



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARCOS VINÍCIUS FERREIRA

**SÍNTESE E APLICAÇÃO DE UMA AZIDA DE CELULOSE NA IMOBILIZAÇÃO
DE ENZIMA LIPASE *Candida antarctica* CALB POR REAÇÃO DO TIPO “CLICK”
CuAAC**

UBERLÂNDIA

2023

MARCOS VINÍCIUS FERREIRA

**SÍNTESE E APLICAÇÃO DE UMA AZIDA DE CELULOSE NA IMOBILIZAÇÃO
DE ENZIMA LIPASE *Candida antarctica* CALB POR REAÇÃO DO TIPO “CLICK”
CuAAC**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Química.

Área de Concentração: Físico-Química

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Maria Nascimento de Assunção.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Barroso Panatieri.

UBERLÂNDIA

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F383 2023	Ferreira, Marcos Vinícius, 1988- SÍNTESE E APLICAÇÃO DE UMA AZIDA DE CELULOSE NA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA LIPASE Candida antarctica CALB POR REAÇÃO DO TIPO "CLICK" CuAAC [recurso eletrônico] / Marcos Vinícius Ferreira. - 2023. Orientadora: Rosana Maria Nascimento Assunção. Coorientadora: Rodrigo Barroso Panatieri. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.668 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Química. I. Assunção, Rosana Maria Nascimento, 1968- , (Orient.). II. Panatieri, Rodrigo Barroso, 1973- , (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. IV. Título. CDU: 54
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 151, PPGQUI				
Data:	Dezenove de dezembro de dois mil e vinte e três	Hora de início:	9:30 h	Hora de encerramento:	13:20 h
Matrícula do Discente:	11913QMI006				
Nome do Discente:	Marcos Vinícius Ferreira				
Título do Trabalho:	“Síntese e Aplicação de uma Azida de Celulose na Imobilização de Enzima Lipase candida antarctica CalB por Reação do Tipo “Click” CuAAC”				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Teórica e Físico-Química de Macromoléculas e Coloides				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	“Modificação química de polímeros naturais e sintéticos visando aplicações nas áreas farmacêutica, alimentícia e ambiental”				
<u>ODS</u>	07 Energia Limpa e Acessível				

Reuniu-se, por webconferência, no *link*: <https://meet.google.com/arh-nsva-inr>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: **Sérgio Antônio Lemos de Moraes e Daniel Pasquini**, da Universidade Federal de Uberlândia; **Helena Maria de Almeida Mattos Martins dos Santos Ali**, Instituto Federal de educação, ciência e tecnologia do triângulo mineiro; **Aparecido Junior de Menezes**, da Universidade Federal de São Carlos, e **Rosana Maria Nascimento de Assunção**, orientadora do candidato.

Iniciando os trabalhos a presidenta da mesa, **Dr^a. Rosana Maria Nascimento de Assunção**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos,

conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Rosana Maria Nascimento de Assunção, Professor(a) do Magistério Superior**, em 03/01/2024, às 08:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Antonio Lemos de Moraes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 03/01/2024, às 09:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Pasquini, Professor(a) do Magistério Superior**, em 03/01/2024, às 09:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helena Maria de Almeida Mattos Martins dos Santos Ali, Usuário Externo**, em 03/01/2024, às 10:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aparecido Junior de Menezes, Usuário Externo**, em 03/01/2024, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5058377** e o código CRC **72E39C3E**.

Dedico toda minha caminhada aos meus pais Maria Zenaide e Sebastião (In memoriam), que me deram todo o apoio e suporte e nunca me deixaram fraquejar. Sempre estiveram aconselhando, rezando e torcendo, mesmo em espírito. Durante todas suas vidas lutaram e se sacrificaram antes de tudo pelo bem-estar e pela criação de seus filhos em um lar repleto de amor. Dedico também ao meu irmão Rafael, minha irmã Meiriely, meus amados sobrinhos e afilhado e todos meus parentes e amigos que me deram todo o apoio e suporte.

Obrigado por tudo!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e ao Divino Espírito Santo pela luz e sabedoria que me guiaram durante mais esta etapa da minha vida, me ajudando a manter a temperança e o equilíbrio e por possibilitarem que, com todas dificuldades e alegrias advindas deste período, eu pudesse aprender e crescer tanto.

Agradecimento especial à minha orientadora prof.^a Rosana que me acolheu em seu grupo de pesquisa e se tornou uma amiga muito querida que me ensina muito mais do que ciência, mas profissionalismo, empatia e paciência, que leva ao pé da letra o ensinar pelo exemplo. Só tenho a dizer que a oportunidade de me tornar seu amigo e conviver durante esses anos me inspiraram, me inspiraram e me inspirarão durante toda minha vida.

A todos os meus professores que para mim estão hoje representados pela prof.^a Rosana e meu coorientador, o prof. Rodrigo, e em seus nomes, agradecer a todos os professores com quem tive a honra de aprender, de receber seus valiosos conselhos, sugestões, dicas, preocupações e por terem contribuído tanto na minha formação profissional e pessoal, desde que entrei no pré-escolar (há bons 30 anos atrás).

Ao meus amigos do Laboratório de Materiais Eletroquímica e Polímeros, tanto os que já passaram como o Mateus, Poliana, Murilo, Andressa e Laila, como os atuais Henrique, Maria Fernanda, Brenda, Alana e Jonatas. Agradeço ainda aos amigos que a UFU me deu nesses dez anos, entre graduação, mestrado e doutorado, especialmente ao Lauro, Diele, Allyson, Laís, Lorena, Adryelly, Patrícia, Laís, Mayara, Evellyn, Leonardo, Lucas, Cynthia entre muitos outros que são tão importantes e valiosos para mim quanto os citados, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos de decepção e frustrações me ajudando a superá-los, mas também em inúmeros momentos de alegria que compartilhamos. Obrigado por permitirem que eu fizesse parte da vida de vocês e espero que eu possa ter retribuído pelo menos um pouquinho do muito que me deram de carinho e aprendizado com nossa amizade nesses anos todos. Aos amigos Roberto, Luan, Vinícius, Nilton, Luana e Júlio que foram pacientes com minhas reclamações e também ausências, e não desistiram de mim (risos). Enfim, a todos meus amigos das horas boas e ruins, de suporte incondicional sem os quais com certeza esta etapa poderia até ter sido vencida mas não da forma maravilhosa o quanto foi.

Ao corpo de servidores técnicos da UFU, aos motoristas que nos conduziram a todas as aulas e as meninas dos Serviços Gerais, com destaque para Letícia e Suely, que sempre proporcionaram um ambiente agradável para o desenvolvimento da pesquisa, além de uma companhia maravilhosa.

“Somos criaturas sem forma, mas ficamos pela metade, caso alguém mais sábio, melhor, mais estimado que nós, assim deve ser tal amigo, não nos ajude a aperfeiçoar nossa natureza fraca e imperfeita.”

(Passagem do livro “Frankenstein” de Mary Shelley, p. 45)

“O mundo era para mim um segredo que eu desejava decifrar. Entre as mais antigas sensações de que posso me lembrar estão a curiosidade, a pesquisa dedicada para aprender as leis ocultas da natureza e uma felicidade equivalente ao júbilo quando elas se revelavam a mim.”

(Passagem do livro “Frankenstein” de Mary Shelley, p. 53)

RESUMO

Catalisadores enzimáticos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de diversos processos industriais, tendo gerado resultados promissores particularmente na área de energias renováveis. Entretanto, um dos problemas associados ao emprego de enzimas livres é a manutenção de sua estabilidade no meio reacional e a sua dificuldade de recuperação do meio reacional, limitando suas reutilizações e aumentando os custos do processo. Diante deste quadro, neste trabalho, um bioconjugado suporte/enzima foi desenvolvido a partir da ligação química, por reação "click" de cicloadição alcino/azida catalisada por cobre (CuAAC), da enzima lipase a um suporte celulósico modificado. No contexto da celulose, que não possui naturalmente os grupos compatíveis a esta reação "click", adotou-se a síntese do tosilato de celulose (MCC-Tos) e sua subsequente transformação em azido celulose (MCC-Az). Para tanto, as variáveis reacionais tempo, temperatura e razão molar cloreto de *p*-toluenossulfonila:unidade de anidroglicose (Tos:UAG) para a síntese do MCC-Tos em fase heterogênea foram otimizadas por planejamento experimental por matriz Doehlert. Deste planejamento, observou-se que as variáveis mais significativas foram a razão molar (RM) e o tempo reacional. Então, foi produzido o derivado MCC-Tos em condições otimizadas extrapoladas (MCC-Otm), a saber de 30 °C, 144 h e RM 10:1 (Tos:UAG), cujo grau de substituição (GS) foi de 1,72. MCC-Tos Otm foi utilizado como precursor na síntese da MCC-Az. Análises estruturais por espectroscopia de infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TGA) e ressonância magnética nuclear de Carbono-13 no estado sólido (RMN ¹³C-CP/MAS), difratogramas de raios-X (DRX) e análises de área superficial específica e porosidade (ASAP) confirmaram a obtenção desses derivados, evidenciando uma redução na cristalinidade (de cerca de 20%) e aumento na área superficial específica da MCC-Az (de 0,924 para 52,995 m² g⁻¹, em relação à MCC). Quanto à inserção do grupo propargil na lipase de *Candida antarctica* B (CalB), formando a CalB-Prop, as técnicas espectroscópicas de FTIR, UV-vis e de fluorescência evidenciaram uma mudança conformacional da enzima após a modificação, mas que não se estenderam a alterações em sua forma ativa. Na imobilização da CalB-Prop no suporte MCC-Az, as técnicas espectroscópicas indicaram a ligação por reação CuAAC, com uma nova mudança conformacional na enzima que refletiu também em alterações na sua forma ativa. A eficiência de incorporação (%EI) da CalB foi estimada em 24,63%, indicando uma imobilização covalente pela redução de 19,54% na intensidade da banda de FTIR da azida. Mesmo com essa baixa %EI, o bioconjugado MCC-CalB apresentou um atividade enzimática específica (AEE) em reação com *p*-nitrofenil palmitato igual a 84,87 LU g⁻¹. Os resultados sugerem a eficiência da síntese dos derivados

celulósicos e do bioconjugado propostos, abrindo caminho para avaliações cinéticas, atividade enzimática e reuso em reações de transesterificação com óleos vegetais.

Palavras-chave: reação “*click*” CuAAC, tosilato de celulose, azido celulose, CalB, imobilização de enzimas

ABSTRACT

Enzymatic catalysts play a fundamental role in the development of various industrial processes, having generated promising results, particularly in the field of renewable energy. However, one of the problems associated with the use of free enzymes is keeping their stability in the reaction medium and the difficulty of recovering them, therefore, limiting their reuse and increasing process costs. In this context, a support/enzyme bioconjugate was developed in this work through the chemical binding, using a click reaction of alkyne/azide cycloaddition catalyzed by copper (CuAAC), of the lipase enzyme to a modified cellulose support. In the context of cellulose, which does not naturally possess groups compatible with this click reaction, the synthesis of cellulose tosylate (MCC-Tos) was adopted, followed by its subsequent transformation into azide cellulose (MCC-Az). For this purpose, the reaction variables such as time, temperature, and molar ratio of p-toluenesulfonyl chloride to anhydroglucose unit (Tos:UAG) for the synthesis of MCC-Tos in a heterogeneous phase were optimized using experimental design by Doehlert matrix. From this design, it was observed that the most significant variables were the molar ratio (RM) and the reaction time. Thus, the MCC-Tos derivative was produced under extrapolated optimized conditions (MCC-Otm), namely at 30 °C, 144 h, and MR 10:1 (Tos:AGU), with a degree of substitution (GS) of 1.72. MCC-Tos Otm was used as a precursor in the synthesis of MCC-Az Otm. Structural analyses using infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance (RMN ^{13}C -CP/MAS), X-ray diffractograms (DRX), and surface area and porosity analysis (ASAP) confirmed the obtainment of these derivatives, showing a reduction in crystallinity (by approximately 20%) and an increase in the surface area of MCC-Az (from 0.924 to 52.995 m² g⁻¹, compared to MCC). Regarding the insertion of the propargyl group into the *Candida antarctica* B lipase (CalB), forming the CalB-Prop, spectroscopic techniques such as FTIR, UV-vis, and fluorescence revealed a conformational change in the enzyme after modification, but without extending to changes in its active form. In the immobilization of CalB-Prop on the MCC-Az support, spectroscopic techniques indicated binding through CuAAC reaction, with a new conformational change in the enzyme that also reflected changes in its active form. The incorporation efficiency (%EI) of CalB was estimated at 24.63%, indicating a covalent immobilization confirmed by a reduction in the intensity of the azide band by 19.54%. Despite this low %EI, the MCC-CalB bioconjugate showed a specific enzymatic activity (AEE) in the reaction with *p*-nitrophenyl palmitate equal to 84.87 LU g⁻¹. The results suggest the efficiency of the proposed cellulose derivatives and bioconjugate synthesis, paving

the way for kinetic evaluations, enzymatic activity, and reuse in transesterification reactions with vegetable oils.

Keywords: CuAAC click reaction, cellulose tosylate, azide cellulose, CalB, enzyme immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1 – (a) Representação da cadeia da celulose e de sua unidade monomérica, a celobiose; (b) representação das ligações de hidrogênio inter (tracejado grosso) e intracadeia (tracejado fino) das unidades de glicose em que a seta indica a direção do doador-aceptor-doador de acordo com as propostas I e II.	22
Figura 1. 2 – Modificações químicas mais comuns da celulose (do topo superior direito) por reações com: isocianatos; haletos de ácidos carboxílicos; ácido sulfúrico; epóxidos; anidridos de ácidos; oxidação do hipoclorito mediada por radical 2,2,6,6-tetrametil-piperidínio-1-óxido (TEMPO); ácidos acéticos halogenados; e clorosilanos.....	24
Figura 1. 3 – Mecanismo reacional da síntese do tosilato de celulose em fase heterogênea. ..	26
Figura 1. 4 – Reações de derivatização da celulose a partir do tosilato de celulose em (a) o grupo tosilato agindo como grupo protetor e (b) como grupo abandonador.	27
Figura 1. 5 – Esquema da reação de formação da azido celulose utilizando como precursor o tosilato de celulose, ambos com GS = 1.....	28
Figura 1. 6 – Detalhes do mecanismo da reação “click” CuAAC atualmente aceita.	31
Figura 1. 7 – Total de publicações na plataforma WebScience por ano utilizando como palavras-chave “Cellulose Click-chemistry”.....	33
Figura 1. 8 – Mecanismo para a síntese da azido celulose (MCC-Az) em DMSO a partir do MCC-Tos com GS = 1.....	38
Figura 1. 9 – Representação das três técnicas mais comumente utilizadas para imobilização enzimática: (a) adsorção física; (b) encapsulamento; e (c) ligação covalente ou ligação cruzada.	40
Figura 1. 10 – Estratégias (a) “grafting to” e (b) “grafting from” para formação do conjugado proteína-polímero.	41
Figura 1. 11 – Esquema da sequência reacional proposta para inserção do grupo propargil à estrutura da CalB por reação de acilação com um propargil-NHS.....	43
Figura 2. 1 – Espectros de FTIR (a) de 4000 a 2000 cm^{-1} ; (b) de 1670 a 650 cm^{-1} e (c) de 1350 a 1000 cm^{-1} ; normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} , para as amostras de MCC, Tos, MCC-Tos (razão molar 3:1) após 24 h e 48 h de reação de tosilção.	53
Figura 2. 2 – Espectros de FTIR (a) de 4000 a 2000 cm^{-1} e (b) de 1450 a 650 cm^{-1} ; normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} das amostras de MCC-Tos produzidas a partir das razões molares 3:1; 4:1; 4,5:1 e 5:1 (Tos:UAG), após 24 h e 48 h de reação de tosilção.	55

Figura 2. 3 – Espectros de FTIR comparativos das amostras de MCC-Tos produzidas a partir da razão molar 5:1 (Tos:UAG), entre 24 h e 216 h de reação de tosilção, na faixa de ampliação de 1450 a 650 cm^{-1} , normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} .	57
Figura 2. 4 – Comportamento das razões das bandas de absorbância 1174/1056 e dos GS calculados em função do tempo de reação de tosilção da MCC.	58
Figura 2. 5 – Espectros por FTIR normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} , para as amostras de MCC-Tos produzidas em cada experimento da Matriz Doehlert, com ampliação da região de 1250 a 950 cm^{-1} .	60
Figura 2. 6 – Mudanças nas superfícies de resposta para três condições distintas de x_3 (RM): (a) menor; (b) intermediário; e (c) maior valor de RM investigados no planejamento experimental, em função de x_1 (temperatura) e x_2 (tempo).	63
Figura 2. 7 – Mudanças nas superfícies de resposta para três condições distintas de x_1 (temperatura): (a) menor; (b) intermediário; e (c) maior valor de temperaturas investigadas no planejamento experimental, em função de x_2 (tempo) e x_3 (RM).	64
Figura 2. 8 – Mudanças nas superfícies de resposta para três condições distintas de x_2 (tempo): (a) menor; (b) intermediário; e (c) maior valor de tempo investigado no planejamento experimental, em função de x_1 (temperatura) e x_3 (RM).	65
Figura 2. 9 – Espectros de FTIR normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} das amostras de MCC-Tos após definição das condições otimizadas (a) ampliados na faixa de 4000 a 2000 cm^{-1} e (b) de 1670 a 650 cm^{-1} .	67
Figura 2. 10 – Espectro por FTIR da amostra MCC-Tos Otm.	69
Figura 2. 11 – Gráfico do GS do grupo tosilato em função das razões de banda 1174/1056.	70
Figura 2. 12 – Espectros por FTIR, normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} , das amostras azida sódica; MCC; MCC-Tos; e MCC-Az após 24 e 48 h de azidação dos precursores MCC-Tos (3:1) e (4:1), (a) ampliados na faixa de 4000 a 2000 cm^{-1} e (b) de 1670 a 650 cm^{-1} .	71
Figura 2. 13 – Espectros por FTIR, normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} , das amostras MCC-Az após 48, 72 e 96 h de azidação do precursor MCC-Tos I, com ampliação (a) na faixa de 4000 a 2000 cm^{-1} e (b) de 1670 a 650 cm^{-1} .	72
Figura 2. 14 – Espectros por FTIR, normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} , das amostras MCC-Az (10:1) após 24, 48, 72 e 96 h de azidação do precursor MCC-Tos I, com ampliação (a) na faixa de 4000 a 2000 cm^{-1} e (b) de 1670 a 650 cm^{-1} .	74

Figura 2. 15 – Espectros de FTIR comparativos das amostras de MCC, MCC-Tos I e MCC-Az I, com ampliação (a) na faixa de 4000 a 2000 cm^{-1} e (b) de 1670 a 650 cm^{-1} , normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1}	75
Figura 2. 16 – Espectros de FTIR comparativos das amostras de MCC, MCC-Tos Otm e MCC-Az Otm, com ampliação (a) na faixa de 4000 a 2000 cm^{-1} , (b) de 1670 a 650 cm^{-1} e (c) 1250 a 1000 cm^{-1} , normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1}	76
Figura 2. 17 – (a) Curvas TGA e (b) DTG para a MCC; e para os derivados MCC-Tos 3:1; MCC-Tos 4:1; MCC-Tos 4,5:1; e MCC-Tos 5:1 com tempo reacional de 48 h. Taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de N_2 a 60 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$	77
Figura 2. 18 – (a) Curvas TGA e (b) DTG para as amostras MCC-Tos (5:1) em tempos reacionais de 24 a 216 h e MCC sem modificação. Taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de N_2 a 60 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$	79
Figura 2. 21 - (a) Curvas TGA e (b) DTG para as amostras de MCC-Az produzidas a partir (a, b) do MCC-Tos (3:1) e (c,d) do MCC-Tos (4:1). Taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de N_2 a 60 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$	81
Figura 2. 22 – (a) Curvas TGA e (b) DTG para as amostras de MCC-Az produzidas a partir do MCC-Tos com tempos reacionais de 48, 72 e 96 h. Taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de N_2 a 60 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$	83
Figura 2. 23 – (a) Curvas TGA e (b) DTG para as amostras de MCC-Az produzidas a partir do MCC-Tos Otm em condições reacionais otimizadas. Taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de N_2 a 60 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$	84
Figura 2. 24 – Espectro dos núcleos de ^{13}C da amostra de MCC por RMN ^{13}C -CP/MAS e estrutura química da UAG.....	85
Figura 2. 25 – Espectros dos núcleos de ^{13}C das amostras selecionadas de MCC-Tos por RMN ^{13}C -CP/MAS e representação de sua estrutura química.	87
Figura 2. 26 – Espectros dos núcleos de ^{13}C das amostras selecionadas de MCC-Az por RMN ^{13}C -CP/MAS e estrutura proposta para o derivado MCC-Az produzido.	88
Figura 2. 27 – Deconvolução do difratograma de Raios-X obtido para a amostra de MCC....	89
Figura 2. 28 – Deconvolução dos difratogramas de Raios-X obtidos para as amostras (a) de MCC-Tos Otm e (b) MCC-Az Otm.	89
Figura 2. 29 – Imagens por MEV obtidas para amostra de MCC antes das reações de modificação com ampliações de 100x (a); (b) 1000x, (c) 5000x e (d) 10000x.....	91
Figura 2. 30 – Imagens por MEV obtidas para amostra de MCC-Tos Otm com ampliações de 100x (a); (b) 1000x, (c) 5000x e (d) 10000x	91

Figura 2. 31 – Imagens por MEV obtidas para amostra de MCC-Az Otm com ampliações de 100x (a); (b) 1000x, (c) 5000x e (d) 10000x	92
Figura 3. 1 – Reação de hidrólise do p-nitrofenil palmitato (pNPP) catalisada por lipase.	98
Figura 3. 2 – Esquema da sequência reacional proposta para imobilização da enzima CalB em MCC-Az: a) inserção do grupo propargil à estrutura da CalB; b) ligação covalente da enzima CalB à MCC-Az através da reação CuAAC.....	101
Figura 3. 3 – Espectros de FTIR normalizados para a CalB liofilizada e para a CalB-Prop (a) na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} e (b) com ampliação do intervalo de 1760 a 1490 cm^{-1}	102
Figura 3. 4 – Equilíbrio de dissociação ácida do p-nitrofenol (pNP).....	104
Figura 3. 5 – (a) Espectros de absorvância na região UV-vis registrados em tampão acetato 50 mmol L^{-1} (pH 4,01) na presença de diferentes concentrações de p-nitrofenol (p-NP): (—) 0,27; (—) 0,54; (—) 21,39; (—) 42,79; (—) 64,19; (—) 106,96 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (b) Ampliação dos espectros UV-vis com absorvância menores que 0,03 u.a. (c) Curva de calibração para o pNP construída a partir das absorvâncias obtidas em (a) no $\lambda=317 \text{ nm}$. (d) Ampliação da curva de calibração na região das concentrações de pNP menores que 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$	105
Figura 3. 6 – (a) Espectros de absorvância na região UV-vis registrados em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 9,0) na presença de diferentes concentrações de p-nitrofenol (p-NP): (—) 0,506; (—) 1,012; (—) 1,517; (—) 2,023; (—) 3,033; (—) 4,042; (—) 6,058; (—) 8,071 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (b) Curva de calibração para o pNP construída a partir das absorvâncias obtidas em (a) no $\lambda=405 \text{ nm}$	105
Figura 3. 7 – Comportamento das atividades enzimáticas específicas das enzimas CalB e CalB-Prop em diferentes pH.	106
Figura 3. 8 – Comportamento das atividades enzimáticas específicas das enzimas CalB e CalB-Prop em diferentes temperaturas.	108
Figura 3. 9 – Espectros na região UV-Vis obtidos para as soluções enzimáticas nas concentrações 0,42 mg mL^{-1} para CalB, e 0,33 mg mL^{-1} para CalB-Prop.....	110
Figura 3. 10 – Espectros de fluorescência obtidos para as soluções enzimáticas nas concentrações 0,42 mg mL^{-1} para CalB, e 0,33 mg mL^{-1} para CalB-Prop, excitadas em $\lambda_{\text{exc}}=228 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{exc}}=280 \text{ nm}$	111
Figura 3. 11 – Espectros de FTIR normalizados para a MCC-CalB comparada aos espectros da CalB-Prop e MCC-Az Otm (a) na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} e (b) com ampliação do intervalo de 1850 a 900 cm^{-1}	112
Figura 3. 12 – Espectro na região UV-vis obtido para uma suspensão do bioconjugado MCC-CalB com concentração 0,15 mg mL^{-1}	113

Figura 3. 13 – Espectros de fluorescência obtidos para uma suspensão do bioconjugado MCC-CalB com concentração 0,15 mg mL ⁻¹ , excitadas em λ_{exc} = 228 nm e λ_{exc} = 280 nm.....	114
Figura 3. 14 – Comportamento das atividades enzimáticas específicas das enzimas CalB e CalB-Prop e do bioconjugado MCC-CalB em pH 4,0 e temperatura de 45 °C.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. 1 – Exemplos de alguns trabalhos utilizando as reações “click” para modificação da celulose.	34
Tabela 2. 1 – Codificação para as condições avaliadas para otimização da síntese do tosilato de celulose.	46
Tabela 2. 2 – Matriz Doehlert de experimentos para otimização da síntese do tosilato de celulose.	47
Tabela 2. 3 – Atribuições das principais bandas de absorção do espectro na região do infravermelho para MCC e MCC-Tos.	54
Tabela 2. 4 – Cálculo das razões de absorbância entre as bandas 1174/1056 obtidas por FTIR e dos GS para as amostras MCC-Tos produzidas a partir das razões molares 3:1; 4:1; 4,5:1 e 5:1 (Tos:UAG).	56
Tabela 2. 5 – Cálculo das razões de absorbância entre as bandas 1174/1056 obtidas por FTIR e dos GS para MCC-Tos 5:1 (Tos:UAG), com tempo reacional entre 24 e 216 h.	58
Tabela 2. 6 – Razões das bandas de absorbância 1174/1056 para os experimentos de otimização da reação de tosilação da MCC empregando o planejamento de experimentos pela matriz Doehlert, juntamente às % de rendimento e os GS calculados.	61
Tabela 2. 7 – Coeficientes estimados para o modelo obtido para o planejamento experimental com a matriz Doehlert e suas significâncias estatísticas ao nível de 95% de probabilidade.	62
Tabela 2. 8 – Análise de variância do modelo quadrático para otimização da reação de tosilação da MCC em fase heterogênea.	62
Tabela 2. 9 – Cálculo das razões de absorbância entre as bandas 1174/1056 obtidas por FTIR e do GS para as amostras produzidas em condições otimizadas e de extrapolação das otimizações.	68
Tabela 2. 10 – Valores de GS estimados a partir dos dados de %S obtidos por Análise Elementar para amostras MCC-Tos e suas respectivas RB.	70
Tabela 2. 11 – Cálculo das razões de absorbância entre as bandas 2111/1056 obtidas por FTIR para as amostras MCC-Az produzidas a partir dos precursores MCC-Tos I, 3:1 e 4:1 (Tos:UAG).	73
Tabela 2. 12 – Cálculo das razões de absorbância entre as bandas 2111/1056 obtidas por FTIR para as amostras MCC-Az (10:1) produzidas a partir do precursor MCC-Tos I.	75
Tabela 2. 13 – Porcentagens de perda de massa relacionadas à saída de água (%P.M. H ₂ O) para a MCC e os derivados MCC-Tos (3:1), (4:1), (4,5:1) e (5:1).	77

Tabela 2. 14 – Dados termogravimétricos obtidos a partir das curvas TGA/DTG para a MCC e os derivados MCC-Tos (3:1), (4:1), (4,5:1) e (5:1), comparados às RB calculados por FTIR e aos GS.....	78
Tabela 2. 15 – Dados termogravimétricos obtidos a partir das curvas TGA/DTG para o MCC-Tos (5:1) em tempos reacionais de 24 a 216 h, comparados às RB, calculadas a partir do FTIR, e aos GS.	80
Tabela 2. 18 – Dados termogravimétricos obtidos a partir das curvas TGA/DTG para as azido celulosas produzidas dos derivados MCC-Tos (3:1) e (4:1).	82
Tabela 2. 19 – Dados termogravimétricos obtidos a partir das curvas TGA/DTG para as azido celulosas produzidas do derivado MCC-Tos Otm.....	84
Tabela 2. 20 – Informações de RB e GS das amostras de MCC-Tos analisadas por RMN ¹³ C-CP/MAS.	86
Tabela 2. 21 – Planos cristalográficos e ângulos dos polimorfos da celulose Tipo I.	89
Tabela 2. 22 – Área superficial específica (S _{BET}), volume de poros cumulativo (V _P) e diâmetro de poros (d _P) obtidos pelas isotermas de adsorção e dessorção de N ₂	93
Tabela 3. 1 – Atribuições das principais bandas de absorção do espectro na região do infravermelho para as enzimas CalB e CalB-Prop.	103
Tabela 3. 2 – Equações de reta para o ajuste linear das absorbâncias por concentração de pNP, obtidas por UV-vis.	106

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%EI	porcentagem estimada de enzima incorporada
%IC	índice de cristalinidade
%S	porcentagem de enxofre
%p.m.	porcentagem de perda de massa
%rendimento	porcentagem de rendimento mássico
%resíduo	porcentagem de resíduo
AEE	atividade enzimática específica
CalB	lipase de <i>Candida antarctica</i> B
CalB-Prop	lipase de <i>Candida antarctica</i> B modificada com grupo propargil
CHNS	Análise Elementar de C, H, N e S
CNC	nanocristais de celulose (do inglês, “ <i>cellulose nanocrystals</i> ”)
CuAAC	cicloadição alcino/azida catalisada por cobre, do inglês “ <i>copper catalyzed alkyne/azide cycloaddition</i> ”
DMAc	dimetilacetamida
DRX	Difração de Raios-X
EDTA	etilenodiamina
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
GS	grau de substituição
LU	unidade de lipase (do inglês, “ <i>lipase unit</i> ”)
LiCl	cloreto de lítio
MCC	celulose microcristalina (do inglês, “ <i>microcrystalline cellulose</i> ”)
MCC-Az	azido celulose
MCC-Az I	azido celulose produzida a partir da MCC-Tos I (GS=1,51)
MCC-Az Otm	azido celulose produzida a partir da MCC-Tos Otm (GS=1,72)
MCC-Tos	tosilato de celulose
MCC-Tos I	tosilato de celulose produzido com tempo reacional de 144 h, temperatura de 30 °C e razão molar 7:1 (Tos:UAG)
MCC-Tos Otm	tosilato de celulose produzido nas condições otimizadas por planejamento experimental
MFC	celulose microfibrilada (do inglês, “ <i>microfibrillated cellulose</i> ”)
NaN ₃	azida de sódio
NFC	nanofibras de celulose (do inglês, “ <i>nanofibrillated cellulose</i> ”)

NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
propargil-NHS	propargil- <i>N</i> -hidroxisuccinimidil
ppm	partes por milhão
RB	razão das intensidades das bandas de absorbância por FTIR
RM	razão Molar
RMN ¹³ C-CP/MAS	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 no estado sólido (do inglês, “ <i>Solid-state Cross-Polarization Magic Angle Spinning Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance</i> ”)
SPAAC	do inglês “ <i>strain-promoted alkyne/azide cycloaddition</i> ”
T _{endset}	temperatura final extrapolada
TEMPO	2,2,6,6-tetrametil-piperidinil-1-oxil
TGA	Análise Termogravimétrica
T _{máx}	temperatura de degradação na taxa máxima de perda de massa
T _{onset}	temperatura inicial extrapolada do evento
Tos	cloreto de <i>p</i> -toluenossulfonila
UAG	unidade de anidroglicose
δ	deslocamento químico (em ppm)
Δ _f H°	entalpia padrão de formação
λ _{exc}	comprimento de onda de excitação

SUMÁRIO

<i>Capítulo 1 – Estudo de Derivados Celulósicos para Aplicações em Reações do Tipo “Click”</i> ..	21
1.1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
1.1.1 Síntese de Derivados Celulósicos	23
1.1.1.1 Produção do Tosilato de Celulose como Precursor de Outros Derivados Celulósicos	25
1.1.2 “Click-Chemistry”	28
1.1.3 Reação “click” CuAAC	30
1.1.4 Aplicações das reações “click-chemistry” para polissacarídeos	32
1.1.4.1 Utilização do Tosilato de Celulose como precursor da Azido Celulose	38
1.2 Utilização de Catalisadores Enzimáticos	39
1.2.1 Imobilização Enzimática	39
1.2.2 Imobilização Enzimática por Ligações Covalentes	41
1.2.3 Lipase de <i>Candida antarctica</i> B (CalB)	42
1.2 OBJETIVOS	44
<i>Capítulo 2 – Síntese do Tosilato de Celulose e do Azido Celulose para Emprego em Reação “click” do tipo CuAAC</i>	45
2.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	45
2.1.1 Materiais e Métodos	45
2.1.2 Síntese do Tosilato de Celulose (MCC-Tos) em Fase Heterogênea	45
2.1.3 Otimização da Síntese do Tosilato de Celulose Empregando Planejamento Experimental por Matriz Doehlert	46
2.1.4 Síntese da Azido Celulose (MCC-Az) a partir dos MCC-Tos e MCC-Tos Otm	48
2.1.5 Caracterização dos Derivados Celulósicos Sintetizados	48
2.1.5.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	48
2.1.5.2 Análise Termogravimétrica e Termogravimetria Derivada (TGA/DTG)	49
2.1.5.3 Análise Elementar e Cálculo do GS da tosilação	49

2.1.5.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 no estado sólido (RMN ^{13}C -CP/MAS)	50
2.1.5.5 Análise de Difração de Raios-X – DRX.....	50
2.1.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	51
2.1.5.7 Análises de Área Superficial Específica e Porosidade (ASAP)	51
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
2.2.1 Síntese do Tosilato de Celulose.....	52
2.2.1.1 Caracterização por FTIR do Tosilato de Celulose.....	52
2.2.1.2 Otimização da Síntese do Tosilato de Celulose Empregando Planejamento Experimental por Matriz Doehlert.....	57
2.2.1.3 Síntese do Tosilato de Celulose na Condição Otimizada pelo Planejamento Experimental por Matriz Doehlert.....	66
2.2.1.4 Determinação do GS por Análise Elementar.....	69
2.2.2 Síntese da Azido Celulose (MCC-Az).....	71
2.2.2.1 Caracterização por FTIR da MCC-Az.....	71
2.2.3 Análise Termogravimétrica e Termogravimetria Derivada (TGA/DTG)	76
2.2.3.1 Curvas TGA/DTG para o Tosilato de Celulose.....	77
2.2.3.3 Curvas TGA/DTG para a Azido Celulose.....	81
2.2.4 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no Estado Sólido (RMN ^{13}C -CP/MAS).....	85
2.2.5 Caracterizações por Difração de Raios-X (DRX)	88
2.2.6 Morfologia e Porosidade	90
2.2.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	90
2.2.6.2 Análises de Área Superficial Específica e Porosidade	93
2.3 CONCLUSÕES.....	94
<i>Capítulo 3 – Síntese da CalB Propargílica e Imobilização em Suporte de Azido Celulose pelo Emprego de Reação “click” do tipo CuAAC</i>	<i>96</i>
3.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	96

3.1.1 Materiais e Métodos	96
3.1.2 Síntese da CalB Modificada com Grupo Propargílico	96
3.1.3 Síntese do Bioconjugado MCC-CalB por reação CuAAC	97
3.1.4 Espectroscopia de Ultravioleta – UV-Vis	97
3.1.5 Espectroscopia de Fluorescência	98
3.1.6 Determinação das Atividades Enzimáticas	98
3.1.7 Cálculo da Porcentagem Estimada de Enzima Incorporada (%EI)	100
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
3.2.1 Caracterização por FTIR das Enzimas CalB e CalB-Prop	102
3.2.2 Determinação das Atividades Enzimáticas Específicas em diferentes pH.....	104
3.2.3 Determinação das Atividades Enzimáticas Específicas em Diferentes Temperaturas	107
3.2.4 Análises por UV-vis e Espectroscopia de Fluorescência para as enzimas CalB e CalB-Prop	109
3.2.5 Caracterização por FTIR do Bioconjugado MCC-CalB.....	112
3.2.6 Análises por UV-vis e Espectroscopia de Fluorescência para o Bioconjugado MCC-CalB	113
3.2.7 Determinação da Porcentagem Estimada de Enzima Incorporada.....	115
3.2.8 Determinação da Atividade Enzimática do Bioconjugado MCC-CalB	116
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
4.1 Trabalhos Futuros	119
5. REFERÊNCIAS	120
6. ANEXOS.....	134

Capítulo 1 – Estudo de Derivados Celulósicos para Aplicações em Reações do Tipo “Click”

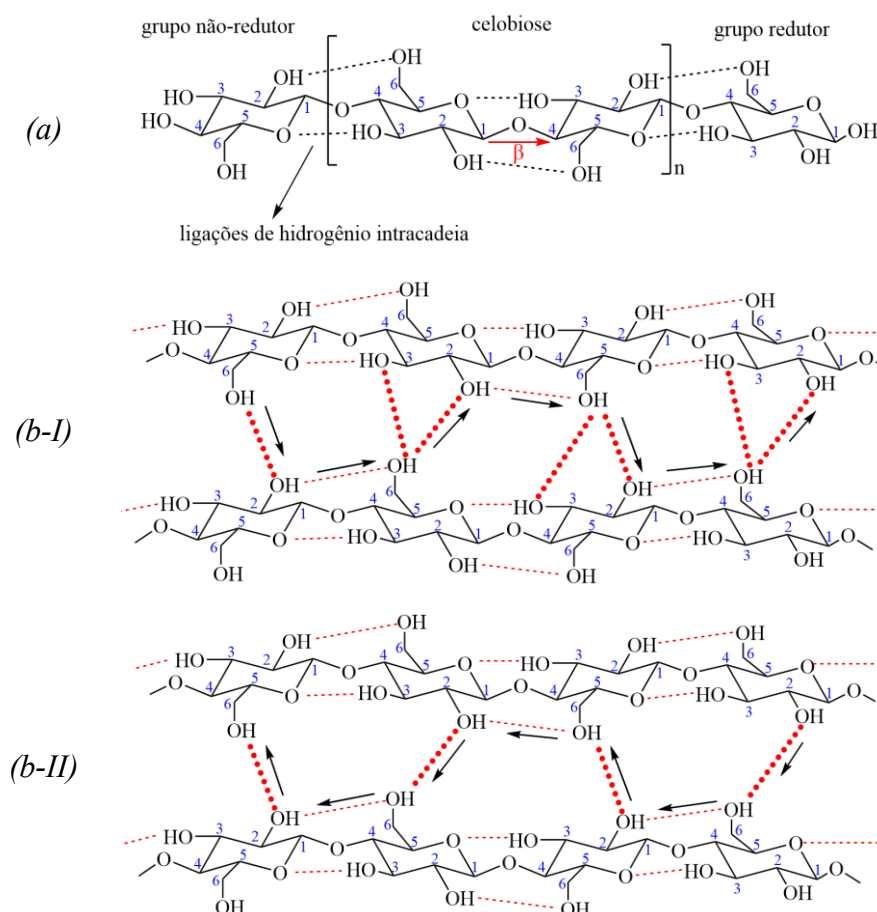
1.1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Dentre os polímeros naturais, a celulose se destaca como o mais abundante, podendo ser extraída a partir de uma ampla variedade de plantas, incluindo madeiras e resíduos agroindustriais, como casca do grão de soja, caroço de manga, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo e palha de milho (IORIS, 2021; MOREIRA, 2010). Estes últimos já tiveram seu potencial para extração de celulose bem estabelecido inclusive por um grupo de pesquisa parceiro, o Grupo de Reciclagem de Polímeros do IQ-UFU (CRUZ *et al.*, 2011; RODRIGUES FILHO *et al.*, 2011; SILVÉRIO *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2009). É possível obter a celulose também de algas, de tunicados (animais marinhos) e de microrganismos, como algumas espécies de bactérias. A bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, se destaca na produção da também chamada celulose bacteriana e é objeto de estudos dos grupos parceiros: Grupo de Química Medicinal e Medicina Regenerativa e do Grupo de Pesquisa em Biopolímeros e Biomateriais, ambos situados na UNIARA (Centro Universitário de Araraquara) (PINTO *et al.*, 2015).

Cada fonte de materiais celulósicos confere especificidades à celulose. A depender da fonte, a celulose pode apresentar diferentes graus de polimerização (tipicamente de 800–10 000 para o algodão e plantas fibrosas, como bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e bambu) (KLEMM *et al.*, 2005); pode ter a presença ou ausência de ligninas (a celulose bacteriana, por exemplo, não possui ligninas) (SWINGLER *et al.*, 2021); pode variar na presença e na quantidade de hemiceluloses. Portanto, as características e composições dos materiais celulósicos vão variar de acordo com a fonte da qual a celulose for extraída e encontrarão as mais diversas aplicações. Dentre elas, mas não limitadas a estas, estão: como filmes de barreira de transporte de gases; como filmes antimicrobianos; como filmes transparentes; displays flexíveis; implantes biomédicos; em aplicações farmacêuticas como sistemas de entrega de fármacos; membranas de separação em hemodiálise; polímeros eletroativos; entre outras (MOON *et al.*, 2011; PAIXÃO *et al.*, 2021; REIS *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2021; RODRIGUES FILHO *et al.*, 2011). Essas possibilidades de aplicações são alternativas viáveis para a geração de produtos de alto valor agregado a partir da biomassa de resíduos agroindustriais, produzidos em altíssima escala no mundo (estimado em 911 milhões de toneladas somente de resíduos advindos da agricultura, globalmente, em 2023 (SARAVANAN *et al.*, 2023), diminuindo a dependência de produtos oriundos do petróleo e seus derivados.

Dentre os fatores que tornam viáveis este amplo número de aplicações da celulose estão suas propriedades únicas como baixo custo de obtenção, renovabilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, com cadeias altamente lineares, alto módulo elástico e força específica (MOREIRA, 2010; NONGBE *et al.*, 2018; SILVÉRIO *et al.*, 2013). Essas propriedades em parte se devem à composição da sua unidade monomérica (a celobiose) que é formada pela ligação de duas moléculas de glicose através de ligações glicosídicas do tipo ligação β – 1,4 (apresentada na Figura 1.1a). A presença das hidroxilas nesta estrutura, conferem a este polímero uma alta superfície funcional e hidrofílica (TINGAUT; HAUERT; ZIMMERMANN, 2011). Estas hidroxilas podem formar ligações de hidrogênio tanto intra como intercadeia, como representadas na Figura 1.1b. por duas propostas (I e II) sugeridas por Nishiyama e colaboradores (2008), em que a sequência de átomos doadores-aceptores-doadores é indicada pelas setas (NISHIYAMA *et al.*, 2008).

Figura 1. 1 – (a) Representação da cadeia da celulose e de sua unidade monomérica, a celobiose; (b) representação das ligações de hidrogênio inter (tracejado grosso) e intracadeia (tracejado fino) das unidades de glicose em que a seta indica a direção do doador-aceptor-doador de acordo com as propostas I e II.



Fonte: adaptado das referências (MOON *et al.*, 2011; NISHIYAMA *et al.*, 2008).

Porém, estas propriedades inerentes desta estrutura altamente linear e repleta de ligações de hidrogênio inter e intracadeia tornam a celulose insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos, se constituindo em um desafio para reações que visem sua funcionalização (BIYOGO *et al.*, 2020; KLEMM *et al.*, 2005).

1.1.1 Síntese de Derivados Celulósicos

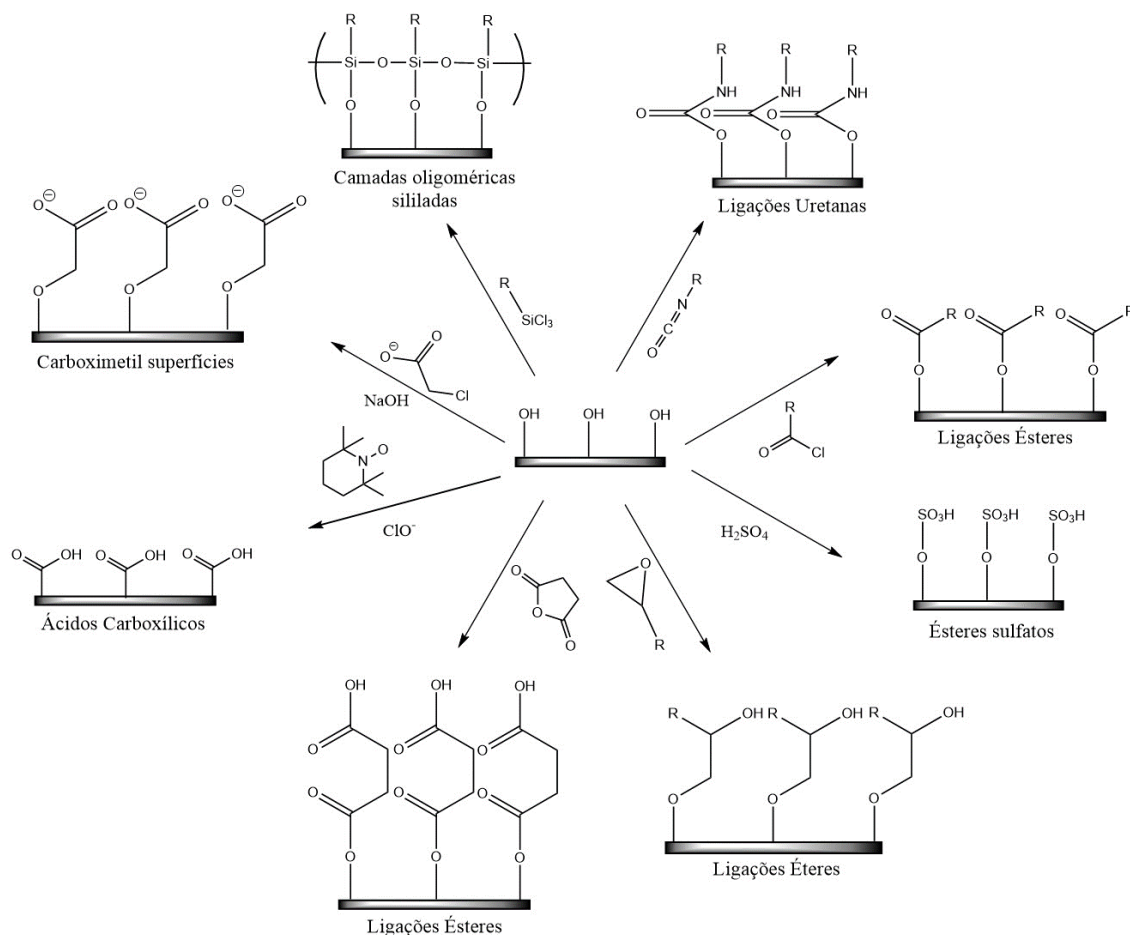
Para modificação química da celulose duas rotas principais podem ser utilizadas: a rota em fase homogênea e a rota em fase heterogênea. Na rota em fase homogênea, a celulose é solubilizada e se encontra na mesma fase que os reagentes. Já na rota em fase heterogênea, a celulose permanece em estado sólido e os reagentes em fase líquida, o que permite a manutenção das estruturas originais das fibras celulósicas (NONGBE *et al.*, 2018). As reações de funcionalização produzem os chamados derivados celulósicos e são uma alternativa para ampliar ainda mais o uso da celulose. Estas modificações químicas são reações que ocorrem nos grupos hidroxila da celulose e permitem alterar suas propriedades mecânicas como resistência e flexibilidade, além de poder diminuir a hidrofobicidade do material (MOON *et al.*, 2011).

Por conseguinte, a modificação química da celulose tem papel relevante no desenvolvimento da química sustentável, uma vez que muitos dos derivados produzidos tem conseguido substituir, em certos níveis, materiais produzidos a partir de derivados do petróleo, em questão de melhora de capacidades de formação de filme, baixos coeficientes de expansão térmica, biodegradabilidade, entre outros (JIANG; NGAI, 2022; SHAGHALEH; XU; WANG, 2018). É também, uma rota versátil para produção de materiais com as mais diversas propriedades e estruturas devido à funcionalidade química das hidroxilas que, nas abordagens tradicionais e mais extensivamente investigadas, passam por reações de esterificação e eterificação para produção de alguns tipos de derivados celulósicos (FILPPONEN; ARGYROPOULOS, 2010; ZHAO *et al.*, 2010).

Dentre as reações de funcionalização tradicionais da celulose podem ser produzidos vários derivados celulósicos, dos quais se destacam: a nitrocelulose; a trimetilsilil-celulose; o sulfato de celulose; o acetato de celulose; a hidroxipropilmetilcelulose; a metilcelulose; o acetato butirato de celulose; a carboximetilcelulose; a aminocelulose; o tosilato de celulose, entre outros, produzidos a partir de várias rotas de reações (Figura 1.2) (KLEMM *et al.*, 2005; MOON *et al.*, 2011).

Porém, estas reações de funcionalização frequentemente exigem condições reacionais de temperaturas elevadas (podendo passar de 80 °C), tempo prolongado de reação (algumas podem levar dias), ausência de oxigênio, uso de quantidade relativamente alta de solventes orgânicos, entre outros fatores, que diminuem o apelo sustentável dos derivados celulósicos. Além destes, deve ser considerado a existência de diferentes reatividades entre as hidroxilas presentes na estrutura celulósica que levam a formação de um derivado em certo grau de substituição, preferencialmente (KLEMM *et al.*, 2005; KLEMM; PHILIP; *et al.*, 1998; MOON *et al.*, 2011; RAHN *et al.*, 1996).

Figura 1. 2 – Modificações químicas mais comuns da celulose (do topo superior direito) por reações com: isocianatos; haletos de ácidos carboxílicos; ácido sulfúrico; epóxidos; anidridos de ácidos; oxidação do hipoclorito mediada por radical 2,2,6,6-tetrametil-piperidinil-1-oxil (TEMPO); ácidos acéticos halogenados; e clorosilanos.



Fonte: adaptado da referência (MOON *et al.*, 2011).

Sendo assim, a hidroxila primária do C6 (altamente acessível) e a hidroxila secundária do C2 (próxima da função acetal) se destacam como as mais reativas, nesta ordem, e, portanto, dificultam a produção de um derivado trissubstituído (com todos três hidrogênios das hidroxilas

de uma unidade glicosídica substituídas por grupos de interesse) que irá requerer condições experimentais apropriadas, normalmente com excesso de reagente, para que seja garantida a reação completa. Uma técnica muito empregada para auxiliar no controle do grau de substituição na síntese de um derivado celulósico é a utilização de grupos protetores, também denominada síntese regioseletiva. Estes grupos recebem esta denominação por se ligarem aos grupos hidroxilas de maior reatividade em uma determinada reação e, assim, favorecem uma reação de substituição com o grupo de interesse nestas hidroxilas. Recebem esta denominação também, por compeliem um grupo substituinte de interesse a ser inserido nas hidroxilas menos reativas, uma vez que as hidroxilas mais reativas estão ligadas a esses grupos protetores (HAMDAOUI *et al.*, 2020; KLEMM *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2010).

1.1.1.1 Produção do Tosilato de Celulose como Precursor de Outros Derivados Celulósicos

A síntese de ésteres de ácidos organossulfônicos (sulfonatos) ocorre por esterificação dos grupos hidroxila da celulose com os correspondentes cloretos ou anidridos de ácido sulfônico. Esta reação é uma maneira eficaz de se produzir derivados celulósicos que possam ser utilizados como precursores de outros derivados. Os sulfonatos de celulose possuem grupos que podem agir tanto como grupos protetores como bons grupos de saída, a depender das reações utilizadas, e criam viabilidade para síntese de uma ampla gama de produtos substituídos, que não estariam disponíveis através dos métodos convencionais de “química O” da celulose (ou seja, ataque do átomo O doador dos grupos hidroxila aos eletrófilos) (GERICKE *et al.*, 2012). Além disso, os próprios sulfonatos de celulose também são materiais com propriedades interessantes com várias possibilidades de aplicações. Os derivados sulfonatos de celulose mais frequentemente sintetizados e utilizados são: os *p*-toluenossulfonatos (tosilatos); seguidos pelos metanossulfonatos (mesilatos); os *p*-bromobenzenossulfonatos (brosilatos); e trifluorometanossulfonatos (triflatos) (KLEMM *et al.*, 2005; MCCORMICK; DAWSEY; NEWMAN, 1990; RAHN *et al.*, 1996).

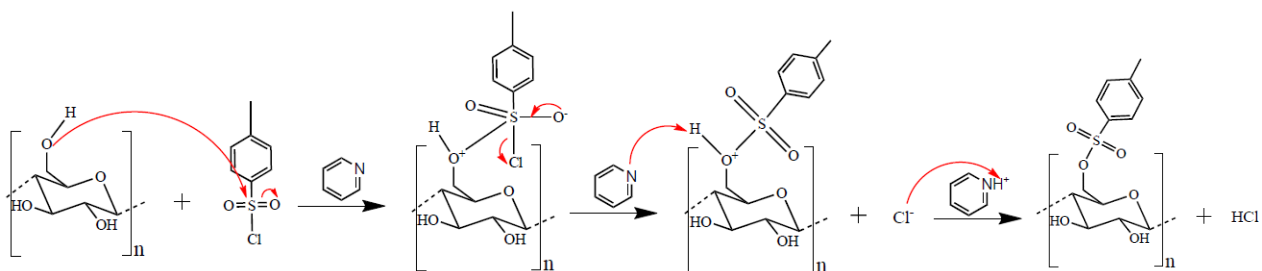
Dentre estes, o éster celulósico do ácido *p*-toluenossulfônico, chamado tosilato de celulose, se destaca como um interessante intermediário na química da celulose, uma vez que seu grupo toсила é um excelente grupo abandonador. Quando esse grupo é incorporado à estrutura da celulose, ele possibilita a realização de reações S_N2 e, conseqüentemente, a substituição do grupo toсила por outro ligante qualquer contendo um átomo nucleofílico (por exemplo, haletos, azidas ou aminas) produzindo os derivados deoxicelulose correspondentes (GERICKE *et al.*, 2012; GRANSTRÖM *et al.*, 2008; HAMDAOUI *et al.*, 2020; PEREIRA,

2019). Também possui um grau de substituição (GS) bem definido e controlado pela razão molar entre agente derivatizante e unidade de anidroglicose (UAG) (LIEBERT; HANSCH; HEINZE, 2006).

O tosilato de celulose pode ser preparado em fase homogênea, pela dissolução da celulose em meio de dimetilacetamida/cloreto de lítio (DMAc/LiCl) e subsequente reação empregando-se cloreto de *p*-toluenossulfonila, como agente esterificante, apresentando curto tempo de reação (tipicamente 24 h) e com temperaturas baixas temperaturas reacionais requeridas (tipicamente 2 a 10 °C), com elevados GS (até 2,3) (KLEMM *et al.*, 2005). Porém, como o mecanismo dessa reação em presença de DMAc é do tipo Vilsmeier-Haack, há exigência da utilização de bases orgânicas fortes como a trietilamina ($pK_a = 10,65$) para que seja garantida a formação de espécies imina tosiladas. Estas são atacadas pelas hidroxilas da celulose, formando o tosilato de celulose. Bases orgânicas mais fracas como a piridina ($pK_a = 5,25$) ou *N,N*-dimetilaniolina ($pK_a = 5,15$) formam um intermediário imínio que favorece a formação de subprodutos como o deoxicloro celulose (FERREIRA, 2018; MCCORMICK; DAWSEY; NEWMAN, 1990; PETZOLD-WELCKE; MICHAELIS; HEINZE, 2009).

Em fase heterogênea, a síntese do tosilato de celulose pode manter a cristalinidade e a estrutura original fibrosa da celulose, porém requer algumas condições reacionais específicas. A celulose precisa ser pré-ativada pela adição de um agente capaz de diminuir as interações intracadeias, como a DMAc, e mantida em meio desidratante para evitar a absorção de água. Além disso, durante a reação, a utilização de um agente de intumescimento, como a piridina, maiores razões molares (RM) de cloreto de *p*-toluenossulfonila:unidade de anidroglicose (Tos:UAG) e maiores tempo reacionais (mais de 74 h), são necessárias para garantir GS comparáveis às reações em fase homogênea (HEUSER; HEATH; SHOCKLEY, 1950; MCCORMICK; DAWSEY; NEWMAN, 1990). Um esquema do mecanismo de reação de tosilatação da celulose em fase heterogênea está representado na Figura 1.3.

Figura 1. 3 – Mecanismo reacional da síntese do tosilato de celulose em fase heterogênea.

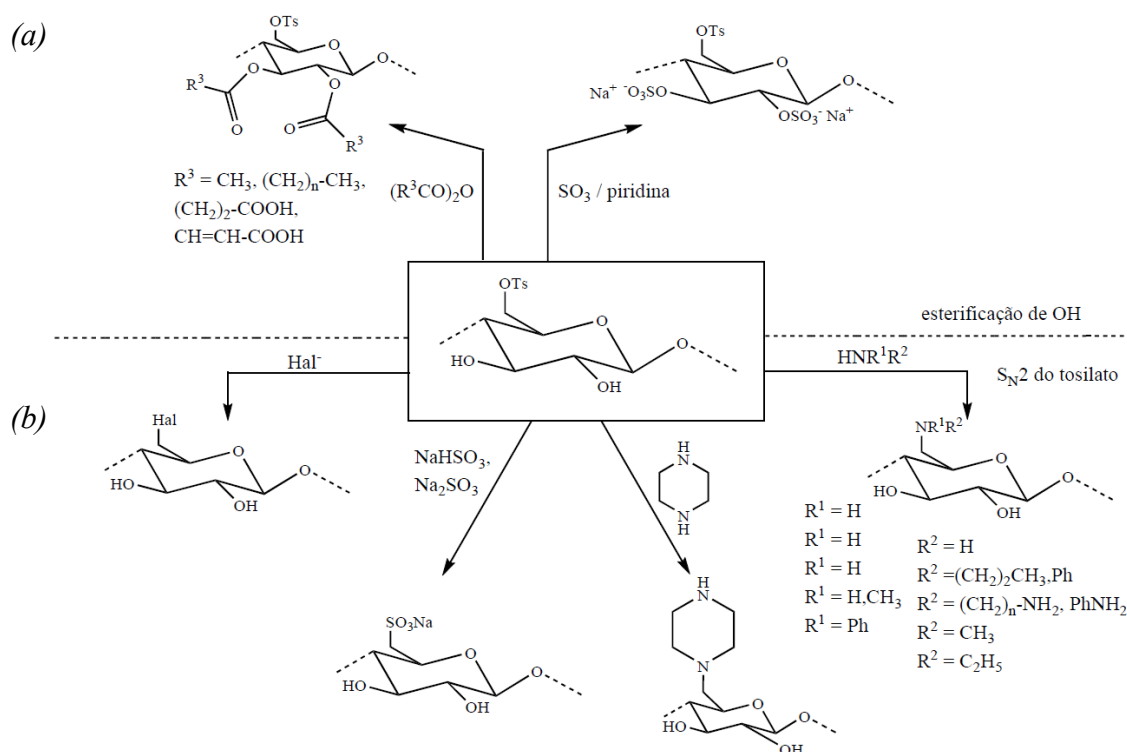


Fonte: adaptado da referência (GERICKE *et al.*, 2012).

A reação de tosilação da celulose não é estritamente regioseletiva, uma vez que esta tem maiores taxas de esterificação nas hidroxilas do C6, em relação às do C2 e C3, seguindo a ordem de reatividade das hidroxilas da celulose. Em condições reacionais de fase heterogênea, as velocidades relativas de reação são tais (5,8 vezes mais para C6 do que para C2) que não é possível substituir hidroxilas primárias por grupos toсила sem substituir também um certo número de grupos hidroxila secundários. Além disso, parece não haver uma diferença significativa na velocidade de reação entre os dois grupos hidroxila secundários (C2 e C3 na unidade de anidroglicose) (HEUSER; HEATH; SHOCKLEY, 1950).

A Figura 1.4 apresenta alguns exemplos de utilização do tosilato de celulose como precursor de alguns derivados celulósicos, em (a) como grupo protetor pela inviabilização da inserção de outros grupos na posição C6 da celulose, e (b) como grupo abandonador, para inserção de grupos de interesse na posição C6.

Figura 1. 4 – Reações de derivatização da celulose a partir do tosilato de celulose em (a) o grupo toсила agindo como grupo protetor e (b) como grupo abandonador.



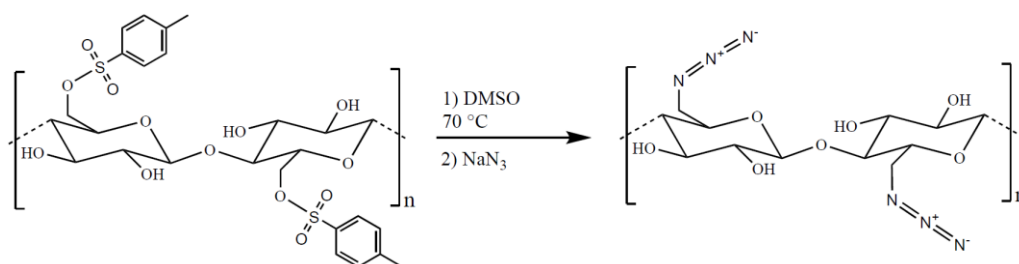
Fonte: adaptado da referência (KLEMM *et al.*, 2005).

Ainda sobre a substituição nucleofílica em tosilatos de celulose, Granström e colaboradores (2008) observaram que, para tosilatos com GS maior que um, há limitação estérica que favorece a substituição nucleofílica no C6 em detrimento dos grupos toсила nas

posições C2 e C3. A extensão desta limitação também dependerá da nucleofilicidade do reagente utilizado (GERICKE *et al.*, 2012; GRANSTRÖM *et al.*, 2008).

Neste trabalho o tosilato de celulose foi utilizado como portador de um bom grupo abandonador, de forma a agir como um precursor para inserção do grupo nucleofílico da azida e consequente formação da azido celulose. Um esquema da reação de formação da azido celulose a partir do tosilato de celulose está representado na Figura 1.5.

Figura 1. 5 – Esquema da reação de formação da azido celulose utilizando como precursor o tosilato de celulose, ambos com GS = 1.



Fonte: adaptado da referência (LIEBERT; HANSCH; HEINZE, 2006).

1.1.2 “Click-Chemistry”

Dentro do contexto das modificações da celulose e na linha de produção de uma ampla variedade de derivados celulósicos com propriedades mecânicas e físicas adequadas às demandas atuais, uma alternativa aos métodos tradicionais de modificação que se têm desenvolvido bastante é o conceito de “click-chemistry”. Reações desse tipo se destacam como ferramentas viáveis para produção de novos derivados e produtos à base de celulose, com funcionalidades desejadas e em condições reacionais mais brandas (BINDER; SACHSENHOFER, 2008; TINGAUT; HAUERT; ZIMMERMANN, 2011; XU; WU; DONG, 2020).

O conceito de “click-chemistry” foi criado e desenvolvido por Kolb e colaboradores (2001) e pode ser definido como um grupo de reações modulares, de amplo escopo, que alcançam altos rendimentos, geram subprodutos seguros ambientalmente e que podem ser facilmente removidos, além de poderem ser estereoespecíficos (mas não necessariamente enantiosseletivos) (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001). As características requeridas para a classificação de uma reação como “click-chemistry” incluem ainda condições de reação simples (idealmente, o processo não deve ser sensível à presença de oxigênio ou água), reagentes e substratos prontamente disponíveis, ausência de uso de solventes ou, se ainda

necessário, que seja um solvente menos tóxico (como a água) ou facilmente removível, e isolamento simples do produto (HEIN; LIU; WANG, 2008; ROSTOVTSEV *et al.*, 2002). A purificação, se necessário, não deve exigir métodos cromatográficos, mas processos como cristalização ou destilação. O produto deve, ainda, ser estável sob condições fisiológicas (HEIN; LIU; WANG, 2008). Tais reações também prosseguem rapidamente até a conclusão e tendem a ser altamente seletivos para um único produto (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001).

Originalmente, as reações “*click-chemistry*” foram planejadas para ajudar a simplificar e acelerar o desenvolvimento de novos medicamentos pela utilização de reações confiáveis e escalonáveis. Sua abordagem consiste, basicamente, em mimetizar as condições em que a natureza cria ligações intermoleculares através da formação de ligações carbono-heteroátomo e heteroátomo-heteroátomo, como na formação dos metabólitos primários, por exemplo (BARROW *et al.*, 2019; KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001).

Para a formação das ligações carbono-heteroátomo, as primeiras reações “*click-chemistry*” se valeram de alterações/adaptações de algumas classes de transformações químicas já reconhecidas. Entre elas estão:

- Reações de cicloadição de espécies insaturadas, especialmente reações de cicloadição 1,3-dipolar, mas também as reações do tipo Diels-Alder;
- Química de substituição nucleofílica, especialmente as reações de abertura de anel de eletrófilos heterocíclicos como os epóxidos, aziridinas, íons aziridínios e íons episulfônio;
- Química carbonílica do tipo “não-aldol”, como as de formação da ureia, tioureia, aromáticos heterocíclicos, éteres de oxima, hidrazonas e amidas;
- Adições a ligações múltiplas carbono-carbono, particularmente casos oxidativos como epoxidação, di-hidroxilação, aziridinação e adição de haleto de sulfenila, mas também adições de Michael de reagentes Nu-H (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001).

Assim, dentre as principais reações do tipo “*click-chemistry*” podem ser citadas: CuAAC (cicloadição alcino/azida catalisada por cobre, do inglês “*copper catalyzed alkyne/azide cycloaddition*”); cicloadição livre de metal [3+2]; SPAAC (do inglês, “*strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*”); reações Diels-Alder; “*click*” oxima; reações de adição de Michael; reações Tiol-Michael; reações Tiol-Eno; reações Tiol-Ino; reações de metátese cruzada em olefinas; e reações de troca enxofre(VI)-fluoreto (CASTRO; RODRÍGUEZ; ALBERICIO, 2016; DONG *et al.*, 2018; MENG; EDGAR, 2016).

Com todas estas características atrativas, as reações “*click-chemistry*” não se limitaram ao campo farmacêutico, mas expandiram-se para basicamente cada canto das ciências moleculares (BARROW *et al.*, 2019). Aplicações na ciência de polímeros, especialmente polissacarídeos como a celulose, quitina, alginato, dextranas, ácido hialurônico, entre outros, permitiram não só contornar as limitações das rotas sintéticas convencionais, mas também sintetizar moléculas com diversos grupos funcionais. Além disso, pós-funcionalização de polímeros, produção de compósitos, sistemas carreadores de fármacos, membranas hidrofóbicas, suporte para imobilização de enzimas com aplicação em catálise e/ou sensores biológicos, modulações de ligações inter cruzadas entre polímeros, estão também entre as muitas aplicações que as reações “*click*” se destacam (HEIN; LIU; WANG, 2008; LIEBERT; HANSCH; HEINZE, 2006; MENG; EDGAR, 2016; NAVARRO *et al.*, 2015; NEGISHI *et al.*, 2011).

1.1.3 Reação “*click*” CuAAC

Dentre as reações “*click-chemistry*”, a reação “*click*” CuAAC está entre os métodos mais eficazes de síntese e tem recebido muita atenção em diversas áreas da química. Esta reação é definida como uma reação do tipo Huisgen 1,3-dipolar de cicloadição catalisada por Cu(I) e foi desenvolvida pioneiramente por Sharpless e colaboradores (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001). Nesta reação, a utilização dos grupos reacionais azida e alcino, que dão nome a esta reação e são estáveis a uma ampla variedade de grupos funcionais, solventes e aditivos, permite à CuAAC a junção de dois blocos ortogonais em ligação sobre condições reacionais brandas para formação de anéis triazólicos (ATILLA; KISKAN; YAGCI, 2016). Devido à natureza altamente energética desses dois grupos funcionais, as reações CuAAC normalmente procedem muito rapidamente e apresentam uma seletividade sem precedentes, mesmo em meio reacionais complexos (XU; WU; DONG, 2020).

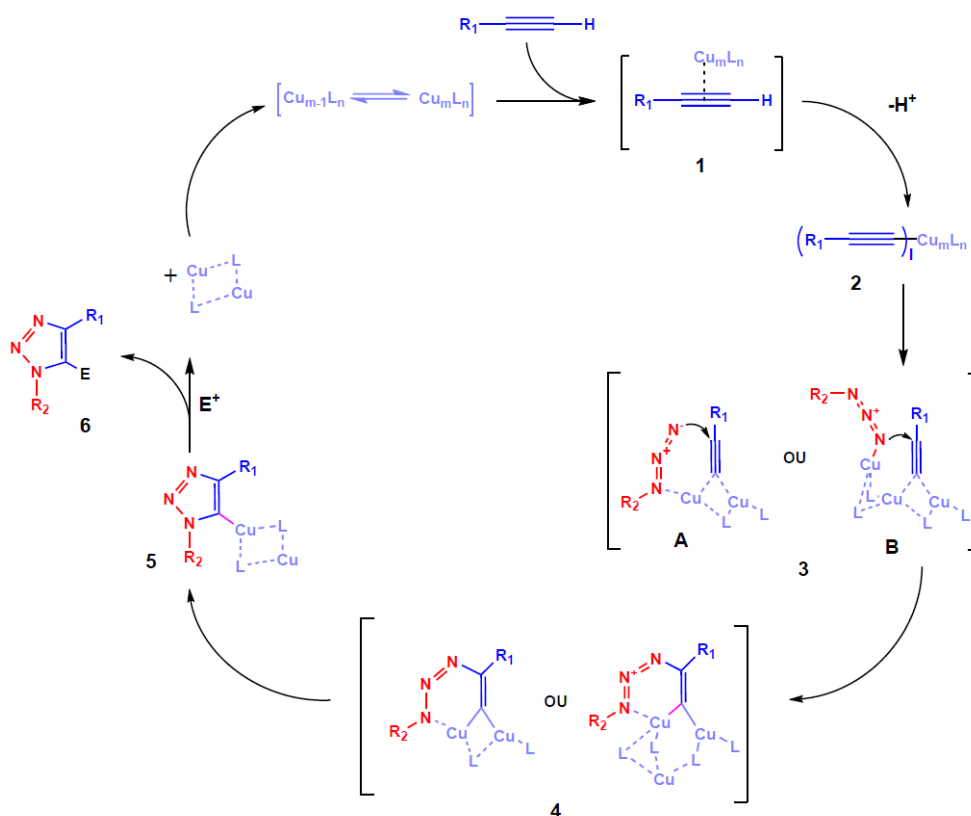
Sua natureza altamente energética, por sua vez, se deve à reação de ligação azida-alcino ser muito exotérmica, apresentando uma variação de entalpia padrão de formação ($\Delta_f H^\circ$) entre -50 e -65 kcal mol⁻¹. Porém, a alta barreira proporcionada pela energia de ativação (cerca de 25 kcal mol⁻¹ para a reação da metil azida e propino, por exemplo) resulta em uma velocidade de reação extremamente baixa e a reagentes inativados. Como preconizado pela equação de Arrhenius (Equação 1), nestas condições, um aumento na temperatura não alteraria consideravelmente a velocidade da reação, devido ao valor relativamente elevado da E_a . Além disso, como os níveis de energia dos orbitais HOMO–LUMO para ambos azida e alcino são de

similar magnitude, uma mistura de regioisômeros 1,2,3-triazol é produzido sob condições de elevada temperatura (COURA, 2015; HEIN; FOKIN, 2010).

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}} \quad \text{Equação (1)}$$

A utilização de cobre como catalisador, altera dramaticamente o mecanismo e o produto da reação, convertendo-o em uma sequência discreta de passos que culminam na formação preferencial de um único produto: o anel 1,4-triazólico. O mecanismo atualmente aceito para a reação “click” CuAAC está representado na Figura 1.6 (HEIN; FOKIN, 2010; NEUMANN *et al.*, 2019).

Figura 1. 6 – Detalhes do mecanismo da reação “click” CuAAC atualmente aceita.



Fonte: adaptado das referências (MELDAL; TORNØE, 2008; NEUMANN *et al.*, 2019).

Os detalhes do mecanismo de reação CuAAC da Figura 1.6, são descritos aqui: (1) inicialmente é formado um π -complexo entre o Cu(I) e o substrato alcino; (2) abaixando o valor de pKa do acetileno a 9,8 e favorecendo a formação do Cu(I)-acetileno mesmo na ausência de uma base; em seguida, (3) a formação de um complexo dinuclear/trinuclear com o grupo azida coordenado leva à pré-orientação dos grupos funcionais reativos; (4) formando um anel de seis

membros pelo ataque nucleofílico da azida, e introduzindo a primeira ligação covalente C-N; com a formação da segunda ligação C-N, o produto 1,2,3-triazol desejado é formado (5); que por sua vez gera o exclusivo 1,4-regioisômero após anexação do eletrófilo (6) (MELDAL; TORNØE, 2008; NEUMANN *et al.*, 2019).

Esta reação CuAAC, quando comparada ao processo térmico, aumenta em um fator de 10^7 a velocidade da reação, tornando-a rápida em baixas temperaturas (25 a 0 °C). Outras vantagens apresentadas pela reação CuAAC incluem alta regiosseletividade; não é afetada por impedimento estérico ou propriedades eletrônicas das moléculas ligadas aos grupos azida e alcino; pode ser realizada em solventes apróticos e próticos, como a água; não são afetadas por muitos grupos funcionais orgânicos ou inorgânicos, eliminando a necessidade de química de grupos protetores (COURA, 2015; NEUMANN *et al.*, 2020).

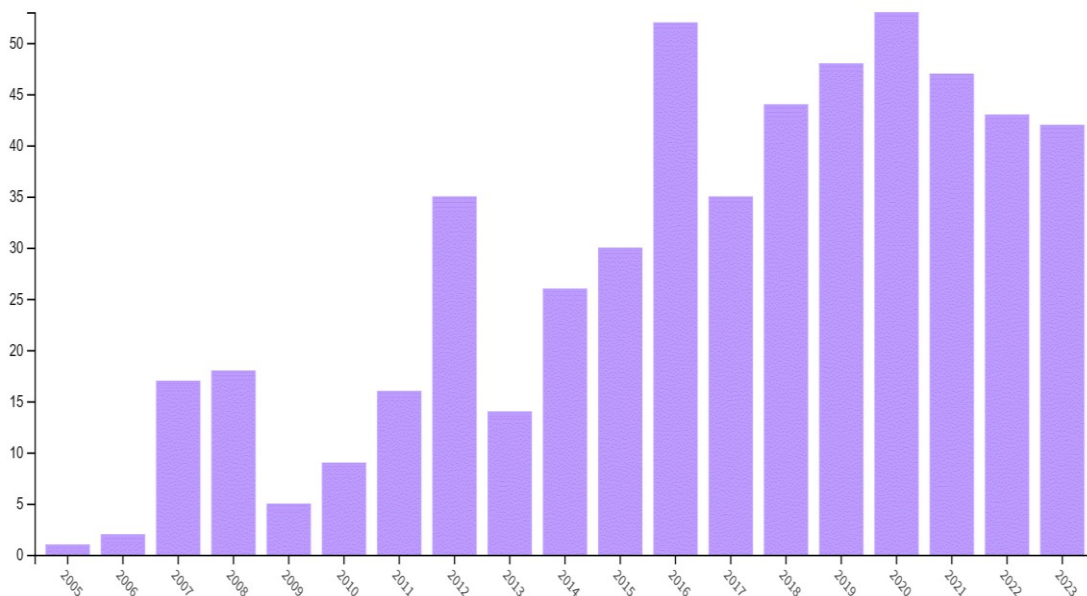
Além das vantagens mencionadas, o anel heterocíclico 1,2,3-triazólico apresenta alta estabilidade química (inerte a muitas condições hidrolíticas, oxidantes e redutivas, mesmo a altas temperaturas), forte momento dipolo, característica aromática e capacidade de aceitar ligações de hidrogênio. Portanto, ela pode interagir de diversas formas com moléculas biológicas, e também servir como um substituinte da ligação amida em algumas circunstâncias (HEIN; FOKIN, 2010). Assim, estas reações abrem novos horizontes para a síntese modular em praticamente qualquer meio reacional com grande confiabilidade (XU; WU; DONG, 2020).

Dentre suas aplicações, mas não limitadas às descritas, incluem-se: aplicação extremamente eficiente para formação de bioconjugados (sistemas de polímeros ligados a proteínas/enzimas), como para instalação de sondas para proteínas de interesse; nas ciências de materiais, na pós-modificação de superfícies e cadeias poliméricas, funcionalização polimérica e junção de dois blocos para formar um polímero em blocos. Entretanto, no que se refere à química polimérica convencional, um fator limitante da aplicação das reações CuAAC é a disponibilidade de grupos azida e/ou alcinos. Esta limitação, porém, é facilmente contornada pela adição de etapas prévias de modificação dos polímeros, ou de monômeros (antes das reações de polimerização) para inserção dos grupos azida ou alcinos (XU; WU; DONG, 2020).

1.1.4 Aplicações das reações “*click-chemistry*” para polissacarídeos

Inúmeros autores já descobriram as vantagens das reações “*click*” para aplicação em polissacarídeos, especialmente a celulose e seus derivados, conforme pode ser visto na Figura 1.7, por uma busca na plataforma WebScience de publicações que utilizaram as palavras-chave “*Cellulose click-chemistry*”.

Figura 1. 7 – Total de publicações na plataforma WebScience por ano utilizando como palavras-chave "Cellulose Click-chemistry".



Fonte: "Cellulose click-chemistry". Acesso em: 26 de novembro de 2023. Disponível em: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/analyze-results/de477c15-7685-4c1c-b42e-ad8ee0b5cffc-b7ef7454>.

Nota-se que só levaram quatro anos desde as definições e fundamentos das reações "*click chemistry*", em 2001, para que surgissem os primeiros trabalhos com aplicações voltadas à celulose. Desde então, o interesse pela utilização dessas rotas sintéticas inovadoras só aumentou, publicando-se uma média de 40 artigos por ano nos últimos seis anos (Figura 1.7).

Alguns exemplos dos trabalhos nessa área que podem ser citados são: a amino funcionalização das nanofibras de celulose (NFC) utilizando a reação "*click*" CuAAC em condições aquosas pela eterificação da 1-azido-2,3-epoxipropano em mistura de solução aquosa alcalina/isopropanol a temperatura ambiente (PAHIMANOLIS *et al.*, 2011); a obtenção de fibras de celulose alquiladas (ACFs) (DING *et al.*, 2017); a biofuncionalização das nanofibras de acetato de celulose por reação SuFEx (TINGAUT; HAUERT; ZIMMERMANN, 2011); formação de nanomateriais "*nanoplatelet gel like*" a partir de nanocristais de celulose (CNC) via radical 2,2,6,6-tetrametil-piperidinil-1-oxil (TEMPO)-mediada oxidação e reação "*click*" CuAAC (FILPPONEN; ARGYROPOULOS, 2010); síntese de dendrímeros, filmes finos, hidrogéis, polímeros com ligações cruzadas e cápsulas para liberação de fármacos funcionalizadas por reação "*click*" do tipo Tiol-Eno (TINGAUT; HAUERT; ZIMMERMANN, 2011). Tanto esta singela lista, como a Tabela 1.1, tem como objetivo citar alguns trabalho que estão mais próximos com a proposta em desenvolvimento neste trabalho.

Tabela 1. 1 – Exemplos de alguns trabalhos utilizando as reações “click” para modificação da celulose.

Fonte de Celulose	Rota	Tipo de “Click”	Observações	Referência
Celulose microcristalina (MCC)	Homogênea	CuAAC	Uma das primeiras sínteses por CuAAC realizada. Azido celulose foi ligada a várias moléculas pequenas contendo alcinos.	(LIEBERT; HANSCH; HEINZE, 2006)
MCC	Heterogênea	CuAAC	Inseriu grupos alcinos na MCC por reação com ácido undecinoico	(KROUIT; BRAS; BELGACEM, 2008)
Tecidos de algodão (< 90% celulose)	Heterogênea	CuAAC	Tecido foi reagido com trifetilfosfina, tetrabrometo de carbono e, após aquecimento, adição de azida sódica para reação com uma porfirina acetilênica de efeito bactericida.	(RINGOT <i>et al.</i> , 2009)
MCC	Homogênea	CuAAC	Azido-celulose (produzida a partir do tosílato de celulose) foi utilizada para ligação cruzada com poli(N-isopropilacrilamida) para formar um hidrogel termossensível.	(ZHANG <i>et al.</i> , 2009)
Nanocristais de celulose (CNC)	Homogênea	CuAAC	Precusores foram produzidos a partir de TEMPO-oxidação das CNCs para depois haver inserção dos grupos azida e alcino, em materiais distintos.	(FILPPONEN; ARGYROPOULOS, 2010)
Nanofibras de celulose (NFC)	Heterogênea	CuAAC	Produziu azido celulose por reação com azida epóxidos em temp. ambiente, por 24 h e ligou a moléculas contendo alcinos.	(PAHIMANOLIS <i>et al.</i> , 2011)
Microfibras de celulose (MFC)	Heterogênea	Tiol-Eno	1ª vez que utilizaram alcóxi-silanos com fotoquímica. Produziram celulose com grupos terminais alcenos.	(TINGAUT; HAUERT; ZIMMERMANN, 2011)

MCC	Homogênea	CuAAC	Produziu azido celulose a partir da Br-Celulose e ligou com vários oligossacarídeos alcino-terminais.	(NEGISHI <i>et al.</i> , 2011)
CNC	Heterogênea	CuAAC	Azido-Celulose (produzida do tosilato de celulose) foi reagida com uma alcino porfirínico para ação fotobactericida.	(FEESE <i>et al.</i> , 2011)
Celulose extraída do bambu	Homogênea	CuAAC	Sintetizou a propargil celulose (celulose terminada com alcino) e fez a reação “click” para ligá-la a uma quitosana azida funcionalizada por reação com o ácido 4-azidobenzóico.	(PENG <i>et al.</i> , 2012)
MCC	Homogênea	CuAAC	Produziu ligações cruzadas entre cadeias celulósicas através da reação “click” entre azido-celulose e propargil celulose.	(PIERRE-ANTOINE; FRANÇOIS; RACHIDA, 2012)
CNC	Heterogênea	CuAAC	Fez a reação com micelas de β -caseína contendo grupos acetilenos para ligação à azido-CNC.	(KARAASLAN; GAO; KADLA, 2013)
CNC	Heterogênea	Tiol-Eno	O grupo alceno foi introduzido pela reação da CNC com o 10-undecenoíla. Reação usou lâmpada UV em 350 nm para promover a ligação com o grupo tiol de interesse.	(ROSILO <i>et al.</i> , 2013)
NFC	Heterogênea	Tiol-Eno	Produziu celulose com alceno terminal por inserção de grupo maleimida (porém, nesta etapa ocorre uma reação Diels-Alder), para ligação covalente com o grupo tiol da sonda fluorescente 7-mercaptop-4-metilcoumarina.	(NAVARRO <i>et al.</i> , 2015)
CNC	Heterogênea	CuAAC	Substituição de mais de 80% dos grupos OH por alcinos. Usou como reagente o anidrido butanóico 4-oxo-4-(prop-2-in-1-iloxi) (sintetizado previamente pelo grupo de pesquisa).	(CHEN, Jun <i>et al.</i> , 2015)

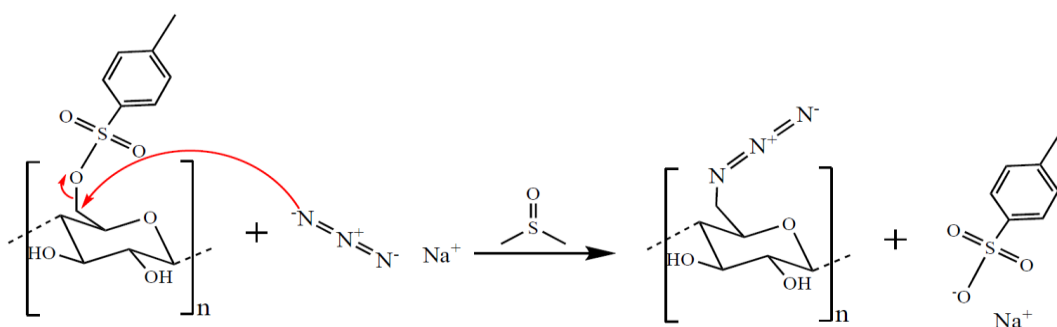
Celulose bacteriana	Heterogênea	CuAAC	Usa reagentes silanólicos para poder reagir diretamente com a celulose bacteriana sem necessidade de secá-la previamente e, assim, adicionar o grupo azida.	(HETTEGGER <i>et al.</i> , 2015)
CNC	Heterogênea	CuAAC	Azido-Celulose (produzida do tosilato de celulose) foi utilizada para acoplar moléculas com ação antitumoral.	(COURA, 2015)
CNC	Heterogênea	CuAAC	Produziu azido-celulose (a partir do precursor CNCs-Br) para reagir com policaprolactona diol modificada para conter o grupo alcino.	(ZHOU <i>et al.</i> , 2018)
Celulose do papel	Heterogênea	CuAAC	Produziu azido-celulose (a partir do tosilato de celulose) para hidrofobização da superfície do papel por ligação de moléculas de colesterol.	(NONGBE <i>et al.</i> , 2018)
CNC	Heterogênea	Tiol-Eno	Reagiu celulose com anidrido metacrílico para inserção do grupo metacrilato e ligou vários grupos contendo tióis para aumento da hidrofobicidade do material.	(AALBERS <i>et al.</i> , 2019)
Fibras de celulose	Heterogênea	CuAAC e abertura de anel epóxi	Faz modificação das fibras com azida (utilizando o tosilato de celulose como precursor) e insere epóxi contendo grupos alcinos.	(SUN <i>et al.</i> , 2020)
CNC	Heterogênea	Tiol-Eno	Utiliza como reagente o ácido 4-pentenóico para modificar a CNC. Insere PEG para formar hidrogel por troca de solvente pela ação de um fotoiniciador.	(ZHOU <i>et al.</i> , 2020)
Kimwipe®paper	Heterogênea	SPAAC	Parte de um precursor biclclononino-celulose e coloca β -ciclodextrina para futuro uso em retirada de organofosfatos	(BIYOGO <i>et al.</i> , 2020)

Tecido de algodão	Heterogênea	Tiol-Eno	Viniltrimetoxisilano-VTMS para inserção dos grupos alcenos. A polimerização foi iniciada por luz UV (365 nm) na presença de 2,2-dimetoxi-2 fenil acetofenona (DMPA) como fotoiniciador.	(CHEN <i>et al.</i> , 2020)
CNC	Heterogênea	Tiol-Eno	Inserção de grupos vinil na superfície dos CNC e ligação “click” com borrachas contendo os grupos tióis.	(CHEN <i>et al.</i> , 2022)
Acetato de celulose	Homogênea	Tiol-Michael	Formação de um éster acrílico de acetato de celulose e imobilização de inúmeras moléculas contendo grupos tióis.	(RÖHRL <i>et al.</i> , 2023)
Polpa celulósica Kraft	Heterogênea	Hidroxilo-Ino	Introdução de anéis aromáticos conjugados e ligações vinil para formação de ligações cruzadas para melhoria da proteção do material final à radiação UV.	(LI <i>et al.</i> , 2024)

1.1.4.1 Utilização do Tosilato de Celulose como precursor da Azido Celulose

Uma limitação da celulose para utilização em reações “click” é que, como discutido, ela também não apresenta grupos azida/alcino naturalmente em sua superfície. Uma alternativa viável é, como abordado no item 1.1.1.1 e nos exemplos da Tabela 1.1, a utilização de um precursor que contenha um bom grupo de saída (como o grupo tosila) para ser submetido a uma reação de substituição nucleofílica para introdução dos grupos azido (COURA, 2015; NONGBE *et al.*, 2018; PIERRE-ANTOINE; FRANÇOIS; RACHIDA, 2012). Um esquema do mecanismo da reação de azidação a partir do tosilato de celulose é apresentada na Figura 1.8.

Figura 1. 8 – Mecanismo para a síntese da azido celulose (MCC-Az) em DMSO a partir do MCC-Tos com $GS = 1$.



Fonte: adaptado de (NONGBE *et al.*, 2018).

O produto dessa reação, chamado azido celulose, permite que este material seja aplicado na síntese de um vasto número de derivados celulósicos pela inserção de inúmeros grupos pela reação CuAAC (alguns exemplos estão na Tabela 1.1). Além do mais, estes grupos azido podem ser reduzidos a amino pela utilização do LiAlH_4 , dependendo da aplicação desejada (GERICKE *et al.*, 2012; HEINZE; RAHN, 1997).

Dessa forma, a estratégia adotada neste trabalho também se baseou na produção do derivado tosilato de celulose em rota heterogênea para aplicação como precursor em reação de substituição nucleofílica pelo grupo azida. Assim, intentou-se manter parte da estrutura celulósica preservada durante as etapas reacionais. Ineditamente, o material azido celulose (MCC-Az) foi estudado como suporte para imobilização covalente, por reação “click” CuAAC, de um biocatalisador do tipo lipase e, para tanto, este último teve de ser modificado para inserção do grupo alcino terminal em um dos seus resíduos de aminoácidos.

1.2 Utilização de Catalisadores Enzimáticos

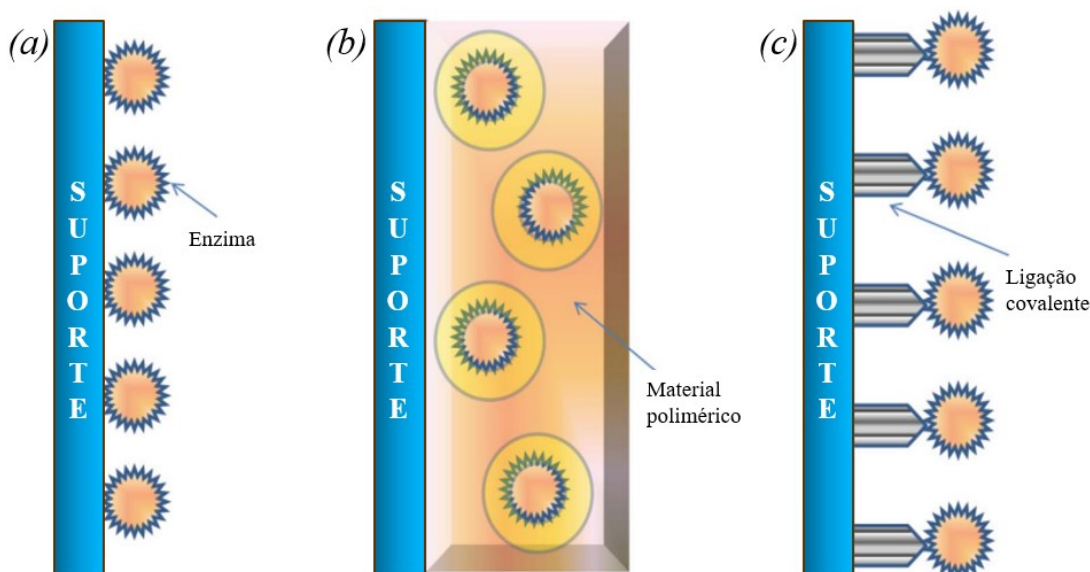
Enzimas são definidas como biocatalisadores estereoespecíficos que diminuem as barreiras de energia de ativação de reações bioquímicas e, portanto, aumentam eficientemente as taxas de reações (ÇAKMAKÇI; YUCE-DURSUN; DEMIR, 2017). Estes catalisadores enzimáticos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de diversos processos industriais, como na produção de medicamentos, energia, remediação ambiental, desenvolvimento de biossensores e síntese de biocombustíveis (ÇAKMAKÇI; YUCE-DURSUN; DEMIR, 2017; CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; KALITA; BARUAH, 2020). A importância desses biocatalisadores em muitas reações químicas decorre de sua eficiência, geralmente em condições de reação brandas, com seletividade excepcional para produtos e baixa toxicidade ambiental (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018).

Porém, apesar de reduzirem os requisitos energéticos, mitigarem a geração de resíduos e simplificarem as rotas de produção, os catalisadores enzimáticos também apresentam algumas desvantagens (DI COSIMO *et al.*, 2013). Essas biomoléculas são difíceis de isolar e purificar e, quando usadas livres (sem serem imobilizadas em algum suporte), são sensíveis a pequenas alterações do meio reacional, se desnaturando a relativamente baixas temperaturas (menores que 45 °C), além de difíceis de separar de reações em fase homogênea (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; SHARIFI *et al.*, 2018). Assim, a imobilização enzimática surge como uma alternativa eficiente para ampliar sua vida útil, aumentando sua estabilidade e reutilização, além de facilitar sua remoção de meios reacionais, portanto, facilitando a purificação dos produtos (ÇAKMAKÇI; YUCE-DURSUN; DEMIR, 2017).

1.2.1 Imobilização Enzimática

A imobilização enzimática consiste no processo de fixação da enzima a um suporte sólido (por exemplo, nanopartículas inorgânicas, materiais poliméricos, metais), tornando-as mais resistentes a diferentes condições e meio reacionais e permitindo sua recuperação e reuso (SU *et al.*, 2017). Diferentes técnicas são utilizadas para a imobilização enzimática, incluindo ligação covalente ou adsorção ao suporte, aprisionamento físico em redes poliméricas e encapsulamento (MATEO *et al.*, 2007). Exemplos destas técnicas de imobilização enzimática são apresentadas na Figura 1.9.

Figura 1. 9 – Representação das três técnicas mais comumente utilizadas para imobilização enzimática: (a) adsorção física; (b) encapsulamento; e (c) ligação covalente ou ligação cruzada.



Fonte: adaptado da referência (MOHAMAD *et al.*, 2015).

Dessa forma, o design dos experimentos de imobilização e a escolha do suporte adequado são fatores limitantes para garantir melhorias no desempenho do biocatalisador e em sua estabilidade térmica, de pH e solvente. O design correto também evita perdas na atividade enzimática após a imobilização devido à mudança conformacional da enzima, limitação da transferência de massa e desprendimento da enzima dos suportes (MATEO *et al.*, 2007; SHARIFI *et al.*, 2018, 2019; SU *et al.*, 2017).

Por exemplo, em um trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, Silva e colaboradores (2017) realizaram a imobilização da fosfolipase (Lecitase Ultra) em triacetato de celulose, por adsorção física, visando a aplicação deste material a reações de produção de biodiesel (SILVA *et al.*, 2017). Após 60 minutos de contato enzima-polímero, os autores obtiveram uma eficiência de imobilização de 97,1% e atividade enzimática de 975,8 U g⁻¹. A produção de ésteres metílicos por reação de transesterificação do óleo de soja resultou em 43,8%. No entanto, no estudo dos ciclos de reutilização, foi observada uma diminuição significativa na atividade enzimática que os autores consideraram estar relacionada à dessorção da enzima do suporte. Portanto, neste trabalho, o tipo de imobilização por ligação covalente foi priorizado de forma a evitar a liberação da enzima e aumentar a estabilidade enzima/suporte.

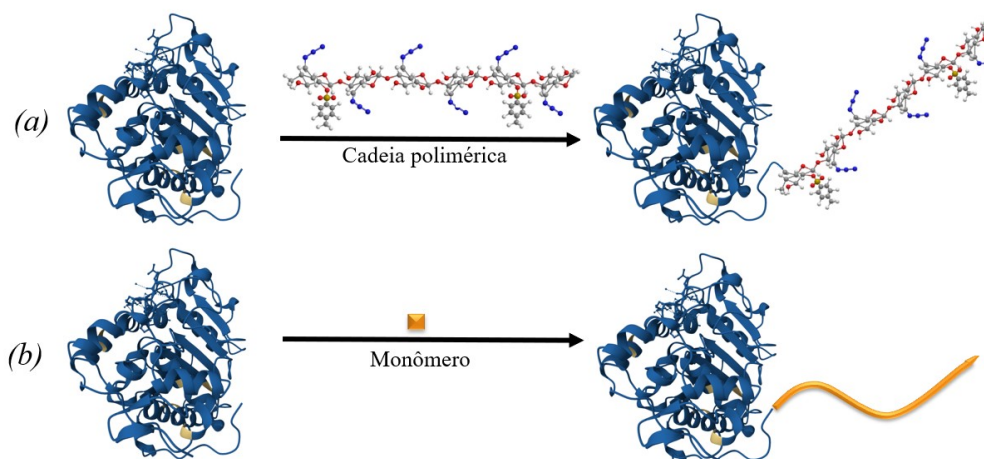
1.2.2 Imobilização Enzimática por Ligações Covalentes

Existem duas estratégias principais para a ligação covalente ou conjugação de polímeros a biomoléculas (como as proteínas e enzimas):

1. A “*grafting to*” – que consiste na realização de uma etapa de síntese do polímero separada da etapa de modificação da biomolécula. Esta estratégia requer a inserção de um grupo funcional à biomolécula que seja compatível com o polímero, antes da conjugação polímero-biomolécula;
2. A “*grafting from*” – que consiste na inserção de um iniciador de polimerização ou um agente de transferência de cadeia na biomolécula, de forma com que o polímero seja formado *in situ* (WRIGHT; PAGE; KONKOLEWICZ, 2019).

Estas duas estratégias estão representadas na Figura 1.10.

Figura 1. 10 – Estratégias (a) “*grafting to*” e (b) “*grafting from*” para formação do conjugado proteína-polímero.



Fonte: adaptado da referência (WRIGHT; PAGE; KONKOLEWICZ, 2019).

A estratégia “*grafting to*” apresenta algumas vantagens para a execução deste trabalho, que incluem, mas não se limitam: à possibilidade de utilização de solventes orgânicos, altas temperaturas, entre outras condições reacionais que seriam prejudiciais para a biomolécula; à possibilidade de realização de todas as caracterizações do material polimérico produzido antes da inserção da biomolécula; à possibilidade de alterar as condições de síntese polimérica e otimizá-las antes de efetivamente imobilizar a biomolécula (LI *et al.*, 2010).

Entretanto, a utilização da estratégia “*grafting to*” traz alguns requerimentos que precisam ser atendidos, entre eles, a inserção de um grupo funcional modificador na

biomolécula e de um grupo compatível no polímero para que ocorra a bioconjugação. Têm-se ainda, a dificuldade de separação de componentes macromoleculares não-reagidos do bioconjugado desejado (MESSINA *et al.*, 2020; OBERMEYER; OLSEN, 2015; WRIGHT; PAGE; KONKOLEWICZ, 2019).

Nesse contexto, as já citadas vantagens das reações “*click chemistry*” as tornam ferramentas interessantes para a imobilização enzimática e, portanto, neste trabalho será investigada a utilização da MCC-Az como suporte para a formação do bioconjugado. Com o grupo azida inserido no material polimérico, caberá inserir o grupo propargil na biomolécula de interesse para que a reação “*click*” CuAAC e, conseqüentemente a imobilização enzimática, seja efetivamente completada.

1.2.3 Lipase de *Candida antarctica* B (CalB)

A enzima CalB é classificada como um tipo de lipase (EC 3.1.1.3 – do inglês, “*Enzyme Commission Number*”) reconhecida por sua capacidade de hidrolisar os triglicerídeos de ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis (AYBASTIER; DEMIR, 2014). O uso industrial das lipases como catalizadores industriais é uma promissora alternativa àquelas usadas na indústria química convencional (TAN *et al.*, 2010) e algumas características que a diferenciam das demais, incluem: a presença de uma “tampa” sobre o sítio ativo menor do que as demais, diminuindo a exigência de ativação interfacial; e capacidade de ser adsorvida em superfícies hidrofóbicas, o que significa que ela permanece classificada como uma enzima interfacial (LUAN; ZHOU, 2017; ORTIZ *et al.*, 2019).

Nesse sentido, a imobilização de CalB em diferentes suportes e a produção de estruturas como agregados enzima-polímero é mais simples do que a utilização de outras lipases, pois não possui forte tendência a formar agregados diméricos (UPPENBERG *et al.*, 1994). Além disso, a imobilização pode melhorar a estabilidade desses sistemas em solventes orgânicos, um aspecto necessário para manter ou aumentar a atividade enzimática (TANG *et al.*, 2006; WRIGHT; PAGE; KONKOLEWICZ, 2019). Dessa forma, a CalB foi selecionada como biomolécula de interesse para ser investigada na imobilização covalente por reação “*click*” CuAAC ao suporte celulósico MCC-Az.

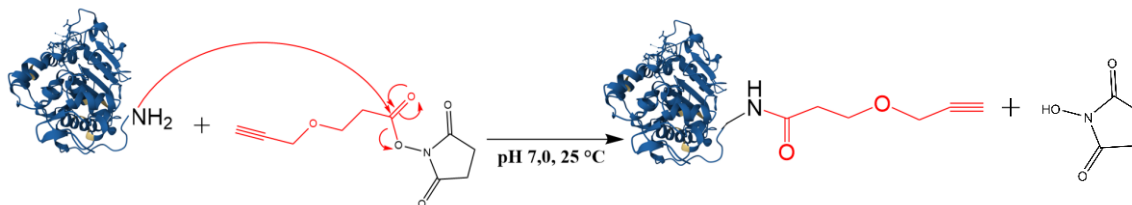
Porém, para acomodar a estratégia “*grafting to*” pensada para este trabalho, a CalB necessita passar por uma reação de modificação para inserção de um grupo propargil. Sendo assim, reações de modificação sítio-específica são eficientes meios de se modificar uma enzima sem a necessidade de purificações exaustivas ou de aparatos para cultivo de biomoléculas

geneticamente modificadas para a expressão de aminoácidos não-canônicos (FILICE *et al.*, 2011).

Reações sítio-específicas que visem modificar a região N-terminal de enzimas apresentam ainda outras vantagens, como: a modificação de aminoácidos em região afastada do sítio ativo, dessa forma preservando sua estrutura; é uma região da enzima comumente exposta a solvente; também é uma região carregada em pH fisiológico; e apresenta a possibilidade de aumentar a estabilidade térmica da enzima modificada (DEMPSEY *et al.*, 2018; INOUE; ONODA; HAYASHI, 2019; MARTOS-MALDONADO *et al.*, 2018; ROSEN; FRANCIS, 2017; XIAO; TOLBERT, 2009). Dentre estas reações, as reações de acilação dos aminoácidos da região N-terminal se destacam por ser uma rota reacional mais simples e eficaz que se constitui na reação de aminoácidos ativos com um éster de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) contendo um grupo químico de interesse. Esta reação possui moderada seletividade em pH 7,0 aos aminoácidos dessa região e, consequentemente, sua modificação química se dá pela formação de ligações amida entre os aminoácidos e o éster contendo o modificador (CHAN *et al.*, 2012; FILICE *et al.*, 2011).

Desta forma, neste trabalho a enzima lipase de *Candida antarctica* B (CalB), fornecida gentilmente pela Novozyme®, foi investigada na formação de um bioconjugado inédito a partir de uma estratégia “*grafting to*” para imobilização covalente por reação “*click*” do tipo CuAAC. Para tanto, um suporte celulósico contendo um grupo azida foi sintetizado (a MCC-Az) e um grupo propargílico foi inserido na região N-Terminal da CalB, por uma reação sítio-específica de acilação dos aminoácidos ativos a pH 7, utilizando como reagente um éster propargil-N-hidroxisuccinimidil (propargil-NHS). Um esquema da reação proposta está apresentado na Figura 1.11.

Figura 1. 11 – Esquema da sequência reacional proposta para inserção do grupo propargil à estrutura da CalB por reação de acilação com um propargil-NHS.



Fonte: adaptado da referência (FILICE *et al.*, 2011)

Espera-se assim que, com a obtenção desse novo bioconjugado, seja possível apresentar uma alternativa promissora e viável no campo dos catalizadores enzimáticos para futuras aplicações em reações de transesterificação de óleos vegetais.

1.2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é sintetizar um bioconjugado composto pela lipase CalB imobilizada covalentemente a um suporte celulósico do tipo azido celulose, por meio da reação “click” CuAAC. De forma mais específica são objetivos deste trabalho:

- i) Estudar a influência das condições reacionais tempo, temperatura e razão molar cloreto de *p*-toluenossulfonila:unidade de anidroglicose (Tos:UAG) na reação de tosilção da celulose microcristalina (MCC) em rota heterogênea;
- ii) Otimizar as condições reacionais através da aplicação de um planejamento de experimentos por Matriz Doehlert para produção de MCC-Tos com maior grau de substituição (GS);
- iii) Produzir o MCC-Tos na condição otimizada pelo planejamento experimental;
- iv) Sintetizar azido celulosas (MCC-Az) a partir dos tosilatos de celulose produzidos;
- v) Caracterizar os materiais produzidos nas diferentes etapas quanto à: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR); Análise Termogravimétrica (TGA); Difração de Raios-X (DRX); Área Superficial Específica e Porosidade (ASAP); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 no estado sólido (RMN ¹³C-CP/MAS);
- vi) Modificar a enzima CalB por uma reação de acilação sítio-específica para inserção de um grupo propargil em sua região N-terminal, a ser chamada CalB-Prop;
- vii) Utilizar a MCC-Az sintetizada a partir do MCC-Tos otimizado para produção de um bioconjugado pela imobilização da CalB-Prop (MCC-CalB) por reação “click” CuAAC;
- viii) Caracterizar as enzimas e o bioconjugado por FTIR; Espectroscopia de Absorção na região do UV-vis e Espectroscopia de Fluorescência;
- ix) Determinar a eficiência de imobilização da CalB no suporte MCC-Az;
- x) Avaliar e comparar a CalB, CalB-Prop e MCC-CalB quanto às suas atividades enzimáticas específicas.

Capítulo 2 – Síntese do Tosilato de Celulose e do Azido Celulose para Emprego em Reação “click” do tipo CuAAC

2.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1.1 Materiais e Métodos

Entre os materiais utilizados neste trabalho, os seguintes precisaram de purificação adicional: a piridina (Synth[®]) e o dimetilsulfóxido (Synth[®]) foram purificados de acordo com os procedimentos de (ARMAREGO; CHAI, 2009; YOSHIKAWA *et al.*, 2010). A água utilizada em todos os experimentos foi água de alta pureza (ASTM tipo I, com resistividade $\geq 18,3 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), obtida a partir de um sistema de ultrapurificação Megapurity[®] (Billerica, MA, EUA). Os demais reagentes utilizados no procedimento experimental descrito abaixo foram de pureza analítica e não necessitaram qualquer procedimento de purificação adicional.

2.1.2 Síntese do Tosilato de Celulose (MCC-Tos) em Fase Heterogênea

Para retirada de excesso de água adsorvida à celulose microcristalina, 1 g (6,17 mmol) de MCC (Synth[®]) foi previamente seca em estufa a 110 °C por 1 h, lavada com etanol (Dinâmica[®]), centrifugada (2500 rpm, 3 min cada ciclo) por 4 vezes e dispersa em 5 mL de DMAc (marca Acros-Organics[®]). Então, a MCC foi seca em estufa a 110 °C por 20 h (FADAVI *et al.*, 2019). Em seguida, a MCC foi dispersa em 50 mL de piridina em um balão de fundo redondo de 100 mL com duas bocas, sob borbulhamento em atmosfera de argônio (White Martins[®]) por 5 min, fechado com septos e deixada sob agitação magnética “overnight” de forma a garantir a dispersão adequada do material (COURA, 2015). 3,528 g (18,5 mmol) de cloreto de *p*-toluenossulfonila (Tos) (3 mols de Tos por mol de unidade de anidroglicose, 3:1 Tos:UAG), da marca Sigma-Aldrich[®], foram dissolvidas em 5 mL de piridina e adicionada gota a gota, com auxílio de uma seringa hipodérmica com agulha 25x7 mm através do septo, ao balão (RAHN *et al.*, 1996). A reação foi mantida à temperatura ambiente (27 °C) por tempos que variaram entre 24 e 48 h, mantendo-se a agitação magnética por todo tempo. O produto foi transferido para um béquer de 250 mL contendo 150 mL de água ultrapura gelada, centrifugado para retirada do excesso de reagentes e redisperso em uma mistura água ultrapura:acetona (1:1) sob agitação em vórtex por 30 seg e novamente centrifugado (2500 rpm, por 3 min cada ciclo). Este procedimento foi repetido por outras três vezes. Então, o material foi lavado mais quatro vezes somente com água ultrapura, seco em estufa a 60 °C por 20 h e reservado em dessecador.

A partir deste procedimento, foram testadas também as proporções 4:1, 4,5:1 e 5:1 de Tos:UAG e tempos reacionais que variaram de 24 a 216 h. Estas alterações no procedimento experimental visaram identificar possíveis influências da razão reagente:MCC no grau de substituição (GS).

2.1.3 Otimização da Síntese do Tosilato de Celulose Empregando Planejamento Experimental por Matriz Doehlert

Através dos ensaios reacionais descritos no item 2.1.2 foi identificado que algumas variáveis, como a razão molar (RM) Tos:UAG e o tempo reacional, poderiam influenciar o GS do material final. Diante de tal possibilidade, escolheu-se utilizar um planejamento experimental por Matriz Doehlert para avaliar simultaneamente estas variáveis. Este tipo de planejamento permite priorizar as variáveis consideradas mais importantes no estudo e avaliar suas interações através de um número reduzido de experimentos. Pelos estudos prévios do item 2.1.2, a variável considerada mais relevante foi o tempo (x_2) e, portanto, foi avaliada em sete níveis diferentes. Para identificar a influência da variável temperatura (x_1) em mais níveis dentro do intervalo de 30 a 90 °C, esta foi avaliada em cinco níveis diferentes e a variável RM (x_3) foi avaliada em três níveis. Estas variáveis e os níveis estudados para a otimização da reação são apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2. 1 – Codificação para as condições avaliadas para otimização da síntese do tosilato de celulose.

<i>Variáveis estudadas</i>	<i>Níveis</i>						
<i>Temperatura (°C) – x_1</i>	30	45	60	75	90		
	-1	-0,5	0	+0,5	+1,0		
<i>Tempo (h) – x_2</i>	2	14	26	38	50	62	74
	-0,866	-0,5774	-0,2887	0	+0,2887	+0,5774	+0,866
<i>Razão (Tos:UAG) – x_3</i>	3:1	5:1	7:1				
	-0,8165	0	+0,8165				

Fonte: o autor.

Os níveis das variáveis foram codificados para otimização estatística das condições de reação. As fórmulas para codificação são apresentadas na Equação 2.

$$x_1 = \frac{(T-60)}{30} \quad x_2 = \frac{(t-38)}{41.570} \quad x_3 = \frac{(RM-5)}{2.449} \quad (\text{Equação 2})$$

Os níveis das variáveis temperatura, tempo de reação e razão Tos:UAG codificados pelas expressões na Equação 2 estão dispostos na Tabela 2.2.

Tabela 2. 2 – Matriz Doehlert de experimentos para otimização da síntese do tosilato de celulose.

Exp.	Temperatura		Tempo		Razão (Tos:UAG)	
	x ₁	°C	x ₂	h	x ₃	mol:mol
1	0	60	0	38	0	5:1
2	1	90	0	38	0	5:1
3	0,5	75	0,866	74	0	5:1
4	0,5	75	0,2887	50	0,8165	7:1
5	-1	30	0	38	0	5:1
6	-0,5	45	-0,866	2	0	5:1
7	-0,5	45	-0,2887	26	-0,8165	3:1
8	0,5	75	-0,866	2	0	5:1
9	0,5	75	-0,2887	26	-0,8165	3:1
10	0	60	0,5774	62	-0,8165	3:1
11	-0,5	45	0,866	74	0	5:1
12	-0,5	45	0,2887	50	0,8165	7:1
13	0	60	-0,5774	14	0,8165	7:1
14	0	60	0	38	0	5:1
15	0	60	0	38	0	5:1

Fonte: o autor.

Foi utilizado como fator de resposta, a razão entre as intensidades das bandas de absorvância no FTIR (RB) em 1174 cm⁻¹, atribuída à presença do grupo tosil ligado à celulose, e da ligação C-O-C da celulose em 1056 cm⁻¹, por ser um método rápido e quantitativo da evolução da reação de tosilação da celulose, reconhecido na literatura (RAHN *et al.*, 1996).

O procedimento experimental descrito no item 2.1.2 foi redimensionado para um volume reacional total de 10 mL de forma a reduzir o consumo de reagentes e a geração de resíduos. Para tanto, as quantidades dos reagentes foram reduzidas proporcionalmente (cerca de 0,2 g de MCC (1,23 mmol), 10 mL de piridina para dispersão da MCC e 1 mL para preparo da solução de Tos, e massa de Tos equivalente à RM desejada) e o balão de 100 mL foi substituído por um frasco do tipo “vial” de 20 mL com tampa de rosca e septo de silicone.

As porcentagens de rendimento (%rendimento) destas reações foram calculadas considerando a relação entre a massa teórica de MCC-Tos, esperada para um determinado GS obtido experimentalmente, e a massa experimental de MCC-Tos (ambas em gramas), conforme Equação 3.

$$\%rendimento = \frac{m_{MCC-Tos \text{ real}}}{m_{MCC-Tos \text{ teórica}}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

2.1.4 Síntese da Azido Celulose (MCC-Az) a partir dos MCC-Tos e MCC-Tos Otm

Para a síntese de MCC-Az, 0,2 g de MCC-Tos (previamente secos em estufa a 60 °C por 12 h), ou seja 1,23 mmol de UAG, e 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, marca Synth[®]) foram adicionados em um balão de fundo redondo de 50 mL com duas bocas e deixados sob agitação magnética “*overnight*”, para auxiliar na dispersão do MCC-Tos, com fluxo constante de argônio. Em seguida, o balão foi imerso em um banho de óleo e 0,272 g (6,47 mmol) de azida de sódio (NaN₃, da marca Dinâmica[®]) (5:1 mol de AGU) dissolvidos em 15 mL de DMSO foi adicionado gota a gota, mantendo-se o fluxo de argônio. Após a adição da azida de sódio, a temperatura do agitador magnético foi ajustada a 70 °C e foi constantemente monitorada, com auxílio de um termômetro imerso no banho de óleo, por todo o tempo reacional (NEGISHI *et al.*, 2011). O tempo reacional variou de 24 a 96 h, de acordo com o experimento. Após o término da reação, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente e vertida em 200 mL de água ultrapura gelada. O material foi lavado com água ultrapura por 30 seg de agitação em vórtex e centrifugação (2500 rpm, por 3 min cada ciclo). Este procedimento foi repetido mais 2 vezes com água ultrapura, 3 vezes com uma mistura 1:1 de etanol e água ultrapura, e mais 2 vezes com água ultrapura. O produto foi seco em estufa a 60 °C e armazenado em dessecador (KOSCHELLA; HARTLIEB; HEINZE, 2011).

2.1.5 Caracterização dos Derivados Celulósicos Sintetizados

2.1.5.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos com o objetivo de avaliar a evolução das reações de modificação química pelo aparecimento e/ou desaparecimento das bandas específicas de cada derivado celulósico produzido e, também, para avaliação do grau de substituição dos derivados MCC-Tos pela aplicação de uma curva de calibração apresentada no item 2.1.5.3.

Para tanto, em um espectrômetro da marca Agilent Technologies, Modelo Cary 630 FTIR, com cristal de diamante e acoplado a um ATR (do inglês “*Attenuated Total Reflectance*”), foram coletados os espectros pela realização de 128 varreduras de absorbância com resolução de 4 cm⁻¹, no intervalo de 4000 cm⁻¹ a 650 cm⁻¹, após coleta de 128 varreduras

de “background”. O equipamento utilizado pertence à Rede de Laboratórios Multiusuários da UFU (RELAM)-Ituiutaba.

Para as normalizações dos espectros por FTIR, dois métodos foram utilizados: 1) para os reagentes, o procedimento de normalização adotado consistiu em equivaler a banda com maior intensidade ao valor de 1 (um) e calcular as intensidades de todas as outras proporcionalmente; 2) para as amostras de celulose e dos derivados celulósicos, a banda considerada máxima (e, portanto, ajustada para o valor de um) foi fixada como a banda em cerca de 1056 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação C1-O-C5 da estrutura interna da celulose. Todos esses tratamentos foram realizados em software de tratamento gráfico.

2.1.5.2 Análise Termogravimétrica e Termogravimetria Derivada (TGA/DTG)

As estabilidades térmicas dos materiais foram avaliadas em um equipamento da marca TA Instruments, modelo TGA 55. As amostras, com massa de aproximadamente 5 mg, foram colocadas em porta amostras de platina de alta pureza e aquecidas de 25 até $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob atmosfera inerte (N_2) com fluxo de gás de 60 mL min^{-1} e taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. As análises foram realizadas no Laboratório de Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

2.1.5.3 Análise Elementar e Cálculo do GS da tosilação

As massas e as porcentagens de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre, em amostras MCC-Tos foram determinadas em um Analisador Elementar Flash EA 1112, da marca Thermo Scientific, por meio da separação dos gases formados (cromatografia gasosa) após a combustão das amostras e foram analisadas sob a forma de CO_2 , N_2 , H_2O e H_2SO_3 , respectivamente. Estes gases foram arrastados por gás hélio através de uma coluna e detectados por condutividade térmica. Estas análises foram realizadas nas Centrais Experimentais Multiusuário da Universidade Federal do ABC (UFABC).

As amostras de MCC-Tos analisadas foram previamente selecionadas de acordo com os valores de RB que apresentaram, e suas massas e porcentagens de enxofre (%S) foram utilizadas para construção de uma curva de calibração, relacionando os GS em função das RB (apresentada no item 2.2.1.4), cuja equação de ajuste linear foi: $\text{GS} = (\text{RB} - 0,14633)/0,48356$.

Os GS apresentados em todos os resultados dos MCC-Tos produzidas neste trabalho foram calculadas por este método.

2.1.5.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 no estado sólido (RMN ^{13}C -CP/MAS)

As análises de RMN no Estado Sólido foram efetuadas em um espectrômetro Bruker Avance III HD operado num campo de 7,05 T, utilizando uma sonda CPMAS de dois canais e rotores zircônia de 4 mm. Os espectros do núcleo de ^{13}C foram obtidos em uma frequência de Larmor de 75,00 MHz, frequência de giro de 9000 Hz, com tempo de relaxação de 1,0 s e um pulso de 90° de 2,3 μs utilizando giro-ao-ângulo mágico, e polarização cruzada com número de scans igual a 4k. Os deslocamentos químicos foram padronizados de forma indireta através de uma amostra de glicina, com sinal referente a carbonila em 176,00 ppm em relação ao TMS que é o padrão primário. As análises foram, em sua maior parte, realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), com o apoio do prof. Dr. Hernane Barud (UNIARA) e do Dr. Gustavo Senra.

O restante das amostras foi analisado em um espectrômetro de mesma marca e modelo, em colaboração com Dr. Anil Mehta no Advanced Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy (AMRIS) ligado ao National High Magnetic Field Laboratory, situado na University of Florida em Gainesville, Flórida (EUA). Essas análises foram realizadas com financiamento aprovado pela National Science Foundation (NSF), número P20225, sob a supervisão do prof. Dr. Brent Sumerlin, do George & Josephine Butler Polymer Research Laboratory, Department of Chemistry, University of Florida, Gainesville, Flórida (EUA).

2.1.5.5 Análise de Difração de Raios-X – DRX

Os difratogramas de Raios-X dos materiais produzidos foram obtidos em um difratômetro da marca Bruker-AXS D5005 equipado com tubo selado de cobre de 2,2 kW, empregando-se a radiação $K\alpha$ do Cu (1,5406 Å) e filtro de Ni, com 2θ no intervalo de 5 a 40° e varredura contínua, com velocidade de 2° min^{-1} , operando a uma potência de 40 kV e corrente de 30 mA. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Análises Termogravimétricas e de Difração de Raios X da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto.

Os padrões de difração obtidos foram utilizados para identificação de mudanças estruturais nas fases amorfas e cristalinas antes e após o processamento da celulose. A separação dos picos cristalinos e amorfos foi feita pelo método de deconvolução usando a função Pseudo-

Voigt¹. Em seguida, as porcentagens de índice de cristalinidade (%IC) foram calculadas conforme Equação 4, descrita abaixo:

$$\%IC = \frac{A_c}{A_c + A_A} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Em que, A_c e A_A são as áreas dos picos cristalinos e do halo amorfo, respectivamente.

2.1.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro em uma Metalizadora para carbono e ouro modelo Quorum QR 150ES e analisadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura modelo VEGA3, TESCAN, operando a 20 kV. Os ensaios foram realizados na Rede de Laboratórios Multiusuários da UFU (RELAM)-Santa Mônica.

2.1.5.7 Análises de Área Superficial Específica e Porosidade (ASAP)

Os materiais celulósicos foram submetidos à determinação da área superficial específica, volume e diâmetro de poros. Estas medidas foram obtidas através da adsorção e dessorção de nitrogênio a $-195,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes das medidas, as amostras foram degaseificadas a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h sob vácuo. A área superficial específica foi calculada de acordo com o método BET (GREGG; SING, 1982) a pressões relativas (p/p_0) entre 0,06 e 0,25, na qual p e p_0 são, respectivamente, pressões de equilíbrio e pressão de saturação do nitrogênio a $-195,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. O volume total de poros foi determinado pelo método do ponto único através da conversão do volume de nitrogênio adsorvido na p/p_0 de 0,995 para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi calculado a partir dos valores de volume total de poros e da área superficial BET, conforme Equação 5.

$$d_p = 4V_p/S_{BET} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que: d_p = diâmetro médio de poros (nm); V_p = volume de poros ($\text{cm}^3\text{ g}^{-1}$) e S_{BET} = área superficial específica ($\text{m}^2\text{ g}^{-1}$) obtida pelo método BET.

Para estas medidas foi empregado um analisador de poros e área superficial específica ASAP da Micromeritics, modelo 2010 (Norcross, GA, EUA) na Rede de Laboratórios Multiusuários da UFU (RELAM)-Ituiutaba.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

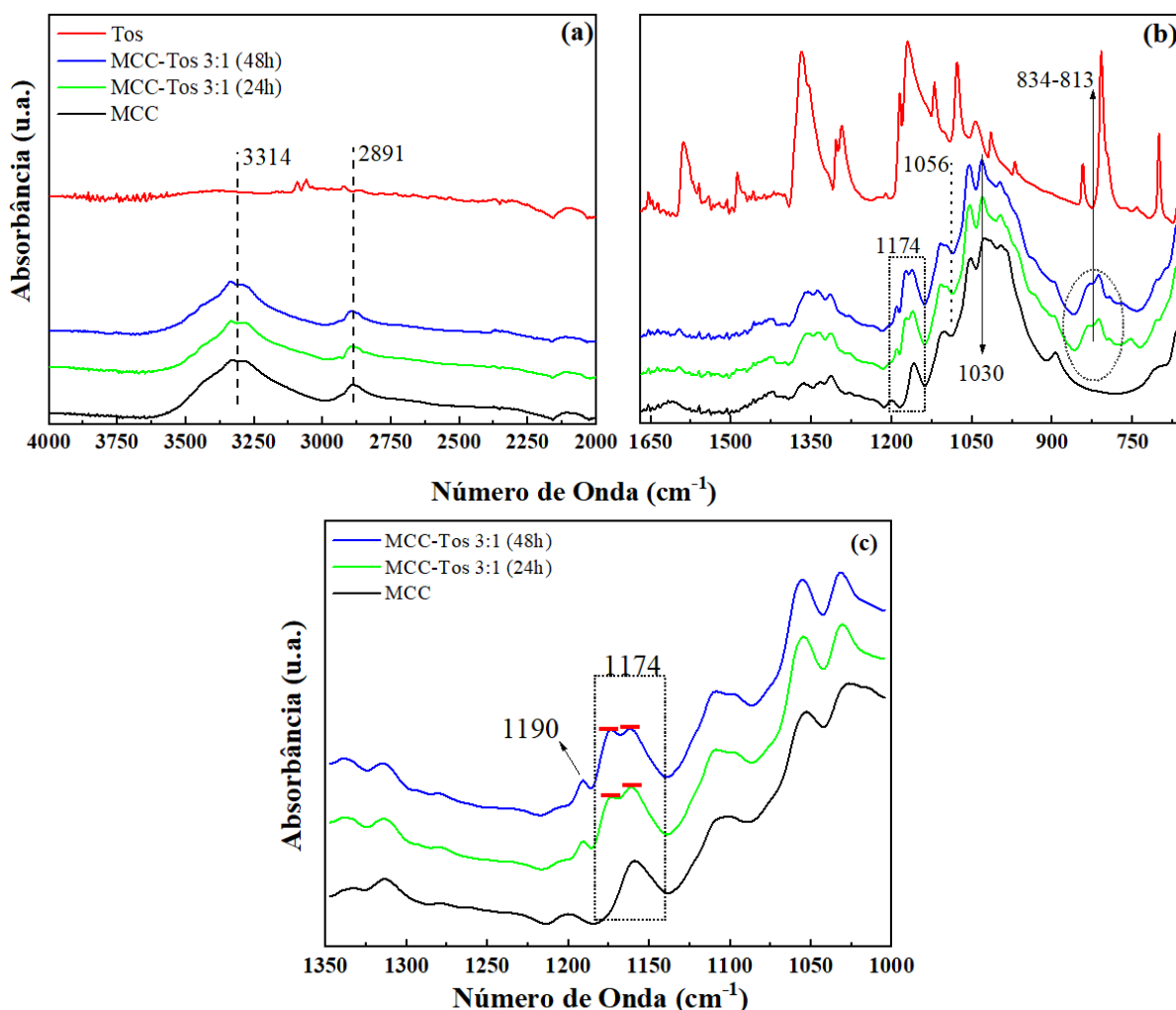
2.2.1 Síntese do Tosilato de Celulose

Como dito anteriormente, o MCC-Tos foi utilizada neste trabalho como precursor para produção da MCC-Az. Desta forma, aproveita-se das vantagens reacionais da produção de um derivado celulósico já bem estabelecido na literatura e que, com um excelente grupo de saída como o tosilato, pode permitir uma maior conversão da MCC em MCC-Az. A reação de tosilção da celulose em fase heterogênea foi adotada em preferência à fase homogênea, uma vez que esta não requer etapas de dissolução da MCC e, assim, garante a manutenção da morfologia e estrutura original da celulose, podendo-se aproveitar estas propriedades para melhor aplicação como suporte na imobilização de enzimas (SILVA, 2017; SUN *et al.*, 2020). Dessa forma, diferentes condições reacionais para a tosilção em fase heterogênea foram avaliadas neste trabalho e as caracterizações dos materiais estão discutidas abaixo.

2.2.1.1 Caracterização por FTIR do Tosilato de Celulose

A fim de observar o comportamento da reação de tosilção descrita no item 2.1.2 para a razão molar 3:1 (Tos:UAG), foi retirada uma alíquota do meio reacional com 24 h e encerrada a reação com 48 h. Os espectros de ambos os produtos (MCC-Tos 3:1, 24 e 48 h) estão apresentados na Figura 2.1, juntamente aos espectros da MCC e do Tos, para melhor comparação das respectivas alterações espectrais produzidas pela reação de tosilção.

Figura 2. 1 – Espectros de FTIR (a) de 4000 a 2000 cm^{-1} ; (b) de 1670 a 650 cm^{-1} e (c) de 1350 a 1000 cm^{-1} ; normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} , para as amostras de MCC, Tos, MCC-Tos (razão molar 3:1) após 24 h e 48 h de reação de tosilação.



Fonte: o autor.

Dos espectros da Figura 2.1 para a MCC, Tos e MCC-Tos, observa-se bandas intensas em aproximadamente 3314 cm^{-1} associadas ao estiramento da ligação O-H da celulose; picos de média intensidade em 2891 cm^{-1} característicos de estiramento da ligação $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$; bandas em aproximadamente 1050 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico da ligação (C1 – O – C5) e em 893 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação glicosídica (C1 – O – C4) (COURA, 2015; FEI *et al.*, 2017; FILHO *et al.*, 2007). Já as bandas que evidenciam a tosilação da celulose se concentram na região de identidade e estão entre elas: a banda em cerca de 1190 cm^{-1} relacionada ao estiramento do grupo sulfonato (celulose-O-SO₂-R), a banda na região de 1174 cm^{-1} atribuída ao estiramento simétrico do grupo SO₂ e as bandas em 834 e 813 cm^{-1} atribuídas ao estiramento do anel aromático *p*-substituído e ao estiramento S – O – C do grupo tosila, respectivamente (GERICKE *et al.*, 2012; O'CONNOR; DUPRÉ; MCCALL, 1957). A

ausência de bandas de formato e posição semelhantes às do espectro da Tos indicou que o processo de lavagem empregado removeu qualquer reagente que não tenha sido consumido. Outras bandas relevantes estão descritas na Tabela 2.3.

Tabela 2. 3 – Atribuições das principais bandas de absorção do espectro na região do infravermelho para MCC e MCC-Tos.

<i>Número de onda (cm⁻¹)</i>	<i>Atribuições</i>
3314	Estiramento O-H
2891	Estiramento (C-H) de grupos CH ₂ e CH ₃
1596	Estiramento C=C do anel aromático
1423	Deformação assimétrica de CH ₂
1365	Deformação simétrica de CH ₂
1360	Estiramento assimétrico SO ₂
1190	Estiramento do grupo sulfonato (– O – SO ₂ – R)
1174	Estiramento simétrico SO ₂
1160	Estiramento C– O
1107	Estiramento assimétrico da ligação (C1 – O – C5)
1056	Estiramento simétrico (C1 – O – C5)
1030	Estiramento do grupo C – O da função éter da cadeia celulósica
893	Estiramento da ligação glicosídica (C1 – O – C4)
834	Estiramento do anel aromático <i>p</i> -substituído
813	Estiramento S – O – C do grupo tosila

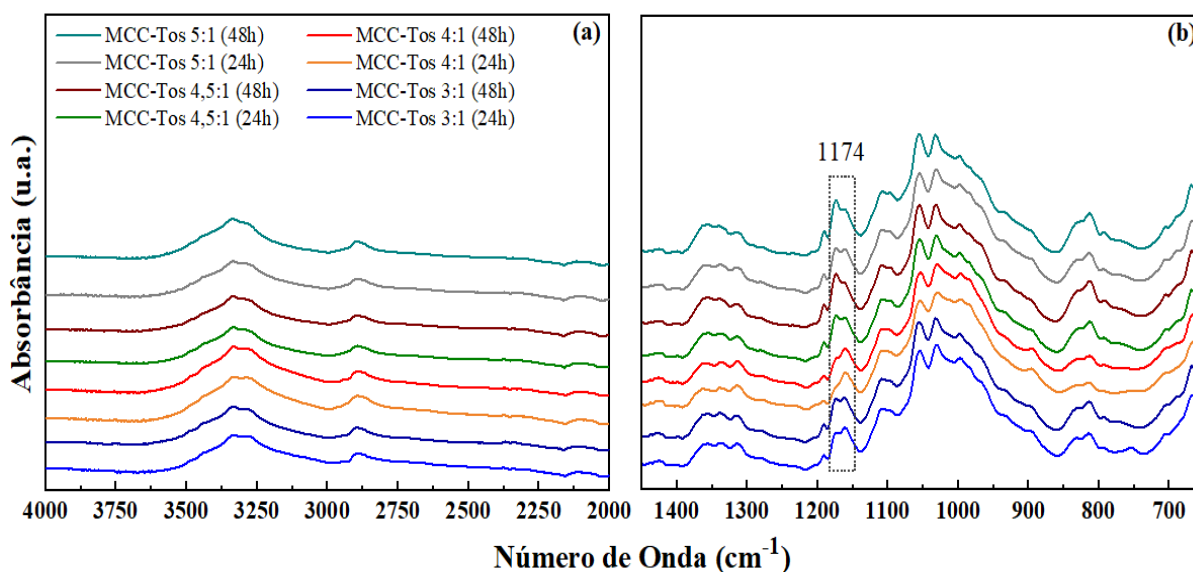
Fontes: (COURA, 2015; FEI *et al.*, 2017; FILHO *et al.*, 2007; GERICKE *et al.*, 2012; O’CONNOR; DUPRÉ; MCCALL, 1957; SHARIFI *et al.*, 2019).

A partir das informações obtidas dos espectros da Figura 2.1.b é evidente a modificação da MCC pela introdução do grupo tosila, com destaque para as bandas em cerca de 1190, 1174, 834 e 813 cm⁻¹ relacionadas a este grupo. Outro fator relevante observado é o aumento da intensidade da banda em 1174 cm⁻¹ do MCC-Tos com 48 h de reação em relação à de 24 h (Figura 2.1c). Esta banda relacionada ao estiramento simétrico do grupo SO₂ é descrita na literatura como uma banda de intensidade relacionada à inserção dos grupos tosila, quantitativamente, e desta forma ela será utilizada para acompanhamento do progresso da reação (O’CONNOR; DUPRÉ; MCCALL, 1957).

Para tanto, utilizou-se o método descrito por Rahn e colaboradores (1996), em que faz-se a razão entre as absorbâncias (sem tratamentos matemáticos) da banda em 1174 cm⁻¹ do grupo tosila e da banda em 1056 cm⁻¹ da estrutura interna da celulose (C1 – O – C5) e que, portanto, não é alterada durante o processo reacional (FEI *et al.*, 2017; RAHN *et al.*, 1996). Desta forma, observou-se que a razão aumentou de 0,37 para 0,40 com o aumento de 24 h de tempo reacional.

Assim, já com indícios de que o tempo reacional poderia ser uma das variáveis a influenciar o grau de substituição (GS) do derivado celulósico, foram avaliadas diferentes razões molares Tos:UAG (4:1, 4,5:1 e 5:1), mantendo-se as durações das reações em 24 e 48 h. Os espectros por FTIR dos materiais produzidos estão apresentados na Figura 2.2.

Figura 2. 2 – Espectros de FTIR (a) de 4000 a 2000 cm^{-1} e (b) de 1450 a 650 cm^{-1} ; normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} das amostras de MCC-Tos produzidas a partir das razões molares 3:1; 4:1; 4,5:1 e 5:1 (Tos:UAG), após 24 h e 48 h de reação de tosilação.



Fonte: o autor.

A partir dos espectros da Figura 2.2a, nota-se que os progressivos aumentos das razões molares (Tos:UAG) não resultaram em alterações significativas na região de 4000 a 2000 cm^{-1} . Porém, dentre as alterações espectrais na região de 1450 a 650 cm^{-1} (Figura 2.2b), destaca-se a já mencionada mudança nas intensidades das bandas em cerca de 1190 e 1174 cm^{-1} referente aos grupos sulfonato e tosila, respectivamente, e a banda em 1596 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação C=C do anel aromático. Estas mudanças na intensidade de absorvância das bandas em 1174 cm^{-1} também foram avaliadas conforme as razões entre as bandas (RB) 1174/1056 e estão apresentadas na Tabela 2.4, juntamente com os valores de GS calculados (conforme descrito posteriormente no item 2.2.1.4) e as porcentagens de rendimento (%rendimento), para melhor interpretação dos resultados.

Tabela 2. 4 – Cálculo das razões de absorbância entre as bandas 1174/1056 obtidas por FTIR e dos GS para as amostras MCC-Tos produzidas a partir das razões molares 3:1; 4:1; 4,5:1 e 5:1 (Tos:UAG).

<i>Amostras</i>	<i>1174 cm⁻¹</i>	<i>1056 cm⁻¹</i>	<i>1174/1056</i>	<i>GS</i>	<i>%rendimento</i>
<i>MCC-Tos 3:1 - 24 h</i>	0,0894	0,2437	0,3670	0,46	--
<i>MCC-Tos 3:1 - 48 h</i>	0,0874	0,2197	0,3979	0,52	69,44
<i>MCC-Tos 4:1 - 24 h</i>	0,0614	0,2233	0,2750	0,27	--
<i>MCC-Tos 4:1 - 48 h</i>	0,0889	0,2850	0,3120	0,34	79,20
<i>MCC-Tos 4,5:1 - 24 h</i>	0,1216	0,2849	0,4268	0,58	--
<i>MCC-Tos 4,5:1 - 48 h</i>	0,1692	0,3405	0,4969	0,72	60,46
<i>MCC-Tos 5:1 - 24 h</i>	0,0985	0,2292	0,4298	0,59	--
<i>MCC-Tos 5:1 - 48 h</i>	0,1360	0,2678	0,5077	0,75	54,96

Fonte: o autor.

Os resultados da Tabela 2.4 apontam para uma sensível variação de 0,37 para 0,43 nas RBs quando se aumenta as razões molares (RM) de 3 para 4,5, no tempo de 24 h. E, apesar da pequena variação nas RB de 0,50 a 0,51 (ou de GS de 0,72 a 0,75, respectivamente) para as RM de 4,5 a 5, respectivamente, no tempo de 48 h, o aumento nas RBs e dos GS (chegando a 0,75 para a RM 5:1) parece ser dependente de ambas as variáveis tempo e razão molar dos reagentes. Essa dependência também é observada quando se compara o aumento na RB em 0,03 em relação ao tempo reacional de 24 para 48 h em ambas as amostras MCC-Tos 3 e 4:1, e um aumento na RB de 0,07 e 0,08 com o aumento do tempo de 24 para 48 h, para as amostras MCC-Tos 4,5 e 5:1, respectivamente. Porém, nota-se ainda que a RB para 24 e 48 h da MCC-Tos 4:1, destoia do aumento esperado para o aumento da razão molar de 3 para 4:1.

Assim, com o objetivo de avaliar a influência das variáveis tempo reacional e RM, otimizar a quantidade de experimentos a serem realizados e verificar a repetibilidade do método, um planejamento experimental por Matriz Doehlert foi empregado. Dessa forma, poder-se-ia verificar se os resultados das RBs das amostras MCC-Tos 4:1 e/ou MCC-Tos 3:1 são esperados estatisticamente ou se foram produzidos por um erro experimental, sem necessidade de fazer uma enorme quantidade de experimentos para avaliar cada variável independentemente e, ainda, obter um modelo matemático que possa prever a condição otimizada para a reação de tosilação da celulose em fase heterogênea.

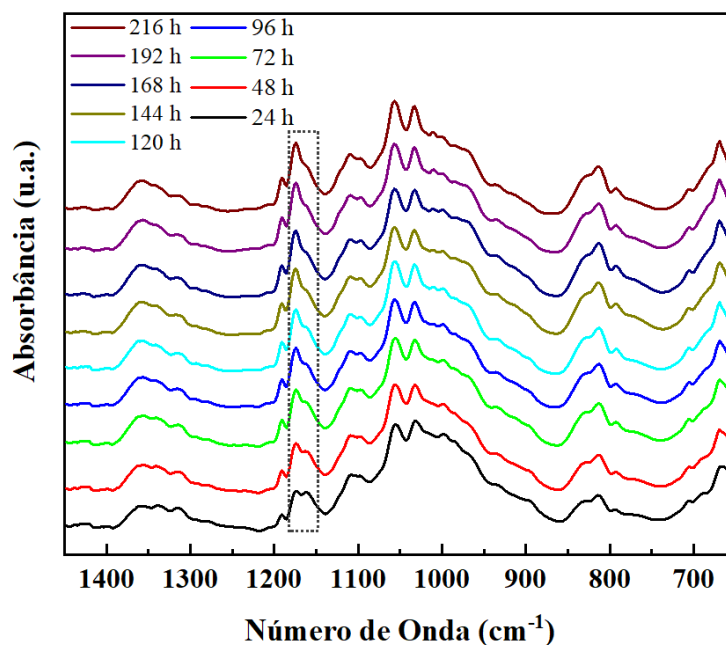
Além disso, a escassez de trabalhos na literatura que descrevam a otimização da reação de tosilação em fase heterogênea por planejamento experimental e estatístico também justifica a realização do Planejamento por Matriz Doehlert. Enquanto que para a tosilação da celulose em fase homogênea, encontram-se trabalhos como o de (HAMDAOUI *et al.*, 2020) que utilizaram o Box-Behnken Design (BBD) de experimentos, poucos trabalhos na literatura

descrevem a otimização da reação de tosilação da celulose em fase heterogênea por qualquer método de planejamento experimental (NONGBE *et al.*, 2018).

2.2.1.2 Otimização da Síntese do Tosilato de Celulose Empregando Planejamento Experimental por Matriz Doehlert

Para determinar os intervalos inferior e superior da variável tempo reacional a serem avaliados no planejamento experimental, foi realizado um experimento de tosilação com RM 5:1 por 216 h, com progresso reacional acompanhado pela retirada de alíquotas a cada 24 h e analisadas por FTIR. Os espectros por FTIR dos materiais produzidos estão apresentados na Figura 2.3, com ampliação na região de 1450 a 650 cm^{-1} . As razões das bandas de absorbância estão transcritas na Tabela 2.5, juntamente aos GS calculados, conforme descrito no item 2.2.1.4.

Figura 2. 3 – Espectros de FTIR comparativos das amostras de MCC-Tos produzidas a partir da razão molar 5:1 (Tos:UAG), entre 24 h e 216 h de reação de tosilação, na faixa de ampliação de 1450 a 650 cm^{-1} , normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} .



Fonte: o autor.

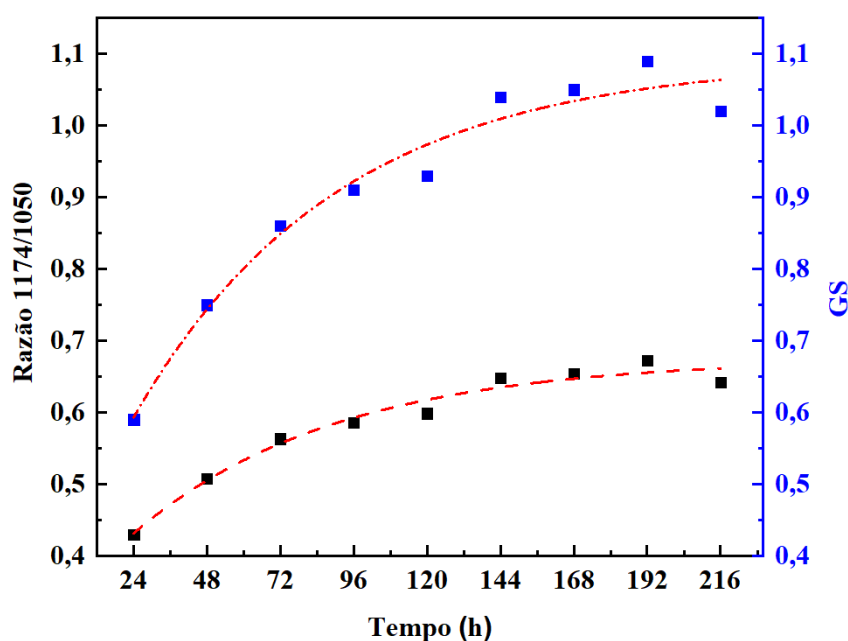
Tabela 2. 5 – Cálculo das razões de absorbância entre as bandas 1174/1056 obtidas por FTIR e dos GS para MCC-Tos 5:1 (Tos:UAG), com tempo reacional entre 24 e 216 h.

<i>Amostras</i>	<i>1174 cm⁻¹</i>	<i>1056 cm⁻¹</i>	<i>1174/1056</i>	<i>GS</i>
24 h	0,0985	0,2292	0,4298	0,59
48 h	0,1360	0,2678	0,5077	0,75
72 h	0,1502	0,2667	0,5629	0,86
96 h	0,1981	0,3384	0,5854	0,91
120 h	0,1570	0,2623	0,5986	0,93
144 h	0,1823	0,2812	0,6481	1,04
168 h	0,1878	0,2872	0,6540	1,05
192 h	0,1974	0,2935	0,6727	1,09
216 h	0,2004	0,3122	0,6417	1,02

Fonte: o autor.

Observando-se o aumento da intensidade das bandas em 1174 cm⁻¹ na Figura 2.3 e das RBs na Tabela 2.5, nota-se uma influência cinética na reação de tosilção da celulose, como discutido anteriormente, mas que é reduzida depois de 96 h de reação. Este fato pode ser bem evidenciado pela comparação dos valores RB e de GS que atingem máximos pouco acima de 0,65 e 1,0, respectivamente, após 144 h de reação, se mantendo praticamente constantes até o fim das 216 h de reação avaliadas. Para melhor visualização da relação entre as RBs, os GS e o tempo reacional, os dados da Tabela 2.5 foram plotados na Figura 2.4.

Figura 2. 4 – Comportamento das razões das bandas de absorbância 1174/1056 e dos GS calculados em função do tempo de reação de tosilção da MCC.



Fonte: o autor.

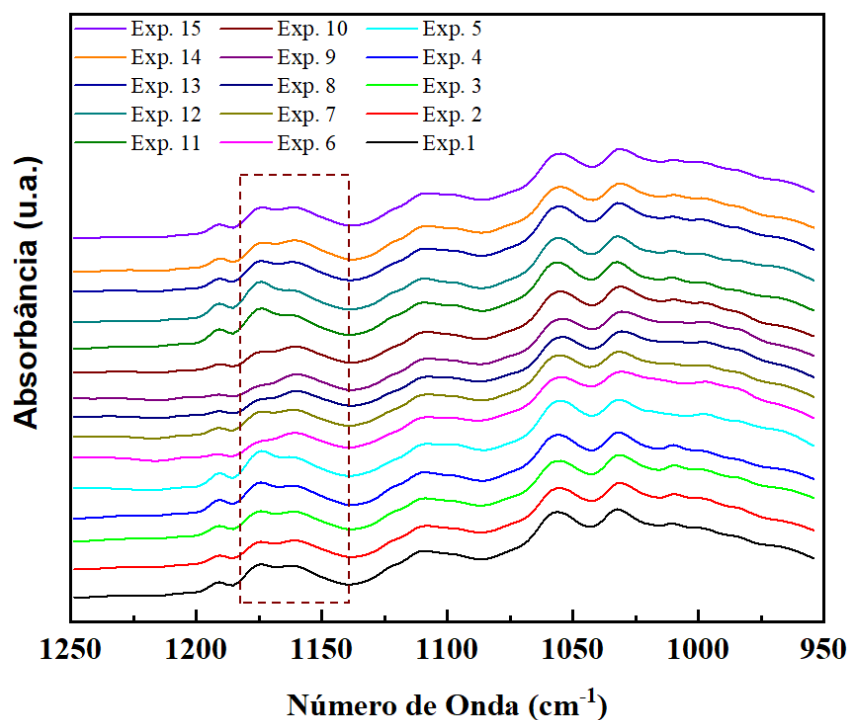
A partir dos dados da Tabela 2.5 e da Figura 2.4, tornou-se claro que a partir de 72 h o tempo reacional tem influência menos expressiva na intensidade de inserção dos grupos tosila. Assim, o limite inferior e superior da variável tempo reacional foram definidos como 2 h e 74 h, respectivamente. Além disso, tempos reacionais maiores que 74 h foram evitados para não prolongar demasiadamente os experimentos do planejamento experimental.

A variável RM compreendeu o intervalo de 3:1 até 7:1 (Tos:UAG). O nível 3:1 correspondeu ao menor valor avaliado, uma vez que ele garante que haja o mínimo de um mol de Tos disponível para reação por função hidroxila disponível em uma UAG. Para RM maiores que o nível 7:1, a limitação encontrada foi a baixa solubilidade do Tos no meio reacional, para as condições experimentais redimensionadas descritas no item 2.1.3.

A última variável adotada para a otimização da reação de tosilação da MCC em fase heterogênea foi a temperatura. Baseando-se em estudos disponíveis na literatura, reações de tosilação em fase heterogênea costumam adotar o método proposto por (HONEYMAN, 1947), em que as temperaturas não excedem 100 °C e o tempo reacional também é limitado a 72 h, no máximo (HEINZE; RAHN, 1997; NONGBE *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2020; TAKAHASHI *et al.*, 1986). Dessa forma, este trabalho definiu a temperatura superior em 90 °C e a inferior em 30 °C durante a investigação da influência dessa variável nas condições reacionais testadas.

O planejamento estatístico baseado na matriz Doehlert foi adotado por permitir a avaliação simultânea de várias variáveis que podem afetar a reação de tosilação da celulose, possibilitando a priorização de variáveis mais importantes no estudo. A variável considerada mais relevante foi o tempo (x_2), sendo avaliada em sete níveis diferentes. A variável temperatura (x_1) foi avaliada em cinco níveis diferentes de forma a melhor investigar o intervalo de 30 a 90 °C e a variável RM (x_3) foi avaliada em três níveis. Desta forma, foram realizados 15 experimentos combinando diferentes condições das três variáveis e uma triplicata do ponto central, de acordo com a matriz de planejamento Doehlert apresentada na Tabela 2.2. Os espectros por FTIR normalizados para cada experimento estão apresentados na Figura 2.5.

Figura 2. 5 – Espectros por FTIR normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} , para as amostras de MCC-Tos produzidas em cada experimento da Matriz Doehlert, com ampliação da região de 1250 a 950 cm^{-1} .



Fonte: o autor.

Os espectros da Figura 2.5 estão restritos à faixa de 1250 a 750 cm^{-1} uma vez que, como os espectros da Figura 2.3, não houve alterações significativas nos espectros na região de 4000 a 1250 cm^{-1} . A partir dos espectros por FTIR destas amostras sem normalizações, as RBs $1174/1056\text{ cm}^{-1}$ foram calculadas para cada experimento e estão apresentadas na Tabela 2.6, juntamente à %rendimento e o GS (cujo cálculo é descrito mais à frente no item 2.2.1.4) para cada reação. Os valores de RB calculados foram utilizadas como fator de resposta para o planejamento pela Matriz Doehlert, por se constituir de um cálculo direto das razões das intensidades de duas bandas dos espectros de FTIR e por também ser uma medida considerada quantitativa de determinação dos grupos tosila (O'CONNOR; DUPRÉ; MCCALL, 1957).

Tabela 2. 6 – Razões das bandas de absorvância 1174/1056 para os experimentos de otimização da reação de tosilação da MCC empregando o planejamento de experimentos pela matriz Doehlert, juntamente às % de rendimento e os GS calculados.

<i>Exp.</i>	<i>Temperatura</i>		<i>Tempo</i>		<i>Razão (Tos:UAG)</i>		<i>1174/1056</i>	<i>GS</i>	<i>%rendimento</i>
	x₁	°C	x₂	h	x₃	mol:mol			
1*	0	60	0	38	0	5:1	0,4423	0,61	63,57
2	1	90	0	38	0	5:1	0,4340	0,59	71,07
3	0,5	75	0,866	74	0	5:1	0,4877	0,71	65,94
4	0,5	75	0,2887	50	0,8165	7:1	0,5064	0,74	64,26
5	-1	30	0	38	0	5:1	0,4761	0,68	65,50
6	-0,5	45	-0,866	2	0	5:1	0,3276	0,37	76,33
7	-0,5	45	-0,2887	26	-0,8165	3:1	0,4226	0,57	68,79
8	0,5	75	-0,866	2	0	5:1	0,3541	0,43	72,46
9	0,5	75	-0,2887	26	-0,8165	3:1	0,3023	0,32	77,69
10	0	60	0,5774	62	-0,8165	3:1	0,3846	0,49	60,14
11	-0,5	45	0,866	74	0	5:1	0,5346	0,80	58,70
12	-0,5	45	0,2887	50	0,8165	7:1	0,5294	0,79	64,89
13	0	60	-0,5774	14	0,8165	7:1	0,4416	0,61	70,26
14*	0	60	0	38	0	5:1	0,4368	0,60	68,28
15*	0	60	0	38	0	5:1	0,4326	0,59	70,77

*Ponto central realizado em triplicata.

Nas condições experimentais testadas, as RBs ficaram no intervalo entre 0,3023 e 0,5346 e o desvio padrão para a triplicata no ponto central foi de 0,0269, com coeficiente de variação de 6,20 %, indicando que o método de síntese apresentou boa repetibilidade. Para os GS, estes ficaram no intervalo entre 0,32 e 0,80 com um desvio padrão para a triplicata do ponto central igual a 0,008, corroborando a boa repetibilidade obtida para as RB.

As %rendimento foram todas maiores que 55% e indicam que, mesmo que possam ter ocorrido perdas de amostras durante os processos de limpeza e secagem das amostras, as reações apresentaram um bom rendimento.

Em seguida, as RB obtidas da Tabela 2.6 foram utilizadas para alimentar o Design-Expert® software, trial version #13 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) e a relação entre as variáveis RM, tempo e temperatura foi estabelecida definindo um modelo matemático que permitisse prever as condições das variáveis que resultassem na maior eficiência da reação de tosilação da MCC, a partir da matriz Doehlert. A Tabela 2.7 apresenta os valores dos coeficientes do modelo matemático obtido.

Tabela 2. 7 – Coeficientes estimados para o modelo obtido para o planejamento experimental com a matriz Doehlert e suas significâncias estatísticas ao nível de 95% de probabilidade.

Coeficientes	Valor	Erro	Teste t	Valor-p
Constante	0,437	± 0,016	28,141	0,0111*
x_1	-0,031	± 0,013	2,303	0,0695
x_2	0,088	± 0,013	6,536	0,0012*
x_3	0,075	± 0,013	5,578	0,0025*
x_1x_1	0,018	± 0,024	0,725	0,5008
x_2x_2	-0,021	± 0,024	0,851	0,4334
x_3x_3	-0,008	± 0,023	0,359	0,7344
x_1x_2	-0,042	± 0,031	1,364	0,2308
x_1x_3	0,074	± 0,035	2,146	0,0846
x_2x_3	0,024	± 0,035	0,708	0,5103

*Coeficientes estatisticamente significativos do modelo ($p < 0,05$).

Aplicando um nível de significância de 5%, um coeficiente foi considerado estatisticamente significativo se o valor de p fosse menor que 0,05. Desta forma, a Equação 6 que descreve a otimização da reação de tosilação foi escrita considerando estes parâmetros significativos.

$$\text{RB (u.a.)} = 0,437 + 0,088 \times x_2 + 0,075 \times x_3 \quad (\text{Equação 6})$$

De acordo com o modelo de previsão da reação de tosilação da Equação 6, as variáveis tempo (x_2) e a RM (x_3) se mostraram significativas, o que justificou a necessidade do planejamento experimental para compreensão da interação entre estas. A validade estatística deste modelo pode ser confirmada pela Análise de Variância (ANOVA), apresentada na Tabela 2.8.

Tabela 2. 8 – Análise de variância do modelo quadrático para otimização da reação de tosilação da MCC em fase heterogênea.

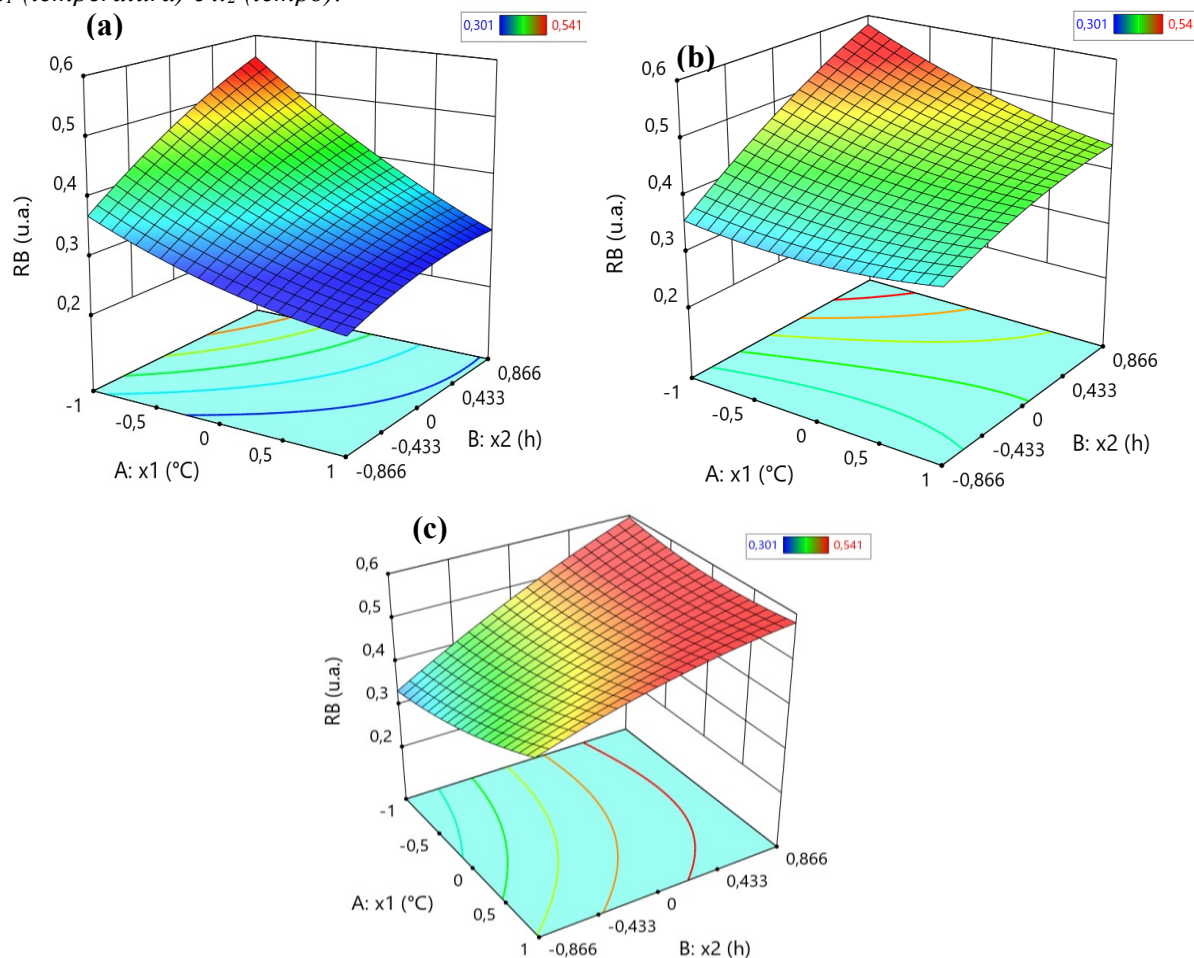
Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Médias Quadradas	F calculado	p
Regressão	0,0633	9	0,007	9,70489	0,01107*
Resíduos	0,0036	5	0,0007		
Falta de Ajuste	0,0036	3	0,0012	50,3405	0,01954*
Erro Puro	5×10^{-5}	2	2×10^{-5}		
Total	0,0669	14			
% variação explicada				94,5855	
% máx. de variação explicável				99,9292	

*Significativo ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

De acordo com a ANOVA da Tabela 2.8, o modelo quadrático da Equação 6 apresenta-se bem ajustado aos resultados experimentais de modificação da MCC por reação de tosilação em fase heterogênea. Este ajuste pode ser confirmado pela significância estatística ($p < 0,05$), ao nível de 95% de probabilidade pelo teste F, do modelo de regressão. Além disso, apesar de o modelo apresentar uma falta de ajuste significativa, 94,6% das variações ocorridas no experimento podem ser explicadas (R^2 ajustado) pelo modelo proposto em face dos 99,93% das variações explicáveis (R^2). As % de variação explicada e % máxima de variação explicável foram obtidas utilizando planilhas de Excel® para tratamento de dados da Matriz Doehlert fornecidos por (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

O modelo quadrático proposto e as interações entre as variáveis (significativas ou não) podem ser mais bem interpretadas a partir dos gráficos tridimensionais das superfícies de respostas apresentados nas Figura 2.6-8.

Figura 2. 6 – Mudanças nas superfícies de resposta para três condições distintas de x_3 (RM): (a) menor; (b) intermediário; e (c) maior valor de RM investigados no planejamento experimental, em função de x_1 (temperatura) e x_2 (tempo).

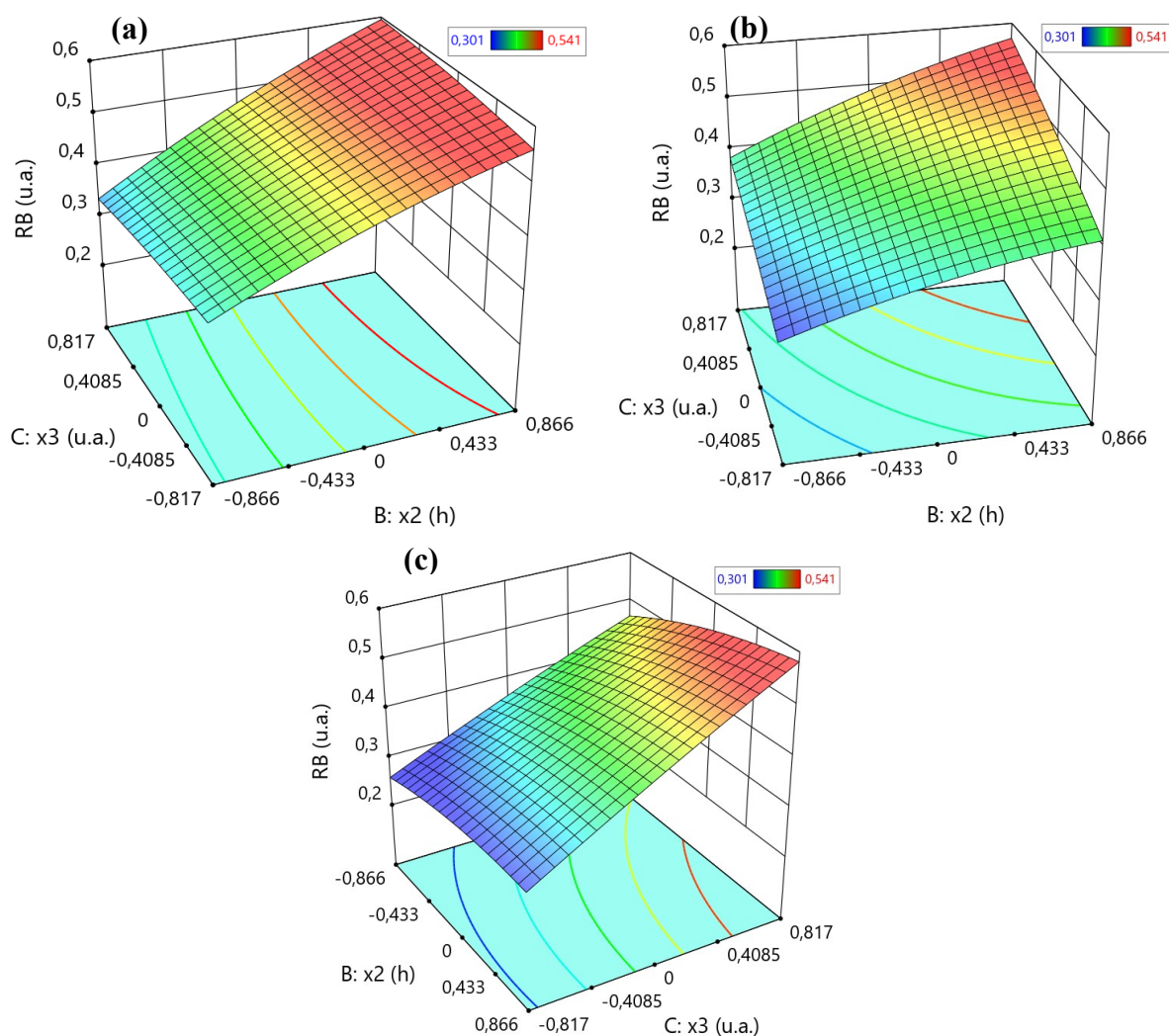


Fonte: o autor.

Da Figura 2.6a-c, nota-se que o aumento das RM são responsáveis por um sensível aumento na eficiência das reações de tosilação, alcançando os maiores valores de RB (0,595 e 0,581) quando se mantêm os maiores tempos reacionais avaliados na (Figura 2.6c). Nessas condições de maiores RM e tempos reacionais, a temperatura não se torna uma variável tão influente nestes tipos de reações. Dessa forma, o planejamento permite propor reações com maiores RM, tempos reacionais tão longos como os avaliados (74 h) e temperaturas reacionais tão baixas quanto as avaliadas (30 °C).

A Figura 2.7 apresenta as mudanças nas superfícies de resposta em relação à temperatura, quando são variadas o tempo e a RM.

Figura 2. 7 – Mudanças nas superfícies de resposta para três condições distintas de x_1 (temperatura): (a) menor; (b) intermediário; e (c) maior valor de temperaturas investigadas no planejamento experimental, em função de x_2 (tempo) e x_3 (RM).

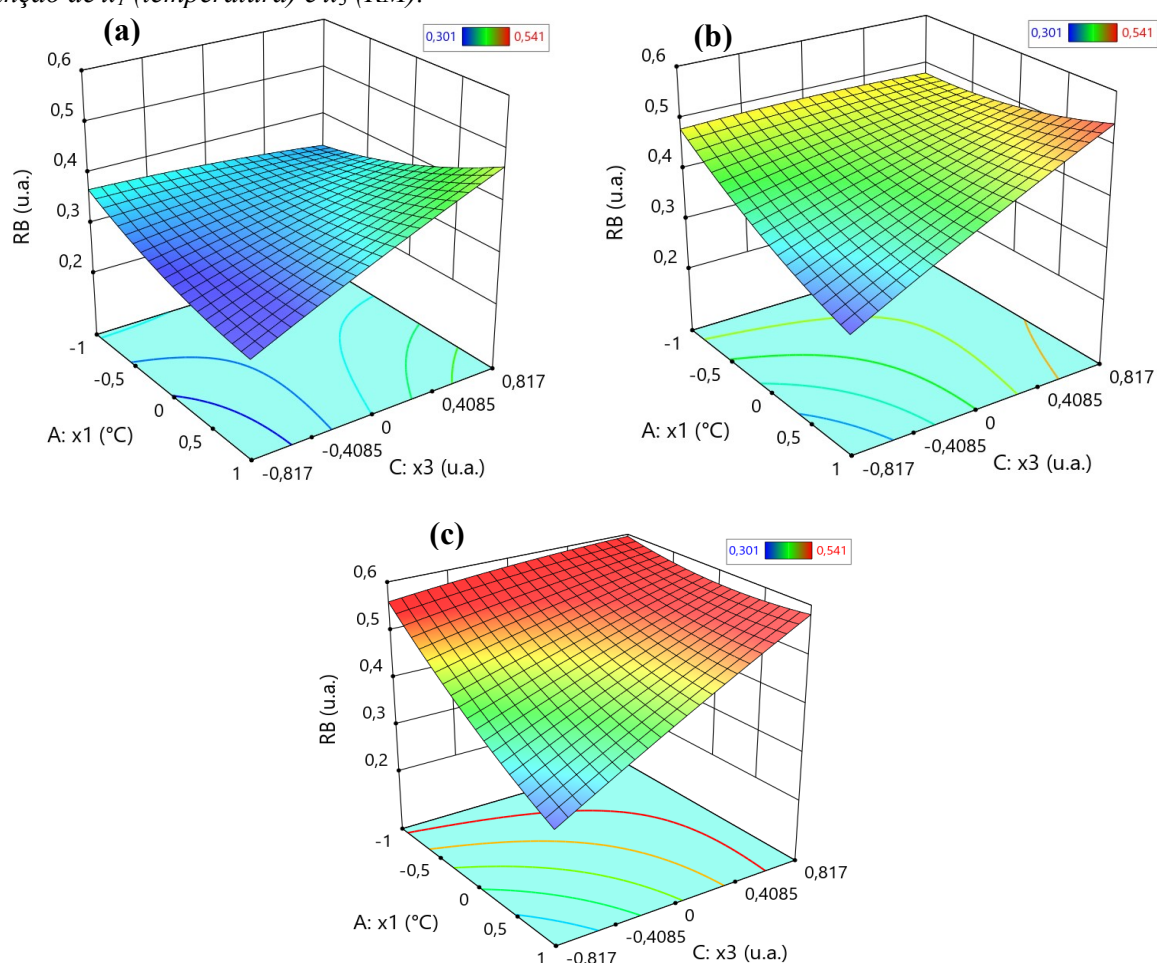


Fonte: o autor.

A Figura 2.7a reforça a afirmação de que maiores valores de RB (0,595) são alcançados mesmo com as menores temperaturas avaliadas (30 °C), desde que as maiores RM e tempos reacionais sejam utilizadas. Nestas condições, fica evidente também que, desde que sejam mantidos longos tempos reacionais, a RM pode ser alterada para modular valores de RB de interesse (entre 0,558 e 0,595). Dessa forma, as superfícies de respostas ilustram o resultado estatístico de que a temperatura não é uma das variáveis significativas para o aumento da eficiência da reação de tosilação. De fato, o aumento da temperatura observado nas Figuras 2.7b e c termina por confinar as variáveis RM e tempo às suas condições já identificadas como melhores (maiores RM e tempos reacionais). Pode-se dizer ainda que, o intervalo de temperatura avaliado neste planejamento foi adequado para a determinação de sua significância estatística.

Em seguida, a Figura 2.8 apresenta os efeitos nas superfícies de resposta para o tempo, quando são variadas a temperatura e a RM.

Figura 2. 8 – Mudanças nas superfícies de resposta para três condições distintas de x_2 (tempo): (a) menor; (b) intermediário; e (c) maior valor de tempo investigado no planejamento experimental, em função de x_1 (temperatura) e x_3 (RM).



Fonte: o autor.

Da Figura 2.28a tem-se que, baixos tempos reacionais (o menor utilizado foi de 2 h) atingem valor de RB entre os menores descritos (0,466), mesmo com a utilização das maiores RM e maiores temperaturas reacionais. Estes resultados indicam que a cinética da reação é lenta e que, mesmo altas temperaturas e excesso de reagentes não são capazes de alterar significativamente a eficiência da reação quando o tempo reacional é reduzido. Já as Figuras 2.8b e c terminam por corroborar as afirmações anteriores, mostrando que os maiores tempos reacionais resultam na maior eficiência reacional e ilustrando como o tempo se comporta como uma das variáveis significativas para a tosilação heterogênea da MCC.

Dessa forma, pode-se dizer que a maior eficiência da tosilação é encontrada em tempos reacionais elevados (74 h) e excesso de reagentes (7:1 – Tos:UAG), porém ainda está sujeita a limitações advindas da dificuldade de acessibilidade e/ou disponibilidade dos grupos hidroxila da celulose em meio heterogêneo. Ainda mais que, como discutido no item 1.1.1.1 da Introdução, as reações de tosilação nestas condições apresentam uma substituição preferencial na posição do C6, mesmo que sem uma pronunciada regioseletividade para baixos e médios valores de GS (KLEMM *et al.*, 1998a, b). Ademais, outros autores também encontraram as melhores condições reacionais em tempos reacionais tão longos como vários dias e com RM de até 40:1 (Tos:UAG), alcançando GS de até 1,52 para reações heterogêneas (GERICKE *et al.*, 2012; KNAUS; MAIS; BINDER, 2003).

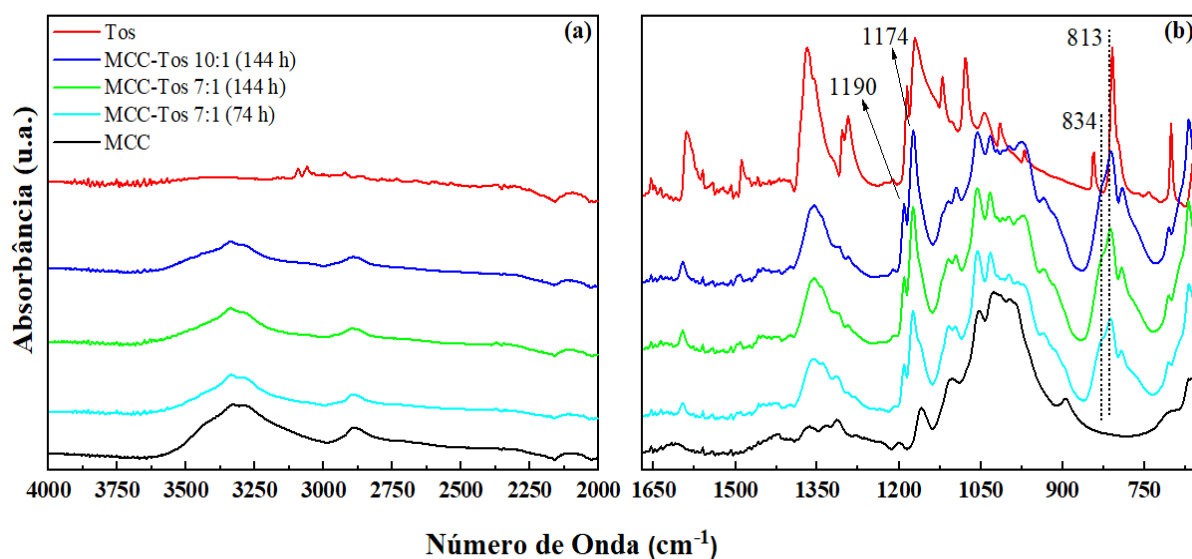
Ainda sobre as três variáveis investigadas, pode-se dizer que maiores temperaturas podem não ser significativas para este tipo de reação por não garantirem um aumento considerável na difusão dos reagentes e seu encontro com as regiões mais reativas das UAG. Dessa forma, temperaturas próximas à ambiente foram definidas como condição reacional de tosilação para este trabalho.

2.2.1.3 Síntese do Tosilato de Celulose na Condição Otimizada pelo Planejamento Experimental por Matriz Doehlert

De posse dos resultados do planejamento experimental, foram definidas como condições otimizadas para as variáveis avaliadas: o tempo reacional de 74 h; RM de 7:1 (Tos:UAG); e temperatura de 30 °C. Além das condições otimizadas utilizadas na síntese do MCC-Tos 7:1 (74 h), este trabalho aproveitou-se do fato de que o planejamento experimental por Matriz Doehlert identifica as variáveis mais significativas e as extrapolou para valores não necessariamente dentro dos intervalos avaliados (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Assim, foram testadas duas combinações das variáveis otimizadas: aumentando o tempo reacional para 144 h

(MCC-Tos 7:1 – 144 h) e aumentando a RM para 10:1 (MCC-Tos 10:1 - 144 h). Dentre os fatores que justificaram a extrapolação do tempo reacional para 144 h, consta as observações de que, após este tempo, um pseudoequilíbrio reacional foi atingido para uma outra condição reacional apresentada na Figura 2.4 (síntese do MCC-Tos com RM 5:1 e tempo de até 216 h). Os espectros por FTIR dos produtos obtidos estão apresentados na Figura 2.9.

Figura 2. 9 – Espectros de FTIR normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} das amostras de MCC-Tos após definição das condições otimizadas (a) ampliados na faixa de $4000\text{ a }2000\text{ cm}^{-1}$ e (b) de $1670\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$.



Fonte: o autor.

Dos espectros da Figura 2.9, alterações relevantes podem ser observadas na região de ampliação entre $1670\text{ e }650\text{ cm}^{-1}$ (Figura 2.9b): uma banda em cerca de 1596 cm^{-1} associada ao estiramento da ligação C=C do anel aromático se torna mais evidente do que nos espectros das Figuras 2.1-5; a banda em 1360 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico SO_2 se sobrepõe em intensidade à banda em 1365 cm^{-1} dos grupos CH_2 da celulose, podendo ser distinguida claramente; outras bandas características do grupo tosila como a banda em 1190 cm^{-1} relacionada ao grupo sulfonato, a banda em 1174 cm^{-1} atribuída ao estiramento simétrico do grupo SO_2 , em $834\text{ e }813\text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao estiramento do anel aromático *p*-substituído e ao estiramento S – O – C do grupo tosila, respectivamente, apresentam uma tendência de aumento em suas intensidades, sugerindo que as alterações nas condições reacionais conseguiram aumentar a eficiência da reação de tosilação (GERICKE *et al.*, 2012; O’CONNOR; DUPRÉ; MCCALL, 1957).

Para verificar essa afirmação, utilizou-se novamente o método descrito por Rahn e colaboradores (1996) do cálculo das razões das bandas (sem tratamentos matemáticos) em 1056 cm^{-1} e 1174 cm^{-1} (RAHN *et al.*, 1996) e acrescentou-se os GS calculados conforme segue descrito no item 2.2.1.4. Os respectivos valores de RB e GS calculados estão apresentados na Tabela 2.9.

Tabela 2. 9 – Cálculo das razões de absorbância entre as bandas 1174/1056 obtidas por FTIR e do GS para as amostras produzidas em condições otimizadas e de extrapolação das otimizações.

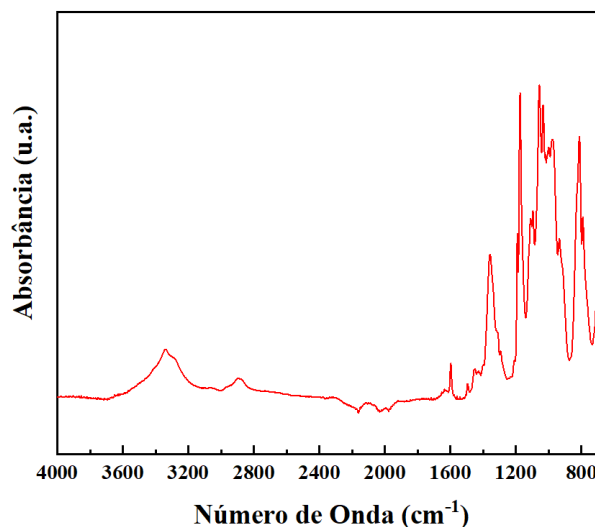
<i>Amostras</i>	<i>1174 cm⁻¹</i>	<i>1056 cm⁻¹</i>	<i>1174/1056</i>	<i>GS</i>	<i>%rendimento</i>
<i>MCC-Tos 7:1 74 h</i>	0,1328	0,2052	0,6472	1,04	56,17
<i>MCC-Tos 7:1 144 h</i>	0,2268	0,2584	0,8774	1,51	46,75
<i>MCC-Tos 10:1 144 h</i>	0,2406	0,2463	0,9769	1,72	73,65

Fonte: o autor.

O valor de RB igual a 0,6472 para o MCC-Tos 7:1 (74 h) comprova a boa previsibilidade do planejamento experimental, uma vez que o valor teórico calculado pela Equação 6 para estas condições otimizadas é de $0,595 \pm 0,027$. Para as condições extrapoladas, as RBs também apresentaram aumento conforme o tempo reacional e a RM foram aumentados. Este aumento seguiu o comportamento esperado pela previsão do modelo matemático e suas superfícies de resposta, mesmo que as condições reacionais de tempo e RM excedessem os limites investigados.

Ainda da Tabela 2.9, as RB mostram que o aumento no tempo para as amostras com mesma RM (7:1) representou um incremento de cerca de 0,2 nos valores de RB e de 0,5 no GS. Entre as amostras de mesmo tempo reacional (144 h), o aumento nas RM foi responsável por um novo incremento de mais cerca de 0,15 nos valores de RB e de 0,2 no GS. Sendo assim, foi definida como condição experimental para produção do tosilato de celulose em fase heterogênea (MCC-Tos Otm): um tempo reacional de 144 h; RM de 10:1 e temperatura de 30 °C. O espectro por FTIR (sem normalização) da amostra MCC-Tos 10:1 144 h, definida como otimizada, está apresentado na Figura 2.10 e será denominada como MCC-Tos Otm no decorrer do texto.

Figura 2. 10 – Espectro por FTIR da amostra MCC-Tos Otm.



Fonte: o autor.

Da Tabela 2.9 e Figura 2.10, destaca-se que o derivado MCC-Tos Otm apresentou um GS igual a 1,72 e será este o derivado utilizado para síntese da MCC-Az Otm e, subsequente, utilização para os testes de imobilização da enzima lipase CalB.

2.2.1.4 Determinação do GS por Análise Elementar

Têm-se na literatura, alguns exemplos que correlacionam o GS às intensidades de absorvância de determinadas bandas ou RB através de uma curva de correlação linear, sendo que, para o tosilato de celulose, Rahn e colaboradores (1996) já comprovaram a validade deste método utilizando as RB para a intensidade das absorvâncias das bandas em 1174 e 1056 cm^{-1} (FEI *et al.*, 2017; RAHN *et al.*, 1996). Dessa forma, este trabalho se valeu deste conhecimento prévio para investigar o estabelecimento de uma reação linear entre o GS e as RB calculadas a partir dos espectros de FTIR das amostras de MCC-Tos produzidas nas etapas anteriores. Estas amostras foram selecionadas conforme seus valores de RB de forma a garantir uma ampla faixa de RBs a serem investigadas.

Para determinar o GS, as amostras selecionadas foram caracterizadas por Análise Elementar e, das porcentagens de enxofre (%S) obtidas para cada amostra, foram calculadas as respectivas quantidades de enxofre (em massa e em número de mol) presentes. Estes, por sua vez, foram relacionados diretamente ao número de mol de grupos toсила, uma vez que cada grupo possui somente um enxofre em sua composição (Figura 1.3). Assim, foi possível estimar o GS dos derivados toсилаtos produzidos conforme dados apresentados na Tabela 2.10.

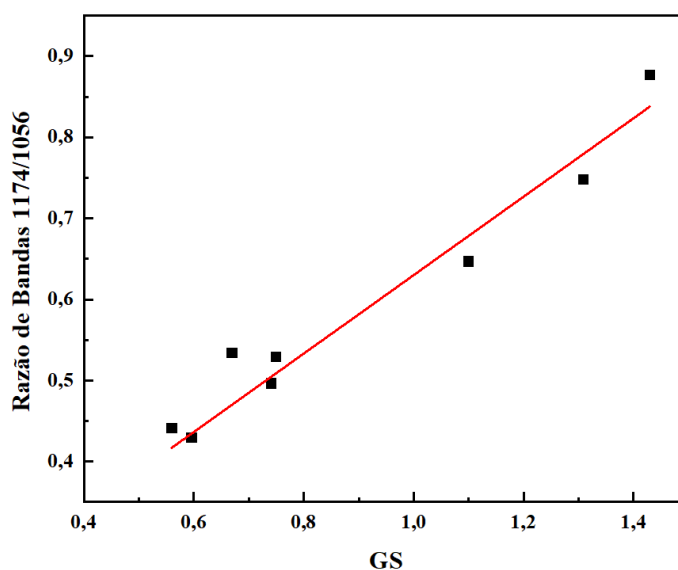
Tabela 2. 10 – Valores de GS estimados a partir dos dados de %S obtidos por Análise Elementar para amostras MCC-Tos e suas respectivas RB.

<i>Amostras</i>	<i>m_{amostra} (mg)</i>	<i>%S</i>	<i>n_s (μmol)</i>	<i>RB</i>	<i>GS</i>
<i>MCC-Tos 5:1-24 h</i>	2,230	3,055	2,1245	0,4298	0,5951
<i>Exp 13</i>	2,717	2,871	2,4327	0,4416	0,5593
<i>Exp 11</i>	2,814	3,432	3,0119	0,5346	0,6686
<i>MCC-Tos 4,5:1-48h</i>	2,259	3,802	2,6784	0,4969	0,7407
<i>Exp 12</i>	2,584	3,845	3,0985	0,5294	0,7491
<i>MCC-Tos 7:1 74 h</i>	2,443	5,630	4,2968	0,6472	1,099
<i>MCC-Tos 7:1-96h</i>	2,442	6,714	5,1131	0,7486	1,308
<i>MCC-Tos 7:1-144 h</i>	2,771	7,336	6,3399	0,8774	1,429

Fonte: o autor.

A partir dos dados da Tabela 2.10, foi plotado um gráfico de GS em função das RB (Figura 2.11) e determinado seu ajuste linear, descrito pela Equação 7.

Figura 2. 11 – Gráfico do GS do grupo tosilato em função das razões de banda 1174/1056.



Fonte: o autor.

$$GS = (RB - 0,14633)/0,48356 \quad (\text{Equação 7})$$

$$r = 0,98 \text{ e } R^2_{\text{ajust.}} = 0,96$$

Dessa forma, observou-se que o método de determinação das RB por FTIR foi quantitativo para estas análises e pode ser relacionado ao GS do tosilato. Assim, a Equação 7 foi aplicada neste trabalho em todas as determinações dos GS para o grupo tosilato.

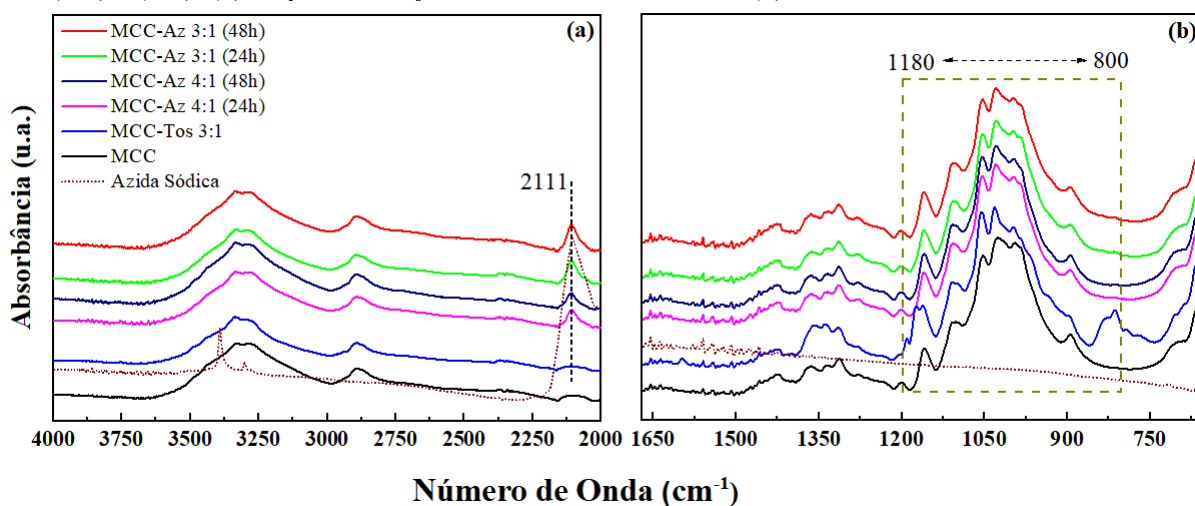
2.2.2 Síntese da Azido Celulose (MCC-Az)

Como descrito no item 2.2.2, a reação de formação da MCC-Az empregada neste trabalho, se baseou na substituição nucleofílica do grupo toсила pelo grupo azida, conforme mecanismo apresentado na Figura 1.8. Os derivados MCC-Az produzidos por essa metodologia, foram então caracterizados conforme descrito abaixo.

2.2.2.1 Caracterização por FTIR da MCC-Az

A fim de investigar o comportamento da reação de azidação em tosilatos de celulose com diferentes GS, todas amostras MCC-Tos produzidas em etapa anterior foram submetidas a azidação por reação com azida sódica em DMSO. Para tanto, os primeiros ensaios de azidação foram realizados utilizando como precursores as amostras MCC-Tos 3:1 e 4:1 (48 h). Foi utilizada uma RM fixa de 5:1 (Az:UAG) e tempos reacionais de 24 e 48 h de reação, a 70 °C. Os produtos foram avaliados por FTIR e os espectros estão apresentados na Figura 2.12.

Figura 2. 12 – Espectros por FTIR, normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} , das amostras azida sódica; MCC; MCC-Tos; e MCC-Az após 24 e 48 h de azidação dos precursores MCC-Tos (3:1) e (4:1), (a) ampliados na faixa de 4000 a 2000 cm^{-1} e (b) de 1670 a 650 cm^{-1} .



Fonte: o autor.

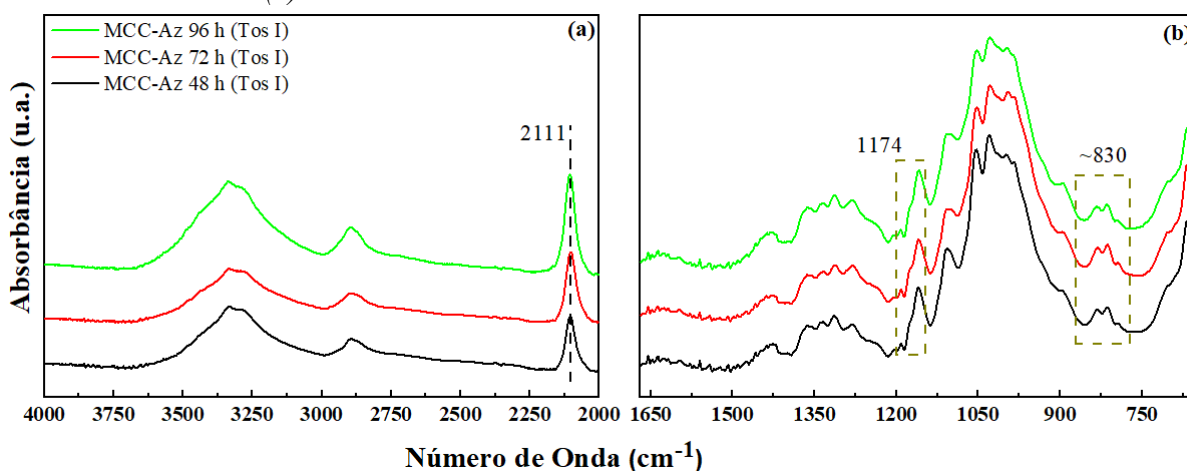
Para a ampliação entre 4000 e 2000 cm^{-1} da Figura 2.12a, os espectros apresentam as bandas características da celulose em aproximadamente 3314 cm^{-1} e 2891 cm^{-1} , cujas atribuições já foram discutidas, porém o surgimento da banda em 2111 cm^{-1} atribuída ao estiramento do grupo azida indica a formação do produto MCC-Az. A posição desta banda em 2111 cm^{-1} também no espectro da azida sódica é a informação mais relevante obtida deste

espectro. Quanto à ampliação de 1650 a 650 cm^{-1} da Figura 2.12b, verifica-se que as bandas que evidenciam a tosilção da celulose em cerca de 1190 cm^{-1} - $\nu_{\text{sim}}\text{sulfonato}$, 1174 cm^{-1} - $\nu_{\text{sim}}\text{SO}_2$, e em 834 e 813 cm^{-1} , ν -anel aromático *p*-substituído e $\nu\text{S-O-C}$, respectivamente, estão ausentes nos espectros das MCC-Az. Essas ausências combinadas ao surgimento da banda característica do grupo azida, indicam que ambos os precursores MCC-Tos foram convertidos ao derivado celulósico MCC-Az (GERICKE *et al.*, 2012; O'CONNOR; DUPRÉ; MCCALL, 1957).

Para os outros precursores MCC-Tos, os ensaios com as reações de azidação foram continuados somente após a otimização das condições experimentais da reação de tosilção da MCC em fase heterogênea. Portanto, a MCC-Tos produzida com tempo, temperatura e RM iguais a 144 h, 30 °C e 7:1 (Tos:UAG), respectivamente, (denominada MCC-Tos I daqui em diante) e a MCC-Tos Otm foram os únicos precursores continuados nos estudos. Como discutido anteriormente, estes precursores apresentaram GS igual a 1,51 e 1,72.

A primeira condição testada para azidação da MCC-Tos após otimização manteve a RM de 5:1 (Az:UAG) e a temperatura de 70 °C, com tempos reacionais avaliados de 48, 72 e 96 h. Para esta etapa somente a MCC-Tos I foi utilizada como precursor. Os espectros por FTIR dos produtos em cada tempo reacional estão apresentados na Figura 2.13.

Figura 2. 13 – Espectros por FTIR, normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} , das amostras MCC-Az após 48, 72 e 96 h de azidação do precursor MCC-Tos I, com ampliação (a) na faixa de 4000 a 2000 cm^{-1} e (b) de 1670 a 650 cm^{-1} .



Fonte: o autor.

Um olhar qualitativo para a Figura 2.13a apresenta indícios de que as bandas correspondentes ao grupo azida em 2111 cm^{-1} aumentaram de intensidade conforme aumenta o tempo reacional. Como forma de obter um valor quantitativo para este aumento, o mesmo raciocínio do cálculo das RB para MCC-Tos foi utilizado aqui: foi calculado a razão entre as

absorbâncias da banda azida em 2111 cm^{-1} e da banda em 1056 cm^{-1} característica da estrutura interna da celulose (C1 – O – C5) e que, portanto, não é alterada durante o processo reacional (FEI *et al.*, 2017; RAHN *et al.*, 1996). A Tabela 2.11 apresenta os resultados das RB em 2111/1056 para os espectros da Figura 2.12 e Figura 2.13.

Tabela 2. 11 – Cálculo das razões de absorvância entre as bandas 2111/1056 obtidas por FTIR para as amostras MCC-Az produzidas a partir dos precursores MCC-Tos I, 3:1 e 4:1 (Tos:UAG).

<i>Amostras</i>	<i>2111 cm⁻¹</i>	<i>1056 cm⁻¹</i>	<i>2111/1056</i>
<i>MCC-Az - 24 h (3:1)</i>	0,0345	0,2150	0,1605
<i>MCC-Az - 48 h (3:1)</i>	0,0250	0,1224	0,2047
<i>MCC-Az - 24 h (4:1)</i>	0,0253	0,1723	0,1471
<i>MCC-Az - 48 h (4:1)</i>	0,0175	0,1204	0,1453
<i>MCC-Az - 48 h (MCC-Tos I)</i>	0,0512	0,1986	0,2576
<i>MCC-Az - 72 h (MCC-Tos I)</i>	0,0987	0,2863	0,3446
<i>MCC-Az - 96 h (MCC-Tos I)</i>	0,0628	0,1433	0,4378

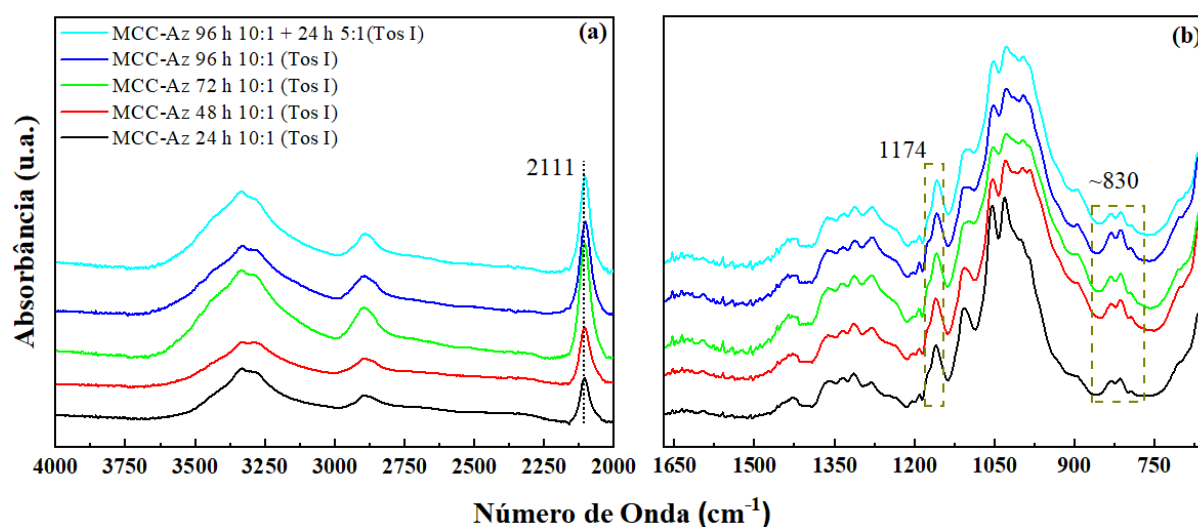
Fonte: o autor.

Comparando-se os valores de RB da Tabela 2.11, observa-se que os maiores valores foram obtidos para o derivado produzido a partir da MCC-Tos I, uma vez que este derivado também foi o que apresentou o maior GS para o grupo tosila. Este resultado está de acordo com o esperado, já que um maior número de grupos tosila indica um maior número de grupos suscetíveis à substituição pelo grupo azida. Para as MCC-Az produzidas a partir da MCC-Tos (4:1), as RB foram as menores e praticamente não apresentaram diferença entre os tempos reacionais, indicando que, como este precursor também apresentou o menor GS de tosila entre os estudados, um tempo de 24 h já foi suficiente para substituir os grupos tosila disponíveis. No entanto, para os precursores com mais grupos tosila ficou evidente que tempos de, ao menos 72 h, seriam requeridos para uma substituição eficiente pelos grupos azida.

Outro fator importante da Figura 2.13b, é a presença das bandas associadas ao tosila de celulose em 834 cm^{-1} e 813 cm^{-1} , de ν -anel aromático *p*-substituído e $\nu\text{S-O-C}$, respectivamente, e de um “ombro” em cerca de 1174 cm^{-1} referente ao $\nu_{\text{sim}}\text{SO}_2$, na região de ampliação de $1650\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$. A presença dessas bandas indica que, apesar dos maiores valores de RB 2111/1056 para as MCC-Az (MCC-Tos Otm), ainda restaram grupos tosila que não foram completamente substituídos por grupos azida, mesmo após 96 h de reação. Ensaios com maiores tempos reacionais que 96 h, retornaram resultados que indicavam que a reação de substituição havia atingido equilíbrio.

Em seguida, propôs-se dobrar a RM de 5:1 para 10:1 (Az:UAG) na tentativa de aumentar a conversão da MCC-Tos à MCC-Az, acompanhando-se as alterações das bandas dos espectros por FTIR. A Figura 2.14 apresenta os espectros das MCC-Az produzidas em tempos reacionais de 24 a 96 h.

Figura 2. 14 – Espectros por FTIR, normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} , das amostras MCC-Az (10:1) após 24, 48, 72 e 96 h de azidação do precursor MCC-Tos I, com ampliação (a) na faixa de $4000\text{ a }2000\text{ cm}^{-1}$ e (b) de $1670\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$.



Fonte: o autor.

É possível observar da Figura 2.14a que as bandas em 2111 cm^{-1} aumentam de intensidade conforme o aumento do tempo reacional, atingindo seu máximo em 72 h. Além disso, a presença de bandas referentes ao grupo tosila indicam que o aumento da RM de 5:1 para 10:1 não foi suficiente para garantir a total substituição dos grupos tosila por grupos azida (Figura 2.14b). Como o precursor MCC-Tos I é parcialmente solúvel em DMSO, admite-se que nesta etapa de modificação da celulose, a azidação ocorre preferencialmente na porção mais solubilizada do derivado tosila, o que poderia aumentar a acessibilidade de alguns grupos tosila preferencialmente a outros. Além disso, como a substituição pelo grupo tosila não ocorre unicamente no C6, grupos tosila ligados aos C2 e C3 também podem apresentar acessibilidade reduzida (HEUSER; HEATH; SHOCKLEY, 1950). Assim, mesmo um excesso de reagentes, nestas condições reacionais, não fora eficaz em garantir a substituição de todos os grupos tosila. As RB de $2111/1056$ foram calculadas e estão dispostas na Tabela 2.12.

Tabela 2. 12 – Cálculo das razões de absorvância entre as bandas 2111/1056 obtidas por FTIR para as amostras MCC-Az (10:1) produzidas a partir do precursor MCC-Tos I.

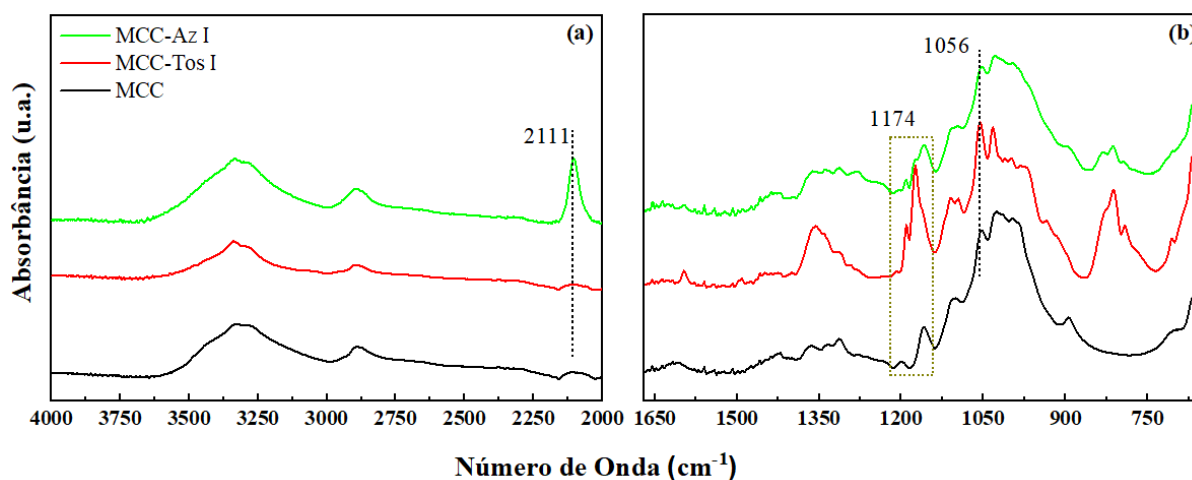
Amostras	2111 cm^{-1}	1056 cm^{-1}	2111/1056
MCC-Az - 24 h	0,0752	0,2884	0,2606
MCC-Az - 48 h	0,0628	0,2021	0,3110
MCC-Az - 72 h	0,0667	0,1183	0,5633
MCC-Az - 96 h	0,0636	0,1416	0,4492
MCC-Az - 96 h + 5:1 24 h	0,0635	0,1338	0,4744

Fonte: o autor.

Analisando os dados da Tabela 2.12, as RB mostram que tempos reacionais maiores que 72 h não foram mais eficientes na síntese da MCC-Az. Além disso, a adição de mais um excesso de reagente na proporção 5:1 (Az:UAG) após 96 h de reação iniciada com a RM 10:1 (Az:UAG) também não se mostrou mais eficiente para formação da MCC-Az. Dessa forma, as condições experimentais para síntese da MCC-Az foram definidas como RM 5:1 (Az:UAG), tempo reacional de 72 h e temperatura de 70 °C.

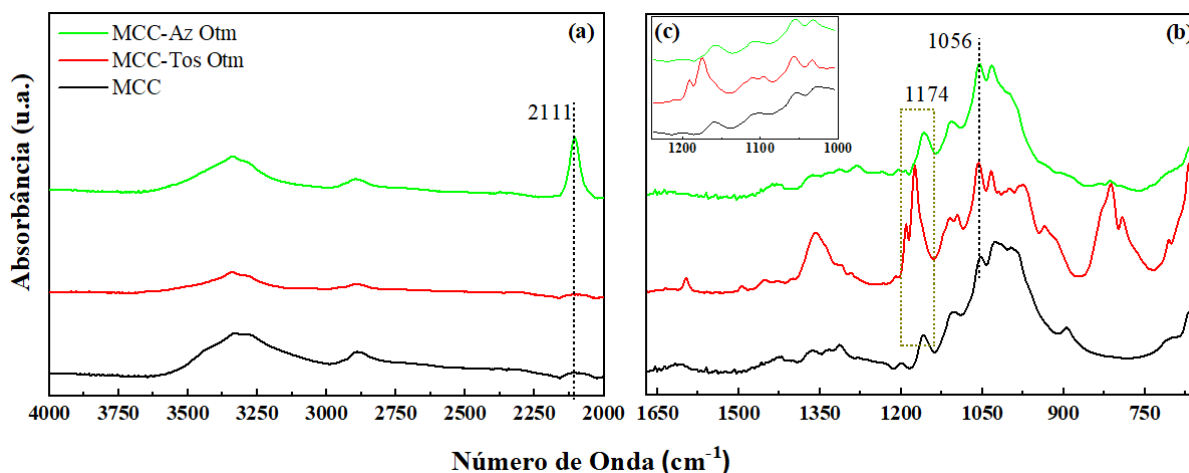
Foram produzidos dois materiais nessas condições otimizadas: um a partir da MCC-Tos I (GS=1,51); e um a partir da MCC-Tos Otm (GS=1,72), sendo denominadas MCC-Az I e MCC-Az Otm, respectivamente. Os espectros por FTIR destes materiais estão apresentados nas Figuras 2.15 e 2.16 juntamente aos da MCC e do MCC-Tos precursor, para melhor visualização das alterações espectrais promovidas pelas reações de tosilação e azidação da celulose.

Figura 2. 15 – Espectros de FTIR comparativos das amostras de MCC, MCC-Tos I e MCC-Az I, com ampliação (a) na faixa de 4000 a 2000 cm^{-1} e (b) de 1670 a 650 cm^{-1} , normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} .



Fonte: o autor.

Figura 2. 16 – Espectros de FTIR comparativos das amostras de MCC, MCC-Tos Otm e MCC-Az Otm, com ampliação (a) na faixa de 4000 a 2000 cm^{-1} , (b) de 1670 a 650 cm^{-1} e (c) 1250 a 1000 cm^{-1} , normalizados em relação à intensidade da banda em 1056 cm^{-1} .



Fonte: o autor.

Em ambas as Figuras 2.15 e Figura 2.16, fica claro as diferenças espectrais com a diminuição de praticamente todas as bandas características de MCC-Tos I e Otm nos espectros das MCC-Az, como discutido anteriormente nos FTIR das outras azido celuloses. Além disso, a partir das intensidades das absorvâncias das bandas em 2111 e 1056 cm^{-1} (0,0468 e 0,0998, para MCC-Az I; 0,05569 e 0,1198, para MCC-Az Otm, respectivamente) foram obtidos valores de RB iguais a 0,4688 e 0,4646, para MCC-Az I e MCC-Az Otm, respectivamente, denotando resultados para a reação de azidação ligeiramente superiores aos das MCC-Az produzidas com as mesmas RM (5:1, Az:UAG) e próximo aos encontrados nos experimentos com RM 10:1.

Dessa forma, ambos os materiais MCC-Az I e MCC-Az Otm apresentarem bons resultados de conversão dos grupos tosila a grupos azida, e a MCC-Az Otm foi selecionada como suporte para os testes de imobilização da enzima CalB, indicados no item 3.1.3.

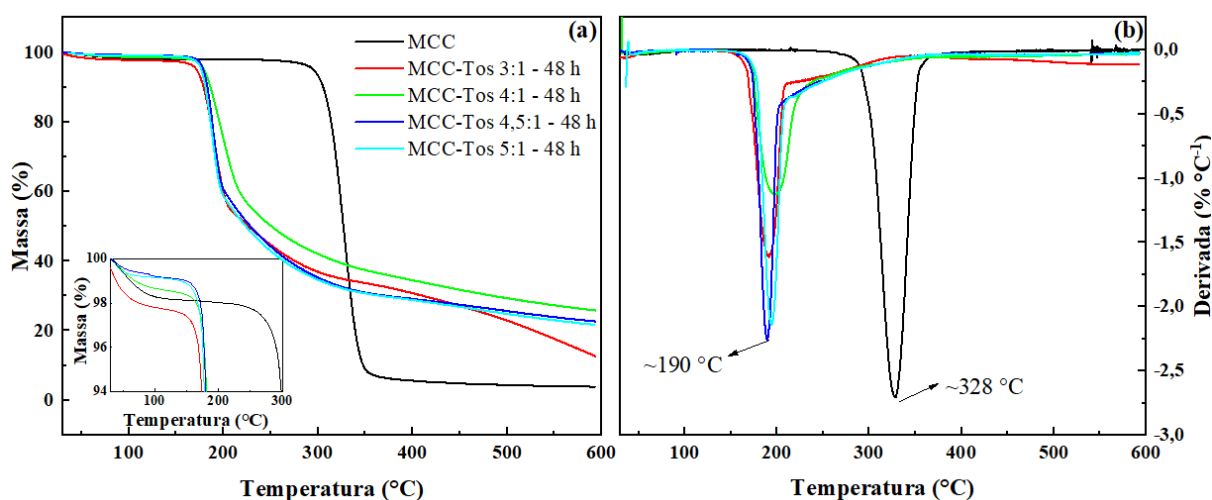
2.2.3 Análise Termogravimétrica e Termogravimetria Derivada (TGA/DTG)

Neste trabalho, os derivados celulósicos produzidos foram caracterizados quanto a seus comportamentos térmicos por uma análise combinada de suas curvas térmicas por TGA/DTG. Estas técnicas são de grande relevância para as caracterizações destas, uma vez que permitem analisar o comportamento térmico dos derivados e associar eventos térmicos característicos de cada modificação (COURA, 2015; HEINZE *et al.*, 1996; SHEN; GU, 2009).

2.2.3.1 Curvas TGA/DTG para o Tosilato de Celulose

Primeiramente, a fim de conhecer o comportamento térmico do tosilato de celulose, os derivados MCC-Tos produzidos com RM 3:1; 4:1; 4,5:1 e 5:1 (Tos:UAG) e tempo reacional de 48 h das primeiras condições reacionais investigadas, foram analisadas por TGA/DTG juntamente com a MCC. Estas curvas TGA/DTG seguem apresentadas na Figura 2.17.

Figura 2. 17 – (a) Curvas TGA e (b) DTG para a MCC; e para os derivados MCC-Tos 3:1; MCC-Tos 4:1; MCC-Tos 4,5:1; e MCC-Tos 5:1 com tempo reacional de 48 h. Taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de N_2 a $60\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$.



Fonte: o autor.

Destaca-se das curvas TGA da Figura 2.17a um primeiro evento térmico responsável pela perda de massa de até 2,35% (para MCC-Tos 3:1) que ocorre a temperaturas inferiores a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, provavelmente relacionado à dessorção de água dos materiais celulósicos. Este evento apresenta uma tendência de diminuição na perda de massa conforme as RB do MCC-Tos aumentam Tabela 2.13 que pode estar relacionado à diminuição da hidrofilicidade do material com a inserção do grupo tosila (HAMDAOUI *et al.*, 2020; HEINZE *et al.*, 1996).

Tabela 2. 13 – Porcentagens de perda de massa relacionadas à saída de água (%P.M. H_2O) para a MCC e os derivados MCC-Tos (3:1), (4:1), (4,5:1) e (5:1).

Amostras	%P.M. (H_2O)	RB	GS
MCC	1,80	--	--
MCC-Tos 3:1 - 48 h	2,35	0,3979	0,52
MCC-Tos 4:1 - 48 h	1,52	0,3120	0,34
MCC-Tos 4,5:1 - 48 h	0,90	0,4969	0,72
MCC-Tos 5:1 - 48 h	0,88	0,5077	0,75

Fonte: o autor.

Em seguida, o segundo e principal evento térmico dos derivados MCC-Tos tem uma T_{onset} (temperatura inicial extrapolada do evento) acima de 175 °C e uma perda de massa (%P.M.) entre 37 e 40%, que está relacionada à cisão dos grupos tosila do MCC-Tos e à formação de ácido *p*-toluenossulfônico (HEINZE *et al.*, 1996; JAIN; LAL; BHATNAGAR, 1987, 1986). Já a MCC, tem uma T_{onset} para o principal evento térmico em cerca de 309 °C. Este evento é responsável pela decomposição de praticamente todo o material (%P.M. igual a 91 %) e é atribuída à decomposição das cadeias poliméricas da celulose (MOON *et al.*, 2011).

O terceiro e último evento térmico para os materiais MCC-Tos, se inicia logo após a T_{endset} (temperatura final extrapolada) do evento principal, entre 196 e 215 °C, e está associado à despolimerização das cadeias celulósicas pela ação desidratante do ácido *p*-toluenossulfônico em atmosfera inerte e livre de água. Esta reação se inicia durante o segundo evento térmico e, mais especificamente, ocorre pela rápida protonação do oxigênio glicosídico e consequente ruptura da ligação glicosídica, culminando na despolimerização da celulose (HEINZE *et al.*, 1996). Para a MCC, o terceiro evento térmico também se inicia logo após a T_{endset} (em cerca de 343 °C) e, por sua vez, se deve à carbonização dos resíduos provenientes da decomposição das cadeias poliméricas (TEIXEIRA *et al.*, 2010).

As temperaturas T_{onset} , T_{endset} foram obtidas pelas intersecções de retas tangentes às linhas de base antes e após determinado evento, definidas em software Trios, versão 5.1.1, fornecido pela TA Instruments®. As $T_{\text{máx}}$ (temperatura de degradação na taxa máxima de perda de massa) foram obtidas a partir das curvas DTG, sendo iguais ao valor do pico máximo de determinado evento. Todas estas temperaturas estão descritas na Tabela 2.14, juntamente com as perdas de massa associadas ao evento térmico principal para cada um dos materiais analisados.

Tabela 2. 14 – Dados termogravimétricos obtidos a partir das curvas TGA/DTG para a MCC e os derivados MCC-Tos (3:1), (4:1), (4,5:1) e (5:1), comparados às RB calculados por FTIR e aos GS.

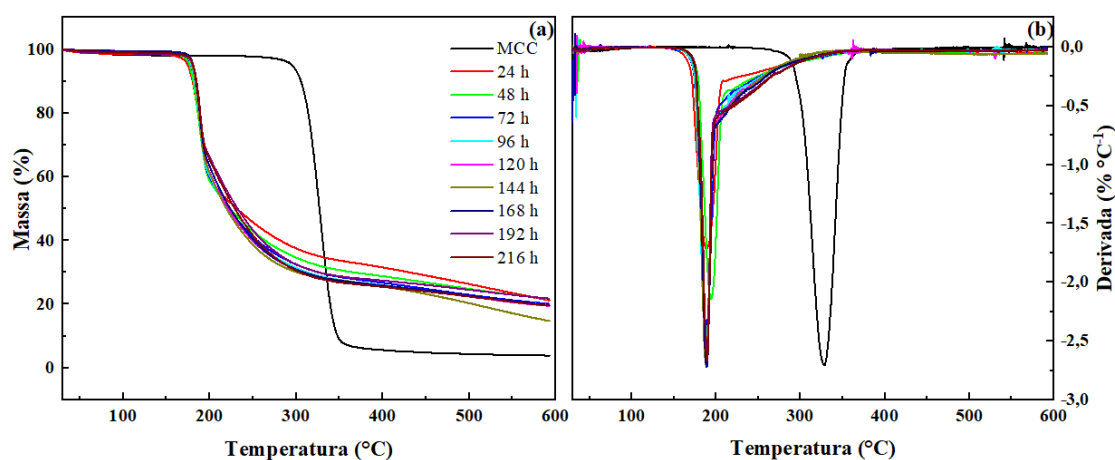
<i>Amostras</i>	T_{onset} (°C)	T_{endset} (°C)	$T_{\text{máx}}$ (°C)	%P.M.	%resíduo	RB	GS
<i>MCC</i>	309,22	342,86	328,54	91,459	3,865	--	--
<i>MCC-Tos 3:1 - 48 h</i>	175,83	201,72	191,10	39,951	12,690	0,3979	0,52
<i>MCC-Tos 4:1 - 48 h</i>	179,68	215,53	197,29	38,387	25,797	0,3120	0,34
<i>MCC-Tos 4,5:1 - 48 h</i>	179,73	197,03	189,41	37,725	22,657	0,4969	0,72
<i>MCC-Tos 5:1 - 48 h</i>	177,61	196,25	194,15	38,074	21,710	0,5077	0,75

Fonte: o autor.

A partir dos dados da Figura 2.17a e Tabela 2.14, também fica claro que a presença de grupos tosila aceleram a decomposição térmica dos derivados MCC-Tos, uma vez que as $T_{\text{máx}}$ ficam abaixo de 200 °C (HAMDAOUI *et al.*, 2020). Quanto à influência do número de grupos tosila inseridos, determinados pelas RB 1174/1056 e pelos GS, não é possível fazer suposições uma vez que os valores dos dados termogravimétricos calculados são todos muito próximos e uma tendência não fica clara. Porém, para a T_{endset} , uma ligeira tendência de diminuição da estabilidade térmica do segundo evento pode estar associada ao aumento da quantidade de ácido *p*-toluenossulfônico (um forte agente desidratante) formado durante o primeiro evento (HEINZE *et al.*, 1996).

Em seguida, foram analisadas por TGA/DTG as amostras MCC-Tos produzidas com RM 5:1 (Tos:UAG) pelos tempos de 24 a 216 h, utilizadas como parâmetro de determinação dos níveis superiores e inferiores da variável tempo no planejamento experimental por Matriz Doehlert. As curvas TGA/DTG estão dispostas na Figura 2.18.

Figura 2. 18 – (a) Curvas TGA e (b) DTG para as amostras MCC-Tos (5:1) em tempos reacionais de 24 a 216 h e MCC sem modificação. Taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e fluxo de N₂ a 60 cm³ min⁻¹.



Fonte: o autor.

Inicialmente, duas observações importantes podem ser feitas relacionadas às estabilidades térmicas dos derivados MCC-Tos: estas são bem próximas tanto quando se considera o primeiro evento térmico das curvas TGA da Figura 2.18a, quanto os picos referentes às $T_{\text{máx}}$ (Figura 2.18b) indicando a formação do MCC-Tos; e, que a condição de tempo reacional prolongado, à temperatura de 30 °C, não prejudicou a estabilidade térmica dos materiais. Os dados termogravimétricos obtidos para estas curvas TGA/DTG estão descritos na Tabela 2.15.

Tabela 2. 15 – Dados termogravimétricos obtidos a partir das curvas TGA/DTG para o MCC-Tos (5:1) em tempos reacionais de 24 a 216 h, comparados às RB, calculadas a partir do FTIR, e aos GS.

<i>Amostras</i>	T_{onset} (°C)	T_{endset} (°C)	$T_{máx}$ (°C)	%P.M.	%Resíduo	RB	GS
<i>MCC-Tos 5:1 - 24 h</i>	176,01	199,27	189,07	38,904	21,209	0,4298	0,59
<i>MCC-Tos 5:1 - 48 h</i>	177,61	196,25	194,15	38,074	21,710	0,5077	0,75
<i>MCC-Tos 5:1 - 72 h</i>	179,54	195,53	188,30	36,048	20,083	0,5629	0,86
<i>MCC-Tos 5:1 - 96 h</i>	179,61	194,94	187,73	34,469	19,707	0,5854	0,91
<i>MCC-Tos 5:1 - 120 h</i>	180,62	193,10	188,13	33,362	19,470	0,5986	0,93
<i>MCC-Tos 5:1 - 144 h</i>	180,64	192,67	187,90	31,999	14,701	0,6481	1,04
<i>MCC-Tos 5:1 - 168 h</i>	181,36	193,23	188,90	29,898	19,699	0,6540	1,05
<i>MCC-Tos 5:1 - 192 h</i>	181,94	193,05	188,90	26,453	21,769	0,6727	1,09
<i>MCC-Tos 5:1 - 216 h</i>	182,17	193,45	189,30	28,086	19,566	0,6417	1,02

Fonte: o autor.

Os valores de T_{onset} confirmam que as alterações na estabilidade térmica do materiais foram pequenas, variando em cerca de 6 °C (Tabela 2.15). Porém, estes valores apresentam uma leve tendência de aumento conforme aumentam os valores das RB (1174/1056) e de GS. Heinze e colaboradores também observaram este aumento nas temperaturas do primeiro evento de degradação do MCC-Tos e o atribuíram a um aumento da ordem supramolecular, conforme aumentam a quantidade de grupos toсила inseridos na estrutura celulósica (HEINZE *et al.*, 1996). A ligeira tendência de redução nos valores de T_{endset} até 144 h de reação, está associada à diminuição da estabilidade térmica do segundo evento devido ao aumento da quantidade de ácido *p*-toluenossulfônico produzido (indicado pelo aumento dos GS), como já discutido. A %P.M. também tem ligeira queda até 192 h de reação que pode ser atribuída à redução da formação de produtos voláteis da degradação das cadeias poliméricas. Isto sugere que, como o ácido *p*-toluenossulfônico age preferencialmente na despolimerização da cadeia polimérica (reduzindo a T_{endset}), o aumento de sua produção associado à maiores GS leva não somente à diminuição das %P.M, mas também à diminuição da % de resíduos a 600 °C (até 144 h) (HEINZE *et al.*, 1996).

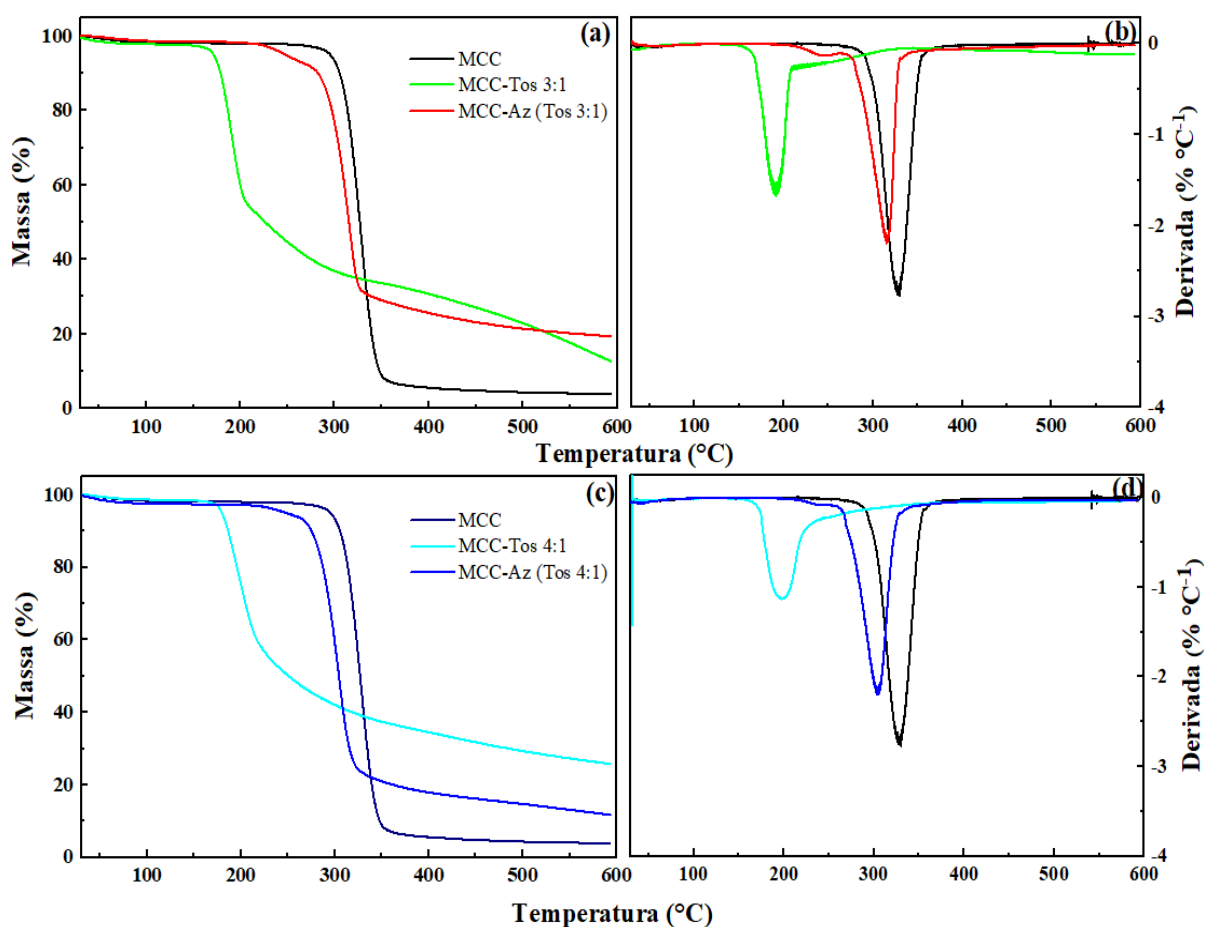
As amostras de MCC-Tos produzidas para cada ponto experimental obtido em planejamento estatístico por Matriz Doehlert e para os MCC-Tos produzidas em condições otimizadas também foram analisadas por TGA/DTG e suas respectivas curvas e informações termogravimétricas estão apresentadas no Anexo 1. Estes resultados apresentaram perfis semelhantes aos já discutidos e também indicaram que uma ordem supramolecular pode ter sido

alcançada nas condições experimentais testadas para os diferentes MCC-Tos, como discutido anteriormente (HEINZE *et al.*, 1996).

2.2.3.3 Curvas TGA/DTG para a Azido Celulose

Algumas amostras de azido celulose produzidas a partir do precursor MCC-Tos também foram analisadas por TGA/DTG e seus resultados são apresentados e discutidos neste item. As primeiras amostras analisadas, foram as MCC-Az produzidas com 48 h de reação de azidação a partir dos derivados MCC-Tos (3:1) e (4:1), que apresentaram as RB (1174/1056) iguais a 0,3979 e 0,3120, respectivamente, e os GS iguais a 0,52 e 0,34, respectivamente, após 48 h de reação de tosilação. As curvas TGA/DTG estão apresentadas na Figura 2.21.

Figura 2. 19 - (a) Curvas TGA e (b) DTG para as amostras de MCC-Az produzidas a partir (a, b) do MCC-Tos (3:1) e (c,d) do MCC-Tos (4:1). Taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de N_2 a $60\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$.



Fonte: o autor.

A comparação das curvas TGA/DTG da Figura 2.21 corrobora as informações obtidas pelos espectros por FTIR do sucesso na substituição do precursor tosiloato pelo grupo azida, evidente pelas mudanças nos eventos térmicos da MCC-Az. O aumento da estabilidade térmica entre MCC-Tos e a respectiva MCC-Az (Figura 2.21a-c) está relacionada à substituição dos grupos tosila pelos grupos azida, uma vez que este grupo não passa por reações provenientes de decomposição térmica que possam acelerar a decomposição do derivado celulósico formado, como ocorre com o MCC-Tos e sua formação de ácido *p*-toluenossulfônico. Quando se compara as curvas DTG da Figura 2.21b-d, observa-se que as $T_{máx}$ de ambas MCC-Az se aproximam da MCC sem modificações.

As curvas TGA/DTG da Figura 2.21a,c mostram que há um evento térmico sutil que ocorre imediatamente antes do evento térmico principal. Este evento foi aqui denominado, juntamente com sua T_{onset} , T_{endset} , $T_{máx}$ e %P.M como evento 1 e se torna mais evidente nas curvas DTG das Figuras 2.21b,d. Na literatura este evento é associado à decomposição de grupos azida de cadeias laterais (YANG *et al.*, 2011). O evento principal foi nomeado como evento 2 e está relacionado à decomposição das cadeias poliméricas principais. As temperaturas para cada evento térmico das MCC-Az estão apresentadas na Tabela 2.18, juntamente às temperaturas dos eventos térmicos dos respectivos precursores.

Tabela 2. 16 – Dados termogravimétricos obtidos a partir das curvas TGA/DTG para as azido celulosas produzidas dos derivados MCC-Tos (3:1) e (4:1).

<i>Amostras</i>	T_{onset1} (°C)	$T_{endset1}$ (°C)	$T_{máx1}$ (°C)	%P.M1	T_{onset2} (°C)	$T_{endset2}$ (°C)	$T_{máx2}$ (°C)	%P.M.2	%resíduo
<i>MCC-Az 3:1</i>	225,18	295,75	245,38	5,251	295,75	324,25	315,55	59,541	19,415
<i>MCC-Tos 3:1</i>	-	-	-	-	175,83	201,72	191,10	39,951	12,690
<i>MCC-Az 4:1</i>	223,45	281,87	249,24	2,635	281,87	316,09	303,94	66,913	11,725
<i>MCC-Tos 4:1</i>	-	-	-	-	179,68	215,53	197,29	38,387	25,797

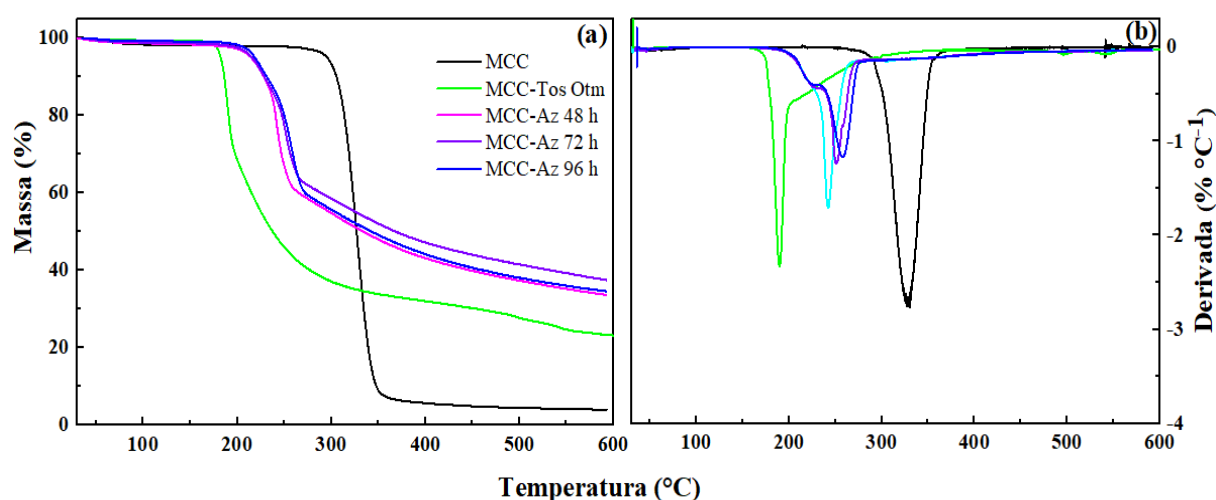
Fonte: o autor.

Ao se comparar os valores de T_{onset} entre as MCC-Az e seus precursores, verifica-se o aumento na estabilidade térmica citado acima, responsável por um aumento de mais de 40 °C da MCC-Az em relação ao MCC-Tos (considerou-se aqui o valor da T_{onset1} , já que após esta temperatura, a decomposição térmica só aumenta) e de mais de 100 °C entre as $T_{máx}$. Nota-se também que, embora a MCC-Az apresente maior estabilidade térmica que MCC-Tos, esta ainda é menor que para MCC sem modificações. Esse comportamento é atribuído à presença dos

grupos azida, que são mais energéticos que os grupos hidroxila da celulose pura (FEESE *et al.*, 2011; TARCHOUN *et al.*, 2020).

Em seguida, foram analisadas as alíquotas de uma reação de síntese da MCC-Az a partir do MCC-Tos em condições reacionais otimizadas, em três tempos diferentes (48, 72 e 96 h) (Figura 2.22). Estas reações também foram acompanhadas por FTIR (Figura 2.13) e apresentavam bandas referentes a grupos funcionais do tosilato, mesmo ao final do tempo reacional avaliado.

Figura 2. 20 – (a) Curvas TGA e (b) DTG para as amostras de MCC-Az produzidas a partir do MCC-Tos com tempos reacionais de 48, 72 e 96 h. Taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de N_2 a $60\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$.



Fonte: o autor.

As curvas TGA/DTG para estas amostras MCC-Az da Figura 2.22, apresentam um perfil térmico característico do derivado azido celulose, como os da Figura 2.21, porém também apresentam semelhanças ao do seu precursor MCC-Tos (Figura 2.20). Estes resultados corroboram os resultados obtidos por FTIR, indicando que os grupos tosilato não foram totalmente substituídos por grupo azida. Uma parte dos grupos tosilato podem não ter sido substituídos por conta da distribuição de suas posições entre os C6, C2 e C3 das UAG. Os dados termogravimétricos extraídos a partir da Figura 2.22 estão dispostos na Tabela 2.19.

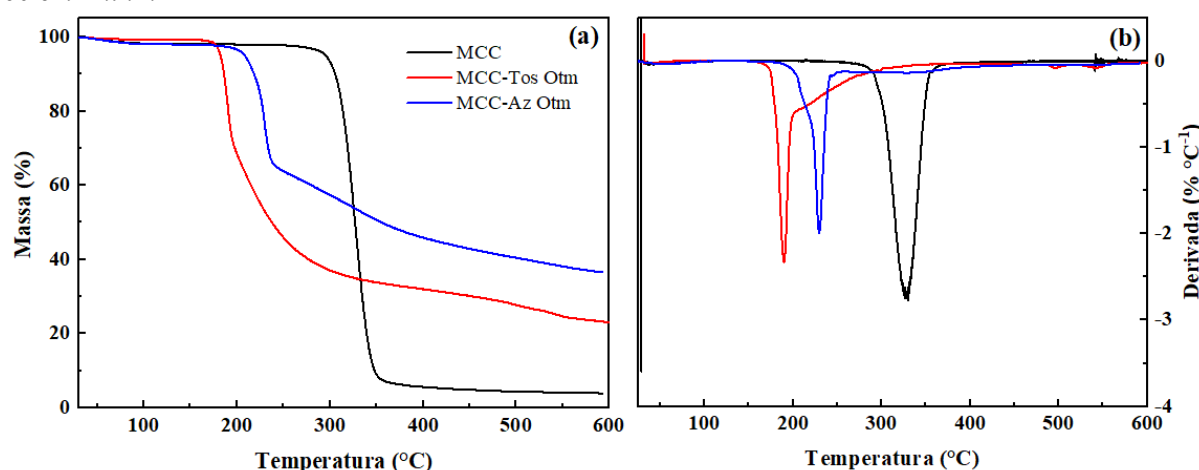
Tabela 2. 17 – Dados termogravimétricos obtidos a partir das curvas TGA/DTG para as azido celulosas produzidas do derivado MCC-Tos Otm.

Amostras	T _{onset} 1 (°C)	T _{endset} 1 (°C)	T _{máx} 1 (°C)	%P.M1	T _{onset} 2 (°C)	T _{endset} 2 (°C)	T _{máx} 2 (°C)	%P.M.2	%Resíduo
MCC-Az Otm 48 h	-	-	-	-	230,16	251,02	241,89	32,879	33,583
MCC-Az Otm 72 h	210,39	245,81	232,47	16,105	245,81	260,90	250,87	16,735	37,416
MCC-Az Otm 96 h	209,78	247,50	229,30	16,382	247,50	267,29	258,22	21,835	34,526
MCC-Az Otm	-	-	-	-	215,62	235,34	229,48	30,501	36,550
MCC-Tos Otm	-	-	-	-	182,28	194,97	189,83	27,020	23,066

Fonte: o autor.

Das temperaturas T_{onset}, T_{endset} e T_{máx} da Figura 2.22 e Tabela 2.19 para o segundo evento térmico, observa-se uma tendência de aumento nestas, conforme a reação prolongou-se, que pode estar associado ao progresso nas reações de substituição dos grupos tosila por grupos azida, culminando no aumento da estabilidade térmica dos produtos MCC-Az. Para as MCC-Az 72 e 96 h ainda foi possível distinguir um “ombro” nas curvas DTG da Figura 2.22b que, como dito acima, pode estar associado à decomposição de grupos azida posicionados mais lateralmente nas cadeias poliméricas. A Figura 2.23 apresenta as curvas TGA/DTG também para o derivado MCC-Az produzido a partir do MCC-Tos Otm, com tempo reacional de 72 h e temperatura de 70 °C, que será utilizado nas etapas posteriores de imobilização enzimática.

Figura 2. 21 – (a) Curvas TGA e (b) DTG para as amostras de MCC-Az produzidas a partir do MCC-Tos Otm em condições reacionais otimizadas. Taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e fluxo de N₂ a 60 cm³ min⁻¹.



Fonte: o autor.

As T_{máx} das Figuras 2.22 e 2.23b e descritas na Tabela 2.19, permitem ainda dizer que, embora estas sejam maiores do que para o precursor MCC-Tos, ainda são menores do que para os derivados MCC-Az produzidos a partir do MCC-Tos (3:1) e (4:1). Estes resultados,

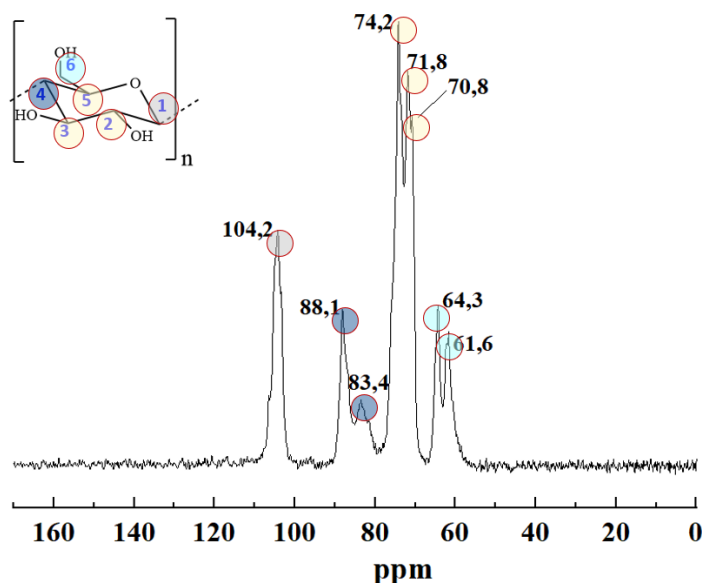
combinados às análises por FTIR indicam que as MCC-Az produzidas a partir de MCC-Tos com menores RB podem ter substituído completamente ou a maior parte dos grupos tosila. Porém, apesar de as MCC-Az produzidas a partir do MCC-Tos Otm ainda apresentarem indícios de presença de grupos tosila, a utilização de um precursor com maior RB pode garantir a inserção de maior quantidade de grupos azida.

2.2.4 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no Estado Sólido (RMN ^{13}C -CP/MAS)

Um dos desafios para a caracterização dos derivados celulósicos por RMN de solução, foi encontrar um solvente adequado para esse tipo de análise e que fosse capaz de solubilizar completamente os materiais celulósicos de forma a produzir resultados representativos das amostras, como é necessário para esta técnica (NEHLS *et al.*, 1994). Depois de algumas tentativas infrutíferas, recorreu-se ao RMN ^{13}C -CP/MAS (do inglês, “*Solid-state Cross-Polarization Magic Angle Spinning Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance*”), uma vez que esta técnica pode produzir informações similares ao do RMN de solução, enquanto supre a necessidade de uma técnica com manuseio mais compatível para amostras de baixa solubilidade (FOSTON, 2014; NOKAB *et al.*, 2022).

Dessa forma, na Figura 2.24 está apresentado o RMN ^{13}C -CP/MAS para a amostra de MCC antes de qualquer modificação química.

Figura 2. 22 – Espectro dos núcleos de ^{13}C da amostra de MCC por RMN ^{13}C -CP/MAS e estrutura química da UAG.



Fonte: o autor.

Da Figura 2.24 retira-se que, no δ 104,2 ppm se encontra o pico relacionado ao C1 que se trata do carbono anomérico da estrutura celulósica. Quanto aos carbonos 2, 3 e 5 surgem 3 picos entre δ 74,2 e 70,8 ppm (FOSTON, 2014; LAN *et al.*, 2011). O sinal no δ 88,1 e 83,4 ppm são relativos ao C4 e em δ 64,3 e 61,6 ppm estão os sinais característicos do C6. O surgimento de dois sinais relacionados aos carbonos C4 e C6 significa que na amostra existe uma mistura entre as fases cristalina e amorfa da celulose. No resultado obtido, o pico em δ 88,1 ppm é referente a região cristalina, enquanto a região amorfa é representada pelo sinal mais alargado em δ 83,4 ppm para o C4. Analogamente, o C6 cristalino e amorfo aparecem em δ 64,3 e 61,6 ppm, respectivamente (GROSZEWICZ *et al.*, 2020).

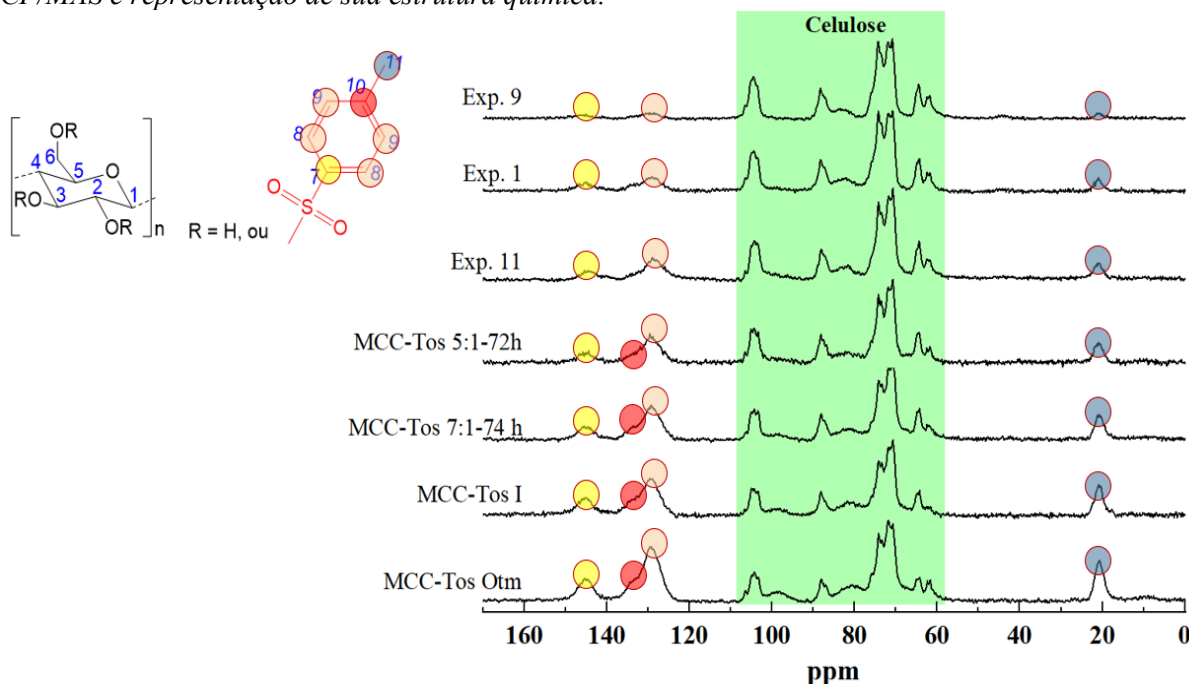
Em seguida, foram selecionadas algumas amostras de MCC-Tos de forma com que representassem uma ampla faixa de GS (de 0,32 a 1,72), a fim de caracterizar as amostras e avaliar como o aumento no GS poderia alterar os espectros de RMN ^{13}C -CP/MAS. As informações de RB e GS das amostras analisadas estão descritas na Tabela 2.20 e os respectivos espectros de RMN ^{13}C -CP/MAS estão apresentados na Figura 2.25.

Tabela 2. 18 – Informações de RB e GS das amostras de MCC-Tos analisadas por RMN ^{13}C -CP/MAS.

Amostras	RB	GS
<i>Exp. 9*</i>	0,3023	0,32
<i>Exp 1*</i>	0,4423	0,61
<i>Exp 11*</i>	0,5346	0,80
<i>MCC-Tos 5:1-72h</i>	0,5629	0,91
<i>MCC-Tos 7:1-74 h</i>	0,6472	1,10
<i>MCC-Tos I</i>	0,8774	1,43
<i>MCC-Tos Otm</i>	0,9769	1,72

*As amostras iniciadas por Exp correspondem aos experimentos do planejamento experimental para a reação de tosilação.

Figura 2. 23 – Espectros dos núcleos de ^{13}C das amostras selecionadas de MCC-Tos por RMN ^{13}C -CP/MAS e representação de sua estrutura química.

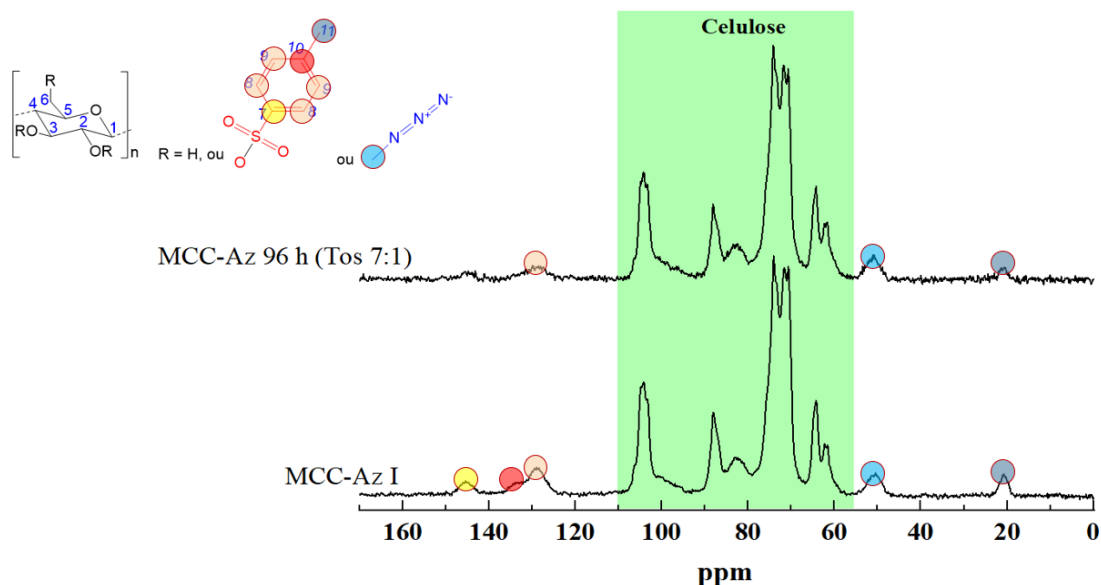


Fonte: o autor.

Nestes espectros da Figura 2.25, além dos sinais característicos da celulose, as amostras apresentaram picos adicionais em torno de δ 145, 129 e 20 ppm referentes aos carbonos aromáticos presentes nos grupos tosilatos. O sinal em δ 145 ppm pode ser assinalado ao carbono ligado diretamente ao átomo de enxofre, enquanto o ombro observado em torno de δ 135 ppm corresponde ao carbono ligado ao grupo metil (GERICKE *et al.*, 2012; HAMDAOUI *et al.*, 2020). Os demais átomos de carbono do anel aromático são representados pelo pico em δ 129 ppm, ao passo que, em δ 20 ppm, é sinalizado o metil ligado ao anel aromático (GRANSTRÖM *et al.*, 2008; GROSZEWICZ *et al.*, 2020). Este resultado indica que a incorporação do tosilato na celulose foi bem-sucedida nestes experimentos e, como os sinais referentes aos tosilatos apresentaram intensidade relativa crescente das amostras em relação aos valores de RB e GS, é possível inferir que a concentração deste grupo é maior conforme estes valores aumentam. Estes resultados estão de acordo com as outras caracterizações previamente apresentadas.

Para as amostras de MCC-Az, foram analisadas as amostras MCC-Az 96 h (Tos 7:1) e a MCC-Az I (ambas com RB iguais a 0,4492 e 0,4688, respectivamente). Os espectros de RMN ^{13}C -CP/MAS destas amostras estão apresentados na Figura 2.26.

Figura 2. 24 – Espectros dos núcleos de ^{13}C das amostras selecionadas de MCC-Az por RMN ^{13}C -CP/MAS e estrutura proposta para o derivado MCC-Az produzido.



Fonte: o autor.

Assim como os espectros de RMN ^{13}C -CP/MAS apresentados anteriormente, os espectros para as amostras MCC-Az da Figura 2.26 foram muito importantes para confirmar a obtenção dos derivados propostos. Neste caso específico, além dos picos característicos da celulose, foi possível identificar a presença dos picos atribuídos aos grupos tosila e azida. Assim sendo, a informação mais importante que os espectros de RMN ^{13}C -CP/MAS das MCC-Az traz é a presença de picos alargados em torno de δ 50 ppm, sinal este referente ao carbono ligado ao grupo N_3 , que confirma a presença do grupo azida no produto e a formação do derivado MCC-Az (JOUBERT *et al.*, 2015).

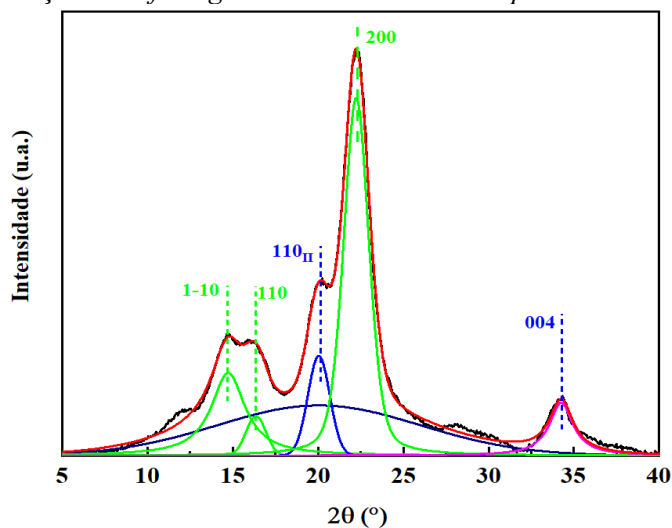
Têm se ainda que a presença dos picos referentes ao grupo tosila corrobora as bandas observadas nos espectros de FTIR e os perfis térmicos observados por TGA/DTG, indicando que houve conversão dos grupos tosila para azida, porém que esta conversão não foi completa.

2.2.5 Caracterizações por Difração de Raios-X (DRX)

A MCC e os derivados MCC-Tos Otm e MCC-Az Otm também foram caracterizados por DRX e os difratogramas obtidos estão apresentados nas Figuras 2.27 e 2.28. Nestes difratogramas, se destacam o perfil de picos característicos de celulose do tipo I (descritos na Tabela 2.21), podendo ter presença de celulose do tipo II, para a MCC (FRENCH, 2014; FRENCH; CINTRÓN, 2013). Ademais, pode se observar os alargamentos dos picos característicos da celulose para os derivados produzidos, indicando um aumento na distância

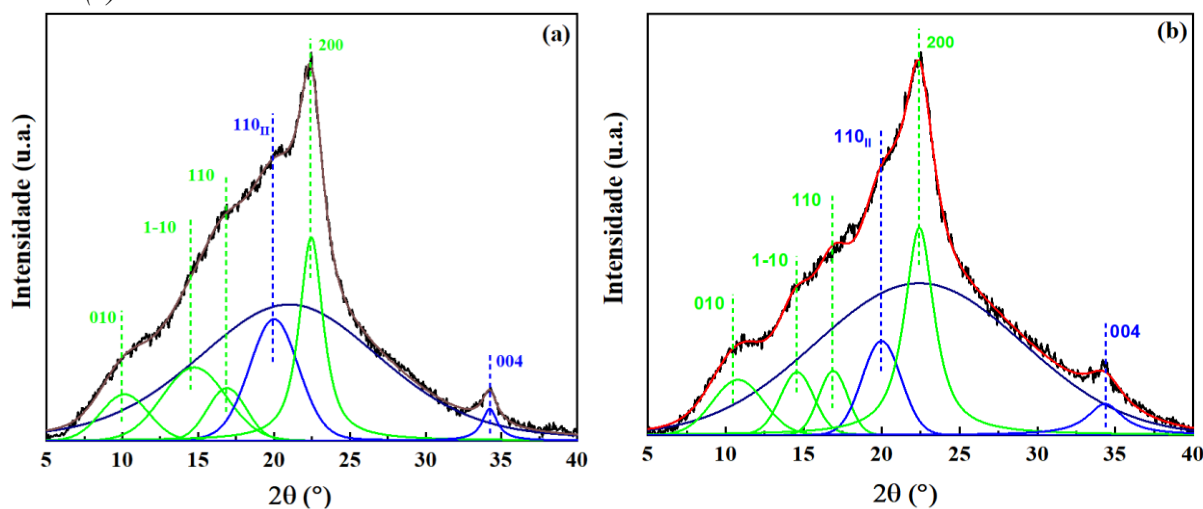
interplanar das regiões cristalinas, possivelmente associada à inserção dos grupos tosil e/ou azida à estrutura da cadeia celulósica principal (MELO, 2015).

Figura 2. 25 – Deconvolução do difratograma de Raios-X obtido para a amostra de MCC.



Fonte: o autor.

Figura 2. 26 – Deconvolução dos difratogramas de Raios-X obtidos para as amostras (a) de MCC-Tos Otm e (b) MCC-Az Otm.



Fonte: o autor.

Tabela 2. 19 – Planos cristalográficos e ângulos dos polimorfos da celulose Tipo I.

Índice de Miller	Plano Cristalográfico 2θ(°)					
	010	1-10	110	110 _{II} *	200	004
Celulose I	10,3	14,6	16,6	20,1	22,2	34,3

*Este pico com índice de Miller em 110 corresponde, possivelmente, à celulose de Tipo II.

Fonte: (FRENCH, 2014; FRENCH; CINTRÓN, 2013)

Além dos picos descritos na Tabela 2.21, observa-se ainda a presença de um halo amorfo centrado em $2\theta = 21^\circ$ tanto para a celulose original como para os derivados produzidos. A partir da determinação das áreas desses halos amorfos (Aa) e das áreas dos picos das regiões cristalinas (Ac) foram calculados os %IC, conforme Equação 4, sendo determinados o %IC para a MCC de 65,88%, de 44,56% para MCC-Tos Otm e de 42,05% para MCC-Az Otm.

Estes %IC mostram que houve uma redução na cristalinidade de cerca de 20% da celulose original para MCC-Tos que pode estar associada à inserção dos grupos tosila durante a reação que usa piridina como meio reacional e agente intumescente, consequentemente, reduzindo a extensão da região cristalina (LABAFZADEH *et al.*, 2012). Para a MCC-Az Otm, a %IC se mantém próxima ao seu material precursor, MCC-Tos Otm.

2.2.6 Morfologia e Porosidade

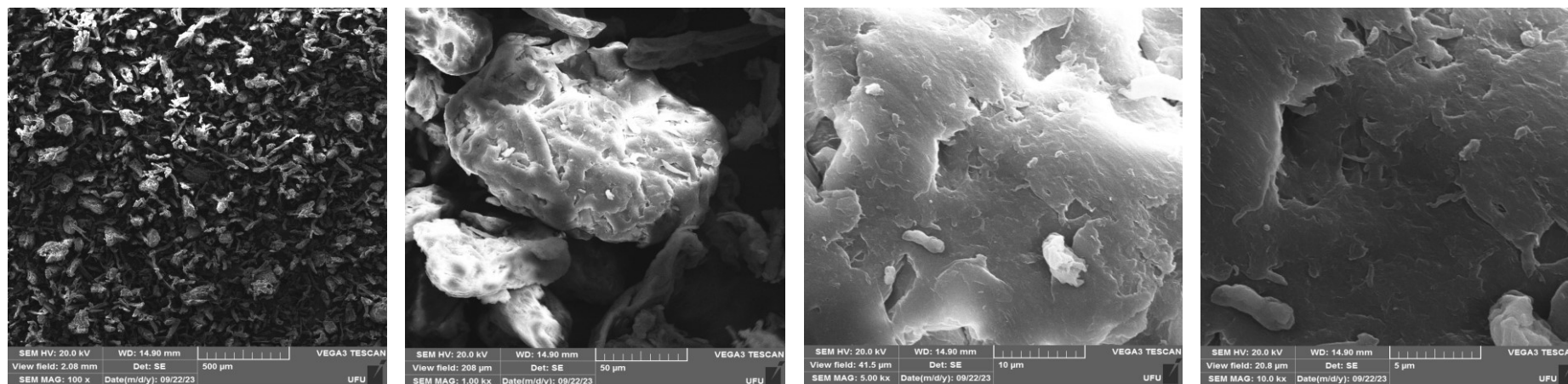
2.2.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o objetivo de verificar as alterações nas superfícies e nas estruturas dos derivados celulósicos ao final de cada etapa de modificação química, as amostras de MCC, MCC-Tos Otm e MCC-Az Otm foram também caracterizadas morfológicamente por MEV. As imagens por MEV estão apresentadas nas Figuras 2.29-31.

Da Figura 2.29, observa-se na ampliação de 100x que a MCC antes das modificações apresenta formato de grânulos com ampla variedade de formas e tamanhos, com uma distribuição bem heterogênea. Nas ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, esses grânulos apresentam superfícies que sugerem que sua formação se deu pelo acúmulo de placas ou escamas umas sobre as outras, que por sua vez, são individualmente lisas e contínuas.

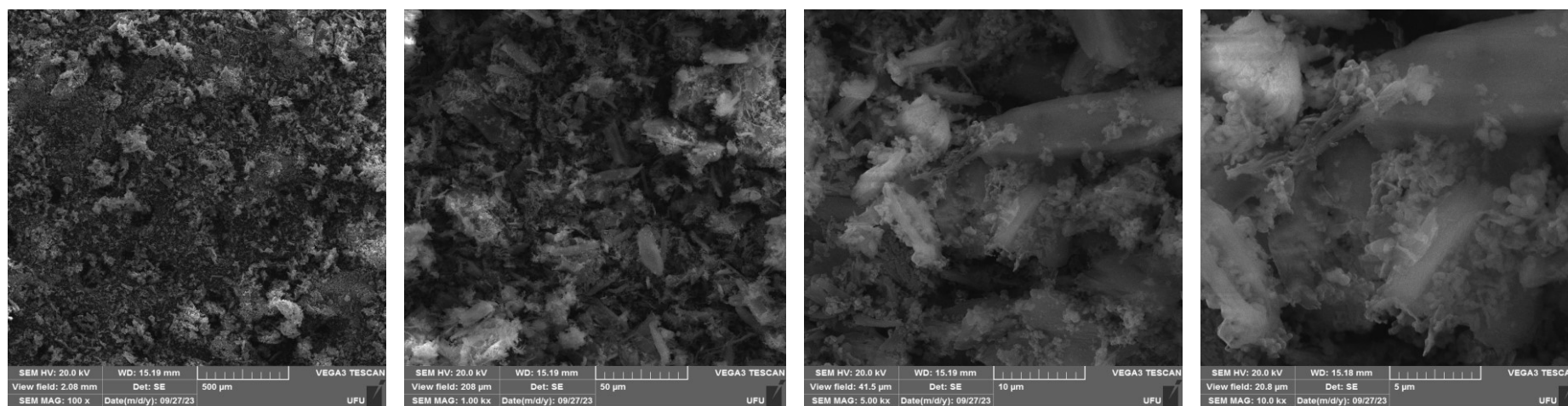
Já para o MCC-Tos Otm (Figura 2.30), a estrutura dos grânulos de MCC aparentam ter sido pulverizados ou fragmentados, restando poucos grânulos com estruturas e tamanhos que se assemelham aos da celulose original (Figura 2.30a). Quando se aumentam as ampliações para 1000 até 10000x (Figura 2.30d), vê-se que algumas estruturas granulares persistem, mas em tamanho e formatos bem diferentes da MCC. Nestas ampliações, a prevalência de estruturas particuladas e de pequenos grânulos se junta a de partículas mais largas e achatadas de vários tamanhos distintos. Assim, estas imagens por MEV mostram que o processo de modificação da celulose à MCC-Tos provoca alterações morfológicas nos grânulos da MCC, diminuindo seus tamanhos e particulando-os, porém de forma heterogênea como pode ser identificado na ampla variedade de tamanhos de partículas e grânulos.

Figura 2. 27 – Imagens por MEV obtidas para amostra de MCC antes das reações de modificação com ampliações de 100x (a); (b) 1000x, (c) 5000x e (d) 10000x



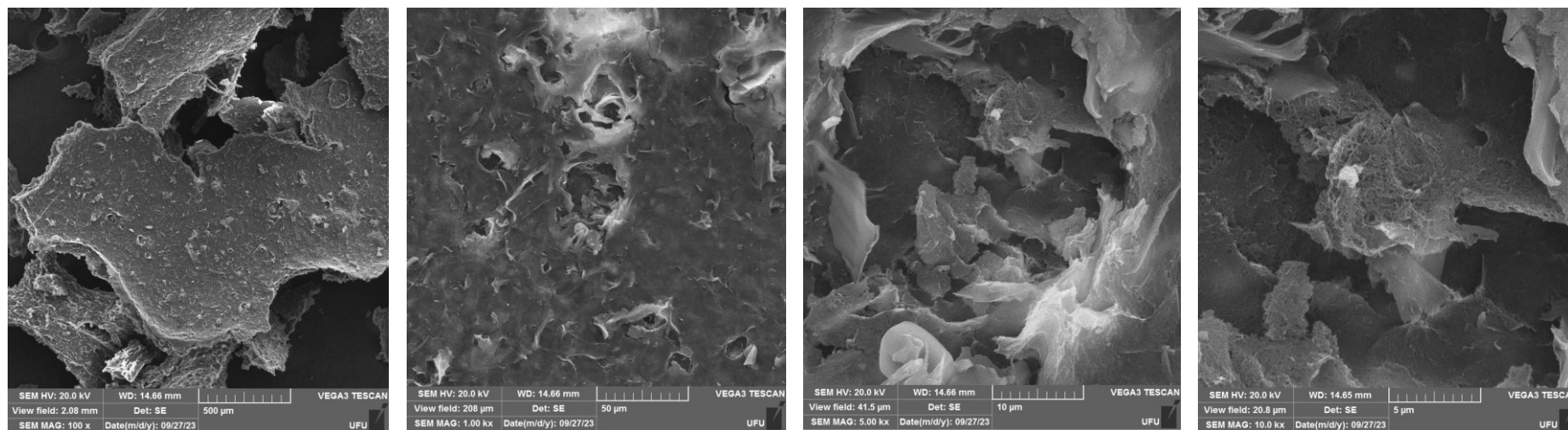
Fonte: o autor.

Figura 2. 28 – Imagens por MEV obtidas para amostra de MCC-Tos Otm com ampliações de 100x (a); (b) 1000x, (c) 5000x e (d) 10000x



Fonte: o autor.

Figura 2. 29 – Imagens por MEV obtidas para amostra de MCC-Az Otm com ampliações de 100x (a); (b) 1000x, (c) 5000x e (d) 10000x



Fonte: o autor.

Nas imagens por MEV para a MCC-Az (Figura 2.31), as partículas e grânulos vistos para os materiais precursores, dão lugar a enormes placas (cerca de 1000 μm), que por congregarem grande parte do material, são em menor quantidade que os grânulos. Nas ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, nota-se que estas placas têm uma superfície coberta por rugosidades e cavidades que podem chegar à ordem de 50 μm .

Essas relevantes alterações morfológicas (de grânulos a grandes placas) podem se refletir em alterações nas áreas superficiais disponíveis e, assim, ter influência na etapa posterior de imobilização enzimática. Por esta razão, análises de área superficial específica e porosidade foram conduzidas e estão apresentadas no próximo tópico.

2.2.6.2 Análises de Área Superficial Específica e Porosidade

Como visto pelas imagens por MEV dos materiais celulósicos, suas morfologias foram alteradas consideravelmente durante as reações de modificação até a obtenção da MCC-Az. Assim, para alcançar maior entendimento de como essas mudanças microscópicas poderiam também ter resultado em alteração da escala nanométrica, foi utilizada a técnica de adsorção e dessorção de N_2 para determinação das áreas superficiais específicas, volume e diâmetro de poros para os materiais MCC, MCC-Tos e MCC-Az. Os resultados dessas análises estão descritos na Tabela 2.22.

Tabela 2. 20 – Área superficial específica (S_{BET}), volume de poros cumulativo (V_P) e diâmetro de poros (d_P) obtidos pelas isotermas de adsorção e dessorção de N_2 .

<i>Amostra</i>	S_{BET} ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	V_P ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	d_P (nm)
<i>MCC</i>	0,9244	0,006080	24,1000
<i>MCC-Tos Otm</i>	8,7955	0,055172	22,4701
<i>MCC-Az Otm</i>	52,9952	0,434689	30,0869

Fonte: o autor.

Da Tabela 2.22, observa-se que as áreas superficiais aumentaram conforme ocorreram as etapas de modificação química, chegando a um aumento de cerca de cinquenta vezes para a MCC-Az Otm em relação à MCC. Essas diferenças nas áreas superficiais indicam que houve uma alteração morfológica também nas escalas nanométricas, evidenciada pelo aumento do volume de poros com diâmetros que variaram de 24 a 30 nm. Segundo a classificação da IUPAC, estes valores médios de d_P correspondem a materiais mesoporosos (ROUQUEROLT *et al.*, 1994). Além disso, as pequenas variações nos d_P acompanhadas pelo aumento de cerca

de 10 vezes no volume de poros conforme cada etapa de modificação ocorreu, implica num aumento na quantidade de poros, com os d_p citados na Tabela 2.22. O citado aumento no volume de poros corrobora o aumento observado da área superficial específica.

Para melhor avaliar os formatos e distribuição de poros nesses materiais, as isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio também foram investigadas (Anexo 5), e se observou que os materiais apresentaram tipos de isotermas que também variaram conforme as modificações químicas se sucederam. Para MCC, a isoterma apresentou um perfil do Tipo III atribuída a materiais com baixa porosidade ou constituído majoritariamente de macroporos, como verificado pelos menores valores de S_{BET} e v_p entre os materiais investigados. Já o MCC-Tos Otm apresentou uma isoterma com histerese do Tipo H4 associada à materiais majoritariamente constituídos de micro e mesoporosos. Para MCC-Az, a isoterma obtida pôde ser classificada como do Tipo H3 e está relacionada a materiais compostos de agregados não-rígidos de partículas em formatos de placas (THOMMES *et al.*, 2015). Dessa forma, foi comprovado que as alterações morfológicas durante as reações de modificação da celulose ocorreram tanto em escala nanométrica como micrométrica.

Quanto à aplicação desse material como suporte para imobilização de biomoléculas, têm-se ainda que, como a área média de uma molécula de lipase é $15,7 \text{ nm}^2$ (FORESTI *et al.*, 2010), a área superficial específica estimada para MCC-Az acomodaria satisfatoriamente uma monocamada de lipases com cerca de 10^{18} moléculas de lipase, considerando-se apenas a questão de disponibilidade de área superficial específica do suporte polimérico, positivamente excedendo os requerimentos para a aplicação desejada do suporte MCC-Az.

2.3 CONCLUSÕES

A reação de tosilação da celulose em fase heterogênea, apesar de há muito reconhecida na literatura, se mostrou uma tarefa mais complexa do que somente adaptação de metodologias para obtenção de materiais eficientemente tosilados. A ausência de um planejamento experimental estatístico disponível na literatura que pudesse descrever as interações entre as variáveis reacionais tempo, temperatura e razão Tos:UAG e que permitisse determinar as variáveis mais significativas observadas neste tipo de reação, consistiu-se em uma lacuna que esta tese necessitou suplantear. Para tanto, as reações de tosilação da MCC foram realizadas seguindo um planejamento experimental por Matriz Doehlert e as condições reacionais otimizadas foram: temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, tempo reacional de 74 h e razão Tos:UAG de 7:1. A fim de obter um material com ainda mais grupos tosil e em quantidade suficiente para as

reações das etapas seguintes, condições extrapoladas a partir das otimizadas (RM 10:1 e tempo igual a 144 h) foram utilizadas para obter um material MCC-Tos com GS de 1,72.

A reação de azidação do MCC-Tos se mostrou eficiente na conversão de praticamente todos os grupos tosila por grupos azida para os derivados MCC-Tos produzidos com menores GS, como os iguais a 0,75. Porém, para os materiais com maiores GS, os espectros por FTIR e TGA sugerem que parte dos grupos tosila ainda permaneceram na estrutura da MCC-Az. Esta hipótese foi confirmada pela presença de picos característicos do grupo tosila nos espectros de RMN ^{13}C -CP/MAS para a MCC-Az.

As caracterizações por FTIR, TGA e RMN ^{13}C -CP/MAS comprovaram as modificações da celulose para produção do MCC-Tos e MCC-Az e permitiram acompanhar o progresso das reações nas diferentes condições avaliadas. Além disso, a curva de calibração obtida por análise elemental (CHNS) permitiu relacionar o GS às RB calculadas por FTIR, e se provou uma ferramenta valiosíssima para análises e caracterizações rápidas do derivados tosilados.

Os difratogramas mostraram que houve uma diminuição de cerca de 20% no %IC conforme a MCC foi convertida em MCC-Tos, e esta à MCC-Az, reduzindo-se de 65,88% para 44,56% no MCC-Tos Otm, e para 42,05% na MCC-Az Otm, atribuída às inserções dos grupos tosila e/ou azida e, consequente, alteração da organização estrutural do material.

Em escala nanométrica, as análises de área superficial específica mostraram um aumento de cerca de 50 vezes na S_{BET} da MCC para a MCC-Az, indicando que o material possui superfície disponível para a imobilização da enzima lipase. Considerando-se ainda o grau de modificação deste material, a MCC-Az tem também grupos azida em quantidade suficiente para garantir a imobilização da enzima em toda sua superfície.

Portanto, com o conhecimento das condições experimentais e os materiais MCC-Tos Otm e MCC-Az Otm produzidos com sucesso, MCC-Az Otm foi aplicada na formação do bioconjugado com a enzima CalB por reação “click” CuAAC e esta é a discussão central do capítulo seguinte.

Capítulo 3 – Síntese da CalB Propargílica e Imobilização em Suporte de Azido Celulose pelo Emprego de Reação “click” do tipo CuAAC

3.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1.1 Materiais e Métodos

Alguns materiais e métodos utilizados neste capítulo, estão descritos a seguir: membrana de celulose regenerada para tubos de diálise, da marca Sigma-Aldrich®, com “*molecular weight cut-off*” (MWCO) de 14000 Da, largura de 76 mm e diâmetro médio quando cheio de 49 mm; a água utilizada em todos os experimentos foi água de alta pureza (ASTM tipo I, com resistividade $\geq 18,3 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), obtida a partir de um sistema de ultrapurificação Megapurity® (Billerica, MA, EUA). A solução de Cu^{2+} foi preparada a partir de CuSO_4 , da marca (Synth®).

A forma de preparo da CalB para utilização consistiu, em: certos volumes de extrato enzimático da lipase CalB, fornecido gentilmente pela Novozyme®, foram dialisados contra água ultrapura por 3 vezes por 12 h e 1 vez por 24 h para retirada de agentes estabilizantes e conservantes, a solução resultante foi então liofilizada e a massa de CalB foi pesada e armazenada a 8 °C, em geladeira, antes de sua utilização em qualquer uma das etapas abaixo.

3.1.2 Síntese da CalB Modificada com Grupo Propargílico

Para a reação de modificação sítio-específica da lipase CalB, foi transferido para um frasco do tipo “*vial*” de 20 mL com tampa de rosca com septo de silicone, 5 mL de uma solução tampão fosfato 50 mmol L^{-1} a pH 7,02. Esta solução foi desaerada por 20 min com fluxo contínuo de argônio (White Martins®). Em seguida, a massa de 0,1 g de CalB liofilizada ($3,1 \text{ }\mu\text{mol}$) foi transferida para a solução e dispersa por 20 min sob fluxo de argônio e agitação magnética constante. Então, 2,09 mg ($9,3 \text{ }\mu\text{mol}$ – 3:1) de propargil-*N*-hidroxisuccinimidil (propargil-NHS, marca Sigma-Aldrich®), previamente dissolvidos em dioxano, da marca Synth® (5 % v/v em relação ao volume total reacional) foram transferidos para o meio reacional com o auxílio de uma seringa hipodérmica de 1 mL com agulha 25x7 mm, e seguiu-se mais 10 min de agitação magnética, sob fluxo de argônio. A reação foi mantida por 24 h sob agitação magnética, à temperatura de 24 °C e, depois transferida para um tubo de diálise e dialisada

contra 500 mL de água ultrapura por 3 vezes por 12 h e 1 vez por 24 h. A solução resultante foi então liofilizada, e a massa de CalB-Prop foi pesada, caracterizada e armazenada a 8 °C, em geladeira, até o momento de uso. Procedimento adaptado de (FILICE *et al.*, 2011). Um esquema geral desta reação será apresentado na Figura 3.2a.

3.1.3 Síntese do Bioconjugado MCC-CalB por reação CuAAC

Para a síntese do bioconjugado, 2,9 mg de MCC-Az (18,07 μmol – 1:1) foi transferido para um frasco do tipo “*vial*” de 20 mL, com tampa de rosca com septo de silicone, e disperso em 5 mL de uma solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ a pH 7,02. Esta solução foi desaerada por 20 min com fluxo contínuo de argônio, fechada e mantida sob agitação magnética “*overnight*” para garantir a completa dispersão da MCC-Az. Em seguida, 6,3 mg de CalB-Prop (0,189 μmol – 0,01:1) foram adicionados à suspensão reacional e desaerados por 20 min com fluxo de argônio. Então, foram adicionados 40 μL de uma solução 0,20 mol L⁻¹ de Cu²⁺ (8,04 μmol – 0,4:1) e 1 mg de ácido ascórbico (5 μmol – 0,3:1), da marca Vetec®. A reação foi desaerada por mais 20 min com fluxo de argônio, fechada e mantida por 48 h, sob agitação magnética constante e à temperatura de 24 °C.

Ao findar das 48 h, a reação foi transferida para um tubo de diálise e dialisada contra 500 mL de uma solução 0,05 mol L⁻¹ de etilenodiamina (EDTA), da marca Vetec®, uma vez por 12 h, para remoção de todo cobre do meio reacional, por 2 vezes contra água ultrapura por 12 h e 1 vez por 24 h, também com água ultrapura. A suspensão resultante foi então liofilizada, e o bioconjugado MCC-CalB foi caracterizado e armazenado a 8 °C, em geladeira, até o momento de uso. Um esquema geral desta reação será apresentado na Figura 3.2b.

3.1.4 Espectroscopia de Ultravioleta – UV-Vis

Os espectros de absorção na região do UV/Vis foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies, modelo UV-Vis-NIR Cary Series, pertencente à Rede de Laboratórios Multiusuários da UFU (RELAM)-Ituiutaba. As amostras foram submetidas à varredura espectrofotométrica de 800 a 200 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico.

Os espectros de absorção eletrônica na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) com variação de temperaturas foram obtidos em um espectrofotômetro SHIMADZU modelo UV-1800, com controlador de temperatura SHIMADZU modelo TCC-100 (a 14,0; 35,0; e 45,0 $\pm$

0,1 °C), utilizando cubetas de quartzo de 1,000 cm de caminho ótico, na faixa de 800 a 200 nm. O espectrofotômetro utilizado pertence ao Laboratório de Compostos Inorgânicos (LCI), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

3.1.5 Espectroscopia de Fluorescência

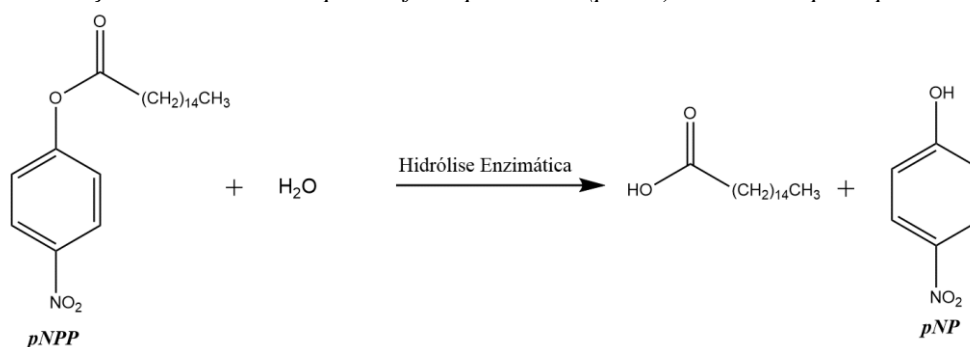
Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies, de modelo Cary Eclipse, localizado na Rede de Laboratórios Multiusuários da UFU (RELAM)-Ituiutaba.

As amostras foram excitadas nos comprimentos de onda 228 e 280 nm, e submetidas a varreduras espectrofotométricas até 800 nm, com janelas de excitação e emissão de 5 e 10 nm, respectivamente, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho ótico.

3.1.6 Determinação das Atividades Enzimáticas

Para a determinação da atividade catalítica das enzimas livres (CalB e CalB-Prop) e após a formação do bioconjugado (MCC-CalB), foi adotado o método de hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP) e acompanhada a formação do *p*-nitrofenol (*p*NP) por espectroscopia na região do UV-vis (KORDEL *et al.*, 1991; PENCREAC'H; BARATTI, 1996). A reação de hidrólise do *p*NPP catalisada por enzima está apresentada na Figura 3.1.

Figura 3. 1 – Reação de hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP) catalisada por lipase.



Fonte: adaptado das referências (SYEDD-LÉON *et al.*, 2020; XIA *et al.*, 2021).

Para tanto, as soluções do substrato foram preparadas em três etapas:

1. Solução A: 1 mL de uma solução de *p*NPP ($8,25 \text{ mmol L}^{-1}$, 3,1 mg), marca Sigma-Aldrich®, foi preparada em isopropanol (Dinamica®), sob 3 min de sonicação a temperatura ambiente;

2. Solução B: 10 mL de uma solução de tampão fosfato a 50 mmol L⁻¹ (pH 7,02), contendo 0,4 %m/v de Triton X-100 e 0,1 %m/v de goma arábica foi preparada por 15 min de sonicação a temperatura ambiente;
3. Um volume da solução A foi adicionado a nove volumes da solução B e mantida sob sonicação por 15 min a temperatura ambiente.

Em seguida, uma alíquota de 2,5 mL da solução da solução do substrato foi transferida para uma cubeta de quartzo e acrescentado 100 µL de uma solução 1 mg mL⁻¹ da enzima ou do bioconjugado, à temperatura de 24 °C. A solução reacional foi monitorada por varreduras de 500 a 200 nm, realizadas a cada 1 min, durante um total de 30 min. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A atividade enzimática específica (AEE) foi determinada pela aplicação da Equação 8 (BARON, 2008).

$$AEE = \frac{(Coef_{ang} \times V_T)}{(\epsilon_{\lambda} \times m_{enz})} \quad \text{(Equação 8)}$$

Em que: Coef_{ang} corresponde ao coeficiente angular obtido da cinética de reação (absorbância em função do tempo em minutos, em min⁻¹); v_T: volume total da solução após a adição da solução enzimática (em L); ε_λ: coeficiente de extinção molar do *p*NPP calculado a partir de curvas de calibração em pH 9,0, para um λ = 405 nm; m_{enz}: massa de enzima adicionada (em mg).

Para as determinações dos ε_λ foram preparadas duas curvas analíticas, sendo uma em pH 4,01 com λ = 317 nm e uma em pH 9,0 com um λ = 405 nm.

Para as determinações das AEE em diferentes pH, as soluções tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ em pH 7,02 foram substituídos por: soluções tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ em pH 2,01; soluções tampão acetato 50 mmol L⁻¹ a pH 4,01; e soluções tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ em pH 9,0. Assim, na Equação 8, um valor de ε_λ calculado pela curva de calibração do *p*NP (marca Vetec®) a pH 9,0, foi utilizado para os testes com pH 7,02 e pH 9,0; e o outro valor de ε_λ calculado pela curva de calibração a pH 4,01, foi utilizado para os testes com pH 2,01 e pH 4,01.

Para as determinações das AEE em diferentes temperaturas, foi utilizado um espectrofotômetro com controle de temperatura (descrito no item 3.1.4) e utilizou-se as temperaturas 14, 35 e 45 °C.

Neste trabalho, uma unidade enzimática de lipase (LU g⁻¹, do inglês “*lipase unit*”) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de *p*NP por minuto, por grama de

enzima e/ou bioconjugado, nestas condições (KORDEL *et al.*, 1991; PENCREAC'H; BARATTI, 1996).

3.1.7 Cálculo da Porcentagem Estimada de Enzima Incorporada (%EI)

A %EI foi determinada por análise de espectroscopia na região do UV-vis para uma suspensão de bioconjugado 0,15 mg mL⁻¹ em água ultrapura (pH 5,95), no comprimento de onda de 280 nm (SCHMID, 2001). Para tanto, o espectro de varredura foi coletado de 800 a 200 nm e a linha de base ajustada.

Para obtenção dos valores de concentração da CalB, considerou-se a lei de Lambert-Beer aplicada (Equação 9).

$$\text{Abs} = \varepsilon_{280} \times b \times C_{\text{CalB}} \quad (\text{Equação 9})$$

Em que: Abs corresponde a absorbância; ε_{280} é o coeficiente de absortividade molar a 280 nm (L mol⁻¹ cm⁻¹); b é o caminho óptico, igual a 1 cm; e C_{CalB} é a concentração de CalB (em mol L⁻¹). O valor de ε_{280} para a CalB foi determinado a partir da Equação 10, descrita abaixo (SCHMID, 2001):

$$\varepsilon_{280} = 5500 \times n_{\text{Trp}} + 1490 \times n_{\text{Tyr}} + 125 \times n_{\text{Cys}} \quad (\text{Equação 10})$$

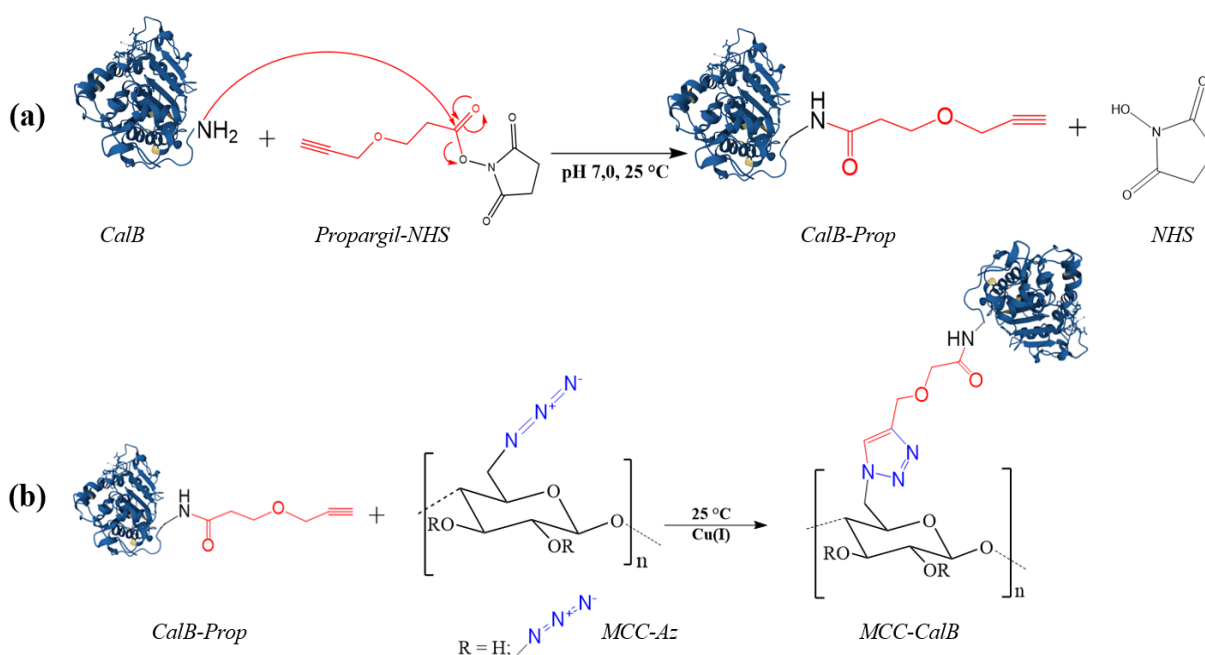
Em que: ε_{280} é o coeficiente de absortividade molar a 280 nm (L mol⁻¹ cm⁻¹); n_{Trp} , n_{Tyr} e n_{Cys} são os números de aminoácidos triptofano (cinco), tirosina (nove) e cisteínas (sete) presentes na CalB (UPPENBERG *et al.*, 1994).

Portanto, para a CalB o valor de ε_{280} calculado foi de 41785 L mol⁻¹ cm⁻¹.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o suporte polimérico sintetizado e caracterizado, passou-se para a etapa de modificação química da enzima pela inserção de um grupo alcino. Nesta etapa, a enzima lipase de *Candida antarctica* B (CalB), fornecida gentilmente pela Novozyme®, foi investigada para inserção de um grupo alcino na sua região N-Terminal através de uma reação com propargil-*N*-hidroxisuccinimidil (propargil-NHS). Um esquema geral dessa reação e da proposta de imobilização da CalB na MCC-Az Otm por ligação covalente, através da reação CuAAC, são representadas na Figura 3.2.

Figura 3. 2 – Esquema da sequência reacional proposta para imobilização da enzima CalB em MCC-Az: a) inserção do grupo propargil à estrutura da CalB; b) ligação covalente da enzima CalB à MCC-Az através da reação CuAAC.



Fonte: o autor.

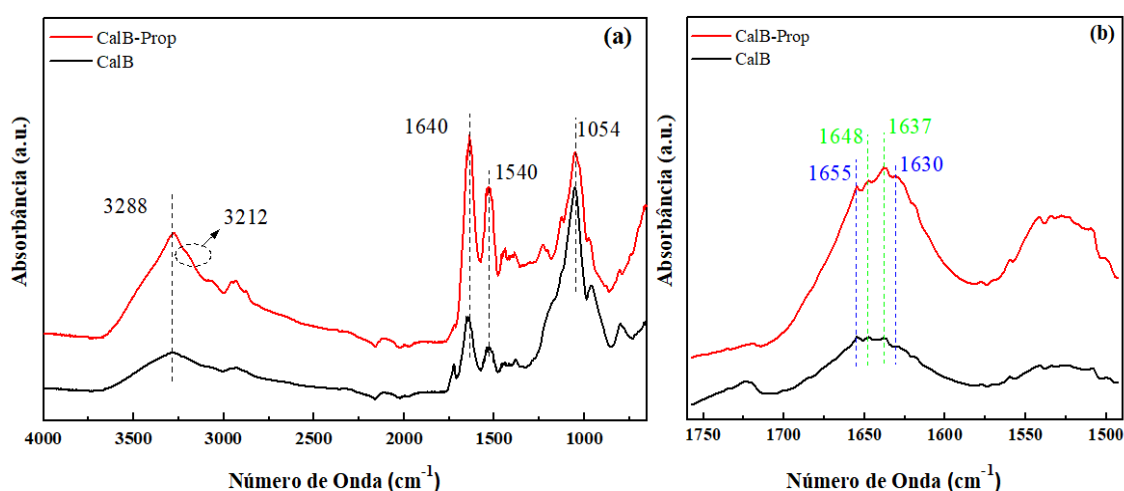
A reação de modificação de aminoácidos por reação com reagentes *N*-hidroxisuccinimidil é conhecida da literatura (FILICE *et al.*, 2011), porém a proposta de utilização desse reagente para inserção de um grupo propargil à enzima CalB é inédita, até onde este autor foi capaz de perscrutar as bases científicas (Figura 3.2a). Seu mecanismo se baseia na reação de acilação dos resíduos de aminoácidos da região N-terminal ativos a pH 7 que, por estarem na região terminal da enzima, não infeririam riscos de alteração direta do sítio ativo da enzima (ROSEN; FRANCIS, 2017). Dessa forma, a enzima modificada – identificada daqui

em diante como CalB-Prop – teria agora um grupo capaz de participar da reação “click” CuAAC e pode ser imobilizada covalentemente, como proposto pela reação da Figura 3.2b.

3.2.1 Caracterização por FTIR das Enzimas CalB e CalB-Prop

Após a reação de modificação da enzima CalB, sua limpeza e liofilização, as amostras de CalB-Prop obtidas foram caracterizadas por FTIR. Também foi coletado e comparado o espectro por FTIR para a enzima CalB sem modificação e liofilizada, após remoção dos conservantes e estabilizantes do extrato enzimático enviado pela Novozyme®. Os espectros FTIR estão apresentados na Figura 3.3.

Figura 3. 3 – Espectros de FTIR normalizados para a CalB liofilizada e para a CalB-Prop (a) na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} e (b) com ampliação do intervalo de 1760 a 1490 cm^{-1} .



Fonte: o autor.

Dos espectros da Figura 3.3a, observa-se a presença de bandas intensas em 3288 cm^{-1} para ambas as enzimas características da região Amida A e uma banda em 3212 cm^{-1} para a CalB-Prop atribuída ao estiramento da ligação N–H de amida (FORESTI *et al.*, 2010). Quanto às mudanças de formato e intensidade das bandas na região de 3000 a 2880 cm^{-1} para a CalB-Prop, atribuídas aos estiramentos Csp₃-H, estas podem estar relacionadas à inserção do grupo modificador contendo o propargil.

Outras alterações relevantes nos espectros da Figura 3.3a, são: um deslocamento na bandas de absorção dos grupos C=O na região de 1640 cm^{-1} e a mudança nas suas intensidades que podem indicar mudanças na conformação da lipase após a inserção do grupo modificador (SÓTI *et al.*, 2016; ZNISZCZOŁ *et al.*, 2016); e as bandas entre 1576–1540 cm^{-1} atribuídas ao

dobramento simétrico das ligações N-H correspondente ao grupo NH_3^+ dos aminoácidos da chamada região Amida II (BARTH, 2007). As principais bandas e suas atribuições estão descritas na Tabela 3.1.

Tabela 3. 1 – Atribuições das principais bandas de absorção do espectro na região do infravermelho para as enzimas CalB e CalB-Prop.

<i>Número de onda (cm^{-1})</i>	<i>Atribuições</i>
3288	Estiramento N-H da região Amidas A
3212	Estiramento N-H
2880	Estiramento $\text{Csp}_3\text{-H}$
1725	Estiramento ligação C=O de amidas do ácido aspártico
1680-1600	Dobramento N-H de Amidas I
1638	Estiramento C=C da histidina
1550-1500	Dobramento N-H de Amidas II
1440	Estiramento C-N da histina e deformação CH_3
1426	Dobramento CH_2
1379	Deformação simétrica CH_3
1340	Associado ao triptofano
1229	Dobramento CH , estiramento C-N e dobramento N-H da histidina
1206	Estiramento C-C do triptofano
1054	Estiramentos C-N, dobramentos C-H e C-C do grupo indol do triptofano
1031	Estiramento C-O da serina
960	Estiramento CO e CC da serina
804	“rocking” do grupo CH_2

Fontes: (BARTH, 2007; FORESTI *et al.*, 2010; SÓTI *et al.*, 2016; ZNISZCZOŁ *et al.*, 2016).

De acordo com Foresti e colaboradores (2010), a região espectral em cerca de 1640 cm^{-1} pode ser utilizada para além de indicar alterações conformacionais, mas também para fornecer informações sobre quais alterações foram estas (FORESTI *et al.*, 2010). Dessa forma, foi feito uma ampliação dessa região nos espectros das enzimas, como pode ser visto na Figura 3.3b, e notou-se que a banda em 1637 cm^{-1} aumenta de intensidade relativa para a CalB-Prop e que surge uma banda em 1630 cm^{-1} , também para a enzima modificada (BARTH, 2007; FORESTI *et al.*, 2010). Estas bandas indicam mudanças conformacionais na estrutura secundária da folha- β e folha- β antiparalela para a enzima CalB-Prop, que podem estar relacionadas à modificação química da região N-terminal promovida pela reação com propargil-NHS (FORESTI *et al.*, 2010).

Em seguida, avaliou-se como estas mudanças conformacionais podem ter afetado as atividades enzimáticas específicas (AEE), com respeito ao pH e temperatura.

3.2.2 Determinação das Atividades Enzimáticas Específicas em diferentes pH

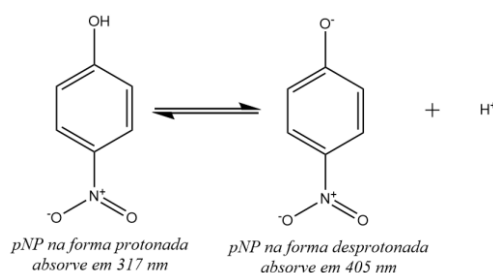
Como variações no pH podem ocasionar a alteração na ionização dos grupos que compõe o sítio ativo da enzima e do substrato utilizado, diferentes valores de pH influenciam a taxa que ocorre a ligação do substrato ao sítio ativo e são um fator relevante a ser estudado. Outra questão importante consiste no fato de que, apesar das alterações de pH não levarem a mudanças na estrutura covalente das enzimas (isto é, sua configuração), estas podem resultar em mudanças em sua conformação (ROBINSON, 2015).

Desta forma, nesta etapa foram avaliadas as enzimas CalB e CalB-Prop quanto à influência dos pH 2, 4, 7 e 9 nas respostas de suas atividades enzimáticas. Esta faixa de pH avaliada buscou compreender o intervalo de pH 5 a 9, considerada a faixa de pH ótimo para a enzima CalB comercial (NOVOZYMES BIOPHARMA DK A/S, 2016), mas não se limitando a ela e, portanto, expandindo-a para compreender também a região de pH ácido.

Para isso, o método empregado para determinação das atividades enzimáticas foi o acompanhamento da formação do *p*-nitrofenol (*p*NP) pela reação de hidrólise enzimática do *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP), por UV-vis (PENCREAC'H; BARATTI, 1996). Um esquema dessa reação está apresentado na Figura 3.1.

Cabe ressaltar que, para utilização desse método de obtenção das atividades enzimáticas em diferentes valores de pH é necessário considerar que o produto reacional *p*-nitrofenol (*p*NP) tem um pKa de 7,16 (MARTÍNEZ; DARDONVILLE, 2013) e, dessa forma, este apresenta bandas de absorbância máxima em diferentes comprimentos de onda, sendo 317 nm para pH ácidos e 405 nm para pH alcalinos (Figura 3.4). Portanto, foi necessário considerar esta informação para a seleção do comprimento de onda a ser monitorado durante os ensaios de atividade enzimática.

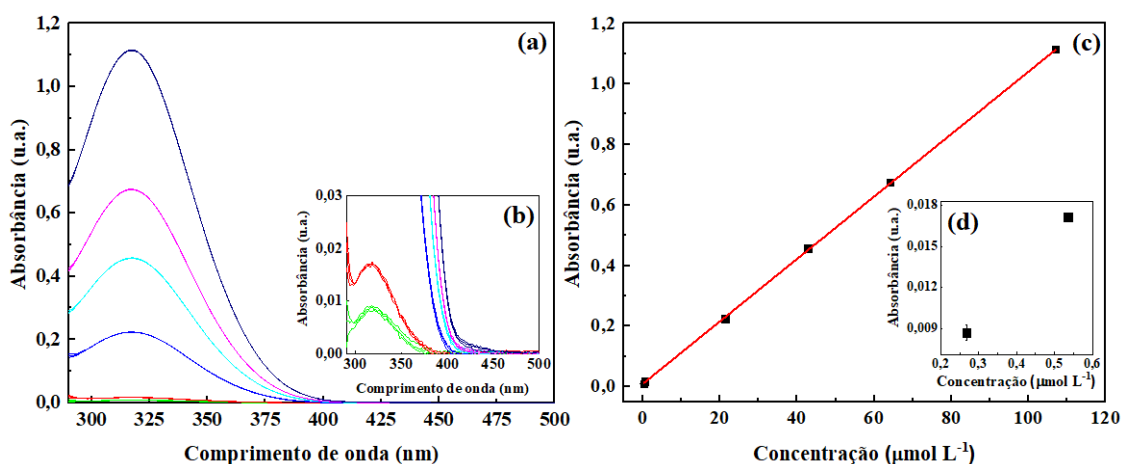
Figura 3. 4 – Equilíbrio de dissociação ácida do *p*-nitrofenol (*p*NP).



Fonte: adaptado de (SYEDD-LÉON *et al.*, 2020; XIA *et al.*, 2021).

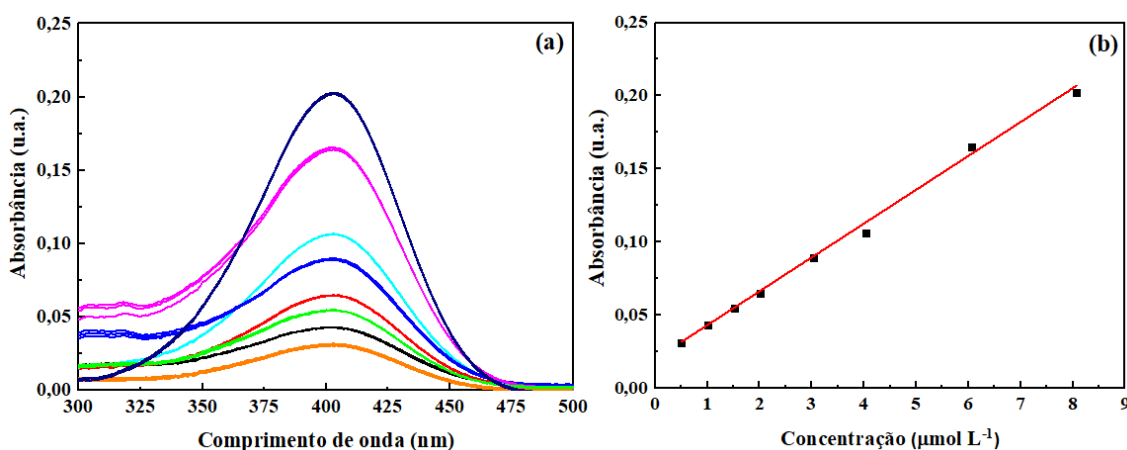
Sendo assim, foram construídas curvas de calibração para um padrão de *p*-nNP em pH 4,01 e em pH 9,0, a partir das diluições de uma solução estoque preparada previamente. As faixas de concentração de *p*-nNP avaliadas em cada pH foram determinadas de forma a compreender os valores de absorbância mínimos e máximos encontrados durante os ensaios de atividade enzimática, para ambas as enzimas CalB e CalB-Prop. As curvas de calibração estão apresentadas nas Figuras 3.5 e 3.6.

Figura 3. 5 – (a) Espectros de absorbância na região UV-vis registrados em tampão acetato 50 mmol L⁻¹ (pH 4,01) na presença de diferentes concentrações de *p*-nitrofenol (*p*-NP): (—) 0,27; (—) 0,54; (—) 21,39; (—) 42,79; (—) 64,19; (—) 106,96 μmol L⁻¹. (b) Ampliação dos espectros UV-vis com absorbância menores que 0,03 u.a. (c) Curva de calibração para o pNP construída a partir das absorbâncias obtidas em (a) no λ=317 nm. (d) Ampliação da curva de calibração na região das concentrações de pNP menores que 0,6 μmol L⁻¹.



Fonte: o autor.

Figura 3. 6 – (a) Espectros de absorbância na região UV-vis registrados em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) na presença de diferentes concentrações de *p*-nitrofenol (*p*-NP): (—) 0,506; (—) 1,012; (—) 1,517; (—) 2,023; (—) 3,033; (—) 4,042; (—) 6,058; (—) 8,071 μmol L⁻¹. (b) Curva de calibração para o pNP construída a partir das absorbâncias obtidas em (a) no λ=405 nm.



Fonte: o autor.

A Tabela 3.2 apresenta as equações reta para o ajuste linear, juntamente com o coeficiente de correlação linear, r , e o coeficiente de determinação ajustado, $R^2_{\text{ajust.}}$, obtidos a partir dos dados das Figuras 3.5 e 3.6. Estas equações foram utilizadas para calcular as concentrações de p NP obtidas e determinar as atividades enzimáticas, pela utilização também da Equação 8.

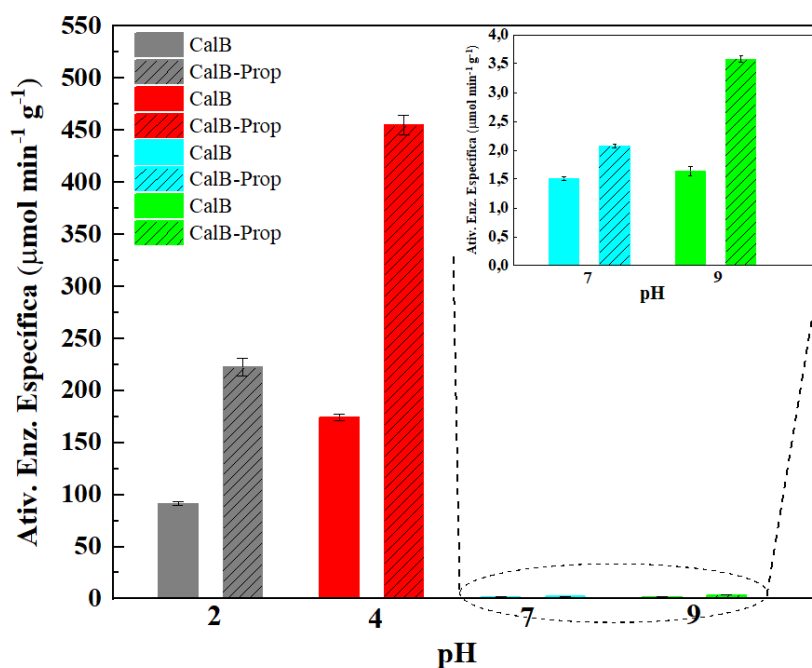
Tabela 3. 2 – Equações de reta para o ajuste linear das absorbâncias por concentração de p NP, obtidas por UV-vis.

pH	Equação de Reta	r	$R^2_{\text{ajust.}}$
4,01	$\text{Abs (u.a.)} = 0,00902 + 0,01032 \times C_{p\text{NP}} (\mu\text{mol L}^{-1})$	0,9998	0,9996
9,0	$\text{Abs (u.a.)} = 0,01999 + 0,02316 \times C_{p\text{NP}} (\mu\text{mol L}^{-1})$	0,9986	0,9969

Fonte: o autor.

A partir das curvas de calibração foram calculadas as concentrações de p NP formados durante 30 min de teste e, considerando a massa de enzima utilizada em cada ensaio, foram calculadas as atividades enzimáticas específicas (em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ou, LU g^{-1}) em relação aos pH testados, como descrito no item 3.1.6. Os ensaios retornaram os resultados apresentados na Figura 3.7.

Figura 3. 7 – Comportamento das atividades enzimáticas específicas das enzimas CalB e CalB-Prop em diferentes pH .



Fonte: o autor.

A partir da Figura 3.7, vê-se que o pH alterou significativamente as atividades enzimáticas específicas (AEE) para ambas as enzimas testadas. Destaca-se que, apesar de os pH 2,01 e 4,01 estarem fora da faixa de pH considerada como ótima para a CalB, pelo fabricante (NOVOZYMES BIOPHARMA DK A/S, 2016), foram os pH ácidos que, pela metodologia utilizada neste trabalho, retornaram os maiores resultados de AEE, chegando a cerca de 175 LU g⁻¹ para esta enzima. Enquanto isso, em meio alcalino estas atingiram um máximo de cerca de 1,5 LU g⁻¹ para a CalB.

Tratando agora das diferenças de AEE entre a CalB e a CalB-Prop, nota-se que para todo os pH avaliados, os valores de LU g⁻¹ foram superiores para a CalB-Prop. Considerando-se os resultados em meio ácido: em pH 2,01 os valores chegam a praticamente dobrar (de 91,34 para 222,38 LU g⁻¹); enquanto para pH 4,01 as AEE quase triplicaram (de 174,56 para 455,05), sendo este o pH que apresentou a maior AEE para ambas as enzimas.

Mesmo em meio alcalino, as AEE aumentaram para a CalB-Prop em relação a CalB: em pH 7,02, as AEE foram de 1,51 LU g⁻¹ para a CalB e de 2,08 LU g⁻¹ para a CalB-Prop; enquanto em pH 9,0, as AEE para a CalB foram de 1,63 LU g⁻¹ e de 3,58 LU g⁻¹ para a CalB-Prop.

Estas mudanças nas AEE corroboram as informações observadas na espectroscopias por FTIR de que houve uma mudança conformacional na CalB-Prop, provavelmente causada pela inserção do grupo propargílico em sua região N-terminal. Estas alterações conformacionais podem ter modificado a acessibilidade ao sítio ativo pelo substrato, o que aumenta a capacidade catalítica da enzima (GIRI *et al.*, 2021).

3.2.3 Determinação das Atividades Enzimáticas Específicas em Diferentes Temperaturas

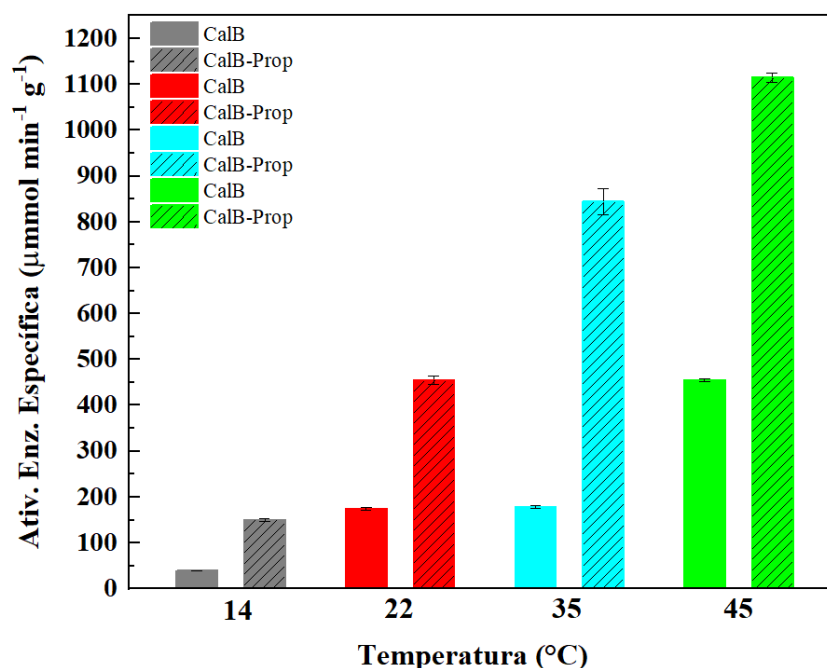
Para os ensaios de atividade enzimática em diferentes temperaturas, fixou-se o pH em 4,01, uma vez que neste pH as enzimas apresentaram as maiores AEE. As temperaturas selecionadas foram de 14, 24, 35 e 45 °C, e foram escolhidas de forma que se avaliasse duas temperaturas fora da faixa de temperaturas consideradas ótimas pelo fabricante (14 e 24 °C) e duas dentro dessa faixa (35 e 45 °C), que é considerada de 30 a 60 °C (NOVOZYMES BIOPHARMA DK A/S, 2016).

De acordo com Robinson (2015), o efeito da temperatura nas atividades enzimáticas é complexo e consiste em duas forças que agem simultaneamente em direções opostas. Enquanto o aumento da temperatura causa o aumento da energia cinética das moléculas e, geralmente, ocasiona o aumento da taxa de reação, este aumento de temperatura é acompanhado pela

progressiva inativação das enzimas causada por sua desnaturação e se torna mais evidente conforme maiores temperaturas são utilizadas (ROBINSON, 2015).

Tendo isto em mente, optou-se pela realização dos testes com acompanhamento do progresso reacional por 30 minutos de exposição das enzimas a estas condições de pH e temperatura. Dessa forma, intentou-se avaliar as atividades enzimáticas sem que houvesse influência do processo de desnaturação das enzimas. Os testes de AEE nas temperaturas escolhidas estão detalhados no item 3.1.6, e forneceram os resultados apresentados na Figura 3.8.

Figura 3. 8 – Comportamento das atividades enzimáticas específicas das enzimas CalB e CalB-Prop em diferentes temperaturas.



Fonte: o autor.

As AEE apresentaram um aumento consistente com o aumento nas temperaturas avaliadas para as duas enzimas, sendo a temperatura de 45 °C a que apresentou as maiores AEE (Figura 3.8). Além disso, a enzima CalB apresentou a maior atividade em uma temperatura dentro da faixa ótima informada pelo fabricante (NOVOZYMES BIOPHARMA DK A/S, 2016).

Em seguida, destaca-se o aumento de AEE para a CalB-Prop que, como nas variações de pH, foi muito expressivo em relação à CalB. Nestes testes, as AEE da CalB-Prop aumentaram em todas as temperaturas avaliadas, conforme detalhado em comparação com a CalB: a 14 °C, a AEE foi de 39,37 LU g⁻¹ para 149,92 LU g⁻¹; a 24 °C, o aumento foi de 174,56 LU g⁻¹ para 455,05; a 35 °C, o aumento foi de 178,49 LU g⁻¹ para 844,67 LU g⁻¹; e a

45 °C, foi de 455,72 LU g⁻¹ para 1114,88 LU g⁻¹. Assim, a temperatura ótima encontrada para a CalB-Prop também foi de 45 °C.

A partir dos ensaios de AEE com variação de temperatura, pode-se dizer que a modificação da CalB realizada neste trabalho, não só não causou prejuízos ao sítio catalítico como alterou a conformação espacial da enzima de uma forma que potencializou a sua resposta catalítica, representando um aumento num fator de 2,45 vezes em sua AEE medida em pH 4,01 e temperatura de 45 °C, em relação à enzima sem modificação.

Estudos e caracterizações que deem conta do aprofundamento do entendimento de como a conformação da CalB-Prop foi alterada, se a posição (ou posições) em que o(s) grupo(s) propargílico(s) foi ligado à enzima foi realmente a N-terminal, como pretendido, e de como a acessibilidade do sítio ativo é modificada, serão realizadas em futuro próximo.

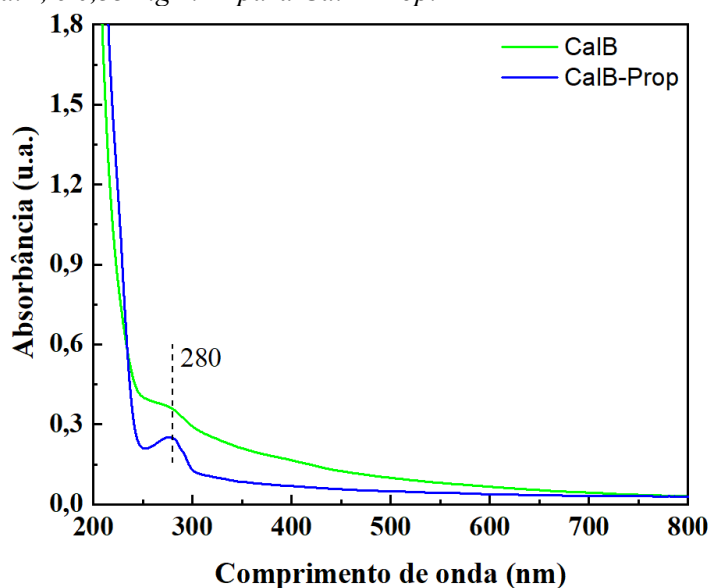
De toda forma, estes resultados são muito promissores no que representam os valores de AEE obtidos, mas também no fato de que a CalB-Prop apresenta agora um grupo capaz de se ligar covalentemente a um suporte que contenha grupos azidas, através da reação “click” CuAAC. Além dessa reação, como citado anteriormente, ser muito eficaz e não necessitar de aquecimento ou de processos laboriosos de limpeza e/ou purificação, a ligação covalente formada é muito estável e difícil de ser rompida, garantindo a imobilização da enzima (CASTRO; RODRÍGUEZ; ALBERICIO, 2016; KRUPÍČKA; DOPIERALSKI; MARX, 2017).

Ademais, é sabido que durante o processo de imobilização enzimática, a perda de movimentação e/ou acomodação da enzima no suporte pode ocasionar redução da atividade enzimática (DI COSIMO *et al.*, 2013). Dessa forma, o aumento expressivo da AEE da CalB-Prop pode, de certa forma, compensar reduções de atividade ocasionadas pela imobilização.

3.2.4 Análises por UV-vis e Espectroscopia de Fluorescência para as enzimas CalB e CalB-Prop

A fim de aprofundar a investigação sobre as mudanças conformacionais observadas pelos espectros de FTIR e pelas AEE, as enzimas CalB e CalB-Prop foram analisadas por espectroscopia UV-vis e espectroscopia de fluorescência e os espectros obtidos estão apresentados nas Figura 3.9 e 3.10, respectivamente.

Figura 3. 9 – Espectros na região UV-Vis obtidos para as soluções enzimáticas nas concentrações $0,42 \text{ mg mL}^{-1}$ para CalB, e $0,33 \text{ mg mL}^{-1}$ para CalB-Prop.



Fonte: o autor.

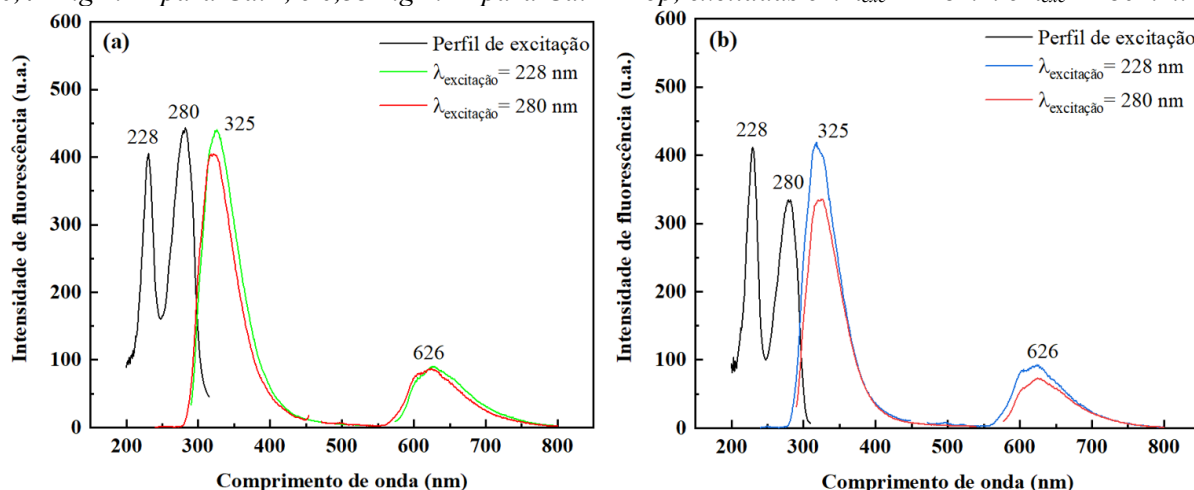
As bandas na região de 230 a 300 nm nos espectros de UV-vis de proteínas são comumente atribuídas aos grupos aromáticos das cadeias laterais dos aminoácidos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe), com uma fraca contribuição das ligações dissulfeto próxima a 260 nm (ANTOSIEWICZ; SHUGAR, 2016; SCHMID, 2001). Mais especificamente, Biter e colaboradores (2019) atribuem a banda em 280 nm ao Trp e uma em 275 nm à Tyr (BITER *et al.*, 2019).

Estas bandas são altamente sensíveis a mudanças no ambiente químico da proteína e, por isso, mudanças conformacionais devido a modificação química, alterações de pH e temperatura, além de outros fatores podem alterar o formato e as absorvâncias na região destes comprimentos de onda (BITER *et al.*, 2019; SANNIGRAHI; DE; CHATTOPADHYAY, 2020). Inclusive, Filice e colaboradores (2011) identificaram alterações na banda em 260 nm para o espectro no UV-vis de uma CalB modificada com grupo dieno, a qual os autores atribuíram a uma provável perda de aromaticidade do grupo indol do Trp pela modificação química (FILICE *et al.*, 2011).

Dessa forma, é razoável concluir que as bandas presentes nos espectros UV-vis das enzimas CalB e CalB-Prop correspondem às absorções dos grupos aromáticos dos aminoácidos triptofano e tirosina e que as alterações no formato dessas bandas sugerem uma alteração conformacional na enzima CalB-Prop (Figura 3.9). Assim, os espectros UV-vis vêm corroborar a hipótese de que houve mudança conformacional da CalB-Prop, possivelmente causada pela inserção do grupo propargil.

Quanto aos espectros de fluorescência das soluções das enzimas CalB e CalB-Prop, estes estão apresentados a seguir na Figura 3.10. Os resultados mostram os perfis de fluorescência de acordo com o comprimento de onda de excitação (λ_{exc}).

Figura 3. 10 – Espectros de fluorescência obtidos para as soluções enzimáticas nas concentrações $0,42 \text{ mg mL}^{-1}$ para CalB, e $0,33 \text{ mg mL}^{-1}$ para CalB-Prop, excitadas em $\lambda_{exc} = 228 \text{ nm}$ e $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$.



Fonte: o autor.

Para os espectros de fluorescência, as soluções apresentaram dois picos de emissão: um por volta de 325 nm e um por volta de 626 nm, que aparecem nas mesmas posições tanto quando o λ_{exc} é 228 nm, como quando o λ_{exc} é 280 nm (Figura 3.10). Esses picos, como as bandas na região UV-vis para proteína, são atribuídos à excitação dos aminoácidos triptofano e fenilalanina, que contêm grupos aromáticos. Normalmente, também há a contribuição da fluorescência da tirosina para estes picos, mas que é sobreposta pela emissão dominante do triptofano (ANTOSIEWICZ; SHUGAR, 2016).

Também se observa nos espectros de fluorescência da Figura 3.10, que os picos de emissão em 325 e 626 nm não sofrem alteração quando se passa da CalB para a CalB-Prop. Filice e colaboradores (2014) explicam que esta ausência de alterações, quando acompanhada por aumento das atividades enzimáticas, significa que as mudanças conformacionais observadas por outras técnicas, não afetaram a forma ativa da enzima (FILICE *et al.*, 2014; XU, Chao *et al.*, 2021).

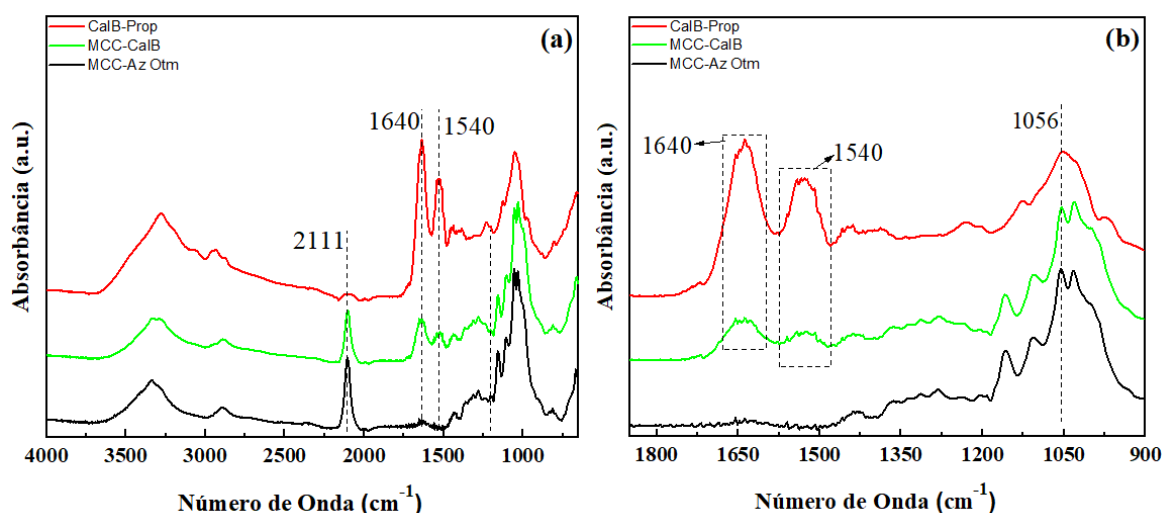
Assim, somando-se às evidências de mudanças conformacionais observadas nas espectroscopias de FTIR e UV-vis e o aumento das AEE para a CalB-Prop, a espectroscopia de fluorescência confirma que estas mudanças não alteraram a forma ativa da enzima. A modificação química da enzima melhorou sua atividade enzimática, tornando-a ainda mais

ativa. Este aspecto é de fundamental importância quando se considera a produção do bioconjugado suporte azido celulósico/enzima.

3.2.5 Caracterização por FTIR do Bioconjugado MCC-CalB

Após as caracterizações da enzima CalB-Prop e avaliação de seus comportamentos em diferentes temperaturas e pH, esta foi imobilizada por ligação covalente catalisada por cobre (CuAAC) ao suporte MCC-Az Otm, conforme esquema reacional apresentado na Figura 3.2. Em seguida, o bioconjugado formado foi dialisado contra uma solução 0,5 mol L⁻¹ de EDTA uma vez, para remoção de íons cobre residuais, e três vezes contra água ultrapura, seco em estufa a 40 °C, pesado e armazenado sob a identificação MCC-CalB. Então, MCC-CalB foi caracterizado por FTIR e seus espectros estão apresentados na Figura 3.11.

Figura 3. 11 – Espectros de FTIR normalizados para a MCC-CalB comparada aos espectros da CalB-Prop e MCC-Az Otm (a) na faixa de 4000 a 650 cm⁻¹ e (b) com ampliação do intervalo de 1850 a 900 cm⁻¹.



Fonte: o autor.

Quando se compara os espectros da MCC-Az Otm, CalB-Prop e MCC-CalB da Figura 3.11a, chama atenção o aparecimento da banda característica do estiramento C=O dos grupos amidas em 1640 cm⁻¹ e da banda em 1540 cm⁻¹ atribuída ao dobramento simétrico das ligações N-H, também de grupo amidas, provenientes da enzima CalB-Prop, no espectro da MCC-CalB (BARTH, 2007; FORESTI *et al.*, 2010; ZNISZCZOŁ *et al.*, 2016). Esta alteração espectral indica que a enzima foi incorporada com sucesso ao suporte celulósico. Ademais, quando se avalia as ampliações dos espectros apresentados na Figura 3.11b, observa-se que há novamente uma mudança conformacional na estrutura secundária da enzima, com suas bandas características na região de 1640 cm⁻¹ apresentando posições e intensidades relativas

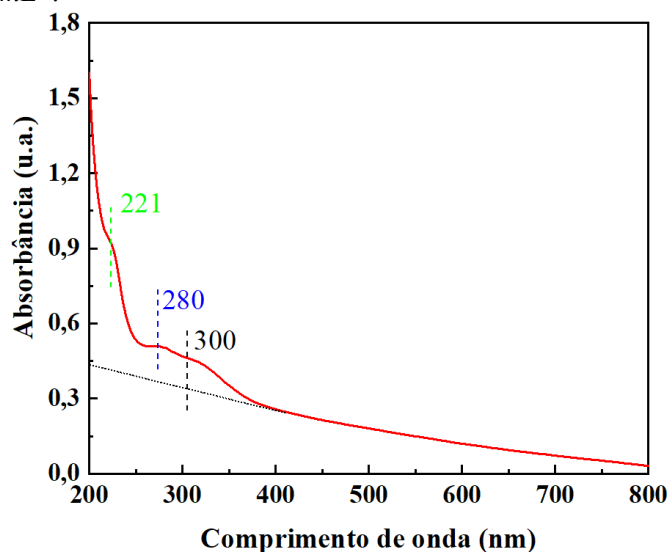
comparáveis à da CalB antes da modificação química, sugerindo que houve uma modificação conformacional na enzima após a imobilização (SÓTI *et al.*, 2016; ZNISZCZOŁ *et al.*, 2016). Esta modificação indica que a imobilização no suporte altera novamente o perfil conformacional e pode indicar que ocorreu imobilização por ligação covalente e não por adsorção física.

Além das alterações citadas, outra muito relevante para a hipótese de imobilização covalente da enzima veio da comparação entre as bandas características do grupo azida em 2111 cm^{-1} para a MCC-CalB e para a MCC-Az Otm. Foi feito o cálculo das RB entre a banda em 2111 e a 1056 cm^{-1} , como discutido no item 2.2.2.1, tanto para o material celulósico antes e após a imobilização da CalB-Prop e os valores encontrados foram de 0,4646 e 0,3738, respectivamente. Essa redução na RB para o bioconjugado MCC-CalB correspondeu a uma diminuição de 19,54% em relação ao do suporte MCC-Az Otm e sugerem que a imobilização da CalB-Prop realmente se deu por ligação covalente.

3.2.6 Análises por UV-vis e Espectroscopia de Fluorescência para o Bioconjugado MCC-CalB

Conforme os espectros de FTIR apontaram nova alteração conformacional para a enzima após a imobilização, seguiu-se as caracterizações espectroscópicas do bioconjugado MCC-CalB pelas espectroscopias na região UV-vis (Figura 3.12) e espectroscopia de fluorescência (Figura 3.13).

Figura 3. 12 – Espectro na região UV-vis obtido para uma suspensão do bioconjugado MCC-CalB com concentração $0,15\text{ mg mL}^{-1}$.



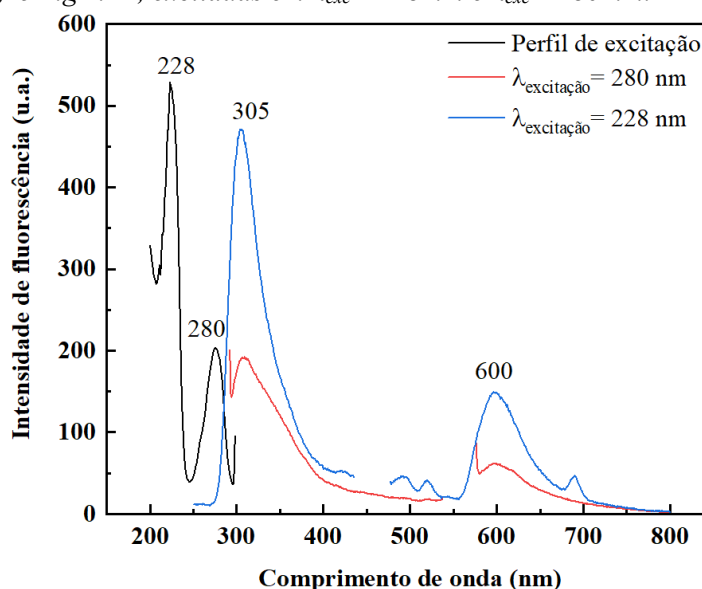
Fonte: o autor.

O espectro na região UV-vis para o bioconjugado apresentou um alargamento da banda em 280 nm e o aparecimento de duas novas bandas, uma em 221 nm e uma em 300 nm, que não estavam presentes ou não eram tão evidentes nos espectros das enzimas livres (Figura 3.9). Quanto à banda em 221 nm, bandas na faixa de 180 a 230 nm são comumente atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ das ligações peptídicas (ANTOSIEWICZ; SHUGAR, 2016).

Já as bandas na região de 230 a 300 nm, como descrito anteriormente, são atribuídas aos grupos aromáticos das cadeias laterais dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, com uma fraca contribuição das ligações dissulfeto próxima a 260 nm e, portanto, as alterações no formato dessa banda sugerem que a enzima sofreu uma nova mudança conformacional durante o processo de imobilização (ANTOSIEWICZ; SHUGAR, 2016; SCHMID, 2001).

Assim, o espectro UV-vis para o bioconjugado traz novas evidências que corroboram a hipótese retirada dos espectros FTIR (Figura 3.11) de que houve uma mudança conformacional da enzima após imobilização. Desse forma, o estudo dos espectros de fluorescência foi realizado no sentido de complementar e melhorar o entendimento sobre essa alteração. Estes espectros estão apresentados na Figura 3.13.

Figura 3. 13 – Espectros de fluorescência obtidos para uma suspensão do bioconjugado MCC-CalB com concentração $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, excitadas em $\lambda_{exc} = 228 \text{ nm}$ e $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$.



Fonte: o autor.

Desses espectros de emissão da Figura 3.13 tem-se que, quando comparadas aos picos das enzimas livres CalB e CalB-Prop (Figura 3.12), os picos de emissão originados pelos λ_{exc} em 228 nm e λ_{exc} em 280 nm apresentaram deslocamentos para o azul (batocrômico) de cerca de 20 nm (de 325 para 305 e de 626 para 600, nas enzimas livres para a MCC-CalB,

respectivamente). Esse deslocamentos apontam para a hipótese de mudança conformacional da enzima após imobilização levantada pelas técnicas de FTIR e UV-vis.

Porém, diferente dos espectros de fluorescência para as enzimas livres, em que não houve deslocamento dos comprimentos de onda de emissão, para a MCC-CalB a mudança conformacional também causou uma alteração no microambiente em torno dos grupos fluorescentes da lipase (JIA *et al.*, 2013; XU, Chao *et al.*, 2021). Estas mudanças podem sugerir que houve modificação na conformação aberta/fechada da enzima, provavelmente atribuídas à imobilização da enzima (FILICE *et al.*, 2014).

Esta hipótese foi verificada através dos ensaios de AEE e os resultados estão apresentados nos próximos tópicos.

3.2.7 Determinação da Porcentagem Estimada de Enzima Incorporada

Antes de realizar os testes de AEE, foi estimada a porcentagem de enzima incorporada (%EI) ao suporte MCC-Az, através do método detalhado no item 3.1.7 (SCHMID, 2001). Por este método, o valor de $\epsilon_{280\text{ nm}}$ calculado para a CalB foi aplicado à absorbância corrigida do espectro UV-vis da suspensão do bioconjugado em 280 nm (Figura 3.12), conforme Equação 10. A absorbância em 280 nm corrigida foi igual a 0,1376.

Após os devidos cálculos e considerando as diluições utilizadas, a concentração de CalB-Prop estimada foi igual a 0,6847 mg mL⁻¹. Uma vez que a massa inicial de CalB-Prop utilizada para a reação de imobilização foi de 2,78 mg (0,01:1, CalB-Prop:UAG) estimou-se a %EI em 24,63%.

Considerando as análises morfológicas e de área superficial específica e porosidade, além das RB para o grupo azida, sabe-se que o suporte MCC-Az tem superfície e grupos suficientes para a incorporação de toda a CalB-Prop nestas condições por reação CuAAC. Portanto, estudos posteriores serão conduzidos de forma a otimizar a reação de imobilização e melhorar ainda mais as %EI.

A partir da quantidade de CalB-Prop imobilizada e da concentração de bioconjugado na solução estoque, 0,94 mg mL⁻¹, foi também estimado que a massa de suporte em 1 mL corresponde a 0,2553 mg. Portanto, como especificamente para esta reação, a massa inicial de suporte foi igual a 1,21 mg, pode ser estimado que houve uma perda relativamente alta de material, dando conta de cerca de 79 %.

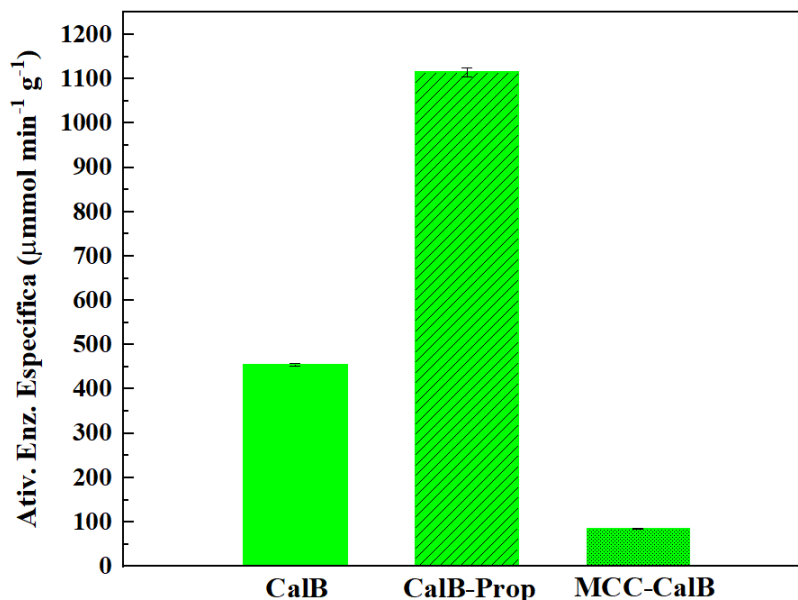
Esta perda possivelmente ocorreu nas etapas de transferência da reação para a diálise, da retirada da reação da diálise, durante os processos de limpeza, e receberá atenção redobrada

em trabalhos posteriores para que se evite perdas tão expressivas dos bioconjugados e/ou suportes.

3.2.8 Determinação da Atividade Enzimática do Bioconjugado MCC-CalB

Agora tendo conhecimento da quantidade estimada de CalB-Prop imobilizada na MCC-Az, foram realizados os ensaios de AEE para o bioconjugado produzido. Para estes testes, conforme as enzimas livres apresentaram maiores valores de AEE a pH 4,01 e temperatura de 45 °C, estas condições foram selecionadas para os testes com o bioconjugado MCC-CalB. Os detalhes do procedimento utilizado estão descritos no item 3.1.6, mas consistiu basicamente em acompanhar a formação do *p*-NP durante 30 min de contato do bioconjugado com a solução do substrato, na temperatura determinada. Os resultados de AEE para o bioconjugado e a comparação com os resultados obtidos para as enzimas CalB e CalB-Prop livres estão apresentados na Figura 3.14.

Figura 3. 14 – Comportamento das atividades enzimáticas específicas das enzimas CalB e CalB-Prop e do bioconjugado MCC-CalB em pH 4,0 e temperatura de 45 °C.



Fonte: o autor.

Quando comparada às AEE para a CalB e CalB-Prop, a MCC-CalB apresentou uma redução de cerca de 5 vezes em relação à CalB e de cerca de 13 vezes para CalB-Prop (de 455,72 LU g⁻¹ e de 1114,88 LU g⁻¹ para 84,97 LU g⁻¹, respectivamente).

Esses resultados estão em acordo com os observados pelas caracterizações espectroscópicas que apontavam uma alteração na forma ativa da enzima e que podem estar

relacionados às mudanças conformacionais desta após a imobilização no suporte celulósico. Imobilização esta que as caracterizações também sugerem que ocorreu por ligação covalente da enzima ao suporte.

Estas reduções de atividade enzimática após a imobilização são conhecidas na literatura e podem ser ocasionadas por uma redução da mobilidade e de liberdade conformacional da enzima (DI COSIMO *et al.*, 2013).

Apesar desta redução na AEE do bioconjugado para o método de conversão do *p*-NPP à *p*-NP, este bioconjugado pode apresentar resultados melhores frente a outros substratos, e estes serão avaliados em trabalhos futuros. Alguns destes possíveis substratos são os óleos vegetais, que podem ser empregados em reações de transesterificação catalisadas por enzimas. Como a lipase é considerada uma enzima com ativação interfacial, a utilização de um bioconjugado composto de um polímero que apresenta certa hidrofiliabilidade como a MCC-Az, pode garantir justamente a quantidade de água necessária às vizinhanças da enzima imobilizada para sua ativação em meios hidrofóbicos, como essas reações de produção de biodiesel.

Outro fator muito relevante é que, como a imobilização da enzima CalB pôde ser comprovada pelos testes de AEE e caracterizações espectroscópicas, sua utilização como um bioconjugado MCC-CalB confere à enzima a capacidade de ser removida após o término da reação, lavada e reutilizada em várias reações consecutivas. Sendo assim, o número de reusos em que o bioconjugado mantém uma atividade catalítica apropriada, também será investigado frente a esses substratos oleaginosos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, este estudo alcançou com sucesso os objetivos propostos, evidenciando avanços significativos na síntese de um bioconjugado inovador para potenciais aplicações em reações de transesterificação de óleos vegetais. A otimização das condições reacionais para a tosilção da celulose microcristalina (MCC) em rota heterogênea permitiu a produção eficiente do tosilato de celulose (MCC-Tos) com um grau de substituição (GS) substancial (igual a 1,72). A subsequente síntese da azido celulose (MCC-Az Otm) a partir do MCC-Tos Otm, apresentou características compatíveis com sua utilização como suporte para a imobilização covalente da lipase CalB, resultando no bioconjugado MCC-CalB por meio da reação "*click*" CuAAC.

As caracterizações dos materiais produzidos em diferentes etapas, utilizando as técnicas FTIR, TGA, DRX, ASAP, MEV e RMN ^{13}C -CP/MAS, proporcionaram uma compreensão detalhada das propriedades estruturais e morfológicas. A modificação da enzima CalB para a geração da CalB-Prop, seguida pela eficiente imobilização no suporte MCC-Az, foi indicada pelas técnicas espectroscópicas, demonstrando uma mudança conformacional na enzima. A determinação da eficiência de imobilização do bioconjugado MCC-CalB e a avaliação comparativa das atividades enzimáticas específicas entre CalB, CalB-Prop e MCC-CalB ofereceram informações valiosas para o potencial desse sistema em reações catalíticas.

Assim, este estudo proporcionou uma base sólida para investigações futuras, incluindo avaliações cinéticas, estudos de reuso em reações de transesterificação com óleos vegetais e outras aplicações relevantes. O bioconjugado MCC-CalB emerge como uma plataforma promissora para catalisadores eficazes em processos de síntese sustentáveis e de energias renováveis.

4.1 Trabalhos Futuros

Como perspectivas deste trabalho podem ser citadas as seguintes:

- a) Caracterizar a enzima CalB-Prop e o bioconjugado MCC-CalB quanto às suas cinéticas enzimáticas e estabilidades térmicas, em pH e solventes orgânicos;
- b) Aplicar a MCC-CalB a reações de transesterificação de óleos vegetais e determinar sua atividade enzimática, rendimento da reação e número de reusos;
- c) Estudar como o grupo propargílico altera a conformação da CalB, em que aminoácidos específicos a reação ocorre, e qual conformação a enzima apresenta após a imobilização no suporte polimérico;
- d) Escrever e publicar manuscritos advindos desta tese. Entre eles, finalizar o artigo já rascunhado intitulado previamente como: “*Optimization of the Heterogeneous Synthesis Conditions for Cellulose Tosylation and Synthesis of a Propargylamine Cellulosic Derivative*”.

5. REFERÊNCIAS

- AALBERS, G. J. W.; BOOTT, C. E.; D'ACIERNO, F.; LEWIS, L.; HO, J.; MICHAL, C. A.; HAMAD, W. Y.; MACLACHLAN, M. J. Post-modification of cellulose nanocrystal aerogels with thiol-ene click chemistry. **Biomacromolecules**, vol. 20, no. 7, p. 2779–2785, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00533>
- ANTOSIEWICZ, J. M.; SHUGAR, D. UV–Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: selected applications. **Biophysical Reviews**, vol. 8, no. 2, p. 163–177, 2016. DOI 10.1007/s12551-016-0197-7
- ARMAREGO, W. L. F.; CHAI, C. **Purification of Laboratory Chemicals**. 6th ed. Burlington, MA: Elsevier, 2009. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2009-0-26589-5>
- ATILLA, M. T.; KISKAN, B.; YAGCI, Y. Externally stimulated click reactions for macromolecular syntheses. **Progress in Polymer Science**, vol. 52, p. 19–78, 2016. DOI 10.1016/j.progpolymsci.2015.09.003
- AYBASTIER, O.; DEMIR, C. Immobilization of *Candida antarctica* lipase A on chitosan beads for the production of fatty acid methyl ester from waste frying oil. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects**, vol. 36, no. 21, p. 2313–2319, 2014. <https://doi.org/10.1080/15567036.2011.567233>
- BARON, A. M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. 2008. 138 f. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal do Paraná. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/17166>
- BARROW, A. S.; SMEDLEY, C. J.; ZHENG, Q.; LI, S.; DONG, J.; MOSES, J. E. The growing applications of SuFEx click chemistry. **Chemical Society Reviews**, vol. 48, no. 17, p. 4731–4758, 2019. <https://doi.org/10.1039/c8cs00960k>
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, no. 1767, p. 1073–1101, 2007. DOI 10.1016/j.bbabbio.2007.06.004
- BINDER, W. H.; SACHSENHOFER, R. ‘Click’ chemistry in polymer and material science: an update. **Macromolecular Rapid Communications**, vol. 29, p. 952–981, 2008. <https://doi.org/10.1002/marc.200800089>
- BITER, A. B.; POLLET, J.; CHEN, W.-H.; STRYCH, U.; HOTEZ, P. J.; ELENA, M. B. A method to probe protein structure from UV absorbance spectra. **Analytical Biochemistry**, vol. 587, p. 113450, 2019. DOI 10.1016/j.ab.2019.113450
- BIYOGO, A. M.; HESPEL, L.; HUMBLLOT, V.; LEBRUN, L.; ESTOUR, F. Cellulose fibers modification through metal-free click chemistry for the elaboration of versatile functional surfaces. **European Polymer Journal**, vol. 135, p. 109866. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109866>
- ÇAKMAKÇI, E.; YUCE-DURSUN, B.; DEMIR, S. Maleic anhydride functionalization of OSTE based coatings via thiol-ene “click” reaction for the covalent immobilization of xylanase. **Reactive and Functional Polymers**, vol. 111, p. 38–43, 2017. DOI

10.1016/j.reactfunctpolym.2016.11.006

CASTRO, V.; RODRÍGUEZ, H.; ALBERICIO, F. CuAAC: An efficient click chemistry reaction on solid phase. **ACS Combinatorial Science**, vol. 18, no. 1, p. 1–14, 2016. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.5b00087>

CHAN, A. O. Y.; HO, C. M.; CHONG, H. C.; LEUNG, Y. C.; HUANG, J. S.; WONG, M. K.; CHE, C. M. Modification of N-terminal α -amino groups of peptides and proteins using ketenes. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 134, no. 5, p. 2589–2598, 2012. <https://doi.org/10.1021/ja208009r>

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. **Catalysts**, vol. 8, no. 6, p. 1–26, 5 Jun. 2018. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>

CHEN, J.; LIN, N.; HUANG, J.; DUFRESNE, A. Highly alkynyl-functionalization of cellulose nanocrystals and advanced nanocomposites thereof via click chemistry. **Polym. Chem**, vol. 6, p. 4385, 2015. DOI 10.1039/c5py00367a

CHEN, X.; ZHOU, Q.; ZHANG, Y.; ZHAO, J.; YAN, B.; TANG, S.; XING, T.; CHEN, G. Fabrication of superhydrophobic cotton fabric based on reaction of thiol-ene click chemistry. **Colloids and Surfaces A**, vol. 586, p. 124175, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124175>

CHEN, Z.; LI, Z.; LAN, P.; XU, H.; LIN, N. Hydrophobic and thermal-insulating aerogels based on rigid cellulose nanocrystal and elastic rubber. **Carbohydrate Polymers**, vol. 275, p. 118708, 2022. DOI 10.1016/j.carbpol.2021.118708

COURA, C. V. Z. **Modificação química da superfície de nanocristais de celulose via reação “click” para a obtenção de bionanomateriais funcionais**. 2015. 137 f. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/BUBD-A2KHSD>

CRUZ, A. C.; MEIRELES, C. D. S.; RIBEIRO, S. D.; RODRIGUES FILHO, G.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; CERQUEIRA, D. A.; ZENI, M.; POLETTO, P. Utilization of cellulose acetate produced from mango seed cellulose as matrix for production of microparticles systems. **Química Nova**, vol. 34, no. 3, p. 385–389, 2011. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422011000300004>

DEMPSEY, D. R.; JIANG, H.; KALIN, J. H.; CHEN, Z.; COLE, P. A. Site-specific protein labeling with N-hydroxysuccinimide-esters and the analysis of ubiquitin ligase mechanisms. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 140, no. 30, p. 9374–9378, 2018. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b05098>

DI COSIMO, R.; MC AULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, vol. 42, no. 15, p. 6437–6474, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3cs35506c>

DING, C.; SUN, L.; XIAO, G.; QIAN, X.; AN, X. Green and combinational method towards clickable alkynylated cellulose fibers (ACFs). **Cellulose**, vol. 24, no. 8, p. 3219–3229, 2017.

<https://doi.org/10.1007/s10570-017-1363-1>

DONG, Y.; LU, X.; WANG, P.; LIU, W.; ZHANG, S.; WU, Z.; CHEN, H. “Click-chemical” modification of cellulose acetate nanofibers: a versatile platform for biofunctionalization.

Journal of Materials Chemistry B, vol. 6, p. 4579–4582, 2018.

<https://doi.org/10.1039/c8tb01401a>

FADAVI, F.; ABDULKHANI, A.; HAMZEH, Y.; BACHER, M.; GORFER, M.; BANDIAN, D.; ROSENAU, T.; HETTEGGER, H. Photodynamic antimicrobial cellulosic material through covalent linkage of protoporphyrin IX onto lyocell fibers. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, vol. 39, no. 1, p. 57–74, 2019. DOI

10.1080/02773813.2018.1500605

FEESE, E.; SADEGHIFAR, H.; GRACZ, H. S.; ARGYROPOULOS, D. S.; GHILADI, R. A. Photobactericidal porphyrin-cellulose nanocrystals: synthesis, characterization, and antimicrobial properties. **Biomacromolecules**, vol. 12, no. 10, p. 3528–3539, 2011. DOI

10.1021/bm200718s

FEI, P.; LIAO, L.; CHENG, B.; SONG, J. Quantitative analysis of cellulose acetate with a high degree of substitution by FTIR and its application. **Analytical Methods**, vol. 9, no. 43, p. 6194–6201, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7AY02165H>

FERREIRA, D. C. **Ésteres Mistos de Celulose : síntese em meio homogêneo, caracterização e moldagem**. 260 f. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, 2018. <https://doi.org/10.11606/T.46.2018.tde-24082018-113636>

FILHO, G. R.; DE ASSUNÇÃO, R. M. N.; VIEIRA, J. G.; MEIRELES, C. da S.; CERQUEIRA, D. A.; DA SILVA BARUD, H.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Characterization of methylcellulose produced from sugar cane bagasse cellulose: Crystallinity and thermal properties. **Polymer Degradation and Stability**, vol. 92, no. 2, p. 205–210, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.11.008>

FILICE, M.; ROMERO, O.; ABIAN, O.; DE LAS RIVAS, B.; PALOMO, J. M. Low ionic liquid concentration in water: a green and simple approach to improve activity and selectivity of lipases. **RSC Advances**, vol. 4, p. 49115, 2014. DOI 10.1039/c4ra07625g

FILICE, M.; ROMERO, O.; GUISAN, J. M.; PALOMO, J. M. Trans,trans-2,4-Hexadiene incorporation on enzymes for site-specific immobilization and fluorescent labeling. **Organic and Biomolecular Chemistry**, vol. 9, no. 15, p. 5535–5540, 2011. <https://doi.org/10.1039/c1ob05401e>

FILPPONEN, I.; ARGYROPOULOS, D. S. Regular linking of cellulose nanocrystals via click chemistry: synthesis and formation of cellulose nanoplatelet gels. **Biomacromolecules**, vol. 11, p. 1060–1066, 2010. <https://doi.org/10.1021/bm1000247>

FORESTI, M. L.; VALLE, G.; BONETTO, R.; FERREIRA, M. L.; BRIAND, L. E. FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions. **Applied Surface Science**, vol. 256, no. 6, p. 1624–1635, 2010. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2009.09.083>

FOSTON, M. Advances in solid-state NMR of cellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 27, p. 176–184, 2014. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2014.02.002>

FRENCH, A. D. Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. **Cellulose**, vol. 21, no. 2, p. 885–896, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0030-4>

FRENCH, A. D.; CINTRÓN, M. S. Cellulose polymorphy, crystallite size, and the Segal Crystallinity Index. **Cellulose**, vol. 20, no. 1, p. 583–588, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9833-y>

GERICKE, M.; SCHALLER, J.; LIEBERT, T.; FARDIM, P.; MEISTER, F.; HEINZE, T. Studies on the tosylation of cellulose in mixtures of ionic liquids and a co-solvent. **Carbohydrate Polymers**, vol. 89, no. 2, p. 526–536, 2012. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.03.040>

GIRI, P.; PAGAR, A. D.; PATIL, M. D.; YUN, H. Chemical modification of enzymes to improve biocatalytic performance. **Biotechnology Advances**, vol. 53, p. 107868, 2021. DOI 10.1016/j.biotechadv.2021.107868

GRANSTRÖM, M.; KAVAKKA, J.; KING, A.; MAJOINEN, J.; VALTTERI, M.; HELAJA, J.; SAMI, H.; VIRTANEN, T.; MAUNU, S.-L.; ARGYROPOULOS, D. S.; KILPELÄINEN, I. Tosylation and acylation of cellulose in 1-allyl-3-methylimidazolium chloride. **Cellulose**, vol. 15, p. 481–488, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10570-008-9197-5>

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. **Adsorption, surface area, and porosity**. London: Academic Press, vol. 86, no 10, 957 p. 1982

GROSZEWICZ, P. B.; MENDES, P.; KUMARI, B.; LINS, J.; BIESALSKI, M.; GUTMANN, T.; BUNTKOWSKY, G. N-Hydroxysuccinimide-activated esters as a functionalization agent for amino cellulose: synthesis and solid-state NMR characterization. **Cellulose**, vol. 27, p. 1239–1254, 2020. DOI 10.1007/s10570-019-02864-5

HAMDAOUI, L. El; ES-SAID, A.; MAROUANI, M. El; MEHDI, B. El; BCHITOU, R.; KIFANI-SAHBAN, F.; MOUSSAOUITI, M. El. Tosylation optimization, characterization and pyrolysis kinetics of cellulose tosylate. **Chemistry Select**, vol. 5, p. 7695–7703, 2020. DOI 10.1002/slct.202001906

HEIN, C. D.; LIU, X.; WANG, D. Click Chemistry, A powerful tool for pharmaceutical sciences. **Pharmaceutical Research**, vol. 25, no. 10, p. 2216–2230, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9616-1>

HEIN, J. E.; FOKIN, V. V. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(i) acetylides. **Chemical Society Reviews**, vol. 39, no. 4, p. 1302–1315, 2010. <https://doi.org/10.1039/b904091a>

HEINZE, T.; RAHN, K. Cellulose-p-toluenesulfonates: A valuable intermediate in cellulose chemistry. **Macromolecular Symposia**, vol. 120, p. 103–113, 1997. <https://doi.org/10.1002/masy.19971200112>

HEINZE, T.; RAHN, K.; JASPERS, M.; BERGHMANS, H. Thermal studies on

homogeneously synthesized cellulose p-toluenesulfonates. **Journal of Applied Polymer Science**, vol. 60, no. 11, p. 1891–1900, 1996. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19960613\)60:11<1891::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19960613)60:11<1891::AID-APP13>3.0.CO;2-4)

HETTEGGER, H.; SUMERSKII, I.; SORTINO, S.; POTTHAST, A.; ROSENAU, T. Silane meets click chemistry: towards the functionalization of wet bacterial cellulose sheets. **ChemSusChem**, vol. 8, p. 680–687, 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/cssc.201402991>

HEUSER, E.; HEATH, M.; SHOCKLEY, W. H. The rate of esterification of primary and secondary hydroxyls of cellulose with p-toluenesulfonyl (tosyl) chloride. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 72, no. 2, p. 670–674, 1950. <https://doi.org/10.1021/ja01158a007>

HONEYMAN, J. Reactions of Cellulose. Part I. **Journal of the Chemical Society**, no. 0, p. 168–173, 1947. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/JR9470000168>

INOUE, N.; ONODA, A.; HAYASHI, T. Site-specific modification of proteins through N-terminal azide labeling and a chelation-assisted CuAAC reaction. **Bioconjugate Chemistry**, vol. 30, no. 9, p. 2427–2434, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00515>

IORIS, E. G. **Potencial biotecnológico de casca de soja para obtenção de nanopartículas de celulose e de lignina**. 2021. 85 f. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2021. Available at: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/25520>

JAIN, R. K.; LAL, K.; BHATNAGAR, H. L. Thermal, morphological and spectroscopic studies on cellulose modified with phosphorus, nitrogen, sulphur and halogens. **Journal of Applied Polymer Science**, vol. 33, no. 2, p. 247–282, 1987. <https://doi.org/10.1002/app.1987.070330201>

JAIN, R. K.; LAL, K.; BHATNAGAR, H. L. Thermal studies on C-6 substituted cellulose and its subsequent C-2 and C-3 esterified products in air. **European Polymer Journal**, vol. 22, no. 12, p. 993–1000, 1986. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(86\)90081-9](https://doi.org/10.1016/0014-3057(86)90081-9)

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. **Adsorption**, vol. 20, no. 5–6, p. 801–821, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>

JIA, R.; HU, Y.; LIU, L.; JIANG, L.; ZOU, B.; HUANG, H. Enhancing catalytic performance of porcine pancreatic lipase by covalent modification using functional ionic liquids. **ACS Catalysis**, vol. 3, no. 9, p. 1976–1983, 2013. DOI 10.1021/CS400404F

JIANG, Z.; NGAI, T. Recent advances in chemically modified cellulose and its derivatives for food packaging applications: a review. **Polymers**, vol. 14, p. 1533, 2022. DOI 10.3390/polym14081533

JOUBERT, F.; MUSA, O.; HODGSON, D. R. W.; CAMERON, N. R. Graft copolymers of hydroxyethyl cellulose by a ‘grafting to’ method: 15N labelling as a powerful characterisation tool in ‘click’ polymer chemistry. **Polym. Chem**, vol. 6, p. 1567, 2015. DOI 10.1039/c4py01413h

- KALITA, E.; BARUAH, J. **Environmental remediation**. Em *Colloidal Metal Oxide Nanoparticles*. Elsevier Inc. Elsevier Inc., 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813357-6.00014-0>
- KARAASLAN, M. A.; GAO, G.; KADLA, J. F. Nanocrystalline cellulose/b-casein conjugated nanoparticles prepared by click chemistry. **Cellulose**, vol. 20, p. 2655–2665, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0065-6>
- KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, vol. 44, no. 22, p. 3358–3393, 2005. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- aKLEMM, D.; PHILIP, B.; HEINZE, T.; HEINZE, U.; WAGENKNECHT, W. **Comprehensive Cellulose Chemistry: Functionalization of Cellulose**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1998. vol. 2, 300 p
- bKLEMM, D.; PHILIPP, B.; HEINZE, T.; HEINZE, U.; WAGENKNECHT, W. 2.2 Swelling and Dissolution of Cellulose The. **Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and Analytical Methods**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1998. vol. 1, p. 43–82
- KNAUS, S.; MAIS, U.; BINDER, W. H. Synthesis, characterization and properties of methylaminocellulose. **Cellulose**, no. 10, p. 139–150, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1024024402735>
- KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, vol. 40, no. 11, p. 2004, 2001. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5)
- KORDEL, M.; HOFMANN, B.; SCHOMBURG, D.; SCHMID, R. D. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: Purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. **Journal of Bacteriology**, vol. 173, no. 15, p. 4836–4841, 1991. <https://doi.org/10.1128/jb.173.15.4836-4841.1991>
- KOSCHELLA, A.; HARTLIEB, M.; HEINZE, T. A “click-chemistry” approach to cellulose-based hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, vol. 86, p. 154–161, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.031>
- KROUIT, M.; BRAS, J.; BELGACEM, M. N. Cellulose surface grafting with polycaprolactone by heterogeneous click-chemistry. **European Polymer Journal**, vol. 44, no. 12, p. 4074–4081, 2008. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2008.09.016>
- KRUPÍČKA, M.; DOPIERALSKI, P.; MARX, D. Unclicking the click: metal-assisted mechanochemical cycloreversion of triazoles is possible. **Angewandte Chemie - International Edition**, vol. 56, no. 27, p. 7745–7749, 2017. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201612507>
- LABAFZADEH, S. R.; KAVAKKA, J. S.; SIEVÄNEN, K.; ASIKKALA, J.; KILPELÄINEN, I. Reactive dissolution of cellulose and pulp through acylation in pyridine. **Cellulose**, vol. 19, no. 4, p. 1295–1304, 2012. DOI 10.1007/S10570-012-9720-6/FIGURES/8

LAN, W.; LIU, C. F.; YUE, F. X.; SUN, R. C.; KENNEDY, J. F. Ultrasound-assisted dissolution of cellulose in ionic liquid. **Carbohydrate Polymers**, vol. 86, no. 2, p. 672–677, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.013>

LI, B.; XU, C.; LIU, L.; ZHANG, X.; YU, J.; FAN, Y. Photocrosslinkable and hydroplasticable UV-shielding nanocellulose films facilitated by hydroxyl-yne click reaction. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 255, p. 128099, 2024. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.128099>

LI, M.; DE, P.; LI, H.; SUMERLIN, B. S. Conjugation of RAFT-generated polymers to proteins by two consecutive thiol-ene reactions. **Polymer Chemistry**, vol. 1, p. 854–859, 2010. DOI 10.1039/c0py00025f

LIEBERT, T.; HANSCH, C.; HEINZE, T. Click chemistry with polysaccharides. **Macromolecular Rapid Communications**, vol. 27, p. 208–213, 2006. <https://doi.org/10.1002/marc.200500686>

LUAN, B.; ZHOU, R. A novel self-activation mechanism of: *Candida antarctica* Lipase B. **Physical Chemistry Chemical Physics**, vol. 19, no. 24, p. 15709–15714, 2017. <https://doi.org/10.1039/c7cp02198d>

MARTÍNEZ, C. H. R.; DARDONVILLE, C. Rapid determination of ionization constants (pKa) by UV spectroscopy using 96-well microtiter plates. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, vol. 4, no. 1, p. 142–145, 2013. DOI 10.1021/ML300326V

MARTOS-MALDONADO, M. C.; HJULER, C. T.; SØRENSEN, K. K.; THYGESEN, M. B.; RASMUSSEN, J. E.; VILLADSEN, K.; MIDTGAARD, S. R.; KOL, S.; SCHOFFELEN, S.; JENSEN, K. J. Selective N-terminal acylation of peptides and proteins with a Gly-His tag sequence. **Nature Communications**, vol. 9, no. 1, 2018. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05695-3>

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 40, no. 6, p. 1451–1463, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>

MCCORMICK, C. L.; DAWSEY, T. R.; NEWMAN, J. K. Competitive formation of cellulose p-toluenesulfonate chlorodeoxycellulose during homogeneous reaction of chloride with cellulose in N, N-dimethyl-acetamide-lithium chloride. **Carbohydrate Research**, vol. 208, p. 183–191, 1990. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(90\)80098-N](https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)80098-N)

MELDAL, M.; TORNØE, C. W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. **Chemical Reviews**, vol. 108, no. 8, p. 2952–3015, 2008. DOI 10.1021/cr0783479

MELO, P. G. Estudo das propriedades físico-químicas de membranas de acetato de celulose/glicerol incorporadas com aditivos de lignina extraída do endocarpo da Macaúba (*Acrocomia aculeata*) e seus derivados modificados quimicamente. 2015. 146 f. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal de Uberlândia. <https://doi.org/10.14393/ufu.te.2015.158>

MENG, X.; EDGAR, K. J. “Click” reactions in polysaccharide modification. **Progress in Polymer Science**, vol. 53, p. 52–85, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.07.006>

MESSINA, M. S.; MESSINA, K. M. M.; BHATTACHARYA, A.; MONTGOMERY, H. R.; MAYNARD, H. D. Preparation of biomolecule-polymer conjugates by grafting-from using ATRP, RAFT, or ROMP. **Progress in Polymer Science**, vol. 100, no. 101186, p. 1–25, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2019.101186>

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, vol. 29, no. 2, p. 205–220, 2015. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>

MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, vol. 40, no. 7, p. 3941–3994, 2011. <https://doi.org/10.1039/c0cs00108b>

MOREIRA, F. K. V. **Desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos biodegradáveis a partir de pectina, amido, e nanofibras de celulose**. 2010. 181 f. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de São Carlos. Disponível em:
<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/817/3298.pdf>

NAVARRO, J. R. G.; CONZATTI, G.; YU, Y.; FALL, A. B.; MATHEW, R.; EDÉN, M.; BERGSTRÖM, L. Multicolor fluorescent labeling of cellulose nanofibrils by click chemistry. **Biomacromolecules**, vol. 16, no. 4, p. 1293–1300, 2015.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00083>

NEGISHI, K.; MASHIKO, Y.; YAMASHITA, E.; OTSUKA, A.; HASEGAWA, T. Cellulose chemistry meets click chemistry: syntheses and properties of cellulose-based glycoclusters with high structural homogeneity. **Polymers**, vol. 3, no. 4, p. 489–508, 2011. DOI 10.3390/polym3010489

NEHLS, I.; WAGENKNECHT, W.; PHILIPP, B.; STSCHERBINA, D. Characterization of cellulose and cellulose derivatives in solution by high resolution ¹³C-NMR spectroscopy. **Progress in Polymer Science**, vol. 19, p. 29–78, 1994. [https://doi.org/10.1016/0079-6700\(94\)90037-X](https://doi.org/10.1016/0079-6700(94)90037-X)

NEUMANN, S.; BIEWEND, M.; RANA, S.; BINDER, W. H. The CuAAC: principles, homogeneous and heterogeneous catalysts, and novel developments and applications. **Macromolecular Rapid Communications**, vol. 41, no. 1, 2020.
<https://doi.org/10.1002/marc.201900359>

NISHIYAMA, Y.; JOHNSON, G. P.; FRENCH, A. D.; FORSYTH, V. T.; LANGAN, P. Neutron crystallography, molecular dynamics, and quantum mechanics studies of the nature of hydrogen bonding in cellulose I β . **Biomacromolecules**, vol. 9, p. 3133–3140, 2008.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bm800726v>

NOKAB, M. E. H. El; HABIB, M. H.; ALASSMY, Y. A.; ABDULJAWAD, M. M.; ALSHAMRANI, K. M.; SEBAKHY, K. O. Solid state NMR: a powerful technique for

investigating sustainable/renewable cellulose-based materials. **Polymers**, vol. 14, no. 5, p. 1049, 6 Mar. 2022. DOI 10.3390/POLYM14051049

NONGBE, M. C.; BRETTEL, G.; EKO, L.; EKO, T.; ROBITZER, M.; GROGNEC, E. Le; FELPIN, F.-X. Cellulose paper azide as a molecular platform for versatile click ligations: application to the preparation of hydrophobic paper surface. **Cellulose**, vol. 25, p. 1395–1411, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1647-5>

NONGBE, M. C.; BRETTEL, G.; EKO, T.; EKO, L.; YAO, B. K.; GROGNEC, E. L.; FELPIN, F.-X. Cellulose paper grafted with polyamines as powerful adsorbent for heavy metals. **Cellulose**, vol. 25, p. 4043–4055, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1833-0>

NOVOZYMES BIOPHARMA DK A/S. Lipases for biocatalysis. **Technical Note Novozymes**, p. 11, 2016. Disponível em: <https://www.novozymes.com/en/solutions/fine-chemicals/biocatalysis/lipases>

O'CONNOR, R. T.; DUPRÉ, E. F.; MCCALL, E. R. Infrared spectrophotometric procedure for analysis of cellulose and modified cellulose. **Analytical Chemistry**, vol. 29, no. 7, p. 998–1005, 1957. <https://doi.org/10.1021/ac60127a003>

OBERMEYER, A. C.; OLSEN, B. D. Synthesis and application of protein-containing block copolymers. **ACS Macro Letters**, vol. 4, no. 1, p. 101–110, 2015. <https://doi.org/10.1021/mz500732e>

ORTIZ, C.; FERREIRA, M. L.; BARBOSA, O.; DOS SANTOS, J. C. S.; RODRIGUES, R. C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; BRIAND, L. E.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst? **Catalysis Science and Technology**, vol. 9, no. 10, p. 2380–2420, 2019. <https://doi.org/10.1039/c9cy00415g>

PAHIMANOLIS, N.; HIPPI, U.; JOHANSSON, L.-S.; SAARINEN, T.; HOUBENOV, N.; RUOKOLAINEN, J.; SEPPÄLÄ, J. Surface functionalization of nanofibrillated cellulose using click-chemistry approach in aqueous media. **Cellulose**, vol. 18, p. 1201–1212, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9573-4>

PAIXÃO, G. A.; SOUZA, T. G.; PRADELA FILHO, L. A.; FERREIRA, M. V.; TAKEUCHI, R. M.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; KIKUTI, E. Low-cost conductive films based on graphite and cellulose acetate as promising electroanalytical platforms. **Polymers for Advanced Technologies**, vol. 32, no. 9, p. 3714–3723, 2021. <https://doi.org/10.1002/pat.5391>

PENCREAC'H, G.; BARATTI, J. C. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* Lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 18, no. 6, p. 417–422, 1996. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00120-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00120-4)

PENG, P.; CAO, X.; PENG, F.; BIAN, J.; XU, F.; SUN, R. Binding cellulose and chitosan via click chemistry: synthesis, characterization, and formation of some hollow tubes. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, vol. 50, p. 5201–5210, 2012. <https://doi.org/10.1002/pola.26371>

PEREIRA, A. R. Síntese e caracterização de um derivado de celulose aminado e sua

utilização na remoção de Cu (II) e As (V) de soluções aquosas mono- e multicomponente. 2019. 149 f. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Ouro Preto. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/12039>

PETZOLD-WELCKE, K.; MICHAELIS, N.; HEINZE, T. Unconventional cellulose products through nucleophilic displacement reactions. **Macromolecular Symposia**, vol. 280, no. 1, p. 72–85, 2009. <https://doi.org/10.1002/masy.200950609>

PIERRE-ANTOINE, F.; FRANÇOIS, B.; RACHIDA, Z. Crosslinked cellulose developed by CuAAC, a route to new materials. **Carbohydrate Research**, vol. 356, p. 247–251, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2011.10.028>

PINTO, E. R. P.; BARUD, H. S.; SILVA, R. R.; PALMIERI, M.; POLITO, W. L.; CALIL, V. L.; CREMONA, M.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Transparent composites prepared from bacterial cellulose and castor oil based polyurethane as substrates for flexible OLEDs. **Journal of Materials Chemistry C**, vol. 3, no. 44, p. 11581–11588, 2015. <http://dx.doi.org/10.1039/c5tc02359a>

RAHN, K.; DIAMANTOGLU, M.; KLEMM, D.; BERGHMANS, H.; HEINZE, T. Homogeneous synthesis of cellulose p-toluenesulfonates in N,N-dimethylacetamide/LiCl solvent system. **Angewandte Makromolekulare Chemie**, vol. 238, p. 143–163, 1996. <https://doi.org/10.1002/apmc.1996.052380113>

REIS, A. M.; VIEIRA, A.; SANTOS, A.; FERREIRA, M.; BATISTA, A.; ASSUNÇÃO, R.; RODRIGUES FILHO, G.; RIBEIRO, E.; FARIA, A. Regenerated cellulose membrane from peanut shell for biodiesel purification. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 00, no. 00, p. 1–10, 2020. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190267>

RIBEIRO, E. A.; RODRIGUES FILHO, G.; ASSUNÇÃO, R. M. N. De; FERREIRA, M. V.; ROYER, B.; REIS, F. V.; CERQUEIRA, D. A.; MUNOZ, R. A. A. Efeito do teor de glicerol no transporte de vapor d'água através de filmes de triacetato de celulose produzidos a partir do aproveitamento da palha de milho (*Zea mays* L.). **Química Nova**, vol. 44, no. 1, p. 28–34, 2021. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170662>

RINGOT, C.; SOL, V.; GRANET, R.; KRAUSZ, P. Porphyrin-grafted cellulose fabric: New photobactericidal material obtained by “Click-Chemistry” reaction. **Materials Letters**, vol. 63, no. 21, p. 1889–1891, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.06.009>

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, vol. 59, p. 1–41, 2015. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>

RODRIGUES FILHO, G.; RIBEIRO, S. D.; MEIRELES, C. da S.; DA SILVA, L. G.; RUGGIERO, R.; FERREIRA, M. F.; CERQUEIRA, D. A.; DE ASSUNÇÃO, R. M. N.; ZENI, M.; POLLETO, P. Release of doxycycline through cellulose acetate symmetric and asymmetric membranes produced from recycled agroindustrial residue: Sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, vol. 33, no. 3, p. 566–571, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.037>

RÖHRL, M.; KÖDEL, J. F.; TIMMINS, R. L.; CALLSEN, C.; AKSIT, M.; FINK, M. F.; SEIBT, S.; WEIDINGER, A.; BATTAGLIARIN, G.; RUCKDÄSCHEL, H.; SCHOBERT,

R.; BREU, J.; BIRSACK, B. New Functional Polymer Materials via Click Chemistry-Based Modification of Cellulose Acetate. **ACS Omega**, vol. 8, no. 11, p. 9889–9895, 2023. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06811>

ROSEN, C. B.; FRANCIS, M. B. Targeting the N terminus for site-selective protein modification. **Nature Chemical Biology**, vol. 13, no. 7, p. 697–705, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2416>

ROSILO, H.; KONTTURI, E.; SEITSONEN, J.; KOLEHMAINEN, E.; IKKALA, O. Transition to reinforced state by percolating domains of intercalated brush-modified cellulose nanocrystals and poly(butadiene) in cross-linked composites based on Thiol–ene click chemistry. **Biomacromolecules**, vol. 14, p. 1547–1554, 2013. DOI 10.1021/bm400185z

ROSTOVTSSEV, V. V.; GREEN, L. G.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie - International Edition**, vol. 41, no. 14, p. 2596–2599, 2002. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4)

ROUQUEROLT, J.; AVNIR, D.; FAIRBRIDGE, C. W.; EVERETT, D. H.; HAYNES, J. H.; PERNICONE, N.; RAMSAY, J. D. F.; SING, K. S. W.; UNGER, K. K. Recommendations for the characterization of porous solids. **Pure & Appl. Chem.**, vol. 66, no. 8, p. 1739–1758, 1994. <https://doi.org/doi:10.1351/pac199466081739>

SANNIGRAHI, A.; DE, N.; CHATTOPADHYAY, K. The bright and dark sides of protein conformational switches and the unifying forces of infections. **Communications Biology**, vol. 3, no. 382, p. 1–6, 2020. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1115-x>

SARAVANAN, A.; KARISHMA, S.; KUMAR, P. S.; RANGASAMY, G. A review on regeneration of biowaste into bio-products and bioenergy: Life cycle assessment and circular economy. **Fuel**, vol. 338, p. 127221, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.127221>

SCHMID, F. Biological Macromolecules: UV-visible spectrophotometry. **Encyclopedia of Life Sciences**, Macmillan Publishers Ltd, p. 1–4, 2001. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0003142>

SHAGHALEH, H.; XU, X.; WANG, S. Current progress in production of biopolymeric materials based on cellulose, cellulose nanofibers, and cellulose derivatives. **RSC Advances**, vol. 8, no. 2, p. 825–842, 2018. <https://doi.org/10.1039/c7ra11157f>

SHARIFI, M.; ROBATJAZI, S. M.; SADRI, M.; MOSAABADI, J. M. Covalent immobilization of organophosphorus hydrolase enzyme on chemically modified cellulose microfibers: Statistical optimization and characterization. **Reactive and Functional Polymers**, vol. 124, p. 162–170, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.01.019>

SHARIFI, M.; ROBATJAZI, S. M.; SADRI, M.; MOSAABADI, J. M. Immobilization of organophosphorus hydrolase enzyme by covalent attachment on modified cellulose microfibers using different chemical activation strategies: Characterization and stability studies. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, vol. 27, p. 191–199, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2018.03.023>

SHEN, D. K.; GU, S. The mechanism for thermal decomposition of cellulose and its main products. **Bioresource Technology**, vol. 100, no. 24, p. 6496–6504, 2009.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.095>

SILVA, F. B.; MORAIS JÚNIOR, W. G.; SILVA, C. V.; VIEIRA, A. T.; BATISTA, A. C. F.; FARIA, A. M. de; ASSUNÇÃO, R. M. N. Preparation and characterization of cellulose triacetate as support for lecithase ultra immobilization. **Molecules**, vol. 22, no. 11, p. 1–19, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22111930>

SILVA, F. B. **Preparação e caracterização de triacetato de celulose a partir da polpa Kraft: aplicação na imobilização de lipase e catálise de reações de transesterificação**. 2017. 105 f. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal de Uberlândia.
<http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.15>

SILVÉRIO, H. A.; FLAUZINO NETO, W. P.; DANTAS, N. O.; PASQUINI, D. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corncob for application as reinforcing agent in nanocomposites. **Industrial Crops and Products**, vol. 44, p. 427–436, 2013.
<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2012.10.014>

SÓTI, P. L.; WEISER, D.; VIGH, T.; NAGY, Z. K.; POPPE, L.; MAROSI, G. Electrospun polylactic acid and polyvinyl alcohol fibers as efficient and stable nanomaterials for immobilization of lipases. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 39, no. 3, p. 449–459, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1528-y>

SU, F. H.; TABAÑAG, I. D. F.; WU, C. Y.; TSAI, S. L. Decorating outer membrane vesicles with organophosphorus hydrolase and cellulose binding domain for organophosphate pesticide degradation. **Chemical Engineering Journal**, vol. 308, p. 1–7, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.09.045>

SUN, L.; YANG, S.; QIAN, X.; AN, X. High-efficacy and long term antibacterial cellulose material: anchored guanidine polymer via double “click chemistry.” **Cellulose**, vol. 27, p. 8799–8812, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03374-5>

SWINGLER, S.; GUPTA, A.; GIBSON, H.; KOWALCZUK, M.; HEASELGRAVE, W.; RADECKA, I. Recent advances and applications of bacterial cellulose in biomedicine. **Polymers**, vol. 13, no. 412, p. 1–29, 2021. <https://doi.org/10.3390/polym13030412>

SYEDD-LÉON, R.; SANDOVAL-BARRANTES, M.; TRIMIÑO-VÁSQUEZ, H.; VILLEGAS-PENARANDA, L. R.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, G. Revisiting the fundamentals of p-nitrophenol analysis for its application in the quantification of lipases activity. A graphical update. **Uniciencia**, vol. 34, no. 2, p. 31–43, 2020.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15359/ru.34-2.2>

TAKAHASHI, S.; FUJIMOTO, T.; BARUA, B. M.; MIYAMOTO, T.; INAGAKI, H. ¹³C-NMR spectral studies on the distribution of substituents in some cellulose derivatives. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, vol. 24, no. 11, p. 2981–2993, 1986. <https://doi.org/10.1002/pola.1986.080241125>

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, vol. 28, no. 5, p. 628–634, 2010.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.012>

TANG, T.; CASTELLETTO, V.; PARRAS, P.; HAMLEY, I. W.; KING, S. M.; ROY, D.; PERRIER, S.; HOOGENBOOM, R.; SCHUBERT, U. S. Thermo-responsive poly(methyl methacrylate)-block-poly(N- isopropylacrylamide) block copolymers synthesized by RAFT polymerization: Micellization and gelation. **Macromolecular Chemistry and Physics**, vol. 207, no. 19, p. 1718–1726, 2006. <https://doi.org/10.1002/macp.200600309>

TARCHOUN, A. F.; TRACHE, D.; KLAPÖTKE, T. M.; KRUMM, B.; KHIMECHE, K.; MEZROUA, A. A promising energetic biopolymer based on azide-functionalized microcrystalline cellulose: Synthesis and characterization. **Carbohydrate Polymers**, vol. 249, no. p. 116820, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116820>

TEIXEIRA, E. M.; OLIVEIRA, C. R.; MATTOSO, L. H. C.; CORRÊA, A. C.; PALADIN, P. D. Nanofibras de algodão obtidas sob diferentes condições de hidrólise ácida. **Polímeros**, vol. 20, no. 4, p. 264–268, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-14282010005000046>

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, vol. 29, no. 2, p. 338–350, 2006. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000200026>

THOMMES, M.; KANEKO, K.; NEIMARK, A. V.; OLIVIER, J. P.; RODRIGUEZ-REINOSO, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K. S. W. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, vol. 87, no. 9–10, p. 1051–1069, 2015. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>

TINGAUT, P.; HAUERT, R.; ZIMMERMANN, T. Highly efficient and straightforward functionalization of cellulose films with thiol-ene click chemistry. **Journal of Materials Chemistry**, no. 21, p. 16066–16076, 2011. <https://doi.org/10.1039/c1jm11620g>

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, vol. 2, no. 4, p. 293–308, 1994. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00031-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00031-9)

VIEIRA, J. G.; OLIVEIRA, G. de C.; FILHO, G. R.; ASSUNÇÃO, R. M. N. de; MEIRELES, C. da S.; CERQUEIRA, D. A.; SILVA, W. G.; MOTTA, L. A. de C. Production, characterization and evaluation of methylcellulose from sugarcane bagasse for applications as viscosity enhancing admixture for cement based material. **Carbohydrate Polymers**, vol. 78, no. 4, p. 779–783, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.06.016>

WRIGHT, T. A.; PAGE, R. C.; KONKOLEWICZ, D. Polymer conjugation of proteins as a synthetic post-translational modification to impact their stability and activity. **Polymer Chemistry**, vol. 10, no. 4, p. 434–454, 2019. <https://doi.org/10.1039/c8py01399c>

XIA, H.; ZHANG, W.; YANG, Z.; DAI, Z.; YANG, Y. Spectrophotometric determination of *p*-nitrophenol under ENP interference. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, vol. 2021, p. 1–9, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6682722>

XIAO, J.; TOLBERT, T. J. Synthesis of n-terminally linked protein dimers and trimers by a combined native chemical ligation-CuAAC click chemistry strategy. **Organic Letters**, vol. 11, no. 18, p. 4144–4147, 2009. <https://doi.org/10.1021/ol9016468>

XU, C.; SUO, H.; XUE, Y.; QIN, J.; CHEN, H.; HU, Y. Experimental and theoretical evidence of enhanced catalytic performance of lipase B from *Candida antarctica* acquired by the chemical modification with amino acid ionic liquids. **Molecular Catalysis**, vol. 501, p. 111355, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2020.111355>

XU, L.; WU, P.; DONG, J. New Polymers From SuFEx Click Chemistry: Syntheses and Perspectives. In *Synthetic Polymer Chemistry: Innovations and Outlook*; Zhao, Z., Hu, R., Qin, A., Tang, B. Z., Eds.; RSC Polymer Chemistry Series; Royal Society of Chemistry, 32, p 1–31, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1039/9781788016469-00001>

YANG, F. F.; SHAO, Z.; LI, N. K.; WANG, F. J.; ZHANG, Y. A novel cellulose-based azide energetic material: 1-Azido-2-hydroxypropyl cellulose ether. **Journal of Energetic Materials**, vol. 29, no. 3, p. 241–260, 2011. <https://doi.org/10.1080/07370652.2010.523755>

YOSHIKAWA, N.; BANDO, S.; KONISHI, H.; LI, C.; YOSHIDA, K. **Method for Purification of Pyridine, and Method for production of Chlorinated Pyridine**. (Patent No. US 2010/0324299 A1)

ZHANG, J.; XU, X. D.; WU, D. Q.; ZHANG, X. Z.; ZHUO, R. X. Synthesis of thermosensitive P(NIPAAm-co-HEMA)/cellulose hydrogels via “click” chemistry. **Carbohydrate Polymers**, vol. 77, no. 3, p. 583–589, 2009. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2009.01.023>

ZHAO, G. L.; HAFRÉN, J.; DEIANA, L.; CÓRDOVA, A. Heterogeneous “organoclick” derivatization of polysaccharides: Photochemical thiol-ene click modification of solid cellulose. **Macromolecular Rapid Communications**, vol. 31, p. 740–744, 2010. <https://doi.org/10.1002/marc.200900764>

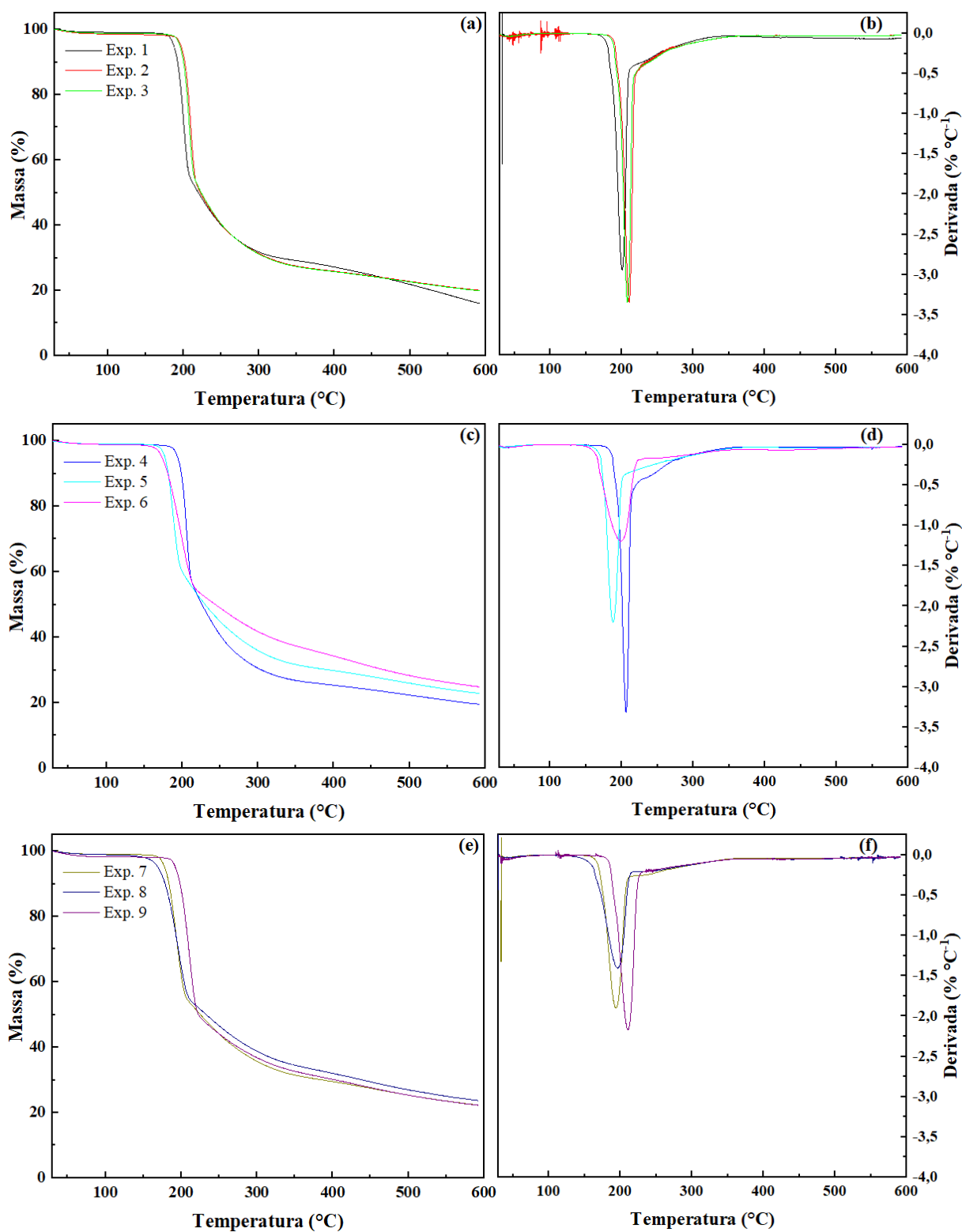
ZHOU, L.; HE, H.; LI, M. C.; HUANG, S.; MEI, C.; WU, Q. Grafting polycaprolactone diol onto cellulose nanocrystals via click chemistry: Enhancing thermal stability and hydrophobic property. **Carbohydrate Polymers**, vol. 189, p. 331–341, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.039>

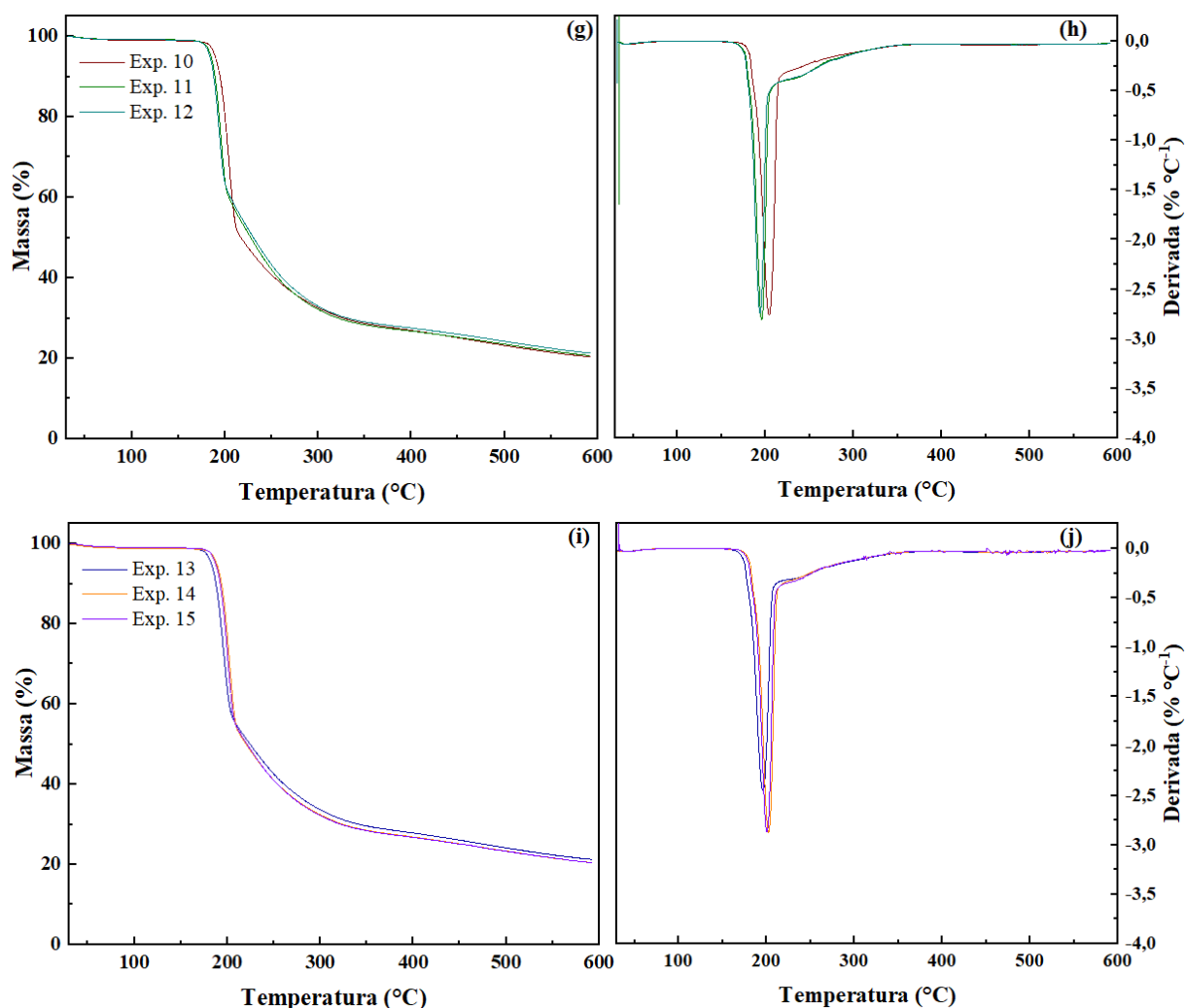
ZHOU, L.; TANG, L. S.; TAO, X. F.; YANG, J.; YANG, M. B.; YANG, W. Facile fabrication of shape-stabilized polyethylene glycol/cellulose nanocrystal phase change materials based on thiol-ene click chemistry and solvent exchange. **Chemical Engineering Journal**, vol. 396, p. 125206, 2020. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2020.125206>

ZNISZCZOŁ, A.; HERMAN, A. P.; SZYMAŃSKA, K.; MROWIEC-BIAŁOŃ, J.; WALCZAK, K. Z.; JARZEBSKI, A.; BONCEL, S. Covalently immobilized lipase on aminoalkyl-, carboxy- and hydroxy-multi-wall carbon nanotubes in the enantioselective synthesis of Solketal esters. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 87–88, p. 61–69, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.02.015>

6. ANEXOS

Anexo I – Curvas TGA (a, c, e, g, i) e DTG (b, d, f, h, j) para os derivados MCC-Tos produzidos nos experimentos do planejamento experimental por Matriz Doehlert. Taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de N_2 a $60\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$.





Fonte: o autor.

Do Anexo 1a,c,e,g,i retira-se que as temperaturas T_{onset} variaram de 174 a 201 °C, T_{endset} de 195 a 219 °C, as %P.M. de 27 a 47% e as %resíduos a 600 °C variaram de 15 a 25 %. Para os Anexos 1b,d,f,h,j vem que as $T_{\text{máx}}$ variaram de 187 a 211 °C. Estes valores e perfis das curvas TGA/DTG confirmam a produção dos derivados celulósicos MCC-Tos, como visto por FTIR e pelas comparações com dados da literatura para diferentes GS de tosilatos de celulose (HAMDAOUI *et al.*, 2020). Além disso, todos os experimentos apresentaram menor estabilidade térmica do que a MCC sem modificação, como esperado. O Anexo 2 traz os valores dos dados termogravimétricos obtidos para todos os experimentos do planejamento experimental, com seus respectivos valores de RB (1174/1056) e GS.

Anexo 2 – Dados termogravimétricos obtidos a partir das curvas TGA/DTG para os derivados MCC-Tos produzidos nos experimentos do planejamento experimental por Matriz Doehlert, comparados às RB calculadas a partir do FTIR e aos GS.

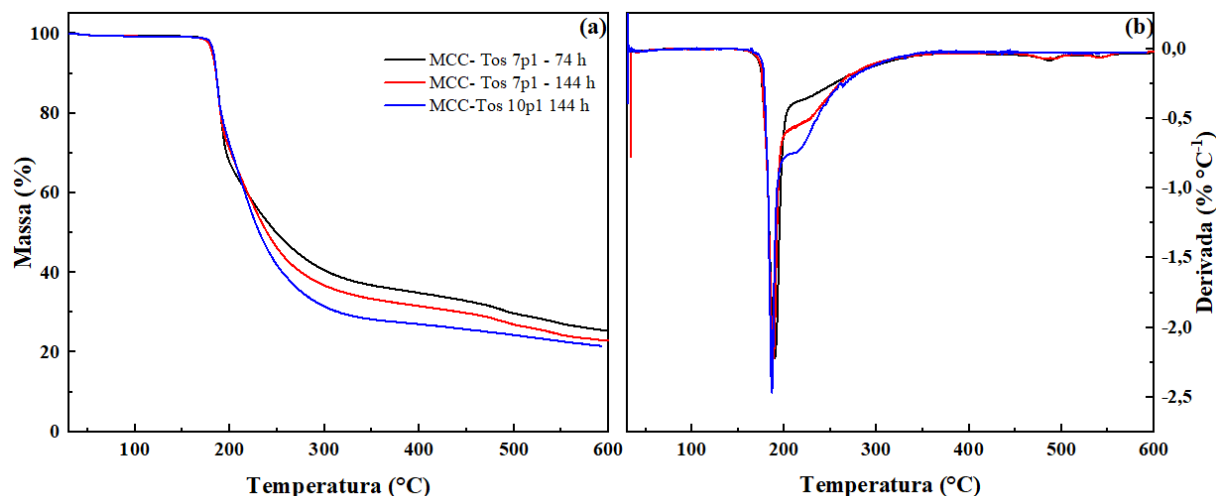
Exp.	T_{onset} (°C)	T_{endset} (°C)	T_{máx} (°C)	%P.M.	%Resíduo	RB	GS
1*	191,37	206,51	200,58	42,490	15,972	0,4423	0,61
2	201,05	215,35	210,43	44,946	20,032	0,4340	0,59
3	199,72	212,95	208,17	43,338	19,889	0,4877	0,71
4	197,54	210,88	206,32	41,035	19,527	0,5064	0,74
5	178,36	195,67	187,95	37,007	22,846	0,4761	0,68
6	176,03	212,40	199,08	42,555	24,846	0,3276	0,37
7	180,37	203,29	194,06	42,946	22,310	0,4226	0,57
8	174,38	206,70	196,56	42,272	23,694	0,3541	0,43
9	196,96	219,39	210,93	46,903	22,274	0,3023	0,32
10	193,11	210,81	204,23	46,779	20,360	0,3846	0,49
11	187,20	200,97	195,85	37,731	20,708	0,5346	0,80
12	185,63	199,29	193,98	37,755	21,305	0,5294	0,79
13	185,28	202,74	196,14	40,814	21,238	0,4416	0,61
14*	192,36	208,36	202,29	43,864	20,429	0,4368	0,60
15*	191,11	206,32	200,58	43,312	20,425	0,4326	0,59

Fonte: o autor.

Uma tentativa de identificar relações entre os dados termogravimétricos e as RB e/ou GS não permitiu que se observasse comportamento que pudessem ser descritos, como aqueles para o MCC-Tos (5:1) em que somente variou-se o tempo reacional (Figura 2.18 e Tabela 2.15). Isto se deve às alterações simultâneas em mais de uma variável (tempo, temperatura e/ou RM) entre cada experimento do planejamento que, em suma, também devem influenciar o comportamento térmico do material final, além do que somente a quantidade de grupos tosila inseridos. Ademais, os valores de RB e GS variaram muito pouco entre si para alguns experimentos, o que pôde não resultar em variação perceptível nos dados termogravimétricos.

Os produtos MCC-Tos após a otimização das condições experimentais pelo planejamento da Matriz Doehlert também foram caracterizados por TGA/DTG e suas curvas estão apresentadas no Anexo 3.

Anexo 3 – (a) Curvas TGA e (b) DTG para as amostras de MCC-Tos após definição das condições otimizadas. Taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de N_2 a $60\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$.



Fonte: o autor.

As curvas TGA do Anexo 3 mostram que os derivados produzidos na condição otimizada (MCC-Tos 7:1 – 74 h), nas condições otimizadas extrapoladas de tempo (MCC-Tos 7:1 – 144 h) e de tempo e RM (MCC-Tos 10:1 – 144 h) tem estabilidade térmica semelhante para o evento térmico principal com T_{onset} próximas. A discussão dos outros dados termogravimétricos, obtidos a partir das curvas TGA/DTG, será feita a partir do Anexo 4.

Anexo 4 – Dados termogravimétricos obtidos a partir das curvas TGA/DTG para as MCC-Tos produzidas em condições otimizadas, comparados às RB calculadas a partir do FTIR e aos GS.

<i>Amostras</i>	$T_{\text{onset}}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$	$T_{\text{endset}}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$	$T_{\text{máx}}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$	%P.M.	%Resíduo	RB	GS
<i>MCC-Tos 7:1 - 74 h</i>	181,68	196,09	189,62	29,867	25,324	0,6472	1,04
<i>MCC-Tos 7:1 - 144 h</i>	181,51	192,37	188,01	22,736	22,852	0,8774	1,51
<i>MCC-Tos 10:1 - 144 h</i>	181,39	189,29	186,80	16,929	21,556	0,9769	1,72

Fonte: o autor.

Como mais de uma condição reacional foi alterada entre as três amostras, foram comparadas (MCC-Tos 7:1 – 74 h) com (MCC-Tos 7:1 – 144 h) e (MCC-Tos 7:1 – 144 h) e (MCC-Tos 10:1 – 144 h), em relação à T_{endset} , %P.M. e %resíduo. Em cada conjunto de comparações, foi possível observar o mesmo comportamento de ligeira redução nos valores destes três dados termogravimétricos com o aumento da inserção de grupos tosila (indicado pelo aumento na RB e nos GS) devido ao aumento na formação de ácido *p*-toluenossulfônico e consequente maior despolimerização das cadeias poliméricas, como descrito no item 2.2.3.1. Porém, valores próximos de T_{onset} como os obtidos, podem indicar que uma ordem

supramolecular semelhante pode ter sido alcançada nas condições experimentais testadas para os diferentes MCC-Tos, como discutido anteriormente (HEINZE *et al.*, 1996).

Em seguida, no Anexo 5 estão apresentadas as isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio para as amostras MCC, MCC-Tos e MCC-Az, conforme discussão apresentada no item 2.2.6.2.

Anexo 5 – Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio dos materiais celulósicos (a) MCC; (b) MCC-Tos; e (c) MCC-Az.

