

ESCOLA POLITÉCNICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
MARIANA MARANGONI

Utilização de *Hypocrea lixii* para Produção de Nanopartículas de
Cobre em Escala Laboratorial.

São Paulo
2016

MARIANA MARANGONI

Utilização de *Hypocrea lixii* para Produção de Nanopartículas de
Cobre em Escala Laboratorial.

Dissertação apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

São Paulo
2016

MARIANA MARANGONI

Utilização de *Hypocrea lixii* para Produção de Nanopartículas de
Cobre em Escala Laboratorial.

Dissertação apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Cláudio A. Oller do
Nascimento.

São Paulo
2016

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 01 de Agosto de 2016

Assinatura do autor:

Mariana M. Marangoni

Assinatura do orientador:

Cláudio de Menezes

Catálogo-na-publicação

Marangoni, Mariana

Utilização de *Hypocrea lixii* para Produção de Nanopartículas de Cobre em Escala Laboratorial / M. Marangoni -- versão corr. -- São Paulo, 2016.

113 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

Dedico esse trabalho aos meus amados pais, Wagner e Mara Lúcia, às minhas queridas irmãs Gabriela e Renata, ao meu noivo e companheiro para toda a vida, Adriano, e ao meu lindo sobrinho Bernardo.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Cláudio A. Oller do Nascimento, pela oportunidade e orientação.

Ao professor Jorge A. Soares Tenório, pelo auxílio e disponibilização de seu laboratório.

Aos amigos e amigas: Mariana de Paula Eduardo, pela paciência, ensinamentos, acompanhamento e apoio, sem os quais esse trabalho não seria possível; Lidiane Andrade, Maria Anita Mendes e Meriellen Dias, pela ajuda, amizade e apoio em diversos momentos; Waldir Caldeira, Vinícius Queiroz e Lívia Fontes pela colaboração, auxílio e parceria.

A todas as outras pessoas que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho: Prof. Benedito Corrêa, Prof. Thiago Basso, Enrique Rozas, Ana Fadel, Daniella Buzzi, Bruno Labate e Fabíola Aliaga.

A FAPESP pelo apoio financeiro que foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

No presente trabalho foi avaliada a capacidade de síntese de nanopartículas de cobre pelo fungo filamentoso *Hypocrea lixii*. Para tanto, o cultivo do fungo foi otimizado em função da concentração celular e do aspecto das hifas. Verificou-se que o cultivo realizado com inóculo de suspensão de esporos congelados em meio contendo extrato de malte forneceu concentração celular de 10g/L consistentemente, além de um aspecto sem aglomerados de células.

A capacidade de bioadsorção de íons cobre (II) da biomassa não viável do fungo *Hypocrea lixii* foi avaliada, utilizando-se isotermas de bioadsorção. Verificou-se que o valor máximo de remoção calculado através do modelo de Langmuir é de 17,4mg/g, que foi considerado condizente com o valor reportado na literatura para o mesmo fungo.

Para a síntese de partículas, inicialmente foram utilizadas biomassa viável e não viável do fungo. Após análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) constatou-se a formação de nanopartículas de diâmetro médio de 15nm no interior e na parede das células para a biomassa não viável. Para a biomassa viável verificou-se a formação de partículas apenas no exterior das células, com diâmetro médio de 30nm. Foi investigado o uso de extratos de suspensão de biomassa viável e não viável, obtidos através do contato das biomassas com água deionizada por 24 horas. Análises de microscopia eletrônica para esses extratos indicaram a formação de partículas de diâmetro médio de 12nm, para o extrato de biomassa viável, e de 10nm para o extrato de biomassa não viável. Um método de obtenção de extrato através de centrifugação de células não viáveis também foi investigado para a síntese de nanopartículas. Análises de microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a formação de nanopartículas de diâmetro médio igual a 13nm. Foi realizada análise de EDS (energy dispersive X-ray spectroscopy) nas partículas obtidas em amostras de extrato proveniente de centrifugação de células não viáveis e verificou-se que são compostas apenas de cobre, confirmando a capacidade de síntese de nanopartículas metálicas. Outras técnicas de caracterização como difração de raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e espectrofotometria (UV-Vis) foram realizadas, porém não forneceram resultados conclusivos.

Como forma de verificar os compostos que poderiam estar envolvidos na síntese das partículas através dos diferentes extratos, foram realizadas análises de espectrometria de massas (MALDI-TOF) e cromatografia gasosa. Através dessas análises foi possível verificar que os compostos que interagem com os íons cobre (II) são aminoácidos, ácidos graxos e açúcares. Apenas no extrato de centrifugação de células não viáveis foi possível verificar a presença de compostos com peso molecular na faixa entre 4kDa e 20kDa, compatível com proteínas.

Uma vez confirmada a capacidade de síntese através de diferentes métodos, foi realizado um delineamento de experimentos central rotacional completo como forma de investigar a influência dos parâmetros pH e temperatura no diâmetro das partículas formadas com o extrato de centrifugação de células não viáveis. O diâmetro das partículas sintetizadas em cada ensaio foi medido através de análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Através dos resultados, um modelo de segundo grau foi calculado utilizando-se o software Minitab® e verificou-se que tanto o pH quanto a temperatura não possuem contribuição significativa no tamanho das partículas sintetizadas. Além disso, observou-se que os diâmetros obtidos para os ensaios foram consideravelmente maiores que o obtido através das análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Considerou-se que essa observação é resultado da presença de ligantes que atuam como estabilizadores das partículas e que contribuem para o aumento virtual do diâmetro medido. Esses ligantes podem ser compostos presentes no extrato e que não aparecem nas análises de microscopia por falta de contraste. Além disso, a análise de DLS é uma medida indireta de diâmetro e são necessárias outras análises para confirmar os resultados obtidos.

Através dos resultados obtidos no presente trabalho, houve confirmação da capacidade de síntese de nanopartículas de cobre do fungo *Hypocrea lixii* e apresentação de metodologias promissoras que podem, após mais estudos, tornar-se um processo industrial.

Palavras-chave: *Hypocrea lixii*. Nanopartículas de cobre. Biossorção. Extrato de células. Delineamento de experimentos central rotacional completo. Biomassa.

ABSTRACT

In this work, the synthesis of copper nanoparticles using fungus *Hypocrea lixii* was evaluated. Therefore, the culture of the fungus was optimized in terms of cell concentration and hyphae qualitative aspect. It was found that cultures inoculated through frozen spore suspensions and using nutrient rich medium containing malt extract reached cell concentrations of 10g/L consistently, in addition to an aggregates-free hyphae aspect.

The biosorption of copper (II) ions using non-viable biomass of *Hypocrea lixii* was measured, and sorption isotherms were constructed. It was found that the maximum removal calculated using the Langmuir model was 17,4mg/g, which was considered consistent with the value previously reported for this fungus.

For the nanoparticle synthesis, the viable and non-viable biomasses of the fungus were initially used. Transmission electron microscopy (TEM) analysis demonstrated the formation of nanoparticles of 15nm of mean diameter inside the cells and in the cell wall for the non-viable biomass. For the viable biomass the particles obtained had 30nm of mean diameter and were located exclusively outside the cells. The use of viable and non-viable biomass suspension extracts was also investigated. The extracts were obtained after contact with double deionized water for 24 hours. Transmission electron microscopy (TEM) analysis showed the formation of particles with mean diameter of 12nm, for the viable biomass extract, and 10nm for the non-viable biomass extract.

A method of obtaining cell extracts through centrifugation was also evaluated for the synthesis of copper nanoparticles. Transmission electron microscopy (TEM) analysis confirmed the formation of nanoparticles with mean diameter of 13nm. Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) was performed on the particles found in samples of the centrifuged cells extract and they were found to be composed of copper only, endorsing the ability of synthesis for this extract. Other characterization techniques such as X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and spectrophotometry (UV-Vis) were performed but the results were inconclusive.

In order to define which compounds present in the cell extracts could be involved in the synthesis reaction, mass spectrometry (MALDI-TOF) and gas chromatography analyses were performed for the different extracts produced.

Through the results of those analyses it was seen that the compounds that interact with the copper (II) ions are amino acids and sugars. Only for the centrifuged cells extract it was possible to confirm the presence of compounds with molecular weights between 4kDa and 20kDa, compatible with proteins.

Having confirmed the ability of the fungus of synthesizing copper nanoparticles through different methods, a central rotational composite design of experiments was established as a way of assessing the influence of the pH and temperature on the diameter of the particles formed using the centrifuged cells extract. The diameter of the particles was measured using dynamic light scattering (DLS). Through the results, a second order model was calculated using the software Minitab[®] and it was found that neither the pH nor the temperature had significant contributions to the size of the particles. Moreover, the diameter found for the experiments were considerably larger than the observed through transmission electron microscopy. It was considered that this observation was a result of the presence of ligands that act as stabilizers for the particles and that contribute to a virtual increase of the diameter measured. These ligands are compounds present in the extract and that are not shown in electron microscopy due to the lack of contrast. Furthermore, the DLS analysis is an indirect measurement of the diameter and other analyses are needed to confirm the results obtained.

Through the results found in this work, there was a confirmation of the ability of the fungus *Hypocrea lixii* to synthesize copper nanoparticles. Promising methodologies were proposed that might, after further studies, become an industrial process.

Keywords : *Hypocrea lixii*. Copper nanoparticles. Biosorption. Cell extract. Central rotational composite design of experiments. Biomass

Índice de Figuras

<i>Figura 1 - Processos de obtenção de biomassas viável e não viável. As etapas envolvidas na obtenção das biomassas estão em destaque.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 2 - Processos de obtenção de extrato de suspensão de biomassas viável e não viável. As etapas envolvidas na obtenção dos extratos de suspensão estão em destaque.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 3 - Processo de obtenção de extrato de centrifugação de células não viáveis. As etapas envolvidas na obtenção do extratos de centrifugação estão em destaque.</i>	<i>40</i>
<i>Figura 4 - Montagem experimental para síntese de nanopartículas em reator controlado. (A) Base controladora de temperatura e agitação. (B) Bomba controladora de pH. (C) Frasco redondo de 250mL para reação. (D) Eletrodo de pH. (E) Termopares. (F) Sistema de injeção de solução de cobre (II) através de membrana estéril de 0,22µm de poro.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 5 - Delineamento composto central rotacional em termos de pH e temperatura.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 6 - Cinética de crescimento do fungo <i>Hypocrea lixii</i> utilizando inóculo de células congeladas e meio de cultura PD. (♦) Curva realizada em Abril/2014. (▲) Curva realizada em Janeiro/2015.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 7 - Cinética de crescimento do fungo <i>Hypocrea lixii</i> utilizando meio contendo extrato de malte e inóculo de suspensão de esporos.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 8 - Isoterma de adsorção de íons cobre (II) pela biomassa não viável do fungo <i>Hypocrea lixii</i>. Dados em triplicata.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 9 - Linearização dos dados de adsorção de íons cobre (II) pela biomassa não viável do fungo <i>H. lixii</i> pelo modelo de Langmuir.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 10 - Linearização dos dados de adsorção de íons cobre (II) pela biomassa não viável do fungo <i>H. lixii</i> pelo modelo de Freundlich.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 11 - Curvas ajustadas através dos modelos de Langmuir (---) e Freundlich (-.-) para os dados de adsorção de íons cobre (II) pela biomassa não viável do fungo <i>H. lixii</i>.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 12 - Amostras de biomassa não viável de <i>H. lixii</i>. (A) e (B) Controle negativo, sem contato com íons cobre (II). (C) e (D) Biomassa não viável após contato com íons cobre (II). As partículas formadas estão indicadas com setas.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 13 - Amostras de biomassa viável de <i>H. lixii</i>. (A) e (B) Controle negativo, sem contato com íons Cu(II). (C) e (D) Biomassa viável após contato com íons Cu(II). As partículas formadas estão indicadas com setas.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 14 - Microscopia eletrônica de transmissão realizada em amostras de extrato de suspensão de biomassa viável de <i>H. lixii</i>. (A) Controle negativo, extrato de suspensão de biomassa sem contato com íons cobre (II). (B) Extrato de suspensão de biomassa após reação de síntese de nanopartículas. (C) Idem (B), partículas menores formadas.</i>	<i>58</i>
<i>Figura 15 - Microscopia eletrônica de transmissão realizada em amostras de extrato de suspensão de biomassa não viável de <i>H. lixii</i>. (A) Controle negativo, extrato de suspensão de biomassa sem contato com íons cobre (II). (B) Extrato de suspensão de biomassa após reação de síntese de nanopartículas. (C) Idem (B), partículas menores formadas.</i>	<i>60</i>

Figura 16 - Microscopia eletrônica de transmissão realizada em amostras de extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii*. (A) Controle negativo, sem adição de íons cobre (II). (B) e (C) Extrato de centrifugação de células não viáveis após reação de síntese de nanopartículas.62

Figura 17 - Microscopia eletrônica de transmissão realizada em extrato de centrifugação de células não viáveis do fungo *H. lixii* após contato com íons cobre (II), detalhe de partícula encontrada. As letras indicam os pontos onde foi realizada a análise de EDS (energy dispersive spectroscopy) para verificação da composição. (A) Espectro correspondente à partícula. (B) Espectro correspondente ao meio vizinho à partícula.....64

Figura 18 - Microscopia eletrônica de transmissão realizada em nanopartículas produzidas através de extrato de centrifugação de células não viáveis do fungo *H. lixii* após contato com íons cobre (II).(A), (B) e (C) representam a diversidade de estruturas cristalinas encontradas. As diferentes direções estão indicadas através das setas.....66

Figura 19 – Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa não viável sem contato com íons cobre (II), coluna DB1.67

Figura 20 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa não viável após contato com íons cobre (II), coluna DB1.68

Figura 21 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa viável sem contato com íons cobre (II), coluna DB1.....68

Figura 22 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa viável após contato com íons cobre (II), coluna DB1.....69

Figura 23 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa não viável sem contato com íons cobre (II), coluna WAX.....70

Figura 24 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa não viável após contato com íons cobre (II), coluna WAX.....70

Figura 25 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa viável sem contato com íons cobre (II), coluna WAX.....71

Figura 26 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa viável após contato com íons cobre (II), coluna WAX.....71

Figura 27 - Espectro de massas obtido através da análise de espectrometria de massas (MALDI-TOF) realizada para extratos de centrifugação de células não viáveis sem contato com íons cobre (II).72

Figura 28 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de centrifugação de células não-viáveis de *H. lixii* sem contato com íons cobre (II), coluna WAX.73

Figura 29 – Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii* após contato com íons cobre (II), coluna WAX.73

Figura 30 - Resultado de análise de DLS realizada em extrato de células não viáveis, sem contato com íons cobre (II).75

Figura 31 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de <i>H. lixii</i> . Condições de reação: pH = 3,6 e temperatura = 32,9°C (Ensaio A).....	77
Figura 32 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de <i>H. lixii</i> . Condições de reação: pH = 3,6 e temperatura = 47,1°C (Ensaio B).....	78
Figura 33 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de <i>H. lixii</i> . Condições de reação: pH = 6,4 e temperatura = 32,9°C (Ensaio C).	79
Figura 34 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de <i>H. lixii</i> . Condições de reação: pH = 6,4 e temperatura = 47,1°C (Ensaio D).	79
Figura 35 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de <i>H. lixii</i> . Condições de reação: pH = 3,0 e temperatura = 40,0°C (Ensaio E).....	80
Figura 36 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de <i>H. lixii</i> . Condições de reação: pH = 7,0 e temperatura = 40,0°C (Ensaio F).....	81
Figura 37 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de <i>H. lixii</i> . Condições de reação: pH = 5,0 e temperatura = 30,0°C (Ensaio G).	81
Figura 38 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de <i>H. lixii</i> . Condições de reação: pH = 5,0 e temperatura = 50,0°C (Ensaio H).	82
Figura 39 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de <i>H. lixii</i> . Condições de reação: pH = 5,0 e temperatura = 40,0°C, primeiro ensaio (Ensaio I).	82
Figura 40 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de <i>H. lixii</i> . Condições de reação: pH = 5,0 e temperatura = 40,0°C, segundo ensaio (Ensaio J).....	83
Figura 41 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de <i>H. lixii</i> . Condições de reação: pH = 5,0 e temperatura = 40,0°C, terceiro ensaio (Ensaio K).....	83
Figura 42 - Gráficos de Resíduos em relação ao diâmetro médio das partículas formadas calculados através do modelo quadrático completo. (A) Gráfico de probabilidade normal. (B) Resíduos em função dos valores ajustados. (C) Histograma de resíduos em função da frequência. (D) Resíduos em função da ordem da observação.	88
Figura 43 - Diagrama resultante da análise de difração de raios-X (DRX). Amostra de extrato de suspensão de biomassa viável após reação de síntese de nanopartículas.	104

<i>Figura 44 - Diagrama resultante da análise de difração de raios-X (DRX). Amostra de biomassa não viável após reação de síntese de nanopartículas.</i>	105
<i>Figura 45 - Análise de espectroscopia de infravermelho (FT-IR). (A) Extrato de suspensão de biomassa viável sem contato com íons cobre (II). (B) Extrato de suspensão de biomassa viável após reação de síntese de nanopartículas.</i>	106
<i>Figura 46 - Análise de espectroscopia de infravermelho (FT-IR). (A) Extrato de células não viáveis sem contato com íons cobre (II). (B) Extrato de células não viáveis após reação de síntese de nanopartículas.</i>	107
<i>Figura 47 - Análise de espectroscopia de infravermelho (FT-IR). (A) Biomassa viável sem contato com íons cobre (II). (B) Biomassa viável após síntese de nanopartículas.</i>	108
<i>Figura 48 - Análise de espectroscopia de infravermelho (FT-IR). Amostra de água destilada.</i>	109
<i>Figura 49 - Espectro resultante da análise de espectrofotometria (UV-Vis) em amostra de extrato de suspensão de biomassa não viável. (A) Controle, sem contato com íons cobre (II). (B) Extrato após reação de síntese de nanopartículas. (C) Solução de cloreto de cobre (II), concentração de íons igual a 2g/L.</i>	110
<i>Figura 50 - Espectro resultante da análise de espectrofotometria (UV-Vis) em amostra de extrato de suspensão de biomassa viável. (A) Controle, sem contato com íons cobre (II). (B) Extrato após reação de síntese de nanopartículas. (C) Solução de cloreto de cobre, concentração de íons cobre (II) igual a 2g/L.</i>	111
<i>Figura 51 - Análise de espectrometria de massas (MALDI-TOF). (E) Amostra de extrato de suspensão de biomassa viável após reação de síntese de nanopartículas. (F) Amostra de extrato de suspensão de biomassa não viável após reação de síntese de nanopartículas. (G) Amostra de extrato de suspensão de biomassa viável sem contato com íons cobre (II). (H) Amostra de extrato de suspensão de biomassa não viável sem contato com íons cobre (II).</i>	112
<i>Figura 52 - Comparação entre espectros obtidos através de análise de espectrometria de massas (MALDI-TOF). (A) Espectro correspondente ao extrato de centrifugação de células não viáveis sem contato com íons cobre (II). (B) Espectro correspondente ao extrato de suspensão de biomassa viável sem contato com íons cobre (II). (C) Espectro correspondente ao extrato de suspensão de biomassa não viável sem contato com íons cobre (II).</i>	113

Índice de tabelas

<i>Tabela 1 - Modelos de adsorção utilizados frequentemente (VOLESKY, 2003).</i>	24
<i>Tabela 2 - Análises comumente usadas na identificação e caracterização de nanopartículas.</i>	34
<i>Tabela 3 - Composição do meio de cultura contendo extrato de malte.</i>	35
<i>Tabela 4 - Matriz do delineamento composto central rotacional.</i>	42
<i>Tabela 5 - Condições de operação das colunas para análises de cromatografia gasosa.</i>	45

<i>Tabela 6 - Parâmetros dos modelos de Langmuir e Freundlich calculados a partir dos dados de adsorção de íons cobre (II) pelo fungo H. lixii.</i>	<i>52</i>
<i>Tabela 7 - Tabela do delineamento de experimentos composto central rotacional com valores codificados e não codificados das variáveis pH e temperatura e os ensaios correspondentes.</i>	<i>74</i>
<i>Tabela 8 - Diâmetros médios, desvios padrão e índice de polidispersividade (PDI) correspondentes aos ensaios que compõem o delineamento composto central rotacional.</i>	<i>84</i>
<i>Tabela 9 - Matriz do delineamento de experimentos. Fatores pH e temperatura com valores codificados e não codificados e respostas de diâmetro médio.</i>	<i>86</i>
<i>Tabela 10 - Análise de variância referente ao modelo quadrático completo obtido através dos dados de diâmetro médio das nanopartículas formadas em função do pH e da temperatura.</i>	<i>87</i>
<i>Tabela 11 - Sumário do modelo quadrático completo referente à regressão.</i>	<i>88</i>

Índice de equações

<i>Equação 1 - Cálculo da massa seca de células.</i>	<i>38</i>
<i>Equação 2 - Cálculo da concentração celular a partir da massa seca de células.</i>	<i>38</i>
<i>Equação 3 - Cálculo da quantidade de metal adsorvido em função da massa de sorvente.</i>	<i>44</i>
<i>Equação 4 – Equação de regressão em unidades não codificadas gerada a partir dos dados de diâmetro médio das nanopartículas de cobre.</i>	<i>86</i>

SUMÁRIO

1	Introdução e Justificativa.....	16
2	Objetivos	19
2.1	Objetivos Gerais	19
2.2	Objetivos Específicos.....	19
3	Revisão da Literatura	20
3.1	Características do fungo <i>Hypocrea lixii</i>	20
3.2	Bioprocessos em larga escala que utilizam biomassa de fungos	20
3.3	Utilização de fungos para biorremediação e recuperação de metais pesados 21	
3.3.1	Utilização de biomassa não viável de fungos em bioissorção de cobre.....	22
3.4	Isoterma de bioissorção.....	24
3.5	Nanotecnologia: definições e estado da arte	25
3.6	Desenvolvimento e uso de nanopartículas.....	26
3.6.1	Aplicações das nanopartículas de cobre.....	27
3.6.2	Métodos tradicionais de produção de nanopartículas	28
3.6.2.1	Métodos 'Top-Down'	28
3.6.2.2	Métodos 'Bottom-Up'	29
3.6.3	Métodos tradicionais para a produção de nanopartículas de cobre	29
3.6.4	Métodos biotecnológicos para a produção de nanopartículas metálicas	30
3.6.4.1	Produção de nanopartículas utilizando fungos.....	32
3.6.4.2	Uso de extratos de células para produção de nanopartículas	33
4	Materiais e Métodos.....	35
4.1	Reagentes	35
4.1.1	Meios de cultivo	35
4.1.2	Soluções.....	35
4.2	Microorganismo	36
4.2.1	Preservação da Cepa.....	36
4.2.2	Estoque de células e inóculos	36
4.3	Cultivo do fungo <i>H. lixii</i>	36
4.4	Obtenção de biomassa viável e não viável	37
4.5	Determinação de concentração celular.....	37
4.6	Obtenção de extratos de células	38
4.6.1	A partir de suspensão de biomassa em água deionizada	38
4.6.2	A partir de centrifugação de células não viáveis	39
4.7	Síntese de nanopartículas de cobre.....	40
4.7.1	Biomassa de células	40
4.7.2	Extrato de células.....	40
4.7.3	Síntese em reator controlado	41

4.8	Planejamento experimental.....	42
4.9	Isotermas de biossorção.....	43
4.10	Análises físico-químicas	44
4.10.1	Espectroscopia de absorção atômica (AAS).....	44
4.10.2	Cromatografia Gasosa	44
4.10.3	Espectrometria de massas (MALDI-TOF).....	45
4.10.4	Espectrofotometria (UV-Vis).....	45
4.10.5	Difração de raios X.....	45
4.10.6	Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR).....	46
4.10.7	Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	46
4.11	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	46
4.11.1	Preparo de amostras de células	46
4.11.2	Preparo de amostras líquidas.....	47
4.11.3	Microscópios Eletrônicos.....	47
5	Resultados e Discussão.....	48
5.1	Definição do meio de cultura	48
5.2	Biossorção de cobre (II) pelo fungo <i>H. lixii</i>.....	50
5.3	Síntese de nanopartículas de cobre utilizando biomassa	54
5.3.1	Biomassa não viável	54
5.3.2	Biomassa viável	55
5.4	Síntese de nanopartículas utilizando extrato de suspensão de biomassa.....	57
5.5	Síntese de nanopartículas utilizando extrato de centrifugação de células não viáveis	61
5.5.1	Caracterização das nanopartículas sintetizadas por extrato de centrifugação de células não viáveis.....	63
5.6	Análise de composição dos extratos de <i>Hypocrea lixii</i>.....	67
5.6.1	Extratos de suspensão de biomassa	67
5.6.2	Extrato de centrifugação de células não viáveis.....	72
5.6.3	Avaliação do efeito do pH e temperatura no diâmetro das nanopartículas formadas ...	74
6	Conclusões	90
7	Sugestões para continuidade do trabalho	94
	REFERÊNCIAS.....	96
	APÊNDICE A - Resultados das análises de Difração de Raios-X (DRX).....	104
	APÊNDICE B - Resultados das análises de Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR).....	106
	APÊNDICE C - Resultados das análises de Espectrofotometria (UV-Vis).....	110
	APÊNDICE D - Resultados das análises de Espectrometria de massas (MALDI-TOF).....	112

1 Introdução e Justificativa

O presente trabalho está inserido em um projeto de descontaminação e biorremediação da lagoa de rejeitos da Mina de cobre de Sossego, localizada em Canaã dos Carajás (PA), na região norte do Brasil, em parceria com a companhia Vale S. A. Nesse projeto, estão sendo investigados diversos microorganismos capazes de promover a lixiviação do solo e adsorver e/ou absorver os íons cobre (II) presentes na fase líquida. Nesse contexto, um estudo recente realizado por SALVADORI et al. (2013) investigou o uso de biomassa não viável do fungo filamentoso *Hypocrea lixii* isolado a partir de água oriunda da lagoa de rejeitos em escala laboratorial para biossorção de cobre iônico e foi verificada sua capacidade de síntese de nanopartículas de cobre.

O prefixo 'nano' é utilizado para indicar a grandeza de 10^{-9} . Sendo assim, 1 nanometro corresponde a 1 bilionésimo de um metro. Em termos práticos, um nanometro corresponde à distância entre 2 a 20 átomos (dependendo do tipo de átomo). O termo nanotecnologia possui diversas definições (RAMSDEN, 2009a). Uma delas, descrita pelo US Foresight Institute é "um grupo de tecnologias emergentes nas quais a estrutura da matéria é controlada na escala nanométrica para produzir novos materiais e dispositivos que sejam úteis e que tenham propriedades únicas" (FORESIGHT INSTITUTE, [s.d.]).

Materiais até a escala micrométrica geralmente mantêm as propriedades de sua forma macrométrica, porém na escala nanométrica as propriedades são completamente diferentes (CAO, 2004). Com o avanço de técnicas de análise microscópica, o desenvolvimento de novos materiais tem sido mais sistemático e melhor fundamentado. A existência dos nanomateriais não é novidade, porém o entendimento sobre formações de alguns óxidos, metais e cerâmicas é relativamente recente (WILSON et al., 2002). Todos os usos e definições diferentes que existem em relação à nanotecnologia refletem sua aplicabilidade em uma gama muito extensa de campos de pesquisa e a necessidade da multidisciplinaridade para compreendê-la (CAO, 2004).

As nanopartículas metálicas são particularmente interessantes, pois são relativamente fáceis de sintetizar e de serem modificadas quimicamente (FELDHEIM; FOSS JR., 2002). Dentre as mais comuns estão as nanopartículas de prata e as nanopartículas de cobre. Devido ao seu custo relativamente baixo (se

comparado a outras nanopartículas) e suas propriedades de interesse, como ótica, catalítica, magnética, antibacteriana e de condução de calor, as nanopartículas de cobre têm atraído bastante atenção e diferentes métodos de produção tem sido propostos (ZHANG et al., 2010). Uma pesquisa recente indicou que o mercado de nanopartículas de óxidos metálicos tinha previsão de crescimento de 270.041 toneladas em 2012 para 1.663.168 toneladas em 2020 (RESEARCH AND MARKETS, 2013). Pode-se dizer que, atualmente, as nanopartículas representam a única parte dos nanomateriais com relevância comercial (RAMSDEN, 2011a)

Tendo em vista que a nanotecnologia tem o potencial de impulsionar a proteção ao meio ambiente através do controle de emissões e do desenvolvimento de novas tecnologias que minimizam a produção de subprodutos (NATIONAL NANOTECHNOLOGY COORDINATION OFFICE, 2003), o desenvolvimento de novos processos para manufatura em escala nanométrica deve seguir às seguintes diretrizes: reduzir/eliminar o desperdício de material, reduzir ao máximo a quantidade de recursos utilizados, minimizar o uso de energia e garantir os aspectos ambientais, de segurança e éticos (NATIONAL NANOTECHNOLOGY COORDINATION OFFICE, 2003).

Nesse cenário, a busca por processos biotecnológicos que consigam sintetizar nanopartículas metálicas com sucesso é motivada pelas desvantagens apresentadas pelos processos tradicionais (como síntese através de micelas e eletrodeposição). As principais desvantagens dos métodos tradicionais são o uso de solventes tóxicos, subprodutos prejudiciais à saúde humana, altos custos relacionados à energia, uso de equipamentos complexos, dificuldade de obter partículas menores e baixa pureza das partículas produzidas (RAMANATHAN; BHARGAVA; BANSAL, 2010; ZHANG et al., 2010).

Por possuírem alta capacidade de sintetizar materiais de tamanho nanométrico naturalmente, as células de microorganismos estão sendo cada vez mais exploradas para a síntese de nanopartículas metálicas (GERICKE; PINCHES, 2006b). Além disso, a interação entre células e metais já é utilizada para processos tecnológicos nas áreas de lixiviação e bioremediação (GERICKE; PINCHES, 2006b).

Até o momento, os bioprocessos investigados para síntese de nanopartículas metálicas incluem o uso de bactérias, bolores, leveduras e plantas (DHILLON et al., 2012a). Cada agente biológico produz partículas com características singulares e

ainda há grande discussão sobre qual a biomolécula e/ou mecanismo é responsável pela biossíntese de nanopartículas de metal (HONARY et al., 2012). Fungos são versáteis, se adaptam facilmente às condições ambientes e crescem em uma grande faixa de pH, temperatura, concentração de metal e de nutrientes. Consequentemente, têm sido escolhidos para uma grande gama de estudos nas áreas de bioremediação e produção de nanopartículas metálicas (GADD, 1993). Destaca-se que a transformação dos íons poluentes em um produto de interesse, como as nanopartículas metálicas, apresenta uma enorme vantagem em relação à adsorção como forma de remediação pois reduz a necessidade de desenvolvimento de processos de dessorção e recuperação dos íons, que geralmente envolvem volumes elevados de eluente e geram material tóxico para descarte (GADD, 1993).

Sendo assim, esse trabalho visa explorar o uso do fungo filamentoso *Hypocrea lixii* para a produção de nanopartículas de cobre sob diferentes condições como forma de verificar seu potencial como processo de produção em escala industrial.

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo do presente trabalho é o estudo da utilização do fungo *Hypocrea lixii* para a produção de nanopartículas de cobre em escala laboratorial. Dessa forma, serão exploradas diferentes metodologias e verificada a influência dos parâmetros pH e temperatura no processo de síntese como estudos preliminares visando ao desenvolvimento de um processo industrial.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desse trabalho incluem:

- Cultivo da biomassa, otimizado em termos de concentração de células e área superficial (qualitativa) das hifas;
- Determinação da capacidade de bioissorção de íons cobre (II) da biomassa não viável;
- Identificação e caracterização das nanopartículas formadas a partir de diversas metodologias utilizando-se técnicas analíticas e microscopia eletrônica;
- Promover a adaptação do processo de síntese para reatores laboratoriais automatizados;
- Realizar o estudo da influência do pH e temperatura na formação das partículas em relação ao diâmetro.

3 Revisão da Literatura

3.1 Características do fungo *Hypocrea lixii*

De acordo com JAKLITSCH (2009), os gêneros *Hypocrea* e *Trichoderma* são manifestações de um mesmo organismo. O gênero *Hypocrea* é menos conhecido e geralmente não é explorado em estudos de biorremediação, bioissorção e síntese de nanopartículas. O gênero *Trichoderma*, por outro lado, é bastante explorado e possui diversos resultados em estudos de bioissorção e produção de nanopartículas (ANAND et al., 2006; LÓPEZ ERRASQUÍN; VÁZQUEZ, 2003; TING; CHOONG, 2009). Um estudo publicado por CHAVERRI e SAMUELS (2002) indica que o fungo *Hypocrea lixii* é o teleomorfo do fungo *Trichoderma harzanium*. Isso significa que a espécie *Hypocrea lixii* é a forma que realiza reprodução sexuada da espécie *Trichoderma harzanium*.

O gênero *Hypocrea* é de extrema importância para produtores industriais de enzimas, e bioagentes para controle de fungos fitopatogênicos e patógenos em humanos imunocomprometidos (KOPCHINSKIY et al., 2005). A espécie *Hypocrea lixii* é descrita como equivalente às espécies *Hypocrea nigricans* e *Hypocrea lentiformis* (CHAVERRI; SAMUELS, 2002).

3.2 Bioprocessos em larga escala que utilizam biomassa de fungos

Para que os fungos possam ser considerados uma opção adequada para o desenvolvimento de um processo industrial de produção de nanopartículas, pode-se citar diversos processos de produção em larga escala e produtos do dia-a-dia que empregam a biomassa desses organismos. A produção de antibióticos como a penicilina, por exemplo, tem sido realizada com o auxílio de fungos da espécie *Penicillium* e *Cephalosporium* há mais de 60 anos (EL-ENSHASY, 2007).

Além da produção de antibióticos, fungos também são fundamentais para a produção de enzimas, riboflavina, ácido cítrico, ácido linoleico, entre outros (EL-ENSHASY, 2007).

Os processos industriais que utilizam fungos também podem ser encontrados nos segmentos de alimentação (produção de alimentos), ração animal e combustíveis. As amilases, também produzidas por fungos (α -amilases) são

utilizadas como adoçantes pela indústria de bebidas, na indústria têxtil, de papel e celulose e na produção de detergentes (SAXENA; MALHOTRA; BATRA, 2003).

3.3 Utilização de fungos para biorremediação e recuperação de metais pesados

A remoção de metais pesados como cobre, cádmio, cromo, zinco, etc. de rejeitos, águas e solos é imprescindível devido a sua toxicidade e ao risco que trazem à saúde humana e aos biomas (KAPOOR; VIRARAGHAVAN; CULLIMORE, 1999). Os métodos convencionais para a remoção de metais pesados incluem precipitação, filtração, troca iônica, tratamento eletroquímico, adsorção em carvão ativado, evaporação, entre outros (WANG; CHEN, 2009). Porém muitos desses métodos são pouco eficazes quando as concentrações de metal são baixas, além de envolverem altos investimentos e custos operacionais (MALIK, 2004). O método que apresenta maior eficiência, mesmo em concentrações baixas é a adsorção. Contudo, o alto preço dos adsorventes (geralmente carvão ativado) é considerado um obstáculo para sua aplicação na indústria (LESMANA et al., 2009). Sendo assim, novos materiais que possam ser usados em abundância e com preços acessíveis têm sido buscados.

A biomassa de fungos tem sido vastamente explorada como uma alternativa aos métodos convencionais de remoção e recuperação de metais pesados em solução aquosa. Estudos como o de KAPOOR, VIRARAGHAVAN e CULLIMORE (1999) indicam que tanto a biomassa viável quanto a não viável de fungos é capaz de acumular metais. A passagem do metal através da membrana e do ciclo metabólico da célula é denominada acúmulo ativo. O acúmulo passivo consiste na aderência (sorção) do metal nos sítios específicos (receptores) presentes na estrutura celular através de uma interação físico-química.

Os fungos filamentosos mais comumente estudados são parte dos gêneros *Aspergillus* (DURSUN et al., 2003; KAPOOR; VIRARAGHAVAN; CULLIMORE, 1999; MUKHOPADHYAY; NORONHA; SURAIISKUMAR, 2007), *Rhizopus* (BHAINSA; D'SOUZA, 2008; PREETHA; VIRUTHAGIRI, 2007) e *Penicillium* (WANG; CHEN, 2009), porém cada espécie tem desempenhos diferentes com relação ao poluente e às condições nas quais são conduzidas a bioadsorção. Fungos desse gênero podem chegar a uma capacidade de remoção de mais de 200mg/g (WANG; CHEN, 2009) e

representam uma alternativa interessante para a bioremediação devido à sua abundância e seu baixo valor.

Existem diferentes formas de interação entre a biomassa viável e não viável de fungos e íons metálicos, algumas delas envolvem a transformação dos íons, como complexação, redução e precipitação de compostos externos às células (GADD, 1993). Sendo assim, pode-se afirmar que algumas espécies de fungos são capazes de remediar locais contaminados não só através da biossorção mas também atuando para formação de compostos menos tóxicos (GADD, 1993). Há registros de espécies que apresentam alta tolerância a íons metálicos e também são capazes de sintetizar nanopartículas metálicas, sugerindo que esses dois processos podem estar relacionados para alguns microrganismos (DHILLON et al., 2012a; KORBKANDI; IRAVANI; ABBASI, 2009a; KOWSHIK et al., 2003).

3.3.1 Utilização de biomassa não viável de fungos em biossorção de cobre

Diversos estudos exploram a diferença entre as capacidades de biossorção de biomassa viável e biomassa não viável. Grande parte desses estudos considera a biomassa viável como as células obtidas após um tempo determinado de cultivo, colhidas e lavadas extensivamente com água deionizada (KAPOOR; VIRARAGHAVAN; CULLIMORE, 1999; SALVADORI et al., 2013) e até mesmo células secas em estufa (BURATTO; COSTA; FERREIRA, 2012; TING; CHOONG, 2009). Para a obtenção de células não viáveis, são aplicados tratamentos químicos, como a fervura em solução de NaOH, ou físicos, como a autoclavagem (BHAINSA; D'SOUZA, 2008; LESMANA et al., 2009).

A capacidade de biossorção em células não viáveis pode ser maior, menor ou igual à capacidade das células viáveis. Contudo, o uso de células não viáveis tem certas vantagens com relação às possíveis aplicações industriais. Sistemas que utilizam células viáveis são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos de altas concentrações de íons metálicos. Além disso, é preciso garantir faixas específicas de condições de operação (pH, temperatura, etc.) e a recuperação do metal e regeneração das células é dificultada em sistemas com células viáveis (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995). Outra vantagem da exploração de biomassa não viáveis é a possível utilização de 'rejeito' de micelas provenientes de processos industriais com fungos já estabelecidos no mercado (DHILLON et al., 2012a).

Em resultados obtidos com células não viáveis, a capacidade de bioadsorção de cobre para o fungo *Rhizopus oryzae* pré-tratado com NaOH foi de 21 mgCu/g enquanto que a capacidade das células viáveis secas em estufa foi de 12,5 mgCu/g (BHAINSA; D'SOUZA, 2008). O fungo *Trichoderma SP2F1* autoclavado apresentou capacidade de bioadsorção igual a 23,01 mgCu/g após 240 minutos de contato. Contudo a máxima bioadsorção prevista pelo modelo de Langmuir é 28,75 mgCu/g (TING; CHOONG, 2009). Em um estudo similar, AKAR e TUNALI (2005) observaram que a capacidade de bioadsorção do fungo *Boytrytis cinerea* após autoclavagem, secagem e moagem é de $9,23 \pm 0,64$ mgCu/g. Já para o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, a capacidade de bioadsorção em um experimento com pH controlado foi de 20,23 mgCu/g, enquanto o máximo previsto pelo modelo de Langmuir é de 26,55 mgCu/g. Nesse experimento, as células foram secas em estufa (SAY; DENIZLI; ARICA, 2001). Um estudo realizado por VEIT et al. (2005a) descreve a bioadsorção de cobre II por fungos mortos através de inativação com solução de formaldeído. Porém a quantidade de cobre adsorvido é muito baixa, se comparada a recentes estudos realizados por SALVADORI et al. (2013): 6,20 mg/g para o fungo *P. pulmonarius* e 1,52 mg/g para o fungo *S. commune* contra 19,0 mg/g para o fungo *Hypocrea lixii*.

VEGLIO' e BEOLCHINI (1997) indicaram que os possíveis mecanismos envolvidos na bioadsorção de metais podem ser classificados de acordo com a dependência do metabolismo das células (dependente ou não dependente) e com a localização do metal adsorvido (intracelular ou extracelular). Além disso, os fenômenos que podem ser classificados como bioadsorção são transporte através da membrana celular, precipitação, adsorção física, troca iônica e complexação.

Tendo em vista os resultados obtidos até o presente, ainda não há consenso sobre qual fungo filamentoso é o ideal para a bioadsorção de cobre e nem sobre qual pré-tratamento é mais eficaz. RANGABHASHIYAM et al., (2014) indicam questões a serem exploradas como o uso de engenharia genética para melhorar a capacidade de adsorção, a melhoria da força mecânica dos biosorventes para o reuso, a busca de uma combinação entre diferentes biosorventes e que atenda a diferentes poluentes e a extensão dos resultados para uma escala piloto, para verificar a possibilidade de utilização comercial.

3.4 Isoterma de bioissorção

Há indícios na literatura de que o equilíbrio da bioissorção de metais pesados e compostos orgânicos segue um padrão similar à isoterma de adsorção. O grau de bioissorção de um íon metálico é função da concentração no equilíbrio a pH e temperaturas constantes e os modelos de adsorção de soluto único de Langmuir e Freundlich são comumente usados para descrever o equilíbrio de bioissorção. (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995)

A Tabela 1 traz os modelos de adsorção frequentemente usados para os fenômenos de bioissorção.

Tabela 1 - Modelos de adsorção utilizados frequentemente (VOLESKY, 2003).

Modelo de adsorção monossoluto	Equacionamento
Langmuir	$Q_{eq} = \frac{b \cdot Q_{m\acute{a}x} \cdot C_{eq}}{1 + b \cdot C_{eq}}$
Freundlich	$Q_{eq} = K_f \cdot C_{eq}^{1/n}$

Nos modelos apresentados, Q_{eq} (mg/g) representa a quantidade de metal adsorvido por unidade de massa do adsorvente e C_{eq} (mg/L) representa a concentração de íons no equilíbrio. No modelo de Langmuir, b (L/mg) é uma constante relacionada à energia de ligação da adsorção (AKSU, 2005). Além disso, esse modelo considera que a adsorção se dá em monocamada em uma superfície com número finito de sítios ativos idênticos (VEIT et al., 2005a). A equação de Freundlich é empírica e se baseia em sorção em uma superfície heterogênea. No modelo de Freundlich, K_f e $1/n$ são constantes características do sistema e representam a capacidade e a intensidade de adsorção, respectivamente (VEIT et al., 2005a).

Acredita-se que não é necessário utilizar modelos mais complexos para ajustar o fenômeno de bioissorção quando os modelos mais simples de Langmuir e Freundlich forem satisfatórios. Porém, esses modelos servem apenas como funções matemáticas, já que não refletem o mecanismo de bioissorção (VOLESKY, 2003).

3.5 Nanotecnologia: definições e estado da arte

O termo nanotecnologia é relativamente novo, porém pesquisas e produtos na escala nanométrica já fazem parte do conhecimento científico há muito tempo (FELDHEIM; FOSS JR., 2002). O estudo de sistemas biológicos e a engenharia de diversos materiais, como dispersões coloidais e catalisadores, estão na esfera nanométrica há séculos (JOSE-YACAMAN et al., 1996). Há relatos de que os chineses utilizavam partículas nanométricas de ouro como corante inorgânico para conferir às suas porcelanas a cor vermelha há milhares de anos (CAO, 2004). Negro de fumo é um nanomaterial usado em pneus para aumentar sua vida útil e lhe conferir a cor preta. Sua descoberta data do início do século XX. A sílica pirogênica (fumed silica), um componente para borrachas de silicone, revestimentos, selantes e adesivos disponível para comercialização desde a década de 1940, é também um nanomaterial.

Existem diversas opiniões sobre o que é exatamente a nanotecnologia. O conceito de nanotecnologia pode envolver o estudo de microestruturas com microscopia eletrônica, fabricação de filmes com espessura de alguns átomos, liberação de medicamentos utilizando nanotubos de carbono e até elevadores espaciais fabricados a partir de nanotubos (CAO, 2004).

Os principais campos de desenvolvimento da nanotecnologia atualmente são eletrônica, fotocatalise (CHEN; YE, 2008), medicina (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012), computação (TIMP; HOWARD; MANKIEWICH, 1998), robótica (BUSNAINA; MEHTA, 2007), energia solar (KAMAT, 2007), novos materiais (ARIGA et al., 2012), entre outros.

O desenvolvimento de processos em larga escala de síntese de nanomateriais tem sido dificultado pela baixa compreensão sobre as barreiras de produção na escala nanométrica (BUSNAINA; MEHTA, 2007). Para acelerar a transferência de conhecimento entre as descobertas científicas e os métodos de produção em larga escala é necessário intensificar a pesquisa relacionada ao scale-up do volume produzido, robustez e confiabilidade dos processos e a integração das nanoestruturas com estruturas em escalas maiores (BUSNAINA; MEHTA, 2007).

3.6 Desenvolvimento e uso de nanopartículas

Definem-se nanopartículas como partículas que possuem uma ou mais dimensões na escala nanométrica (RAMSDEN, 2009a). Com o desenvolvimento da nanotecnologia, é possível encontrar nanopartículas dos mais diversos materiais, como metais (KELLY et al., 2003), óxidos metálicos (ATHAR, 2009), materiais biológicos como polissacarídeos (GAN; WANG, 2007) e lipídeos (MULLER; MADER; GOHLA, 2000), etc. Devido às suas propriedades, as nanopartículas tem sido usadas para produção de materiais sob medida para cada aplicação, melhorando sua performance (RAMSDEN, 2009a).

As nanopartículas de metal têm sido utilizadas há séculos. Artefatos datados do século XI encontrados nas ruínas de Chichen Itza apresentam um pigmento azul cuja cor se deve à presença de nanopartículas de ferro e cromo (JOSE-YACAMAN et al., 1996). Além disso, a cor avermelhada do vidro conhecido como '*ruby glass*', produzido desde o século XVII, se deve à incorporação de nanopartículas de ouro à sílica fundida (FELDHEIM; FOSS JR., 2002).

Nanomateriais e nanocompósitos possuem as mais diversas aplicações em diferentes campos do conhecimento. Com o avanço das técnicas de microscopia, novas possibilidades se abriram para a caracterização, medição e manipulação de nanoestruturas e nanomateriais, ampliando ainda mais seu potencial como substituição de materiais convencionais (CAO, 2004).

Desde o começo do século XXI, as aplicações para nanopartículas em pó tem se expandido e, atualmente são utilizadas as seguintes, entre muitas outras (ATHAR, 2009):

- Protetores solares e cosméticos: nanopós de titânio e zinco;
- Tecidos: Teflon e fibras nanométricas são usados em roupas resistentes a manchas e que não amassam. Algumas nanopartículas podem inclusive ser usadas para higienizar tecidos devido à sua ação antibacteriana, diminuindo o uso de substâncias tóxicas (DASTJERDI; MONTAZER, 2010);
- Revestimentos: nanocompósitos e pó de dióxido de titânio nanométrico são usados em revestimentos antirriscos e autolimpantes para lentes e superfícies de vidro;
- Explosivos: nanopó de alumínio é usado para aumentar a inflamabilidade desses materiais.

-Catalisadores: devido à alta área superficial, nanocatalisadores tem alta eficiência;

-Desinfetantes: nanoemulsões e nanopartículas de compostos de lantânio estão sendo usadas como desinfetantes de superfície para prevenir o crescimento de algas em piscinas e aquários;

-Filtração: filtros feitos com nanofibras são usados para reter vírus, bactérias, células animais, endotoxinas e macromoléculas. Também são usados para remoção de traços de metais tóxicos da água;

-Usos médicos: nanopartículas de prata são usadas como agentes antibacterianos em bandagens e como revestimento de aparelhos de surdez. Além disso, outras aplicações nessa área incluem liberação de medicamentos apenas no local necessário, diminuindo os efeitos colaterais, e facilitação de diagnósticos com o uso de nanobiosensores (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012);

-Displays de televisão: nanopós são utilizados em telas de televisão;

-Ligas metálicas: ligas estão sendo produzidas com estruturas nanocristalinas para aumentar sua resistência.

Além das aplicações listadas acima, ainda podem ser encontrados usos para nanopartículas em embalagens de alimentos, na produção de papel, na produção de baterias, abrasivos, etc. (RAMSDEN, 2009b).

3.6.1 Aplicações das nanopartículas de cobre

Em especial para as nanopartículas de cobre e seus óxidos, podem ser destacadas aplicações importantes como células solares, controladores solares, absorvedores de radiação solar, catalisadores, interruptores nanométricos, cátodos de alta capacidade em baterias de lítio, supercondutores a baixas temperaturas, sensores químicos (HOSSEINI et al., 2012), equipamentos médicos, tratamento de água, processamento de alimentos (VARSHNEY; BHADAURIA; GAUR, 2012a), entre outras (EVANS; MATSUNAGA; KIGUCHI, 2008; KATHIRESAN et al., 2009a; NORASHIKIN; STAPLEY; SHAMA, 2011).

3.6.2 Métodos tradicionais de produção de nanopartículas

O interesse na produção de nanopartículas tem crescido rapidamente. Os nanomateriais, por causa de suas propriedades únicas, estão na vanguarda do desenvolvimento da ciência dos materiais (NEIKOV, 2009).

Atualmente, é possível produzir nanopartículas através de processos '*top-down*', que partem do material em escala macroscópica, e '*bottom-up*', que contemplam a nucleação e crescimentos de cristais (RAMSDEN, 2011b). Existe ainda uma terceira classe de processos chamada de '*bottom-bottom*', que consiste na síntese mecânica de nanopartículas em que cada átomo é posicionado em local predeterminado (RAMSDEN, 2011b). Porém, como essas técnicas ainda não atingiram importância comercial, devido ao minúsculo volume que pode ser produzido, elas não serão exploradas.

3.6.2.1 Métodos '*Top-Down*'

Fragmentação e dispersão: considerado um método de baixa tecnologia, a fragmentação consiste na moagem do material desejado. As maiores vantagens desse processo são a universalidade e o baixo custo. As desvantagens incluem a facilidade de dispersão das partículas, a introdução de defeitos e contaminantes e a impossibilidade de se atingir a escala nanométrica em alguns materiais (RAMSDEN, 2011b).

Litografia: a litografia para produção de nanopartículas é similar à usada há muito para a fabricação de circuitos integrados e microchips (GAN; WANG, 2007). O tipo de litografia mais utilizado atualmente para produção de nanopartículas é a fotolitografia (HAYNES; HAES; DUYNE, 2000). Ela consiste da exposição de um polímero fotosensível à luz ultravioleta para criar um padrão (PIMPIN; SRITURAVANICH, 2012). Os métodos disponíveis para produção de nanopartículas incluem litografia por feixe de elétrons, litografia por Raio-X, litografia de feixe focado de íons, entre outros (BUSNAINA; MEHTA, 2007).

Estão disponíveis outros métodos de formação de nanopartículas, como o método de eletroexplosão, que consiste em liquefazer ou mesmo vaporizar um fio de metal através da aplicação de corrente pulsada. O método de condensação gasosa também envolve a vaporização do metal precursor, mas depende das colisões entre partículas ultrafinas para a formação dos nanocristais (ATHAR, 2009).

3.6.2.2 Métodos 'Bottom-Up'

Síntese de nanopartículas através de um Template: consiste em utilizar um material poroso como substrato para o crescimento de nanopartículas. Os templates podem ser de alumina, membranas poliméricas ou de silicone revestido com titânio. (FOSS JR., 2001). Outra forma de síntese a partir de template é a utilização de dendrímeros (uma forma singular de polímero). O método consiste em colocar o dendrímero em contato com o íon metálico e promover uma reação de redução. Os dendrímeros podem ser imobilizados em eletrodos ou solubilizados em diferentes solventes. (CROOKS et al., 2001)

Síntese de nanocristais através de micelas e microemulsões: nanocristais podem ser formados a partir de micelas ou micelas reversas (PILENI, 2001). O método consiste em encapsular uma pequena quantidade de solução de sais metálicos (é utilizado o sal do metal de interesse) dentro de micelas em uma microemulsão e, em seguida, adicionar outra microemulsão com o agente redutor também encapsulado em micelas. Assim, a reação de redução ocorre instantaneamente quando as micelas se chocam (geralmente por movimento browniano) (EASTOE; HOLLAMBY; HUDSON, 2006) e ficam restritas ao espaço encapsulado pelas micelas, que varia de 1 a 20nm (SHCHUKIN; SUKHORUKOV, 2004). Para a formação das micelas, podem ser usadas microemulsões de água em hidrocarboneto ou água em fluidos supercríticos (EASTOE; HOLLAMBY; HUDSON, 2006) com uso de surfactantes, como o AOT (dioctil sulfosuccinato de sódio) (SHCHUKIN; SUKHORUKOV, 2004) ou o dodecilsulfato de sódio (PILENI, 2001). Além disso, são utilizados solventes como hexano ou o isooctano (PILENI, 2001).

Síntese através de eletrodeposição: o método consiste da formação de nanopartículas através da redução de íons metálicos quando submetidos a uma determinada voltagem. Esse método é mais apropriado quando se deseja obter partículas metálicas depositadas sobre uma superfície, importante para aplicações como catalisadores (GORER et al., 2001).

3.6.3 Métodos tradicionais para a produção de nanopartículas de cobre

A produção de nanopartículas de cobre pode ser feita através de diversos processos tradicionais. Entre eles estão a redução química, a produção utilizando solvente em condições supercríticas, o uso de micelas reversas (microemulsões),

decomposição térmica, entre outros (ZHANG et al., 2010; SHAH; AL-GHAMDI, 2011; EASTOE; HOLLAMBY; HUDSON, 2006; BACO-CARLES; DATAS; TAILHADES, 2011).

O método de redução química é bastante simples e versátil. Os agentes redutores mais usados na atualidade são formaldeído, ácido ascórbico, hipofosfito de sódio e hidrato de hidrazina. Porém, esse método apresenta desvantagens ligadas principalmente à escolha do agente redutor, como a toxicidade, impurezas presentes, alto custo, capacidade reduzida de redução, etc. (ZHANG et al., 2010)

A utilização de solventes em estado supercrítico é um método bastante eficiente e capaz de produzir partículas com até 9nm de diâmetro. Nesse método, é possível utilizar a água como solvente, diminuindo o problema com substâncias tóxicas, porém utiliza uma quantidade bastante alta de energia pois lança mão de aquecimento a 140°C por 15 horas (SHAH; AL-GHAMDI, 2011). A preparação das nanopartículas através de solvente supercrítico envolve aquecimento por longos períodos de tempo e o uso de equipamentos especiais, diminuindo significativamente o apelo econômico desse processo.

A síntese através de decomposição térmica se baseia na redução química de oxalatos metálicos realizada em atmosfera controlada de nitrogênio ou hidrogênio a altas temperaturas (~200°C, no caso do oxalato de cobre). O processo de decomposição térmica é capaz de produzir partículas de diâmetros relativamente pequenos (6 a 40 nm, em média) e não utiliza compostos tóxicos. A decomposição dos precursores gera apenas gás carbônico e água, além das partículas, e não apresenta maiores riscos à saúde humana. Porém, assim como no caso da utilização de solventes em estado supercrítico, também lança mão de aquecimento por períodos prolongados, podendo chegar a 15 horas (BACO-CARLES; DATAS; TAILHADES, 2011).

3.6.4 Métodos biotecnológicos para a produção de nanopartículas metálicas

A produção de nanopartículas através de processos biotecnológicos tem sido estudada como forma de apresentar uma alternativa aos processos tradicionais. A motivação principal é eliminar o uso de compostos tóxicos e desenvolver um método de produção barato, porém com uso de tecnologias mais limpas e sustentáveis.

Atualmente já existem métodos de produção de nanopartículas utilizando bactérias, leveduras, algas, fungos filamentosos e plantas (DHILLON et al., 2012a).

A síntese de nanopartículas através de bactérias tem tido bons resultados e diversos microrganismos tem apresentado a capacidade de fabricá-las. A *Pseudomonas stutzeri* AG259 é capaz de produzir nanopartículas de prata, assim como alguns *Lactobacillus*, também capazes de sintetizar nanopartículas de ouro (VARSHNEY; BHADARIA; GAUR, 2012a).

O uso de leveduras tem sido explorado para a produção de nanopartículas de cádmio e a levedura resistente à prata MKY3 mostrou capacidade de fabricar nanopartículas externamente à célula (KOWSHIK et al., 2003).

Algas também tem demonstrado capacidade de produzir nanopartículas de prata, como a alga marrom *Sargassum wightii* e as microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella vulgaris* (GOVINDARAJU et al., 2009; MOHSENIAN et al., 2011).

O uso de fungos filamentosos para a produção de nanopartículas apresenta inúmeras vantagens em relação ao uso de outros organismos. Dentre elas a facilidade de scale-up, viabilidade econômica, facilidade de processamento após a síntese e de manuseio (VARSHNEY; BHADARIA; GAUR, 2012a). O fungo *Aspergillus fumigatus* foi usado na produção de nanopartículas de prata e apresentou ótimos resultados (BHAINSA; D'SOUZA, 2006a). O fungo *Fusarium oxysporum* é capaz de produzir nanopartículas de sulfato cobre com tamanho médio de 3 nm (HOSSEINI et al., 2012), enquanto que o fungos *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium waksmanii* apresentaram formação de nanopartículas de tamanho médio igual a 150 nm, dependendo fortemente do pH e concentração da solução de sal (CuSO_4) (HONARY et al., 2012).

É importante destacar que, até onde se sabe grande parte dos bioprocessos disponíveis para a síntese de nanopartículas se baseiam no uso do bioagente vivo (ativo e viável). É possível encontrar um número reduzido de estudos utilizando a biomassa não viável de fungos filamentosos apenas para a biossorção e/ou bioremediação de locais contendo contaminantes nocivos, como metais pesados. Porém ainda não é possível estabelecer uma ligação direta entre os mecanismos de adsorção ou biossorção de íons metálicos e a síntese de nanopartículas metálicas

Isso indica que o uso de biomassa de fungos não viável ainda é um campo pouco explorado dentro da biossíntese de nanopartículas metálicas, mas que apresenta alto potencial, já que além de possuir todos os benefícios de um bioprocessamento, ainda tem a vantagem de não depender da viabilidade do agente biológico para a formação das partículas. Assim, é possível obter maior flexibilidade para o ajuste dos parâmetros de processo e, desse modo, aperfeiçoar a produção e as características das nanopartículas sintetizadas.

3.6.4.1 Produção de nanopartículas utilizando fungos

A produção de nanopartículas por organismos vivos tem sido estudada com interesse nos últimos anos. O apelo econômico, pela baixa utilização de recursos, e ecológico, devido à inexistência de subprodutos nocivos, de processos que exploram a rota biológica são bastante expressivos. Diversos microrganismos também têm sido usados para a produção de nanopartículas (GURUNATHAN et al., 2009; KOWSHIK et al., 2003; MOHSENI AZAR et al., 2011). Porém, na maior parte dos casos utilizam-se células viáveis e, muitas vezes, a síntese de nanopartículas se dá durante o crescimento. Sendo assim, os parâmetros de processo (como temperatura, pH e agitação) ficam condicionados aos limites de cultivo. As vantagens de utilização de fungos para a síntese de nanopartículas incluem a facilidade de *scale-up* e de processamento, facilidade de manipulação da biomassa e obtenção de grande área superficial com otimização de cultivo (VARSHNEY; BHADARIA; GAUR, 2012b).

Para a síntese de nanopartículas utilizando biomassa de fungos, verifica-se que o uso de biomassa viável é muito comum (GAJBHIYE et al., 2009) e a maior parte dos estudos explora a formação de nanopartículas de prata e ouro (MANDAL et al., 2006). Alguns estudos descrevem o uso de diferentes extratos de células para a produção de nanopartículas de prata (BALAJI et al., 2009; BASAVARAJA et al., 2008a; BHAINSA; D'SOUZA, 2006b; KATHIRESAN et al., 2009b), indicando que a capacidade de síntese pode estar ligada a substâncias produzidas durante o crescimento da biomassa. Um estudo feito por SANGHI e VERMA (2009) conseguiu reduzir o tempo de acumulação de nanopartículas de prata na superfície do fungo *Coriolus versicolor* de 72 horas para apenas 1 hora adicionando íons OH^- .

MUKHERJEE et al. (2002) indicam que a redução dos íons AuCl_4^- ocorre devido à redutases excretadas pelo fungo em solução.

A grande maioria dos fungos utilizados em estudos com extratos de células são patogênicos a plantas e/ou humanos e acrescentam dificuldades em relação à manipulação e ao descarte (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010). Sendo assim, se faz necessário buscar alternativas não patogênicas que possam ser utilizadas em processos similares. Um estudo recente utilizou o fungo comercialmente usado em agricultura *Trichoderma asperellum* para sintetizar nanopartículas de prata. Foi utilizado como agente redutor um "caldo" resultante do contato entre as células e água deionizada após 72 horas e os resultados indicaram formação de partículas de diâmetro médio de 35,4nm (MUKHERJEE et al., 2008).

3.6.4.2 Uso de extratos de células para produção de nanopartículas

Juntamente com o desenvolvimento do uso de biomassa de diferentes organismos para síntese de nanopartículas metálicas, tem-se observado um crescimento no número de trabalhos que utilizam extrato de células para o mesmo fim. Diversos microrganismos foram estudados e pode-se destacar o uso de bactérias e fungos filamentosos como os mais comumente explorados. KORBKANDI, IRAVANI e ABBASI (2009) apresentam inúmeros autores que analisam essa rota para síntese de nanopartículas. As técnicas utilizadas incluem uso do meio de cultura de bactérias após centrifugação (GURUNATHAN et al., 2009; KALISHWARALAL et al., 2008; SAIFUDDIN; WONG; YASUMIRA, 2009; SHAHVERDI et al., 2007), uso de uma enzima redutase obtida a partir de extrato de células de fungo (ANIL KUMAR et al., 2007), uso de extrato de células de fungo sem purificação (BALAJI et al., 2009; BASAVARAJA et al., 2008a; CUEVAS et al., 2015; MUKHERJEE et al., 2008), etc.

A metodologia mais comumente utilizada para a biomassa de fungos filamentosos é a separação da biomassa do meio de cultura, lavagem cuidadosa com água deionizada, ressuspensão da biomassa em água deionizada por um período mínimo de 24 horas e filtração. Nenhuma técnica de lise ou digestão das células é aplicada e o "caldo" filtrado é usado sem purificação ou tratamento posterior. A síntese é realizada através do contato do extrato de células com uma solução relativamente diluída (entre 1 e 10 mM) de um sal do metal de interesse.

Todas as análises de identificação e caracterização são realizadas a partir da solução resultante (BASAVARAJA et al., 2008b; BHAINSA; D'SOUZA, 2006a, 2006b; MUKHERJEE et al., 2008). Não foram encontrados estudos descrevendo a composição do extrato obtido através dessa metodologia. As análises comumente utilizadas para a identificação e caracterização das nanopartículas formadas através de extratos de células estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Análises comumente usadas na identificação e caracterização de nanopartículas.

Análise	Características	Referências
Espectrofotometria (UV-Vis)	É possível verificar um pico de adsorção característico para nanopartículas. O comprimento de onda depende do tamanho, formato e composição da partícula.	(CUEVAS et al., 2015) (DURÁN et al., 2005)
Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)	Mudanças entre os espectros fornecem indícios do mecanismo de reação	(SHARMA; YNGARD; LIN, 2009)
Difração de raios-X (DRX)	Fornecer a estrutura cristalina presente nas partículas como forma de identificação de sua composição	(LISIECKI; BILLOUDET; PILENI, 1996)
Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	Fornecer imagens para observação do tamanho médio e do formato das partículas	(BANSAL et al., 2004)
Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	Determina a distribuição dos diâmetros das partículas.	(SALVADORI et al., 2013)

O uso de extratos de células para a síntese de nanopartículas apresenta algumas vantagens em relação ao uso das células. A análise das partículas através de microscopia eletrônica é facilitada, já que não é necessário realizar o dispendioso processo de preparo das amostras, descrito de forma geral por GERICKE e PINCHES (2006). Além disso, o processo de separação das nanopartículas sintetizadas internamente às células ou na parede celular é potencialmente o maior entrave para a utilização comercial da biossíntese. Acredita-se que a identificação dos agentes redutores presentes nos extratos de células possa ser a chave para uma futura customização do processo de síntese, aumentando a capacidade produtiva e melhorando as características da partícula (tamanho, formato, distribuição, etc.) (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

4 Materiais e Métodos

4.1 Reagentes

4.1.1 Meios de cultivo

Para cultivo e manutenção do fungo *H. lixii* Foram utilizados os meios PD (Difco™ Potato Dextrose), PDA (Difco™ Potato Dextrose Agar) e meio contendo extrato de malte, cuja composição pode ser verificada na Tabela 3. Todos os meios de cultura foram preparados em água destilada.

Tabela 3 - Composição do meio de cultura contendo extrato de malte.

Componente	Concentração
Extrato de malte (BD Bacto™ Malt extract)	10 g/L
Glicose (Merck Millipore D(+)-Glucose)	20 g/L
Extrato de levedura (BD Bacto™ Yeast extract)	10 g/L

Os cultivos realizados em meio líquido foram realizados com meio PD e o meio contendo extrato de malte. Para manutenção das cepas foi utilizado o meio PDA.

4.1.2 Soluções

Foi utilizado o sal cloreto de cobre ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, J. T. Baker®) como fonte de íons cobre (II). Foram preparadas soluções de 10 g/L e a partir delas foram feitas diluições até as concentrações necessárias.

Para ajuste de pH, foram utilizadas soluções de hidróxido de sódio (NaOH, Synth®) 3M e ácido clorídrico (HCl, Química moderna) 0,5M. A coleta de esporos foi realizada a partir de solução estéril de cloreto de sódio (NaCl, Fmaia) com concentração 0,9% em massa. Para congelamento de células e esporos, foi utilizado glicerol (glicerina bidestilada 85%, Merck) estéril.

A diluição de amostras para análise de absorção atômica foi realizada utilizando-se ácido nítrico (HNO_3 70%, Synth®) com concentração de 5% em volume.

Todas as soluções foram feitas utilizando-se água deionizada purificada (Milli-Q, Millipore) com os reagentes mencionados, sem purificação adicional.

4.2 Microorganismo

O fungo *Hypocrea lixii* foi isolado a partir de amostra coletada na lagoa de rejeitos da mina de Sossego, localizada em Canaã dos Carajás (PA) (SALVADORI et al., 2013). A cepa utilizada nesse projeto foi gentilmente cedida pelo ICB - USP, através da Dra. Márcia R. Salvadori.

4.2.1 Preservação da Cepa

A cepa foi mantida em meio PDA em estufa a 25°C. Novos cultivos foram realizados periodicamente com intuito de preservar as células do fungo.

4.2.2 Estoque de células e inóculos

Foram produzidos estoques de células congeladas e de suspensão de esporos. Uma cultura em meio PD inoculada a partir da cepa original foi utilizada para produzir o estoque de células congeladas. Ao meio de cultura com 40 horas de cultivo foi adicionado glicerol estéril de modo que a concentração final fosse 20% em massa. A solução foi congelada em criotubos de 2mL cada e mantida a -80°C.

Para obtenção da suspensão de esporos, uma cultura em meio PDA foi iniciada e mantida a 25°C em estufa com fornecimento de luz artificial. Após 10 dias de cultivo, foi adicionada solução de cloreto de sódio estéril e recolhida uma amostra para contagem. A concentração da suspensão foi determinada a partir da contagem em câmara de Neubauer. A contagem forneceu uma concentração de 2.10^7 esporos/mL e antes do congelamento, foi adicionado glicerol de modo a atingir uma concentração final de 20%. A solução foi adicionada em criotubos de 2mL e mantidas a -80°C.

4.3 Cultivo do fungo *H. lixii*

O fungo *Hypocrea lixii* foi cultivado em frascos erlenmeyer de 500mL contendo 100mL de meio de cultura. As condições de cultivo utilizadas foram 25°C e 150rpm por 120 horas, conforme indicado por SALVADORI et al. (2013a). Foram utilizados inóculos de células e de suspensão de esporos congelados (previamente

descongelados à temperatura ambiente). Cada criotubo contendo 2mL de inóculo foi utilizado para inocular o volume de 100mL de meio de cultura.

4.4 Obtenção de biomassa viável e não viável

A biomassa viável foi obtida através de cultivo, filtração através de papel filtro qualitativo e lavagem extensiva com água deionizada purificada (Milli-Q, Millipore) até que todo o meio de cultura fosse retirado das células. Após retirado o excesso de água, a fase sólida resultante foi denominada biomassa viável.

Para obtenção de biomassa não viável, a biomassa viável foi submetida a esterilização através de autoclavagem a 121°C durante 30 minutos. O fluxograma contido na Figura 1 ilustra as diferentes etapas desses processos.

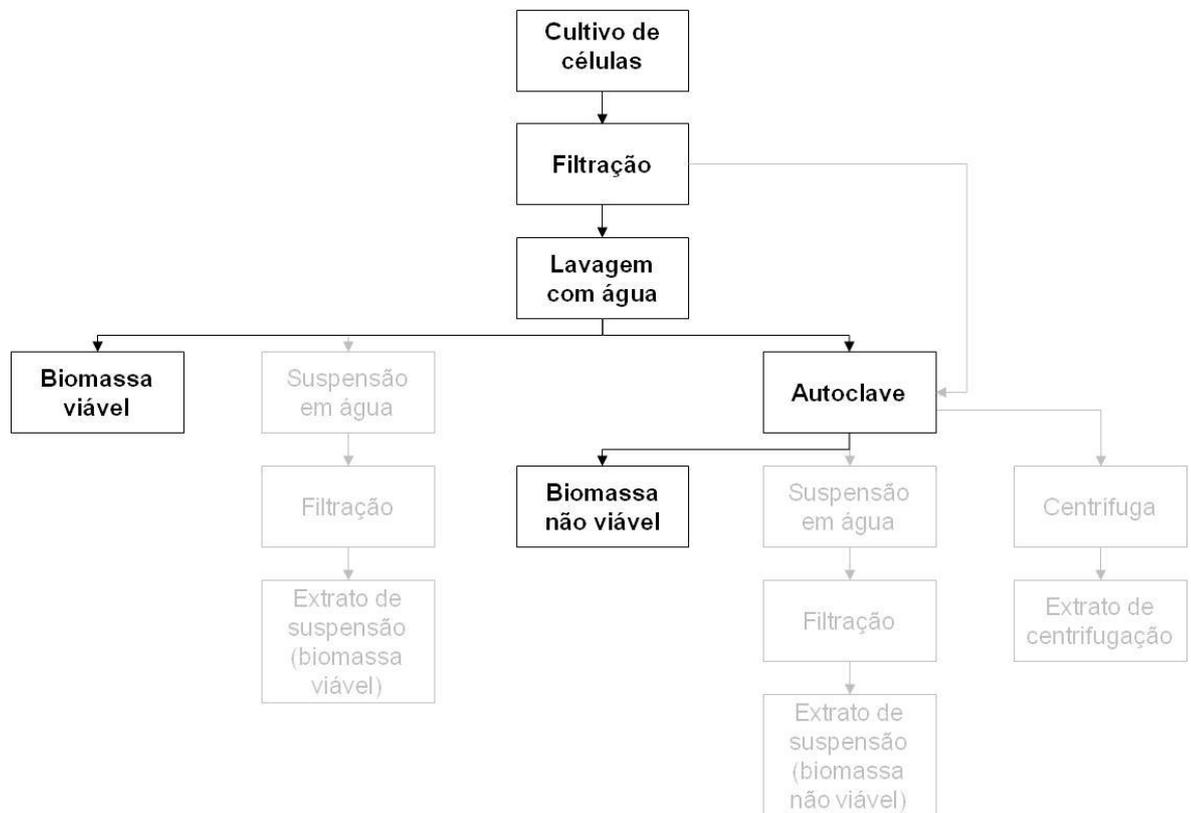


Figura 1 - Processos de obtenção de biomassa viável e não viável. As etapas envolvidas na obtenção das biomassa estão em destaque.

4.5 Determinação de concentração celular

O processo para a determinação da concentração celular dos cultivos consistiu em realizar o cálculo de massa seca e relacioná-lo com o volume do

cultivo. Para tanto, foram realizadas as seguintes etapas: coletar amostras em béqueres e pesá-las em balança de precisão (Shimadzu Corp. AYW220D), filtrá-las utilizando um sistema de filtração a vácuo (Sartorius Stedim Biotech S. A.) através de membranas HA em ésteres de celulose (Merck Millipore) com diâmetro de poro igual a 0,45µm, previamente secas e pesadas. Após a filtração, as membranas foram submetidas à secagem durante 15 minutos em microondas (potência a 20%), segundo procedimento descrito por OLSSON e NIELSEN (1997) e, uma vez secas, foram armazenadas em dessecador até que resfriassem. Em seguida, as membranas secas foram pesadas em balança de precisão. O cálculo realizado para obter a massa seca de células está descrito na Equação 1:

Equação 1 - Cálculo da massa seca de células.

$$m_{seca} = m_{total} - m_{memb}$$

Onde m_{seca} = massa de células seca, em gramas;

m_{total} = massa total (células + membrana) após secagem, em gramas;

m_{memb} = massa da membrana seca, em gramas.

O valor de massa seca obtido foi utilizado para o cálculo da concentração celular como mostra a Equação 2.

Equação 2 - Cálculo da concentração celular a partir da massa seca de células.

$$C_{células} = \frac{m_{seca}}{m_{amostra}} \cdot d_{susp} \cdot 10^3$$

Onde $C_{células}$ = concentração de células, em g/L;

$m_{amostra}$ = massa total da amostra úmida, em gramas;

d_{susp} = densidade da suspensão de células, considerada equivalente à densidade da água, 1g/mL.

4.6 Obtenção de extratos de células

4.6.1 A partir de suspensão de biomassa em água deionizada

O extrato de suspensão de biomassa em água foi obtido adicionando-se biomassa viável e biomassa não viável a 100mL de água deionizada purificada (Milli-Q, Millipore). A suspensão de biomassa foi mantida em shakers durante 24 horas a 25°C e 150rpm. Após esse período as células foram filtradas e o líquido obtido foi

identificado, reservado e mantido a 4°C. Todas as etapas foram realizadas em ambiente estéril. O fluxograma contido na Figura 2 ilustra as etapas desse processo.

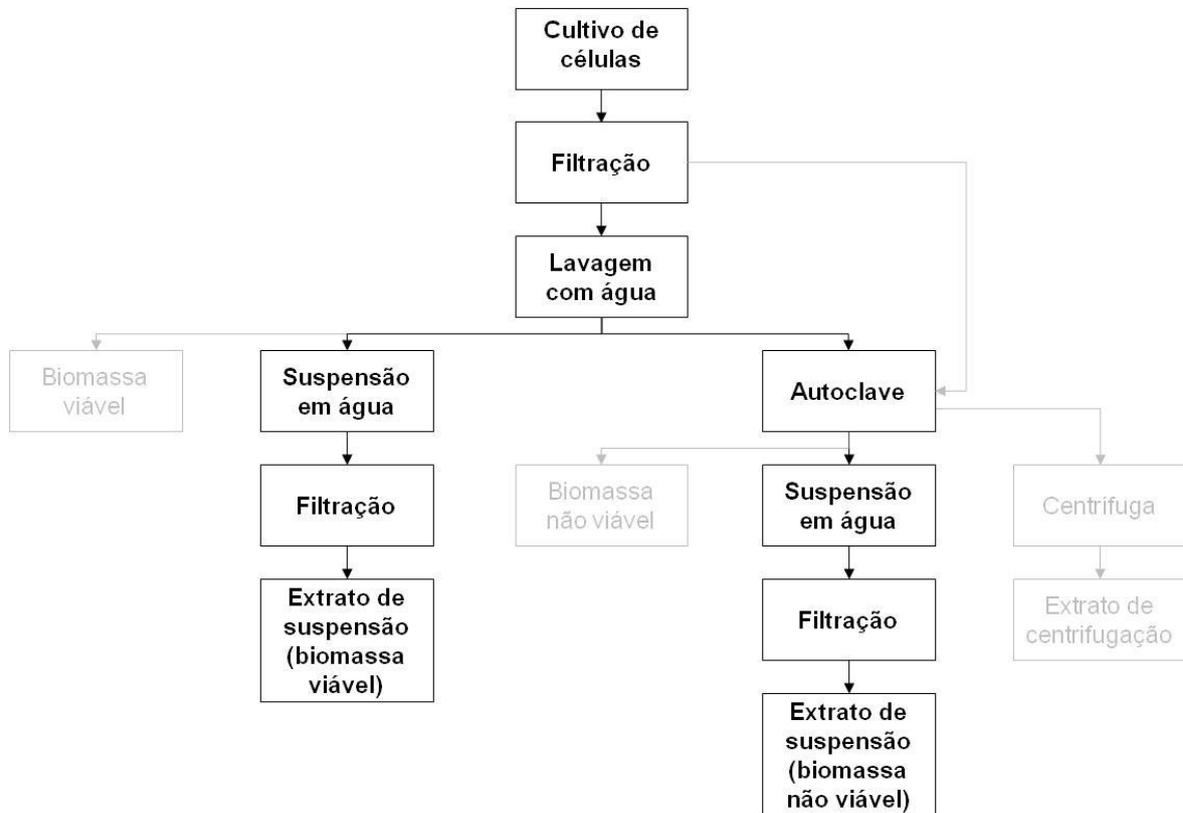


Figura 2 - Processos de obtenção de extrato de suspensão de biomassa viável e não viável. As etapas envolvidas na obtenção dos extratos de suspensão estão em destaque.

4.6.2 A partir de centrifugação de células não viáveis

Após o cultivo, as hifas foram filtradas através de papel filtro qualitativo, e o excesso de meio de cultura foi retirado. A biomassa resultante foi esterilizada através de autoclavagem a 121°C durante 30 minutos e centrifugada a 13.400 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado através de sistema a vácuo (Sartorius Stedim Biotech S. A.) em membranas HA em ésteres de celulose (Merck Millipore) estéreis com diâmetro de poro igual a 0,45µm. Após a filtração, o extrato de centrifugação foi mantido em geladeira a 4°C até o momento de uso. O fluxograma contido na Figura 3 ilustra as etapas desse processo.

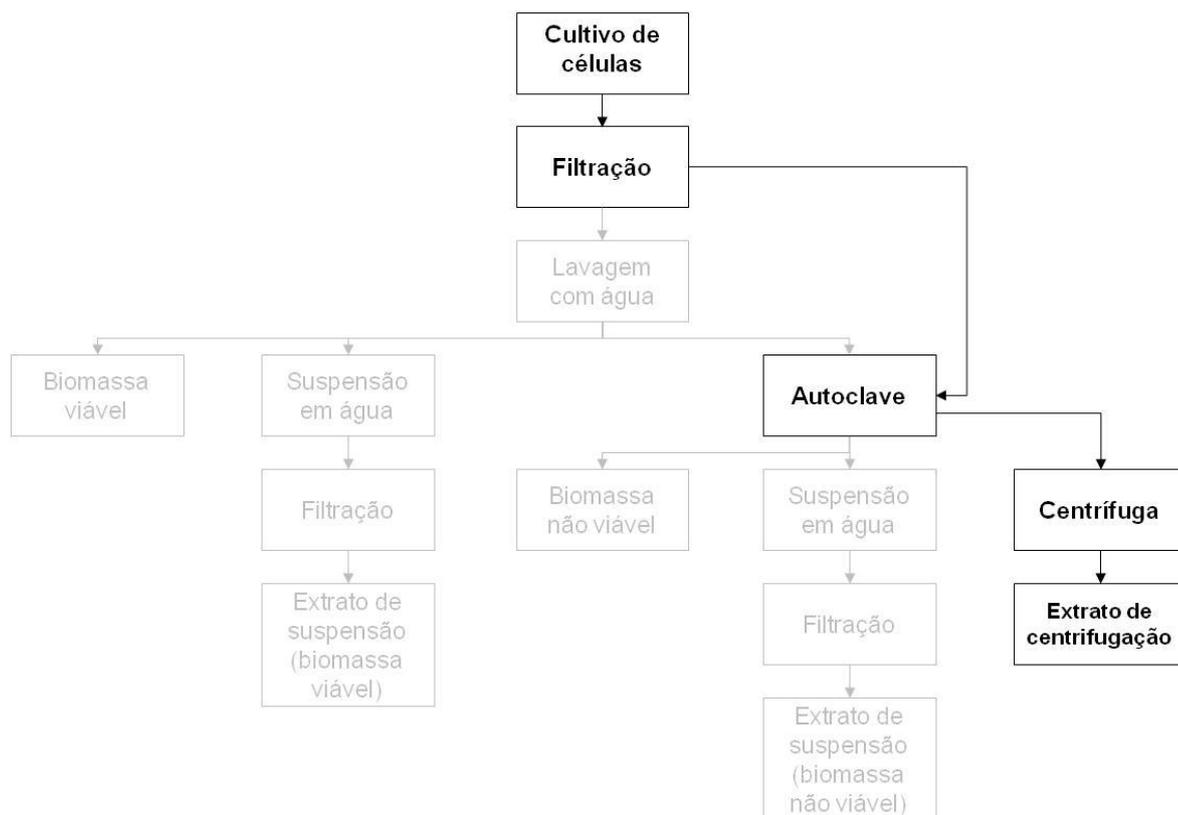


Figura 3 - Processo de obtenção de extrato de centrifugação de células não viáveis. As etapas envolvidas na obtenção do extratos de centrifugação estão em destaque.

4.7 Síntese de nanopartículas de cobre

4.7.1 Biomassa de células

O processo de síntese de nanopartículas utilizando biomassa de células consistiu em adicionar aproximadamente 1g de biomassa de células (úmida) em um tubo falcon contendo 40mL de uma solução de 100 mg/L de cloreto de cobre (II). Em seguida o tubo foi mantido a 40°C e 150 rpm por 60 minutos, conforme descrito por SALVADORI et al. (2013a). A biomassa foi filtrada em sistema a vácuo através de membrana com 0,45µm de poro. Esse procedimento foi realizado para biomassa viável e não viável.

4.7.2 Extrato de células

Para síntese de nanopartículas utilizando extrato de células foram adicionados 4mL de solução de cloreto de cobre (II) com concentração 10g/L a 16mL de extrato de células em um tubo falcon. Após a adição de solução de cobre (II), os tubos foram centrifugados a 24.800 g durante 15 minutos a 4°C e, em

seguida, mantidos a 40°C e 150rpm durante 24 horas. Finalizado o período de 24 horas, os tubos foram transferidos para a geladeira e mantidos a 4°C.

4.7.3 Síntese em reator controlado

A síntese de nanopartículas em reator controlado foi realizada utilizando reatores automatizados (Atlas Lithium, Syrris Ltd.) com frascos redondos de 250mL com controle de temperatura através de placa aquecida, agitação magnética e controle de pH, cuja montagem experimental pode ser verificada na Figura 4. Foram adicionados 60mL de extrato de centrifugação de células não viáveis ao frasco em ambiente estéril. Foram realizados os controles de temperatura e, em seguida, de pH para as condições estabelecidas na Seção 4.8 e a agitação foi fixada em 1200rpm. Atingindo-se a estabilidade do sistema, foram adicionados 15mL de solução de cobre (II) de concentração 10g/L em velocidade que permitisse manter o pH e temperatura estáveis. Após a adição da solução de cobre (II), o sistema foi mantido controlado durante 24 horas. Finalizado o período de síntese, o conteúdo do frasco foi transferido para tubos falcon e mantido em geladeira a 4°C para conservação.

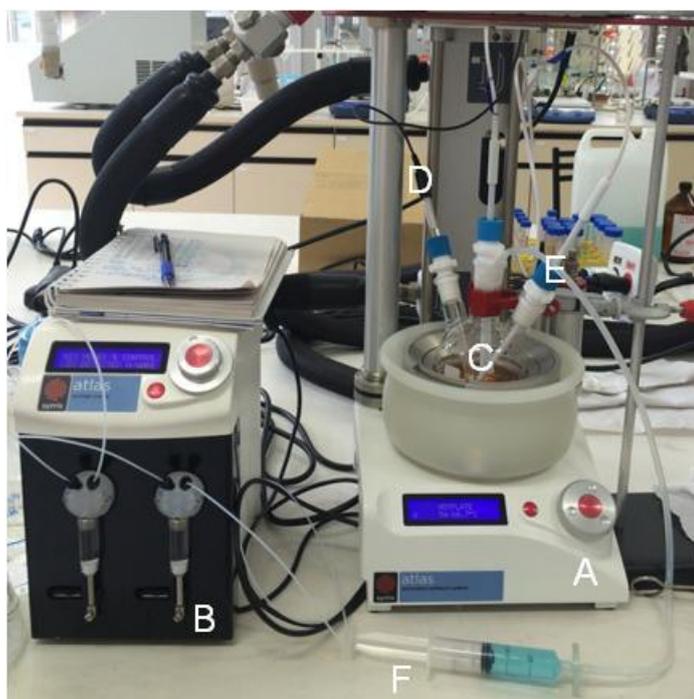


Figura 4 - Montagem experimental para síntese de nanopartículas em reator controlado. (A) Base controladora de temperatura e agitação. (B) Bomba controladora de pH. (C) Frasco redondo de 250mL para reação. (D) Eletrodo de pH. (E) Termopares. (F) Sistema de injeção de solução de cobre (II) através de membrana estéril de 0,22µm de poro.

4.8 Planejamento experimental

Foi utilizada metodologia de planejamento central rotacional completo com 2 fatores, incluindo 4 pontos axiais, 4 pontos no cubo e 3 pontos centrais para avaliação do erro puro. Sendo assim, foi determinada a influência da temperatura e pH no processo de síntese de nanopartículas promovido em reatores controlados (Seção 4.7.3). Os pontos foram selecionados conforme ilustrado na Figura 5. As diferentes condições testadas estão indicadas pela Tabela 4. Os diâmetros das partículas formadas foram avaliados através de análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e foram utilizados como a resposta do planejamento. Foram utilizadas faixas de pH e temperatura consideradas adequadas tendo em vista o que se observa em trabalhos similares (DHILLON et al., 2012b; GERICKE; PINCHES, 2006a; SALVADORI et al., 2013).

Tabela 4 - Matriz do delineamento composto central rotacional.

pH	Temperatura (°C)	pH codificado	Temperatura codificada	Letra Correspondente
3,6	32,9	-1	-1	A
3,6	47,1	-1	1	B
6,4	32,9	1	-1	C
6,4	47,1	1	1	D
3,0	40,0	-1,41	0	E
7,0	40,0	1,41	0	F
5,0	30,0	0	-1,41	G
5,0	50,0	0	1,41	H
5,0	40,0	0	0	I
5,0	40,0	0	0	J
5,0	40,0	0	0	K

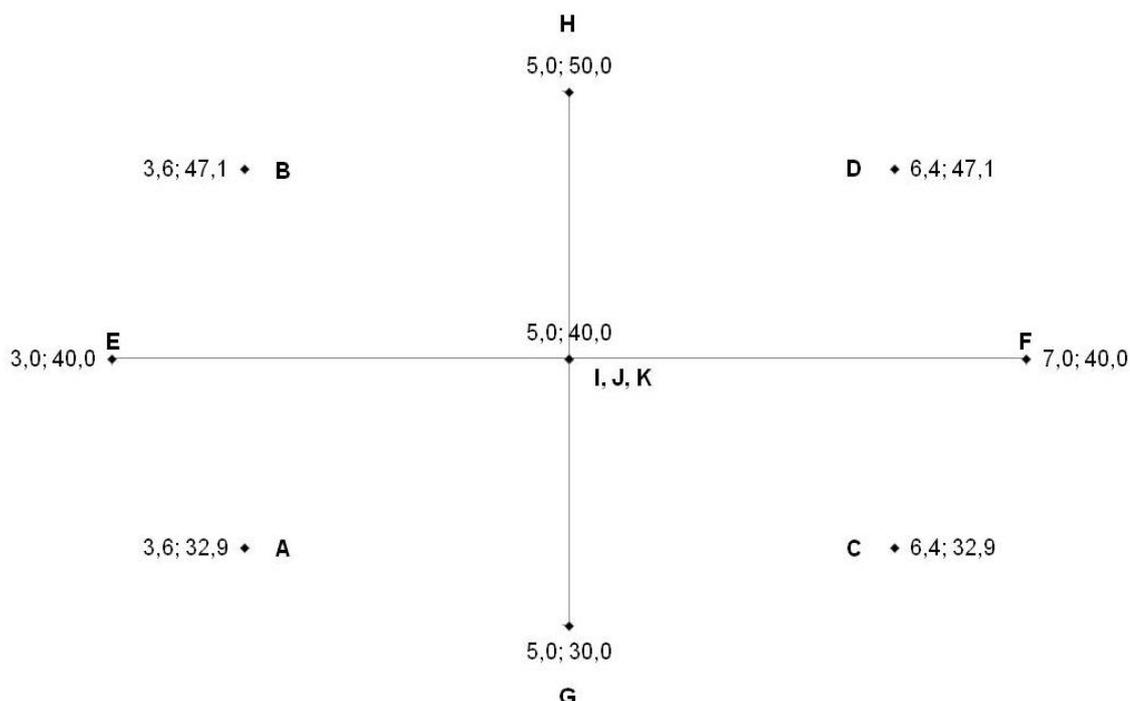


Figura 5 - Delineamento composto central rotacional em termos de pH e temperatura.

Os resultados foram processados utilizando-se a ferramenta 'Superfície de Respostas' do software Minitab[®] versão 17.

4.9 Isotermas de bioissorção

As curvas de bioissorção de cobre (II) para a biomassa não viável foram levantadas em sistema de batelada. O procedimento experimental consistiu em adicionar 40 mL de cada solução de cobre (II) em tubos falcon de 50mL, em seguida adicionar uma quantidade de biomassa não viável em cada tubo. Os tubos com biomassa foram colocados em shakers à 25°C e 150rpm por 24 horas.

Após esse período, todo o conteúdo dos tubos foi filtrado utilizando-se um sistema de filtração a vácuo (Sartorius Stedim Biotech S. A.) em membranas HA em ésteres de celulose (Merck Millipore) com diâmetro de poro igual a 0,45µm. As soluções filtradas foram então analisadas através de espectroscopia de absorção atômica (AAS), sendo diluídas com ácido nítrico a 5%. Para as soluções padrão, que não entraram em contato com a biomassa e, portanto, fornecem a quantidade inicial de cobre, o procedimento consistiu em adicionar 40mL em tubos falcon e, posteriormente diluí-las utilizando ácido nítrico 5% para leitura das concentrações por espectroscopia de absorção atômica (AAS).

A capacidade de bioadsorção do fungo *H. lixii* (Q_{eq}) foi calculada a partir do balanço de massa de metal após o tempo de contato. Experimentos similares descrevem o equilíbrio após apenas algumas horas, portanto com o tempo padrão de 24 horas garantiu-se o equilíbrio (RANGABHASHIYAM et al., 2014; SALVADORI et al., 2013; VEIT et al., 2005b).

Equação 3 - Cálculo da quantidade de metal adsorvido em função da massa de sorvente.

$$Q_{eq} = \frac{V \cdot (C_0 - C_{eq})}{m_{seca}}$$

Onde Q_{eq} = Capacidade de bioadsorção no equilíbrio (mg metal/g células secas)

V = Volume da solução (L)

C_0 = Concentração inicial de metal na solução (mg metal/L ou ppm*)

C_{eq} = Concentração final de metal na solução no equilíbrio (mg metal/L ou ppm)

m_{seca} = Massa seca de células (g)

*Considerou-se que as soluções de cobre (II) têm densidade muito próxima à da água devido às baixas concentrações ($\rho_{solução} \approx \rho_{H_2O} = 1,0g/mL$).

4.10 Análises físico-químicas

4.10.1 Espectroscopia de absorção atômica (AAS)

As análises foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica AA-7000 (Shimadzu Corp.) utilizando-se lâmpada de cátodo oco no comprimento de onda 324,75nm (Hamamatsu Photonics K. K.), e detector por chama de gás acetileno e ar. Todas as amostras foram diluídas com ácido nítrico 5% até concentrações na faixa de 1 a 5 mg/L, adequada para o set-up do detector.

4.10.2 Cromatografia Gasosa

Para realização das análises de cromatografia gasosa, um volume de 500 μ L de cada amostra foi seco em secador a vácuo e posteriormente derivatizado através de sililação (silylation). A análise foi realizada em um cromatógrafo gasoso acoplado

a um espectrômetro de massas GC-MS QP 2010 Plus (Shimadzu®) com fonte de ionização por elétrons de 70eV e analisador quadrupolo. As colunas utilizadas foram DB1 (100% dimetil-polisiloxano - 50m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 1,2 µm de espessura do filme – Agilent Technologies), adequada para análise de aminoácidos, ácido fosfórico e ácidos orgânicos, e ZB-WAX plus (100% polietileno glicol - 60m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme - Phenomenex), adequada para análise de aminoácidos e açúcares, nas condições indicadas pela Tabela 5.

Tabela 5 - Condições de operação das colunas para análises de cromatografia gasosa.

Coluna	DB1	WAX
Temperatura do Injetor	280 °C	260 °C
Temperatura da Interface	300 °C	260 °C
Programa de Temperatura do forno	50 °C (5 °C/min) até 300°C (10 min)	50 °C (5 °C/min) até 300°C (10 min)
Tempo total de análise	60 min	60 min
Temperatura da fonte de íons	300 °C	260 °C
Faixa de massas analisadas	30-700 m/z	30-700 m/z

4.10.3 Espectrometria de massas (MALDI-TOF)

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no equipamento UltrafleXtreme™ MALDI-TOF/TOF (Bruker®). As amostras foram colocadas diretamente sobre o porta amostras e, após secas ao ar, foram recobertas com solução saturada de ácido α -cyano-4-hidroxinâmico (matriz) e novamente secas ao ar para posterior análise.

4.10.4 Espectrofotometria (UV-Vis)

Para as análises de espectrofotometria foi utilizado o espectrofotômetro UV-2000 (Shimadzu®). As amostras foram submetidas a uma varredura de comprimentos de onda entre 190 e 800 nm, com intervalos de 0,5nm em cubetas de quartzo.

4.10.5 Difração de raios X

As análises de difração de raios-X foram realizadas utilizando-se o difratômetro D8 Discover (Bruker®). As amostras foram preparadas através de liofilização (FreeZone 4.5, Labconco®) durante 24 horas e trituração com almofariz.

4.10.6 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR)

As análises de espectroscopia de infravermelho foram realizadas no equipamento IRPrestige-21 (Shimadzu®), utilizando ATR com faixa de comprimento de onda entre 600 e 4000 cm^{-1} . As amostras de células foram liofilizadas e as amostras de extrato foram concentradas em secador a vácuo (CentriVap Concentrator, Labconco®) para facilitar a análise e diminuir a interferência da água.

4.10.7 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizadas em um analisador Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd) com laser de He-Ne de comprimento de onda 633nm à temperatura de 25°C. O ângulo de espalhamento utilizado foi de 90°. A faixa de medição do equipamento é de 0,3nm a 10 μm .

As amostras foram analisadas após serem centrifugadas a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C para garantir a remoção de impurezas e aglomerados que pudessem distorcer os resultados.

4.11 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

4.11.1 Preparo de amostras de células

O preparo de amostras de células para microscopia eletrônica de transmissão consistiu de diversas etapas (GERICKE; PINCHES, 2006a). Inicialmente foi realizada a fixação com glutaraldeído 3% diluído em tampão fosfato. Em seguida, as células foram lavadas com tampão fosfato diversas vezes e, a seguir, emblocadas em ágar. O objetivo foi conferir maior resistência mecânica às amostras.

O ágar contendo as células foi cortado em paralelepípedos de aproximadamente 2mm³ de volume, de modo a conter uma amostra significativa. Os cortes foram adicionados a uma solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% em tampão cacodilato 0,1M por um período de 1 hora a 4°C. Após o contato com a solução de ósmio, as amostras foram lavadas três vezes com solução salina (NaCl 0,1M) durante 10 minutos a 4°C por lavagem. Após a última lavagem, as amostras foram deixadas por um período de 2 horas em geladeira antes de serem colocadas em contato com solução de acetato de uranila 1% por 12 horas.

Após o processo de fixação, as amostras seguiram para o preparo dos blocos de resina. O primeiro passo para o preparo dos blocos foi a desidratação gradativa utilizando álcool etílico a 70%, 95% e 100%. Finalmente, às amostras foram adicionadas soluções de álcool etílico 100% e resina por 2 horas, resina pura por 2 horas em temperatura ambiente e 12 horas em geladeira e, por fim, nova solução de resina pura. A última etapa do preparo consistiu na secagem dos blocos em estufa e realização dos cortes com espessura de nanômetros utilizando-se uma lâmina de diamante (ultramicrotomia). Os cortes foram coletados em porta amostras de cobre (EMS FCF200-Cu) e de níquel (EMS FCF200-Ni), recobertos com Formvar e carbono.

4.11.2 Preparo de amostras líquidas

Para análise microscópica dos extratos de células, aproximadamente 10 μ L de cada amostra foram pipetados e colocados sobre porta amostras de níquel (EMS FCF200-Ni). As amostras foram mantidas em geladeira até que toda água tivesse evaporado.

4.11.3 Microscópios Eletrônicos

As imagens das amostras de células e de extratos foram feitas em microscópios eletrônicos Zeiss EM 900 e JEOL JEM 2100.

5 Resultados e Discussão

5.1 Definição do meio de cultura

A correta avaliação da capacidade de biossorção depende do contato entre as células do fungo e os íons cobre (II). Cultivos que apresentam aglomerados muito grandes de células apresentam uma redução virtual do valor máximo da massa de cobre retirada em relação à massa de células. Também para a produção de nanopartículas é interessante obter cultivos sem a presença de aglomerados, pois dessa forma se garante uma interação homogênea entre hifas e a solução de cobre (II). Sendo assim, buscou-se obter cultivos com alta área superficial. Foram realizados testes com diferentes meios de cultura adequados para o crescimento de fungos filamentosos, inclusive o meio utilizado por SALVADORI et al. (2013) e elegeu-se o meio PD como meio de trabalho. A escolha foi baseada em observações qualitativas da área superficial das hifas e medições da concentração celular, que para o meio PD chegou a aproximadamente 10g/L em termos de massa seca. Além disso, o meio PD tem composição aproximada ao meio original utilizado por SALVADORI et al. (2013), diminuindo a ocorrência de modificações metabólicas e mórnicas nas células.

Inicialmente, as células do fungo foram cultivadas a partir de inóculo de células congeladas em meio PD. Como pode ser observado na Figura 6, a concentração de células obtida sofreu uma redução significativa com o passar do tempo, caindo para menos que a metade do que foi observado nos primeiros cultivos.

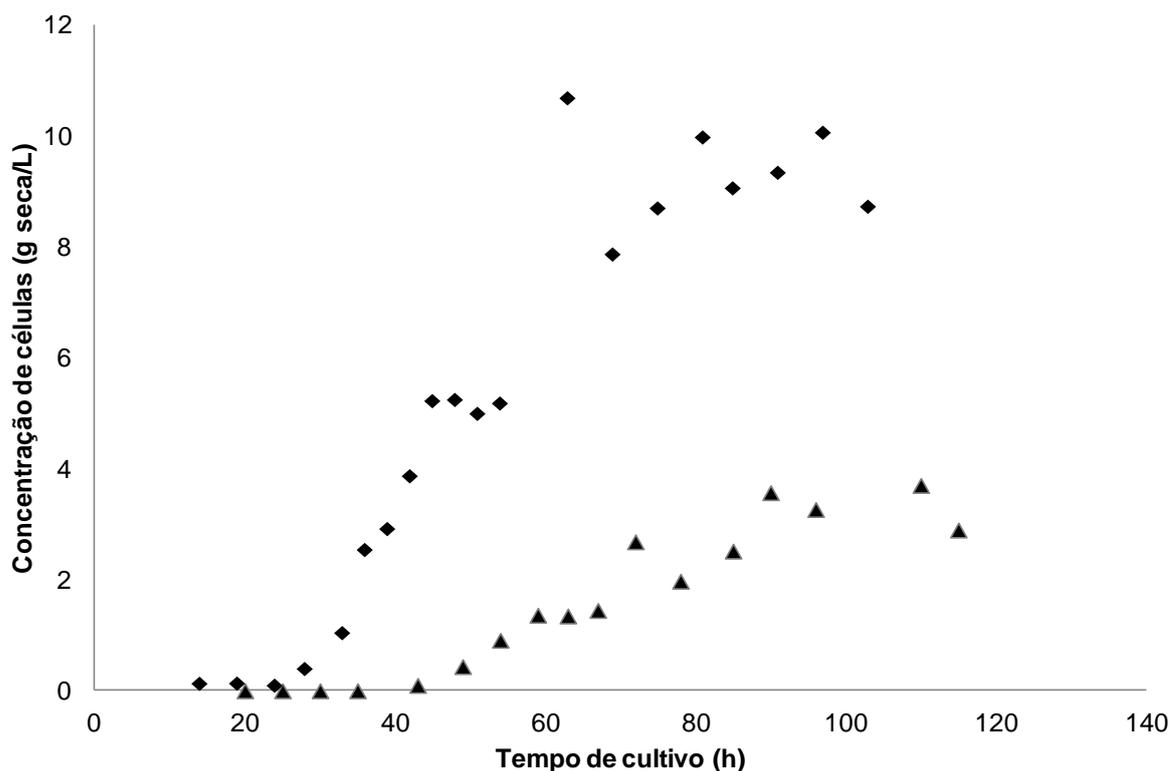


Figura 6 - Cinética de crescimento do fungo *Hypocrea lixii* utilizando inóculo de células congeladas e meio de cultura PD. (♦) Curva realizada em Abril/2014. (▲) Curva realizada em Janeiro/2015.

Levantaram-se diversas hipóteses sobre o que poderia ter causado a diminuição observada da concentração. A primeira delas foi a deterioração do estoque de células congeladas com o passar do tempo. Acredita-se que a viabilidade das células diminua após longos períodos de congelamento. Outros fatores considerados foram a variabilidade da concentração de células viáveis em cada tubo de inóculo e a baixa concentração de nutrientes presentes no meio PD. Sendo assim, optou-se por alterar o meio de cultivo e o inóculo, elegendo-se o meio contendo extrato de malte, por sua maior concentração de nutrientes, e o inóculo de suspensão de esporos, que são mais resistentes ao congelamento que as hifas. A Figura 7 mostra como a mudança de meio e inóculo foram eficazes para obtenção de cultivos com alta concentração celular novamente, chegando a mais de 10g/L. A avaliação qualitativa de área superficial obtida também indicou melhora com as mudanças realizadas, gerando hifas mais soltas e sem a presença de grandes aglomerados de células, observados frequentemente nos cultivos com meio PD. Os resultados alcançados com meio contendo extrato de malte foram consistentes para todos os cultivos subsequentes.

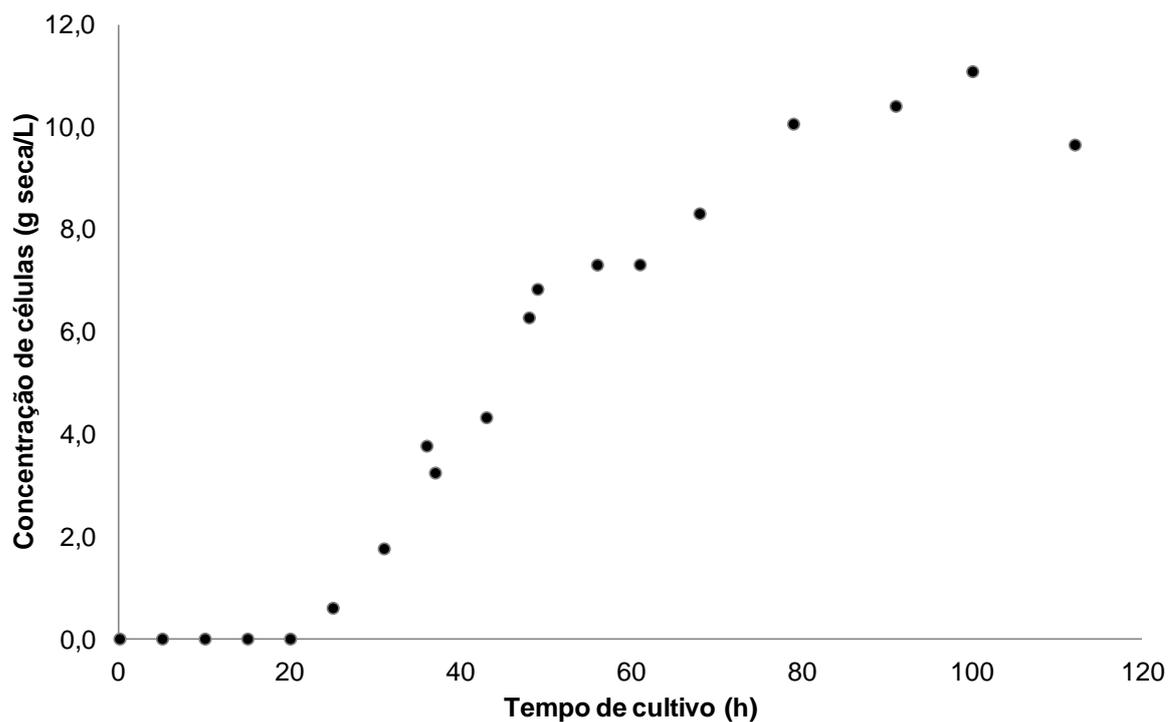


Figura 7 - Cinética de crescimento do fungo *Hypocrea lixii* utilizando meio contendo extrato de malte e inóculo de suspensão de esporos.

5.2 Bioissorção de cobre (II) pelo fungo *H. lixii*

Diversas tentativas de determinar a capacidade de bioissorção de íons cobre (II) foram realizadas para a biomassa não viável. Verificou-se frequentemente alta variabilidade entre as repetições e total falta de ajuste para os modelos comumente utilizados (Langmuir e Freundlich), até mesmo seguindo exatamente a metodologia sugerida por SALVADORI et al. (2013). A Figura 8 apresenta os resultados de adsorção de cobre (II) pela biomassa não viável de *Hypocrea lixii*.

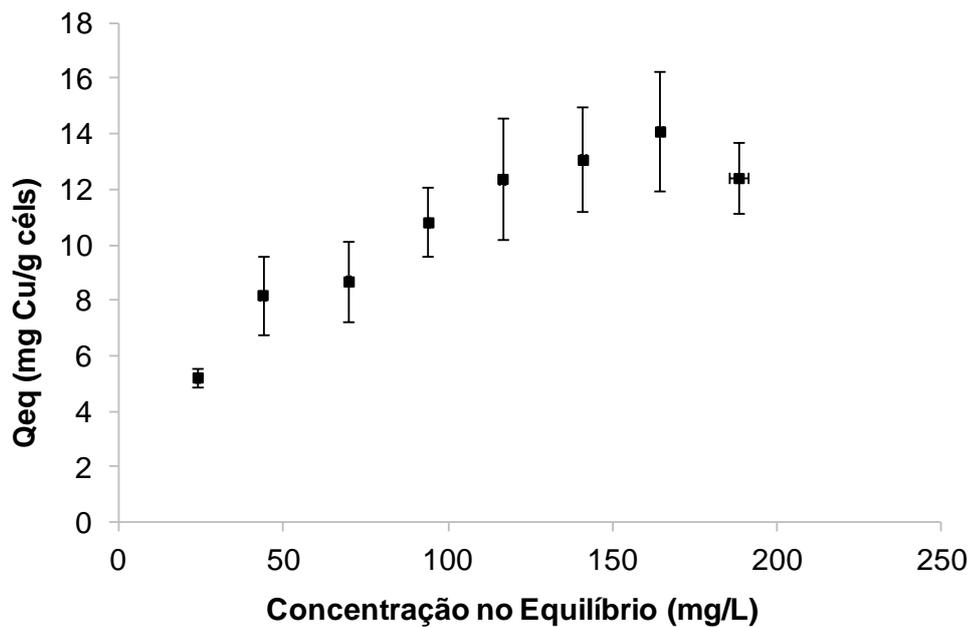


Figura 8 - Isoterma de adsorção de íons cobre (II) pela biomassa não viável do fungo *Hypocrea lixii*. Dados em triplicata.

Os resultados obtidos foram utilizados para verificar os ajustes fornecidos pelos modelos de Langmuir e Freundlich. As Figura 9 e Figura 10 representam a linearização dos dados para cada um dos modelos.

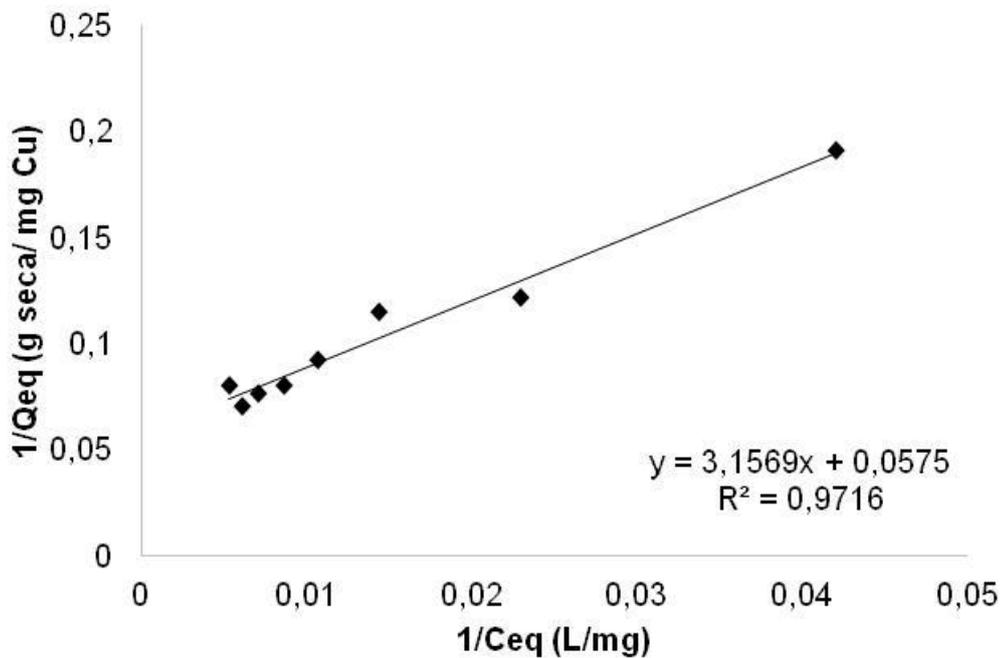


Figura 9 - Linearização dos dados de adsorção de íons cobre (II) pela biomassa não viável do fungo *H. lixii* pelo modelo de Langmuir.

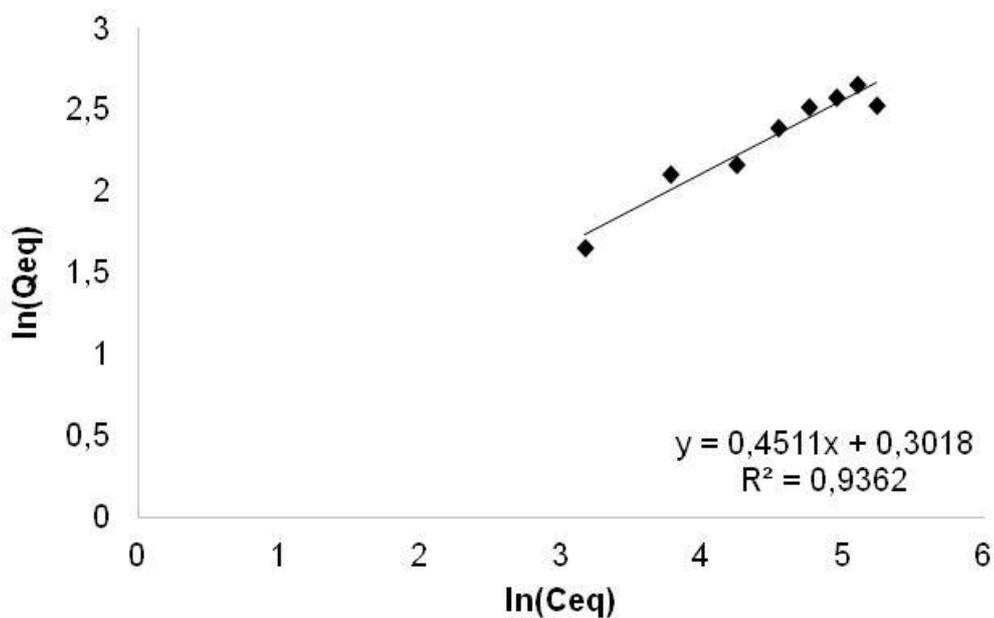


Figura 10 - Linearização dos dados de adsorção de íons cobre (II) pela biomassa não viável do fungo *H. lixii* pelo modelo de Freundlich.

A Tabela 6 apresenta os valores dos parâmetros de cada um dos modelos e a Figura 11 as curvas ajustadas a partir dos parâmetros calculados.

Tabela 6 - Parâmetros dos modelos de Langmuir e Freundlich calculados a partir dos dados de adsorção de íons cobre (II) pelo fungo *H. lixii*.

Langmuir			Freundlich		
b (L/g)	q_{max} (mg/g)	R^2	K_f	1/n	R^2
0,0182	17,4	0,972	1,35	0,451	0,936

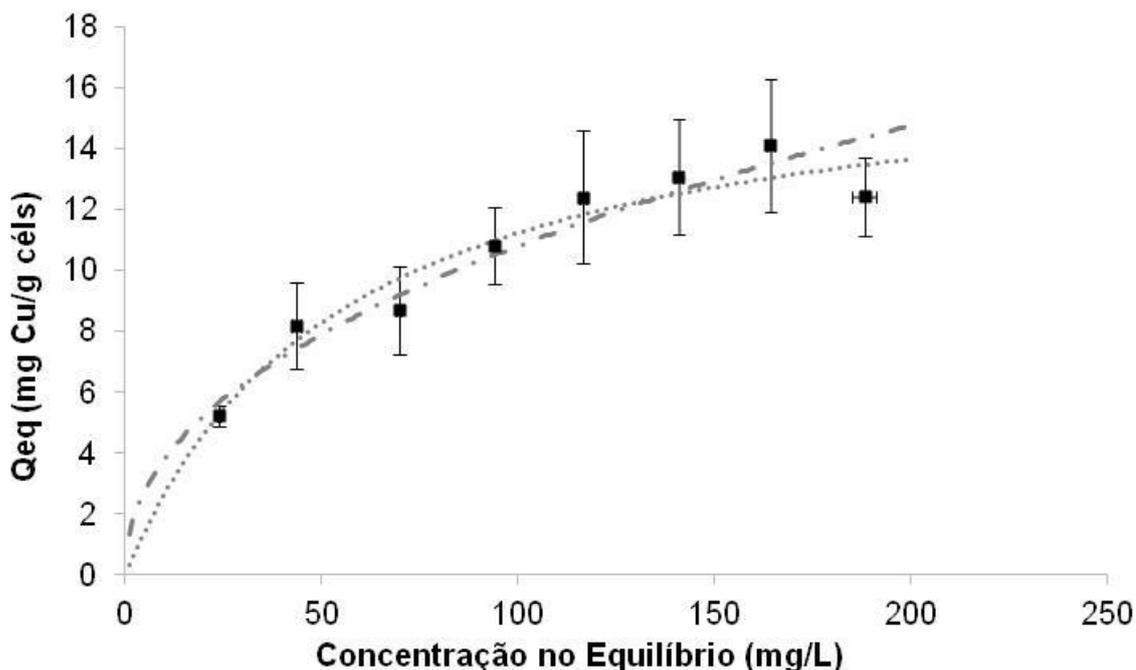


Figura 11 - Curvas ajustadas através dos modelos de Langmuir (····) e Freundlich (-·-·) para os dados de adsorção de íons cobre (II) pela biomassa não viável do fungo *H. lixii*.

Verificou-se que o desvio padrão obtido é bastante alto, principalmente para as concentrações mais altas de íons cobre (II). Acredita-se que isso se deva, majoritariamente, ao efeito das diluições necessárias das amostras antes da leitura no equipamento de absorção atômica, que multiplicam os desvios inerentes à análise, e ao fato da capacidade máxima de adsorção da biomassa seja relativamente pequena se comparada à concentração de íons nessa faixa, aproximando-se do erro experimental.

Apesar dos desvios, é possível observar a tendência esperada de aumento na capacidade de bioadsorção em função do aumento da concentração de íons cobre (II). Além disso, observa-se que a partir de 125mg/L ocorreu a saturação dos sítios ativos e que a massa de cobre adsorvida pela pelas células chegou a 13mg de cobre/g de células, aproximadamente.

Considerou-se que valores de coeficiente de regressão linear acima de 0,9 fornecem ajustes adequados já que o sorvente utilizado é complexo e apresenta variabilidade elevada, quando comparado a um sorvente não-biológico tradicional, como o carvão ativado. Sendo assim, pode-se afirmar que os modelos de Langmuir e Freundlich forneceram ajustes adequados aos dados experimentais, como pode ser verificado através da Tabela 6. O modelo de Langmuir apresentou ajuste

ligeiramente melhor que o modelo de Freundlich, porém não é possível afirmar que esse modelo possa ser usado para prever a adsorção de íons cobre (II) pela biomassa não viável do fungo, já que para isso o valor do coeficiente linear deveria estar mais próximo de 1.

O modelo de Langmuir indica que a adsorção máxima para a biomassa é próxima de 17,4 mg/g, o que é menor que o reportado anteriormente para o mesmo fungo (SALVADORI et al., 2013). Porém, tendo em vista que esse valor é calculado considerando parâmetros do ajuste linear dos dados experimentais e que se verificou valores altos de desvio padrão, entende-se que foi possível confirmar a capacidade de bioadsorção do fungo *H. lixii*.

Foram realizados novos experimentos de bioadsorção na tentativa de diminuir os desvios e confirmar a capacidade de bioadsorção descrita anteriormente para o fungo *H. lixii*. Entretanto, não houve diminuição significativa no desvio padrão encontrado para concentrações mais baixas, e para os pontos correspondentes à concentrações mais altas o valor aumentou, chegando a 30% da massa de metal adsorvido para a concentração de 175mg/L.

A repetição do experimento apresentou uma curva de adsorção com inclinação menor que a esperada. Apesar disso, verificou-se a tendência de aumento mais acentuado até aproximadamente 125ppm e estabilização da capacidade em aproximadamente 10mg de cobre/g de células.

Através dos ajustes obtidos pelos modelos de Langmuir e Freundlich na repetição do experimento de adsorção, verificou-se que novamente que nenhum dos modelos pode ser usado para prever a capacidade de adsorção da biomassa, pois os valores dos coeficientes de regressão linear a partir dos dados experimentais foram menores do que os obtidos anteriormente. A variabilidade entre cultivos da biomassa pode ser responsável pelos resultados obtidos, mesmo que as condições sejam as mesmas para os dois experimentos.

5.3 Síntese de nanopartículas de cobre utilizando biomassa

5.3.1 Biomassa não viável

Conforme reportado por (SALVADORI et al., 2013), a síntese de nanopartículas de cobre ocorre utilizando-se a biomassa não viável após contato com íons cobre(II). Observando-se as imagens da Figura 12, obtidas através de

microscopia eletrônica de transmissão, é possível visualizar a formação de nanopartículas nas amostras de biomassa não viável.

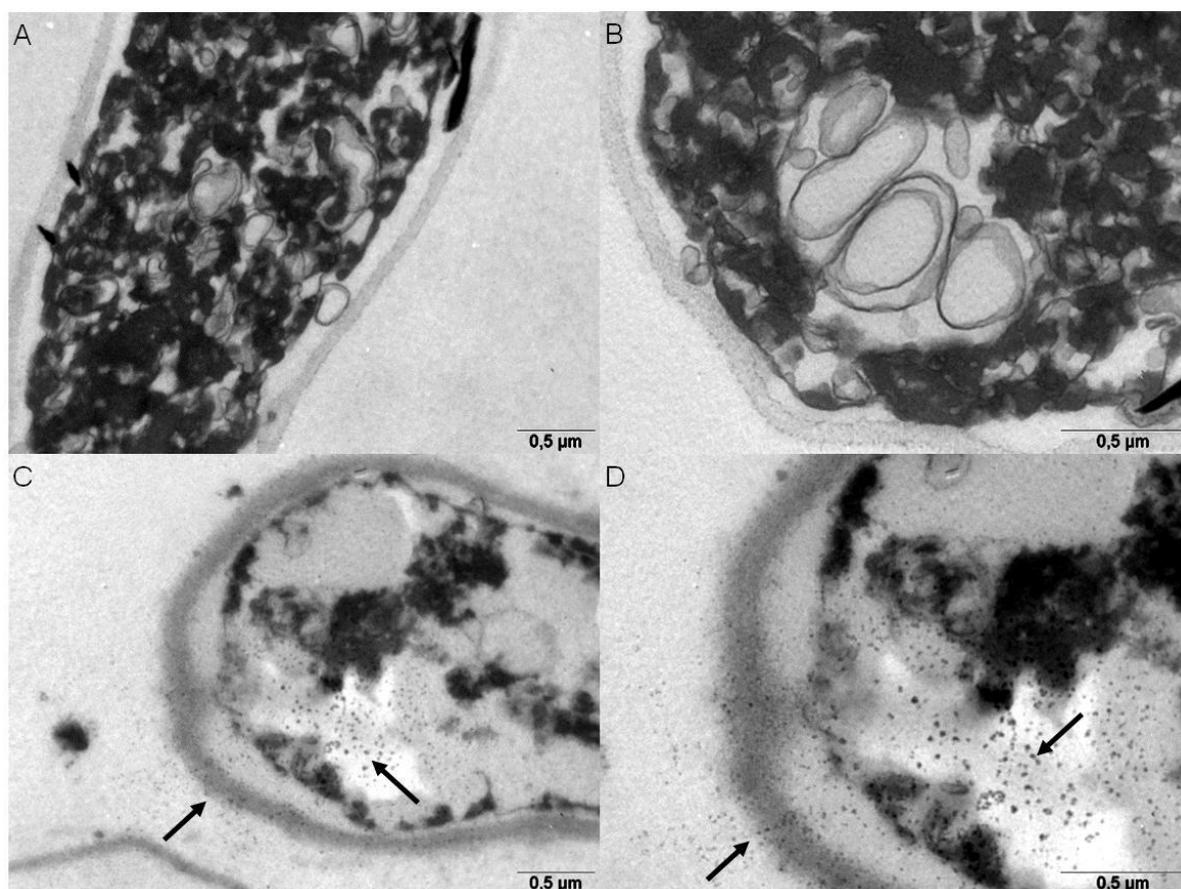


Figura 12 - Amostras de biomassa não viável de *H. lixii*. (A) e (B) Controle negativo, sem contato com íons cobre (II). (C) e (D) Biomassa não viável após contato com íons cobre (II). As partículas formadas estão indicadas com setas.

Como se verifica na Figura 12, as partículas formadas estão distribuídas principalmente no interior das células e na parede celular, indicando que o congelamento e o pré-tratamento da biomassa pode ter levado a uma porosidade maior da parede e permitido a difusão dos íons cobre (II) ou das partículas já formadas para o interior da célula. Os diâmetros das partículas foram medidos com auxílio do programa Microsoft PowerPoint. O tamanho médio das partículas formadas está entre 13 e 30 nm e a variabilidade dos diâmetros é baixa. Grande parte das partículas tem diâmetro próximo de 15nm.

5.3.2 Biomassa viável

A fim de verificar se a biomassa viável do fungo *H. lixii* também apresentava capacidade de síntese de nanopartículas de cobre, realizou-se o mesmo

procedimento. A Figura 13, cujas imagens foram obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão, apresenta os resultados.

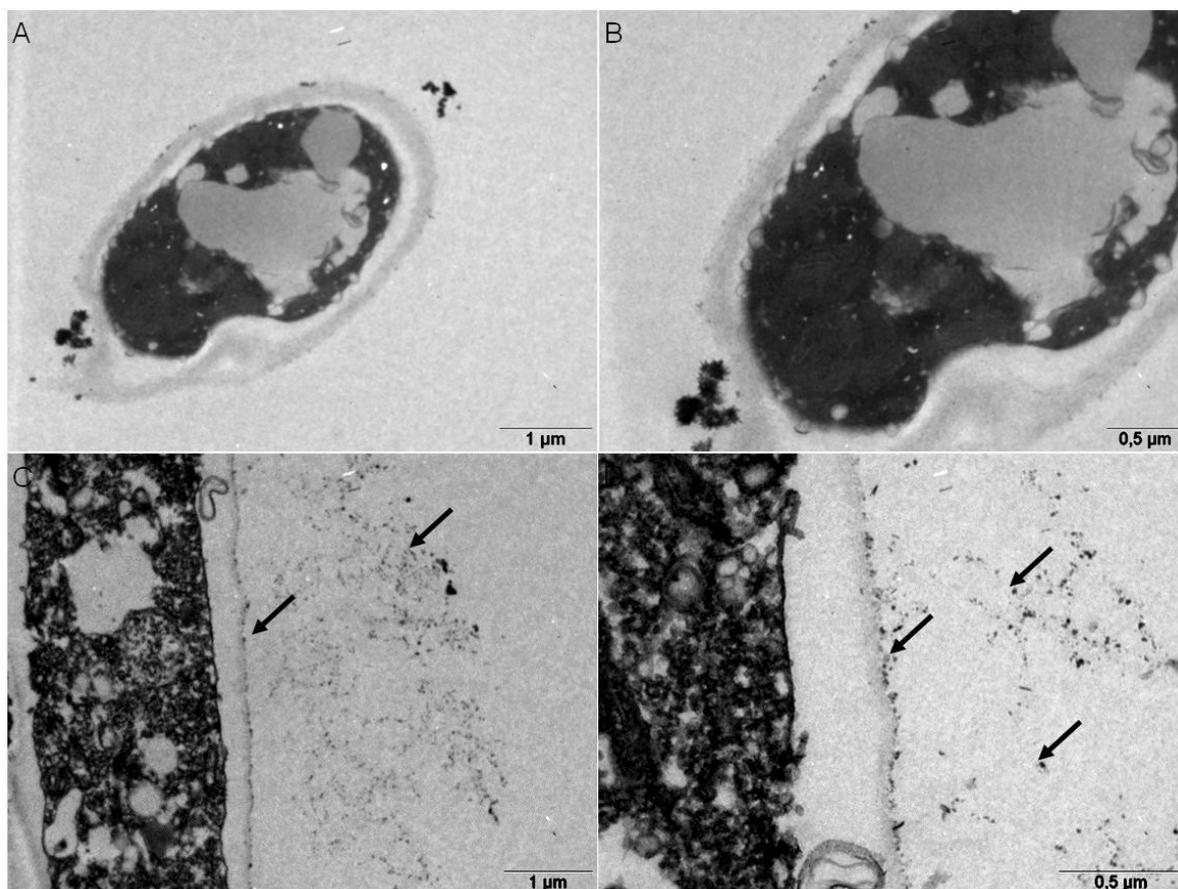


Figura 13 - Amostras de biomassa viável de *H. lixii*. (A) e (B) Controle negativo, sem contato com íons Cu(II). (C) e (D) Biomassa viável após contato com íons Cu(II). As partículas formadas estão indicadas com setas.

Através da Figura 13, verifica-se que também houve formação de partículas, porém não se verifica a presença delas no interior das células, como ocorreu para a biomassa não viável. Para a biomassa viável, foi possível identificar apenas partículas próximas à parede e no espaço exterior às células. O aspecto geral das partículas formadas é bastante distinto do que foi verificado para a biomassa não viável e também há um ajuntamento significativo dessas partículas fora da vizinhança das células. O tamanho médio das partículas formadas é de 20 a 55nm e a variabilidade dos diâmetros é maior que a visualizada para a biomassa não viável. Ainda é necessário analisar a composição das partículas observadas para confirmar que se trata de nanopartículas de cobre metálico ou óxido de cobre.

5.4 Síntese de nanopartículas utilizando extrato de suspensão de biomassa

Uma vez que os resultados obtidos com as biomassas viável e não viável corroboram a capacidade de síntese de nanopartículas do fungo *H. lixii* e que há diversos trabalhos descrevendo a biossíntese de nanopartículas metálicas através do extrato de suspensão de células, decidiu-se iniciar a investigação do uso de extrato de *H. lixii* para síntese.

A fim de verificar a presença de nanopartículas de cobre após o processo de síntese, foram realizadas as análises de espectrofotometria (UV-Vis), espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e difração de raios-X (DRX), porém nenhuma delas forneceu resultados conclusivos. Sendo assim, eles não serão discutidos nessa seção, porém podem ser vistos nos Apêndices A, B e C.

Foram realizadas análises de microscopia eletrônica de transmissão em amostras dos extratos de suspensão de células antes e após a reação de síntese para verificar a formação de nanopartículas. A Figura 14 apresenta os resultados dessas análises para o extrato de suspensão de biomassa viável.

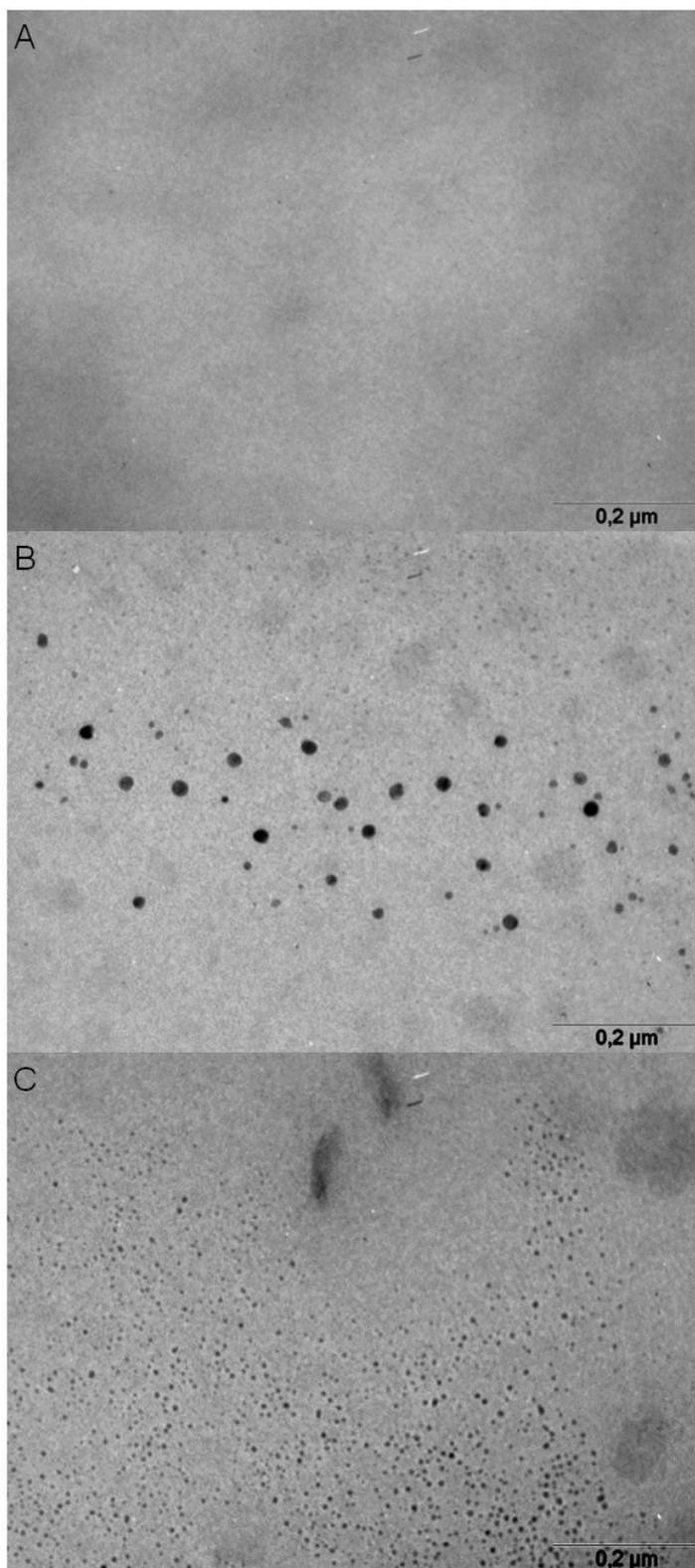


Figura 14 – Microscopia eletrônica de transmissão realizada em amostras de extrato de suspensão de biomassa viável de *H. lixii*. (A) Controle negativo, extrato de suspensão de biomassa sem contato com íons cobre (II). (B) Extrato de suspensão de biomassa após reação de síntese de nanopartículas. (C) Idem (B), partículas menores formadas.

Como pode ser verificado na Figura 14, após o contato com os íons cobre (II), os extratos de suspensão de biomassa viável apresentaram formação de

nanopartículas. O formato encontrado é majoritariamente esférico e há partículas de diâmetro médio de 3 a 20nm. Verifica-se que a variabilidade de tamanhos é baixa, indicando a presença de uma distribuição estreita. Os diâmetros médios das partículas foram calculados com o auxílio do programa Microsoft PowerPoint.

Da mesma forma, os extratos de biomassa não viável apresentaram formação de nanopartículas. As partículas observadas na Figura 15 apresentam formato majoritariamente esférico e diâmetro médio de partículas entre 4 e 15 nm. Da mesma forma que para as partículas de cobre formadas pelo extrato de suspensão de biomassa viável, verifica-se que para as partículas formadas pelo extrato de suspensão de biomassa não viável a distribuição de diâmetros é bastante estreita. Também é possível verificar uma predominância de diâmetros abaixo de 10nm.

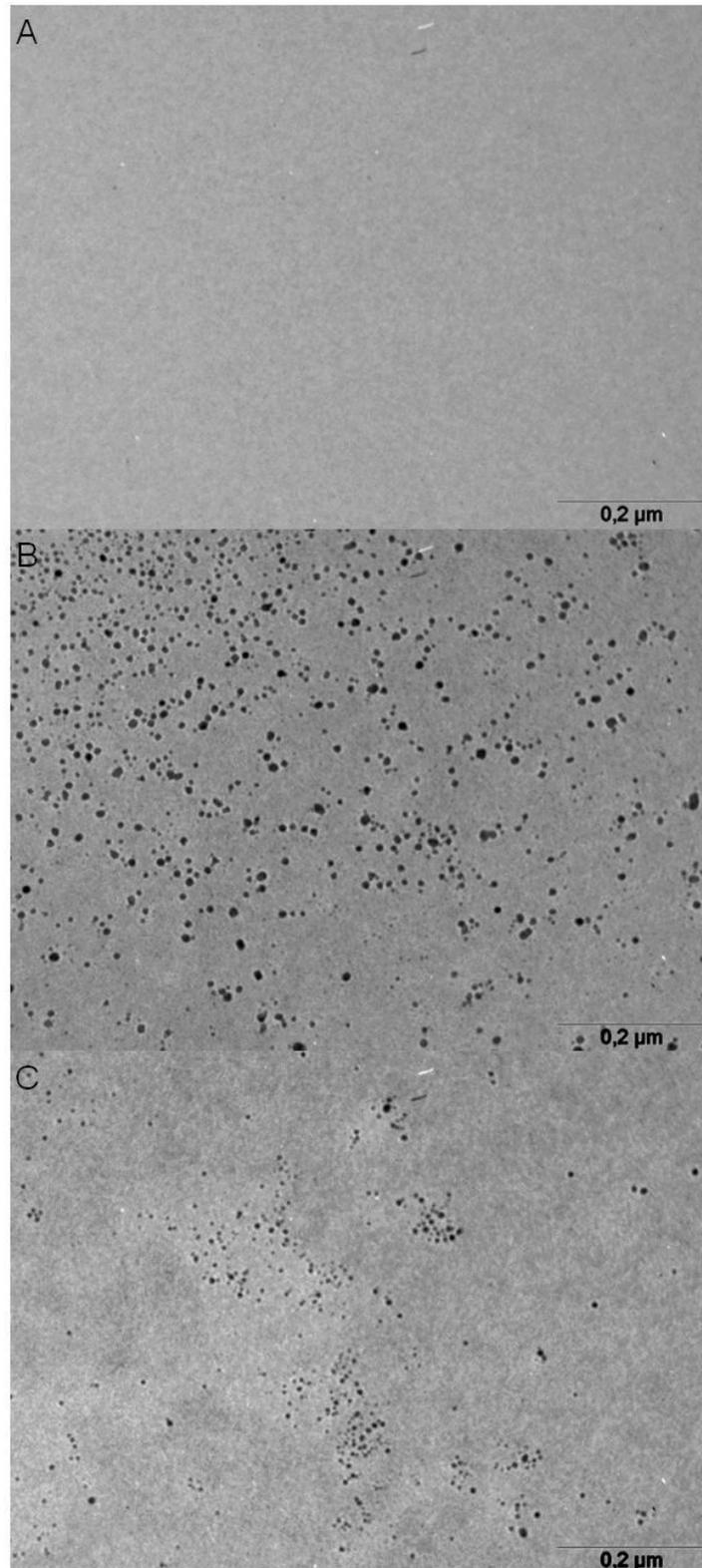


Figura 15 - Microscopia eletrônica de transmissão realizada em amostras de extrato de suspensão de biomassa não viável de *H. lixii*. (A) Controle negativo, extrato de suspensão de biomassa sem contato com íons cobre (II). (B) Extrato de suspensão de biomassa após reação de síntese de nanopartículas. (C) Idem (B), partículas menores formadas.

5.5 Síntese de nanopartículas utilizando extrato de centrifugação de células não viáveis

Diferentes métodos de obtenção de extrato de células podem ser observados na literatura. Além do método de suspensão em água deionizada descrito nesse trabalho, também se verifica o uso de centrifugação para remover as células e obter um extrato líquido que pode ser usado para a produção de nanopartículas (KORBKANDI; IRAVANI; ABBASI, 2009a). Dessa forma, foram realizados ensaios para determinar se o extrato proveniente da centrifugação de células não viáveis de *Hypocrea lixii* também apresentaria capacidade de síntese de nanopartículas, como foi verificado para os extratos de suspensão anteriormente.

Após o processo de síntese descrito na Seção 4.7.2, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) em amostras dos extratos obtidos por centrifugação de células não viáveis. Os resultados podem ser observados através da Figura 16.

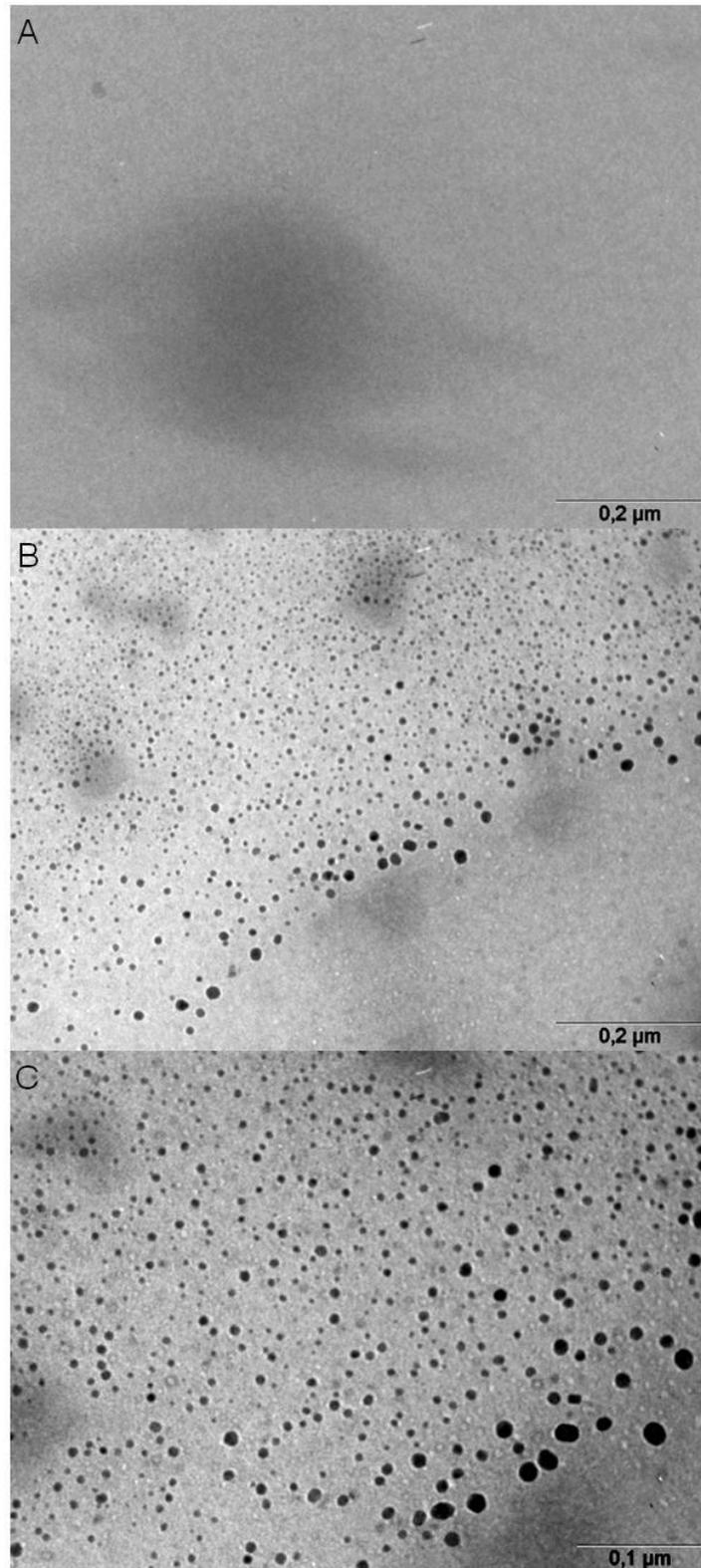


Figura 16 - Microscopia eletrônica de transmissão realizada em amostras de extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii*. (A) Controle negativo, sem adição de íons cobre (II). (B) e (C) Extrato de centrifugação de células não viáveis após reação de síntese de nanopartículas.

Como pode ser visto na Figura 16, após a adição de íons cobre (II) há formação de nanopartículas majoritariamente esféricas e com diâmetro médio entre

5 e 20nm, medidos com auxílio do programa Microsoft PowerPoint. Através das imagens, acredita-se que a dispersão de diâmetros seja bastante estreita, o que é uma característica de interesse. Outra característica das partículas formadas que pode ser observada através da Figura 16 é que a maior parte delas tem diâmetro menor que 10nm.

5.5.1 Caracterização das nanopartículas sintetizadas por extrato de centrifugação de células não viáveis

Como forma de caracterizar as partículas encontradas nas análises de microscopia eletrônica de transmissão, foi realizada análise de EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) que fornece informações sobre a composição atômica através da emissão característica de raios-X. A Figura 17 mostra os pontos onde foram realizados a análise EDS e os resultados obtidos.

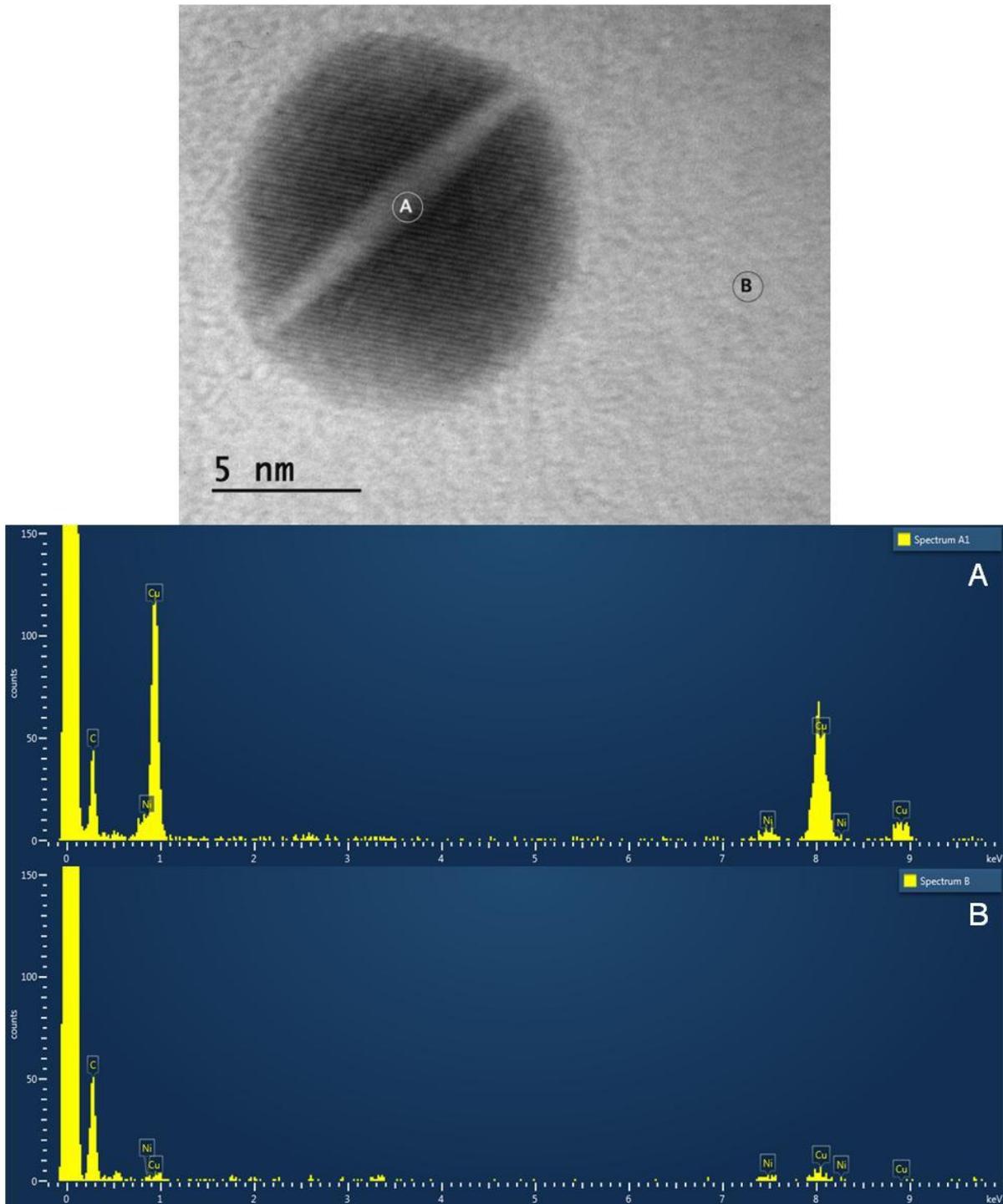


Figura 17 - Microscopia eletrônica de transmissão realizada em extrato de centrifugação de células não viáveis do fungo *H. lixii* após contato com íons cobre (II), detalhe de partícula encontrada. As letras indicam os pontos onde foi realizada a análise de EDS (energy dispersive spectroscopy) para verificação da composição. (A) Espectro correspondente à partícula. (B) Espectro correspondente ao meio vizinho à partícula.

Através dos resultados obtidos com a análise de EDS realizadas nas partículas, é possível afirmar que a composição da partícula seja apenas cobre, pois não foi identificada a presença de oxigênio. O pico de maior intensidade, próximo a

0keV, está presente em todos os resultados e representa um sinal 'branco', não sendo característico da amostra e sim intrínseco da análise. Os sinais correspondentes aos elementos carbono e níquel são decorrentes dos materiais que compõe o porta-amostra. É possível observar uma pequena presença de sinal de átomos de cobre no espectro correspondente à vizinhança da partícula, porém isso se deve tanto à presença do sal cloreto de cobre em excesso quanto ao sinal residual proveniente da partícula, que pode ocorrer pela distância pequena entre os pontos.

Observa-se na Figura 18 que há formação de estruturas cristalinas nas partículas sintetizadas. Verifica-se que uma mesma partícula pode apresentar 3 ou mais direções diferentes de planos cristalinos, identificados através do aspecto 'hachurado'.

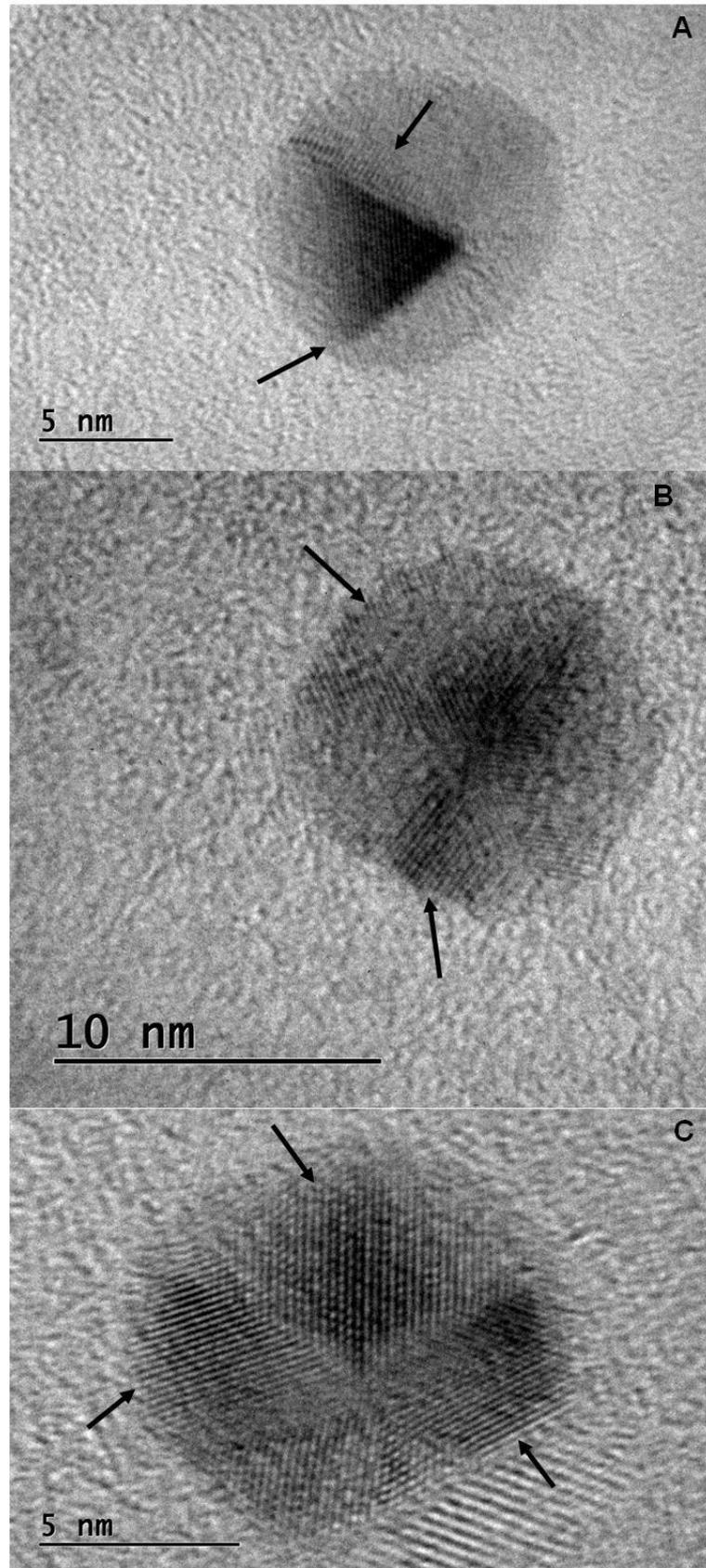


Figura 18 - Microscopia eletrônica de transmissão realizada em nanopartículas produzidas através de extrato de centrifugação de células não viáveis do fungo *H. lixii* após contato com íons cobre (II). (A), (B) e (C) representam a diversidade de estruturas cristalinas encontradas. As diferentes direções estão indicadas através das setas.

5.6 Análise de composição dos extratos de *Hypocrea lixii*

Grande parte dos trabalhos realizados com extrato de células para síntese de nanopartículas sugere que a reação de redução é promovida por enzimas, outras proteínas e diferentes macromoléculas produzidas pelos microrganismos (KATHIRESAN et al., 2009b; KORBOKANDI; IRAVANI; ABBASI, 2009b; MANDAL et al., 2006; MOHANPURIA; RANA; YADAV, 2007). Como forma de identificar qualitativamente as substâncias presentes nos extratos que poderiam ser responsáveis pelas partículas encontradas, foram realizadas análises de espectrometria de massas (MALDI-TOF) e de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

5.6.1 Extratos de suspensão de biomassa

Para os extratos de suspensão de biomassa foram realizadas análises de espectrometria de massas (MALDI-TOF), porém não foram encontrados indícios de proteínas ou moléculas com relação massa/carga entre 4 e 20 kDa. Os resultados dessas análises podem ser vistos no Apêndice D. Sendo assim, prosseguiu-se com a análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Os resultados das análises através da coluna DB1 para o extrato de suspensão de biomassa não viável podem ser verificados na Figura 19 e na Figura 20.

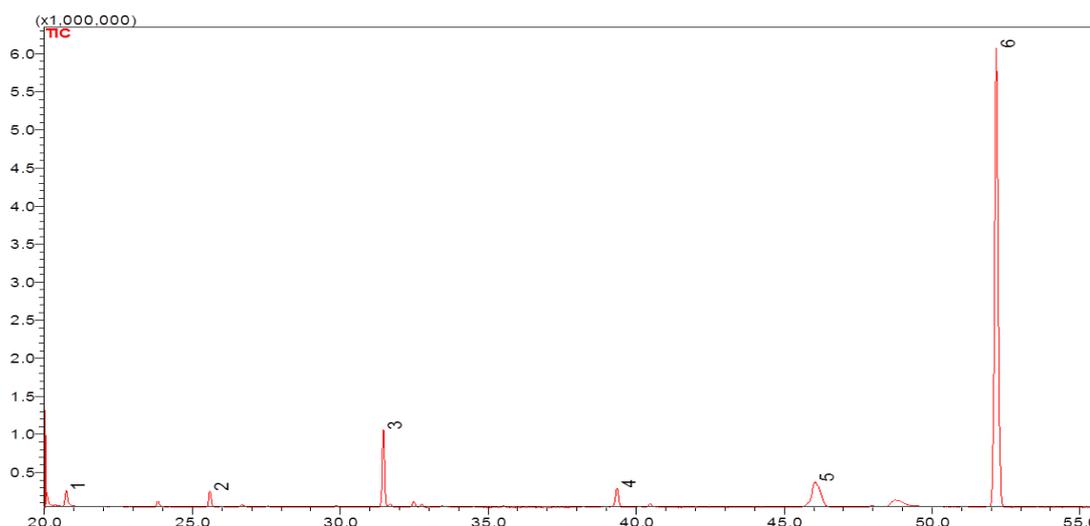


Figura 19 – Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa não viável sem contato com íons cobre (II), coluna DB1.

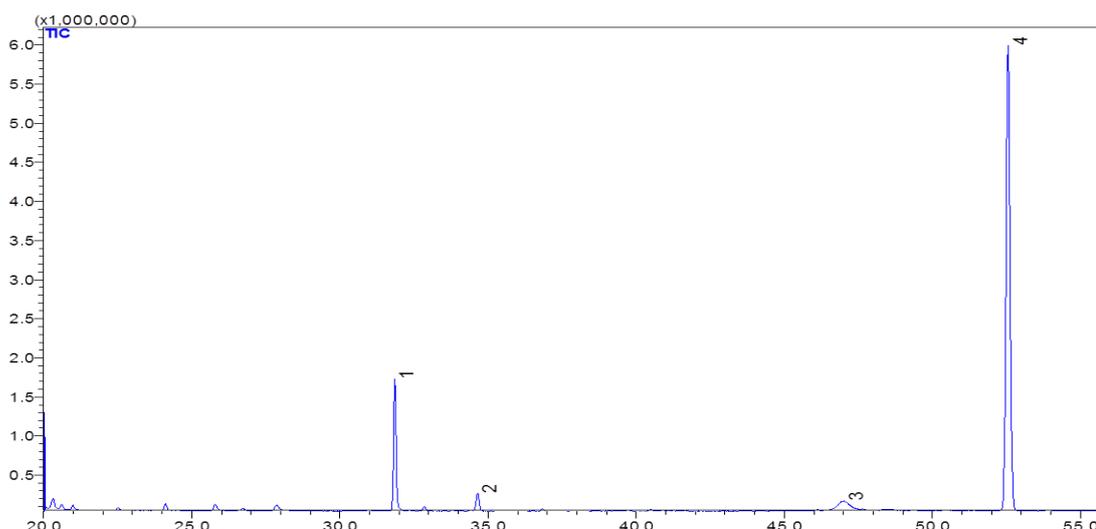


Figura 20 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa não viável após contato com íons cobre (II), coluna DB1.

A partir dos resultados demonstrados pelas Figura 19 e Figura 20, é possível observar que, com a adição dos íons cobre (II), houve interação de algumas moléculas presentes no extrato. Os picos 1, 2, 4 e 5 da Figura 19 correspondem a aminometil propanol, L-Alanina, ácido piroglutâmico e a Uridina, respectivamente. Como esses picos não aparecem no espectro da Figura 20, acredita-se que tenham interagido com os íons cobre (II). O mesmo pode ser verificado nos espectros das Figura 21 e Figura 22.

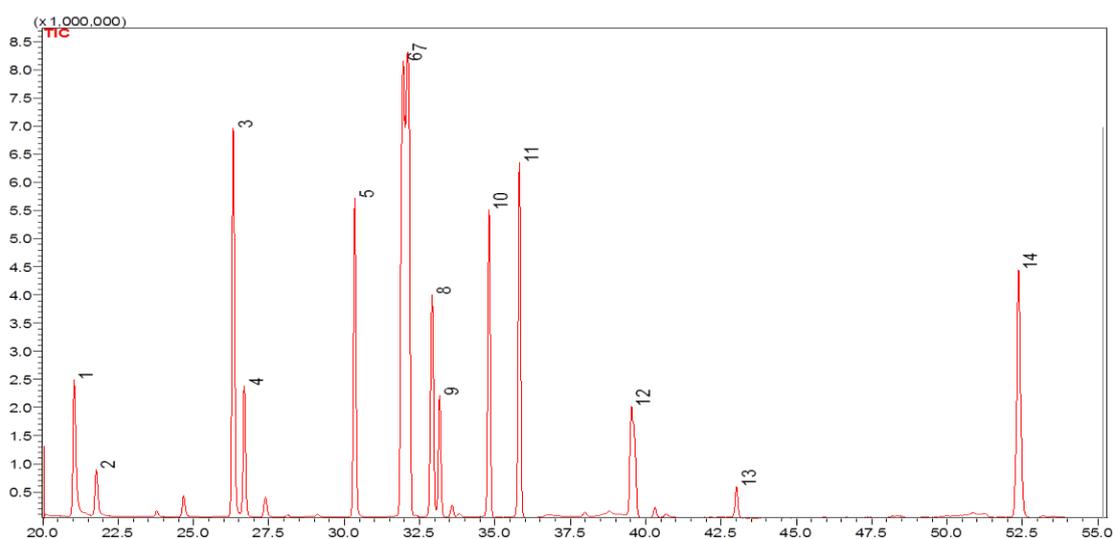


Figura 21 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa viável sem contato com íons cobre (II), coluna DB1.

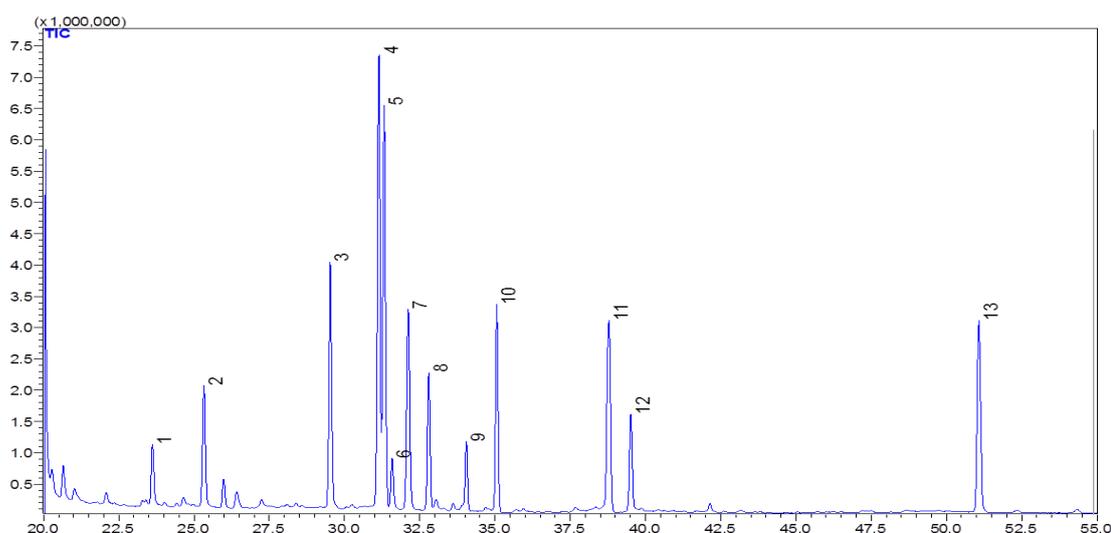


Figura 22 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa viável após contato com íons cobre (II), coluna DB1.

Os picos 1, 2, 3, 4 e 13, verificados na Figura 21, correspondem a cianamida, diisopropil fosfato dimetilmetanamina, L-Alanina, Glicina e ácido 2-amino-9-fenil-nonanóico (aminoácido semelhante a fenilalanina), respectivamente. Essas substâncias não aparecem no espectro da Figura 22, após a adição de íons cobre (II), indicando sua interação. Além disso, os picos 10, 11, e 12 da Figura 21, que correspondem a L-Serina, L-treonina e ácido L-aspártico, respectivamente, sofreram uma queda de intensidade, podendo indicar uma diminuição em sua concentração no extrato após a adição dos íons cobre (II).

Buscando maiores informações sobre as substâncias presentes nos extratos, as amostras também foram analisadas utilizando-se a coluna ZB-WAX, que é ideal para separação de açúcares. Os resultados para os extratos de suspensão de biomassas viável e não viável podem ser vistos nas Figura 23 a Figura 26.

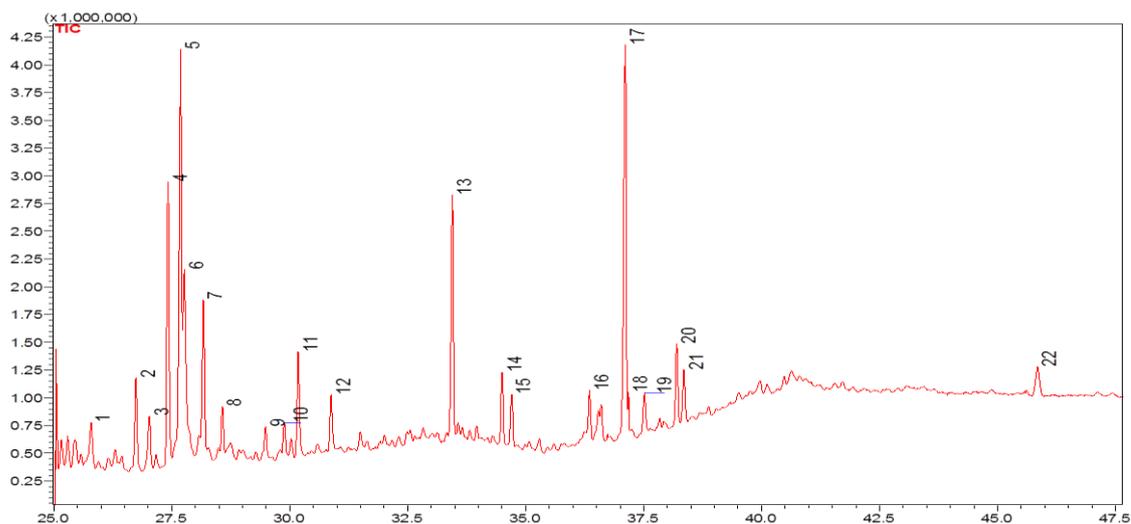


Figura 23 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa não viável sem contato com íons cobre (II), coluna WAX.

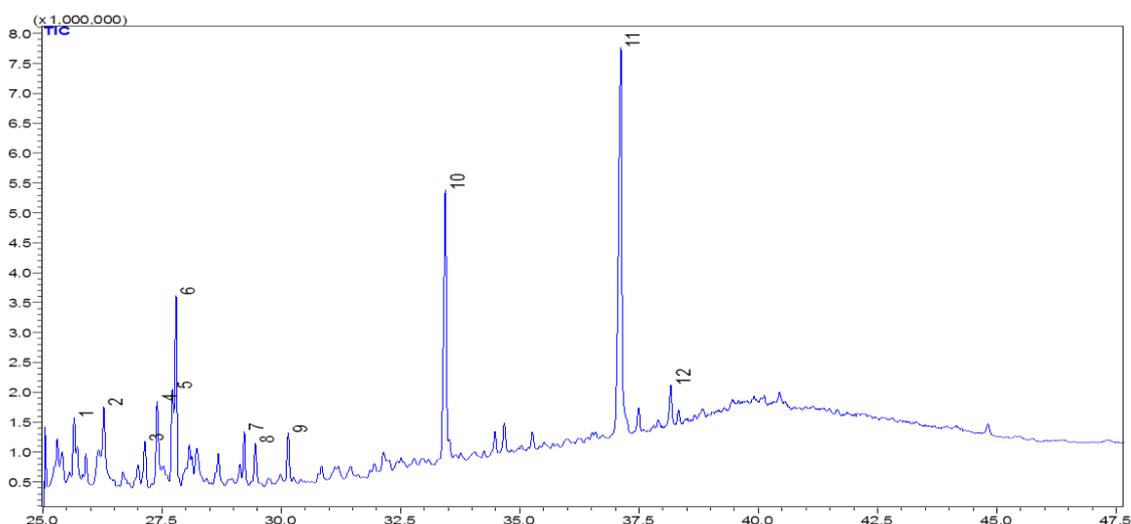


Figura 24 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa não viável após contato com íons cobre (II), coluna WAX.

Os resultados obtidos através da coluna WAX seguem a mesma tendência do que foi observado na coluna DB1. No espectro correspondente à Figura 23, os picos 2 e 9, identificados como ácido palmítico e ácido mirítico, respectivamente, não estão presentes no espectro da Figura 24 indicando que podem ter interagido com o cobre iônico. Os picos de número 4, 5 e 11 correspondentes a ácido fosfórico, ácido piroglutâmico e d-eritrofuranoose, respectivamente, tiveram uma diminuição em sua intensidade após contato com os íons cobre (II), indicando que também para esses compostos pode ter havido interação. Finalmente, para os extratos de suspensão de biomassa viável, os resultados estão nas Figura 25 e Figura 26.

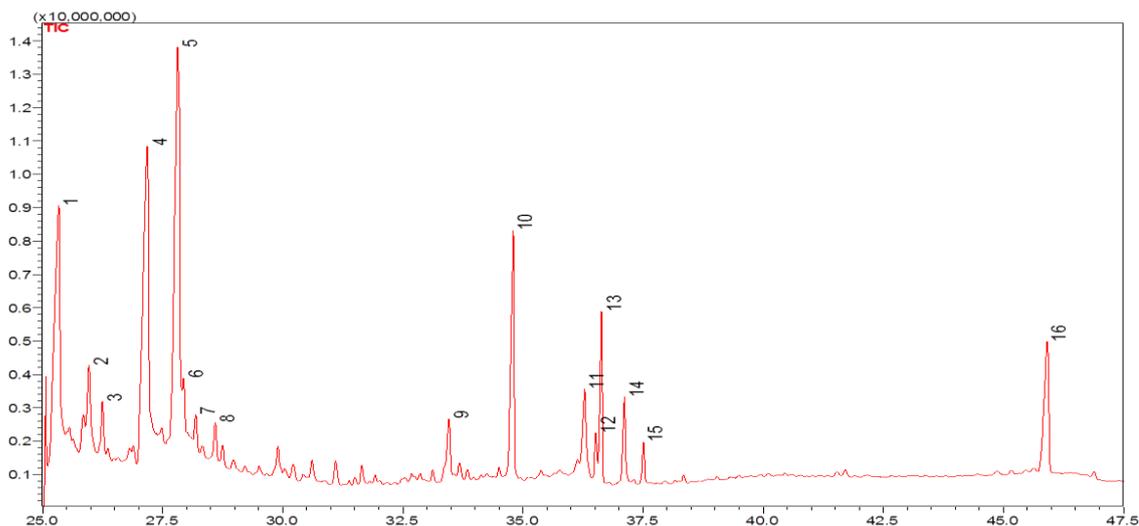


Figura 25 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa viável sem contato com íons cobre (II), coluna WAX.

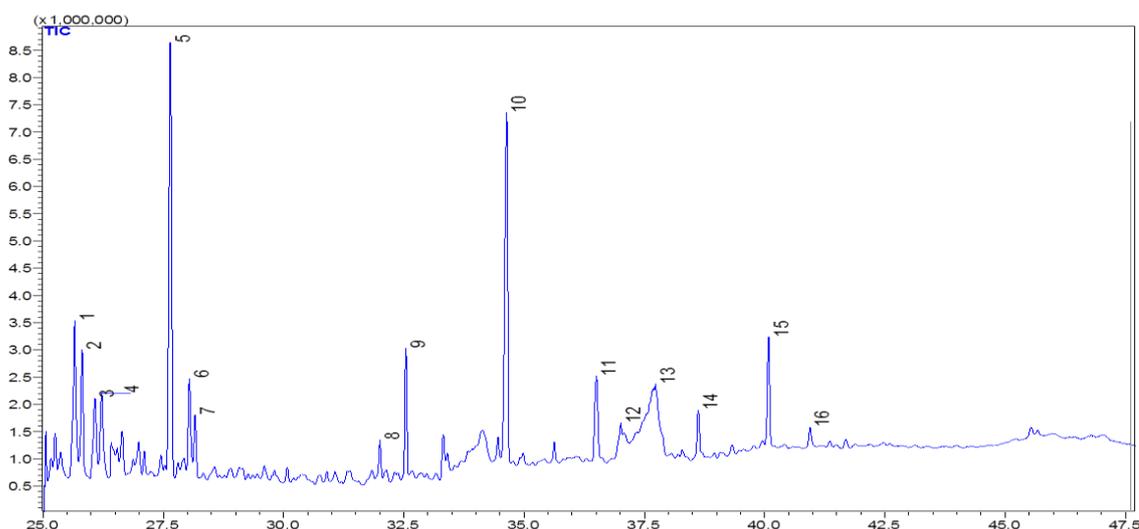


Figura 26 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de suspensão de biomassa viável após contato com íons cobre (II), coluna WAX.

Assim como nos demais espectros, houve picos que foram identificados nas amostras sem cobre e não estão presentes após a adição de íons cobre (II). Os picos 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 13 e 16 correspondem a L-Glutamina, L-Ornitina, ácido 2-amino-9-fenil-nonanóico (semelhante a fenilalanina), L-Prolina, glicose, D-galactofuranose, ácido palmítico, maltose, 2-acetamido-2-deoxi-D-manose e Uridina, respectivamente, e estão ausentes no espectro correspondente ao extrato de células viáveis após adição de íons cobre (II). Isso indica que houve interação desses compostos com os íons.

Tendo em vista os resultados das análises de cromatografia gasosa, verifica-se que a maior parte dos compostos que não foram identificados após a adição de íons cobre (II) são aminoácidos, ácidos graxos e açúcares.

5.6.2 Extrato de centrifugação de células não viáveis

Da mesma forma que para os extratos de suspensão de células, foi realizada análise de espectrometria de massas (MALDI-TOF) para o extrato de centrifugação de células não viáveis. O resultado dessa análise pode ser visto na Figura 27.

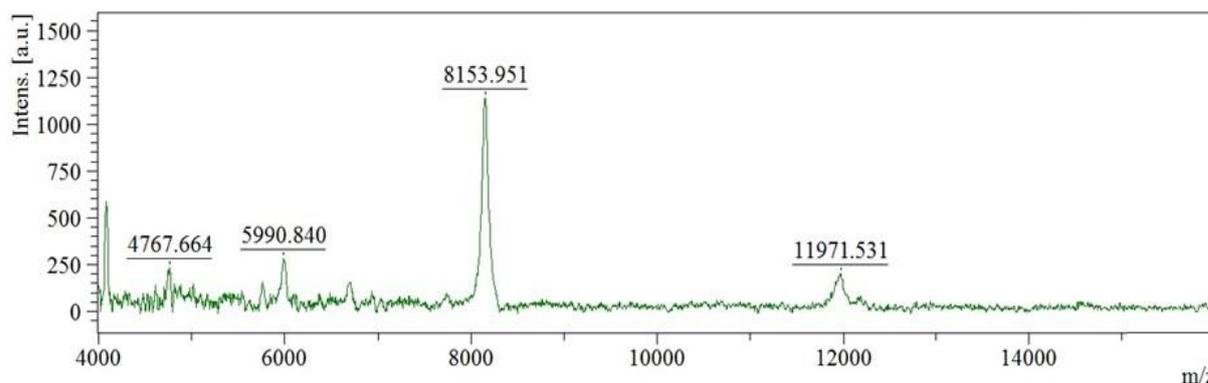


Figura 27 - Espectro de massas obtido através da análise de espectrometria de massas (MALDI-TOF) realizada para extratos de centrifugação de células não viáveis sem contato com íons cobre (II).

Como pode ser visto na Figura 27, diferentemente do que foi observado para os extratos de suspensão de biomassa, existem picos que indicam a presença de compostos com alto peso molecular. Esses picos podem ser correspondentes a pequenas proteínas e/ou peptídeos produzidos pelo fungo *H. lixii* ou que fazem parte de sua estrutura celular.

Para verificar se as interações com os íons cobre (II) observadas para os extratos de suspensão de biomassa também ocorriam para o extrato de centrifugação de células não viáveis, foram realizadas análises de cromatografia gasosa através da coluna WAX, mais adequada para separação de açúcares. Os resultados estão apresentados na Figura 28 e na Figura 29.

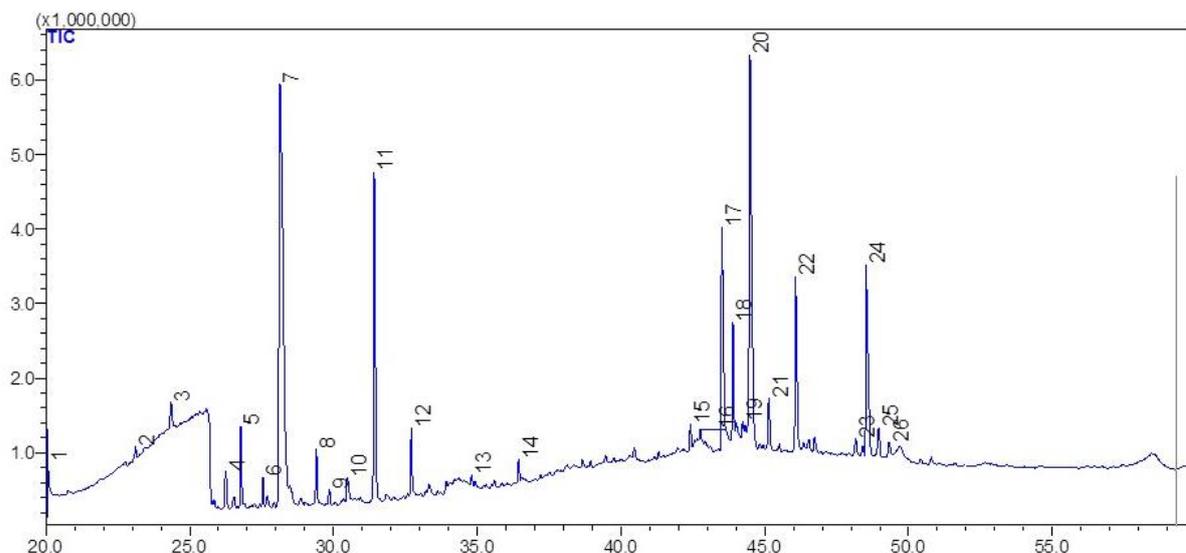


Figura 28 - Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de centrifugação de células não-viáveis de *H. lixii* sem contato com íons cobre (II), coluna WAX.

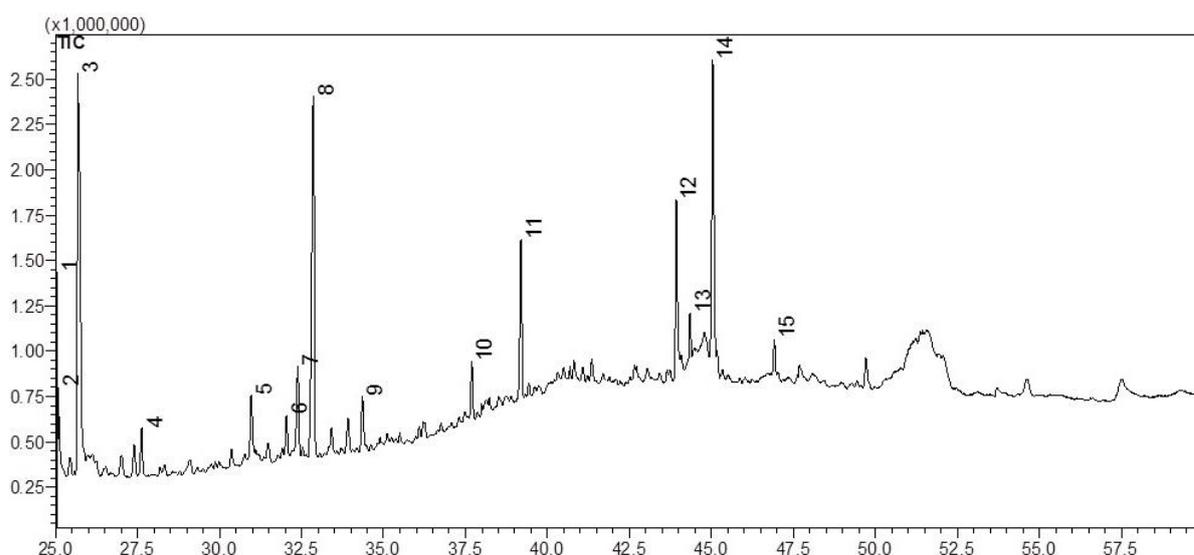


Figura 29 – Perfil cromatográfico obtido através de análise de cromatografia gasosa para o extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii* após contato com íons cobre (II), coluna WAX.

Através da comparação entre os cromatogramas obtidos para o extrato de centrifugação de células não viáveis antes e depois do contato com íons cobre (II), é possível verificar que os picos 5, 7, 12, 22, e 24 da Figura 28 correspondentes a gluconolactona, glucitol, glicose, maltose e d-glicopirranose, respectivamente, não estão mais presentes no cromatograma da Figura 29. Além disso, é possível verificar que os picos 11, 17, 20 e 18, correspondentes a treitol (um álcool de açúcar), e isômeros de maltose (celobiose, lactose, etc) e de turanose sofreram uma diminuição expressiva em sua intensidade.

Os dados encontrados através das análises de cromatografia gasosa para o extrato de centrifugação de células não viáveis seguem a mesma tendência do que foi encontrado para os extratos de suspensão de biomassa viável e não viável. Os compostos que apresentam maior interação com os íons cobre (II) nesse caso foram alcoóis de açúcares e dissacarídeos. Não foram identificados picos correspondentes a aminoácidos, diferentemente do que ocorreu para os extratos de suspensão de biomassa.

5.6.3 Avaliação do efeito do pH e temperatura no diâmetro das nanopartículas formadas

Como forma de avaliar o efeito do pH e da temperatura na formação das partículas, foi proposto um delineamento composto central rotacional, conforme descrito na Seção 4.8 e apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Tabela do delineamento de experimentos composto central rotacional com valores codificados e não codificados das variáveis pH e temperatura e os ensaios correspondentes.

pH	Temperatura (°C)	pH codificado	Temperatura codificada	Letra Correspondente
3,6	32,9	-1	-1	A
3,6	47,1	-1	1	B
6,4	32,9	1	-1	C
6,4	47,1	1	1	D
3,0	40,0	-1,41	0	E
7,0	40,0	1,41	0	F
5,0	30,0	0	-1,41	G
5,0	50,0	0	1,41	H
5,0	40,0	0	0	I
5,0	40,0	0	0	J
5,0	40,0	0	0	K

Para realização dos ensaios propostos foi escolhido o extrato de centrifugação de células não viáveis. Os resultados das análises de espectrometria de massas (MALDI-TOF) confirmaram a presença de compostos com alto peso molecular não verificados nos demais extratos. Além disso, as análises de microscopia eletrônica de transmissão e de EDS confirmaram a capacidade desse extrato de formação de nanopartículas de cobre estáveis. Não foram consideradas

as biomassas para esse fim pela dificuldade de preparação de amostra para realização de microscopia e também por não haver confirmação da composição das partículas observadas. Sendo assim, considerou-se que o extrato de centrifugação de células não viáveis era a escolha mais adequada.

Foram realizadas análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS) para determinação da distribuição dos diâmetros das partículas formadas em cada uma das condições estabelecidas pelo delineamento. É importante ressaltar que através da técnica de espalhamento de luz obtém-se o diâmetro hidrodinâmico das partículas presentes em solução. O diâmetro hidrodinâmico é definido como o tamanho de uma esfera rígida que se difunde no meio da mesma forma que a partícula analisada. Sendo assim, não é possível distinguir se há moléculas ao redor da partícula agindo como estabilizadores ou se a partícula tem formato diferente de esférico, o que pode acarretar em uma leitura de diâmetro maior que a real. Os resultados obtidos para cada uma das condições testadas estão apresentados nas Figura 31 a Figura 41.

Foi realizada a análise de DLS também no extrato de células não viáveis, como forma de verificar se havia moléculas ou compostos que interagem com a luz e que pudessem interferir nas medidas. A Figura 30 mostra o resultado obtido.

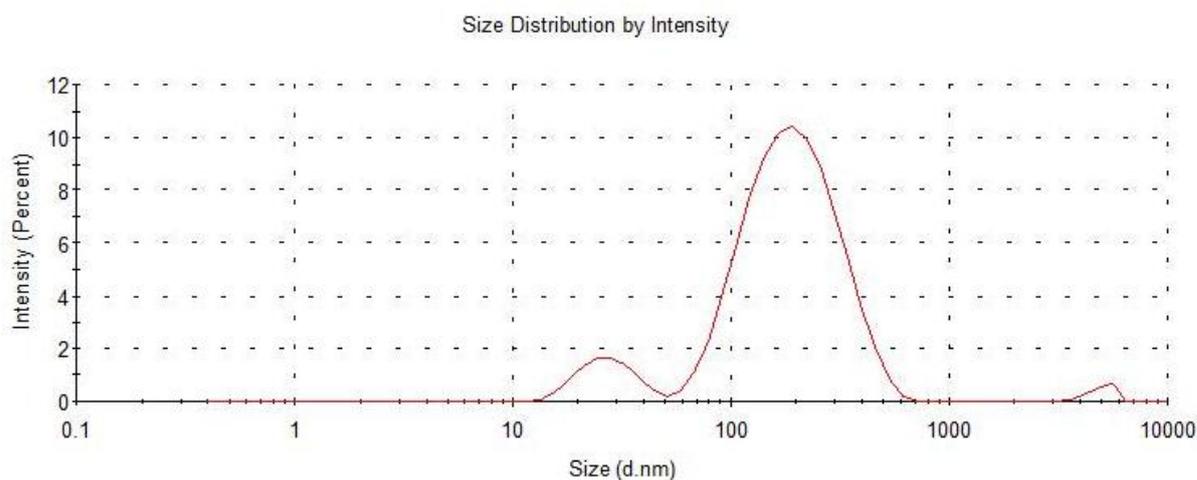


Figura 30 - Resultado de análise de DLS realizada em extrato de células não viáveis, sem contato com íons cobre (II).

Através da Figura 30 foi possível verificar que há registro de picos nos diâmetros próximos a 25nm e 200nm. Como o extrato de células não viáveis não possui partículas em suspensão, buscou-se compreender o que poderia representar os picos encontrados. De acordo com KASZUBA et al. (2008), ao analisar amostras

de diversas soluções de sacarose, previamente filtradas através de filtros de 0,02 μ m de poro, verificou-se a presença consistente de um pico próximo a 200nm de diâmetro, além do pico correspondente às moléculas de sacarose, próximo de 1 nm.

A presença desse pico foi explicada por WEINBUCH et al. (2015), em que se verificou que os responsáveis eram aglomerados de impurezas decorrentes do processo de produção e da matéria prima. Esse pico foi verificado para diferentes tipos de açúcares, como frutose, maltose, galactose, etc. Ainda de acordo com WEINBUCH et al. (2015), apenas diafiltração foi capaz de remover com sucesso as impurezas. Nos resultados encontrados por WEINBUCH et al. (2015) é possível verificar que as impurezas analisadas formam um padrão de picos muito semelhante ao encontrado para o extrato de células não viáveis puro. Sendo assim, estabeleceu-se que quaisquer picos encontrados na mesma região serão desconsiderados pois não são relevantes para o objetivo desse trabalho.

A presença de picos com diâmetros a partir de 100nm também será desconsiderada, pois podem se tratar de complexos de cobre insolúveis e aglomerados de impurezas, como foi verificado para o extrato sem contato com cobre. Além disso, pode ter havido formação de partículas de diâmetros maiores que 100nm ou aglomerados de partículas menores. Independentemente de qual fator é responsável, esses picos foram considerados irrelevantes, pois estão fora da faixa definida como correspondente a nanopartículas nesse trabalho, que é abaixo de 100nm. Quaisquer picos identificados com diâmetro superior a 1000nm podem ser correspondentes a partículas de poeira ou aglomerados muito grandes e, portanto, também não serão considerados como informação relevante.

Para as condições descritas para o ensaio A, o resultado da análise de DLS está apresentado na Figura 31.

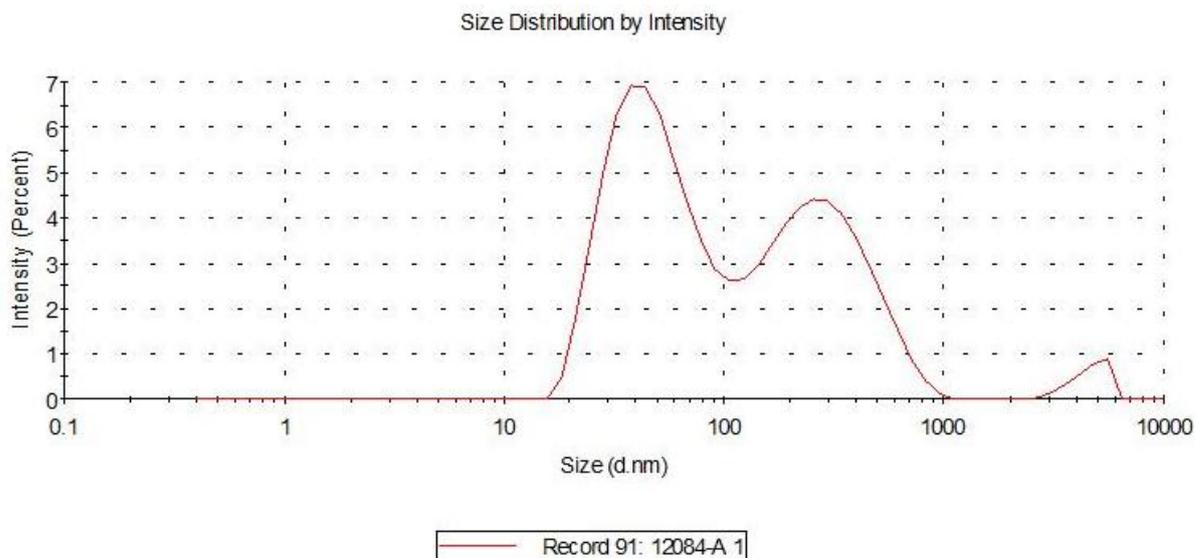


Figura 31 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii*. Condições de reação: pH = 3,6 e temperatura = 32,9°C (Ensaio A).

Como pode ser visto na Figura 31, nas condições do ensaio A houve formação de partículas com diâmetro médio de 50nm, aproximadamente. Foi possível identificar também a presença de um pico na região correspondente às impurezas presentes no extrato de células não viáveis puro.

Com o aumento da temperatura, verificou-se que a distribuição dos diâmetros das partículas formadas se tornou mais larga, apresentando um pico próximo de 15nm e outro, mais bem definido e intenso, próximo de 65nm, como pode ser visto na Figura 32.

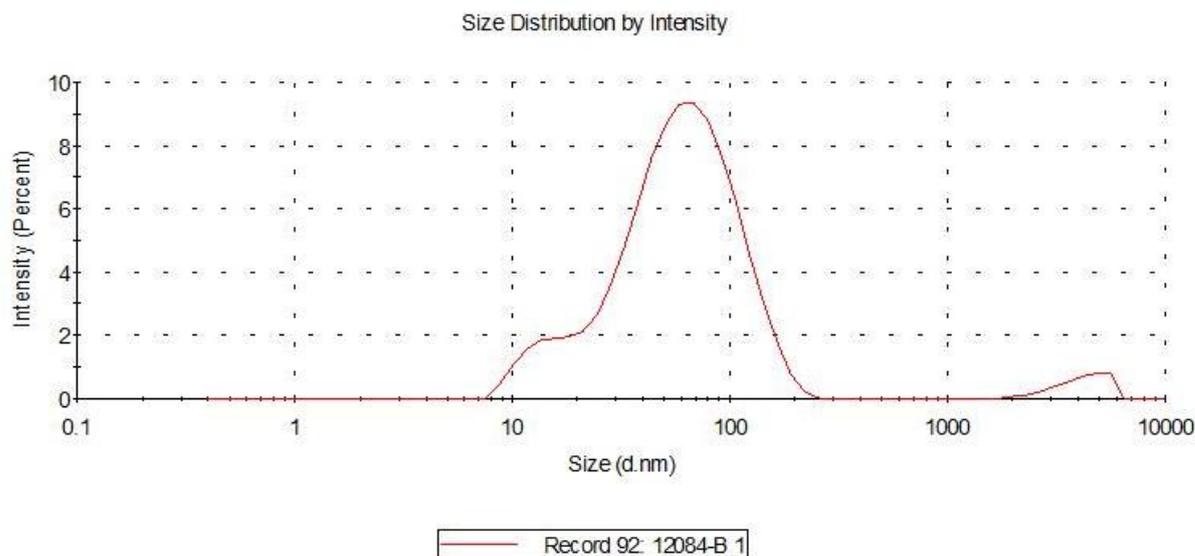


Figura 32 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii*. Condições de reação: pH = 3,6 e temperatura = 47,1°C (Ensaio B).

Para o ensaio B, correspondente à Figura 32, não foi verificada a presença dos picos correspondentes às impurezas. É possível que em certas condições de pH e temperatura as impurezas identificadas formem aglomerados de diâmetros maiores e precipitem durante a centrifugação que antecede as análises de DLS. Para as condições do Ensaio B não houve formação de aglomerados de partículas menores que 1 μ m.

A condição do ensaio C, ilustrada pela Figura 33, produziu partículas com duas distribuições bem definidas. A primeira, com pico próximo de 5nm e a segunda com pico próximo a 50nm. Não foram verificados picos maiores que 100nm para essa condição.

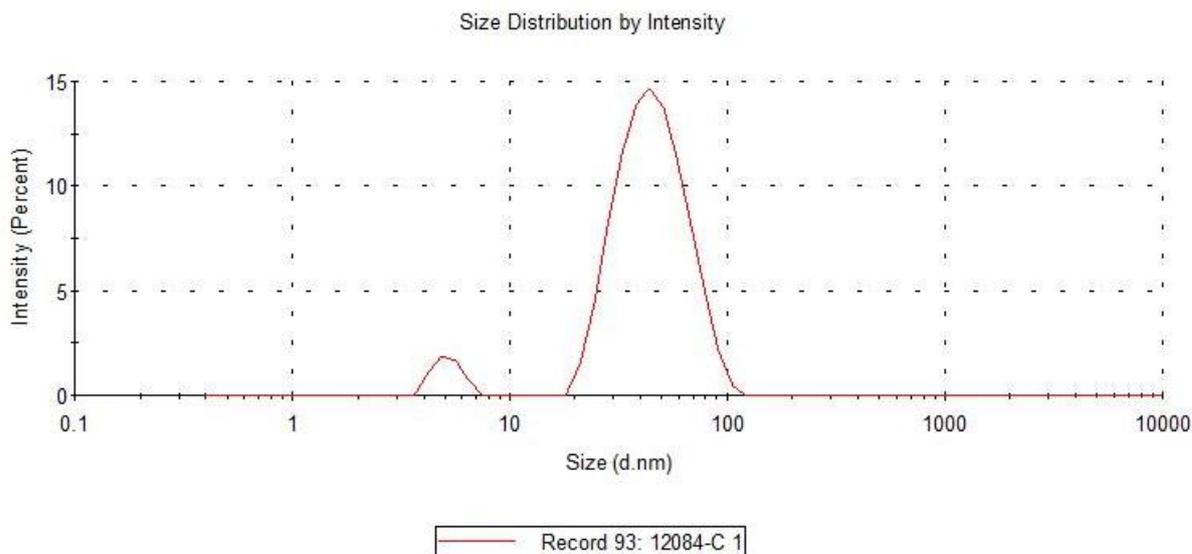


Figura 33 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii*. Condições de reação: pH = 6,4 e temperatura = 32,9°C (Ensaio C).

Como pode ser observado na Figura 34, correspondente ao ensaio D, o aumento de temperatura em relação à condição do ensaio C gerou uma distribuição semelhante à Figura 32, com um pico menor próximo a 15nm e outro mais bem definido próximo a 50nm. Novamente, como no ensaio A, correspondente à Figura 31, pode-se observar a presença de picos maiores que 100nm.

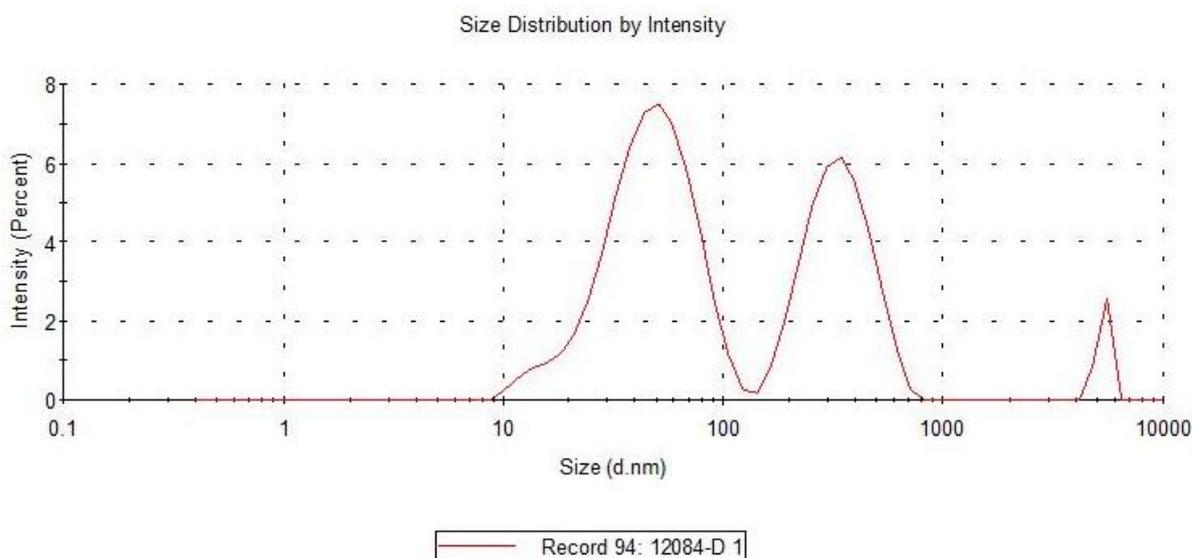


Figura 34 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii*. Condições de reação: pH = 6,4 e temperatura = 47,1°C (Ensaio D).

A condição do ensaio E, ilustrada pela Figura 35, gerou uma distribuição mais estreita, com ponto máximo próximo a 40nm. Verifica-se um pico de grande

intensidade na região próxima a 250nm, o que indica que houve formação de aglomerados ou partículas grandes para essa condição.

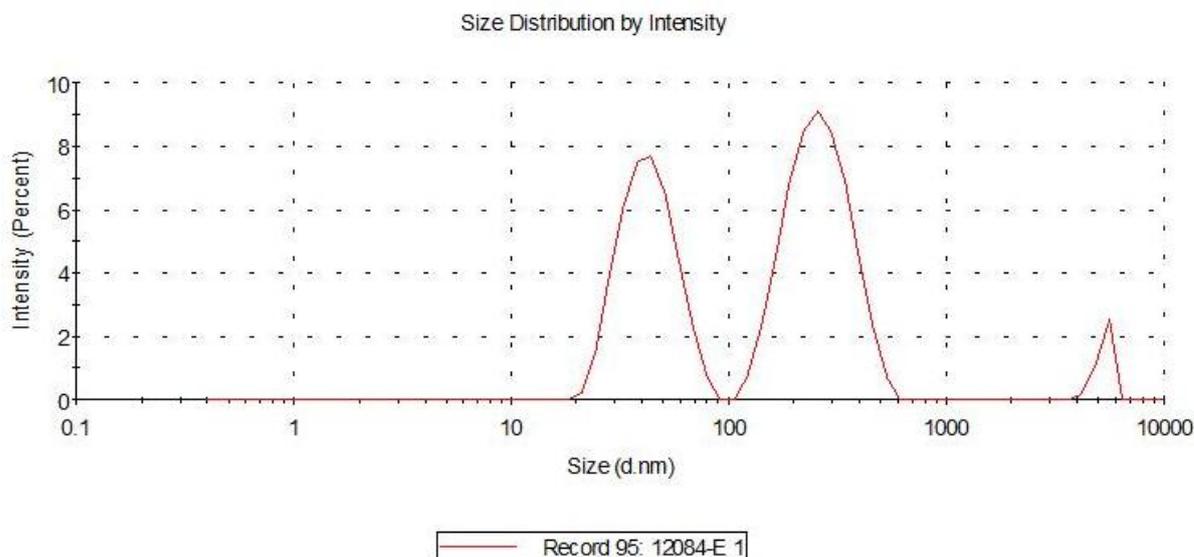


Figura 35 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii*. Condições de reação: pH = 3,0 e temperatura = 40,0°C (Ensaio E).

Os resultados do ensaio F, apresentados pela Figura 36, foram similares ao encontrados nas condições da Figura 35. A distribuição de partículas produzidas é estreita, ficando próxima a 50nm e também há um pico por volta de 250nm. Porém, ao contrário do que foi verificado na Figura 35 para o ensaio E, a intensidade do pico correspondente às nanopartículas é maior que para as partículas maiores que 100nm. Considerando que o pH do ensaio E, é muito inferior ao ensaio F, verifica-se que para a temperatura de 40°C, o aumento do pH gerou um aumento na estabilidade das partículas menores pois houve uma diminuição na quantidade de sinal proveniente de partículas ou aglomerados maiores que 100nm.

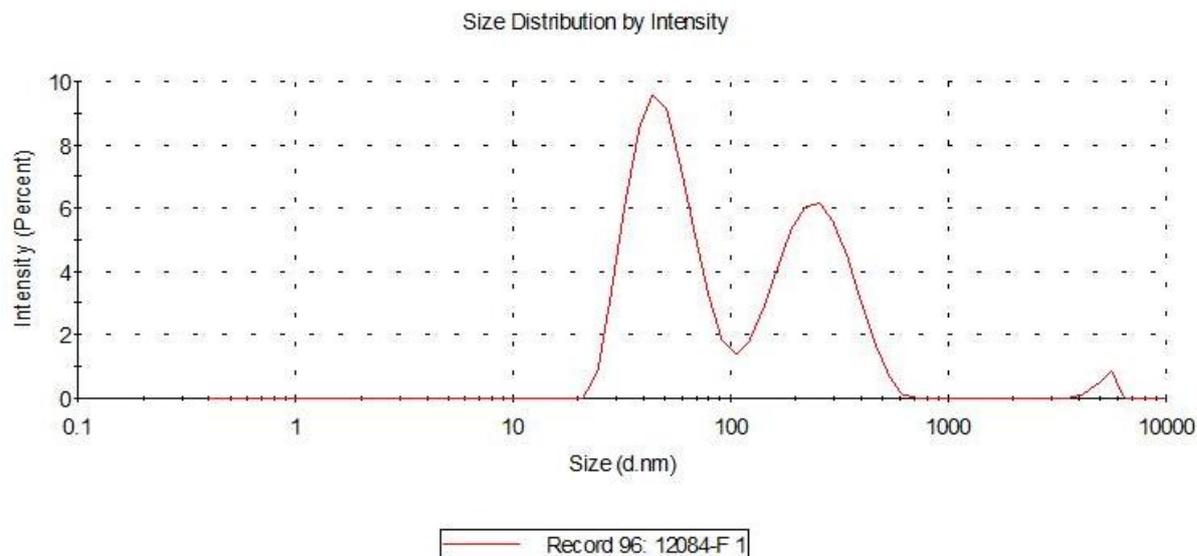


Figura 36 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii*. Condições de reação: pH = 7,0 e temperatura = 40,0°C (Ensaio F).

Nas condições do ensaio G, cujos resultados estão na Figura 37, observa-se que não houve formação de partículas com diâmetros maiores que 100nm, descartando a presença de impurezas e de aglomerados intermediários. A distribuição de nanopartículas está ligeiramente mais larga que a verificada para o ensaio F, com ponto máximo próximo a 50nm.

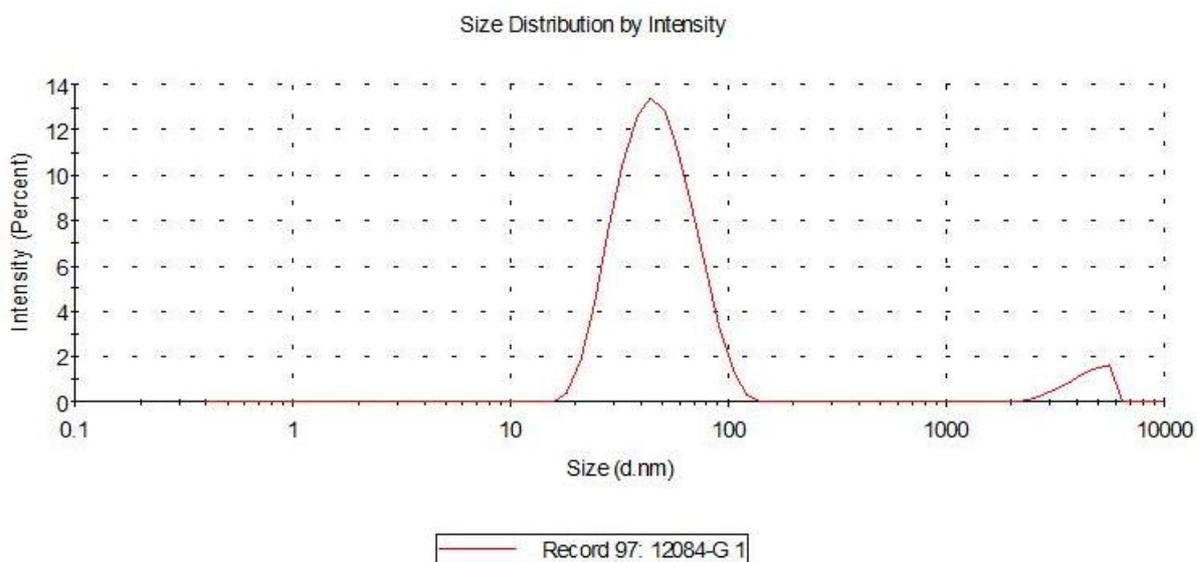


Figura 37 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii*. Condições de reação: pH = 5,0 e temperatura = 30,0°C (Ensaio G).

Os resultados indicados pelas Figuras 38 a 41 sugerem que as condições correspondentes geraram partículas bastante estáveis, pois não foram identificados picos maiores que 100nm e tampouco aglomerados superiores a 1.000nm.

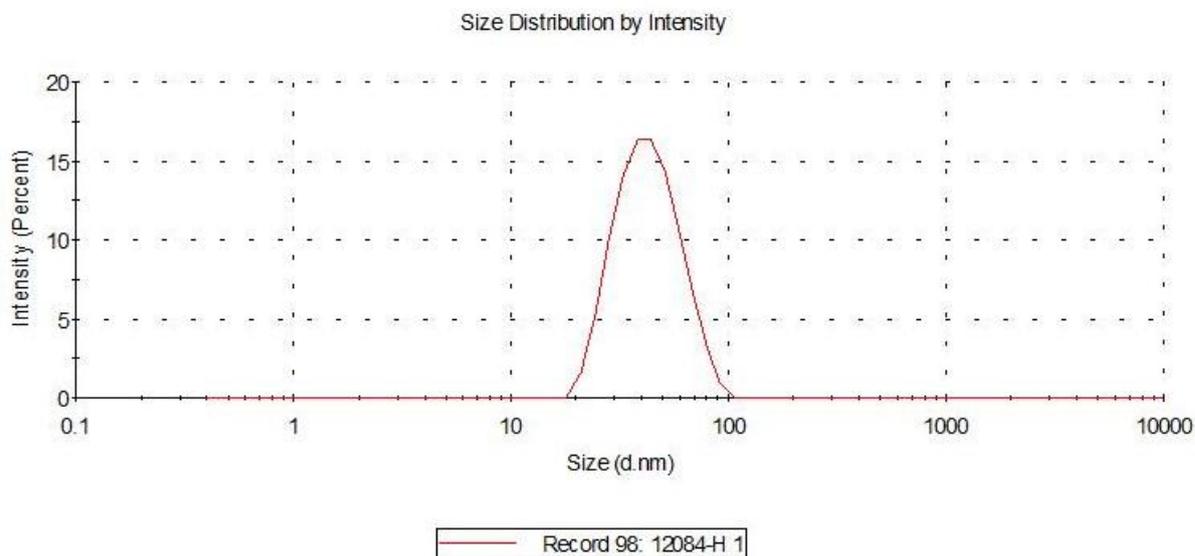


Figura 38 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii*. Condições de reação: pH = 5,0 e temperatura = 50,0°C (Ensaio H).

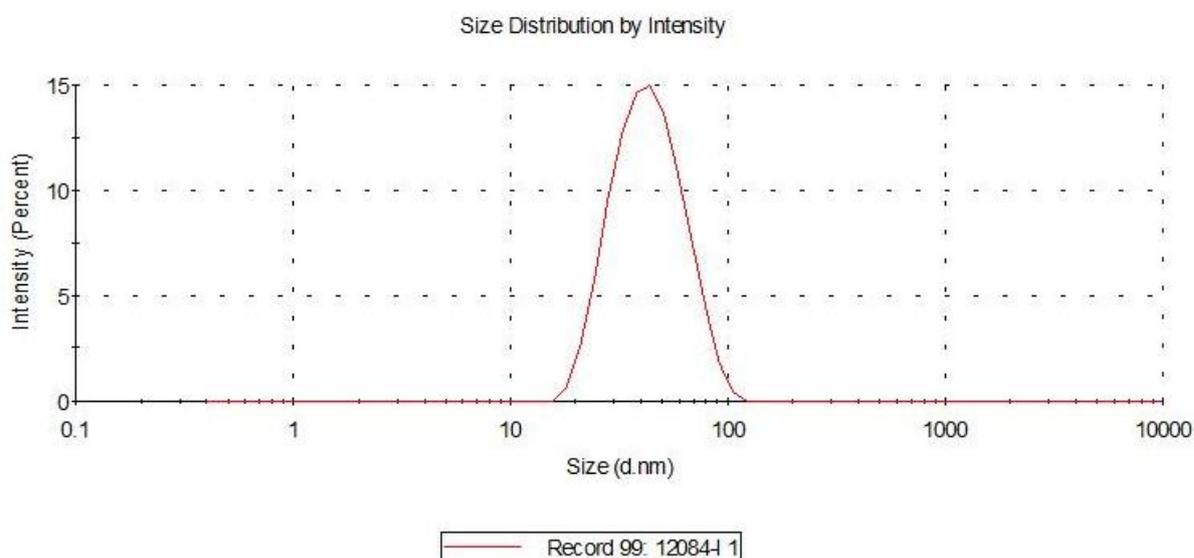


Figura 39 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii*. Condições de reação: pH = 5,0 e temperatura = 40,0°C, primeiro ensaio (Ensaio I).

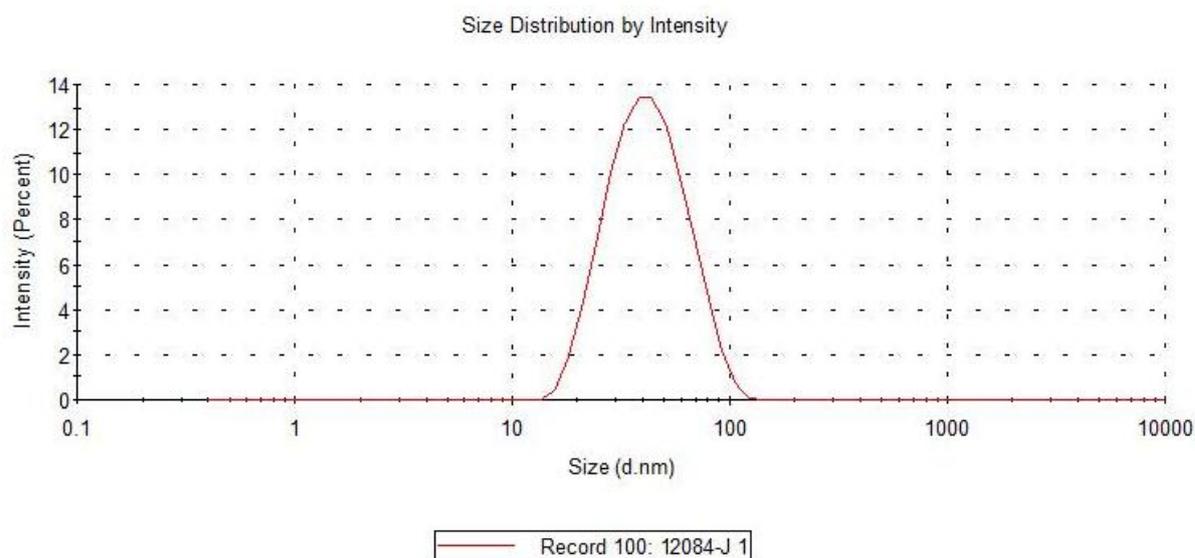


Figura 40 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii*. Condições de reação: pH = 5,0 e temperatura = 40,0°C, segundo ensaio (Ensaio J).

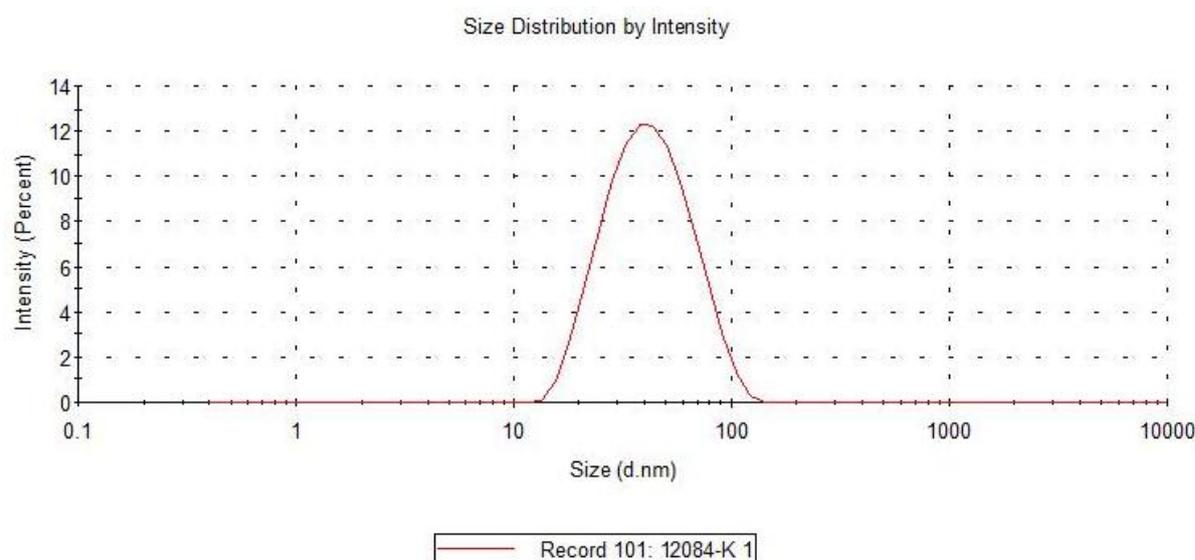


Figura 41 - Resultado de análise de DLS de nanopartículas de cobre formadas através de extrato de centrifugação de células não viáveis de *H. lixii*. Condições de reação: pH = 5,0 e temperatura = 40,0°C, terceiro ensaio (Ensaio K).

Observa-se que todos os ensaios conduzidos a pH = 5,0 não apresentaram aglomerados ou partículas maiores que 100nm nem os picos correspondentes às impurezas verificados para o extrato sem contato com íons cobre (II), sugerindo que para esse valor de pH, as partículas formadas são mais homogêneas. Eventuais aglomerados ou partículas maiores que possam ter se formado nesses ensaios foram removidos através da centrifugação realizada antes das análises.

Com relação à temperatura, não foi possível estabelecer uma relação clara quanto à homogeneidade das partículas formadas para valores mais altos ou mais

baixos com as distribuições apresentadas. As condições que apresentaram partículas com diâmetros mais dispersos foram as correspondentes ao ensaio E, apresentado na Figura 35, e apenas para esse ensaio a intensidade do pico correspondente aos aglomerados ou partículas maiores que 100nm foi maior que a intensidade do pico correspondente às nanopartículas formadas.

Na Tabela 8 estão os dados obtidos de diâmetro médio para cada um dos ensaios realizados e seus respectivos desvios padrão.

Tabela 8 - Diâmetros médios, desvios padrão e índice de polidispersividade (PDI) correspondentes aos ensaios que compõem o delineamento composto central rotacional.

pH	Temperatura (°C)	Letra Correspondente	Diâmetro médio (nm)	Desvio Padrão (nm)	PDI*
3,6	32,9	A	49,96	22,17	0,511
3,6	47,1	B	64,85	37,71	0,421
6,4	32,9	C	47,04 e 5,175	16,54 e 0,728	0,266
6,4	47,1	D	49,26	22,00	0,490
3,0	40,0	E	43,52	12,40	0,702
7,0	40,0	F	50,92	17,78	0,496
5,0	30,0	G	48,84	18,85	0,333
5,0	50,0	H	44,25	14,45	0,260
5,0	40,0	I	45,15	16,39	0,252
5,0	40,0	J	44,51	17,89	0,251
5,0	40,0	K	44,89	19,73	0,246

(*índice de polidispersividade)

Os dados de diâmetro e desvios padrão apresentados na Tabela 8 correspondem aos dados dos principais picos identificados através da distribuição individual de tamanhos, e não ao valor de diâmetro médio global (Z-average) fornecido pelo equipamento. Devido à alta polidispersividade de algumas amostras, o valor de diâmetro médio global não é confiável, pois é gerado a partir de análise cumulativa e fornece uma média ponderada da intensidade. Esse valor é representativo apenas para amostras com baixo índice de polidispersividade ($PDI < 0,3$). Além disso, o método de cálculo do diâmetro médio global pode tender a supervalorizar a contribuição de diâmetros menores, gerando uma falsa diminuição da média.

Através dos desvios padrão observados na Tabela 8, também é possível identificar com maior precisão quais condições de síntese forneceram distribuições mais homogêneas. Verifica-se que dentre os ensaios realizados, as condições

correspondentes aos ensaios A, B e D foram as que geraram diâmetros mais dispersos. Porém é possível observar que os valores dos desvios padrão para esses ensaios refletem os resultados obtidos, pois em todos eles houve formação de picos com caudas/'ombros' ou picos menores adjacentes que não foram considerados separadamente pelo equipamento.

Para o ensaio correspondente à letra C houve formação de dois picos distintos e bem definidos, o que sugere a presença de uma distribuição bimodal. Sendo assim, os valores de cada um dos picos identificados foram apresentados separadamente na Tabela 8.

Os diâmetros encontrados através das análises de DLS são consideravelmente maiores do que os diâmetros observados através das análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para as amostras de extrato de centrifugação de células não viáveis, que se encontram por volta de 15nm, em média. Isso ocorre pois a análise de DLS é uma medida indireta de diâmetro, e, além disso, considera o diâmetro hidrodinâmico das partículas. Sendo assim, as moléculas que são responsáveis pela estabilização das nanopartículas contribuem para o aumento dos diâmetros observados. Foram realizadas análises de microscopia eletrônica para verificar o tamanho real das partículas formadas em cada ensaio, porém os resultados não foram conclusivos devido à má preparação de amostras. Sendo assim, esses resultados não foram considerados válidos.

A discrepância entre os resultados das análises de DLS e de microscopia eletrônica não invalida a verificação da influência de pH e temperatura no diâmetro das partículas, pois considerou-se que, partindo do mesmo extrato de centrifugação de células não viáveis, os agentes redutores e os ligantes envolvidos na síntese e estabilização das partículas sejam os mesmos para todos os ensaios. Sendo assim, quaisquer diferenças observadas entre os diâmetros foram causadas pela variação do tamanho das nanopartículas em si.

A Tabela 9 apresenta o planejamento com os ensaios realizados, os valores de pH e temperatura codificados, os valores originais e os resultados de diâmetro médio obtidos através das análises de DLS.

Tabela 9 - Matriz do delineamento de experimentos. Fatores pH e temperatura com valores codificados e não codificados e respostas de diâmetro médio.

pH	Temperatura (°C)	pH codificado	Temperatura codificada	Letra Correspondente	Diâmetro médio (nm)
3,6	32,9	-1	-1	A	49,96
3,6	47,1	-1	1	B	64,85
6,4	32,9	1	-1	C	47,04
6,4	47,1	1	1	D	49,26
3,0	40,0	-1,41	0	E	43,52
7,0	40,0	1,41	0	F	50,92
5,0	30,0	0	-1,41	G	48,84
5,0	50,0	0	1,41	H	44,25
5,0	40,0	0	0	I	45,15
5,0	40,0	0	0	J	44,51
5,0	40,0	0	0	K	44,89

A partir dos valores apresentados na Tabela 9, foi elaborado um modelo quadrático completo utilizando o software Minitab®. Para o ensaio C foi considerado apenas o pico referente ao diâmetro próximo a 47nm, que está mais condizente do que foi observado para os demais ensaios. Apenas para esse ensaio foi observado um pico bem definido abaixo de 10nm, sendo assim, para efeito de cálculo de ajuste, esse pico será desconsiderado. O modelo gerado corresponde a Equação 4.

Equação 4 – Equação de regressão em unidades não codificadas gerada a partir dos dados de diâmetro médio das nanopartículas de cobre.

$$D_{\text{médio}} = 85 - 1,94.T - 1,3.pH + 0,0464.T^2 + 1,33.pH^2 + 0,317.T.pH$$

Onde $D_{\text{médio}}$ é o diâmetro médio das partículas formadas em nm e T é a temperatura em °C.

A Tabela 10 apresenta a análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos.

Tabela 10 - Análise de variância referente ao modelo quadrático completo obtido através dos dados de diâmetro médio das nanopartículas formadas em função do pH e da temperatura.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma de quadrados (Aj.)	Quadrados Médios (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	116,882	23,3765	0,48	0,781
Linear	2	22,185	11,0923	0,23	0,805
pH	1	8,09	8,0899	0,17	0,701
Temperatura	1	14,095	14,0948	0,29	0,614
Quadrado	2	54,566	27,2828	0,56	0,604
pH*pH	1	39,919	39,9188	0,82	0,407
Temperatura*Temperatura	1	30,427	30,4275	0,62	0,466
Interação com 2 Fatores	1	40,132	40,1322	0,82	0,406
pH*Temperatura	1	40,132	40,1322	0,82	0,406
Erro	5	244,282	48,8563		
Falta de ajuste	3	244,075	81,3582	785,31	0,001
Erro puro	2	0,207	0,1036	*	*
Total	10	361,164			

O valor de α considerado para analisar a significância dos efeitos foi de 0,05. Sendo assim, através dos dados da Tabela 10, observa-se que não há termos significativos e o valor P para o modelo em si também é muito elevado, indicando que o modelo calculado não se ajusta aos dados observados. Além disso, também é possível observar que o valor P para a falta de ajuste é significativa. Isso significa que o modelo não é capaz de explicar a presença de resíduos altos. A Figura 42 apresenta os gráficos de resíduo do modelo.

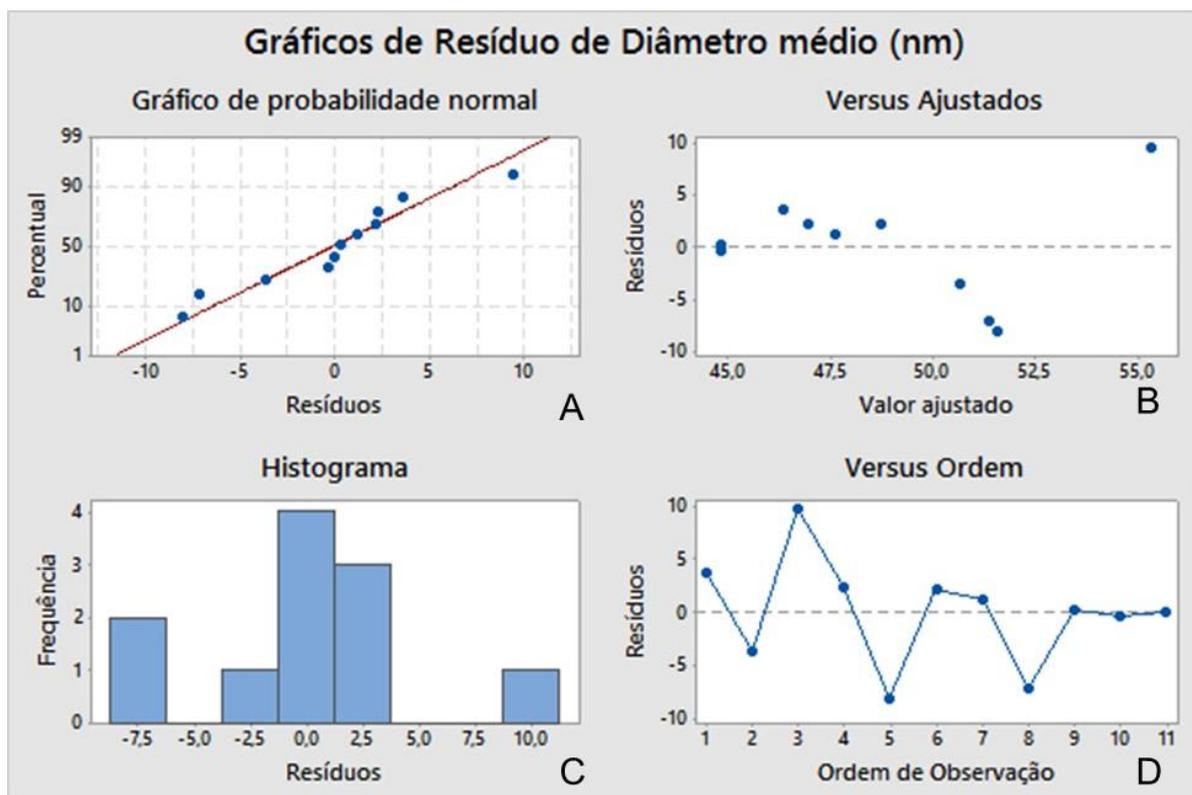


Figura 42 - Gráficos de Resíduos em relação ao diâmetro médio das partículas formadas calculados através do modelo quadrático completo. (A) Gráfico de probabilidade normal. (B) Resíduos em função dos valores ajustados. (C) Histograma de resíduos em função da frequência. (D) Resíduos em função da ordem da observação.

Através da Figura 42 verifica-se que o modelo quadrático completo tem distribuição de resíduos normal. Não se verifica padrões nos gráficos de resíduos em função dos valores ajustados e da ordem de observação, indicando que a variância é constante e que não há correlação entre erros próximos.

A Tabela 11 apresenta os valores de R^2 e de S obtidos para o modelo quadrático completo.

Tabela 11 - Sumário do modelo quadrático completo referente à regressão.

S	R^2	$R^2(\text{aj})$	$R^2(\text{pred})$
6,98973	32,36%	0,00%	0,00%

Através dos valores apresentados pela Tabela 11, verifica-se que não houve ajuste dos dados. O valor de R^2 para a regressão está muito abaixo da faixa aceitável, mesmo considerando que o sistema analisado é bastante complexo. Conclui-se que não foi possível verificar uma tendência de diâmetro médio das

partículas formadas em função do pH e da temperatura com as faixas escolhidas e através do planejamento realizado.

Os resultados encontrados sugerem que o pH e a temperatura não são determinantes para o tamanho das partículas. É possível que esses fatores sejam responsáveis por variações relevantes em termos de rendimento e de quantidade de partículas formadas. No entanto não foi possível avaliar essa influência com as análises realizadas. Conclui-se que apenas os compostos presentes nas células ou produzidos pelo fungo *Hypocrea lixii* são responsáveis pelo tamanho das partículas sintetizadas.

No que diz respeito a estabilidade das soluções após a reação de síntese, não foram observadas mudanças no aspecto nem a presença de precipitados que indiquem oxidação ou aglomeração das partículas.

6 Conclusões

- O cultivo do fungo *Hypocrea lixii* apresenta melhores características de crescimento e maior concentração celular quando utilizado um meio de cultura com maior concentração de nutrientes. Os cultivos iniciais com inóculo de células congeladas se mostraram muito suscetíveis às variações de área superficial e concentração celular, que tem consequências negativas no desenvolvimento desse trabalho. Sendo assim, padronizou-se o cultivo a partir de inóculo de suspensão de esporos congelada e meio de cultivo contendo extrato de malte.
- Através dos experimentos de adsorção de íons cobre (II), verificou-se que a biomassa atingiu um potencial de adsorção muito próximo ao verificado para o mesmo fungo na literatura. No entanto, observa-se que variações entre cultivos são responsáveis por alterações relevantes no potencial de adsorção. Além disso, entre repetições também foram verificadas diferenças significativas. O uso de biomassa de fungo como adsorvente pode estar sujeito a essas variações devido à complexidade do fenômeno, da biomassa em si e à presença de agentes orgânicos que possam interagir com os íons (complexação, troca iônica, etc.) sem que sejam adsorvidos.
- Os resultados obtidos com a análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das biomassas viável e não viável mostraram formação de nanopartículas. Para a biomassa não viável, verificou-se que as partículas se formaram dentro das células e através da parede celular, enquanto que para a biomassa viável existem partículas apenas no exterior da célula. Essa diferença pode ser atribuída ao processo de autoclavagem realizado para obtenção da biomassa não viável. Esse processo pode causar uma porosidade maior da parede celular, além de inativar quaisquer mecanismos metabólicos de defesa das células contra o efeito oxidativo dos íons cobre (II).

- A utilização de extratos de suspensão de biomassa mostrou-se promissora para a síntese de nanopartículas, assim como o extrato proveniente da centrifugação de células não viáveis. As partículas encontradas através das imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para o extrato de suspensão de biomassa viável tem diâmetros entre 3 e 20nm e para o extrato de suspensão de biomassa não viável entre 4 e 15nm. Em média, os tamanhos encontrados são bastante próximos para os dois extratos, indicando que pode haver semelhanças no mecanismo de síntese. A caracterização realizada através de EDS para as partículas formadas no extrato proveniente de centrifugação de células não viáveis mostra que a reação de síntese promovida entre esse extrato e os íons cobre (II) geram nanopartículas de cobre metálico de diâmetros entre 5 e 20nm, que também estão bastante próximos dos valores encontrados para os dois extratos de suspensão de biomassa
- Ao contrário do que está reportado na literatura, não foram encontrados indícios de proteínas e outras macromoléculas na composição dos extratos de suspensão. A análise de cromatografia gasosa desses extratos indica que, em termos gerais, as moléculas que interagem com os íons cobre (II) são aminoácidos, açúcares e ácidos graxos. É possível que essas moléculas sejam as responsáveis pela formação das partículas observadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Através da análise de espectrometria de massas (MALDI-TOF) para o extrato proveniente de centrifugação de células não viáveis, verificou-se a presença de macromoléculas com peso entre 4kDa e 20kDa, compatível com a faixa de relação massa/carga de proteínas. Também foi realizada análise de cromatografia gasosa para o extrato proveniente de centrifugação de células não viáveis e os resultados corroboraram o que foi encontrado para as amostras de extrato de suspensão de biomassa viável e não viável, indicando que os açúcares presentes nessas amostras podem interagir com os íons cobre (II). No entanto, não foram encontrados aminoácidos nem ácidos graxos nas amostras de extrato proveniente de centrifugação de células não viáveis.

- Tendo em vista os resultados obtidos através das diversas análises realizadas, considerou-se que o extrato proveniente de centrifugação de células era a escolha mais adequada para a realização dos ensaios correspondentes ao delineamento central rotacional completo proposto para investigar a influência do pH e da temperatura no diâmetro das nanopartículas formadas.
- As partículas formadas em cada condição de pH e temperatura foram avaliadas através de análise de DLS (espalhamento de luz dinâmico). Os diâmetros obtidos através dessa análise sugerem formação de partículas significativamente maiores do que foi observado através da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Isso pode ser resultado dos compostos ligados às partículas (estabilizantes), que não são vistos através da microscopia por falta de contraste, já que a medida fornecida pelo DLS considera o diâmetro hidrodinâmico.
- Os resultados da análise de DLS indicaram que não há evidências de que o pH e a temperatura tenham influência significativa no diâmetro das partículas formadas. No entanto, foi possível perceber diferenças entre as distribuições obtidas para cada um dos ensaios realizados. Os ensaios realizados em pH 5,0 apresentaram distribuições com baixo índice de polidispersividade, indicando que para esse pH é possível obter partículas mais homogêneas. Todos os outros ensaios apresentaram distribuições diferentes, mas com valores de diâmetro médio semelhantes. Alguns ensaios apresentaram distribuições bimodais. Essas características podem ter contribuído para a falta de ajuste do modelo estatístico apresentado. É possível que os parâmetros pH e temperatura tenha influência em outros aspectos das partículas formadas, como estabilidade e quantidade, que não foram avaliados nesse trabalho.
- É necessário investigar alternativas de separação entre a biomassa, os extratos e as partículas formadas para que outras análises de caracterização possam ser realizadas. A presença da matéria orgânica e dos íons cobre (II) não reagidos podem ter dificultado uma caracterização mais completa. Além disso, para algumas análises, como a difração de raios-X, será necessária uma quantidade maior de material.

- O presente trabalho confirmou a capacidade de síntese de nanopartículas de cobre do fungo *Hypocrea lixii* e mostrou métodos promissores que podem ser desenvolvidos no futuro em um processo industrial. O uso de extrato de células pode viabilizar um estudo mais profundo dos mecanismos de reação envolvidos no uso de fungos para síntese de nanopartículas. Além disso, as análises e processos de separação, que são atualmente um dos maiores entraves para o uso comercial da biossíntese de nanopartículas, são facilitados.

7 Sugestões para continuidade do trabalho

Tendo em vista as conclusões e os resultados obtidos, apresentam-se as seguintes sugestões:

- É necessário avaliar métodos de separação para uma melhor caracterização das partículas obtidas. Para as biomassas, sugere-se avaliar os métodos de digestão com ácido, sonicação seguida de centrifugação e ultracentrifugação seguida de lavagem. Para os extratos sugere-se centrifugação seguida de lavagem ou diálise. Desse modo será possível realizar análises como a difração de raios-X (DRX) sem a interferência da matéria orgânica. Além disso, através da separação eficaz das partículas será possível verificar o rendimento da reação de síntese.
- Sugere-se investigar o mecanismo de reação de síntese e identificar os possíveis agentes redutores presentes nos extratos. Isso pode ser feito através da aplicação de um método de separação para os componentes dos extratos, como a cromatografia líquida, e a realização da reação de síntese individualmente. Assim, será possível verificar quais frações apresentam formação de nanopartículas. A identificação desses compostos pode ser realizada através de espectrometria de massas (MALDI-TOF) e/ou espectroscopia de infravermelho (FT-IR).
- Para aumentar a confiabilidade das análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET), sugere-se estudar formas de separação e lavagem eficazes para as partículas formadas. Considera-se que a presença da matéria orgânica, compostos biológicos e dos íons cobre (II) não reagidos prejudiquem a preparação das amostras e, conseqüentemente, a obtenção das imagens. Além disso, é necessário estabelecer um protocolo de preparação de amostras líquidas para padronizar parâmetros como o volume, a concentração ideal, a necessidade ou não de centrifugação, etc.

- Sugere-se realizar novo delineamento de experimentos para investigação da influência dos parâmetros pH e temperatura na quantidade de partículas formadas. Essa etapa depende do sucesso da determinação de um método eficaz de separação das nanopartículas. Além disso, pode ser verificada a influência de outros parâmetros como agitação, concentração da solução de íons cobre (II) utilizada, tempo de cultivo das hifas, etc.
- Uma vez definidos os parâmetros mais relevantes na síntese das partículas, sugere-se realizar um estudo de aumento de escala em relação ao que foi realizado no presente trabalho, utilizando-se num primeiro momento reatores controlados ou reatores de bancada.
- Tendo em mente as diversas aplicações para as nanopartículas de cobre, sugere-se avaliar a eficácia das partículas formadas utilizando-se o fungo *Hypocrea lixii* em termos de estabilidade, necessidade de adaptação para futura comercialização, resistência a oxidação, etc.

REFERÊNCIAS

- AKAR, T.; TUNALI, S. Biosorption performance of *Botrytis cinerea* fungal by-products for removal of Cd(II) and Cu(II) ions from aqueous solutions. **Minerals Engineering**, v. 18, p. 1099–1109, 2005.
- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 997–1026, 2005.
- ANAND, P. et al. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. **Bioresource technology**, v. 97, n. 8, p. 1018–25, maio 2006.
- ANIL KUMAR, S. et al. Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 3, p. 439–445, 2007.
- ARIGA, K. et al. Nanoarchitectonics for Mesoporous Materials. **The Chemical Society of Japan**, v. 85, n. 1, p. 1–32, 2012.
- ATHAR, T. Metal Oxide Nanopowder. In: **Emerging Nanotechnologies for Manufacturing**. [s.l.] William Andrew, 2009. p. 325–385.
- BACO-CARLES, V.; DATAS, L.; TAILHADES, P. Copper Nanoparticles Prepared from Oxalic Precursors. **ISRN Nanotechnology**, v. 2011, p. 1–7, 2011.
- BALAJI, D. S. et al. Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *Cladosporium cladosporioides* fungus. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 68, n. 1, p. 88–92, 1 jan. 2009.
- BASAVARAJA, S. et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. **Materials Research Bulletin**, v. 43, n. 5, p. 1164–1170, maio 2008a.
- BASAVARAJA, S. et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. **Materials Research Bulletin**, v. 43, n. 5, p. 1164–1170, maio 2008b.
- BHAINSA, K. C.; D'SOUZA, S. F. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 47, n. 2, p. 160–4, 1 fev. 2006a.
- BHAINSA, K. C.; D'SOUZA, S. F. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 47, n. 2, p. 160–4, 1 fev. 2006b.
- BHAINSA, K. C.; D'SOUZA, S. F. Removal of copper ions by the filamentous fungus, *Rhizopus oryzae* from aqueous solution. **Bioresource technology**, v. 99, n. 9, p. 3829–35, jun. 2008.
- BURATTO, A. P.; COSTA, R. D.; FERREIRA, E. DA S. Aplicação de biomassa fúngica de *Pleurotus ostreatus* em processo de biossorção de íons cobre (II).

Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 17, n. 4, p. 413–420, 2012.

BUSNAINA, A.; MEHTA, M. Introduction to Nanoscale Manufacturing and the State Industry in the United States. In: **Nanomanufacturing Handbook**. [s.l.: s.n.].

CAO, G. Introduction. In: **Nanostructures and Nanomaterials**. [s.l.] World Scientific Publishing Co., 2004. p. 1–14.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. Hypocrea lixii, the teleomorph of Trichoderma harzianum. **Mycological Progress**, v. 1, n. August, p. 283–286, 2002.

CHEN, D.; YE, J. Hierarchical WO₃ hollow shells: Dendrite, sphere, dumbbell, and their photocatalytic properties. **Advanced Functional Materials**, v. 18, p. 1922–1928, 2008.

CROOKS, R. M. et al. Synthesis, Characterization, and Applications of Dendrimer-Encapsulated Metal and Semiconductor Nanoparticles. In: FOSS JR., C. A.; FELDHEIM, D. L. (Eds.). . **Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications**. [s.l.] CRC Press, 2001.

CUEVAS, R. et al. Extracellular Biosynthesis of Copper and Copper Oxide Nanoparticles by Stereum hirsutum , a Native White-Rot Fungus from Chilean Forests. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, 2015.

DASTJERDI, R.; MONTAZER, M. A review on the application of inorganic nanostructured materials in the modification of textiles : Focus on anti-microbial properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 5–18, 2010.

DHILLON, G. S. et al. Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, n. December 2010, p. 49–73, 2012a.

DHILLON, G. S. et al. Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 49–73, 2012b.

DURSUN, A. Y. et al. Bioaccumulation of copper (II), lead (II) and chromium (VI) by growing Aspergillus niger. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1647–1651, 2003.

EASTOE, J.; HOLLAMBY, M. J.; HUDSON, L. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. **Advances in colloid and interface science**, v. 128-130, n. 2006, p. 5–15, 21 dez. 2006.

EL-ENSHASY, H. A. Filamentous Fungal Cultures - Process Characteristics, Products, and Applications. In: YANG, S.-T. (Ed.). . **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. [s.l.: s.n.]. p. 225–261.

EVANS, P.; MATSUNAGA, H.; KIGUCHI, M. Large-scale Application of Nanotechnology for Wood Protection. **Nature Nanotechnology**, v. 3, p. 577, 2008.

FELDHEIM, D. L.; FOSS JR., C. A. Overview. In: **Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications**. [s.l.] Marcel Dekker, Inc., 2002. p. 1–15.

FORESIGHT INSTITUTE. **US Foresight Institute**. Disponível em: <<http://www.foresight.org/nano/index.html>>. Acesso em: 7 mar. 2016.

FOSS JR., C. A. Electrochemical Template Synthesis of Nanoscopic Metal Particles. In: FOSS, C. A. .; FELDHEIM, D. L. . (Eds.). . **Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications**. [s.l.] CRC Press, 2001. p. 119–139.

GADD, G. M. Interactions of fungi with toxic metals. n. 47, p. 25–60, 1993.

GAJBHIYE, M. et al. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 5, n. 4, p. 382–386, 2009.

GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier- Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 59, n. 1, p. 24–34, 1 set. 2007.

GERICKE, M.; PINCHES, A. Biological synthesis of metal nanoparticles. **Hydrometallurgy**, v. 83, p. 132–140, 2006a.

GERICKE, M.; PINCHES, A. Biological synthesis of metal nanoparticles. **Hydrometallurgy**, v. 83, n. 1-4, p. 132–140, 2006b.

GORER, S. et al. Electrodeposition of Metal Nanoparticles on Graphite and Silicon. In: FELDHEIM, D. L.; FOSS JR., C. A. (Eds.). . **Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications**. [s.l.] Marcel Dekker, Inc., 2001. p. 237–259.

GOVINDARAJU, K. et al. Extracellular Synthesis of Silver Nanoparticles by a Marine Alga, *Sargassum Wightii* Grevilli and Their Antibacterial Effects. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 9, p. 5497–5501(5), 2009.

GURUNATHAN, S. et al. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 74, n. 1, p. 328–35, 1 nov. 2009.

HAYNES, C. L.; HAES, A. J.; DUYNE, R. P. VAN. Nanosphere Lithography: Synthesis and Application of Nanoparticles with Inherently Anisotropic Structures and Surface Chemistry. **MRS Proceedings**, v. 635, p. 2–7, 2000.

HONARY, S. et al. Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium citrinum* and *Penicillium waksmanii*. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 7, n. 3, p. 999–1005, 2012.

HOSSEINI, M. R. et al. Biologically synthesized copper sulfide nanoparticles: Production and characterization. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 15, n. 2, p. 222–225, abr. 2012.

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. **Studies in Mycology**, v. 63, p. 1–91, 2009.

JOSE-YACAMAN, M. et al. Maya Blue Paint: An Ancient Nanostructured Material. **Science**, v. 273, n. 5272, p. 223–225, 1996.

KALISHWARALAL, K. et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis*. **Materials Letters**, v. 62, n. 29, p. 4411–4413, 2008.

KAMAT, P. V. Meeting the clean energy demand: nanostucture architectures for solar energy conversion. **J. Phys. Chem. C**, v. 111, p. 2834–2860, 2007.

KAPOOR, A; VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption - an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review. **Bioresource Technol.**, v. 53, n. 95, p. 185–206, 1995.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D. R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 95–104, 1999.

KASZUBA, M. et al. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 5, p. 823–829, 2008.

KATHIRESAN, K. et al. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 71, n. 1, p. 133–7, 1 jun. 2009a.

KATHIRESAN, K. et al. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 71, n. 1, p. 133–7, 1 jun. 2009b.

KELLY, K. L. et al. The Optical Properties of Metal Nanoparticles_The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **Journal of Physical Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 668–677, 2003.

KOPCHINSKIY, A. et al. TrichoBLAST: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. **Mycological research**, v. 109, p. 658–660, 2005.

KORBOKANDI, H.; IRAVANI, S.; ABBASI, S. Production of nanoparticles using organisms. **Critical reviews in biotechnology**, v. 29, n. May, p. 279–306, 2009a.

KORBOKANDI, H.; IRAVANI, S.; ABBASI, S. Production of nanoparticles using organisms. **Critical reviews in biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 279–306, jan. 2009b.

KOWSHIK, M. et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. **Nanotechnology**, v. 14, p. 95–100, 2003.

LESMANA, S. O. et al. Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 19–41, 2009.

LÓPEZ ERRASQUÍN, E.; VÁZQUEZ, C. Tolerance and uptake of heavy metals by

Trichoderma atroviride isolated from sludge. **Chemosphere**, v. 50, n. 1, p. 137–43, jan. 2003.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, v. 30, p. 261–278, 2004.

MANDAL, D. et al. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 5, p. 485–92, jan. 2006.

MOHANPURIA, P.; RANA, N. K.; YADAV, S. K. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 3, p. 507–517, 3 ago. 2007.

MOHSENAZAR, M. et al. Potential of microalgae and lactobacilli in biosynthesis of silver nanoparticles. **BioImpacts**, v. 1, n. 3, p. 149–52, jan. 2011.

MUKHERJEE, P. et al. Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. **Chembiochem : a European journal of chemical biology**, v. 3, n. 5, p. 461–463, 2002.

MUKHERJEE, P. et al. Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. **Nanotechnology**, v. 19, p. 075103, 2008.

MUKHOPADHYAY, M.; NORONHA, S. B.; SURAIŠHKUMAR, G. K. Kinetic modeling for the biosorption of copper by pretreated *Aspergillus niger* biomass. **Bioresource technology**, v. 98, n. 9, p. 1781–7, jul. 2007.

MULLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 50, n. 1, p. 161–177, 2000.

NATIONAL NANOTECHNOLOGY COORDINATION OFFICE. **Nanotechnology and the Environment Report of a National Nanotechnology Initiative Workshop**. [s.l.: s.n.].

NEIKOV, O. D. Nanopowders. In: **Handbook of Non-ferrous Metal Powders**. First ed. [s.l.] Elsevier, 2009.

NORASHIKIN, M. Z.; STAPLEY, A. G. F.; SHAMA, G. Green-Synthesized Nanoparticles for Effective Bacteria Killing (Green Technology for Safe Environment). v. 83, p. 2011, 2011.

OLSSON, L.; NIELSEN, J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 517–522, 1997.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology,**

and Medicine, v. 8, n. 2, p. 147–166, 2012.

PILENI, M.-P. Self-Assemblies of Nanocrystals: Fabrication and Collective Properties. In: FOSS JR., C. A.; FELDHEIM, D. L. (Eds.). . **Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications**. [s.l.] CRC Press, 2001.

PIMPIN, A.; SRITURAVANICH, W. Reviews on micro- and nanolithography techniques and their applications. **Engineering Journal**, v. 16, n. 1, p. 37–55, 2012.

PREETHA, B.; VIRUTHAGIRI, T. Bioaccumulation of chromium(VI), copper(II) and nickel(II) ions by growing *Rhizopus arrhizus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 131–135, 2007.

RAMANATHAN, R.; BHARGAVA, S. K.; BANSAL, V. **Biological Synthesis of Copper/Copper Oxide Nanoparticles**Melbourne, AU, 2010.

RAMSDEN, J. **Essentials of Nanotechnology**. [s.l: s.n.].

RAMSDEN, J. Miscellaneous Applications. In: **Applied Nanotechnology: The Conversion of Research Results to Products**. [s.l.] Elsevier, 2009b. p. 65–82.

RAMSDEN, J. What is nanotechnology? In: **Nanotechnology: An Introduction**. [s.l.] Elsevier Inc., 2011a.

RAMSDEN, J. Nanomaterials and their Production. In: **Nanotechnology: An Introduction**. [s.l.] Elsevier, 2011b. p. 101–124.

RANGABHASHIYAM, S. et al. Significance of exploiting non-living biomaterials for the biosorption of wastewater pollutants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 1669–1689, 2014.

RESEARCH AND MARKETS. **The Global Market for Metal Oxide Nanoparticles to 2020**. [s.l: s.n.].

SAIFUDDIN, N.; WONG, C. W.; YASUMIRA, A. A. N. Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant of Bacteria with Microwave Irradiation. **E-Journal of Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 61–70, 2009.

SALVADORI, M. R. et al. Biosynthesis and Uptake of Copper Nanoparticles by Dead Biomass of *Hypocrea lixii* Isolated from the Metal Mine in the Brazilian Amazon Region. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80519, 25 nov. 2013.

SANGHI, R.; VERMA, P. Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 501–504, 2009.

SAXENA, R. K.; MALHOTRA, B.; BATRA, A. Commercial Importance of Some Fungal Enzymes. In: ARORA, D. K. (Ed.). . **Handbook of Fungal Biotechnology**. [s.l.] Marcel Dekker, Inc., 2003.

SAY, R.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Biosorption of cadmium(II), lead(II) and

copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource technology**, v. 76, p. 67–70, 2001.

SHAH, M. A.; AL-GHAMDI, M. S. Preparation of Copper (Cu) and Copper Oxide (Cu₂O) Nanoparticles under Supercritical Conditions. **Materials Sciences and Applications**, v. 02, n. 08, p. 977–980, 2011.

SHAHVERDI, A. R. et al. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: A novel biological approach. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 919–923, 2007.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1-2, p. 83–96, 2009.

SHCHUKIN, D. G.; SUKHORUKOV, G. B. Nanoparticle synthesis in engineered organic nanoscale reactors. **Advanced Materials**, v. 16, n. 8, p. 671–682, 2004.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 6, n. 2, p. 257–62, abr. 2010.

TIMP, G. L.; HOWARD, R. E.; MANKIEWICH, P. M. Nano-electronics for Advanced Computation and Communication. In: **Nanotechnology**. [s.l.] Springer-Verlag New York, Inc., 1998.

TING, A. S. Y.; CHOONG, C. C. Bioaccumulation and biosorption efficacy of *Trichoderma* isolate SP2F1 in removing copper (Cu(II)) from aqueous solutions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1431–1437, 2009.

VARSHNEY, R.; BHADAURIA, S.; GAUR, M. S. A Review: Biological Synthesis of Silver and Copper Nanoparticles. **Nano Biomed Eng**, v. 4, n. 2, p. 99–106, 2012a.

VARSHNEY, R.; BHADAURIA, S.; GAUR, M. S. A review: biological synthesis of silver and copper nanoparticles. **Nano Biomedicine and Engineering**, v. 4, n. 2, p. 99–106, 2012b.

VEGLIO', F.; BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: a review. **Hydrometallurgy**, v. 44, n. 3, p. 301–316, mar. 1997.

VEIT, M. T. et al. Adsorption isotherms of copper(II) for two species of dead fungi biomasses. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3303–3308, out. 2005a.

VEIT, M. T. et al. Adsorption isotherms of copper(II) for two species of dead fungi biomasses. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3303–3308, out. 2005b.

VOLESKY, B. Biosorption process simulation tools. **Hydrometallurgy**, v. 71, p. 179–190, 2003.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future.

Biotechnology Advances, v. 27, n. 2, p. 195–226, 2009.

WEINBUCH, D. et al. Nanoparticulate Impurities in Pharmaceutical-Grade Sugars and their Interference with Light Scattering-Based Analysis of Protein Formulations. **Pharmaceutical Research**, p. 2419–2427, 2015.

WILSON, M. et al. **Nanotechnology: basic science and emerging technologies**. [s.l.] Chapman & Hall/CRC, 2002.

ZHANG, Q. et al. Preparation of copper nanoparticles by chemical reduction method using potassium borohydride. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 20, p. 240–244, 2010.

APÊNDICE A - Resultados das análises de Difração de Raios-X (DRX)

Foram realizadas análises de difração de raios-X (DRX) em amostras de extrato de suspensão de biomassa viável após reação de síntese de nanopartículas. Os resultados podem ser encontrados na Figura 43.

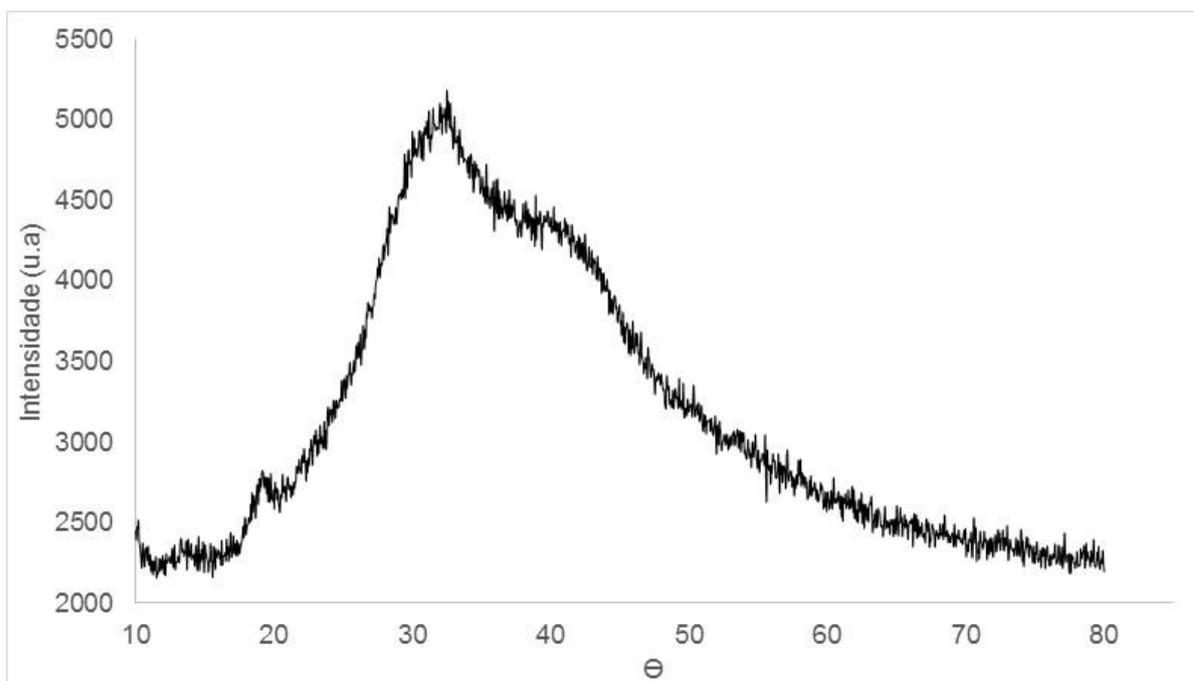


Figura 43 - Diagrama resultante da análise de difração de raios-X (DRX). Amostra de extrato de suspensão de biomassa viável após reação de síntese de nanopartículas.

Da mesma forma, foi realizada análise de DRX para amostra de biomassa não viável após reação de síntese de nanopartículas. Os resultados podem ser verificados na Figura 44.

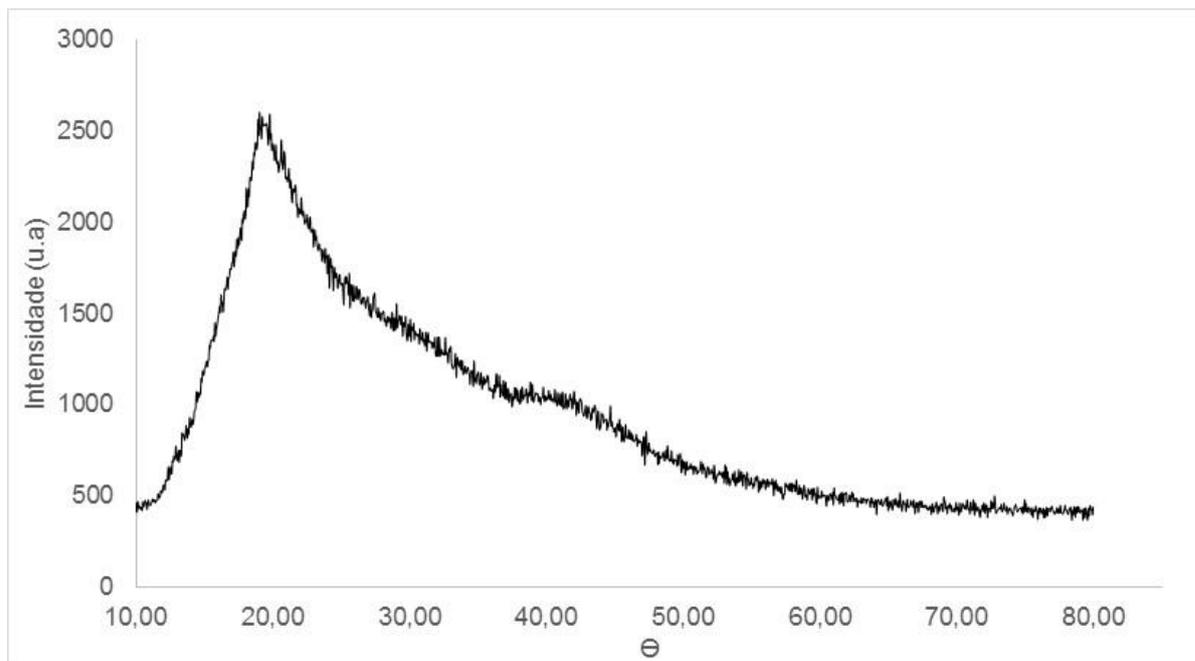


Figura 44 - Diagrama resultante da análise de difração de raios-X (DRX). Amostra de biomassa não viável após reação de síntese de nanopartículas.

Como pode ser observado nos resultados, não foi possível identificar nenhum material cristalino presente nas amostras. É possível que a concentração de nanopartículas formadas seja insuficiente para que ocorra registro no equipamento. Além disso, a presença de grande quantidade de material amorfo (biomassa e componentes do extrato) pode encobrir os picos característicos do material cristalino formado.

APÊNDICE B - Resultados das análises de Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR)

Foram realizadas análises de espectroscopia de infravermelho (FT-IR) em amostras de extrato de suspensão de biomassa viável antes e depois da reação de síntese de nanopartículas. Os resultados podem ser encontrados na Figura 45.

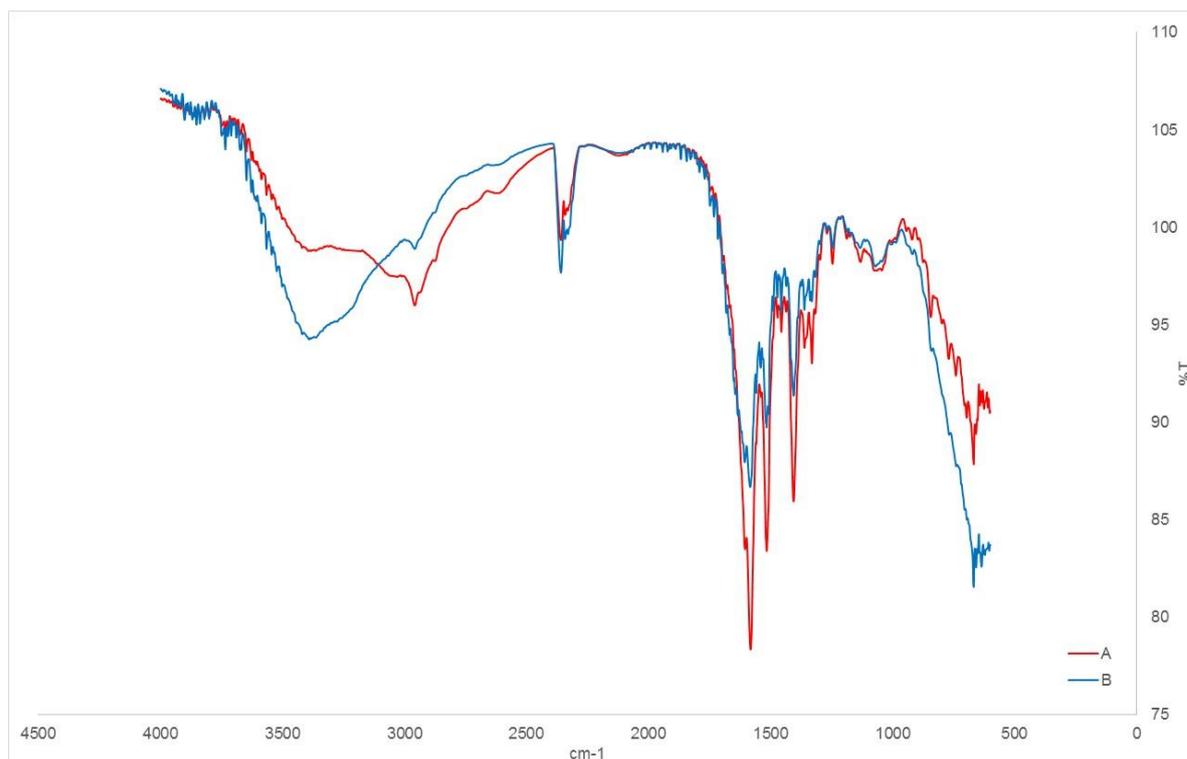


Figura 45 - Análise de espectroscopia de infravermelho (FT-IR). (A) Extrato de suspensão de biomassa viável sem contato com íons cobre (II). (B) Extrato de suspensão de biomassa viável após reação de síntese de nanopartículas.

Da mesma forma foram analisadas amostras de extrato de suspensão de biomassa não viável antes e depois da reação de síntese de nanopartículas. Os resultados podem ser encontrados na Figura 46.

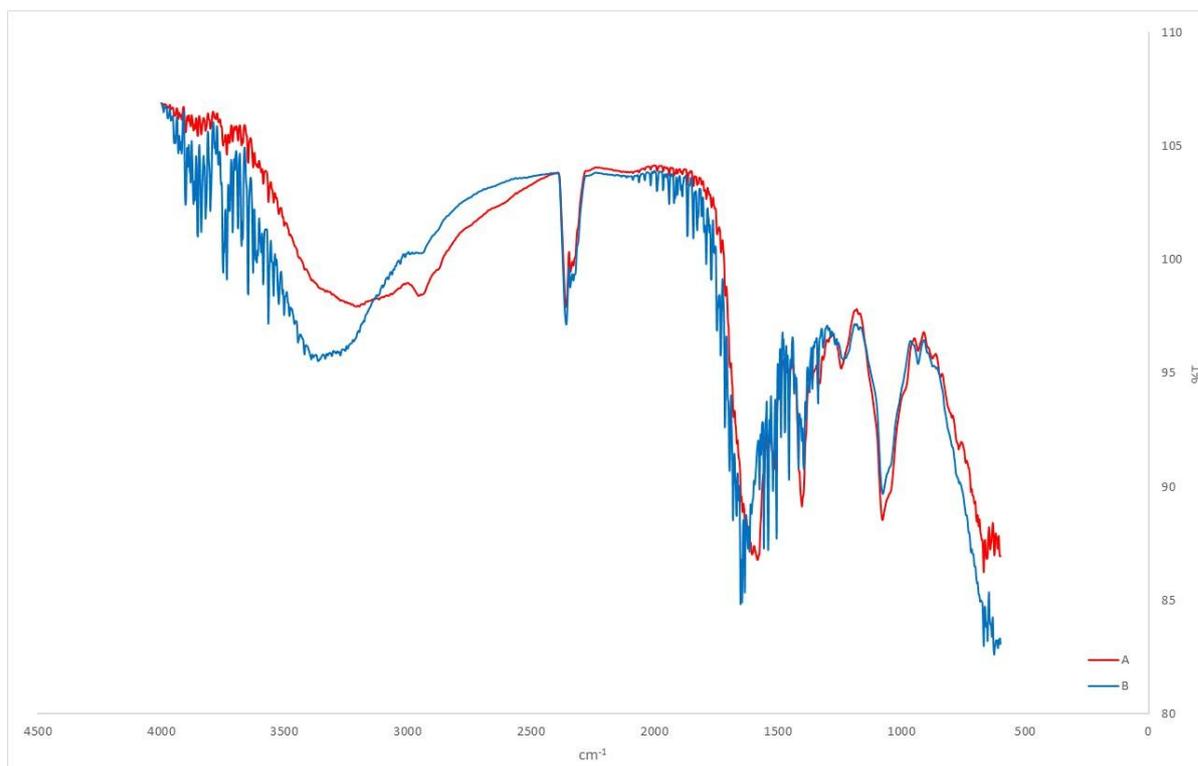


Figura 46 - Análise de espectroscopia de infravermelho (FT-IR). (A) Extrato de células não viáveis sem contato com íons cobre (II). (B) Extrato de células não viáveis após reação de síntese de nanopartículas.

Também foram analisadas amostras de biomassa viável antes e depois da reação de síntese de nanopartículas. Os resultados podem ser encontrados na Figura 47.

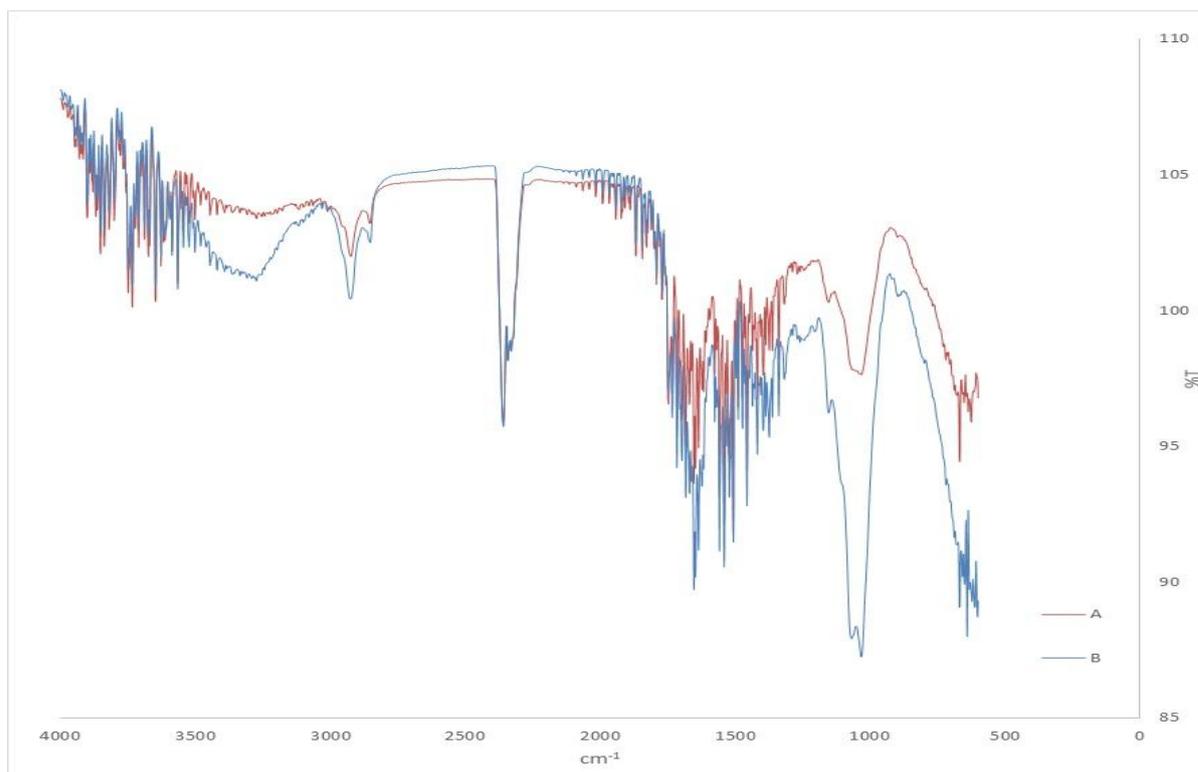


Figura 47 - Análise de espectroscopia de infravermelho (FT-IR). (A) Biomassa viável sem contato com íons cobre (II). (B) Biomassa viável após síntese de nanopartículas.

A fim de verificar a influência da água nos resultados encontrados para as amostras de extratos de suspensão e de biomassa viável, foi realizada a análise para a água destilada. Os resultados podem ser observados na Figura 48.

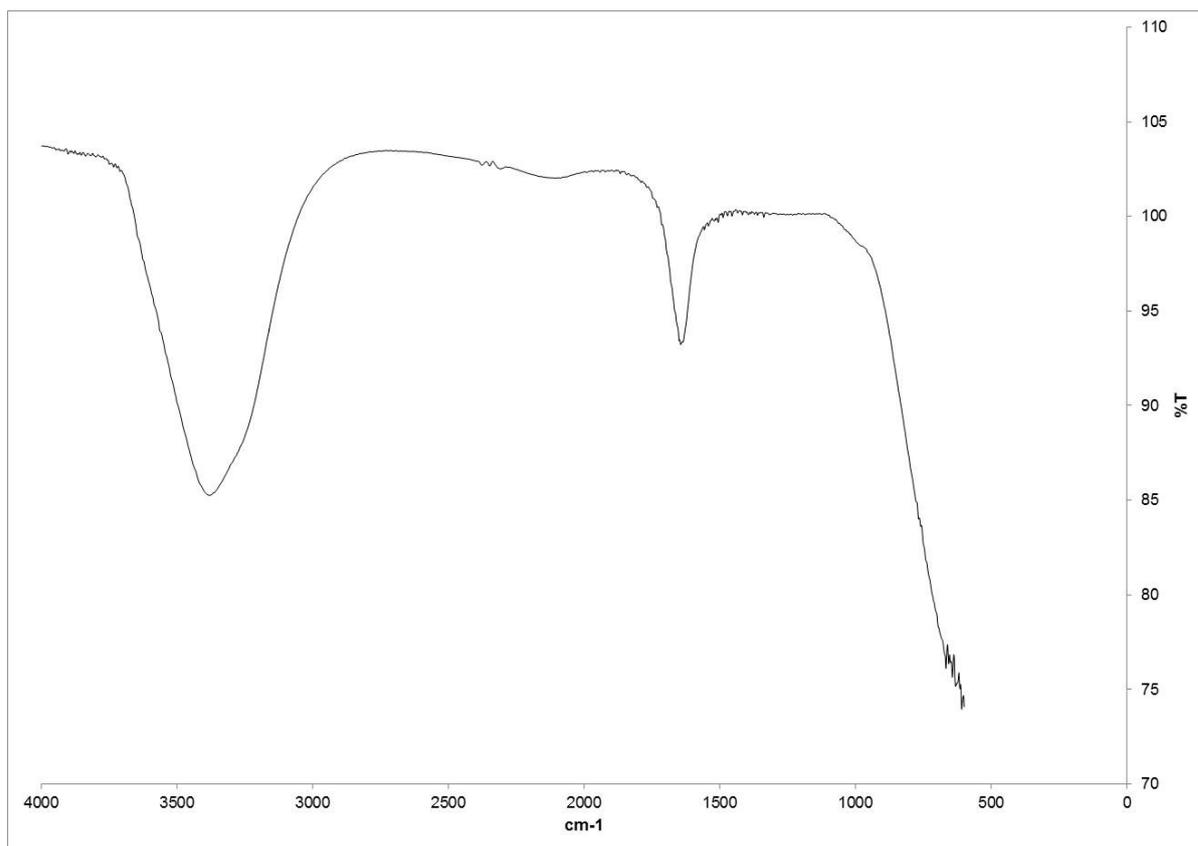


Figura 48 - Análise de espectroscopia de infravermelho (FT-IR). Amostra de água destilada.

Não foi possível identificar mudanças significativas nas ligações químicas verificadas através dos resultados das análises de FT-IR para amostras antes e após a síntese de nanopartículas. A complexidade das amostras e a presença de uma quantidade considerável de água, mesmo após processos de secagem indicam que as análises de FT-IR podem não ser adequadas para identificar qual composto está envolvido na reação de síntese de nanopartículas no caso do uso de compostos biológicos.

APÊNDICE C - Resultados das análises de Espectrofotometria (UV-Vis)

Foram realizadas análises de espectrofotometria em amostras de extrato de suspensão de biomassa viável e não viável, antes e depois da reação de síntese de nanopartículas. Os resultados podem ser verificados nas Figura 49 e Figura 50.

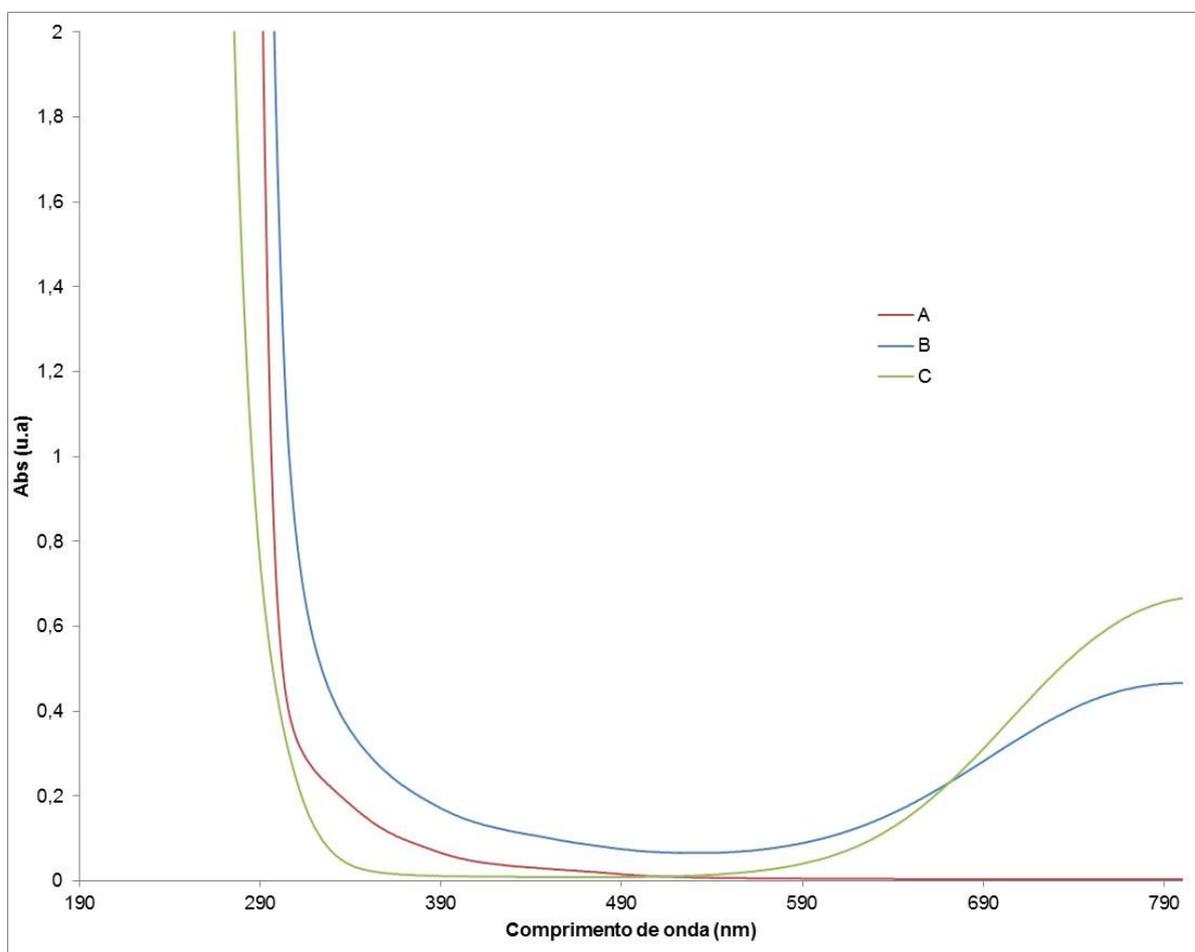


Figura 49 - Espectro resultante da análise de espectrofotometria (UV-Vis) em amostra de extrato de suspensão de biomassa não viável. (A) Controle, sem contato com íons cobre (II). (B) Extrato após reação de síntese de nanopartículas. (C) Solução de cloreto de cobre (II), concentração de íons igual a 2g/L.

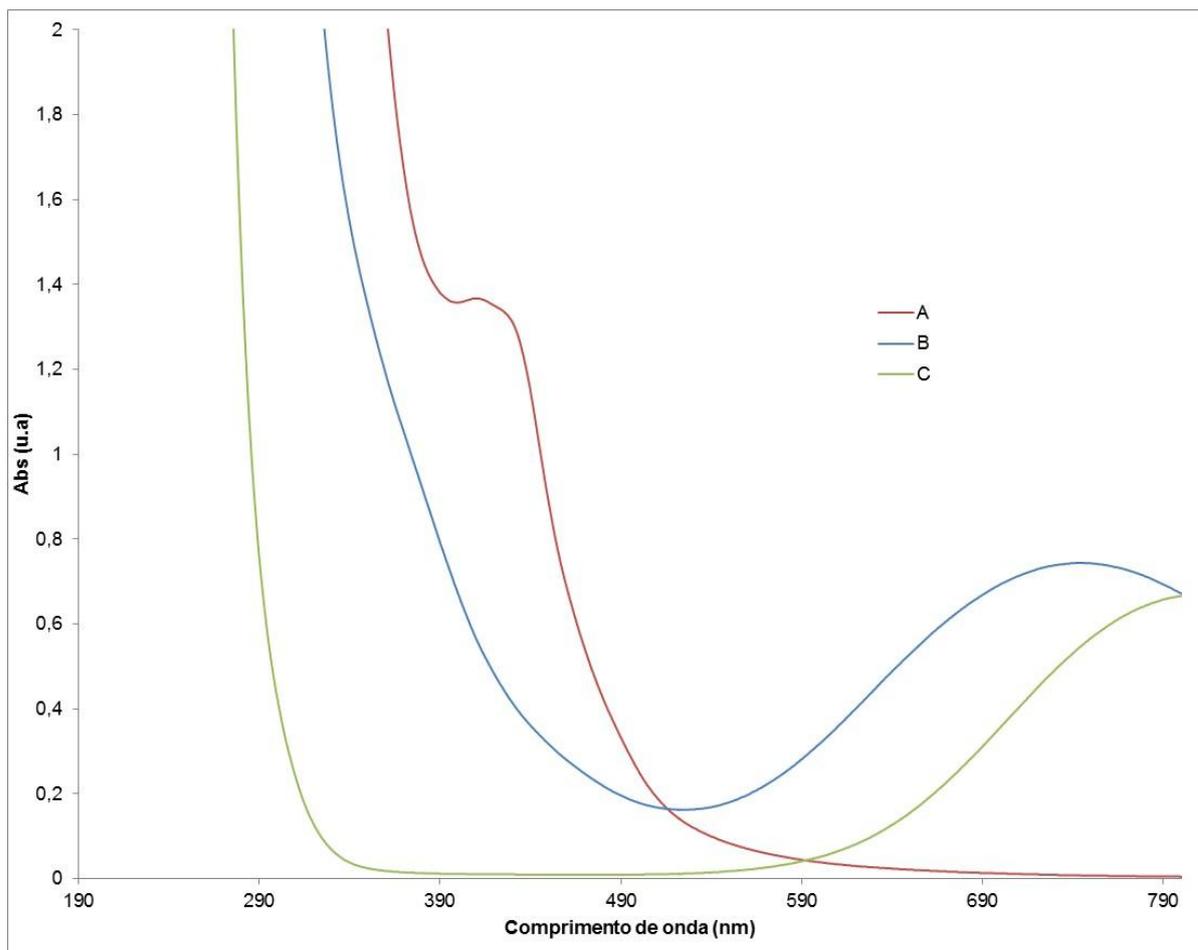


Figura 50 - Espectro resultante da análise de espectrofotometria (UV-Vis) em amostra de extrato de suspensão de biomassa viável. (A) Controle, sem contato com íons cobre (II). (B) Extrato após reação de síntese de nanopartículas. (C) Solução de cloreto de cobre, concentração de íons cobre (II) igual a 2g/L.

APÊNDICE D - Resultados das análises de Espectrometria de massas (MALDI-TOF)

A fim de identificar a composição dos extratos de suspensão de biomassa viável e não viável, foram realizadas análises de espectrometria de massas (MALDI-TOF). Os resultados podem ser observados na Figura 51.

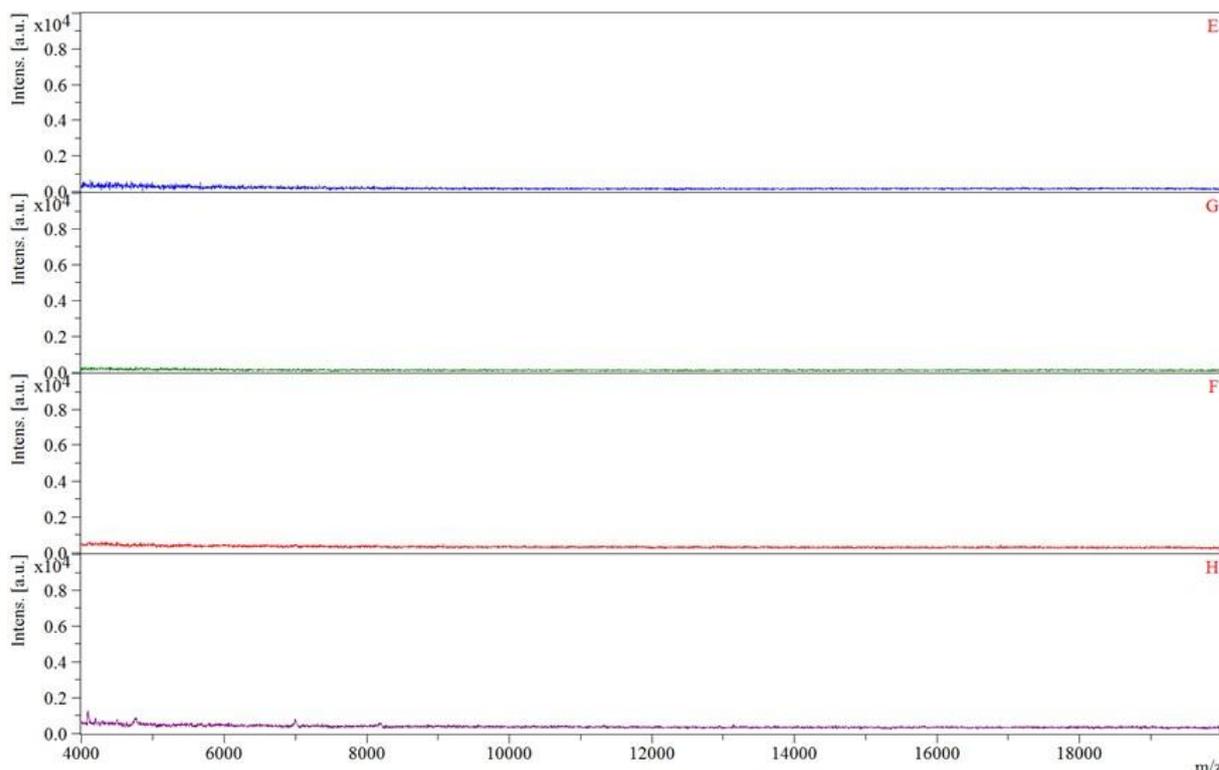


Figura 51 - Análise de espectrometria de massas (MALDI-TOF). (E) Amostra de extrato de suspensão de biomassa viável após reação de síntese de nanopartículas. (F) Amostra de extrato de suspensão de biomassa não viável após reação de síntese de nanopartículas. (G) Amostra de extrato de suspensão de biomassa viável sem contato com íons cobre (II). (H) Amostra de extrato de suspensão de biomassa não viável sem contato com íons cobre (II).

Também foram realizadas análises para os extratos de suspensão de biomassa após a reação de síntese de nanopartículas. O objetivo dessas análises foi comparar os picos presentes antes e depois da reação de síntese, para fornecer informações acerca da massa molecular das moléculas que interagem com os íons cobre (II) e deixam de aparecer no espectrograma após a síntese. Porém, como pode ser verificado na Figura 51, não foi possível identificar compostos com alta massa molecular em nenhuma das amostras. Esse fato pode ser um indício de que são compostos mais simples, e não proteínas, que são responsáveis pela síntese e estabilização das partículas formadas nos extratos de suspensão de biomassa viável e não viável.

Na Figura 52 é possível verificar em mesma escala as diferenças encontradas entre as análises de extratos de suspensão de biomassa e de centrifugação de células não viáveis. Apenas nesse último foram encontrados indícios da presença de moléculas orgânicas com peso molecular entre 4 kDa e 20kDa.

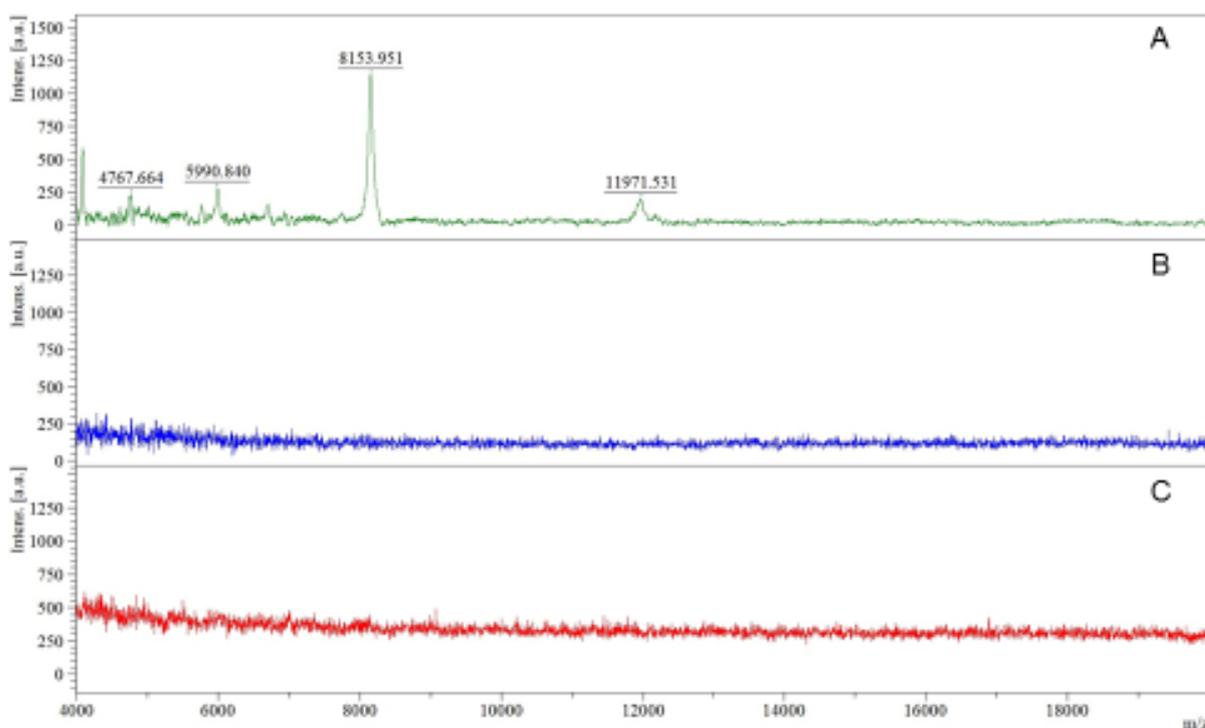


Figura 52 - Comparação entre espectros obtidos através de análise de espectrometria de massas (MALDI-TOF). (A) Espectro correspondente ao extrato de centrifugação de células não viáveis sem contato com íons cobre (II). (B) Espectro correspondente ao extrato de suspensão de biomassa viável sem contato com íons cobre (II). (C) Espectro correspondente ao extrato de suspensão de biomassa não viável sem contato com íons cobre (II).