

Biossíntese de Nanopartículas Metálicas por Fungos

Metal Nanoparticles Biosynthesis by Fungi

RESUMO

Wadis Ferreira Lima
limaw@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Flavia Satie Noguti
flavianoguti@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Dr.Cleverson Busso
cleversonbusso@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Dr.Renato Eising
renatoeising@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

A nanotecnologia vem tomando grandes proporções devido as suas utilizações em novas tecnologias. Visando colaborar nos avanços desta área, este trabalho propõe a biossíntese de nanopartículas metálicas de prata por ação do *Aspergillus niger* e a adaptação da metodologia para produção de nanopartículas de cobre por *Fusarium oxysporum*. A biomassa foi obtida após repique das placas e cultivo por sete dias em meio PDA em temperatura 27 °C em estufa. Posteriormente o crescimento dos fungos as placas foram inundadas com soro fisiológico 0,9% e uma gota de Tween 20, e realizado o processo de filtração dos esporos. Com os esporos separados estes foram incubado em uma solução com meio liquido Glucose Casein Hydrolytase por 72 horas e temperatura 27°C em um agitador de movimento orbital a 150 rpm. Após realizou-se filtração dos micélios obtidos, e então incubados em uma solução contendo AgNO₃. Posteriormente os frascos com a solução e micélios foram envoltos com papel alumínio e incubados a 28° C. A biossíntese das nanopartículas metálicas pode ser observada pela mudança de coloração.

PALAVRAS-CHAVE: *Aspergillus niger*. Biossíntese. *Fusarium oxysporum*

ABSTRACT

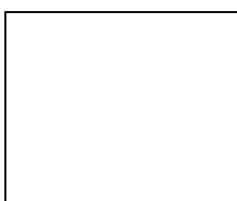
Nanotechnology has gained great proportions due to its use in new technologies. Aiming to collaborate with the advances in this area, this work proposes the biosynthesis of metallic silver nanoparticles by the action of *Aspergillus niger* and the adaptation of the methodology for the production of copper nanoparticles by *Fusarium oxysporum*. The biomass was obtained after plating fungi in the plates and cultivation for seven days in BDA medium at 27 ° C in an incubator. After the growth of the fungi, the plates were flooded with 0.9% saline solution and a drop of Tween 20, and the spore filtration process was carried out. With the spores separated, they were incubated in a solution with Glucose Casein Hydrolytase liquid medium for 72 hours. hours and a temperature of 27 ° C on an orbital shaker at 150 rpm. After filtering the mycelia obtained, they are incubated in a solution containing AgNO₃. The flasks with the solution and the mycelia were wrapped in aluminum foil and incubated at 28 ° C. The metal nanoparticles biosynthesis can be observed by the changing in the color

KEYWORDS: *Aspergillus niger*. Biosynthesis. *Fusarium oxysporum*

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A biossíntese trata-se do processo de anabolismo, onde células de um determinado microrganismo utilizam a energia recebida de uma substância no processo de construção de novas estruturas celulares. Diante disto, a aplicação desta técnica na produção de biomateriais em escalas nano tem sido objeto de estudo nos últimos anos. A utilização da nanotecnologia e nanociência tem desenvolvido um papel importante em produção de soluções à desafios tecnológicos e ambientais nas áreas da medicina, tratamento de efluentes entre outras demandas (Sharma et al., 2009).

Fungos são organismos eucarióticos encontrados nos lugares mais distintos e tipicamente estes realizam decomposição de matéria orgânica. Acredita-se que existe cerca de 5 milhões de espécies de fungos em todo o mundo, mas uma pequena parte destes passaram por reconhecimento, cerca de 70 mil espécies já foram catalogadas (Blackwell.,2011).Os fungos tem sido considerados microrganismos promissores em aplicações de biossíntese pela capacidade de produzir enzimas capazes de degradar diversas matérias orgânicas entre outros produtos de valor agregado. O *Aspergillus niger* é um exemplo de microrganismo que vem sendo muito utilizado nas aplicações biotecnológicas, este fungo ganhou destaque devido a sua capacidade de degradar polissacarídeos vegetais como celulose, xilana, xiloglucano entre outros (Vries et al., 2001).

O *Aspergillus niger* é um fungo fitopatogênico pertencente ao o grupo de espécies *Aspergillus section Nigri*, este é popularmente conhecido pela causa da doença do bolor negro, responsável pela contaminação de diversos alimentos em armazenamento, como decomposição de frutas frescas. Entretanto por volta de 1919 o fungo ganhou grande reconhecimento na indústria de biotecnologia, devido os resultados das pesquisas de James Currie, onde este ressaltou a capacidade do *Aspergillus* metabolizar e biossintetizar quantidades significativas de ácido cítrico (Lima et al., 2019).

O *Fusarium oxysporum*, pertence ao gênero *Fusarium*, da ordem moniliales , família Tuberculariaceae, tem sido investigado e estudado por diversos pesquisadores e atraindo mais atenção dos pesquisadores em relação a outras espécies de fungos (Khatoun et al., 2015). Este fungo é mais conhecido devido a suas atividades toxicológicas e alguns casos micoses em humanos e animais, entretanto o mesmo se mostra com alto potencial para utilização como fitopatogênico. O fungo possui grande habilidade em causar doenças nas plantas hospedeiras, gerando um interesse econômico, pois pode acabar com plantas indesejadas em diversas plantações (Hawksworth et al., 1995). O interesse na utilização deste fungo na síntese de nanopartículas de cobre é pela sua alta capacidade de metabolização, o fungo normalmente atinge o tecido vascular das plantas e desenvolve um metabolização impedindo o movimento da água na planta e consumindo os nutrientes da planta, e também a sua alta capacidade de adaptação em diversas condições se mostrando um fungo cosmopolita.

Segundo Narayanan & Sakthivel, (2010) existem muitas pesquisas voltadas para o campo da nanotecnologia devido ao seu potencial em se tornar tecnologias de ponta. Com isso, as nanopartículas de metais passaram a serem amplamente estudadas devido às suas propriedades físico-químicas únicas. A partir deste

contexto, este trabalho apresenta uma proposta da utilização da biossíntese na produção de nanopartículas por ação fúngica.

METODOLOGIA

A cultura do fungo *Aspergillus niger* tem origem do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS 40371) e foi obtida a partir de repiques realizados das placas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná no Laboratório de biologia molecular e microbiologia. Para o meio de cultura foram pesados aproximadamente 39 g de Potato Dextrose Agar (PDA-HIMEDA) e dissolvido em um litro de água destilada e autoclavado durante 15 min a 121 ° C a 15 psi (libra / polegadas quadradas). Após resfriamento do material utilizado como meio de cultura, foram realizados os preparos das placas de Petri com aproximadamente 20 mililitros da solução de PDA em estado líquido, aguardar o resfriamento da solução das placas em fluxo laminar com luz UV por aproximadamente 20 minutos.

A próxima etapa foi o repique dos fungos nas placas preparadas anteriormente, transferindo-se pequenas amostras do fungo para as placas e realizada a incubação destas placas em estufa por 7 dias a temperatura de 27° C. Posteriormente o crescimento, analisou-se as placas que obtiveram resultados satisfatórios, sem indícios de contaminação e crescimento por outros microrganismos não desejados, obtendo placas aptas a serem utilizadas para o processo de inundação.

Posteriormente, realizou-se a inundação com soro fisiológico (LBS, dosagem 0,9%) e 1 gota Tween 20 (Proquímios), e com esta solução foi realizado o processo de filtração para obtenção dos esporos. Com estes esporos foi realizado a incubação em frascos contendo meio líquido GC (Glucose Casein Hydrolysate). Para o preparo da solução anterior, foram utilizados Glucose (Vetec, 99,5%) e Caseína Hidrolisada (Sigma-Aldrich) onde foram dissolvidos em água previamente esterilizada 0,4% (g/v) de hidrolisado de caseína e 0,5% (g/v) de glucose e após a solução passou pelo processo de autoclavagem. Os frascos de cultura contendo a solução de GC e os esporos foram então incubados em temperatura 27°C em um agitador de movimento orbital a 150 rpm por 72 horas.

O micélio fúngico foi obtido após três dias de crescimento, a solução contendo estes micélios passou por uma nova filtração através do papel de filtro nº 1 da Whatman e lavado com água destilada, assim o filtrado de células vivas foi obtido. Com 50ml do Filtrado foi realizada nova incubação em 10 ml de AgNO₃ (Proquímios, 99%) solução de nitrato de prata 1x10⁻³ mol/L. O frasco deve estar bem tampado com algodão e posteriormente embrulhado em papel alumínio para ser mantido no escuro por 24 horas em uma incubadora a 28 ° C. A biogênese de nanopartículas de prata pode observada por mudança gradual na a cor dos frascos experimentais.

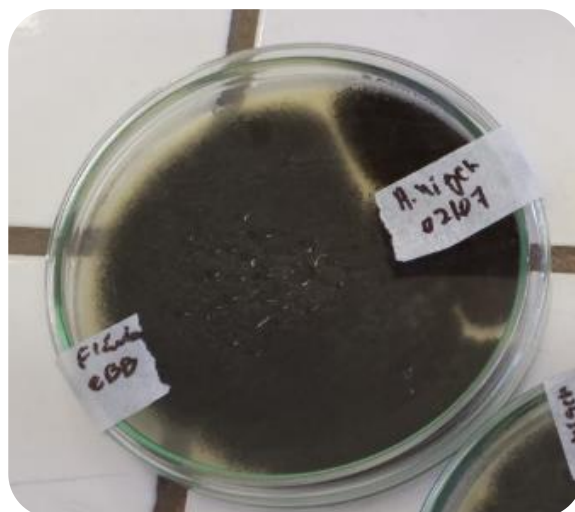
O fungo *Fusarium oxysporum* foi cedido pelo professor Cleverson Busso. O repique desta amostra ocorreu de maneira semelhante ao do *Aspergillus niger*, preparou-se placas de Petri com a solução de PDA, aguardou-se o tempo de resfriamento do meio de cultura, e realizado repiques do *Fusarium* nas placas. As

placas então foram incubadas por sete dias para que ocorra o crescimento do fungo em temperatura 27° C.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após o preparo do meio de cultivo PDA ocorreu a replicação do *Aspergillus niger* e uma pequena amostra foi retirada com o auxílio de uma alça de transferência e aplicada sobre o meio de cultivo, realizou-se incubação por sete dias em temperatura 27°C. Esperado o tempo de crescimento do microrganismo podemos observar um bom crescimento em algumas placas, sem presença de microrganismos indesejados e contaminações conforme Figura1.

Figura1. Placa de Petri com crescimento do *Aspergillus niger*



Fonte: Lima e Noguti (2019).

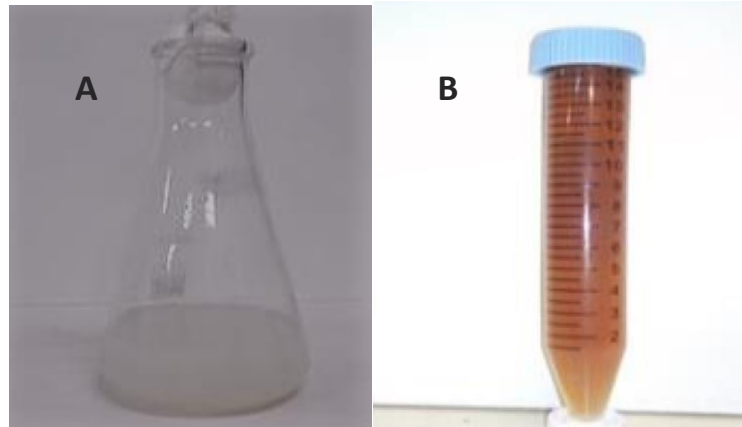
Com as placas escolhidas foram realizadas as etapas de inundação com solução fisiológica 0,9% e Tween 20 dentro da câmara de fluxo. Realizado a inundação, com auxílio de uma alça de Drigalski realizamos um melhor desprendimento dos esporos do meio de cultivo, com esta solução fisiológica e esporos tivemos que realizar um processo de filtração utilizando algodão previamente esterilizado para separação somente do filtrado de células vivas.

Com este filtrado foi realizado uma incubação dos microrganismos na solução de glucose Casein Hydrolytase (GB) em uma temperatura de 27° C e agitação 150 rpm em agitador de movimento orbital por 72 duas horas. Posteriormente os três dias de incubação obtemos o micélio fúngico por meio de uma nova filtração da solução de GB em papel filtro e lavado com água destilada.

A biossíntese das nanopartículas de prata aconteceu por meio da adição do sal de prata (AgNO_3) no filtrado fúngico (Figura 2A). Esta adição permite que as proteínas e outras biomoléculas sintetizadas pelo microrganismo passem a atuar na redução dos íons de prata, como também atuam no processo de estabilização das nanopartículas. Assim, com relação à análise da eficiência da biossíntese mediada pelo *Aspergillus niger*, podemos determinar que devido a alteração na

cor do meio de reação esta biossíntese foi satisfatória sugerindo a formação das nanopartículas (Figura 2B).

Figura 2. A - Dispersão de nitrato de prata com filtrado dos micélios sem a incubação. B - Dispersão com filtrado após a incubação.



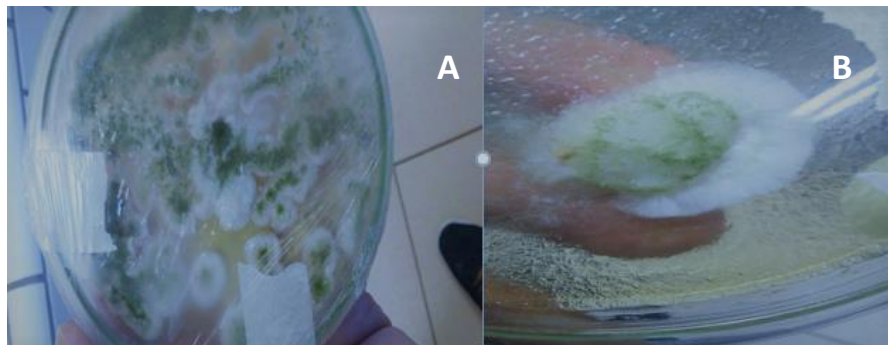
Fonte: Lima (2019).

Portanto ao observarmos a Figura 2, notamos que quando adicionamos o filtrado fúngico no frasco que contém AgNO_3 (1 mM) e aguardarmos o período de 3 dias, a cor da solução passa a ter uma tonalidade marrom. Segundo Ahmad et al. após o processo de inoculação e incubação temos um processo de mudança na coloração da solução observando aparecimento de uma cor marrom-amarelada no filtrado fúngico temos a sugestão da formação das nanopartículas de prata nesta solução (Ahmad et al., 2003). O microrganismo realiza uma biossíntese no meio, segregando uma enzima promovendo a redução dos íons de prata, levando a formação de nanopartículas de prata metálica. A redução de íons Ag^+ para Ag^0 ocorre no processo de biossíntese por meio ações extracelulares (Basavarajas et al., 2008).

Assim, com o processo de biossíntese de nanopartículas de prata se mostrando eficaz, iniciou-se uma pesquisa e análise bibliográfica para a utilização do método para síntese e caracterização de nanopartículas utilizando outro metal, o cobre. Este metal em nanopartículas metálicas, tem sido apontado com alto efeito bactericida devido a sua elevada relação superfície/volume, esta relação permite que as partículas do metal interajam com as membranas microbianas (Arab et al., 2017).

Com isso, começou-se a replicação de dois microrganismos o *Aspergillus niger* utilizado anteriormente e *Fusarium oxysporum*, ambos inoculados em placas de Petri contendo cerca de 20 mL. Conforme a metodologia descrita aguardou-se cerca de 7 dias para observar-se o crescimento dos microrganismos, ambos apresentaram placas com crescimento satisfatório e sem presença de microrganismos indesejados conforme figuras 3 e 4.

Figura 3. A - Placa de Petri com repique de *Fusarium oxysporum*. B – Detalhe do crescimento de *Fusarium oxysporum* da figura A.



Fonte: Lima (2020).

Figura 4. Placa de Petri com repique de *Aspergillus niger*



Fonte: Lima (2020).

No entanto, não foi possível realizar as etapas subsequentes do trabalho, como testar a eficácia do processo na obtenção das nanopartículas de cobre por meio de biossíntese dos fungos e caracteriza-las, devido ao início da pandemia de Sars-CoV-2 ocasionando a interrupção das atividades acadêmicas na UTFPR e em todo o país.

CONCLUSÃO

O trabalho de iniciação científica tem como objetivo demonstrar as atividades realizadas no laboratório, bem como analisar o processo de biossíntese de nanopartículas de prata sintetizadas pelo fungo *Aspergillus niger*, como também o início do projeto de obtenção de nanopartículas de cobre biosintetizadas por *Fusarium oxysporum*. Considerando os métodos adotados para que ocorra a biossíntese na produção das nanopartículas de prata por intermédio do

Aspergillus niger, pode-se concluir que a biossíntese foi satisfatória já que o fungo demonstrou ser hábil para promover a sintetização do produto.

No início do ano de 2020 ocorreu a pandemia do Sars-CoV-2, o vírus com alto potencial de transmissão, acabou levando governos a tomarem decisões do lockdown. Devido a essa a situação as atividades acadêmicas na Universidade Tecnológica Federal do Paraná foram suspensas até o presente momento como medida de conter a transmissão do vírus. Diante disto, os resultados e discussão, bem como uma conclusão do processo de biossíntese de nanopartículas de cobre utilizando os dois fungos repicados, ficaram em aberto até o presente momento. Com isso, ao retornar as atividades acadêmicas no âmbito da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Toledo, estes itens poderão serem concluídos após ocorrer os experimentos em laboratório.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo espaço dos laboratórios onde foram realizadas as etapas de pesquisa.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A.; MUKHERJEE, P.; SENAPATI, S.; MANDAL, D.; KHAN, M. I.; SASTRY, M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 28, p. 313–318, 2003.

ARAB, F. E; PARIS, E. C; SOUZA, C.W.O; FERREIRA, M.D. Avaliação Do Efeito Antimicrobiano De Nanopartículas De Óxidos Metálicos . IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio – UFSCar, São Carlos. 2017.

BASAVARAJA, S.; BALAJI, S. D.; LAGASHETTY, A.; RAJASAB, A. H.; VENKATARAMAN, A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Materials Research Bulletin*, v. 43, n. 5, p. 1164–1170, 2008.

BLACKWELL, M., *The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?* 1. *American Journal of Botany* 2011, 98, (3), 426-438

HAWKSWORTH, D.L; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*. 8ed. CAB International: Oxon, UK 1995.

KHATOON, N.; AHMAD, R.; SARDAR, M. Robust and fluorescent silver nanoparticles using *Artemisia annua*: Biosynthesis, characterization and antibacterial activity. *Biochemical Engineering Journal*, v. 102, p. 91–97, 2015.

LIMA, Mary Anne S. et al. *Aspergillus niger*: Cem Anos de Contribuição à Química dos Produtos Naturais. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 30, n. 10, pág. 2029-2059, outubro de 2019. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532019001002029&lng=en&nrm=iso. acesso em 27 de agosto de 2020.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 156, n. 1–2, p. 1–13, 2010.

Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interf Sci.* 2009;145(1-2):83–96.

Vries, R.P.; Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 497-522.