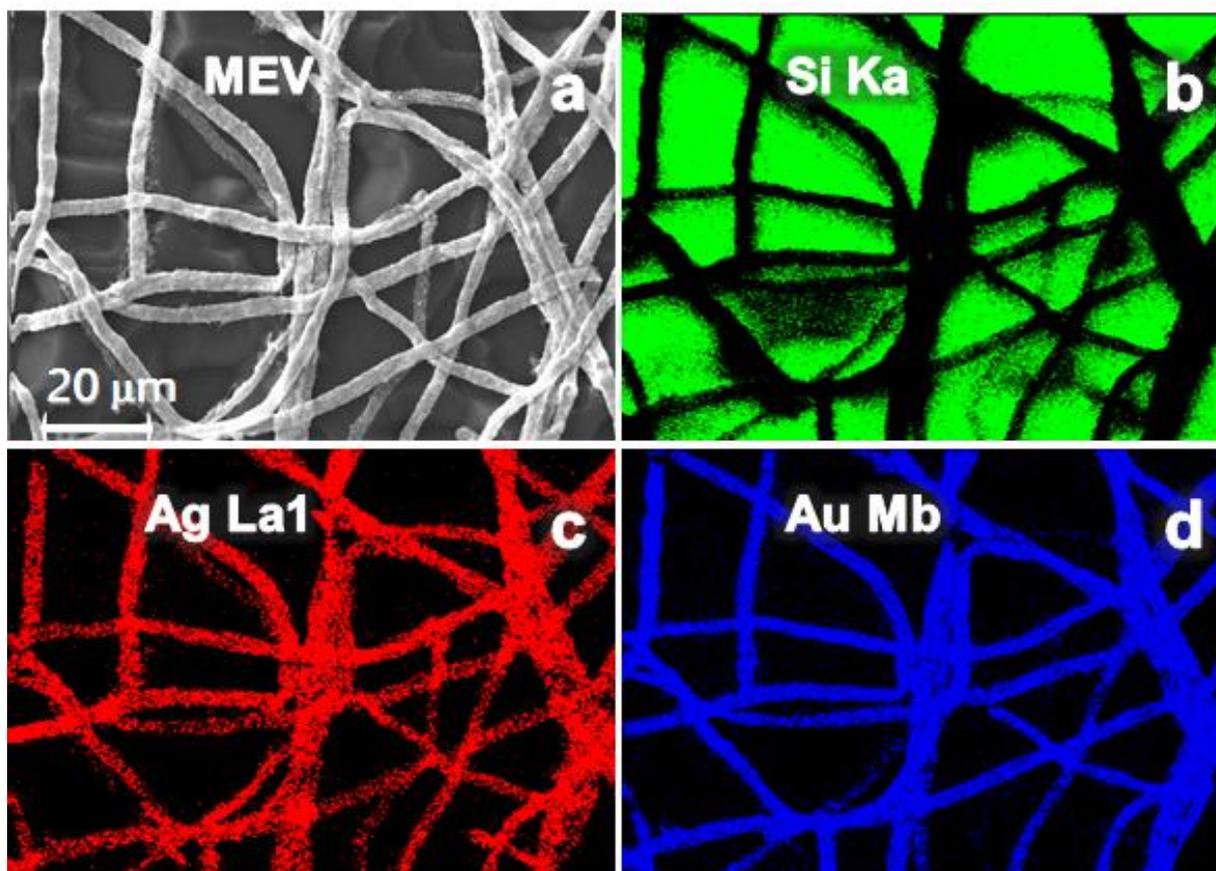


FIGURA 5.11 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS do material híbrido composto por camadas de ouro e prata, respectivamente, formando os microtubos. a) MEV do material híbrido. Imagem do mapeamento em 2D por EDS de b) Si Ka, c) Ag La1 e d) Au Mb.

Analisando as imagens de MEV e de microanálise (Figura 5.11), observa-se que tanto as nanopartículas de ouro quanto as nanopartículas de prata estão presentes nas hifas do fungo *Aspergillus aculeatus*, uma vez que o contraste das imagens é perceptível nos mapeamentos de EDS, inferindo que há homogeneidade na distribuição das nanopartículas no material híbrido. Pode-se observar, também, que o contraste das nanopartículas de ouro é maior que o das nanopartículas de prata, mostrando que a quantidade presente daquelas são maiores.

### 5.2.2.2 - Microtubos Formados por Nanopartículas de Prata e de Ouro

O procedimento para formação dos microtubos com nanopartículas de prata e ouro, nessa ordem, foi executado da mesma forma com o que foi realizado para os microtubos contendo primeiramente nanopartículas de ouro e depois de prata. Os microtubos foram caracterizados por MEV e microanálise.

As figuras 5.12, 5.13 e 5.14 apresentam as imagens de MEV de diferentes regiões do micélio fúngico com seus respectivos mapeamento em 2-D de EDS.

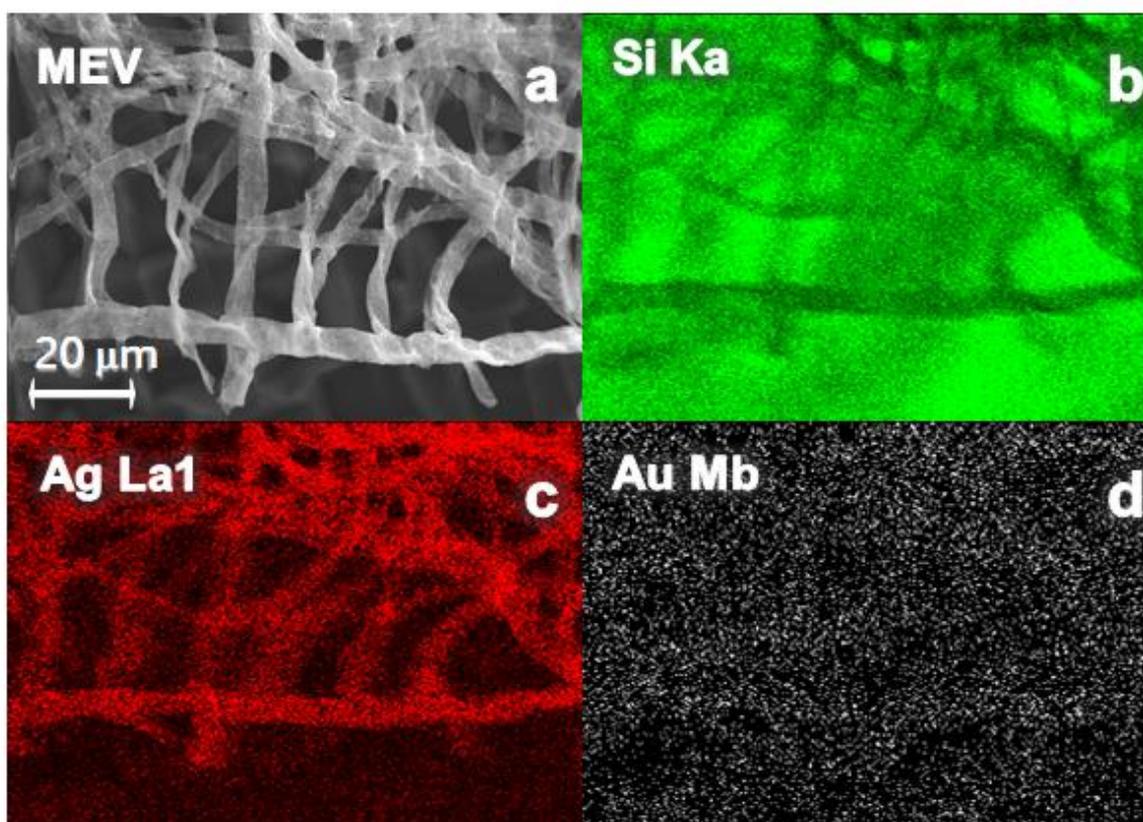


FIGURA 5.12 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS do material híbrido composto de camadas de prata/ouro formando os microtubos. a)

MEV do material híbrido, b) Imagem em 2D de EDS do Si Ka, c) Imagem em 2D de EDS do Ag La1, d) Imagem em 2D de EDS do Au Mb.

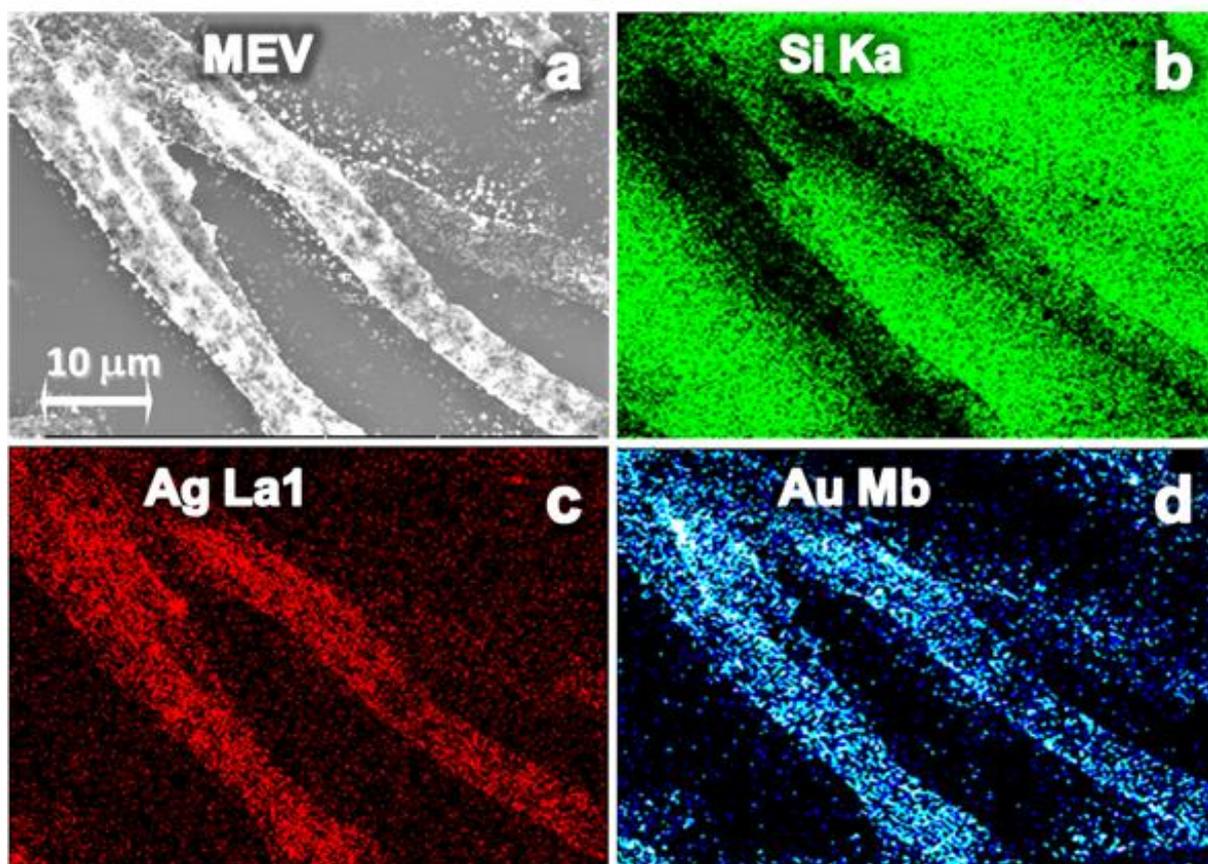


FIGURA 5.13 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS do material híbrido composto de camadas de prata/ouro formando os microtubos. a) MEV do material híbrido, b) Imagem em 2D de EDS do Si Ka , c) Imagem em 2D de EDS do Ag La1 , d) Imagem em 2D de EDS do Au Mb.

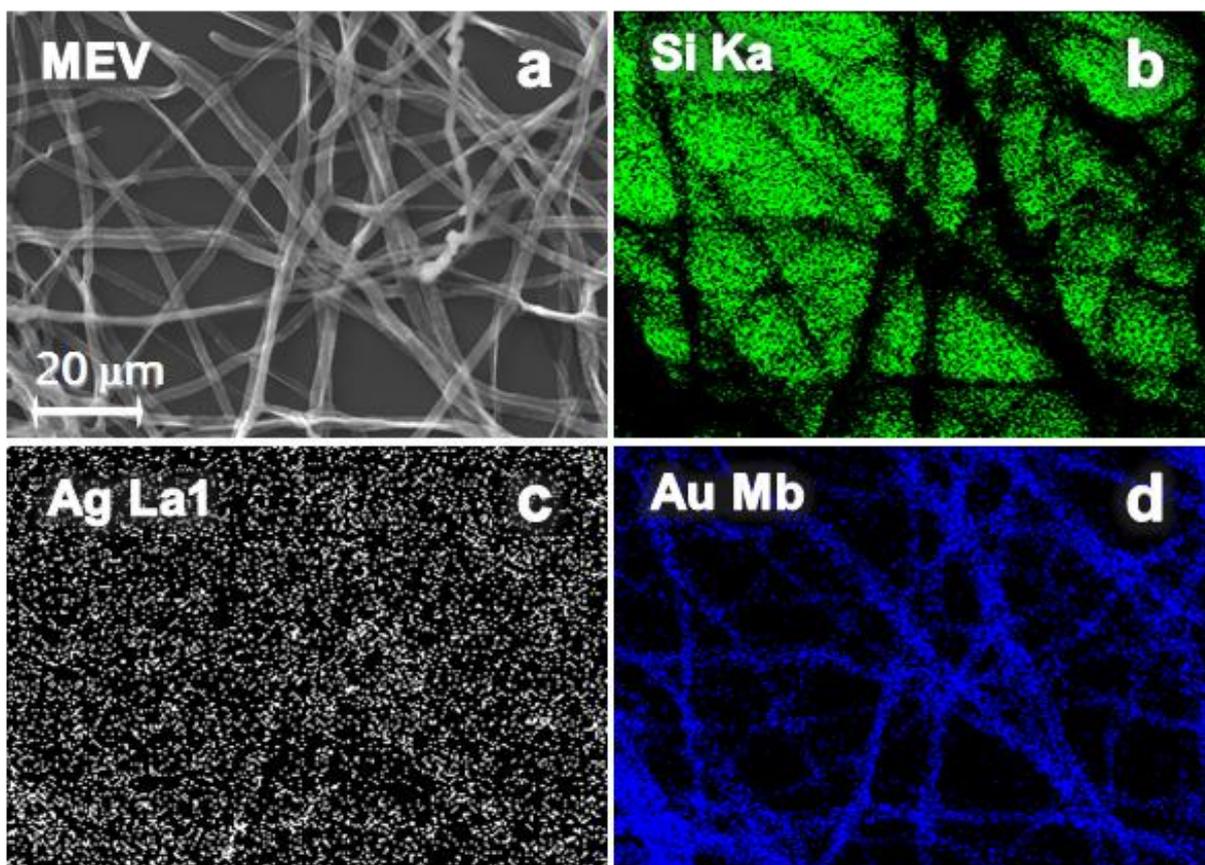


FIGURA 5.14 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS do material híbrido composto de camadas de prata/ouro formando os microtubos. a) MEV do material híbrido, b) Imagem em 2D de EDS do Si Ka, c) Imagem em 2D de EDS do Ag La1, d) Imagem em 2D de EDS do Au Mb.

Comparando as imagens de MEV e microanálise das figuras 5.12, 5.13 e 5.14, observa-se que existem hifas recobertas com predominância de prata, hifas com predominância de ouro e com a presença das duas nanopartículas. A figura 5.15 ilustra uma possível explicação desse recobrimento irregular.

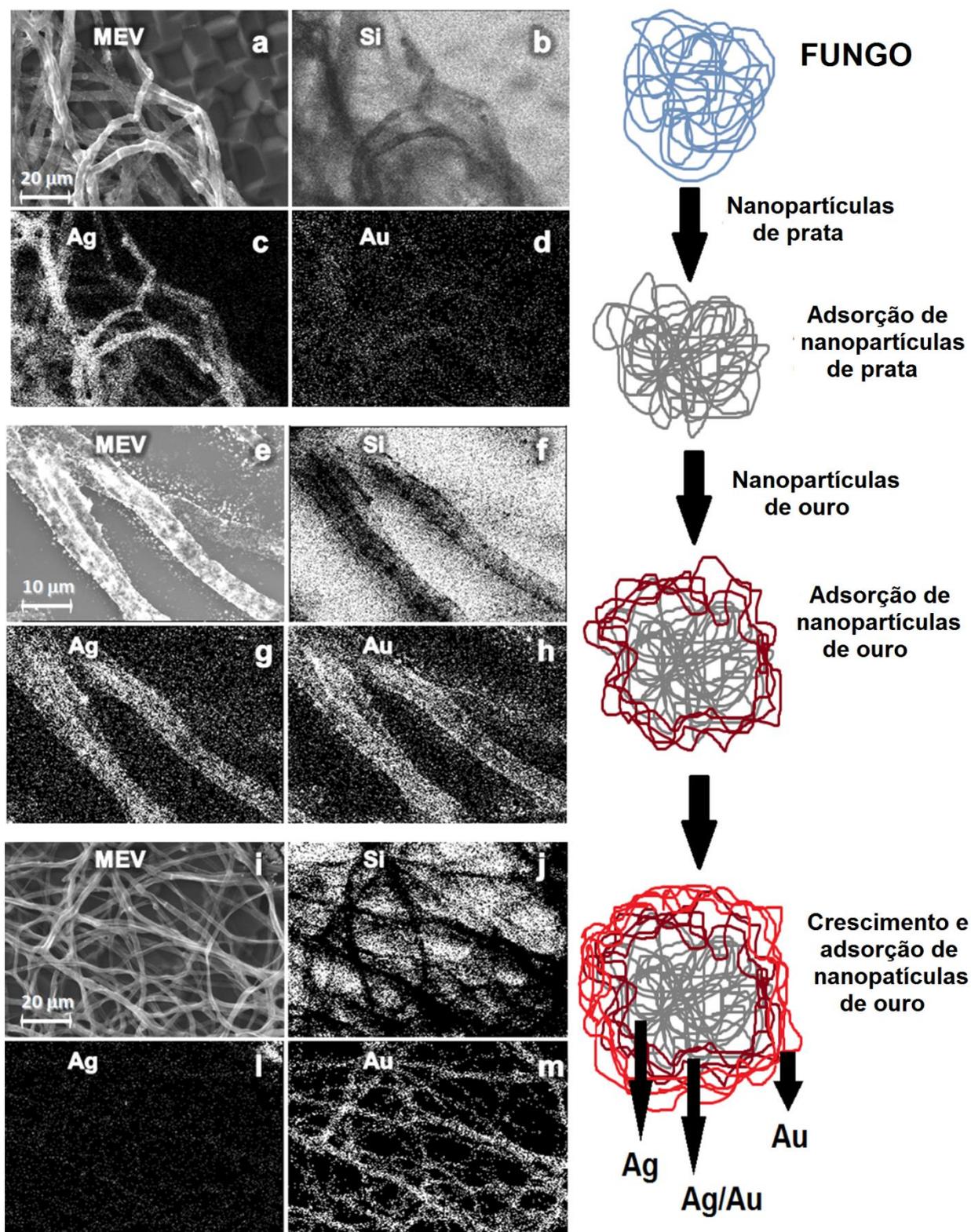


FIGURA 5.15 - Esquema ilustrativo do recobrimento das hifas pelas nanopartículas de prata/ouro e imagens de MEV desses recobrimentos.

Ao adicionar a dispersão coloidal de prata na massa micelial, o fungo entra em contato com essas nanopartículas, que recobre a sua superfície. O segundo recobrimento dá-se pelas nanopartículas de ouro, onde há a formação da multicamada prata/ouro. No entanto, na presença de macronutrientes, tais como o citrato, as hifas podem crescer, mesmo após a adição das dispersões coloidais. Aquelas hifas que cresceram após a retirada da dispersão coloidal de prata entraram em contato apenas com a dispersão coloidal de ouro, o que fez com que em sua superfície ficassem aderidas apenas tais nanopartículas. Considerando tais observações, dependendo da região em que se é realizada as imagens e as microanálises, pode haver ou não a presença das nanopartículas e, portanto, a presença ou não das camadas contendo diferentes partículas. Assim, possivelmente, as hifas do centro da massa micelial contêm maior quantidade de nanopartículas de prata, as intermediárias, contêm as duas nanopartículas e as hifas mais externas, somente nanopartículas de ouro. Nesse trabalho, foram encontradas as três regiões.

Por fim, foram avaliadas hifas contendo uma mistura coloidal de nanopartículas de ouro e de prata. A Figura 5.16 mostra imagens de MEV com microanálise por EDS dessas hifas.

Na mistura coloidal composta de nanopartículas de ouro e de prata, foi possível observar uma leve organização de ambas as nanopartículas nas hifas do fungo. Embora a quantidade de nanopartículas recobrindo as hifas não seja expressiva, pode-se comprovar a possibilidade de se formar microtubos contendo multicamadas de diferentes tipos de nanopartículas, depositadas como mistura coloidal de duas dispersões coloidais preparadas previamente e separadamente.

Foram encontrados, portanto, três distintas regiões no micélio com diferentes recobrimentos. A possibilidade de se recobrir as hifas com diferentes

nanopartículas abre portas para o recobrimento com outros tipos de nanopartículas, sejam estas inorgânicas ou orgânicas.

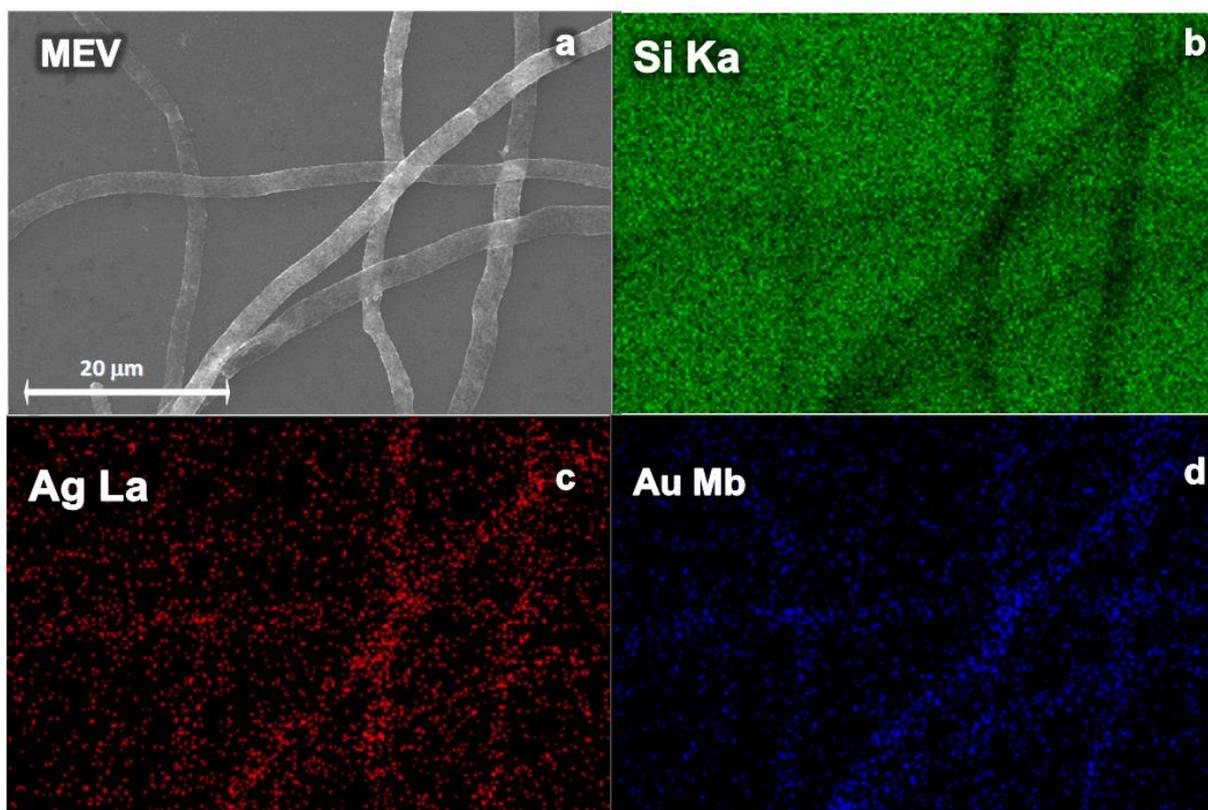


FIGURA 5.16 - Imagens de MEV e mapeamento em 2D por EDS do material híbrido formado pela adição de uma dispersão coloidal contendo uma mistura de nanopartículas de ouro e de prata. a) MEV do material híbrido. Imagem em 2D de EDS de b) Si Ka, c) de Ag La e d) de Au.

## 6 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram a possibilidade de formação de multicamadas de diferentes nanopartículas metálicas nos microtubos utilizando fungos como *biotemplates*, sejam essas multicamadas do tipo *multilayer-by-multilayer* ou uma mistura coloidal de nanopartículas.

A homogeneidade de forma e espessura é obtida na ausência de crescimento do fungo durante o processo de recobrimento das hifas com as nanopartículas. Devido a esse crescimento diferenciado, três diferentes regiões foram encontradas no micélio, referentes à exposição das hifas na dispersão coloidal.

O uso de antibióticos e radiação UV-Vis foram considerados, todavia, por causa de sua baixa eficiência, foram descartados tais possibilidades de uso. Também, foi considerado o uso metanol, entretanto, esse desnatura o fungo antes mesmo da adição das nanopartículas metálicas.

Não foi possível formar as multicamadas expressivas de diferentes tamanhos de nanopartículas de ouro, contudo, os resultados obtidos até o momento dá suporte aos próximos estudos na área.

As imagens de MEV referentes à organização de uma mistura coloidal de diferentes nanopartículas metálicas abre um campo de inúmeras possibilidades em relação ao recobrimento de diferentes tipos de nanopartículas, sejam essas de caráter inorgânico ou orgânico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. STRATHERN, P. O Sonho de Mendeleiev. Rio de Janeiro, Jorge Zahar Editor, 2002. 264 p.
2. DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C. & DE MORAIS, P. C. Nanotecnologia: Introdução, Preparação e Caracterização de Nanomateriais e Exemplos de Aplicação. São Paulo, Artliber, 2006. 208 p.
3. IJIMA, S. "Helical microtubules of graphitic carbon". *Nature*, **354** (6348): 56, 1991.
4. MYERS, D. Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Wiley-VCH, 1999. 501 p.
5. ALIVISATOS, A. P. "Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals". *J. Phys. Chem. - US*, **100** (31): 13226, 1996.
6. DE OLIVEIRA, C. R. Estudos em Crescimento Orientado de Nanocristais em Colóides. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2005. Tese de Doutorado, 87 p.
7. CHIANG, Y. M.; BIRNIE, D. P & KINGERY, W. D. Physical Ceramics: Principles for Ceramic Science and Engineering. New York, John Wiley and Sons, 1997. 522 p.
8. HARTLAND, G. V. "Optical studies of dynamics in noble metal nanostructures". *Chem. Rev.*, **111** (6): 3858, 2011.
9. CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V. L. & O'CONNOR, C. J. "Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles". *Chem. Rev.*, **104**: 3893, 2004.
10. TOSCHEV, S. Crystal Growth - An Introduction. Amsterdam, Elsevier, 1973. 531 p.
11. ZURITA-GOTOR, M. & ROSNER, D. E. "Aggregate size distribution evolution for brownian coagulation - sensitivity to an improved rate constant". *J. Colloid Interf. Sci.*, **274**: 502, 2004.
12. EASTOE, J.; HOLLAMBY, M. J. & HUDSON, L. "Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles". *Adv. Colloid Interf.*, **128**: 5, 2006.
13. WEISS, G. H. "Overview of theoretical models for reactions rates". *J. Stat. Phys.*, **42**: 3, 1986.
14. JENSEN, P. "Growth of nanostructures by cluster deposition: experiments and simple models". *Rev. Mod. Phys.*, **71**: 1695, 1999.
15. LAMER, V. K. & DINEGAR, R. H. "Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols". *J. Am. Chem. Soc.*, **72**: 4847, 1950.

16. KUKUSHKIN, S. A. & NEMNA, S. V. "The effect of pH on nucleation kinetics in solutions". Dokl. Phys. Chem., **377** (6): 792, 2000.
17. WONG, E. M.; HOERTZ, P. G.; LIANG, C. J.; SHI, B. M.; MEYER, G. J. & SEARSON, P. C. "Influence of organic capping ligands on the growth kinetics of ZnO nanoparticles". Langmuir, **17**: 8362, 2001.
18. OSKAM, G.; NELLORE, A.; PENN, R. L. & SEARSON, P. C. "The growth kinetics of TiO<sub>2</sub> nanoparticles from titanium (IV) alkoxide at high water/titanium ratio". J. Phys. Chem. B, **107**: 1734, 2003.
19. SHAW, D. J. Introduction to Colloid and Surface Chemistry. 4<sup>th</sup> ed. London, Butterworth-Heinemann, 1992. 306 p.
20. ISRAELACHVILI, J. N. Intermolecular and Surface Forces: With Applications to Colloidal and Biological Systems. 2<sup>nd</sup> ed. London, Academic Press, 1991. 450 p.
21. NAGARAJAN, R. & HATTON, T. A. Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization. Washington, DC, American Chemical Society, 2008.
22. HIEMENZ, P. C. Principles of Colloid and Surface Chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Marcel Dekker, 1986. 815 p.
23. JONGH, L. J.; DE AGUIAR, J. A. O.; BROM, H. B.; LONGONI, G.; VAN RUITENBEEK, J. M.; SCHMID, G.; SMIT, H. H. A.; VAN STAVEREN, M. P. J. & THIEL, R. C. "Physical properties of high-nuclearity metal cluster compounds". Z. Phys. D - Atom. Mol. Cl., **12**: 445, 1989.
24. BÖNNEMANN, H. & RICHARDS, R. M. "Nanoscopic metal particles - synthetic methods and potential applications". Eur. J. Inorg. Chem., 2455, 2001.
25. TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. T. & HILLIER, J. "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold". Discuss. Faraday Soc., **11**:55, 1951.
26. HAYAT, M. A. Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications. San Diego, Academic Press, 1989. 536 p.
27. KEATING, C. D.; MUSICK, M. D.; KEEFE, M. H. & NATAN, M. J. "Kinetics and thermodynamics of Au colloid monolayer self-assembly - undergraduate experiments in surface and nanomaterials chemistry". J. Chem. Educ., **76** (7): 949, 1999.
28. VANRHEENEN, P. R.; MCKELVY, M. J. & GLAUNSINGER, W. S. "Synthesis and characterization of small platinum particles formed by the chemical-reduction of chloroplatinic acid". J. Solid State Chem., **67**: 151, 1987.
29. WHALEY, S. R.; ENGLISH, D. S.; HU, E. L.; BARBARA, P. F. & BELCHER, A. M. "Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly". Nature, **405**: 665, 2000.

30. LI, F.; JOSEPHSON, D. P. & STEIN, A. "Colloidal assembly: the road from particles to colloidal molecules and crystals". *Angew. Chem. Int. Edit.*, **50** (2): 360, 2011.
31. DOYEN, M.; BARTIK, K. & BRUYLANTS, G. "UV–Vis and NMR study of the formation of gold nanoparticles by citrate reduction: observation of gold–citrate aggregates". *J. Colloid Interf. Sci.*, **399**: 1, 2013.
32. GEORGIEV, P.; BOJINOVA, A.; KOSTOVA, B.; MOMEKOVA, D.; BJORNHOLM, T. & BALASHEV, K. "Implementing atomic force microscopy (AFM) for studying kinetics of gold nanoparticles growth". *Colloid Surface A*, **434**: 154, 2013.
33. KIMLING, J.; MAIER, M.; OKENVE, B.; KOTAIDIS, V.; BALLOT, H. & PLECH, A. "Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited". *J. Phys. Chem. B*, **110** (32): 15700, 2006.
34. KUMAR, S.; GANDHI, K. S. & KUMAR, R. "Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method". *Ind. Eng. Chem. Res.*, **46** (10): 3128, 2007.
35. ROHIMAN, A.; ANSHORI, I.; SURAWIJAYA, A.; IDRIS, I.; ISKANDAR, F. & ABDULLAH, M. "Study of colloidal gold synthesis using Turkevich method". *AIP Conf. Proc.*, **1415** (1): 39, 2011.
36. MURPHY, C. J.; GOLE, A. M.; STONE, J. W.; SISCO, P. N.; ALKILANY, A. M.; GOLDSMITH, E. C. & BAXTER, S. C. "Gold nanoparticles in biology- beyond toxicity to cellular imaging". *Accounts Chem. Res.*, **41** (12): 1721, 2008.
37. SRNOVÁ-SLOUFOVÁ, I.; LEDNICKÝ, F.; GEMPERLE, A. & GEMPERLOVÁ, J. "Core-shell (Ag) Au bimetallic nanoparticles: analysis of transmission electron microscopy images". *Langmuir*, **16**: 9928, 2000.
38. 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, 2008.
39. NARAYANAN, K. B. & SAKTHIVEL, N. "Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes". *Adv. Colloid Interf. Sci.*, **156**: 1, 2010.
40. NIEMEYER, C. M. "Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science". *Angew. Chem. Int. Edit.*, **40** (22): 4128, 2001.
41. AKSAY, I. A.; TRAU, M.; MANNE, S.; HONMA, I.; YAO, N.; ZHOU, L.; FENTER, P.; EISENBERGER, P. M. & GRUNER, S.M. "Biomimetic pathways for assembling inorganic thin films". *Science*, **273** (5277): 892, 1996.

42. NAIK, R. R.; STRINGER, S. J.; AGARWAL, G.; JONES, S. E. & STONE, M. O. "Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles". *Nat. Mater.*, **1** (3): 169, 2002.
43. SHIN, H.; JO, S. & MIKOS, A. G. "Biomimetic materials for tissue engineering". *Biomaterials*, **24** (24): 4353, 2003.
44. BENYUS, J. M. *Biomimicry*. New York, Harper Collins, 2009. 320 p.
45. DARDER, M.; ARANDA, P. & RUIZ-HITZKY, E. "Bionanocomposites: a new concept of ecological, bioinspired, and functional hybrid materials". *Adv. Mater.*, **19** (10): 1309, 2007.
46. LIU, M.; WANG, S.; WEI, Z.; SONG, Y. & JIANG, L. "Bioinspired design of a superoleophobic and low adhesive water/solid interface". *Adv. Mater.*, **21** (6): 665, 2009.
47. ESTROFF, L. A. & HAMILTON, A. D. "At the interface of organic and inorganic chemistry- bioinspired synthesis of composite materials". *Chem. Mater.*, **13**: 3227, 2001.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. ZHOU, J. C.; GAO, Y.; MARTINEZ-MORALES, 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, 2008.
52. 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.
53. RIBEIRO, C.; BARRADO, C. M.; DE 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.
54. ARANTES, T. M.; MAMBRINI, G. P.; STROPPIA, 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.
55. ZHANG, T.; WANG, W.; ZHANG, D.; ZHANG, X.; MA, Y.; ZHOU, Y. & QI, L. "Biotemplated synthesis of gold nanoparticle-bacteria cellulose

- nanofiber nanocomposites and their application in biosensing". *Adv. Funct. Mater.*, **20** (7): 1152, 2010.
56. QIAO, Y.; WANG, Y.; YANG, Z.; LIN, Y. & HUANG, J. "Self-templating of metal-driven supramolecular self-assembly: a general approach toward 1d inorganic nanotubes". *Chem. Mater.*, **23** (5): 1182, 2011.
  57. JUÁREZ, J.; CAMBÓN, A.; TOPETE, A.; TABOADA, P. & MOSQUERA, V. "One-dimensional magnetic nanowires obtained by protein fibril biotemplating". *Chem-Eur. J.*, **17** (26): 7366, 2011.
  58. NANDAN, B.; GOWD, E. B.; BIGALL, N. C.; EYCHMÜLLER, A.; FORMANEK, P.; SIMON, P. & STAMM, M. "Arrays of inorganic nanodots and nanowires using nanotemplates based on switchable block copolymer supramolecular assemblies". *Adv. Funct. Mater.*, **19** (17): 2805, 2009.
  59. 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.
  60. CHANDLER, D. "Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly". *Nature*, **437** (7059): 640, 2005.
  61. JACKSON, B. D.; DARWIN, C. & HOOKER, J. D. *Index Kewensis, an Enumeration of the Genera and Species of Flowering Plants: From the Time of Linnaeus to the Year 1885 Inclusive Together With their Authors' names, the Works in which They Were First Published, Their Native Countries and Their Synonyms*. Clarendon Press, 1895.
  62. LINNAEUS, C. *Species Plantarum*. Stockholm, Laurentii Salvii, 1753.
  63. MITTERMEIER, R. A.; ROBLES-GIL, P. & MITTERMEIER, C. *Megadiversity Earth's Biological Wealthiest Nations*. Mexico, CEMEX/Agrupación Sierra Madre, 1997.
  64. MITTERMEIER, R. A.; MYERS, N.; THOMSEN, J. B.; FONSECA, G. A. B. D. & OLIVIERI, S. "Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities". *Conserv. Biol.*, **12**: 516, 1998.
  65. KIRK, P. M.; STALPERS, J. A.; MINTER, D. W. & CANNON, P. F. *Dictionary of the Fungi*. The Netherlands, CABI Publishing, 2011. 771 p.
  66. HAWKSWORTH, D. L. "The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited". *Mycol. Res.*, **105**: 1422, 2001.
  67. LEWINSOHN, T. M. & PRADO, P. I. K. L. *Biodiversidade Brasileira: Síntese do Estado Atual do Conhecimento*. São Paulo, Editora Contexto, 2002. 176 p.
  68. FORZZA, R. C. E. A. *Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil*. Rio de Janeiro, Andrea Jakobsson. 2010. 871 p.

69. HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.; ERIKSSON, O.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LUCKING, R.; THORSTEN, H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.; MCLAUGHLIN, D.; POWELL, M.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J.; STALPERS, J.; VILGALYS, R.; AIME, M.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.; CASTLEBURY, L.; CROUS, P.; DAI, Y. -W.; GAMS, W.; GEISER, D.; GRIFFITH, G.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.; HYDE, K.; IRONSIDE, J.; KO LJALG, U.; KURTZMAN, C.; LARSSON, K. H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; DLIKOWSKA, M.; MILLER, A.; MONCALVO, J. -M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, E.; REEB, V.; ROGERS, J.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHUBLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M.; WINKA, K.; YAO, Y. -J. & ZHANG, N. "A Higher-level Phylogenetic Classification of the Fungi". *Mycol. Res.*, **111**: 509, 2007.
70. STEVENSON, G. B. *Biologia dos Fungos, Bactérias e Vírus*. São Paulo, Polígono, 1974. 267 p.
71. PELCZAR, M. J.; REID, R. & CHAN, E. C. S. *Microbiology*. 4<sup>th</sup> ed., New York, McGraw-Hill, 1977. 952 p.
72. COCHRANE, V. W. *Physiology of Fungi*. New York, John Wiley, 1958. 524 p.
73. ADAMS, D. J. "Fungal cell wall chitinases and glucanases". *Microbiology*, **150** (7): 2029, 2004.
74. BOWMAN, S. M. & FREE, S. J. "The structure and synthesis of the fungal cell wall". *BioEssays*, **28** (8): 799, 2006.
75. CABIB, E. "The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis". *J. Biol. Chem.*, **276** (23): 19679, 2001.
76. KLIS, F. M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K. & BRUL, S. "Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiol. Rev.*, **26**: 239, 2002.
77. WEBSTER, J. & WEBER, R. *Introduction to Fungi*. 3<sup>th</sup> ed. Cambridge, Cambridge University Press, 2007. 841 p.
78. ALEXOPOULOS, J. C.; MIMS, C. W. & BLACKWELL, M. S. *Introductory Mycology*. 4<sup>th</sup> ed. New York, John Wiley and Sons, 1996. 869 p.
79. HUBKA, V.; KOLARIK, M.; KUBATOVA, A. & PETERSON, S. W. "Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*". *Mycologia*, **105** (4): 912, 2013.
80. CAMPOS, F. R. Metabolismo secundário de *Aspergillus aculeatus* e *Microbispora* sp. isolados como microrganismos endofíticos de *Melia*

- azedarach L. (Meliaceae). São Carlos, Programa de Pós-graduação em de Química - UFSCar, 2005. Tese de Doutorado, 284 p.
81. GORUP, L. F. Nanopartículas coloidais de ouro e prata e sua funcionalização com dibutil-dicalcogenetos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2010. Dissertação de Mestrado, 127 p.