

Tatiana Gisset Pineda Vásquez

**BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA A PARTIR
DE CINZA DA CASCA DE ARROZ USANDO O FUNGO
*Fusarium oxysporum***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Dachamir Hotza (UFSC)

Coorientador: Carlos Henrique Lemos Soares (UFSC)

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
a través do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

Pineda Vásquez, Tatiana Gisset
Biossíntese de nanopartículas de sílica a partir de
Cinza da casca de arroz usando o fungo *Fusarium oxysporum*
/ Tatiana Gisset Pineda Vásquez; orientador, Dachamir
Hotza; co-orientador, Carlos Henrique Lemos Soares. -
130p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Engenharia de Materiais.

Inclui referências

1. Ciência e Engenharia de Materiais. 2. Cinza da casca
de Arroz. 3. Sílica. 4. *Fusarium oxysporum*.
5. Biossíntese. I. Hotza, Dachamir. II. Lemos Soares,
Carlos Henrique. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais. IV. Título.

Tatiana Gisset Pineda Vásquez

**BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA A PARTIR
DE CINZA DA CASCA DE ARROZ USANDO O FUNGO**

Fusarium oxysporum

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 25 de Fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Antonio Pedro Novaes de Oliveira,
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Dachamir Hotza
Orientador-EQA/UFSC

Prof. Dr. Carlos H. Lemos Soares
Coorientador-CCB/UFSC

Prof. Dra Ana E. Casas Botero
UPB-Colômbia

Prof. Dr. Wilson Acchar
UFRN

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.
EQA/UFSC

Prof. Dr. Cesar V. Franco
Química/UFSC

Prof. Dr. Carlos R. Rambo
EEL/UFSC

À memória das minhas amadas mãe e
tia, *Marta e Emilse*,

Ao meu irmão, e à minha linda tia
Celina.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde, e pela fortaleza para realizar este trabalho.

Aos professores Dachamir Hotza e Carlos Soares, pela orientação, dedicação, paciência e pelas palavras certas no momento justo, por acreditar em mim e neste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina: Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PGMAT), aos seus professores e funcionários, em especial ao Rogério.

Ao Centro de Ciências Biológicas (CCB)

Aos laboratórios CERMAT, VITROCER, LCP, LABMATE, LABMAT, LCME.

Ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (Reuni), pelo suporte financeiro durante o Doutorado.

Aos meus amigos e colegas de Materiais: Jaime Aguilar, Angela, Ida, Grazielle, Karla, Denise, Francielly, Sabrina, Anelise, Jaime, Giovana pela ajuda e amizade.

Aos meus colegas do CCB: Tião, Simão, Paulo, Rodrigo, Ivana, Yoná e em especial a Mabel por sua contribuição como bolsista de iniciação científica.

Ao meu namorado Julian, pelo amor, doçura, pela companhia, dedicação, compreensão, paciência e ajuda incondicional.

À minha família por ser meu suporte em todo momento e por apoiar meus projetos.

Aos todos meus amigos colombianos em Florianópolis, em especial a Verônica, Sergio, Renzo, Luis e Jaime L, pela alegria, ajuda e conselhos.

À minha querida amiga Anita, por sua amizade incondicional, por estar em cada momento mesmo na distância.

Aos meus colegas da UPB pela ajuda e apoio.

“Quem nunca errou, nunca experimentou nada novo.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Neste trabalho, avaliou-se uma nova rota biológica a temperatura e pressão ambiente para biotransformação da sílica contida na cinza da casca de arroz (CCA) usando o fungo *Fusarium oxysporum*. Ensaios foram realizados para caracterização do bioprocessamento através do seguimento de parâmetros como produção de biomassa, consumo de substrato, pH, produção de ácidos orgânicos e concentração de CCA. A sílica solúvel foi analisada em diversos meios de cultura: malte-glicose (MG), malte-levedo-glicose (MYG), batata-glicose (PG) e arroz-glicose (RG). As proteínas extracelulares produzidas pelo fungo foram analisadas por SD-PAGE e métodos colorimétricos. A CCA e as nanopartículas foram analisadas por DRX, IV, potencial zeta, BET, MEV e MET antes e depois do bioprocessamento. Os resultados mostraram que algumas proteínas com tamanhos entre 24, 55 e 70 kDa, e o metabolismo do fungo são provavelmente responsáveis pela dissolução e transformação da sílica a partir da CCA. Os meios de cultura MG e PG apresentaram melhores resultados com relação à transformação cristalina da sílica e com a dissolução da mesma. Foi verificado que há uma transformação da CCA em nanopartículas de sílica quase esféricas de tamanhos entre 6 a 10 nm, área de superfície de 177 m²/g e com estrutura cristalina.

Palavras-chave: Cinza da casca de Arroz, Sílica, *Fusarium oxysporum*, Biossíntese.

ABSTRACT

In this study a biological route at room temperature for the biotransformation of rice husk ash (RHA) in silica nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum* was evaluated. Tests were carried out by monitoring the fungal biomass production, substrate consumption, pH, organic acids production. Solubilized silica was analyzed in different culture media: malte-glucose (MG), malte-yeast-glucose (MYG), potato-glucose (PG) and rice-glucose (RG). Extracellular proteins were analyzed by SD-Page and colorimetric methods. RHA and silica nanoparticles were analyzed by XRD, FTIR, zeta potential, BET, SEM and TEM, before and after bioprocessing. The results showed that the production of organic acids was not totally related to the solubility of silica and some proteins that are (24, 55 and 70 kDa) and the metabolism of the fungus with the exposure of RHA that contribute to this. MG and PG media were selected for *F. oxysporum* growth and production of silica nanoparticles. Zeta potential, XRD and SEM results showed a transformation of silica nanoparticles in RHA. The results indicated that through a biological process at room temperature a biotransformation of rice husk ash is reached by bioleaching and enzymatic action allowing the synthesis of silica quasi-spherical nanoparticles with size between 6 and 40 nm, surface area of 177 m²/g, and crystalline structure.

Keywords: Rice Husk Ash, Silica, *Fusarium oxysporum*, Biosynthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Produção de arroz no Brasil em 2012.....	7
Figura 2.2 – Estrutura da sílica em configuração tetraédrica.....	8
Figura 2.3 – Partículas irregulares de SiO ₂ com diâmetro médio de 0,030 µm, obtidas mediante um processo térmico com pré-tratamento químico.	10
Figura 2.4 – Partículas esféricas de SiO ₂ com diâmetro médio entre 75-252 nm, obtidas mediante síntese química usando silicato de sódio sintetizado pela lixiviação ácida com ácido fosfórico.	12
Figura 2.5 – Espículas de SiO ₂ amorfa com diâmetros entre 0,7 e 0,9 µm, e 15 µm de comprimento.....	14
Figura 2.6 – Esquema de síntese de sílica estruturada por algas	15
Figura 2.7 – MEV das partículas de Si/SiO ₂ sintetizadas mediante <i>Actinobacter</i> sp.	16
Figura 2.8 – MEV e DRX das nanopartículas de sílica a partir da casca de arroz usando <i>F. oxysporum</i>	19
Figura 3.1– Curva de crescimento do fungo <i>F. oxysporum</i>	32
Figura 3.2–Variação do pH durante o processo de biotransformação da CCA pela ação do <i>F. oxysporum</i>	33
Figura 3.3–Concentração de sílica solúvel em função do tempo para soluções de CCA com e sem <i>F. oxysporum</i> e meio de cultura com presença de <i>F.oxysporum</i>	34
Figura 3.4 – Concentração de sílica em função do tempo para soluções de silicato de sódio e meio de cultura com e sem <i>F. oxysporum</i>	35
Figura 3.5 – Espectro de infravermelho da CCA antes e após o tratamento com <i>F. oxysporum</i>	36
Figura 3.6 – Difractograma de cinza da casca de arroz.	36
Figura 3.7 – Difractograma de cinza da casca de arroz após o tratamento com <i>F. oxysporum</i> à temperatura de 28°C, pressão atmosférica. Picos destacados correspondem à cristobalita.	37
Figura 3.8 – Micrografias da cinza da casca de arroz antes (a,c, e) e após o tratamento com <i>F. oxysporum</i> a 28°C e pressão atmosférica (b,d,f)	38
Figura 4.1 – Dissolved silica from RHA along the time in the presence of (a) <i>F.oxysporum</i> and (b) water.	45
Figura 4.2 – SEM micrographs of RHA surfaces: (A) upper and (B) lower surfaces before fungal treatment; (C) upper and (D) lower surfaces after fungal treatment.	46
Figura 5.1- Modelo de superfície de resposta para produção de POD.....	53
Figura 5.2- Modelo de superfície de resposta para a produção de β-glicosidase.	54
Figura 5.3-Modelo de superfície de respota para a dissolução da sílica	55
Figura 5.4- Micrografias da cinza da casca de arroz antes (A) e depois (B) do tratamento com <i>F. oxysporum</i> a 28 °C (pH = 6,5, t = 240 h, GC = 3 g/L), sílica solubilizada (C).	56
Figura 5.5- Modelo de superfície de resposta: tamanho de partícula da CCA...57	57

Figura 6.1 –CO ₂ production from <i>F. oxysporum</i> growing in media MG and MGYP, supplemented with RHA.	66
Figura 6.2 – Glucose consumption curve by <i>F. oxysporum</i> growing in MG and MGYP media.	68
Figura 6.3 – Organic acids curves compared to soluble silica for the MGYP and MG culture media.	69
Figura 6.4 – Electrophoresis results: (A) Extracellular proteins of <i>F. oxysporum</i> growing in MG medium Page, (B) Extracellular proteins of <i>F. oxysporum</i> growing in MG medium supplemented with RHA, (C) Page Ruler Prestained 10-170 kDa (Thermo).	70
Figura 6.5 – XRD diffractograms for RHA and silica nanoparticles after the biotransformation using <i>F. oxysporum</i>	71
Figura 6.6 – Zeta potential of silica particles in RHA before and after the interaction with <i>F. oxysporum</i>	72
Figura 6.7 – SEM micrographs and EDX of lower surface RHA before (A,C) and after (B,D) the interaction with <i>F. oxysporum</i>	73
Figura 7.1– <i>Fusarium oxysporum</i> em diferentes meios de cultura sem a presença da CCA: a) extrato de arroz, b) extrato de malte, c) extrato de batata, d) tintura com azul de algodão.	81
Figura 7.2– Crescimento do <i>F. oxysporum</i> em extrato de malte e com presença de diferentes concentrações de CCA: 1,0; 2,0 e 3,0% respectivamente, a 28°C e 6 dias de crescimento.	83
Figura 7.3– Produção de proteínas totais por <i>F. oxysporum</i> em extrato de arroz, batata e malte em meio líquido (FML) e sistema sólido-líquido (FSS) a pH 6,5 e 28°C.	84
Figura 7.4– Produção de peroxidase pelo <i>F. oxysporum</i> em extrato de arroz, batata e malte em meio líquido (FML) e sistema sólido-líquido(FSS) a pH 6,5 e 28°C.	86
Figura 7.5– Produção de β-glicosidase pelo <i>F. oxysporum</i> em extrato de arroz, batata e malte em meio líquido (FML) e sistema sólido-líquido (FSS) a pH 6,5 e 28°C.	88
Figura 7.6– Sílica dissolvida por <i>F. oxysporum</i> em extrato de arroz, batata e malte em meio líquido (FML) e sistema sólido-líquido (FSS) a pH 6,5 e 28°C.	90
Figura 7.7– Potencial zeta das partículas de sílica antes(A) e depois da interação com <i>F. oxysporum</i> em extrato de arroz, batata e malte em meio líquido(FML) e sistema sólido-líquido(FSS) a pH 6,5 e 28°C.	92
Figura 7.8– Micrografias da sílica biotransformada por <i>F. oxysporum</i> em meio líquido através de MEV (A-C) e MET (D-F)em diferentes substratos, A e D: arroz integral; B e E: batata; C e F: malte. Nas Fig. (C-D) encontra-se inserida a difração de elétrons da área selecionada das micrografias correspondentes.	93
Figura 7.9-DTP das nanopartículas de SiO ₂ no meio de cultura contendo extrato de arroz.	94
Figura 7.10– DTP das nanopartículas de SiO ₂ no meio de cultura contendo extrato de batata.	94

Figura 7.11- DTP das nanopartículas de SiO₂ no meio de cultura contendo extrato de malte.95

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^k para a síntese de sílica.	51
Tabela 5.2 – Composição química da CCA.....	58
Tabela 7.1 – Parâmetros obtidos pelo modelo de Gompertz modificado ajustado ao crescimento do <i>F. oxysporum</i> nos diferentes meios de cultura.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BG	β - Glicosidase
CA	Casca de arroz
CCA	Cinza da casca de arroz
CIBIOT	<i>Centro de Estudios e Investigaciones en Biotecnologia</i>
CERMAT	Nucleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos
CVD	Deposição química de vapor
CVI	Infiltração química de vapor
CVI-R	Reação de infiltração química de vapor
DMF	N,N-dimetilformamida
DRX	Difração de Raios X
EDS	<i>Energy dispersive X-ray spectroscopy</i>
FML	Fermentação em meio líquido
FSS	Fermentação em suporte sólido
GC	Concentração de glicose
LABMAT	Laboratório Interdisciplinar de Materiais
LAMATE	Laboratório de Materiais Elétricos
LCP	Laboratório de Controle de Processos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
PIE	Potencial isoelétrico
RH	<i>Rice husk</i>
RHA	<i>Rice husk ash</i>
PNPG	p-nitrofenil- β -Dglucopyranoside
POD	Peroxidase
SAED	<i>Selected Area Electron Diffraction</i>

SEM

Scanning Electron Microscopy

UFSC

Universidade Federal de Santa Catarina

UPB

Universidad Pontificia Bolivariana λ Duração da fase *lag* μ_{\max}

Velocidade específica máxima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	2
1.1.1 Objetivo Geral	2
1.1.2 Objetivos Específicos	2
1.2 ESTRUTURA DA TESE	2
1.3 ORIGINALIDADE	3
1.4 REFERÊNCIAS	4
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 VALORIZAÇÃO DA CASCA DE ARROZ.....	7
2.2 SÍLICA	8
2.3 CINZA DA CASCA DE ARROZ.....	8
2.4 SÍNTESE DE MATERIAIS NANOMÉTRICOS	9
2.4.1 Método de cima para baixo (<i>top down</i>)	9
2.4.2 Método de baixo para cima (<i>bottom-up</i>).....	11
2.4.3 Rotas biológicas.....	13
2.5 <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	17
2.6 REFERÊNCIAS	19
3 BIOTRANSFORMAÇÃO DA CINZA DA CASCA DE ARROZ EM NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MEDIANTE <i>Fusarium oxysporum</i>	29
3.1 INTRODUÇÃO.....	29
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.3 MATERIAIS	30
3.4 MÉTODOS.....	31
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.5.1 Análise da curva de crescimento.....	32
3.5.2 Análise da variação do pH.....	33
3.5.3 Análise da sílica solúvel	33
3.5.4 Análise dos grupos funcionais da CCA antes e após a biotransformação	35
3.5.5 Determinação da composição de fases da CCA.....	36
3.5.6 Análise da microestrutura das partículas da CCA.....	37
3.6 CONCLUSÃO.....	38
3.7 REFERÊNCIAS	39
4 EXTRACELLULAR SYNTHESIS OF SILICA OXIDE PARTICLES BY <i>Fusarium oxysporum</i> FROM RICE HUSK ASH	43
4.1 INTRODUCTION	43
4.2 MATERIALS AND METHODS	43
4.2.1 Materials	43
4.2.2 Processing.....	44
4.2.3 Characterization.....	44

4.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	44
4.4	CONCLUSIONS	46
4.5	REFERENCES	47
5 INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE PROCESSO NA OBTENÇÃO DE SÍLICA A PARTIR DE CINZA DA CASCA DE ARROZ PELA AÇÃO DE <i>Fusarium oxysporum</i>.....		
		49
5.1	INTRODUÇÃO	49
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.2.1	Materiais	50
5.2.2	Bioprocesso.....	50
5.2.3	Planejamento experimental.....	50
5.2.4	Dosagem de enzimas e proteínas totais.....	51
5.2.5	Quantificação da sílica solúvel	51
5.2.6	Análise química	51
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.3.1	Planejamento experimental.....	51
5.3.2	Proteína total extracelular	52
5.3.3	Peroxidasas totais.....	52
5.3.4	β -Glicosidase	53
5.3.5	Sílica solúvel da CCA.....	54
5.3.6	Análise microestrutural da CCA.....	56
5.3.7	Tamanho de partícula.....	57
5.3.8	Análise química	57
5.4	CONCLUSÕES	58
5.5	REFERÊNCIAS.....	59
6 GROWTH MEDIA SELECTION FOR BIOTRANSFORMATION OF SILICA NANOPARTICLES FROM RICE HUSK ASH USING <i>Fusarium oxysporum</i>		
		63
6.1	INTRODUCTION	63
6.2	MATERIALS AND METHODS	64
6.2.1	Materials	64
6.2.2	Biotransformation conditions.....	64
6.2.3	Characterization of biotransformation process.....	64
6.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	65
6.4	CONCLUSIONS	73
6.5	REFERENCES	74
7 AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA A BIOTRANSFORMAÇÃO DA CINZA DA CASCA DE ARROZ MEDIANTE <i>Fusarium oxysporum</i>		
		77
7.1	INTRODUÇÃO	77
7.2	MATERIAIS E MÉTODOS	77
7.2.1	Cinza da casca de arroz.....	77
7.2.2	<i>Fusarium oxysporum</i>	78

7.2.3 Meios de cultura	78
7.2.4 Avaliação morfológica e cinética de crescimento radial do micélio	78
7.2.5 Bioprocesso	79
7.2.6 Caracterização das principais enzimas associadas à obtenção de sílica	79
7.2.7 Quantificação da sílica solúvel	80
7.2.8 Potencial zeta	80
7.2.9 Caracterização microestrutural da CCA	80
7.2.10 Caracterização das fases cristalográficas	80
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
7.3.1 Morfologia do <i>F. oxysporum</i>	81
7.3.2 Análise da atividade enzimática	83
7.3.3 Análise da sílica dissolvida	88
7.3.4 Potencial zeta	91
7.3.5 Análise microestrutural	92
7.3.6 Fases cristalinas	95
7.4 CONCLUSÃO	96
7.5 REFERÊNCIAS	97
8 CONSIDERAÇÕES E RECOMENDAÇÕES FINAIS	103

1 INTRODUÇÃO

Países em desenvolvimento possuem recursos agrários e subprodutos industriais disponíveis em abundância, muitos dos quais são subutilizados em uma grande variedade de produtos de baixo valor agregado. Devido à crescente preocupação mundial pela obtenção de novas fontes renováveis de energia e pelos danos causados ao meio ambiente, múltiplas pesquisas têm sido desenvolvidas para encontrar, usar e desenvolver tecnologias baseadas nos recursos agrários. Essas novas tecnologias geram usualmente novos resíduos, que poderiam tornar-se materiais com considerável valor agregado.

Atualmente a casca de arroz (CA) é um dos subprodutos do beneficiamento do arroz, um produto alimentício fundamental na maioria dos países. Em 2012 a produção de arroz, no Brasil foi de aproximadamente 12 milhões de toneladas, que corresponde a cerca de 2,4 milhões de toneladas de casca de arroz, sendo um candidato para valorização no setor energético. Nesses últimos anos, a casca de arroz tem sido empregada como biocombustível em diferentes processos industriais como pirólise, gaseificação e combustão em leitos fixos e fluidificados em indústrias, principalmente no próprio setor de beneficiamento de arroz [1]. Entre 15 a 20% da massa da CA é cinza; no contexto da produção anual brasileira corresponde a ~365 mil toneladas [2,3].

A cinza da casca de arroz (CCA) encontra-se na forma amorfa é composta principalmente de óxido de silício (80-97%) e baixas quantidades de óxidos de potássio, sódio, cálcio e alumínio, além de material ainda não queimado. Tal composição pode variar com o tipo de tecnologia empregada para a transformação da casca e com o tipo de cultivo, safra, condições climáticas e geográficas. Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido desenvolvidos para dar valor agregado à CCA. No entanto, a maioria dessas pesquisas tem sido concluída sem o estabelecimento de soluções técnica, ecológica e economicamente viáveis. A agregação real de valor, assim como o uso de energia na queima e de ácidos inorgânicos para a purificação e estruturação desse resíduo, necessita de avaliação crítica, além das considerações ambientais.

A sílica, principal constituinte da CCA, é considerada uma matéria-prima básica, amplamente empregada na área de eletrônica, cerâmica, polímeros, como resinas, peneiras moleculares, suportes catalíticos [4,5]. Partículas de sílica muito finas, micro ou nanossílica, podem ter aplicações tecnológicas como agentes tixotrópicos, isolantes

térmicos, cargas, biomateriais, encapsulamento de estruturas, aditivos na construção civil, entre outros [4-6].

Os processos para a produção da sílica são caros e empregam substâncias que agridem o meio ambiente, assim como também altas temperaturas e pressões [2,3,7,8]. Alternativas para a produção de sílica incluem processos biológicos utilizados por esponjas, diatomáceas e algas [9,10]. Estudos recentes indicam que os fungos através de enzimas extracelulares têm a capacidade de biotransformar a sílica de diferentes fontes, como a casca de arroz [4,10].

Neste contexto, a motivação deste trabalho foi estabelecer uma rota biológica através de um fungo filamentosso denominado *Fusarium oxysporum* para a obtenção de sílica micro e nanoestruturada a partir da cinza da casca de arroz, agregando valor a esse subproduto e que seja ambientalmente viável.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver uma rota biológica de obtenção de sílica micro e nanoestruturada a partir da cinza da casca de arroz.

1.1.2 Objetivos Específicos

Foram objetivos específicos ao longo deste trabalho:

- Caracterizar propriedades físico-químicas da matéria-prima (cinza da casca de arroz).
- Avaliar os principais parâmetros que afetam a eficiência do bioprocessamento de nanossílica.
- Caracterizar estrutura e propriedades de nanopartículas de sílica.

1.2 ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está organizada na forma de artigos. Alguns deles já foram publicados em revistas e apresentados em congressos, e os outros serão submetidos para publicação. No capítulo 2 apresenta-se uma revisão da literatura, onde são apresentados conceitos gerais relacionados com a cinza da casca de arroz, incluindo rotas e mecanismos para a síntese da sílica. O capítulo 3 corresponde a um trabalho já publicado, cujo objetivo foi testar de forma geral a viabilidade da síntese de nanomateriais óxidos através de *F. oxysporum*,

onde foi realizado um seguimento a diferentes parâmetros como produção de biomassa, variação de pH, concentração de sílica solúvel; técnicas como infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X foram empregadas para analisar a CCA antes e após o contato com o fungo. O capítulo 4 é um artigo publicado que apresenta algumas das principais características da sílica dissolvida, incluindo tamanho de partícula, determinação da área superficial e análise microestrutural a partir de imagens obtidas por MEV. O capítulo 5 corresponde a um trabalho publicado em um congresso, no qual a influência de parâmetros de processo: tempo de contato entre o *F. oxysporum* e a CCA, pH e concentração de glicose foram avaliadas, através de um planejamento experimental. O capítulo 6 aborda a avaliação do efeito de diferentes meios de cultura comerciais na síntese da sílica através de *F. oxysporum*; nesse caso, novas características, como consumo de glicose, taxa de produção de CO₂ como medida indireta do crescimento do fungo e identificação de enzimas foram determinadas. Para finalizar, no capítulo 7, foram abordadas alternativas mais econômicas para a síntese de nanopartículas de sílica através de meios não comerciais e de diferentes formas de fermentação; a produção de proteína total e atividade enzimática da peroxidase e β -glicosidase foram usadas para avaliar o processo metabólico do *F. oxysporum* e determinar em que etapa a sílica era biotransformada. Características das micro e nanopartículas, também foram obtidas.

1.3 ORIGINALIDADE

A sílica, em tamanho micro ou nanométrico, é considerada uma matéria-prima básica, amplamente empregada na área de eletrônica, cerâmica e polímeros, como resinas, peneiras moleculares, suportes catalíticos, entre outros. A obtenção desse material por rotas biológicas tem sido estudada recentemente. Nesse sentido, o trabalho aqui desenvolvido apresenta as seguintes contribuições de caráter original:

- Uso da cinza da casca de arroz para a síntese biológica de micro e nanossílica por meio de *F. oxysporum*, através de um processo econômica e ambientalmente amigável, quando comparado aos métodos tradicionais.
- Com relação ao bioprocessos, pela primeira vez, foram testadas diferentes fontes de carbono não comerciais que incluem extratos de malte, arroz e batata com glicose. Diferentes técnicas foram usadas

e comparadas para a caracterização da cinética de crescimento do *F. oxysporum* e para a análise da biotransformação da CCA em SiO₂ micro e nanométrico.

- Partículas de SiO₂ cristalinas com tamanho ~10 nm foram obtidas usando extrato de malte. Além disso, usando extratos não comerciais, como batata, podem ser obtidas partículas de 30 a 60 nm na forma amorfa.

1.4 REFERÊNCIAS

- [1]. CHANDRASEKHAR, S.; SATYANARAYANA, K. G.; PRAMADA, P. N.; RAGHAVAN, P.; GUPTA, T. N. Review Processing, properties and applications of reactive silica from rice husk—an overview. **Journal of Materials Science**, v. 38, n. 15, p. 3159-3168, 2003.
- [2]. MARTINEZ-ANGEL, J. D.; PINEDA-VASQUEZ, T. G.; HOTZA, D.; JUNKES, J.A. Caracterização de cinza obtida por combustão de casca de arroz em reator de leito fluidizado. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1110-1114, 2009.
- [3]. DELLA, V.; HOTZA, D. Estudo comparativo entre sílica obtida por lixívia ácida da casca de arroz e sílica obtida por tratamento térmico da cinza de casca de arroz. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1175-1179, 2006.
- [4]. BANSAL, V.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Fungus Mediated Biotransformation of Amorphous Silica in Rice Husk to Nanocrystalline Silica. **Journal of American Chemical Society**, v. 128, p. 14059-14066, 2006.
- [5]. HUBERT, D. H. W.; JUNG, M.; GERMAN, A. L. Vesicle templating. **Advanced Materials**, v. 12, n. 17, p. 1291-1294, 2000.
- [6]. LIOU, T. H. Preparation and characterization of nano-structured silica from rice husk. **Materials Science and Engineering**, v. 364, p. 313-323, 2004.
- [7]. CHAKRAVERTI, A.; MISHRA, P.; BANERJEE, H.D. Investigation of combustion of raw and acid-leached rice husk for production of pure amorphous white silica. **Journal of Materials Science**, v. 23, p. 21-24, 1988.
- [8]. TZONG-HORNG, L.; SHAO-JUNG, W. Kinetics Study and Characteristics of Silica Nanoparticles Produced from Biomass-Based Material. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 18, p. 8379-8387, 2010.

- [9]. EHRLICH, H., DEMADIS, K., POKROVSKY O., KOUTSOUKOS, P. Modern views on decalcification: biosilica and biotic silica dissolution in natural and artificial environments. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 4656–4689, 2010.
- [10]. BANSAL, V. BHARDE, A; RAMANATHAN, R; BHARGAVA, S. Inorganic materials using unusual microorganisms. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 179-182, p. 150-168, 2012.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VALORIZAÇÃO DA CASCA DE ARROZ

No Brasil e em vários países em desenvolvimento, o arroz é um dos principais produtos alimentícios. Em 2012, a produção anual de arroz no Brasil correspondeu a ~12 milhões de toneladas. Os maiores estados produtores estão situados na região sul: Rio Grande do Sul e Santa Catarina (IBGE, 2012). Na Fig. 2.1 são apresentados os percentuais de produção de arroz por região brasileira em 2012.

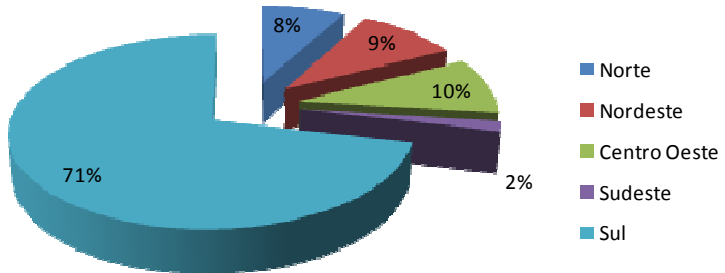


Figura 2.1 –Produção de arroz no Brasil em 2012.

No processamento industrial do arroz, as cascas correspondem a 15 e 20% em massa dos resíduos (DELLA *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2009), dependendo da variedade e cultura do arroz. Esses percentuais correspondem a 365 mil toneladas de casca produzidas no Brasil em 2012.

As cascas de arroz têm baixa densidade, além de baixa taxa de biodegradação, permanecendo em sua forma original por longos períodos de tempo.

Devido a seu alto poder energético, ~15MJ/kg (MARTÍNEZ *et al.*, 2010), a casca de arroz vem sendo utilizada como fonte de calor para secagem do próprio cereal nas usinas de beneficiamento do grão e, mais recentemente, está sendo usada para a produção de energia elétrica renovável pela queima direta em unidades termelétricas brasileiras. Conforme a ANEEL (2012), há 9 usinas de biomassa da casca de arroz, que juntas geram 32608 kW, representando 0,03% do total da produção energética nacional.

2.2 SÍLICA

A sílica pode se encontrar como um polímero do ácido silícico com unidades de SiO_4 inter-relacionados na forma tetraédrica, sendo sua fórmula geral SiO_2 . Na Fig. 2.2 é apresentada estrutura da sílica em configuração tetraédrica. Na natureza pode se apresentar em estado cristalino como quartzo (mais frequente), cristobalita ou tridimita, ou como sílica amorfa ou vítrea. Sílicas utilizadas em aplicações químicas são sintetizadas, principalmente a partir de ácido silícico ou de reagentes do tipo silano. (JAL *et al.*, 2004).

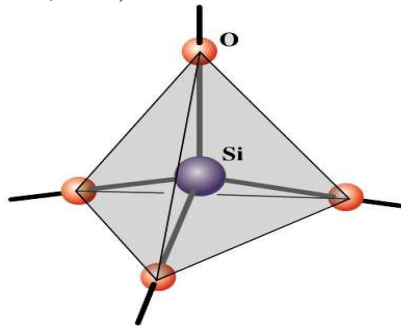


Figura 2.2 –Estrutura da sílica em configuração tetraédrica.

A sílica é considerada uma matéria-prima básica, amplamente empregada na área eletrônica (RODRIGUEZ *et al.*, 2007; JINCHENG e KROLL, 2010) cerâmica (PRASAD *et al.*, 2003; SUTAS *et al.*, 2012; KAEWKHAO *et al.*, 2012) polímeros (YONGCHUN *et al.*, 2005 KHALFA e WARD, 2010; BOONYAPOOKANA *et al.*, 2011; CHANGCHUN *et al.*, 2011) entre outras (HUBERT *et al.*, 2000; BANSAL *et al.*, 2006.). Micro ou nanopartículas de sílica têm aplicações tecnológicas como agentes tixotrópicos (BOFFA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2010), isolantes térmicos (QIANG *et al.*, 2012; TAO *et al.*, 2013), cargas, biomateriais (SMIRNOVA *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2012) encapsulamento de componentes (XINGDONG, 2005; MEUNIER *et al.*, 2010; ISNAENI *et al.*, 2013), entre outros (HUBERT *et al.*, 2000; LIOU, 2004; BANSAL *et al.*, 2006).

2.3 CINZA DA CASCA DE ARROZ

A cinza de casca de arroz (CCA) é o produto da transformação termoquímica da CA. As condições dos diferentes processos de conversão (pirólise, gaseificação e/ou combustão) determinam as características físico-químicas do produto final. A CCA corresponde a 14-25% da CA, dependendo da variedade do arroz, do clima e do solo

da região produtora (KRISHNARAO *et al.*, 2001). O principal componente da CCA gerada em processos térmicos é a sílica (SiO₂), entre 80 e 97% em massa, que dependendo da temperatura de combustão pode ser amorfa ou cristalina; também incluem-se em menores quantidades CaO (0,25-2,5%), MgO (2,3-1,3%), K₂O (<1,1%), Na₂O (<0,78%).

2.4 SÍNTESE DE MATERIAIS NANOMÉTRICOS

Nos últimos anos, cientistas têm mostrado que materiais compostos de partículas nanométricas têm frequentemente propriedades diferenciadas em relação a materiais com partículas mais grosseiros, quimicamente análogos. Por exemplo, cerâmicas produzidas a partir de materiais nanométricos são mais resistentes mecanicamente do que as fabricadas a partir de partículas maiores. Algumas apresentam ainda escoamento plástico ou propriedades elásticas em temperaturas elevadas. Metais nanoestruturados são significativamente mais duros do que metais de grãos mais grosseiros. Materiais nanoestruturados são em geral mais ativos cataliticamente do que seus equivalentes convencionais. (ESTEVES *et al.*, 2004; BELYAKOV, 2010).

A síntese de materiais nanométricos pode se dividir em duas abordagens: *top-down* (de cima para baixo), partindo de partículas grossas até nanopartículas, ou *bottom-up* (de baixo para cima), a partir de átomos até estruturas mais complexas. Em ambos os casos, os processos podem ser desenvolvidos em meio líquido, gasoso ou sólido (SANTOS, 2010).

2.4.1 Método de cima para baixo (*top down*)

O *top-down* é considerado como método clássico que reúne processos como moagem com bolas ou rolos por via úmida, tratamentos térmicos, litografia, entre outros. Entretanto, esse método pode causar imperfeições na superfície da estrutura, além disso, os custos energéticos são elevados e a contaminação dos materiais pode ser alta (BELYAKOV A, 2010).

Uma alternativa de fabricação consiste na redução de um corpo metálico empregando diversos agentes químicos que incluem NaBH₄, N₂H₄, NH₂OH, etanol, etilenoglicol e N,N-dimetilformamida (DMF). (KOMARNENI *et al.*, 2002; QINGYI *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2007).

Especificamente, os processos empregados para obter sílica a partir dos métodos *top-down* usando casca de arroz são apresentados a seguir.

Sílica com alta pureza, área superficial $\sim 200 \text{ m}^2/\text{g}$ e tamanho de partícula nanométrico tem sido obtida usando tratamentos térmicos (RAMARAO *et al.*, 1989) e/ou químicos (CHAKRAVERTI *et al.*, 1988; KRISHNARAO *et al.*, 2001; CHANDRASEKHAR *et al.*, 2005; DELLA *et al.*, 2006; TZONG e SHAO, 2010, ADAM *et al.*, 2012) antes ou depois da combustão da casca de arroz em temperaturas entre 500 e 1400°C em diferentes intervalos de tempo. Os produtos químicos incluem HCl, H₂SO₄, HNO₃, NaOH, NH₄OH. Chakraverti *et al.* (1988) desenvolveram um processo de lixiviação da CA com HCl (1N) que remove a maioria dos elementos metálicos. A cinza da combustão completa de casca tratada com ácido foi branca, enquanto a casca não-tratada foi marrom clara. O tratamento ácido não afetou o caráter amorfo da sílica.

Chakraverti *et al.* (1988) patenteou um processo para produzir pó de sílica amorfa superfina (>92% sílica, 0,04-0,05 μm) a partir da CA. Sílica nanoestruturada com alta pureza, >99% SiO₂ e área de superfície $\geq 250 \text{ m}^2/\text{g}$ foi preparada por Yalçin e Sevinc (2001) e Della *et al.* (2006). Na Fig.2.3 apresenta-se o formato das partículas de sílica obtido por Yalçin e Sevinc (2001), obtidas a partir de lixiviação com uma solução de HCl por 24 h antes do tratamento térmico. Segundo Krishnarao *et al.* (2001), Yalçin e Sevinc (2001), e Tzong e Shao (2010), o tratamento químico antes da combustão aparenta ser mais adequado. A formação de partículas escuras na sílica de casca não-tratada foi maior do que na casca tratada com ácido. Atribui-se esse fenômeno ao potássio na casca, que é removido em grande parte pelo tratamento ácido (KRISHNARAO *et al.*, 2001).

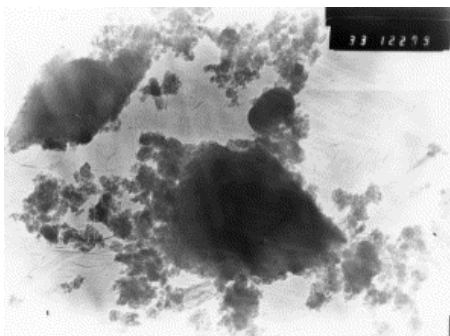


Figura 2.3 – Partículas irregulares de SiO₂ com diâmetro médio de 0,030 μm , obtidas mediante um processo térmico com pré-tratamento químico. (YALÇIN e SEVINC, 2001).

Um pré-tratamento da casca de arroz com HNO_3 e calcinação a 600°C produziu sílica branca, amorfa e quimicamente pura (98,5%). Sidheswaran *et al.* (1996) atribuem isso à formação de nitroderivados de lignina, que foram lixiviados, prevenindo a formação de coque durante a calcinação. (CHANDRASEKHAR *et al.*, 2005)

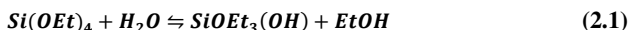
O efeito do tratamento de CA e CCA com ácidos orgânicos foi reportado recentemente (CHANDRASEKHAR *et al.*, 2005). A lixiviação das cascas com ácidos acético e oxálico com diferentes concentrações, seguida de tratamento térmico, resultou em produtos com propriedades otimizadas, como pureza, reatividade, brilho, área de superfície e volume de poros.

2.4.2 Método de baixo para cima (*bottom-up*)

O método *bottom-up* consiste basicamente em construir estruturas átomo por átomo ou molécula por molécula. De acordo com essa abordagem, podem-se fabricar nanoestruturas através das seguintes alternativas: síntese química, organização determinada e auto-organização (SANTOS, 2010).

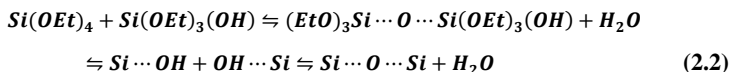
Na síntese química são utilizadas moléculas ou partículas de dimensão nanométrica, sendo o método de sol-gel o mais comum para a obtenção de nanossílica. (NOBLE, 2003; JAL *et al.*, 2004; MOROSANOVA, 2012). O método envolve a reação simultânea de hidrólise e condensação. Nesse processo, um sol de silicato de sódio, ou alcóxido ou ainda haleto de silício, é convertido em uma rede de polímeros gelificados. A hidrólise parcial dos ortossilicatos ocorre quando são misturados com água e etanol (JAL *et al.*, 2004).

Reação de hidrólise:



A condensação ocorre tanto entre os dois grupos OH ou um grupo OH e etóxi para formar uma ponte de oxigênio e água ou etanol.

Reação de condensação:



A adição de ácido ou base catalisa o processo, e adição de um eletrólito ou a mudança de pH do sol, influencia o processo de condensação. Assim, diferentes processos baseados no método sol-gel têm sido desenvolvidos. (FARIAS E AIROLDI, 2000; SUNGTACK *et al.*, 2001; JAL *et al.*, 2004; YEOH *et al.*, 2009; MOROSANOVA,

2012). Zulkifli *et al.* (2012) sintetizaram partículas de sílica com diâmetro variando entre 75-252 nm, área superficial de $364 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e formato esférico como observado na Fig. 2.4, empregando como precursor silicato de sódio obtido pela adição de ácido fosfórico na casca de arroz e etanol a pH 9,0.

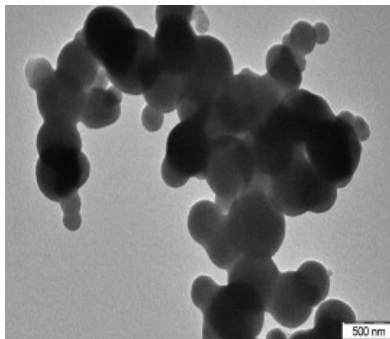


Figura 2.4 – Partículas esféricas de SiO₂ com diâmetro médio entre 75-252 nm, obtidas mediante síntese química usando silicato de sódio sintetizado pela lixiviação ácida com ácido fosfórico (ZULKIFLI *et al.*, 2012).

Na abordagem por organização determinada, as moléculas são manipuladas e colocadas em determinada ordem, uma por uma. Atualmente, o crescimento de nanoestruturas pode ser feito via fase vapor: deposição química de vapor (CVD), infiltração química de vapor (CVI), reação de infiltração química de vapor (CVI-R); ou a partir de moldes, sendo os métodos de fase vapor os mais empregados na construção de nanoestruturas (ALMEIDA *et al.*, 2006; SANTOS, 2010). Os principais parâmetros de controle nos métodos via fase vapor são a molhabilidade, fluxo, temperatura, pressão e tempo de deposição dos reagentes. Esses métodos têm como vantagens: deposição de camadas homogêneas, obtenção de estruturas complexas, mas são geralmente caros (XIANG *et al.*, 2009).

Na opção por auto-organização, átomos e moléculas se organizam de forma autônoma por meio de interações químicas ou físicas construindo nanoestruturas ordenadas. A estruturação empregando microrganismos é um exemplo da auto-organização (XIANG *et al.*, 2009).

2.4.3 Rotas biológicas

As abordagens mais tradicionais de síntese de materiais em nanoescala exigem condições rigorosas de síntese, como altas temperaturas, pressões consideráveis, condições de pH extremos. Além disso, muitas vezes são produzidos subprodutos tóxicos. Normalmente, as quantidades produzidas são pequenas, e o material resultante é altamente irreproduzível, devido à dificuldade de controle da aglomeração (YALÇIN e SEVINC, 2001; TZONG e SHAO, 2010).

A seguir, são apresentadas algumas rotas biológicas para a síntese de nanomateriais, empregando esponjas, algas, bactérias e fungos.

Muitos organismos naturais produzem tecidos rígidos, como ossos, dentes, conchas, unidades esqueléticas e espículas. Normalmente, esses tecidos são dispositivos com funções mecânicas (estrutura, corte, polimento), ou físicas (magnética, óptica, piezoelétrica), ou ainda bioquímicas, servindo como fonte de íons para as atividades fisiológicas e, portanto, parte integrante do organismo (SARIKAYA, 1999).

Os tecidos rígidos são biocompósitos e incorporam em sua estrutura tanto macromoléculas (lipídeos, proteínas, polissacarídeos) como minerais (hidroxiapatita, carbonato de cálcio, sílica). Alguns organismos unicelulares (bactérias e algas) também produzem materiais inorgânicos de forma intra ou extracelular. Os exemplos mais importantes incluem esponjas e diatomáceas, as quais sintetizam materiais silícicos (CHERYL *et al.*, 2004; LIKHOSHWAY *et al.*, 2008; XIANG *et al.*, 2009; EHRLICH *et al.*, 2010; MÜLLER *et al.*, 2011).

2.4.3.1 Esponjas

Nas esponjas, o esqueleto é composto de espículas formadas principalmente por sílica amorfa, cuja síntese está associada a uma enzima denominada silicateína (SHIMIZU e MORSE, 2000; SUMEREL *et al.*, 2003; LOPEZ *et al.*, 2005; MÜLLER *et al.*, 2006; MÜLLER *et al.*, 2011). O processo inicia de forma intracelular no complexo de Golgi onde no transporte da enzima às vesículas sofrem uma fosforilação formando filamentos axiais. Após da montagem da primeira camada de filamentos, a sílica é formada. Finalmente, as espículas são liberadas no espaço extracelular, onde crescem em comprimento e diâmetro. Ainda não se sabe se o crescimento é feito totalmente mediante cordas de silicateína que são organizadas em paralelo com as superfícies das espículas ou se outras biomoléculas, tais como peptídeos ou poliaminas podem ser participantes ativos (LOPEZ *et al.*, 2005; MÜLLER *et al.*,

2006; MÜLLER *et al.*, 2011). Na Fig. 2.5 é apresentada uma micrografia com espículas de sílica amorfa da espécie *S. domuncula*.

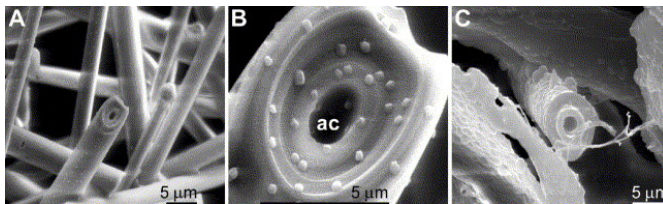


Figura 2.5 – Espículas de SiO₂ amorfa com diâmetros entre 0,7 e 0,9 µm, e 15 µm de comprimento (MÜLLER *et al.*, 2006).

Pela estabilidade da silicateína em meio aquoso e pela capacidade de hidrolisar e policondensar diversos óxidos, têm sido desenvolvidas rotas empregando silicateínas para sintetizar e nanoestruturar dióxido de titânio (TiO₂) amorfo a partir de uma solução de di-hidróxido de bis(lactato de amônio) de titânio(IV) (Ti[BALDH]) (SUMEREL *et al.*, 2003); oxohidróxido de gálio nanocristalino (GaOOH) (KISAILUS *et al.*, 2005), entre outros.

2.4.3.2 Diatomáceas

As diatomáceas são protistas aquáticos importantes para o ambiente marinho e no ciclo biogeoquímico do silício, exibem tamanhos entre 10-150 µm com paredes celulares a base de sílica nanoestruturada.

A formação da parede celular nanoestruturada, bem como os diferentes padrões morfológicos, tais como poros e fendas na sílica, são controlados por proteínas integradas às paredes celulares (CHERYL *et al.*, 2004). Três famílias de proteínas têm sido identificadas na matriz orgânica da parede celular das diatomáceas: frustulinas, pleuralinas e silafinas. As silafinas têm recebido maior atenção devido à sua habilidade para induzir e regular o processo de precipitação da sílica a temperatura e pressão ambiente (KRÖGER *et al.*, 2002; POULSEN e KRÖGER, 2004; CHERYL *et al.*, 2004). A síntese da sílica *in vivo* começa com a formação de sílica amorfa, que existe como siloxano [n(SiO₂)], em sua forma mais simples, em pH neutro e temperaturas abaixo de 40°C. Então, as enzimas catalisam o processo de polimerização, primeiro formando um monômero, e logo um dímero até obter o polímero que precipita na forma de partículas de sílica pela ação da silafina. Na Fig. 2.6 é apresentado o esquema da síntese de partículas

nanométricas de sílica, na qual parâmetros como pH e a presença de sais ou eletrólitos influenciam a interação e tamanho das partículas.

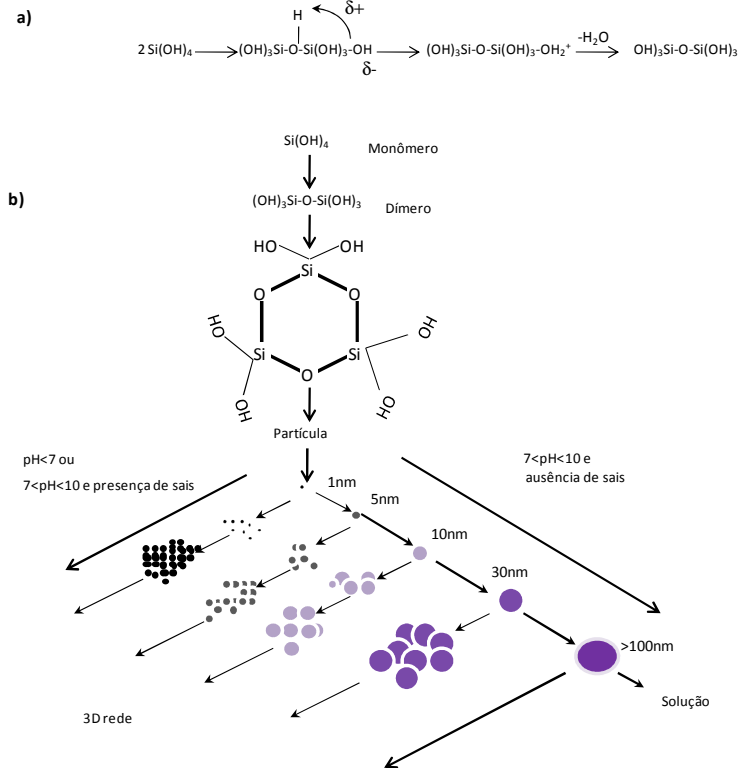


Figura 2.6 – Esquema de síntese de sílica estruturada por algas (CHERYL *et al.*, 2004)

2.4.3.3 Bactérias e fungos

Tanto as bactérias como os fungos tem um papel importante no ciclo da sílica na terra. Interações entre microbiota e silicatos podem ser classificados segundo Ehrlich *et al.* (2010) nas seguintes reações:

- Reações de dissolução e destruição da rede cristalina de silicato
- Captação e utilização de silício
- Liberação de silício e sedimentação no ambiente

As bactérias aceleram a dissolução de sílica nas frústulas e degradam enzimaticamente a matriz orgânica das diatomáceas no mar.

Esse processo permite formar a sílica solúvel que é essencial para o crescimento de diatomáceas.

Pesquisadores especulam que o ácido silícico, produzido pela hidrólise de silicatos na terra, estimula o crescimento das bactérias e por isso o silício ou a sílica são importantes tanto para os fungos como para as bactérias (EHRlich *et al.*, 2010).

Segundo Ehrlich (1996) e Fowle e Fein (2001), a ação das bactérias sobre os minerais a base de silicatos tem sido caracterizado como não-enzimática. Os mecanismos pelos quais agem pode envolver a produção metabólica de produtos tais como ácidos orgânicos que podem atuar como acidulantes e/ou ligantes, sob a forma de NH_3 . Também as bactérias fornecem prótons que ajudam a quebrar ligações Si-O e Al-O através da catálise e protonação. Ao mesmo tempo, alguns dos ácidos e grupos presentes na parede celular das bactérias também podem atuar como ligantes que puxam cátions da estrutura da rede cristalina, facilitando posteriormente a quebra de ligações (EHRlich, 1996; JHA e PRASAD, 2010).

Alem da dissolução, as bactérias também estão envolvidas na transformação entre as diferentes formas de silício. Singh *et al.* (2008) reportaram a formação de nanocompósitos de silício/sílica com morfologia semi-esférica tendo um tamanho perto de 10 nm, usando *Actinobacter sp.* e empregando como precursor K_2SiF_6 a temperatura ambiente e pressão atmosférica, como apresentado na Fig. 2.7. Os autores presumem que esta bactéria segrega redutases e enzimas de oxidação, que levam à síntese de nanocompósitos Si/SiO₂.

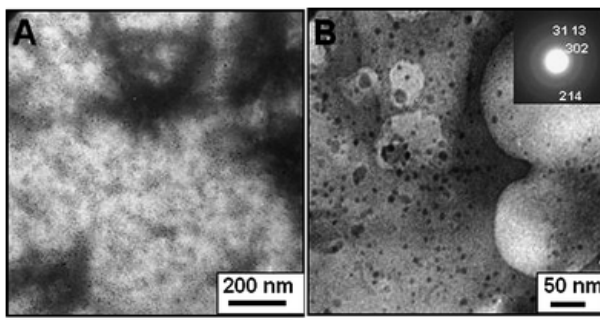


Figura. 2.7 – MEV das partículas de Si/SiO₂ sintetizadas mediante *Actinobacter sp.* (SINGH *et al.*, 2008).

Os fungos também podem ser empregados na produção de enzimas de forma extracelular para a biotransformação de diversos

materiais como zircônia (BANSAL *et al.*, 2004), magnetita (BHARDE *et al.*, 2005), titânia (BANSAL *et al.*, 2006a), prata (DURAN *et al.*, 2005). O mecanismo inclui a lixiviação da sílica na forma de ácido silícico seguido por um processo de hidrólise catalisado enzimaticamente e conclui com a precipitação devido ao processo de condensação realizado pelas proteínas do fungo (BANSAL *et al.*, 2007; EHRLICH *et al.*, 2010).

2.5 *Fusarium oxysporum*

O *F. oxysporum* é um fungo fitopatígeno encontrado em solos que, junto com diversos microrganismos como actinomicetos, bactérias e fungos de outras espécies, contribui com o ciclo biogeoquímico do silício. As plantas obtêm o silício a partir de água do solo na forma de ácido silícico (H_4SiO_4) que é hidrossolúvel e precipita como sílica amorfa. Após a morte das plantas, a sílica retorna ao solo. O ácido húmico é gerado pelos produtos de degradação enzimática das plantas mortas, que aumenta a atividade de degradação dos solos. Assim, plantas e microrganismos, incluindo o *F. oxysporum*, através da sua interação com complexos de minerais do solo, contribuem significativamente no ciclo do silício (BARBER e SHONE, 1966). Essas características tornam o *F. oxysporum* um microorganismo potencialmente interessante na dissolução e síntese de sílica de diferentes fontes.

A temperatura ótima de crescimento do *F. oxysporum* in vitro é de 28°C (DALMAGRO, 2007). Esse fungo tem a capacidade de produzir diferentes ácidos, em particular o ácido fusárico (BACON, 1996), um derivado do ácido picolínico e diversas enzimas como a cutinase empregada em processos de transesterificação na indústria química, farmacêutica e na síntese de peptídeos (DALMAGRO, 2007).

O *F. oxysporum* tem sido empregado para a biorremediação de metais pesados. Sanyal *et al.* (2005) reportaram a biorremediação de ions de Pb^{+2} e Cd^{+2} mediante a formação de cristais de carbonato de cádmio e chumbo, aproveitando a produção de CO_2 pelo metabolismo do fungo. O fungo tem a capacidade de suportar concentrações ao redor de 10^{-2} M dos metais e com morfologias homogêneas em forma de agulhas, atribuída à ação de algumas proteínas aniônicas.

Esse fungo é capaz de realizar processos de lixiviação seletiva. Bansal *et al.* (2007) demonstraram a capacidade deste fungo de lixiviar seletivamente sílica a partir de areia de zircônia, obtendo nanopartículas de sílica (2-10 nm) cobertas e estabilizadas por proteínas. Presume-se que as enzimas secretadas pelo fungo que atuam no processo de

biolixiviação atuem especificamente nos precursores de Si presentes na areia de zircônia e não nos precursores de Zr.

O *F. oxysporum* também tem sido empregado na transformação de partículas metálicas como ouro (AHMAD *et al.*, 2003; DURÁN *et al.*, 2005). Durán *et al.* (2005) reportaram a produção extracelular de partículas metálicas por várias cepas desse fungo, cuja síntese ocorre pela redução dos íons metálicos por nitrato redutase que depende de um processo de transporte da quinona extracelular.

Por fim, o *F. oxysporum* também exibe capacidade para a transformação de óxidos de zircônia, usando diversas fontes, como areia de zircônia (BANSAL *et al.*, 2007); soluções aquosas de K_2ZrF_6 (BANSAL *et al.*, 2004); óxidos de titânio e silício empregando soluções aquosas de titânia e sílica K_2TiF_6 , K_2ZrF_6 (BANSAL *et al.*, 2005); e resíduos agrícolas como casca de arroz (BANSAL *et al.*, 2005). Nesse último estudo, verificou-se a capacidade do fungo de disponibilizar a sílica presente na casca de arroz mediante proteínas extracelulares de natureza catiônica, e da capacidade do metabolismo do fungo de transformar a sílica amorfa presente na casca de arroz em sílica cristalina a temperatura ambiente e pressão atmosférica. Na Fig. 2.8 são apresentadas as micrografias das nanopartículas de SiO_2 obtidas pela ação do fungo e os difratogramas em função do tempo indicando a transformação estrutural da SiO_2 . A curva 8 corresponde ao filtrado obtido através da exposição de casca de arroz à água com pH de 4,5 por 15 dias. As curvas 2 a 7 correspondem às partículas de sílica formadas em 4, 8, 12, 16, 20 e 24 h e a curva 1 se relaciona às nanopartículas após o tratamento com o fungo por 24 h submetida à calcinação por 2h a 400°C em seguida ao processo biológico.

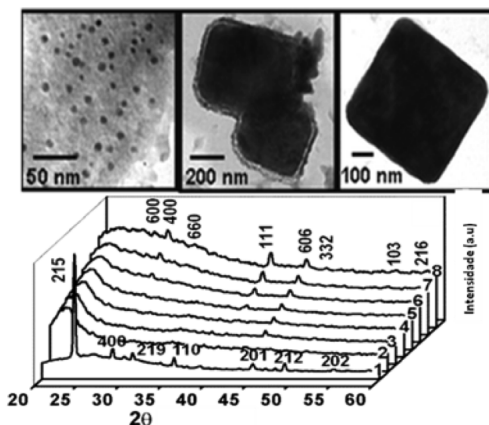


Figura 2.8 – MEV e DRX das nanopartículas de sílica a partir da casca de arroz usando *F. oxysporum* (BANSAL *et al.*, 2005).

2.6 REFERÊNCIAS

ADAM, F.; APPATURI, J.N.; IQBAL A. The utilization of rice husk silica as a catalyst: Review and recent progress, **Catalysis Today**, v.190, n. 1, p. 2–14, 2012.

AHMAD A.; MUKHERJEE P.; SENAPATI S.; MANDAL D. M.; KHAN I.; KUMAR R.; SASTRY M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 28, n 4, p. 313-318, 2003.

ALMEIDA, D.;POPOVSKA, N.; GERHARD, H. Optimization of the ceramization process for the production of three-dimensional biomorphic porous SiC ceramics by chemical vapor infiltration (CVD), **Journal of the European Ceramic Society**, v.26, n. 12, p. 2381-2387, 2006.

ANEEL. Matriz de Energia Elétrica. 2012. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/OperacaoCapacidadeBrasil.asp>> Acesso: outubro, 2012.

BACON, C. W.; PORTER, J. K.; NORRED, W. P.; LESLIE, J. F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4039-4043, 1996.

BANSAL, V.; RAUTARAY, D.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium*

oxysporum. **Materials Chemistry and Biochemical Science Division**, v. 14, p. 3303-3305, 2004.

BANSAL, V.; PODDAR, P.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Room-temperature biosynthesis of ferroelectric barium titanate nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 36, p. 11958-11963, 2006.

BANSAL, V.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Fungus-mediated biotransformation of amorphous silica in rice husk to nanocrystalline silica. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 43, p. 14059-14066, 2006.

BANSAL, V.; ASAD S.; BHARGAVA S.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Zirconia enrichment in zircon sand by selective fungus mediated bioleaching of silica, **Langmuir**, v. 23, n. 9, p. 4993-4998, 2007.

BARBER, D. A.; SHONE, G. T. Absorption of silica from aqueous solutions by plants, **Journal of Experimental Botany**, v. 17, p. 569, 1966.

BELYAKOV A. V. Introduction of nanomaterials and nanotechnologies in ceramics plants. **Glass and Ceramics**, v. 67, n. 7-8, p. 203- 208, 2010.

BHARDE, A.; RAUTARAY, D.; BANSAL, V.; AHMAD, A.; SARKAR, I.; MOHAMMAD, S.; SANYAL, M.; SASTRY M. Extracellular Biosynthesis of Magnetite using Fungi, **Small**, v.2, n.1, p.135-141, 2006.

BOFFA, V.; TEN ELSHOF, J.E.; BLANK, D.H.A. Preparation of templated mesoporous silica membranes on macroporous α -alumina supports via direct coating of thixotropic polymeric sols, **Microporous and Mesoporous Materials**, v.100, n. 1-3, p.173-182, 2007.

BOONYAPOOKANA, A.; NAGATA, K.; MUTOH, Y.; Fatigue crack growth behavior of silica particulate reinforced epoxy resin composite, **Composites Science and Technology**, v. 71, n. 8, p. 1124-1131, 2011.

Centro Nacional de Referência em Biomassa. Banco de biomassa. **CENBIO**. 2010. Disponível em: <<http://cenbio.iee.usp.br>> Acesso em: outubro, 2012.

CHAKRAVERTI, A.; MISHRA, P.; BANERJEE, H.D. Investigation of combustion of raw and acid-leached rice husk for production of pure amorphous white silica, **Journal of Materials Science**, v. 23, p. 21-24, 1988.

CHANDRASEKHAR, S.; PRAMADA, P. N.; PRAVEEN, L. Effect of organic acid treatment on the properties of rice husk silica, **Journal of Materials Science**, v. 40, p. 6535-6544, 2005.

CHANGCHUN, A.; YONG, X.; WEN, W.; LIANGJIE, Y. Large scale and environmentally friendly preparation of micro-submicron spherical silica and their surface effect in resin materials, **Powder Technology**, v. 210, n. 3, p. 323-327, 2011.

CHANG·X., LI·H.; YANG·Y.; XU·H.; YANG·X.; YONGMEI, M. Synthesis of multimorphologic nanostructured SiO₂ using organogelator sol-gel transcription. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 43, p. 15-19, 2007.

CHERYL, W.; HUANG, J.; KAPLAN, D. Lessons from seashells: silica mineralization via protein templating. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 11, 2004.

DALMAGRO, J. Associação de *Trichoderma sp.* e fungicidas no controle de *F. oxysporum* e *f. sp. phaseoli*. Tese de M. Sc. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

DAS, S. K.; BHOWAL, J.; DAS, A. R.; GUHA, A. K. Adsorption Behavior of *Rhodamine B* on *Rhizopus oryzae* Biomass. **Langmuir**, v.22, n. 17, p. 7265-7272, 2006.

DELLA, V.; KÜHN, I.; HOTZA, D. Reciclagem de resíduos agro-industriais: cinza de casca de arroz como fonte alternativa de sílica. **Cerâmica Industrial**, v.10, p. 22 - 25, 2005.

DELLA, V.P.; HOTZA, D.; JUNKES, J.A.; OLIVEIRA, A.P.N. Estudo comparativo entre sílica obtida por lixívia ácida da casca de arroz e sílica obtida por tratamento térmico da cinza de casca de arroz. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1175-1179, 2006.

DURÁN, N.; MARCATO, P.D.; ALVES, O. L.; DE SOUZA G.; ESPOSITO E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *F. oxysporum* strains, **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, n. 8, p.7, 2005.

EHRlich, H.; DEMADIS, K.; POKROVSKY O.; KOUTSOUKOS, P. Modern views on decalcification: biosilica and biotic silica dissolution in natural and artificial environments. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 4656-4689, 2010.

EHRlich, H. How microbes influence mineral growth and dissolution. **Chemical Geology**, v. 132, p. 5-9, 1996.

ESTEVES, A.; BARROS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.

FARIAS, R.; AIROLDI, C. Síntese e reatividade de sílica lamelar. **Química Nova**, v.23, n.1, p. 88-93, 2000.

FOWLE, D.A.; FEIN, J.B. Quantifying the effects of bacterial cell walls on the precipitation of metal hydroxides from aqueous solution. **Geomicrobiology Journal**, v.18, n.1, p. 77-91, 2001.

HUBERT, D. H. W.; JUNG, M.; GERMAN, A. L. **Advanced Materials**, v.12, n.17, p.1291-1294, 2000.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, DPE, COAGRO, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Novembro 2010. Online. Disponível em: <www.ibge.gov.br> Acesso: janeiro 2013.

ISNAENI; LI-HUA, J.; YONG-HOON, C. Silica encapsulation of toluene soluble quantum dots with high photostability, **Journal of Colloid and Interface Science**, v.395, p. 45-49, 2013.

JAL, P. K.; SUDARSHAN M.; SAHA, A.; PATEL, S.; MISHRA, B. K. Synthesis and characterization of nanosilica prepared by precipitation method, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 240, p. 173-178, 2004.

JHA, A. K.; PRASAD K. Ferroelectric BaTiO₃ nanoparticles: Biosynthesis and characterization, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 330-334, 2010.

JINCHENG, D.; KROLL, P. Electronic structure and interfacial properties of Ge nanoclusters embedded in amorphous silica, **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 356, n. 44-49, p. 2448-2453, 2010.

KAEWKHAO, J.; LIMSUWAN, P. Utilization of rice husk fly ash in the color glass production, **Procedia Engineering**, v. 32, p. 670-675, 2012.

KHALFA, A. I.; WARD, A. A. Use of rice husks as potential filler in styrene butadiene rubber/linear low density polyethylene blends in the

presence of maleic anhydride. **Materials & Design**, v. 31, n.5, p. 2414-2421, 2010.

KISAILUS, D.; CHOI, J. H.; WEAVER, J. C.; YANG, W. AND MORSE, D. E. Enzymatic synthesis and nanostructural control of gallium oxide at low temperature. **Advanced Materials**, v.17, n. 3, p. 314-318, 2005.

KOMARNENI, S.; NEWALKAR, D. B.; KATSUKI, H.; BHALLA, A. Microwave-polyol process for Pt and Ag nanoparticles, **Langmuir**, v. 18, p. 5959-5962, 2002.

KRISHNARAO, R.; SUBRAHMANYAM, J.; JAGADISH, T. K. Studies on the formation of black particles in rice husk silica ash. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 21, n. 1, p. 99-104, 2001.

KRÖGER, N.; LORENZ, S.; BRUNNER, E.; SUMPER M. Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis. **Science**, v. 298, n. 5593, p. 584-586, 2002.

LEW, C.M.; YAN, Y.S. Pure-silica-zeolite low-k dielectric films for computer chips. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 170, 2007, p. 1502-1507, 2007.

LIKHOSHWAY, Y.; SOROKOVIKOVA, E.G; BELYKH, O.I.; KALUZHNYAYA, O.; BELIKOV, S.I.; BEDOSHVILI, D.; KALUZHNYAYA, O.; MASYUKOVA, J.A.; SHERBAKOVA, T.A. Visualization of the silicon biomineralization in cyanobacteria, sponges and diatoms. **Biosphere Origin and Evolution**, p. 219-230, 2008.

LIU, T.H. Preparation and characterization of nano-structured silica from rice husk. **Materials Science and Engineering A**, v. 364, p. 313-323, 2004.

LOPEZ, P. J.; GAUTIER, C.; LIVAGE, J.; CORADIN, T. Silica nanostructures formation. **Current Nanoscience**, v.1, p. 73-83, 2005.

MARTINEZ, J.; PINEDA, T.; JUNKES, J.A.; HOTZA, D. Caracterização de cinza obtida por combustão de casca de arroz em reator de leito fluidizado. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1110-1114, 2009.

MARTINEZ, J.; PINEDA, T.; LOPEZ, J.; BETANCUR, M. Assessment of the rice husk lean-combustion in a bubbling fluidized bed for the

production of amorphous silica-rich ash. **Fuel and Energy Abstracts**, v. 36, n. 6, p. 3846-3854, 2011.

MEUNIER, C. F.; DANDOY, P.; BAO-LIAN, S. Encapsulation of cells within silica matrices: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 342, n.2, p. 211-224, 2010.

MOROSANOVA, E. Silica and silica-titania sol-gel materials: synthesis and analytical application. **Talanta**, v. 102, n. 15, p.114-122, 2012.

MULLER, W.; BELIKOV, S.; TREMEL, W.; PERRY, C.; GIESKES W.; BOREIKO, A; SCHRODER, H. Siliceous spicules in marine demosponges (example *Suberites domuncula*), **Micron**, v. 37, n. 2, p. 107-120, 2006.

MÜLLER, W.E.G.; WANG, X.; WIENSA, M.; SCHLOBMACHER, U.; JOCHUM, K.; SCHRÖDER, H.C. Hardening of bio-silica in sponge spicules involves an aging process after its enzymatic polycondensation: Evidence for an aquaporin-mediated water absorption. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1810, n. 7, p. 713-726, 2011.

NOBLE, K. Porous siloxane-silica hybrid materials by sol-gel processing, **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 26, n. 1-3, p. 419-423, 2003.

POULSEN N.; KRÖGER N. Silica Morphogenesis by Alternative Processing of Silaffins in the Diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 4, p. 42993-42999, 2004.

PRASAD, C.S.; MAITI, K.N.; VENUGOPAL; R. Effect of substitution of quartz by rice husk ash and silica fume on the properties of whiteware compositions, **Ceramics International**, v. 29, n. 8, p. 907-914, 2003.

QIANG, C.; SHUBIN, W.; ZHEN, L. Fabrication and characterization of aluminum silicate fiber-reinforced hollow mesoporous silica microspheres composites, **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 152, p.104-109,2012.

QINGYI, L.; FENG, G.; DONGSHENG, L. AND SRIDHAR, K. Biomolecule and/or microwave-assisted solvothermal syntheses of nanomaterials. **Advances in Technology of Materials and Materials Processing**, v. 7, n. 2, p. 111-118, 2005.

RAMARAO, G.; SASTRY, A.; ROHATGI, P.K. Nature and reactivity of silica available in rice husk and its ashes. **Bulletin of Materials Science**, v. 12, p. 469, 1989.

RAUTARAY, D.; SANYAL, A.; ADYANTHAYA, S.; AHMAD, A.; SASTRY M. Biological Synthesis of Strontium Carbonate Crystals Using the Fungus *Fusarium oxysporum*. **Langmuir**, v. 20, n. 16, p. 6827-6833, 2004.

RODRÍGUEZ, A.; BOTTA, P. M.; RIVAS, J.; ARAMAKI, K.; LÓPEZ, Q. M.A. Mesostructured fluorocarbon–silica hybrid materials with a low dielectric constant. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 298, n. 3, p. 284-2861, 2007.

SANTOS, W. Nanociência e Nanotecnologia: manipulando a matéria “átomo a átomo”. **Brasil Escola**. 2010. Online. Disponível em: <http://www.meuartigo.brasilecola.com/fisica/nanociencia-nanotecnologia-manipulacao-materia-atomo-atomo.htm>. Acesso: novembro 2010.

SANYAL, A.; RAUTARAY, D; BANSAL, V.; AHMAD, A. AND SASTRY, M.. Heavy-metal remediation by a fungus as a means of production of lead and cadmium carbonate crystals. **Langmuir**, v. 21, n. 16, p. 7220-7224, 2005.

SARIKAYA, M. Biomimetics: Materials fabrication through biology. **PNAS**, v. 96, n. 25, p. 14183-14185, 1999.

SHIMIZU, K.; MORSE, D. The biological and biomimetic synthesis of silica and other polysiloxanes. **Biomimetalization**, p. 207, 2000.

SIDHESWARAN, P.; BHAT, A. N. Recovery of amorphous silica in pure form from rice husks. **Transactions - Indian Ceramic Society**, v. 55, n.4, p. 93, 1996.

SINGH, SANJAY.; BHATTA, UMANANDA M.; SATYAM, P. V.; DHAWAN, ALOK.; SASTRY, MURALI; PRASAD, B. L. V. Bacterial synthesis of silicon/silica nanocomposites. **Journal of Materials Chemistry**, v. 18, n. 22, p. 2601-2606, 2008.

SMIRNOVA, I.; MAMIC, J.; ARLT, W. Adsorption of Drugs on Silica Aerogels, **Langmuir**, v.19, n.20, p. 8521–8525, 2003.

SUMEREL, L.; YANG, W.; KISAILUS, D.; WEAVER, J. C.; CHOI, J. H.; MORSE, D. E. Biocatalytically templated synthesis of titanium dioxide. **Chemistry of Materials**, v.15, n. 25, p. 4804–4809, 2003.

SUNGTACK, K.; SUNG, H.; CHUL, R.C.; MIN PARK, S.; JUNKYUNG K. Preparation and characterization of epoxy composites filled with functionalized nanosilica particles obtained via sol-gel process. **Polymer**, v.42, n.3, p. 879-887, 2001.

SUTAS, J.; MANA, A.; PITAK, L. Effect of Rice Husk and Rice Husk Ash to Properties of Bricks, **Procedia Engineering**, v. 32, p. 1061-1067, 2012.

TAO, X.; YA-LING, H.; ZI-JUN H. Theoretical study on thermal conductivities of silica aerogel composite insulating material, **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 58, n. 1–2, p. 540-552, 2013.

TZONG-HORNG, L.; SHAO-JUNG, W.U. Kinetics Study and Characteristics of silica nanoparticles produced from biomass-based material. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 18, p.8379-8387,2010.

XIANG, T.; CHOW, S.K.; ZHANG, D. Biomorphic Mineralization: From Biology to Materials. **Progress in Materials Science**, v. 54, n.5, p. 542-659, 2009.

XINGDONG, L. Silica encapsulation study on SrAl_2O_4 : Eu^{2+} , Dy^{3+} phosphors, **Materials Chemistry and Physics**, v. 93, n. 2–3, p. 526-530, 2005.

YALCIN, N.; SEVINC, V. Studies on silica obtained from rice husk. **Ceramics International**, v. 27, p. 219-224, 2001.

YANG, P.; GAI, S.; LIN, J. Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery, **Journal Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 9, p. 3679-3698, 2012.

YEOH, B.W.; MOHAMAD, D.; RAHMAN, I.A.; SIPAUT, C.S.; GHANI, A.M. Synthesis of nanosilica fillers by sol-gel process and surface modification, **Dental Materials**, v. 25, n. 5, p. 25, 2009.

YONGCHUN, C.; SHUXUE, Z.; GUODONG, C.; LIMIN, W. Preparation and characterization of polyester/silica nanocomposite resins, **Progress in Organic Coatings**, v. 54, n. 2, p. 120-126, 2005.

ZHANG, H.; ZHAO, X.; DING, X.; LEI, H.; CHEN, X.; YUNLING, L.; AN, D.; WANG, Z. A study on the consecutive preparation of d-xylose and pure superfine silica from rice husk. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1263-1267, 2010.

ZULKIFLI, N.S.C.; RAHMAN I.; MOHAMAD, D.; HUSEIN, A. Green sol–gel route for the synthesis of structurally controlled silica particles from rice husk for dental composite filler, **Ceramics International**, v. 39, n. 4, p. 4559-4567, 2013..

3 BIOTRANSFORMAÇÃO DA CINZA DA CASCA DE ARROZ EM NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MEDIANTE *FUSARIUM OXYSPORUM*¹

3.1 INTRODUÇÃO

A cinza da casca de arroz (CCA) é um subproduto agrícola empregado como biocombustível em diferentes processos como pirólise, gaseificação e combustão em leitos fixos e fluidificados especialmente em indústrias de beneficiamento de arroz [1-3]. A quantidade de sílica presente na CCA pode variar entre 80 e 97% dependendo das condições de queima e sua estrutura encontra-se, principalmente, na forma amorfa [1, 4].

A sílica é um material inorgânico empregado em uma ampla gama de aplicações comerciais como peneiras moleculares, suporte para catalisadores, materiais eletrônicos, assim como na indústria civil como pozolana no cimento e na produção de abrasivos de carbetto de silício, entre outros [4-7]. As partículas de sílica apresentam baixa densidade e alta resistência térmica e química. Com a diminuição no tamanho de partícula, a reatividade da sílica aumenta significativamente, facilitando, por exemplo, o processo de sinterização. Atualmente, a síntese de nanoestruturas da sílica é feita em condições extremas de pH, usando produtos como HCl, H₂SO₄, HNO₃, NaOH e NH₄OH [8], além de pressões e temperaturas elevadas [9], eventualmente em meios que apresentam toxicidade [5,8]. Normalmente, as quantidades produzidas são pequenas, e o material resultante apresenta características inconstantes, devido à dificuldade de controle da aglomeração.

Recentemente surgiram novas alternativas relacionadas com a biossilificação. Muitos organismos biológicos produzem tecidos rígidos, como ossos, dentes, conchas, unidades esqueléticas e espículas. Normalmente, esses tecidos são dispositivos com funções mecânicas (por exemplo, estrutura, corte, polimento), ou físicas (por exemplo, magnética, óptica, piezoelétrica), ou ainda bioquímicas, servindo como fonte de íons para as atividades fisiológicas e, portanto, parte integrante do organismo [10].

Os tecidos rígidos são biocompósitos e incorporam em sua estrutura tanto macromoléculas (lipídeos, proteínas, polissacarídeos) como minerais (hidroxiapatita, carbonato de cálcio, sílica). Alguns organismos unicelulares (bactérias e algas) também produzem materiais inorgânicos de forma intra ou extracelular. Os exemplos mais importantes incluem esponjas diatomáceas, as quais sintetizam materiais silícicos [11-14]. Os fungos também podem ser empregados especialmente na produção de

¹ Publicado em: **Matéria**, v. 17, n. 1, p. 946–954, 2012.

enzimas de forma extracelular para a biotransformação de diversos materiais como zircônia e titânia [15-16].

Recentemente BANSAL *et al.* [17] apresentaram uma rota alternativa para obtenção de nanopartículas de sílica a partir da CA. A sílica amorfa presente na casca foi biotransformada à temperatura ambiente (25°C) em partículas de 2-6 nm com formato semiesférico, na forma cristalina usando um fungo filamentosos, denominado *Fusarium oxysporum*. Tal processo tem um potencial grande de aplicação, já que opera a 25°C, sem usar produtos químicos.

O *Fusarium oxysporum* é um fungo fitopatígeno encontrado em solos, que vive saprofiticamente na matéria orgânica e em resíduos infectados. O micélio é incolor inicialmente, mas com a idade torna-se amarelo, rosa ou púrpura. Sua temperatura ótima de crescimento *in vitro* é de 28°C [18]. O *F. oxysporum* é um microrganismo apropriado para a biossíntese de nanopartículas metálicas, capaz de sintetizar proteínas ou macromoléculas *in vitro* [15-17].

Portanto, este trabalho tem como objetivo apresentar a avaliação de uma rota biológica à temperatura ambiente para a biotransformação da cinza da casca de arroz em nanopartículas de sílica empregando o fungo *Fusarium oxysporum*.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3 MATERIAIS

A CCA foi adquirida da Indústria e Comércio de Arroz Fumacense Ltda (Morro da Fumaça, SC, Brasil), não tendo sofrido nenhum processamento prévio antes de ser submetida ao processo de biotransformação.

O microrganismo empregado foi o *Fusarium oxysporum* fornecido pelo Centro de Estudios e Investigaciones en Biotecnología (CIBIOT) da Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), Medellín, Colômbia. O fungo foi mantido em meio de cultura sólido com extrato de batata e glicose em placas com incubação a 25 ± 1 °C [18].

O meio de cultura aquoso, com 15 g/L de extrato de malte (Hymedia) e 3 g/L glicose (Hymedia), foi ajustado em pH 6,8 usando ácido clorídrico 1 M (Vetec) e hidróxido de sódio 1 M (Vetec) e posteriormente esterilizado em autoclave a 120 °C, durante 20 min [17].

Para a obtenção da curva padrão de sílica solúvel em espectrometria, foi empregada uma solução aquosa de silicato de sódio concentrada (10ppm) preparada a partir de silicato de sódio 99,8% (Vetec), e posteriormente foram feitas diluições com água deionizada correspondentes a 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 ppm, respectivamente.

3.4 MÉTODOS

As curvas de crescimento do fungo foram determinadas em meio líquido com e sem presença de CCA e silicato de sódio puro (Vetec) durante um período total de 11 dias, através do método gravimétrico. Em frascos erlenmeyers de 250 mL foram colocados 100 mL de meio de cultura líquido e 0,03 g de micélio. O pH inicial foi ajustado para 6,8 com hidróxido de sódio (NaOH) 1 M e ácido clorídrico (HCl) 1 M. O micélio foi retirado da cultura, lavado com água deionizada e finalmente pesado. Simultaneamente foi registrada a variação do pH de cada amostra.

A quantificação da sílica solúvel foi feita mediante a formação de um complexo beta-molibdossilicato de coloração amarela, com uma solução molibdato de amônio com pH ácido na faixa de 1,4 a 2,0. Para cada 2,5 mL de amostra foram adicionados 0,1 mL de solução aquosa de molibdato de amônio (0,1 g/mL) e 0,05 mL de HCl 1M. A solução foi agitada e deixada em repouso por 10 min. Na sequência, foi adicionado 0,1 mL de solução de ácido oxálico (3g/L) o qual promove a mudança da coloração amarela para azul por efeito da redução do complexo. Então, a solução foi agitada novamente e posta em repouso por 1 hora. Finalmente, a leitura foi feita em espectrofotômetro UV-Visível (Pró-Análise V-1200) com comprimento de onda de 660 nm [19]. Para a obtenção da curva padrão, foi empregada uma solução aquosa de silicato de sódio com concentrações de SiO₂ correspondentes a 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 ppm respectivamente, usando o procedimento anterior.

Para a técnica de espectroscopia de infravermelho, foram tomadas amostras antes e depois do tratamento da CCA com o fungo *F. oxysporum*. As amostras foram incorporadas por prensagem em pastilhas de KBr e analisadas em espectrômetro IV (ABB, FTLA 2000), com a finalidade de observar a biotransformação nos grupos funcionais da CCA.

Um difratômetro de raios X (Philips, X-Pert) foi empregado para a caracterização das fases cristalográficas da CCA antes e depois do tratamento com o fungo. As análises foram realizadas em amostras na forma de pó, sem nenhum tipo de preparação prévia, no intervalo de medida de 2 θ entre 3 e 120°.

Por fim, foi realizada uma análise por microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM-6390LV). As amostras foram dispostas sobre uma fita de carbono e, por não possuírem caráter condutor, foram metalizadas com uma fina camada de ouro, para visualizar as estruturas da CCA antes e após o tratamento empregando o fungo [17].

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Análise da curva de crescimento

O meio decultura desempenha um papel importante para as diferentes aplicações dos microrganismos [20]. A curva de crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* é apresentada na Figura 3.1, onde nas primeiras 114 h (aproximadamente 4 dias) o microrganismo encontrou-se na fase *lag*, definida como um período onde não há quase variação na biomassa de fungo [20]. Para os diversos ensaios realizados, uma vez superada essa etapa, o *F. oxysporum* apresentou uma fase exponencial de crescimento no meio de cultura com 20 g/L de CCA que contém principalmente SiO_2 e outros elementos em baixas concentrações como Na, K, Fe, Mg, Mn, Al. Esses elementos podem estimular o crescimento pois são considerados como essenciais para várias funções [21]. Após 174 h (aproximadamente 7 dias) o estágio final conhecido como fase estacionária, caracterizada pela escassez de nutrientes, começa a aparecer, especialmente para o meio de cultura contendo CCA e sílica. Esses resultados indicam que o fungo cresceu rapidamente e em maior quantidade no meio de cultura com CCA e que não foram observadas mudanças significativas no crescimento do fungo entre os meios de cultura com silicato de sódio e o meio de cultura sem aditivos.

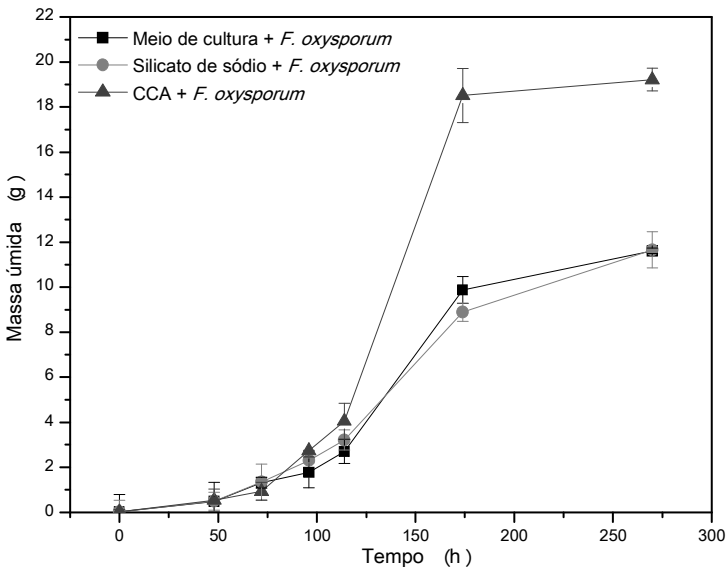


Figura 3.1– Curva de crescimento do fungo *F. oxysporum*.

3.5.2 Análise da variação do pH

A variação do pH em diferentes ensaios foi avaliada em função do tempo. Foram verificadas as condições dos meios contendo tanto sílica como CCA sem adição de biomassa, para descartar mudanças do pH por fatores externos à ação microbiana. Ao longo do experimento, o pH permaneceu em torno de 6,1, enquanto a maior queda foi observada no sistema contendo unicamente o fungo sem a presença de fontes de sílica, até atingir um valor de 3,5. Na Figura 3.2 são mostrados os diferentes perfis de variação de pH. A tendência geral do *F. oxysporum* é diminuir o pH do meio ao longo do tempo. Esse comportamento pode ser explicado a partir da formação de ácidos. BACON *et al.* [22] observaram a capacidade das espécies *Fusarium* de produzir ácidos, especialmente o fusárico.

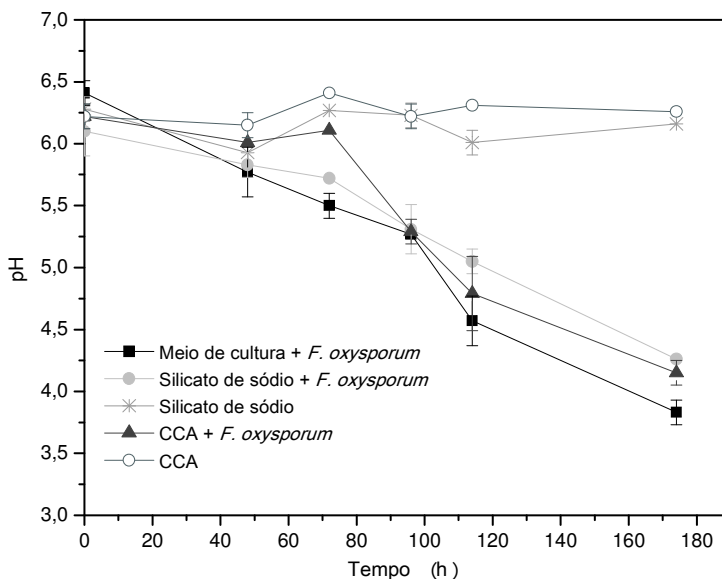


Figura 3.2–Variação do pH durante o processo de biotransformação da CCA pela ação do *F. oxysporum*.

3.5.3 Análise da sílica solúvel

Na Figura 3.3 e 3.4 são apresentadas as curvas de concentração de sílica solúvel em função do tempo para soluções com cinza da casca de arroz, silicato de sódio e meio de cultura com e sem microrganismo.

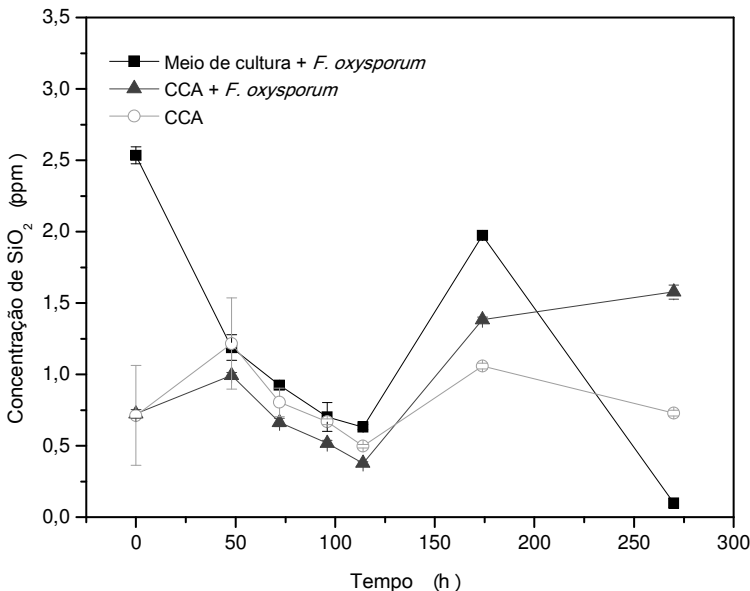


Figura 3.3—Concentração de sílica solúvel em função do tempo para soluções de CCA com e sem *F. oxysporum* e meio de cultura com presença de *F.oxysporum*.

Nas primeiras 120 h, observa-se que o microrganismo está num processo de adaptação. Logo após este processo, começa a disponibilização da sílica no meio líquido. Segundo BANSAL *et al.* [17], formam-se então nanopartículas esféricas de sílica. O período de disponibilização da sílica corresponde à fase exponencial do *F. oxysporum*, que é o período onde se tem maior quantidade de biomassa e de enzimas excretadas extracelularmente pelo *F. oxysporum* para a lixiviação seletiva de sílica, assim como a geração de proteínas que estabilizam as partículas [17,23, 24]. No processo onde somente se tem o meio de cultura (Figura 3.3), observam-se variações na concentração de sílica, pois o microrganismo empregado foi obtido de uma placa de *Petri* com meio de cultura sólido na presença de CCA com a finalidade de diminuir o tempo de adaptação à sílica.

Na Figura 3.4 são apresentados os resultados obtidos dos ensaios realizados empregando duas soluções de silicato de sódio com uma concentração inicial de 10 ppm de SiO_2 , 15 g/L de extrato de malte e 3 g/L de glicose, com e sem a presença do *F. oxysporum*. Ambas as curvas apresentaram um comportamento similar com concentrações de sílica entre 40 e 50 ppm. Presume-se que o microrganismo, além de disponibilizar a sílica ao meio, atua como agente modificador na estrutura da sílica presente

no silicato de sódio, o que está de acordo com resultados reportados na literatura [17].

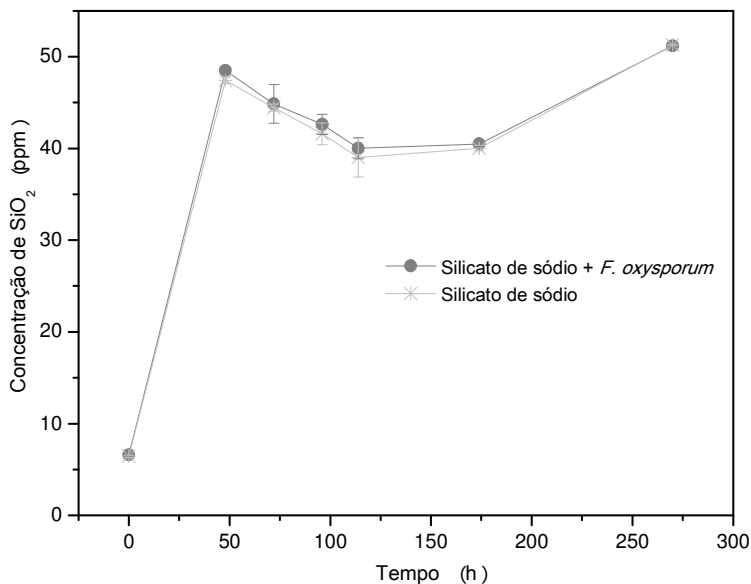


Figura 3.4 – Concentração de sílica em função do tempo para soluções de silicato de sódio e meio de cultura com e sem *F. oxysporum*.

3.5.4 Análise dos grupos funcionais da CCA antes e após a biotransformação

A cinza da casca de arroz foi analisada por espectrofotometria de IR, que permitiu obter as bandas de absorção característicos da cinza antes e depois do tratamento empregando *F. oxysporum*. A maioria dos picos relacionados com a sílica está compreendida entre os comprimentos de onda 500 e 1250 cm^{-1} . Em ambos os casos, a mudança mais importante está no intervalo entre 950 e 1250 cm^{-1} com pico máximo em 1070 cm^{-1} , que pode ser observado na Figura 3.5, associada com o modo vibracional de estiramento das moléculas assimétricas Si-O-Si [17,25]. Esse halo está presente em menor intensidade na CCA tratada, devido possivelmente à lixiviação de partículas de sílica ao meio aquoso [17]. Os picos associados a comprimentos de onda de 540 e 800 cm^{-1} estão relacionados ao modo de balanço e flexão de SiO_2 , respectivamente [26]. O pico ao redor de 2300 cm^{-1} está associado às impurezas da CCA.

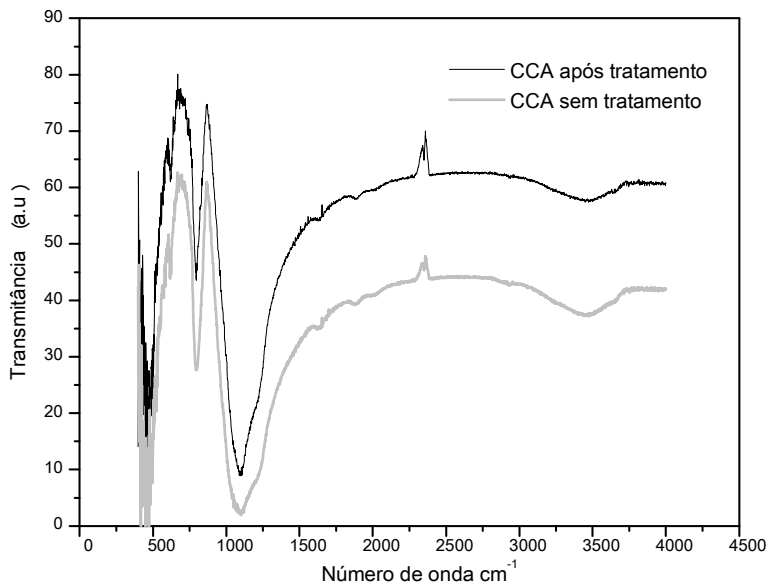


Figura 3.5 – Espectro de infravermelho da CCA antes e após o tratamento com *F. oxysporum*.

3.5.5 Determinação da composição de fases da CCA

Segundo o difratograma obtido antes e após o tratamento, Figura 3.5 e Figura 3.6 respectivamente, a sílica presente na cinza manteve-se predominantemente amorfa e apresentou um halo de baixa intensidade entre 15 e 30°, de acordo com relatos encontrados na literatura [1,3], este halo é típico da forma estrutural da CCA.

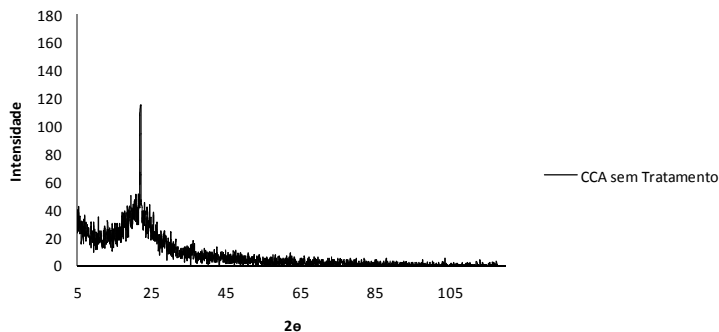


Figura 3.6 – Difratograma de cinza da casca de arroz.

Na Figura 3.7 picos correspondentes à cristobalita, em torno de 22° e 37° começam a evidenciar-se com maior intensidade após o tratamento com o fungo. Provavelmente a ação do fungo é já significativa a temperaturas baixas (28°C) e pressão atmosférica. Resultados semelhantes empregando casca de arroz foram encontrados por Bansal *et al.* [17].

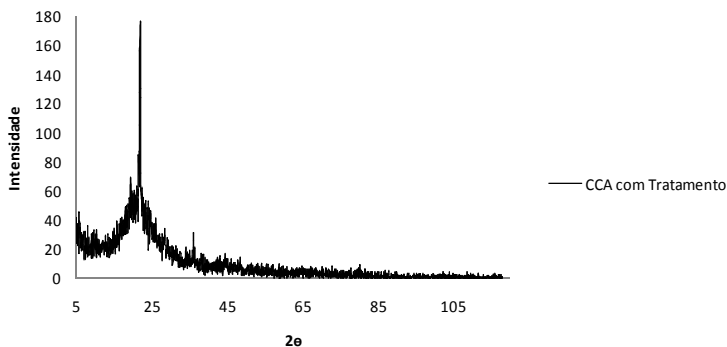


Figura 3.7 –Difratograma de cinza da casca de arroz após o tratamento com *F. oxysporum* à temperatura de 28°C , pressão atmosférica. Picos destacados correspondem à cristobalita.

3.5.6 Análise da microestrutura das partículas da CCA

As micrografias obtidas por MEV das partículas de CCA permitiram identificar uma estrutura lamelar e porosa (Figura 3.8 a, c, e), atribuída à oxidação dos compostos orgânicos que foram convertidos em gases durante o processo de combustão [1]. Nessas micrografias, Figura 3.8 (a, b, e, f), também pode ser vista a ondulação da epiderme externa, região que concentra o maior percentual de sílica [1, 2, 24]. A Figura 3.8 (c, d) mostra, com maior detalhamento, a epiderme interna de uma das partículas de casca de arroz presente na cinza, antes e depois do tratamento. Nota-se uma estrutura celular e porosa conhecida como esqueleto de sílica, resultante da remoção da lignina e celulose durante a queima [2] e que coincide com a área de menor mudança estrutural, possivelmente por apresentar menor concentração de sílica em relação à parte externa da CCA [2].

Após o tratamento com o fungo *F. oxysporum*, foi notado um aumento na porosidade (Figura 3.8 b, c, d), provavelmente devido ao desprendimento de partículas estruturadas da sílica pela ação do microrganismo. Os mecanismos podem ser atribuídos à ação enzimática e lixiviação ácida. [14,17, 23].

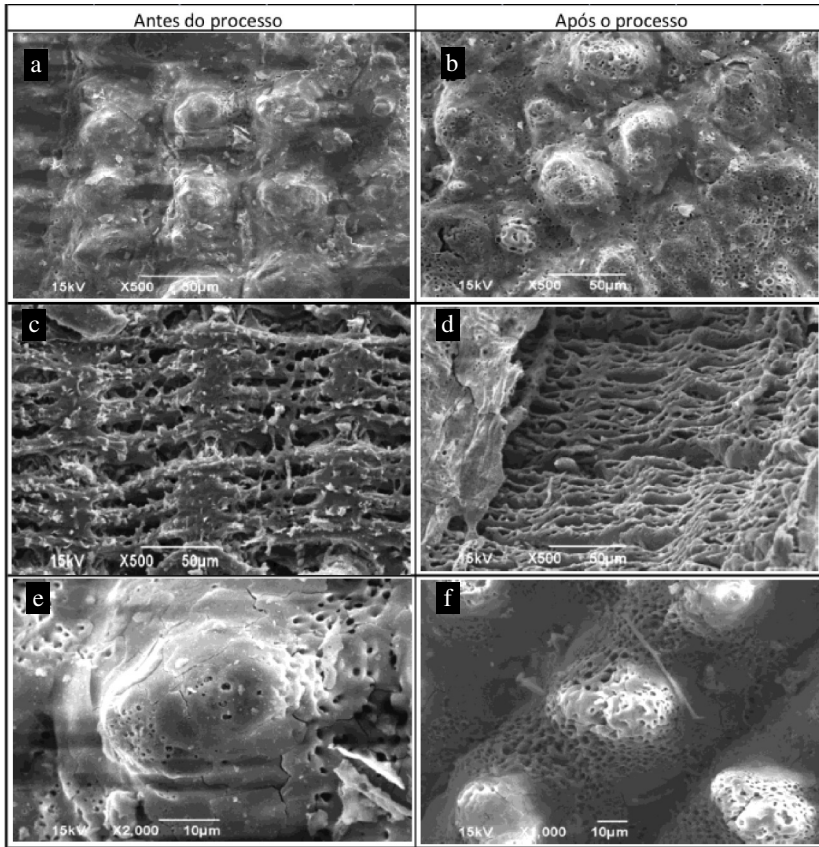


Figura 3.8 – Micrografias da cinza da casca de arroz antes (a,c, e) e após o tratamento com *F. oxysporum* a 28°C e pressão atmosférica (b,d,f)

3.6 CONCLUSÃO

Em conclusão, foi possível observar que o fungo *F. oxysporum* pode ser usado para biotransformar a sílica amorfa presente na cinza da casca de arroz através da ação microbiana.

O fungo *F. oxysporum* apresenta uma maior taxa de crescimento no meio de cultura contendo CCA. O tempo para chegar à fase estacionária é de aproximadamente 11 dias. Uma produção de biomassa ao redor de 20 g/L foi obtida. Para diminuir a fase *lag*, que é de aproximadamente 4 dias, é necessário empregar outros mecanismos de indução.

A síntese de nanomateriais óxidos à temperatura ambiente é possível mediante o uso de microrganismos e de resíduos agroindustriais. O

método proposto apresenta baixo custo e de baixo impacto ambiental. A sílica formada tem possibilidade de ser empregada na indústria da construção civil como elemento de reforço a baixas idades de hidratação, o que está sendo pesquisado na continuidade deste trabalho.

3.7 REFERÊNCIAS

- [1] MARTINEZ ANGEL, J.D., PINEDA VASQUEZ, T.G., JUNKES, J.A., HOTZA, D., “Caracterização de cinza obtida por combustão de casca de arroz em reator de leito fluidizado”, *Química Nova*, v. 32, n. 5, pp. 1110-1114, 2009.
- [2] DELLA, V.P., HOTZA, D., JUNKES, J.A., OLIVEIRA, A.P.N., “Estudo comparativo entre sílica obtida por lixívia ácida da casca de arroz e sílica obtida por tratamento térmico da cinza de casca de arroz”, *Química Nova*, v. 29, n. 6, pp. 1175-1179, 2006.
- [3] DELLA, V.P., KUHN, I., HOTZA, D., “Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica”, *Química Nova*, v. 24, n. 6, pp. 778-782, 2001.
- [4] CHANDRASEKHAR, S., PRAMADA, P. N.; PRAVEEN, L., “Effect of organic acid treatment on the properties of rice husk silica”, *Journal of Materials Science*, v. 40, pp. 6535-6544, 2005.
- [5] DA SILVA JR, J., *Obtenção de xerogel de sílica a partir das cascas de arroz em uma aproximação bottom-up para produção de materiais em eletrônica*, Tese de Mestrado, UFSC, Florianópolis, SC, 2009.
- [6] KALAPATHY, U., PROCTOR, A., SHULTZ, J., “A simple method for production of pure silica from rice hull ash”, *Bioresource Technology*, v. 73, pp. 257-262, 2000.
- [7] LIOU, T.H., “Preparation and characterization of nano-structured silica from rice husk”, *Materials Science and Engineering A*, v. 364, pp. 313–323, 2004.
- [8] CHAKRAVERTI, A., MISHRA, P., BANERJEE, H.D., “Investigation of combustion of raw and acid-leached rice husk for production of pure amorphous white silica”, *Journal of Materials Science*, v. 23, pp. 21-24, 1988.
- [9] RAMARAO, G., SASTRY, A., ROHATGI, P.K., “Nature and reactivity of silica available in rice husk and its ashes”, *Bulletin of Materials Science*, v. 12, pp. 469, 1989.
- [10] SARIKAYA, M., “Biomimetics: Materials fabrication through biology”, *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 96, n. 25, pp. 14183-14185, 1999.

- [11] XIANG, T., CHOW, S.K., ZHANG, D., “Biomorphic Mineralization: From Biology to Materials”, *Progress in Materials Science*, v. 54, n. 5, pp. 542-659, 2009.
- [12] CHERYL, W., HUANG, J., KAPLAN, D., “Lessons from seashells: silica mineralization via protein templating”, *Trends in Biotechnology*, v. 22, n. 11, pp. 577-585, 2004.
- [13] LIKHOSHWAY, Y.V., SOROKOVIKOVA, E.G., BELYKH, O.I., KALUZHNYAYA, O.L.V., BELIKOV, S.I., BEDOSHVILI, Y.D., KALUZHNYAYA, O.K.V., MASYUKOVA, J.A., SHERBAKOVA, T.A., “Visualization of the silicon biomineralization in cyanobacteria, sponges and diatoms”, *Biosphere Origin and Evolution*, v. 3, pp. 219-230, 2008.
- [14] EHRlich, H., DEMADIS, K.D., POKROVSKY, O.S., KOUTSOUKOS, P.G., “Modern views on decalcification: biosilica and biotic silica dissolution in natural and artificial environments”, *Chemical Reviews*, v.110, pp. 4656–4689, 2010.
- [15] BANSAL, V., RAUTARAY, D., AHMAD, A., SASTRY, M., “Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*”, *Journal of Materials Chemistry*, v. 14, pp. 3303-3305, 2004.
- [16] BANSAL, V., PODDAR, P., AHMAD, A., SASTRY, M., “Room-temperature biosynthesis of ferroelectric barium titanate nanoparticles”. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 36, pp. 11958-11963, 2006.
- [17] BANSAL, V., AHMAD, A., SASTRY, M., “Fungus-mediated biotransformation of amorphous silica in rice husk to nanocrystalline silica”, *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 43, p. 14059-14066, 2006.
- [18] DALMAGRO, J. *Associação de Trichoderma sp. e fungicidas no controle de Fusarium oxysporum f. sp. Phaseoli*. Tese de Mestrado, UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.
- [19] EATON, A.D., CLESCERI, L.S., RICE, E.W., GREENBERG, A.E., FRANSON, M.A.H. (editors), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th ed., American Public Health Association, Washington, DC, 1995.
- [20] CASAS, A.E., TOREM, M., SOUZA L., “Fundamental studies of *Rhodococcus opacus* as a biocollector of calcite and magnesite”, *Minerals Engineering*, v. 20, n. 10, pp. 1026-1032, 2007.
- [21] MITCHELL, R., GU, D., *Environmental microbiology*, 2nd ed., Wiley Blackwell, Hong Kong, 2009.

- [22] BACON, C.W., PORTER, J.K., NORRED, W.P., LESLIE, J.F., "Production of fusaric acid by *Fusarium* Species", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 11, pp. 4039-4043, 1996.
- [23] GADE, A., INGLE, A., WHITELEY, C., RAI, M., "Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications", *Biotechnology Letters*, v. 32, n. 5, pp. 593-600, 2010.
- [24] ROZAINEE, M., NGO, S. P., SALEMA, A.A., TAN, K.G.; ARIFFIN, M., ZAINURA, Z.N., "Effect of fluidising velocity on the combustion of rice husk in a bench-scale fluidised bed combustor for the production of amorphous rice husk ash", *Bioresource Technology*, v. 99, n. 4, pp. 703-713, 2008.
- [25] UMEDA, J., KONDOH, K., "High-purification of amorphous silica originated from rice husks by combination of polysaccharide hydrolysis and metallic impurities removal", *Industrial Crops and Products*, v. 32, n. 3, pp. 539-544, 2010.

4 EXTRACELLULAR SYNTHESIS OF SILICA OXIDE PARTICLES BY *Fusarium oxysporum* FROM RICE HUSK ASH²

4.1 INTRODUCTION

Chemical synthesis of silicon oxide (silica, SiO₂) is expensive and requires extreme conditions of pH, temperature and pressure[1]. Silica is an inorganic material widely used in commercial applications as well as mesoporous silica membranes for filtration and molecular separation [2], precursor in photonic and solar cell industries [3] among others. Several silica sources have been used including fumed silica, sodium silicate, and TEOS (tetraethylorthosilicate) [4,5]. The use of a cheaper source for silica synthesis may be an important contribution to the industrial scale production of several materials.

Rice husk (RH) is an agricultural waste material abundantly available in rice-producing countries. RH might be burned as a fuel due to its high calorific power (~15MJ/kg) [6-8]. However, combustion of RH produces large amounts of waste products; particularly ashes and their disposal are a serious burden on environment. The rice husk ash (RHA) contains 87–97 wt% of silica in a hydrated amorphous form [9-11], which could be a suitable precursor for chemical synthesis involving silica sources.

This paper presents a biological route for synthesis of SiO₂ from rice husk ash using *Fusarium oxysporum*.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Materials

The rice husk ash used in this study was obtained from Indústria e Comércio de Arroz Fumacense Ltda (Morro da Fumaça, SC, Brazil), without pretreatment.

F. oxysporum was obtained from Universidad Pontificia Bolivariana (UPB-Colombia), and maintained in malt agar (Hymedia). To prepare biomass for bioprocessing, fungus was grown in a liquid medium (MG) consisting of malt extract (1.5%), glucose (0.3%). The pH value was adjusted to 6.8 with HCl 0.3 M and NaOH 0.3 M solutions. The flasks were incubated on orbital shaker at 28°C and agitated at 200 rpm [12-14].

² Published in: **Materials Science Forum**, v. 727-729, p. 1153–1157, 2012.

4.2.2 Processing

Bioprocessing of rice husk ash by *F. oxysporum* to obtain SiO₂ particles was performed in 100 mL distilled water containing 2 g rice husk ash in a 250 mL Erlenmeyer flask. After heatsterilization (121°C, 20 min), the medium with RHA was inoculated with fungal biomass (0.5 g dry weight). The reaction between the fungal biomass and rice husk ash was carried out in a shaker (200 rpm) at 28 °C during 140 h. The reaction products were collected at different time intervals (each 24 h) after separating the fungal mycelia and rice husk ash from the aqueous component by filtration.

4.2.3 Characterization

Concentration of dissolved silica was monitored using UV spectroscopy at 660 nm by the standard molybdate method [15]. RHA after treatment was separated from the aqueous solution by filtration. Then, fungal mycelia and some substances as fungal proteins were removed from RHA at 400 °C for 2 h. The filtrate thus obtained with biotransformed silica was centrifuged at 4500 rpm for 15 min to remove impurities as fungal proteins and then dried at 100°C for 24 h. The powders were subjected to a scanning electron microscopy (SEM, JEOL JSM-6390LV- tungsten filament) at LCME/UFSC. The Brunauer–Emmett–Teller (BET) surface area and porosity of the samples were measured with a nitrogen adsorption instrument (Micrometrics ASAP 2020). Dissolved silica from rice husk ash during the reaction with *F. oxysporum* was monitored using UV spectroscopy. Dissolved silica was evaluated at pH 6.8 and 28°C.

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

Fig. 4.1 shows that ~30% of silica on RHA is soluble in water after 24 h. The amount of dissolved silica from RHA steadily increased to ~80% maximum extraction at ~5 days.

Recently Bansal *et al.* have shown that *F. oxysporum* fungus bioleached silica nanoparticles from rice husk [16] and sand [17]. The formation of the silica particles is believed to follow a two-step process. The first step involves leaching of silica from grains in the form of silicic acid by extracellular proteins produced by fungal biomass. In the second step the silicate complex is hydrolyzed to silica by specific proteins present in the fungus [18]. Bansal *et al.* [17] found a higher amount of leached-out silica (96%). This difference is probably associated to the composition of the silica source, since rice husk

presents more organic material than rice husk ash. In the latter case, the organic matter is associated to non-burned carbon species.

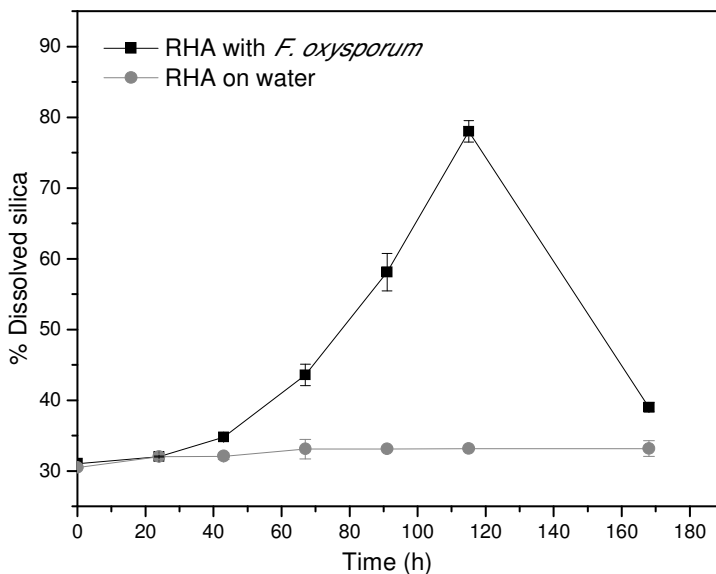


Figura 4.1 –Dissolved silica from RHA along the time in the presence of (a) *F.oxysporum* and (b) water.

Fig. 4.2 shows SEM micrographs of rice husk ash obtained by extracellular process using *F. oxysporum* at 28°C and atmospheric pressure. The surface of rice husk ash could be clearly seen. The SEM images were associate to EDX semi-quantitative analysis (Fig. 4.2, A and B), which show the presence of heterogeneously distributed silica on upper as well as lower surfaces of rice husk ash. This was also reported by Rozainee *et al.*[19] and Martinez *et al.*[6]. Particles before treatment are irregular in shape with average size of $610 \pm 60 \mu\text{m}$. After fungal treatment (Fig. 4.2, C and D), the structure of RHA was broken down, the morphology of silica particles changed, and the average size decreased. Moreover, after bioprocessing Si peaks in EDX presented a stronger signal (Fig. 4.2, C) corresponding to a larger amount of silica particles leached out. In this way, the extracellular bioprocess led to transformation of silica from rice husk ash at room temperature.

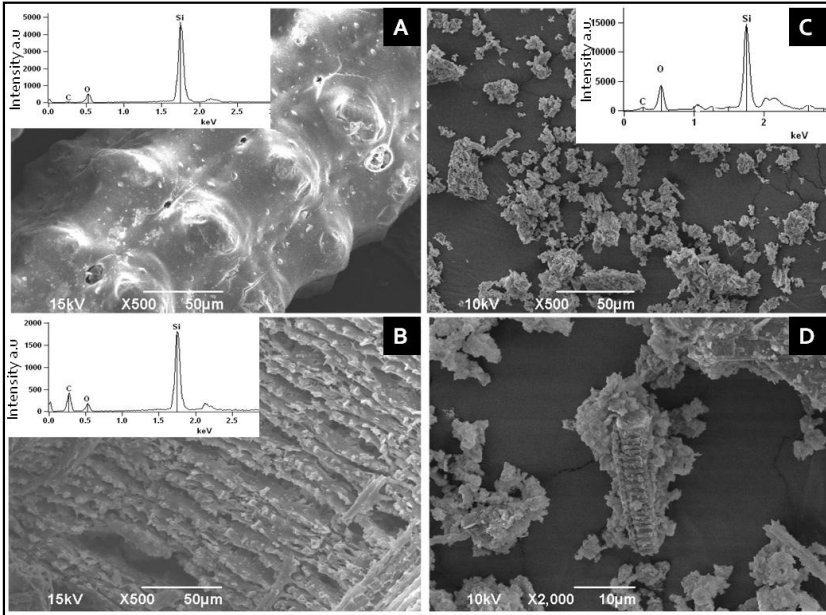


Figure 4.2 –SEM micrographs of RHA surfaces: (A) upper and (B) lower surfaces before fungal treatment; (C) upper and (D) lower surfaces after fungal treatment.

Specific surface area of as-received RHA was $\sim 115 \text{ m}^2/\text{g}$. After extracellular bioprocess RHA particles corresponded to $125 \text{ m}^2/\text{g}$ and silica leached-out particles to $177 \text{ m}^2/\text{g}$, respectively. Higher specific surface areas of micro or nanosilica may lead to increased strength in concrete, when used as reinforcement additives [20]. Moreover, a decrease in porosity and specific volume was evidenced. At the beginning, RHA presented variable porosity with specific volume up to $0.026 \text{ cm}^3/\text{g}$. After bioprocessing, the porosity of RHA was lower, while silica leached out particles showed no porosity. Therefore, *F. oxysporum* not only dissolved silica, but also modified porosity and produced dense silica particles.

4.4 CONCLUSIONS

Extracellular synthesis of silicon dioxide from rice husk ash using *F. oxysporum* was possible, being 80% of dissolved silica from RHA.

F. oxysporum produced morphology modifications on RHA structure, which was confirmed by a decrease in particle average size ($\sim 600 \mu\text{m}$ to $\sim 5 \mu\text{m}$), and specific surface area, which increased from

115 to 125 m²/g. Moreover, dissolved silica presented higher surface area (177 m²/g) and density.

Biosynthesis of oxide materials using a fungal route is feasible from cheap agro-industrial waste materials.

4.5 REFERENCES

- [1] K. Nakagawa, H. Matsuyama, T. Maki, M. Teramoto, N. Kubota, *Separation and Purification Technology*, 44 (2005) 145-151.
- [2] I.J. Bruce, J. Taylor, M. Todd, M.J. Davies, E. Borioni, C. Sangregorio, T. Sen, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 284 (2004) 145-160.
- [3] L.-Y. Lin, J.-T. Kuo, H. Bai, *Journal of Hazardous Materials*, 192 (2011) 255-262.
- [4] G. Chandrasekar, K.-S. You, J.-W. Ahn, W.-S. Ahn, *Microporous and Mesoporous Materials*, 111 (2008) 455-462.
- [5] L.Y. Lin, H. Bai, *Microporous and Mesoporous Materials*, 136 (2010) 25-32.
- [6] J.D. Martínez, T. Pineda, J.P. López, M. Betancur, *Energy*, 36 (2011) 3846-3854.
- [7] E. Natarajan, A. Nordin, A.N. Rao, *Biomass and Bioenergy*, 14 (1998) 533-546.
- [8] C. Prompubess, L. Mekasut, P. Piumsomboon, P. Kuchontara, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 24 (2007) 989-995.
- [9] J.D. Martinez, T. Pineda, J.P. Lopez, M. Betancur, *Energy*, 36 (2011) 3846-3854.
- [10] J.A. Junkes, V.P. Della, W. Acchar, A.P.N. Oliveira, D. Hotza, *Industrial Ceramics*, 26 (2006) 11-15.
- [11] M. Rozainee, S.P. Ngo, *Proceedings of the 18th International Conference on Fluidized Bed Combustion* (2005) 169-176.
- [12] V. Bansal, A. Ahmad, M. Sastry, *Journal of the American Chemical Society*, 128 (2006) 14059-14066.
- [13] T.L. Riddin, M. Gericke, C.G. Whiteley, *Nanotechnology*, 17 (2006) 3482-3489.
- [14] Y. Govender, T. Riddin, M. Gericke, C.G. Whiteley, *Biotechnology Letters*, 31 (2009) 95-100.
- [15] C.L. Schelske, E.F. Stoermer, *Science*, 173 (1971) 423-424.
- [16] V. Bansal, A. Ahmad, M. Sastry, *Journal of the American Chemical Society*, 128 (2006) 14059-14066.
- [17] V. Bansal, A. Sanyal, D. Rautaray, A. Ahmad, M. Sastry, *Advanced Materials*, 17 (2005) 889-892.

- [18] H. Ehrlich, K.D. Demadis, O.S. Pokrovsky, P.G. Koutsoukos, *Chemical Reviews*, 110 (2010) 4656-4689.
- [19] M. Rozainee, S.P. Ngo, A.A. Salema, K.G. Tan, M. Ariffin, Z.N. Zainura, *Bioresource Technology*, 99 (2008) 703-713.
- [20] M.F.M. Zain, M.N. Islam, F. Mahmud, M. Jamil, *Construction and Building Materials*, 25 (2011) 798-805.

5 INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE PROCESSO NA OBTENÇÃO DE SÍLICA A PARTIR DE CINZA DA CASCA DE ARROZ PELA AÇÃO DE *Fusarium oxysporum*³

5.1 INTRODUÇÃO

A cinza da casca de arroz (CCA) é um resíduo do beneficiamento industrial do arroz que contém entre 54 e 96% de SiO₂,¹ o que a torna uma matéria-prima valorizada para a produção de sílica, sob diversas formas.² A CCA, natural ou tratada química e/ou termicamente, tem aplicações como isolante térmico,^{3,4} pozolana em cimento e concreto,⁵⁻⁹ filler em polímeros,¹⁰⁻¹³ precursor para síntese de carbetos de silício,¹⁴ zeólita¹⁵ e cordierita,¹⁶ suporte de catalisadores,^{17,18} matéria-prima para cerâmica e vidro,¹⁹⁻²² adsorvente de metais pesados²³⁻²⁵ e gases tóxicos,^{26,27} entre outras.

Para se aumentar o valor agregado da CCA, diversos processos químicos,²¹⁻³¹ térmicos,³²⁻³⁴ ou uma combinação de ambos³⁵⁻³⁷ têm sido relatados, de modo a aumentar a superfície específica das partículas de sílica e diminuir a quantidade de impurezas, que incluem elementos alcalinos e alcalino-terrosos. No entanto, esses tratamentos empregam combustíveis fósseis para gerar calor, além de ácidos ou bases como insumos em operações de lixiviação. Assim, há produção de novos resíduos sólidos, efluentes líquidos e emissões gasosas em grandes quantidades, além de consumo energético significativo. Tais aspectos limitam a aplicação em maior escala desses tratamentos, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental.

Recentemente, cientistas começaram a estudar a biotransformação de micro e nanomateriais usando bactérias, fungos e algas, capazes de sintetizar substâncias como parte do seu metabolismo.³⁸⁻⁴¹ A formação de sílica micro e nanoestruturada através da biodegradação da cinza da casca de arroz pela ação de fungos é uma alternativa promissora,^{42,43} já que parte de um resíduo, tem um baixo custo de insumos e pode ocorrer a temperatura ambiente.

Os fungos filamentosos têm se destacado nesses processos de biotransformação por sua capacidade de degradação do material lignocelulósico, através de produção de enzimas extracelulares não específicas. Basicamente, as enzimas responsáveis pela degradação da cinza da casca de arroz são as enzimas oxidativas (oxidoreduções) e hidrolíticas (hidrolases).³⁹

³Submetido para publicação.

Neste trabalho, foi usado um planejamento experimental para analisar a influência de parâmetros de processo na produção extracelular de enzimas como a β -glicosidase e peroxidase e seus possíveis envolvimento na produção de sílica solúvel e nanoestruturada para a síntese da sílica com o uso do fungo *F. oxysporum*. Particularmente, foram analisados pH, tempo de fermentação e concentração de glicose no meio de cultura.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Materiais

A cinza da casca de arroz foi fornecida pela Indústria e Comércio de Arroz Fumacense (Morro da Fumaça, SC, Brasil) com diâmetro médio de $\sim 600\mu\text{m}$. Foram utilizados Azul de Comasie Brilliant Blue G-250 e p-nitrofenil- β -Dglucopyranoside (PNPG), ambos da Sigma-Aldrich; o-dianisidina e peróxido de hidrogênio da Merck; ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH) da Vetec; extrato de malte e glicose anidra da Hymedia.

O microrganismo empregado foi o *F. oxysporum*, fornecido pelo Centro de Estudios e Investigaciones en Biotecnología (CIBIOT) da Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), Medellín, Colômbia. O fungo foi mantido em meio de cultura sólido com extrato de malte e glicose em placas com incubação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.⁴²

5.2.2 Bioprocesso

O meio de cultura foi preparado em frascos erlenmeyer, contendo 15 g/L de extrato de malte, 20 g/L de cinza da casca de arroz. O pH foi ajustado empregando NaOH 0,1 M e/ou HCl 0,1 M. Diferentes concentrações de glicose foram testadas (3, 8 e 16 g/L). Posteriormente, os frascos foram esterilizados em autoclave a 120°C , durante 20 min.⁴³ Cada frasco foi inoculado com $\sim 0,5$ g (base úmida) de *F. oxysporum*, em câmara estéril e mantido em agitação a 200 rpm a 28°C durante os diferentes tempos estabelecidos no planejamento experimental (48, 144 e 240 h).

5.2.3 Planejamento experimental

Foi realizado um planejamento fatorial 2^k com um ponto central onde k representa 3 fatores: pH, tempo de contato entre o fungo e a cinza da casca de arroz (t) e concentração de glicose (GC). A base 2 representa o nível de tratamentos para cada fator. Quando o ponto central é adicionado, estima-se o efeito das interações e a curvatura da

superfície de resposta sem realizar o planejamento fatorial completo, diminuindo o número de experimentos.⁴⁴ Na Tabela 5.1 são apresentados os fatores e os níveis selecionados nesta pesquisa.

Tabela 5.1- Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^k para a síntese de sílica.

Fatores	-1	0	1
pH	3,0	6,5	10
t(h)	48	144	240
GC(g/L)	3	8	16

5.2.4 Dosagem de enzimas e proteínas totais

A concentração de proteína total foi dosada usando o método de Bradford.⁴⁵ A enzima β -glicosidase foi avaliada segundo o método de Tan e colaboradores.⁴⁶ A determinação da atividade da peroxidase foi feita através do método de Vinterhalter & James, baseado na oxidação da O-dianisidina a 460 nm.⁴⁶

5.2.5 Quantificação da sílica solúvel

A quantificação da sílica solúvel foi feita pelo método colorimétrico em espectrofotômetro UV-Visível (Pró-Análise V-1200) com comprimento de onda de 660 nm. A distribuição de tamanho de partícula em suspensões aquosas foi determinada através de difração a laser (Mastersizer 2000, Malvern). Finalmente, foi realizada uma análise por microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM-6390LV).

5.2.6 Análise química

A análise química da CCA antes e após o bioprocessamento foi realizada por espectrometria de fluorescência de raios X e espectrometria de absorção atômica (FRX) no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Materiais (LDCM), em Criciúma.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Planejamento experimental

O planejamento fatorial determina quais fatores têm efeitos relevantes na resposta e também permite medir as interações entre eles.

Os processos biológicos empregados na síntese de materiais metálicos e de diferentes óxidos exigem condições específicas de pH,

concentração de nutrientes, tempo de contato, temperatura, entre outros. Essas condições estão diretamente relacionadas não somente à solubilização da sílica no meio aquoso, como também à produção de enzimas extracelulares responsáveis pela hidrólise e redução de diferentes compostos.

5.3.2 Proteína total extracelular

A análise de variância (ANOVA) e o diagrama de Pareto com $p=0,5$ indicam que estatisticamente o pH da solução foi o fator que mais influenciou na produção de proteínas. Alguns trabalhos publicados demonstraram que a produção de proteínas extracelulares pode acompanhar a produção de biomassa em fungos filamentosos.⁴⁷ Nas condições do bioprocessamento, para maiores valores de pH o *F. oxysporum* na presença de 20 g/L de CCA produziu maiores concentrações de proteína. Embora as interações entre o pH e a concentração de glicose e o tempo de fermentação e a concentração de glicose tenham sido pouco consideráveis, essas não podem ser descartadas. O modelo de segunda ordem na Eq. (5.1) foi o que apresentou menor erro ($R^2 = 0,755$ e ajuste = 0,535).

$$PT \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = 308,8 + 447,33pH + 62,12pH^2 + 180,42pH \cdot GC - 178,24t \cdot GC \quad (5.1)$$

5.3.3 Peroxidases totais

As peroxidases (POD) constituem um grupo de enzimas oxidoreduzidas que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio e a concomitante oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos.^{48,49} Atividade destas enzimas produzidas por microrganismos, em especial fungos, tem sido relacionadas com uma grande variedade de processos de interesse biotecnológicos tais como degradação de poluentes, entre outros.⁴⁹ A ANOVA e o diagrama de Pareto com $p = 0,5$ indicam que existe uma forte interação entre os fatores. Foi observado conforme a Fig. 5.1, que a produção desta enzima é considerável nas primeiras 90h da fermentação e em pH em torno de 3,0-4,0, preferencialmente quando a concentração de glicose é alta (16g/L).

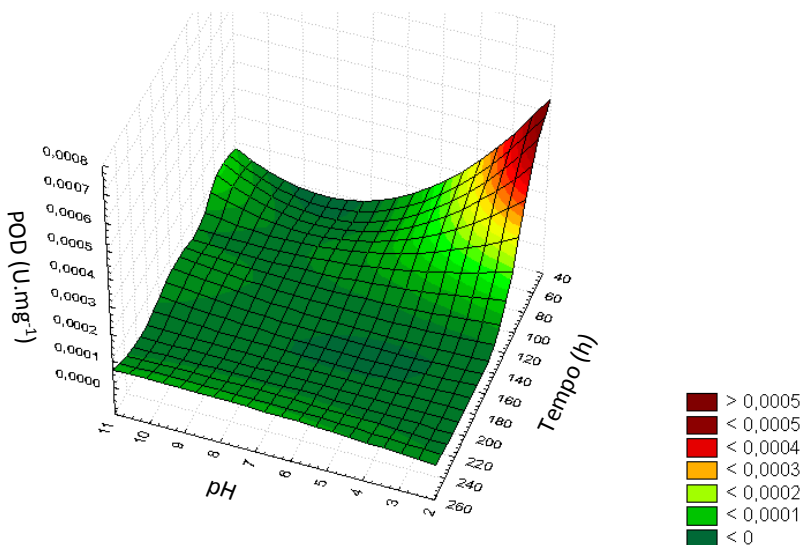


Figura 5.1- Modelo de superfície de resposta para produção de POD.

A Eq. (5.2) representa o modelo estatístico obtido pela análise do planejamento experimental ($R^2 = 0,770$ e ajuste = $0,563$):

$$\begin{aligned}
 POD \left(\frac{U}{mg} \right) = & 1,5 \times 10^{-5} + 1,47 \times 10^{-4}GC + 5,8 \times 10^{-5}GC^2 + 1,8 \times \\
 & 10^{-4}pH \cdot t - 1,9 \times 10^{-4}pH \cdot GC - 1,6 \times 10^{-4}t \cdot GC
 \end{aligned} \quad (5.2)$$

5.3.4 β -Glicosidase

Os fatores selecionados, segundo a ANOVA e o diagrama de Pareto com $p = 0,5$; indicam que existe uma forte interação entre as variáveis na produção da β -glicosidase, principalmente envolvendo o tempo. A produção desse tipo de enzima foi maior em intervalos de concentração de glicose elevadas. No entanto, para tempos maiores do bioprocessamento, provavelmente em função da escassez dos nutrientes, a produção dessa enzima também foi estimulada. Provavelmente, *F. oxysporum* secreta este grupo de enzimas para catalisar reações de hidrólise, na qual os carboidratos de mais alta massa molecular presentes no meio de cultura são transformados em glicose, para fornecer energia e manter o metabolismo micelial.⁵⁰ β -glicosidasas são enzimas envolvidas no metabolismo primário do fungo, sendo assim importante monitorar a sua produção ao longo do tempo, visando avaliar

o comportamento metabólico. Por outro lado, a produção da β -glicosidase foi altamente dependente do meio de cultivo e do pH; ^{46,51} para valores de pH próximos ao neutro o meio de cultivo exibiu concentrações elevadas desta enzima, conforme a Fig.5.2.

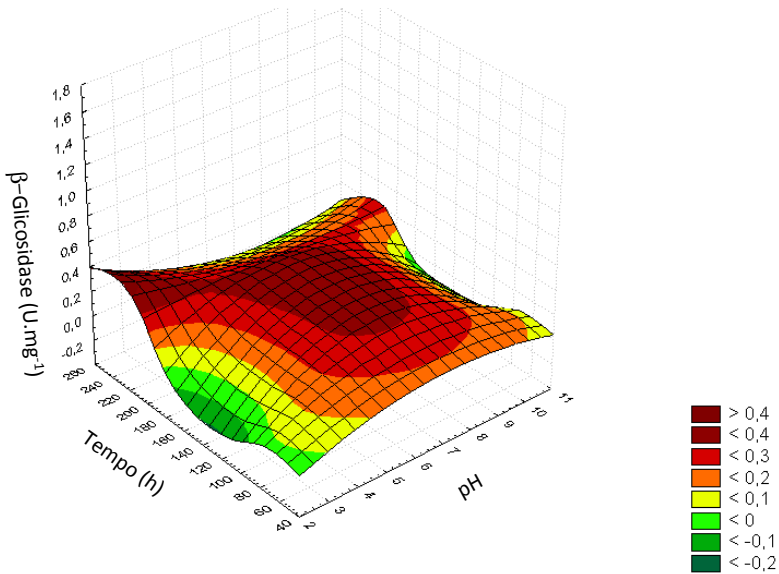


Figura 5.2- Modelo de superfície de resposta para a produção de β -glicosidase.

Por outro lado, na Eq. (5.3) é apresentado o modelo estatístico obtido pela análise do planejamento experimental ($R^2 = 0,704$ e ajuste = 0,439):

$$BG \left(\frac{U}{mg} \right) = 0,098 - 0,058pH + 0,111t + 0,151t^2 - 0,003GC - 0,138GC^2 - 0,151pH \cdot t + 0,125t \cdot GC \quad (5.3)$$

5.3.5 Sílica solúvel da CCA

A disponibilização de sílica no meio aquoso depende principalmente do pH e do tempo de duração da fermentação. Não obstante, existem limites para os valores do pH, pois a produção de enzimas extracelulares responsáveis pela biotransformação da sílica pode ser inibida.

Estudos em diatómeas estabeleceram que a solubilização da sílica através da ação de enzimas denominadas silafinas, por processos de

hidrólise e condensação a pH próximos ao neutro, permitiram a obtenção de partículas de sílica mais estáveis em meio aquoso.

O modelo de superfície de resposta é apresentado na Fig 5.3 e prediz que a maior concentração de sílica dissolvida pode ser obtida a pH superior ao neutro, e com tempos de contato entre o fungo e a CCA na faixa de 80-200 h. Nessa condição, foi observado um máximo de 129 ppm a pH 11,6; $t = 173$ h e $GC = 3$ g/L. Embora a maior concentração predita pelo modelo seja em pH 11,6, para valores de pH próximos ao neutro, concentrações de sílica solúvel consideráveis foram observadas. Uma vantagem, nessa condição, é que é possível diminuir a contaminação da CCA com íons de Na presentes no hidróxido usado para fixar o pH. Com relação ao tempo do bioprocessamento, provavelmente a solubilização e biotransformação da sílica ocorreram como resultado de processos inseridos no metabolismo secundário, os quais são operantes quando se tem algum tipo de estresse, como aquele provocado por alterações de pH, conforme foi verificado. Nesses casos, ocorre a ativação da produção de enzimas extracelulares responsáveis pela biotransformação da sílica.

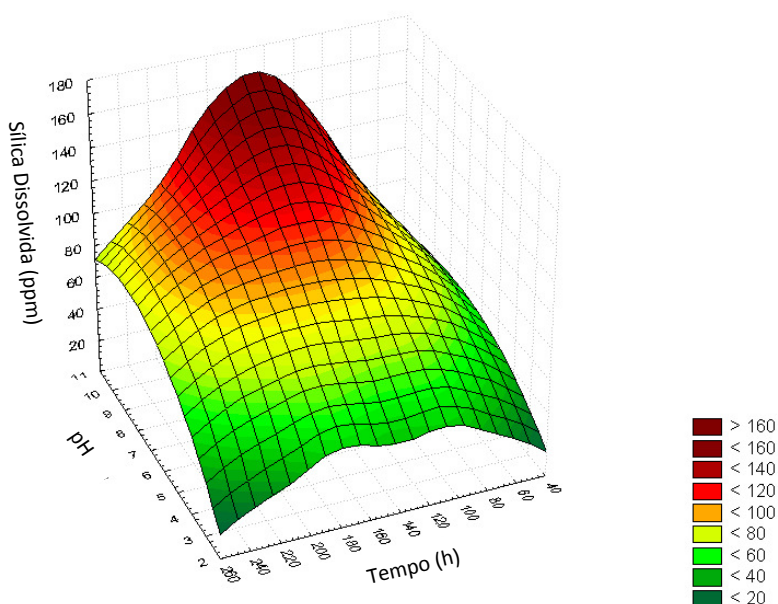


Figura 5.3-Modelo de superfície de resposta para a dissolução da sílica

Por outro lado, a concentração de glicose não exibiu estatisticamente efeitos consideráveis na síntese do dióxido de silício. O modelo de segunda ordem na Eq. (5.4) foi o que apresentou menor erro ($R^2 = 0,896$ e ajuste = 0,803) para a descrição da solubilização da sílica em função dos fatores selecionados:

$$SiO_2(ppm) = 108,85 + 48,63pH + 27,16t - 73,16t^2 - 4,25GC - 4,76GC^2 + 6,20pH \cdot t \quad (5.4)$$

5.3.6 Análise microestrutural da CCA

A estrutura típica da CCA é lamelar e porosa (Fig 5.4A), quando submetida ao bioprocessamento (pH = 6,5; t = 240 h, GC = 3 g/L). Observa-se uma diminuição de tamanho considerável (~600 para ~80 μm), na mesma magnificação (500 \times , Fig 5.4B). Por outro lado, as partículas de sílica solubilizadas apresentaram tamanhos menores que 5 μm (Fig 5.4C).

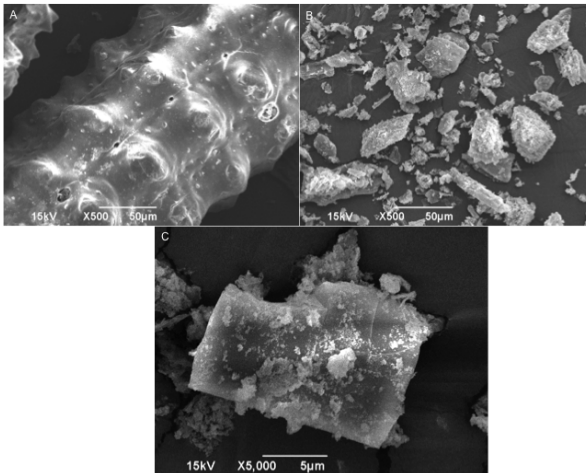


Figura 5.4- Micrografias da cinza da casca de arroz antes (A) e depois (B) do tratamento com *F. oxysporum* a 28 °C (pH = 6,5, t = 240 h, GC = 3 g/L), sílica solubilizada (C).

5.3.7 Tamanho de partícula

A ANOVA e o diagrama de Pareto com $p = 0,5$ indicam que o diâmetro médio das partículas da CCA foi função principalmente do tempo. Tempos de permanência maiores promovem a diminuição do tamanho de partícula da CCA (Fig. 5.5), que é acompanhado pela solubilização da sílica.

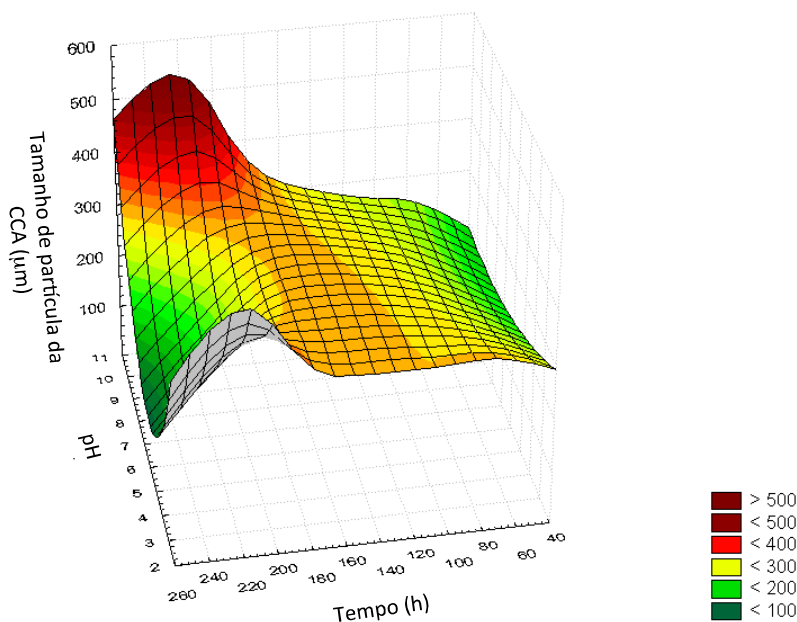


Figura 5.5- Modelo de superfície de resposta: tamanho de partícula da CCA

O modelo de segunda ordem na Eq. (5.5) foi o que apresentou menor erro para a determinação do diâmetro em função dos fatores de maior interação ($R^2 = 0,603$ e ajuste = 0,231):

$$D_{CCA}(\mu m) = 315,44 - 7,03pH - 254,61t^2 + 157,03GC^2 + 75,504pH \cdot t \quad (5.5)$$

5.3.8 Análise química

A análise química foi realizada por FRX, para amostras nos diferentes níveis do pH, para uma concentração fixa de glicose(3g/L) e tempo do bioprocessamento de 240h; na Tabela 5.2 são apresentados os

valores dos diferentes elementos presentes na CCA antes e após solubilização e biotransformação por *F.oxysporum*, na forma de óxidos.

Tabela 5.2- Composição química da CCA.

Elementos	CCA sem tratamento	pH 6,5	pH 3,0	pH 10,0
%(W)				
Al ₂ O ₃	0,06	0,06	0,07	<0,05
CaO	0,55	0,56	0,50	0,57
Fe ₂ O ₃	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
K ₂ O	0,78	1,59	1,41	1,53
MgO	0,32	0,38	0,34	0,38
MnO	0,15	0,16	0,15	0,16
Na ₂ O	<0,05	0,34	0,96	4,07
P ₂ O ₅	0,37	0,83	0,72	0,85
SiO ₂	84,9	92,16	91,45	85,81
TiO ₂	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
PF*	11,6	1,76	4,05	4,55

*Perda ao fogo

Esses resultados indicam que a concentração da sílica na CCA antes do bioprocessamento foi de ~85% e aumentou significativamente para ~92% nos processos em pH próximo ao neutro e pH 3,0. Embora valores de pH >10 sejam usados para a solubilização da sílica nos processos convencionais,⁵³ na presença do *F. oxysporum* a concentração máxima obtida de SiO₂ é de ~86%. Possivelmente, a alcalinidade do meio pode inibir a atividade de algumas enzimas e o metabolismo do fungo, responsáveis pelo processo de hidrólise e condensação da SiO₂, dando como resultado uma baixa concentração deste óxido.

5.4 CONCLUSÕES

A análise estatística indicou que a síntese da sílica em meio aquoso é fortemente dependente do pH e do tempo. Embora a

concentração de glicose não exerça influência direta na biotransformação da sílica, é um parâmetro importante na produção de enzimas extracelulares.

O modelo estatístico de segunda ordem foi o que apresentou menor erro e melhor ajuste para a descrição da solubilização da sílica.

Para impedir a inibição enzimática e garantir maior dissolução de sílica com tamanhos nano e micrométricos, é recomendável trabalhar a pH próximos ao neutro, concentração de glicose baixa 3g/L e por um período de tempo maior a 144h.

5.5 REFERÊNCIAS

1. Fuad, M.Y.A.; Ismail, Z.; Ishak, Z.A.M.; Omar, A.K.M. Em *Plastics Additives*; Pritchard, G., ed.; Springer: New York, 1998.
2. Foletto, E. L.; Hoffmann, R.; Hoffmann, R. S.; Portugal Jr., U. L.; Jahn, S. L.; *Quím. Nova* 2005, 28, 1055.
3. Kapur, P.C.; *Ceram. Int.* 1985, 11, 142.
4. Gonçalves, M.R.F.; Bergmann, C.P.; *Constr. Build. Mater.* 2007, 21, 2059.
5. Ikpong A.A.; *Cem. Concr. Res.* 1993, 23, 387.
6. Ismail, M.S.; Waliuddin, A.M.; *Constr. Build. Mater.* 1996, 10, 521.
7. Anwar, M.; Miyagawa, T.; Gaweesh, M.; *Waste Manag. Ser.* 2000, 1, 671.
8. Safiuddin, M.; West, J.S.; Soudki, K.A.; *Cem. Concr. Composites* 2010, 32, 708.
9. Khan, R.; Jabbar, A.; Ahmad, I.; Khan, W.; Khan, A.N.; Mirza, J.; *Constr. Build. Mater.* 2012, 30, 360.
10. Chand, N.; Dan, T.K.; Verma, S.; Rohatgi, P.S.; *J. Mater. Sci. Letters* 1987, 6, 733.
11. Fuad, M.Y.A.; Yaakob, I.; Ishak, Z.A.M.; Omar, A.K.M.; *Polymer Testing* 1993, 12, 107.
12. Ismail, H.; Nasaruddin, M.N.; Ishiaku, U.S.; *Polymer Testing* 1999, 18, 287.
13. Ayswarya, E.P.; Francis, K.F.V.; Renju, V.S.; Thachil, E.T.; *Mater. Design* 2012, 41, 1.
14. Krishnarao, R.V.; Godkhindi, M.M.; *Ceram. Int.* Volume 1992, 18, 35.
15. Wang, H.P.; Lin, K.S.; Huang, Y.J.; Li, M.C.; Tsaur, L.K.; *J. Hazardous Mater.* 1998, 58, 147.
16. Naskar, M.K.; Chatterjee, M.; *J. Eur. Ceram. Soc.* 2004, 24, 3499.

17. Chang, F.W.; Kuo, W.Y.; Lee, K.C.; *Appl. Catalysis* 2003, A246, 253.
18. Adam, F.; Ahmed, A.E.; *Chem. Eng. J.* 2008, 145, 328.
19. Prasad, C.S.; Maiti, K.N.; Venugopal R.; *Ceram. Int.* 2001, 27, 629.
20. Prasad, C.S.; Maiti, K.N.; Venugopal R.; *Ceram. Int.* 2003, 29, 907.
21. Sutas, J.; Mana, A.; Pitak, L.; *Procedia Eng.* 2012, 32, 1061.
22. Kaewkhao, J.; Limsuwan, P.; *Procedia Eng.* 2012, 32, 670.
23. Feng, Q.; Lin, Q.; Gong, F.; Sugita, S.; Shoya, M.; *J. Colloid Interface Sci.* 2004, 278, 1.
24. Srivastava, V.C.; Mall, I.D.; Mishra, I.M.; *J. Hazardous Mater.* 2006, 134, 257.
25. Lakshmi, U.R.; Srivastava, V.C.; Mall, I.D.; Lataye, D.H.; *J. Environ. Manag.* 2009, 90, 710.
26. Jang, H.T.; Park, Y.K.; Ko, Y.S.; Lee, J.Y.; *Int. J. Greenhouse Gas Control*, 2009, 3, 545.
27. Dahlan, I.; Lee, K.T.; Kamaruddin, A.H.; Mohamed, A.R.; *J. Hazardous Mater.* 2009, 166, 1556.
28. Feng, Q.; Yamamichi, H.; Shoya, M.; Sugita, S.; *Cem. Concrete Res.* 2004, 34, 521.
29. Salas, A.; Delvasto, S.; Gutierrez, R.M.; Lange D.; *Cem. Concrete Res.* 2009, 39, 773.
30. An, D.; Guo, Y.; Zhu, Y.; Wang, Z.; *Chem. Eng. J.* 2010, 162, 509.
31. Liou, T.H.; Yang, C.C.; *Mater. Sci. Engineering*, 2011, B176, 521.
32. Ibrahim, D.M.; El-Hemally, S.A.; Abo-El-Enein, S.A.; Hanafi, S.; Helmy, M.; *Thermoch. Acta* 1980, 37, 347.
33. Della, V.P.; Kühn, I.; Hotza, D.; *Mater. Letters* 2002, 57, 818.
34. Martínez, J. D.; Pineda, Tatiana G.; Junkes, J. A.; Hotza, D.; *Quím. Nova*, 2009, 32, 1110.
35. Della, V. P.; Hotza, D.; Junkes, J. A.; Oliveira, A. P. N.; *Quím. Nova*, 2006, 29, 1175.
36. Liu, Y.; Guo, Y.; Zhu, Y.; An, D.; Gao, W.; Wang, Z.; Ma, Y.; Wang, Z.; *J. Hazardous Mater.* Volume 2011, 186, 1314.
37. Liou, T.H.; Yang, C.C.; *Mater. Sci. Eng.* 2011, B176, 521.
38. Kamida, H. M.; Durrant, R.T.; Monteiro, R.; Armas E.D.; *Quím. Nova* 2005, 28, 629.
39. Bansal, V.; Ahmad, A.; Sastry, M.; *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 14059.

40. Bansal, V.; Asad, S.; Bhargava, S.; Ahmad, A.; Sastry, M.; *Langmuir* 2007, 23, 4993.
41. Bansal, V.; Bharde, A.; Ramanathan, R.; Bhargava, S.; *Adv. Colloid Interface Sci.* 2012, 179-182, 150.
42. Pineda, T.; Hotza, D.; Soares, C.H.L.; Casas, A.; Ramírez, M.; *Matéria* 2012, 17, 946.
43. Pineda, T.; Soares, C.H.L.; Hotza, D.; Casas, A.E.; Ramírez, M.E.; Torres, M.M.; *Mater. Sci. Forum* 2012, 727-728, 1153.
44. Montgomery, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. 4th ed., New York: Wiley, 1996.
45. Bradford, M.M.; *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248.
46. Esposito, L.; Innocentini-Meia, L.H.; Ferraz, A.; Canhos, V P; Durán, N.; *J. Biotech.* 1993, 29, 219.
47. Djajakirana, G.; Joergensen, R.G.; Meyer, B.; *Biol. Fertility Soils* 1996, 22, 299.
48. Ikehata, K.; Buchanan, I.D.; Smith, D.W.; *Ver. Ciência Tecn. Human. IFPE* 2004, 3, 1.
49. Aguiar, M.M.; Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2008.
50. Philippoussis, A.; Zervakis, G.; Diamantopoulou, P. *World J. Microbiol. Biotech.* 2001, 17, 191.
51. Sternberg, D.; *Appl. Environ. Microbiol.* 1976, 31, 648.
52. Cheryl, W.; Huang, J.; Kaplan, D. *Trends Biotech.* 2004, 22, 11.
53. Kalapathy, U.; Proctor, A.; Shultz, J. *Bioresource Tech.* 2000, 73, 257.

6 GROWTH MEDIA SELECTION FOR BIOTRANSFORMATION OF SILICA NANOPARTICLES FROM RICE HUSK ASH USING *Fusarium oxysporum*⁴

6.1 INTRODUCTION

Silica is widely used for industrial and commercial purposes. Silica nanoparticles may present high surface area and purity and have been successfully used in resins,¹⁻⁴ catalytic supports,⁵⁻¹⁰ molecular filters,¹¹⁻¹³ biomedical applications,¹⁴⁻¹⁸ rubber fillers,^{19,20} construction materials²¹⁻²⁴, among others.²⁴⁻²⁵

Silica nanoparticles can be obtained from several residues. One of the most common sources is the rice husk ash (RHA) that is an industrial waste produced by burning rice husk primarily for the generation of electricity, as a sustainable biomass energy resource. Rice husk, the hard protective shell of rice grains, is an agricultural by-product of rice mills.²⁶ In 2012 almost 243 millions of tonnes of rice husk were produced in the world and used for several processes (gasification, pyrolysis, combustion). Almost 15% of this residue are ashes that can be employed as a low-cost source for silica synthesis, contributing to the industrial scale production of several materials.²⁷

The silica present in rice husk is in a hydrated amorphous form. Thermal and chemical treatments have been used to modify silica nanoparticles modification.^{23,25,29} However, those processes can be expensive and have a low productivity. Basal *et al.* presented a biological route for the transformation of silica nanoparticles from rice husk using the fungus *Fusarium oxysporum*.²³ This technique has a great potential because it can use soft conditions of temperature and pressure, being environment friendly. Moreover, Pineda *et al.*³⁰ synthesized silica particles from RHA using cultures of *F. oxysporum*. They observed that before and after reaction with the fungus, the morphology of silica particles in RHA changed and the average size decreased from ~600 to ~5 μm .

Different authors have established that microorganisms can modify their interaction with minerals according to culture conditions.^{31,32} The growth conditions of *F. oxysporum* such as concentration of substrate and protein, and the addition of minerals containing silica to culture media could influence the behavior of biotransformation process.³³

⁴Submetido para publicação.

The amorphous biosilica in RHA can be simultaneously leached and transformed into crystalline silica nanoparticles by *F.oxysporum*. The leaching step has been associated to the organic acids production and the biotransformation step with a hydrolyzation due to the action of specific proteins.³⁴ Both steps depend of growing conditions and culture media, which change their composition according to relation sugar-protein.

The aim to this work is to analyze the behavior of *F.oxysporum* in two commercial culture media supplemented with RHA. The growing curves will be compared and the best conditions will be established for the biotransformation of silica particles from RHA taking into account the biotechnological process and economic aspects.

6.2 MATERIALS AND METHODS

6.2.1 Materials

Rice husk ash (RHA) was obtained from Arroz Fumacense (Morro da Fumaça, SC, Brazil), without pretreatment.

F. oxysporum was obtained from Universidad Pontificia Bolivariana (UPB, Medellin, Colombia) and maintained at 25°C in plates with potato dextrose agar (Merck). Spores were harvested with distilled sterile water to prepare a solution with a final concentration of 108 spores/mL.

6.2.2 Biotransformation conditions

Silica biotransformation was carried out using two liquid culture media. A malt-glucose(MG) medium was composed by malt extract (1,5%) and glucose (0.3%), and a malt-glucose-yeast-peptone(MGYP) medium was composed by malt extract (0.3%), glucose (1%), yeast extract (0.3%), and peptone (0.5%) The pH value was adjusted to 6.8 with NaOH 0.1 M and HCl 0.1 M solutions. Both culture media were supplemented with RHA, MG (2% RHA) and MGYP (10% RHA). Media were autoclaved for 20 min at 121°C. Cultures were started by inoculation of 10 mL *F. oxysporum* spores solution (108 spores/mL) into 250 mL erlenmeyer flasks containing 100 mL of media (MG or MGYP) supplemented with RHA. The flasks were incubated at 25°C on a rotating shaker (150 rpm) during 4 days.

6.2.3 Characterization of biotransformation process

Microbial growth was evaluated by CO₂ production, using an Oxitop device (WTW) every 30 minutes. Samples were collected during

the course of reaction, by separating fungal mycelia and the remaining RHA from the aqueous component by filtration. The filtrate was used to measure glucose consumption and organic acids production by high performance liquid chromatography (HPLC). The PerkinElmer HPLC system was equipped with a refraction index detector (RID) and a 300 mm ion exclusion column (7.8×150mm, Waters). The mobile phase consisted of 0.005N sulfuric acid. The flow rate was 0.6 mL/min.

The extracellular proteins were analyzed using 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), after centrifugation at 10 000 rpm for 30 min of silica nanoparticles.

Concentration of solubilized silica was measured from the aqueous phase by UV-VIS spectrophotometry using the standard molybdate method.³⁵ Samples of solubilized silica were evaporated under reduced pressure to powder, and the powder was characterized after calcination at 400°C during 2 h by scanning electronic microscopy (SEM, JEOL JSM-6390LV),³⁶ and X-ray diffractometry (XRD, Philips X-Pert) with rotating anode generators and monochromatic detector using Cu K radiation.

Zeta potential measurements of silica particles before and after the biotransformation were performed (Zeta Nano Sizer ZEN-3600, Malvern). The concentration of RHA and the suspension of silica nanoparticles were both 100 mg·dm⁻³. According to the literature,³⁷ NaCl 0.01 M was used as an indifferent electrolyte. The isoelectric point (IEP) was evaluated for different pH values.

6.3 RESULTS AND DISCUSSION

Fig. 6.1 shows the results obtained for CO₂ produced from *F. oxysporum* growing in MG and MGYP media, both supplemented with RHA. The CO₂ production can be related to microbial metabolic activity during growth.³⁸ This method was selected due to the interference of RHA in biomass measurements when the dry weight method is used. The CO₂ production is associated with microbial metabolism and it can be used as an indirect method to follow the growth of *F. oxysporum* although it also implies the CO₂ production during maintenance.

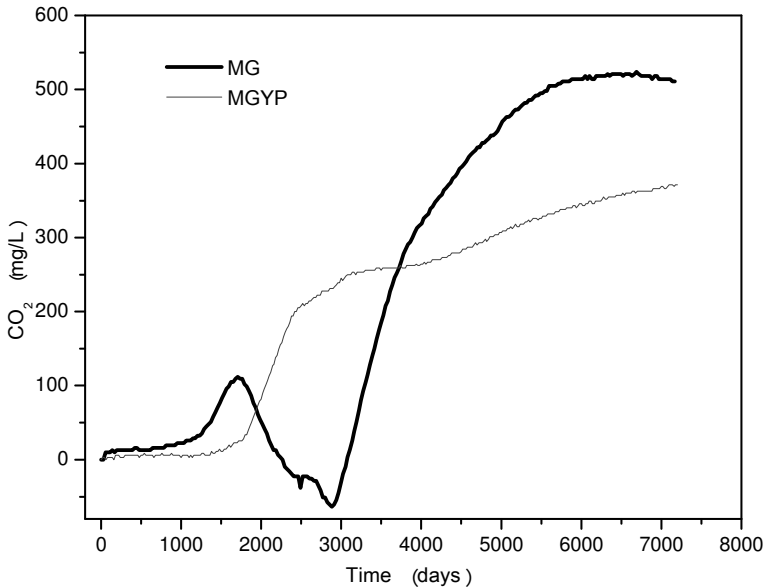


Figura 6.1 –CO₂ production from *F. oxysporum* growing in media MG and MGYP, supplemented with RHA.

The results show the CO₂ production curves for both media culture and the different phases of microbial growth in a closed system. First stage represents the time needed for microorganisms to adapt to the media culture (latency phase). In this case, *F. oxysporum* presented a latency phase of 1 day for the MGYP medium and about 2 days for MG medium.

During the second stage the microorganism presents an exponential growth characterized by the maximum growth rate. For *F. oxysporum* the maximum CO₂ production rate was 20.4 mg/L·h in MG and 15 mg/L·h in MGYP. The amount of CO₂ produced in MG media was higher than in MGYP media after 5 days of incubation.

According with CO₂ production, the results shows that the *F. oxysporum* grows better in MG media. The composition of this culture media contains less glucose and proteins than MGYP. The results are important due to economic considerations for industrial production of biotransformed silica.

The fungal growth, associated with CO₂ production, may be correlated to the amount of substrate used Fig. 6.2 shows the glucose consumption by *F.oxysporum* in MG and MGYP media, which

contained 0.3 % and 1 % of glucose, respectively. The initial glucose content of the culture media and the behavior of its depletion rate across the time is an important element to establish the substrate yield and the uptake of essential nutrients.

Fig. 6.2 also shows that most of total glucose was consumed after the second day for the fungus growing in MGY medium (85%) and after the third day when it grows in MG media (95%). When the glucose consumption results were compared to the growth curves, in special when the fungus achieved the stationary phase, i.e., the total glucose was fully consumed. As the growing results showed in Fig. 6.1, the substrate consumption curves indicate that in MG medium the fungus can produce more CO₂ using a lower concentration of glucose. This result may indicate that other carbon sources, glucose different, would be being used for growing and produce CO₂ or alternatively, it means the higher rate of glucose consumption instead of CO₂ production is followed for other metabolites production, for example, by organic acids production. The latter hypothesis seems to be correct if the curve of organic acid production is observed.

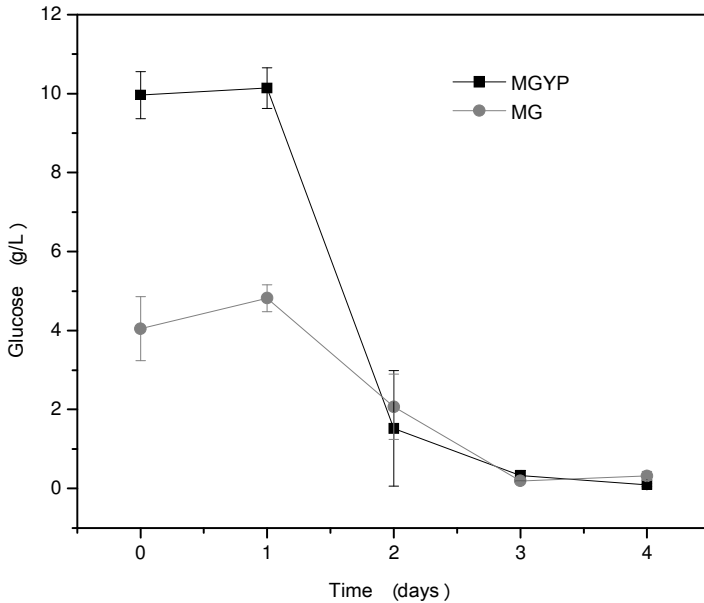


Figura 6.2 – Glucose consumption curve by *F. oxysporum* growing in MG and MGYP media.

Fig. 6.3 shows organic acids production results compared to the soluble silica curves for MGYP and MG culture media. It was observed that silica concentration increased when the organic acid concentration decreased in both culture media. The results of this study show an increase in silica nanoparticles solubilization that is not associated with the organic acids production. Frequently the leaching step has been related to the organic acids production.³⁹ The organic acids are synthesized by the fungi in the glycolytic pathway and could promote the bioleaching process due to chemical attack. Studies have been reported for bioleaching processes of metals, where organic acids promote the mineral dissolution by lowering the pH and increase the load of soluble metals by complexation / chelating into soluble metallic complexes.³⁹ However, for the silica biotransformation, the organic acid production contributes to the enzymatic activity of the protein responsible for silica biotransformation. Bansal *et al.* found that the silica biotransformation is associated with proteins present in fungal biomass.⁴⁰

Considering the growth curves results, the glucose consumption and the organic acids production, it may be established that the MG medium is better for the transformation of silica nanoparticles compared to MGYP medium. Considering the culture media composition for MG and MGYP, the MG medium contains minor quantities of carbon and protein sources. Those results are important due the economic considerations for the scale up of processes.

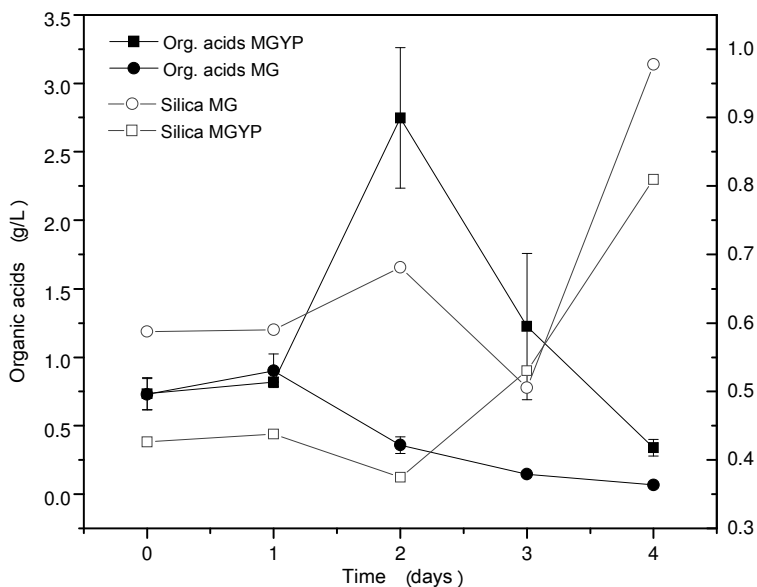


Figura 6.3 –Organic acids curves compared to soluble silica for the MGYP and MG culture media.

Fig. 6.4 shows the electrophoretic profile of extracellular proteins produced by *F. oxysporum* during its growth in MG medium supplemented with RHA. These proteins were analyzed using 12% SDS-PAGE. For fungi growing in MG with RHA (Fig.4, B) a band corresponding to a low molecular weight protein was observed at around 10-15 kDa and around 24 kDa, as well as two bands between 55 and 70 kDa and a very high molecular weight protein of more than 200 kDa. It was noticed that the exposure of *F. oxysporum* to MG medium with RHA induce the secretion of proteins of molecular weights around 24 kDa and 55-70 kDa. The presence of a low molecular weight protein around 24 kDa is in agreement with Bansal *et al.*'s work.⁴⁰ They

established that this low molecular weight protein might be acting as hydrolyzing/capping proteins and that the high molecular weight proteins could be acting as a template for nanosilica synthesis.²³ Proteins of 55-70 kDa have not been reported for this system but four proteins of molecular masses between 66 and 10 kDa have been seen on gel electrophoresis by Mukherjee *et al.* They believe that out of four proteins of that study, one was responsible for the reduction of ions and the subsequent formation of gold nanoparticles.⁴¹

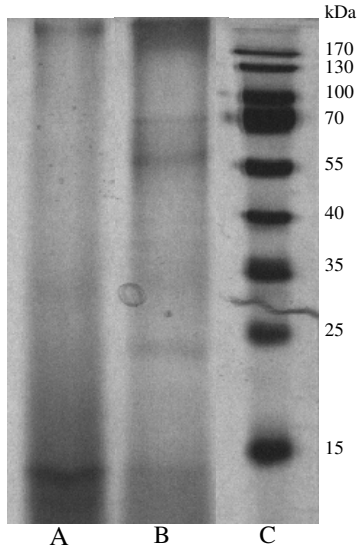


Figura 6.4 –Electrophoresis results: (A) Extracellular proteins of *F. oxysporum* growing in MG medium Page, (B) Extracellular proteins of *F. oxysporum* growing in MG medium supplemented with RHA, (C) Page Ruler Prestained 10-170 kDa (Thermo).

According to the above results, MG was selected as the culture medium to evaluate the nanoparticle characterization using the XRD and zeta potential measurements, both before and after the biotransformation.

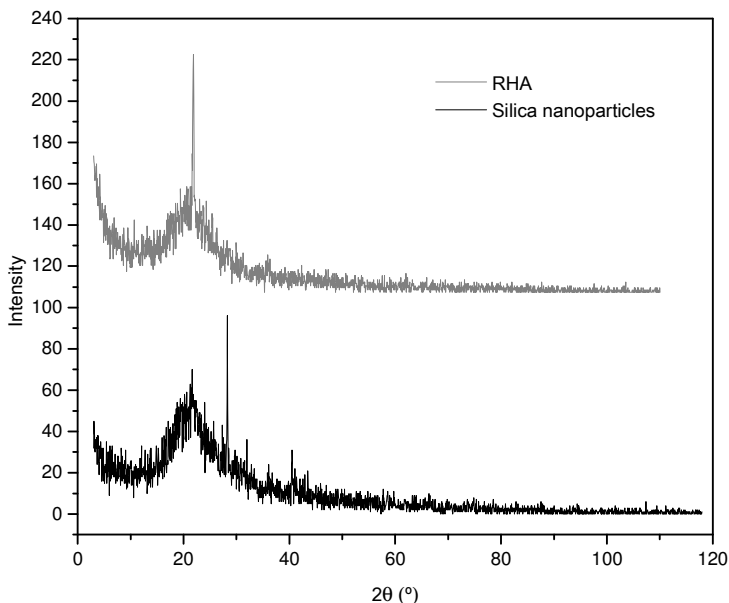


Figura 6.5 – XRD diffractograms for RHA and silica nanoparticles after the biotransformation using *F. oxysporum*.

Fig. 6.5 shows the XRD results for RHA and silica nanoparticles after the fungal transformation. According to the literature, peaks between 15° and 30° are typical for RHA, and peaks between 22° and 37° correspond to cristobalite.³⁶ The results show the changes on the DRX angles before the biotransformation and could indicate the surface modification on the silica particles due to the fungal action. Bansal *et al.* obtained similar results with rice husk.²³

Fig. 6.6 shows the zeta potential curves of silica particles as a function of pH before and after the interaction with *F. oxysporum*. The results correspond to negative charges for both materials for all the tested pH values. The isoelectric point (IEP) value of RHA particles was around pH 2.8, the RHA surface is electronegative when the pH is above 3.0. The zeta potential decreases with increasing pH value till pH 10, which is in good agreement with Ma *et al.*⁴²

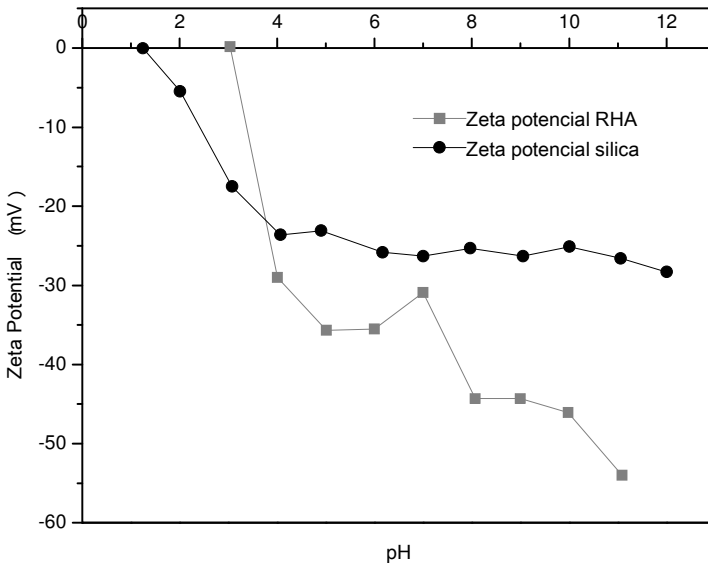


Figura 6.6 –Zeta potencial of silica particles in RHA before and after the interaction with *F. oxysporum*.

Observing Fig. 6.6, it is interesting to become aware of the zeta potential alteration profiles after the fungal contact with the particle surfaces. The IEP value of silica nanoparticles decreased, around 1.0. It could be due to secretion of protein fungal compounds that interact with the RHA surfaces and modifies the superficial particles.

Fig. 6.7 shows SEM micrographs of rice husk ash obtained by extracellular process using *F. oxysporum* at 28°C and atmospheric pressure. The surface of rice husk ash is clearly seen. SEM images show the presence of heterogeneously distributed silica on upper and lower surfaces of rice husk ash. This was also reported by Rozainee *et al.*⁴³ and Martinez *et al.*²⁸ Particles before treatment are irregular in shape with average size of $610 \pm 60 \mu\text{m}$. After fungal treatment (Fig. 6.7, A and B), the structure of RHA was broken down, the morphology of silica particles changed, and the average size decreased. Moreover, after bioprocessing Si peaks in EDX presented a stronger signal corresponding to a larger amount of silica particles leached out. In this way, the extracellular bioprocess led to transformation of silica from rice husk ash at room temperature.

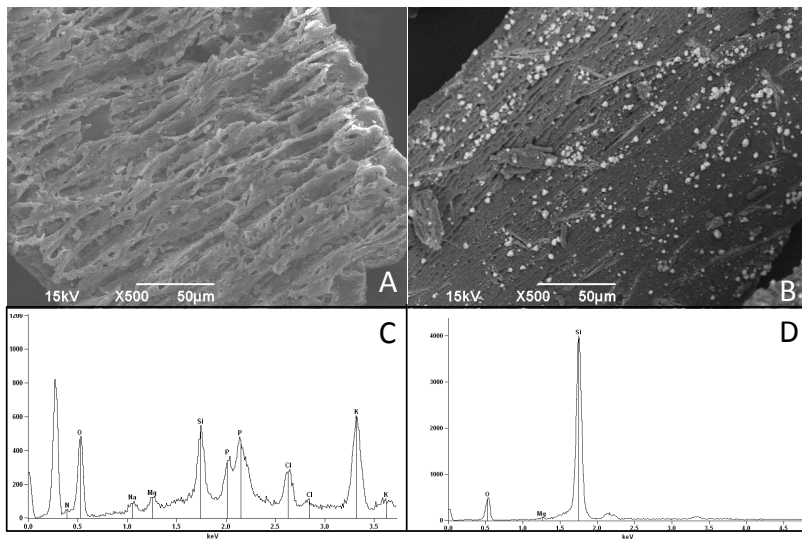


Figure 6.7 – SEM micrographs and EDX of lower surface RHA before (A,C) and after (B,D) the interaction with *F. oxysporum*.

6.4 CONCLUSIONS

Taken into account the growth curves results, CO₂ production, the glucose consumption and the organic acids production, it may be concluded that the MG medium is better for biotransformation of silica nanoparticles compared with MGY medium. Considering the composition of culture media, these results are important due to the economic considerations for the scale up of processes.

According to the organic acids and the soluble silica production, the results showed an increase in silica nanoparticles solubilization that is not associated with the organic acids production. It was correlated to proteins associated with the exposure of *F. oxysporum* to RHA.

Changes on the XRD angles with the fungal biotransformation correspond to the surface modification on silica particles due to the fungal action. Likewise, an alteration on zeta potential profiles was observed after fungal contact with the particle surfaces. This change could be due to secretion of fungal proteins that interact with the RHA surfaces and modifies the superficial particles. SEM images showed different average sizes in silica nanoparticles, after fungal treatment indicating a morphological change in silica nanoparticles.

6.5 REFERENCES

- (1) Khalfa, A. I.; Ward, A. A. *Mater. Des.* **2010**, 31, 2414-2421.
- (2) Changchun, A.; Yong, X.; Wen, W.; Liangjie, Y. *Powder Technol.* **2011**, 210 (3), 323-327.
- (3) Yongchun, C.; Shuxue, Z.; Guodong, C.; Limin, W. *Prog. Org. Coat.* **2005**, 54 (2), 120-126.
- (4) Boonyapookana, A.; Nagata, K.; Mutoh, Y.; *Compos. Sci. Technol.* **2011**, 71(8), 1124-1131.
- (5) Drisko, G. L.; Wang, X.; Caruso, R. A. *Langmuir*, **2011**, 27 (6), 2124-2127.
- (6) Chen, J.; Zhang, Y.; Tan, L.; Zhang, Y. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2011**, 50 (7), 4212-4215.
- (7) Wang, C.; Bai, H. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2011**, 50 (7), 3842-3848.
- (8) Bellino, M.G.; Regazzoni, A. E.; Soler-Illia, G.A. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2010**, 2 (2), 360-365.
- (9) Zhong-Jie, J.; Chun-Yan, L.; Lu-Wei, S. *J. Phys. Chem. B.* **2005**, 109 (5), 1730-1735.
- (10) Richmond, M. K.; Scott, S. L.; Alper, Howard. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (43), 10521-10525.
- (11) Yamashita, K.; Daiguji, H. *J. Phys. Chem. C.* **2013**, 117 (5), 2084-2095.
- (12) Müllner, M.; Lunkenbein, T.; Breu, J.; Caruso, F.; Müller, A.E.H. *Chem. Mater.* **2012**, 24 (10), 1802-1810.
- (13) Tao, Z.; Toms, B.; Goodisman, J.; Asefa, T. *ACS Nano*, **2010**, 4 (2), 789-794.
- (14) Ahmad, B.; Ahmad, N. M.; Fessi, H.; Elaissari, A. *Drug Discov. Today*, **2012**, 17, (19-20), 1147-1154.
- (15) Şan, O. *Mater. Lett.* **2003**, 57 (15), 2189-2192.
- (16) Smirnova, I.; Mamic, J.; Arlt, W. *Langmuir*, **2003**, 19 (20), 8521-8525.
- (17) Yang, P.; Gai, S.; Lin, J. *Chem Soc Rev.* **2012**, 41 (9), 3679-3698.
- (18) Slowing, II.; Vivero-Escoto J.L.; Wu, C.W.; Lin, V.S. *Adv Drug Deliv Rev.* **2008**, 60 (11), 1278-1288.
- (19) Hassan, H.H.; Ateia, E.; Darwish, N.A.; Halim, S.F.; Abd El-Aziz, A.K. *Mater. Design.* **2012**, 34, 533-540.
- (20) Rama Rao, G.V.; Krug, M. E.; Balamurugan, S.; Xu, H.; Xu, Q.; López, G. P. *Chem. Mater.*, **2002**, 14 (12), 5075-5080.

- (21) Senff, L.; Hotza, D.; Ferreira, V. M.; Labrincha, J. A. *Mater. Sci. Eng. A*. **2012**, 532, 354-361.
- (22) Senff, L.; Labrincha, J. A.; Ferreira, V. M.; Hotza, D.; Repette, W. L. *Constr. Build. Mater.* **2009**, 23, (7), 2487-2491.
- (23) Bansal, V.; Ahmad, A.; Sastry, M. J. *Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14059– 14066.
- (24) Lussoli, R.J.; Rodrigues-Neto, J. B.; Klein, A. N.; Hotza, D.; Moreno, R. *Mater. Res. Bull.* **2013**, In Press.
- (25) Jian, H.; Jie, Y.; Zhang, J.; Yu, Y.; Zhang, G. *Cement Concrete Comp.* **2013**, In press.
- (26) Gurav, J. L.; Jung, I.-K.; Park, H.-H.; Kang, E. S.; Nadargi, D. Y. *J. Nanomater.* **2010**, 1–11
- (27) FAO. Rice Market Monitor. 2012. in: <<http://www.fao.org/docrep/017/ap772e/ap772e.pdf>>. Accessed in February **2013**.
- (28) Martinez, J.; Pineda, T.; López, J. P.; Betancur, M. *Energy*, **2011**, 36, (6), 3846-3854,.
- (29) Junkes, J. A.; Della, V. P.; Acchar, W.; Oliveira, A. P. N.; Hotza, D. *Ind. Ceram.* **2006**, 26, 11-15.
- (30) Pineda-Vasquez, T.; Soares, C. H. L.; Hotza, D.; Casas-Botero, A. E.; Ramírez-Carmona, M.; Torres-Taborda, M. *Mater. Sci. Forum*, **2012**, 727-728, 1153-1157.
- (31) Sharma, P. K.; Dasb, K.; Hanumantha R.; Forssberg, K.S.E. *Hydrometall.* **2003**, 71, 285-292.
- (32) Tomczak, M. M.; Slocik, J.M.; Stone, M.O.; Naik, R.R. *Biochem. Soc. Focus. Meet.* **2007**, 35, 512–515.
- (33) Narayanan, K. B.; Sakthivel, N. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2010**, 156, 1–13.
- (34) Bansal, V.; Sanyal, A.; Rautaray, D.; Ahmad, A.; Sastry, M. *Adv. Mater.* **2005**, 17, (7), 889-892.
- (35) Schelske, C. L.; Stoermer, E. F. *Science*, **1971**, 173, 423-424.
- (36) Pineda-Vasquez, T.; Soares, C. H. L.; Hotza, D. ; Casas-Botero, A. E.; Ramírez-Carmona, M.; Torres-Taborda, M. *Matéria*, **2012**, 17,(1), 946-954.
- (37) Casas, A.E.; Torem, M.; Mesquita, L. *Miner. Eng.* **2007**, 20, (10), 1026-1032.
- (38) Kihal, M.; Henni, J.E.; Prevost, H.; Diviès, C. *Afr. J. Biotechnol.* **2006**, 5, (4), 378-383.
- (39) Ghorbani, Y.; Oliazadeh, M.; Shahvedi, A.; Roohi, R.; Pirayehgar, A. *Afr. J. Biotechnol.* **2007**, 6, (11), 1284-1288.

- (40) Bansal, V.; Rautaray, D.; Bharde, A.; Ahire, K.; Sanyal, A.; Ahmad, A.; Sastry, M. *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 2583-2589.
- (41) Mukherjee, P.; Senapati, S.; Mandal, D.; Ahmad, A.; Khan, M. I.; Kumar, R.; Sastry, M. *Chem. Biochem.* **2002**, 3, (5), 461-463.
- (42) Ma, X.-K.; Lee, N.H.; Oh, H.J.; Kim, J.W.; Rhee, C.K.; Park, K.S.; Kim, S.J. *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2010**, 358, 172-176.
- (43) Rozainee, M.; Ngo, S. P.; Salema, A.A.; Tan, K.G.; Ariffin, M., Zainura, Z.N. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99, (4), 703-713.

7 AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA A BIOTRANSFORMAÇÃO DA CINZA DA CASCA DE ARROZ MEDIANTE *Fusarium oxysporum*⁵

7.1 INTRODUÇÃO

A casca de arroz é uma camada que contém hemicelulose, lignina e sílica, principalmente; compostos que dão rigidez e proteção microbiana ao grão [1-4]. Durante o beneficiamento a casca é removida, e depois é considerado como um resíduo agrícola, usada principalmente em usinas para geração de energia [4-9]. Esse processo gera cinzas como subproduto. O constituinte principal da cinza da casca de arroz (CCA) é a sílica (SiO₂), em composições compreendidas entre 80 e 97%, a qual é geralmente amorfa [5-6,9].

A CCA, natural ou tratada, tem aplicações como isolante térmico [10-11], pozolana em cimento e concreto [12-16], filler em polímeros [17-20], precursor para síntese de carbeto de silício [21], zeólita [22], e cordierita [23], suporte de catalisadores [24-25], matéria-prima para cerâmica e vidro [26-29], adsorvente de metais pesados [30-32], e gases tóxicos [33-34] entre outras [35-37].

Os processos para a produção da sílica usualmente tem custo elevado, empregam substâncias que agredem o meio ambiente, e ocorrem a altas temperaturas e pressões [4,5,38,39]. Alternativas para a produção de sílica incluem processos biológicos, através de esponjas, diatomáceas e algas [40,41]. Estudos recentes indicam que o fungo *Fusarium oxysporum* através de enzimas extracelulares tem a capacidade de biotransformar a sílica de diferentes fontes [41-43], em especial casca de arroz [35,41] e cinza da casca de arroz [42].

O presente trabalho apresenta resultados relacionados com parâmetros do bioprocessamento em diferentes meios de cultura não comerciais que leva a alternativas mais econômicas para a síntese de sílica a partir da cinza da casca de arroz pela ação de *F. oxysporum*.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Cinza da casca de arroz

A CCA é um subproduto da combustão da casca de arroz, cujo propósito é gerar energia elétrica para o beneficiamento do arroz e foi adquirida da de Arroz Fumacense (Morro da Fumaça, SC, Brasil), não

⁵Submetido para publicação.

tendo sofrido nenhum processamento prévio antes de ser submetida ao processo de biotransformação.

7.2.2 *Fusarium oxysporum*

O microrganismo empregado foi o *Fusarium oxysporum* fornecido pelo Centro de Estudios e Investigaciones en Biotecnología (CIBIOT) da Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), Medellín, Colômbia. O fungo foi mantido em meio de cultura sólido com extrato de batata e glicose em placas com incubação a 25 ± 1 °C.

7.2.3 Meios de cultura

Foram estudados 3 diferentes meios de cultura tanto em estado líquido como semissólido, os substratos avaliados foram: malte (15g/L) da Hymedia, batata inglesa *Solanum* sp. (120g/L) e arroz integral tipo 1 (30 g/L) da marca Urbano. A concentração de glicose (Hymedia) foi de 3g/L para todos os ensaios. O pH foi ajustado em 6,8 usando soluções de HCl 0,1M (Vetec) e NaOH (Vetec) 0,1M. Somente nos meios sólidos foram adicionados 20 g/L de ágar (Hymedia) para permitir a solidificação do extrato. Todos os meios foram esterilizados por 20 min a 120°C.

7.2.4 Avaliação morfológica e cinética de crescimento radial do micélio

Para a avaliação da cinética de crescimento, o fungo foi cultivado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro nos três diferentes substratos. Foi variada a concentração de CCA (0%, 1,0%, 2,0% e 3,0%) em cada ensaio durante 7 dias, por triplicata. Para verificar características morfológicas do *F. oxysporum* no microscópio ótico, foi realizada uma coloração com azul de metila (Merck). A taxa de crescimento foi avaliada a cada 24 h, pela medida do raio de crescimento do fungo a partir do ponto de inoculação, com auxílio de uma régua, à temperatura de 28°C. A análise dos principais parâmetros de crescimento foi feita através do modelo de Gompertz modificado, segundo a Eq. 7.1:

$$y = a \exp\{-\exp(b - c \cdot t) + 1\} \quad (7.1)$$

onde y é o raio de crescimento do fungo (mm); t , o tempo (h); a , b e c , parâmetros estimados pelo modelo.

Esses parâmetros estão relacionados com os parâmetros microbiológicos de crescimento λ (duração da fase lag), μ_{\max} (velocidade

específica máxima de crescimento) e A (aumento logarítmico da biomassa) pelas Equações (7.2,7.3,7.4, 7.5)[44].

$$a = A \quad (7.2)$$

$$b = 1 + \frac{\mu_{max}}{A} \quad (7.3)$$

$$c = \frac{\mu_{max}}{A} \quad (7.4)$$

$$\lambda = \frac{b-1}{\mu_{max}} \quad (7.5)$$

7.2.5 Bioprocesso

Para analisar a cinética de liberação de enzimas associadas à biotransformação da CCA, foram preparados 250 mL de meio de cultura líquido, em erlenmeyer de 500 mL, com os respectivos substratos sem adição de fontes de sílica (controle) e com adição de CCA (20g/L) e ácido silícico puríssimo da Vetec (3,0g/L), foram esterilizados e inoculados com aproximadamente 0,3g (base úmida) de *F. oxysporum*, em câmara de fluxo laminar.

No processo em meio sólido, foram inicialmente colocados 100mL de meio de cultura sólido em erlenmeyer de 500 mL e inoculados com 0,3g (base úmida) de *F. oxysporum*. Após 7dias de incubação a 28°C, quando se obtém uma adequada fixação e crescimento do micélio do fungo na base sólida do meio, três diferentes soluções aquosas com um volume de 150mL de água deionizada (controle), cinza da casca de arroz (20g/L) e ácido silícico (3,0g/L), foram adicionados aos respectivos frascos, para cada ensaio. Alíquotas destas soluções foram coletadas a cada 48h até 168h para posteriores análises.

7.2.6 Caracterização das principais enzimas associadas à obtenção de sílica

A dosagem dos parâmetros como atividade de β -glicosidase, peroxidase, e proteínas totais foram realizadas pelo método colorimétrico em espectrofotômetro UV-VIS (Femto 700 Plus). A β -glicosidase (B-G) foi avaliada segundo método de Tan e Colaboradores (1987), baseado na liberação de p-nitrofenol a 410 nm [45]. A determinação da atividade da peroxidase (POD) foi feita através do método de Vinterhalter & James (1986), baseado na oxidação da O-dianisidina a 460 nm e a quantificação da proteína total (PT) foi realizada pelo método de Bradford a 595 nm [46]. Para todas as enzimas, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a

quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μ mol de substrato por minuto. A atividade específica foi expressa em unidades por mg de proteína (U.mg⁻¹).

7.2.7 Quantificação da sílica solúvel

A quantificação da sílica solúvel foi feita mediante a formação de um complexo β -molibdo-silicato de coloração amarela, com uma solução molibdato de amônio com pH ácido na faixa de 1,4 a 2,0. Para cada 2,5 mL de amostra foram adicionados 0,1 mL de solução aquosa de molibdato de amônio (0,1 g/mL) e 0,05 mL de HCl 1M. A solução foi agitada e deixada em repouso por 10 min. Na sequência, foi adicionado 0,1 mL de solução de ácido oxálico (3g/L). A solução foi então agitada e posta em repouso por 1 h. Finalmente, a leitura foi feita em espectrofotômetro UV-Visível (Pró-Análise V-1200) com comprimento de onda de 660 nm [47].

7.2.8 Potencial zeta

As medidas de potencial zeta foram realizadas em um equipamento (ZEN-3600, Malvern) acoplado a um titulador (MPT-2, da Malvern). Foram preparadas suspensões contendo CCA antes e depois da interação com o microrganismo, com uma concentração de sólidos de aproximadamente 0,1% [48].

7.2.9 Caracterização microestrutural da CCA

As amostras foram calcinadas a 400° C durante 2 h e dispostas sobre uma fita de carbono, metalizadas com uma fina camada de ouro e caracterizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL JSM-6390LV) com filamento de tungstênio.

Para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET, JEM-1011, operando a 80kV), as amostras dos três diferentes meios líquidos, foram colocadas em banho de ultrassom por 10 min. Após decantação, uma gota da solução foi depositada sobre uma grade suporte de cobre de 300 mesh revestida com cobre e carbono.

7.2.10 Caracterização das fases cristalográficas

Um difratômetro de raios X (DRX, Philips, X-Pert) foi empregado para a caracterização das fases cristalográficas da CCA antes e depois do tratamento com o fungo. As análises foram realizadas em amostras na forma de pó, sem nenhum tipo de preparação prévia, no intervalo de medida de 2 θ entre 3 e 100°.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Morfologia do *F. oxysporum*

Verificou-se, que *F. oxysporum* possui a capacidade de crescer em diferentes meios testados. De forma geral, apresentou micélio aéreo filamentososo, denso e cotonoso, de cor roxa. O fungo apresentou uma textura mais cotonosa nos meios de cultura com extrato de batata e arroz do que no extrato de malte, como pode se observar na Fig. 7.1. Além disso, na presença do meio de cultura com extrato de arroz integral, o fungo apresentou um aumento na coloração roxa, atribuída à presença de pigmentos solúveis de antraquinona[49].

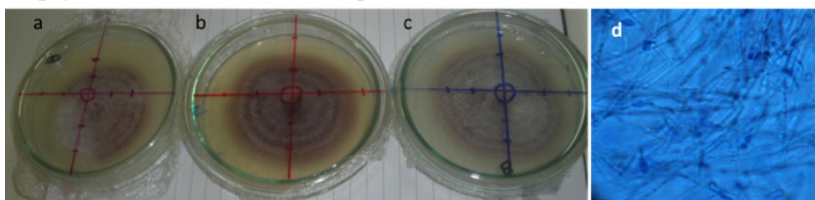


Figura 7.1– *Fusarium oxysporum* em diferentes meios de cultura sem a presença da CCA: a) extrato de arroz, b) extrato de malte, c) extrato de batata, d) tintura com azul de algodão.

Na Tabela 7.1 são apresentados os principais parâmetros estabelecidos no modelo de Gompertz modificado. Verificou-se que os dados experimentais ajustaram-se satisfatoriamente ao modelo proposto. Zwietering *et al.* [44] mostraram que o modelo de Gompertz modificado foi o que melhor descreveu o crescimento microbiano de acordo com a estatística do teste *t* e teste F. Pelos parâmetros extraídos do modelo, pode-se observar que a taxa de crescimento (μ_{\max}) do *F. oxysporum* foi da mesma ordem de grandeza para todos os substratos, sendo maior para o meio de cultura elaborado com extrato de malte em todas as concentrações de CCA, seguido pelo extrato de batata e o extrato de arroz. Estudos similares usando como substratos batata e malte para espécies *Fusarium sp.* coincidem com os resultados aqui encontrados[41]. Estudos usando como substrato arroz integral, não tem sido reportados. O fato de μ_{\max} ser maior no extrato de malte pode ser devido à melhor assimilação deste meio, quando comparado com arroz e batata.

Com relação à influência da concentração de CCA no crescimento radial do *F. oxysporum*, foi observado que a partir da concentração de 2,0% de CCA diminui o crescimento micelial na maioria dos substratos avaliados, indicando que este resíduo pode inibir

o crescimento do fungo em altas concentrações, tornando-se assim tóxico para o microrganismo.

Tabela 7.1– Parâmetros obtidos pelo modelo de Gompertz modificado ajustado ao crescimento do *F. oxysporum* nos diferentes meios de cultura.

Parâmetros	Concentração de CCA no meio de cultura % (W)			
	0	1,0	2,0	3,0
Batata				
A	48,11	49,80	47,87	46,92
$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	0,51	0,46	0,47	0,47
$\lambda(\text{h})$	20,13	19,90	19,51	17,80
R^2	0,975	0,937	0,941	0,925
Arroz				
A	61,36	59,89	49,30	57,34
$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	0,43	0,45	0,50	0,48
$\lambda(\text{h})$	23,07	23,61	20,06	24,33
R^2	0,939	0,954	0,962	0,962
Malte				
A	46,78	42,97	44,91	49,71
$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	0,55	0,74	0,58	0,51
$\lambda(\text{h})$	18,40	14,08	17,33	20,01
R^2	0,949	0,964	0,965	0,964

Com relação às mudanças morfológicas observadas na presença da CCA no meio de cultura sólido, foi observado que a partir de uma concentração de 3,0% g/L de CCA nos diferentes meios empregados, há uma notável redução na quantidade de esporos nos diferentes meios de cultura, como apresentado na Fig 7.2.

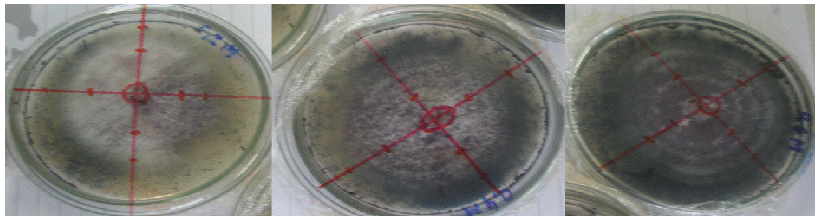


Figura 7.2– Crescimento do *F. oxysporum* em extrato de malte e com presença de diferentes concentrações de CCA: 1,0; 2,0 e 3,0% respectivamente, a 28°C e 6 dias de crescimento.

7.3.2 Análise da atividade enzimática

A análise da liberação de proteínas pelo fungo *F. oxysporum* evidenciou a influência do tipo de substrato e forma da fermentação. O perfil das curvas do extrato contendo batata e malte na fermentação líquida exibe valores de concentração de proteína em torno a 900 e 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A CCA estimulou a produção de proteínas em todos os ensaios realizados. O tempo para a ativação da produção de proteínas é similar entre os meios líquidos, em torno de 48 h, e coincide com o tempo onde finaliza a fase latente do fungo em meio líquido. A partir de ~96 h o metabolismo para a produção proteica extracelular tornou-se mais ativo, quando foram exibidos os maiores valores de concentração. Já nos meios de cultivo com suporte sólido, a tendência foi de aumentar continuamente, embora numa taxa de velocidade menor como apresentado na Fig 7.3. Aqui cabe destacar que a CCA contém elementos, principalmente Si, e Fe, Na, P, K, Ca em baixas concentrações, além de material lignocelulósico [5,9]. Alguns desses componentes poderiam afetar o metabolismo do fungo.

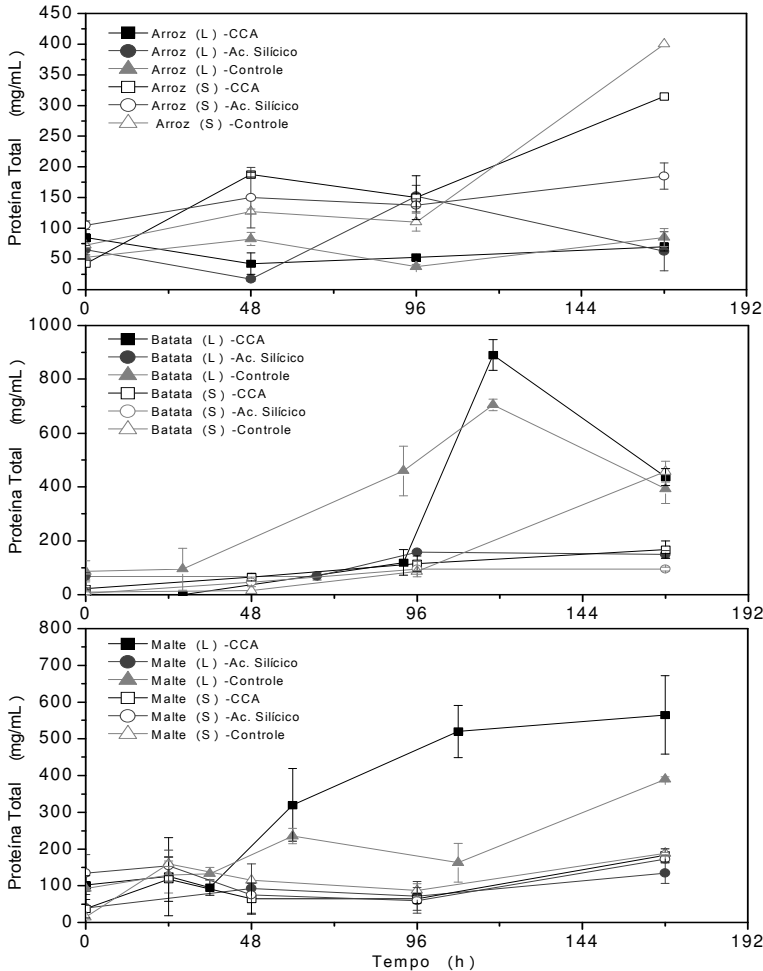


Figura 7.3– Produção de proteínas totais por *F. oxysporum* em extrato de arroz, batata e malte em meio líquido (FML) e sistema sólido-líquido (FSS) a pH 6,5 e 28°C.

As peroxidases (POD) são um grupo de enzimas oxi-redutases que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio e a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos. Algumas enzimas deste grupo podem transformar moléculas complexas em moléculas de menor tamanho para degradar estruturas, especialmente da madeira e das

camadas protetoras dos grãos, como arroz e trigo, que contêm lignina e sílica, responsáveis pela rigidez das mesmas proteção contra a ação microbiana [4,9]. As enzimas são produzidas por fungos com atividade lignocelulolítica, como *F. oxysporum* [50,51]. Estas enzimas, também são usadas como bioindicadores e podem depurar certos componentes por co- metabolismo [52]. Na Fig. 7.4 observa-se que a batata foi o meio de cultura que estimulou a maior produção deste tipo de enzimas, tanto na FML quanto no FSS. Segue as fermentações com arroz e, em menor concentração, com extrato de malta, o que indica que o tipo de substrato tem influência na atividade enzimática da peroxidase extracelular.

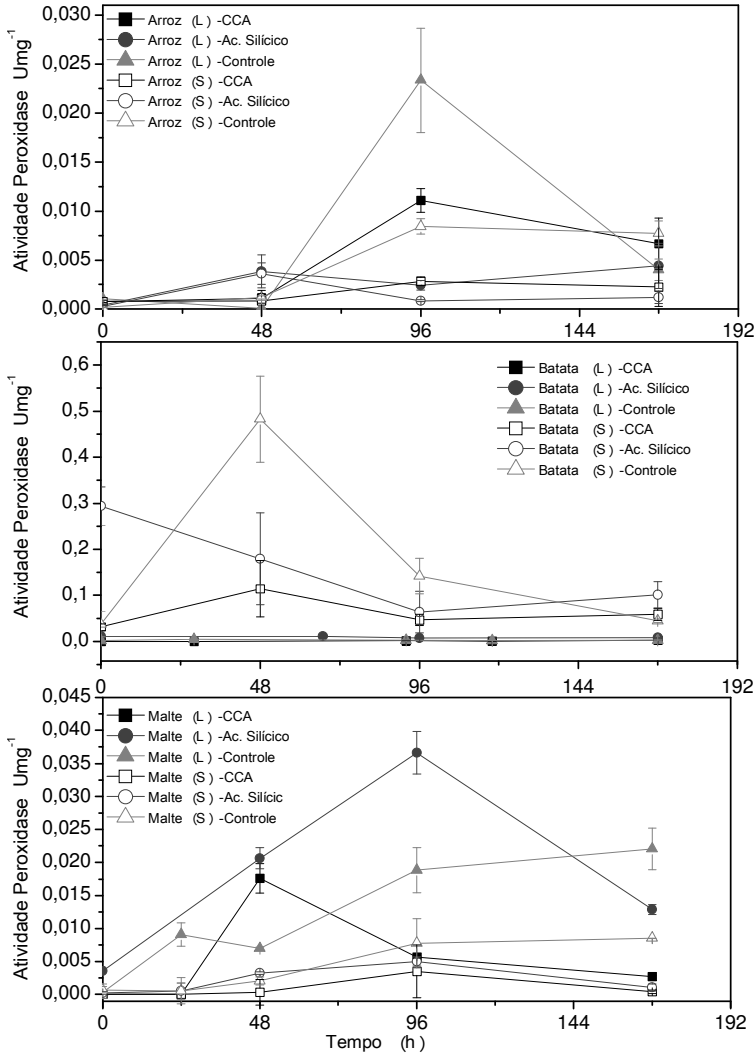


Figura 7.4– Produção de peroxidase pelo *F. oxysporum* em extrato de arroz, batata e malte em meio líquido(FML) e sistema sólido-líquido(FSS) a pH 6,5 e 28°C.

A β -glicosidase é uma enzima produzida em quantidades elevadas pela maioria dos fungos lignocelulolíticos [53]. A sua produção foi observada em maior quantidade nos meios não comerciais,

especialmente nas FSS. Esse resultado está de acordo com Deschamps e Huet (1984) que estudaram a produção de β -glicosidase por *Aspergillus phoenicis* em FSS e FML e encontraram uma maior produção e estabilidade da enzima em FSS [54].

No extrato de malte, para ambos os tipos de fermentação, a produção da β -glicosidase permanece em baixas concentrações até 48h, quando começa a aumentar rapidamente (Fig. 7.5-C), o que coincide com a diminuição de glicose no meio. Para o *F. oxysporum* suprir a menor quantidade deste componente, desta forma, estimula a produção da β -glicosidase, a qual catalisa reações de hidrólises para liberação de glicose na maioria dos microrganismos [53,55,56], pelos resultados aqui observados, esta pode ser considerada como um indicativo de crescimento.

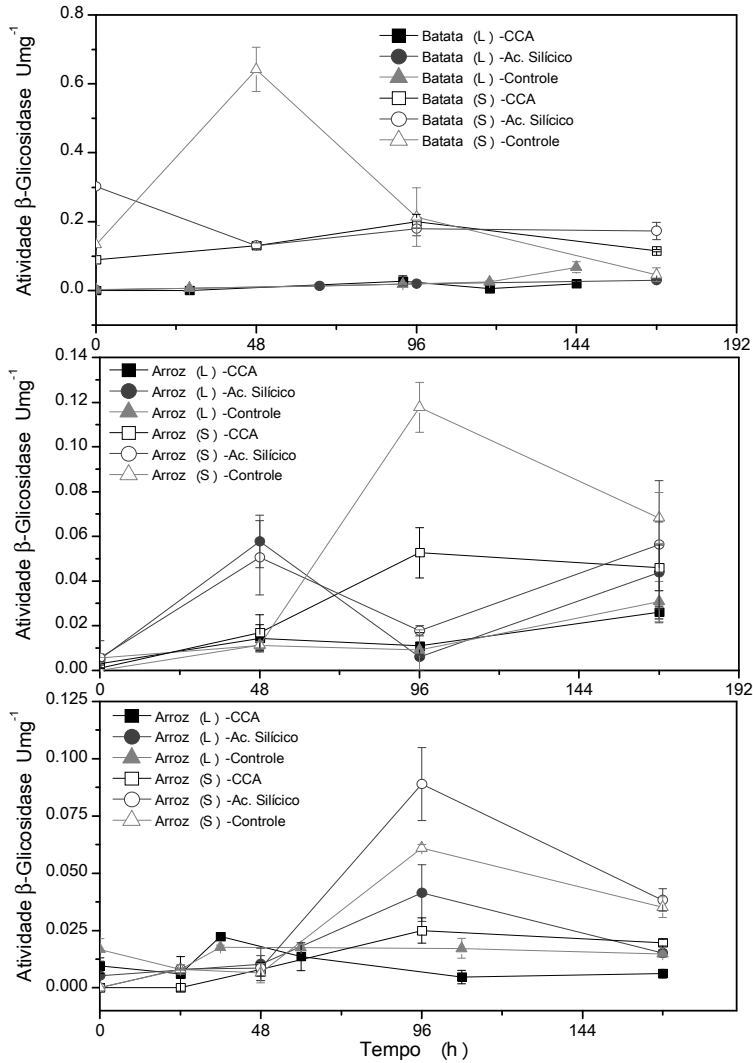


Figura 7.5– Produção de β -glucosidase pelo *F. oxysporum* em extrato de arroz, batata e malte em meio líquido (FML) e sistema sólido-líquido (FSS) a pH 6,5 e 28°C.

7.3.3 Análise da sílica dissolvida

As Fig 7.6 apresenta o comportamento da sílica ao longo do bioprocesso. A forma solúvel do silício é como ácido monossilícico

(H_4SiO_4) [57]. A sílica provém de diferentes origens, CCA e ácido silícico, principalmente [4,57]. Foi observado que no início nos diferentes meios de cultura e nos controles a quantidade de sílica dissolvida foi mínima, devido ao período de indução do fungo antes de realizar a inoculação nos diferentes sistemas. A solubilização da sílica pelo *F. oxysporum* ocorre de forma diferente dependendo da fonte de carbono, silício, e do sistema de fermentação. Observou-se que a sílica proveniente do ácido silícico rapidamente é solubilizada, entre 48 e 96h, sendo maior a solubilização nos meios batata (L) e arroz (L), com valores de 100 e 140 ppm, respectivamente. Por outro lado, para a sílica proveniente da CCA de arroz, a máxima solubilização acontece entre 96 e 72h no FML, e principalmente na FSS, tempo no qual, as concentrações das enzimas peroxidase e β -glicosidase apresentaram os máximos valores, se bem favorecem a dissolução, tudo indica que existem outros tipos de enzimas que podem contribuir para a hidrólise e condensação da sílica. Estas enzimas segundo Bansal *et al.* [35], são do tipo reductases. Pelo perfil da atividade enzimática da β - glicosidase, a solubilização da sílica pode acontecer a través do metabolismo secundário.

Acredita-se que a dissolução da sílica ocorra em várias etapas. Inicialmente, há formação de ácido silícico, seguida pela produção de um complexo de um monômero de silicato solúvel. Finalmente, há transformação em nanopartículas estáveis de SiO_2 , pela ação de proteínas específicas do *F. oxysporum* [35,41,43]. Assim se justifica o menor tempo gasto na dissolução da sílica a partir de ácido silícico e a queda a partir das 96h nos meios líquidos.

Nas fermentações com suporte sólido, o comportamento foi relativamente diferente, a dissolução da sílica leva mais tempo. Isso está intimamente relacionado com a produção de proteínas nesses meios. No entanto, a tendência é aumentar a dissolução das partículas de SiO_2 , especialmente nos extratos de malte e arroz, para os quais se observaram valores entre 40 e 120 ppm, para ambas as fontes de sílica.

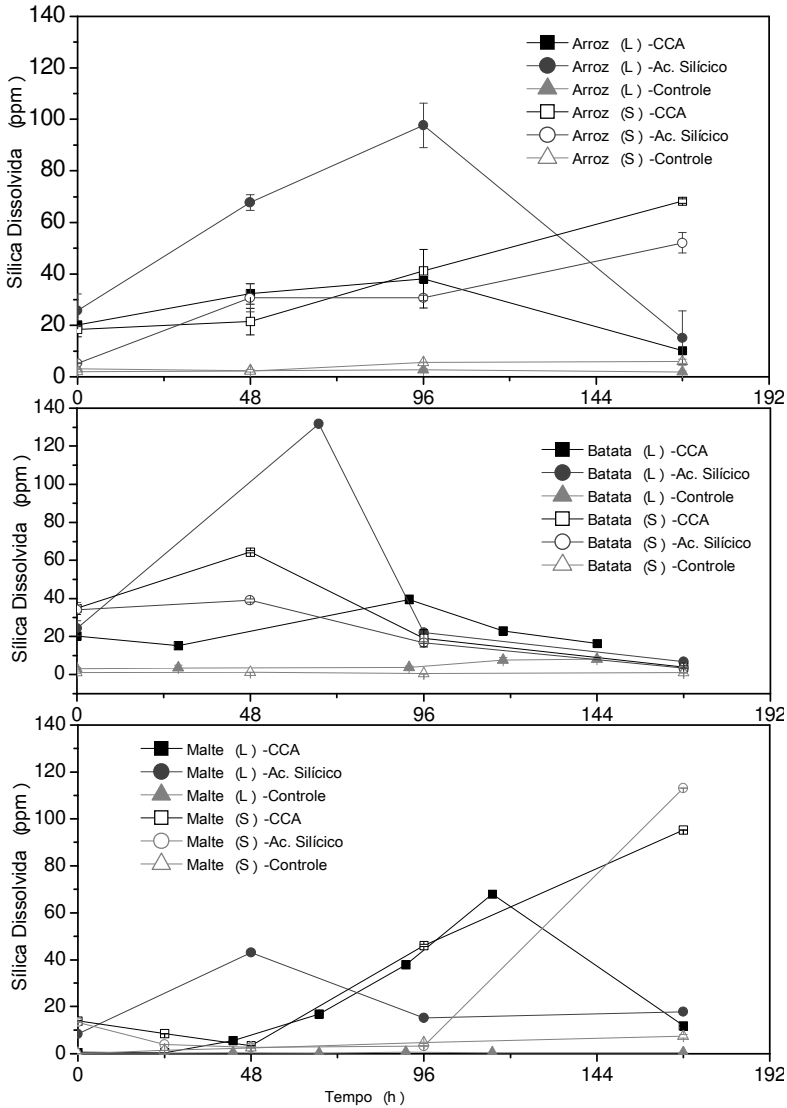


Figura 7.6– Silica dissolvida por *F. oxysporum* em extrato de arroz, batata e malte em meio líquido (FML) e sistema sólido-líquido (FSS) a pH 6,5 e 28°C.

7.3.4 Potencial zeta

O potencial zeta é um parâmetro importante para analisar a estabilidade de suspensões aquosas e representa o potencial elétrico no plano de cisalhamento quando a partícula esta em movimento sob ação de um campo elétrico. Os valores de potencial zeta estão relacionados à estabilidade das suspensões. Um potencial de ~20 mV, em valor absoluto e à temperatura ambiente, é geralmente associado a uma suspensão estabilizada eletrostaticamente [38,58].

Na Fig. 7.7A-B observa-se que a partir de pH 3,0 a superfície da CCA torna-se negativa. O potencial zeta das partículas após a interação com *F. oxysporum* em meio líquido foi alterado e decresce com o aumento do pH. O potencial isoelétrico (PIE) das partículas da sílica, para todos os ensaios, diminui para uma faixa entre 1,5-2,0. Esses valores coincidem com os reportados na literatura para sílicas de diferentes origens [59-61]. Essa variação implica que há uma mudança na superfície das partículas, provavelmente pela interação eletrostática entre proteínas catiônicas do *F. oxysporum* e a sílica [43]. Esse comportamento coincide com a produção de proteínas totais, já que, no meio contendo batata, a concentração de proteínas foi maior. Isso possivelmente conduz à modificação da superfície da sílica, levando a um valor de potencial zeta menos negativo.

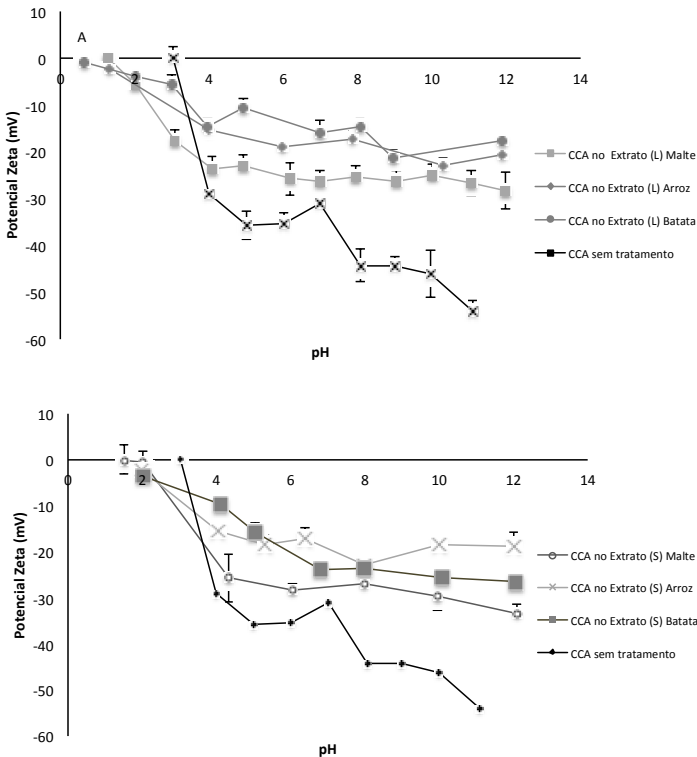


Figura 7.7– Potencial zeta das partículas de sílica antes(A) e depois da interação com *F. oxysporum* em extrato de arroz, batata e malte em meio líquido(FML) e sistema sólido-líquido(FSS) a pH 6,5 e 28°C.

7.3.5 Análise microestrutural

Na Fig 7.8 são apresentadas micrografias da CCA após a biotransformação empregando diferentes substratos em FML. O MEV foi realizado após calcinação a 400°C por 2h para eliminar algumas proteínas que ficam aderidas à superfície das partículas de CCA e para poder verificar as características microestruturais. As partículas são em geral irregulares, com uma distribuição de tamanho de partícula amplo, variando entre 600µm até 10nm. Resultados similares foram obtidos por Bansal *et al.* [35], que realizaram a biotransformação da sílica da casca de arroz usando *F. oxysporum* a 27 °C e pH 4.5.

Nas microscopias obtidas por MET, Fig. 7.8 (D-E), cujas amostras não foram submetidas à calcinação, pode se observar uma

variação considerável na forma e tamanho das partículas nos diferentes meios. A Fig 7.8 (D) revela que as nanopartículas de sílica estão recobertas por uma matriz, que segundo Bansal *et al.*, é proteica [35], com uma distribuição de tamanho variando entre 10-40 nm, a abertura para difração de elétrons (SAED– *selected area electron diffraction*) indica que não há variação na estrutura cristalina da sílica dissolvida. Analogamente, as nanopartículas obtidas usando batata Fig 7.8 (E), apresentam tamanho inferior a 20 nm. Na Fig. 7.8 (F) as nanopartículas de sílica são tendencialmente esféricas com uma distribuição estreita de tamanho em torno de 10 nm. A SAED sugere que são principalmente cristalinas, concordando com Bansal *et al.*[35]. Isso leva a concluir que o tipo de substrato influencia o metabolismo do fungo, o qual é responsável pela transformação de fase da sílica.

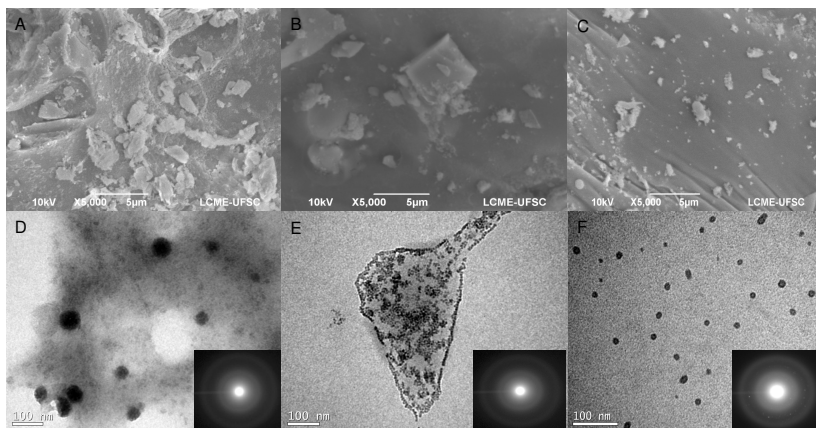


Figura 7.8– Micrografias da sílica biotransformada por *F. oxysporum* em meio líquido através de MEV (A-C) e MET (D-F) em diferentes substratos, A e D: arroz integral; B e E: batata; C e F: malte. Nas Fig. (C-D) encontra-se inserida a difração de elétrons da área selecionada das micrografias correspondentes.

7.3.6 Análise da distribuição de tamanho de partícula (DTP)

Nas Fig. 7.9; 7.10 e 7.11 são apresentadas as diferentes distribuições de tamanho de partícula da sílica biotransformada em fermentação em meio líquido para cada tipo de fonte de proteína. Tamanhos de partícula de SiO_2 entre 400-1100 nm foram obtidos usando extrato de malte, Fig 7.9, com distribuição monomodal e com diâmetro médio de ~600 nm.

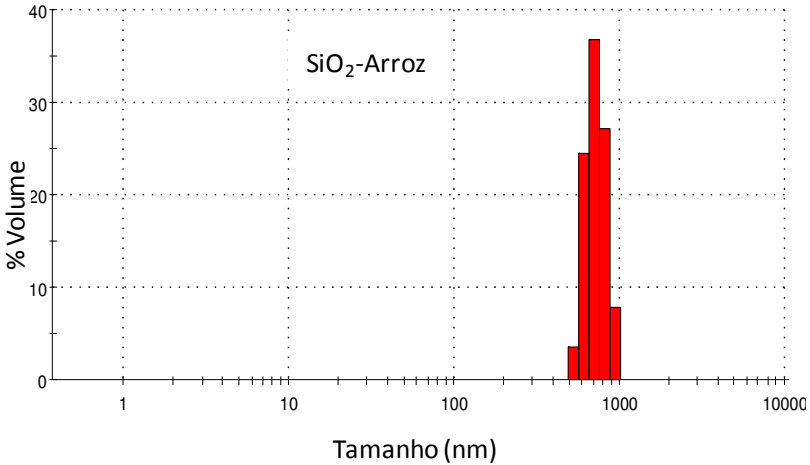


Figura 7.9-DTP das nanopartículas de SiO₂ no meio de cultura contendo extrato de arroz.

Na Fig. 7.11 apresenta-se a DTP das nanopartículas de SiO₂ usando como fonte de proteína extrato de malte. As partículas apresentam uma distribuição monomodal com tamanhos entre 30-50 nm e diâmetro médio de 40 nm.

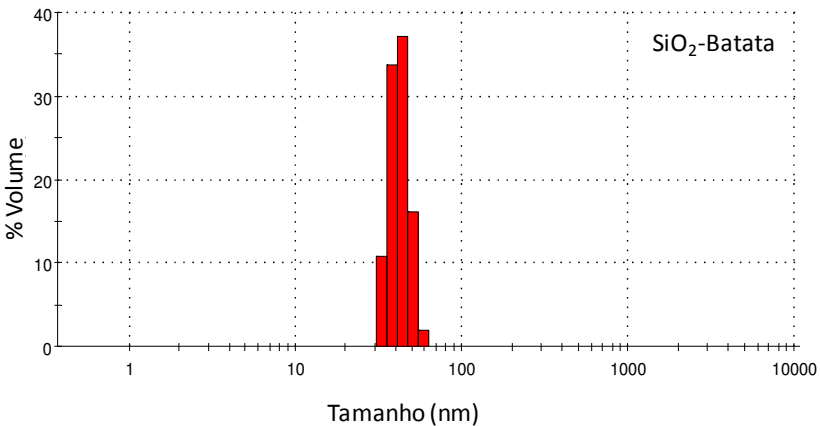


Figura 7.10– DTP das nanopartículas de SiO₂ no meio de cultura contendo extrato de batata.

Na Fig. 7.10 apresenta-se a DTP das nanopartículas de SiO_2 usando como fonte de proteína extrato de malte. As partículas foram consideravelmente pequenas e apresentam uma distribuição monomodal com tamanhos entre 10-20 nm e diâmetro médio de 15 nm.

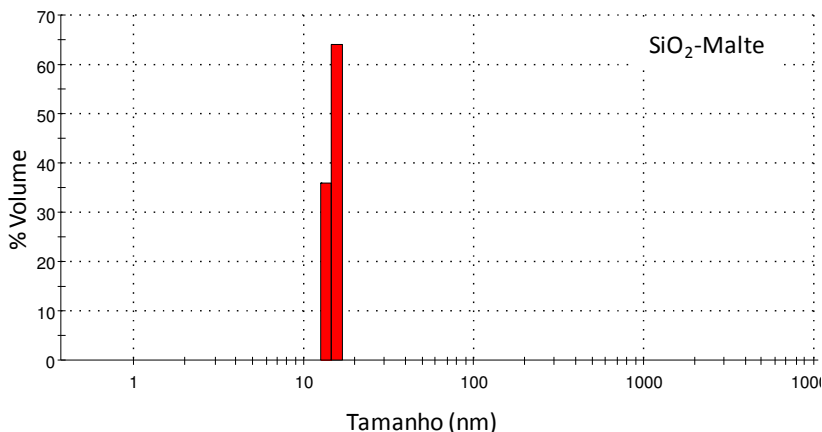


Figura 7.11- DTP das nanopartículas de SiO_2 no meio de cultura contendo extrato de malte.

A DTP e o tamanho médio da SiO_2 nos diferentes meios de cultura na fermentação líquida, concordam com os resultados encontrados através das outras técnicas analisadas. Há uma variação entre os valores obtidos pela análise de imagens (MEV e MET) e os valores obtidos através da análise de espalhamento de luz dinâmica no nanosizer, atribuída principalmente à aglomeração das nanopartículas em suspensão. Esse fenômeno tem sido observado por vários pesquisadores para a determinação de tamanho de nanopartículas metálicas [62], orgânicas [63] e de óxidos cerâmicos [64]. Pelos valores do potencial zeta das partículas em suspensão, o desvio nos valores do diâmetro médio das partículas entre as diferentes técnicas foi menor na sílica obtida no extrato de malte e batata, o que demonstra que são estáveis em suspensão.

7.3.7 Fases cristalinas

Os difratogramas de raios X permitiram observar a transformação da sílica amorfa (CCA e ácido silícico) em outras formas cristalinas, Fig 7.9. A cinza da casca de arroz antes da fermentação apresentou um halo tipo da sílica amorfa em ângulos 2θ na faixa de 15° -

22° [5,9,42]. Além disso, há um pequeno pico de baixa intensidade em torno de 22°, típico da cristobalita. Esses resultados permitiram corroborar a informação obtida pela SAED (Fig 7.10), pela qual a transformação cristalina da CCA ocorre, principalmente, através do uso do extrato de malte. Picos ao redor de 22°, 31° e 36° típicos da cristobalita [5,61] e o aparecimento de um pico em torno a 26,66° relativo ao quartzo, evidenciam esse fato. Por outro lado, o *F. oxysporum* também conseguiu transformar o ácido silícico, de natureza amorfa [61] numa estrutura cristalina, sendo mais predominante a forma da cristobalita, seguido de quartzo.

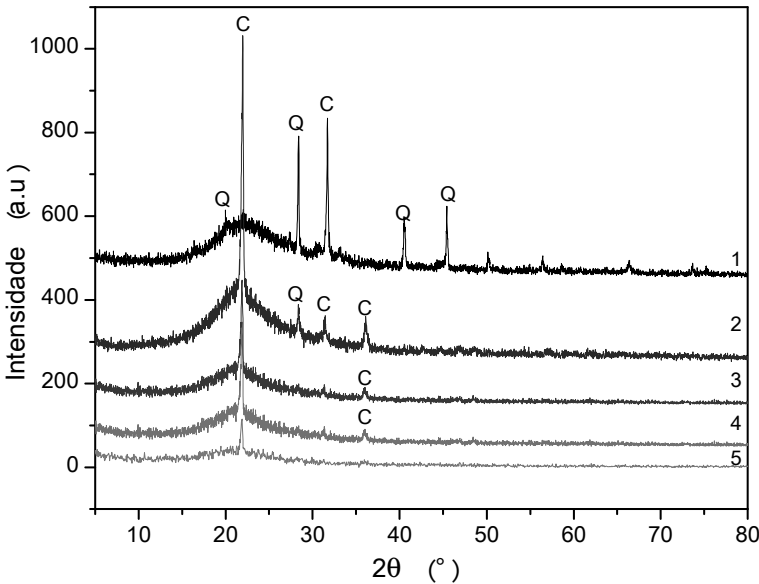


Figura 7.12 – DRX das partículas de sílica antes após a interação com *F. oxysporum* em FML: (1) Ácidosilícico em extrato de malte; (2) CCA em extrato de malte; (3) CCA em extrato de batata; (4) CCA em extrato de arroz; e (5) CCA sem tratamento em pH 6,5 e 28°C. Q = quartzo; C = cristobalita.

7.4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados aqui obtidos pode-se concluir que o *F. oxysporum* tem a capacidade de crescer na presença da cinza da casca de arroz nos diferentes meios testados, em concentrações com até 2,0% de CCA. No entanto, a partir de 3,0%, o crescimento é limitado.

Todos os meios testados permitiram a dissolução da sílica da casca de arroz nos diferentes arranjos. Dentre todos, o extrato de batata gera maiores concentrações de sílica com menor tamanho, o que torna o bioprocessamento mais econômico. Para fins de transformação de fase, é recomendado usar extrato de malte. Além de dissolver a sílica proveniente da casca de arroz, o malte permitiu a transformação da sílica amorfa em cristobalita.

Através das micrografias de transmissão eletrônica, pode-se verificar que as partículas dissolvidas são nanométricas e que há uma boa adesão das proteínas na superfície dessas. Isso também foi comprovado pela análise do potencial zeta, cujo ponto isoelétrico foi modificado.

Outros estudos devem ser abordados para identificar com exatidão as enzimas responsáveis pela transformação da sílica, se bem, a peroxidase e a β -glicosidase favorecem a dissolução, o presente estudo indica que existem outros tipos de enzimas que podem contribuir para a hidrólise e condensação da sílica.

A POD e β -glicosidase podem ser usadas como biomarcadores deste processo em trabalhos futuros.

7.5 REFERÊNCIAS

1. Salanti, A.; Soia, L.; Frigerio, P.; Orlandi, M. *Bioresource Technology*, **2013**, 128, 330-336.
2. Salanti, A.; Zoia, L.; Orlandi, M.; Zanin, F.; Elegir, G. J. *Agric. Food. Chem.*, **2010**, 58, 10049–10055.
3. Yeletsy, P.M.; Yakovlev, V.A.; Mel'Gunov, M.S.; Parmon, V.N. *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, 121, (1–3), 34-40.
4. Della, V.; Hotza, D. *Quim. Nova*, **2006**, 29, (6), 1175-1179.
5. Martinez, J. D. ; Pineda-Vásquez, T.; Lopez, J.P.; Betancur, M. *Quim. Nova*, **2009**, 32, (5), 1110-1114.
6. Martínez, J.D.; Pineda-Vásquez, T.; López, J. P.; Betancur, M. *Energy*, **2011**, 36, (6), 3846-3854.
7. Shafie, S.M.; Mahlia, T.M.I.; Masjuki, H.H.; Rismanchi, B. *Energy Procedia*, **2012**, 14, 499-504.
8. Carmona, V.B.; Oliveira, R.M.; Silva, W.T.L.; Mattoso, L.H.C.; Marconcini, J.M. *Ind. Crops Prod.*, **2013**, 43, 291-296.

9. Rozainee, M.; Ngo, S. P.; Salema, A.A.; Tan, K.G.; Ariffin, M., Zainura, Z.N. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99, (4), 703-713.
10. Kapur, P.C.; *Ceram. Int.* **1985**, 11, 142.
11. Gonçalves, M.R.F.; Bergmann, C.P.; *Constr. Build. Mater.* **2007**, 21, 2059.
12. Ikpong A.A.; *Cem. Concr. Res.* **1993**, 23, 387.
13. Ismail, M.S.; Waliuddin, A.M.; *Constr. Build. Mater.* **1996**, 10, 521.
14. Anwar, M.; Miyagawa, T.; Gaweesh, M.; *Waste Manag. Ser.* **2000**, 1, 671.
15. Safiuddin, M.; West, J.S.; Soudki, K.A.; *Cem. Concr. Composites*, **2010**, 32, 708.
16. Khan, R.; Jabbar, A.; Ahmad, I.; Khan, W.; Khan, A.N.; Mirza, J.; *Constr. Build. Mater.* **2012**, 30, 360.
17. Chand, N.; Dan, T.K.; Verma, S.; Rohatgi, P.S.; *J. Mater. Sci. Letters* **1987**, 6, 733.
18. Fuad, M.Y.A.; Yaakob, I.; Ishak, Z.A.M.; Omar, A.K.M.; *Polymer Testing*, **1993**, 12, 107.
19. Ismail, H.; Nasaruddin, M.N.; Ishiaku, U.S.; *Polymer Testing*, **1999**, 18, 287.
20. Ayswarya, E.P.; Francis, K.F.V.; Renju, V.S.; Thachil, E.T.; *Mater. Design*, **2012**, 41, 1.
21. Krishnarao, R.V.; Godkhindi, M.M.; *Ceram. Int.* **1992**, 18, 35.
22. Wang, H.P.; Lin, K.S.; Huang, Y.J.; Li, M.C.; Tsaur, L.K.; *J. Hazardous Mater.* **1998**, 58, 147.
23. Naskar, M.K.; Chatterjee, M.; *J. Eur. Ceram. Soc.* **2004**, 24, 3499.
24. Chang, F.W.; Kuo, W.Y.; Lee, K.C.; *Appl. Catalysis A.* **2003**, 246, 253.
25. Adam, F.; Ahmed, A.E.; *Chem. Eng. J.* **2008**, 145, 328.
26. Prasad, C.S.; Maiti, K.N.; Venugopal R.; *Ceram. Int.* **2001**, 27, 629.

27. Prasad, C.S.; Maiti, K.N.; Venugopal R.; *Ceram. Int.* **2003**, 29, 907.
28. Sutas, J.; Mana, A.; Pitak, L.; *Procedia Eng.* **2012**, 32, 1061.
29. Kaewkhao, J.; Limsuwan, P.; *Procedia Eng.* **2012**, 32, 670.
30. Feng, Q.; Lin, Q.; Gong, F.; Sugita, S.; Shoya, M.; *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, 278, 1.
31. Srivastava, V.C.; Mall, I.D.; Mishra, I.M.; *J. Hazardous Mater.* **2006**, 134, 257.
32. Lakshmi, U.R.; Srivastava, V.C.; Mall, I.D.; Lataye, D.H.; *J. Environ. Manag.* **2009**, 90, 710.
33. Jang, H.T.; Park, Y.K.; Ko, Y.S.; Lee, J.Y.; *Int. J. Greenhouse Gas Control*, **2009**, 3, 545.
34. Dahlan, I.; Lee, K.T.; Kamaruddin, A.H.; Mohamed, A.R.; *J. Hazardous Mater.* **2009**, 166, 1556.
35. Bansal, V.; Ahmad, ; Sastry, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14059-14066.
36. Hubert, D. H. W.; Jung, M.; German, A. L, *Adv. Mater*, **2000**, 12, (17), 1291-1294.
37. Liou, T. H. *Mater. Sci. Eng. A*, **2004**, 364, 313–323.
38. Chakraverti, A.; Mishra, P.; Banerjee, H.D.J. *Mater. Sci*, **1988**, 23, 21-24.
39. Tzong-Horng , L.; Shao-Jung , W. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2010**, 49, 18, 8379-8387.
40. Ehrlich, H.; Demadis, K.; Pokrovsky, O.; Koutsoukos, P. *Chem. Rev.* **2010**, 1104656–4689.
41. Bansal, V.; Bharde, A; Ramanathan, R; Bhargava, S. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, 179-182, 150-168.
42. Pineda-Vasquez, T.; Soares, C.H.L. ; Hotza, D. ; Casas-Botero, A.E. ; Ramírez-Carmona, M. ; Torres-Taborda, M. *Matéria*, **2012**, 17, (1), 946 – 954.
43. Bansal, V.; Asad S.; Bhargava S.; Ahmad, A.; Sastry, M.. *Langmuir*, **2007**, 23, (9), 4993-4998.

44. Zwietering, m. H.; Jongenburger, I.; Rombouts, F. M.; Van 'T Riet, K *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, 56, (6), 1875-1881.
45. Esposito, E.; Innocentini-Mei, L.H.; Ferraz, A.; Canhos, V.P.; Duran, N. J. *Biotechnol.*, **1993**, 29, (3) 219-228.
46. Bradford, M.M. *Anal. Biochem*, **1976**, 72, (1), 248-254.
47. Eaton, d. A.; Clesceri, L. S.; Greenberg, A. E. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19thed. **1995**, 1015 p.
48. Casas, B.; Torem, M.L.; Mesquita, L. *Miner. Eng.* **2007**, 20, (10), 1026–1032.
49. Nagia, f. A.; El-Mohamedy, R. S. R. *Dyes Pigments*, **2007**, 75, (3), 550-555.
50. Gupta , K.; Misra , K.; Gaur, K. J. *Plant. Prot. Res.* **2010**, 50, (4), 452-462.
51. Paszczynski , A.; Crawford, R. L. *Biotec. Prog.* **1995**, 11, (4), 368–379.
52. Philippoussis , A.; Zervakis, G.; Diamantopoulou, P. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 17, 191-200.
53. Fonseca -Zanoelo, F. ; Teixeira De Moraes-Polizeli, M.; Francisco-Terenzi, H.; Atílio-Jorge, J. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, 240, (2), 137-143.
54. Deschamps, F.; Huet, M. C. *Biotechnol. Lett.* **1984**, 6, (7), 451-456.
55. Peralta, R. M.; Terenzi, H; Jorge, J. A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, 1033, 243–249.
56. Zhiyou, W.; Wei, L.; Shulin , C. *Appl. Biochem. Biotechnol*, **2005**, 121-124, 93-104.
57. Delstanche , S. ; Opfergelt, S.; Cardinal, D.; Elsass, F.; Andréb L.; Delvaux, B. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **2009**, 73, (4), 923-934.
58. Hotza, D. *Cerâmica*, **1997**, 43, 157-164.
59. Guanli, X.; Jingjie, Z.; Guangzhi , S. *Powder Technol.* **2003**, 134, (3), 218-222.
60. Franks, G. V. J. *Colloid Interface Sci*, **2002**, 249, 44-51.

61. Liwei, W.; Zichen, W.; Hua, Y.; Guangli, Y, *Mater. Chem. Phys.*, **1999**, 57, (3), 260-263.
62. Mahl, D.; Diendorf, J.; Meyer-Zaika, W.; Epple, M. *Colloids Surf. A.* **2011**, 377, (1–3), 386-392.
63. Kato, H.; Suzuki, M.; Fujita, K.; Horie, M.; Endoh, S.; Yoshida, Y.; Iwahashi, H.; Takahashi, K.; Nakamura, A.; Kinugasa, S. *Toxicol.Vitro*, **2009**,23, (5), 927-934.
64. Jeong, H. R.; Sin, Y. B.; Jong-Won, Y.; Chang, S. L.; Kwang, B. S. *Appl. Surf. Sci.* **2007**, 253, (20), 8408-8414.

8 CONSIDERAÇÕES E RECOMENDAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi desenvolvida uma rota biológica, através de *F. oxysporum*, para a obtenção de micro e nanopartículas de sílica a partir da cinza da casca de arroz (CCA). A CCA é um resíduo agroindustrial, produzido em grandes proporções e de difícil disposição. Nesse processo, foram levados em consideração aspectos importantes relacionados com o meio ambiente. Rotas convencionais, normalmente usam precursores derivados do petróleo e reagentes que agredem a natureza, assim como condições extremas de temperatura, pH e pressão.

Os resultados mostraram que há uma transformação da CCA em nanopartículas de sílica quase esféricas de tamanhos entre 6 a 40 nm e área de superfície de 177 m²/g. Essa transformação depende do meio de cultura e do tipo de fermentação. Meios de cultura comerciais podem ser substituídos por meios com fonte de carbono economicamente viáveis, tais como batata inglesa (*Solanum sp.*). Esse meio potencializa a solubilização da sílica e a transforma em nanopartículas com tamanhos inferiores a 20 nm, através de uso de extrato de malte.

Considerando o estudo enzimático realizado nos diferentes meios de cultura, encontrou-se que algumas proteínas com tamanhos entre 24, 55 e 70 kDa e o metabolismo do fungo são provavelmente responsáveis pela dissolução e transformação da sílica a partir da CCA. Também foi identificada que a dissolução e transformação da sílica é realizada em diferentes etapas do crescimento do fungo. Enquanto a dissolução ocorre nas primeiras 96 h, a transformação da sílica é realizada em uma etapa posterior, por metabolismo secundário. Isso também foi verificado no planejamento experimental que estabeleceu que a melhor concentração de glicose para a síntese de sílica corresponde a 3g/L.

Foi demonstrada também a possibilidade de síntese e transformação da sílica usando *F. oxysporum* e outras fontes de SiO₂ como ácido silícico. Outros estudos devem ser abordados para identificar com exatidão as enzimas responsáveis pela transformação da sílica. Embora a peroxidase e a β-glicosidase tenham favorecido a identificação dos possíveis mecanismos envolvidos na dissolução da sílica, o presente estudo indica que existem outros tipos de enzimas responsáveis pela hidrólise e condensação das partículas de SiO₂. Essas enzimas podem ser usadas como bioindicadores do processo da biotransformação da sílica.

Para ampliação de escala do bioprocessamento deve ser considerada a fermentação em suporte sólido, em biorreator, através de módulos conectados por um sistema de tubulação. Um dos módulos teria o *F.*

oxysporum confinado num suporte inerte e outro módulo teria a solução com a CCA, com a finalidade de garantir uma maior produção de enzimas por um período maior de tempo.

Recomenda-se continuar com a pesquisa e testar o efeito da adição destas nanopartículas, em diferentes processos, por exemplo, como aditivo ao cimento na indústria civil. Por suas características e por encontrar-se em suspensão, a combinação de micro e nanossílica poderia melhorar algumas propriedades como a resistência mecânica e ao ataque químico.

Também se recomenda o uso dessa rota biológica para o beneficiamento de diferentes minerais contaminados com sílica, devido à especificidade do *F. oxysporum* com relação à dissolução do SiO₂.

Por fim, pelas características aqui observadas, o *F. oxysporum* pode ser empregado na indústria química e têxtil para a produção de pigmentos, já que foi observado que, dependendo do meio de cultura e do pH do processo, diferentes tonalidades podem ser obtidas.