



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**MATERIAIS HÍBRIDOS MULTIFUNCIONAIS CONSTITUÍDOS DE
BIOPOLÍMERO DE QUITOSANA E NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Anike Hübner Virgili

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, julho de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**MATERIAIS HÍBRIDOS MULTIFUNCIONAIS CONSTITUÍDOS DE
BIOPOLÍMERO DE QUITOSANA E NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Anike Hübner Virgili

Dissertação realizada sob a orientação do
Prof^o. Edilson Valmir Benvenuti e co-orientação da
Prof^a. Eliana Weber de Menezes,
apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Materiais da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, julho de 2018.

CIP - Catalogação na Publicação

Virgili, Anike Hübner
Materiais híbridos multifuncionais constituídos de
biopolímero de quitosana e nanopartículas de ouro /
Anike Hübner Virgili. -- 2018.
59 f.
Orientador: Edilson Valmir Benvenutti.

Coorientadora: Eliana Weber de Menezes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Porto Alegre,
BR-RS, 2018.

1. Ouro nanoparticulado. 2. APTMS. 3. Atividade
antimicrobiana. 4. Nanocatalisador heterogêneo. 5.
Reações de hidrogenação. I. Benvenutti, Edilson
Valmir, orient. II. Menezes, Eliana Weber de,
coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos.”

(Marcel Proust)

*Dedico este trabalho aos meus pais José Carlos e Carla,
por todo amor, compreensão e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edilson Valmir Benvenuti, pela confiança e oportunidade em fazer parte deste grupo.

À minha coorientadora, Prof^ª. Dra. Eliana Weber de Menezes, por todos os ensinamentos, compreensão, amizade e principalmente, paciência. Obrigada!!

Às Professoras Dra. Tania Maria Haas Costa e Dra. Leliz Ticoná Arenas, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Barbalho Pereira pela realização das análises espectroscópicas dos filmes.

À Prof^ª. Dra. Patrícia Malheiros, pela possibilidade de realizar as análises antimicrobianas em seu laboratório; à doutoranda Daniela Laranja por toda ajuda e explicação durante a realização das análises.

Ao Dr. Leandro Luza e ao Laboratório de Catálise Molecular do Instituto de Química da UFRGS, pela realização das reações de hidrogenação catalítica.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Sólidos e Superfícies: Douglas, Luana, Natália, Monique, Danielle, Karine, Billy, Giulia, Oleg, Cezar, Júlia F. e Rafaela pela amizade, idas ao OutVilla e risadas. Obrigada!!

Aos meus amigos, pela amizade, apoio e carinho. Obrigada!!

À minha família, em especial aos meus amados pais, José Carlos e Carla, por todo amor, compreensão, e principalmente incentivo para que eu pudesse estar aqui. Muito Obrigada!!

À Capes pelo auxílio financeiro.

LISTA DE TRABALHOS GERADOS

Artigo publicado

Virgili, A.H., Luza, L., Fernandes, J.A., Costa, T.M.H., de Menezes, E.W., Benvenuti, E.V.; Self-supported gold/chitosan nanocatalyst for chemoselective hydrogenation in π -conjugated C=C–C=O system; *Catal. Commun.*, **2018**, 116, 32.

Trabalho publicado em evento científico regional

Virgili, A.H., dos Santos, J.F., Luza, L., Costa, T.M.H., Benvenuti, E.V., de Menezes, E.W. *Nanopartículas de ouro em Fase Líquida e em Fase Sólida Estabilizadas por Biopolímero Natural*. 1º **MultiMAT**. Porto Alegre, 23 a 25 de novembro de 2016.

dos Santos J.F., **Virgili A.H.**, Pereira M.B., Arenas L.T., de Menezes E.W.; *AuNPs aderidas a superfície de vidro plano usando precursores de silício como agentes estabilizadores e reticuladores*. 1º **MultiMAT**. Porto Alegre, 23 a 25 de novembro de 2016.

Trabalho publicado em evento científico internacional

Virgili A.H., Charqueiro D.S., Matte C., Poppe J., Hertz P.F., Costa T.M.H. Benvenuti E.V., de Menezes E.W.; *Silica with large mesopores for lipase immobilization*. **19th International Sol-Gel Conference**. September 3-8, 2017 in Liege – Belgium.

RESUMO

Neste trabalho foram obtidas nanopartículas de ouro empregando biopolímero de quitosana como agente estabilizador e controlador de tamanho. Duas abordagens são apresentadas envolvendo o sistema nanopartículas de ouro/quitosana: a primeira, inclui o desenvolvimento de filmes com atividade antimicrobiana e, a segunda, envolve o desenvolvimento de catalisador heterogêneo para hidrogenação de compostos orgânicos. Na primeira abordagem, foram obtidos filmes, por *drop-casting*, com diferentes alíquotas de uma dispersão de nanopartículas de ouro na presença de quitosana e 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS). Como substrato, foram utilizadas lâminas de vidro previamente tratadas. Os filmes mostraram-se compactos, homogêneos, com baixa rugosidade e apresentaram atividade contra a bactéria *Salmonella* Typhimurim. Na segunda abordagem, nanopartículas de ouro estabilizadas e suportadas em quitosana foram obtidas na forma de pó, a partir da secagem da dispersão aquosa. Esse material foi utilizado como nanocatalisador heterogêneo em reações de hidrogenação de sistemas conjugados C=C-C=O e não-conjugados C=C e C=O. O catalisador mostrou atividade e seletividade para álcoois saturados ou cetonas saturadas (seletividades $\geq 97\%$) dependendo do agente redutor utilizado, NaBH₄ ou H₂. Quando H₂ foi usado, o catalisador mostrou atividade somente para C=C-C=O conjugados, formando aldeídos e cetonas saturadas. Para C=C e C=O isolados e C=C-C=C conjugados, não foi observada atividade, independente do sistema empregado.

Palavras-chave: ouro nanoparticulado, APTMS, atividade antimicrobiana, nanocatalisador heterogêneo, reações de hidrogenação.

ABSTRACT

In this work, gold nanoparticles were obtained using chitosan biopolymer as stabilizer agent and size controller. Two approaches are presented involving the gold/chitosan nanoparticle system: the first includes the development of films with antimicrobial activity and the second involves the development of a heterogeneous catalyst for the hydrogenation of organic compounds. In the first approach, films were obtained by drop-casting with different aliquots of gold nanoparticles dispersion in the presence of chitosan and 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS). As substrate, were used glass slides previously treated. The films showed to be compact, homogeneous, with low roughness and showed activity against the bacterium *Salmonella* Typhimurim. In the second approach, stabilized and supported chitosan gold nanoparticles were obtained in powder form from the drying of the aqueous dispersion. This material was used as heterogeneous nanocatalyst in hydrogenation reactions of C=C and C=O conjugated and nonconjugated systems. The catalyst showed activity and selectivity for saturated alcohols or saturated ketones (selectivities $\geq 97\%$) depending on the reducing agent used, NaBH₄ or H₂. When H₂ was used, the catalyst showed activity only for C=C–C=O conjugates, forming aldehydes and saturated ketones. For C=C and C=O isolates and C=C–C=C conjugates, no activity was observed.

Keywords: nanoparticulate gold, APTMS, antimicrobial activity, heterogeneous nanocatalyst, hydrogenation reactions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cálice de Lycurgus. Iluminado por fora à esquerda, iluminado por dentro à direita.¹⁹

Figura 2. Aumento da área superficial com a diminuição das dimensões.³⁰

Figura 3. Espectro de absorção na região do visível para uma dispersão de nanopartículas esféricas de ouro, com comprimento de onda 520 nm. Adaptado da referência 32.

Figura 4. Representação da oscilação da nuvem eletrônica com campo eletromagnético. Adaptado da referência 6.

Figura 5. Espectro de absorção no UV-Vis de nanopartículas de ouro com diferentes formas. Adaptado da referência 8.

Figura 6. Métodos para síntese de nanopartículas: Top-down e Bottom-up. Adaptado da referência 24.

Figura 7. Processo de formação de nanopartículas de ouro por redução com NaBH₄. Adaptado da referência 39.

Figura 8. Nanopartículas na ausência e na presença de agentes estabilizantes.⁴⁰ (a) Estabilização eletrostática; (b) Estabilização estérea.⁴²

Figura 9. Estrutura do 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS).

Figura 10. Estrutura química da celulose, quitina e quitosana.⁵⁰

Figura 11. Dispersão de nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana.

Figura 12. Métodos de deposição de filmes.⁶³

Figura 13. Método de *drop-casting*.⁶⁵

Figura 14. Representação da ação antimicrobiana da quitosana. Adaptado da referência 73.

Figura 15. Diagrama de energia potencial para uma reação catalítica heterogênea.⁸⁴

Figura 16. Modos de adsorção do composto 2-ciclohexenona na superfície de nanopartículas metálicas.²³

Figura 17. a) dispersão aquosa, Ch/AuNP; b) filme, após secagem da dispersão Ch/AuNP na linha de vácuo; c) pó, após moagem com N₂ líquido, AuNP/Quitosana.

Figura 18. Espectros de absorção, na região do visível, das dispersões aquosas Ch/AuNP e Ch/AuNP/APTMS.

Figura 19. Imagens dos filmes Ch/AuNP/AP formados a partir de deposições contendo 10, 25, 50 e 100 µL da dispersão aquosa Ch/AuNP/APTMS.

Figura 20. Espectro de absorção na região do visível do filme Ch/AuNP/AP com 100 µL de dispersão Ch/AuNP/APTMS.

Figura 21. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura do filme Ch/AuNP/AP (adição de 100 µL) obtidas em diferentes ampliações.

Figura 22. Placas com crescimento de bactéria *Salmonella* a partir dos filmes Ch/AuNP/AP com alíquotas de 10, 25, 50 e 100 μL .

Figura 23. Espectros de absorção na região do UV-Vis da dispersão Ch/AuNP (a) e do sólido AuNP/Quitosana (b).

Figura 24. Imagens de TEM e histogramas de distribuição dos diâmetros das nanopartículas de ouro na dispersão Ch/AuNP (a) e sólido AuNP/Quitosana (b). As imagens foram obtidas com magnificações de 300.000 \times e 500.000 \times , respectivamente.

Figura 25. Espectros de XPS do material AuNP/Quitosana: (a) C 1s, (b) O 1s, (c) N 1s e (d) Au 4f.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados de perfilometria para o filme Ch/AuNP/AP, obtidos com diferentes alíquotas de deposição.

Tabela 2. Avaliação dos filmes Ch/AuNP/AP e seus brancos contra bactérias do tipo *Salmonella Typhimurium*.

Tabela 3. Hidrogenação de 2-ciclohexenona pelo catalisador AuNP/Quitosana.

Tabela 4. Hidrogenação seletiva de substratos orgânicos insaturados, na presença de H₂ e AuNP/Quitosana.

LISTA DE ABREVIATURAS

APTMS	3-aminopropiltrimetoxisilano
AuNP	Nanopartículas de ouro
AuNP/Quitosana	Material sólido usado como catalisador
BET	Brunauer, Emmett e Teller
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Caldo de nutrientes)
Ch	Quitosana
Ch/AuNP	Dispersão de nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana
Ch/AuNP/AP	Filmes formados pela dispersão Ch/AuNP/APTMS
Ch/AuNP/APTMS	Dispersão Ch/AuNP após adição de APTMS
HAuCl ₄	Ácido Cloroáurico
NaBH ₄	Borohidreto de Sódio
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> (Microscopia Eletrônica de Transmissão)
TOF	<i>Turnover Frequency</i> (Frequência de rotação)
TON	<i>Turnover Number</i> (Número de rotação)
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV-Vis	Ultravioleta-visível
XLD	Xilose Lisina Desoxicolado
γ -Al ₂ O ₃	Óxido de Alumínio

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA	16
2.2	NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	16
2.3	NANOPARTÍCULAS DE OURO	18
2.3.1	Síntese das nanopartículas	20
2.3.2	Síntese química (bottom up)	20
2.3.2.1	3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS)	22
2.4	QUITOSANA	23
2.4.1	Complexos metálicos.....	23
2.4.2	Filmes obtidos pela técnica <i>drop-casting</i>	24
2.4.3	Atividade antimicrobiana.....	25
2.5	CATÁLISE.....	27
2.5.1	Hidrogenação seletiva de compostos orgânicos insaturados	28
3.	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4.	PARTE EXPERIMENTAL.....	31
4.1	MATERIAIS	31
4.2	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	31
4.3	FILMES CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE OURO	32
4.3.1	Tratamento das lâminas de vidro: limpeza e ativação dos grupos silanóis.....	32
4.3.2	Preparo dos filmes por <i>drop-casting</i>	32
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	32
4.4.1	Espectroscopia na região do UV-Vis das dispersões	32
4.4.2	Espectroscopia na região do UV-Vis dos filmes	33
4.4.3	Perfilometria	33
4.4.4	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)	33
4.5	TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FILMES	33
4.6	CATALISADOR HETEROGÊNEO	34
4.7	CARACTERIZAÇÃO DO CATALISADOR	35
4.7.1	Espectroscopia na região do UV-Vis	35

4.7.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	35
4.7.3	Isotermas de Adsorção e Dessorção de N ₂	35
4.7.4	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS).....	36
4.8	TESTES CATALÍTICOS	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1	FILMES COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTENDO QUITOSANA E NANOPARTÍCULAS DE OURO	37
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	37
5.3	TESTES ANTIBACTERIANOS.....	41
5.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
5.5	AuNP/QUITOSANA COMO CATALISADOR HETEROGÊNEO PARA HIDROGENAÇÃO DE COMPOSTOS CONTENDO O GRUPO CONJUGADO C=C-C=O	43
5.6	CARACTERIZAÇÃO DO CATALISADOR AuNP/QUITOSANA.....	43
5.7	HIDROGENAÇÃO CATALÍTICA DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS INSATURADOS	46
5.8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
6.	CONCLUSÕES	50
7.	REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

Nanopartículas de ouro, tem despertado grande interesse da comunidade científica, devido as suas características físico-químicas, que estão diretamente relacionadas com a sua forma e tamanho.¹ Adicionalmente, apresentam propriedades como biocompatibilidade, absorções em comprimentos de onda na região do visível, estabilidade química, propriedades antimicrobianas e propriedades catalíticas², que possibilitam sua aplicação como dispositivos ópticos^{3,4}, catalisadores^{5,6} e em sistemas biológicos^{7,8}. Um dos métodos de síntese envolve a adição de agentes estabilizadores que tem como função evitar o processo de agregação das nanopartículas. Dentre esses agentes estabilizadores destacam-se, polímeros, dendrímeros, silsesquioxanos e surfactantes.⁹

A quitosana é um biopolímero obtido a partir da desacetilação da quitina, encontrada em exoesqueleto de crustáceos e insetos e nas paredes celulares de alguns fungos.¹⁰ Esse biopolímero apresenta biocompatibilidade, biodegradabilidade, possibilidade de formação de filmes e complexação de metais.^{10,11} Adicionalmente, apresenta grupos amino livres, que após solubilização em meio ácido, torna possível a complexação e estabilização de nanopartículas de ouro.¹² Devido a possibilidade de formar filmes, a quitosana vem sendo empregada como revestimento de eletrodos para o desenvolvimento de sensores (na presença de nanopartículas de ouro)^{13,14} e em embalagens alimentícias¹⁵. O método *drop-casting*, é um dos métodos empregados para deposição de filmes e é ideal quando se deseja preparar filmes com quantidades conhecidas de um material. Assim, uma alíquota líquida é adicionada na superfície de um substrato e, após a evaporação do solvente, há formação do filme.¹⁶ Para aplicação em embalagens alimentícias, é interessante que os filmes apresentem atividade antimicrobiana, a fim de preservar e prolongar a validade dos alimentos.¹⁷ Neste sentido, filmes que apresentem atividade contra a bactéria *Salmonella enterica*, são interessantes, visto que esta bactéria é responsável por surtos de salmoneloses e infecções alimentares.¹⁸ Então, a quitosana juntamente das nanopartículas de ouro, na forma de um material híbrido nanoestruturado, se tornam interessantes, já que estes possuem atividade antimicrobiana.

Nanopartículas de ouro como catalisadores heterogêneos tem merecido destaque devido a sua atividade em comparação com a forma *bulk*.^{5,19,20} Uma aplicação dos nanocatalisadores de ouro é na hidrogenação de compostos orgânicos. A hidrogenação de compostos carbonílicos α,β -insaturados, utilizando catalisadores de nanopartículas de ouro tem mostrado habilidade em hidrogenar cataliticamente C=O, produzindo álcoois insaturados através dos modos de adsorção via $\eta^1\text{O}$ (*end-on*) e $\eta^2\text{CO}$ (π ou di- σ).^{21,22} A hidrogenação

catalítica de C=C, resultando em compostos carbonílicos saturados, com boas conversões e seletividades é pouco reportada, pois neste caso, os modos de adsorção ocorrem via η^2_{CC} ou pelo sistema C=C-C=O via η^3 ($\eta^2_{CC}+\eta^1_O$) ou η^4 ($\eta^2_{CC}+\eta^2_{CO}$: di- π ou η^4_{CCCCO})²³. Assim, a utilização de nanocatalisadores heterogêneos que possuam métodos simples de preparação, baixos custos e que resultem em bons resultados se mostram promissores para serem aplicados na química fina e como intermediários em processos industriais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA

O prefixo nano, deriva do grego e significa ‘anão’ ou muito pequeno e representa o fator 10^{-9} de alguma medida no sistema métrico. Assim, para ser classificado como um material em nanoescala o tamanho apresentado precisa ser de 1-100 nanômetros (nm).^{19,24} A nanociência pode ser definida como a ciência que manipula a matéria ao nível molecular, nanométrico; a nanotecnologia potencializa as propriedades da matéria a fim de criar novas aplicações, utilizando para isso uma ampla gama de métodos e ferramentas.^{24,25,26}

Esses conceitos foram primeiramente apresentados pelo físico Richard Feynman no trabalho intitulado “There’s Plenty of Room at the Bottom”, no encontro da Sociedade Americana de Física, em 1959.²⁷ Nesta apresentação, Feynman afirmou que, se pudéssemos ter algum controle sobre a manipulação das coisas, na escala de átomos e moléculas, seria possível criar diversas novas propriedades.²⁴ Apenas anos mais tarde foi possível aplicar o que Feynman havia comunicado, já que na época, as ferramentas ideais para construir e depois analisar com maior grau de precisão esses novos materiais nanométricos ainda não existiam.²⁸

Hoje em dia, as técnicas de microscopia com possibilidade de diferenciar detalhes nanométricos e até atômicos são fundamentais para trabalhar em nanossistemas. Entre as técnicas, a Microscopia por Varredura de Sonda (Tunelamento e Força Atômica) têm-se mostrado de grande utilidade, a fim de se determinar o perfil da superfície da amostra, como também detalhes relativos ao comportamento elétrico, magnético e químico; também, a Microscopia Eletrônica de alta resolução, possibilita ver os materiais no nível atômico.²⁸

Esses exemplos citados mostram como a nanotecnologia tem se mostrado importante no mundo científico para solucionar problemas tecnológicos. No dia-a-dia, diversos produtos já fazem parte de sistemas nanométricos: na geração de energia solar, medicina, catálise, meio ambiente, entre outros.^{28,29}

2.2 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Embora se tenha bastante conhecimento a respeito de nanopartículas e seus usos nos dias atuais, sabe-se que estas já eram utilizadas há algum tempo. Um exemplo bem importante

desta história está na utilização de nanopartículas de ouro e prata no Cálice de Lycurgus, da Roma Antiga (Figura 1) que data dos anos 290-325 d.C.. A coloração do vidro, verde, ao ser iluminada por dentro, adquire coloração avermelhada e está relacionada às nanopartículas de ouro e prata inseridas no vidro.¹⁹



Figura 1. Cálice de Lycurgus. Iluminado por fora à esquerda, iluminado por dentro à direita.¹⁹

Nanopartículas metálicas têm gerado grande interesse em razão das propriedades físicas, químicas e/ou biológicas únicas em comparação com as partículas em forma *bulk*, macroestruturadas.^{19,29} Devido ao seu tamanho, a razão entre a área de superfície e o volume das nanopartículas aumenta (Figura 2), fazendo com que elas se tornem mais reativas e também com comportamentos diferenciados, que dão origem a muitas aplicações potenciais em áreas como óptica, eletrônica, catálise, liberação de fármacos, cosméticos, biossensores, entre outras.^{30,31}

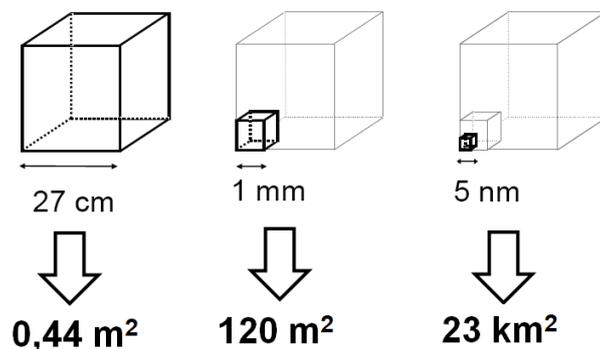


Figura 2. Aumento da área superficial com a diminuição das dimensões.³⁰

2.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO

Ouro metálico, quando em forma de *bulk*, apresenta alta condutividade, maleabilidade, resistência à corrosão e oxidação, mantendo sempre sua coloração característica, amarela.^{5,19,31} Porém, quando em forma de nanopartículas, apresentam características como estabilidade química, inércia sob condições fisiológicas, propriedades catalíticas e absorção de luz em comprimentos de onda na região do visível, o que possibilita seu uso em diversos campos de aplicações tecnológicas.^{1,2}

Nanopartículas de ouro podem exibir diferentes colorações daquela encontrada na forma macroscópica, que variam com seu tamanho e morfologia.¹⁹ A coloração das nanopartículas de ouro esféricas, com tamanhos menores do que 10 nm, geralmente é vermelho-rubi; esta cor se deve à absorção de luz em comprimentos de onda de próximos de 520 nm, correspondente à luz verde (Figura 3).^{3,4,32}

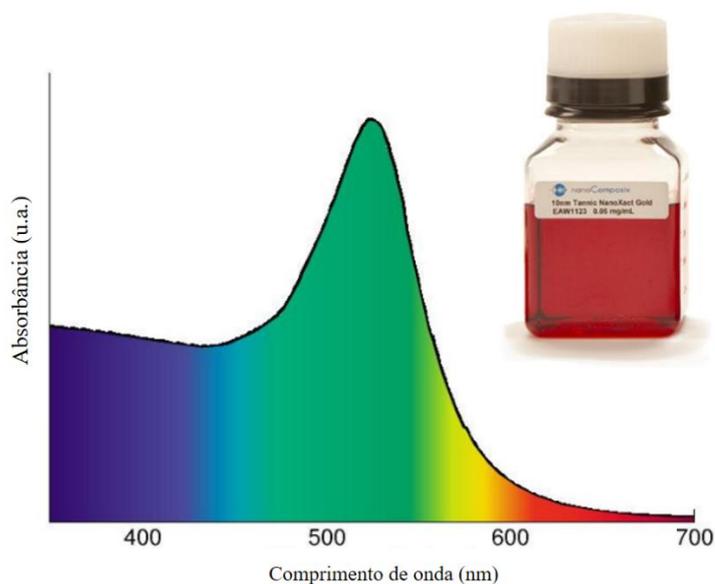


Figura 3. Espectro de absorção na região do visível para uma dispersão de nanopartículas esféricas de ouro, com comprimento de onda 520 nm. Adaptado da referência 32.

Essa coloração está relacionada ao fenômeno físico de ressonância de plasmon de superfície, que é resultante das oscilações coletivas de cargas dos elétrons nas nanopartículas metálicas, quando excitados pela luz. Quando as nanopartículas são submetidas ao campo elétrico, há formação de um dipolo que induz forças restauradoras na nanopartícula, o que leva à oscilações (Figura 4). O pico de absorção de radiação eletromagnética ocorre quando a frequência do campo magnético se torna ressonante com o movimento desses elétrons.^{2,6} Devido à esse fato, ocorre variação na coloração de acordo com o tamanho das nanopartículas e a composição do meio em que elas estão dispersas. A aproximação ou agregação dessas

partículas resulta em desvios para maiores comprimentos de onda e mudança na coloração.^{3,6} O pico de absorção resultante da ressonância pode ser observada e medida através de espectrofotômetro na região do ultravioleta-visível.³¹

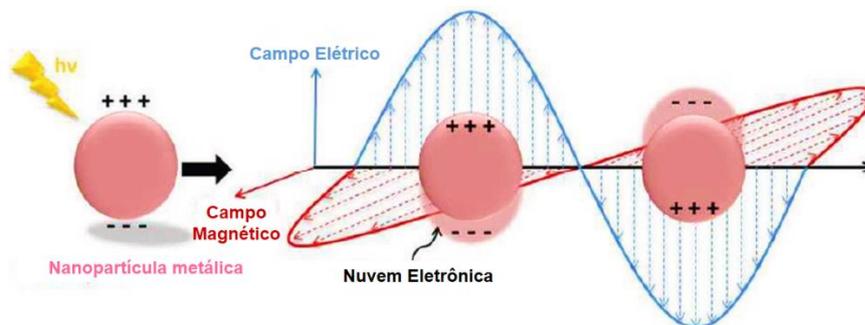


Figura 4. Representação da oscilação da nuvem eletrônica com campo eletromagnético. Adaptado da referência 6.

As nanopartículas obtidas podem ser tanto isotrópicas, com formato de esferas, quanto anisotrópicas, com formatos de estrela, triângulo e outros. As nanopartículas metálicas em formato esférico possuem apenas uma banda de absorção, já as partículas anisotrópicas apresentam mais de uma absorção no espectro do visível, devido às diferentes oscilações, longitudinais e transversais (Figura 5).⁸

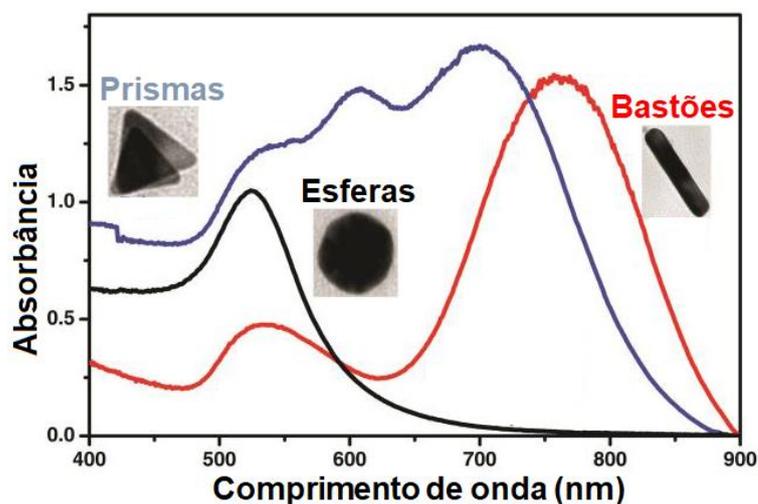


Figura 5. Espectro de absorção no UV-Vis de nanopartículas de ouro com diferentes formas. Adaptado da referência 8.

Devido à propriedade das nanopartículas de ouro de interagir com a luz, estas podem ser aplicadas em áreas como: óptica^{3,4}, catálise^{5,6} e biológicas^{7,8}. Ainda, na indústria alimentícia, as nanopartículas de ouro são utilizadas como nanossensores para adulterantes em

alimentos^{4,33} e também para a detecção de diferentes agentes patogênicos como *Escherichia coli*³⁴ e *Salmonella*³⁵.

2.3.1 Síntese das nanopartículas

Para obter nanopartículas utilizam-se, de forma geral, dois métodos de síntese: *bottom-up* (baixo-para-cima), em que a síntese ocorre a partir de átomos ou moléculas individuais e o método *top-down* (cima-para-baixo), que envolve quebra de um material na forma *bulk* até que se atinja o tamanho desejado (Figura 6).^{24,36}

O método *bottom-up*, é o que ocorre por processos químicos, a partir da produção de nanoestruturas, que podem ser planejadas de forma a ter características especiais. Como vantagem, obtém-se nanoestruturas com menos defeitos e composição química mais homogênea. A utilização de um agente de revestimento é necessária para evitar a agregação e precipitação das nanopartículas em dispersão.^{24,37}

No método *top-down* as estruturas em escala nanométrica são criadas progressivamente por processos físicos a partir de materiais em escala macroscópica. Pode ser feita por moagem em moinho de bolas, incidência de laser e tem como vantagem, poder sintetizar nanopartículas em curto espaço de tempo.³⁷

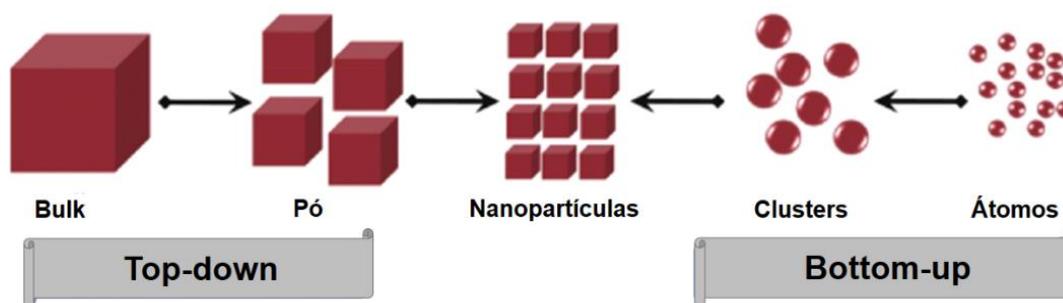


Figura 6. Métodos para síntese de nanopartículas: Top-down e Bottom-up. Adaptado da referência 24.

2.3.2 Síntese química (bottom up)

No processo de formação das nanopartículas, há a influência de dois fatores: controle termodinâmico e cinético. De acordo com a termodinâmica, o processo de síntese consiste na

nucleação e crescimento, enquanto na abordagem cinética, a formação de nanopartículas ocorre através da quantidade de precursores disponíveis para o crescimento.³⁸

A nucleação é uma etapa essencial na formação das nanopartículas, pois é a partir desta que ocorre o processo de cristalização e crescimento das partículas nucleadas. Como pode ser visto na Figura 7, no processo de formação de nanopartículas de ouro com NaBH_4 , primeiramente, os íons AuCl_4^- são reduzidos à ouro atômico (Au^0), levando ao grau de supersaturação, onde a concentração do soluto na reação é superior a concentração de saturação. Devido às colisões dos átomos, ocorrem as formações dos núcleos, dando início à etapa de nucleação. Assim, as espécies reduzidas começam a se agregar, formando *clusters* e iniciando o processo de crescimento. As etapas de redução e nucleação ocorrem rapidamente, enquanto que a etapa determinante é a de crescimento.^{39,40}

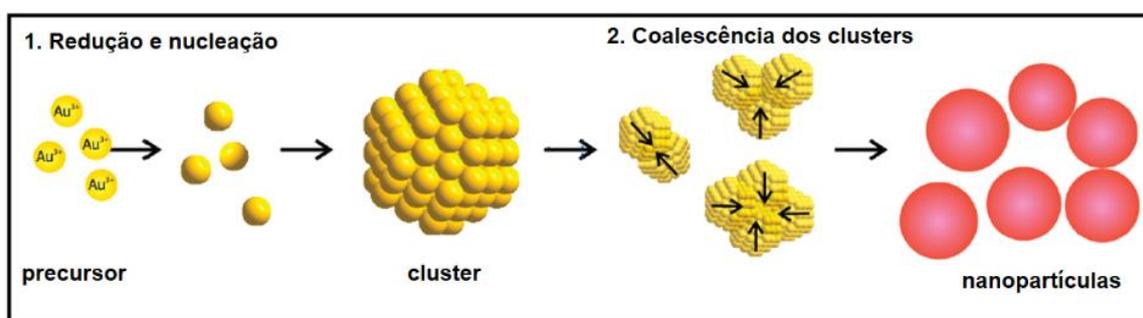


Figura 7. Processo de formação de nanopartículas de ouro por redução com NaBH_4 . Adaptado da referência 39.

Ainda que exista controle dos processos de nucleação e crescimento, deve-se observar também a estabilização das partículas, uma vez que quando dissolvidas livremente em solução, a aglomeração e o crescimento de nanopartículas metálicas são termodinamicamente favorecidas. Essa aglomeração tem o objetivo de diminuir a energia total do sistema, porém, conduz à perda das propriedades das nanopartículas (Figura 8).⁴⁰

Para que ocorra estabilização das nanopartículas é preciso uma camada protetora na sua superfície, podendo esta ser feita por dois meios⁴¹: através da estabilização eletrostática, utilizando-se compostos iônicos, que formam uma dupla camada na superfície da nanopartícula (Figura 8a) e/ou através da estabilização estérica, onde há adsorção de macromoléculas, como polímeros ou surfactantes, que, através do impedimento estérico, evitam a aproximação e agregação das nanopartículas (Figura 8b).³⁸

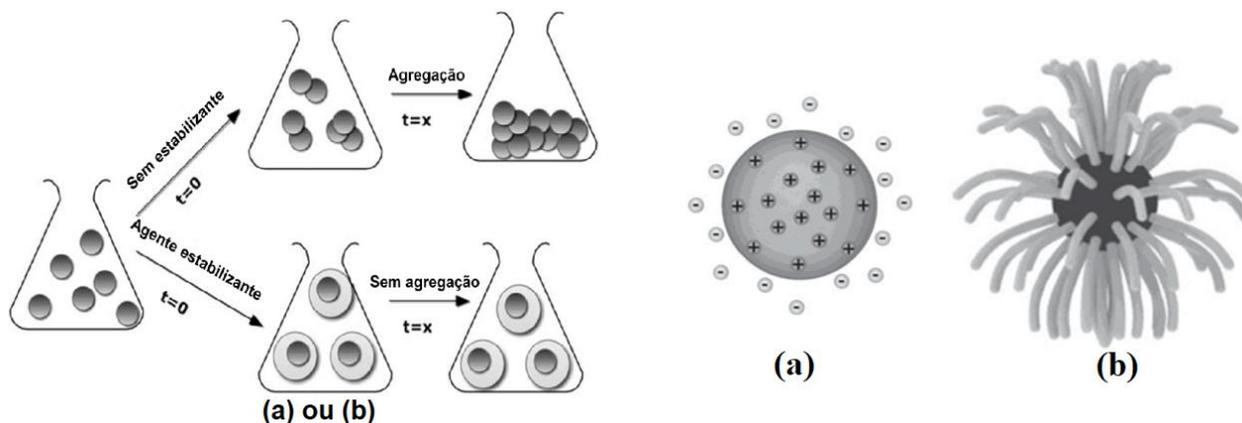


Figura 8. Nanopartículas na ausência e na presença de agentes estabilizantes.⁴⁰
 (a) Estabilização eletrostática; (b) Estabilização estérea.⁴²

2.3.2.1 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS)

O organossilano 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS), possui em sua estrutura um grupo orgânico reativo (NH_2) e um grupo inorgânico (silicato de alquila), Figura 9.⁴² Os grupos metoxi ($-\text{OCH}_3$) da estrutura podem ser facilmente hidrolisados formando grupos silanóis ($-\text{SiOH}$). Estes grupos podem formar ligações covalentes com matrizes que também contém grupos silanóis na superfície, como sílica. Devido a esta propriedade este organossilano é considerado um bom agente de adesão⁴³ e modificador de superfície⁴⁴. Adicionalmente, em meio aquoso, este composto tem facilidade de se reticular formando uma estrutura polimérica⁴⁵. Também foi relatado o seu uso como estabilizador de nanopartículas metálicas. Em meio aquoso ácido^{46,47,48}, a estabilização pode ocorrer através de um mecanismo eletrostático (devido aos grupos NH_2 protonados) e também por um mecanismo estéreo (devido à sua estrutura polimérica). Além disso, como relatado em estudos anteriores, materiais contendo grupos amino protonados podem exibir atividade antimicrobiana.⁴⁹ Assim, o APTMS torna-se um composto interessante pois ajuda na estabilização de nanopartículas de ouro, ajuda na formação de filmes e também apresenta propriedades antibacterianas.

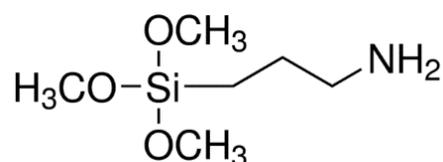


Figura 9. Estrutura do 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS).

2.4 QUITOSANA

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, atrás da celulose. É o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos e também está presente nas paredes celulares de alguns fungos.¹⁰ A quitina e a celulose possuem semelhança funcional, apresentando baixa solubilidade e baixa reatividade química, e semelhança estrutural, como mostra a Figura 10. Devido à essas propriedades, a quitina em sua forma natural não é a mais utilizada.^{1,50}

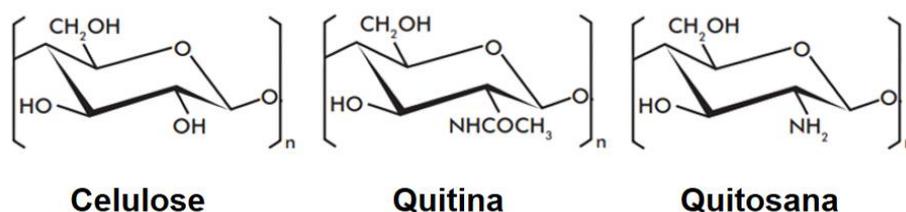


Figura 10. Estrutura química da celulose, quitina e quitosana.⁵⁰

A partir da desacetilação da quitina, obtém-se a quitosana, um polímero que possui grupos amino livres (conversão maior que 50%). Conforme o grau médio de desacetilação, podem-se obter quitosanas com diferentes propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade.¹¹ O processo de desacetilação raramente é completo, pois com o aumento do grau de desacetilação, aumenta a possibilidade de degradação do polímero, portanto, a maioria dos produtos comerciais são copolímeros de unidades repetidas de quitosana e quitina.^{11,51}

A quitosana, além de ser um material de baixo custo, apresenta interessantes propriedades como: biocompatibilidade; biodegradabilidade; não-toxicidade; formação de filmes, fibras, géis e complexação de metais.^{10,11} Em razão de suas propriedades, ela vem sendo utilizada na indústria alimentícia^{15,52}, biofarmacêutica^{53,54}, de cosméticos^{55,56} e tratamento de água^{57,58}.

2.4.1 Complexos metálicos

Estabilizar nanopartículas metálicas com ligantes orgânicos faz com que estas se tornem estáveis. Assim, o uso da quitosana se torna bastante interessante para a formação de

complexos metálicos, pois pode atuar tanto como agente redutor e como agente estabilizante de nanopartículas metálicas.^{2,53}

A ligação do metal ao grupo amino da quitosana pode ocorrer por quelação ou por atração eletrostática. A partir da solubilização desse biopolímero em meio ácido, ocorre protonação dos grupos amino ($-NH_2$), que possibilita a estabilização eletrostática das nanopartículas (Figura 11).¹² Ácido acético e ácido fórmico são os mais usados para solubilização em meio ácido ($pH < 6,5$) para que ocorra hidratação com mais facilidade. Para valores de pH acima de 6,5, as aminas desprotonam-se, tornando o polímero insolúvel em meio aquoso.^{1,10} Através de modificações químicas na estrutura da quitosana, como carboximetilação, quaternização e alquilação, é possível melhorar sua solubilidade para uso em pH neutro.^{59,60}

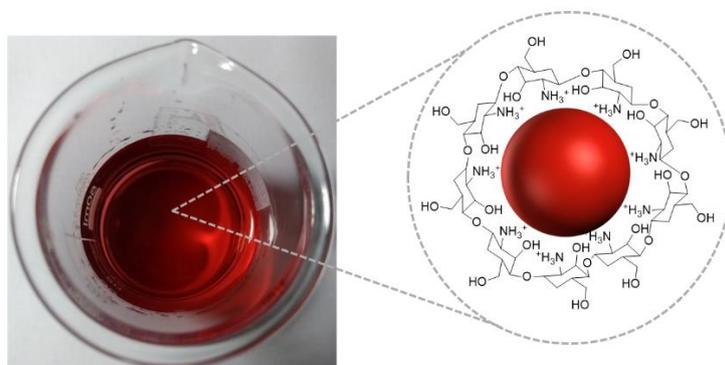


Figura 11. Dispersão de nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana.

2.4.2 Filmes obtidos pela técnica *drop-casting*

Devido à propriedade de formar filmes, a quitosana tem sido empregada em superfícies ativas, na forma de membranas suportadas, para interação com agrotóxicos^{61,62} e em embalagens alimentícias¹⁵. Na presença de nanopartículas de ouro, filmes de quitosana têm sido empregados em sensores eletroquímicos^{13,14}.

Alguns métodos de deposição estão mostrados na Figura 12. Filmes podem ser obtidos a partir de métodos como, *chemical bath*, *spin-coating*, *dip-coating* e *drop-casting*.⁶³

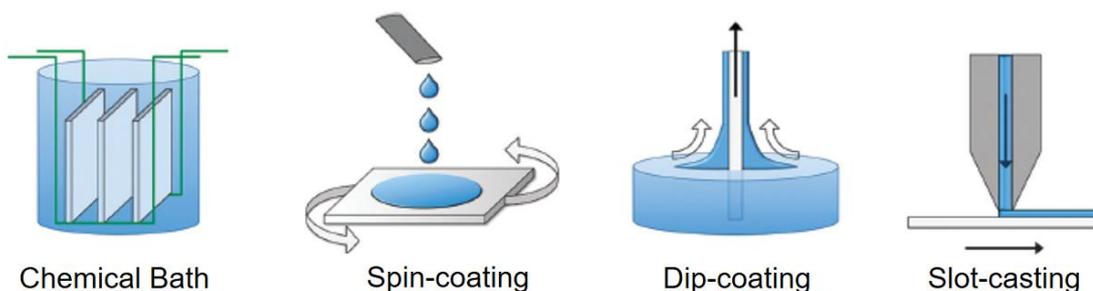


Figura 12. Métodos de deposição de filmes.⁶³

O método *drop-casting* é ideal quando o substrato utilizado apresenta tamanho reduzido. Este método envolve adicionar uma quantidade conhecida de um líquido contendo o material desejado na superfície de um substrato e posterior evaporação do solvente, como pode ser visto na Figura 13.¹⁶ Como vantagem, essa metodologia não requer equipamentos ou procedimentos sofisticados.^{64,65} Uma desvantagem é que mesmo sobre condições ideais, diferenças na taxa de evaporação sobre o substrato ou flutuações nas concentrações podem levar à variações na espessura do filme⁶⁵, devido a um gradiente de tensão superficial, que arrasta as partículas ao longo da linha de contato, onde o solvente evapora. Esse fenômeno é conhecido como “mancha de café”.^{66,67}

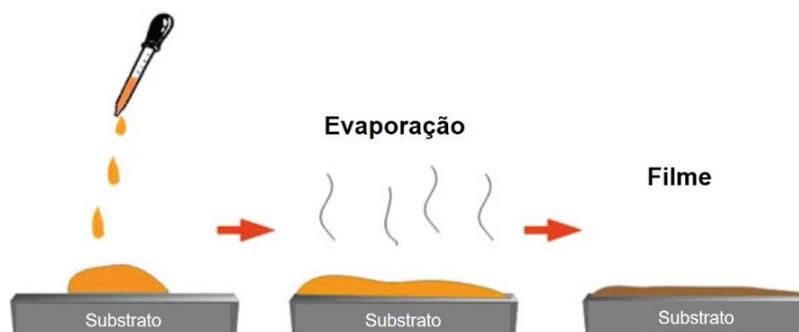


Figura 13. Método de *drop-casting*.⁶⁵

2.4.3 Atividade antimicrobiana

Na indústria alimentícia, o uso de embalagens é fundamental para prolongar a validade dos alimentos e preservá-los frescos¹⁷, assim uma importante propriedade ao utilizar filmes para embalagens alimentícias é a atividade antimicrobiana. Estes filmes geralmente são investigados contra uma ampla gama de microorganismos, como bactérias e fungos.^{15,17,52}

A eficácia de filmes de quitosana^{15,68} e filmes de nanopartículas de ouro⁶⁹, contra bactérias gram-positivas e gram-negativas tem sido reportada, assim como a eficácia de

materiais contendo estes dois componentes juntos^{70,71}. Embora o exato mecanismo de ação antibacteriana da quitosana ainda não seja completamente compreendido, no geral, é devido às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana celular da bactéria. O modelo mais aceitável é o de interação eletrostática das cargas positivas, grupos amino protonados, das moléculas de quitosana com as cargas negativas da membrana celular. Essa interação leva ao vazamento de constituintes protéicos e outros compostos intracelulares (Figura 14). Assim, supõe-se que quanto maior for o número de aminas catiônicas, maior será a atividade antimicrobiana.^{52,72,73}

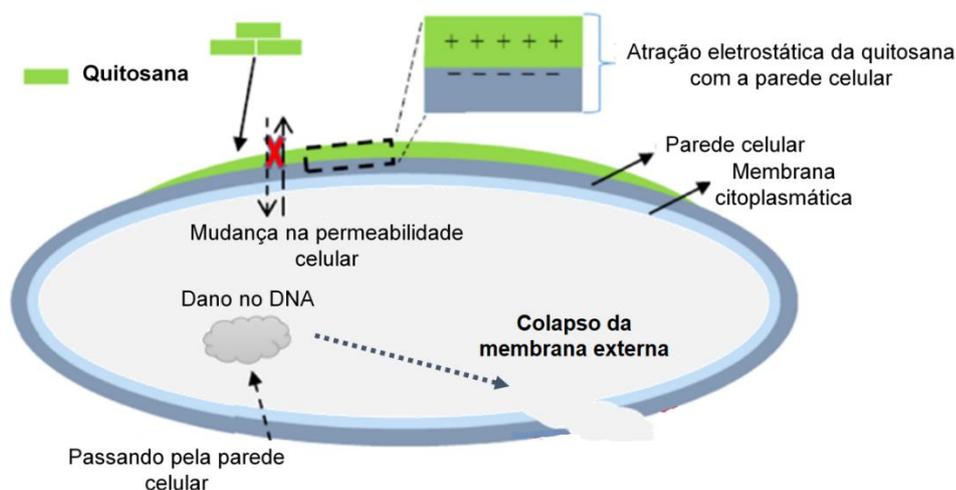


Figura 14. Representação da ação antimicrobiana da quitosana. Adaptado da referência 73.

Para nanopartículas de ouro, o mecanismo ocorre de forma semelhante à quitosana. Primeiramente as nanopartículas se ligam à superfície da célula, causando alterações estruturais e danos. São geradas perturbações das funções vitais das células, como a permeabilidade, levando à depressões e lacunas, que inibem a atividade das enzimas da cadeia respiratória e levam à morte celular.^{74,75,76}

As bactérias do gênero *Salmonella*, são propagadas geralmente em alimentos crus/mal cozidos ou manipulação incorreta. São bastonetes gram-negativos, não formadores de esporos e se dividem em 2 espécies: *S. enterica* e *S. bongori*.⁷⁷ A *S. enterica* agrupa aquelas bactérias responsáveis por diversas infecções (salmonelose) em humanos e em animais de sangue quente.¹⁸ Embora existam mais de 2000 sorovares da *S. enterica*, os sorovares Enteritidis e Typhimurium são os maiores causadores de infecções alimentares.⁷⁷ Neste trabalho a bactéria *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium foi a escolhida para ser estudada em filmes de quitosana contendo nanopartículas de ouro.

2.5 CATÁLISE

Por muitos anos, complexos à base de ouro não eram utilizados para catálise, pois pela inércia do ouro no *bulk*, este não adsorvia moléculas como hidrogênio e oxigênio em sua superfície e dessa forma não se mostravam promissores. Atualmente, já se sabe que ouro, como material nanoparticulado e diâmetro menor que 10 nm, possui propriedades ideais para ser aplicado como catalisador em reações catalíticas.^{5,19,20}

Nanopartículas metálicas estabilizadas por quitosana tem sido aplicadas como catalisadores heterogêneos em algumas reações como hidrogenação⁷⁸ e redução de *p*-nitrofenol⁷⁹. Enquanto nanopartículas de ouro suportadas vêm sendo usadas como catalisadores na oxidação de CO⁸⁰ e álcool⁸¹, e hidrogenação de nitrocompostos⁸², dienos conjugados e alcenos⁸³.

A catálise pode ser chamada enzimática, homogênea ou heterogênea, dependendo do estado físico das substâncias envolvidas e a natureza do catalisador. O papel do catalisador é interagir com os reagentes, produtos ou intermediários, diminuindo a energia de ativação e promovendo mecanismos de reação alternativos com o objetivo de aumentar a velocidade da reação para obter determinados produtos (Figura 15).⁸⁴ Quando os componentes estão na mesma fase, a catálise é dita homogênea, quando os componentes estão em fases diferentes a catálise é heterogênea; ao utilizar macromoléculas biológicas como enzimas, esta é dita enzimática.^{84,85} As nanopartículas metálicas apresentam características de catálise homogênea, no nível macroscópico, e heterogênea, ao nível nanoscópico.⁸⁶

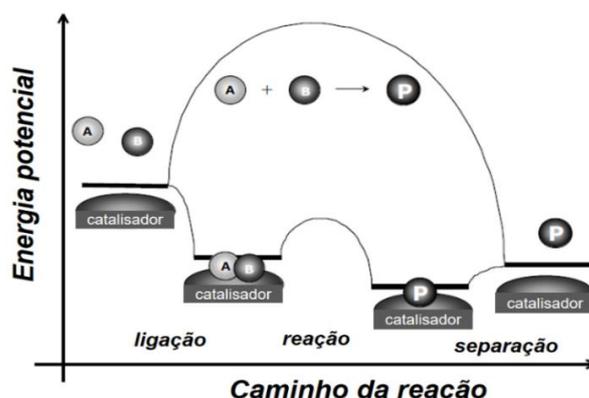


Figura 15. Diagrama de energia potencial para uma reação catalítica heterogênea.⁸⁴

2.5.1 Hidrogenação seletiva de compostos orgânicos insaturados

Entre as diversas reações catalíticas para compostos orgânicos, a hidrogenação catalítica vem sendo aplicada em diversos campos. É uma reação importante na química fina, na indústria de polímeros, alimentícios e agroquímicos.^{87,88,89} A reação foi descoberta no início do século XIX, pelo químico francês Paul Sabatier, e seus estudos envolvem hidrogenação e adsorção de gases em superfícies metálicas. Nesta se utiliza: o substrato, o redutor (composto contendo hidrogênio) e o catalisador. As reações de hidrogenação são reações catalisadas heterogeneamente por metais e o mecanismo envolve quimiossorção dos reagentes na superfície do catalisador. A quimiossorção é um tipo de adsorção onde as espécies adsorvidas formam ligações covalentes com o metal.^{85,87,88}

A hidrogenação seletiva de cetonas e aldeídos, que contenham ligações de grupos conjugados C=C e C=O são reações importantes industrialmente.^{90,91} A hidrogenação seletiva de 2-ciclohexenona se mostra como uma etapa importante na obtenção de 2-ciclohexanona, utilizada para a fabricação do nylon-6 e resinas de poliamida.^{92,93}

Catalisadores de nanopartículas de ouro têm mostrado habilidade em hidrogenar cataliticamente C=O de compostos carbonílicos α,β -insaturados, produzindo álcoois alílicos de alto valor agregado em compostos como acroleína⁹⁴, crotonaldeído²², benzalacetona⁹⁰ e cinamaldeído²¹. Particularmente nestas reações, os álcoois insaturados são obtidos por adição-1,2 do hidrogênio no C=O através dos modos de adsorção via η^1_{O} (*end-on*) e η^2_{CO} (π ou di- σ) (Figura 16: A, B, e C).²³

Já a hidrogenação quimiosseletiva resultando em compostos carbonílicos saturados envolvendo catalisadores de ouro é pouco reportada e geralmente é obtida através de adição-3,4 ou adição-1,4.^{90,95,96} Nesses casos, o composto adsorve na superfície metálica através de ligações dupla etilênicas via modos de adsorção η^2_{CC} (π ou di- σ) (Figura 16: D e E) ou pelo sistema C=C-C=O via η^3 ($\eta^2_{\text{CC}}+\eta^1_{\text{O}}$) ou η^4 ($\eta^2_{\text{CC}}+\eta^2_{\text{CO}}$: di- π ou η^4_{CCCO}) (Figura 16: F, G, e H). No segundo caso, o fator cinético leva à hidrogenação da ligação C=C (adição-3,4) mais facilmente e rapidamente do que por C=O (adição-1,2). Ainda, a adição-1,4 do hidrogênio também melhora a seletividade para os produtos carbonílicos saturados, uma vez que um composto enólico é formado e isomerizado à mesma espécie do que aquela formada por adição-3,4.²³

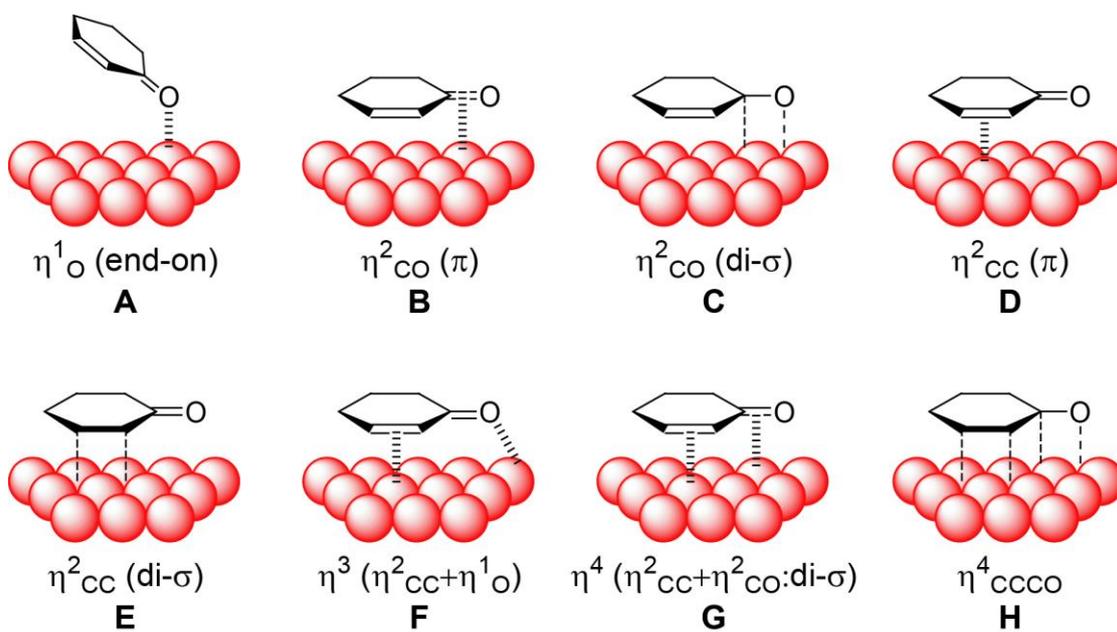


Figura 16. Modos de adsorção do composto 2-ciclohexenona na superfície de nanopartículas metálicas.²³

3. OBJETIVOS

Desenvolver materiais híbridos nanoestruturados, contendo nanopartículas de ouro e quitosana, que sejam biocompatíveis e que possam ser aplicados na obtenção de filmes com atividade antimicrobiana e como catalisador heterogêneo em reações de hidrogenação catalítica de compostos orgânicos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas de ouro em meio aquoso, empregando como agente estabilizante o biopolímero quitosana;
- Formar filmes, pela técnica de *drop-casting*, após adição do organosilano 3-aminopropiltrimetoxisilano e determinar sua atividade antibacteriana contra a bactéria gram-negativa *Salmonella Typhimurium*;
- Desenvolver nanocatalisador de ouro suportado em quitosana e aplicá-lo em reações de hidrogenação catalítica de compostos orgânicos contendo grupos C=C e C=O conjugados e isolados.
- Investigar os modos de adsorção destes compostos na superfície de nanopartículas de ouro suportadas por quitosana.

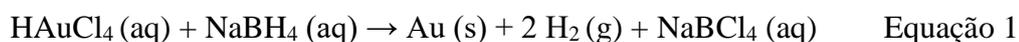
4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS

Neste trabalho foram usados os seguintes reagentes: quitosana de baixo peso molecular (Sigma-Aldrich, grau de desacetilação de 75-85%), ácido acético (Merck), borohidreto de sódio (Vetec), gás hidrogênio (White Martins), HAuCl₄ (obtido através da dissolução de ouro em solução de água régia), ácido clorídrico (Merck), Ácido fórmico (Neon), 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS, 97%, Sigma-Aldrich), lâminas de vidro para microscopia (Precision Glass Line, 26x76 mm), caldo infusão BHI (Himedia, Indiavax), ágar Xilose Lisina Desoxicolado (XLD; Oxoid, United Kingdom).

4.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

Nanopartículas de ouro foram obtidas utilizando como precursor metálico HAuCl₄ e como agente redutor NaBH₄, de acordo com a Equação 1. Como agente estabilizante, foi utilizada quitosana, dissolvida em ácido orgânico.



Para os filmes, a dispersão de nanopartículas de ouro foi preparada dissolvendo quitosana (75 mg) em ácido fórmico 10% (v/v), sob agitação mecânica por 1 hora. Para uso como catalisador heterogêneo, a dispersão de nanopartículas de ouro foi preparada dissolvendo quitosana (150 mg) em ácido acético 50% (v/v) sob agitação mecânica, a 50 °C por 4 h e temperatura ambiente até 24 h.

Em ambos os casos, após dissolução da quitosana, foram adicionados 1 mL de HAuCl₄ 5×10⁻³ mol.L⁻¹ e 10 mL de NaBH₄ 0,02 mol.L⁻¹, recentemente preparado. Neste trabalho, as dispersões de nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana foram denominadas de Ch/AuNP.

4.3 FILMES CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE OURO

4.3.1 Tratamento das lâminas de vidro: limpeza e ativação dos grupos silanóis

Para os filmes, utilizou-se como substrato, lâminas de vidro para microscopia, as quais foram cortadas (1,3 cm²), limpas com NaOH 1 mol.L⁻¹, em ultrassom (Unique, modelo USC-800A), por 2 h a 50 °C. Após, foram lavadas com água destilada e deixadas em ultrassom, na presença de HCl 1 mol.L⁻¹, por 1 h. Na sequência, as lâminas foram lavadas com água destilada, secas em estufa e acondicionadas em placas de Petri para posterior preparo dos filmes.

4.3.2 Preparo dos filmes por *drop-casting*

Filmes finos foram obtidos empregando a técnica de deposição *drop-casting*, de forma que, na dispersão de Ch/AuNP foi adicionado 1 mL de APTMS (5,9 mmol). Este sistema foi aqui denominado de Ch/AuNP/APTMS. As deposições foram feitas adicionando-se 10, 25, 50 e 100 µL de Ch/AuNP/APTMS diretamente na lâmina tratada. As alíquotas depositadas correspondem a $1,6 \times 10^{-6}$; $3,9 \times 10^{-6}$; $7,8 \times 10^{-6}$ e $1,6 \times 10^{-5}$ mmol de Au, respectivamente. Após, as lâminas ficaram em estufa a 30 °C por 24 h e 70 °C por 1 h. Filmes obtidos com este procedimento foram denominados como Ch/AuNP/AP. Também foram preparados filmes “brancos”, contendo tudo menos as nanopartículas de ouro.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

4.4.1 Espectroscopia na região do UV-Vis das dispersões

A presença de nanopartículas de ouro nas dispersões Ch/AuNP e Ch/AuNP/APTMS foi primeiramente confirmada por espectroscopia eletrônica no ultravioleta-visível (UV-Vis), utilizando um espectrofotômetro UV-160 1PC Shimadzu. Água destilada foi usada como referência e a análise foi realizada entre comprimentos de onda de 400 a 700 nm.

4.4.2 Espectroscopia na região do UV-Vis dos filmes

Para os filmes, Ch/AuNP/AP, foram primeiramente obtidos espectros de transmitância e refletância total. Utilizou-se um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 5000 com janela espectral de 400 a 700 nm. Para calcular a porcentagem de luz absorvida pelos filmes com e sem nanopartículas de ouro, utilizou-se a seguinte expressão:

$$\% \text{ Abs} = 100 - \%T - \%R \quad \text{Equação 2}$$

Já a absorbância calculada como mostra a Equação 3 é resultante apenas das nanopartículas de ouro ($\% \Delta \text{Abs}_{\text{AuNP}}$):

$$\% \Delta \text{Abs}_{\text{AuNP}} = \% \text{Abs}_{\text{amostra}} - \% \text{Abs}_{\text{branco}} \quad \text{Equação 3}$$

4.4.3 Perfilometria

A rugosidade e espessura dos filmes Ch/AuNP/AP foi analisada por perfilometria óptica utilizando como substrato, lâminas de silício. As análises foram realizadas em um perfilômetro óptico Ambios Technology, modelo XP2, do Grupo de Laser & Óptica, no Instituto de Física da UFRGS.

4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)

As micrografias do filme Ch/AuNP/AP com 100 μL foram obtidas a partir de um microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo Auriga, do Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS. As lâminas, contendo os filmes, foram previamente fixadas com fita de carbono em *stubs* de alumínio. As imagens foram obtidas com tensão de aceleração de 0,7 kV, utilizando detector de elétrons secundários.

4.5 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FILMES

Para medir a atividade antimicrobiana dos filmes utilizou-se a bactéria *Salmonella* Typhimurium. Para esse ensaio, primeiramente foi feito o preparo do inóculo, em que a cepa foi cultivada em solução de caldo BHI (Brain Heart Infusion) a 37 °C por 24 h. Após, a

suspensão bacteriana foi ajustada para 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹), diluindo-se a solução inicial em caldo BHI até absorvância ser igual a 0,5 para comprimento de onda de 630 nm em um espectrofotômetro Ultrospec 3100 Pro (Amersham Biosciences, United Kingdom). Essa suspensão foi então diluída até 10^6 UFC e após, 100 μ L desta solução foi aplicada aos filmes Ch/AuNP/AP. Foi feita a incubação por 24 h a 37 °C. Após, cada lâmina foi imersa em um tubo Falcon (15 mL) contendo 10 mL de água peptonada e colocada em ultrassom por 10 minutos. Ao final do tempo de sonificação, 100 μ L desta solução foi transferida para *ependorf*. Na sequência, foi feita uma diluição em série (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}), seguida pela agitação vigorosa e transferência de 20 μ L de cada diluição, em duplicatas, para as placas de Petri contendo o meio para crescimento XLD. Esses ensaios foram feitos em duplicatas. A quantificação do número de UFC foi feita pela contagem das colônias de bactérias em cada uma das duplicatas da placa de Petri.

4.6 CATALISADOR HETEROGÊNEO

Para a aplicação em catálise heterogênea, a dispersão aquosa de nanopartículas de ouro (denominada Ch/AuNP, Figura 17a) foi seca em linha de vácuo a 40 °C, obtendo-se um material sólido tipo “plástico”, Figura 17b, que após trituração em gral de porcelana com nitrogênio líquido, resultou em um sólido granulométrico, Figura 17c. Esse material, contendo nanopartículas de ouro suportadas em quitosana, foi denominado AuNP/Quitosana.



Figura 17. a) dispersão aquosa, Ch/AuNP; b) filme, após secagem da dispersão Ch/AuNP na linha de vácuo; c) pó, após moagem com N₂ líquido, AuNP/Quitosana.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DO CATALISADOR

4.7.1 Espectroscopia na região do UV-Vis

A presença de nanopartículas de ouro na dispersão aquosa de Ch/AuNP foi confirmada por espectroscopia eletrônica no ultravioleta-visível (UV-Vis), utilizando espectrofotômetro UV-160 1PC Shimadzu. Água destilada foi usada como referência e a análise foi realizada entre comprimentos de onda de 400 e 700 nm. Já para o sólido resultante da secagem desta dispersão, a referência usada foi o ar.

4.7.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A análise de TEM foi utilizada para determinar a forma e o tamanho médio das nanopartículas de ouro na dispersão aquosa e no sólido. Para a dispersão aquosa, foram colocadas 2 gotas da dispersão diretamente na *grid* de cobre revestida com carbono. Já a amostra sólida (5 mg) foi preparada dispersando-a em isopropanol (1,5 mL) e banho ultrassônico por 30 min; subsequentemente, 2 gotas da fase dispersa foram colocadas diretamente na *grid* de cobre revestida com carbono. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico JEOL JEM-1220, operando a 80 kV, do Centro de Microscopia da UFRGS. O programa *Quantikov* foi usado para determinar a distribuição dos tamanhos das nanopartículas de ouro.

4.7.3 Isotermas de Adsorção e Dessorção de N₂

As isotermas de adsorção-dessorção de N₂ foram determinadas na temperatura de ebulição de N₂ líquido. O equipamento utilizado foi o Tristar II 3020 Kr Micromeritics. As amostras foram primeiramente degaseificadas a 120 °C, sob vácuo, por 12 horas. As áreas superficiais específicas foram determinadas por BET (Brunauer, Emmett and Teller) pela técnica de multipontos.

4.7.4 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS)

As medidas de XPS foram realizadas utilizando um equipamento Kratos AXIS Ultra DLD (GSK Carbon Neutral Laboratory for Sustainable Chemistry - University of Nottingham, UK). Os espectros foram coletados utilizando energia de passagem de 80 eV e passo em energia de 0,5 eV. Dados de alta resolução nos picos de fotoelétrons foram coletados na energia de passagem de 20 eV. Os dados foram processados com o software CASAXPS (Versão 2.3.17). Os dados de alta resolução foram corrigidos para o sinal de referência C-H / C-C a 284,8 eV.

4.8 TESTES CATALÍTICOS

A amostra sólida, AuNP/Quitosana, foi aplicada como catalisador heterogêneo em reações de hidrogenação de compostos carbonílicos α,β -insaturados, utilizando NaBH_4 e H_2 como agentes redutores. As reações que utilizaram NaBH_4 como agente redutor (hidrogenação da 2-ciclohexenona) foram realizadas em erlenmeyers de 50 mL à temperatura ambiente. De forma geral, adicionou-se primeiramente o catalisador AuNP/Quitosana (0,6 $\mu\text{mol Au}$), o composto carbonílico α,β -insaturado (substrato/ Au =833) e 5 mL de água como solvente. Por fim, adicionou-se 5 mmol de NaBH_4 dissolvido em 5 mL de água. Este sistema foi mantido sob agitação e alíquotas de 100 μL foram removidas durante as reações.

Quando o agente redutor foi H_2 , as reações de hidrogenação foram realizadas em um reator Fisher-Porter (Parr Multi-reactor 4590, 50 mL). Este reator foi conectado a um cilindro de hidrogênio, seguido da adição do catalisador AuNP/Quitosana (0,6 $\mu\text{mol Au}$), do substrato (compostos carbonílicos α,β -insaturados) e 10 mL de água. O reator foi pressurizado sob 10 ou 30 bar de H_2 e aquecido a temperaturas de 100, 150 ou 200°C. Alíquotas de 100 μL foram removidas durante as reações e após o tempo de reação o reator foi resfriado a temperatura ambiente e despressurizado.

A conversão e seletividade foram determinadas por Cromatografia Gasosa. O cromatógrafo utilizado foi da marca Agilent Technologies GC System 6820, equipado com uma coluna DB-17 (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm); injetor e detector (FID) com temperatura de 260 °C; N_2 como carreador (1 mL.min⁻¹); pressão da coluna, 10 psi; programa de temperatura: 40 °C (10 min) a 250 °C com taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. *Turnover frequency* (TOF) foi calculada como mol de substrato convertido/(mol Au \times minuto) da inclinação das curvas de *Turnover number* (TON) vs tempo, para baixas conversões de substrato.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 FILMES COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTENDO QUITOSANA E NANOPARTÍCULAS DE OURO

Neste trabalho foram desenvolvidos filmes contendo nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana, na presença de um organossilano (APTMS), que teve como objetivo melhorar a adesão do filme na lâmina de vidro, devido às interações entre os grupos silanóis do vidro e do organossilano.⁹⁷ A escolha da técnica *drop-casting* foi feita em função do controle da quantidade de nanopartículas de ouro adicionada ao filme.

Serão apresentados resultados de caracterização das dispersões aquosas e dos filmes contendo nanopartículas de ouro, bem como, a atividade antimicrobiana dos filmes, contra a bactéria *Salmonella Typhimurium*.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

As dispersões aquosas de nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana, Ch/AuNP e Ch/AuNP/APTMS, foram analisadas por UV-Vis e os espectros de absorção são apresentados na Figura 18.

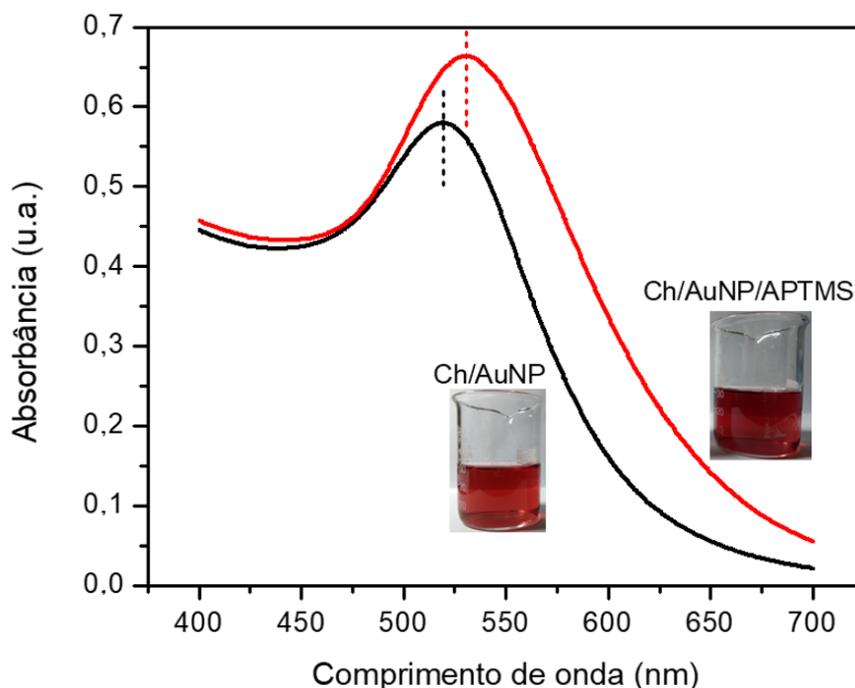


Figura 18. Espectros de absorção, na região do visível, das dispersões aquosas Ch/AuNP e Ch/AuNP/APTMS.

Nos espectros da Figura 18, pode-se observar que as dispersões apresentam coloração avermelhada, com máximos de absorção em 519 nm (Ch/AuNP) e 531 nm (Ch/AuNP/APTMS). A coloração, bem como os perfis de absorção na região do visível, indicam a formação de nanopartículas de ouro esféricas.^{1,2} Pode-se observar um deslocamento da banda de absorção para maiores comprimentos de onda, após a adição de APTMS, que indica uma possível aglomeração das nanopartículas.

Filmes, obtidos por *drop-casting*, foram preparados conforme descrito no item 4.3.2. As deposições foram feitas com diferentes volumes (10, 25, 50 e 100 μL) da dispersão aquosa Ch/AuNP/APTMS. As variações de volume objetivaram avaliar a atividade antibacteriana com diferentes quantidades de nanopartículas de ouro. A Figura 19 mostra imagens dos filmes Ch/AuNP/AP formados a partir de deposições contendo 10, 25, 50 e 100 μL da dispersão aquosa Ch/AuNP/APTMS.

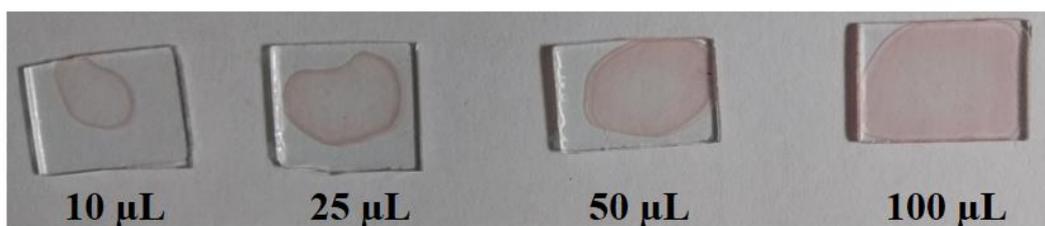


Figura 19. Imagens dos filmes Ch/AuNP/AP formados a partir de deposições contendo 10, 25, 50 e 100 μL da dispersão aquosa Ch/AuNP/APTMS.

A partir das imagens da Figura 19, observa-se filmes com coloração avermelhada decorrentes da evaporação de diferentes volumes de Ch/AuNP/APTMS no substrato de vidro plano. Nesses filmes, as bordas são ligeiramente mais escuras do que o centro. Segundo Deegan e colaboradores⁹⁸ esse fenômeno acontece devido a dois fatores: histerese do ângulo de contato e fluxo capilar devido à evaporação. É devido ao fluxo capilar que o conteúdo da gota é levado até a linha de contato, que inicialmente é onde a gota é mais fina e nesta região há uma alta taxa de evaporação, este efeito é conhecido como “mancha de café”. Isso ocorre, principalmente, quando se depositam materiais líquidos pouco voláteis. No presente trabalho, a presença de quitosana na dispersão Ch/AuNP/APTMS aumenta a viscosidade do sistema, produzindo esse efeito.

O filme Ch/AuNP/AP foi analisado por UV-Vis. A Figura 20 mostra o espectro de absorção desse filme com 100 μL da dispersão Ch/AuNP/APTMS.

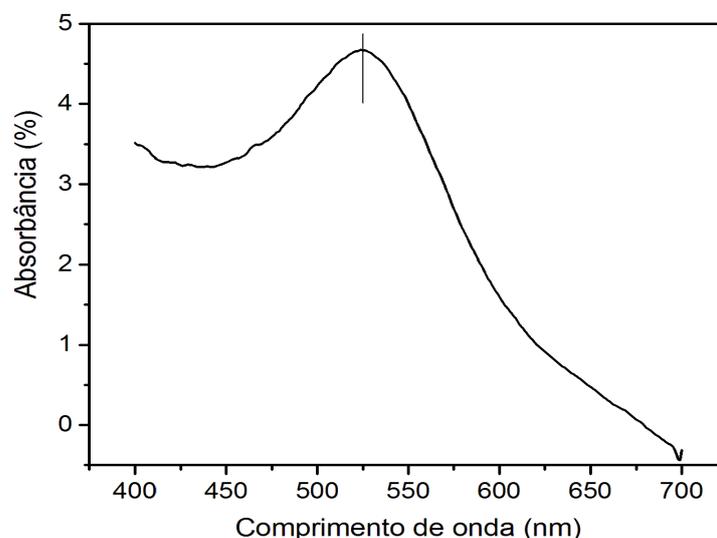


Figura 20. Espectro de absorção na região do visível do filme Ch/AuNP/AP com 100 μL de dispersão Ch/AuNP/APTMS.

A partir da Figura 20, observa-se uma banda com máximo de absorção em 526 nm. Essa banda é um indicativo claro da presença de nanopartículas de ouro nos filmes. Comparando-se esse espectro de absorção com aqueles apresentados para as dispersões aquosas (Figura 18), observa-se que o máximo da banda de absorção do filme apresenta-se ligeiramente deslocado para comprimento de onda menor, que pode ser interpretado considerando os efeitos produzidos pela matriz sólida (espalhamento de luz, índice de refração, etc.).^{99,100}

Os filmes obtidos com diferentes alíquotas foram analisados por perfilometria, sendo que os valores médios de rugosidade e espessura dos filmes estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados de perfilometria para o filme Ch/AuNP/AP, obtidos com diferentes alíquotas de deposição.

Alíquota (μL)	Espessura ($\pm 3 \mu\text{m}$)	Rugosidade média ($\pm 0,03 \mu\text{m}$)
10	33	0,15
25	31	0,18
50	36	0,22
100	46	0,16

A análise perfilométrica permite afirmar que a espessura dos filmes está na ordem de algumas dezenas de microns, sendo que não parece haver uma dependência direta da espessura com a quantidade da alíquota adicionada. Outra informação importante é a sua rugosidade. Para todas as amostras, a rugosidade observada foi menor que 1 % da espessura, revelando que os filmes devem revestir uniformemente a superfície do substrato.

Com o intuito de observar melhor esse revestimento, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura de uma das amostras (alíquota 100 μL). As imagens estão apresentadas na Figura 21.

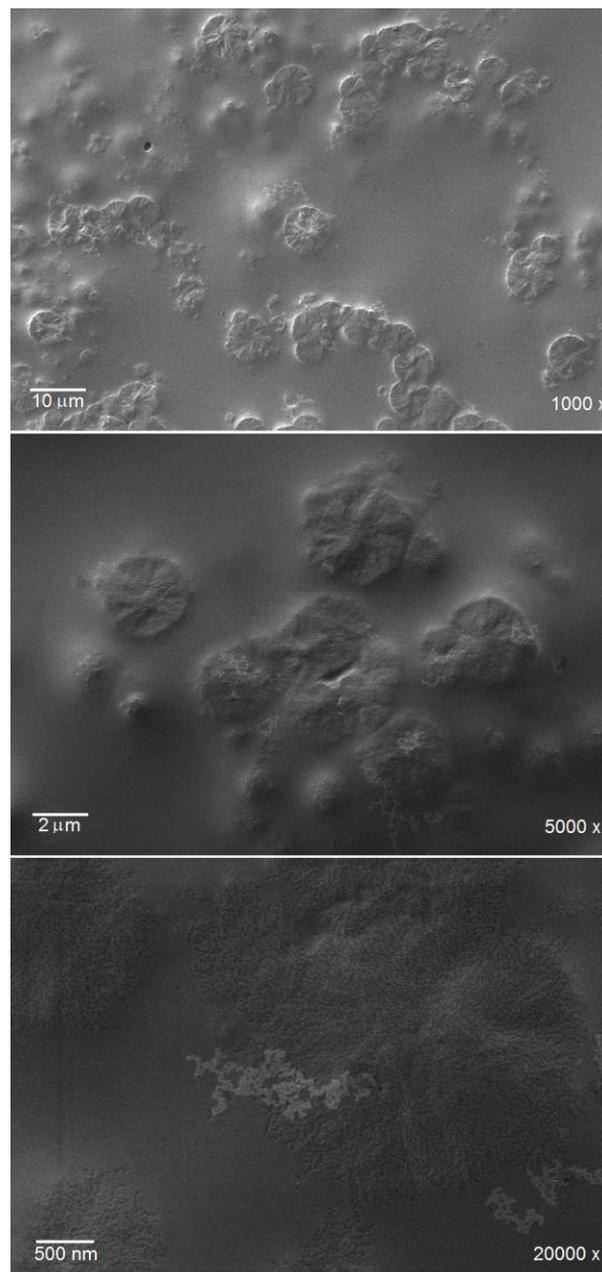


Figura 21. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura do filme Ch/AuNP/AP (adição de 100 μL) obtidas em diferentes magnificações.

Pode-se observar nas imagens da Figura 21 que os filmes revestem de forma homogênea toda a superfície do substrato, no nível micrométrico analisado. Na imagem obtida com maior magnificação é claramente possível observar a presença das nanopartículas de ouro que são identificadas pelo contraste das regiões com maior brilho, devido a maior densidade do metal em relação a porção orgânica. Pode-se observar ainda que as nanopartículas encontram-se aglomeradas, em concordância com os resultados de UV-Vis (Figura 18).

5.3 TESTES ANTIBACTERIANOS

Os filmes Ch/AuNP/AP e seus respectivos brancos foram avaliados contra a bactéria gram-negativa *Salmonella* Typhimurium e os resultados são apresentados na Tabela 2 e na Figura 22. Essa bactéria foi escolhida por ser bastante comum e facilmente encontrada em alimentos como carne de gado, aves, suínos e ovos crus. Além das análises nos filmes, também foram feitas análises em lâminas de vidro tratadas (controle). Por não apresentarem atividade antibacteriana, as lâminas controle resultaram em maiores log UFC/mL para a bactéria *Salmonella*, $6,92 \pm 0,11$.

Tabela 2. Avaliação dos filmes Ch/AuNP/AP e seus brancos contra bactérias do tipo *Salmonella* Typhimurium.

Alíquota (μL)	Log UFC/mL	
	Ch/AuNP/AP	Branco
10	$5,45 \pm 0,41$	$5,39 \pm 0,02$
25	$5,17 \pm 0,06$	$5,11 \pm 0,48$
50	0	$4,39 \pm 0,01$
100	0	0

De acordo com os resultados da Tabela 2 e Figura 22, observa-se que os filmes obtidos com maiores volumes de alíquotas da dispersão Ch/AuNP/APTMS (50 e 100 μL) foram os mais eficientes, visto que não foi observada a presença de colônias de bactéria. Para os filmes brancos, que não contêm nanopartículas de ouro, mas contêm todo conteúdo restante como quitosana e APTMS, parece haver uma tendência de diminuição na contagem de bactérias com o aumento da alíquota. Esse resultado evidencia que os filmes de quitosana apresentam

uma atividade antimicrobiana inerente, conforme já reportado.¹⁵ O filme contendo nanopartículas de ouro formado a partir da alíquota de 50 μL a atividade antimicrobiana foi superior.

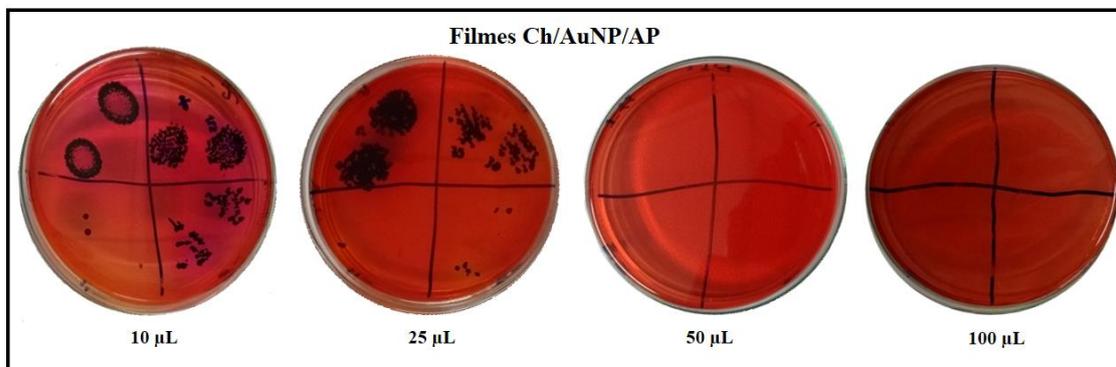


Figura 22. Placas com crescimento de bactéria *Salmonella* a partir dos filmes Ch/AuNP/AP com alíquotas de 10, 25, 50 e 100 μL .

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo foi possível desenvolver filmes contendo nanopartículas de ouro, compactos, bastante homogêneos e com baixa rugosidade. Esses filmes apresentaram atividade antimicrobiana. Adicionalmente, por serem constituídos com biopolímero de quitosana, não são agressivos ao meio ambiente além de apresentarem baixo custo, tornando-os extremamente promissores para serem aplicados tecnologicamente como revestimentos de embalagens de alimentos.

É importante destacar a presença do APTMS nos filmes, visto que este organossilano interage com a quitosana, com as nanopartículas de ouro e com o vidro, proporcionando melhor adesão do filme. Durante os testes, foram utilizadas diferentes quantidades de APTMS, e foi observado que os melhores resultados foram aqueles em que foi adicionado 1 mL da solução de APTMS na dispersão. Também cabe destacar que, além do método *drop-casting* também utilizou-se *dip-coating* para obtenção dos filmes. Porém, devido ao fato de não sabermos a quantidade de nanopartículas de ouro presentes no filme, por *dip-coating*, optou-se pelo método *drop-casting*.

5.5 AuNP/QUITOSANA COMO CATALISADOR HETEROGÊNEO PARA HIDROGENAÇÃO DE COMPOSTOS CONTENDO O GRUPO CONJUGADO C=C-C=O

Neste trabalho foi desenvolvido um catalisador heterogêneo contendo nanopartículas de ouro estabilizadas e suportadas em quitosana. Serão apresentados resultados de caracterização e aplicação deste catalisador em reações de hidrogenação de compostos orgânicos insaturados, bem como o estudo dos modos de adsorção e reatividades das ligações C=C-C=O sobre o catalisador.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DO CATALISADOR AuNP/QUITOSANA

A espectroscopia eletrônica no UV-Vis foi realizada a fim de confirmar a presença de nanopartículas de ouro na dispersão e no sólido. Os espectros são mostrados na Figura 23.

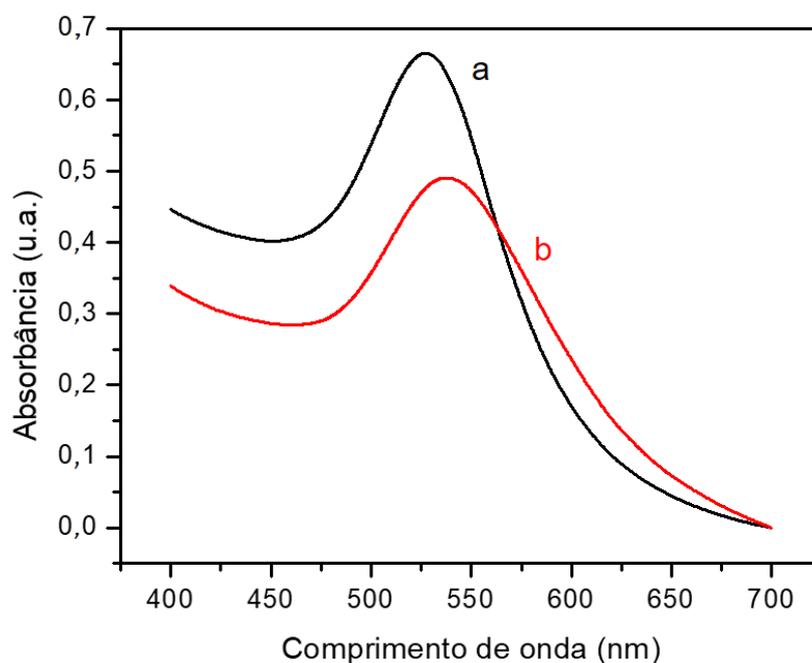


Figura 23. Espectros de absorção na região do UV-Vis da dispersão Ch/AuNP (a) e do sólido AuNP/Quitosana (b).

A dispersão apresentou máximo de absorção em 526 nm, enquanto o sólido apresentou em 539 nm. Os máximos de absorção, devido à ressonância de plasmon de superfície das nanopartículas de ouro, confirmam a presença de nanopartículas esféricas. O deslocamento da

curva b pode ser atribuído a aglomeração das nanopartículas de ouro no sólido⁹⁹ e também à mudança de índice de refração da matriz¹⁰⁰.

Para confirmar que as nanopartículas de ouro apresentam forma esférica foi feita a análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) da dispersão e também da amostra sólida. Estas imagens são mostradas na Figura 24.

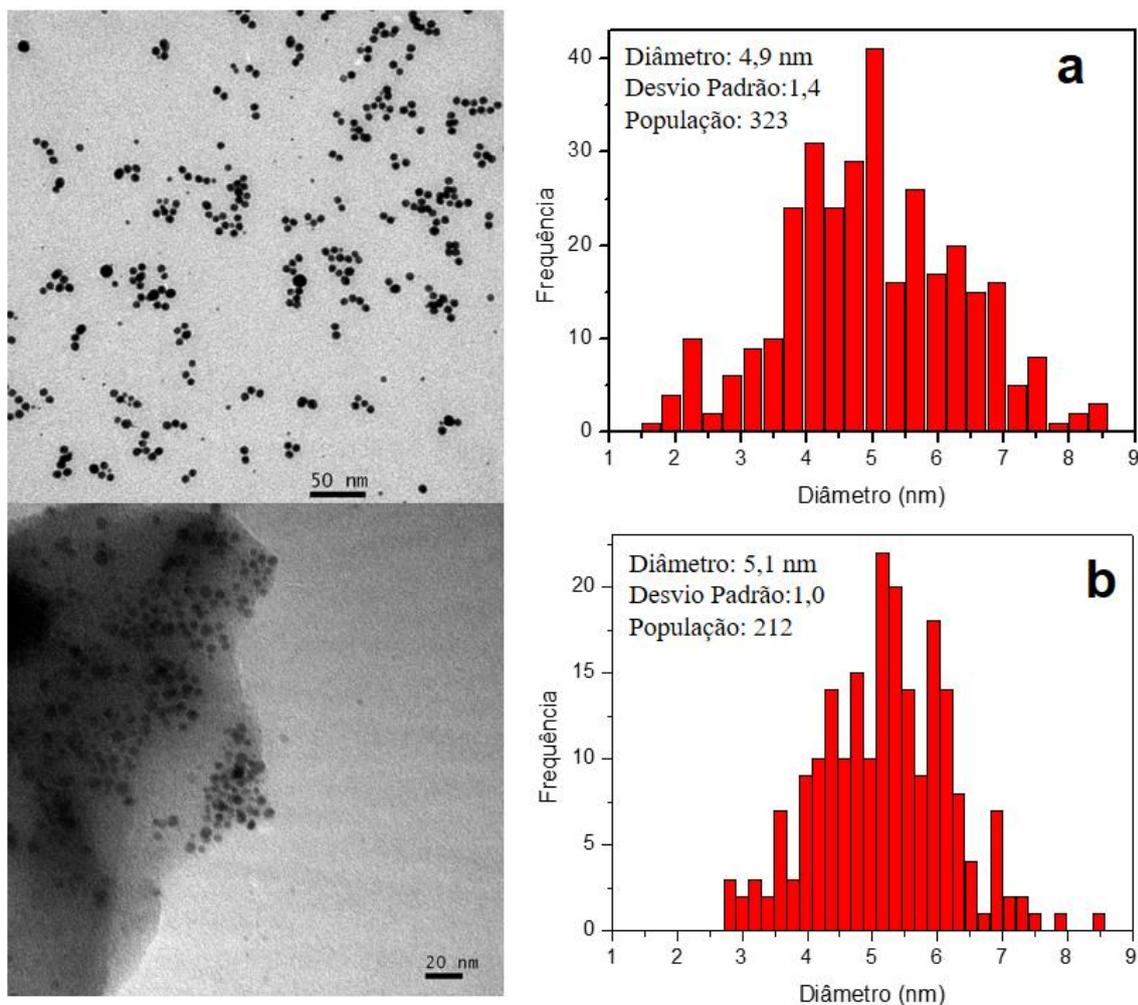


Figura 24. Imagens de TEM e histogramas de distribuição dos diâmetros das nanopartículas de ouro na dispersão Ch/AuNP (a) e sólido AuNP/Quitosana (b). As imagens foram obtidas com magnificações de 300.000× e 500.000×, respectivamente.

Através das imagens da Figura 24, nota-se que as nanopartículas exibem forma esférica e diâmetro médio de $4,9 \pm 1,4$ nm, em dispersão, e $5,1 \pm 1,0$ nm, no sólido. É importante destacar que, mesmo no sólido, as nanopartículas metálicas foram uniformes quanto a forma e diâmetro, confirmando que o deslocamento observado no espectro de UV-Vis da Figura 23, deve ser devido a aglomeração das nanopartículas e efeitos da matriz.

A análise textural revelou que AuNP/Quitosana é um material não-poroso. Sua área específica BET ($5,0 \pm 0,5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) foi duas vezes maior do que no material branco (obtido pelo mesmo método, porém sem a presença de nanopartículas de ouro) ($2,3 \pm 0,5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$). Este aumento na área específica pode ser interpretado considerando a presença das nanopartículas de ouro. Uma vez que AuNP/Quitosana é um material polimérico, os resultados de área específica são interessantes considerando a possibilidade do seu uso como catalisador.

Os espectros de XPS de C 1s, O 1s, N 1s e Au 4f do material AuNP/Quitosana estão mostrados na Figura 25. Esses espectros foram retirados do espectro total da análise.

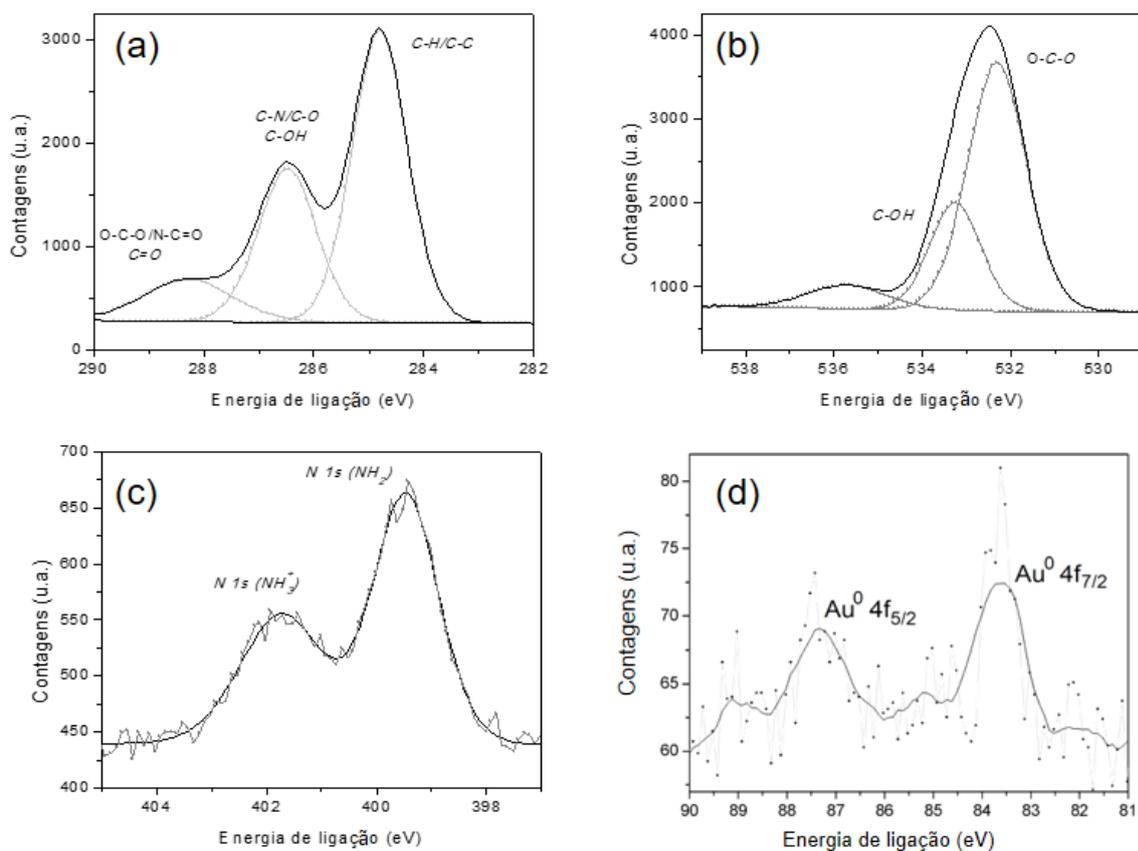


Figura 25. Espectros de XPS do material AuNP/Quitosana: (a) C 1s, (b) O 1s, (c) N 1s e (d) Au 4f.

Em relação à estrutura da quitosana, utilizada como suporte para as nanopartículas de ouro, o espectro XPS do C 1s mostra três picos (Figura 25a): 284,8 (C-C/C-H), 286,5 (C-N/C-O) e 288,3 eV (O-C-O/N-C=O), que estão em concordância com os resultados apresentados por Machou e colaboradores¹⁰¹. O espectro XPS do O 1s apresenta dois picos (Figura 25b): um em 532,3 eV, atribuído aos oxigênios encontrados na estrutura da quitosana e outro em 533,3 eV, atribuído ao oxigênio encontrado em grupos amida, não desacetilados.¹⁰¹ Há ainda

um pico em 535,6 eV, que é resultante do oxigênio quimissorvido no material¹⁰². O espectro XPS de N 1s (Figura 25c) apresenta dois picos, com máximos em 399,5 e 401,7 eV que são atribuídos aos grupos amino não-protonados (NH₂) e grupos amino protonados (NH₃⁺) da quitosana, respectivamente.¹⁰¹ A presença do grupo protonado é devido ao HAuCl₄ e também ao ácido acético, usado na solubilização da quitosana. Já o espectro XPS do Au 4f (Figura 25d) é característico de espécies Au⁰ e apresenta máximos em 83,7 e 87,3 eV.¹⁰³ A intensidade dos picos Au 4f foi muito baixa, em comparação com os picos de C, O e N 1s. Esse fato está relacionado à composição da amostra, já que o sólido é composto principalmente por quitosana, que atua como estabilizante e suporte para as nanopartículas de ouro, o que faz com que os picos para carbono, oxigênio e nitrogênio sejam muito altos em relação ao do ouro. Devido à baixa quantidade de ouro no material, não foi detectada a interação N-Au.

5.7 HIDROGENAÇÃO CATALÍTICA DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS INSATURADOS

A hidrogenação do composto 2-ciclohexenona (1) foi usada como referência para avaliar a performance catalítica do material AuNP/Quitosana. Os resultados estão mostrados na Tabela 3.

Quando NaBH₄ foi usado como agente redutor em meio aquoso, a hidrogenação ocorreu tanto em C=O como em C=C. A hidrogenação da 2-ciclohexenona (1), na presença de NaBH₄, entrada 1, resultou em 2-ciclohexenol (18%) (3) e ciclohexanol (82%) (4). Embora, a hidrogenação não tenha sido seletiva, pois ocorreu nas duas duplas ligações, houve alta conversão (97%) em um curto intervalo de tempo (1,5 h). Esses resultados sugerem que o substrato 2-ciclohexenona (1) pode adsorver na superfície de ouro por dois caminhos:

- i) via η^1_{O} or η^2_{CO} (Figura 16: A e B), resultando no álcool alílico por meio de adição-1,2 do hidrogênio;
- ii) via η^3 or η^4 (Figura 16: F, G e H), resultando no produto totalmente hidrogenado.

Ciclohexanona (2) foi hidrogenada seletivamente à ciclohexanol (4), com conversão de 90%, enquanto o álcool insaturado 2-ciclohexenol (3) não mostrou seletividade na hidrogenação (Tabela 3, entradas 2 e 3). Esses resultados confirmam que as adsorções do tipo η^1_{O} ou η^2_{CO} estão presentes (adição-1,2) (Figura 16: A e B) e praticamente exclui a existência

de caminhos através de η^2_{CC} (adição-3,4) (Figura 16: D e E), ao utilizar NaBH_4 como agente redutor. As ligações $\text{C}=\text{C}$ podem ser hidrogenadas por AuNP/Quitosana apenas quando conjugadas ao grupo $\text{C}=\text{O}$ (Tabela 3, entradas 1 e 3). Estes resultados estão em oposição à casos já citados na literatura que afirmam que há baixa adsorção do sistema conjugado $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$ em superfícies de ouro^{23,104}. Este fato pode estar relacionado à presença de quitosana no catalisador, que age como agente estabilizante e suporte das nanopartículas de ouro, provavelmente mudando a força/capacidade de coordenação do substrato na superfície das nanopartículas de ouro e, conseqüentemente, afetando seu desempenho catalítico. Esta mesma tendência foi observada na hidrogenação de compostos carbonílicos α,β -insaturados utilizando nanopartículas de ouro suportadas em $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ modificadas com líquido iônico⁸³. Na entrada 4, a reação foi realizada utilizando menor quantidade de NaBH_4 (0,5 mmol) e resultou em menor conversão (53%) e também menor atividade ($\text{TOF}=12 \text{ min}^{-1}$). Porém, na seletividade não foram observadas mudanças significativas, 22% para 2-ciclohexenol (3) e 78% para ciclohexanol (4).

Tabela 3. Hidrogenação de 2-ciclohexenona pelo catalisador AuNP/Quitosana.

Reaction scheme: 2-cyclohexenone (1) reacts with AuNP/Quitosana and NaBH_4 ou H_2 to produce cyclohexanone (2), 2-cyclohexenol (3), and cyclohexanol (4).

Entrada ^[a,b]	Agente Redutor	T (°C)	Conversão (%) [tempo(h)]	Seletividade (%)			TOF (min^{-1})
				2	3	4	
1	NaBH_4	25	97 [1,5]	—	18	82	77
2 ^[b]	NaBH_4	25	90 [10,0]	—	—	>99	8
3 ^[c]	NaBH_4	25	—	—	—	—	—
4 ^[d]	NaBH_4	25	53 [6,0]	—	22	78	12
5	10 bar H_2	100	1 [24,0]	>99	0	<1	0,3
6	30 bar H_2	100	2 [24,0]	>99	0	<1	0,5
7	30 bar H_2	150	62 [10,0]	>99	0	<1	9
8	30 bar H_2	200	>99 [6,0]	>99	0	<1	32

^[a]Condições das reações: Au (0,6 μmol), 2-ciclohexenona/Au = 833, H_2O (10 mL), NaBH_4 (5 mmol) (entradas 1, 2, e 3); ^[b]Substrato: ciclohexanona(2); ^[c]Substrato: 2-ciclohexenol(3); ^[d]0,5 mmol de NaBH_4 .

Utilizando-se H_2 como agente redutor para hidrogenação da 2-ciclohexenona houveram mudanças nas atividades e principalmente nas seletividades (Tabela 3, entradas 5-8). A 100 °C, o catalisador se mostrou inativo, mesmo com pressões moderadas de 10 e 30 bar (Tabela 3, entradas 5 e 6), indicando que nesta temperatura, o aumento da pressão não tem influência significativa. Porém, ao aumentar a temperatura para 150 e 200 °C, foram obtidas conversões mais altas (62% e 99%) e maiores atividades (TOF= 9 min^{-1} e 32 min^{-1}) para obtenção de 2-ciclohexanona (2). Baseando-se nestes resultados, é possível que o substrato 2-ciclohexenona (1) consiga adsorver na superfície das nanopartículas de ouro pelo modo de adsorção η^2_{CC} (adição-3,4) (Figura 16: D e E) ou pelos modos η^3 ou η^4 (adição-3,4 ou adição-1,4) (Figura 16: F, G e H).

Assim, conhecendo-se alguns dos modos de adsorção, utilizando H_2 como agente redutor, outras reações com o catalisador AuNP/Quitossana e diferentes substratos insaturados foram empregados: ciclohexanona (2) e 2-ciclohexenol (3); compostos carbonílicos α,β -insaturados: 2-metil-2-ciclohexen-1-ona (5), *t*-crotonaldeído (8), e *t*-cinamaldeído (11); alcenos: ciclohexeno (14); dienos conjugados: 1,3-ciclohexadieno (15) (Tabela 4).

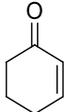
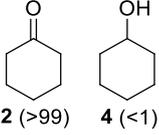
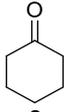
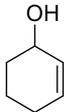
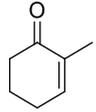
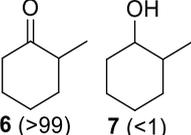
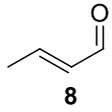
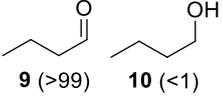
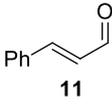
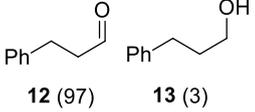
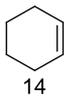
A tentativa de hidrogenação das ligações carbonílicas e etilênicas isoladas nos compostos ciclohexanona (2) e 2-ciclohexen-1-ol (3), respectivamente, foi realizada para investigar a influência da conjugação $C=C-C=O$ nos modos de adsorção desses substratos com o catalisador AuNP/Quitossana e H_2 como agente redutor (Tabela 4, entradas 2 e 3). É importante notar que tanto $C=O$ como $C=C$ não foram hidrogenados, indicando que os modos de adsorção via η^1_O e η^2_{CO} (Figura 16: A e B) e η^2_{CC} (Figura 16: D e E) não ocorrem nestas condições de reação. Assim, é possível afirmar que somente os modos de adsorção η^3 e η^4 (Figura 16: F, G e H) são viáveis na superfície das nanopartículas de ouro utilizando H_2 como agente redutor.

Adicionalmente, a dupla ligação $C=C$ é hidrogenada seletivamente ($\geq 97\%$) nos compostos carbonílicos α,β -insaturados: 2-metil-2-ciclohexen-1-ona (5), *t*-crotonaldeído (8) e *t*-cinamaldeído (11), com atividades relacionadas aos efeitos eletrônicos dos grupos cetona e aldeído e também efeitos estéreos devido aos volumes ocupados pelos diferentes substituintes: $-H$, $-CH_3$ e $-Ph$ (Tabela 4, entradas 4-6). Essas quimiosseletividades observadas indicam novamente que os modos de adsorção destas reações são η^3 e η^4 (Figura 16: F, G e H).

Embora a ligação $C=O$ não tenha sido hidrogenada com o agente redutor H_2 , é importante notar que os substratos contendo grupos $C=C$ isolados e grupos conjugados $C=C-C=C$ também não sofreram hidrogenação. Estes resultados podem ser observados para

os componentes: 2-ciclohexen-1-ol (3), ciclohexeno (14) e 1,3-ciclohexadieno (15) (Tabela 4, entradas 3, 7 e 8). Assim, a hidrogenação do sistema contendo o grupo conjugado C=C-C=O pode estar relacionada ao catalisador utilizado, visto que a quitosana pode favorecer os modos de adsorção propostos, conduzindo a seletividade de acordo com o agente redutor utilizado, NaBH₄ ou H₂.

Tabela 4. Hidrogenação seletiva de substratos orgânicos insaturados, na presença de H₂ e AuNP/Quitosana.

Entrada ^[a]	Substrato	Conversão (%) [tempo(h)]	Seletividade (%)	TOF/ min ⁻¹
1		>99 [6,0]	 2 (>99) 4 (<1)	32
2		— [24,0]	—	—
3		— [24,0]	—	—
4		15 [24,0]	 6 (>99) 7 (<1)	3
5		>99 [5,0]	 9 (>99) 10 (<1)	46
6		>99 [6,0]	 12 (97) 13 (3)	27
7		— [24,0]	—	—
8		— [24,0]	—	—

^[a] Condições das reações: Au (0,6 μmol), substrato/Au = 833, H₂O (10 mL), H₂ (30 bar), 200 °C.

5.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi desenvolvido um catalisador auto-suportado, AuNP/Quitosana, onde quitosana atua como estabilizador e também como suporte para nanopartículas de ouro. Este catalisador foi obtido a partir da secagem da dispersão aquosa de nanopartículas de ouro. Foi observado por UV-Vis e microscopia de transmissão que as nanopartículas de ouro apresentam forma esférica e diâmetro próximo de 5 nm, tanto na dispersão aquosa quanto no material sólido. O catalisador foi aplicado para hidrogenação seletiva de ligações C=C em compostos carbonílicos α,β -insaturados. Os resultados indicaram que o catalisador favorece os modos de adsorção η^3 e/ou η^4 de sistemas C=C-C=O π -conjugados conduzindo a seletividade para álcoois insaturados ou cetonas saturadas, dependendo do agente redutor (NaBH₄ ou H₂) utilizado na hidrogenação.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi empregada quitosana como agente estabilizador e controlador de tamanho na síntese de nanopartículas de ouro. Essas nanopartículas foram usadas no preparo de filmes e também como catalisador heterogêneo. Os filmes foram obtidos na presença de um organossilano (APTMS) que tem por função melhorar a adesão no substrato de sílica, bem como, promover a homogeneidade dos filmes, tornando-os menos rugosos e compactos. Os filmes, contendo nanopartículas de ouro, apresentaram maiores atividades antibacterianas, contra a bactéria *Salmonella Typhimurium*, em comparação com os brancos (na ausência de nanopartículas de ouro). O catalisador heterogêneo foi constituído de nanopartículas de ouro auto-suportadas em quitosana. Neste caso, a quitosana serviu como estabilizador e também como suporte para as nanopartículas. Este nanocatalisador foi aplicado em reações de hidrogenação de compostos carbonílicos α,β -insaturados, mostrando atividade até 77 min⁻¹ e seletividades maiores do que 99% para aldeídos e cetonas saturados, utilizando H₂ como agente redutor. Foram avaliados os modos de adsorção dos substratos (compostos orgânicos) sobre as nanopartículas de ouro e foi observado que a presença da quitosana no catalisador modifica a capacidade de coordenação do substrato na superfície das nanopartículas de ouro e, conseqüentemente, afeta seu desempenho catalítico. Os resultados mostraram que o catalisador favorece a adsorção do grupo C=C quando conjugado ao C=O, bem como, dirige a

seletividade para álcoois insaturados ou cetonas saturadas, dependendo do agente redutor utilizado, NaBH₄ ou H₂.

7. REFERÊNCIAS

1. Esther, J., Sridevi, V.; Synthesis and characterization of chitosan-stabilized gold nanoparticles through a facile and green approach, *Gold Bull.*, **2016**, 50 (1), 1.
2. Sun, L., Li, J., Cai, J., Zhong, L., Ren, G., Ma, Q.; One pot synthesis gold nanoparticles using chitosan with varying degree of deacetylation and molecular weight, *Carbohydr. Polym.*, **2017**, 178, 105.
3. Yusoff, N., Pandikumar, A., Ramaraj, R., Lim, H.N., Huang, N.M.; Gold nanoparticle based optical and electrochemical sensing of dopamine, *Microchim. Acta*, **2015**, 182 (13), 2091.
4. Jazayeria, M.H., Aghaie, T., Avan, A., Vatankhah, A., Ghaffari, M.R.S.; Colorimetric detection based on gold nano particles (GNPs): An easy, fast, inexpensive, low-cost and short time method in detection of analytes (protein, DNA, and ion), *Sens. Biosensing Res.*, **2018**, 20, 1.
5. Vigneron, F., Caps, V.; Evolution in the chemical making of gold oxidation catalalysts, *C. R. Chimie*, **2016**, 19, 192.
6. Peiris, S., McMurtie, J., Zhu, H.Y.; Metal nanoparticles photocatalysts: emerging processes for green organic synthesis, *Catal. Sci. Technol.*, **2016**, 6, 320.
7. Mu, H., Tang, J., Liu, Q., Sun, C., Wang, T., Duan, J.; Potent Antibacterial Nanoparticles agains Biofilm and Intracellular Bacteria, *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 18877.
8. Attia, Y.A., Buceta, D., Requejo, F.G., Giovaneth, J., López-Quintela, M.A.; Photostability of gold nanoparticles with different shapes: role of Ag clusters, *Nanoscale*, **2015**, 7, 11273.
9. Schneid, A.C., Pereira, M.B., Horowitz, F., Mauler, R.S., Matte, C.R., Klein, M.P., Hertz, P.F., Costa, T.M.H., de Menezes, E.W., Benvenuti, E.V.; Silver Nanoparticle Thin Films Deposited on Glass Surface Using an Ionic Silsesquioxane as Stabilizer and as Crosslinking Agent, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2015**, 26 (5), 1004.
10. Elieh-Ali-Komi, D., Hamblin, M.R.; Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials, *Int.J. Adv. Res.*, **2016**, 4, 411.

11. Younes, I., Rinaudo, M.; Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications, *Mar. Drugs.*, **2015**, 13, 1133.
12. Crini, G., Morin-Crini, N., Fatin-Rouge, N., Déon, S., Fievet, P.; Metal removal from aqueous media by polymer-assisted ultrafiltration with chitosan, *Arab. J. Chem.*, **2017**, 10, S3826.
13. Xiang, C., Li, R., Adhikari, B., She, Z., Li, Y., Kraatz, H.B.; Sensitive electrochemical detection of Salmonella with chitosan-gold nanoparticles composite film, *Talanta*, **2015**, 140, 122.
14. Wang, B., Ji, X., Zhao, H., Wang, N., Li, X., Ni, R., Liu, Y.; An amperometric β -glucan biosensor based on the immobilization of bi-enzyme on Prussian blue-chitosan and gold nanoparticles-chitosan nanocomposite films, *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, 55, 113.
15. Mohebi, E., Shahbazi, Y.; Application of chitosan and gelatina based active packaging films for peeled shrimp preservation: A novel functional wrapping design, *LWT - Food Sci. Technol.*, **2017**, 76, 108.
16. Eslamian, M., Soltani-Kordshuli, F.; Development of multiple-droplet drop-casting method for the fabrication of coatings and thin solid films, *J. Coat. Technol. Res.*, **2018**, 15(2), 271.
17. Luo, Y., Wang, Q.; Recent Advances of Chitosan and Its Derivatives for Novel Applications in Food Science, *J. Food Processing & Beverages*, **2013**, 1(1), 13.
18. Loureiro, E.C.B., Marques, N.D.B., Ramos, F.L.P., Reis, E.M.F., Rodrigues, D.P., Hofer, E.; Salmonella serovars of human origin identified in Pará State, Brazil from 1991 to 2008. *Rev. Pan-Amaz. Saude*, **2010**, 1(1), 93.
19. Schaming, D., Remita, H.; Nanotechnology: from the ancient time to nowadays, *Found Chem*, **2015**, 17(3), 187.
20. Mitsudome, T., Kaneda, K.; Gold nanoparticle catalysts for selective hydrogenations, *Green Chem.*, **2013**, 15, 2636.
21. Hao, C.H., Guo, X.N., Pan, Y.T., Chen, S., Jiao, Z.F., Yang, H., Guo, X.Y.; Visible-Light-Driven Selective Photocatalytic Hydrogenation of Cinnamaldehyde over Au/SiC Catalysts, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, 9361.
22. Stephenson, C.J., Whitford, C.L., Stair, P.C., Farha, O.K., Hupp, J.T.; Chemoselective Hydrogenation of Crotonaldehyde Catalyzed by an Au@ZIF-8 Composite, *Chem. Cat. Chem.*, **2016**, 8, 855.

23. Claus, P.; Selective hydrogenation of α,β -unsaturated aldehydes and others C=O and C=C bonds containing compounds, *Top. Catal.*, **1998**, 5, 51.
24. Pareek, V., Bhargava, A., Gupta, R., Jain, N., Panwar, J.; Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review, *Adv. Sci. Eng. Med.*, **2017**, 9, 527.
25. Whitesides, G.M.; Nanoscience, Nanotechnology and Chemistry, *Small*, **2005**, 1(2) 172.
26. Lv, M., Liu, Y., Geng, J., Kou, X., Xin, Z., Yang, D.; Engineering nanomaterials-based biosensors for food safety detection, *Biosens. Bioelectron*, **2018**, 106, 122.
27. Feynman, R.P.; There's plenty of room at the bottom; *Miniaturization*; Gilbert Horace (Edt.), Reinhold, Nova Iorque, **1961**, 282.
28. Adams, F.C., Barbante, C.; Nanoscience, Nanotechnology and Spectrometry, *Spectrochim Acta Part B*, **2013**, 86, 3.
29. Zhang, F.; Grand challenges for Nanoscience and Nanotechnology in Energy and Health, *Front. Chem.*, **2017**, 5 (80), 1.
30. Hanemann, T., Szabó, D.V.; Polymer-Nanoparticle Composites: From Synthesis to Modern Applications, *Materials*, **2010**, 3, 3468.
31. Dhar, J., Patil, S.; Self-Assembly and Catalytic Activity of Metal Nanoparticles Immobilized in Polymer Membrane Prepared via Layer-by-Layer Approach, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2012**, 4, 1803.
32. Disponível em www.nanocomposix.com/pages/color-engineering. (acesso em 09/07/2018).
33. Gao, N., Huang, P., Wu, F.; Colorimetric detection of melamine in milk based on Triton X-100 modified gold nanoparticles and its paper-based application, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2018**, 192, 174.
34. Weidemaier, K., Carruthers, E., Curry, A., Kuroda, M., Fallows, E., Thomas, J., Sherman, D., Muldoon, M.; Real-time pathogen monitoring during enrichment: a novel nanotechnology-based approach to food safety testing, *Int. J. Food Microbiol.*, **2015**, 198, 19.
35. Zong, Y., Liu, F., Zhang, Y., Zhan, T., He, Y., Hun, X.; Signal amplification technology based on entropy-driven molecular switch for ultrasensitive electrochemical determination of DNA and *Salmonella typhimurium*, *Sens. Actuators B Chem.*, **2016**, 225, 420.

36. Abdel-Raouf, N., Al-Enazi, N.M., Ibraheem, I.B.M.; Green biosynthesis of gold nanoparticles using *Galaxaura elongata* and characterization of their antibacterial activity, *Arab. J. Chem.*, **2017**, 10, S3029.
37. Zewde B., Ambaye A., Stubbs J. III, Dharmara R; A Review of Stabilized Silver Nanoparticles – Synthesis, Biological Properties, Characterization, and Potential Areas of Applications, *JSM Nanotechnol. Nanomed.*, **2016**, 4, 1043.
38. Polte, J.; Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective, *Cryst. Eng. Comm.*, **2015**, 17, 6809.
39. Polte, J., Erler, R., Thünemann, A.F., Sokolov, S., Ahner, T.T., Rademann, K., Emmerling, F., Kraehnert, R.; Nucleation and Growth of Gold Nanoparticles Studied via in situ Small Angle X-ray Scattering at Millisecond Time Resolution, *ACS Nano*, **2010**, 4, 1076.
40. Xiong, Y.; Lu, X.; *Metallic Nanostructures: From Controlled Synthesis to Applications*; Springer Intl. Publishing: Switzerland, **2015**; 1–310.
41. Virkutyte, J., Varma, R.S.; Green synthesis of metal nanoparticles: Biodegradable polymers and enzymes in stabilization and surface functionalization, *Chem. Sci.*, **2011**, 2, 837.
42. Kregiel, D; Advances in biofilm control for food and beverage industry using organo-silane technology: A Review, *Food Control*, **2014**, 40, 32.
43. Li, W., Chen, Y., Wu, S., Zhang, J., Wang, H., Zeng, D., Xie; Preparing high-adhesion silver coating on APTMS modified polyethylene with excellent anti-bacterial performance, *Appl. Surf. Sci.*, **2018**, 436, 1117.
44. Jung, H.S., Moon, D.S., Lee, J.K.; Quantitative Analysis and Efficient Surface Modification of Silica Nanoparticles, *J. Nanomater.*, **2012**, 48, 1.
45. Mandal, A., Sekar, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., Sastry, T.P.; Synthesis, characterization and evaluation of collagen scaffolds crosslinked with aminosilane functionalized silver nanoparticles: in vitro and in vivo studies, *J. Mater. Chem. B*, **2015**, 3, 3032.
46. Erba, E., Mansilla, A.Y., Hoppe, C.E., Williams, R.J.J.; Synthesis and characterization of an antibacterial powder based on the covalent bonding of aminosilane-stabilized silver nanoparticles to a colloidal silica, *J. Mater. Sci.*, **2016**, 51, 3817.
47. Pandey, P.C., Pandey, A.K.; In *Advances in Bioceramics and Biotechnologies II*, McKittrick, J.M., Narayan, R.; John Wiley & Sons, **2014**.

48. Narayanan, A., Pandey, P.C.; Studies on the competitive interaction of glutathione With 3-aminopropyltrimethoxysilane-stabilized gold Nanoparticles; Resumo no The 8th Pacific Rim International Congress on Advanced Materials and Processing, **2013**.
49. Fernandes, S.C.M., Sadocco, P., Causio, J., Silvestre, A.J.D., Mondragon, I., Freire, C.S.R.; Antimicrobial pullulan derivative prepared by grafting with 3-aminopropyltrimethoxysilane: Characterization and ability to form transparent films, *Food Hydrocoll.*, **2014**, 35, 247.
50. Ramírez, M.A., Rodríguez, A.T., Alfonso, L., Peniche, C.; Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications, *Biotecnol. Apl.*, **2010**, 27, 270.
51. He, X., Li, K., Xing, R., Liu, S., Hu, L., Li, P.; The production of fully deacetylated chitosan by compression method, *Egypt J. Aquat. Res.*, **2016**, 42, 75.
52. Al-Naamani, L., Dobretsov, S., Dutta, J.; Chitosan-zinc oxide nanoparticle composite coating for active food packaging applications, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **2016**, 38, 231.
53. Tammam, S.N., Khalil, M.A.F., Gawad, E.A., Althani, A., Zaghloul, H., Azzazy, H.M.E.; Chitosan gold nanoparticles for detection of amplified nucleic acids isolated from sputum, *Carbohydr. Polym.*, **2017**, 164, 57.
54. Pellá, M.C.G., Lima-Tenório, M.K., Tenório-Neto, E.T., Guilherme, M.R., Muniz, E.C., Rubira, A.F.; Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications, *Carbohydr. Polym.*, **2018**, 198, 233.
55. Sionkowska, A., Kaczmarek, B., Michalska, M., Lewandowska, K., Grabska, S.; Preparation and characterization of collagen/chitosan/hyaluronic acid thin films for application in hair care cosmetics, *Pure Appl. Chem.*, **2017**, 89, 1829.
56. Morsy, R., Ali, S.S., El-Shetehy, M.; Development of hydroxyapatite-chitosan gel sunscreen combating clinical multidrug-resistant bacteria, *J. Mol. Struct.*, **2017**, 1143, 251.
57. Boardman, S.J., Lad, R., Green, D.C., Thornton, P.D.; Chitosan hydrogels for targeted dye and protein adsorption, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2017**, 134, 44846.
58. Azzam, E.M.S., Eshaq, G., Rabie, A.M., Bakr, A.A., Abd-Elaal, A.A., Metwally, A.E.E., Tawfik, S.M.; Preparation and characterization of chitosan-clay nanocomposites for the removal of Cu(II) from aqueous solution, *Int. J. Biomol. Macromol.*, **2016**, 89, 507.

59. Xu, T., Xin, M., Li, M., Huang, H., Zhou, S.; Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N,N,N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives, *Carbohydr. Polym.*, **2010**, 81, 931.
60. Goy, R.C., Morais, S.T.B., Assis, O.B.G; Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2016**, 26, 122.
61. Anh, D.H., Dumri, K.; Facile fabrication of organobentonite-carboxymethyl chitosan hybrid film that absorbs organophosphate insecticides, *Bull. Mater. Sci.*, **2017**, 40(6), 1189.
62. Cui, H.F., Wu, W.W., Li, M.M., Song, X., Lv, Y., Zhang, T.T.; A highly stable acetylcholinesterase biosensor based on chitosan-TiO₂-graphene nanocomposites for detection of organophosphate pesticides, *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, 99, 223.
63. Pasquarelli, R.M., Ginley, D.S., O'Hayres, R.; Solution processing of transparent conductors: from flask to film, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 5406.
64. Shkir, M., Ganesh, V., AlFaify, S., Yahia, I.S.; Structural, linear and third order nonlinear optical properties of drop casting deposited high quality nanocrystalline phenol red thin films, *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.*, **2017**, 28, 10573.
65. Kajal, P., Ghosh, K., Powar, S.; In *Applications of Solar Energy*, Energy, Environment and Sustainability; Tyagi, H. et al, Springer Nature, Singapore, **2018**.
66. Zhao, C., Xing, L., Xiang, J., Cui, L., Jiao, J., Sai, H., Li, Z., Li, F.; Formation of uniform reduced graphene oxide films on modified PET substrates using drop-casting method, *Particuology*, **2014**, 17, 66.
67. Majumder, M. et al.; Overcoming the "Coffee-Stain" Effect by Compositional Marangoni-Flow-Assisted Drop-Drying, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116, 6536.
68. Shah, A., Hussain, I., Murtaza, G.; Chemical synthesis and characterization of chitosan/silver nanocomposites films and their potential antibacterial activity, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 116, 520.
69. Zhou, Y., Kong, Y., Kundu, S., Cirillo, J.D., Liang, H.; Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and bacillus Calmette-Guérin, *J. Nanobiotechnology*, **2012**, 10, 19.
70. Mendoza, G., Regiel-Futyra, A., Andreu, V., Sebastián, V., Kyziol, A., Stochel, G., Arruebo, M.; Bactericidal Effect of Gold-Chitosan Nanocomposites in Coculture Models of Pathogenic Bacteria and Human Macrophages, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9, 17693.

71. Prema, P., Thangapandiyan, S.; In-vitro antibacterial activity of gold nanoparticles capped with polysaccharide stabilizing agents, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2013**, 5(1), 310.
72. Yan, F., Dang, Q., Liu, C., Yan, J., Wang, T., Bing, F., Cha, D., Li, X., Liang, S., Zhang, Z.; 3,6-O-[N-(2-Aminoethyl)-acetamide-yl]-chitosan exerts antibacterial activity by a membrane damage mechanism, *Carbohydr. Polym.*, **2016**, 149, 102.
73. Hosseinejad, M., Jafari, S.M.; Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2016**, 85, 467.
74. Cui, Y., Zhao, Y., Tian, Y., Zhang, W., Lü, X., Jiang, X.; The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*, *Biomaterials*, **2012**, 33, 2327.
75. Dizaj, S.M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M.H., Adibkia, K.; Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles, *Mater. Sci. Eng., C*, **2014**, 44, 278.
76. Zawrah, M.F., El-Moez, S.I.A.; Antimicrobial Activities of Gold Nanoparticles against Major Foodborne Pathogens, *Life Sci. J.*, **2011**, 8(4), 37.
77. Andino, A., Hanning, I.; *Salmonella enterica*: Survival, Colonization and Virulence Differences among Serovars, *Scientific World Journal*, **2015**, 2015, 1.
78. Zhou, J., Dong, Z., Yang, H., Shi, Z., Zhou, X., Li, R., Pd immobilized on magnetic chitosan as a heterogeneous catalyst for acetalization and hydrogenation reactions, *Appl. Surf. Sci.*, **2013**, 279, 360.
79. Alshehri, S.M., Almuqati, T., Almuqati, N., Al-Farraj, E., Alhokbany, N., Ahamad, T.; Chitosan based polymer matrix with silver nanoparticles decorated multiwalled carbon nanotubes for catalytic reduction of 4-nitrophenol, *Carbohydr. Polym.*, **2016**, 151, 135.
80. Sandoval, A., Zanella, R., Klimova, T.E.; Titania nanotubes decorated with anatase nanocrystals as support for active and stable gold catalysts for CO oxidation, *Catal. Today*, **2017**, 282, 140.
81. Li, R., Yan, X., Zhu, X., Shou, D., Zhou, X., Dai, Y., Yang, Y.; Gold nanoparticles confined in ordered mesopores: Size effect and enhanced stability during gas-phase selective oxidation of cyclohexanol, *Catal. Today*, **2017**, 298, 269.
82. Tan, Y., Liu, X.Y., Zhang, L., Wang, A., Li, L., Pan, X., Miao, S., Haruta, M., Wei, H., Wang, H., Wang, F., Wang, X., Zhang, T.; ZnAl-Hydroxide-Supported Au₂₅

- Nanoclusters as Precatalysts for Chemoselective Hydrogenation of 3-Nitrostyrene, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56, 2709.
83. Luza, L., Rambor, C.P., Gual, A., Fernandes, J.A., Eberhardt, D., Dupont, J.; Revealing Hydrogenation Reaction Pathways on Naked Gold Nanoparticles, *ACS Catal.*, **2017**, 7, 2791.
84. Chorkendorff, I., Niemantsverdriet, J.W.; Concepts of Modern Catalysis and Kinetics, Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2003**.
85. Deutschmann, O., Knözinger, H.; Kochloefl, K.; Turek, T.; Heterogeneous Catalysis and Solid Catalysts, 1. Fundamentals. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, **2000**.
86. Rothenberg, G.; In Catalysis: Concepts and Green Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2008**.
87. Alshammari, A., Kalevaru, V.N., Martin, A.; In Green Nanotechnology - Overview and Further Prospects; InTech, **2016**.
88. Hu, C., Creaser, D., Siahrostami, S., Grönbeck, H., Ojagh, H., Skoglundh, M.; Catalytic hydrogenation of C=C and C=O in unsaturated fatty acid methyl esters, *Catal. Sci. Technol.*, **2014**, 4, 2427.
89. Chen, B., Dingerdissen, U., Krauter, J.G.E., Rotgerink, H.G.L.L., Möbus, K., Ostgard, D.J., Panster, P., Riermeier, T.H., Seebald, S., Tacke, T., Trauthwein, H.; New developments in hydrogenation catalysis particularly in synthesis of fine and intermediate chemicals, *Appl. Catal., A*, **2005**, 280, 17.
90. Ide, M.S., Hao, B., Neurock, M., Davis, R.J.; Mechanistic Insights on the Hydrogenation of α,β -Unsaturated Ketones and Aldehydes to Unsaturated Alcohols over Metal Catalysts, *ACS Catal.*, **2012**, 2, 671.
91. Siddiqui, N., Sarkar, B., Pendem, C., Khatun, R., Konthala, L.N.S., Sasaki, T., Bordoloi, A., Bal, R.; Highly selective transfer hydrogenation of α,β -unsaturated carbonyl compounds using Cu-based nanocatalysts, *Catal. Sci. Technol.*, **2017**, 7, 2828.
92. Olivas, A., Jerdev, D.I., Koel, B.E.; Hydrogenation of cyclohexanone on Pt-Sn surface alloys, *J. Catal.*, **2004**, 222, 285.
93. Esikova, T.Z., Taran, S.A.; A Novel Strain *Gulosibacter* sp. BS4 Degrading epsilon-Caprolactam and Nylon-6 Oligomers, *Microbiology (Moscow, Russ. Fed.)*, **2016**, 85(5), 642.

94. Cano, I., Huertos, M.A., Chapman, A.M., Buntkowsky, G., Gutmann, T., Groszewicz, P.B., Leeuwen, P.W.N.M.; Air-Stable Gold Nanoparticles Ligated by Secondary Phosphine Oxides as Catalysts for the Chemoselective Hydrogenation of Substituted Aldehydes: a Remarkable Ligand Effect, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 7718.
95. Das, D., Pal, K., Llorca, J., Dominguez, M., Colussi, S., Trovarelli, A., Gayen, A.; Chemoselective hydrogenation of cinnamaldehyde at atmospheric pressure over combustion synthesized Pd catalysts, *Reac. Kinet. Mech. Cat.*, **2017**, 122, 135.
96. Zhao, J., Ni, J., Xu, J., Xi, J., Cen, J., Li, X.; Ir promotion of TiO₂ supported Au catalysts for selective hydrogenation of cinnamaldehyde, *Catal. Commun.*, **2014**, 54, 72.
97. Marques, M.E., Mansur, A.A.P., Mansur, H.S.; Chemical functionalization of surfaces for building three-dimensional engineered biosensors, *Appl. Surf. Sci.*, **2013**, 275, 347.
98. Deega, R.D., Bakajin, O., Dupont, T.F., Huber, G., Nagel, S.R., Witten, T.A.; Contact lines deposits in an evaporating drop, *Phys. Rev. E*, **2000**, 62, 756.
99. Jena, B.K., Raj, C.R.; Optical sensing of biomedically important polyionic drugs using nano-sized gold particles, *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 23, 1285.
100. Laranjo, M.T., Kist, T.B.L., Benvenuti, E.V., Gallas, M.R., Costa, T.M.H.; Gold nanoparticles enclosed in silica xerogels by high-pressure processing, *J. Nanopart. Res.*, **2011**, 13, 4987.
101. Machou, H., Genet, M.J., Aliouche, D., Dupont-Gillain, C.C., Rouxhet, P.G.; XPS analysis of chitosan-hydroxyapatite biomaterials: from elements to compounds, *Surf. Interface Anal.*, **2013**, 45, 1088.
102. Olejniczak, A., Lezanska, M., Wloch, J., Kucinska, A., Lukaszewics, J.P.; Novel nitrogen-containing mesoporous carbons prepared from chitosan, *J. Mater. Chem. A*, **2013**, 1, 8961.
103. Fan, C., Li, W., Zhao, S., Chen, J., Li, X.; Efficient one pot synthesis of chitosan-induced gold nanoparticles by microwave irradiation, *Mater. Lett.*, **2008**, 62, 3518.
104. Milone, C., Ingoglia, R., Pistone, A., Neri, G., Frusteri, F., Galvagno, S.; Selective hydrogenation of α,β -unsaturated ketones to α,β -unsaturated alcohols on gold-supported catalysts, *J. Catal.*, **2004**, 222, 348.