

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Adriana Machado Fontes

**Novos bio-híbridos fungos@NPs-AuPd e suas aplicações na
catálise heterogênea**

Tese de Doutorado

VIRTUTE SPIRITUS

SALVADOR-BA

1808
Dezembro de 2016.

Adriana Machado Fontes

**Novos bio-híbridos fungos@NPs-AuPd e suas aplicações na
catálise heterogênea**

Tese de Doutorado apresentada à
Universidade Federal da Bahia, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação em
Química, para cumprimento dos requisitos à
obtenção do grau de Doutora em Química.

Orientador: Dr. Marcos Malta

Co-Orientadora: Dr^a. Regina Geris

SALVADOR-BA

Dezembro de 2016.

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Machado Fontes, Adriana

Novos bio-híbridos fungos@NPs-AuPd e suas aplicações na catálise heterogênea / Adriana Machado Fontes. -- Salvador-Ba, 2016.
161 f. : il

Orientador: Marcos Malta dos Santos.

Coorientadora: Regina Maria Geris dos Santos.

Tese (Doutorado - Química) -- Universidade Federal da Bahia, Departamento de Físico-Química / Programa de Pós-Graduação em Química, 2016.

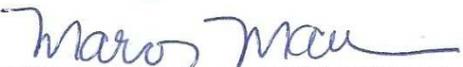
1. catálise heterogênea. 2. bio-híbridos de fungos filamentosos e nanopartículas. 3. nanopartículas bimetalicas de ouro e paládio. 4. MEV, MET, RMN-H. 5. hidrogenação de MBE. I. Malta dos Santos, Marcos. II. Maria Geris dos Santos, Regina. III. Título.

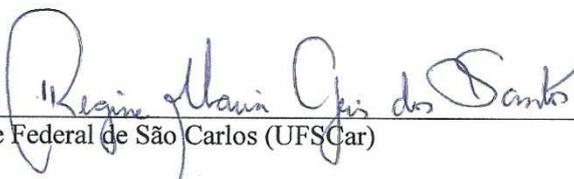
TERMO DE APROVAÇÃO

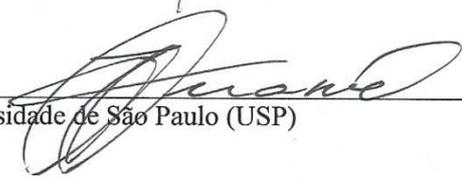
ADRIANA MACHADO FONTES

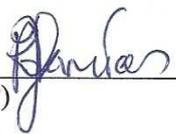
“Novos bio-híbridos fungos@NPs-AuPd e suas aplicações na catálise heterogênea”

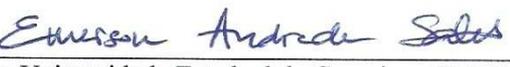
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

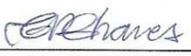
Prof. Dr. Marcos Malta dos Santos 
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Profª. Drª. Regina Maria Geris dos Santos 
Doutorado em Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz 
Doutorado em Química Orgânica, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Arnaud Victor dos Santos 
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Emerson Andrade Sales 
Doutorado em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia

Profª. Drª. Claudilene Ribeiro Chaves 
Doutorado em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 09 de dezembro de 2016.

Dedico esta tese ao meu noivo Daniel, aos meus pais Ilma e Ademar, à minha irmã Danielle e ao meu cunhado Paulo que me apoiaram muito e me acompanharam em momentos importantes deste trabalho.

“It’s not the strongest who survive, nor the most intelligent, but the ones most adaptable to changes.”
Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a vida.

Ao Professor Dr. Marcos Malta dos Santos pela orientação, apoio, preocupação, amizade, paciência e confiança desde a iniciação científica;

À Professora Dr^a. Regina Maria Geris pela orientação, apoio, amizade, preocupação, por disponibilizar o espaço em seu laboratório LBQM para que desenvolvêssemos a parte experimental, também agradeço a Mari e Miguelzinho pelo carinho.

Ao Programa de Pós-graduação em Química da UFBA, Michel Erik S. Jesus, Luciana S. Silva e Cristiane Araújo por todo apoio, carinho e atenção; e ao corpo docente do Instituto de Química, pela oportunidade e contribuição dada na minha formação;

À CAPES por todo o apoio financeiro para a execução deste trabalho, pela bolsa PDSE (Programa de Doutorado Sanduíche) concedida que permitiu a minha visita à University of Saskatchewan no Canadá durante 11 meses;

Aos professores Dr. Emerson Andrade Sales (UFBA), Dr^a. Claudilene Ribeiro Chaves (UFBA), Dr. Arnaud Victor dos Santos (UNEB), Dr. Frederico Guaré Cruz (UFBA) pela participação em minha banca examinadora dando importantes contribuições para o meu trabalho;

Aos Professores do Instituto de Física Dr. Antônio Ferreira da Silva e Dr. Marcus Vinícius Santos da Silva pelo apoio também na parte de caracterização e disponibilização da infra-estrutura do Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da UFBA (LAMUME), à Jessica Guerreiro pelas análises de microscopia eletrônica, pela sua amizade e colaboração.

Aos colaboradores e amigo Leonis L. da Luz e seu orientador Dr. Severino Alves Júnior da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio no desenvolvimento dos trabalhos durante este curso de Doutorado.

Aos professores do Instituto de Química da UFBA que nos ajudaram no desenvolvimento dos trabalhos: Dr. Frederico Guare Cruz, Dr^a. Zênis Novaes da Rocha.

Aos professores Dr. Arnaud Victor dos Santos (UNEB) e Dr. Madson de Godói Pereira (UNEB) pelo apoio e amizade durante o desenvolvimento dos trabalhos desde a graduação.

A Vilberto Lázaro Martins Nascimento do Laboratório de raios X pelas análises de DRX no Instituto de Química da UFBA.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-BA) pelo serviço de microscopia eletrônica, pelo grandioso apoio nos treinamentos para processamento das amostras, onde aprendi a trabalhar com ultramicrotomia, processamento de material para MET, MEV pela viabilidade dos experimentos complementares a este trabalho, pela amizade: Dr^a. Maria Lúcia Vieira Moreno, Dr^a. Adriana Lanfredi Rangel, Dr. Cláudio Pereira Figueira, Márcio Ferreira dos Santos, Arlene Souza Lessa, muito obrigada.

Ao Professor Dr. Robert W. J. Scott da University of Saskatchewan por me receber atenciosamente em seu grupo para o estágio de Doutorado Sanduíche. Agradeço também aos seus estudantes de doutorado no ano de 2015, Mahesh K. Gangishetty e Sudheesh K. Veeranmaril pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho. Ao WCVM Imaging Centre staff da University of Saskatchewan, pelos treinamentos para processamento de material e para obtenção das imagens de microscopia eletrônica, MET e MEV de alta resolução. Ao Saskatchewan Structural Sciences Centre, pelo apoio nas análises de RMN-H.

À FACEPE, pela concessão da bolsa BCT (Bolsa de Cooperação Técnica, Processo N^o BCT-0197-1.06/12 FACEPE/CETENE, de 01/07/2012 até 01/06/2014);

Ao CNPq pela bolsa DTI-B (Desenvolvimento tecnológico e Industrial, nível B do CNPQ/ LMNano/CETENE, Processo N° 383589/2014-2, 01/07 2014 até 01/01/2015);

À FAPESB por apoios financeiros que contribuíram no desenvolvimento destes trabalhos;

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), especialmente à Adriana Campos e Magaly Nascimento pelo apoio, amizade e carinho no desenvolvimento destes trabalhos;

Aos colegas do IQ, LBQM e GESNAT: Luiz Henrique, Cristiane Almeida, Jucineide Barbosa, Messias, Ícaro, Jeferson Rosário, Verônica, Vanessa, Letícia, Maurício, Leonardo, Hênia, Ivan, Ailton, Heiter, Beni, Carine, Carina, Ane, Camila.

À minha família por todo apoio, carinho e atenção.

A todos os meus amigos, amigas, pessoas especiais em minha vida, que de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. Muito Obrigada!

RESUMO

Nanopartículas de ouro e paládio (NPs-AuPd) foram obtidas com a redução seqüencial do cloreto de paládio (PdCl₂) sobre fungos filamentosos contendo nanopartículas de ouro (NPs-Au) previamente depositadas em sua superfície. Nesta tese, foi investigada a síntese e caracterização de bio-híbridos fungos decorados com NPs-AuPd formados pelas espécies de fungo *Phialomyces macrosporus*, *Trichoderma sp*, *Penicillium sp* e *Aspergillus niger*. Inicialmente, foram efetuados testes para avaliar a aplicabilidade destes novos materiais em reações de interesse industrial como a reação de hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol (MBE), a oxidação do álcool crotilico e reação de Suzuki entre o iodo-benzeno e o ácido fenilborônico. Destes testes verificou-se que o *Trichoderma sp* [citrato]:[Au³⁺] = 2,0 apresentou 99% de conversão para a hidrogenação do MBE utilizando água e metanol como solvente, com isso os estudos de aplicação dos bio-híbridos seguiram-se utilizando a reação de hidrogenação do MBE. Os estudos seguintes de hidrogenação do MBE foram efetuados utilizando apenas água como solvente, à temperatura ambiente. Os testes no escuro e na presença de luz mostraram que a luz visível aumentou a eficiência catalítica dos bio-híbridos *A.niger*/NPs-AuPd de 60 para 99%. O bio-híbrido *A.niger*/NPs-AuPd razão molar [citrato]:[Au³⁺]=7,1 apresentou porcentagem de conversão = 60%, este valor está diretamente relacionado com a quantidade de NPs-AuPd que este fungo foi capaz de assimilar e também com o estado de agregação das NPs-Au previamente depositadas na superfície dos fungos, que corroboram com os cálculos de % atômica obtidos com o EDX. Um experimento controle submetendo os bio-híbridos a duas horas de agitação 1200 RPM em temperatura ambiente mostrou que estes materiais mantêm a sua estrutura microtubular e a estabilidade das NPs. Os bio-híbridos apresentaram elevada redução na eficiência catalítica após 4 ciclos de hidrogenação, o *P.macrosporus*/NPs-AuPd teve uma redução de 94,4%, o *Trichoderma sp*/NPs-AuPd 63,2%, o *Penicillium sp* 62,5% e o *Aspergillus niger* 98,7%.

ABSTRACT

Gold and palladium core-shell nanoparticles (AuPd-NPs) were obtained with the sequential reduction of the palladium chloride (PdCl₂) over filamentous fungi containing gold nanoparticles (Au-NPs) previously deposited on its surface. In this thesis, we investigated the synthesis and characterization of fungal decorated with AuPd-NPs formed by the fungus species *Phialomyces macrosporus*, *Trichoderma sp*, *Penicillium sp* and *Aspergillus niger*. Initially, tests were carried out to evaluate the applicability of these new materials to reactions of industrial interest such as the hydrogenation reaction of 2-methyl-3-buten-2-ol (MBE), the oxidation of crotyl alcohol and Suzuki's reaction between iodine-benzene and phenylboronic acid. From these tests it was found that *Trichoderma sp* [citrate]: [Au³⁺] = 2.0 presented 99% conversion to the hydrogenation of MBE using water and methanol as solvent, with this results the following applications studies of bio-hybrids were using the hydrogenation reaction of MBE. In the next step, MBE hydrogenation studies were performed using only water as solvent at room temperature. Tests in the dark and under visible light showed an increase of the catalytic efficiency of *A.niger* / NPs-AuPd bio-hybrids from 60 to 99%. The bio-hybrid *A.niger* / NPs-AuPd molar ratio [citrate]: [Au³⁺] = 7.1 showed conversion percentage = 60%, this value is directly related to the amount of NPs-AuPd this fungus was able to assimilate and also with the state of aggregation of the Au-NPs previously deposited on the surface of the fungi, which corroborate with the % atomic calculations obtained with EDX. A control experiment subjecting the bio-hybrids to two hours of stirring 1200 RPM at room temperature showed that these materials maintain their microtubular structure and the stability of the NPs. The bio-hybrids showed a high reduction in catalytic efficiency after 4 cycles of hydrogenation, *P.macrosporus* / NPs-AuPd showed 94.4% of reduction, *Trichoderma sp* / NPs-AuPd 63.2%, *Penicillium sp* 62.5% and *Aspergillus niger* 98.7%.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Esquema proposto para a formação do material híbrido Fungo@ NPs Au-Pd	25
Figura 02. Variação da dispersão (F) em função do número de átomos (n). Adaptado de Roduner, 2006b.....	29
Figura 03. Esquema que mostra a estabilização eletrostática de NPs. a) Íons podem adsorver na superfície das nanopartículas criando uma dupla camada elétrica que fornecem repulsões coulombicas evitando a agregação. b) Estabilização por efeito estérico que é obtida através da adsorção de longas cadeias de polímeros ou macromoléculas na superfície das nanopartículas. Adaptado de Aiken e Finke, 1999.....	31
Figura 04. Representação esquemática mostrando as etapas do processo de hidrogenação na presença de um catalisador. Perfil do mecanismo de Horiuti-Polanyi. Etapa 2, (a)→(b)→(c), é reversível. Átomos de paládio são representados por esferas de cor azul, átomos de carbono pelas esferas pretas, átomos de hidrogênio pelas esferas verdes e átomos de deutério são representados pelas esferas vermelhas. Fonte: Mattson <i>et al.</i> , 2013.....	33
Figura 05. Esquema mostrando uma das reações de acoplamento realizada por Suzuki-Miyaura, a qual foi realizada com um ácido organoborônico e haletos de arila catalisada por paládio, obtido da referência (MÜLLER).....	34
Figura 06. Esquema mostrando as etapas da reação de Suzuki (MÜLLER).....	35
Figura 07. Esquema representando a síntese do crotonaldeído à partir da oxidação seletiva catalítica do álcool crotilico, obtido da referência (LEE <i>et al.</i> , 2010).....	36
Figura 08. Representação esquemática de cortes transversais de alguns tipos de nanoligas bimetalicas: <i>core-shell</i> (a), <i>cluster</i> dividido (b), misturado (c), três camadas (d). Fonte: Ferrando <i>et al.</i> , 2008.....	38
Figura 09. Micrografias eletrônicas de varredura de microtubos porosos de ouro após o tratamento térmico em 350 °C (a), 450 °C (b) e 550 °C (c e d). Fonte: Rehman <i>et al.</i> , 2011.....	46
Figura 10. Micrografias eletrônicas de transmissão de cortes transversais do bio-híbrido <i>P.macrosporus</i> /Au-NPs cultivadas em soluções [Citrato]:[Au ³⁺] = (a-b) 0,3, (c) 2,0, (d) 7,1 e (e-f) 17,3. Fonte: Fontes <i>et al.</i> , 2014.....	48
Figura 11. Reação de hidrogenação no escuro e sob luz visível constituída por LEDs verdes (potência ≈500 mW).....	62
Figura 12. a) espectro Uv-Vis das NPs-Pd e b) fotografia digital mostrando aspecto da solução coloidal.	69
Figura 13. a) MET das NPs-Pd, razão [citrato]:[Pd ²⁺] = 2,0 e b) distribuição de tamanho de partículas processados pelo software ImageJ.....	70
Figura 14. MET do Fungo <i>Trichoderma sp</i> sem nanopartículas mostrando as organelas internas, o septo (indicado pela seta preta), bem como os vacúolos (indicado pela seta vermelha) nos aumentos de a) 12.000X e b) 20.000X.....	71

Figura 15. Micrografias eletrônicas de varredura dos híbridos <i>Trichoderma sp@NPs-Pd</i> [citrato]:[Pd ²⁺] = 0,3, modo elétron secundário e elétrons retroespalhado da esquerda para direita, no aumento de 2.000X.	73
Figura 16. a) Espectro UV-Vis antes e depois do cultivo do fungo <i>P. macrosporus</i> na solução contendo NPs-Pd, b) fotografia digital do bio-híbrido na solução de NPs-Pd [citrato]:[Pd ²⁺] = 3,7.	74
Figura 17. MET do bio-híbrido <i>P. macrosporus@NP-Pd</i> [citrato]:[Pd ²⁺] = 3,7 nos aumentos de a) 20.000X e b) 200.000X. c) Distribuição de tamanho de partículas pelo programa ImageJ, d) contagem de partículas gerado pelo programa.	75
Figura 18. Imagens de MET <i>P. macrosporus</i> [citrato]:[Pd ²⁺] = 7,1 nos aumentos a) 20.000X, b) 200.000X, c) 50.000X e d) 200.000X.	76
Figura 19. Espectro EDX e MEV do bio-híbrido <i>P. macrosporus@Pd</i> [citrato]:[Pd ²⁺] = 7,1.	77
Figura 20. MET do híbrido <i>Penicillium sp@ NPs-Pd</i> [citrato]:[Pd ²⁺] = 2,0 destacando a) corte longitudinal da hifa aumento 12.000X, b) região do citoplasma onde está o vacúolo 100.000X, c) região do citoplasma aumento de 200.000X, d) destaque para o vacúolo 300.000X e distribuição de tamanhos de partículas presentes no interior do vacúolo obtido pelo ImageJ.	78
Figura 21. Internalização de NPs poliméricas em fungos <i>A. oryzae</i> e nanopartículas aderidas em <i>A. nidulans</i> , obtido da referência (NOMURA <i>et al.</i> , 2016).	79
Figura 22. MET do bio-híbrido <i>Penicillium sp@NPs-Pd</i> [citrato]:[Pd ²⁺] = 3,7 (a-b); c) Solução coloidal de NPs-Pd contendo fragmentos do micélio e d) espectros UV-Vis da solução (controle) e da solução após o crescimento do fungo.	80
Figura 23. Imagens de MET do bio-híbrido <i>A. niger@NP-Pd</i> razões [citrato]:[Pd ²⁺] = a) 0,3; b) 2,0; c) 3,7; d) 3,7; e) 7,1 e f) espectro EDX do <i>A. niger@NP-Pd</i> [citrato]:[Pd ²⁺] = 7,1.	81
Figura 24. Quantidade de Au, Pd e Pt depositadas em diferentes espécies de fungos cultivados nas soluções com diferentes quantidades do íon citrato. Razões Metal:(Carbono + Metal) foram obtidos através da técnica de EDX.	82
Figura 25. Esquema mostrando a conversão do cis-2-buteno para butano-D ₂ através dos diferentes níveis em que o Hidrogênio pode interagir tanto na superfície quanto nas sub-superfícies das NPs-Pd facilitando a hidrogenação. Adaptado de Ludwig <i>et al.</i> , 2010.	85
Figura 26. MEV do bio-híbrido <i>Trichoderma sp@AuPdNP</i> , razões molares [citrato]:[Au ³⁺] = a) 0,3 e b) 2,0; nos aumentos de 10.000X (a-b) e 100.000X (a.1-b.1) e modo de elétrons secundários (a, a.1 e b). Modo de elétrons retroespalhados (b.1).	88
Figura 27 a) MEV de NPs-Pd e b) distribuição de tamanho de partículas. Fonte: Chen <i>et al.</i> , 2010.	89
Figura 28. MEV dos bio-híbridos <i>Trichoderma sp@NPs-AuPd</i> que foram testados em 2 horas de agitação a 30°C, razão molar [citrato]:[Au ³⁺] = 2,0.	91
Figura 29. MEV <i>Trichoderma sp@NPs-AuPd</i> [citrato]:[Au ³⁺] = 7,1, com destaque para as micro-películas formadas na superfície das NPs.	92

Figura 30. MEV bio-híbrido <i>Trichoderma sp</i> @NPs-AuPd com destaque para a morfologia das NPs-AuPd formadas.....	92
Figura 31. Espectros RMN-H do produto da reação de oxidação do álcool crofílico aplicando o bio-híbrido <i>Trichoderma sp</i> @NP-AuPd razão [citrato]:[Au ³⁺] = 2,0. As letras em azul identificam os hidrogênios indicados no espectro.	96
Figura 32. Esquema proposto para a formação do crotonaldeído na presença de bio-híbridos fungos@NPs-AuPd, a região marrom representa as NPs-AuPd e a região vermelha representa as NPs-Au. Adaptado de BALCHA <i>et al.</i> , 2011.	97
Figura 33. Espectros RMN-H do produto da reação de Suzuki (a), destacando o material de partida iodo-benzeno (b) na presença do bio-híbrido <i>Trichoderma sp</i> @NP-AuPd razão [citrato]:[Au ³⁺] = 2,0. As letras em azul identificam os hidrogênios indicados.....	98
Figura 34. Esquema proposto para a formação do bifênil através do ciclo catalítico de Suzuki, na presença de bio-híbridos fungos@NPs-AuPd, a região marrom representa as NPs-AuPd e a região vermelha representa as NPs-Au. Adaptado de Gjiri, 2016.	99
Figura 35. Espectros RMN-H do produto da reação de hidrogenação do álcool crofílico aplicando o bio-híbrido <i>Trichoderma sp</i> @NP-AuPd razão [citrato]:[Au ³⁺] = 2,0. As letras em azul identificam os hidrogênios indicados.....	101
Figura 36. Esquema proposto para a formação do 2-metil-butan-2-ol à partir da hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol na presença de bio-híbridos fungos@NPs-AuPd, a região marrom representa as NPs-AuPd e a região vermelha representa as NPs-Au. Adaptado da referência "Adition of hydrogen- hydrogenation".	102
Figura 37. Imagens MEV de alta resolução dos bio-híbridos fungos@NPs-AuPd formados pelas espécies a) <i>P.macrosporus</i> , b) <i>Trichoderma sp</i> , c) <i>Penicillium sp</i> e d) <i>Aspergillus niger</i> , [citrato]:[Au ³⁺] = 7,1. Estruturas características de cada espécie (a.1-d.1), detalhes da superfície recoberta com NPs-AuPd (a.2-d.2).	106
Figura 38. Porcentagem de conversão do MBE relacionado com as quatro espécies de fungo. Esta reação foi realizada no escuro, à temperatura ambiente.....	107
Figura 39. Porcentagem de conversão do MBE relacionado com as quatro espécies de fungo. Esta reação foi realizada na presença de luz visível (LED verde ≈500 mW de potência), o que faz aumentar a temperatura da reação para 30 °C.	108
Figura 40. Imagens de MEV comparando <i>P.macrosporus</i> [citrato]:[Au ³⁺] = 7,1, obtidas depois das reações de hidrogenação a) no escuro, b) na presença da luz visível. Modo de elétrons secundários (a.1-b.1), modo de elétrons retroespalhados (a.2-b.2).	110
Figura 41. Imagens de MEV comparando <i>A.niger</i> [citrato]:[Au ³⁺] = 7,1, obtidas depois das reações de hidrogenação a) no escuro, b) na presença da luz visível. Modo de elétrons secundários (a.1-b.1), modo de elétrons retroespalhados (a.2-b.2).	111
Figura 42. Imagens de MET dos bio-híbridos <i>A.niger</i> @ NPs-AuPd [citrato]:[Au ³⁺] = a) 0,3; b) 2,0; c) 3,7; d) 7,1 e e) 17,3, respectivamente são mostradas com detalhes as NPs-AuPd em 400.00X de aumento (a.1- e.1).	115

Figura 43. Estimativa indicando a porcentagem de tamanho de partículas acima de 30 nm de diâmetro, nas razões [citrato]:[Au ³⁺] = 0,3, 2,0, 3,7, 7,1, 17,1, estes cálculos foram realizados com análise de tamanho de partículas utilizando o programa Image].	116
Figura 44. Zoom das imagens de MET dos bio-híbridos <i>A.niger</i> @ NPs-AuPd [citrato]:[Au ³⁺] = d) 7,1 e e) 17,3, vide Figura 42.....	119
Figura 45. Esquema representando o mecanismo de formação das NPs bimetálicas depositadas em regiões externas e internas da parede celular. Partículas formadas nas regiões mais internas estão completamente estabilizadas por grupos funcionais presentes nas microfibras da parede do fungo, no entanto, partículas formadas nas regiões mais externas à parede não foram eficientemente estabilizadas por estas microfibras, fazendo seu tamanho aumentar.....	120
Figura 46. Imagens MET do bio-híbrido <i>A.niger</i> @ NPs-AuPd [citrato]:[Au ³⁺] = a) 7,1; b) 7,1 e c) 0,3 e seus respectivos EDX (a.1-c.1).	121
Figura 47. Imagens de MEV dos bio-híbridos <i>A.niger</i> @NPs-AuPd [citrato]:[Au ³⁺] = a) 0,3; b) 2,0; c) 3,7; d) 7,1 e e) 17,3, detalhe da superfície do <i>A.niger</i> @ NPs-AuPd [citrato]:[Au ³⁺] = 7,1 é mostrado em f).....	122
Figura 48. Análise semi-quantitativa de Au e Pd depositadas bio-híbridos <i>A.niger</i> @ NPs-AuPd [citrato]:[Au ³⁺] = 0,3; 2,0; 3,7; 7,1 e 17,3, Razão Metal:(Carbono + Metal) foram obtidos através da técnica de EDX acoplado ao MEV.	123
Figura 49. Padrões de DRX dos bio-híbridos <i>A.niger</i> @NPs-AuPd, [citrato]:[Au ³⁺] = 7,1 com destaque para os planos 111 do Au e Pd.	124
Figura 50. a) Análise termogravimétrica do fungo sem NPs e do bio-híbrido <i>A.niger</i> @NPs-AuPd, [citrato]:[Au ³⁺] = 0,3. b) porcentagem em massa dos fungos que foram calcinados com a análise térmica.	125
Figura 51. Efeito da concentração dos íons citrato na conversão do 2-metil-3-buten-2-ol (MBE) avaliando-se os bio-híbridos <i>A.niger</i> @NPs-AuPd.	127
Figura 52. Imagens de MEV do bio-híbrido <i>A.niger</i> @NPs-AuPd [citrato]:[Au ³⁺] = 7,1 depois de 2 horas de reação de hidrogenação do MBE, utilizando água como solvente, agitação a 1200 RPM em temperatura ambiente.	128
Figura 53. Bio-híbridos <i>P.macrosporus</i> , <i>Trichoderma sp</i> , <i>Penicillium sp</i> e <i>Aspergillus niger</i> , cultivados na razão [citrato]:[Au ³⁺] = 2,0 em de 4 ciclos de utilização.....	131
Figura 54. MEV do bio-híbridos <i>P.macrosporus</i> @NPs-AuPd cultivado na razão [citrato]:[Au ³⁺] = 2,0, depois de 4 ciclos de utilização.	132
Figura 55. MEV do bio-híbrido <i>Trichoderma sp</i> @ NPs-AuPd cultivados na razão [citrato]:[Au ³⁺] = 2,0 depois de 4 ciclos de utilização.	133
Figura 56. Análise de tamanho de partículas das soluções NPs-Au(a), NPs-Pd (e) e NPs-AuPd (d), estabilizadas com íons citrato, razão [citrato]:[Au ³⁺] =0,3 Análises realizadas no CETENE.....	152

Figura 57. MEV do bio-híbrido <i>Trichoderma sp@AuPd</i> NP, razões molares [citrato]:[Au ³⁺] = a) 0,3; b) 2,0; c) 3,7; d) 7,1 e e) 17,3, nos aumentos de 10.000X (a-e) e 100.000X (a.1-e.1 e a.2-e.2). Modo de elétrons secundários (a.1-e.1) e modo de elétrons retroespalhados (a.2-e.2).....	153
Figura 58. Espectro RMN-H obtido com a hidrogenação do MBE após 30 minutos de reação na presença do bio-híbrido <i>Trichoderma sp@NPs-AuPd</i> [citrato]:[Au ³⁺] = 2,0 utilizando metanol e água como solvente.....	154
Figura 59. Imagens de MEV comparando <i>Trichoderma sp@NPs-Pd</i> [citrato]:[Au ³⁺] = 7,1, obtidas depois das reações de hidrogenação a) no escuro, b) na presença da luz visível. Modo de elétrons secundários (a.1-b.1), modo de elétrons retroespalhados (a.2-b.2).....	155
Figura 60. <i>Trichoderma sp@NPs-Pd</i> [citrato]:[Au ³⁺] = 7,1 depois da hidrogenação em presença da luz visível. Modo elétrons retroespalhados.	155
Figura 61. Imagens de MEV comparando <i>Penicillium sp@NPs-Pd</i> [citrato]:[Au ³⁺] = 7,1, obtidas depois das reações de hidrogenação a) no escuro, b) na presença da luz visível. Modo de elétrons secundários (a.1-b.1), modo de elétrons retroespalhados (a.2-b.2).	156
Figura 62. MEV do bio-híbrido <i>Penicillium sp@ NPs-AuPd</i> cultivados na razão [citrato]:[Au ³⁺] = 2,0 depois de 4 ciclos de utilização.	156
Figura 63. MEV do bio-híbrido <i>A.niger@NPs-AuPd</i> cultivados na razão [citrato]:[Au ³⁺] = 2,0 depois de 4 ciclos de utilização.	157
Figura 64. DTG do bio-híbrido <i>A.niger@NPs-AuPd</i> [citrato]:[Au ³⁺] e do fungo <i>A.niger</i> obtidos no pelo software origin.....	157
Figura 65. Avaliação cinética da redução do p-nitrofenol através de UV-Vis. a) <i>A.niger@NPs-AuPd</i> , b) NPs-Pd, c) NPs-Au e d) cinética da reação pseudo-primeira ordem avaliando o pico em 400nm do p-nitrofenol.	158
Figura 66. Avaliação da taxa de redução máxima do p-nitrofenol utilizando o bio-híbrido <i>A.niger @NPs-AuPd</i> nas razões [citrato]:[Au ³⁺] = 0,3, 2,0, 3,7, 7,1, 17,3.	158
Figura 67. Espectros de RMN das reações de oxidação do álcool crotilico (a), reação de Suzuki (b), e hidrogenação do MBE(c) na presença do bio-híbrido <i>Trichoderma sp @ [citrato]:[Au³⁺] = 2,0</i> , estes espectros foram obtidos a cada 30 minutos de reação que se completaram em 3h.....	159
Figura 68. Espectros de RMN da reação de hidrogenação do MBE na presença do <i>A niger@NPs-AuPd</i> [citrato]:[Au ³⁺] = 7,1 no escuro (a) e sob luz visível(b). Estes espectros foram obtidos a cada 20 minutos de reação que se completou em 2h.	160
Figura 69. Espectros de RMN da reação de hidrogenação do MBE na presença do <i>A niger@NPs-AuPd</i> [citrato]:[Au ³⁺] = 7,1. Estes espectros foram obtidos a cada 20 minutos de reação que se completou em 2h.....	161
Figura 70. Espectros de RMN da reação de hidrogenação do MBE na presença do <i>Trichoderma sp@NPs-AuPd</i> [citrato]:[Au ³⁺] = 2,0. Estes espectros foram obtidos a cada 20 minutos de reação que se completou em 2h, depois de quatro ciclos de utilização do bio-híbrido.....	161

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Reações catalisadas por NPs-Pd de interesse deste trabalho.....	32
Tabela 02. Materiais e reagentes para cada etapa deste trabalho de pesquisa.....	55
Tabela 03. Condições de operação do DRX.....	59
Tabela 04. Métodos de caracterização utilizados.	60
Tabela 05. Crescimento dos fungos nas suspensões contendo diferentes razões [citrato]:[Pd ²⁺].	72
Tabela 06. Reagentes, produtos e porcentagem de conversão na presença do catalisador bio-híbrido <i>Trichoderma</i> sp@NP-AuPd razão [citrato]:[Au ³⁺] = 2,0.....	94
Tabela 07. Massas dos bio-híbridos utilizadas para o TG.....	126
Tabela 08. pH das soluções contendo NPs-Pd antes e depois do crescimento fúngico.	152
Tabela 09. pH das soluções contendo NPs-Pt antes e depois do crescimento fúngico.	152

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NPs - nanopartículas

@NPs-AuP – Denominação utilizada para indicar que à esquerda do símbolo @ foi o material localizado na parte interna que sofreu deposição pelas NPs. E à direita do símbolo @ têm-se os materiais que estão na superfície, neste caso são as NPs metálicas. É uma adaptação à simbologia utilizada para representar estruturas do tipo caroço@casca (YAN *et al.*, 1991).

NPs-M – nanopartículas metálicas

NPs-Au – nanopartículas de ouro

NPs-Pd – nanopartículas de paládio

NPs-Pt – nanopartículas de platina

NPs-AuPd – nanopartículas bimetálicas de ouro e paládio

MTs-Au- microtubos de ouro

sp – espécie de fungo onde a taxonomia ainda não está completamente descrita

MBE – 2-metil-3-buten-2-ol; MBA – 2-metil-butan-2-ol

RMN-H- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MET – microscopia eletrônica de transmissão

EDX/EDS – espectroscopia por energia dispersiva de raios-X

DRX – difração de raios-X

RPM – rotações por minuto

LED – diodo emissor de luz

mW – mili watt

Uv-Vis – Ultravioleta –visível

UFBA – Universidade Federal da Bahia

UNEB – Universidade do Estado da Bahia

USASK – University of Saskatchewan

SERS - Surface Enhanced Raman Scattering (efeito da intensificação de espalhamento por meio de superfície)

DNA – Ácido desoxiribonucleico

BDA- batata, dextrose e ágar

LBQM 01- *P.macrosporus*

LBQM 02- *Trichoderma sp*

LBQM 07- *Penicillium sp*

LBQM 67- *Aspergillus niger*

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	22
1.1 ESTUDOS ANTERIORES E MOTIVAÇÃO DESTE TRABALHO.....	22
2.0 OBJETIVOS	27
2.1 GERAIS	27
2.2 ESPECÍFICOS	27
3.0 REVISÃO DE LITERATURA	28
3.1 PROPRIEDADES DAS NPs-Pd	28
3.1.1 Efeitos de superfície	28
3.1.2 Estabilidade das nanopartículas.....	30
3.1.3 Aplicações das NPs-Pd na catálise.....	31
3.1.4 Hidrogenação de alcenos	32
3.1.5 Reação de Suzuki.....	34
3.1.6 Oxidação de alcoóis.....	35
3.2 NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS.....	37
3.2.1 Aplicações das NPs-AuPd na catálise	39
3.3 INTERAÇÕES ENTRE METAIS E MICRORGANISMOS E SUAS PRINCIPAIS APLICAÇÕES.....	41
3.3.1 O uso de microrganismos como “biotemplates” para deposição de NPs metálicas	41
3.3.2 Fungos filamentosos como <i>templates</i> para automontagem de nanopartículas metálicas	43
4.0 PARTE EXPERIMENTAL	51
4.1 PROCEDIMENTOS PARA SÍNTESE DO BIO-HÍBRIDO	51
4.1.1 Cultivo dos fungos para síntese do bio-híbrido fungo@NP-Au	51
4.1.2 Cultivo dos fungos filamentosos e pré-adaptação em íons citrato.....	52
4.1.3 Síntese das nanopartículas de ouro, paládio e platina e bio-híbridos fungos@NP-Au	52
4.1.4 Síntese dos bio-híbridos fungos@NPs-AuPd.....	53
4.1.5 Secagem dos bio-híbridos por ponto crítico	54
4.1.6 Experimental	55
4.2 MÉTODOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS DE ANÁLISE	56
4.2.1 Técnicas de caracterização das NPs em solução.....	56
4.2.2 Técnicas de caracterização dos bio-híbridos.....	57

4.2.3 Testes catalíticos	59
4.2.4 Medidas de RMN-H	60
4.3 APLICAÇÃO CATALÍTICA DOS BIO-HÍBRIDOS FUNGOS@NPs-AuPd	61
4.3.1 Reações de hidrogenação	61
4.3.2 Reação de oxidação.....	64
4.3.3 Reação de Suzuki.....	64
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	65
5.1 FUNGOS@NPs-Pd, INTERNALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS (BIOACUMULAÇÃO) X TOXICIDADE	66
5.1.1 Resultados e discussão.....	68
5.2.2 Considerações finais.....	83
5.2 CATALISADORES BIO-HÍBRIDO FUNGOS@NPs-AuPd.....	84
5.2.1 Resultados e discussão.....	87
5.2.2 Espectros RMN-H	95
5.2.3 Considerações finais.....	103
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ESPÉCIE FÚNGICA E DA APLICAÇÃO DA LUZ VISÍVEL NA HIDROGENAÇÃO CATALÍTICA DO 2-METIL-3-BUTEN-2-OL APLICANDO BIO-HÍBRIDOS FUNGOS@NPs-AuPd	104
5.3.1 Resultados e discussão.....	105
5.3.2 Considerações finais.....	112
5.4 ESTUDO DO EFEITO DOS ÍONS CITRATO PARA O ESTADO DE AGREGAÇÃO DAS NPs-AuPd E SUA INFLUÊNCIA NA HIDROGENAÇÃO CATALÍTICA DO 2-METIL-3-BUTEN-2-OL UTILIZANDO O BIO-HÍBRIDO <i>ASPERGILLUS NIGER</i>@NPs-AuPd	113
5.4.1 Resultados e discussão.....	113
5.4.2 Considerações finais.....	129
5.5 RECICLAGEM DOS BIO-HÍBRIDOS FUNGOS@NPs-AuPd	130
5.5.1 Resultados e discussão.....	131
5.6.2 Considerações finais.....	134
6.0 CONCLUSÕES GERAIS	135
7.0 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	136

REFERÊNCIAS	137
APÊNDICE.....	151
APÊNDICE A) Análise de tamanho de partículas por espalhamento de luz das soluções.....	152
APÊNDICE B) pH das soluções contendo NPs metálicas em que os fungos foram cultivados.....	152
APÊNDICE C) MEV do bio-híbrido <i>Trichoderma sp</i> @NPs-AuPd razões [citrato]:[Au ³⁺] = 0,3, 2,0, 3,7, 7,1 e 17,3.....	153
APÊNDICE D) Cálculo da taxa de conversão das reações.....	154
APÊNDICE E) Aplicação da luz visível para o aumento da cinética de hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol (MBE) utilizando bio-híbrido fungos@AuPd como catalisadores	155
APÊNDICE F) Reciclagem dos bio-híbridos fungos@AuPd	156
APÊNDICE G) DTG dos bio-híbridos.....	157
APÊNDICE H) Aplicações dos bio-híbridos fungos @AuPd para a redução do 4-nitrofenol	158
APÊNDICE I) Espectros de RMN-H.....	159

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 ESTUDOS ANTERIORES E MOTIVAÇÃO DESTE TRABALHO

Através de estudos anteriores (FONTES, 2012; FONTES *et al.*, 2014), foi possível constatar que fungos da espécie *P.macrosporus*, *Trichoderma sp*, *Penicillium sp* e *Aspergillus niger* cultivados em soluções contendo NPs-Au foram capazes de assimilar estas NPs em sua parede celular. Verificou-se que o citrato apresentou um papel fundamental como estabilizante das NPs-Au, como fonte de carbono para os fungos e também como um agente modulador para o estado de agregação das NPs-Au sobre os microrganismos.

Assim, através da modificação da concentração de íons citrato na solução contendo NPs-Au, variando a razão molar [citrato]:[Au³⁺] = 0,3; 2,0; 3,7; 7,1; 17,3, foi possível modular a força iônica do meio e a dupla camada elétrica na superfície das NPs-Au (FONTES *et al.*, 2014). Devido à fraca interação entre os íons citrato e as NPs-Au, supôs-se que componentes presentes na parede celular (aminoácidos, cadeias de polissacarídeos e β-glucanas) deslocaram os íons citrato que não foram consumidos pelos fungos durante o seu crescimento, ligando-se diretamente na superfície das NPs. Desta maneira, NPs-Au permaneceram estabilizadas estericamente pelos biopolímeros presentes na parede celular durante os processos fisiológicos.

Nas soluções com baixas concentrações de íons citrato ([citrato]:[Au³⁺] = 0,3; 2,0), o crescimento do fungo provocou a exaustão destes íons próximos a parede celular, causando desestabilização elétrica das NPs-Au, as quais permaneceram espaçadas mesmo após deposição na parede do fungo (SUGUNAN, MELIN, SCHNÜRER, *et al.*, 2007; FONTES *et al.*, 2014).

No entanto, híbridos cultivados em soluções apresentando concentrações mais altas de íons citrato mostraram uma densa camada metálica, com NPs-Au interconectadas sobre o microrganismo. Sob estas circunstâncias, o aumento da força

iônica conduz a contração da dupla camada elétrica das NPs-Au, reduzindo a repulsão eletrostática entre as partículas, a qual usualmente é acompanhada pela desestabilização de NPs (CHE MAN *et al.*, 2014). Durante o crescimento dos fungos em soluções com força iônica elevada, o componente metálico formou aglomerados aprisionados nos constituintes da parede celular (FONTES *et al.*, 2014).

Além disso, os bio-híbridos quando calcinados até 800 °C formam MTs-Au com a imitação fiel da morfologia dos fungos após serem completamente degradados (FONTES *et al.*, 2014). Contudo, estes microtubos formados por ouro e mesmo quando em forma de NPs-Au encontram limitações para a aplicação na catálise. O ouro em sua forma massiva (bulk) é quimicamente inerte, e as NPs-Au apresentam aplicações catalíticas apenas quando seu tamanho se encontra abaixo de 5 nm (HARUTA *et al.*, 1987; HARUTA, 2003; HVOLBÆK *et al.*, 2007).

No entanto, estudos utilizando as NPs-Pd vêm sendo bem mais aplicadas como catalisadores eficientes para diferentes tipos de reações, tais como Suzuki (PÉREZ-LORENZO, 2012), Heck (CHANDRASEKHAR E NARAYANAN, 2011), para reações de oxidação de alcoóis (MIFSUD *et al.*, 2010), reações de hidrogenação (NIU *et al.*, 2001), principalmente por não apresentarem limitações de tamanhos para suas aplicações na catálise, contrariamente do que ocorre com as NPs-Au.

Assim, a idéia proposta foi obter bio-híbridos formados por NPs-Pd para aplicá-los em reações de catálise. No entanto, as NPs-Pd apresentam efeito tóxico para microrganismos (BIGALL *et al.*, 2008). Por exemplo, através de testes de inibição realizados com a bactéria *S. aureus* utilizando soluções de concentração 10^{-9} M, Adams *et al.*, 2014 reportaram que NPs-Pd com tamanhos 2,5 nm e 3,1 nm inibiram significativamente o crescimento da *S. aureus*.

Os fungos selecionados mostrados nesta tese apresentaram inibição em seu crescimento quando foram cultivados em soluções contendo NPs-Pd. As imagens MEV e MET revelaram que houve assimilação interna destas NPs pela espécie

Penicillium sp. Além disso, depois do cultivo dos fungos em NPs-Pd foi verificada a presença de enxofre principalmente nas espécies *P.macrosporus* e *A.niger*, provavelmente proveniente da parede celular (JOHNSTON, 1965) ou do metabolismo fúngico (MYUNG *et al.*, 2008). O enxofre é considerado um contaminante potencial para catalisadores de Pd (ANGELES-WEDLER *et al.*, 2008).

Assim, com o intuito de obter bio-híbridos revestidos com paládio, mas sem perder as características dos fungos filamentosos como suporte biológico (tais como uniformidade das hifas, estruturas de reprodução e formas estruturais únicas, sua ampla versatilidade e diversas vantagens de aplicações) (PELCZAR JR, 2005; BIGALL *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2016). A idéia de utilizar as NPs-Au como um “revestimento protetor” para os fungos e depois depositá-los com NPs-Pd foi então aplicada como uma maneira de evitar a inibição do crescimento dos fungos e sobrepor à baixa assimilação destes pelas NPs-Pd, bem como evitar contaminação por enxofre proveniente dos fungos. Uma nova metodologia de síntese para a obtenção de bio-híbridos bimetálicos foi então desenvolvida, e estes materiais foram aplicados em diferentes tipos de reações para estudos da cinética e catálise envolvida.

Neste trabalho então, propôs-se a) cultivo de fungos em solução de NPs-Au; b) redução seqüencial de NPs-AuPd utilizando redutor fraco (ácido ascórbico); c) produção de NPs-AuPd na superfície de fungos filamentosos que são bastante ativas cataliticamente, fato inédito; d) caracterização dos bio-híbridos e e) testes catalíticos.

A aplicação de NPs em solução ainda permanece limitada pelas dificuldades de separá-las do seu meio, por isso as aplicações das mesmas em sua maioria requerem a utilização de superestruturas como suportes (BIGALL, 2010). Atualmente, diferentes tipos de abordagens que envolvem a utilização de microrganismos incluindo fungos como suportes biológicos para a deposição de diferentes tipos de nanopartículas têm sido aplicados. Por exemplo, os fungos podem

servir como suporte para deposição de NPs tais como polianilina (WANG *et al.*, 2015), politiofeno (LIU *et al.*, 2008), e serem aplicadas de diferentes maneiras como eletrodos, sensores (SHARMA e SRIVASTAVA, 2013), e como catalisadores. Esta ultima abordagem vem sendo bastante investigada (BIGALL *et al.*, 2008).

Os bio-híbridos bimetálicos fungos@NPs-AuPd foram sintetizados primeiramente através da metodologia já desenvolvida pelo nosso grupo nas razões molares [citrato]:[Au³⁺] = 0,3; 2,0; 3,7; 7,1; 17,3 e em seguida fungos contendo NPs-Au foram aplicados como precursores para a deposição das NPs-Pd (Figura 01). Esta deposição foi efetuada seguindo metodologia análoga a de Balcha *et al.*, 2011, com algumas modificações. Os bio-híbridos foram caracterizados por MEV-EDX, MEV de alta resolução, MET-EDX, DRX e TG, além disso, foram aplicados em diferentes tipos de reações como reação de Suzuki, oxidação e hidrogenação.

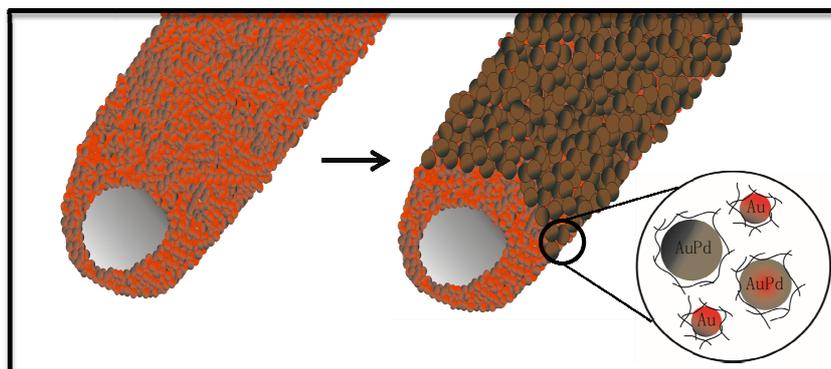


Figura 01. Esquema proposto para a formação do material híbrido Fungo@NPs Au-Pd

Parte da motivação deste trabalho teve origem no fato de que os estudos e aplicações de materiais bio-híbridos ainda é uma área pouco explorada no país. A importância no controle da deposição de NPs nestes materiais é um fator preponderante para evitar desperdícios de reagentes. Estudos de reutilização destes bio-híbridos também foram realizados e propriedades catalíticas dos bio-híbridos puderam ser moduladas de acordo com a quantidade de metal depositada.

Esta tese de doutorado foi dividida basicamente em seis partes principais. O capítulo 3 é constituído por uma revisão de literatura sobre NPs-Pd, NPs-AuPd, suas propriedades e principais aplicações e também se destaca os materiais bio-híbridos formados por fungos e NPs, suas propriedades e principais aplicações na catálise. No capítulo 4 tem-se a parte experimental, os procedimentos, equipamentos utilizados para as caracterizações. O capítulo 5 apresenta os resultados e discussões, está subdividido em 5 seções seguindo uma ordem cronológica dos experimentos, apresentando fundamentos e discussões que se complementam a cada seção. O capítulo 6 descreve sugestões para trabalhos futuros.

2.0 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Demonstrar a viabilidade de formação dos bio-híbridos fungos filamentosos/NPs bimetálicas AuPd, sua caracterização rigorosa e posterior estudo catalítico de algumas reações de interesse industrial como as reações de hidrogenação e oxidação de álcoois, e reação de Suzuki.

2.2 ESPECÍFICOS

- Sintetizar NPs-Au variando a concentração de íons citrato nas razões molares [citrato]:[Au³⁺] = 0,3; 2,0; 3,7; 7,1; 17,3;
- Sintetizar NPs-AuPd através da redução seqüencial com algumas modificações da metodologia de Balcha *et al.*, 2011;
- Analisar morfologicamente as espécies de fungos e avaliar o estado de agregação das NPs na parede celular dos mesmos através de MEV e MET.
- Estimar via análise semi-quantitativa os metais ouro e paládio presentes via EDX;
- Analisar o comportamento térmico das amostras contendo NPs-Au e Pd;
- Aplicar os bio-híbridos nas reações de hidrogenação e oxidação de álcoois, na reação de Suzuki e verificar em qual das reações o material híbrido é mais efetivo, correlacionando a sua efetividade com a quantidade de ouro e paládio presente nestes materiais;
- Verificar a eficiência catalítica quanto as i) espécies de fungos aplicadas ii) variação das razões molares [citrato]:[Au³⁺] = 0,3; 2,0; 3,7; 7,1; 17,3; como uma função da afinidade dos fungos pelas NPs-Au e Pd;
- Analisar a eficiência de reciclabilidade dos bio-híbridos.

3.0 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PROPRIEDADES DAS NPs-Pd

O paládio é um importante catalisador para uma ampla variedade de processos industriais (COTTON, 1997). O desenvolvimento de catalisadores que apresentem elevado desempenho tem sido requerido devido ao crescente aumento da demanda de novos materiais, e como resultado, sínteses que controlam a forma e o tamanho das partículas tem sido investigadas (CHEONG *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2015).

Particularmente, NPs-Pd apresentam propriedades importantes e vem desempenhando importante papel dentro de uma ampla faixa de aplicações na catálise, eletrônica, produção de energia, síntese química, e limpeza do ambiente (JANA *et al.*, 2001; BARNARD *et al.*, 2005; MANOCCHI *et al.*, 2010).

As variações nas propriedades físico-químicas que surgem em função do tamanho e da forma das partículas de paládio em nanoescala são provenientes principalmente dos efeitos de superfície, do seu baixo número de coordenação e da estabilidade das NPs (RODNER, 2006a; SAU *et al.*, 2010).

3.1.1 Efeitos de superfície

As NPs apresentam elevada reatividade porque uma proporção de átomos relativamente alta está presente em sua superfície enquanto que em uma partícula grande a maioria dos átomos ocupa o volume interno. A influência dos efeitos de superfície nas NPs é um fator significativamente maior comparada com aquelas partículas do material massivo (BEJ *et al.*, 2016).

Os efeitos de superfície dependem da fração de átomos na superfície, conhecida como dispersão (simbolizada pela letra F na Figura 02) que é medida em função da área superficial dividida pelo volume da NP (RODNER, 2006b). Os

átomos presentes da superfície de uma partícula possuem menos vizinhos diretos que os átomos internos da matéria estendida (*bulk*). Além disso, partículas com maior fração de átomos na superfície possuem menor número de coordenação (o qual está relacionado com o número de átomos vizinhos). Já os átomos no interior da matéria estendida (*bulk*) são mais altamente coordenados, formam mais ligações e são mais estáveis que aqueles encontrados na superfície (RODUNER, 2006b).

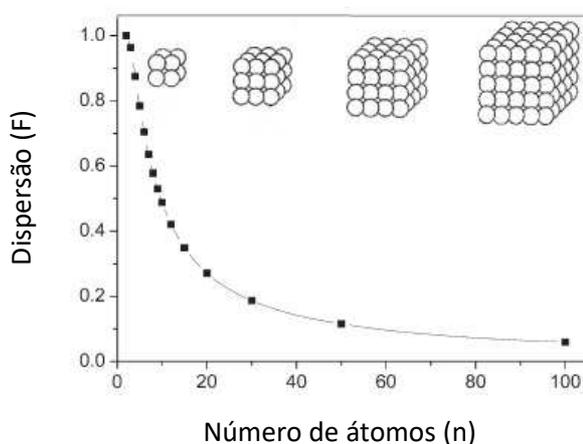


Figura 02. Variação da dispersão (F) em função do número de átomos (n). Adaptado de Roduner, 2006b.

Analisando a Figura 02, para uma partícula cúbica hipotética, verifica-se que a dispersão (F) diminui à medida que aumenta o número de átomos do material; os átomos dos vértices são menos saturados que aqueles das arestas, seguido daqueles da superfície plana e os completamente saturados estão presentes no interior da partícula. Por causa disso, os vértices dos átomos apresentam maior afinidade pelas moléculas adsorvidas, seguidos daqueles das arestas e por último das superfícies planas, apresentando propriedades que são bastante importantes para reações catalíticas (RODUNER, 2006b).

A maior razão superfície por volume das NPs comparadas com seus correspondentes massivos tem atraído elevada atenção para as suas aplicações catalíticas, porque uma menor quantidade de materiais pode ser utilizada, e um aumento da atividade catalítica pode ser atingido para uma mesma massa de

material (AN e SOMORJAI, 2012; HAGEN, 2015c). Além dos efeitos de tamanho, as formas das NPs também são importantes para o desempenho catalítico, o qual tem sido reportado ser altamente dependente dos planos cristalográficos presentes na superfície das NPs (TANAKA *et al.*, 2011). A cristalinidade do metal determina o número de sítios catalíticos por unidade de área da superfície, a qual por sua vez governa a atividade catalítica (BEJ *et al.*, 2016). Os planos (111) presentes nas superfícies das NPs -Pd são os mais ativos cataliticamente (NARAYANAN e EL-SAYED, 2005).

3.1.2 Estabilidade das nanopartículas

As propriedades do material a ser obtido são dependentes da forma e da distância de interação entre as NPs, que é dada em função das características do estabilizante (LINK e EL-SAYED, 2003).

Devido a sua baixa estabilidade dificilmente estas NPs encontram-se isoladas (HALPERIN, 1986). É necessária uma estabilização extra (NAGARAJAN e HATTON, 2008), para manter as NPs distantes umas das outras, e assim obter um controle rigoroso sobre a dispersão do meio. A passivação ou estabilização das nanopartículas pode ser efetuada pelos seguintes mecanismos: carregando-as eletricamente de maneira uniforme ou incorporando-as em uma matriz para evitar processos de agregação física e reatividade química (NAGARAJAN e HATTON, 2008).

A estabilização eletrostática [Figura 03 (a)] de uma solução coloidal de nanopartículas é descrita pela teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), a qual retrata que a estabilidade do sistema é determinada pelo balanço entre as forças atrativas de van der Waals e repulsivas eletrostáticas (MURCIA e NAUMANN, 2007). Dessa forma, as NPs se mantêm estáveis se a intensidade das forças eletrostáticas repulsivas for maior que a intensidade da força atrativa de van der Waals, ou seja, as nanopartículas não se agregam se possuírem uma densidade de carga suficiente em sua superfície (MURCIA e NAUMANN, 2007).

Por outro lado, quando as NPs são incorporadas em uma matriz como biopolímeros ou dendrímeros, ocorre estabilização por efeito estérico [Figura 03 (b)] (SPERLING e PARAK, 2010). As camadas poliméricas, macromoléculas ou tensoativos não iônicos adsorvidos na superfície, promove a repulsão inter-partícula através do efeito estérico. Em alguns casos são utilizados os polieletrólitos que podem estabilizar as NPs tanto pelo efeito repulsivo das cargas como também por efeito estérico (PETER *et al.*, 2002; MURCIA e NAUMANN, 2007).

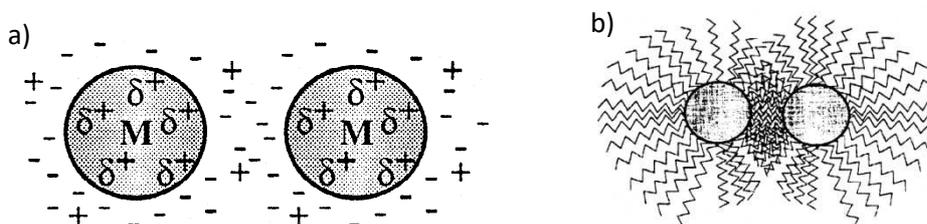


Figura 03. Esquema que mostra a estabilização eletrostática de NPs. a) Íons podem adsorver na superfície das nanopartículas criando uma dupla camada elétrica que fornecem repulsões coulombicas evitando a agregação. b) Estabilização por efeito estérico que é obtida através da adsorção de longas cadeias de polímeros ou macromoléculas na superfície das nanopartículas. Adaptado de Aiken e Finke, 1999.

No entanto, para o estudo em aplicações catalíticas, quanto maior a passivação das NPs promovidas por agentes estabilizantes, uma menor fração da sua superfície estará disponível para as reações resultando numa redução da sua atividade catalítica (LI e EL-SAYED, 2001).

3.1.3 Aplicações das NPs-Pd na catálise

Nanopartículas de paládio tem recebido atenção particular devido à notável eficácia deste metal como catalisador, por exemplo, para reações de hidrogenação (DOYLE *et al.*, 2003; BENNETT *et al.*, 2010; LUDWIG *et al.*, 2011a), oxidação de alcoóis (LEE *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2016), Suzuki (NARAYANAN e EL-SAYED, 2005; GU *et al.*, 2015). Na Tabela 01 são mostradas as três reações que foram aplicadas neste trabalho.

Tabela 01. Reações catalisadas por NPs-Pd de interesse deste trabalho.

Reagente	Produto	tipo de reação
		Oxidação do álcool crofílico
		Reação de acoplamento Suzuki-Miyaura
		Reação de Hidrogenação do MBE

3.1.4 Hidrogenação de alcenos

Segundo Horiuti e Polanyi, 1934, o processo de hidrogenação catalítica é bimolecular, resultante de uma abordagem estatisticamente independente de dois átomos de hidrogênio. Os processos essenciais que ocorrem são: a) dissociação do hidrogênio na superfície do metal, ou quimissorção do hidrogênio molecular produzindo átomos de hidrogênios adsorvidos; b) adsorção do alceno, em que ocorre a quimissorção da dupla ligação na superfície acompanhada pela abertura da dupla ligação e formação de duas novas ligações com o catalisador; c) subsequente adição do hidrogênio ao alceno, onde ocorre a transferência de átomos de hidrogênio para um dos átomos de carbono do hidrocarboneto adsorvido formando um estado meio-hidrogenado, seguido por remoção do átomo de hidrogênio do carbono no estado meio hidrogenado conduzindo a substituição ou subsequente ligação do átomo de hidrogênio ao outro átomo de carbono e, finalmente, d) dessorção do produto, um alceno (DOYLE *et al.*, 2003).

A Figura 04 mostra com detalhes as etapas do processo de hidrogenação do C₂H₄ na presença de catalisador de paládio. D₂ foi utilizado no lugar de H₂. Em

vermelho, tem-se os átomos de deutério presentes no paládio (catalisador, cor azul). Na etapa 1, eteno se liga ao paládio pela combinação de elétrons π doadores para um único átomo de paládio e ligações sigma nos dois átomos de paládio que estão próximos. Ao contrário do hidrogênio, eteno pode ligar-se apenas na superfície do paládio. Na etapa 2, um átomo de deutério (ou hidrogênio) forma uma ligação sigma com C2 enquanto C1 forma uma ligação sigma com o paládio, (a) \rightarrow (b) \rightarrow (c). Esta etapa é reversível, (c) \rightarrow (b) \rightarrow (a) onde ocorrem múltiplas trocas hidrogênio-deutério (D-H). Quando a reação reversível (c) \rightarrow (b) ocorre, há uma maior probabilidade de um átomo de hidrogênio ser transferido para o paládio, em vez do átomo de deutério. Na etapa 3, a fração do σ -etil-Pd sofre uma eliminação redutiva irreversível com um átomo de D ou H, (c) \rightarrow (d) \rightarrow (e) (MATTSON *et al.*, 2013).

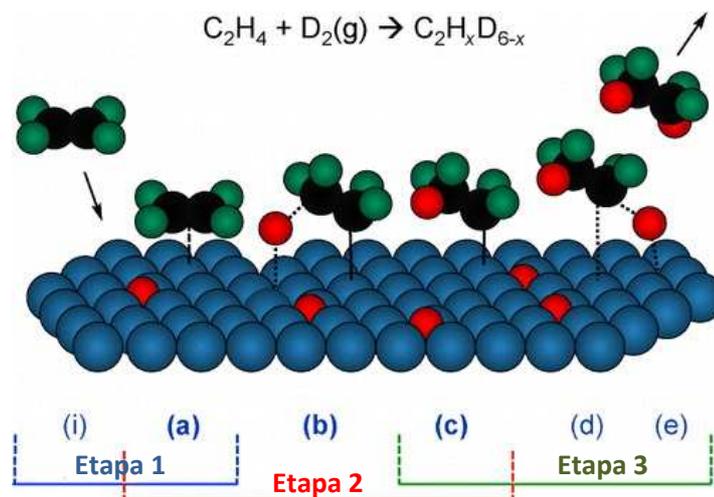


Figura 04. Representação esquemática mostrando as etapas do processo de hidrogenação na presença de um catalisador. Perfil do mecanismo de Horiuti-Polanyi. Etapa 2, (a) \rightarrow (b) \rightarrow (c), é reversível. Átomos de paládio são representados por esferas de cor azul, átomos de carbono pelas esferas pretas, átomos de hidrogênio pelas esferas verdes e átomos de deutério são representados pelas esferas vermelhas. Fonte: Mattson *et al.*, 2013.

3.1.5 Reação de Suzuki

Reações de acoplamento cruzado ou cross-coupling catalisadas por paládio apresentam elevada importância para a formação de ligações C-C. Dentre estas, a reação de Suzuki, descoberta por Akira Suzuki laureado prêmio Nobel em 2010 (MIYAURA e SUZUKI, 1995), tem sido altamente relevante para síntese de compostos bi-arílicos (Figura 05). Compostos bi-arílicos podem ter uma ampla variedade de aplicações como intermediários na preparação de materiais, em produtos naturais e compostos bioativos (XIAO, SARINA, JAATINEN, *et al.*, 2014).

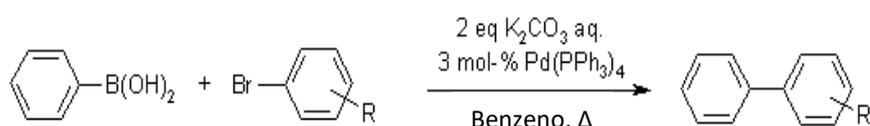


Figura 05. Esquema mostrando uma das reações de acoplamento realizada por Suzuki-Miyaura, a qual foi realizada com um ácido organoborônico e haletos de arila catalisada por paládio, obtido da referência (MÜLLER).

Mecanismo

Smith *et al.*, 1994, reportaram que a etapa que determina a velocidade da reação é a quebra das ligações C-X, denominada adição oxidativa, nesta etapa são formadas as ligações C-Pd e Pd-X [Figura 06 (a-c)], em seguida o haleto é eliminado (na presença da base), então o ácido aril-borônico também se liga ao paládio formando a ligação C-Pd-C [Figura 06 (d-e)], seguido da dessorção do composto C-C acoplado [Figura 06 (f)]. Neste mecanismo a base utilizada foi o NaOH, mas outras bases também podem ser utilizadas, por exemplo o K_2CO_3 .

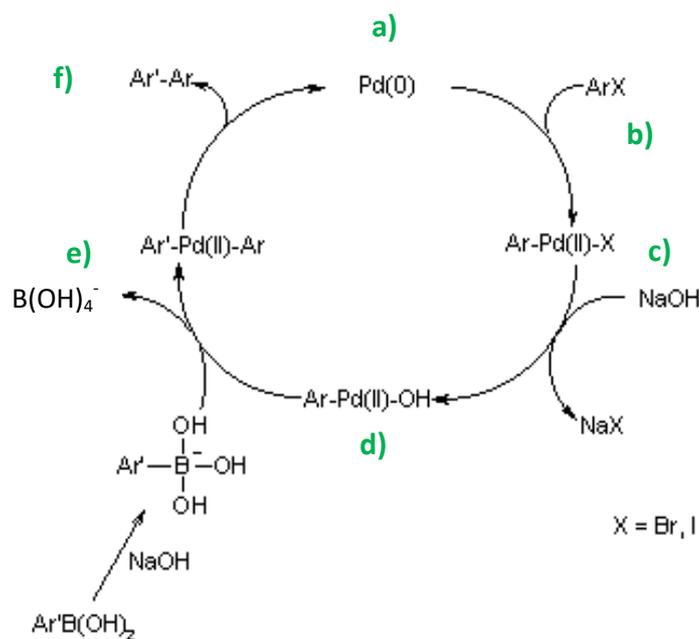


Figura 06. Esquema mostrando as etapas da reação de Suzuki (MÜLLER).

NPs bimetálicas AuPd tem sido aplicadas para reações de acoplamento Suzuki (WANG *et al.*, 2013; XIAO, SARINA, BO, *et al.*, 2014; XIAO, SARINA, JAATINEN, *et al.*, 2014). A reação de Suzuki é considerada sensível a estrutura do catalisador, assim pesquisas tem voltado o seu interesse na variação da forma e tamanho de nanopartículas catalisadoras. Narayanan e El-Sayed, 2005, demonstraram que NPs-Pt com morfologia tetraédrica são capazes de catalisar a reação entre o ácido fenilborônico e iodobenzeno, fato que é atribuído as arestas das partículas tetraédricas (NARAYANAN e EL-SAYED, 2005; COLLINS *et al.*, 2014). No entanto, NPs-Pt com morfologia esférica não apresentam efeito catalítico para esta reação. A utilização de NPs-Pd não apresenta estas limitações.

3.1.6 Oxidação de alcoóis

A oxidação de alcoóis é importante na indústria da química fina principalmente na produção de aldeídos como intermediários para obtenção de diferentes substâncias (BALCHA *et al.*, 2011) e aplicação em fragrâncias, essências, tais como acetato de citronelil (cheiro de frutas) e cinamaldeído (cheiro de canela) (LEE *et al.*, 2010).

Na produção de aldeídos a partir de alcoóis, os catalisadores mais utilizados são de paládio (Figura 07), no entanto defeitos em sua superfície após as reações fazem com que as nanopartículas bimetálicas sejam uma melhor alternativa para o aumento da atividade, seletividade do catalisador e evitar problemas de envenenamento dos catalisadores paládio puro (LEE *et al.*, 2010). O uso de NPs como catalisadores para a oxidação de alcoóis é escolhido como um método tradicional, pois as reações podem ser realizadas a temperatura ambiente, utilizando oxigênio molecular como oxidante em vez de permanganatos e cromatos, assim como o uso de solventes brandos como a água ou em determinadas condições sem uso de solventes (MACLENNAN, 2013).

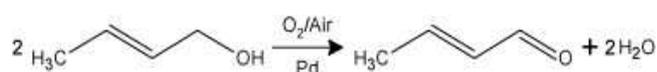


Figura 07. Esquema representando a síntese do crotonaldeído à partir da oxidação seletiva catalítica do álcool crofílico, Fonte: Lee *et al.*, 2010.

O mecanismo da oxidação de alcoóis inicia-se pela adsorção dissociativa do álcool na superfície do paládio formando um alcóxido e hidretos (adição oxidativa) (TSUNOYAMA *et al.*, 2005). Então o átomo de hidrogênio ligado ao carbono- β do alcóxido adsorvido é transferido para a superfície do paládio, formando aldeído e Pd-H, a qual é a etapa determinante da velocidade. Ao final, a molécula de oxigênio remove os hidretos da superfície do paládio para reativá-lo e formar H_2O_2 (TSUNOYAMA *et al.*, 2005). A seletividade das reações de oxidação também é dependente do tamanho e morfologia das nanopartículas catalisadoras, assim como do suporte e estabilizante das NPs, também depende das condições da reação tais como temperatura e oxidante (MACLENNAN, 2013).

3.2 NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS

Nanopartículas ou nanoligas bimetálicas tem sido bastante investigadas principalmente devido a sua importância para a catálise (TOSHIMA e YONEZAWA, 1998). A combinação de mais de um metal em uma NP gera uma melhora em suas propriedades catalíticas. Por exemplo, a adição de pequena quantidade de rutênio em cobalto aumenta a sua seletividade (FERRER *et al.*, 2007; YUAN *et al.*, 2007; WILSON, 2014).

Nanopartículas ou nanoligas bimetálicas consistem de dois diferentes elementos que juntos apresentam suas propriedades melhoradas, tais como atividade e seletividade (GONG, 2012), quando comparado com as nanopartículas monometálicas. Por exemplo, *nanoclusters* de paládio estabilizados podem ser efetivos apenas para catalisar a oxidação seletiva de álcoois secundários, enquanto que nanopartículas bimetálicas de AuPd estabilizadas em polivinilpirrolidona (PVP), podem ser usadas como catalisadores efetivos para uma ampla faixa de reações de oxidação de álcoois em condições brandas (HOU *et al.*, 2008).

A preparação de NPs bimetálicas inicia-se pela redução de dois sais metálicos que pode ser realizada através de duas rotas mais conhecidas: a co-redução e/ou a redução seqüencial (TOSHIMA e YONEZAWA, 1998; BALCHA *et al.*, 2011). A co-redução é um método mais simples que consiste em reduzir os dois sais metálicos ao mesmo tempo, como se faz para obter NPs monometálicas. Na redução seqüencial, geralmente aplicada para preparar NPs do tipo core-shell, os metais são reduzidos sucessivamente, utilizando no primeiro momento um agente redutor mais forte e no segundo, um redutor mais fraco (TOSHIMA e YONEZAWA, 1998).

As propriedades das nanoligas bimetálicas são resultantes do seu arranjo atômico, bem como sua estrutura eletrônica. Dependendo da composição, da rota de síntese e das condições de reação, diferentes arranjos estruturais podem ser obtidos para nanoligas bimetálicas (FERRANDO *et al.*, 2008; GONG, 2012). Estruturas

caroço-casca (*core-shell*), ligas misturadas aleatoriamente e partículas segregadas em camadas são as principais classificações de nanoligas bimetálicas (Figura 08). (FERRANDO *et al.*, 2008; GONG, 2012). A adição de agentes estabilizantes ou matrizes tais como polímeros, carvão ativado ou óxidos metálicos desempenham importante papel no arranjo dos elementos nestas nanoligas (FERRANDO *et al.*, 2008; GONG, 2012).

Existe uma razão particular em utilizar NPs do tipo *core-shell* como catalisadores modelo. Tal estrutura permite que um metal inerte, como o ouro, influencie em um metal ativo como o paládio sem estar na superfície da partícula. (FERRER *et al.*, 2007; YUAN *et al.*, 2007; WILSON, 2014).

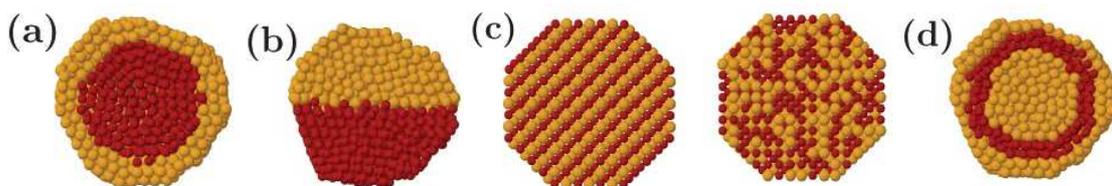


Figura 08. Representação esquemática de cortes transversais de alguns tipos de nanoligas bimetálicas: *core-shell* (a), *cluster* dividido (b), misturado (c), três camadas (d). Fonte: Ferrando *et al.*, 2008.

Nanoligas bimetálicas formadas por AuPd são conhecidas como ligas completamente miscíveis em todas as composições. Elas podem catalisar efetivamente um grande número de reações (FERRANDO *et al.*, 2008).

A estrutura eletrônica do átomo metálico depende do meio no qual ele está, ao introduzir-se um segundo metal ao primeiro seja como uma liga (*alloy*) ou como uma camada sobre um substrato (*core-shell*), ocorre uma mudança considerável na estrutura eletrônica e na atividade do metal (FERRER *et al.*, 2007; YUAN *et al.*, 2007; WILSON, 2014).

Em superfícies heterometálicas, ocorrem transferências de carga do elemento com maior densidade eletrônica para aquele com maiores vacâncias no estado d

(orbitais d), e quanto mais a carga flui entre átomos não semelhantes, aumentam as chances dos adsorbatos ligarem-se aos sítios metálicos da sua superfície. A influência na transferência de carga nas propriedades catalíticas de catalisadores bimetálicos é um dos caminhos pelos quais um metal como o ouro (Au) pode alterar a atividade de um metal ativo como o Pd (FERRER *et al.*, 2007; YUAN *et al.*, 2007; WILSON, 2014).

Outro efeito intermetálico surge quando um segundo metal é intercalado na superfície do mesmo, conhecido como efeito de conjunto. Neste caso, um segundo metal altera a geometria e estrutura cristalina dos sítios de superfície, quebrando múltiplos conjuntos de átomos do primeiro metal ativo, o que pode resultar em alterações em sua atividade catalítica (FERRER *et al.*, 2007; YUAN *et al.*, 2007; WILSON, 2014).

A síntese de NPs bimetálicas para a catálise apresenta algumas vantagens em relação às rotas sintéticas tradicionais para obtenção catalisadores contendo NPs suportadas. A utilização de NPs bimetálicas minimiza a quantidade usada de metais preciosos, tais como ouro e paládio, e simplifica o processo que geralmente é requerido na síntese tradicional de catalisadores, a qual em geral demanda elevado tempo de preparação e gastos com alto custos de energia (BALCHA *et al.*, 2011). Nestes processos, precursores metálicos são depositados em substratos, seguido por várias ativações de tratamentos térmicos, sendo necessário um controle rigoroso do pH, tipo do suporte óxidos, concentração do precursor e procedimentos de calcinação (DASH *et al.*, 2009).

3.2.1 Aplicações das NPs-AuPd na catálise

Catalisadores bimetálicos compreendem dois metais dispersos em um material suporte. Neste caso existem dois degraus extras de variabilidade para considerar: a composição relativa de cada partícula, e a distribuição da morfologia das partículas formadas (WILSON, 2014).

Hou *et al.*, 2008 reportaram que as NPs bimetálicas AuPd tem sido bastante exploradas para o aumento da atividade catalítica com reações que envolvem a oxidação de alcoóis a aldeídos ou cetonas. Quando comparados com catalisadores de ouro ou paládio puros, os catalisadores bimetálicos, devido aos seus efeitos sinérgicos apresentam propriedades diferentes dos seus derivados individuais (FERRER *et al.*, 2007; YUAN *et al.*, 2007; DASH *et al.*, 2009; BALCHA *et al.*, 2011; WILSON, 2014), isso ocorre devido às transferências eletrônicas entre os átomos de ouro e paládio.

São inúmeras as aplicações dos catalisadores bimetálicos os quais representam um fator de elevada importância para o desenvolvimento industrial (SINFELT, 1983). Por exemplo, nanopartículas bimetálicas são preferidas nas reações de hidrogenação catalítica do álcool alílico em solução aquosa, uma vez que apresentam melhores resultados quando comparadas com NPs de metais em suas formas puras (SCOTT *et al.*, 2004).

NPs bimetálicas que possuem paládio em sua constituição tem sido aplicadas em hidrogenações de olefinas, com elevada seletividade e reatividade (TOSHIMA e YONEZAWA, 1998). Ligas de NPs-AuPd suportadas em carbono compostas por diferentes razões metálicas foram usadas para catalisar a desidrogenação de ácido fórmico em 50 °C. Observou-se que o catalisador Au₄₁Pd₅₉ foi 7,7 vezes mais ativo do que paládio puro e 2,9 vezes maior que ouro puro (FERRER *et al.*, 2007; YUAN *et al.*, 2007; WILSON, 2014). Catalisadores formados por Au-Pd suportados em TiO₂ apresentaram 93% de seletividade para produção de H₂O₂ (EDWARDS *et al.*, 2005).

3.3 INTERAÇÕES ENTRE METAIS E MICRORGANISMOS E SUAS PRINCIPAIS APLICAÇÕES

3.3.1 O uso de microrganismos como “biotemplates” para deposição de NPs metálicas

Templates biológicos têm sido amplamente utilizados devido às diversas vantagens que são oferecidas, suas formas precisas, com diferentes níveis hierárquicos de estruturas da escala micro a macroscópica e a organização espacial que fornecem às nanopartículas (AVERY *et al.*, 2009; SABAHA *et al.*, 2013a).

São materiais naturais, baratos e podem ser aplicados na síntese de biomateriais em condições brandas, o que evita desperdícios e impactos naturais. Oferecem uma ampla variedade de morfologias e tamanhos, por isso, são considerados como *templates* adequados para a deposição de nanomateriais funcionais. Até o presente momento, uma grande quantidade de células, incluindo vírus, bactérias, fungos, algas (BRAYNER *et al.*, 2011; BRAYNER *et al.*, 2012; DAHOUMANE *et al.*, 2012; GELABERT *et al.*, 2016), têm sido testados como *templates* para a deposição de nanomateriais (MERTIG *et al.*, 1999).

A parede celular microbiana apresenta grupos funcionais como os grupos carboxílicos, fosfatos e grupos amidas que favorecem a formação de uma atmosfera ideal para as ligações metálicas e nucleação. Tais grupos podem conduzir a formação de NPs e/ou estruturas na superfície da parede celular. Selvakumar *et al.*, 2014 reportaram que algumas bactérias são capazes fornecer cargas negativas através destes grupos carboxílicos e fosfatos os quais permitem a nucleação de metais de cargas positivas como a prata, bem como a formação de nanoestruturas em solução.

Várias propriedades das NPs incluindo seu tamanho, estrutura superficial e composição contribuem significativamente para a atividade, eficiência e seletividade na catálise. Sistemas biológicos mantêm estrito controle sobre estas propriedades e imobilizam nanopartículas em suas superfícies seja por emaranhamento sobre a

parede celular ou por envolvê-los dentro da parede celular (SELVAKUMAR *et al.*, 2014; BHARGAVA *et al.*, 2015).

Neste aspecto, a fusão entre a nanotecnologia e a biologia abriu novos horizontes para síntese controlada de nanomateriais de nano e micro escalas de comprimento. Inspirados na natureza e direcionados pela necessidade de obter estruturas com morfologias desejadas, a arquitetura microbial tem sido explorada como *template* (SHARMA e SRIVASTAVA, 2013).

Em geral, quando as reações são realizadas sob condições severas ocorrem muitas perdas dos catalisadores, seja por aglomerações das nanopartículas, seja por lixiviação, ou mesmo durante a recuperação. Esta é uma questão preocupante principalmente em se tratando de metais preciosos, pois compromete a aplicabilidade das NPs não suportadas e livres. Neste contexto o suporte desempenha importante papel no desenvolvimento de sistemas catalíticos com NPs suportadas, as quais exibem múltiplas melhoras em relação às NPs livres, tais como fácil separação da mistura reacional e reciclabilidade.

Apesar das NPs em solução apresentarem uma maior eficiência catalítica do que NPs suportadas, como mostrado na Figura 56 (APÊNDICE H, p.152) para a redução do *p*-nitrofenol, a utilização de suportes para a deposição de NPs possuem mais vantagens, como por exemplo, a reciclabilidade.

A abordagem que envolve a utilização de células de microrganismos como suportes para NPs têm fornecido um sistema interessante, de baixo custo e interface heterogênea inteligente para reações catalíticas, gerando menos impactos para o ambiente (SUGUNAN, MELIN, SCHNURER, *et al.*, 2007; FAKHRULLIN *et al.*, 2012; PALOMO e FILICE, 2016).

É muito difícil obter um controle total da síntese de macromoléculas naturais bem como um controle estrutural preciso através de rotas de síntese química para

obter estruturas em micro ou larga escala de tamanhos. Assim, o direcionamento de nanomateriais em sistemas naturais desencadeia uma nova forma de obter novos materiais, através da automontagem, fazendo surgir novas características e funções provenientes da natureza.

3.3.2 Fungos filamentosos como *templates* para automontagem de nanopartículas metálicas

As propriedades elétricas, ópticas, mecânicas dos nanomateriais, bem como a área superficial dependem da sua morfologia final. Este pode ser obtido através da funcionalização da superfície de NPs e subseqüente interações múltiplas na superfície do *template* pelo envolvimento de forças direcionadas naturalmente como interações hidrofílicas/hidrofóbicas, contribuições entrópicas, força gravitacional, interações de van der Waals e Coulombicas (SABAH *et al.*, 2013a).

Fungos filamentosos contendo nanopartículas metálicas automontadas, os quais apresentam diâmetros típicos de hifas que variam de poucos micrômetros (variando de espécie para espécie) e comprimentos variando de cerca de 10 micrômetros a poucos milímetros, podem encontrar aplicações como componentes de circuitos, sensores de alta área superficial, dependendo da funcionalidade das NPs (SUGUNAN, MELIN, SCHNURER, *et al.*, 2007).

O estudo da utilização de fungos para a deposição de NPs metálicas apresentou destaque com uma nova abordagem de uso de fungos como *templates* para a montagem de nanopartículas funcionalizadas com oligonucleotídeos, apresentada em 2003, por Li, Z. *et al.* Neste trabalho foi mostrado que é possível controlar a deposição de NPs de diferentes tamanhos utilizando as propriedades recombinantes das macromoléculas de DNA. Primeiramente, depositou-se uma camada de NPs-Au de 13 nm funcionalizadas com macromoléculas DNA (oligonucleotídeos), e em seguida, uma segunda camada de nanopartículas de 30 nm foi recoberta sobre as hifas dos fungos através da utilização de DNA complementar.

No entanto, este método não forneceu conhecimentos mais aprofundados sobre a natureza das interações entre as partículas e a superfície dos fungos.

Em 2007, Sugunan, Melin, Schnurer, *et al.*, mostraram que o glutamato monosódico, estabilizante para NPs-Au, também serviu como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento fúngico. Foram testados três espécies *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*, os íons glutamato não somente eram importantes para o crescimento dos fungos e estabilização das NPs, como também participavam como peça fundamental para a auto-organização destas NPs-Au sobre os filamentos dos fungos. Esta deposição ocorreu enquanto os fungos cresciam, consumindo o excesso de íons glutamato presentes no meio coloidal. Foi feito um segundo experimento em que os íons glutamato foram substituídos por água (através de diálise) e verificou-se que não ocorriam mudanças significativas na cor dos filamentos. Os fungos selecionados na pesquisa de Sugunan, Melin, Schnurer, *et al.*, 2007, não cresceram na solução que continha somente água e NPs-Au. Foi atribuído que a manutenção do crescimento do fungo gerada com a presença dos íons glutamato foi importante para que as nanopartículas fossem estabilizadas sobre os filamentos. Este trabalho apresentou uma importante contribuição para o entendimento do papel das cargas dos íons presentes na solução, bem como os estabilizantes das NPs interferiam na deposição das NPs sobre a parede do fungo. No entanto, assim como Li, Z. *et al.*, este não apresentou mais detalhes dos tipos de interações entre os componentes da parede celular do fungo e a superfície das NPs-Au (SUGUNAN, MELIN, SCHNURER, *et al.*, 2007).

Em 2008, Bigall *et al.*, mostraram que diferentes espécies de fungos foram cultivadas em suspensões contendo NPs-Au, Ag, Pt e Pd, utilizando o íon citrato como estabilizante. Aplicando a secagem por ponto crítico para desidratar os híbridos formados por fungos e NPs-M, as formas macroscópicas e microscópicas tridimensionais foram conservadas. O MEV foi empregado para mostrar diferentes afinidades dos fungos pelo metal, bem como para análise da morfologia. O

interessante deste trabalho foi que os fungos apresentaram diferentes afinidades pelas NPs metálicas, com direcionamentos para aplicações dos sistemas híbridos. Foi reportado, por exemplo, que o sistema híbrido, formado por fungos e nanopartículas de platina podia catalisar a reação redox de íons hexacianoferrato (III) e tiosulfato em solução aquosa. No entanto, não foi mostrado nenhum estudo da deposição das NPs utilizando o MET, e até então, permanecia o desconhecimento sobre os tipos de interações que ocorrem entre a parede do fungo e as NPs.

Depois das idéias de aplicações dos sistemas híbridos propostas por Bigall *et al.*, foi possível perceber que um novo direcionamento para estudo destes tipos de sistemas começou a se desenvolver. Surgiram novas aplicações destes materiais como biossensores. Hifas de fungos da espécie *Aspergillus nidulans* podem atuar como substratos ativos para SERS, sendo possível detectar um número limitado de moléculas através da espectroscopia Raman (SZEGHALMI *et al.*, 2007).

Em 2010, Bigall e Eychmueller, publicaram no periódico *Philosophical transactions of the royal society* o artigo *Synthesis of noble metal nanoparticles and their non-ordered superstructures*, no qual foi introduzida a idéia que o *template* orgânico (biológico) de materiais híbridos formados por NPs-M e microrganismos poderia ser removido facilmente pela calcinação do material para recuperar o metal nobre que foi utilizado na síntese.

Esta nova idéia proposta por Bigall e Eychmueller, 2010, inspirou novos trabalhos que foram publicados nos anos seguintes. Por exemplo, Rehman *et al.*, 2011, apresentaram um método para crescimento de fungos *Aspergillus niger* em suspensões contendo NPs-Au sintetizadas apenas com extrato de chá preto, nenhum outro produto químico foi adicionado. O tratamento térmico até 550°C (Figura 09) destes materiais híbridos levou a formação de MTs porosos os quais poderiam ter interessantes aplicações na catálise, sensores e eletrônica (REHMAN *et al.*, 2011). No entanto, neste trabalho não foi observado com detalhes a formação de microtubos

que apresentassem uma réplica perfeita da arquitetura do híbrido *Aspergillus niger*/NPs-Au.

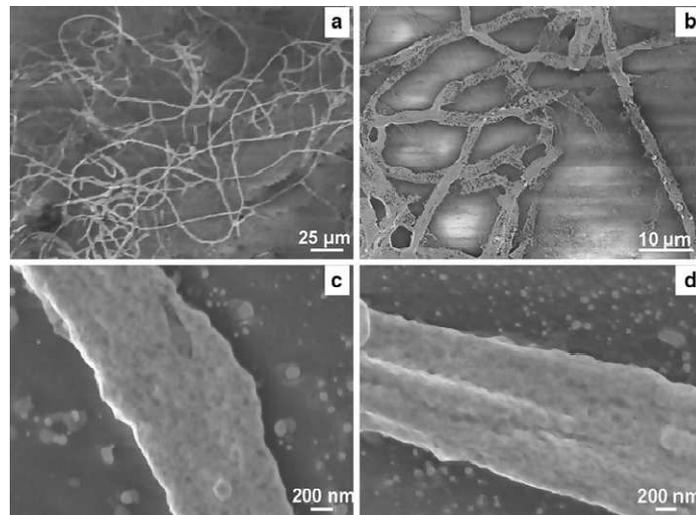


Figura 09. Micrografias eletrônicas de varredura de microtubos porosos de ouro após o tratamento térmico em 350 °C (a), 450 °C (b) e 550 °C (c e d). Fonte: Rehman *et al.*, 2011.

Em 2012, Sabah *et al.*, produziram novamente materiais híbridos utilizando como *template* o fungo da espécie *Aspergillus niger* e como estabilizante para as NPs-Au o glutamato monossódico (MSG). Nesta nova abordagem, a cobertura de NPs-Au nas hifas dos fungos vivos foi controlada pela variação da concentração do MSG em relação ao sal de ouro, e a temperatura reacional. Foi observado que em soluções de NPs-Au contendo baixas concentrações do íon glutamato, ocorreu uma redução mais rápida na absorvância máxima das soluções, após a germinação e crescimento do fungo *A.niger*, provavelmente devido ao rápido consumo de íons glutamato causados pelo rápido crescimento das hifas para pH 4-4,5.

Sharma e Srivastava, 2013, apresentaram a utilização de MTs-Au obtidos pela montagem de NPs-Au funcionalizadas com aminoácidos sobre hifas de fungos, como microeletrodos para transferência de elétrons entre enzimas e eletrodo de superfície. Seu trabalho mostrou uma aplicação importante como biossensor de glicose, através da utilização de enzimas que oxidam a glicose. Foi apontado que a maioria dos

microrganismos possui uma rede de cargas negativas no pH fisiológico ($\approx 5,7$) devido ao número de grupos carboxílicos e fosfatos que dominam sua superfície quando comparados com os grupos amino. Esta informação é importante para o melhor entendimento das interações que podem ocorrer entre as superfícies das NPs metálicas e a superfície dos fungos, por exemplo, grupos amino presentes na superfície das NPs-Au resultam em ligações peptídicas com os grupos carboxílicos presentes na superfície dos fungos.

No trabalho, publicado por Sabah *et al.*, 2013a, foi explorado o uso de estímulos externos (energia de luz visível) para obter microtubos utilizando hifas do fungo *Aspergillus niger* através da automontagem de ouro coloidal estabilizado com glutamato monossódico. Foram obtidos MTs-Au pelo controle de vários parâmetros de crescimento, tais como faixa de comprimento de onda, temperatura e limitações nutricionais, foi mostrado que variações no tempo de exposição aos nutrientes e luz visível foram cruciais para controlar as dimensões dos fios de bio-compostos.

Todos os trabalhos supra-citados foram motivos de inspiração de estudos posteriores cujos resultados encontram-se na revista *Biomaterials Science* (FONTES *et al.*, 2014). Nesta comunicação, foi mostrada a possibilidade de obter réplicas reproduzíveis da estrutura microtubular de fungos filamentosos, produzindo microtubos de ouro tridimensionais (MTs- Au). Os MTs- Au foram obtidos através da calcinação de nanopartículas de ouro (NPs-Au) depositadas em fungos filamentosos, após cultivo destes microrganismos em suspensões coloidais contendo cinco diferentes razões molares de íons citrato e ouro ($[\text{Cit}]:[\text{Au}^{3+}] = 0,3; 2,0; 3,7; 7,1$ e $17,3$). Para verificar as condições ótimas para a deposição de ouro sobre quatro *templates* biológicos, utilizou-se o *Phialomyces macrosporus*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, e *Aspergillus niger*.

Através da otimização da razão citrato/NPs-Au, mostrou-se que existe uma melhoria na montagem de NPs-Au na parede celular dos microrganismos (Figura

10), os quais apresentaram estruturas tubulares especiais depois da secagem por ponto crítico e pela remoção do *biotemplate* fúngico após a calcinação.

Foi mostrado que estruturas microtubulares de ouro, mostrando a replicação da morfologia dos fungos, e, no entanto livre do *template*, foram obtidas usando microrganismos destas espécies como suporte. Esta descoberta foi importante para desenvolvimento de aplicações futuras destes materiais híbridos em áreas tais como catálise onde o tamanho e forma das montagens de NPs são parâmetros importantes na eficiência do catalisador.

Até o presente momento não se atingiu um consenso para o mecanismo de deposição das nanopartículas metálicas sobre estes microrganismos, o qual tem sido descrito através de diferentes hipóteses.

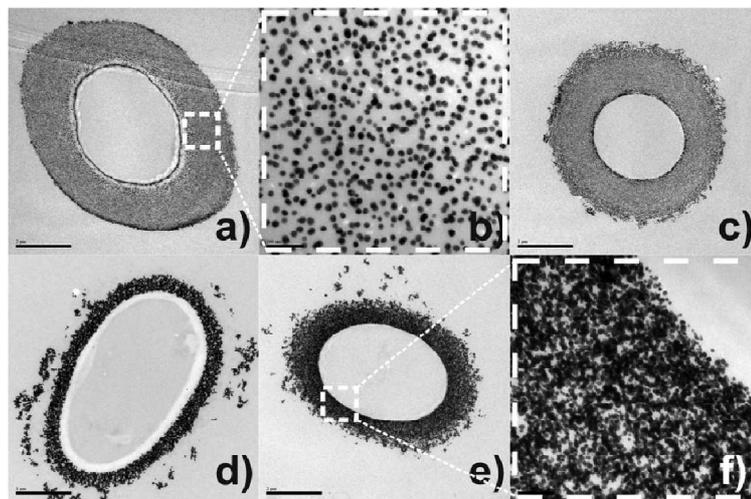


Figura 10. Micrografias eletrônicas de transmissão de cortes transversais do bio-híbrido *P. macrosporus*/Au-NPs cultivadas em soluções [Citrato]:[Au³⁺] = (a-b) 0,3, (c) 2,0, (d) 7,1 e (e-f) 17,3. Fonte: FONTES *et al.*, 2014.

Alguns autores consideram que o consumo dos íons estabilizantes e que também funcionam como fonte nutricional direciona a estabilização das NPs sobre os fungos (LI, ZHI *et al.*, 2003). Outros autores consideram ser mais realístico que as interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas entre parede celular e NPs são

responsáveis pela eficiência da imobilização das NPs sobre estes microrganismos (FAKHRULLIN *et al.*, 2012). Ou mesmo supõe-se que a acumulação das NPs pode ser o resultado de um mecanismo de proteção dos microrganismos frente à “contaminação” do meio, as quais são removidas do meio e armazenadas na parede celular (FAKHRULLIN *et al.*, 2012). Outra linha de pensamento afirma que proteínas hidrofobinas secretadas no meio pelos fungos são capazes de modificar a tensão superficial das suas hifas. O excesso ou a privação de nutrientes ao redor dos fungos pode ativar genes específicos para formar filmes de hidrofobinas na superfície das hifas que seriam responsáveis pela deposição das NPs (KUBO *et al.*, 2016).

No trabalho de Fontes *et al.*, 2014, pôde-se modular o estado de agregação das NPs-Au na parede celular dos fungos através da variação das razões molares de íons citrato e ouro [citrato]:[Au³⁺]. Acredita-se que o consumo dos íons citrato pelos fungos causam desestabilização elétrica próximo a superfície das NPs, em concentrações mais baixas as NPs permanecem isoladas mesmo após depositadas sobre a parede celular, pois os grupos funcionais presentes na superfície do fungo ou produzidos por estes permanecem estabilizando as NPs. Mas aumentando a concentração de íons citrato, conseqüentemente aumenta-se a força iônica que conduz à contração da dupla camada elétrica das NPs-Au e reduz a repulsão eletrostática entre as mesmas, favorecendo a desestabilização e conseqüente aglomeração das NPs sobre a parede celular (FONTES *et al.*, 2014).

Na presente tese, as NPs-AuPd foram obtidas com a redução seqüencial do sal de paládio PdCl₂ sobre as NPs-Au previamente depositadas na superfície dos fungos utilizando a metodologia descrita por Fontes *et al.*, 2014, como um fato inédito. Esta metodologia foi desenvolvida no intuito de obter bio-híbridos bimetálicos formados por fungos e NPs-AuPd para aplicação em reações catalíticas de interesse industrial. Supôs-se que as NPs-Au atuaram como “sementes” onde ocorreu a redução do PdCl₂, favorecendo o crescimento das NPs-AuPd. Grupos funcionais presentes na parede celular dos fungos (-COOH e NH₂) que estabilizam as NPs-Au

permaneceram estabilizando as NPs-AuPd formadas nas regiões mais internas da parede celular. E nas regiões mais externas as NPs-AuPd foram depositadas através de desestabilização elétrica por falta de um estabilizante efetivo para as NPs-AuPd, onde as mesmas cresceram muito mais do que o esperado e ficaram depositadas nas regiões externas. Após sua deposição, estas NPs formadas permaneceram na superfície dos fungos submetendo-os a duas horas de agitação a 1200 RPM em temperatura ambiente. Estes materiais bio-híbridos também foram estudados quanto a sua reciclabilidade.

4.0 PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo serão apresentados os procedimentos para a síntese dos materiais bio-híbridos desde o cultivo dos fungos e síntese das NPs-Au até a obtenção dos bio-híbridos bimetálicos. Em seguida, serão apresentados os métodos qualitativos e quantitativos de análise e por fim os procedimentos para as aplicações catalíticas, estudos da reciclabilidade. A Tabela 02 ao final da seção 4.1, apresenta os materiais e reagentes utilizados para obtenção dos bio-híbridos. Ao final da seção 4.2, a Tabela 04 apresenta de forma sintética as técnicas de análise aplicadas para as caracterizações destes bio-materiais.

4.1 PROCEDIMENTOS PARA SÍNTESE DO BIO-HÍBRIDO

4.1.1 Cultivo dos fungos para síntese do bio-híbrido fungo@NP-Au

As quatro espécies de fungos isoladas no Laboratório de Biotecnologia e Química de Microrganismos (LBQM) assim codificadas como (LBQM 01) *Phialomyces macrosporus*, (LBQM 02) *Trichoderma sp*, (LBQM 07) *Penicillium sp* e (LBQM 67) *Aspergillus niger*, foram cultivados de acordo com a metodologia descrita anteriormente por Fontes *et al.*, 2014, obedecendo as seguintes etapas: i) os fungos foram cultivados em meio nutritivo contendo batata, dextrose e ágar (BDA), ii) os microrganismos foram então pré – adaptados em solução de ácido cítrico e citrato de sódio, iii) foi realizada a síntese de NPs-Au estabilizadas em solução contendo ácido cítrico e citrato de sódio e em seguida, iv) fragmentos de micélio e esporos dos fungos foram inoculados nas soluções contendo NPs-Au estabilizadas com íons citrato (FONTES, 2012).

4.1.2 Cultivo dos fungos filamentosos e pré-adaptação em íons citrato

Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura BDA (30% m/v de batata, 2,0% m/v de dextrose e 1,5% m/v de ágar) por 7 dias. Então, pequenos pedaços do tecido micelial foram separados e encubados em solução tampão de íons citrato contendo 1% m/v de citrato de sódio e 0,05% m/v de ácido cítrico cujo pH \approx 5,7, por um período máximo de um mês (Bigall *et al.*, 2008). Depois deste período, pequenos pedaços do micélio e esporos foram coletados e adicionados em solução contendo NPs-M com concentrações específicas de íons citrato em que os fungos foram encubados por 2 meses no escuro e em repouso a 27 °C.

4.1.3 Síntese das nanopartículas de ouro, paládio e platina e bio-híbridos fungos@NP-Au

Soluções contendo NPs-Au, Pd e Pt foram preparadas através da redução química do ácido tetracloroáurico (HAuCl₄), cloreto de paládio (PdCl₂:HCl 1:2), ácido hexacloroplatínico (H₂PtCl₆) seguindo a metodologia descrita por Bigall *et al.*, 2008, e aplicada anteriormente pelo nosso grupo para preparação de MTs-Au bio-inspirados (FONTES, 2012; FONTES *et al.*, 2014), com algumas pequenas modificações. A solução utilizada em nosso experimento foi preparada de modo a obter 0,135 mmol do precursor metálico no volume total de 500 mL. Para isto, 1,1 mL de uma solução estoque do precursor metálico foram adicionados em água deionizada fervente sob vigorosa agitação por um minuto. Em seguida 1,1 mL de uma solução contendo 1,0% de citrato de sódio e 0,05% de ácido cítrico foi adicionada. Após 20 segundos sob agitação, 2,75 mL de uma solução recém-preparada 0,08% de borohidreto de sódio (NaBH₄) contendo 1,0% de citrato de sódio e 0,05% de ácido cítrico foi adicionada. Imediatamente depois da adição do agente redutor (NaBH₄), a coloração mudou de amarelo pálido para vermelho vinho, a qual é característica da formação de NPs-Au, e amarelo pálido para marrom, a qual é característica da formação de NPs-Pd e Pt.

A mistura foi mantida sob vigorosa agitação e fervura constante durante 10 minutos seguida de resfriamento até a temperatura ambiente. O resultado obtido apresentou razão molar final de [citrato]:[Au³⁺] = 0,3. As soluções estoques de NPs metálicas (Au, Pd e Pt) foram utilizadas para obter as demais soluções, com diferentes razões molares de [citrato]:[Au³⁺], através da adição alíquotas de 6,6; 12,1; 23,1 e 56,1 mL da solução contendo 1% de citrato de sódio e 0,05% de ácido cítrico nas soluções de NPs metálicas previamente preparadas, resultando em soluções coloidais com razões molares finais de [citrato]:[Au³⁺] = 2,0; 3,7; 7,1 e 17,3. Respectivamente, 25 mL destas soluções contendo NPs foram dispensados em frascos de Erlenmeyer de 50 mL e utilizados para cultivo dos fungos selecionados. As soluções contendo NPs Pd e Pt foram filtradas em filtro seringa, tamanho de póro 200 µm antes de inocular os fungos.

4.1.4 Síntese dos bio-híbridos fungos@NPs-AuPd

A preparação dos bio-híbridos fungos@NPs-AuPd foi feita através de uma modificação na metodologia proposta por Balcha *et al.*, 2011, para a formação de NPs-AuPd do tipo *core shell* em solução. Os fungos foram previamente cultivados por 2 meses em soluções coloidais de NPs-Au, com as razões molares finais variadas de [citrato]:[Au³⁺] = 0,3; 2,0; 3,7; 7,1 e 17,3. Após o crescimento do micélio, cada solução de NPs foi cuidadosamente substituída por água deionizada esterilizada, através de lavagens sucessivas. Em seguida, estes bio-híbridos foram transferidos para frascos de penicilina de 20 mL de capacidade previamente esterilizados e misturados com 1,0 mL de ácido ascórbico 0,10M (1,0x10⁻⁴ mol) seguido pela adição de 1,0 mL de PdCl₂ 10,0 mM (1,0x10⁻⁵ mol) e água deionizada esterilizada foi adicionada para obter volume final de 14,5 mL. A solução contendo o bio-híbrido foi agitada manualmente por 1 hora enquanto era resfriada em banho de gelo, em seguida a mistura foi agitada em shaker fechado *overnight* (T=24,5 °C, 102 RPM). Foi possível verificar o escurecimento do tecido fúngico após este período de incubação.

4.1.5 Secagem dos bio-híbridos por ponto crítico

O material híbrido obtido foi secado através de equipamento de secagem por ponto crítico (Leica EM CPD 030- FIOCRUZ-BA). O procedimento para secagem seguiu-se através de uma etapa inicial de lavagem dos bio-híbridos com água deionizada seguida de desidratação em solução alcoólica nas concentrações de 30, 50, 70, 90 e 100%, sendo que a ultima concentração foi repetida 3 vezes. Os intervalos entre as trocas foram de 20 minutos. Em seguida, os bio-híbridos foram dispostos em porta amostra para secagem por ponto crítico, com capacidade de armazenamento de 9 amostras para cada secagem e inserido na câmara do equipamento para secagem por ponto crítico. Nesta etapa o álcool foi substituído gradualmente por CO₂ líquido e a temperatura foi então ajustada para atingir o valor de 40 °C que é a temperatura crítica do CO₂. O procedimento de secagem dura em torno de 2h.

Após aplicação nas reações, os bio-híbridos foram lavados com água deionizada, desidratados e em seguida foram armazenados em cápsulas microporosas de 30 microns (Cedarlane) para procedimento de secagem por ponto crítico (marca Polaron, modelo E3000- WCVM Imaging Centre-Usask).

Uma lista completa de todos os reagentes comerciais químicos e materiais utilizados neste estudo são apresentados na Tabela 02. Todos os reagentes químicos foram utilizados sem nenhuma purificação adicional.

4.1.6 Experimental

Tabela 02. Materiais e reagentes para cada etapa deste trabalho de pesquisa.

1) Síntese de NPs-Au, NPs-Pd e NPs-Pt		2) Síntese dos bio-híbridos fungos@NPs-Au	
Materiais	Reagentes	Materiais	Reagentes
Frascos de Erlenmeyer 50 e 500mL; Placa de aquecimento com agitação magnética; Agitador magnético; Balões volumétricos de 50 e 100 mL; Balança analítica; Espátulas; Béquer de 50 mL	H ₂ AuCl ₄ .3H ₂ O (Aldrich, ≥ 99,999%) PdCl ₂ : HCl (1:2) (Aldrich, ≥ 99,999%) H ₂ PtCl ₆ . 6H ₂ O (Aldrich ≥ 99,9%) Ácido cítrico monohidratado (Merk) Citrato de sódio dihidratado (Reagen) NaBH ₄ (Aldrich)	Placas de vidro; Frasco de Erlenmeyer 500 mL; Balança digital; Espátula; Coador de pano; Suporte universal; Microondas; Béquer 500 mL; Autoclave; Papel craft e álcool 70% Capela de fluxo laminar	Batata Dextrose-glicose ágar
2.2) Cultivo dos fungos em íons citrato			
Materiais	Reagentes	3) Síntese dos bio-híbridos fungos@NPs-AuPd	
Béquer de 50 mL; Espátulas; Bisturi; Lamina para bisturi; Frascos de Erlenmeyer de 100 mL; Balão volumétrico de 1L.	Citrato de sódio dihidratado (Reagen) Ácido cítrico monohidratado (Merk) Fragmentos do fungo utilizando a cultura nova de BDA	Materiais	Reagentes
		Frascos de penicilina; Autoclave; Pissete contendo água deionizada esterilizada; Pipeta de Pasteur Capela de fluxo laminar	PdCl ₂ : HCl (1:2) (Aldrich) Ácido ascórbico Fungos @NPs Au
4) Reação de hidrogenação		5) Reação de oxidação	
Materiais	Reagentes	Materiais	Reagentes
Linha Shlenk de vidro para gases; Balão de fundo redondo; Placa de agitação e aquecimento, contendo sensor de temperatura; Monômetro; Banho de água; Frascos vials.	Gás hidrogênio 2-metil-3-buten-2-ol Metanol (grau HPLC , Fisher scientific) Bio-híbridos fungos@NPs-AuPd Clorofórmio -D (CDCl ₃)	Balão de reação 50 mL com três entradas; Condensador; Septos; Agitador e bagueta magnética	Álcool crofílico 96% (Aldrich) Água Milli-Q Gás Oxigênio
		6) Reação de Suzuki	
		Materiais	Reagentes
		Balão de fundo redondo 25 mL; Agitador magnético; Bagueta magnética.	Iodo-benzeno (Fisher scientific) Ácido fenil-borônico (Fisher scientific) K ₂ CO ₃ Etanol (grau HPLC , Fisher scientific)e N ₂ (g)

4.2 MÉTODOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS DE ANÁLISE

A atividade e seletividade de um catalisador dependem da sua morfologia, dispersão das partículas ativas e a interação com o suporte. Para obter a informação das características das soluções contendo NPs metálicas e dos bio-híbridos obtidos, esta seção descreve as técnicas de caracterização empregadas neste estudo.

4.2.1 Técnicas de caracterização das NPs em solução

As soluções coloidais foram caracterizadas através de espectroscopia UV-Vis, microscopia eletrônica de transmissão e análise tamanho de partículas por espalhamento de luz dinâmico.

Espectroscopia UV-Vis

A obtenção dos espectros de UV-Vis das soluções coloidais foi efetuada logo após as sínteses das NPs utilizando-se o espectrofotômetro UV-Visível, marca Rigol, modelo Ultra-3560 (UFBA-Laboratório do prof. Marcos Malta).

Microscopia eletrônica de Transmissão-MET

Aproximadamente 10 gotas das soluções contendo NPs-Au e Pd foram depositadas sobre grades de cobre de 3 mm de espessura e 200 mesh e levadas ao microscópio eletrônico de transmissão marca JEOL, modelo EM 12130 na FIOCRUZ-BA.

Análise de tamanho de Partículas por espalhamento de luz dinâmico

Aproximadamente 3 mL das soluções coloidais de Au e Pd foram analisadas através do analisador de partículas da marca Microtrac, modelo FLEX 10.6.2 no CETENE.

4.2.2 Técnicas de caracterização dos bio-híbridos

Microscopia Eletrônica de Varredura - (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva - (EDX/EDS)

Neste estudo, amostras secas dos bio-híbridos foram montadas em *stubs* de microscópio sem nenhum outro recobrimento adicional de material condutor. Neste trabalho análises iniciais de MEV foram efetuadas no microscópio JEOL, modelo JSM 6390LV (FIOCRUZ-BA) acoplado com um instrumento de EDX, operando em uma aceleração de voltagem de 5 kV. Mapas elementares de Au presentes no material híbrido foram obtidos através do sistema de microanálise associado ao MEV. Através dessas análises de EDX, que foram feitas com magnificação de 500X, foi possível verificar qualitativamente e semi-quantitativamente o ouro presente no material com análise elementar dos metais Au e Pd e demais componentes presentes nos bio-híbridos.

As imagens de alta resolução foram obtidas pelo microscópio Hitachi moledo SU 8010, em que o detector de BSE foi utilizado para permitir a visualização das NPs metálicas nos bio-híbridos (WCVM Imaging Centre-USASK).

Microscopia Eletrônica de Transmissão -MET

As amostras contendo híbrido fungo@NPs-AuPd foram processadas através processamento padrão de material para a microscopia eletrônica de transmissão. O processamento de material híbrido formado por fungo/ NPs-AuPd foi efetuado nas seguintes etapas: 1- desidratação em acetona; 2- substituição: mistura 1:1 de acetona 100% e resina Poly-Bed® *overnight* (no mínimo 6 horas) em temperatura ambiente. 3- impregnação: resina pura por 6-8 horas em temperatura ambiente. 4- emblocamento: em molde específico, coloca-se o numero de registro do material, preenche-o com resina e em seguida coloca-se o fragmento. 5-Polimerização: coloca-se o material para polimerizar em estufa a 60 °C por 3 dias.

O processamento de material formado apenas pelo fungo foi efetuado nas seguintes etapas: 1- fixação em glutaraldeído 2,0% + paraformaldeído 4,0%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 1h em temperatura ambiente; 2- lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 (3 banhos de 10 minutos em temperatura ambiente); 3- pós- fixação em tetroxido de ósmio 1% + ferricianeto de potássio 0,8% + cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por 1h 46 minutos em temperatura ambiente; 4- lavagem utilizando tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 (3 banhos de 10 minutos em temperatura ambiente); 5- desidratação em acetona; e as demais etapas que seguiram foram descritas anteriormente (2-5 para o híbrido) que é a mesma para todos os materiais. Em seguida, os blocos de resina foram desbastados utilizando-se uma lixa e então cortados utilizando um ultramicrotomo Leica modelo EM UC6.

Cortes ultrafinos foram efetuados em formato de trapézios com espessura de 70 a 80 nm. Estes cortes foram então dispostos sobre grades de cobre de 3 mm de espessura e 200 *mesh*. Todo o processamento das amostras foi efetuado através do serviço de microscopia eletrônica da FIOCRUZ, as imagens dos bio-híbridos fungos@NPs-Pd foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL modelo EM 12130 da FIOCRUZ. E as imagens de MET dos bio-híbridos fungos@NPs-AuPd foram obtidas no Hitachi HT7700 (WCVM imaging centre-Usask).

Difração de raios X

Os padrões de difração foram obtidos usando o difratômetro Shimadzu XRD-6000 (Instituto de Química-UFBA). Os bio-híbridos foram utilizados inteiros sem nenhum tipo de deterioração do material. As análises foram conduzidas por radiação monocromática de Cobre (Cu) de alta intensidade, nas condições descritas na Tabela 03. O software X'pert high score plus foi empregado para processar os dados obtidos e comparar com os padrões de difração (Instituto de Química-UFBA).

Tabela 03. Condições de operação do DRX.

Parâmetros	Condições
Radiação	Cu _K α ($\lambda' = 0.154056$ nm)
Velocidade de Varredura	2°/min.
Voltagem do tubo	40kV
Corrente do tubo	30 mA
Faixa de observação	10-80°

Análise termogravimétrica

Os materiais híbridos foram analisados termicamente através de uma termobalança, modelo TGA T5000, em curva de aquecimento controlada até 800 °C (10°C/min), em ar sintético. As amostras foram depositadas em um cadinho de platina. (USASK-Laboratório do prof. Robert Scott)

4.2.3 Testes catalíticos

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-RMN-H, equipamento Bruker Avance, NMR 500 MHz (SSSC-Usask) foi utilizada para os testes catalíticos aplicando-se bio-híbridos como catalisadores.

A taxa de conversão foi obtida através do cálculo: Taxa de conversão = produtos/ material de partida (reagentes e produtos), ou seja: [2-metil-butan-2-ol/(2-metil-3-buten-2-ol + 2-metil-butan-2-ol)] x 100. Os valores utilizados foram as integrais dos produtos e as integrais dos reagentes para cada tipo de reação. Por exemplo, para a reação de hidrogenação do 2-metil 3-buten-2-ol foram selecionadas as integrais do quarteto em 1,35 ppm referente a 3 hidrogenios do produto 2-metil-butan-2-ol e do quarteto referente a 1 hidrogênio do 2-metil-3-buten-2-ol obtidos a cada 20 minutos. Para a reação de oxidação do álcool crofílico utilizou-se os valores das integrais do singlete relacionado a 1H do reagente álcool crofílico e um dubleto relacionado a 3H do produto crotonaldeído. Para a reação de Suzuki, os valores utilizados foram as integrais do dubleto relacionado a 2H do iodobenzeno e a

integral do multiplete relacionado a 4H do bifenil, maiores detalhes deste estudo foram mostrados na seção 5.2.2, p. 95, e no APÊNDICE D, p. 154.

4.2.4 Medidas de RMN-H

A cinética das reações foi avaliada através da espectroscopia RMN-H. Durante as reações, a solução contendo os produtos foi coletada a cada 30 minutos e separada cuidadosamente dos fungos. Em um frasco *vail* a solução aquosa contendo os produtos e reagentes foi misturada com CDCl_3 (clorofórmio-d), agitadas por 5 minutos e transferida para um funil de separação onde a parte orgânica foi coletada, transferida para um tubo de RMN para ser analisadas.

A Tabela 04 apresenta uma lista dos instrumentos empregados para caracterização dos bio-híbridos e as técnicas aplicadas para os testes catalíticos.

Tabela 04. Métodos de caracterização utilizados.

Caracterização das NPs em solução	Caracterização dos bio-híbridos	
UV-Visível	MEV-EDX	TG
Analisador de partículas	MET-EDX	MO
MET – Jeol	HTSEM	
	EXAFS	
	DRX	
Testes catalíticos		
H-RMN		
UV-Vis*		

* Utilizado também para avaliar a cinética de redução do p-nitrofenol apresentado no APÊNDICE H, p.141.

4.3 APLICAÇÃO CATALÍTICA DOS BIO-HÍBRIDOS FUNGOS@NPS-AuPd

Os bio-híbridos foram secados por ponto crítico para manter a sua morfologia complexa. Em seguida estes materiais foram utilizados para as reações de catálise sem nenhum outro tratamento adicional. As amostras secas[†] foram testadas no laboratório do prof. Dr. Robert W. J. Scott da University of Saskatchewan durante o período de Doutorado Sanduíche (Fevereiro-Dezembro de 2015). Os testes de catálise seguiram etapas distintas que são apresentadas a seguir.

4.3.1 Reações de hidrogenação

a) Reação de hidrogenação

Aproximadamente 2 mg do catalisador bio-híbrido *Trichoderma sp*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = 2,0 foi transferido para um balão de fundo redondo de capacidade de 1 L. Em seguida este balão foi septado e conectado a uma linha Schlenk por onde circulava o gás hidrogênio e conectado a um manômetro, a pressão inicial de H₂ foi 0,37 atm. O bio-híbrido foi adicionado e em seguida 6 mL de água deionizada foi adicionada, mais 150 µL de metanol. O balão foi purgado com hidrogênio por 20 minutos. Em seguida o sistema foi agitado por mais 10 minutos para ter certeza de que nenhum vazamento de gás estava ocorrendo. Então 0,1 mL de substrato (2-metil-3-buten-2-ol) foram adicionados e o tempo anotado. Esta reação foi efetuada em temperatura ambiente, sendo controlada através de sensor de temperatura conectado a placa de agitação e o balão foi mantido submerso em um banho com água. A cada 30 minutos, 200 µL da solução contendo produtos mais reagentes foram retirados, misturados com 500 µL de CDCl₃ (clorofórmio-d), agitados, em seguida a parte orgânica foi separada e analisada por H-RMN.

[†] Uma quantidade limitada das amostras foi utilizada para estas reações, uma vez que não foi possível realizar o cultivo dos fungos na University of Saskatchewan, todos os testes foram realizados com amostras de fungos cultivados no LBQM, secados na FIOCRUZ e enviados via correio para Usask.

b) Reação de hidrogenação na presença de luz visível e no escuro

Os bio-híbridos fungos@NPs-AuPd das quatro espécies de fungos selecionadas *Phialomyces macrosposrus*, *Trichoderma sp*, *Penicillium sp* e *Aspergillus niger* os quais cresceram previamente na solução de NPs-Au na razão [citrato]:[Au³⁺] = 7,1:1 foram selecionados para os testes de hidrogenação do MBE sob luz visível e no escuro com a finalidade de verificar se existia influência das espécies fúngicas na resposta catalítica do material bio-híbrido. A hidrogenação foi efetuada em frascos fechados hermeticamente com septos e sob agitação constante. O procedimento foi o mesmo descrito na seção 4.3.1(a), exceto que nesta etapa estas reações foram efetuadas apenas em água, o metanol não foi utilizado para evitar a degradação dos componentes da parede celular dos fungos. Bexigas foram utilizadas para armazenamento do H₂ a baixa pressão ($\approx 0,03$ atm). Além disso, estas reações desta etapa foram efetuadas em temperatura ambiente (≈ 25 °C), sendo monitoradas através de sensor de temperatura conectado a placa de agitação, e os frascos foram mantidos submersos em um banho com água (Figura 11). A cada 20 minutos, alíquotas de 200 μ L da mistura contendo produtos mais reagentes foram coletadas e foi adicionado com 500 μ L de CDCl₃, seguido de agitação, separação da parte orgânica e análise por H-RMN. A presença da luz visível resultou em aumento da temperatura do meio reacional até 29 °C. Enquanto que no escuro, a reação procedeu a 25 °C.



Figura 11. Reação de hidrogenação no escuro e sob luz visível constituída por LEDs verdes (potência ≈ 500 mW).

c) *Reação de hidrogenação para estudo efeito da variação das razões [citrato]:[Au³⁺] do bio-híbrido *Aspergillus niger*@NPsAuPd*

Para estudo de como o estado de agregação das NPs-Au, previamente depositadas na superfície dos fungos, o qual foi modulado pela variação da concentração dos íons citrato nas razões molares [citrato]:[Au³⁺] = 0,3; 2,0; 3,7; 7,1 e 17,3, poderia interferir na formação e deposição das NPs-AuPd e conseqüentemente em sua atividade catalítica, foram selecionados os bio-híbridos da espécie *Aspergillus niger*@NPsAuPd que cresceram nas soluções com as razões [citrato]:[Au³⁺] = 0,3; 2,0; 3,7; 7,1 e 17,3 respectivamente. Em seguida, estes bio-híbridos foram aplicados para reação de hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol. As reações foram realizadas no escuro à temperatura ambiente, de acordo com o procedimento descrito na seção 4.3.1(b).

d) *Reciclagem dos bio-híbridos utilizando reações de hidrogenação*

Os bio-híbridos *Phialomyces macrosposrus*, *Trichoderma sp*, *Penicillium sp* e *Aspergillus niger*, cultivados previamente em solução de NPs-Au na razão [citrato]:[Au³⁺] = 2,0:1 foram utilizados para estudos de reciclagem. O intuito foi verificar se haveria influência das espécies fúngicas na resistência dos bio-híbridos frente a quatro ciclos de reciclagem para a reação de hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol. Após cada ciclo, os bio-híbridos foram lavados com água deionizada 5 vezes e em seguida re-dispersos em 6 mL de água ultra pura (Milli-Q) num frasco de 30 mL de capacidade e então septados, purgados com hidrogênio por 20 minutos. Estas reações foram efetuadas de acordo com o procedimento descrito na seção 4.3.1(b). Depois de 4 ciclos o material híbrido se encontrava bastante desgastado, os fragmentos foram perdidos durante a agitação e lavagens sucessivas.

Os fragmentos restantes após os 4 ciclos, foram armazenados em cápsulas microporosas de 30 microns (Cedarlane) para procedimento de secagem por ponto crítico (marca Polaron, modelo E3000) e em seguida visualizados em microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (marca Hitachi, modelo SU8010).

4.3.2 Reação de oxidação

Aproximadamente 2 mg do bio-híbrido *Trichoderma sp*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = 2,0 foi transferido para um balão de fundo redondo de três entradas com 50 mL de capacidade. Em seguida, 6 mL de água deionizada foi adicionada, e uma bagueta magnética, o balão foi conectado a um condensador para obter um sistema de refluxo. O sistema foi purgado por 20 minutos com O_{2(g)}, seguido da adição de 300 µL do álcool crotilico (Aldrich). A reação foi efetuada em temperatura ambiente. Alíquotas de 200 µL da solução contendo produtos mais reagentes foram obtidas em intervalos de 30 minutos, misturadas com 500 µL de CDCl₃ (clorofórmio-d) e levadas para análise por RMN-H.

4.3.3 Reação de Suzuki

Em um balão de fundo redondo de 25 mL de capacidade, 0,5 mmol de iodobenzeno foi adicionado a H₂O: etanol (3:2), seguido da adição 0,3 mmol de ácido bromobenzóico e 2 mmol de K₂CO₃. A mistura foi purgada com nitrogênio por 5 minutos e em seguida aproximadamente 2 mg do catalisador bio-híbrido *Trichoderma sp*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = 2,0 foi adicionado. A reação foi realizada em temperatura ambiente. A cada 30 minutos, 200 µL da solução contendo produtos mais reagentes foram retiradas e misturadas com 500 µL de CDCl₃ e levadas para análise por H-RMN.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo encontram-se os principais resultados obtidos através das caracterizações e aplicações dos bio-híbridos fungos@NPs. Procurou-se organizar de forma didática, distribuindo a explicação dos fatos e resultados em seções que obedecem à ordem cronológica de estudos da aplicação e caracterização dos bio-híbridos, avaliando seu comportamento frente às diferentes variações em seus sistemas de crescimento provocadas pelas NPs metálicas. Por sua vez, cada seção apresenta uma breve introdução apresentando o estado da arte do tema em questão seguida de resultados e discussão que se complementam a cada seção. Os temas abordados foram seguintes:

- Fungos@NPs-Pd, internalização de nanopartículas (bioacumulação) x toxicidade;
- Catalisadores bio-híbrido fungos@NPs-AuPd;
- Avaliação do efeito da espécie de fungo e da aplicação da luz visível na hidrogenação catalítica do 2-metil-3-buten-2-ol utilizando bio-híbrido fungos@NPs-AuPd como catalisadores;
- Estudo do efeito dos íons citrato para o estado da agregação das NPs e sua influência na Hidrogenação catalítica do 2-metil-3-buten-2-ol utilizando o bio-híbrido *Aspergillus niger*@NPs-AuPd;
- Reciclagem dos bio-híbridos fungos @AuPd.

5.1 FUNGOS@NPs-Pd, INTERNALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS (BIOACUMULAÇÃO) X TOXICIDADE

Neste trabalho foi apresentado um estudo da deposição de NPs-Pd sobre fungos filamentosos das espécies: *P.macrosporus*, *Trichoderma sp*, *Penicillium sp* e *A.niger* com base na estrutura e crescimento das hifas em meios de elevado estresse.

Fungos são microrganismos multicelulares bastante versáteis, eles possuem uma parede celular que protege a membrana plasmática que lhes dá elevada resistência mecânica. Os fungos são capazes de se adaptar a condições mais severas do que a maioria dos microrganismos, podem crescer em diferentes meios desde pH 2,0 até pH 9,0 e sua alimentação é via absorção de nutrientes (PELCZAR JR., 2005).

Os fungos filamentosos possuem uma parede celular formada basicamente por manoproteínas, quitina e 1,3- β -glucanas, os quais variam de espécie para espécie. Adicionalmente, outros polímeros 1,3- α -glucanas ou 1,6- β -glucanas podem estar presentes (RAM *et al.*, 2004). Estes microrganismos se apresentam como um dos recursos em biodiversidade menos explorados em todo o planeta (WEBSTER e WEBER, 2007).

Fungos são heterotróficos e seu modo de obtenção de nutrientes é através de digestão extracelular devido à atividade de enzimas secretadas e seguida da absorção dos produtos solubilizados digeridos no meio. A combinação entre a digestão extracelular e absorção pode ser vista como uma etapa determinante para o estilo de vida do fungo (WEBSTER e WEBER, 2007).

Os fungos estudados apresentam morfologia microtubular em que os filamentos são denominados de hifas. As hifas podem ser septadas ou não-septadas (cenocíticas). Os septos são formados pela invaginação da parede celular entre as células que formam um longo filamento e são capazes de dividir os filamentos em células distintas contendo os núcleos (PELCZAR JR., 2005).

Cada septo possui um póro que permite a migração do citoplasma e o núcleo dentro das células (PELCZAR JR., 2005). Além de septos e os póros, também estão presentes os vacúolos que armazenam espécies moleculares que não foram transportadas para a membrana plasmática durante os processos de absorção de nutrientes, para posterior degradação (PEÑALVA, 2010).

Materiais bio-híbridos que envolvem a combinação de fungos e NPs apresentam estruturas únicas as quais são facilmente reproduzidas (KUBO *et al.*, 2016). As rotas mais conhecidas de obtenção destes tipos de materiais, em geral, envolvem o cultivo destes microrganismos em meios contendo NPs, onde o entendimento dos tipos de interações entre os sistemas coloidais e as nanopartículas é motivo de interesse para amplas discussões (SUGUNAN, MELIN, SCHNÜRER, *et al.*, 2007; BIGALL *et al.*, 2008; KUBO *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2016).

Sabe-se que meios contendo elevada concentração de substâncias tóxicas para os microrganismos desaceleram o seu crescimento. Por exemplo, foi reportado que nanopartículas de óxidos como Mn_2O_3 inibiram em 50% a captação de O_2 em *S. cerevisiae* quando a concentração das NPs era de 170 mg L^{-1} . Quando a concentração das NPs foi aumentada para 1000 mg L^{-1} estas contribuíram para destruição de 30% da membrana celular (OTERO-GONZÁLEZ *et al.*, 2013), além disso, o estado de agregação destas NPs desempenham importante papel na toxicidade, uma vez que maior dispersão das NPs pode interferir na sua toxicidade reduzindo-a (OTERO-GONZÁLEZ *et al.*, 2013) ou aumentando-a (GARCÍA-SAUCEDO *et al.*, 2011).

O tamanho das partículas também pode interferir na toxicidade do meio, por exemplo, Sun *et al.*, 2014, mostraram que o efeito de toxicidade provocado por nanopartículas de PbS em *S.cerevisiais* depende do tamanho das NPs. Menores partículas foram mais tóxicas, e provocaram um aumento na síntese da quitina como resposta do fungo para estas NPs (SUN *et al.*, 2014). Neste trabalho da tese, fungos puderam crescer em soluções contendo NPs-Au, mas em soluções contendo NPs-Pd em que as NPs são menores, seu crescimento foi inibido (BIGALL *et al.*, 2008).

Buscando investigar mais profundamente os efeitos das NPs-Pd sobre fungos, foi proposto o cultivo dos fungos em soluções coloidais de NPs-Pd com diferentes concentrações de íons citrato nas razões [citrato]:[Pd²⁺] = 0,3; 2,0; 3,7 e 7,1, utilizando a metodologia aplicada para a síntese de NPs-Pd por Bigall *et al.*, 2008.

5.1.1 Resultados e discussão

Este trabalho iniciou-se com um estudo sistemático dos fungos selecionados, cultivados em condições de elevado estresse, como por exemplo, em soluções coloidais contendo NPs-Pd. Figura 12(a) apresenta os espectros de UV-Vis das soluções de NPs-Pd e da solução contendo Pd²⁺. A solução contendo íons Pd²⁺ (um metal de transição d) e íons citrato apresentou uma banda em torno de 250 nm que corresponde a transições eletrônicas d-d. Por outro lado, os espectros UV-Vis de soluções coloidais contendo NPs-Pd não apresentam banda de absorção plasmônica na região do visível (LIN *et al.*, 2006; BIGALL *et al.*, 2008; BANKAR *et al.*, 2010; DAUTHAL e MUKHOPADHYAY, 2013).

Alguns tipos de íons de metais de transição não apresentam cores porque a transição entre o orbital ocupado de energia mais alta e o orbital desocupado de energia mais baixa (ΔE) apresenta um comprimento de onda curto. Quando íons metálicos estão complexados modificações dos níveis de energia dos orbitais d podem tornar ΔE maior e absorção no visível pode ocorrer, mas outros ligantes podem tornar ΔE menor e a absorção do visível desaparece (XIONG *et al.*, 2005; KUMAR, 2013).

Uma solução aquosa de Pd²⁺ forma a espécie $[(PdCl_x(H_2O)_{4-x})^{(x-2)-}]$ ou $[PdCl_x(OH)_{4-x}]^{2-}$, cuja formação depende da concentração do Pd²⁺ e do pH da solução, a qual torna o Pd²⁺ incolor no espectro visível (KUMAR, 2013).

Nanopartículas metálicas absorvem fótons na região do visível devido a oscilação dos elétrons da banda de condução na superfície metálica conhecida como plasmons superficiais. Muitos metais de transição em nanoescala, como as NPs-Pd com tamanhos abaixo do que 10 nm, não mostram picos plasmônicos superficiais

pronunciados devido às baixas energias envolvidas nas transições d-d incluindo oscilações plasmonicas (KUMAR, 2013).

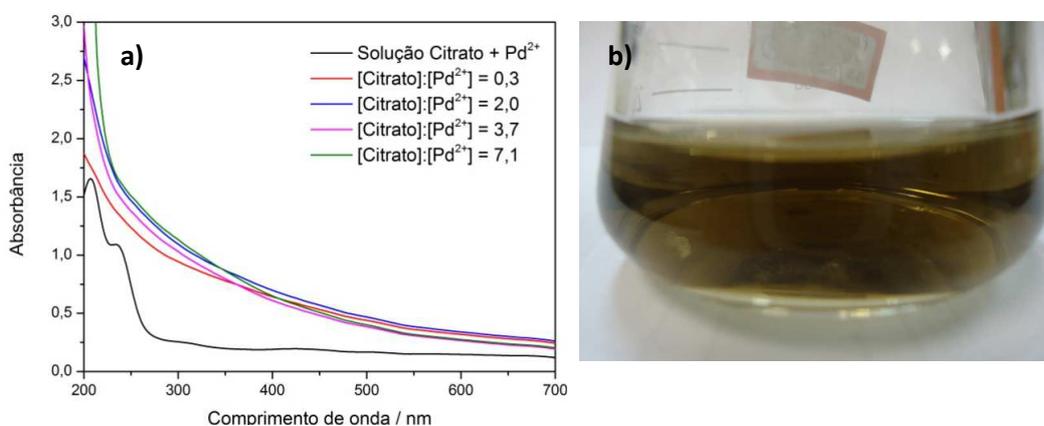
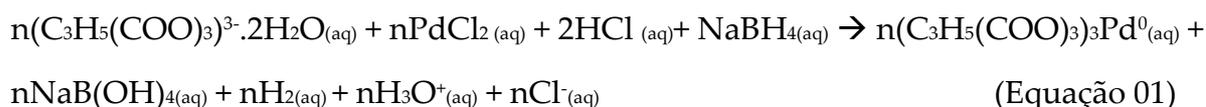


Figura 12. a) espectro Uv-Vis das NPs-Pd e b) fotografia digital mostrando aspecto da solução coloidal.

A metodologia para a síntese das NPs-M empregada foi rápida e em menos de 2 minutos foi possível observar a mudança da coloração da solução de bege escuro proveniente da solução do precursor PdCl₂, para marrom escuro após a adição imediata do agente redutor borohidreto de sódio (NaBH₄) [Figura 12(b)]. A solução apresentou-se estável à temperatura ambiente.

Na reação de redução do PdCl₂, o íon BH₄⁻ libera o íon hidreto (H⁻) na presença de água. Esse ânion liberado se associa com um dos hidrogênios da água, formando a espécie H₂ e a espécie BH₃(OH)⁻. O BH₃(OH)⁻ formado provoca a redução Pd²⁺. Contudo, como o meio é ácido devido a presença do HCl, formam-se as espécies B(OH)₄⁻ + H⁺ e o Pd²⁺ é reduzido a Pd⁰, promovendo os processos de nucleação e crescimento das partículas na presença do agente estabilizante (Equação 01)



A Figura 13(a) apresenta uma típica imagem de MET de NPs-Pd (no modo de elétrons secundários, campo claro) sintetizadas na razão [citrato]:[Pd²⁺]=2,0. As nanopartículas têm morfologia quase-esféricas e se apresentam na forma de

aglomerados devido à evaporação do solvente sobre grades de cobre recobertas com um filme fino de resina Formvar, procedimento geralmente utilizado para visualização de NPs no microscópio eletrônico.

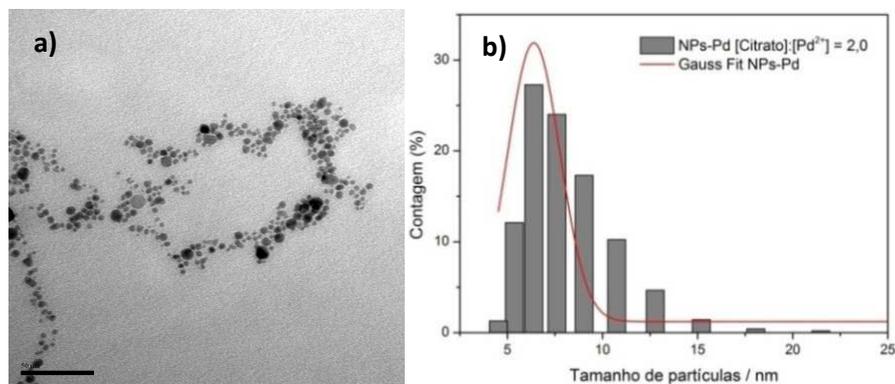


Figura 13. a) MET das NPs-Pd, razão [citrato]:[Pd²⁺] = 2,0 e b) distribuição de tamanho de partículas processados pelo software ImageJ.

Uma estimativa do diâmetro das partículas foi feita analisando a Figura 13(a) utilizando o software ImageJ [Figura 13 (b)]. O diâmetro médio das partículas foi de 6,4 nm ($\approx 70\%$ de NPs com tamanho entre 5 e 9 nm, e $\approx 30\%$ de NPs com tamanho entre 10 e 20 nm). Uma grande limitação desta metodologia é polidispersão das nanopartículas, mesmo após a filtração, ainda foi possível obter NPs com tamanhos muito variados (Figura 56-APÊNDICE B, p.152).

A Figura 14 mostra imagens de MET do fungo *Trichoderma sp* nas magnificações 12.000X e 15.000X. Nesta imagem é possível visualizar as organelas internas, os septos e os vacúolos. Em maior magnificação, [Figura 14(b)] verifica-se a presença do poro região onde ocorre ampla comunicação entre as células.

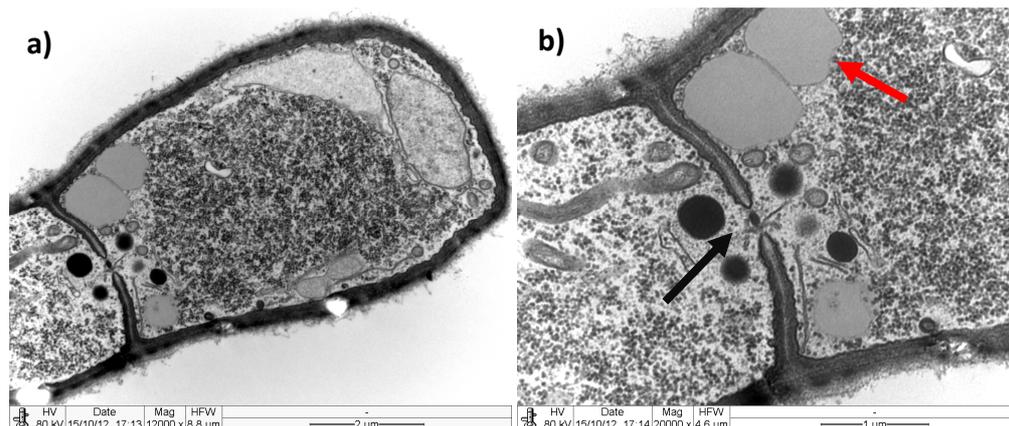


Figura 14. MET do Fungo *Trichoderma sp* sem nanopartículas mostrando as organelas internas, o septo (indicado pela seta preta), bem como os vacúolos (indicado pela seta vermelha) nos aumentos de a) 12.000X e b) 20.000X.

As espécies de fungos selecionadas que foram cultivadas nas soluções de NPs-Pd com diferentes razões [citrato]:[Pd²⁺] apresentaram inibição do seu crescimento. O resultado não foi surpreendente, uma vez que não era esperado que os microrganismos crescessem nestas soluções, fato que já havia sido relatado por Bigall *et al.*, 2008.

A quantidade de biomassa fúngica formada dos híbridos foi bastante limitada. A Tabela 05 mostra que houve total inibição do crescimento (indicado pelo sinal “-”) para os fungos cultivados nas soluções contendo a proporção de [citrato]:[Pd²⁺]= 3,7, com exceção apenas do *P.macrosporus*. Analisando a Tabela 08, que mostra o pH das soluções contendo NPs-Pd antes e depois do crescimento fúngico verificou-se que nesta razão [citrato]:[Pd²⁺]= 3,7, houve um aumento dos valores de pH após o crescimento dos fungos (APÊNDICE B, p.152).

O aumento no pH depois do crescimento fúngico em suspensões coloidais contendo NPs-Au já foi observado por Sabah *et al.*, 2012, utilizando o glutamato monossódico como estabilizantes para NPs. Foi atribuído que o consumo dos íons glutamato pelos fungos resulta na quebra de macromoléculas a espécies mais simples como aminoácidos os quais são reduzidos a espécies ainda mais simples que servem como nutrientes para os fungos, como por exemplo, carbono (C), grupos hidroxil

(OH⁻), nitrogênio (N), hidrogênio (H), íons amônio (NH₄⁺) e íons sódio. Os íons de cargas opostas se combinam para formar compostos básicos, tais como NaOH, NH₄OH resultando no aumento o pH do meio.

O aumento do pH e a presença das NPs-Pd com tamanhos reduzidos interferem na deposição destes sobre os fungos e conseqüentemente em seu metabolismo (SABAH *et al.*, 2012).

Tabela 05. Inibição do crescimento dos fungos nas suspensões contendo diferentes razões [citrato]:[Pd²⁺].

Espécie	Ocorrência de inibição do crescimento nas suspensões contendo as seguintes razões [citrato]:[Pd ²⁺]			
	0,3:1	2,0:1	3,7;1	7,1:1
<i>P.macrosporus</i>	-	+/-	+/-	+/-
<i>Trichoderma sp</i>	+/- [‡]	+/-	-	-
<i>Penicillium sp</i>	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	-	-

O *Trichoderma sp* @NPs-Pd [citrato]:[Pd²⁺] = 0,3:1, apresentou a capacidade de acumular maior quantidade de NPs entre os septos das hifas. Na imagem de MEV (Figura 15) verifica-se que estas regiões entre os septos das hifas são brilhantes devido a presença de elevado carregamento eletrônico nestas unidades, indicando que elevada quantidade de NPs-Pd foram acumuladas nestas regiões. Esta informação é importante uma vez que os septos são regiões de ampla comunicação entre as células, como as NPs foram acumuladas nestas regiões, isto significa que os processos que envolvem migração de núcleos e/ou organelas citoplasmáticas entre as células, para o crescimento dos microrganismos, foram comprometidos.

[‡] (+/-) significa inibição parcial do crescimento, (-) significa inibição total do crescimento.

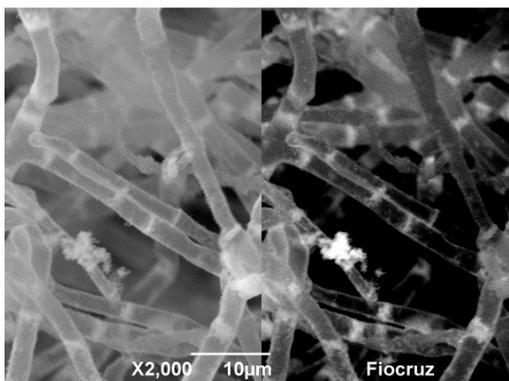


Figura 15. Micrografias eletrônicas de varredura dos híbridos *Trichoderma sp@NPs-Pd* [citrato]:[Pd²⁺] = 0,3, modo elétron secundário e elétrons retroespalhado da esquerda para direita, no aumento de 2.000X.

O fungo da espécie *P. macrosporus* também apresentou inibição de crescimento em solução contendo NPs-Pd com razão [citrato]:[Pd²⁺] = 3,7. A solução de NPs-Pd em que este fungo foi cultivado tornou-se mais clara, fato que pode ser observado com o espectro UV-Visível das soluções antes e depois do cultivo do microrganismo [Figura 16(a)]. Como a absorvância da solução depende da concentração de NPs, a redução na absorvância é resultante da deposição das NPs sobre os fungos (KUBO *et al.*, 2016). A Figura 16 (b) mostra imagem de fotografia digital do fungo *P. macrosporus* cultivado na solução contendo NPs-Pd [citrato]:[Pd²⁺] = 3,7.

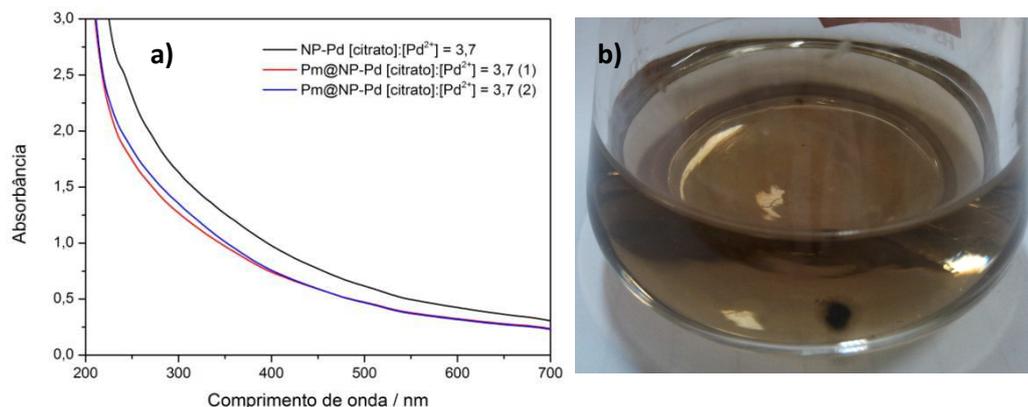


Figura 16. a) Espectro UV-Vis antes e depois do cultivo do fungo *P. macrosporus* na solução contendo NPs-Pd, b) fotografia digital do bio-híbrido na solução de NPs-Pd [citrato]:[Pd²⁺]= 3,7.

Fixando-se arbitrariamente o comprimento de onda em 500 nm, verificou-se que a absorvância foi reduzida 23,3% após o cultivo do fungo, significando que as NPs migraram da solução para a superfície dos fungos [Figura 16(a)]. Este resultado corrobora com a análise de MET de cortes transversais da hifa do híbrido *P. macrosporu@NPs-Pd* [citrato]:[Pd²⁺] = 3,7 [Figura 17 (a)], a qual mostra que as NPs (\approx 5nm) foram estabilizadas sobre a parede celular do *P. macrosporus* [Figura 17 (b)]. Verificou-se também a presença de um componente intracelular, que ocupa aproximadamente 50% do volume desta região.

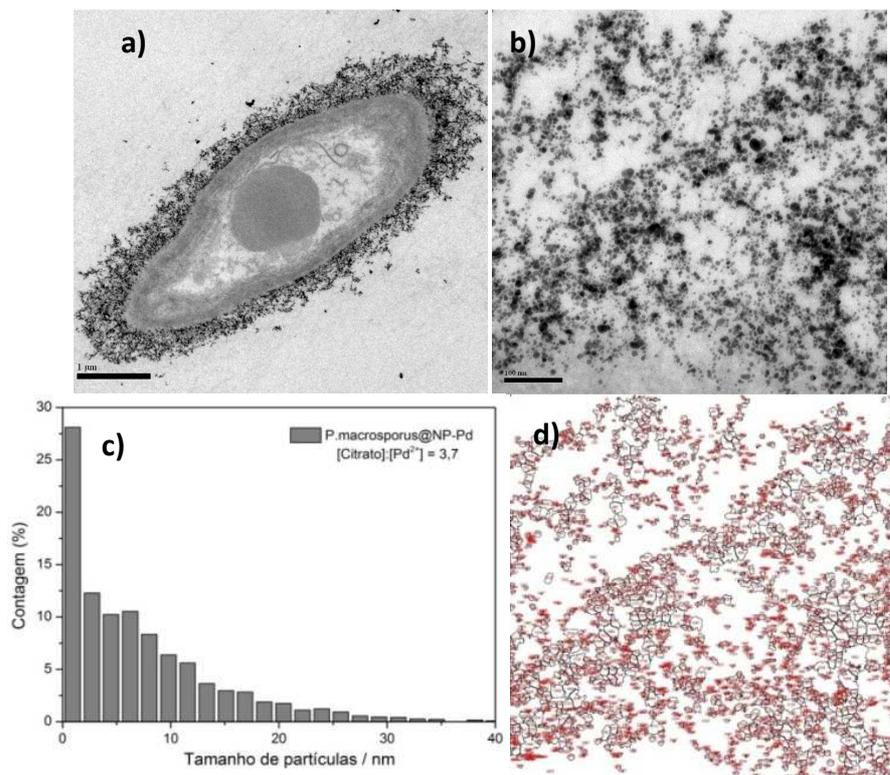


Figura 17. MET do bio-híbrido *P.macrosporus@NP-Pd* [citrato]:[Pd²⁺] = 3,7 nos aumentos de a) 20.000X e b) 200.000X. c) Distribuição de tamanho de partículas pelo programa ImageJ, d) contagem de partículas gerado pelo programa.

A Figura 18 mostra o MET de cortes transversais de hifas do fungo *P.macrosporus* [citrato]:[Pd²⁺] = 7,1 nos aumentos 20.000X, 200.000X, 50.000X e 200.000X. Nanopartículas de Pd (≈5nm) foram depositadas exclusivamente na parede celular destes fungos. Aumentando-se a razão [citrato]:[Pd²⁺] = 7,1, verificou-se que as NPs se encontraram mais separadas umas das outras. A parede celular do fungo *P.macrosporus* apresentou uma espessa camada de NPs dispersas em sua superfície.

Comparando o pH das soluções na razão [citrato]:[Pd²⁺] = 3,7 e 7,1 para o fungo *P.macrosporus*, (Tabela 08, APÊNDICE B, p.152), verificou-se um aumento no pH de 5,3 para 6,1 na razão [citrato]:[Pd²⁺] = 3,7, no entanto na razão [citrato]:[Pd²⁺] = 7,1 não resultou em alteração significativa no pH de 6 para 6,1. O pH além de interferir no metabolismo fúngico (KUBO *et al.*, 2016), também pode modificar caminho de deposição das NPs, alterando a dupla camada elétrica na superfície das NPs e sua aglomeração sobre os fungos (FONTES *et al.*, 2014). Como os valores de

pH nas duas condições foram mantidos, a maior concentração de íons citrato no meio (fonte de carbono) pode promover uma melhor resposta da espécie fúngica para síntese das microfibras da parede celular (parede mais espessa), o que favorece maior estabilização das NPs sobre este fungo nesta condição específica (Figura 18).

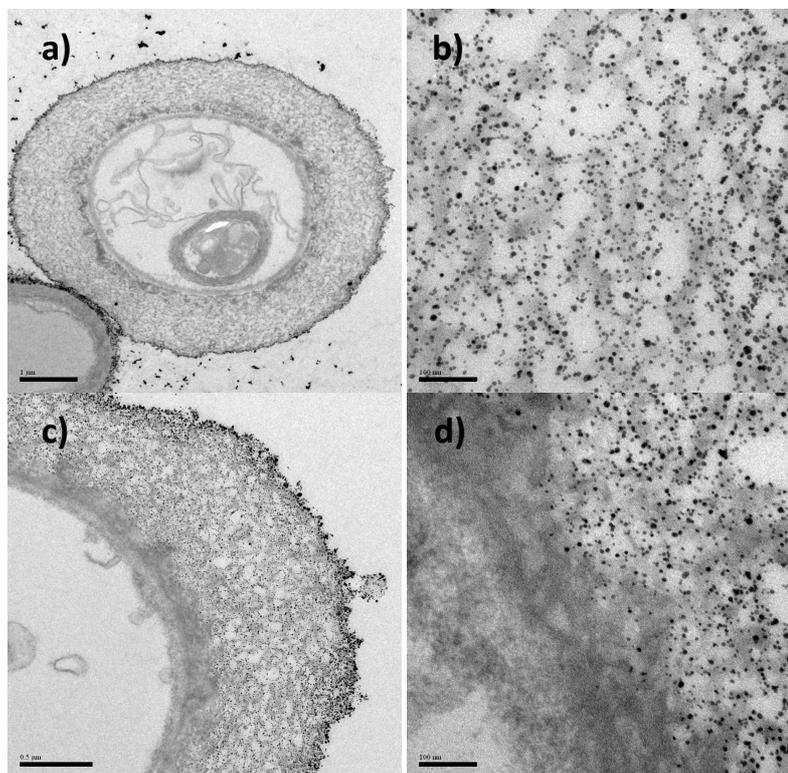


Figura 18. Imagens de MET *P.macrosporus* [citrato]:[Pd²⁺] = 7,1 nos aumentos a) 20.000X, b) 200.000X, c) 50.000X e d) 200.000X.

Os elementos presentes nos híbridos foram analisados através de espectros EDX obtidos em 500x de magnificação [Figura 19 (a)], onde verificou-se a presença de paládio (Pd), oxigênio (O), enxofre (S), alumínio (Al), Arsênio (As) e uma intensidade mínima de Ferro (Fe). O elemento enxofre o qual pode ser proveniente dos compostos presentes nas hifas dos fungos (Johnston, 1965), ou do seu metabolismo (MYUNG *et al.*, 2008) são revelados como contaminantes para catalisadores de paládio (YU e SHAW, 1998), uma vez que eles competem fortemente com os sítios ativos para as reações. Os picos do enxofre apareceram em elevada intensidade em amostras do fungo *P. macrosporus* [citrato]:[Pd²⁺] = 7,1.

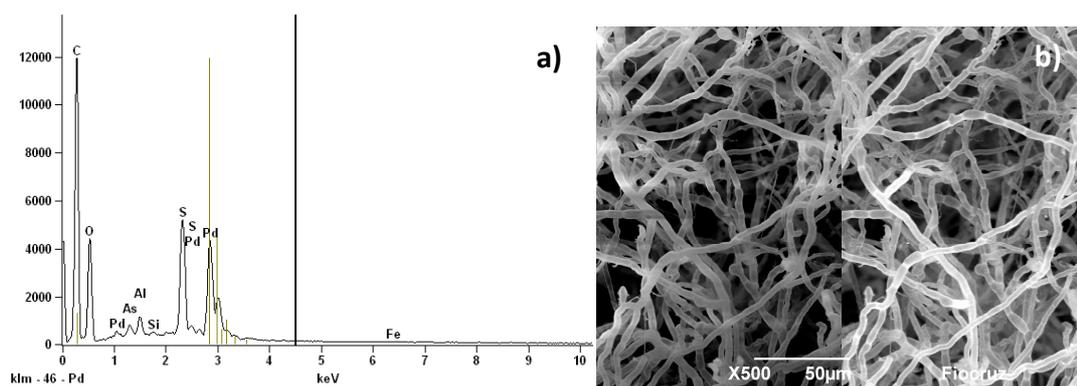


Figura 19. Espectro EDX e MEV do bio-híbrido *P.macrosporus@Pd* [citrato]:[Pd²⁺] = 7,1.

O pico de alumínio foi proveniente do porta amostra de alumínio utilizado para MEV, e os demais elementos podem ter sido provenientes do processo de crescimento dos fungos meios contendo BDA, ou soluções de íons citrato, o citrato de sódio e ácido cítrico utilizados apresentam algumas impurezas em sua composição.

Por outro lado, o fungo da espécie *Penicillium sp* além de apresentar seu crescimento inibido na solução de NP-Pd [citrato]:[Pd²⁺] = 2,0, apresentou resultado inesperado, as NPs migraram para o interior do citoplasma celular das hifas, sendo absorvidas por componentes presentes no interior da célula (Figura 20).

Verificou-se ao longo do citoplasma aglomerações de NPs [Figura 20(c)], enquanto que no interior dos vacúolos, as NPs apresentaram-se dispersas, e monodispersas [Figura 20(b e d)]. As NPs-Pd presentes no interior dos vacúolos tem tamanho médio em torno de 6 nm, calculado através do programa ImageJ.

Nomura *et al.*, 2016 mostraram que a internalização de nanopartículas poliméricas de poliestireno em fungos filamentosos *Aspergillus oryzae* por endocitose ocorreu devido a sua parede celular relativamente mais suave (*soft*) quando comparada com a parede celular do *Aspergillus nidulans*, o qual não permitiu a internalização das NPs (Figura 21).

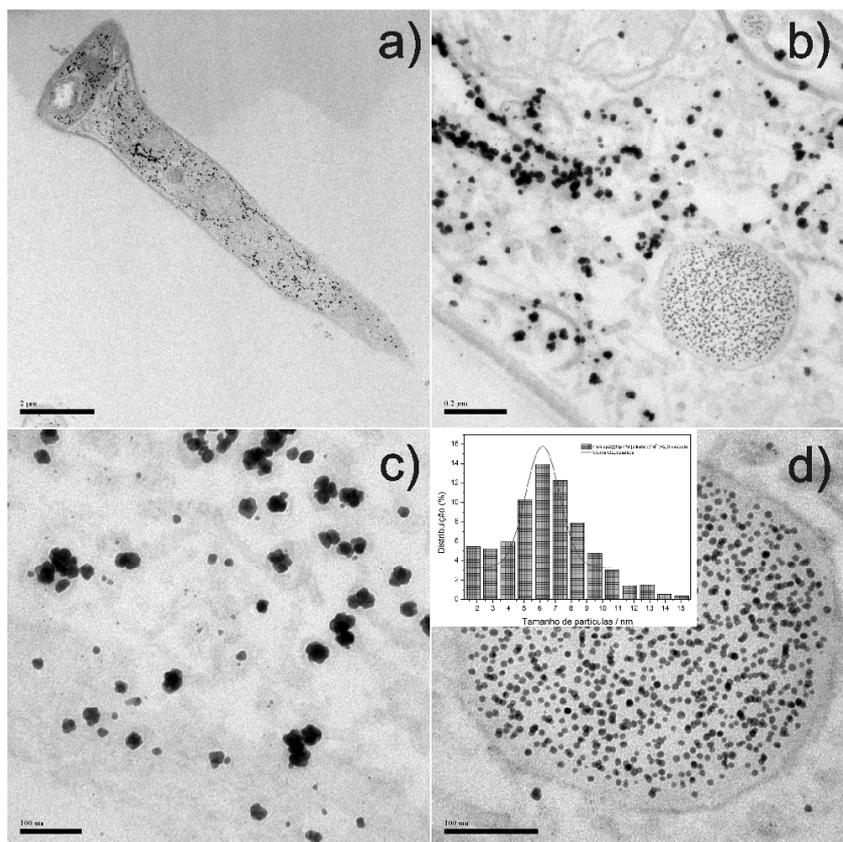


Figura 20. MET do híbrido *Penicillium sp@* NPs-Pd [citrato]:[Pd²⁺] = 2,0 destacando a) corte longitudinal da hifa aumento 12.000X, b) região do citoplasma onde está o vacúolo 100.000X, c) região do citoplasma aumento de 200.000X, d) destaque para o vacúolo 300.000X e distribuição de tamanhos de partículas presentes no interior do vacúolo obtido pelo ImageJ.

Os mesmos autores retrataram também um aumento nas forças eletrostáticas atrativas entre as NPs e a parede celular pode provocar a morte celular em soluções de cultivo contendo sacarose, indicando que a adesão das NPs às células possivelmente induz a morte mais provavelmente do que a internalização destas NPs nas células dos microrganismos (NOMURA *et al.*, 2013). No entanto, quando o mesmo teste foi feito com o ágar, a internalização das NPs não foi observada, concluindo que superfícies celulares cultivadas em ágar adquiriram propriedades hidrofóbicas (presença de hidrofobinas) que inibiram a captação das NPs pelos fungos (Figura 21) (NOMURA *et al.*, 2016).

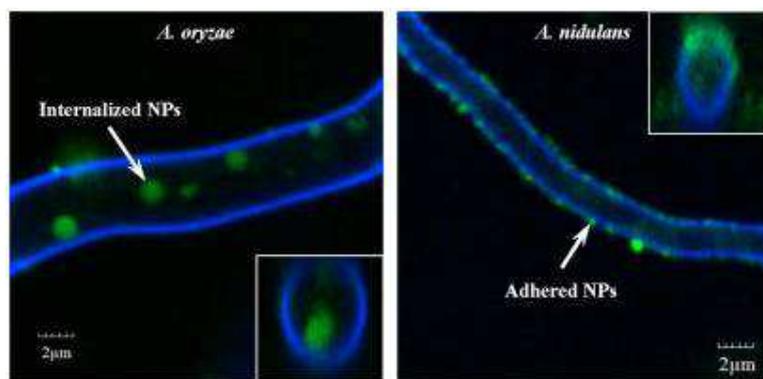


Figura 21. Internalização de NPs poliméricas em *fungos A.oryzae* e nanopartículas aderidas em *A.nidulans*, obtido da referência (NOMURA *et al.*, 2016).

Através de imagens de MET [Figura 22 (a e b)], avaliando o *Penicillium sp* @NPs-Pd numa maior razão [citrato]:[Pd²⁺] = 3,7 foi possível observar que uma pequena fração de NPs-Pd também migrou para o interior de espaços específicos presentes no interior do citoplasma. Analisando os espectros Uv-vis antes e após o crescimento fúngico [Figura 22(d)], fixando-se o comprimento de onda em 500 nm, verificou-se que a absorbância da solução NP-Pd [citrato]:[Pd²⁺] = 3,7 também foi reduzida 22% após o cultivo do microrganismo, significando que as NPs-Pd foram depositadas sobre os fungos.

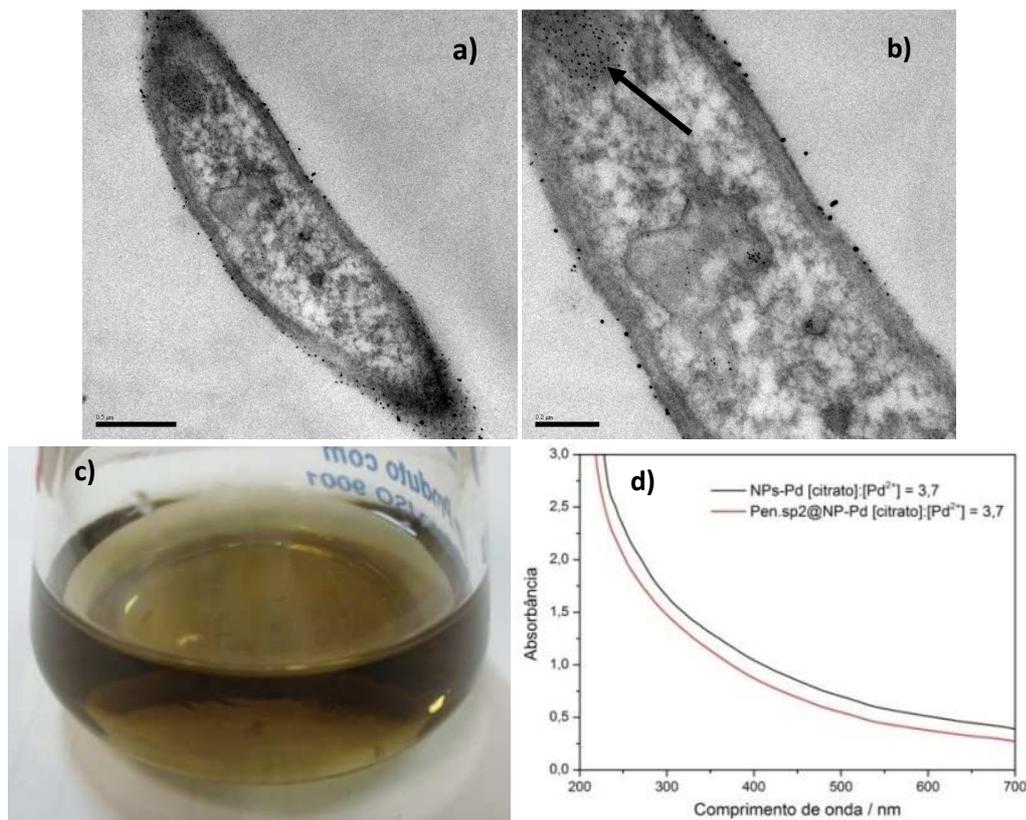


Figura 22. MET do bio-híbrido *Penicillium sp*@NPs-Pd [citrato]:[Pd²⁺]= 3,7 (a-b); c) Solução coloidal de NPs-Pd contendo fragmentos do micélio e d) espectros UV-Vis da solução (controle) e da solução após o crescimento do fungo.

Analisando as imagens de MET de seções transversais das hifas dos bio-híbridos *A.niger*@NP-Pd com todas as concentrações de íons citrato (Figura 23), percebeu-se que esta espécie também não apresentou a tendência em acumular NPs no interior das células. Na razão [citrato]:[Pd²⁺] = 0,3, foram verificados espaçamentos vazios na parede celular o que pode indicar ruptura [Figura 23 (a)]. Na Figura 23(b) razão [citrato]:[Pd²⁺] = 2,0, as NPs depositadas foram bastante raras. No entanto, na razão [citrato]:[Pd²⁺] = 3,7, houve uma ocorrência de acumulação interna de NPs-Pd sem ruptura da membrana [Figura 23 (c)] e na razão [citrato]:[Pd²⁺] = 7,1 [Figura 23 (d)], observou-se uma camada de NPs-Pd depositadas sobre a parede do fungo. Não foi observado nenhum caso de aumento da espessura da parede celular mesmo após 3 meses de cultivo destes fungos.

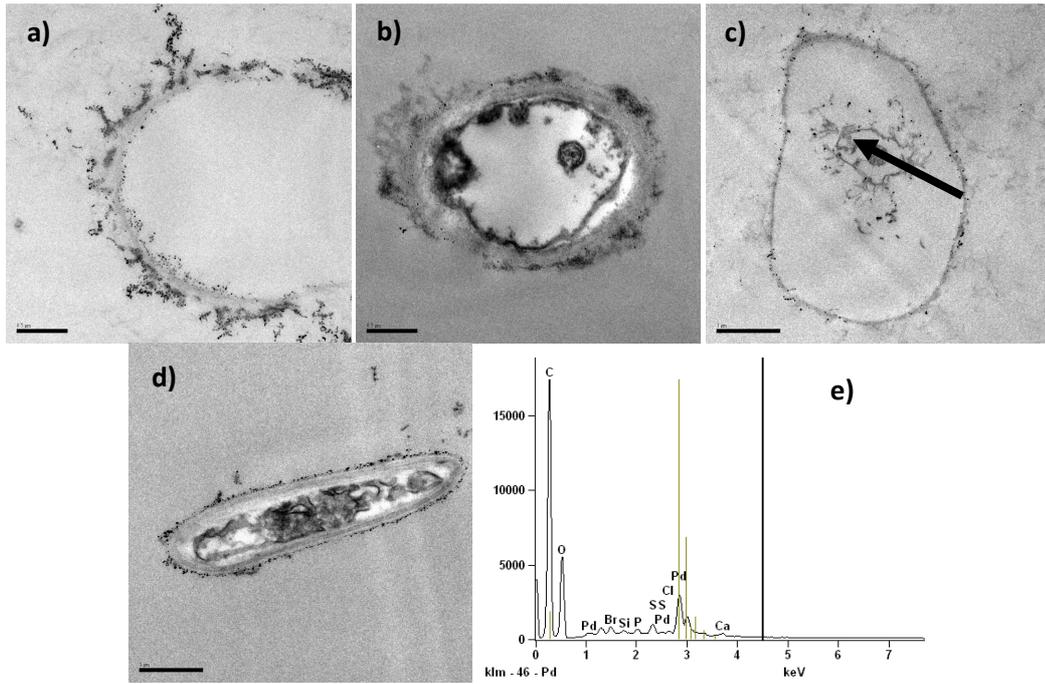


Figura 23. Imagens de MET do bio-híbrido *A.niger*@NP-Pd razões [citrato]:[Pd²⁺] = a) 0,3; b) 2,0; c) 3,7; d) 3,7; e) 7,1 e f) espectro EDX do *A.niger*@NP-Pd [citrato]:[Pd²⁺] =7,1.

Analisando os espectros de EDX dos bio-híbridos contendo NPs-Pd e NPs-Au puras que foram cultivados nas mesmas condições e concentrações de íons citrato, foi possível comparar as razões metal/metal+carbono utilizando os valores de porcentagem atômicos. As NPs-Au podem inibir apenas parcialmente o crescimento fúngico uma vez que estes apresentam respostas variáveis quando se modifica o seu meio de cultivo (KUBO *et al.*, 2016).

A Figura 24 mostra um gráfico de uma análise semi-quantitativa da relação metal/metal+carbono de bio-híbridos cultivados em três metais diferentes nas razões [citrato]:[Mⁿ⁺] = 0,3; 2,0; 3,7; e 7,1. Devido à reconhecida biocompatibilidade, os fungos acumulam uma maior quantidade de NPs-Au que Pd. Por exemplo, nas mesmas condições, o fungo *P. macrosporus* apresentou 10% a mais de NPs-Pd comparado com o *A.niger* na razão [citrato]:[Pd²⁺]=7,1. Estes resultados foram compatíveis com as imagens de MET (Figura 18 e Figura 23).

A quantidade de metais que pode ser depositada em cada espécie de fungo depende de diversos fatores, dentre eles pode-se citar o metabolismo de cada microrganismo, variabilidade das características biológicas, diferentes grupos funcionais presentes na parede celular do fungo, substâncias que são liberadas durante o crescimento e absorção de nutrientes. Portanto, são variações que não podem ser controladas por se tratar de organismos vivos, e cada espécie pode se comportar de maneira diferenciada.

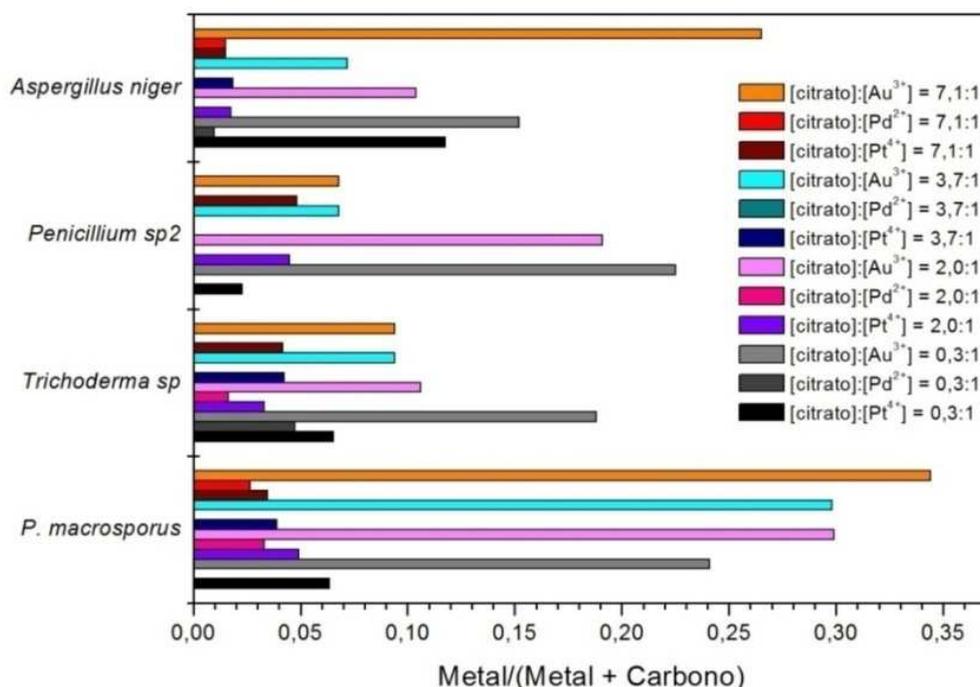


Figura 24. Quantidade de Au, Pd e Pt depositadas em diferentes espécies de fungos cultivados nas soluções com diferentes quantidades do íon citrato. Razões Metal:(Carbono + Metal) foram obtidos através da técnica de EDX.

5.1.2 Considerações finais

Comparando-se os meios com os diferentes metais verificou-se que os fungos que mais assimilaram nanopartículas foram aqueles que cresceram em soluções contendo NPs-Au. No entanto para aplicações em reações catalíticas, as NPs-Pd são mais requisitadas quando o interesse é aplicar em reações de oxidação, Suzuki, hidrogenações (HOU *et al.*, 2008; LUDWIG *et al.*, 2011b; COLLINS *et al.*, 2014), que são importantes reações requeridas em escala industrial. Desta maneira, para evitar a inibição do crescimento, a baixa acumulação das NPs-Pd e possível contaminação do paládio com enxofre causada pelos fungos, foi pensado em uma nova estratégia para redução seqüencial do sal de Pd sobre NPs-Au para obter bio-híbridos bimetálicos/NPs-AuPd com a finalidade de aplicá-los em reações catalíticas de interesse industrial que envolvem a oxidação, hidrogenação, e reação de Suzuki. Na seção seguinte, novas estratégias para obtenção dos bio-híbridos fungos@NPs-AuPd serão apresentadas.

5.2 CATALISADORES BIO-HÍBRIDO FUNGOS@NPS-AuPd

Microrganismos tais como vírus, bactérias e fungos são *biotemplates* atrativos para auto-organização de materiais em nanoescala devido as suas formas estruturais vivas únicas e baixo custo de reprodução (BERRY *et al.*, 2004; BERRY *et al.*, 2005; RADLOFF *et al.*, 2005; FONTES *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2016). Fungos têm sido aplicados como suportes para deposição de NPs metálicas com diversas abordagens de utilização como, por exemplo, em terapia fototérmica (ZHU *et al.*, 2016), adsorção de contaminantes (ZHU *et al.*, 2016), eletrônica (BERRY *et al.*, 2004) e na catálise (BIGALL *et al.*, 2008).

NPs-Pd tem sido aplicadas na escala industrial em reações como oxidação de alcoóis (FENG *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2016), reação de Suzuki (ELLIS *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2011; DU *et al.*, 2011; COLLINS *et al.*, 2014; GU *et al.*, 2015) e hidrogenação de olefinas (NIU *et al.*, 2001; LUDWIG *et al.*, 2011a; MONDAL *et al.*, 2016; OHNO *et al.*, 2016).

Alguns parâmetros definem o aumento da transferência de massa no sistema, por exemplo, aumento da solubilidade do gás no solvente líquido e por sua vez o catalisador o qual deve interagir e apresentar superfícies ativas disponíveis na reação (RAWEEWAN KLAEWKLA *et al.*, 2011). Outros parâmetros que também interferem na transferência de massa são: a agitação mecânica que favorece a solubilização do gás no líquido porque aumenta a área interfacial gás-líquido quando dispersa o H_{2(g)} na fase líquida (GUTIÉRREZ-ORTIZ *et al.*, 2000); o aumento da quantidade do catalisador (VELU *et al.*, 2011); a morfologia e tamanho das partículas (WILSON *et al.*, 2006; MA e SEMAGINA, 2010).

Nas reações de hidrogenação, o paládio é um importante catalisador porque há evidências de que o H é dissolvido no interior da fase metálica, no entanto o mecanismo da interação entre paládio e hidrogênio ocorre ainda é motivo de controvérsias. Alguns autores consideram que o H interage com os átomos localizados em subsuperfícies (LUDWIG *et al.*, 2010), fato que favorece o aumento da

atividade catalítica para a conversão de alcenos, como exemplificado na conversão do cis-2-buteno para butano-D₂ (Figura 25).

Átomos subsuperficiais com baixa coordenação facilitam a difusão do hidrogênio nas subsuperfícies e a formação de espécies de hidrogênio ativas requeridas para a hidrogenação (LUDWIG *et al.*, 2010).

A maior preocupação para a síntese destas NPs metálicas está em obter um suporte adequado para estes catalisadores metálicos, o qual deve manter os sítios ativos disponíveis para as reações, idealmente não deve interagir quimicamente com o substrato de modo a reduzir a velocidade da reação (HAGEN, 2015c).



Figura 25. Esquema mostrando a conversão do cis-2-buteno para butano-D₂ através dos diferentes níveis em que o Hidrogênio pode interagir tanto na superfície quanto nas sub-superfícies das NPs-Pd facilitando a hidrogenação. Adaptado de Ludwig *et al.*, 2010.

Há algumas décadas atrás, algumas pesquisas estavam voltadas para a bioacumulação de íons de metais pesados tais como cádmio, chumbo, urânio em microrganismos como fungos, bactérias e até mesmo algas a fim de aplicá-los em bio-remediação para purificação de meios aquáticos e resíduos (NORRIS e KELLY, 1977; OLAFSON *et al.*, 1979; MACASKIE e DEAN, 1982; MACASKIE e DEAN, 1985).

Como por exemplo, em 1982, Macaskie e Dean reportaram que alguns tipos de proteínas presentes em fungos e bactérias chamadas de metaloproteínas eram responsáveis pela sua capacidade de acumulação de metais pesados, informando que o fungo da espécie *Aspergillus niger* era capaz de acumular cádmio em aproximadamente 15%, obtidos da massa seca do mesmo. E apontaram a presença de “exopolímeros” produzidos por alguns microrganismos que são capazes de ligá-los aos metais (MACASKIE e DEAN, 1982).

Atualmente, como uma alternativa para a sustentabilidade dentro do tema da química verde, estudos têm sido focados na utilização de fungos e outros microrganismos como suportes biológicos (LI, ZHI *et al.*, 2003; SUGUNAN, MELIN, SCHNURER, *et al.*, 2007; BENNETT *et al.*, 2010; BIGALL, 2010; REHMAN *et al.*, 2011; FONTES *et al.*, 2014). Recentemente, artigos de revisões têm sido publicados mostrando o quanto o interesse em microrganismos como suporte tem ganhado espaço na área de síntese de materiais avançados (FAKHRULLIN *et al.*, 2012; DEPANCHE *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2014; SELVAKUMAR *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2016).

Os fungos aplicados neste trabalho possuem morfologia filamentosa e estruturas que os identificam e os diferenciam em suas espécies, alguns deles têm a capacidade de assimilar uma maior quantidade de NPs nestas estruturas que os identificam. Por exemplo, o fungo da espécie *P.macrosporus* apresenta estrutura em forma de conídios (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016), no entanto, quando este cresce em soluções contendo NPs-Au, ele forma uma estrutura denominada clamidósporo, que é verificada quando ele se encontra em ambiente de elevado estresse, como um mecanismo de defesa (FONTES *et al.*, 2014).

Neste trabalho, fungos foram aplicados como suporte para a deposição de NPs-Au e em seguida NPs-Pd através da redução seqüencial utilizando o ácido ascórbico como agente redutor para o sal de paládio. Os fungos contendo NPs-Au serviram como sementes (“seeds”) para a deposição e crescimento das NPs-Pd.

5.2.1 Resultados e discussão

O resultado principal foi um material bio-híbrido que apresenta a funcionalidade das NPs-Au e Pd acopladas em um suporte biológico. O mecanismo de estabilização destas NPs ainda não é completamente entendido, no entanto, supõe-se que componentes presentes na parede celular e/ou formados através do metabolismo fúngico foram capazes de estabilizar estas NPs na superfície da parede celular (FAKHRULLIN *et al.*, 2012).

Nas etapas de síntese para obter NPs bimetálicas, sabe-se que átomos de um metal podem ser depositados em um cluster formado de outro metal via processo de “semente-germinação”, em que um cluster sem ligantes passivantes sofre uma segunda etapa de redução na presença do sal do outro metal (FERRANDO *et al.*, 2008).

As sementes de ouro (NPs-Au \approx 20nm) depositadas previamente sobre os fungos, estabilizadas através dos grupos funcionais (-COOH, -NH₂) presentes na parede celular destes microrganismos, serviram como o centro de nucleação para a redução do Pd, o que geralmente resulta em NPs do tipo *core-shell*. Foi reportado por DASH *et al.*, 2009, que na presença das sementes de ouro, a cinética de redução do Pd²⁺ pelo ácido ascórbico é muito mais rápida, e que com estas rotas poucas partículas de Pd puras são formadas.

Na Figura 26, são mostradas imagens de MEV de alta resolução, as quais revelaram as NPs presentes na superfície dos fungos estudados, as NPs-AuPd foram obtidas pelo processo “semente-germinação” (*seed-germ*). Através do modo de elétrons retroespalhados, verificou-se uma relativa diferença de coloração entre nanopartículas maiores (\approx 70 nm) que se apresentam mais claras e brilhantes quando comparadas com as nanopartículas menores, (\approx 20 nm). Isso foi claramente observado na [Figura 26(b.1)].

Partículas compostas por átomos de maior densidade eletrônica emitem uma intensidade maior de elétrons para o detector, no modo de funcionamento de elétrons retro-espalhados estas partículas serão mais claramente refletidas. O átomo de Au apresenta massa atômica = 196,97 e número atômico = 79 em seu estado neutro. Enquanto átomos de Pd apresentam massa atômica de 106,42 e número atômico = 46. Quando os átomos de ouro são atingidos pelo feixe proveniente do canhão de elétrons no microscópio eletrônico de varredura, eles refletem uma quantidade maior de elétrons e por isso apresentam-se mais claros (GOLDSTEIN, 2003).

Um maior entendimento das propriedades destes bio-híbridos será apresentado mais adiante na seção 5.4 p. 113 onde foram apresentadas as caracterizações físico-químicas. Nesta seção uma atenção maior foi dada às as características morfológicas destes materiais obtidos observados através do MEV.

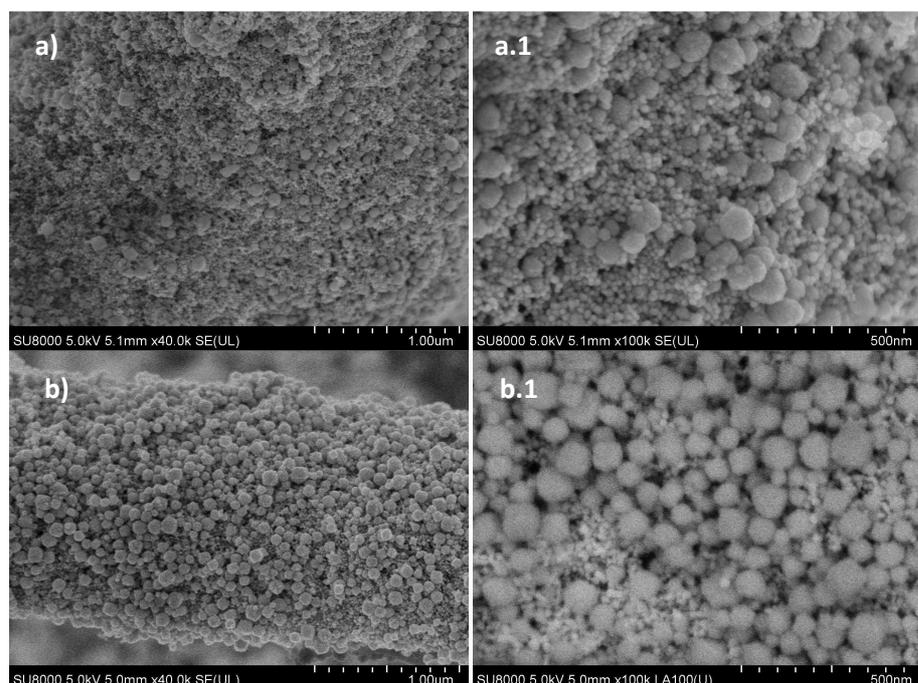


Figura 26. MEV do bio-híbrido *Trichoderma* sp@NPs-AuPd, razões molares [citrato]:[Au³⁺] = a) 0,3 e b) 2,0; nos aumentos de 10.000X (a-b) e 100.000X (a.1-b.1) e modo de elétrons secundários (a, a.1 e b). Modo de elétrons retroespalhados (b.1).

Desta maneira, supõe-se que as NPs mais brilhantes (≈ 20 nm) que foram depositadas previamente sobre os fungos são as NPs-Au (*seeds*), e as nanopartículas maiores provavelmente são formadas por AuPd, na qual o Pd encontra-se na camada mais externa das NPs tornando-as mais escuras no MEV. Imagens de MEV dos fungos *Trichoderma sp*@NPs-AuPd razões [citrato]:[Au³⁺] = 0,3, 2,0, 3,7, 7,1, e 17,3 foram mostradas no APÊNDICE C, p.153.

NPs-Pd com tamanhos de 33 a 110 nm foram sintetizadas por Chen *et al.*, 2010 utilizando NPs-Au ≈ 3 nm como sementes, *seed colloid*, para redução do H₂PdCl₄ na presença de H₂O₂ como agente redutor e íons citrato como estabilizante das NPs (Figura 27).

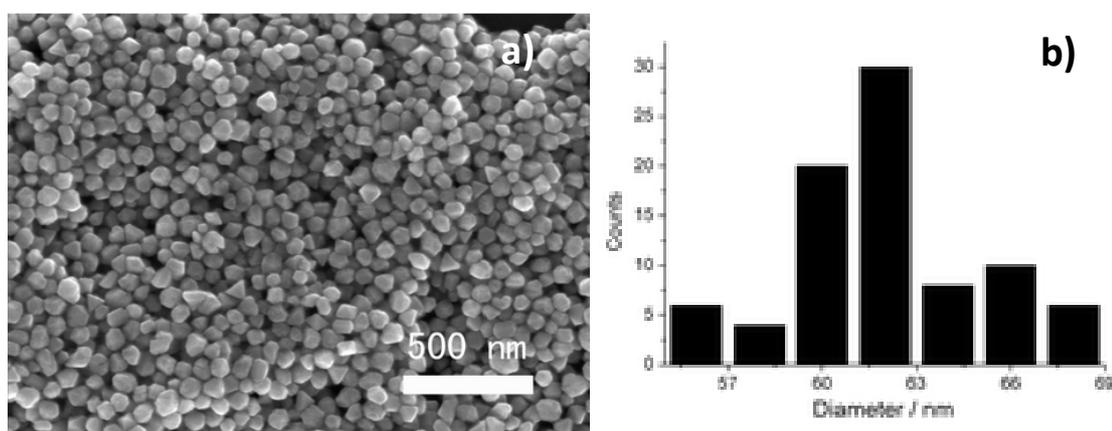


Figura 27 a) MEV de NPs-Pd e b) distribuição de tamanho de partículas.

Fonte: Chen *et al.*, 2010.

Foi reportado que era possível ajustar o tamanho médio das NPs-Pd obtidas através da variação da concentração de sementes de ouro, o tamanho médio das NPs-Pd foi reduzido de 110 para 33 nm quando a quantidade das NPs-Au foi aumentada de 20 para 500 μ L (CHEN *et al.*, 2010).

Aproximadamente 0,2 mg do biocatalisador foram utilizados nestas reações. Foi realizado primeiramente um experimento controle. Quando o bio-híbrido foi adicionado ao volume de água utilizado nestas reações e então submetido à agitação estes ficaram fragmentados em pequenos pedaços, mas a tendência a maior fragmentação depende da espécie fúngica, por exemplo, o *P.macrosporus* tendeu a se

fragmentar mais facilmente do que o *Trichoderma sp*, depois de submetido à agitação. No entanto, foi possível obter um material que preservou as mesmas características após a agitação, NPs foram mantidas estabilizadas na superfície da parede celular (Figura 28). Com a finalidade de monitorar a resistência mecânica destes catalisadores, aproximadamente a mesma massa de bio-híbrido foi submetida à agitação por 2 horas, sem a presença de reagentes.

Foi possível perceber, pela Figura 28(c) e (d), que o fungo foi efetivo para suportar as NPs estabilizando-as em sua superfície, mesmo após a agitação. As NPs não se desprenderam do fungo, uma vez que elas se encontram estabilizadas por cadeias de polissacarídeos presentes na sua parede celular ou por compostos produzidos através do seu metabolismo (FONTES *et al.*, 2014; KUBO *et al.*, 2016).

A Figura 28 apresenta imagens de MEV bio-híbridos *Trichoderma sp*@NPs-AuPd razão molar [citrato]:[Au³⁺] = 2,0, nos aumentos de 500, 1000, 10.000 e 40000X. A Figura 28 (a) foi obtida no modo de elétrons secundários. As Figura 28(b), (c) e (d) foram obtidas no modo de elétrons retroespalhados. A Figura 28(b) mostra que algumas hifas não apresentam recobrimento homogêneo tornando-se mais escuras no modo de elétrons retroespalhados, no aumento maior [Figura 28 (c)], verifica-se a relativa diferença de uma hifa com NPs dispersas e o esporângio completamente recoberto pelas NPs. A Figura 28 (d) obtida no aumento de 40.000X, apresenta detalhes das NPs-AuPd na superfície do esporângio.

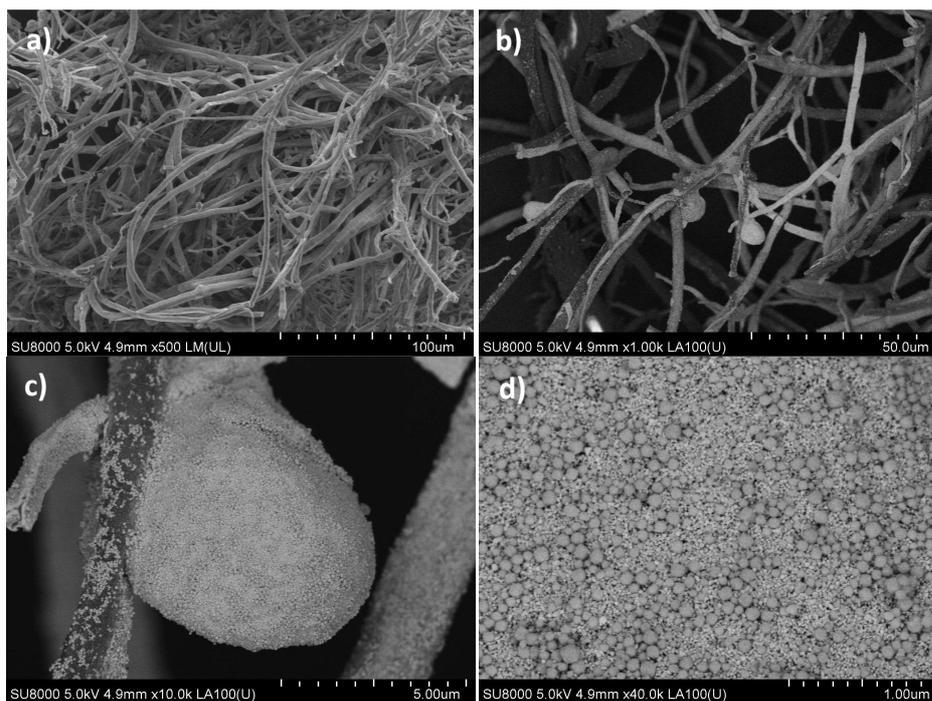


Figura 28. MEV dos bio-híbridos *Trichoderma sp@NPs-AuPd* que foram testados em 2 horas de agitação a 30°C, razão molar [citrato]:[Au³⁺] = 2,0.

Na razão [citrato]:[Au³⁺] = 7,1, depois da deposição das NPs-AuPd, o *Trichoderma sp* gerou uma camada superficial acima das nanopartículas, não se sabe ao certo a origem desta ultraestrutura, provavelmente é proveniente de material produzido a partir da parede celular ou por substâncias produzidas através do metabolismo secundário do fungo como resposta ao estresse causado pelo meio (KUBO *et al.*, 2016). Neste caso, foi possível perceber uma fina camada polimérica envolvendo as nanopartículas em sua superfície (Figura 29- indicado pelas setas brancas).

KUBO *et al.*, 2016, consideram que o excesso ou a privação de nutrientes ao redor dos fungos pode determinar o caminho metabólico modificado por genes específicos resultando em um filme de hidrofobinas que pode ser responsável pela deposição e estabilização das NPs sobre a parede celular. Estas hidrofobinas podem ter sido formadas sobre as NPs-AuPd após a deposição destas sobre os fungos, contribuindo para que as NPs permanecessem ligadas em sua superfície.

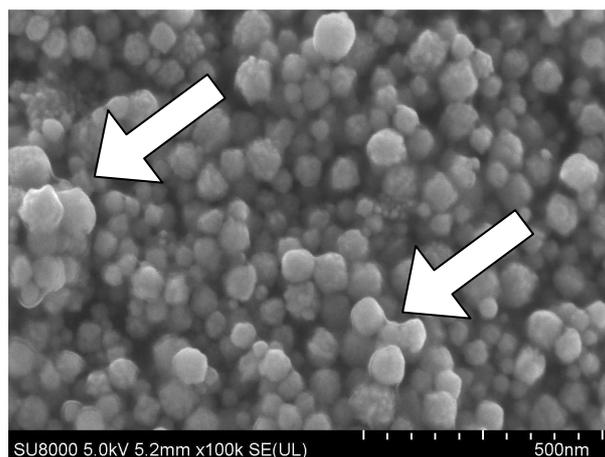


Figura 29. MEV *Trichoderma sp*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = 7,1, com destaque para as micro-películas formadas na superfície das NPs.

NPs-AuPd formadas apresentaram aspecto rugoso, mostrando sua superfície heterogênea em imagens de MEV obtidas no modo de elétrons secundários no aumento de 100.000 X. A Figura 30 destaca as partículas aproximadamente esféricas que apresentam a superfície rugosa, sendo a maioria destas com tamanho entre 60 e 100 nm de diâmetro.

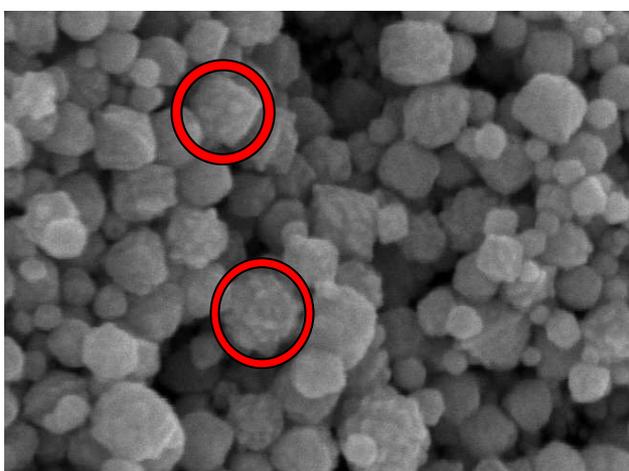


Figura 30. MEV bio-híbrido *Trichoderma sp* @NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] com destaque para a morfologia das NPs-AuPd formadas.

No presente trabalho de tese, a primeira idéia foi aplicar estes novos bio-híbridos como catalisadores nas reações de oxidação do álcool crofílico, na reação de Suzuki e na reação de hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol. Assim estas três reações

foram avaliadas, aplicando-se um mesmo sistema híbrido que foi obtido nas condições semelhantes (Tabela 06).

O sistema híbrido formado pelo fungo da espécie *Trichoderma sp@NPs-AuPd* cultivados em NPs-Au razão [citrato]:[Au³⁺]= 2,0, foram aplicados para esta avaliação inicial. Esta razão foi escolhida por três motivos: i) verificar qual a melhor resposta catalítica para o bio-híbrido fungo *Trichoderma sp@NPs-AuPd* nestas três reações em uma mesma condição; ii) este bio-híbrido apresentou maior massa micelial em relação aos demais fungos e por isso foi possível aplicá-lo para um maior número de reações; iii) estes fungos foram cultivados no LBQM e então enviados para a USASK, uma quantidade limitada destes materiais foi disponível para aplicações destes nas reações.

Na reação de hidrogenação, o balão de reação foi purgado juntamente com o bio-híbrido com hidrogênio para que todo o vapor de água e gases dissolvidos no interior do balão e do solvente (água deionizada) fosse substituído por H₂. Nesta reação foi utilizado 150 µL de metanol para aumentar a solubilidade do álcool 2-metil-3-buten-2-ol na solução e aumentar assim a transferência de massa.

As reações foram testadas aplicando a velocidade de agitação de 1200 RPM para manter constante a dispersão do H_{2(g)} sobre a fase líquida e para aumentar a dispersão dos bio-híbridos também na fase líquida. O produto de interesse deve ter boa solubilidade no solvente e este não pode apresentar ressonâncias na região de interesse da substância que está sendo analisada (Saksri Supasorn e Vibuljun).

Na Tabela 06 são apresentados os resultados da porcentagem de conversão obtidos aplicando-se o *Trichoderma sp@NP-AuPd* como catalisador. A reação de hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol apresentou 99% de conversão, seguido da reação de Suzuki com 15% de conversão e por último a oxidação do álcool crotilico com 2,0%. Estes resultados foram obtidos através dos cálculos apresentados na seção 4.2.3, p. 59, e detalhados no APÊNDICE D, p. 154, utilizando espectroscopia RMN-H.

A elevada conversão na reação de hidrogenação atribuiu-se a alguns fatores i) a pressão de $H_{2(g)}$ aplicada que faz aumentar os choques entre as moléculas de $H_{2(g)}$ e os demais componentes da mistura reacional; ii) a forte influência da concentração do paládio presente nas NPs sobre os bio-híbridos; iii) a utilização do metanol como solvente para aumento da solubilidade e transferência de massa no sistema líquido-sólido-gás. A presença do solvente pode aumentar a cobertura superficial de hidrogênio na superfície do catalisador (SINGH e VANNICE, 2001).

As reações de hidrogenação também são consideradas sensíveis a estrutura, e também dependem do tamanho das NPs. A escolha do MBE foi estrategicamente pensada por ele ser mais solúvel em água do que o álcool alílico, por exemplo. O MBE apresenta ponto de ebulição acima das temperaturas em que as reações de hidrogenação ocorrem, por ser um álcool simples evita a ocorrência de reações paralelas que podem interferir na atividade do catalisador (Singh e Vannice, 2001).

Tabela 06. Reagentes, produtos e porcentagem de conversão na presença do catalisador bio-híbrido *Trichoderma sp*@NP-AuPd razão [citrato]:[Au³⁺] = 2,0, após três horas de reação.

Reagente	Produto	% Conversão/ tipo de reação
		2,0% Oxidação do álcool crofílico
		15% Reação de acoplamento Suzuki-Miyaura
		99% Reação de Hidrogenação

5.2.2 Espectros RMN-H

a) Oxidação do álcool crofílico

A Figura 31 mostra os produtos da reação de oxidação que foram identificados por RMN-H. Esta reação se procedeu em 3 h, a cada 30 minutos, alíquotas da mistura contendo produtos e reagentes foram coletadas, misturadas com CDCl_3 como descrito na seção 4.2.4, p. 60. Nesta figura são mostrados apenas os espectros obtidos nos tempos de 1, 2 e 3 h de reação, indicados pelas cores vermelha, verde e lilás, respectivamente. O espectro de cor azul é do álcool crofílico (substrato), no solvente CDCl_3 sem o tratamento com $\text{O}_{2(g)}$. Depois da exposição ao $\text{O}_{2(g)}$, os picos característicos do crotonaldeído começaram a aparecer com aproximadamente 30 minutos de reação (APÊNDICE I, p. 159), os quais se apresentaram levemente mais intensos após 3 horas.

O álcool crofílico (Figura 31) apresenta um multipletto em 5,6 - 5,7 ppm relacionado a 2H (**b** e **d**), um dubleto em 4,06 - 4,07 ppm relacionado com 2H (**e**), um singletto em 2,16 ppm relacionado a 1H(**a**) e um duplo dubleto em 1,69 - 1,71 ppm relacionado com 3H(**c**). Quando o álcool crofílico é hidrogenado na presença de NPs-Pd, ele é seletivamente convertido a crotonaldeído (BALCHA *et al.*, 2011). O crotonaldeído é caracterizado por um dubleto em 9,48 - 9,49 ppm relacionado a 1H (**e'**), um multipletto em 6,83 - 6,90 ppm relacionado a 1H (**d'**), um multipletto em 6,11 - 6,17 ppm relacionado a 1H (**b'**) e um duplo dubleto em 2,01 - 2,03 ppm relacionado a 3H do CH_3 (**c'**). O cálculo da porcentagem de conversão foi realizado como descrito na seção 4.2.3, p. 59 e detalhado no APÊNDICE D, p. 154. os valores utilizados foram as integrais do duplo dubleto relacionado a 3H (**c**) do álcool crofílico e do duplo dubleto relacionado a 3H (**c'**) do crotonaldeído.

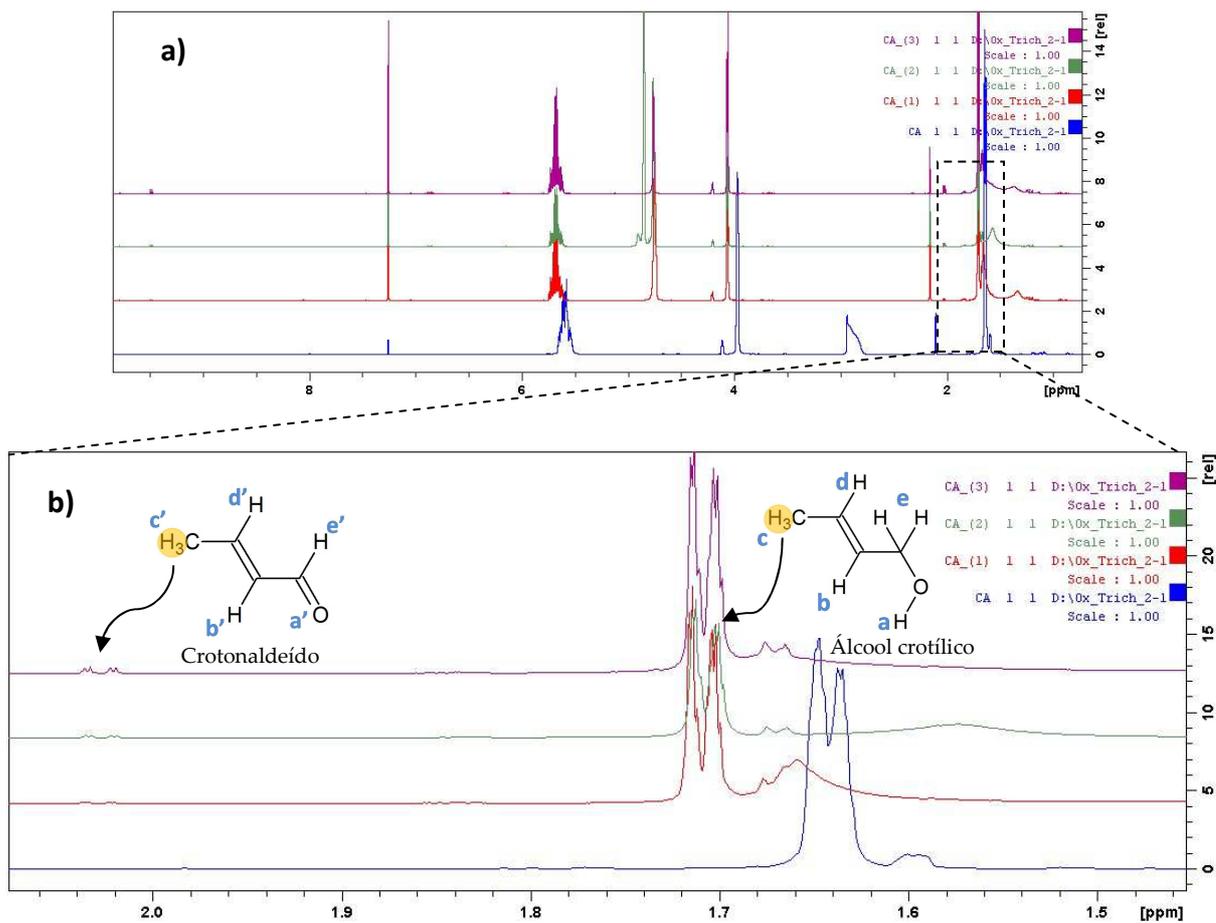


Figura 31. Espectros RMN-H do produto da reação de oxidação do álcool crofílico aplicando o bio-híbrido *Trichoderma* sp@NP-AuPd razão [citrato]:[Au³⁺] = 2,0. As letras em azul identificam os hidrogênios indicados no espectro.

Um dos mecanismos que tem sido propostos para esta reação envolve a eliminação de β -H seguido pela adição de oxigênio em espécies de Pd-H (Figura 32). O papel do oxigênio no mecanismo da reação de oxidação do álcool crofílico na presença de NPs-AuPd é retirar o H adsorvido da superfície do catalisador que forma espécies Pd-H com o álcool (BALCHA *et al.*, 2011), como é esquematizado na (Figura 32).

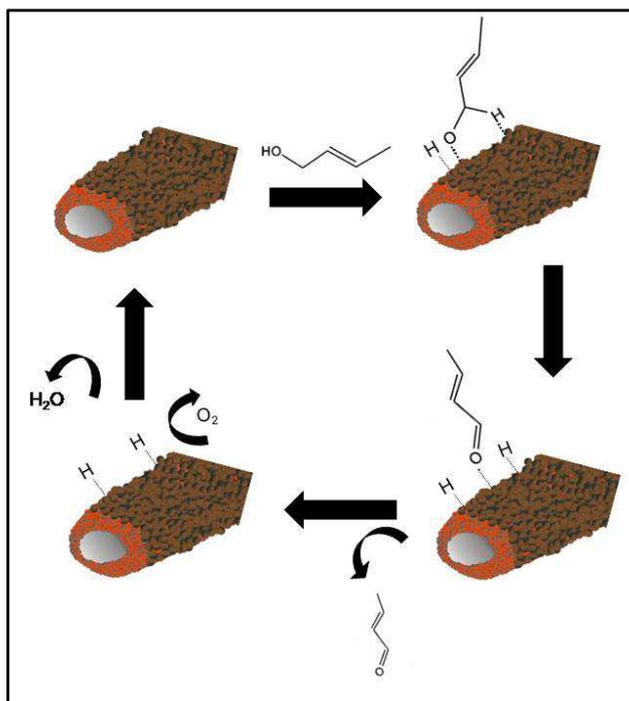


Figura 32. Esquema proposto para a formação do crotonaldeído na presença de bio-híbridos fungos@NPs-AuPd, a região marrom representa as NPs-AuPd e a região vermelha representa as NPs-Au. Adaptado de BALCHA *et al.*, 2011.

b) Reação de acoplamento Suzuki-Miyaura

Os produtos da reação de Suzuki são mostrados na Figura 33. Foram feitas análises a cada 30 minutos durante 3 horas de reação. Esta figura mostra os espectros obtidos a cada 1 h de reação. O espectro azul do iodobenzeno em CDCl_3 mostra que após 1 hora de reação algumas mudanças puderam ser observadas como é destacado na Figura 33(b), o aparecimento do multipeto característico do bifenil foi observado em 7,4 ppm.

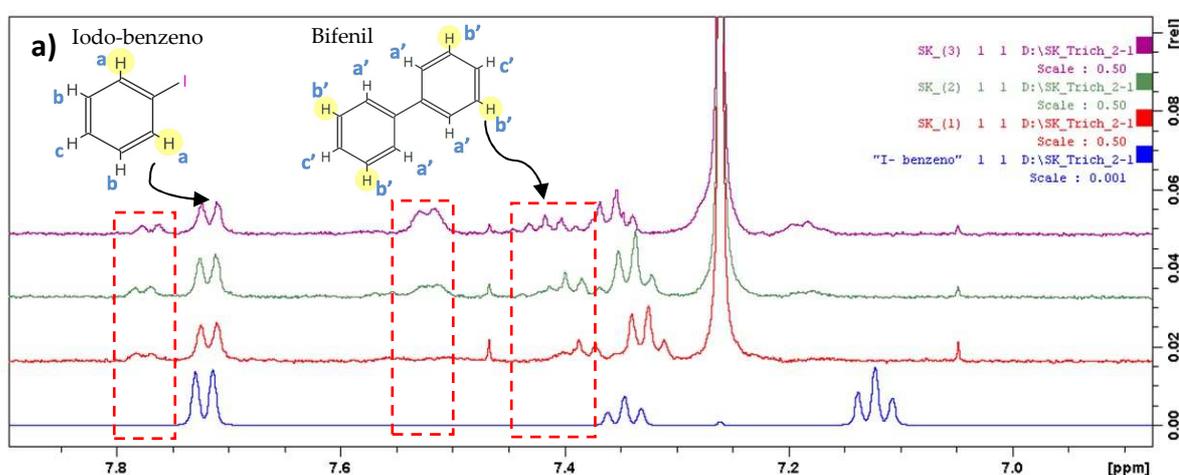


Figura 33. Espectros RMN-H do produto da reação de Suzuki (a), destacando o material de partida iodo-benzeno (b) na presença do bio-híbrido *Trichoderma* sp@NP-AuPd razão [citrato]:[Au³⁺] = 2,0. As letras em azul identificam os hidrogênios indicados.

O iodo-benzeno (Figura 33) apresenta um dubleto em 7,71 - 7,72 ppm, relacionado a 2H (a), um tripleto em 7,33 - 7,36 ppm relacionado a 1H (b) e um tripleto em 7,10 - 7,14 ppm relacionado a 2H (c). O Bifenil que é o principal produto da reação de Suzuki que apresenta um multipeto em 7,5 ppm relacionado a 4H (a'), um multipeto em 7,4 ppm relacionado a 4H (b'), um multipeto em 7,35 relacionado a 2H (c'). O cálculo da porcentagem de conversão foi realizado como descrito na seção 4.2.3, p. 59 e detalhado no APÊNDICE D, p. 154, os valores utilizados foram as

integrals do dubleto relacionado a 2H (a) do iodobenzeno, e a integral do multiplete relacionado a 4H (b'). Como indicado na Figura 33.

A etapa determinante da velocidade da reação de Suzuki é a quebra da ligação C-I do haleto de arila. Nesta etapa elétrons são transferidos para átomos de C e I, para formar ligações C-Pd e I-Pd. A qual é basicamente a formação das ligações C-Pd e a quebra das ligações C-X (Figura 34). Os elétrons provenientes das transições eletrônicas entre Au e Pd são injetados no iodobenzeno para quebrar as ligações C-I (WANG *et al.*, 2013). Neste esquema proposto para mecanismo da reação de Suzuki apresentado na Figura 34, a base foi NaOH, mas nesta reação foi utilizado como base o carbonato de potássio (K₂CO₃).

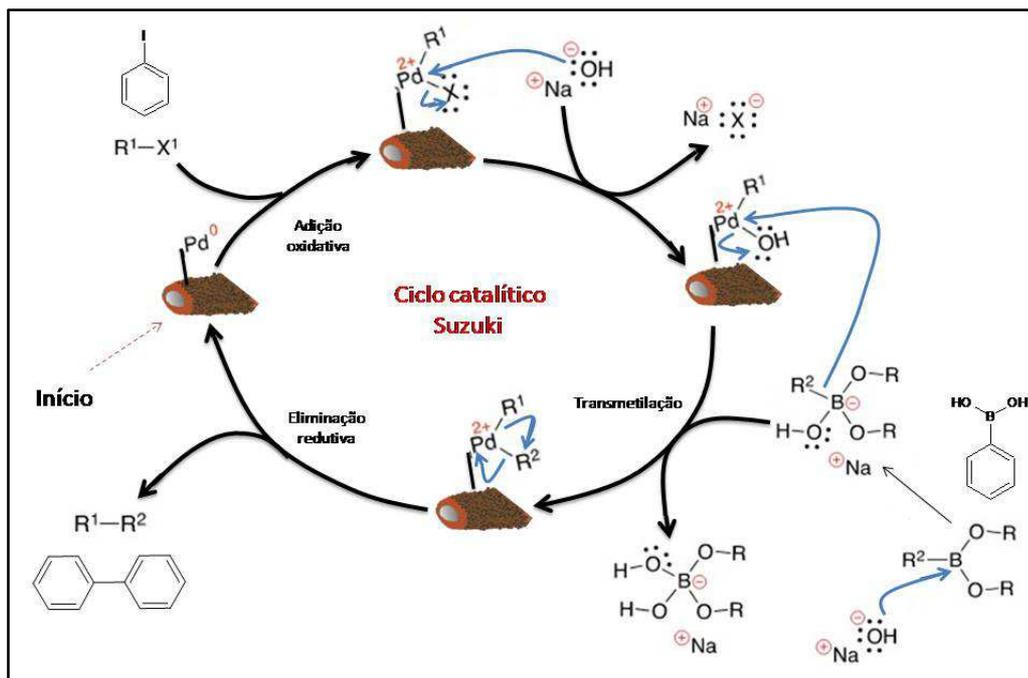


Figura 34. Esquema proposto para a formação do bifenil através do ciclo catalítico de Suzuki, na presença de bio-híbridos fungos@NPs-AuPd, a região marrom representa as NPs-AuPd e a região vermelha representa as NPs-Au. Adaptado de Gjiri, 2016.

c) Hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol

A Figura 35 mostra o espectro do 2-metil-3-buten-2-ol puro obtido sem o tratamento com o $H_{2(g)}$, o qual é identificado com a cor azul. Os espectros de cor vermelha, verde e lilás mostram a conversão em 1, 2 e 3h de reação. Os picos característicos do MBA começaram a aparecer com 30 minutos de reação APENDICE I, p.159. Depois de 1h os picos característicos do MBE desapareceram, indicando completa conversão a MBA.

A taxa de conversão foi obtida através do cálculo mostrado na seção 4.2.3, p. 59 e detalhado no APÊNDICE D, p. 154. O MBE (Figura 35) é caracterizado por um duplo dubleto em 5,81-5,86 ppm referente a 1 hidrogênio do grupo CH (**e**), um duplo dubleto em 4,82-5,07 ppm referentes a 2 hidrogênios do grupo CH_2 (**d**), um singleto em 1,31 ppm referente a 6 hidrogênios do grupo CH_3 (**c** e **b**) e 1 singleto em ≈ 2 ppm relacionado ao hidrogênio do grupo OH (**a**).

O produto formado pela hidrogenação do MBE é o 2-metil-butan-2-ol (MBA), o qual apresenta um duplo dubleto referente a 2 hidrogênios (**e'**) em 1,48-1,52 ppm do grupo CH_2 , um tripleto referente a 3 hidrogênios em 0,90-0,93 ppm do grupo CH_3 (**d'**), um singleto referentes a 6 hidrogênios do grupo CH_3 em 1,2 ppm (**b'** e **c'**) e um singleto em $\approx 1,59$ ppm referente ao grupo OH (**a'**) mostrados na Figura 35.

Os valores utilizados para o cálculo da taxa de conversão foram os resultados da integração do duplo dubleto (**e'**) referente a 2 hidrogênios do 2-metil-butan-2-ol, e do duplo dubleto (**e**) referente a 1 hidrogênio do 2-metil-3-buten-2-ol, obtidos a cada 20 minutos (Figura 35).

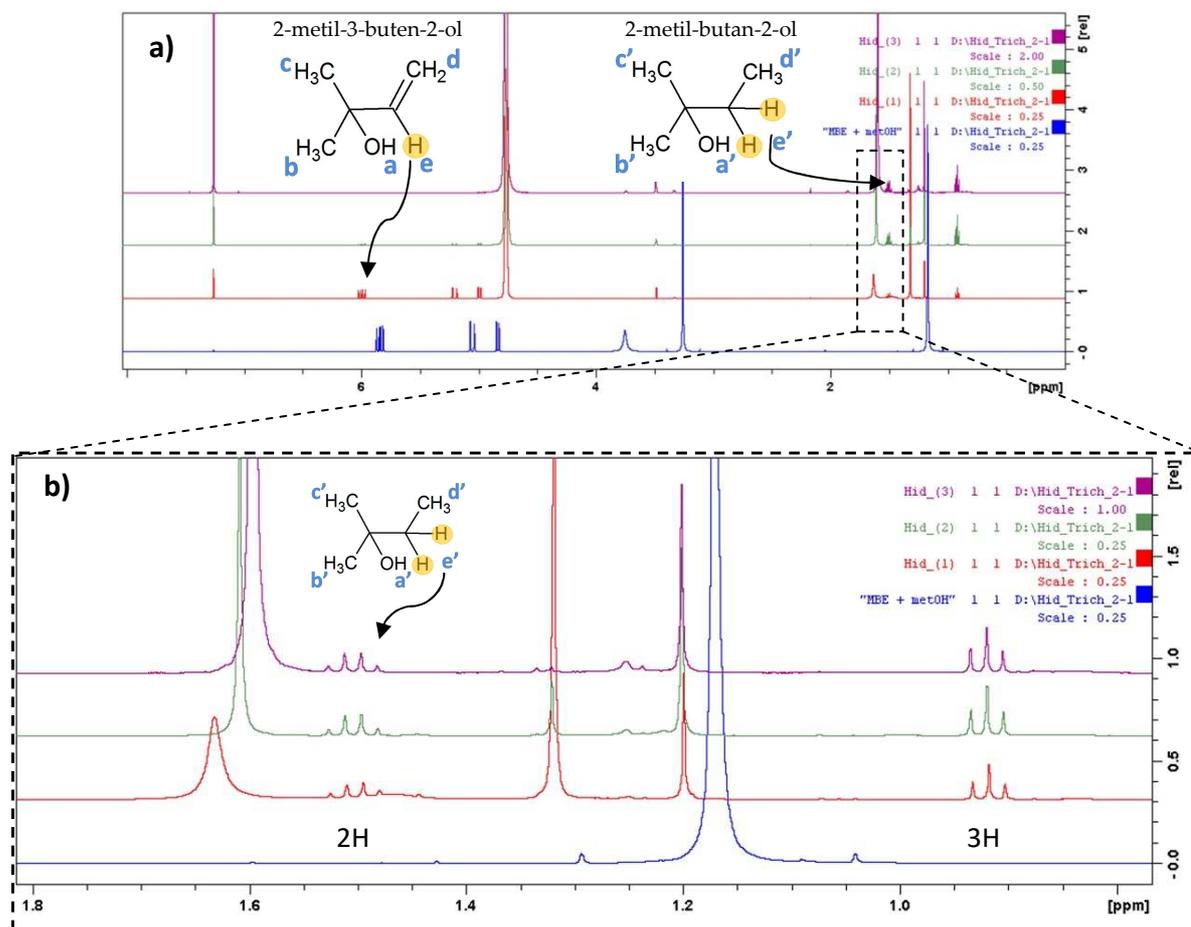


Figura 35. Espectros RMN-H do produto da reação de hidrogenação do álcool crofílico aplicando o bio-híbrido *Trichoderma* sp@NP-AuPd razão [citrato]:[Au³⁺] = 2,0. As letras em azul identificam os hidrogênios indicados.

O mecanismo da hidrogenação de alcenos foi proposto em 1984. A Figura 36 apresenta um esquema proposto adaptado para a hidrogenação do MBE utilizando os bio-híbridos fungos@NPs-AuPd como catalisadores em condições brandas à baixa pressão. Quando inicia-se o fluxo de H_{2(g)} na presença do bio-híbrido, As NPs-AuPd transferem elétrons para o H_{2(g)}, o qual se dissocia formando espécies Pd-H na superfície do bio-híbrido Figura 36(a) e (b). Foi mostrado por Ludwig *et al.*, 2010, que uma fraca ligação com o H também pode ser formada em regiões subsuperficiais das NPs. Como o fungo apresenta superfície flexível em que os filamentos podem se

curvar ou distorcer sua posição facilmente (não são microtubos rígidos) durante a agitação mecânica, as regiões subsuperficiais também ficam expostas, favorecendo estes processos de interação do H com as NPs subsuperficiais, fato que favorece um aumento da eficiência do processo. Depois de formar as espécies Pd-H o MBE é adsorvido na superfície do bio-híbrido, sofre uma adição eletrofílica e se liga na superfície das NPs-AuPd [Figura 36 (c) e (d)]. Em seguida o MBE sofre mais uma adição eletrofílica do segundo H (azul) seguido da dessorção do MBA (e).

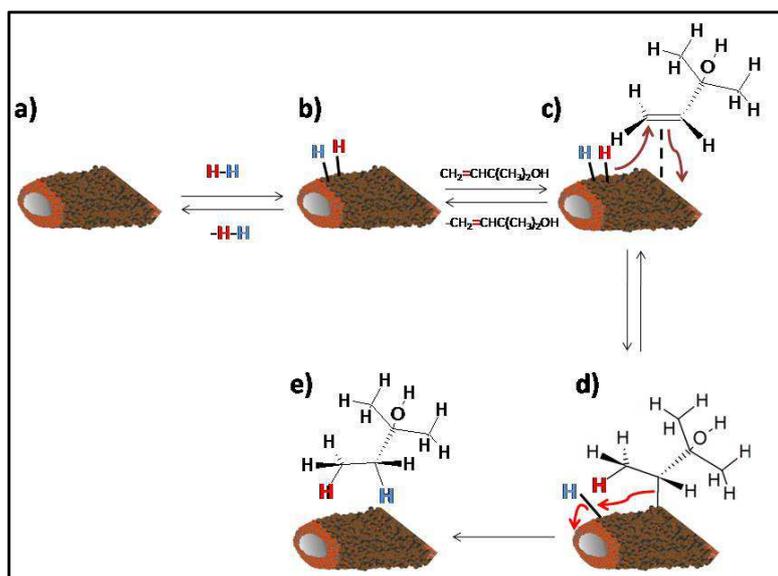


Figura 36. Esquema proposto para a formação do 2-metil-butano-2-ol à partir da hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol na presença de bio-híbridos fungos@NPs-AuPd, a região marrom representa as NPs-AuPd e a região vermelha representa as NPs-Au. Adaptado da referência "Adition of hydrogen- hydrogenation".

5.2.3 Considerações finais

Nesta seção uma ênfase maior foi dada às características morfológicas superficiais das NPs depositadas sobre os bio-híbridos. As nanopartículas de AuPd apresentam superfície rugosa, o que fornece as características que podem interferir para a atividade catalítica do bio-híbrido, na busca para compreensão de como se procedem as reações com três fases sólido-líquido-gás.

Além das características morfológicas, um estudo inicial de aplicação destes bio-híbridos nas reações de oxidação, Suzuki e hidrogenação foram realizadas. Deste estudo inicial foi possível perceber que o bio-híbrido *Trichoderma sp*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = 2,0 apresentou 99% de conversão para a reação de hidrogenação na presença do metanol como solvente. E esta foi uma das razões para continuar o estudo da aplicação dos bio-híbridos para avaliar o efeito das diferentes espécies de fungos na eficiência catalítica destes materiais frente à reação de hidrogenação do MBE, no entanto, sem a utilização do metanol, o qual acelerou o processo de degradação da parede celular dos microrganismos.

Na seção 5.3 será mostrado como que as quatro espécies de fungo *P.macrosporus*, *Trichoderma sp*, *Penicillium sp* e *Aspergillus niger* podem interferir na eficiência catalítica do bio-híbrido fungo@NPs-AuPd para a hidrogenação do MBE. Em seguida, será avaliada como fato inédito, a aplicação da luz visível na reação de hidrogenação do MBE e como esta pode interferir na velocidade e eficiência dos bio-híbridos como catalisadores.

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ESPÉCIE FÚNGICA E DA APLICAÇÃO DA LUZ VISÍVEL NA HIDROGENAÇÃO CATALÍTICA DO 2-METIL-3-BUTEN-2-OL APLICANDO BIO-HÍBRIDOS FUNGOS@NPs-AuPd

A radiação eletromagnética na faixa de comprimento de onda da luz visível tem sido aplicada para estudos dos seus efeitos na plasmônica, uma vez que o feixe de luz pode fornecer radiação e energia suficientes para intensificar os efeitos plasmônicos coletivos presentes nas superfícies das nanopartículas metálicas, e/ou conduzir transições eletrônicas entre metais. O forte acoplamento das NPs metálicas com a luz em fótons de energia específicos ocorre devido à excitação óptica das ressonâncias eletrônicas coletivas do metal conhecido como plasmons de superfície (MUKHERJEE *et al.*, 2013). A luz visível tem sido aplicada a NPs formadas por CdS (o qual atua como fotossensibilizante) para direcionar e catalisar a hidrogenação de compostos carbonílicos (LI *et al.*, 2011).

Xiao, Sarina, Jaatinen, *et al.*, 2014, mostraram que a luz visível também pode ser aplicada para catalisar reações de acoplamento Suzuki na presença de NPs bimetálicas de ouro e paládio. Estes mesmos autores reportaram que as ligas de NPs absorvem fortemente a luz visível a qual fornece elevada energia para a condução de elétrons das NPs, que por sua vez produzem elétrons altamente energéticos nos sítios superficiais. As superfícies energizadas nas NPs ativam os substratos e com isso aumentam sua atividade na faixa típica das reações de acoplamento de Suzuki.

Metais que apresentam ressonância plasmonica superficial, os quais transformam energia luminosa em energia térmica através das suas superfícies plasmônicas, podem oferecer uma alternativa para a abordagem da conversão de energia solar para energia química e sua interface com a catálise. Por exemplo, nanopartículas cúbicas bimetálicas de ouro e paládio foram aplicadas em reações de hidrogenação direcionadas por luz visível (ZHAO *et al.*, 2015).

Apesar de estudos aplicando a luz visível para direcionar o crescimento de fungos da espécie *Aspergillus niger* já terem sido realizados por Sabah *et al.*, 2013b,

esta foi a primeira vez que bio-híbridos formados por fungos como *templates* são utilizados em reações catalíticas envolvendo a aplicação da luz visível para o melhoramento da eficiência catalítica do mesmo. Neste trabalho, os bio-híbridos bimetálicos fungos@NPs-AuPd foram aplicados na hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol. Foram avaliados dois efeitos, 1) o efeito da variação espécie fúngica para a atividade e eficiência catalítica, e 2) o efeito da luz para o aumento da eficiência catalítica do catalisador bio-híbrido.

Estas reações procederam-se em água sem a adição de outros solventes e a baixas pressões. Estes fatores são importantes, uma vez que catalisadores mais eficientes podem ser utilizados em condições brandas de temperatura e pressão. Catalisadores para serem considerados bons e com elevada eficiência devem ser robustos, evitar desperdícios, reduzir a utilização e descarte de solventes no ambiente aquático, sua obtenção deve ser economicamente viável, seu processo de produção deve requerer o mínimo de formação de resíduos para o ambiente (Hagen, 2015b; a).

Um estudo da aplicação da luz para o aumento da eficiência do catalisador foi efetuado considerando-se os seguintes fatores: i) a luz visível fornece energia para o aumento do efeito plasmônico das nanopartículas ii) a luz visível no comprimento de onda de 532 nanômetros (luz verde- comprimento de onda na faixa de excitação plasmonica das NPs-Au) é capaz de aumentar a temperatura do meio até 29°C, fazendo com que o meio torne-se mais energético e com os efeitos plasmônicos de superfície tornam-se mais efetivos nestas condições.

5.3.1 Resultados e discussão

Os bio-híbridos fungos@NPs-AuPd selecionados para este conjunto de reações são formados pelas espécies *P.macrosporus*, *Trichoderma sp*, *Penicillium sp* e *Aspergillus niger* (Figura 37). Neste estudo, a razão [citrato]:[Au³⁺] = 7,1 foi mantida constante para verificar o efeito da espécie dos fungos e da radiação luminosa na reação de hidrogenação do MBE.

A Figura 37 apresenta as imagens de MEV dos bio-híbridos utilizados neste estudo. Imagens da espécie *P.macrosporus* [Figura 37 (a-a.2)] revelaram NPs aproximadamente esféricas (≈ 70 nm) e NPs menores (≈ 20 nm), provavelmente são NPs-Au que não sofreram assimilação e deposição do Pd⁰. O *Trichoderma sp*, *Penicillium sp* e *Aspergillus niger* também apresentaram NPs (≈ 70 nm) em sua superfície [Figura 37 (b-d.2)].

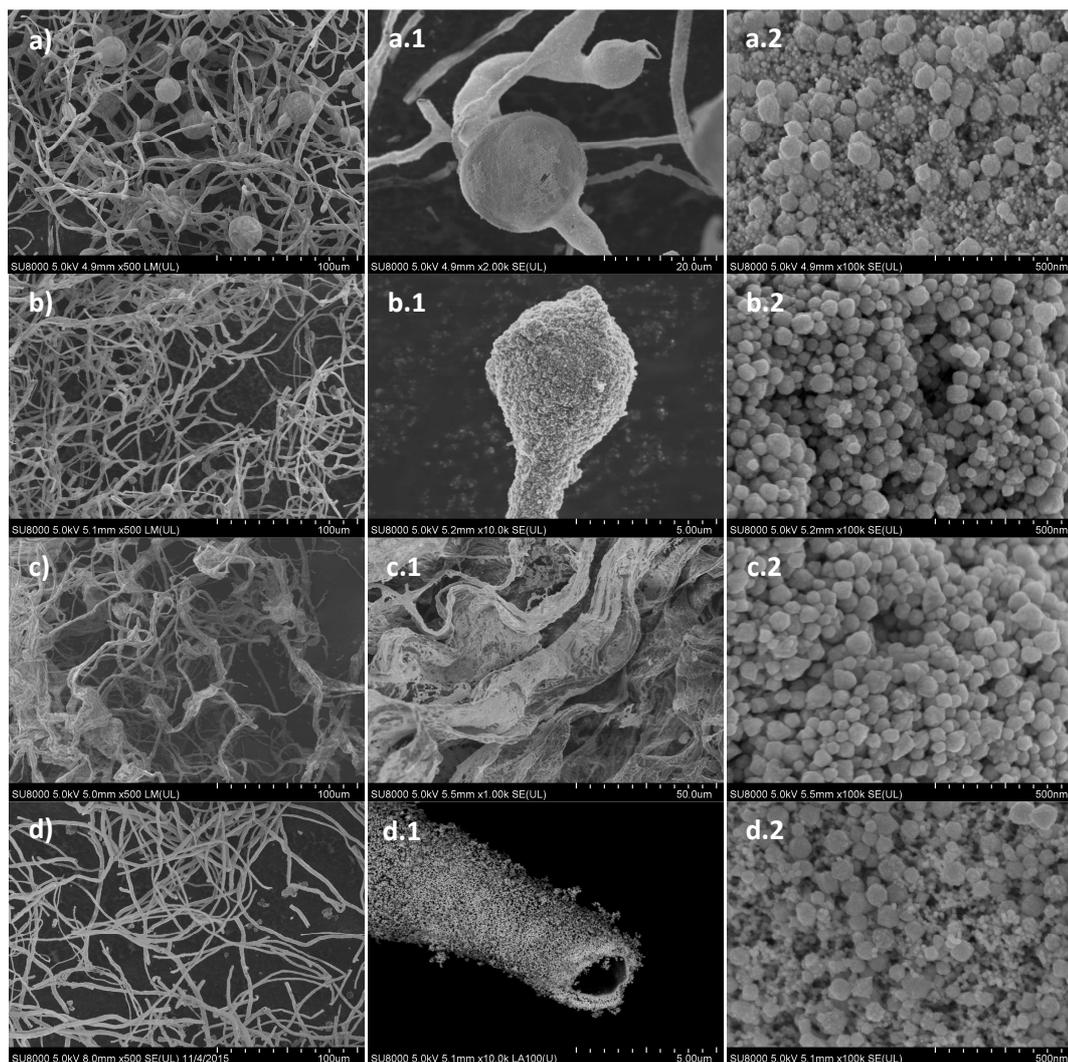


Figura 37. Imagens MEV de alta resolução dos bio-híbridos fungos@NPs-AuPd formados pelas espécies a) *P.macrosporus*, b) *Trichoderma sp*, c) *Penicillium sp* e d) *Aspergillus niger*, [citrato]:[Au³⁺] = 7,1. Estruturas características de cada espécie (a.1-d.1), detalhes da superfície recoberta com NPs-AuPd (a.2-d.2).

Através dos gráficos obtidos com a conversão do MBE foi possível perceber quais espécies de fungos apresentaram ser mais efetivas para as reações de

hidrogenação no escuro, à temperatura ambiente, utilizando apenas água como solvente e à pressão reduzida inicial de 0,03 atm (Figura 38). Avaliando-se os bio-híbridos da espécie *P.macrosporus*, *Trichoderma* e *Penicillium sp*, apenas 20% do produto foi obtido ao final de 2 horas de reação no escuro, à temperatura ambiente. No entanto, o bio-híbrido da espécie *A.niger*, favoreceu a formação de 60% do produto 2-metil-butanol (MBA).

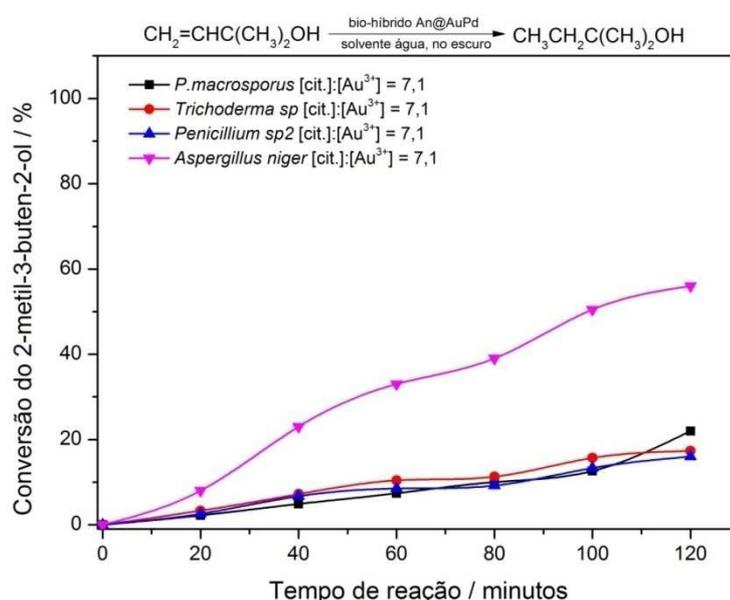


Figura 38. Porcentagem de conversão do MBE relacionado com as quatro espécies de fungo. Esta reação foi realizada no escuro, à temperatura ambiente.

Na presença da luz visível (Figura 39), os efeitos catalíticos foram intensificados, mostrando uma melhora significativa na eficiência catalítica, em 40 minutos, aproximadamente 95% dos produtos já haviam sido obtidos com o bio-híbrido formado com a espécie *A.niger*, em segundo lugar foi o *Penicillium sp* com 45%, seguido do *P.macrosporus* com 40% e por ultimo o *Trichoderma sp* com 20% de conversão.

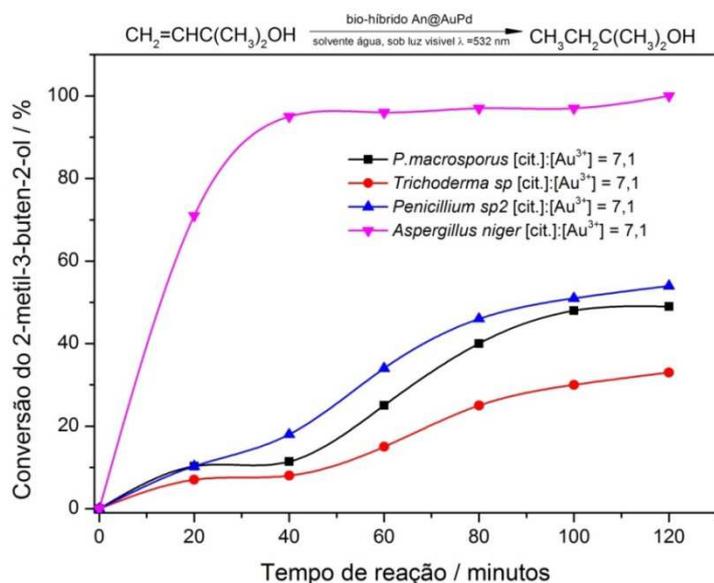


Figura 39. Porcentagem de conversão do MBE relacionado com as quatro espécies de fungo. Esta reação foi realizada na presença de luz visível (LED verde ≈ 500 mW de potência), o que faz aumentar a temperatura da reação para 30°C .

Estes gráficos da Figura 39 mostraram um comportamento não linear da velocidade de hidrogenação, a qual é característica de uma reação controlada pela superfície (SAMARDŽIĆ *et al.*, 2014). Os espectros RMN-H do *A.niger*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = 7,1 no escuro e sob luz foram mostrados nas Figuras 68 e 69 (APÊNDICE I).

A presença da luz sobre as NPs bimetálicas na superfície dos fungos conduz a transferência de elétrons do ouro para o paládio. O excesso de elétrons na superfície das NPs induz a interação dos sítios ativos com o substrato adsorvido, fato que resulta numa melhoria na velocidade da reação (MUKHERJEE *et al.*, 2013). Além disso, aquecimento local gerado na superfície das NPs metálicas aumenta a temperatura total da mistura reacional (MUKHERJEE *et al.*, 2013). Com o aumento da temperatura nos frascos gerado pela presença da luz, ocorre uma elevação da energia cinética das partículas no meio reacional que resultam num aumento na velocidade

da reação. A morfologia e composição das NPs metálicas impactam fortemente nos efeitos plasmônicos de superfície (LINIC *et al.*, 2011).

As NPs-Pd não apresentam bandas plasmônicas quando isoladas, mas as NPs-Au possuem esta propriedade. Assim, através dos efeitos coletivos plasmônicos das NPs-Au, elétrons são transferidos para a banda de condução do paládio, os quais apresentam efeitos eletrônicos intensificados devido a presença das NPs-Au (FERRER *et al.*, 2007; YUAN *et al.*, 2007; WILSON, 2014).

NPs metálicas com propriedades plasmônicas possuem propriedades únicas quando interagem com a luz. Sob iluminação, os elétrons livres na banda de condução oscilam com a mesma frequência da luz incidente. Seguindo esta excitação eles sofrem decaimento por dois caminhos, radiativo ou não- radiativo. O decaimento radiativo é basicamente a re-emissão de fótons, os quais não apresentam contribuição para o melhoramento plasmônico. Os efeitos de decaimento não-radiativos ocorrem em vários caminhos seja por transições eletrônicas, seja por liberar aquecimento durante o processo de relaxação ou ambos. Este último processo é chamado de efeito foto-térmico e a energia térmica liberada por este processo pode aumentar a temperatura na superfície de NPs plasmônicas (MUKHERJEE *et al.*, 2013).

No sistema sob iluminação, a energia térmica liberada pela superfície das NPs sobre os bio-híbridos resulta em um aumento total na temperatura do sistema, uma vez que aumentando-se a temperatura das NPs haverá uma condução de energia para a superfície orgânica biológica presente nos microrganismos.

Após a exposição da luz-visível o bio-híbrido *P.macrosporus* NPs-AuPd apresentou certo encolhimento em suas hifas [Figura 40, (b)], fato que era esperado devido ao aquecimento local das NPs na superfície dos fungos que transferem energia térmica para a superfície orgânica biológica, a qual inicia a decomposição térmica em 187 °C na presença de NPs-AuPd (Figura 64, APÊNDICE G, p.157).

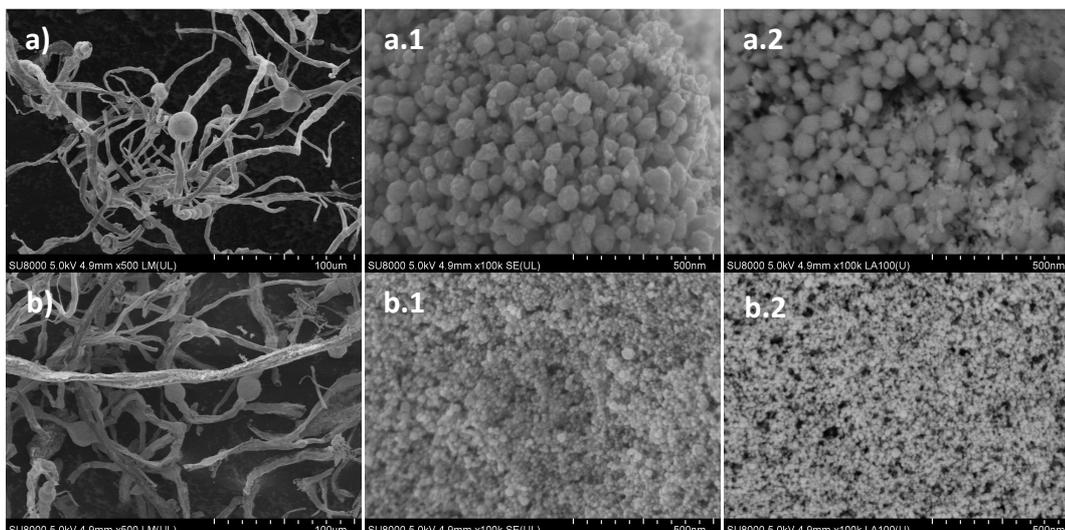


Figura 40. Imagens de MEV comparando *P.macrosporus* [citrato]:[Au³⁺] = 7,1, obtidas depois das reações de hidrogenação a) no escuro, b) na presença da luz visível. Modo de elétrons secundários (a.1-b.1), modo de elétrons retroespalhados (a.2-b.2).

Depois das reações tanto sob luz visível e no escuro, as NPs permaneceram estabilizadas na superfície da parede celular dos fungos mostrando que o material é resistente para a reação de hidrogenação e agitação mecânica a 1200 RPM durante duas horas (Figura 41).

Apenas com as imagens de MEV, não se pode definir quais os principais fatores que interferiram no aumento da eficiência catalítica desempenhada pelo bio-híbrido *A.niger*@NP-AuPd [citrate]:[Au³⁺]=7,1. A princípio supõe-se que como as NPs fazem o papel fundamental de disponibilizar sítios ativos em que o paládio é o metal catalisador, a conversão do álcool desempenhada pelo catalisador é proporcional a quantidade de sítios ativos presentes na amostra, ou seja, à quantidade de NPs formadas na superfície dos fungos. No entanto, outros fatores intrínsecos dos fungos também podem interferir na eficiência das NPs, tais como largura e idade das hifas, componentes da parede celular, estruturas de reprodução características, todos estes

fatores que são individuais de cada espécie podem interferir nestes resultados favorecendo o *A.niger* como o melhor *biotemplate* catalítico para este tipo de reação.

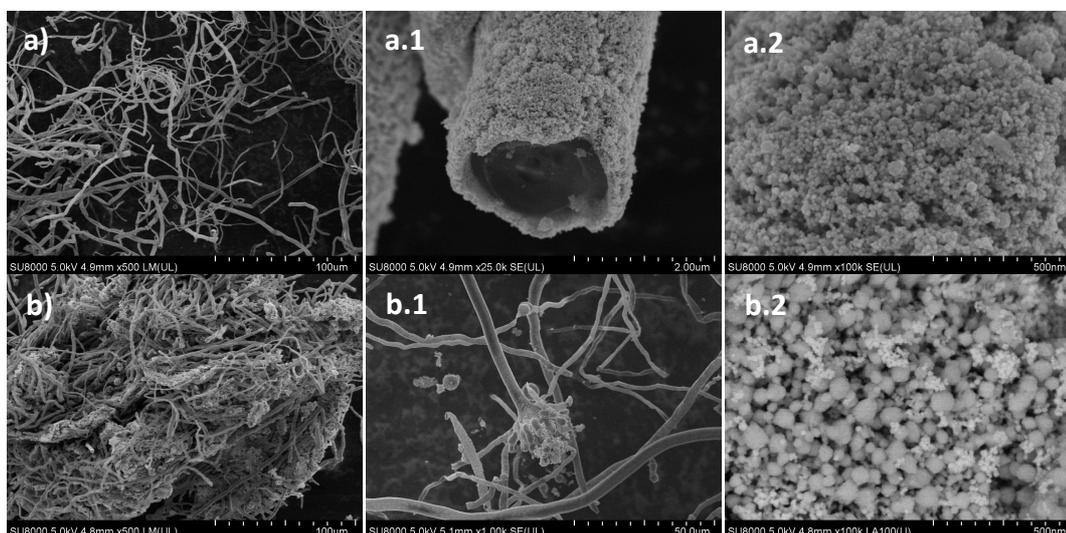


Figura 41. Imagens de MEV comparando *A.niger* [citrato]:[Au³⁺] = 7,1, obtidas depois das reações de hidrogenação a) no escuro, b) na presença da luz visível. Modo de elétrons secundários (a.1-b.1), modo de elétrons retroespalhados (a.2-b.2).

A quitina contribui enormemente para a resistência da parede celular dos fungos filamentosos. Quando alguns fungos sofrem estresse causado pelo seu meio, estes podem sofrer a hiperacumulação de quitina, outras espécies de fungos podem responder de maneira oposta inibindo a sua formação (RAM *et al.*, 2004). Quando a síntese da quitina é afetada, as hifas em crescimento tendem a se dilatar e sofrer lise, a menos que haja uma regulação no equilíbrio osmótico do meio. RAM *et al.*, 2004, mostraram que ao expor o *A.niger* a condições de estresse, há um aumento da produção de quitina viabilizado por genes expressivos. Uma maior produção da quitina por este fungo pode favorecer a estabilização das NPs metálicas em sua superfície por um longo período de tempo, fato que pode contribuir para o seu papel de *template* efetivo para as NPs.

Desta maneira a fim de elucidar com maiores detalhes os efeitos catalíticos pronunciados pelo bio-híbrido obtido com a espécie *A.niger*, foi iniciado um estudo mais aprofundado deste bio-híbrido que será apresentado no na seção 5.4.

5.3.2 Considerações finais

Este capítulo teve como finalidade investigar a variação das espécies de fungos utilizadas na formação do bio-híbrido fungos@NPs-AuPd para o efeito na atividade catalítica destes materiais na reação de hidrogenação do MBE. Como resultado, o *A.niger* foi a espécie que apresentou a melhor eficiência catalítica comparando-se com os demais bio-híbridos. Para isto foram investigados dois sistemas de reação de hidrogenação, o primeiro no escuro e o segundo utilizando um dispositivo que emite radiação visível (LED verde, $\lambda = 532$ nm, com potência de ≈ 500 mW).

A aplicação da luz visível teve como principal função o aumento da temperatura e aumento dos efeitos de catálise plasmônica que envolvem as NPs bimetalicas, considerando que NPs com tamanho menor que o comprimento de onda aplicado apresentam seu efeito plasmônico intensificado (MUKHERJEE *et al.*, 2013). Neste trabalho, ficou demonstrado que não apenas os efeitos plasmônicos fazem parte deste processo como também efeitos intrínsecos do catalisador bio-híbrido que é formado por fungos, mostrando que as espécies fúngicas interferem no efeito catalítico obtido por cada um deles.

Na seção 5.4 será apresentado um estudo sobre hidrogenação do bio-híbrido *A.niger*@NPs-AuPd, suas propriedades e como a variação na concentração dos íons citrato pode interferir na formação das NPs-AuPd, bem como na sua atividade catalítica.

5.4 ESTUDO DO EFEITO DOS ÍONS CITRATO PARA O ESTADO DE AGREGAÇÃO DAS NPs-AuPd E SUA INFLUÊNCIA NA HIDROGENAÇÃO CATALÍTICA DO 2-METIL-3-BUTEN-2-OL UTILIZANDO O BIO-HÍBRIDO *Aspergillus niger*@NPs-AuPd

Os estudos mostrados na seção anterior levaram à conclusão de que o bio-híbrido formado pela espécie *A.niger*@NPs-AuPd apresentou-se mais promissor para a reação de hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol (MBE). No entanto, algumas características físicas dos bio-híbridos tais como porcentagem de paládio em sua superfície comparada com a de ouro ainda não foram revelados. Assim, esta seção teve como principal finalidade apresentar um estudo mais detalhado dos bio-híbridos formados pela espécie *A.niger*@NPs-AuPd. Para isso, foram avaliadas amostras da espécie *A.niger* cultivados em soluções de NPs-Au nas razões [citrato]:[Au³⁺] = 0,3; 2,0; 3,7; 7,1 e 17,3 respectivamente, os quais foram utilizados como “sementes” para a redução do paládio sobre as NPs-Au previamente depositadas nos fungos. Para entender melhor as características morfológicas destes bio-híbridos foram obtidas imagens de MET, MEV e para obter um perfil dos elementos presentes foram feitas análises por EDX acoplado a MET e MEV. Os bio-híbridos também foram analisados por DRX e TG.

5.4.1 Resultados e discussão

Com esta metodologia, inspirada na síntese de nanopartículas de AuPd do tipo *core-shell* desenvolvidas por Balcha *et al.*, 2011, esperava-se que todas as NPs-Au fossem recobertas com o paládio formando uma espécie de caroço-casca (*core-shell*). As imagens de MET mostraram que as NPs-AuPd foram formadas, no entanto, não foram obtidas nanopartículas esféricas regulares como as NPs-Au (Figura 42).

Avaliando-se todas as amostras através de MET, foi possível obter um perfil de deposição destas NPs em cada condição em que os fungos foram obtidos. A Figura 42 (a-e) apresenta imagens de MET dos bio-híbridos *A.niger*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = 0,3; 2,0; 3,7; 7,1 e 17,3, respectivamente no aumento de 15.000X e um

maior aumento para mostrar as NPs-AuPd em 400.00X (a.1-e.1). Na razão [citrato]:[Au³⁺] = 0,3 e 2,0 [Figura 42 (a-b)] as NPs formam aglomerações sobre a parede do fungo, enquanto que na razão [citrato]:[Au³⁺] = 3,7 [Figura 42 (c)] as NPs encontravam-se mais dispersas. Mas em [citrato]:[Au³⁺] = 7,1, uma densa aglomeração destas NPs foi observada e na razão [citrato]:[Au³⁺] = 17,3 partículas com tamanhos ≈ 70 nm nm recobriram a parede do fungo. Uma estimativa do tamanho das partículas utilizando o programa ImageJ revelou que 59,4% das NPs apresentavam tamanhos acima de 30 nm na razão [citrato]:[Au³⁺] = 17,3. Por outro lado, nas razões [citrato]:[Au³⁺] = 0,3 e 2,0 apenas 4,2 e 4,9% das NPs apresentaram tamanhos acima de 30 nm de diâmetro, respectivamente. Estes valores foram apresentados na Figura 43.

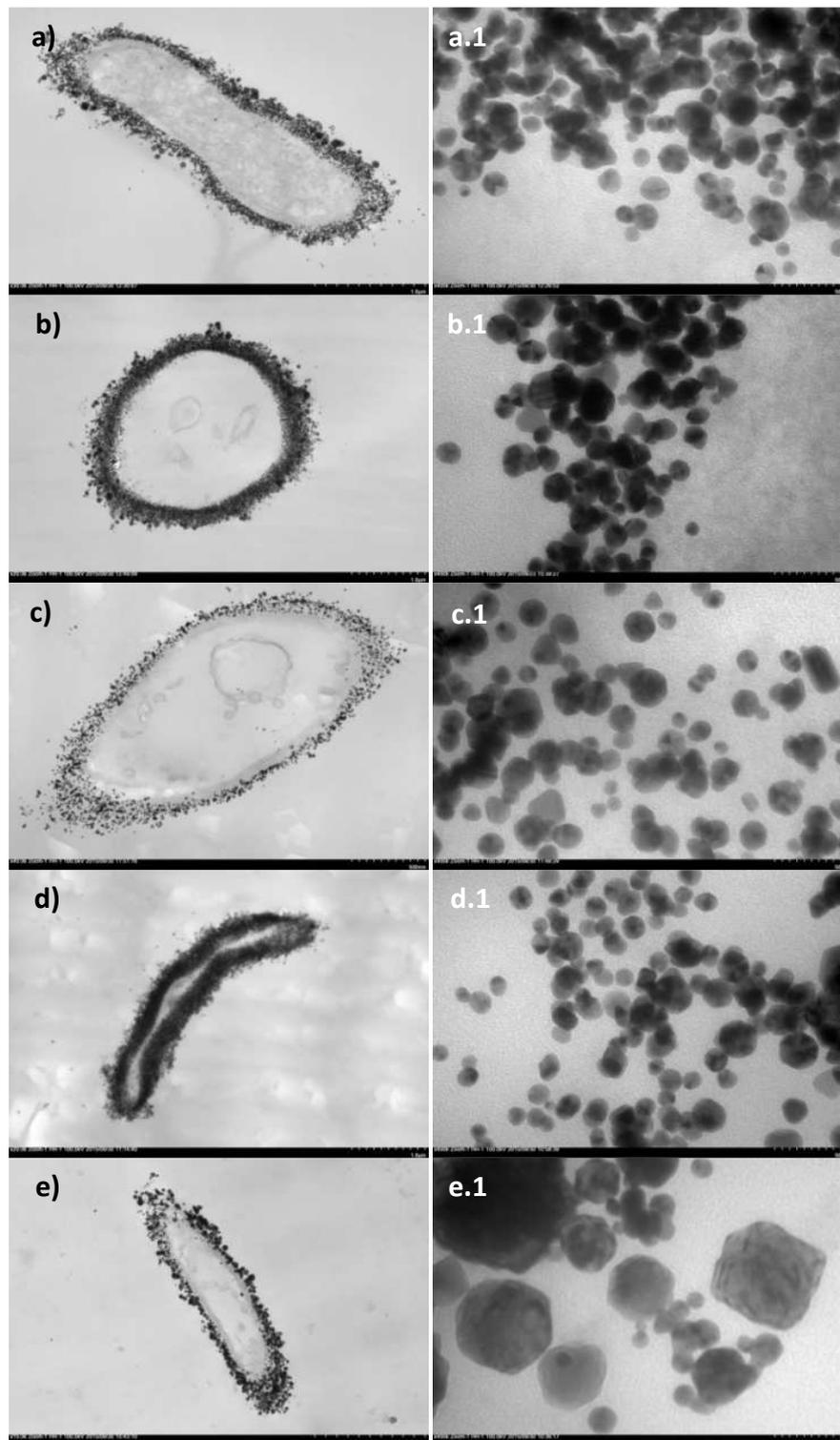


Figura 42. Imagens de MET dos bio-híbridos *A.niger* @ NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = a) 0,3; b) 2,0; c) 3,7; d) 7,1 e e) 17,3, respectivamente são mostradas com detalhes as NPs-AuPd em 400.00X de aumento (a.1- e.1).

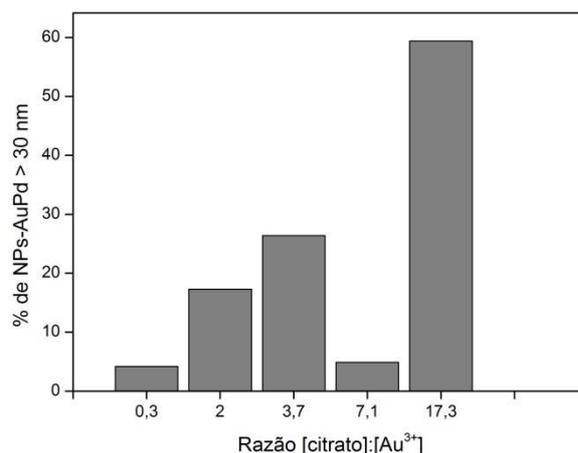


Figura 43. Estimativa indicando a porcentagem de tamanho de partículas acima de 30 nm de diâmetro, nas razões [citrato]:[Au³⁺] = 0,3, 2,0, 3,7, 7,1, 17,1, estes cálculos foram realizados com análise de tamanho de partículas utilizando o programa ImageJ.

O processo de deposição de NPs-AuPd foi o mesmo para todos os fungos, o que os diferenciaram foram as condições de crescimento, sendo que a variação na razão [citrato]:[Au³⁺] interfere no pH, na força iônica do meio, e na agregação das NPs-Au na parede celular do fungo, como já foi detalhadamente discutido na introdução desta tese.

A forma como estas NPs-Au estavam distribuídas na superfície dos fungos influencia na morfologia das NPs bimetálicas AuPd. Uma vez que as NPs-Au estão estabilizadas pelos grupos funcionais presentes nas macromoléculas microfibrilares que constituem a parede celular dos fungos, quando adiciona-se o paládio e este é então reduzido com o agente redutor, estas macromoléculas presentes na parede do fungo continuam a interferir na estabilidade e crescimento destas nanopartículas.

Assim, supõe-se que se as macromoléculas (quitina, β-glucanas) da parede do fungo não estão presentes em quantidades suficientes para estabilizar as NPs, um maior número de nanopartículas com tamanhos maiores será obtido após a redução do paládio.

No MET, diferentemente do MEV, partículas formadas por átomos mais elétron-densos (maior número atômico) apresentaram-se mais escuras do que partículas formadas por átomos menos elétron-densos (menor número atômico). Isso ocorre porque no MET o detector se encontra localizado logo abaixo da altura da amostra e captura os sinais dos elétrons que atravessam a amostra os quais são provenientes do canhão de elétrons, assim quanto maior a massa, o número atômico, mais escura estas partículas são no MET, pois estas bloqueiam a passagem do feixe de elétrons nesta região de maior massa atômica (KUO, 2014).

Com as imagens de MET em maiores magnificações (400.000X), observou-se que as nanopartículas com tamanhos ≈ 70 nm apresentam uma região menor mais escura [Figura 44(e.1)], muito provavelmente estes pontos menores mais escuros são devido à presença das NPs-Au (*seeds*). Quando o sal de paládio é reduzido na presença das NPs-Au, a nucleação, germinação e crescimento são iniciados sobre estas NPs-Au que atuam como “sementes”. Se durante a nucleação e crescimento, o Pd não encontrou um estabilizante eficiente que controlasse o seu tamanho (nas regiões externas à parede celular), suas partículas cresceriam bastante depositando-se sobre as demais partículas formadas dentro das microfibras da parede celular do bio-híbrido e mantendo as NPs-Au em seu interior, como fica claramente observado na [Figura 44 (e.1),] NPs-Pd ≈ 70 nm envolvendo NPs-Au ≈ 20 nm.

Esta observação ficou mais evidente quando compararam-se os dados estimados de tamanho de partículas (Figura 43) com as imagens de MET (Figura 42). Por exemplo, o *A.niger* que cresceu na razão [citrato]:[Au³⁺]=7,1 apresentou espessura da parede mais compacta {com NPs mais monodispersas do que as obtidas na razão [citrato]:[Au³⁺] = 17,3 [Figura 42, (e)]}, completamente recoberta por NPs bastante próximas, ao visualizar estas NPs no aumento de 400.00X, percebeu-se que estas NPs apresentavam pontos escuros em seu centro indicando ser NPs-bimetálicas do tipo core-shell (Figura 44, d.1). A estimativa mostrou que nesta concentração, apenas

4,2% das NPs são maiores do que 30 nm. Ou seja, foram formadas NPs menores, bimetálicas.

Assim nanopartículas bimetálicas com tamanhos menores do que 30 nm foram formadas em regiões mais internas da parede celular [esquematizado na Figura 45, (d.1)]. Neste caso, muito provavelmente, o paládio encontrou uma camada de macromoléculas estabilizantes na região interna da parede do fungo que limitasse seu crescimento como mostrado na Figura 42(d.2) esta mesma imagem foi ampliada para melhor visualização na Figura 44 (d.1).

No processo de síntese dos bio-híbridos bimetálicos, após a redução do sal de paládio e agitação por 1 hora em banho de gelo, os fungos foram dispostos em uma mesa agitadora *overnight* a uma temperatura de 24,5 °C e velocidade de agitação de 102 RPM. Este tempo pode ter sido suficiente para que os microfilmes de hidrofobinas (KUBO *et al.*, 2016) fossem formados sobre os fungos estabilizando as NPs que foram nucleadas e cresceram tanto nas regiões internas da parede quanto nas regiões externas à parede celular (Figura 29).

Avaliando as imagens de MEV de alta resolução na seção 5.2.1 (Figura 30) teve-se a impressão de que as NPs-Au estariam imersas nas NPs-Pd formadas como a estrutura esquematizada na Figura 45(a). Mas após avaliar as imagens de MET (Figura 42), o que parece é que como as NPs-Pd não possuem o estabilizante efetivo que limitem o seu crescimento fora da parede celular do fungo, estas cresceram bastante (Figura 45,b-c), apresentando uma forma aproximadamente esférica e rugosa. Algumas destas NPs-Pd possuem NPs-Au em seu interior. Como foi perceptível nestes cortes com zoom das imagens MET da Figura 44 (d.1 e e.1) respectivamente.

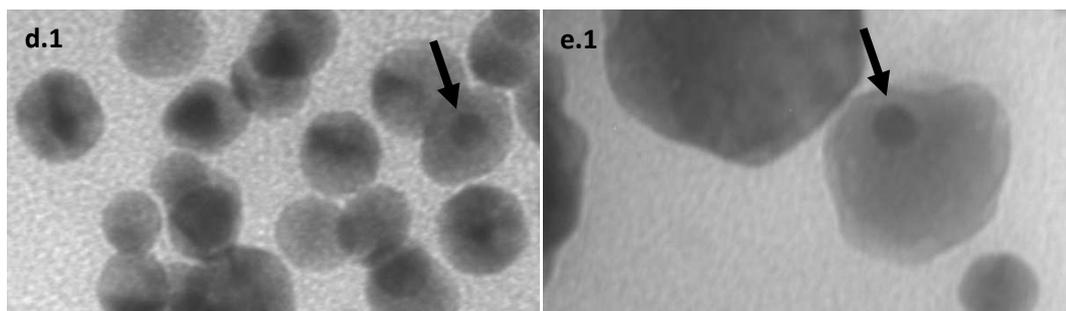


Figura 44. Zoom das imagens de MET dos bio-híbridos *A.niger* @ NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = d) 7,1 e e) 17,3, obtidos da Figura 42.

Foi possível perceber que NPs-Au encontram-se no interior destas partículas maiores formadas por Pd e que o crescimento das NPs-AuPd até tamanhos $\approx 70-90$ nm foi devido ao fato de as NPs terem sido formadas sem a presença de um estabilizante externo que limitasse a nucleação e o crescimento das NPs-Pd [Figura 45(c)]. Assim, esperava-se que estas NPs-AuPd fossem estabilizadas pelas macromoléculas de proteínas e glucanas presentes na parede celular dos fungos (Figura 45-esquema). Em regiões mais internas da parede celular [Figura 45 (c)] estas NPs possuem tamanhos menores ($\approx 10-30$ nm) e são bimetálicas em sua maioria. No entanto, nas regiões mais externas estas NPs apresentam tamanhos maiores ($\approx 70-90$ nm), sugerindo que nem todas são bimetálicas, como foi possível verificar através das imagens de MET mostradas na Figura 42.

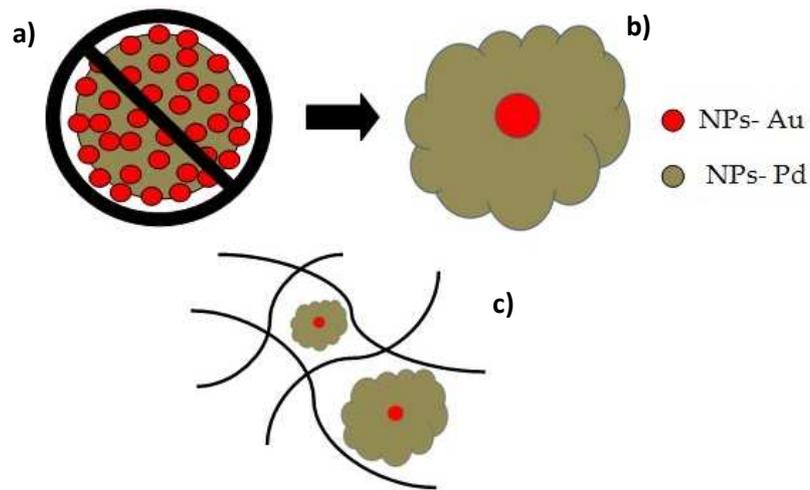


Figura 45. Esquema representando o mecanismo de formação das NPs bimetálicas depositadas em regiões externas e internas da parede celular. Partículas formadas nas regiões mais internas estão completamente estabilizadas por grupos funcionais presentes nas microfibras da parede do fungo, no entanto, partículas formadas nas regiões mais externas à parede não foram eficientemente estabilizadas por estas microfibras, fazendo seu tamanho aumentar.

Para provar a presença do ouro e do paládio nestas nanopartículas depositadas nos bio-híbridos, foram realizadas análises por EDX através de MET.

Na Figura 46(a), a região em destaque foi a região selecionada para a obtenção do espectro de EDX através do MET, que foi realizado em 250.000X de aumento e na Figura 46(b) o EDX foi obtido em 25.000X. Quanto maior a magnificação obtida, maior é a intensidade e a porcentagem atômica obtida dos átomos de paládio presentes nesta região dos cortes transversais das amostras do bio-híbrido *A.niger@NP-AuPd*.

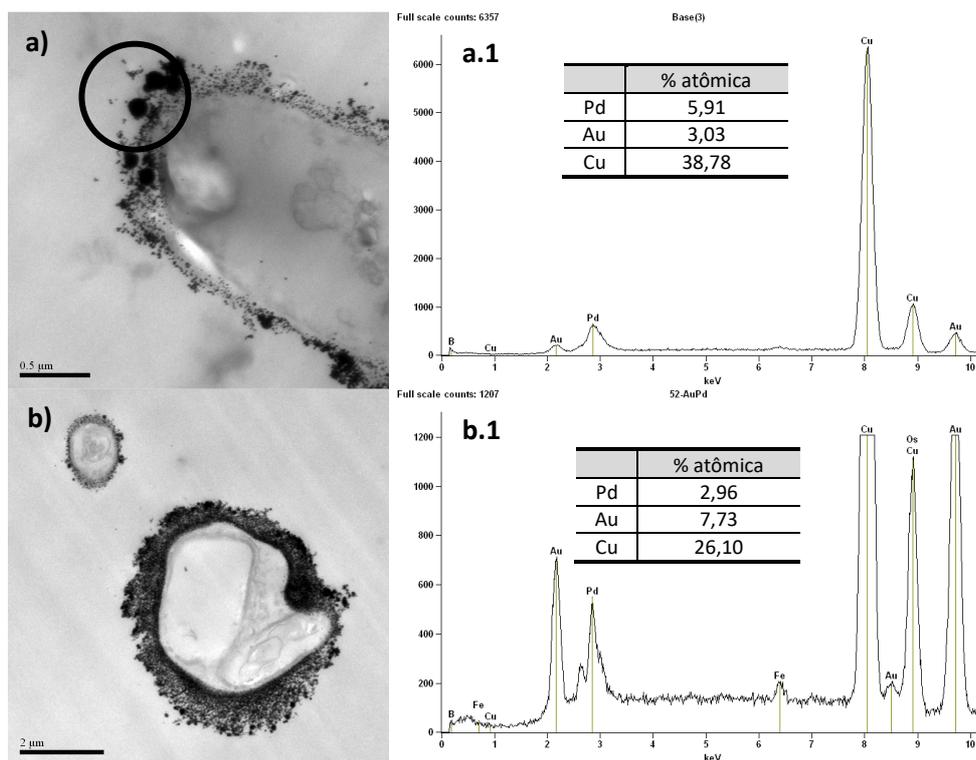


Figura 46. Imagens MET do bio-híbrido *A.niger* @ NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = a) 7,1; b) 7,1 e c) 0,3 e seus respectivos EDX (a.1-c.1).

O EDX é uma análise superficial que retira elétrons de camadas mais internas numa profundidade de até 10 nm da amostra. Como esta é uma análise superficial, cada vez que se aumenta a magnificação uma maior quantidade de sinais de paládio é obtida pelo fato do paládio estar localizado em regiões mais externas da superfície da amostra. Uma vez que o sal de paládio foi reduzido na superfície das NPs-Au. O MEV e o EDX obtido através do MEV confirmaram estas observações. Na Figura 47 são mostradas imagens de MEV de alta resolução no aumento de 25.000X [Figura 47, (a-e)] e 100.000X [Figura 47 (f)]. Nestas imagens foi possível perceber que NPs-AuPd com tamanhos $\approx 70-90$ nm foram mais escassas no bio-híbrido *A.niger*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺]=0,3 [Figura 47(a)], opostamente no *A.niger*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺]=7,1 [Figura 47 (d e f)], verificou-se elevada quantidade de NPs $\approx 70-90$ em sua superfície com a magnificação de 100.000X.

Estes resultados condizem com o que foi visto nas imagens de MET [Figura 42 (d)] no que se refere à quantidade de NPs depositadas na superfície do fungo *A.niger*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺]=7,1.

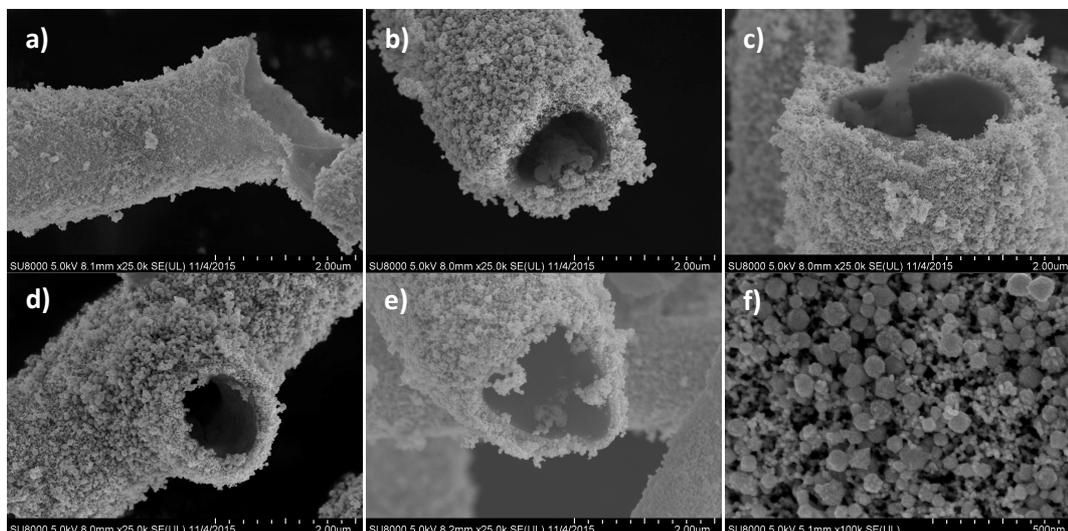


Figura 47. Imagens de MEV dos bio-híbridos *A.niger*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = a) 0,3; b) 2,0; c) 3,7; d) 7,1 e e) 17,3, detalhe da superfície do *A.niger* @ NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺]= 7,1 é mostrado em f).

O estudo de EDX, através do cálculo da razão metal/(carbono + metal) foi aplicado para obter valores semi-quantitativos dos metais presentes na superfície destas amostras. O gráfico da Figura 48 mostra dados dos espectros de EDX adquiridos com 500X de magnificação.

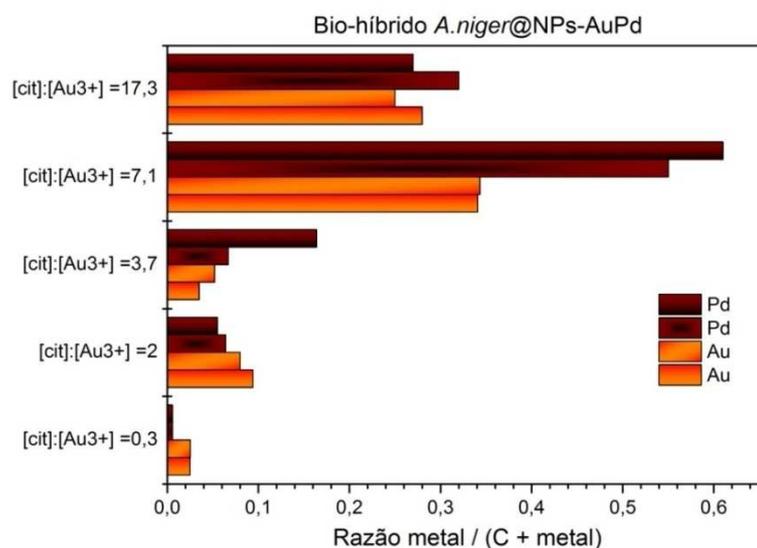


Figura 48. Análise semi-quantitativa de Au e Pd depositadas bio-híbridos *A.niger* @ NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = 0,3; 2,0; 3,7; 7,1 e 17,3, Razão Metal:(Carbono + Metal) foram obtidos através da técnica de EDX acoplado ao MEV.

Com este gráfico (Figura 48), ficou bastante claro que os bio-híbridos formados por *A.niger*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺]=7,1 foram os que mais assimilaram NPs-Pd e NPs-Au em sua superfície, seguido das seguintes razões: 17,3; 3,7; 2,0 e por ultimo 0,3.

A presença dos cristais de Au e Pd nas amostras contendo NPs-AuPd foi confirmada com análises de DRX. Os espectros de DRX padrões das amostras *A.niger*@NPs-Au, *A.niger*@NPs-AuPd, *A.niger* e *A.niger*@NPs-Pd são mostrados na Figura 49. O fungo *A.niger* puro apresenta apenas um pico largo em 21,3° indicando a presença de material amorfo, o qual aparece em todas as amostras, porem se apresenta mais intenso no *A.niger* puro. Os picos 40,1°; 46,5°e 68,2° revelam a presença de nanocristais de Pd (HAN *et al.*, 2015), e os picos 38,4°; 44,3°; 64,5° e 77,5° estão relacionados com a presença de nanocristais de Au (WONG *et al.*, 2016) na amostra *A.niger*@NPs-AuPd, [citrato]:[Au³⁺] = 7,1.

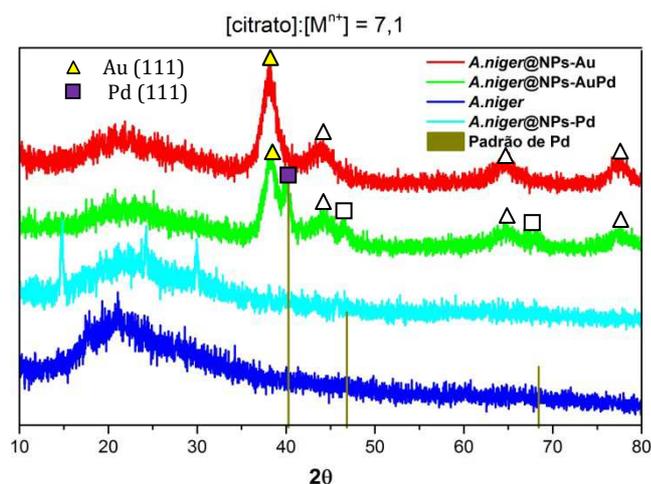


Figura 49. Padrões de DRX dos bio-híbridos *A.niger*@NPs-AuPd, [citrato]:[Au³⁺] = 7,1 com destaque para os planos 111 do Au e Pd.

Os quatro picos de Au na amostra *A.niger*@NPs-Au são mantidos no mesmo ângulo 2θ quando observados nas amostras de *A.niger*@NPs-AuPd. Alguns autores retratam que as NPs bimetálicas de AuPd apresentam um pico mais largo (YANG *et al.*, 2014) localizada em 38,9°, que segundo Han *et al.*, 2015, este pico largo indica a formação de ligas de NPs bimetálicas homogêneas. Mas, neste bio-híbrido *A.niger*@NPs-AuPd verifica-se a presença de picos isolados de Au e Pd, não ocorrendo sobreposição dos picos (como ocorre nas ligas ou misturas de NPs bimetálicas (TANG *et al.*, 2012)), e/ou mudanças significativas nos seus ângulos, indicando que provavelmente as nanopartículas nos bio-híbridos se encontram parcialmente isoladas (monometálicas) ou heterogêneas do tipo core-shell. Fato que foi observado nas imagens de MET e MEV.

No bio-híbrido contendo apenas NPs-Pd (*A.niger*@NPs-Pd, Figura 49), o perfil do espectro de DRX foi muito parecido com o do fungo sem nanopartículas [Figura 49 (*A.niger*)], isso ocorreu muito provavelmente pelo fato de o bio-híbrido não apresentar metal suficiente para ser detectado pelo equipamento, uma vez que o paládio inibe o crescimento da biomassa fúngica.

As curvas de TG [Figura 50 (a)] foram obtidas com programação de rampa de aquecimento constante de 10°C min⁻¹ na faixa de temperatura de 25 a 800°C, sob

fluxo de ar sintético a uma vazão de 50 mL min⁻¹. Aproximadamente 9 mg das amostras *A.niger* e *A.niger*@NPs-AuPd (Tabela 07) foram analisadas termicamente utilizando cadinho de platina. A perda de massa destas amostras está associada com a degradação (queima) do template biológico que se finaliza em ≈ 400 °C.

O fungo *A.niger* puro apresentou dois eventos de perda de massa em 264 e 319 °C. A presença das NPs-AuPd promoveu a diminuição das temperaturas de decomposição em 187 e 293 °C (APÊNDICE G, p.157). Como já foi visto em trabalho anterior (FONTES *et al.*, 2014) que a presença do componente metálico acelera a eliminação dos componentes orgânicos, neste caso, a aceleração da degradação conduzida pelas NPs-AuPd tornou-se maior quando comparada com a decomposição da biomassa fúngica provocada somente pelas NPs-Au que foi de 310-391 °C (FONTES *et al.*, 2014).

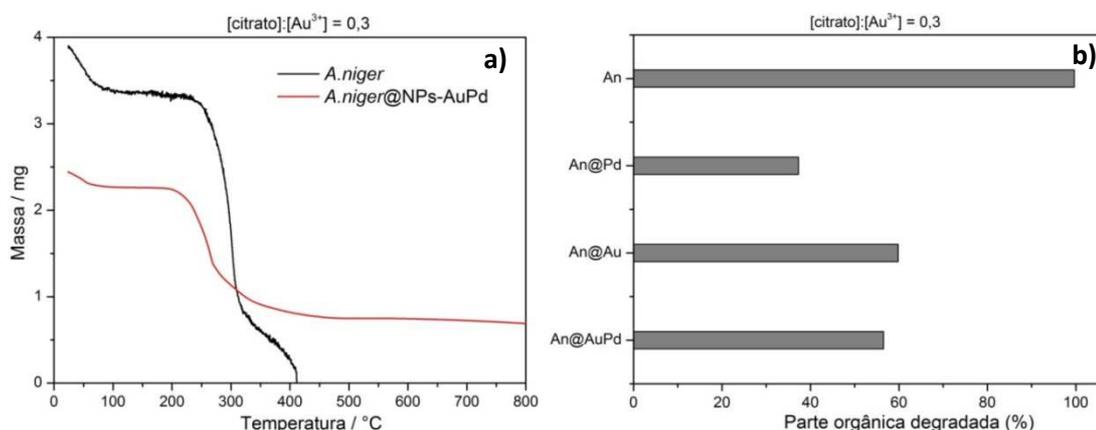


Figura 50. a) Análise termogravimétrica do fungo sem NPs e do bio-híbrido *A.niger*@NPs-AuPd, [citrato]:[Au³⁺] = 0,3. b) porcentagem em massa dos fungos que foram calcinados com a análise térmica.

A análise termogravimétrica dos bio-híbridos *A.niger*@NPs-Au, *A.niger*@NPs-AuPd, *A.niger* e *A.niger*@NPs-Pd que foram cultivados em [citrato]:[Au³⁺] = 0,3 também permitiu obter o cálculo da biomassa fúngica presente nos bio-híbridos: $Massa_{total} - Massa_{final} = \text{biomassa do fungo}$. Estes resultados apresentados na Figura 50(b), confirmam que as NPs – Pd inibem muito mais o crescimento do fungo, 23% a mais da massa biológica foi obtida quando as NPs cresceram em soluções contendo

NPs-Au puras, comparando com os que foram cultivados em soluções de NPs-Pd puras.

A utilização das NPs-AuPd sobre os fungos apresentou um aumento da biomassa de 20% comparado com NPs-Pd. Estes resultados provaram que a utilização das NPs-AuPd gerou uma melhoria para aumento da biomassa fúngica, mesmo com a presença de NPs-Pd sobre os fungos. Os quais podem ser aplicados na catálise. As massas dos bio-híbridos utilizadas para estas análises devem ser levadas em consideração, uma massa muito menor do bio-híbrido *A.niger@NPs-Pd* foi obtida, como mostrado na Tabela 07.

Tabela 07. Massas dos bio-híbridos utilizadas para o TG.

Espécie do fungo	metal	Razão [Citrato]:[metal]	Massa (mg)
<i>Aspergillus niger</i>	AuPd	0.3:1	8.7
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	9.5
<i>Aspergillus niger</i>	Au	0.3:1	4.6
<i>Aspergillus niger</i>	Pd	0.3:1	2.0

A principal meta desta etapa do trabalho foi entender a composição destas NPs-AuPd e como estas se distribuía na parede celular dos fungos, procurando investigar de que maneira estas informações ajudariam a entender as diferenças nas características de cada bio-híbrido quando aplicados como catalisadores nas reações. Nesta etapa do trabalho foi investigado também o efeito da concentração dos íons citrato para a atividade catalítica dos sistemas híbridos na hidrogenação do MBE (Figura 51).

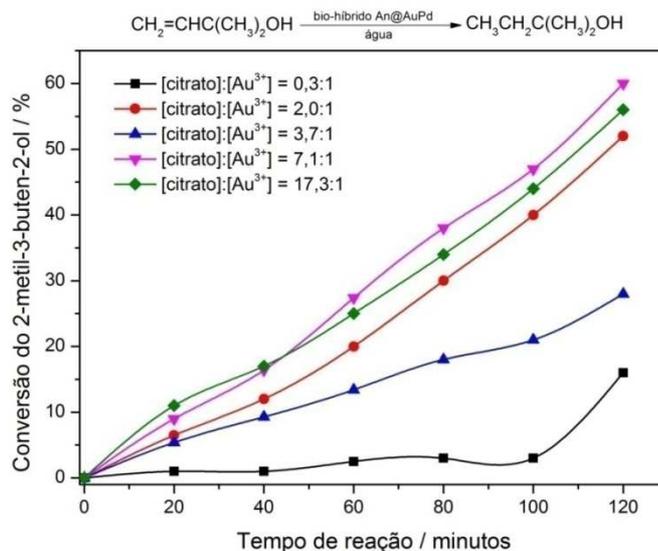


Figura 51. Efeito da concentração dos íons citrato na conversão do 2-metil-3-buten-2-ol (MBE) avaliando-se os bio-híbridos *A.niger*@NPs-AuPd.

O sistema híbrido formado por *A.niger*@NPs-AuPd apresentou 60% de conversão na razão molar [citrato]:[Au³⁺]= 7,1 (Figura 51). Nesta concentração foi possível observar através do MET que as NPs se encontravam mais próximas umas as outras formando uma camada compacta sobre os fungos devido aos efeitos da força iônica do meio como já foi apresentado em estudos anteriores (FONTES *et al.*, 2014). Foi percebido também que nesta concentração, há uma elevada quantidade de NPs com tamanhos menores que 30 nm [Figura 43 e Figura 42 (d-d.1)], indicando que uma maior quantidade de grupos funcionais presentes na parede celular dos fungos (-COOH e -NH₂) provenientes das microfibras de proteínas e β-glucanas puderam estabilizar as NPs-AuPd formadas na parede celular dos fungos, limitando o seu crescimento. Partículas menores apresentam uma maior fração de átomos superficiais, são átomos menos coordenados e, portanto mais reativos, podendo apresentar propriedades catalíticas melhoradas quando comparados com partículas maiores. Este efeito pode se estender para explicar o comportamento do *A.niger* como *biotemplate* nesta condição específica [citrato]:[Au³⁺]= 7,1, atribuindo como a melhor condição em que esta espécie de fungo é capaz de catalizar a hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol.

Os resultados obtidos com os testes catalíticos (Figura 51) foram condizentes com os dados de análise semi-quantitativa obtidos via EDX acoplado ao MEV (Figura 48). Isto sugere que a atividade catalítica do bio-híbrido está intimamente relacionada com a concentração de nanopartículas em sua superfície. O tamanho das NPs formadas também é um fator importante. Estes resultados foram comparados com estudos da redução do p-nitrofenol (Figura 65, APÊNDICE p.158), em que nesta concentração [citrato]:[Au³⁺]= 7,1, o *A.niger* também apresentou elevado valor da taxa da cinética da reação obtidos via UV-Vis sugerindo que a quantidade e estabilidade das NPs sobre a parede dos fungos apresentam uma forte influência nos efeitos catalíticos destes materiais.

Imagens de MEV destes bio-híbridos *A.niger*@NPs-AuPd foram obtidas após sua aplicação como catalisadores. A Figura 52 mostra que as hifas dos fungos mantêm suas estruturas características e as NPs-AuPd permanecem estabilizadas na superfície da parede celular das hifas.

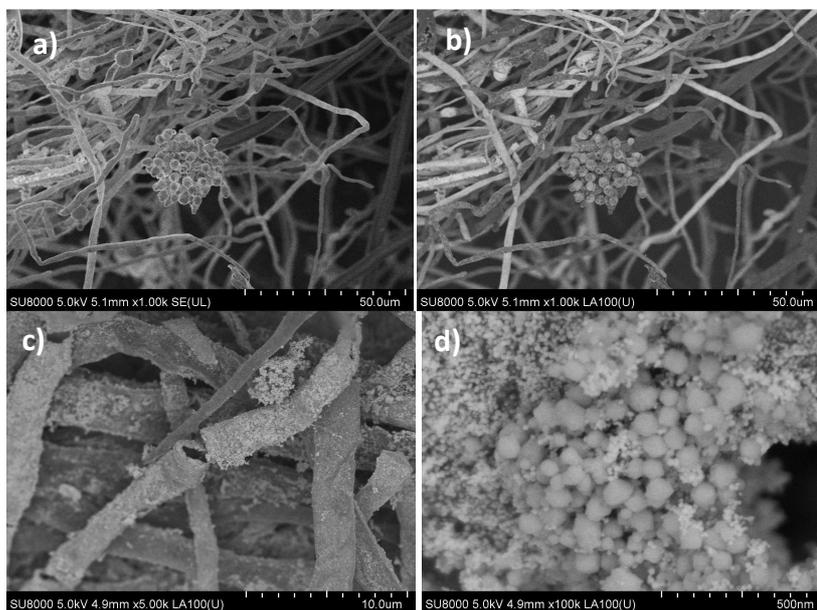


Figura 52. Imagens de MEV do bio-híbrido *A.niger*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = 7,1 depois de 2 horas de reação de hidrogenação do MBE, utilizando água como solvente, agitação a 1200 RPM em temperatura ambiente.

5.4.2 Considerações finais

Nesta seção foi avaliado com mais detalhes as características físicas e químicas dos bio-híbridos da espécie *A.niger*, o efeito da concentração do íon citrato na agregação e tamanho das NPs-Au e na formação das NPs-AuPd obtidas com o método de redução seqüencial dos íons Pd sobre ouro. Foi possível perceber que a atividade catalítica dos bio-híbridos é proporcional a quantidade de paládio presente nas diferentes razões [citrato]:[Au³⁺] confirmado com a análise EDX. Além disso, o tamanho e morfologia das NPs também podem interferir nestes resultados, uma vez que NPs menores podem ser obtidas em regiões mais internas da parede celular.

Na seção 5.5 será apresentada uma breve avaliação sobre a reciclabilidade dos bio-híbridos quando aplicados a quatro ciclos sucessivos de hidrogenação do MBE, depois das reações, os fragmentos dos fungos que sobraram foram lavados, desidratados e secos por secagem por ponto crítico para observação ao MEV.

5.5 RECICLAGEM DOS BIO-HÍBRIDOS FUNGOS@NPS-AuPd

Esta seção tem por objetivo apresentar uma breve abordagem sobre a reciclagem dos bio-híbridos aplicando-os na mesma reação de hidrogenação do MBE, descrito nas seções anteriores. Para este estudo foram selecionados os bio-híbridos formados pelas quatro espécies *P.macrosporus*, *Trichoderma sp*, *Penicillium sp* e *Aspergillus niger*, cultivados na razão [citrato]:[Au³⁺] = 2,0[§]. Fixando-se uma razão [citrato]:[Au³⁺] foi possível verificar quais dos bio-híbridos são mais resistentes para suportar quatro ciclos de hidrogenação.

A reciclagem dos catalisadores é um tópico especial para a confirmação da resistência do material que foi sintetizado, a escolha do catalisador adequado não depende apenas da sua eficiência como também de quanto que ele pode ser reutilizado nos processos em que são aplicados (Dauthal e Mukhopadhyay, 2016). NPs-Au quando aplicadas em reações a sua recuperação torna-se difícil, pois vai depender do tamanho das NPs e do estabilizante. Por exemplo, NPs-Au estabilizadas em íons citrato com tamanhos de 20 nm dificilmente podem ser recuperadas porque ao centrifugá-las a uma velocidade muito alta podem ser facilmente perdidas por precipitação. NPs-Au estabilizadas em PVP podem ser recuperadas por centrifugação, no entanto, muitas partículas são perdidas durante o processo de separação através sobrenadante. Autores apontam que NPs-Pd estabilizadas em PVP sofrem precipitação quando aplicadas em reações de Suzuki (LI *et al.*, 2000), tornando a sua reciclagem inviável.

Estudos vêm sendo efetuados para entender os processos de reciclagem de diversos tipos de catalisadores (COLE-HAMILTON *et al.*, 2006), aqueles que são mais fáceis de recuperar geralmente estão suportados em um material sólido. Muitos trabalhos aplicando o uso de microrganismos como *templates* para nanopartículas de metais nobres vem sendo aplicados nas mais diversas abordagens. No entanto, esta

[§] Esta razão [citrato]:[Au³⁺] foi escolhida devido a um numero limitado de amostras selecionadas para as reações.

foi a primeira vez que foi abordada a recuperação de bio-híbridos formados por fungos e NPs-AuPd na hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol utilizando apenas água como solvente.

5.5.1 Resultados e discussão

Após as reações, os bio-híbridos foram lavados 5 vezes com água deionizada a cada ciclo e em seguida reutilizados em uma nova reação, os mesmos procedimentos de purga foram mantidos utilizando o hidrogênio durante 20 minutos e agitação sem a presença do substrato, para não ocorrer perda do gás durante a agitação.

Avaliando o bio-híbrido espécie *P.macrosporus* [Figura 53 (a)], depois de cada ciclo de 2 horas de reação teve sua eficiência reduzida de 15 para 0,85% após 4 ciclos, resultando em uma perda de 94,4% da sua capacidade em relação ao primeiro ciclo.

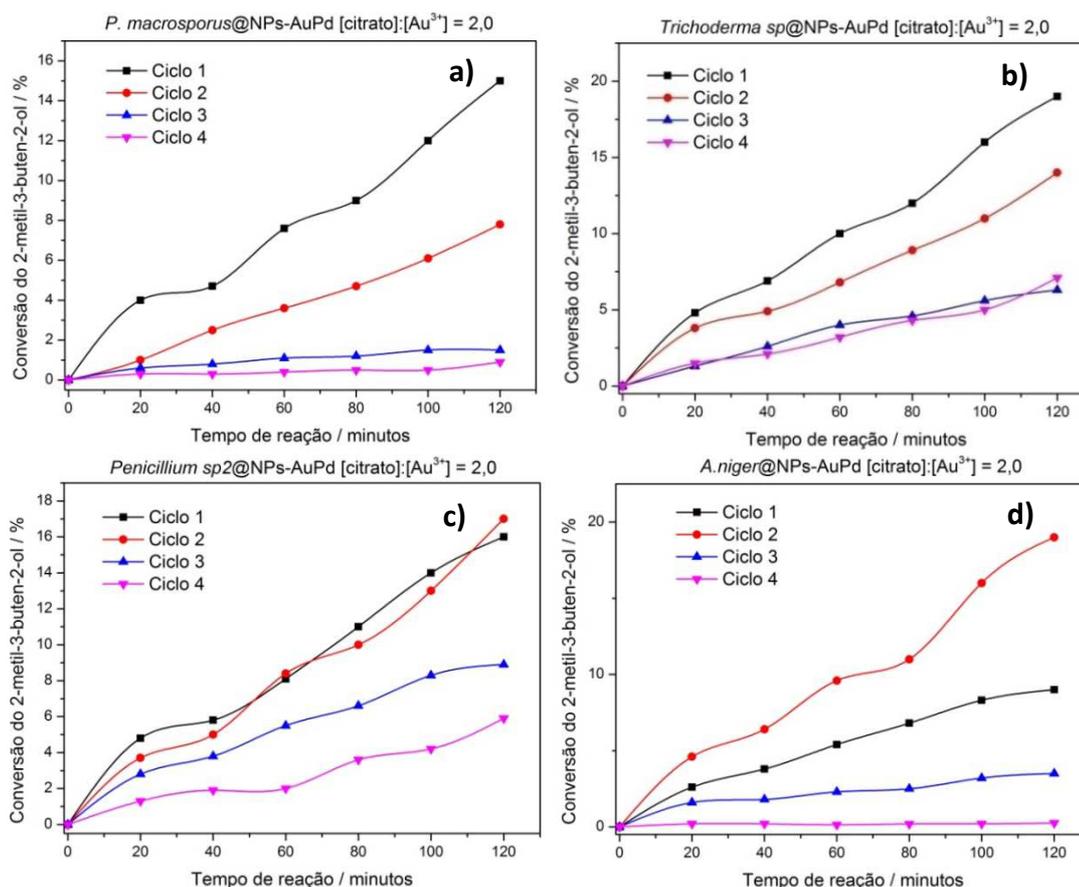


Figura 53. Bio-híbridos *P.macrosporus*, *Trichoderma sp*, *Penicillium sp* e *Aspergillus niger*, cultivados na razão [citrato]:[Au³⁺] = 2,0 em de 4 ciclos de utilização.

A amostra *Trichoderma sp*@NPs-AuPd mostrou uma redução de 19 para 7%, a perda da capacidade foi de 63,2%. A eficiência de conversão da amostra *Penicillium sp*@NPs-AuPd foi reduzida de 16 para 6%, a perda foi de 62,5% em relação ao primeiro ciclo. E o bio-híbrido *A.niger*@NPs-AuPd apresentou uma redução da eficiência de 19 para 0,25% e a perda em sua capacidade de conversão foi de 98,7% em relação ao primeiro ciclo de utilização [Figura 53, (d)]. Os espectros RMN-H do *Trichoderma sp*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] =7,1 foram mostrados na Figura 70 (APÊNDICE, p. 161).

Avaliando as imagens de MEV obtidas após os 4 ciclos de utilização, ou seja, totalizando 8 horas de aplicação na reação de hidrogenação do MBE sob agitação de 1200 RPM em temperatura ambiente, mudanças superficiais nas hifas dos fungos tornaram-se evidentes. A parede celular do *P.macrosporus* adquiriu muitas deformações (Figura 54). Além disso, este fungo em especial apresentou muitas perdas do seu material durante as lavagens sucessivas para a sua reciclagem.

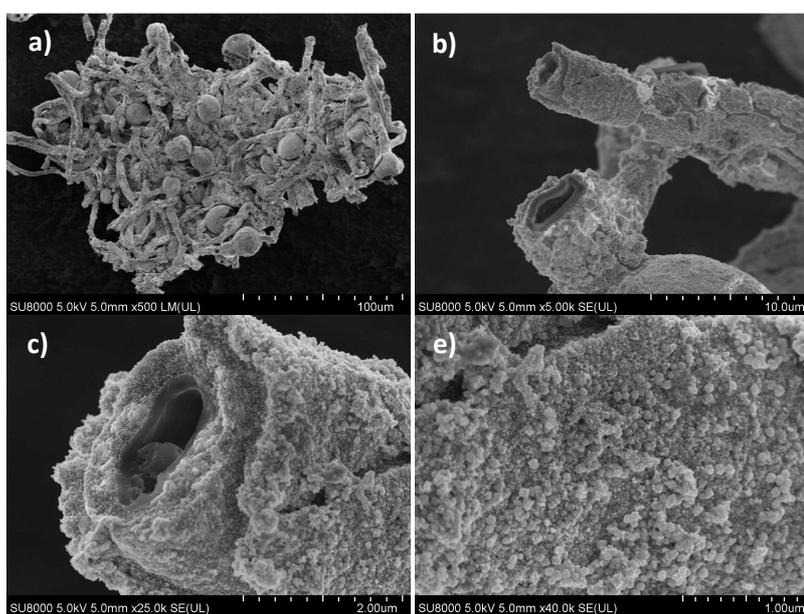


Figura 54. MEV do bio-híbridos *P.macrosporus*@NPs-AuPd cultivado na razão [citrato]:[Au³⁺] = 2,0, depois de 4 ciclos de utilização.

Os fungos são constituídos por material orgânico composto por hidrocarbonetos, polissacarídeos tais como quitina e β -glucanas (Adams, 2004), os

quais podem ser degradados em meios ácidos ou muito básicos, meios muito oxidantes ou redutores, ou quando submetidos a forças mecânicas como agitação magnética na presença de substratos orgânicos como o MBE.

No entanto, o fungo *Trichoderma* sp não apresentou as mesmas deformações em sua superfície (Figura 55), sua biomassa micelial foi mais facilmente recuperável durante as lavagens sucessivas. Percebeu-se que mesmo após 8 horas de utilização, as suas hifas permaneceram bastante brilhantes no MEV – modo de elétrons retroespalhados, com a presença de microtubos e nanopartículas de AuPd em sua superfície.

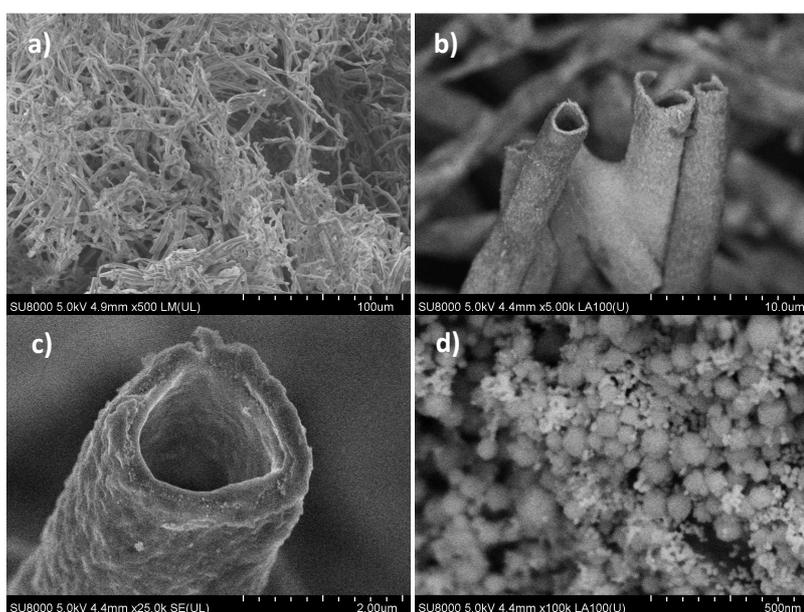


Figura 55. MEV do bio-híbrido *Trichoderma* sp@ NPs-AuPd cultivados na razão [citrato]:[Au³⁺] = 2,0 depois de 4 ciclos de utilização.

A utilização dos bio-híbridos para reciclagem não apresentou resultados satisfatórios, elevada perda da eficiência catalítica dos bio-híbridos foi observada. Os fungos *Trichoderma* e *Penicillium* sp, forneceram maior biomassa sendo mais facilmente recuperáveis. Os fungos *P.macrosporus* e *A.niger*, apesar de atuar como excelentes catalisadores, não são eficientes para serem reciclados, uma vez que quando hidratados são quebradiços, podendo se fragmentar facilmente em pedados bastante pequenos, o que dificultou no momento da sua recuperação nas sucessivas

lavagens, ocasionando numa perda significativa de material. No, entanto o *A.niger* preservou suas características individuais, como estruturas de reprodução, hifas (Figura 63, APÊNDICE, p.157).

5.6.2 Considerações finais

Nesta seção foram avaliadas as eficiências de reciclabilidade dos fungos analisando as quatro espécies *P. macrosporus*, *Trichoderma sp*, *Penicillium sp* e *Aspergillus niger* cultivados em NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = 2,0, para a hidrogenação catalítica do MBE.

Verificou-se que ocorre uma elevada perda da eficiência de reciclabilidade destes materiais bio-híbridos após 4 ciclos de hidrogenação, uma elevada perda destes materiais foi verificada com os fungos *P.macrosporus* e *Aspergillus niger*, após a agitação em solução aquosa, estes materiais tornaram-se quebradiços, fato que dificultou a sua recuperação e reuso. Os fungos *Trichoderma* e *Penicillium sp*, forneceram maior biomassa sendo mais facilmente recuperáveis. No entanto, estes bio-híbridos também apresentaram baixa eficiência catalítica quando reciclados.

6.0 CONCLUSÕES GERAIS

Nesta tese foram obtidos materiais bio- híbridos formados por NPs bimetálicas de Au e Pd, depositadas em fungos filamentosos para aplicações catalíticas. A utilização de soluções contendo NPs-Pd puras inibiu o crescimento das espécies de fungos utilizadas neste estudo, e mostrou uma contaminação das NPs-Pd por enxofre que provavelmente foi proveniente dos compostos presentes na parede celular ou produzidos através do metabolismo fúngico.

Como a principal meta em sintetizar estes bio-materiais foi visando a sua aplicação nas reações de catálise, tais como as reações de hidrogenação, oxidação e Suzuki, então este novo método de síntese de NPs-AuPd, utilizando as NPs-Au previamente depositadas nos fungos, as quais atuaram como “sementes” para a nucleação e crescimento do Pd⁰, permitiu obter NPs bimetálicas de AuPd do tipo *core-shell* na superfície dos fungos, evitando a contaminação com o enxofre.

Verificou-se que os bio-híbridos *A.niger*@NPs-AuPd foram promissores para as reações catalíticas que envolveram as reações de hidrogenação do MBE. Quando estes bio-híbridos foram submetidos à luz visível, ocorreu um eficiente aumento na taxa de conversão da reação de hidrogenação do MBE. A avaliação do efeito da variação da concentração de íons citrato, mostrou que bio-híbridos *A.niger* [citrato]:[Au³⁺] = 7,1 apresentaram 60% de conversão do BEM, que foi o maior valor obtido deste conjunto de dados. Estes resultados foram compatíveis com os estudos semi-quantitativos com EDX, mostrando que a quantidade das NPs-AuPd acumuladas interferiu no efeito catalítico do bio-híbrido. O tamanho e distribuição das partículas avaliados através de MET foram considerados fatores importantes para um melhor entendimento da resposta catalítica gerada pelos fungos. Com os estudos de reciclabilidade, verificou-se que os bio-híbridos não apresentaram resultados satisfatórios, indicando uma elevada redução na eficiência durante os 4 ciclos de utilização.

7.0 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

7.1 Quanto ao estudo de obtenção dos bio-híbridos

- a) Investigar a variação da concentração do precursor de paládio e sua influência no tamanho e forma das partículas sobre os fungos e seus efeitos catalíticos;
- b) Avaliar a influência de outros estabilizantes para a morfologia final das NPs e seus efeitos catalíticos;
- c) Avaliar a composição, morfologia, cristalinidade e efeitos eletrônicos dos bio-híbridos através de análises de MET de alta resolução, EDX de alta resolução, XANES, EXAFS;
- d) Síntese dos bio-híbridos utilizando outros precursores, por exemplo, platina, níquel, cobre.
- e) Avaliar a influência de diferentes meios de cultivo para o crescimento do fungo e deposição das NPs bimetálicas.

7.2 Quanto ao estudo da aplicação destes bio-híbridos nos testes catalíticos

- a) Verificar o efeito de outros tipos de solventes para o aumento da eficiência catalítica e sua biocompatibilidade com o sistema reacional;
- b) Estudar o efeito de outros substratos simples para a reação de hidrogenação, Suzuki e oxidação utilizando os bio-híbridos como catalisadores;

7.3 Quanto ao estudo de aplicação dos bio-híbridos em diferentes sistemas

- a) Investigar as propriedades eletroquímicas dos microtubos de AuPd obtidos com a calcinação dos bio-híbridos fungos-AuPd, aplicando-os como eletrodos para reações de oxi-redução;
- b) Aplicação dos bio-híbridos como sensores para estudo utilizando a espectroscopia RAMAN;
- c) Avaliar a viabilidade de aplicação dos bio-híbridos na biorremediação de solos;

7.4 Quanto ao estudo da influencia das NPs nas mudanças de fatores biológicos

- a) Investigar os efeitos biológicos e modificações genéticas causadas pela deposição das NPs sobre os fungos;

REFERÊNCIAS

ADAMS, C.; WALKER K.; OBARE, S.; DOCHERTY, K. Size-Dependent Antimicrobial Effects of Novel Palladium Nanoparticles. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 1, 2014.

ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology-Sgm**, v. 150, Jul 2004. ISSN 1350-0872.

Addition of hydrogen- hydrogenation. Disponível em: <
<http://slideplayer.com/slide/5678063/>>.

AIKEN, J. D.; FINKE, R. G. A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis. **Journal of Molecular Catalysis a-Chemical**, v. 145, n. 1-2, p. 1-44, Sep 8 1999. ISSN 1381-1169.

AN, K.; SOMORJAI, G. A. Size and Shape Control of Metal Nanoparticles for Reaction Selectivity in Catalysis. **Chemcatchem**, v. 4, n. 10, p. 1512-1524, Oct 2012. ISSN 1867-3880.

ANGELES-WEDLER, D.; MACKENZIE, K.; KOPINKE, F.-D. Permanganate oxidation of sulfur compounds to prevent poisoning of Pd catalysts in water treatment processes. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 15, p. 5734-5739, 2008. ISSN 0013936X.

AVERY, K. N.; SCHAAK, J. E.; SCHAAK, R. E. M13 Bacteriophage as a Biological Scaffold for Magnetically-Recoverable Metal Nanowire Catalysts: Combining Specific and Nonspecific Interactions To Design Multifunctional Nanocomposites. **Chemistry of Materials**, v. 21, n. 11, p. 2176-2178, Jun 9 2009. ISSN 0897-4756.

BALCHA, T.; STROBL, J. R.; FOWLER, C.; DASH, P.; SCOTT, R. W. J. Selective Aerobic Oxidation of Crotyl Alcohol Using AuPd Core-Shell Nanoparticles. **Acs Catalysis**, v. 1, n. 5, p. 425-436, May 2011. ISSN 2155-5435.

BANKAR, A.; JOSHI, B.; KUMAR, A. R.; ZINJARDE, S. Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of palladium nanoparticles. **Materials Letters**, v. 64, n. 18, p. 1951-1953, 2010. ISSN 0167-577X.

BARNARD, A. S.; LIN, X. M.; CURTISS, L. A. Equilibrium morphology of face-centered cubic gold nanoparticles > 3 nm and the shape changes induced by temperature. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 51, p. 24465-24472, Dec 29 2005. ISSN 1520-6106.

BEJ, A.; GHOSH, K.; SARKAR, A.; KNIGHT, D. W. Palladium nanoparticles in the catalysis of coupling reactions. **Rsc Advances**, v. 6, n. 14, p. 11446-11453, 2016 2016. ISSN 2046-2069.

BENNETT, J. A.; CREAMER, N.J.; DEPLANCHE, K.; MACASKIE, L.E.; SHANNON, I.J.; WOOD, J. Palladium supported on bacterial biomass as a novel heterogeneous catalyst: A comparison of Pd/Al₂O₃ and bio-Pd in the hydrogenation of 2-pentyne. **Chemical Engineering Science**, v. 65, n. 1, p. 282-290, Jan 1 2010. ISSN 0009-2509.

BERRY, V.; GOLE, A.; KUNDU, S.; MURPHY, C.; SARAF, R. Deposition of CTAB-terminated nanorods on bacteria to form highly conducting hybrid systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 50, Dec 21 2005. ISSN 0002-7863.

BERRY, V.; RANGASWAMY, S.; SARAF, R. F. Highly selective, electrically conductive monolayer of nanoparticles on live bacteria. **Nano Letters**, v. 4, n. 5, May 2004. ISSN 1530-6984.

BHARGAVA, A.; Jain, N.; Gangopadhyay, S.; Panwar, J. Development of gold nanoparticle-fungal hybrid based heterogeneous interface for catalytic applications. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1293-1300, Aug 2015. ISSN 1359-5113.

BIGALL, N. C.; EYCHMUELLER, A. Synthesis of noble metal nanoparticles and their non-ordered superstructures. **Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences**, v. 368, n. 1915, p. 1385-1404, Mar 28 2010. ISSN 1364-503X.

BIGALL, N. C.; REITZIG, M.; NAUMANN, W.; SIMON, P.; VAN PÉE, K.-H.; EYCHMÜLLER, A. Fungal templates for noble-metal nanoparticles and their application in catalysis. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 47, n. 41, 2008 2008. ISSN 1433-7851.

BIGALL, N. C. A. E. A. Synthesis of noble metal nanoparticles and their non-ordered superstructures. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical**, v. 368, n. 1915, p. 1385-1404, 2010.

MIZRAHI, A.; LISS ALAN R. **Biological waste treatment, of advances in biotechnological processes**, volume 12 (1989),10: 91-92 p. 1989. Inc., New York, ISBN 0-8451-3211-3.

BRAYNER, R.; CORADIN, T.; BEAUNIER, P.; GRENÈCHE, J.-M.; DJEDIAT, C.; YÉPRÉMIAN, C.; COUTÉ, A.; FIÉVET, F. Intracellular biosynthesis of superparamagnetic 2- lines ferri- hydrite nanoparticles using *Euglena gracilis* microalgae. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 20-23, 2012. ISSN 0927-7765.

BRAYNER, R.; COUTÉ, A.; LIVAGE, J.; PERRETTE, C.; SICARD, C. Micro- algal biosensors. **Anal Bioanal Chem**, Berlin/Heidelberg, v. 401, n. 2, p. 581-597, 2011. ISSN 1618-2642.

CHANDRASEKHAR, V.; NARAYANAN, R. S. Organostannoxane-supported Pd(0) nanoparticles as efficient catalysts for Heck-coupling reactions. v. 52, n. 27, p. 3527-3531, 2011. ISSN 0040-4039.

CHE MAN, S. H.; LY, D.; WHITTAKER, M. R.; THICKETT, S. C.; ZETTERLUND, P. B. Nano-sized graphene oxide as sole surfactant in miniemulsion polymerization for nanocomposite synthesis: Effect of pH and ionic strength. **Polymer**, v. 55, n. 16, p. 3490-3497, 2014. ISSN 0032-3861. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386114004881>>.

CHEN, H.; ISPAS, A.; HICKEY, S.G.; EYCHMÜLLER, A.; WEI, G. Synthesis of palladium nanoparticles and their applications for surface-enhanced Raman scattering and electrocatalysis. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 50, p. 21976-21981, 2010. ISSN 19327447.

CHEONG, S.; WATT, J. D.; TILLEY, R. D. Shape control of platinum and palladium nanoparticles for catalysis. **Nanoscale**, v. 2, n. 10, p. 2045-2053, 2010. ISSN 2040-3364.

COLE-HAMILTON, D. J.; TOOZE, R. P.; MYLIBRARY. **Catalyst separation, recovery and recycling chemistry and process design**. Dordrecht: Dordrecht : Springer, 2006.

COLLINS, G.; SCHMIDT, M.; O'DWYER, C.; HOLMES, J. D.; MCGLACKEN, G. P. The Origin of Shape Sensitivity in Palladium-Catalyzed Suzuki–Miyaura Cross Coupling Reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 53, n. 16, p. 4142-4145, 2014. ISSN 1433-7851.

COTTON, S. **Chemistry of Precious Metals**. Chapman & Hall: Springer Netherlands, 1997. ISBN 978-94-009-1463-6.

DAHOUMANE, S. A.; DJEDIAT, C.; YÉPRÉMIAN, C.; COUTÉ, A.; FIÉVET, F.; CORADIN, T.; BRAYNER, R. Recycling and adaptation of *Klebsormidium flaccidum* microalgae for the sustained production of gold nanoparticles. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 109, n. 1, p. 284-288, 2012. ISSN 00063592.

DAS, P. SHARMA, D.; SHIL, A. K.; KUMARI, A. Solid-supported palladium nano and microparticles: an efficient heterogeneous catalyst for ligand-free Suzuki–Miyaura cross coupling reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 11, p. 1176-1178, 2011. ISSN 0040-4039.

DASH, P.; BOND, T.; FOWLER, C.; HOU, W.; SCOTT, R. W. J.; COOMBS, N. Rational Design of Supported PdAu Nanoparticle Catalysts from Structured Nanoparticle Precursors. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 29, p. 12719-12730, Jul 23 2009. ISSN 1932-7447.

DAUTHAL, P.; MUKHOPADHYAY, M. Biosynthesis of Palladium Nanoparticles Using *Delonix regia* Leaf Extract and Its Catalytic Activity for Nitro-aromatics Hydrogenation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 51, p. 18131-18139, 2013. ISSN 0888-5885.

DAUTHAL, P.; MUKHOPADHYAY, M. AuPd bimetallic nanoparticles: Single step biofabrication, structural characterization and catalytic activity. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 35, p. 45-53, 2016. ISSN 1226-086X.

DEPANCHE, K.; BENNETT, J.A.; MIKHEENKO, I.P.; OMAJALI, J.; WELLS, A.S.; MEADOWS, R.E.; WOOD, J.; MACASKIE, L.E. Catalytic activity of biomass-supported Pd nanoparticles: Influence of the biological component in catalytic efficacy and potential application in 'green' synthesis of fine chemicals and pharmaceuticals. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 147, p. 651-665, Apr 5 2014. ISSN 0926-3373.

DOYLE, A. M.; SHAIKHUTDINOV, S. K. ; JACKSON, S. D.; FREUND, H.-J. Hydrogenation on Metal Surfaces: Why are Nanoparticles More Active than Single Crystals? **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 42, n. 42, p. 5240-5243, 2003. ISSN 1433-7851.

DU, Z.; ZHOU, W.; WANG, F.; WANG, J.-X. In situ generation of palladium nanoparticles: ligand-free palladium catalyzed ultrafast Suzuki– Miyaura cross-coupling reaction in aqueous phase at room temperature. **Tetrahedron**, v. 67, n. 26, p. 4914-4918, 2011. ISSN 0040-4020.

EDWARDS, J. K.; SOLSONA, B. E. ; LANDON, P.; CARLEY, A. F. ; HERZING, A. ; KIELY, C. J. ; HUTCHINGS, G. J. Direct synthesis of hydrogen peroxide from H₂ and O₂ using TiO₂-supported Au– Pd catalysts. **Journal of Catalysis**, v. 236, n. 1, p. 69-79, 2005. ISSN 0021-9517.

ELLIS, P. J.; FAIRLAMB, I. J. S.; HACKETT, S. F. J.; WILSON, K.; LEE, A. F. Evidence for the Surface-Catalyzed Suzuki–Miyaura Reaction over Palladium Nanoparticles: An Operando XAS Study. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 49, n. 10, p. 1820-1824, 2010. ISSN 1433-7851.

FAKHRULLIN, R. F.; ZAMALEEVA, A. I.; MINULLINA, R. T.; KONNOVA, S.A. ; PAUNOV, V. N. Cyborg cells: functionalisation of living cells with polymers and nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 11, p. 4189-4206, 2012 2012. ISSN 0306-0012.

FENG, B.; HOU, Z.; YANG, H.; WANG, X.; HU, Y.; LI, H.; QIAO, Y.; ZHAO, X.; HUANG, Q. Functionalized poly(ethylene glycol)-stabilized water-soluble palladium nanoparticles: property/activity relationship for the aerobic alcohol oxidation in water. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 26, n. 4, p. 2505, 2010.

FERRANDO, R.; JELLINEK, J.; JOHNSTON, R. L. Nanoalloys: From theory to applications of alloy clusters and nanoparticles. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 3, p. 845-910, Mar 2008. ISSN 0009-2665.

FERRER, D.; TORRES-C., A.; GAO, X.; SEPÚLVEDA-G.,S. ; ORTIZ-M., U. ; JOSÉ-Y., M. Three- layer core/ shell structure in Au- Pd bimetallic nanoparticles. **Nano letters**, v. 7, n. 6, p. 1701, 2007. ISSN 1530-6984.

FONTES, A. M. “Biotemplates” para automontagem de nanopartículas de ouro: buscando inspiração na natureza para sintetizar estruturas complexas. 2012. 108 p. (Dissertação de Mestrado). Instituto de Química, **Universidade Federal da Bahia**, Salvador-Bahia-Brasil.

FONTES, A. M.; GERIS, R.; DOS SANTOS, A. V.; PEREIRA, M. G.; RAMALHO, J. G. S.; DA SILVA, A. F.; MALTA, M. Bio-inspired Au microtubes based on morphology of filamentous fungi. **Biomaterials Science**, Royal Society of Chemistry: 956-960 p. 2014.

GAO, D.; ZHOU, H.; WANG, J.; MIAO, S.; YANG, F.; WANG, G.; WANG, J.; BAO, X. Size-dependent electrocatalytic reduction of CO₂ over Pd nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 13, p. 4288, 2015.

GARCÍA-SAUCEDO, C.; FIELD, J. A.; OTERO-GONZALEZ, L.; SIERRA-ÁLVAREZ, R. Low toxicity of HfO₂, SiO₂, Al₂O₃ and CeO₂ nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of hazardous materials**, v. 192, n. 3, p. 1572, 2011.

GELABERT, A.; SIVRY, Y.; GOBBI, P.; MANSOURI-GUILANI, N.; MENGUY, N.; BRAYNER, R.; SIRON, V.; BENEDETTI, M.F.; FERRARI, R. Testing nanoeffect onto model bacteria: Impact of speciation and genotypes. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 2, p. 216-225, 2016. ISSN 17435390.

GJIRI, E. Suzuki cross-coupling. 2016. Disponível em: < <http://www.name-reaction.com/suzuki-cross-coupling> >.

GOLDSTEIN, J. Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. 3rd ed. New York, **Kluwer Academic**, Plenum Publishers, 2003.

GONG, J. Structure and Surface Chemistry of Gold-Based Model Catalysts. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 5, p. 2987-3054, May 2012. ISSN 0009-2665.

GU, Y.; FAVIER, I.; PRADEL, C.; GIN, D. L.; LAHITTE, J.-F.; NOBLE, R. D.; GÓMEZ, M.; REMIGY, J.-C. High catalytic efficiency of palladium nanoparticles immobilized in a polymer membrane containing poly(ionic liquid) in Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction. **Journal of Membrane Science**, v. 492, p. 331-339, 2015. ISSN 0376-7388.

GUTIÉRREZ-ORTIZ, J. I.; LÓPEZ-FONSECA, R.; GONZÁLEZ-ORTIZ DE ELGUEA, C.; GONZÁLEZ-MARCOS, M. P.; GONZÁLEZ-VELASCO, J. R. Mass Transfer Studies in the Hydrogenation of Methyl Oleate Over a Ni/SiO₂ Catalyst in the Liquid Phase. **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, Dordrecht, v. 70, n. 2, p. 341-348, 2000. ISSN 0133-1736.

HAGEN, J. Economic Importance of Catalysts. In: (Ed.). **Industrial Catalysis**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015a. p.459-462. ISBN 9783527684625.

_____. Environmental Catalysis and Green Chemistry. In: (Ed.). **Industrial Catalysis**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015b. p.335-352. ISBN 9783527684625.

_____. Introduction. In: (Ed.). **Industrial Catalysis**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015c. p.1-16. ISBN 9783527684625.

HALPERIN, W. P. Quantum size effects in metal particles. **Reviews of Modern Physics**, v. 58, n. 3, p. 533-606, 1986. Disponível em: < <http://link.aps.org/doi/10.1103/RevModPhys.58.533> >.

HAN, C.; WU, L.; GE, L.; LI, Y.; ZHAO, Z. AuPd bimetallic nanoparticles decorated graphitic carbon nitride for highly efficient reduction of water to H₂ under visible light irradiation. **Carbon**, v. 92, p. 31-40, 2015. ISSN 0008-6223.

HARUTA, M. When Gold Is Not Noble: Catalysis by Nanoparticles. **Chemical Record**, New York, v. 3, n. 2, p. 75-87, 2003. ISSN 1527-8999.

HARUTA, M.; KOBAYASHI, T.; SANO, H.; YAMADA, N. Novel Gold Catalysts for the Oxidation of Carbon Monoxide at a Temperature far Below 0 ° C. **Chem. Lett.**, v. 16, n. 2, p. 405-408, 1987. ISSN 0366-7022.

HORIUTI, I.; POLANYI, I. Exchange reactions of hydrogen on metallic catalysts. **Transactions of the Faraday Society**, v. 30, p. 1164-1172, 1934. ISSN 00147672.

HOU, W.; DEHM, N. A.; SCOTT, R. W. J. Alcohol oxidations in aqueous solutions using Au, Pd, and bimetallic AuPd nanoparticle catalysts. **Journal of Catalysis**, v. 253, n. 1, p. 22-27, Jan 1 2008. ISSN 0021-9517.

HVOLBÆK, B.; JANSSENS, T.V.W.; CLAUSEN, B.S.; FALSIG, H.; CHRISTENSEN, C. H.; NØRSKOV, J. K. Catalytic activity of Au nanoparticles. **Nano Today**, v. 2, n. 4, p. 14-18, 2007. ISSN 17480132.

JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 13, n. 7, p. 2313-2322, Jul 2001. ISSN 0897-4756.

JOHNSTON, I. R. The composition of the cell wall of *Aspergillus niger*. **Biochemical Journal**, v. 96, n. 3, p. 651-658, 1965. ISSN 02646021.

KUBO, A. M. GORUP, L. F. ; AMARAL, L.S. ; FILHO, E.R. ; CAMARGO, E. R. Kinetic Control of Microtubule Morphology Obtained by Assembling Gold Nanoparticles on Living Fungal Biotemplates. **Bioconjugate Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 2337-2345, 2016. ISSN 1043-1802.

KUMAR, C. **UV-VIS and Photoluminescence Spectroscopy for Nanomaterials Characterization**. 2013.

KUO, J. E. *Electron Microscopy Methods and Protocols*. 3rd ed. 2014.

LEE, A. F.; CHANG, Z ; ELLIS, P ; HACKETT, SFJ ; WILSON, K. Selective oxidation of crotyl alcohol over Pd(111). **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 51, p. 18844-18847, 2007. ISSN 19327447.

LEE, A. F.; ELLIS, C. V.; WILSON, K.; HONDOW, N.S. In situ studies of titania-supported Au shell-Pd core nanoparticles for the selective aerobic oxidation of crotyl alcohol. **Catalysis Today**, v. 157, n. 1, p. 243-249, 2010. ISSN 0920-5861.

LI, J.; YANG, J.; WEN, F.; LI, C. A visible- light-driven transfer hydrogenation on CdS nanoparticles combined with iridium complexes. **Chemical Communications**, v. 47, n. 25, p. 7080-7082, 2011. ISSN 1359-7345.

LI, Y.; EL-SAYED, M. A. The effect of stabilizers on the catalytic activity and stability of Pd colloidal nanoparticles in the Suzuki reactions in aqueous solution. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 37, p. 8938-8943, Sep 20 2001. ISSN 1089-5647.

LI, Y.; HONG, X. M. ; COLLARD, D. M. ; EL-SAYED, M. A. Suzuki cross- coupling reactions catalyzed by palladium nanoparticles in aqueous solution. **Organic Letters**, v. 2, n. 15, p. 2385-2388, 2000. ISSN 15237060.

LI, Z.; CHUNG, S.-W.; NAM, J.-M.; GINGER, D. S.; MIRKIN, C. A. Living Templates for the Hierarchical Assembly of Gold Nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 20, p. 2306-2309, 2003. ISSN 1521-3773. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200351231> >.

LIN, C.-S.; KHAN, M. R.; LIN, S. D. The preparation of Pt nanoparticles by methanol and citrate. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 299, n. 2, p. 678-685, 2006. ISSN 0021-9797.

LINIC, S.; CHRISTOPHER, P.; INGRAM, D. **Plasmonic- metal nanostructures for efficient conversion of solar to chemical energy**. Nat. Mater. 10: 911-921 p. 2011.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Optical Properties and Ultrafast Dynamics of Metallic nanocrystals. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 331-366, 2012/08/13 2003. ISSN 0066-426X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physchem.54.011002.103759> >.

LIU, L.; DUAN, X.; LIU, H.; WANG, S.; LI, Y. Microorganism-based assemblies of luminescent conjugated polyelectrolytes. **Chemical Communications**, n. 45, p. 5999-6001, 2008 2008. ISSN 1359-7345.

LUDWIG, W.; SAVARA, A.; DOSTERT, K.-H.; SCHAUERMANN, S. Olefin hydrogenation on Pd model supported catalysts: New mechanistic insights. **Journal of Catalysis**, v. 284, n. 2, p. 148-156, 2011a. ISSN 0021-9517.

SAVARA, A.; SCHAUERMANN, S.; FREUND, H.-J. Role of Low-Coordinated Surface Sites in Olefin Hydrogenation: A Molecular Beam Study on Pd Nanoparticles and Pd(111). **ChemPhysChem**, Weinheim, v. 11, n. 11, p. 2319-2322, 2010. ISSN 1439-4235.

MA, R.; SEMAGINA, N. Nanoparticle Shape Effect Study as an Efficient Tool to Reveal the Structure Sensitivity of Olefinic Alcohol Hydrogenation. **Journal Of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 36, p. 15417-15423, 2010. ISSN 1932-7447.

MACASKIE, L.; DEAN, A. Uranium accumulation by immobilized cells of a *Citrobacter* sp. **Biotechnol Lett**, Dordrecht, v. 7, n. 7, p. 457-462, 1985. ISSN 0141-5492.

MACASKIE, L. E.; DEAN, A. C. R. Cadmium accumulation by micro-organisms. **Environmental Technology Letters**, v. 3, n. 1-11, p. 49-56, 1982. ISSN 0143-2060.

MACLENNAN, A. Investigation of Au, Pd, and AuPd Nanoparticle Catalysts for Alcohol Oxidation Reactions. **University of saskatchewan**, C. O. G. S. A. R. 2013.

MANOCCHI, A. K.; HORELIK, N. E.; YI, H.; LEE, B. Simple, Readily Controllable Palladium Nanoparticle Formation on Surface-Assembled Viral Nanotemplates. **Langmuir**, v. 26, n. 5, p. 3670-3677, Mar 2 2010. ISSN 0743-7463.

MATTSON, B.; FOSTER, W.; GREIMANN, J.; HOETTE, T.; LE, N.; MIRICH, A.; WANKUM, S.; CABRI, A.; REICHENBACHER, C.; SCHWANKE, E. Heterogeneous catalysis: the Horiuti-Polanyi mechanism and alkene hydrogenation. **Journal of Chemical Education**, v. 90, n. 5, p. 613-619, 2013. ISSN 0021-9584.

MERTIG, M.; KIRSCH, R. ; POMPE, W. ; ENGELHARDT, H. Fabrication of highly oriented nanocluster arrays by biomolecular templating. **European Physical Journal D**, v. 9, n. 1-4, p. 45-48, Dec 1999. ISSN 1434-6060.

MIFSUD, M.; PARKHOMENKO, K. V. ; ARENDS, I. W.C.E. ; SHELDON, R.A. Pd nanoparticles as catalysts for green and sustainable oxidation of functionalized alcohols in aqueous media. **Tetrahedron**, v. 66, n. 5, p. 1040-1044, Jan 30 2010. ISSN 0040-4020.

MIYAURA, N.; SUZUKI, A. Palladium- catalyzed cross- coupling reactions of organoboron compounds. **Chem. Rev.**, 95: 2457-2483 p. 1995.

MONDAL, J.; TRINH, Q.T.; JANA, A.; NG, W.K.H.; BORAH, P.; HIRAO, H.; ZHAO, Y. Size-Dependent Catalytic Activity of Palladium Nanoparticles Fabricated in Porous Organic Polymers for Alkene Hydrogenation at Room Temperature. **ACS applied materials & interfaces**, v. 8, n. 24, p. 15307, 2016.

MUKHERJEE, S.; BROWN, L. V. ; HALAS, N. J. ; LARGE, N.; NORDLANDER, P.; HALAS, N. J.; NEUMANN, O.; LASSITER, J. B.; NORDLANDER, P.; HALAS, N. J. ; MUKHERJEE, S.; LARGE, N.; NEUMANN, O.; BROWN, L. V. ; LASSITER, J. B.; NORDLANDER, P.; HALAS, N. J. ; LIBISCH, F.; CHENG, J. ; CARTER, E. A. Hot electrons do the impossible: plasmon-induced dissociation of H₂ on Au. **Nano letters**, v. 13, n. 1, p. 240, 2013.

MURCIA, M. J.; NAUMANN, C. A. Biofunctionalization of Fluorescent Nanoparticles. In: (Ed.). **Nanotechnologies for the Life Sciences**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007. ISBN 9783527610419.

MYUNG, K.; MANTHEY, J.; NARCISO, J. *Aspergillus niger* metabolism of citrus furanocoumarin inhibitors of human cytochrome P450 3A4. **Appl Microbiol Biotechnol**, Berlin/Heidelberg, v. 78, n. 2, p. 343-349, 2008. ISSN 0175-7598.

MÜLLER, R. Organic Chemistry Portal- Reactions >> Name Reactions. Switzerland, Disponível em: < <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/suzuki-coupling.shtm> >. Acesso em: 18/11.

NAGARAJAN, R.; HATTON, T. A. **Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization**. American Chemical Society, Washington, DC: 2008

NARAYANAN, R.; EL-SAYED, M. A. Effect of colloidal nanocatalysis on the metallic nanoparticle shape: the Suzuki reaction. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 21, n. 5, p. 2027, 2005. ISSN 0743-7463.

NIU, Y. H.; YEUNG, L. K.; CROOKS, R. M. Size-selective hydrogenation of olefins by dendrimer-encapsulated palladium nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 28, p. 6840-6846, Jul 18 2001. ISSN 0002-7863.

NOMURA, T.; MIYAZAKI, J.; MIYAMOTO, A.; KURIYAMA, Y.; TOKUMOTO, H.; KONISHI, Y. Exposure of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to functionalized polystyrene latex nanoparticles: influence of surface charge on toxicity. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 7, p. 3417, 2013.

NOMURA, T.; TANI, S.; YAMAMOTO, M.; NAKAGAWA, T.; TOYODA, S.; FUJISAWA, E.; YASUI, A.; KONISHI, Y. Cytotoxicity and colloidal behavior of polystyrene latex nanoparticles toward filamentous fungi in isotonic solutions. **Chemosphere**, v. 149, p. 84-90, 2016. ISSN 0045-6535.

NORRIS, P. R.; KELLY, D. P. Accumulation of cadmium and cobalt by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 317-324, 1977. ISSN 00221287.

OHNO, S.; WILDE, M.; MUKAI, K.; YOSHINOBU, J.; FUKUTANI, K. Mechanism of Olefin Hydrogenation Catalysis Driven by Palladium-Dissolved Hydrogen. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 21, p. 11481-11489, 2016. ISSN 19327447.

OLAFSON, R. W.; ABEL, K.; SIM, R. G. Prokaryotic metallothionein: Preliminary characterization of a blue- green alga heavy metal- binding protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 89, n. 1, p. 36-43, 1979. ISSN 0006-291X.

OTERO-GONZÁLEZ, L.; GARCÍA-SAUCEDO, C.; FIELD, J. A. ; SIERRA-ÁLVAREZ, R. Toxicity of TiO₂, ZrO₂, Fe₀, Fe₂O₃, and Mn₂O₃ nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 1201-1206, 2013. ISSN 0045-6535.

PALOMO, J.; FILICE, M. Biosynthesis of Metal Nanoparticles: Novel Efficient Heterogeneous Nanocatalysts. **Nanomaterials**. 6, 2016.

PARK, J. H.; YANG, S. H.; LEE, J.; KO, E. H.; HONG, D.; CHOI, I. S. Nanocoating of Single Cells: From Maintenance of Cell Viability to Manipulation of Cellular Activities. **Advanced Materials**, v. 26, n. 13, p. 2001-2010, 2014. ISSN 0935-9648.

PELCZAR JR, M. J. **Microbiologia**. Conceitos e Aplicações. CHAN, E. C. S. e KRIEG, N. R.: Pearson, Makron Books. 1 2005.

PETER, K.; KRASSIMIR, D.; NIKOLAI, D. Chemical Physics of Colloid Systems and Interfaces. In: (Ed.). **Handbook of Surface and Colloid Chemistry, Second Edition**: CRC Press, 2002. ISBN 978-0-8493-1079-9.

PEÑALVA, M. Á. Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 684-692, 2010. ISSN 1369-5274.

PÉREZ-LORENZO, M. Palladium nanoparticles as efficient catalysts for Suzuki cross-coupling reactions. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 3, n. 2, p. 167-174, 2012. ISSN 19487185.

RADLOFF, C.; VAIA, R. A.; BRUNTON, J.; BOUWER, G. T.; WARD, V. K.; RADLOFF, C. Metal nanoshell assembly on a virus bioscaffold. **Nano Letters**, v. 5, n. 6, Jun 2005. ISSN 1530-6984.

RAM, A. F. J.; ARENTHORST, M. ; DAMVELD, R. ; VANKUYK, P. ; KLIS, F. ; VAN DEN HONDEL, C. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: Fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall. **Microbiology**, v. 150, n. 10, p. 3315-3326, 2004. ISSN 13500872.

RAWEEWAN KLAEWKLA; AREND, M.; HOELDERICH, W. F. A Review of Mass Transfer Controlling the Reaction Rate in Heterogeneous Catalytic Systems. In: NAKAJIMA, D. H. (Ed.). **Mass - Transfer - Advanced Aspects**, 2011.

REHMAN, A.; MAJEED, M.; IHSAN, A.; HUSSAIN, S.; SAIF-UR-REHMAN, M.; GHAURI, Z.; KHALID, I.; HUSSAIN, I. Living fungal hyphae-templated porous gold microwires using nanoparticles as building blocks. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 12, p. 6747-6754, Dec 2011. ISSN 1388-0764.

RODRÍGUEZ, G. A. A.; ABREU, M. S. de ; PINTO, F. A. M. F. ; MONTEIRO, A. C. A.; NÚÑEZ, Á. M. P. ; RESENDE, M. L. V. de ; de SOUZA, J. T. ; MEDEIROS, F. H. V. de *Phialomyces macrosporus* decreases anthracnose severity on coffee seedlings by competition for nutrients and induced resistance. **Biological Control**, v. 103, p. 119-128, 2016. ISSN 1049-9644.

RODUNER, E. Nanoscopic Materials Size-dependent Phenomena. **RCS: Royal Society of Chemistry**, 2006a.

_____. Size matters: why nanomaterials are different. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 7, p. 583-592, 2006 2006b. ISSN 0306-0012.

SABAH, A.; DAKUA, I.; DUTTA, J.; KUMAR, P.; MOHAMMED, W. S. ; DUTTA, J. Growth of templated gold microwires by self organization of colloids on *aspergillus niger*. **Digest**

Journal of Nanomaterials and Biostructures, v. 7, n. 2, p. 583-591, Apr-Jun 2012. ISSN 1842-3582.

SABAH, A. ; KUMAR, P. ; MOHAMMED, W. S. ; DUTTA, J. Visible-Light-Induced Directed Gold Microwires by Self-Organization of Nanoparticles on *Aspergillus Niger*. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 30, n. 5, p. 473-480, May 2013a. ISSN 0934-0866.

SAKSRI SUPASORN; VIBULJUN, S. Interactive web-based learning: NMR spectroscopy. **Mahidol University**, Disponível em: < http://chem.sci.ubu.ac.th/e-learning/inmr_en/nmr/experimental_methods/nmr_solvents.htm >.

SAMARDŽIĆ, Z. M.; JELČIĆ, Ž.; ZRNČEVIĆ, S. Kinetics and mass transfer in the hydrogenation of 2-((1-benzyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)methylene)-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-one hydrochloride over Pt/C catalyst. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 28, n. 4, p. 437-445, 2014. ISSN 03529568.

SAU, T. K. ROGACH, A. L. ; JÄCKEL, F. ; KLAR, T. A. ; FELDMANN, J. Properties and Applications of Colloidal Nonspherical Noble Metal Nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 22, n. 16, Apr 22 2010. ISSN 0935-9648.

SCOTT, R. W. J. WILSON, O. M.; OH, S. K. ; KENIK, E. A.; CROOKS, R. M. Bimetallic palladium-gold dendrimer-encapsulated catalysts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 47, p. 15583-15591, Dec 1 2004. ISSN 0002-7863.

SELVAKUMAR, R. SEETHALAKSHMI, N.; THAVAMANI, P.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Recent advances in the synthesis of inorganic nano/microstructures using microbial biotemplates and their applications. **Rsc Advances**, v. 4, n. 94, p. 52156-52169, 2014. ISSN 2046-2069.

SHARMA, S.; SRIVASTAVA, S. Gold microwires based amperometric biosensor exploiting microbial architecture. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 50, p. 174-179, Dec 15 2013. ISSN 0956-5663.

SINFELT, J. H. Bimetallic catalysts : discoveries, concepts, and applications. New York: New York : **Wiley**, 1983.

SINGH, U. K.; VANNICE, M. A. Kinetics of liquid-phase hydrogenation reactions over supported metal catalysts — a review. **Applied Catalysis A, General**, v. 213, n. 1, p. 1-24, 2001. ISSN 0926-860X.

SMITH, G. B.; DEZENY, G. C. ; HUGHES, D. L.; KING, A. O.; VERHOEVEN, T. R. Mechanistic studies of the Suzuki cross-coupling reaction. **Journal of Organic Chemistry**, v. 59, n. 26, p. 8151-8156, 1994. ISSN 00223263.

SPERLING, R. A.; PARAK, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. **Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences**, v. 368, n. 1915, Mar 28 2010. ISSN 1364-503X.

SUGUNAN, A.; MELIN, P. ; SCHNÜRER, J. ; HILBORN, J. G. ; DUTTA, J. Nutrition-driven assembly of colloidal nanoparticles: Growing fungi assemble gold nanoparticles as microwires. **Advanced Materials**, v. 19, n. 1, p. 77-+, Jan 2007. ISSN 0935-9648.

SUN, M.; Yu, Q. ; Hu, M.; Hao, Z.; Zhang, C.; Li, M. Lead sulfide nanoparticles increase cell wall chitin content and induce apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 273, p. 7-16, 2014. ISSN 0304-3894.

SZEGHALMI, A.; KAMINSKYJ, S.; ROSCH, P.; POPP, J.; GOUGH, K. M. Time fluctuations and imaging in the SERS spectra of fungal hypha grown on nanostructured substrates. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 44, p. 12916-12924, Nov 8 2007. ISSN 1520-6106.

TANAKA, S.; KANEKO, T.; ASAO, N.; YAMAMOTO, Y.; CHEN, M.; ZHANG, W.; INOUE, A. A nanostructured skeleton catalyst: Suzuki-coupling with a reusable and sustainable nanoporous metallic glass Pd-catalyst. **Chemical Communications**, v. 47, n. 21, p. 5985-5987, 2011. ISSN 1359-7345.

TANG, J.; TIAN, X.-C. ; PANG, W.-H.; LIU, Y.-Q.; LIN, J.-H. Codeposition of AuPd bimetallic nanoparticles on to ITO and their electrocatalytic properties for ethanol oxidation. **Electrochimica Acta**, v. 81, p. 8-13, 2012. ISSN 0013-4686.

TOSHIMA, N.; YONEZAWA, T. Bimetallic nanoparticles— novel materials for chemical and physical applications. **New Journal of Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1179-1201, 1998. ISSN 1144-0546.

TSUNOYAMA, H.; SAKURAI, H.; NEGISHI, Y.; TSUKUDA, T. Size- specific catalytic activity of polymer- stabilized gold nanoclusters for aerobic alcohol oxidation in water. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 26, p. 9374, 2005. ISSN 0002-7863.

VELU, U.; STANISLAUS, A.; VIRUPAIAH, G.; SHIVAKUMARAI, V.; BALASUBRAMANIAN, V. Hydrogenation of Olefins Catalyzed by Polymer- Supported Palladium- Imidazole. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 32, n. 1-2, p. 280-285, 2011. ISSN 1872-2067.

WANG, F.; LI, C.; CHEN, H.; JIANG, R.; SUN, L. - D.; LI, Q.; WANG, J.; YU, J. C. ; YAN, C. - H. Plasmonic harvesting of light energy for Suzuki coupling reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 15, p. 5588, 2013.

WANG, H.; LI, X.; CHAI, L.; ZHANG, L. Nano- functionalized filamentous fungus hyphae with fast reversible macroscopic assembly & disassembly features. **Chemical Communications**, v. 51, n. 40, p. 8524-8527, 2015. ISSN 1359-7345.

WANG, Q.; CAI, X.; LIU, Y.; XIE, J.; ZHOU, Y.; WANG, J. Pd nanoparticles encapsulated into mesoporous ionic copolymer: Efficient and recyclable catalyst for the oxidation of benzyl alcohol with O₂ balloon in water. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 189, p. 242-251, Jul 15 2016. ISSN 0926-3373.

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to Fungi**. Third edition. 2007.

WILSON, A. The Synthesis and Characterization of AuPd Nanoparticle Catalysts for Systematically Investigating the Effects of Bimetallic Interactions on Catalytic Performance. **ProQuest Dissertations Publishing** 2014.

WILSON, O. M.; KNECHT, M. R.; GARCIA-MARTINEZ, J. C.; CROOKS, R. M. Effect of Pd nanoparticle size on the catalytic hydrogenation of allyl alcohol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 14, p. 4510-4511, Apr 12 2006. ISSN 0002-7863.

WONG, S.-T.; SHAMSUDDIN, M.; ALIZADEH, A.; YUN, Y.-S. In- situ generated palladium seeds lead to single- step bioinspired growth of AuPd bimetallic nanoparticles with catalytic performance. **Materials Chemistry and Physics**, v. 183, p. 356-365, 2016. ISSN 0254-0584.

XIAO, Q.; SARINA, S.; BO, A.; LIU, H.; ARNOLD, D. P.; HUANG, Y.; ZHU, H.; JIA, J.; WU, H. Visible light- driven cross- coupling reactions at lower temperatures using a photocatalyst of palladium and gold alloy nanoparticles. **ACS Catalysis**, v. 4, n. 6, p. 1725-1734, 2014. ISSN 21555435.

XIAO, Q.; SARINA, S.; JAATINEN, E.; JIA, J.; ARNOLD, D. P. ; LIU, H.; ZHU, H. Efficient photocatalytic Suzuki cross- coupling reactions on AuPd alloy nanoparticles under visible light irradiation. **Green Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 4272-4285, 2014. ISSN 1463-9262.

XIONG, Y.; CHEN, J.; WILEY, B.; XIA, Y.; YIN, Y.; LI, Z.-Y. Size- Dependence of Surface Plasmon Resonance and Oxidation for Pd Nanocubes Synthesized via a Seed Etching Process. **Nano Letters**, v. 5, n. 7, 2005.

YAN, C.; TING G.; CHAGMING J.; HAUFLE, R.E.; CHIBANTE, L.P.F.; FURE, J.; LIHONG W.; ALFORD, J.M.; SMALLEY, R.E. Fullerenes with metals inside. **Journal of Physical Chemistry**, v. 95, n. 20, 1991. ISSN 0022-3654.

YAN, Y.; JIA, X.; YANG, Y. Palladium nanoparticles supported on CNT functionalized by rare-earth oxides for solvent-free aerobic oxidation of benzyl alcohol. **Catalysis Today**, v. 259, p. 292-302, 2016. ISSN 0920-5861.

YANG, M.; WANG, Z.; WANG, W.; LIU, C.-J. Synthesis of AuPd alloyed nanoparticles via room-temperature electron reduction with argon glow discharge as electron source. **Nanoscale Res Lett**, Boston, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2014. ISSN 1931-7573.

YU, T.-C.; SHAW, H. The effect of sulfur poisoning on methane oxidation over palladium supported on γ - alumina catalysts. **Applied Catalysis B, Environmental**, v. 18, n. 1, p. 105-114, 1998. ISSN 0926-3373.

YUAN, D.; WU, R.; GONG, X. Atomic configurations of Pd atoms in PdAu(111) bimetallic surfaces investigated using the first- principles pseudopotential plane wave approach. **Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics**, v. 75, n. 8, 2007. ISSN 10980121.

ZHANG, H.; LIU, Y.; ZHANG, X. Selective Oxidation of Benzyl Alcohol Catalyzed by Palladium Nanoparticles Supported on Carbon-Coated Iron Nanocrystals. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 32, n. 11, p. 1693-1701, 2011. ISSN 1872-2067.

ZHAO, X.; Long, R.; Liu, D.; Luo, B.; Xiong, Y. PdAg alloy nanocages: integration of Ag plasmonic properties with Pd active sites for light-driven catalytic hydrogenation. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 3, n. 18, p. 9390-9394, 2015. ISSN 2050-7488.

ZHU, W.-K.; CONG, H.-P.; GUAN, Q.-F.; YAO, W.-T.; LIANG, H.-W.; WANG, W.; YU, S.-H. Coupling Microbial Growth with Nanoparticles: A Universal Strategy to Produce Functional Fungal Hyphae Macrospheres. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 20, p. 12693-12701, 2016. ISSN 19448244.

APÊNDICE

APÊNDICE A) Análise de tamanho de partículas por espalhamento de luz das soluções

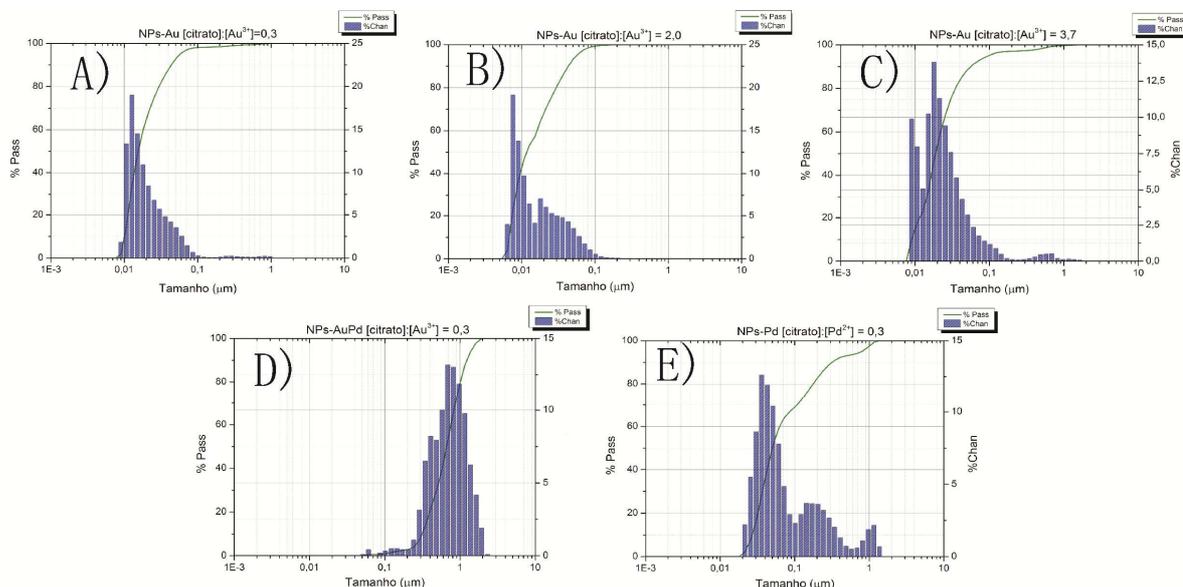


Figura 56. Análise de tamanho de partículas das soluções NPs-Au(a), NPs-Pd (e) e NPs-AuPd (d), estabilizadas com íons citrato, razão [citrato]:[Au³⁺]=0,3 Análises realizadas no CETENE.

APÊNDICE B) pH das soluções contendo NPs metálicas em que os fungos foram cultivados.

Tabela 08. pH das soluções contendo NPs-Pd antes e depois do crescimento fúngico.

Soluções NPs-Pd		Depois do cultivo dos fungos			
Razão [citrato]:[Pd ²⁺]	pH	<i>P.macrosporus</i>	<i>Trichodema sp</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>A.niger</i>
0,3	3,5	3,6	3,4	3,5	3,4
2,0	4,5	4,9	4,7	5,0	4,8
3,7	5,4	6,1	6,0	5,8	5,7
7,1	6,0	6,1	5,9	6,2	6,1

Tabela 09. pH das soluções contendo NPs-Pt antes e depois do crescimento fúngico.

Soluções NPs-Pt		Depois do cultivo dos fungos			
Razão [citrato]:[Pd ²⁺]	pH	<i>P.macrosporus</i>	<i>Trichodema sp</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>A.niger</i>
0,3	2,9	2,6	2,5	2,6	2,6
2,0	3,3	3,1	3,0	3,0	3,0
3,7	3,4	2,8	3,1	3,1	3,2
7,1	4,1	3,9	4,0	4,0	5,0

APÊNDICE C) MEV do bio-híbrido *Trichoderma sp*@NPs-AuPd razões [citrato]:[Au³⁺] = 0,3, 2,0, 3,7, 7,1 e 17,3.

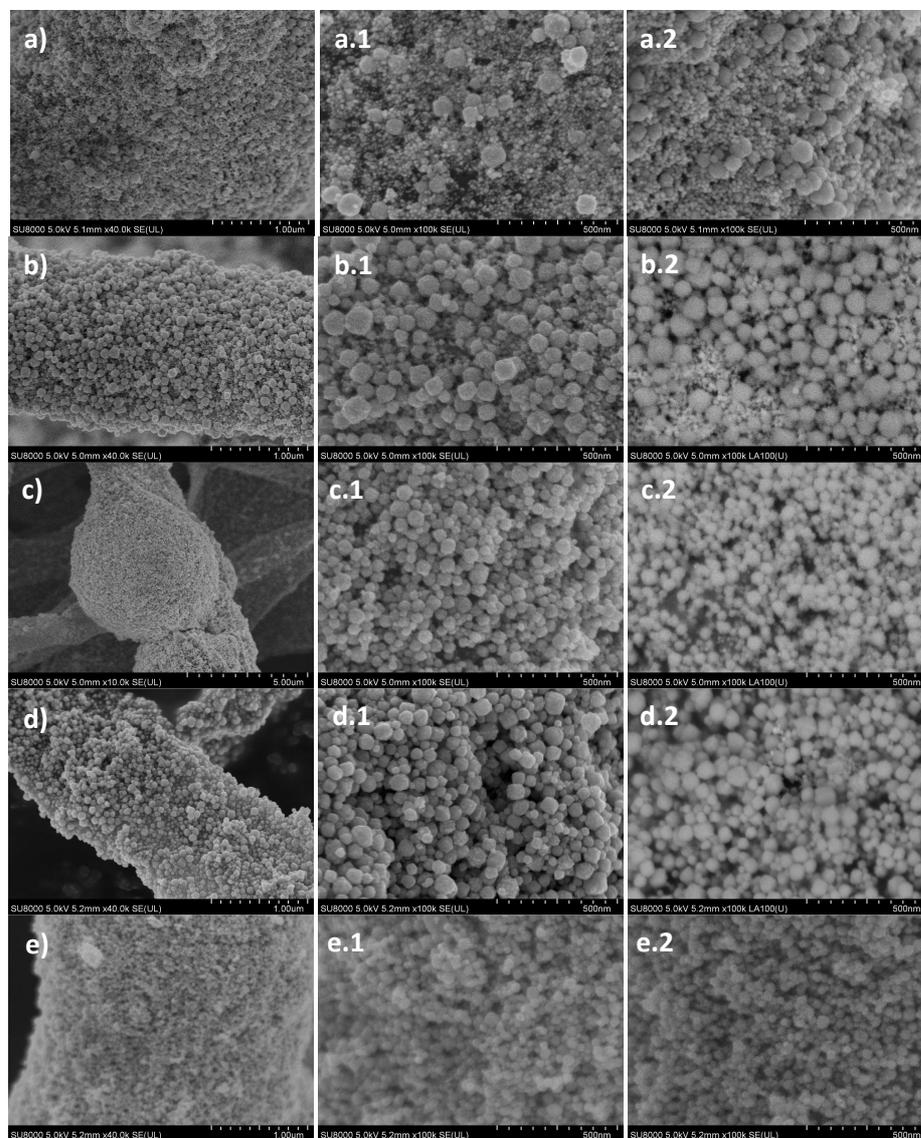


Figura 57. MEV do bio-híbrido *Trichoderma sp*@AuPdNP, razões molares [citrato]:[Au³⁺] = a) 0,3; b) 2,0; c) 3,7; d) 7,1 e e) 17,3, nos aumentos de 10.000X (a-e) e 100.000X (a.1-e.1 e a.2-e.2). Modo de elétrons secundários (a.1-e.1) e modo de elétrons retroespalhados (a.2-e.2).

APÊNDICE D) Cálculo da taxa de conversão das reações

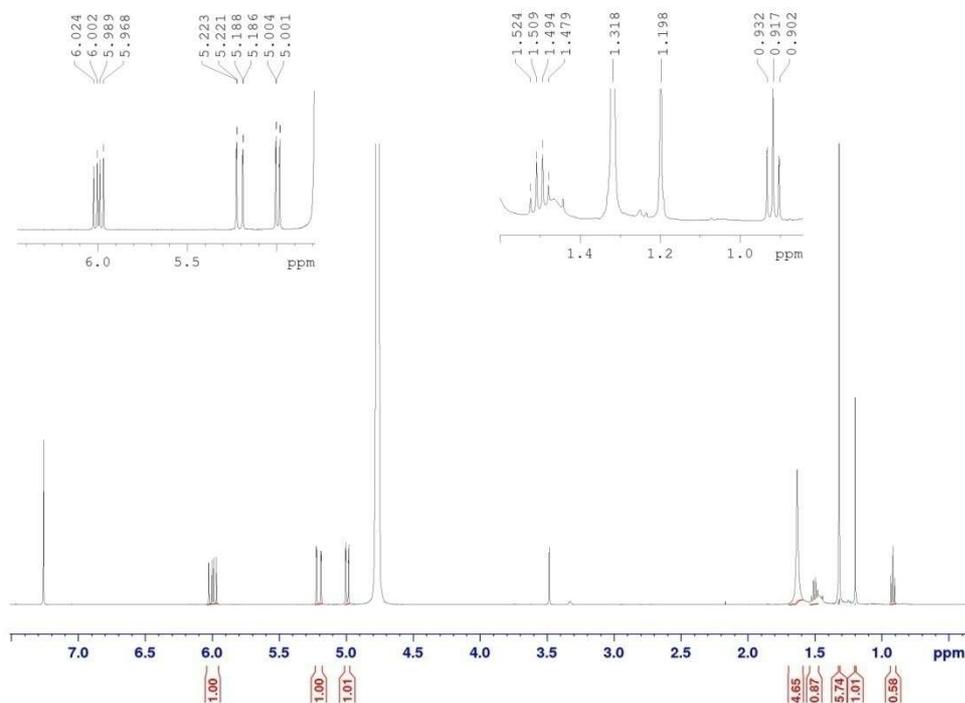


Figura 58. Espectro RMN-1H obtido com a hidrogenação do MBE após 30 minutos de reação na presença do bio-híbrido *Trichoderma sp*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺]= 2,0 utilizando metanol e água como solvente.

A taxa de conversão foi obtida através do cálculo: Taxa de conversão = produtos/ material de partida (reagentes e produtos), ou seja: [2-metil-butan-2-ol/(2-metil-3-buten-2-ol + 2-metil-butan-2-ol)] x 100.

Assim, foi considerada a integral do quarteto em 1,5 ppm relacionada a 2H do MBA = 0,87. E a integral do duplo dubleto em 6,0 ppm relacionada a 1H do MBE. Como o valor de 0,87 está relacionado a 2H, este foi dividido por 2, para relacionar-se estequimetricamente a 1H, assim tem-se:

$$\text{Taxa de conversão do MBE em MBA} = \frac{\left(\frac{0,87}{2}\right)}{1 + \left(\frac{0,87}{2}\right)} = 0,30 \times 100 = 30\%$$

Este mesmo cálculo foi efetuado para as demais reações, como foi descrito na seção 4.2.3, p. 59.

APÊNDICE E) Aplicação da luz visível para o aumento da cinética de hidrogenação do 2-metil-3-buten-2-ol (MBE) utilizando bio-híbrido fungos@AuPd como catalisadores

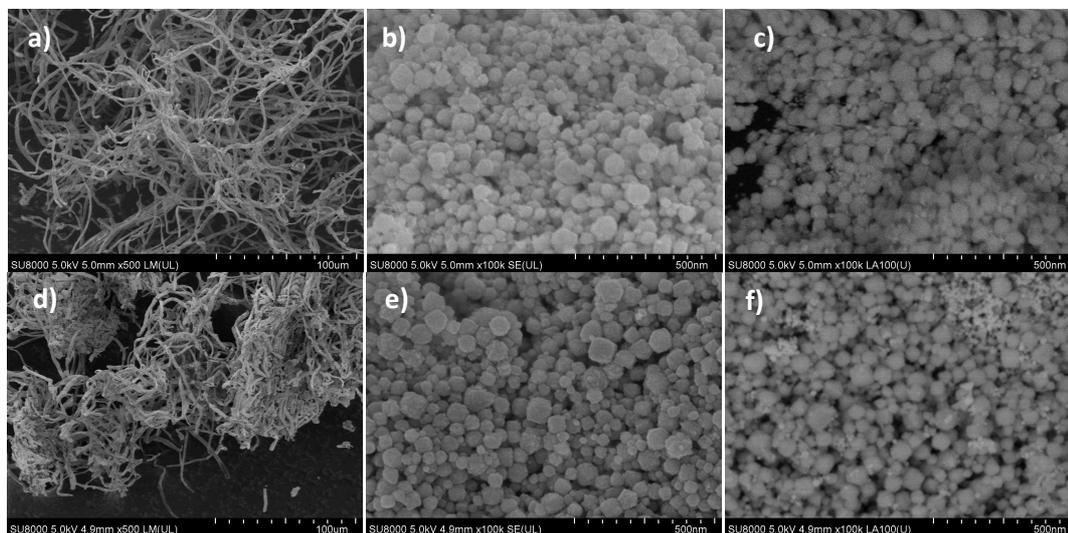


Figura 59. Imagens de MEV comparando *Trichoderma sp*@NPs-Pd [citrato]:[Au³⁺] = 7,1, obtidas depois das reações de hidrogenação a) no escuro, b) na presença da luz visível. Modo de elétrons secundários (a.1-b.1), modo de elétrons retroespalhados (a.2-b.2).

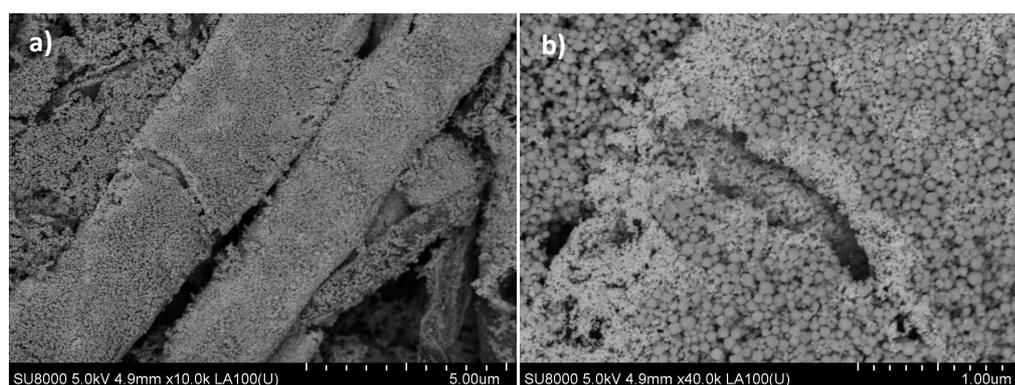


Figura 60. *Trichoderma sp*@NPs-Pd [citrato]:[Au³⁺] = 7,1 depois da hidrogenação em presença da luz visível. Modo elétrons retroespalhados.

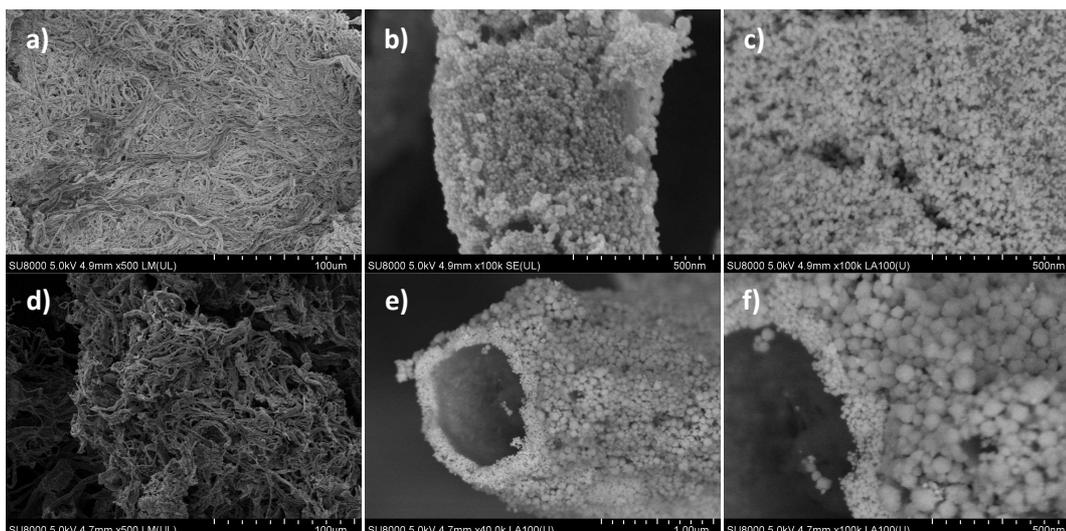


Figura 61. Imagens de MEV comparando *Penicillium sp@NPs-Pd* [citrato]:[Au³⁺] = 7,1, obtidas depois das reações de hidrogenação a) no escuro, b) na presença da luz visível. Modo de elétrons secundários (a.1-b.1), modo de elétrons retroespalhados (a.2-b.2).

APÊNDICE F) Reciclagem dos bio-híbridos fungos@AuPd

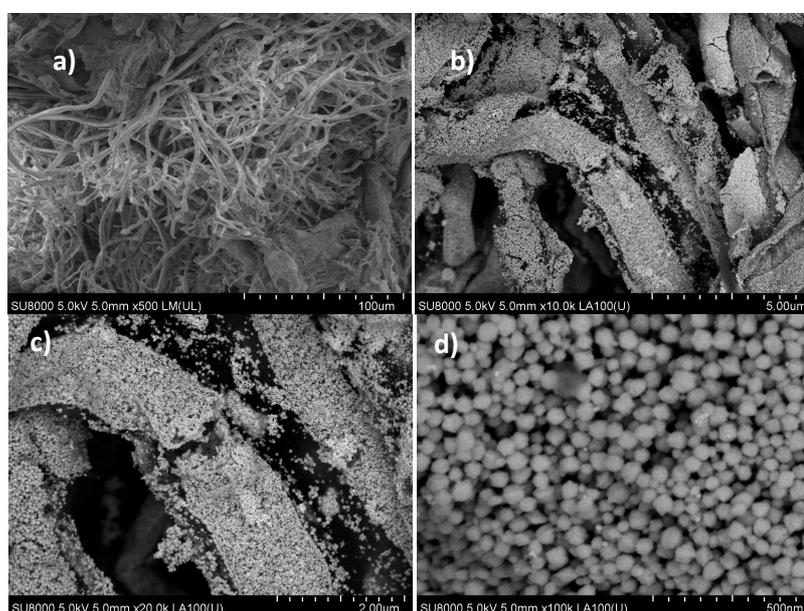


Figura 62. MEV do bio-híbrido *Penicillium sp@NPs-AuPd* cultivados na razão [citrato]:[Au³⁺] = 2,0 depois de 4 ciclos de utilização.

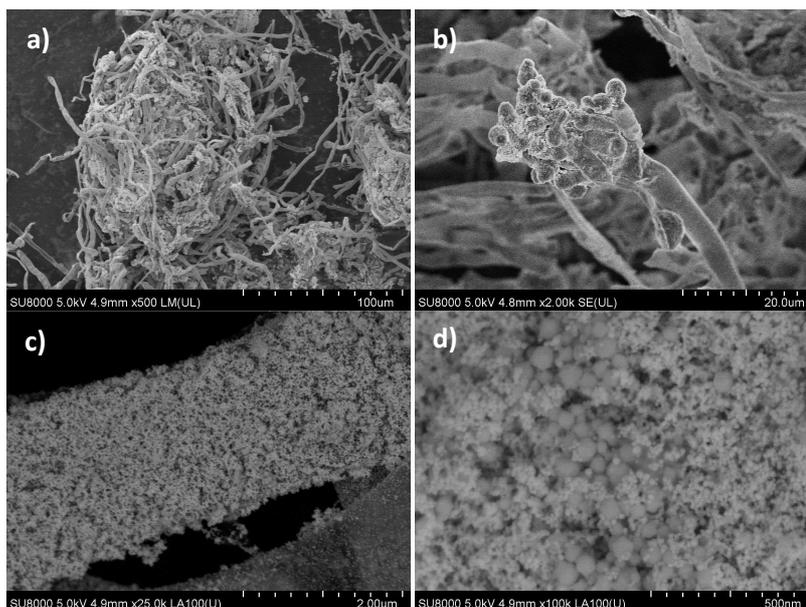


Figura 63. MEV do bio-híbrido *A.niger@NPs-AuPd* cultivados na razão [citrato]:[Au³⁺] = 2,0 depois de 4 ciclos de utilização.

APÊNDICE G) DTG dos bio-híbridos

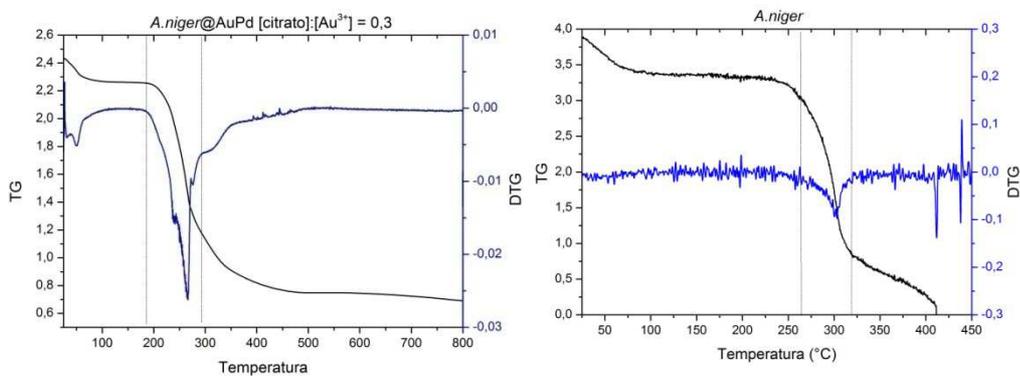


Figura 64. DTG do bio-híbrido *A.niger@NPs-AuPd* [citrato]:[Au³⁺] e do fungo *A.niger* obtidos no pelo software origin.

APÊNDICE H) Aplicações dos bio-híbridos fungos @AuPd para a redução do 4-nitrofenol

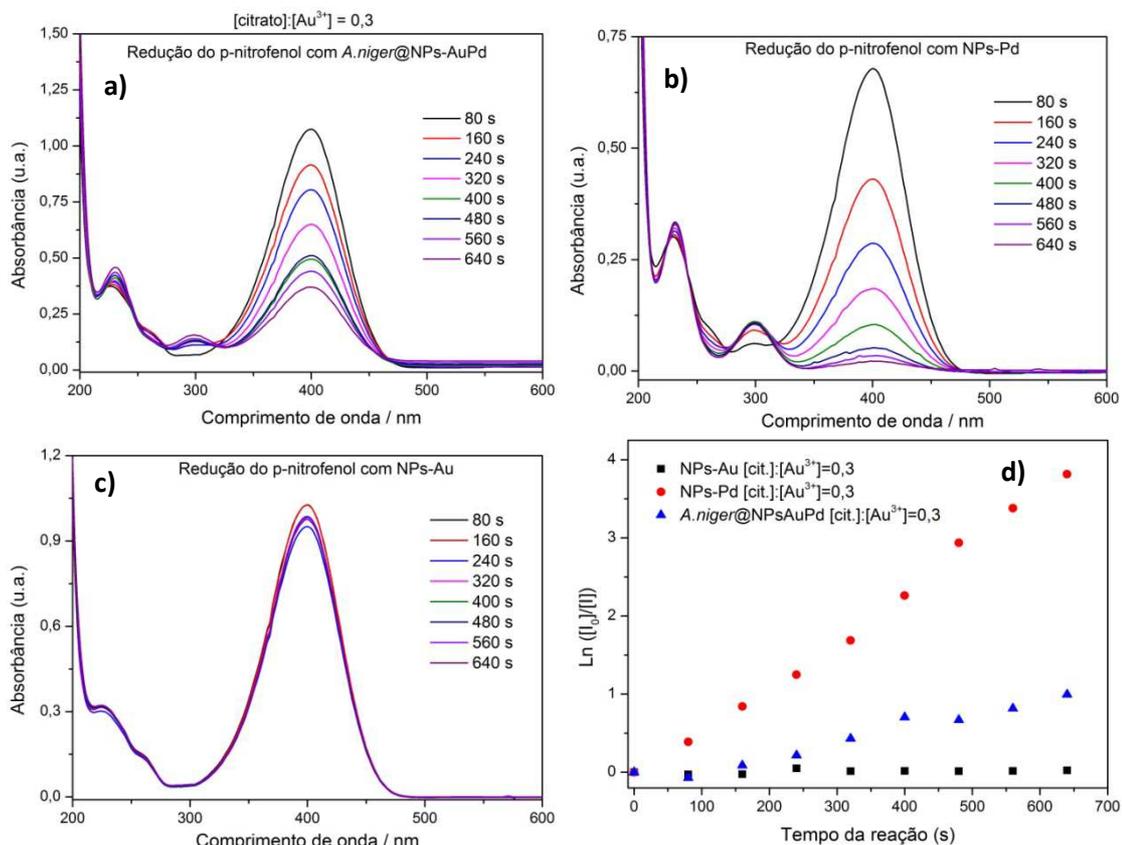


Figura 65. Avaliação cinética da redução do p-nitrofenol através de UV-Vis. a) *A.niger*@NPs-AuPd, b) NPs-Pd, c) NPs-Au e d) cinética da reação pseudo-primeira ordem avaliando o pico em 400nm do *p*-nitrofenol.

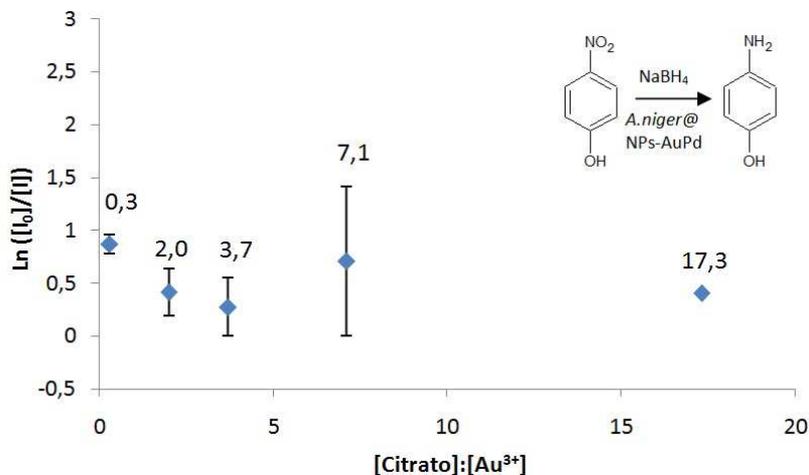


Figura 66. Avaliação da taxa de redução máxima do *p*-nitrofenol utilizando o bio-híbrido *A.niger* @NPs-AuPd nas razões $[\text{citrato}]:[\text{Au}^{3+}] = 0,3, 2,0, 3,7, 7,1, 17,3$.

APÊNDICE I) Espectros de RMN-H

Reação de oxidação, Suzuki e hidrogenação aplicando *Trichoderma sp* @[citrato]:[Au³⁺]=2,0

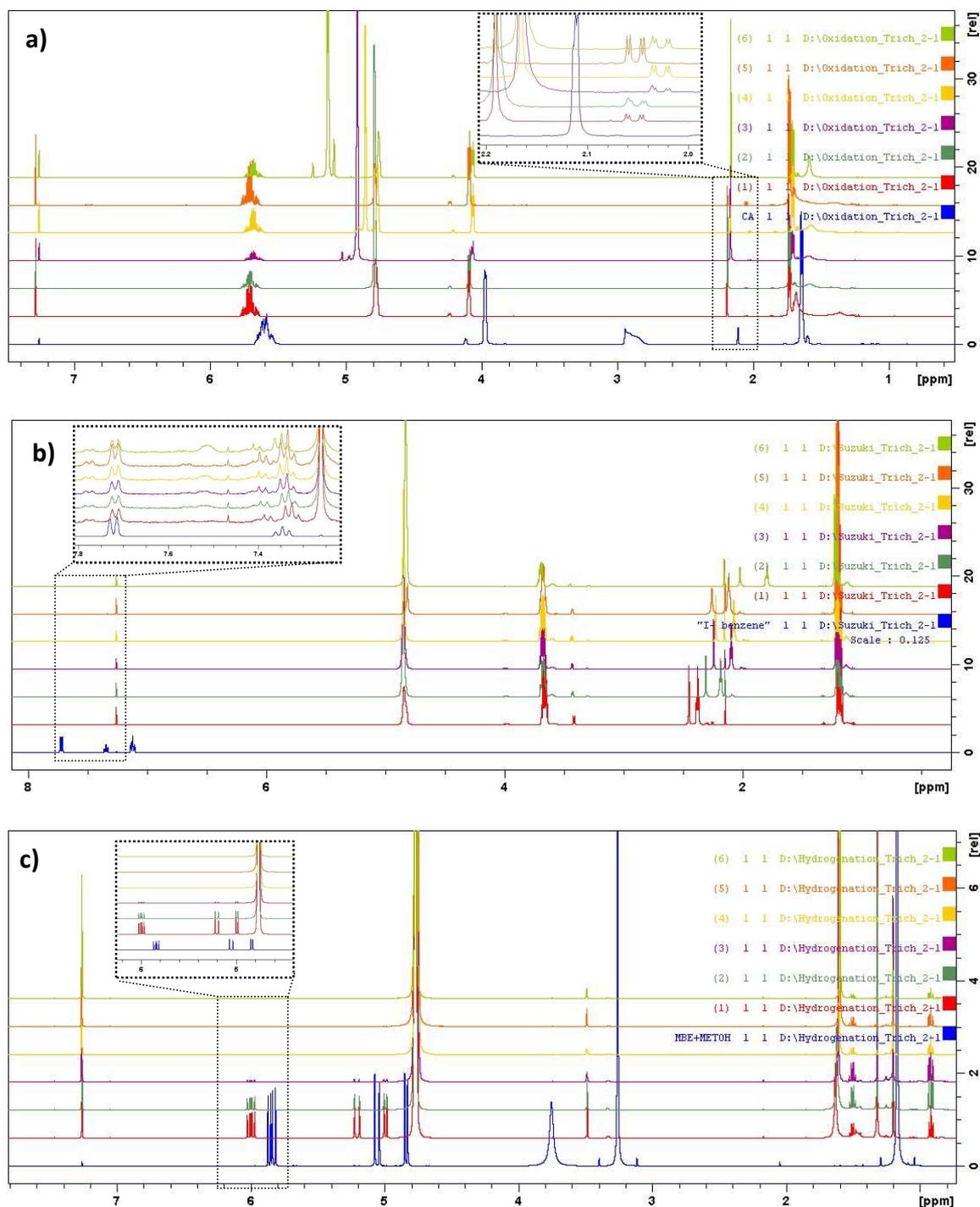


Figura 67. Espectros de RMN das reações de oxidação do álcool crotilico (a), reação de Suzuki (b), e hidrogenação do MBE(c) na presença do bio-híbrido *Trichoderma sp* @[citrato]:[Au³⁺]=2,0, estes espectros foram obtidos a cada 30 minutos de reação que se completaram em 3h.

Reações de hidrogenação no escuro e sob luz visível, variando citrato (*A.niger*) e reciclagem (*Trichoderma sp*)

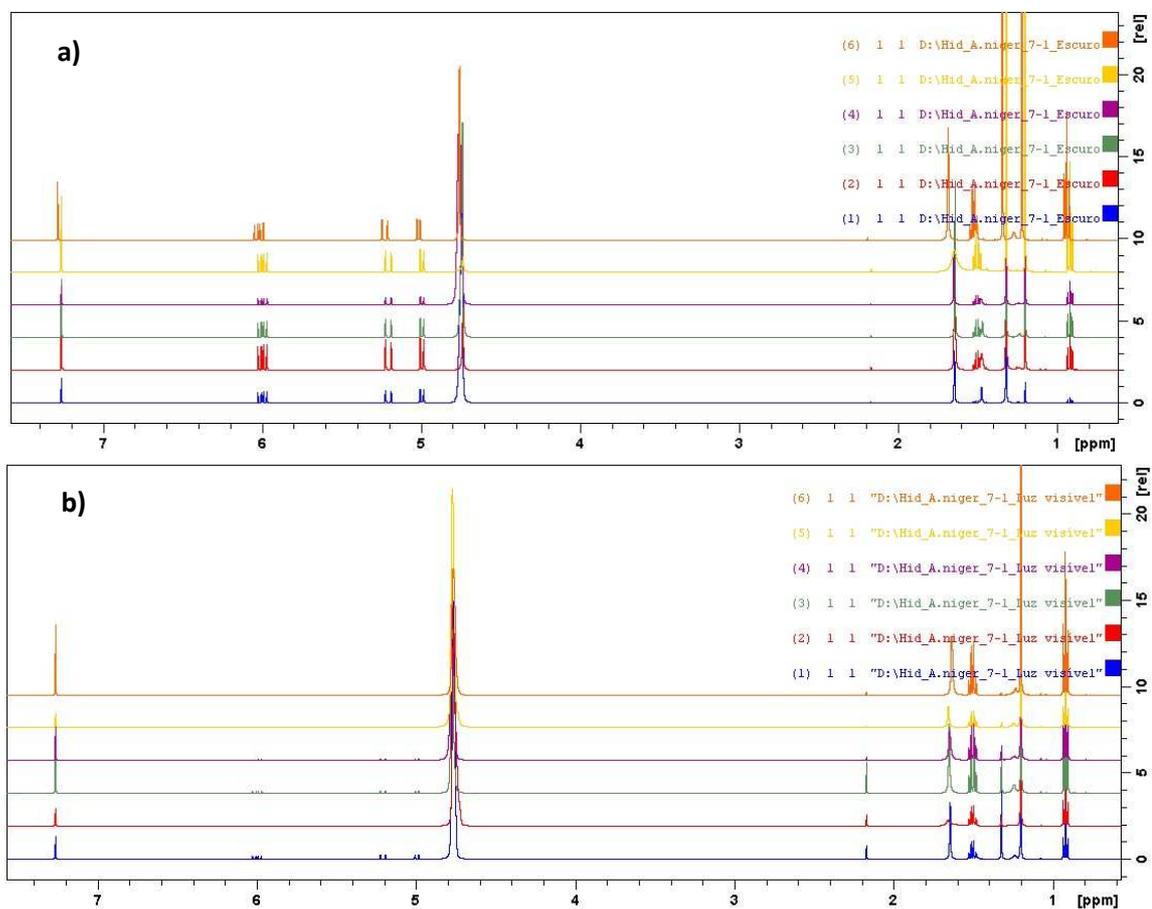


Figura 68. Espectros de RMN da reação de hidrogenação do MBE na presença do *A niger*@NPs-AuPd [citrati]:[Au³⁺] = 7,1 no escuro (a) e sob luz visível(b). Estes espectros foram obtidos a cada 20 minutos de reação que se completou em 2h.

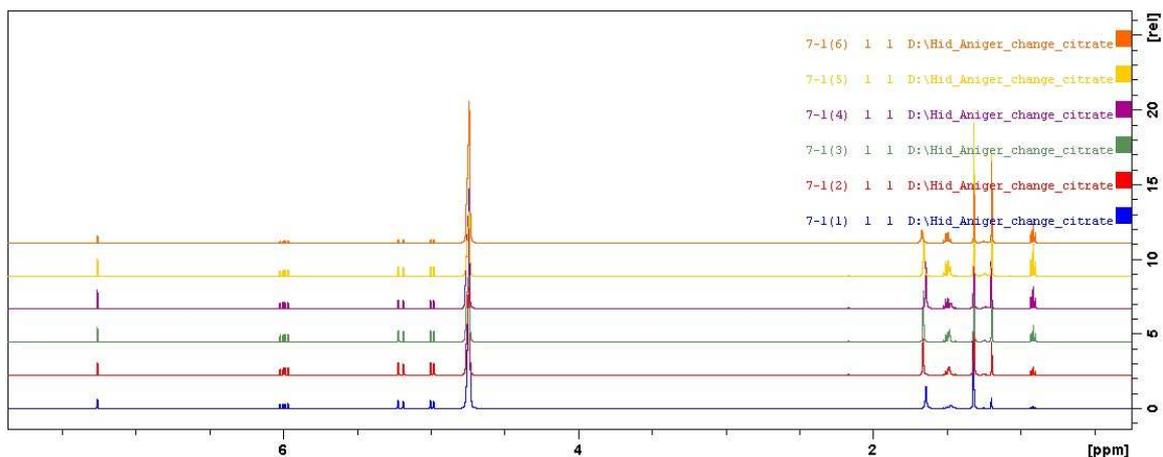


Figura 69. Espectros de RMN da reação de hidrogenação do MBE na presença do *A niger*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = 7,1. Estes espectros foram obtidos a cada 20 minutos de reação que se completou em 2h.

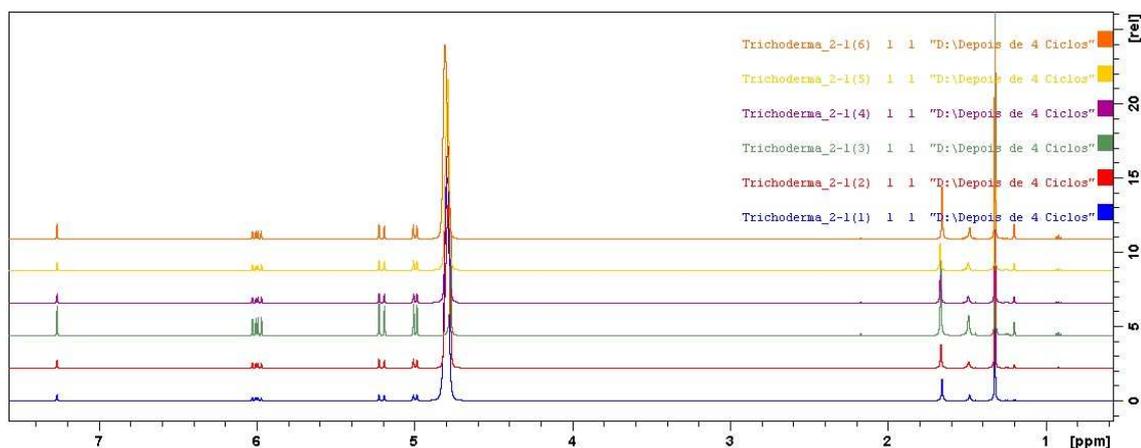


Figura 70. Espectros de RMN da reação de hidrogenação do MBE na presença do *Trichoderma sp*@NPs-AuPd [citrato]:[Au³⁺] = 2,0. Estes espectros foram obtidos a cada 20 minutos de reação que se completou em 2h, depois de quatro ciclos de utilização do bio-híbrido.