

**IMPLEMENTAÇÃO DO PROCESSO DE BIOSÍNTESE DE  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM REATOR DE LEITO FIXO  
UTILIZANDO BIOMASSA FÚNGICA IMOBILIZADA EM DIFERENTES  
SUPORTES**

**Gabriel Komorek de Ramos**

São Vicente

2025

## **IMPLEMENTAÇÃO DO PROCESSO DE BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM REATOR DE LEITO FIXO UTILIZANDO BIOMASSA FÚNGICA IMOBILIZADA EM DIFERENTES SUPORTES**

Trabalho de Conclusão de Curso na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista. Para obtenção do título de grau Bacharel em Ciências Biológicas com Habilitação em Gerenciamento Costeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Ottoni

Coorientador: Me. Beatriz Mendes Santos

D427i

de Ramos, Gabriel Komorek

Implementação do processo de biossíntese de nanopartículas de prata em reator de leito fixo utilizando biomassa fúngica imobilizada em diferentes suportes / Gabriel Komorek de Ramos. -- São Vicente, 2025

33 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni

Coorientadora: Beatriz Mendes Santos

1. Biotecnologia. 2. Fungos filamentosos. 3. Biossíntese. 4. Nanopartículas.  
5. Biorreatores. I. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família, em especial meus pais Alessandra e Waldir, por todo o amor, apoio e suporte concedidos incondicionalmente para que pudesse atingir meus objetivos; e meu irmão Matheus, que mesmo de outro continente, continua sendo a mesma figura de inspiração para mim.

Agradeço à minha orientadora Cristiane, por toda a atenção, paciência, apoio e acolhimento essenciais para a elaboração deste trabalho; e à minha coorientadora Beatriz, por todo o amparo e conhecimento transmitido por todos esses meses. Estendo os agradecimentos aos demais colegas do laboratório MICROBIONANOTEC: Stella, Lívia, Laura e Arthur.

Agradeço aos meus colegas e amigos que fiz durante todos esses anos, compartilhando não só a alegria dos bons momentos, mas também os pesos do crescimento acadêmico e pessoal: Bruno, Júlia, Ana Beatriz, Fernanda, Raphaela, Sophia, Marcelo, Pedro e Luísa.

Agradeço aos meus queridos amigos de Jacareí, em especial: Daniel, Isabella e Mateus, por estarem comigo nos meus melhores e piores momentos, e pelos anos de risos, reflexões e evolução.

Agradeço aos meus irmãos de Ordem, em especial: Miguel, Leonardo, Lucas, Gabriel e Pedro, com quem tenho o prazer de compartilhar essa jornada em busca de um trabalho bem feito e de um dever bem cumprido.

Agradeço aos meus guias e à toda espiritualidade amiga, por sempre iluminarem minha mente e meus caminhos. *Epá Babá, Okê Arô, Odoyá.*

Por fim, agradeço a mim mesmo, por nunca ter me deixado desistir e por me permitir aprender, persistir e crescer.

## RESUMO

Nanopartículas (NPs) são estruturas de 1 a 100 nm que possuem propriedades únicas, como alta área superficial e elevada reatividade, sendo amplamente aplicadas em áreas como medicina e energia. Dentre elas, as nanopartículas metálicas, especialmente as de prata (AgNPs), destacam-se por sua ação antimicrobiana, empregadas em fármacos, cosméticos e materiais hospitalares. As rotas usuais de síntese desses materiais, embora eficazes, envolvem altos custos energéticos e o uso de reagentes tóxicos, o que motivou o avanço de métodos de biossíntese mais sustentáveis. A biossíntese utiliza o metabolismo de organismos para converter íons metálicos de um precursor em NPs. Os fungos se destacam pela produção eficiente de enzimas redutoras e fácil cultivo, permitindo uma síntese rápida e sustentável. Apesar do predomínio de processos em batelada, reatores de fluxo contínuo surgem como alternativa mais produtiva e ecológica. Assim, o objetivo deste trabalho foi imobilizar biomassa fúngica em suportes de ácido polilático (PLA) e esponjas de poliuretano (PU) em reator de leito fixo (PBR) para biossíntese contínua de AgNPs. A mudança da coloração do filtrado enzimático para castanho indicou a formação de AgNPs, confirmada pelas análises espectrofotométricas. As amostras com biomassa livre apresentaram picos de absorvância entre 400 e 450 nm, faixa característica das AgNPs, sendo mais evidentes nos preenchimentos de 25%, 50% e 100%, sugerindo maior atividade metabólica e liberação de enzimas. Já a biomassa aderida ao PLA demonstrou baixa síntese, enquanto a aderida ao PU exibiu curvas de absorvância crescentes, evidenciando formação contínua de NPs. A menor quantidade de biomassa observada nos suportes, especialmente no PLA, parece limitar a produção, enquanto a estrutura porosa do PU favorece a imobilização e mantém boa eficiência de síntese, mesmo com menos biomassa. Esses resultados confirmam a influência direta do tipo de suporte na eficiência da biossíntese fúngica de AgNPs, enquanto estudos futuros devem aprofundar a caracterização dessas NPs.

**Palavras-chave:** Nanopartículas de prata, reator de leito fixo, biossíntese fúngica, imobilização por suportes, síntese contínua.

## ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) are structures ranging from 1 to 100 nm that possess unique properties, such as high surface area and elevated reactivity, and are widely applied in fields such as medicine and energy. Among them, metallic nanoparticles, especially silver nanoparticles (AgNPs), stand out for their antimicrobial activity, being used in pharmaceuticals, cosmetics, and hospital materials. The usual synthesis routes for these materials, although effective, involve high energy costs and the use of toxic reagents, which has motivated the advancement of more sustainable biosynthesis methods. Biosynthesis uses the metabolism of organisms to convert metal ions from a precursor into NPs. Fungi stand out due to their efficient production of reducing enzymes and easy cultivation, allowing rapid and sustainable synthesis. Despite the predominance of batch processes, continuous-flow reactors have emerged as a more productive and eco-friendly alternative. Thus, the aim of this work was to immobilize fungal biomass on polylactic acid (PLA) supports and polyurethane (PU) sponges in packed-bed reactor (PBR) for the continuous biosynthesis of AgNPs. The change in color of the enzymatic filtrate to brown indicated the formation of AgNPs, confirmed by spectrophotometric analyses. Samples with free biomass showed absorbance peaks between 400 and 450 nm, a characteristic range for AgNPs, being more evident in the 25%, 50%, and 100% fillings, suggesting higher metabolic activity and enzyme release. Biomass adhered to PLA, however, showed low synthesis, while that adhered to PU exhibited increasing absorbance curves, indicating continuous nanoparticle formation. The smaller amount of biomass observed on the supports, especially PLA, appears to limit production, whereas the porous structure of PU favors immobilization and maintains good synthesis efficiency even with less biomass. These results confirm the direct influence of the type of support on the efficiency of fungal biosynthesis of AgNPs, while future studies should further deepen the characterization of these NPs.

**Key-words:** Silver nanoparticles, packed-bed reactor, fungal biosynthesis, supports immobilization, continuous synthesis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO <sub>3</sub> :	Nitrato de Prata
AgNPs:	Nanopartículas de Prata
BDA:	Batata Dextrose Ágar
DLS:	Espalhamento Dinâmico de Luz
MGLP:	Malte Glicose Levedura Peptona
NADH:	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida
NADPH:	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NAD <sup>+</sup> :	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADP <sup>+</sup> :	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato oxidado
NPs:	Nanopartículas
PLA:	Ácido Polilático
PU:	Poliuretano
PBR:	Reator de Leito Fixo
Pdl:	Índice de Poldispersão
Pz:	Potencial Zeta
SPR:	Ressonância Plasmônica de Superfície
UV-Vis:	Espectroscopia de Absorção Ultravioleta-Visível

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fungo <i>Rhizopus arrhizus</i> cultivado em BDA	<b>12</b>
<b>Figura 2.</b> Suportes empregados para imobilização da biomassa	<b>13</b>
<b>Figura 3.</b> Processo de inoculação da biomassa e adição no PBR	<b>15</b>
<b>Figura 4.</b> Leito do reator preenchido	<b>15</b>
<b>Figura 5.</b> Mudança da coloração das amostras	<b>16</b>
<b>Figura 6.</b> Espectro UV-Vis das amostras de batelada	<b>18</b>
<b>Figura 7.</b> Espectros UV-Vis advindas da biomassa livre (25%)	<b>19</b>
<b>Figura 8.</b> Espectro UV-Vis advindas da biomassa livre (50%, 75% e 100%)	<b>20</b>
<b>Figura 9.</b> Espectros UV-Vis advindas da biomassa aderida ao PLA	<b>21</b>
<b>Figura 10.</b> Espectros UV-Vis advindas da biomassa aderida ao PU	<b>22</b>

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Caracterização das AgNPs biossintetizadas

**25**

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>10</b>
<b>2. Objetivo</b>	<b>12</b>
<b>3. Material e Métodos</b>	<b>12</b>
3.1. Fungo	12
3.2. Suportes para Imobilização	13
3.3. Inoculação de Biomassa	13
3.4. Implementação do Reator de Leito Fixo (PBR)	14
3.5. Detecção da Biossíntese de AgNPs	16
3.6. Caracterização de AgNPs	16
<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>17</b>
4.1. Biossíntese de AgNPs em Batelada	17
4.2. Biossíntese de AgNPs em PBR	18
4.2.1. Biomassa Livre	18
4.2.2. Biomassa Imobilizada nos Suportes	20
4.3. Caracterização das AgNP	24
<b>5. Conclusões</b>	<b>26</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b>	<b>27</b>

## 1. Introdução

Nanopartículas (NPs) são estruturas que variam de escala entre 1 a 100 nm, e são de alto interesse para diversas indústrias, como a medicina, energia e nutrição. Graças a sua proporção nanométrica, esses materiais apresentam propriedades únicas, como forte reatividade superficial e alta área de superfície, sendo as nanopartículas metálicas muito estudadas e empregadas. Metais nobres, como prata, platina e ouro são utilizados na síntese desses materiais, presentes em medicamentos, produtos cosméticos e de higiene pessoal (Jamkhande et al., 2019; Othman et al., 2019). A prata é historicamente conhecida por suas propriedades antimicrobianas, capaz de prevenir infecções bacterianas e cicatrizar feridas (Dawadi et al., 2021), e com o surgimento da nanotecnologia, esse metal foi prontamente utilizado como precursor para a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs). Apesar de exibir propriedades catalíticas e ópticas únicas, que contribui para o desenvolvimento de biossensores, a atividade antibacteriana desses materiais é o que mais atrai a atenção de pesquisadores, o que resulta em sua aplicação em áreas médicas e hospitalares, capaz de inibir o crescimento até de bactérias multirresistentes e potencial de combater o vírus da HIV (Siddiqi et al., 2018; Khodashenas & Ghorbani, 2019; Bruna et al., 2021).

Existem variadas rotas para a síntese das AgNPs, sendo as mais usuais as sínteses física e química. As abordagens físicas são rápidas e consomem menos reagentes químicos, enquanto demandam muita energia e apresentam baixo rendimento. As abordagens químicas, apesar de promissoras, fazem uso de reagentes tóxicos, e geram resíduos danosos ao meio ambiente (Pryschepa et al., 2020; Sofi et al., 2022). Nesse cenário, o método da biossíntese surge como uma alternativa mais sustentável, utilizando do metabolismo de microrganismos como bactérias e algas, assim como extratos vegetais e fungos filamentosos (Lee & Jun, 2019; Das et al., 2020; Bamal et al., 2021). Tal abordagem de síntese ecológica comunica-se diretamente com os objetivos 12 (consumo e produção responsável), 14 (vida na água) e 15 (vida terrestre) da Agenda 2030 proposta pela Organização das Nações Unidas, e por isso, tem ganhado atenção especial.

Os fungos são conhecidos pelo seu potencial para a produção de diversos compostos bioativos, e por conta de sua alta tolerância a metais e fácil manipulação,

são agentes promissores para a biossíntese de AgNPs. Devido a produção de um amplo conjunto de enzimas, esses organismos conseguem não só modificar sais metálicos em NPs, mas o fazem muito mais rapidamente quando comparados a outros microrganismos. Os fungos também apresentam fácil cultivo e manutenção em laboratório, além de serem mais adequados para uma síntese em larga escala em decorrência da maior resistência de sua massa micelial, quando comparada com plantas. (Guilger-Casagrande & Lima, 2019; Chopra et al., 2022). A biossíntese micogênica de NPs pode ser intracelular, quando o precursor metálico é internalizado na biomassa, sendo necessário a posterior extração das NPs, ou extracelular, mais utilizado, no qual o precursor é adicionado no filtrado aquoso que contém apenas as enzimas fúngicas (Qidwai et al., 2018).

A maioria dos métodos de síntese de AgNPs é realizada em batelada, com desvantagens associadas ao prolongado tempo de processo e baixa reprodutibilidade. Porém, cada vez mais estudos buscam contornar essas problemáticas com o uso de reatores para alimentar continuamente os reagentes desse procedimento. Diversas publicações investigam a síntese química de AgNPs com distintos reatores, como de microcanal simples, disco rotativo e de fluxo coaxial microfluídico (Okafor et al., 2017; Długosz & Banach, 2019). Ainda assim, raros são os estudos que utilizam da síntese contínua dos reatores junto do potencial de biossíntese que organismos como os fungos apresentam. Após a coleta do extrato enzimático, a biomassa fúngica geralmente é descartada, o que limita a operação. Empregar um reator de leito fixo (PBR) nesse processo cria um cenário onde a biomassa pode ser reutilizada para distintas coletas no decorrer dos dias, tornando a biossíntese ainda mais sustentável, uma vez que utiliza menos reagentes para a produção.

Para a melhor circulação da água pelo leito reator, é importante o uso de suportes que consigam imobilizar a biomassa fúngica. Materiais a base de polímeros como o ácido polilático (PLA) e o poliuretano (PU) são usualmente utilizados para imobilização de enzimas e até células (Ye et al., 2019; Li et al., 2020; Alkan-Tas et al., 2021). O PLA é um polímero facilmente sintetizado por vários métodos, se tornando bem conhecido como uma fonte termoplástica biodegradável para impressões 3D (Monnier et al., 2018; Joseph et al., 2023). O PU é altamente versátil, amplamente utilizado em diversos setores industriais devido à sua capacidade de

apresentar diferentes propriedades físicas, como flexibilidade e resistência, sendo aplicado em espumas, adesivos e revestimentos (Dacewicz & Grzybowska-Pietras, 2021). Porém, são inexistentes os estudos que utilizam esses materiais como imobilizantes de biomassa em reator. Diante do exposto, neste estudo serão utilizados como suportes as peças de PLA e as esponjas de PU para imobilizar a biomassa fúngica em reator, com a perspectiva de potencializar a biossíntese contínua de AgNPs em reator.

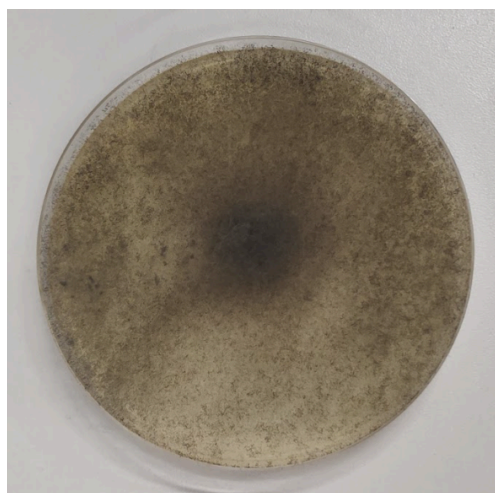
## 2. Objetivo

Imobilizar biomassa fúngica em suportes de ácido polilático (PLA) e esponjas de poliuretano (PU) em reator de leito fixo (PBR) para biossíntese contínua de nanopartículas de prata (AgNPs).

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Fungo

O fungo *Rhizopus arrhizus*, cepa IPT1013 pertencente ao agrupamento de biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas, foi previamente cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura de batata, dextrose e ágar (BDA), incubadas a 30 °C por 7 dias.

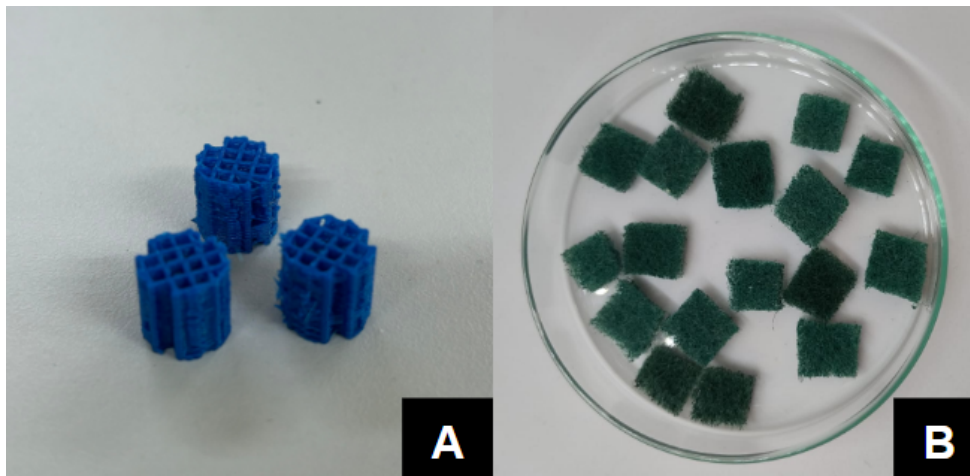


**Figura 1.** Fungo *Rhizopus arrhizus* cultivado em placa de Petri em meio de cultura BDA.

### 3.2. Suportes para Imobilização

As peças de ácido polilático (PLA) foram cedidas pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática e Bioprocessos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG, Campus Poços de Caldas), impressos por uma impressora 3D CREALITY® Modelo K1C e tecnologia Fused Deposition Modeling, a partir de filamentos de PLA. As peças possuem geometria cilíndrica de 1,0 cm de diâmetro e altura, poros com abertura de 2,65 mm e porosidade total de 71%.

As esponjas de poliuretano (PU) foram adquiridas comercialmente e cortadas para formar cubos de 1,0 cm de aresta. Ambos os suportes foram previamente autoclavados antes de serem utilizados para o crescimento da biomassa.



**Figura 2.** Suportes empregados para imobilização da biomassa no leito do reator. A: Peças de ácido polilático; B: Esponjas de poliuretano.

### 3.3. Inoculação da Biomassa

O crescimento da biomassa foi conduzido a partir da inserção de 5 discos (6 mm) do fungo previamente crescido em BDA em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura líquido MGLP (Aguiar et al., 2024). Para os testes de imobilização da biomassa nos suportes, foram adicionadas 3 peças de PLA e 3 esponjas de PU, para cada configuração. Os frascos foram submetidos, em incubadora shaker, à condição padrão de agitação de 150 rpm a 30 °C, por 72 h.

#### *Experimento em Batelada*

Para os testes em batelada, a biomassa crescida foi filtrada e lavada com 500 mL de água deionizada para remoção do meio de cultura, sendo transferida a um

novo frasco Erlenmeyer, contendo dez vezes o valor de sua massa em mL de água deionizada, também mantido em agitação de 150 rpm a 30 °C, por 72 h. A substituição do MGLP pela água deionizada cria um cenário de estresse para o fungo, estimulando a liberação das enzimas.

A biomassa crescida foi filtrada do extrato enzimático, que por sua vez, foi submetido a uma série de filtragens à vácuo em papel filtro Millipore (3 µm) para remoção de restos celulares.

Ao extrato enzimático restante, foi adicionado uma solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) 100 mM na proporção de 10 µL para cada 1 mL de extrato. A mistura foi mantida em ambiente isento de luz à agitação de 150 rpm a 30 °C, por 72 h.

### **3.4. Implementação do Reator de Leito Fixo (PBR)**

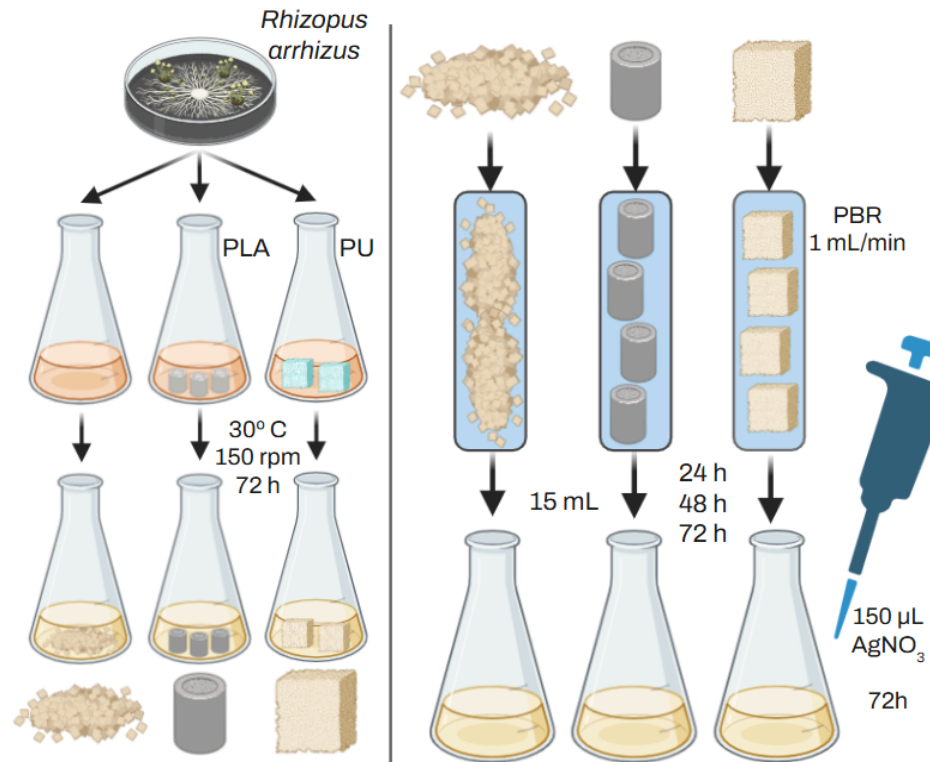
O aparato experimental foi constituído por uma bomba peristáltica, com vazão volumétrica contínua de 1 mL/min utilizada para alimentar o afluente em fluxo ascendente, por meio de uma tubulação de silicone (0,5 cm de diâmetro) até a entrada do PBR.

O afluente foi mantido em banho maria com circulação interna de água na temperatura do processo. O reator foi construído em vidro de borossilicato com diâmetro e comprimento nominais de 1,2 e 20 cm, respectivamente, cuja biomassa, tanto livre quanto imobilizada, constituíram seu leito. A temperatura do processo foi controlada no reator por uma jaqueta térmica mediante circulação de água oriunda de um banho termostatizado. As extremidades (entrada e saída) do reator foram equipadas por bandejas de distribuição usinadas em material antiaderente visando homogeneizar a dispersão radial do afluente através do leito do reator.

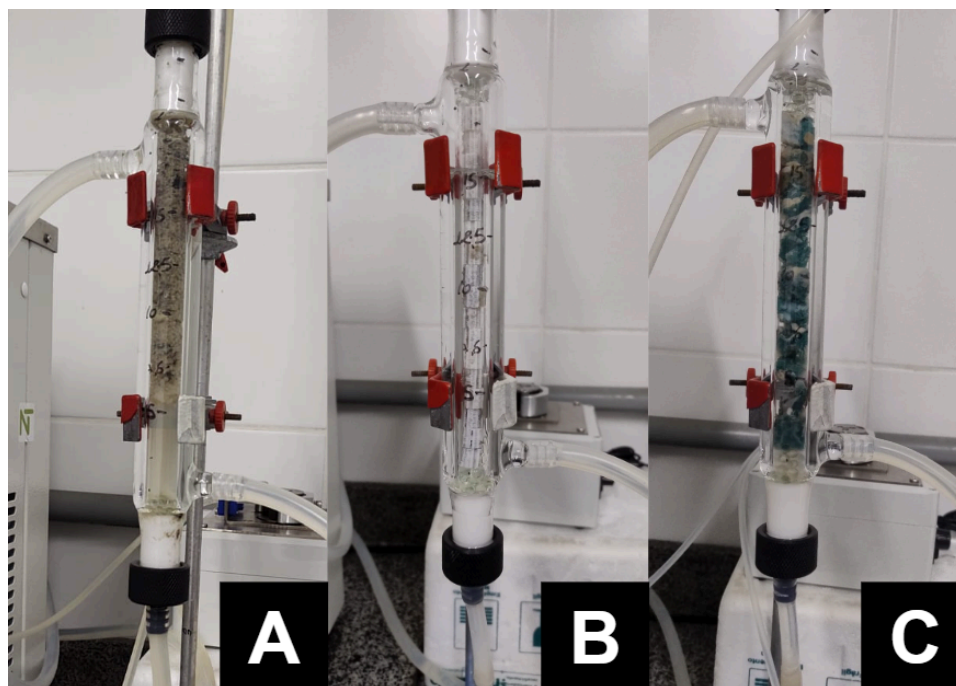
O leito do reator foi preenchido seguindo a seguinte configuração: (A) Biomassa livre, (B) Biomassa imobilizada nas peças de PLA e (C) Biomassa imobilizada nas esponjas de PU. Para a biomassa livre, o leito foi preenchido em 25%, 50%, 75% e 100% de capacidade, com o auxílio de microesferas de vidro para melhor comportar o conteúdo, enquanto os suportes carregando a biomassa preencheram sempre 100% do volume do leito.

A coleta de 15 mL do extrato enzimático foi realizada pela saída superior do reator, também submetida a uma série de filtragens à vácuo em papel filtro Millipore

(3  $\mu\text{m}$ ), seguida da adição de 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{AgNO}_3$ . A mistura foi mantida isenta de luz à agitação de 150 rpm a 30 °C por 72 h.



**Figura 3.** Esquema do processo de inoculação da biomassa fúngica, tanto livre quanto imobilizada nos suportes, e sua adição no PBR.



**Figura 4.** Leito do reator preenchido de acordo com as configurações: (A) Biomassa livre, (B) Aderida ao PLA; (C) Aderida ao PU.

### 3.5. Detecção da Biossíntese de AgNPs

Dois métodos foram utilizados para a comprovação da biossíntese de AgNPs nas amostras, após as 72 h da adição do precursor metálico. A primeira se dá pela detecção visual da coloração do extrato, que muda para um tom castanho escuro. Tal coloração é observada devido à oscilação dos elétrons livres na superfície metálica das NPs, fenômeno conhecido como ressonância de plásmons de superfície (SPR) (Al-Asbahi et al., 2024).



**Figura 5.** Mudança da coloração das amostras mediante biossíntese de AgNPs, exemplificado pelas coletas advindas da biomassa livre com 100% do leito de reator preenchido.

Em seguida, as amostras foram submetidas a uma leitura de espectroscopia UV-Vis, que comprovam a biossíntese pela banda de absorção típica desses materiais em comprimentos de onda entre 400 e 480 nm (Hieu et al., 2022).

### 3.6. Caracterização das AgNPs

Além da espectroscopia UV-Vis, as amostras foram analisadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), a fim de caracterizar as nanopartículas biossintetizadas em relação ao diâmetro hidrodinâmico, potencial de polidispersão e potencial zeta.

O diâmetro hidrodinâmico de partículas em suspensão apresenta um valor próximo, porém maior do que o diâmetro da NP, em decorrência de uma esfera de

solvatação proteica formada na superfície das NPs quando diluídas em algum solvente. O tamanho de maior relevância para as AgNPs é de 1 a 100 nm.

O índice de polidispersão (Pdl) indica a distribuição dos tamanhos das NPs analisadas, ou seja, quanto menor seu valor, menor será a variedade de diâmetros, mantendo maior homogeneidade de tamanhos. Os valores ideais para Pdl para as AgNPs biossintetizadas são os mais próximos de 0 até 0,3, uma vez que sua faixa vai de 0 a 1.

O potencial zeta (Pz) mede a estabilidade das NPs, analisando seus potenciais de superfície. Valores consideráveis de Pz, sejam positivos ou negativos, indicam alta repulsão entre as partículas em suspensão, que, por impedir sua aglomeração, confere estabilidade química aos materiais. NPs estáveis apresentam altos valores de Pz, positivos ou negativos, como valores menores que -20 mV ou maiores que +20 mV (Zwar, 2021).

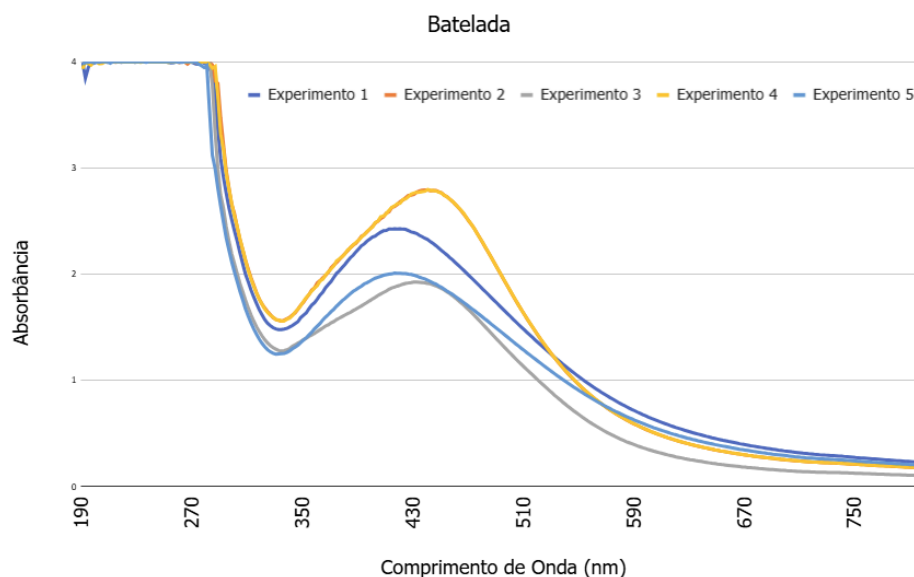
## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Biossíntese de AgNPs em Batelada

As AgNPs são materiais de grande interesse em indústrias alimentícias, médicas e farmacológicas, graças a suas propriedades antimicrobianas, catalíticas e ótima estabilidade química. Entretanto, métodos convencionais de síntese dessas nanopartículas fazem uso de reagentes tóxicos e geram resíduos danosos ao meio ambiente, o que impulsiona a busca por rotas alternativas mais sustentáveis, como aquelas mediadas por fungos filamentosos (Danagoudar et al., 2020; Mistry et al., 2021). Apesar desse potencial, a reutilização da biomassa e a viabilização de síntese contínua ainda representam desafios.

O fungo *Rhizopus arrhizus* foi submetido a diferentes configurações de crescimento de biomassa, para a avaliação de sua biossíntese de AgNPs em reator de leito fixo, que permite um cenário de síntese contínua e avaliar a relação quanto a quantidade de biomassa fúngica.

Em batelada, foi comprovada a capacidade dessa espécie para a biossíntese de AgNPs, pela formação de coloração castanho e ficou evidente a formação de AgNPS pelo gráfico de absorvância exibido na figura 6.



**Figura 6.** Espectro de absorção UV-Vis das amostras de batelada, onde cada linha colorida representa distintas réplicas experimentadas.

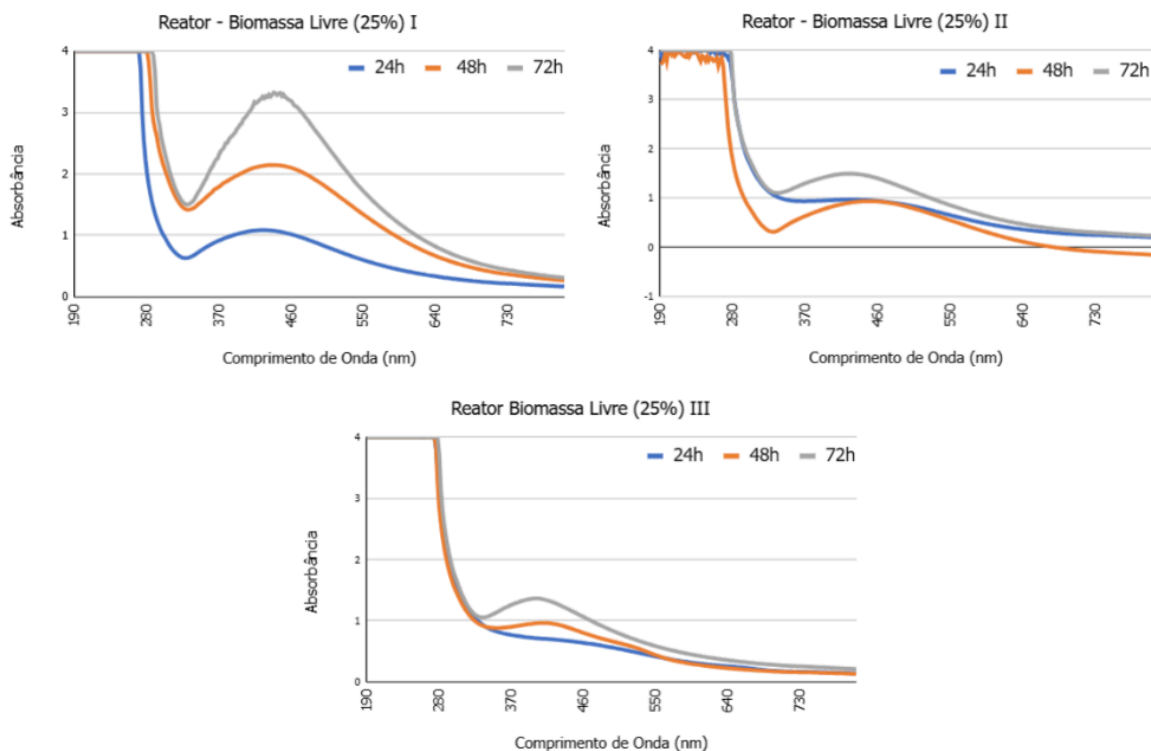
Todas as cinco réplicas realizadas apontam positivamente para a biossíntese, resultados que serviram de comparativo para com os de reator. Nos experimentos em batelada, a coleta do extrato enzimático só é realizada após 72 h da filtração do meio de cultura e sua substituição pela água deionizada. Portanto, qualquer síntese observada em reator, nos tempos de 24 e 48 h já representa um desempenho superior em termos de tempo de síntese.

## 4.2. Biossíntese de AgNPs em PBR

### 4.2.1. Biomassa Livre

#### *25% de preenchimento de leito*

Três réplicas foram conduzidas utilizando a biomassa livre de suportes preenchendo 25% do leito do reator. O primeiro apresentou curvas acentuadas, com seu pico atingindo maiores valores de absorbância com o passar dos tempos de coleta. O segundo exibiu curvas mais atenuadas nos tempos de 48 h e 72 h, bem semelhantes às do terceiro experimento. Os gráficos de absorbância podem ser observados na figura 7.



**Figura 7.** Espectros de absorção UV-Vis das amostras advindas da biomassa livre preenchendo 25% do leito do reator.

*Biomassa livre - 50% de preenchimento de leito*

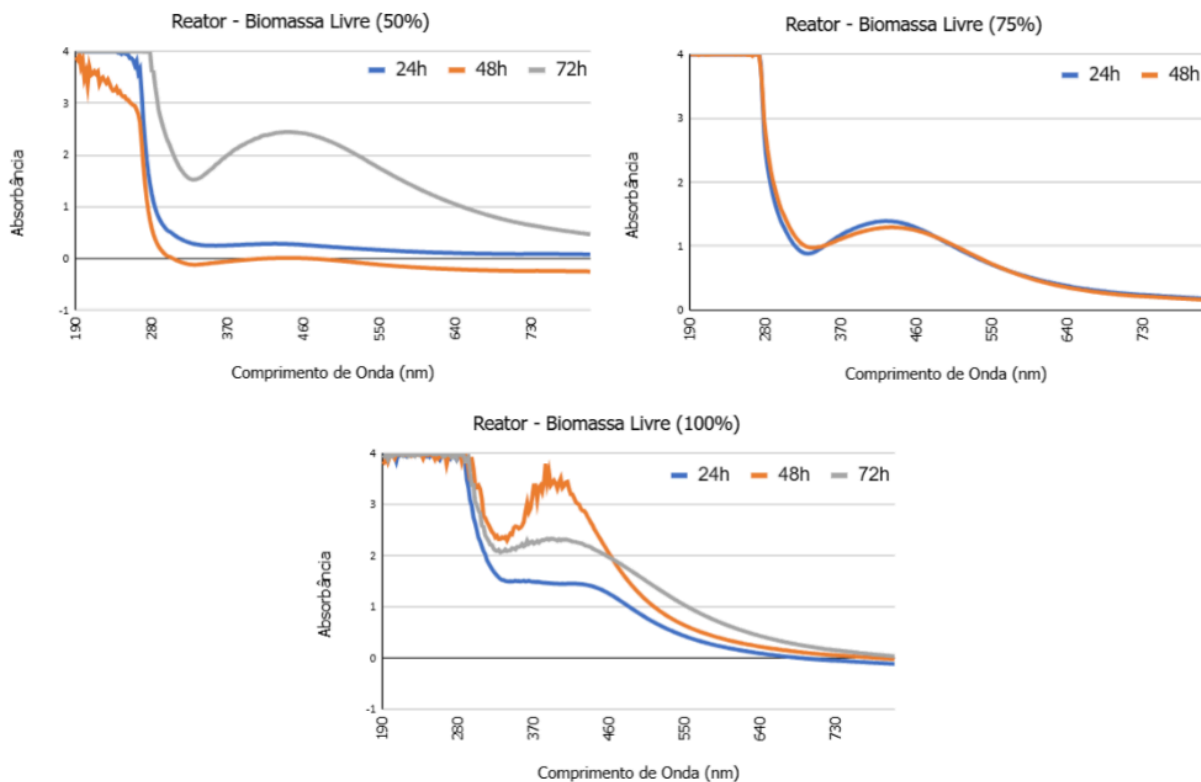
As amostras advindas da biomassa livre preenchendo 50% do leito do reator apresentaram síntese apenas no último tempo de coleta, resultado conferido no gráfico de absorbância (figura 8).

*Biomassa livre - 75% de preenchimento de leito*

O gráfico de absorbância das amostras provenientes de 75% de preenchimento do leito com biomassa livre (figura 8) exhibe curvas singelas nos dois tempos de coleta. A amostra de 72 h foi extraviada.

*Biomassa livre - 100% de preenchimento de leito*

As amostras resultantes do preenchimento completo do leito do reator pela biomassa livre apresentaram forte síntese na coleta de 48 h, atenuada em 72 h. No gráfico de absorbância (figura 8) podem ser percebidos ruídos nas linhas, que pode ser explicado pelo comprometimento do fluxo ascendente da água pelo reator causado pelo excesso e aglomeração de biomassa.

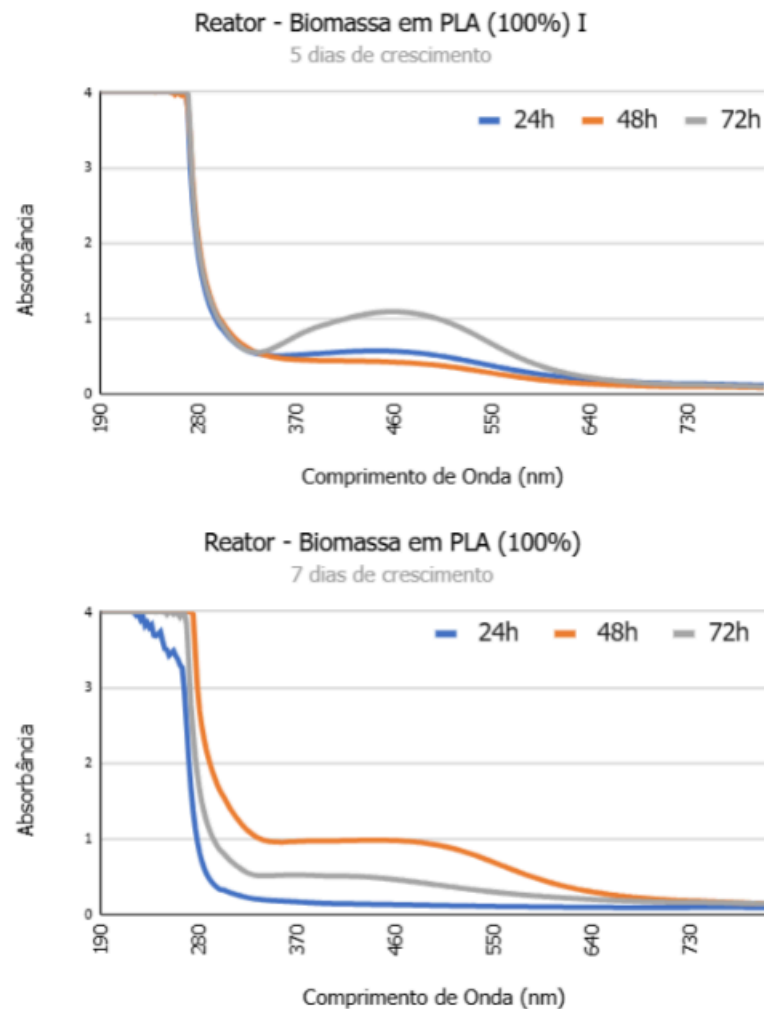


**Figura 8.** Espectro de absorção UV-Vis das amostras advindas da biomassa livre preenchendo 50%, 75% e 100% do leito do reator.

#### 4.2.2. Biomassa Imobilizada nos Suportes

##### *Biomassa aderida às peças de PLA*

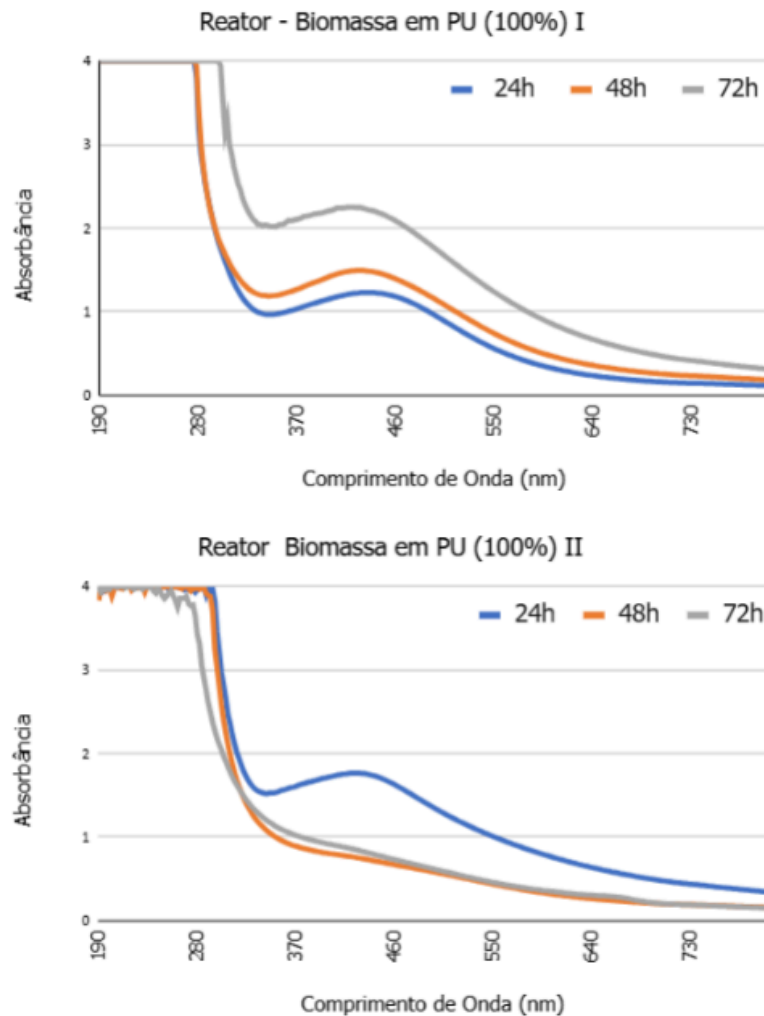
Três experimentos foram realizados utilizando a biomassa imobilizada nas peças de PLA, preenchendo 100% do leito do reator. O primeiro não apresentou nenhuma síntese, evidenciado pela ausência da mudança de cor do extrato. Para tentar contornar esse problema, nos experimentos seguintes a biomassa foi mantida em crescimento no MGLP por mais dias (5 e 7, respectivamente, ao invés de 3). A figura 9 exibe a absorbância desses experimentos, com uma diminuta síntese no último tempo de coleta de apenas um deles.



**Figura 9.** Espectros de absorção UV-Vis das amostras advindas da biomassa aderida às peças de PLA.

*Biomassa aderida às esponjas de PU*

Três experimentos foram efetuados utilizando a biomassa imobilizada nas esponjas de PU, preenchendo 100% do leito do reator. O primeiro apresentou acentuadas curvas, maiores de acordo com o passar dos tempos de coleta, e o segundo exibiu síntese apenas na coleta de 24 h. O terceiro experimento não expressou mudança de coloração após a adição do  $\text{AgNO}_3$ , provavelmente por contaminação da amostra. Por essa razão a ausência de seu gráfico na figura 10.



**Figura 10.** Espectros de absorção UV-Vis das amostras advindas da biomassa aderida às peças de PU.

Após análise dos nossos resultados pela observação do aspecto morfológico da suspensão coloidal, houve a transformação do filtrado aquoso de uma coloração amarelada para marrom escuro ou castanho. Isso acontece devido à excitação da ressonância plasmônica da superfície das nanopartículas (Balai et al. 2009; Korbekandi et al., 2013; Al-Asbahi et al., 2024). Essa observação do aspecto castanho do filtrado aquoso também foi observado em todos os resultados apresentados neste estudo, tanto em batelada quanto no reator de leito fixo com os diferentes suportes e com a biomassa livre. Essa análise só foi possível uma vez que os fungos podem realizar a produção de AgNPs de forma extracelular, quando o precursor metálico é adicionado ao filtrado enzimático e as NPs formadas estão livres, não sendo necessária a liberação de AgNPs das células como é feito no

método intracelular.

As análises espectrofotométricas revelaram que as amostras com biomassa livre preenchendo 25%, 50% e 100% do leito do reator apresentaram picos de absorvância situados na faixa de 400 a 450 nm, compatível com a região característica de nanopartículas metálicas. No caso da biomassa livre a 25% de preenchimento, observou-se a formação de curvas acentuadas, com aumento progressivo da intensidade de absorvância ao longo dos tempos de coleta, indicando um processo contínuo de síntese e provável crescimento das nanopartículas. A condição com 50% de preenchimento apresentou pico de absorvância na mesma faixa (400-450 nm), porém restrito ao último tempo de coleta, sugerindo que a síntese ocorreu de forma mais tardia ou menos eficiente. Para 75% de preenchimento, os espectros mostraram curvas discretas, o que indica baixa atividade de síntese, possivelmente em razão de limitações de oxigenação ou difusão de nutrientes. Na condição de 100% de preenchimento com biomassa livre, foi registrada forte resposta de absorvância em 48h, também dentro da faixa de 400 e 450 nm, seguida de atenuação em 72 h. Esse comportamento sugere intensa formação inicial de nanopartículas, seguida de possível aglomeração ou precipitação.

Por outro lado, as amostras com biomassa aderida às peças de PLA apresentaram resultados negativos ou apenas traços de síntese, com ausência de picos definidos na faixa de 400 e 450 nm. Já as biomassas aderidas às esponjas de PU exibiram curvas de absorvância mais pronunciadas e crescentes ao longo dos tempos de coleta, indicando que esse suporte favoreceu a formação de nanopartículas, também com absorvância característica entre 400 e 450 nm. O deslocamento do pico para comprimentos de onda mais longos, ou seja, maior absorvância, indica nanopartículas maiores (Elamawi et al., 2018). Muitas biomoléculas possuem capacidade de reagir com íons de prata, participando ativamente do processo de síntese de nanopartículas, dentre as quais destacam-se aquelas envolvidas em vias metabólicas complexas, associadas à transferência de elétrons durante a conversão de NADPH/NADH em NADP<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup> (Gudikandula et al., 2017).

Com base nisso, os resultados obtidos neste estudo indicam que mecanismos semelhantes possam ter ocorrido nas amostras de biomassa livre, especialmente

nas condições de 25%, 50% e 100% de preenchimento de leite, que apresentaram picos de absorvância entre a faixa característica da formação de AgNPs. Esse comportamento sugere que a maior atividade metabólica da biomassa livre favoreceu a liberação de enzimas. Por outro lado, a biomassa aderida às peças de PLA demonstrou pouca atividade de síntese, enquanto a biomassa aderida às esponjas de PU apresentou resultados relevantes, indicando que o suporte tem influência direta na eficiência da síntese biogênica de AgNPs.

Diferentes estudos que buscam otimizar a produção de AgNPs de origem fúngica analisam diversos parâmetros, tais como a quantidade de biomassa. Esse parâmetro foi observado em dois estudos que utilizaram a espécie *Fusarium oxysporum*, porém obtiveram resultados diferentes quanto à quantidade de biomassa. O estudo de Birla et al. (2013) demonstrou que com o aumento da biomassa fúngica da espécie *Fusarium oxysporum* de 0,2 g para 0,6 g suspensa em 100 mL de água destilada houve o aumento concomitante da produtividade de nanopartículas de prata. Já o estudo de Korbekandi et al. (2013) demonstrou que houve um aumento da produção de AgNPs com o aumento da biomassa, porém esse aumento não foi linear. O que demonstra que o aspecto da biomassa é importante e pode interferir na síntese de AgNPs.

Em relação à quantidade de biomassa, ela foi visualmente inferior nos suportes em comparação às configurações de biomassa livre, sendo ainda menor nas peças de PLA do que nas esponjas de PU. O PLA apresenta menor rugosidade, oferecendo uma área de contato reduzida para a fixação do fungo, o que pode explicar a baixa atividade de síntese. Por outro lado, o PU apresenta poros, favorecendo a retenção da biomassa, que mesmo em menor quantidade, ainda resulta em expressiva produção de AgNPs. Isso sugere que a eficiência da biossíntese está relacionada à qualidade da fixação que o suporte emprega.

### 4.3. Caracterização das AgNPs

A Tabela 1 apresenta os valores resultantes da análise e caracterização das amostras por DLS, para análise de seu tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e potencial de superfície zeta (Pz). O perfil desejável para as AgNPs biossintetizadas são as de tamanho médio até 100 nm, Pdl que variam de 0

**Tabela 1.** Caracterização das AgNPs biossintetizadas (valores destacados dentro do perfil).

Configuração de Síntese	Coleta	Tamanho Hidrodinâmico (em nm)	Índice de Polidispersão (Pdl)	Potencial Zeta (Pz)
Batelada	-	239,9	0,479	-14,7
	-	65,16	0,274	-22,9
	-	68,26	0,271	-29,7
	-	84,54	0,271	-15,2
	-	169,1	0,283	-17,8
Biomassa Livre 25%	24h	135,4	0,351	-15,6
	48h	142,8	0,227	-12,5
	72h	150,2	0,214	-9,78
Biomassa Livre 25% (2)	24h	187,6	0,266	-14,5
	48h	196	0,279	-14,4
	72h	159,5	0,235	-17
Biomassa Livre 25% (3)	24h	157,1	0,408	-15,6
	48h	161,8	0,558	-11,6
	72h	129,9	0,281	-15,6
Biomassa Livre 50%	24h	234,1	0,27	-11,7
	48h	342	0,377	-15,2
	72h	140,8	0,327	-16,9
Biomassa Livre 75%	24h	116,7	0,318	-13,4
	48h	117	0,268	-12,7
Biomassa Livre 100%	24h	69,13	0,404	-16,6
	48h	142,7	0,457	-21,8
	72h	121	0,394	-16,3
Biomassa aderida ao PLA (5d)	24h	137,4	0,421	-26,8
	48h	115,8	0,28	-16,7
	72h	133,9	0,263	-14,1
Biomassa aderida ao PLA (7d)	24h	-	-	-
	48h	144,1	0,22	-19,7
	72h	119,5	0,385	-15,2
Biomassa aderida ao PU (I)	24h	91,24	0,529	-23,4
	48h	116,9	0,376	-16,1
	72h	139,6	0,22	-14,9
Biomassa aderida ao PU (II)	24h	234	0,409	-20,9
	48h	130,8	0,295	-12,6
	72h	212,1	0,318	-16,1

a 0,3 e Pz de valores menores que -20 mV ou maiores que +20 mV. NPs com esse perfil são considerados colóides estáveis e com distribuição monodispersa de tamanhos.

De início, é possível observar que todas as amostras apresentaram valores negativos para Pz, variando de -9 mV a -29,7 mV. Os altos valores negativos para Pz indicam boa estabilidade das AgNPs sintetizadas, que previne a formação de agregados pela repulsão entre as partículas. A negatividade desses valores pode ser atribuída a componentes polifenólicos, que são liberados durante o crescimento dos fungos e participam do encapsulamento das AgNPs.

Estudos semelhantes resultaram em valores de Pz dentro da faixa encontrada nesse. Tyagi et al. (2019) utilizou o fungo *Beauveria bassiana* para a biossíntese de AgNPs, que tiveram valor de Pz de -22 mV. O estudo de Elamawi et al. (2018) encontrou o valor de -19,7 mV para as partículas biossintetizadas pelo fungo *Trichoderma longibrachiatum*. Omran et al. (2018) relatou o valor de -16,7 mV para as AgNPs biossintetizadas por *Aspergillus brasiliensis*.

Acerca do tamanho hidrodinâmico, é possível observar muitos valores que excedem 100 nm. O diâmetro de AgNPs biossintetizadas por fungos muitas vezes excede esse valor em decorrência do encapsulamento por biomoléculas fúngicas, como proteínas e enzimas, que atuam como agente redutores durante a síntese desses materiais. Em relação às configurações, as amostras advindas de biomassa livre apresentaram mais valores acima do tamanho ideal quando comparadas com as amostras advindas de biomassa imobilizada com os suportes.

Sobre o Pdl, muitas das amostras se encontram dentro da faixa ideal de polidispersão, indicando alta homogeneidade dos tamanhos das AgNPs biossintetizadas. Ambas as configurações não diferem em serem mais ou menos suscetíveis a valores maiores ou menores de Pdl, sendo bem homogêneas em ambos os casos.

## 5. Conclusões

A biossíntese fúngica contínua de AgNPs em PBR mostrou-se viável e fortemente influenciada pelo tipo de suporte empregado. As esponjas de PU se

destacaram como o material mais eficiente para a síntese, promovendo adequada adesão da biomassa e permitindo a formação de AgNPs estáveis.

Em contraste, as peças de PLA apresentaram menor eficiência, possivelmente devido à limitada fixação fúngica em sua superfície. Ainda assim, a natureza biodegradável do PLA e sua potencial adaptação por modificações superficiais o tornam um suporte promissor para demais pesquisas.

Num geral, as amostras em reator apresentaram maiores nanopartículas, mas bem estáveis e homogêneas na distribuição de tamanhos, tornando este um método sustentável auspicioso para ser aperfeiçoado e otimizado para uma síntese mais limpa de AgNPs.

## 6. Referências Bibliográficas

Aguiar, A.P.; Ottoni, C.A.; Aquaroli, C.L.R.; Mendes, E.C.V.; Simões, M.F.; Barbieri, E. Mycogenic silver nanoparticles from *Penicillium citrinum* IB-CLP11 - their antimicrobial activity and potential toxicity effects on freshwater organisms. *Environmental Science-Nano*. v. 11:2229-2238 (2024).

Al-Asbahi, M.G.S.S.; Al-Ofiry, B.A.; Saad, F.A.A; et al; Silver nanoparticles biosynthesis using mixture of *Lactobacillus* sp. and *Bacillus* sp. growth and their antibacterial activity. *Sci Rep*. v. 14:10224 (2024).

Alkan-Tas, B.; Durmus-Sayar, A.; Duman, E.; Sevinis-Ozbulut, B.; Unlu, A.; Binay, B.; Unal, S.; Unal, H. Antibacterial hybrid coatings from halloysite-immobilized lysostaphin and waterborne polyurethanes. *Progress in Organic Coatings*. v. 156:106248 (2021).

Bamal, D.; Singh, A.; Chaudhary, G.; Kumar, M.; Singh, M.; Rani, N.; Mundlia, P.; Sehrawat, A.R. Silver Nanoparticles Biosynthesis, Characterization, Antimicrobial Activities, Applications, Cytotoxicity and Safety Issues: An Updated Review. *Nanomaterials*. v. 11:2086 (2021).

Balaji, D. S. et al. Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *Cladosporium cladosporioides* fungus. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*. v. 68:88-92 (2009).

Birla, S. S., Gaikwad, S. C., Gade, A. K., & Rai, M. Rapid synthesis of silver nanoparticles from *Fusarium oxysporum* by optimizing physiocultural conditions. *The Scientific World Journal*, v. 2013:796018 (2013).

Bruna, T.; Maldonado-Bravo, F.; Jara, P.; Caro, N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 22:7202 (2021).

Chopra, H.; Bibi, S.; Singh, I.; Hasan, M.M.; Khan, M.S.; Yousafi, Q.; Baig, A.A.; Rahman, M.M.; Islam, F.; Emran, T.B.; Cavalu, S. Green Metallic Nanoparticles: Biosynthesis to Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* v. 10:874742 (2022).

Danagoudar, A.; Pratap, G.K.; Shantaram, M.; Ghosh, K.; Kanade, S.R.; Joshi, C.G. Characterization, cytotoxic and antioxidant potential of silver nanoparticles biosynthesised using endophytic fungus (*Penicillium citrinum* CGJ-C1). *Mater Today Commun.*, v. 25:101385. (2020).

Dacewicz, E.; Grzybowska-Pietras, J. Polyurethane Foams for Domestic Sewage Treatment. *Materials* v. 14:933 (2021).

Das, C.G.A.; Kumar, V.G.; Dhas, T.S.; Karthick, V.; Govindaraju, K.; Joselin, J.M.; Baalamurugan, J. Antibacterial activity of silver nanoparticles (biosynthesis): A short review on recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v. 27:101593 (2020).

Dawadi, S.; Katuwal, S.; Gupta, A.; Lamichhane, U.; Thapa, R.; Jaisi, S.; Lamichhane, G.; Bhattarai, D.P.; Parajuli, N. Current Research on Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications. *Journal of Nanomaterials*. v. 2021:6687290 (2021).

Długosz, O.; Banach, M. Continuous Production of Silver Nanoparticles and Process Control. *J Clust Sci.* v. 30:541–552 (2019).

Elamawi, R.M.; Al-Harbi, R.E.; Hendi, A.A. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egyptian journal of biological pest control.* v. 28:1-11 (2018).

Guilger-Casagrande, M.; Lima, R. Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* v. 7:287 (2019).

Hieu, H.N.; Trang, D.T.H.; Hien, V.T.T.; Nghia, N.V.; Lam, N.T.; Nguyen, T.M.D. Microorganism-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus niger* and *Bacillus megaterium*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures.* v. 17:359-367 (2022).

Jamkhande, P.G.; Ghule, N.W.; Bamer, A.H.; Kalaskar, M.G. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* v. 53:101174 (2019).

Joseph, T.M.; Kallingal, A.; Suresh, A.M.; Mahapatra, D.K.; Hasanin, M.S.; Haponiuk, J.; Thomas, S. 3D printing of polylactic acid: recent advances and opportunities. *Int J Adv Manuf Technol.* v. 125:1015-1035 (2023).

Khodashenas, B.; Ghorbani, H.R. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry,* v. 12:1823-1838 (2019).

Korbekandi, H.; Ashari, Z.; Iravani, S.; Abbasi, S. Optimization of Biological Synthesis of Silver Nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. *Iran J Pharm Res. Summer.* v. 12:289-98 (2013).

Lee, S.H.; Jun, B.H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences.* v. 20:865 (2019).

Li, S.; Zhao, S.; Hou, Y.; Chen, G.; Chen, Y.; Zhang, Z. Polylactic Acid (PLA) Modified by Polyethylene Glycol (PEG) for the Immobilization of Lipase. *Appl Biochem Biotechnol.* v. 190:982-996 (2020).

Mistry, H.; Thakor, R.; Patil, C.; Trivedi, J.; Bariya, H. Biogenically proficient synthesis and characterization of silver nanoparticles employing marine procured fungi *Aspergillus brunneoviolaceus* along with their antibacterial and antioxidative potency. *Biotechnol Lett.* v. 43:307-316. (2021).

Monnier, A.; Tawil, E.A.; Nguyen, Q.T.; Valleton, J.; Fatyeyeva, K.; Deschrevel, B. Functionalization of poly(lactic acid) scaffold surface by aminolysis and hyaluronan immobilization: How it affects mesenchymal stem cell proliferation. *European Polymer Journal.* v. 107:202-217 (2018).

Okafor, O.; Weilhard, A.; Fernandes, J.A.; Karjalainen, E.; Goodridge, R.; Sans, V. Advanced reactor engineering with 3D printing for the continuous-flow synthesis of silver nanoparticles†. *React. Chem. Eng.* v. 2:129-136 (2017).

Omran, B.A.; Nassar, H.N.; Fatthallah, N.A.; Hamdy, A.; El-Shatoury, E.H.; El-Gendy, N.S. Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles mycosynthesized by *Aspergillus brasiliensis*, *Journal of Applied Microbiology.* vol. 125:370-382 (2018).

Othman, A.M.; Elsayed, M.A.; Al-Balakocy, N.G.; Hassan, M.M.; Elshafei, A.M. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles induced by fungal proteins and its application in different biological activities. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* v. 17:8 (2019).

Pryschepa, O.; Pomastowski, P.; Buszewski, B. Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. *Advances in Colloid and Interface Science.* v. 284:102246 (2020).

Qidwai, A.; Pandey, A.; Kumar, R.; Shukla, S. K.; Dikshit, A. Advances in biogenic nanoparticles and the mechanisms of antimicrobial effects. *Indian J. Pharm. Sci.* v. 80:592-603 (2018).

Siddiqi, K.S.; Husen, A.; Rao, R.A.K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J. Nanobiotechnol.* v. 16:1-28 (2018).

Sofi, M.A.; Sunitha, S.; Sofi, M.A.; Pasha, S.K.K. Choi, D. An overview of antimicrobial and anticancer potential of silver nanoparticles. *Journal of King Saud University - Science.* v. 34:101791 (2022).

Tyagi, S.; Tyagi, P.K.; Gola, D.; Chauhan, N. Bharti, R.K. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using entomopathogenic fungus: characterization and antibacterial potential. *SN Appl. Sci.* vol. 1:1545 (2019).

Ye, J.; Chu, T.; Gao, B.; He, B. A Versatile Approach for Enzyme Immobilization Using Chemically Modified 3D-Printed Scaffolds. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering.* v. 7:21 (2019).

Zwar, I. Biossíntese de nanopartículas de prata por actinomicetos e potencial aplicação na agricultura. Dissertação de PPG, USP (2021).

**PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Discente:** GABRIEL KOMOREK DE RAMOS

**Título:** “Implementação do processo de biossíntese de nanopartículas de prata em reator de leito fixo utilizando biomassa fúngica imobilizada em diferentes suportes”

**Orientador:** Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

**Curso/Habilitação:** Bacharelado em Ciências Biológicas/Gerenciamento Costeiro

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni	<i>Aprovado</i>
Dra. Roberta Alves Merguizo Chinellato	<i>Aprovado</i>
MSC. Arthur Pérez Aguiar	<i>Aprovado</i>

**PARECER:**

*Algumas sugestões de correções no documento para a entrega final.. Já no foi elaborado quando a apresentação foi realizada.*

**CONCEITO FINAL:**

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que o discente **Gabriel Komorek de Ramos** obteve o seguinte conceito:

APROVADO

REPROVADO

São Vicente, 12 de dezembro de 2025.

*Cristiane Angélica Ottoni*  
**Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni**

*Roberta Alves Merguizo Chinellato*  
**Dra. Roberta Alves Merguizo Chinellato**

*Arthur Pérez Aguiar*  
**MSC. Arthur Pérez Aguiar**

Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista  
 Praça Infante D. Henrique s/nº - CEP 11330-900 - São Vicente (SP) - Brasil  
 Tel. (13) 3569-7100 - graduacao.clp@unesp.br