

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Camila Van Zanten Coura

Modificação química da superfície de nanocristais
de celulose via reação “click” para a obtenção
de bionanomateriais funcionais

Belo Horizonte

2015

UFMG/ICEx/DQ. 1097

D. 598

Camila Van Zanten Coura

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Físico-Química.

Belo Horizonte

2015

C858m
2015
D

Coura, Camila van Zanten
Modificação química da superfície de nanocristais de celulose via reação "click" para a obtenção de bionanomateriais funcionais [manuscrito] / Camila van Zanten Coura. 2015.
[xiii], 113 f. : il.

Orientador: Fabiano Vargas Pereira.
Coorientador: Eufrânio Nunes da Silva Júnior.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Físico-Química - Teses 2. Cristais - Teses 3. Celulose - Teses 4. Lignocelulose - Teses I. Pereira, Fabiano Vargas, Orientador II. Silva Júnior, Eufrânio Nunes da, Coorientador III Título.

CDU 043



**"Modificação Química da Superfície de Nanocristais de Celulose via Reação
"Click" para a Obtenção de Bionanomateriais Funcionais"**

Camila Van Zanten Côura

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Fabiano Vargas Pereira - Orientador
UFMG

Prof. Eufrânio Nunes da Silva Júnior - Coorientador
UFMG

Prof. Luciano Andrey Montoro
UFMG

Profa. Hállen Daniel Rezende Calado
UFMG

Belo Horizonte, 29 de julho de 2015.

AGRADECIMENTOS

À toda força espiritual que me cerca e me apoia ininterruptamente, minha gratidão eterna.

À minha família, meu pai (seu Coura), minha mãe (Bernadete), Rose e irmãos (Letícia, Davi e Miguel) obrigada pelo amor, pelos ensinamentos sutis e valiosos, e por me apoiarem quando mais preciso. Ao meu pai, principalmente, pelo incentivo constante à minha formação intelectual e humana, e por me mostrar que somente a educação poderia me levar onde quer que eu sonhasse chegar.

Ao Valdir, pela paciência, incentivo, apoio, carinho e ajuda constantes. Sua presença nesta etapa da minha vida foi fundamental.

A todos os meus amigos, que sabem que o são, muito obrigada.

Ao Professor Fabiano Vargas, orientador deste projeto, pela amizade, pelas oportunidades de aprendizado e crescimento científico, pelo apoio em outras causas importantes e pela orientação valiosa.

Ao Professor Eufrânio Júnior, coorientador deste projeto, pela contribuição sem a qual este trabalho não teria sido possível.

Ao pessoal da secretaria de pós-graduação do Departamento de Química, em especial LÍlian, Paulete, Fernanda, Marane, Alessandra e Bruno, por toda ajuda e paciência.

Ao Centro de Microscopia da UFMG pelas imagens fornecidas.

Ao Ismael e Alexandre, do CDTN, pela ajuda com as análises por XPS.

À Ana, do IV; à Juliana e Luciana, do DRX; ao Marley, do CHN e à Prof. Maria Irene, da TG, pelas análises realizadas.

À Professora Rosane San Gil, da UFRJ, pelas análises de RMN CP/MAS de ^{13}C .

À CAPES, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	4
2.1. Celulose.....	4
2.2. Nanocristais de celulose (NCC).....	10
2.3. Reações <i>click</i>	16
2.3.1. Reações <i>click</i> aplicadas a polissacarídeos	19
2.4. Quinonas com atividade antitumoral e moléculas fluorescentes	23
2.5. Liberação controlada de fármacos e marcadores fluorescentes	27
3. Objetivos.....	32
4. Metodologia.....	33
4.1. Materiais.....	33
4.2. Obtenção dos NCC.....	34
4.3. Preparação dos precursores NCC-N ₃ e NCC-P.....	34
4.3.1. Preparação de NCC-N ₃	34
4.3.2. Preparação de NCC-P.....	36
4.4. Reações <i>click</i>	36
4.4.1. NCC-QA.....	36
4.4.2. NCC-BTD.....	37
4.4.4. NCC-QN ₃	38
4.4.4. NCC-Fen.....	38
4.5. Caracterização dos materiais.....	39
4.5.1. Birrefringência de fluxo.....	39
4.5.2. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	39

4.5.3.	Difração de raios X (DRX).....	39
4.5.4.	Análise elementar (CHN)	40
4.5.5.	Análise termogravimétrica (TG)	40
4.5.6.	Espectroscopia UV-Vis e espectroscopia de fluorescência.....	40
4.5.7.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	40
4.5.8.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	41
4.5.9.	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS).....	41
5.	Resultados e discussões	42
5.1.	Caracterização dos NCC	42
5.1.1.	Birrefringência de fluxo.....	42
5.1.2.	Espectroscopia no infravermelho	42
5.1.3.	Difração de raios X.....	44
5.1.4.	Morfologia dos NCC	45
5.1.5.	Análise elementar	46
5.1.6.	Análise termogravimétrica	47
5.1.7.	Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C.....	48
5.2.	Caracterização do precursor NCC-N ₃	49
5.2.1.	Obtenção do precursor NCC-Tos	49
5.2.2.	Obtenção do precursor NCC-N ₃ a partir de NCC-Tos.....	51
5.2.2.1.	Espectroscopia no infravermelho (FT-IR).....	51
5.2.2.2.	Difração de raios X.....	52
5.2.2.3.	Análise elementar	53
5.2.2.4.	Análise termogravimétrica	55
5.3.	Caracterização do precursor NCC-P	56
5.3.1.	Espectroscopia no infravermelho	56
5.3.2.	Difração de raios X.....	57
5.3.3.	Análise elementar	58
5.3.4.	Análise termogravimétrica	58
5.4.	Caracterização do produto <i>click</i> NCC-QA.....	60

5.4.1.	Espectroscopia no infravermelho	60
5.4.2.	Difração de raios X.....	62
5.4.3.	Análise elementar	63
5.4.4.	Análise termogravimétrica	64
5.4.5.	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	66
5.4.6.	Ressonância Magnética Nuclear.....	67
5.4.7.	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS).....	68
5.5.	Caracterização do produto <i>click</i> NCC-BTD.....	69
5.5.1.	Espectroscopia no infravermelho	70
5.5.2.	Difração de raios X.....	72
5.5.3.	Análise elementar	73
5.5.4.	Análise termogravimétrica	74
5.5.5.	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	76
5.5.6.	Espectroscopia UV-Vis e espectroscopia de fluorescência.....	76
5.5.7.	Ressonância Magnética Nuclear.....	78
5.5.8.	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X.....	79
5.6.	Caracterização do produto <i>click</i> NCC-QN ₃	79
5.6.1.	Espectroscopia no infravermelho	80
5.6.2.	Difração de raios X.....	82
5.6.3.	Análise elementar	83
5.6.4.	Análise termogravimétrica	83
5.6.5.	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	85
5.6.6.	Ressonância Magnética Nuclear.....	86
5.6.7.	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X.....	87
5.7.	Caracterização do produto <i>click</i> NCC-Fen.....	88
5.7.1.	Espectroscopia no infravermelho	88
5.7.2.	Difração de raios X.....	89
5.7.3.	Análise elementar	90
5.7.4.	Análise termogravimétrica	91

5.7.5. Espectroscopia UV-Vis e espectroscopia de fluorescência.....	93
5.7.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	95
5.7.7. Ressonância Magnética Nuclear.....	96
5.7.8. Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X.....	97
6. Conclusões.....	98
7. Referências bibliográficas	100
ANEXO.....	108

RESUMO

Neste trabalho, foi estudada a modificação superficial de nanocristais de celulose (NCC) via reação *click* com a formação do anel 1,2,3-triazólico. Aos NCC foram ligadas duas moléculas com atividade biológica antitumoral (alcino-1,4-naftoquinona – QA, e azido-1,4-naftoquinona – QN₃) e duas moléculas fluorescentes (2,1,3-benzotiadiazola aminopiridina – BTB, e Fenazina-*nor*-β-N₃ – Fenazina). Para que fosse possível a reação *click* dos NCC com as moléculas de interesse, em uma primeira etapa uma parte dos NCC foi funcionalizada superficialmente com grupos azido, fornecendo NCC-N₃, e a outra parte com grupos alcino, rendendo NCC-P. Uma parte dos NCC-N₃ foi então “clorada” com a molécula QA, obtendo-se NCC-QA, e a outra parte com a BTB, gerando NCC-BTB. Analogamente, uma parte dos NCC-P foi funcionalizada com a QN₃, fornecendo NCC-QN₃, e a outra parte com a Fenazina, rendendo NCC-Fen. Os NCC, os precursores e os produtos *click* foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho (FT-IR), difração de raios X (DRX), análise elementar (CHN), análise termogravimétrica (TG), microscopia eletrônica de transmissão (MET), ressonância magnética nuclear de ¹³C (RMN de ¹³C) e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS). Adicionalmente, os NCC funcionalizados com as moléculas fluorescentes foram caracterizados por espectroscopia UV-Vis e de fluorescência. A análise elementar permitiu estimar o grau de substituição (GS) dos grupos hidroxila dos NCC pelos grupos azido e alcino e pelas moléculas de interesse. Os valores de GS calculados para os precursores foram de 13% e 30% para NCC-N₃ e NCC-P, respectivamente. Os valores de GS para os produtos *click* foram calculados em 10% para NCC-Fen, 20% para NCC-BTB e NCC-QN₃ e 12% para NCC-QA. Todos os produtos *click* mostraram-se termicamente mais estáveis que os NCC não modificados, fornecendo mais uma evidência de modificação superficial. Apesar dos produtos *click* terem sofrido diminuição no índice de cristalinidade (IC), com valores na faixa de 51-56%, em comparação aos 88% dos NCC não modificados, as imagens de microscopia indicaram que as estruturas nanocristalinas foram preservadas mesmo após três ou quatro reações de modificação superficial.

Palavras-chave: Nanocristais de celulose; modificação superficial; 1,4-naftoquinonas; moléculas fluorescentes.

Title: Surface modification of cellulose nanocrystals via click chemistry aiming at the development of functional bionanomaterials.

ABSTRACT

In this work we aimed at the preparation of surface functionalized cellulose nanocrystals (NCC) with two bioactive molecules with potential anticancer activity (alkyne-1,4-naftoquinone – QA, and azide-1,4-naftoquinone – QN₃) and two fluorescent molecules (2,1,3-benzothiadiazole aminopiridine – BTM, and fenazine-*nor*-β-N₃ – Fenazine) via click chemistry with the formation of 1,2,3-triazole covalent linkage. In order to render NCC's surface suitable for the appendage of the molecules, a first functionalization step was required to yield azide functionalized nanocrystals (NCC-N₃) and alkyne functionalized nanocrystals (NCC-P). One batch of NCC-N₃ was then clicked with the alkyne terminated QA (yielding NCC-QA) and the other with the alkyne terminated BTM (yielding NCC-BTM). Similarly, one batch NCC-P was clicked with the azide terminated QN₃ (yielding NCC-QN₃) and the other with the azide terminated Fenazine (yielding NCC-Fen). The pristine NCC, the precursors and the click products were characterized by FT-IR, XRD, CHN, TG, TEM, ¹³C CP/MAS NMR, and XPS. In addition, the fluorescently labelled NCC were characterized by means of UV-Vis and fluorescence spectroscopy to evaluate whether the click product was rendered fluorescent. Elemental analysis data provided an estimation of the degree of substitution (DS) of NCC's hydroxyl groups by the azide and alkyne groups and the clicked molecules. Values for DS were 13% and 30% for NCC-N₃ and NCC-P, respectively; and 10% for NCC-Fen, 20% NCC-BTM and NCC-QN₃ and 12% NCC-QA. All click products were thermally more stable than the pristine NCC, which also provided further evidence for surface modification. Despite the fact that the click products suffered a decrease in their crystallinity indexes (CI), which ranged between 51-56%, compared to pristine NCC (88%), TEM analysis proved that the nanocrystalline structures were well preserved even after 3 or 4 surface modification reactions.

Key words: Nanocrystalline cellulose; surface modification; click chemistry; 1,4-naphthoquinones, fluorescent molecules.

LISTA DE ABREVIATURAS

AF: ácido fólico

AMC: 7-amino-4-metilcumarina

BTD: 2,1,3-benzotiadiazolas e 2,1,3-benzotiadiazola aminopiridina

CMC: celulose microcristalina

CNH: análise elementar

CTAB: cetiltrimetilamônio

CuAAC: cicloadição 1,3-dipolar catalisada por Cu(I) ou *copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*

DBTRG C6: células cerebrais cancerosas de rato

DBTRG-05 e H4: células cerebrais cancerosas humanas

DOX: doxorubicina

DP: grau de polimerização

DTG: análise termogravimétrica derivada

DTX: docetaxel

ESIPT: *excited-state intramolecular charge transfer*

ETOP: etoposídeo

FAM-SE: 5,6-carboxifluoresceína succinimidil éster

Fenazina (ou Fen): Fenazina-nor- β -N₃

FITC: fluoresceína isotiocianato

FT-IR: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

GS: grau de substituição

HMC: 7-hidrazino-4-metilcumarina

IC: índice de cristalinidade

ICT: *intramolecular charge transfer*

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MEV: microscopia eletrônica de varredura

NaN₃: azida de sódio

NCC: nanocristais de celulose

NCC-BTD: nanocristais de celulose modificados com 2,1,3-benzotiadiazolas

NCC-Fen: nanocristais de celulose modificados com Fenazina

NCC-N₃: nanocristais de celulose modificados com azido
NCC-P: nanocristais de celulose modificados com alcino
NCC-QA: nanocristais de celulose modificados com alcino-1,4-naftoquinona
NCC-Tos: nanocristais de celulose modificados com cloreto de *p*-toluenossulfonila
NFC: nanofibrilas de celulose
OG-SE: ácido carboxílico succinimidil éster
OLED: diodo orgânico emissor de luz ou *organic light emitting diode*
PANAM: poli(amido amina)
PEG: poli(etileno glicol)
PgBr: brometo de propargila ou 3-bromopropino
PgCl: cloreto de propargila ou 3-cloropropino
PgNH₂: amino propargila ou 3-aminopropino
PPG: poli(propileno glicol)
PTX: paclitaxel
QA: alcino-1,4-naftoquinona
RBITC: rodamina B isotiocianato
RMN CP/MAS ¹³C: ressonância magnética nuclear de ¹³C com polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico
TAMRA-SE: 5,6-carboxitetrametilrodamina succinimidil éster
TET: tetraciclina
TG: análise termogravimétrica
T_{máx}: temperatura de máxima taxa de perda de massa
T_{onset}: temperatura de início de perda de massa
TosCl: cloreto de tosila ou cloreto de *p*-toulenossulfonila
UAG: unidade de anidroglicose
UV-Vis: espectroscopia ultravioleta-visível
XPS: Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo das microfibrilas de celulose. Adaptado de Nelson e Cox [16].	5
Figura 2. Representação da cadeia macromolecular da celulose mostrando a unidade de repetição – o dissacarídeo celobiose.	6
Figura 3. Esquema estrutural da microfibrila de celulose. Adaptado de Lin e colaboradores [2].	7
Figura 4. Formas alternativas de ligações de hidrogênio na celulose I α (superior) e I β (inferior). Adaptado de Habibi [1].	8
Figura 5. Comparação entre as células unitárias dos polimorfos I α e I β da celulose. Adaptado de Moon [7].	8
Figura 6. Micrografias de NCC extraídos de a) casca de arroz (barra de escala: 100 nm) [28], b) pseudocaule de banana [30], c) resíduo de casca de batata [32] e d) tunicado [34].	11
Figura 7. Representação esquemática da fase colestérica dos NCC. Adaptado de Eichhorn [18].	14
Figura 8. Fotografia realizada em nosso laboratório (DQ-UFMG) de uma dispersão de NCC a 4% m/v visualizada entre lentes polarizadoras.	15
Figura 9. Esquema da cicloadição térmica clássica de Huisgen com obtenção de regioisômeros.	17
Figura 10. Mecanismo de formação do anel 1,2,3-triazólico catalisado por Cu(I). Adaptado de Worrel [57].	19
Figura 11. Imagens obtidas por MEV dos tubos formados após reação <i>click</i> entre a celulose e a quitosana. As barras de escala são de 10 μ m para a primeira microscopia e 100 μ m para as duas seguintes. Adaptado de Peng [66].	21
Figura 12. Hidrogéis obtidos logo após a reação <i>click</i> catalisada por Cu(I). São mostrados somente os géis 3 (G3), 6 (G6), 9 (G9) e 12 (G12). Adaptado de Koschella [67].	21
Figura 13. Imagens de MET evidenciando as estruturas em forma de “cogumelo”. A barra de escala corresponde a 100 nm em ambas imagens. Adaptado de Karaaslan [43].	23
Figura 14. Estrutura da 1,4-naftoquinona.	24
Figura 15. Estruturas de a) lapachol b) β -lapachona e c) <i>nor</i> - β -lapachona.	24
Figura 16. Estrutura da Fenazina.	25
Figura 17. Núcleo básico da 2,1,3-benzotiadiazola.	26
Figura 18. Moléculas utilizadas neste trabalho para obtenção dos produtos <i>click</i> .	33
Figura 19. Birrefringência de uma suspensão de NCC à concentração de 4% m/v. Fotografia de uma dispersão obtida com os NCC utilizados neste trabalho.	42
Figura 20. Espectro infravermelho dos NCC.	43
Figura 21. Difratoograma de raios X dos NCC.	44

Figura 22. Imagens de MET dos NCC não modificados. A barra de escala está informada na figura.	46
Figura 23. Unidade de anidroglicose (UAG).	46
Figura 24. Curvas TG e DTG dos NCC. Atmosfera de N ₂	48
Figura 25. Espectro de RMN CP/MAS de ¹³ C dos NCC.	49
Figura 26. Espectros no infravermelho de NCC e NCC-Tos (a) com detalhe na região de 750 a 2000 cm ⁻¹ (b).	50
Figura 27. Difrátogramas dos NCC e NCC-Tos.	51
Figura 28. Espectros no infravermelho dos NCC e NCC-N ₃ evidenciando a banda característica do grupo azido.	52
Figura 29. Difrátogramas de NCC e NCC-N ₃	52
Figura 30. Estrutura da UAG evidenciando os grupos hidroxila passíveis de reagir.	54
Figura 31. Curvas TG a) e DTG b) dos NCC e NCC-N ₃	56
Figura 32. Espectros no infravermelho de NCC e NCC-P evidenciando a banda correspondente ao grupo alcino.	57
Figura 33. Difrátogramas dos NCC e NCC-P.	57
Figura 34. Curvas a) TG e b) DTG dos NCC e NCC-P.	59
Figura 35. Representação esquemática dos NCC-QA.	60
Figura 36. Espectros no infravermelho de a) NCC, NCC-N ₃ e NCC-QA, b) NCC-N ₃ e NCC-QA e c) alcino-1,4-naftoquinona.	61
Figura 37. Difrátogramas dos NCC, NCC-N ₃ e NCC-QA.	62
Figura 38. a) Curvas TG dos NCC, NCC-N ₃ e NCC-QA e curvas DTG dos b) NCC e NCC-QA e c) NCC-N ₃ e NCC-QA.	65
Figura 39. Micrografias MET dos NCC-QA. A barra de escala está indicada na figura.	67
Figura 40. Espectro de RMN CP/MAS de ¹³ C dos NCC-QA.	68
Figura 41. Representação esquemática dos NCC-BTD.	70
Figura 42. a) Espectros no infravermelho dos NCC, NCC-N ₃ e NCC-BTD e b) região em detalhe dos espectros dos NCC-N ₃ e NCC-BTD.	71
Figura 43. Difrátogramas dos NCC, NCC-N ₃ e NCC-BTD.	73
Figura 44.a) Curvas TG dos NCC, NCC-N ₃ e NCC-BTD e curvas DTG dos b) NCC e NCC-BTD e c) NCC-N ₃ e NCC-BTD.	75
Figura 45. Imagens de MET para os NCC-BTD. A barra de escala está indicada na figura. ...	76
Figura 46. NCC-BTD em suspensão de acetona.	77
Figura 47. Espectros UV-Vis (a) e de fluorescência (b) dos NCC e NCC-BTD.	77
Figura 48. Espectro de RMN CP/MAS de ¹³ C dos NCC-BTD.	78
Figura 49. Representação esquemática dos NCC-QN ₃	80

Figura 50. Espectros no infravermelho de (a) NCC, NCC-P e NCC-QN ₃ , (b) NCC-P e NCC-QN ₃ e (c) azido-1,4-naftoquinona.....	81
Figura 51. Difractogramas dos NCC, NCC-P e NCC-QN ₃	82
Figura 52. Curvas TG dos NCC, NCC-P e NCC-QN ₃ (a) e curvas DTG dos NCC e NCC-QN ₃ (b) e NCC-P e NCC-QN ₃ (c).....	84
Figura 53. Imagens de MET para os NCC-QN ₃ . A barra de escala está indicada na figura.	86
Figura 54. Espectro de RMN CP/MAS de ¹³ C dos NCC-QN ₃	86
Figura 55. Representação esquemática dos NCC-Fen.	88
Figura 56. Espectros FT-IR de NCC, NCC-P e NCC-Fen (a) e NCC-P e NCC-Fen (b).....	89
Figura 57. Difractogramas dos NCC, NCC-P e NCC-Fen.	90
Figura 58. Curvas TG de NCC, NCC-P e NCC-Fen (a) e curvas DTG de NCC e NCC-Fen (b) e entre NCC-P e NCC-Fen (c).....	92
Figura 59. Suspensão de NCC-Fen em acetona.	94
Figura 60 a) Espectros UV-Vis e b) de fluorescência de NCC, Fenazina- <i>nor</i> -β-N ₃ e NCC-Fen.	95
Figura 61. Micrografias de MET dos NCC-Fen. A barra de escala está indicada na figura.	96
Figura 62. Espectro de RMN de ¹³ C CP/MAS dos NCC-Fen.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química de alguns tipos de matéria-prima lignocelulósica. Adaptado de Hon [19].	4
Tabela 2. Grau de polimerização médio para alguns tipos de celulose. Adaptado de Zugenmaier [25].	9
Tabela 3. Dimensões dos NCC de acordo com a origem da celulose. Adaptado de Habibi [1].	13
Tabela 4. Principais absorções no infravermelho para os NCC não modificados.	43
Tabela 5. Dados de análise elementar para os NCC não modificados.	47
Tabela 6. Dados dos principais eventos térmicos relacionado à degradação térmica dos NCC.	47
Tabela 7. Composição percentual dos NCC e NCC-N ₃ obtida por análise elementar.	53
Tabela 8. Dados dos principais eventos térmicos dos NCC e NCC-N ₃ .	55
Tabela 9. Composição percentual de NCC e NCC-P obtida por análise elementar.	58
Tabela 10. Dados dos principais eventos térmicos dos NCC e NCC-P.	59
Tabela 11. Índices de cristalinidade de NCC, NCC-N ₃ e NCC-QA obtidos por DRX.	62
Tabela 12. Dados de análise elementar para NCC, NCC-N ₃ e NCC-QA.	63
Tabela 13. Dados dos principais eventos térmicos dos NCC, NCC-N ₃ e NCC-QA.	66
Tabela 14. Dados de XPS de N 1s de NCC-N ₃ e NCC-QA.	69
Tabela 15. Índices de cristalinidade dos NCC, NCC-N ₃ e NCC-BTD.	72
Tabela 16. Composição percentual de NCC, NCC-N ₃ e NCC-BTD obtida por análise elementar.	73
Tabela 17. Principais eventos térmicos dos NCC, NCC-N ₃ e NCC-BTD.	74
Tabela 18. Dados de XPS de N 1s dos NCC-N ₃ e NCC-BTD.	79
Tabela 19. Índices de cristalinidade de NCC, NCC-P e NCC-QN ₃ .	82
Tabela 20. Dados de análise elementar para NCC, NCC-P e NCC-QN ₃ .	83
Tabela 21. Dados dos principais eventos térmicos dos NCC, NCC-P e NCC-QN ₃ .	85
Tabela 22. Dados de XPS de N 1s dos NCC-QN ₃ .	87
Tabela 23. Índices de cristalinidade dos NCC, NCC-P e NCC-Fen.	90
Tabela 24. Dados de análise elementar para os NCC, NCC-P e NCC-Fen.	91
Tabela 25. Dados dos principais eventos térmicos dos NCC, NCC-P e NCC-Fen.	93
Tabela 26. Dados de XPS de N 1s para NCC-Fen.	97

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

A inserção de novos materiais funcionais no nosso cotidiano, com características específicas como atividade antibacteriana, fotoluminescência, maior resistência mecânica, propriedades de barreira, dentre outras, é um dos principais objetivos da ciência dos materiais. As aplicações desses materiais são diversas, e variam desde sistemas catalíticos à engenharia de tecidos e sistemas de liberação controlada de fármacos. Além disso, são muito discutidas atualmente questões relacionadas à preservação de recursos naturais e reciclagem, levando a um renovado interesse no que se refere aos biomateriais, com especial foco na utilização de matéria-prima renovável e biodegradável em sua preparação. As características marcantes dos polissacarídeos naturais levaram ao estudo de suas aplicações nas ciências dos materiais, com possíveis modificações químicas ou físicas, no intuito de melhorar suas propriedades intrínsecas [1-4].

Entre os polissacarídeos destaca-se a celulose, o polissacarídeo de ocorrência natural mais abundante do planeta. Esse polissacarídeo é obtido de fontes renováveis e é biodegradável, atendendo, assim, a dois requisitos quase indispensáveis quando se pensa no desenvolvimento de biomateriais com características sustentáveis. Os materiais desenvolvidos a partir da celulose são muito versáteis e podem apresentar características superiores em relação aos materiais convencionalmente utilizados para aquele determinado fim e que são, normalmente, provenientes de fontes não renováveis (como os polímeros produzidos a partir de derivados do petróleo). Por exemplo, a celulose tem um longo histórico de utilização na área farmacológica, graças a sua boa capacidade de compactação quando misturada a outros excipientes farmacêuticos, formando pílulas adequadas para a administração oral de fármacos [5]. A celulose microcristalina (CMC) também é utilizada em sistemas auto-emulsificantes para liberação controlada de fármacos e formulações semissólidas injetáveis [5] e é também considerada o agente de ouro na manufatura de pellets na indústria farmacêutica [6].

A degradação das regiões amorfas das microfibrilas celulósicas, normalmente realizada por hidrólise ácida, dá origem a nanoestruturas em formato de bastões que são conhecidas como nanocristais de celulose (NCC). Os NCC vêm sendo muito explorados na engenharia de materiais no campo de materiais nanoestruturados. Por exemplo, tem-se estudado a utilização dos nanocristais para a melhoria das propriedades mecânicas e de barreira de polímeros, para a

fabricação de filmes finos, nanofibras, géis, membranas, bionanocompósitos, tecidos biocompatíveis e até mesmo como plataforma para a síntese de nanopartículas metálicas [2], [7-9].

Além de serem provenientes de fontes renováveis e serem biodegradáveis, biomateriais fabricados a partir de NCC podem ser também bioativos (pela inserção de moléculas com conhecida atividade biológica) e, graças às características intrínsecas da celulose, são também biocompatíveis e de baixa toxicidade [2]. Assim, os NCC podem constituir-se de uma importante ferramenta para aplicações biomédicas, como na preparação de sistemas de liberação controlada de moléculas bioativas, bioimagem celular – como contrastes ou marcadores celulares – e como tecidos biomiméticos [1, 2]. No que se refere à utilização desses materiais nas áreas de biomedicina e farmacologia, o uso de nanoestruturas para sistemas de liberação controlada de fármacos é muito vantajosa, pois permite a penetração das nanopartículas nos tecidos alvo por capilares sanguíneos, além de serem bem absorvidas pelas células do organismo, devido ao pequeno tamanho de partícula, muitas vezes sub-celular [10].

Os NCC possuem grupos hidroxila reativos em sua superfície que permitem a reação com uma vasta gama de moléculas. Devido às vantagens da utilização de sistemas nanométricos e baseados em biomateriais para terapia e diagnóstico, muitos trabalhos relatam a utilização dos nanocristais superficialmente modificados em diversas aplicações. Por exemplo, na linha de trabalhos ligada à incorporação de moléculas com atividade biológica aos NCC, Feese e colaboradores [11] fabricaram NCC funcionalizados superficialmente com porfirinas catiônicas e demonstraram que o material obtido apresentou excelente eficácia em relação à inativação fotodinâmica de *Mycobacterium smegmatis* e *Staphylococcus aureus*. Os autores mostraram de forma elegante como os NCC carregam grande potencial para aplicações na área da saúde, como demonstrado pela potencial fabricação de materiais bioativos e fotobactericidas.

É também reportada a utilização dos NCC para bioimagem celular [12], com amplas possibilidades de aplicação em técnicas espectrofluorimétricas, como espectrofluorimetria e microscopia de fluorescência. O uso dos NCC modificados com moléculas fluorescentes pode se tornar uma importante ferramenta no estudo da interação dos NCC com as células e a biodistribuição *in vivo* de agentes terapêuticos e de diagnóstico; eles podem ser identificados por técnicas espectrofluorimétricas, permitindo a quantificação e localização das

nanopartículas no interior das células do sistema hospedeiro, objetivando avaliar a biodistribuição dos agentes [13].

Um método que tem sido alvo de investigações para modificação superficial dos NCC e acoplamento de diversas moléculas é a reação *click*, sendo que uma das mais populares é a cicloadição 1,3-dipolar catalisada por Cu, também conhecida por CuAAC. Essa reação envolve o acoplamento do grupo alcino terminal de uma molécula ao grupo azida terminal de outra, formando o anel 1,2,3-triazólico que conecta as duas extremidades [14]. Assim, é possível modificar a superfície dos NCC com moléculas de interesse pelo acoplamento dessas duas extremidades. A CuAAC se tornou uma reação popular em virtude dos altos rendimentos atingidos, rapidez de reação em condições brandas, altas regio e estereosseletividade e simplicidade experimental de execução [14]. As reações *click* serão utilizadas para modificar a superfície dos nanocristais e permitir a incorporação das moléculas de interesse covalentemente ligadas.

Dessa forma, procurando explorar as características promissoras dos NCC como dispositivos capazes de suportar moléculas com diferentes propriedades, este trabalho teve como objetivo realizar o acoplamento de moléculas com atividade antitumoral e moléculas fluorescentes na superfície dos NCC. Para tanto, os grupos hidroxila superficiais dos NCC foram modificados, por meio de reações *click* CuAAC, para suportar as moléculas de interesse.

Capítulo 2

Revisão bibliográfica

2. Revisão bibliográfica

2.1. Celulose

A celulose é um polissacarídeo de ocorrência natural e constitui a fonte polimérica renovável mais abundante do planeta [15] visto que, anualmente, os vegetais sintetizam mais de 10^{11} toneladas de celulose [16].

A parede celular de todos os vegetais é composta por fibras de celulose incorporadas em uma matriz lignocelulósica; os outros componentes dessa matriz são a hemicelulose e a lignina, presentes em proporções variadas dependentes da espécie vegetal de origem, como exemplificado na Tabela 1. Existem, ainda, outras espécies produtoras de celulose, tais como a alga Valônia, bactérias e tunicados (animais marinhos) [17, 18].

Tabela 1. Composição química de alguns tipos de matéria-prima lignocelulósica. Adaptado de Hon [19].

Fonte	Composição / %			
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Extratos
Madeira dura (ex. eucalipto)	43-47	25-35	16-24	2-8
Madeira macia (ex. coníferas)	40-44	25-29	25-31	1-5
Bagaço de cana	40	30	20	10
Sabugo de milho	45	35	15	5
Algodão	95	2	1	0,4
Linho (não macerado)	63	12	3	13
Cânhamo	70	22	6	2
Juta	71	14	13	2
Rami	76	17	1	6
Sisal	73	14	11	2
Palha de trigo	30	50	15	5

A biossíntese da celulose nos vegetais é realizada por complexos celulose-sintase situados na membrana celular. As proteínas celulose-sintase se encontram embebidas na membrana

plasmática celular em complexos hexaméricos chamados rosetas. Cada microfibrila de celulose é formada pelo agrupamento e cristalização espontâneos de dezenas de cadeias celulósicas, feitas uma a uma pela celulose-sintase. As microfibrilas possuem de 3 a 5 nm de largura e muitos micrômetros de comprimento [20].

A celulose constitui-se por cadeias macromoleculares lineares, formadas por monômeros de β -D-glicopiranosose, também chamados de unidades de anidroglicose (UAG), unidos por ligações glicosídicas β -1,4, reunidas em conjuntos de aproximadamente 36 cadeias que se agregam lado a lado para formar microfibrilas (Figura 1) [16].

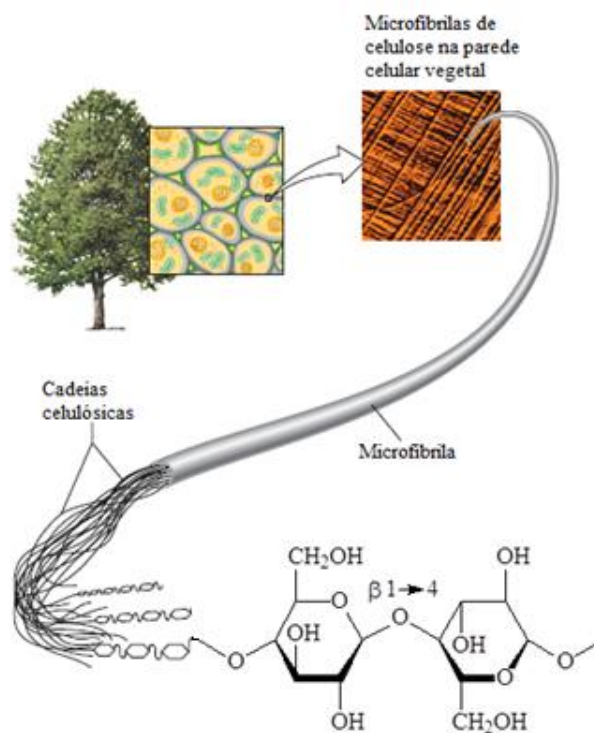


Figura 1. Esquema representativo das microfibrilas de celulose. Adaptado de Nelson e Cox [16].

Cada unidade de β -d-glicopiranosose sofre uma rotação de 180° no plano da molécula em relação à unidade adjacente, formando o dissacarídeo conhecido como celobiose, que atua como unidade recorrente na cadeia macromolecular, medindo aproximadamente 10 \AA (Figura 2). A cadeia celulósica possui duas extremidades quimicamente distintas: em uma delas (a extremidade não-redutora) o carbono anomérico participa da ligação glicosídica β -1,4; enquanto na outra extremidade (a extremidade redutora) o carbono anomérico se encontra livre e em equilíbrio entre a forma hemiacetal cíclica e o aldeído. Todos os anéis da cadeia

celulósica adotam a configuração 4C_1 da conformação de cadeira, que é a mais estável; como consequência, todos os grupos hidroxila adotam a posição equatorial nas moléculas. Essa estrutura é estabilizada por uma rede de ligações de hidrogênio intermoleculares [21].

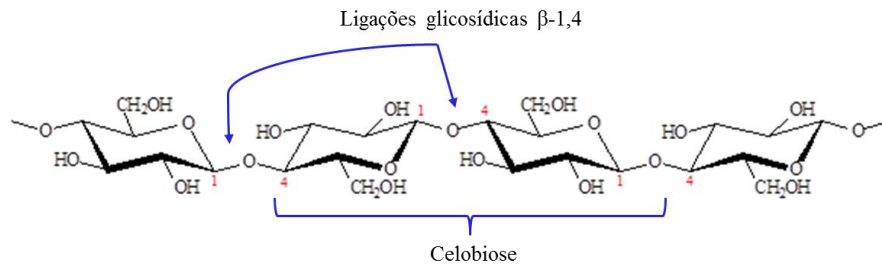


Figura 2. Representação da cadeia macromolecular da celulose mostrando a unidade de repetição – o dissacarídeo celobiose.

As cadeias de celulose possuem uma polaridade que resulta do fato das extremidades serem quimicamente distintas, como exposto anteriormente. Devido a essa polaridade natural, dois tipos de arranjos estruturais podem ocorrer, dependendo se as extremidades redutoras estão todas voltadas para a mesma direção (arranjo paralelo) ou se as extremidades redutoras e não-redutoras estão dispostas de forma alternada (arranjo antiparalelo) [21]. Após intensa investigação, determinou-se que o arranjo adotado pela celulose de ocorrência natural é o paralelo [22-24].

A estrutura básica da celulose, ou seja, as cadeias macromoleculares formadas por unidades de β -D-glicopiranosose unidas em conjuntos que formam as microfibrilas, é equivalente para todos os organismos produtores desse polissacarídeo. Entretanto, certos aspectos da celulose nativa diferem de acordo com os diferentes organismos produtores. Duas variações estruturais que são normalmente observadas são as variações na estrutura cristalina e no grau de polimerização das cadeias. É importante notar que, além das variações estruturais decorrentes das diferentes fontes das quais a celulose é extraída, esse biopolímero é também altamente passível de sofrer essas modificações quando sujeito a diferentes tratamentos químicos.

As microfibrilas de celulose são compostas por domínios amorfos e domínios cristalinos (Figura 3). Os grupos hidroxila livres presentes na estrutura macromolecular da celulose são responsáveis pelas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, que podem gerar vários tipos de arranjos cristalinos. Na celulose, esses arranjos cristalinos são geralmente imperfeitos,

de forma que, em termos de dimensões do cristal, até mesmo a orientação das cadeias macromoleculares e a pureza da forma cristalina da celulose devem ser levadas em consideração.



Figura 3. Esquema estrutural da microfibrila de celulose. Adaptado de Lin e colaboradores [2].

Quatro polimorfos principais foram identificados para a celulose: tipos I, II, III e IV, além de subgrupos desses quatro tipos. A forma natural da celulose, chamada celulose I ou celulose nativa, é aparentemente a mais abundante. Ela existe como uma estrutura tridimensional complexa resultante da coexistência de duas fases cristalinas distintas, celulose I α e I β . Ambas as fases cristalinas estão presentes em proporções variadas na matriz celulósica de acordo com a fonte da qual provém: vegetais superiores, por exemplo, são ricos na fase I β , enquanto a celulose proveniente de bactérias e algas é rica na fase I α . A celulose tipo I pode sofrer uma modificação estrutural irreversível para sua forma cristalina mais estável, celulose II, por dois processos: regeneração e mercerização. O processo de regeneração envolve o preparo de uma solução de celulose ou de um derivado intermediário da celulose em um solvente apropriado, seguido por coagulação (precipitação) e recristalização. A mercerização envolve o intumescimento da celulose em soluções concentradas de NaOH, seguido por lavagem e recristalização [21].

Apesar de ambos os polimorfos da celulose, I α e I β , apresentarem a configuração paralela das cadeias, as ligações de hidrogênio intermoleculares diferem entre si, como pode ser observado na Figura 4. Por esse motivo, o arranjo das cadeias celulósicas na macroestrutura é diferente em cada caso, de forma que cada polimorfo possui uma célula unitária distinta (Figura 5) [7].

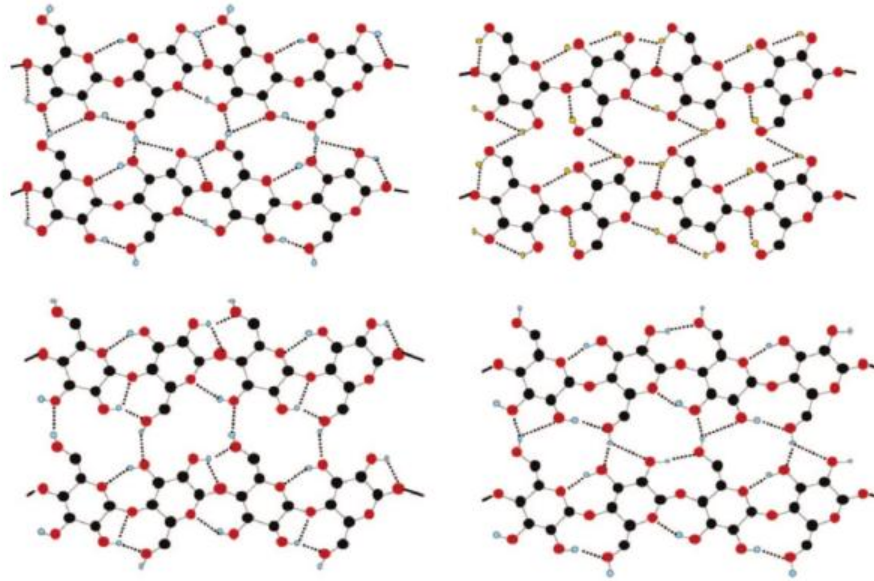


Figura 4. Formas alternativas de ligações de hidrogênio na celulose I α (superior) e I β (inferior). Adaptado de Habibi [1].

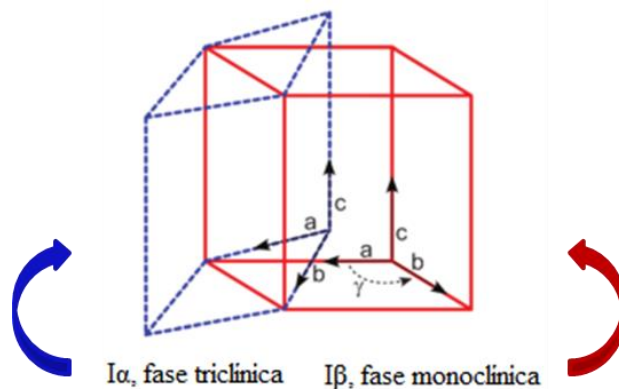


Figura 5. Comparação entre as células unitárias dos polimorfos I α e I β da celulose. Adaptado de Moon [7].

Além das diferentes estruturas cristalinas apresentadas pela celulose, o grau de polimerização (DP, *degree of polymerization*) também varia de acordo com a fonte da qual ela provém. O DP representa o número médio de unidades monoméricas – unidades de β -D-glicopiranosose, no caso da celulose, presentes em uma cadeia polimérica. Além disso, diferentes tratamentos químicos das fibras também alteram o grau de polimerização das cadeias, como pode ser observado na Tabela 2. Nota-se, por exemplo, uma diminuição significativa no DP da polpa de celulose em relação à celulose nativa proveniente da madeira.

Tabela 2. Grau de polimerização médio para alguns tipos de celulose. Adaptado de Zugenmaier [25].

Fonte de celulose	Grau de polimerização
Madeira de várias espécies	6000-10000
Polpa	500-2000
Polpa tratada com sulfato	950-1300
Polpa branqueada	700
Algodão	10000-15000
Línter de algodão branqueado	1000-5000
Valônia	25000
Celulose bacteriana	4000-6000
Rami	10000
Tecido de linho	9000
Rayon	300-500
Celofane	300
Acetato de celulose	200-350

Como matéria-prima polimérica, a celulose é historicamente utilizada como material de construção, na forma de madeira; em roupas e tecidos em geral, quando fabricados, por exemplo, a partir do algodão e do linho; como papel, cartolina, papelão e como fonte de energia por meio da queima de biomassa lignocelulósica (madeira, capim seco etc.). O vasto emprego que se dá à matéria-prima lignocelulósica deve-se, em parte, ao conhecimento humano adquirido ao longo dos séculos de suas propriedades e características. O conhecimento empírico de técnicas de tingimento de fibras celulósicas, da combustão da madeira, da obtenção de carvão e da biodegradação da celulose foi adquirido ao longo de milhares de anos.

Nas últimas décadas, esse polissacarídeo começou a ser utilizado em aplicações mais elaboradas como, por exemplo, no preparo de fios e filmes sintéticos e biodegradáveis e uma variedade de derivados estáveis de celulose que são atualmente amplamente utilizados em

vários setores industriais, dentre os quais podem-se citar os setores farmacêutico, de alimentos e de revestimento de materiais (como madeira, plástico, metal, couro, etc.) [26].

A celulose ocupa um lugar único nos anais dos polímeros. Em 1838, Payen a reconheceu como um composto químico único e cunhou o termo celulose para designar o biopolímero, que tem sido usado como precursor para transformações químicas mesmo antes de ter sua natureza polimérica reconhecida e estudada. A origem da química da celulose como um ramo de pesquisas em polímeros remonta aos experimentos de H. Staudinger nas décadas de 1920 e 1930, relativos à acetilação e desacetilação da celulose, que resultaram no conceito de reações polímero-análogos. De acordo com esse conceito, os grupos funcionais de macromoléculas – no caso da celulose, os grupos hidroxila primários e secundários – podem sofrer o mesmo tipo de reação que substâncias moleculares análogas de baixa massa molar. Em seguida, foi observado que a estrutura supramolecular do biopolímero pode ter um papel importante na determinação da velocidade e do grau de conversão, bem como na distribuição dos grupos funcionais, os quais são bem caracterizados para a celulose [27].

2.2. Nanocristais de celulose (NCC)

Os NCC são obtidos por hidrólise ácida de fibras de celulose, oferecendo vantagens como alta reatividade, biodegradabilidade e abundância natural além do intrínseco caráter renovável. Além disso, a combinação única das suas impressionantes propriedades mecânicas com as dimensões nanométricas e a alta razão de aspecto (razão entre comprimento e espessura dos bastões de NCC) conferem todas as qualidades exigidas como reforço em matrizes poliméricas [1].

Como citado anteriormente, a celulose é composta por domínios amorfos e domínios cristalinos. Os domínios amorfos são altamente susceptíveis à hidrólise e, sob condições ácidas controladas, são removidos, deixando intactos os domínios cristalinos. O material recuperado após hidrólise ocorre na forma de bastões, ou agulhas, de dimensões nanométricas que são conhecidos como nanocristais de celulose (NCC), nanocelulose, *whiskers* ou ainda *nanowhiskers* de celulose [2].

Além das fontes mais comuns para extração de NCC, isto é, madeira, polpa, fibras naturais (sisal, cânhamo, linho etc.), e, mais recentemente, bactérias, algas e tunicado, novos estudos vêm apontando a viabilidade de obtenção de NCC a partir de resíduos agroindustriais. Pode-se

citar como exemplos trabalhos que relatam a utilização de casca de arroz [28], bagaço de cana-de-açúcar [29], pseudocaule de banana [30], casca de coco [31] e casca [32] e resíduo de batata [33] como fontes para extração de NCC. A Figura 6 mostra microscopias de NCC extraídos de diferentes fontes.

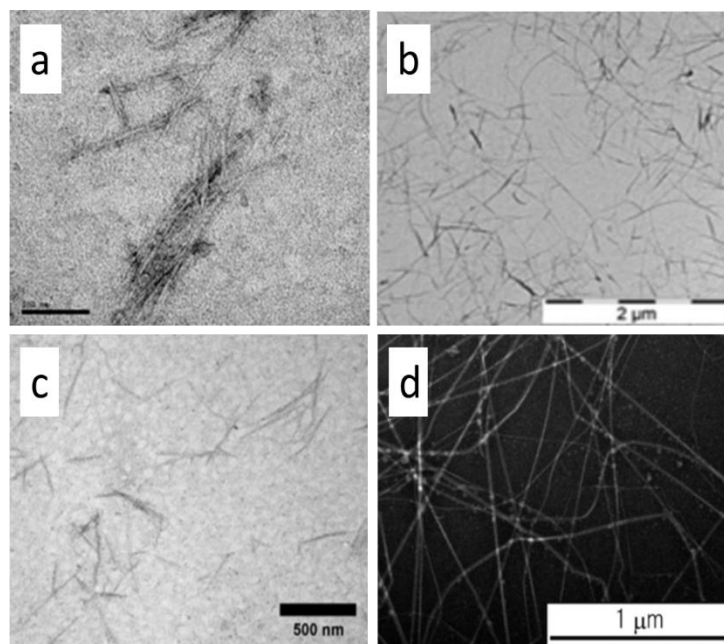


Figura 6. Micrografias de NCC extraídos de **a)** casca de arroz (barra de escala: 100 nm) [28], **b)** pseudocaule de banana [30], **c)** resíduo de casca de batata [32] e **d)** tunicado [34].

Existem diferentes métodos para extração dos NCC. O mais comumente utilizado é a extração com solução de ácido sulfúrico 64 ou 65% m/m [5], [35-39]. Esse tipo de extração normalmente incorpora uma porcentagem de grupos sulfato na superfície dos nanocristais. Roman e Winter [40] estudaram a incorporação de grupos sulfato nos NCC após tratamento da celulose bacteriana com solução de ácido sulfúrico em variadas condições – concentração da solução ácida, razão ácido/fibra, temperatura e tempo de hidrólise – e obtiveram um grau de incorporação máximo de aproximadamente 1% (73 mmol de grupos sulfato por kg de NCC). Além disso, relataram que a incorporação dos grupos sulfato diminuiu a estabilidade térmica dos NCC.

Brito e colaboradores [41] também calcularam o grau de substituição por grupos sulfato na superfície dos NCC extraídos de bambu e eucalipto com solução de ácido sulfúrico. A extração ácida da polpa de bambu foi realizada em condições variadas de temperatura, razão

ácido/fibra e tempo de hidrólise, e o grau de substituição para os NCC atingiu um valor máximo de 1,04%. Em relação aos NCC extraídos do eucalipto, somente uma condição de hidrólise foi utilizada (temperatura: 50 °C, razão ácido/fibra: 9/1, tempo de hidrólise: 50-65 min), e o grau de substituição obtido foi de 0,96%.

Outros métodos que também são utilizados para extrair os NCC da celulose são os tratamentos com ácido bromídrico [42], ácido clorídrico [43], ácido fosfórico [44] e líquidos iônicos [45]. A utilização de misturas de ácidos clorídrico e acético, ou clorídrico e butírico, também foi reportada [46]. Nesse sistema, os autores utilizaram dois sistemas diferentes: uma mistura de ácido acético aquoso 90% m/m e ácido clorídrico a 0,027 mol L⁻¹ como um sistema, e uma mistura de ácido butírico aquoso 90% m/m e ácido clorídrico 0,027 mol L⁻¹ como o segundo sistema. Além da hidrólise ácida, um outro método utilizado em menor escala para obtenção dos NCC é a hidrólise enzimática [7].

As vantagens de utilização de nanocristais de celulose (ou de outro polissacarídeo de ocorrência natural, como quitina ou amido), para reforço de materiais poliméricos, em vez de nanopartículas inorgânicas, advêm, principalmente, da grande disponibilidade das fontes naturais e renováveis para obtenção desse polissacarídeo, de sua biocompatibilidade intrínseca aliada à biodegradabilidade, do seu processamento fácil, do baixo custo de obtenção, dos altos valores do módulo de elasticidade e da resistência e da presença dos grupos hidroxila reativos em sua superfície [2], [47]. O módulo elástico dos NCC é, por exemplo, equivalente ao do Kevlar; o qual apresenta valores entre 124 e 130 GPa, enquanto o NCC apresenta valores entre 143 e 150 GPa [47]. Outro trabalho comparou o módulo de elasticidade do NCC ao do aço, que atinge valores de 200 GPa [3].

Dois parâmetros dos NCC que podem variar significativamente em relação ao material celulósico de origem e ao tratamento aplicado para extração dos nanocristais são a largura (L) e o comprimento (C) dos NCC. Consequentemente, a razão de aspecto, ou seja, a razão entre o comprimento e o diâmetro (L/C), também varia. A Tabela 2 apresenta as dimensões de NCC de acordo com a origem da celulose.

Para NCC obtidos de polpa de eucalipto, que foi a fonte de material celulósico utilizada neste trabalho, nota-se que a dimensão dos nanocristais também varia de acordo com o método de tratamento da polpa. Tonoli e colaboradores [48] obtiveram valores para comprimento e diâmetro médios de 175±38nm e 15±6nm, respectivamente, para a polpa branqueada de

eucalipto após 30 min de hidrólise com solução de ácido sulfúrico e, após 60 min de hidrólise, os valores obtidos para comprimento e diâmetro médios foram de 142 ± 49 nm e 11 ± 4 nm, respectivamente.

Tabela 3. Dimensões dos NCC de acordo com a origem da celulose. Adaptado de Habibi [1].

Origem da celulose	Comprimento / nm	Largura / nm
Bactéria	100-1000	5-50
Algodão	70-300	5-15
Línter de algodão	25-500	6-70
Celulose microcristalina (CMC)	35-500	3-48
Rami	50-250	5-10
Sisal	100-500	3-6,5
Tunicado	500-3000	10-30
Valônia	>1000	10-20
Madeira macia	100-200	3-5
Madeira dura	140-150	4-5

É importante aqui fazer a distinção entre os NCC e as nanofibrilas de celulose (NFC). Enquanto os NCC possuem comprimentos que variam de $\sim 25\text{--}3000$ nm, as nanofibrilas atingem comprimentos muito maiores na escala micrométrica, de $5\text{--}20$ μm , com dimensões laterais na escala de $10\text{--}100$ nm [47]. Além disso, as NFC podem ser obtidas por processos puramente mecânicos, associados ou não a tratamentos químicos ou enzimáticos, que mantêm os domínios amorfos e cristalinos das fibras. Por exemplo, o cisalhamento mecânico das fibras de celulose as desintegra em suas subunidades estruturais, que são as nanofibrilas [1].

Teoricamente, o grau de cristalinidade dos NCC deveria assumir o valor de 100%; entretanto, devido à presença de domínios amorfos remanescentes dos tratamentos ácidos para obtenção dos nanocristais, os valores experimentais normalmente não ultrapassam 90% e caem, tipicamente, na faixa de 54-88%. Em relação à degradação térmica, os NCC possuem, tipicamente, temperatura de degradação térmica, T_{onset} , entre 200 e 300 °C. Entretanto, esses

valores dependem da taxa de degradação térmica, do tamanho do nanocrystal e de modificações superficiais realizadas [2].

Nanocristais de celulose também apresentam propriedades de cristal líquido. De uma forma geral, o comportamento de cristal líquido é esperado de toda partícula rígida, assimétrica em formato de bastão [2]. Os nanocristais, quando em suspensão e em concentração suficientemente alta, formam fases nemáticas quirais (ou colestéricas). Fases nemáticas são caracterizadas por cristais que não possuem ordem translacional entre si, mas, contam com alto grau de ordenamento de longo alcance em relação a um eixo preferencial. Significa dizer que os cristais em um mesmo plano estão, necessariamente, apontando para uma mesma direção comum, mas, não se encontram alinhados uns aos outros (desordem translacional). A fase colestérica compreende planos de fases nemáticas que se alinham uns sobre os outros ao longo de um eixo perpendicular comum, ou eixo colestérico. Cada plano possui um vetor diretor específico (\vec{n}), e a orientação de cada vetor diretor sofre um giro de rotação em redor do eixo colestérico de um plano para o outro, gerando um empacotamento helicoidal (Figura 7) [2], [18].

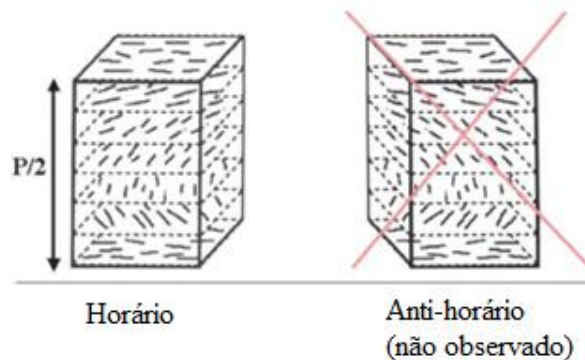


Figura 7. Representação esquemática da fase colestérica dos NCC. Adaptado de Eichhorn [18].

É importante notar que a quiralidade de uma solução de NCC é exclusivamente levógira. Na Figura 7, $P/2$ representa meio passo da hélice, ou seja, o comprimento relativo ao giro de 180° dos nanocristais na estrutura helicoidal. Outro aspecto interessante é que a aparência da fase nemática quiral fornece uma identidade visual às suspensões de NCC, que se traduz como a birrefringência característica quando a suspensão é visualizada entre lentes polarizadoras como mostrado na Figura 8.

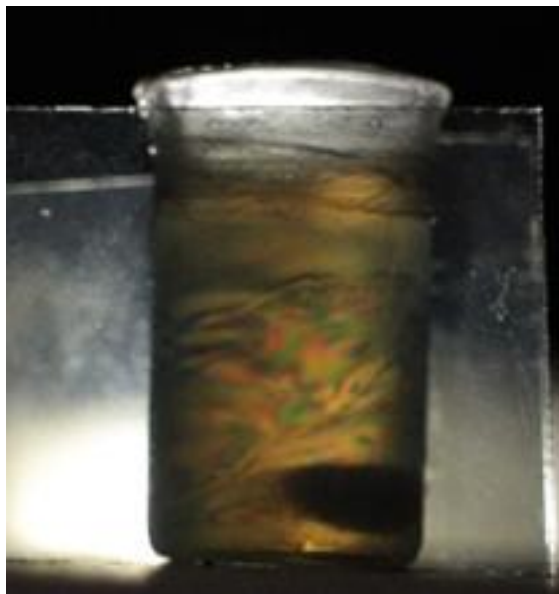


Figura 8. Fotografia realizada em nosso laboratório (DQ-UFMG) de uma dispersão de NCC a 4% m/v visualizada entre lentes polarizadoras.

No campo dos materiais nanoestruturados, os NCC têm recebido grande atenção para uma série de aplicações. Por exemplo, tem-se estudado a utilização dos nanocristais para fabricação de filmes finos, nanofibras, géis, membranas, bionanocompósitos, tecidos biocompatíveis e até mesmo como plataforma para a síntese de nanopartículas metálicas [2], [7-9].

Dentre a gama de aplicações dos NCC nas ciências dos materiais, uma das mais estudadas é na ciência dos polímeros, em que os nanocristais são utilizados especialmente como nanocargas na fabricação de bionanocompósitos, no intuito de melhorar, por exemplo, as características mecânicas e de barreira (contra gases) desses materiais. Bionanocompósitos são materiais em que pelo menos um dos componentes – a carga ou a matriz, ou ambos, provêm de fontes renováveis [49-50]. O campo de pesquisas em bionanocompósitos tem se tornado atrativo e promissor, devido principalmente ao impacto ambiental causado pela utilização de plásticos derivados do petróleo.

Mesquita e colaboradores [51] fabricaram um bionanocompósito de NCC e quitosana covalentemente ligados a partir da modificação superficial dos NCC com cloreto de metiladipoíla (MAC), e subsequente reação desses com os grupos amino na superfície da quitosana. O bionanocompósito resultante apresentou melhora significativa no desempenho mecânico, com um aumento de 150% na resistência à tração e 160% no módulo de elasticidade em relação à quitosana pura.

Os grupos hidroxila presentes na superfície dos NCC os tornam passíveis de sofrer modificações químicas. Muitas pesquisas vêm sendo feitas no intuito de modular as características intrínsecas dos nanocristais por modificações químicas superficiais, tornando-os materiais versáteis para o ancoramento de uma diversidade de moléculas.

Há uma série de modificações superficiais que podem ser feitas na superfície dos NCC pela formação de ligações covalentes entre as moléculas de interesse e os grupos hidroxila da celulose. Existem diversas reações que permitem a enxertia de moléculas nos NCC, dentre as quais as mais comumente reportadas são a oxidação, esterificação, eterificação, sililação, amidação, enxertia de polímeros e, mais recentemente, as reações *click* [1], [52].

2.3. Reações *click*

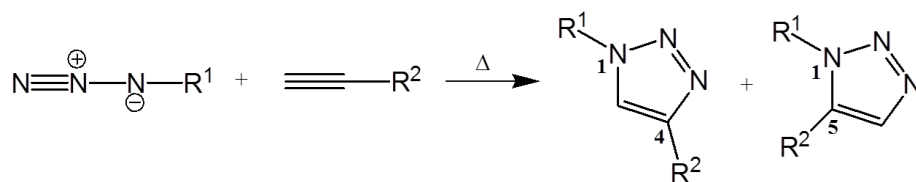
O termo “reações *click*” designa um conjunto de reações que promove a formação de ligações entre átomos de carbono que são intermediadas por heteroátomos de forma simples, rápida e seletiva. Essas reações são ditas serem “*spring-loaded*” em uma única direção, o que significa dizer que se processam rapidamente para gerar, quase sempre, um único produto desejado. Sendo assim, as reações *click* representam mais um estilo de síntese que engloba várias reações que possuem uma série de pré-requisitos em comum. Para ser útil como uma reação *click*, os requisitos que devem ser preenchidos pelo processo são: a reação deve ter escopo abrangente, fornecer altos rendimentos, gerar somente subprodutos inofensivos e que possam ser removidos por métodos não-cromatográficos, e ser estereoespecífica (mas não necessariamente enantiosseletiva). Além disso, as características do processo devem incluir condições simples de reação (idealmente, o processo não deve ser sensível ao oxigênio e à água); reagentes e substratos prontamente disponíveis; o não uso de solvente ou, quando indispensável, o uso de um solvente benigno, como água, ou um solvente que possa ser facilmente removido; e isolamento simples do produto [14].

Em nossos estudos foi utilizado um tipo específico de reação *click*, a cicloadição 1,3-dipolar, que ocorre pela fusão de dois grupos insaturados; nesse caso, o grupo azido (N_3) e o grupo alcino ($-C\equiv C-H$) [53].

A cicloadição 1,3-dipolar forma heterociclos de cinco membros a partir da fusão dos dois átomos de carbono da ligação tripla do alcino e dos três átomos de nitrogênio do grupo azido; esses heterociclos são de origem exclusivamente sintética e não ocorrem na natureza. A

primeira observação feita com heterociclos semelhantes foi em 1893 por Michael, seguida por investigações mais detalhadas entre as décadas de 1950 a 1970 por Huisgen e colaboradores [54].

A fusão entre os grupos azido e alcino é exotérmica por natureza, fornecendo um produto de reação termodinamicamente mais estável que os reagentes, pois para essa reação a entalpia padrão (ΔH°) costuma variar de -45 a 55 kcal mol⁻¹. Entretanto, há uma barreira considerável de energia de ativação (E_a), cerca de 25 kcal mol⁻¹, o que torna essa reação cineticamente desfavorável. Assim, de acordo com a equação de Arrhenius ($k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$), um aumento na temperatura não alteraria consideravelmente a velocidade da reação, devido ao valor relativamente elevado da E_a . Além disso, a cicloadição 1,3-dipolar efetuada sem catalisador e sob altas temperaturas fornece uma mistura de produtos 1,4 e 1,5-dissubstituídos [54], conforme ilustrado na Figura 9.



Proporção aproximada 1:1

Figura 9. Esquema da cicloadição térmica clássica de Huisgen com obtenção de regioisômeros.

A cicloadição 1,3-dipolar catalisada por Cu(I), também conhecida por CuAAC (*copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*), foi testada simultaneamente pelos grupos de Meldal [55] e Fokin e Sharpless [53]; que reportaram que a reação apresenta alta regioseletividade, fornecendo exclusivamente o produto 1,4-dissubstituído.

Além da alta regioseletividade, diversas outras são as vantagens da reação catalisada por Cu. Por exemplo, (i) a reação não é afetada por impedimento estérico ou propriedades eletrônicas das moléculas ligadas aos grupos azida e alcino; (ii) a reação não é afetada pela presença de água e da maioria dos grupos funcionais orgânicos e inorgânicos; (iii) a reação catalisada por Cu representa um aumento de até 10⁷ vezes na velocidade da reação em relação ao processo térmico não catalisado, fazendo com que seja convenientemente realizada em uma faixa de temperatura de 0 a 25 °C; e (iv) o anel 1,2,3-triazólico que resulta da reação pode

interagir de diversas formas com moléculas biológicas, e também servir como um substituinte da ligação amida em algumas circunstâncias [56].

Uma variedade de catalisadores de Cu(I) pode ser utilizada na CuAAC, dentre eles os sais CuI e CuBr e complexos como $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$, $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ e $[\text{Cu}(\text{PPh}_3)_3]\text{Br}$ [56]. Entretanto, foi verificado que, apesar de se poder utilizar uma série de fontes de Cu(I) diretamente no meio reacional, o catalisador é melhor preparado *in situ* pela utilização de um sal de Cu(II) e de um agente redutor. Essa é outra grande vantagem do processo catalisado por Cu, pois sais de Cu(II) são mais baratos que sais de Cu(I) e normalmente mais puros que esses. O sal de Cu(II) mais comumente utilizado é o $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Quanto ao agente redutor, ácido ascórbico e/ou ascorbato de sódio se mostraram muito adequados nesse processo, pois permitem a preparação de um amplo espectro de produtos 1,4-triazóis com altos rendimentos e pureza [53]. Além disso, a utilização de sais de Cu, um metal abundante e de baixo custo, dispensa o emprego de outros metais mais nobres, como Pd, Rh e Ru, que são raros, muitas vezes mais caros e até tóxicos [57]. Adicionalmente, como já citado, a utilização de Cu como catalisador fornece apenas o produto 1,4-dissubstituído e a utilização de outros metais pode fornecer outros regioisômeros, como foi reportado por Zhang e colaboradores [58]. Estes autores utilizaram complexos de Ru(II) para catalisar a cicloadição de alcinos terminais e internos e obtiveram, além dos 1,2,3-triazóis 1,4-dissubstituídos, os produtos 1,5-dissubstituídos e 1,4,5-trissubstituídos, dependendo do complexo de Ru utilizado como catalisador. Sendo assim, para sínteses que necessitem da formação exclusiva do regioisômero 1,4-dissubstituído, a CuAAC é a rota mais adequada.

Inicialmente, pensou-se que o mecanismo de formação do anel 1,2,3-triazólico ocorresse por um processo catalisado somente por um átomo de Cu [53]. Entretanto, experimentos realizados com marcação isotópica das espécies de Cu provaram que, na verdade, a formação do anel 1,2,3-triazólico é catalisada por um intermediário dinuclear de Cu, conforme exemplificado na Figura 10 [57].

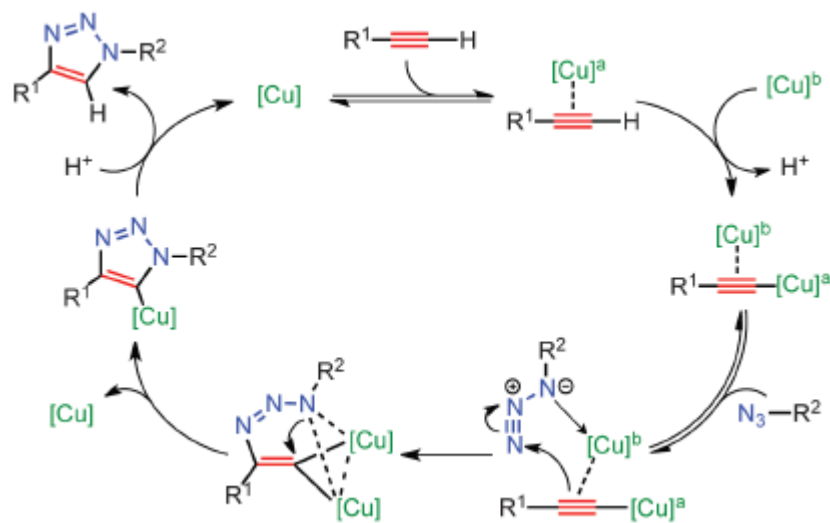


Figura 10. Mecanismo de formação do anel 1,2,3-triazólico catalisado por Cu(I). Adaptado de Worrel [57]

A partir dos resultados promissores reportados por diversos pesquisadores que utilizaram a CuAAC [54], [59, 60] e pelos estudos pioneiros citados acima, que demonstraram o amplo escopo e as vantagens do processo, a cicloadição 1,3-dipolar catalisada por Cu se tornou uma das reações mais comumente empregadas para os mais diversos fins, e acabou se tornando o protótipo das reações *click*, muitas vezes sendo apenas denominada CuAAC.

2.3.1. Reações *click* aplicadas a polissacarídeos

As reações *click* têm recentemente ganhado espaço entre as modificações superficiais aplicadas a polissacarídeos de ocorrência natural, de vez que permitem a pronta enxertia de uma diversidade de moléculas em sua superfície e a concomitante aquisição de novas funcionalidades nesses substratos já tão versáteis, referidos como as mais novas e promissoras plataformas para o desenvolvimento de “eco-materiais” [61]. Para tornar possível a reação *click* em polissacarídeos, eles devem sofrer uma modificação superficial no intuito de acoplar a sua superfície o grupo azido ou o grupo alcino. De fato, a cicloadição entre os grupos azido e alcino parece ser a mais estudada para os polissacarídeos [61, 62].

Vários trabalhos reportam a utilização de reações *click* para funcionalização de polissacarídeos. Pahimanolis e colaboradores [63] modificaram a superfície da dextrana com o grupo 1-azido-2,3-epoxipropano e obtiveram grau de substituição (GS, grau de substituição)

de 0,20. À dextrana funcionalizada com os grupos azido foram enxertadas, via CuAAC, cadeias de poli(etilenoglicol) monometil éter terminadas com grupos propargila ($-\text{H}_2\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$), fornecendo produtos *click* com valores de GS de 0,08 a 0,10. Em um trabalho mais recente, Pahimanolis e colaboradores [64] funcionalizaram o xilano, outro polissacarídeo de ocorrência natural, com o grupo 1-azido-2,3-epoxipropano, gerando produtos com GS de até 0,28. Em uma segunda etapa, o copolímero telequérico poli(etilenoglicol-*b*-propilenoglicol-*b*-etilenoglicol), terminado em propargila, foi enxertado na superfície do xilano pela rota CuAAC, levando à formação de hidrogéis.

A CuAAC parece também representar um papel interessante no que se refere à obtenção de novos materiais com propriedades superiores aos materiais de partida. Nessa linha de trabalhos, Elchinger e colaboradores [65] realizaram a ligação entre fibra de celulose de polpa kraft e amido pela rota CuAAC. A fibra de polpa kraft foi funcionalizada com brometo de propargila (PgBr) para acoplamento do alcino, enquanto o amido foi funcionalizado com grupos azido em duas etapas: (i) modificação superficial do amido com cloreto de tosila, TosCl; (ii) reação do amido tosilado com azida de sódio, NaN_3 . Os polissacarídeos funcionalizados foram ligados pela reação *click*, fornecendo a fibra de polpa kraft enxertada com amido que foi usada na fabricação de papel com duas diferentes composições: com 25% e 50% de fibra enxertada em relação à polpa kraft pura. Os ensaios realizados mostraram que o novo material apresentou melhora significativa em relação a algumas das propriedades da polpa kraft: melhora de 71% no índice de resistência à propagação do rasgo, de 44% no índice de resistência à ruptura e até 173% no índice de alongamento.

A possibilidade de ligações cruzadas entre dois polissacarídeos de origem natural também é contemplada e explorada por meio das reações *click*. Por exemplo, Peng e colaboradores [66] funcionalizaram a superfície da celulose com grupos propargila pela reação com cloreto de propargila (PgCl), enquanto a superfície da quitosana foi funcionalizada com grupos azido pela reação com ácido 4-azidobenzóico. Em seguida, os polissacarídeos foram unidos pela rota CuAAC. Os autores reportaram a formação de tubos ocos após a reação *click*, como evidenciado pelas imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figura 11).

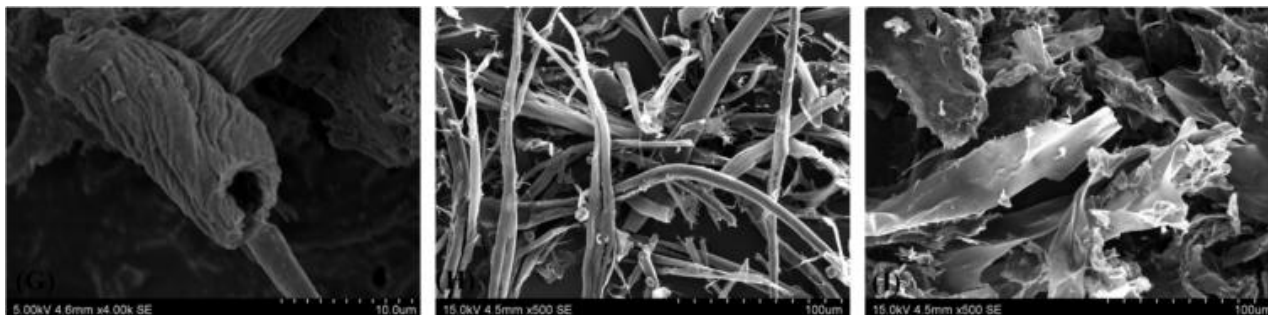


Figura 11. Imagens obtidas por MEV dos tubos formados após reação *click* entre a celulose e a quitosana. As barras de escala são de 10 µm para a primeira microscopia e 100 µm para as duas seguintes. Adaptado de Peng [66].

A formação de ligações cruzadas também foi explorada entre polissacarídeos de mesma natureza. Koschella e colaboradores [67] prepararam hidrogéis de celulose pela formação de ligações cruzadas entre o polissacarídeo pela rota CuAAC. Para tanto, dois derivados da celulose foram preparados: um deles portando o grupo alcino em sua superfície, obtido pela reação da celulose com PgNH₂ (propargilamina), e o outro portando o grupo azido na superfície, obtido pela reação de tosilação da celulose, seguida pela substituição com o grupo azido utilizando NaN₃. As condições que foram variadas para obtenção de diferentes hidrogéis foram as quantidades de cada precursor modificado de celulose (6-deoxi-6-azido-carboximetil celulose e 6-deoxi-6-aminopropargil-carboximetil celulose) e de catalisador.

Os autores reportaram a formação de diferentes hidrogéis (Figura 12) após a reação *click* catalisada por cobre. Entretanto, os géis não apresentaram boas propriedades mecânicas, possivelmente devido ao baixo rendimento em relação às ligações cruzadas.

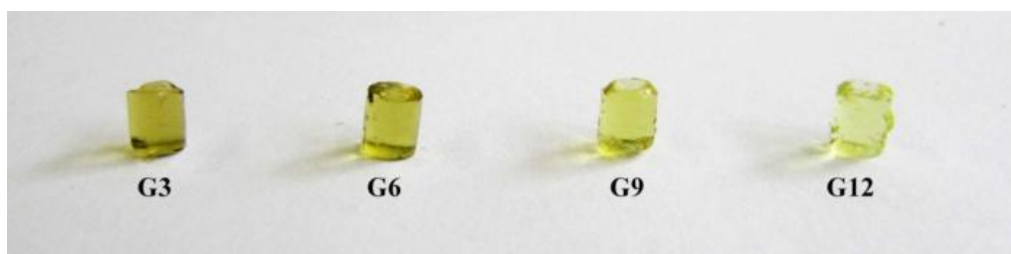


Figura 12. Hidrogéis obtidos logo após a reação *click* catalisada por Cu(I). São mostrados somente os géis 3 (G3), 6 (G6), 9 (G9) e 12 (G12). Adaptado de Koschella [67].

Faugeras e colaboradores [68] também desenvolveram um material pela ligação cruzada de celulose superficialmente modificada com o grupo alcino e com o grupo azido. Os autores

utilizaram celulose microcristalina (CMC) como material de partida. A inserção do grupo azido também seguiu a rota de tosilacção seguida por substituição por azido com NaN_3 , enquanto a CMC funcionalizada com Alcino foi obtida pela reacção com PgBr.

Em se tratando de reacções *click* em celulose, a maioria dos trabalhos relatados na literatura diz respeito à modificação química obtida em polpa de celulose ou em celulose microcristalina. Existem poucos relatos de funcionalização de NCC por reacções *click*.

Feese e colaboradores [11] fabricaram NCC funcionalizados superficialmente com porfirinas catiónicas pela *click* CuAAC e demonstraram que o material obtido apresentou excelente eficácia em relação à inativação fotodinâmica de *Mycobacterium smegmatis* e *Staphylococcus aureus*. Os autores mostraram de forma elegante como os NCC carregam grande potencial para aplicações na área da saúde, como demonstrado pela potencial fabricação de materiais bioativos e fotobactericidas.

Seguindo essa mesma linha de ideias, Filpponen e colaboradores [69] decoraram a superfície de NCC com grupos alcino, seguido pelo acoplamento via CuAAC com as moléculas fluorescentes cumarina e antraceno funcionalizadas com grupos azido. As nanopartículas produzidas mostraram-se fluorescentes e foto-responsivas e, mais significativamente, as cadeias laterais introduzidas de cumarina e antraceno sofreram cicloadições induzidas por luz UV. Os autores indicaram que o material tem potencial para ser aproveitado na fabricação de nanoarranjos foto-responsivos baseados em NCC, já que as reacções de cicloadição sofridas pelas cadeias de cumarina e antraceno podem ser revertidas pelo ajuste do comprimento de onda irradiada.

A versatilidade de funcionalização dos NCC, associada à abrangência das reacções *click*, permite também a incorporação de moléculas biológicas em sua superfície. Essa teoria foi testada por Karaaslan e colaboradores [43] ao acoplarem às extremidades dos NCC micelas de uma proteína modelo, a β -caseína. Para tanto, a extremidade redutora dos NCC foi funcionalizada com o grupo azido, enquanto as micelas protéicas foram funcionalizadas com o grupo alcino. Foram formadas algumas estruturas que os autores chamaram de “cogumelos”, evidenciando a ligação entre as extremidades dos NCC e as micelas de β -caseína, como mostrado pelas imagens de Microscopia Eletrónica de Transmissão (MET) (Figura 13). Os resultados obtidos nesse trabalho evidenciam o potencial de aplicação dos NCC na construção

de nanobiomateriais e no design de nanovesículas multifuncionais para aplicações em nanomedicina.

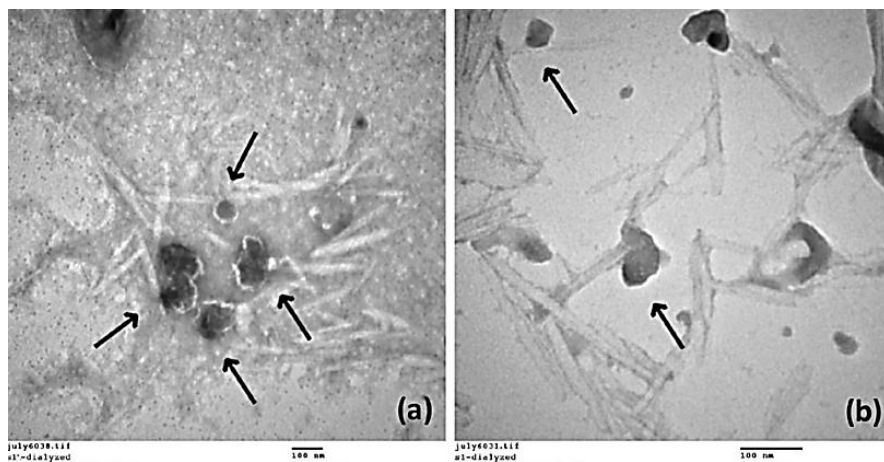


Figura 13. Imagens de MET evidenciando as estruturas em forma de “cogumelo”. A barra de escala corresponde a 100 nm em ambas imagens. Adaptado de Karaaslan [43].

2.4. Quinonas com atividade antitumoral e moléculas fluorescentes

Com o objetivo de tirar vantagem da reatividade dos grupos hidroxila superficiais dos NCC, moléculas com promissora atividade antitumoral e moléculas fluorescentes podem ser ligadas quimicamente aos nanocristais no intuito de fornecer plataformas potencialmente úteis para o tratamento do câncer e para diagnóstico por imagem.

O desenvolvimento de novas estratégias de quimioterapia envolvendo moléculas capazes de atuar como agentes antitumorais tem sido o foco de pesquisas relacionadas ao tratamento do câncer. Nessa linha específica, encontram-se muitos produtos naturais e diversas drogas sintéticas que possuem o núcleo naftoquinoidal, principal responsável pela atividade biológica desses compostos. As quinonas são abundantes na natureza e ocorrem em animais, plantas e microrganismos. Tanto as quinonas naturais quanto seus análogos sintéticos são uma fonte promissora de compostos citotóxicos e, por isso, têm sido alvo de diversas pesquisas que têm comprovado que esses compostos possuem amplo espectro de ação contra diversas doenças, dentre elas o câncer. Na família das quinonas, a classe de compostos mais importante e vastamente distribuída é a das 1,4-naftoquinonas (Figura 14), para as quais foi reportada atividade antitumoral. A atividade biológica e as propriedades estruturais desses compostos os levaram a ser considerados como estruturas privilegiadas na química medicinal [70].

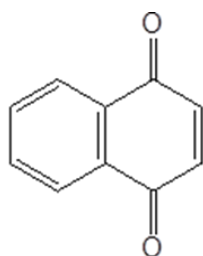


Figura 14. Estrutura da 1,4-naftoquinona.

O lapachol [Figura 15 a)] é uma 1,4-naftoquinona de ocorrência natural originário de árvores da família Bignoniaceae, muito encontrada no Brasil. A β -lapachona [Figura 15 b)] é um metabólito secundário do lapachol, que também pode ser obtido pela ciclização desse composto, e tem demonstrado atividade biológica contra vários tipos de câncer. Da Silva Júnior e colaboradores [71] sintetizaram uma série de derivados da β -lapachona que foram testados contra linhagens celulares cancerosas de leucemia, de melanoma, de cólon e do sistema nervoso central. Os derivados contendo o anel 1,2,3-triazólico demonstraram a melhor atividade antitumoral. Em outro trabalho, foi reportada atividade antitumoral de cinco derivados da *nor*- β -lapachona [Figura 15 c)] contendo o anel 1,2,3-triazólico e um precursor azidonaftoquinona contra uma série de fibroblastos. A maioria dos compostos mostrou-se fortemente ou moderadamente ativa contra todas as linhagens de células cancerosas testadas [72].

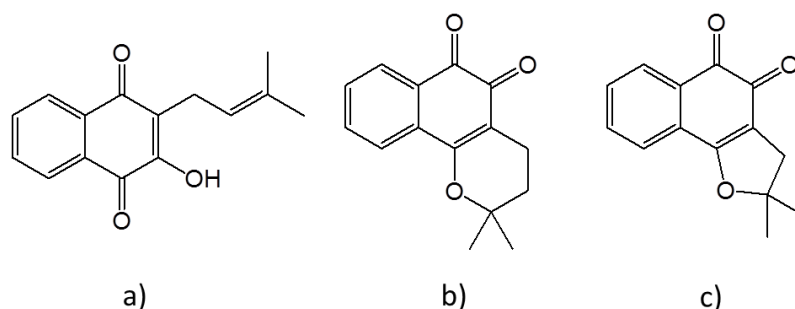


Figura 15. Estruturas de a) lapachol b) β -lapachona e c) *nor*- β -lapachona.

Recentemente, Wu [73] testou diversos híbridos de 1,2-naftoquinonas e tetrazolo[1,5-a]pirimidinas contra duas linhagens celulares cancerosas, HCT116 (câncer de cólon) e HepG2 (hepatoma). Dos derivados testados, cinco apresentaram capacidades

inibidoras significativas contra as células cancerosas. Os derivados quinoidais também apresentaram atividade antibacteriana efetiva. Chadar e colaboradores [74] sintetizaram oito derivados naftoquinoidais a partir da vitamina K3 e testaram a atividade bacteriana desses compostos contra *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Todos os compostos sintetizados foram ativos contra ambas as cepas.

As Fenazinas são uma classe de compostos químicos produzidos por alguma bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas spp.*, e são historicamente reconhecidas por seu amplo espectro de atividade antibiótica [75]. As Fenazinas de ocorrência natural são tipicamente pigmentadas e apresentam dois máximos distintos em seu espectro de absorção no ultravioleta e pelo menos um na região do visível, que varia de acordo com a natureza e posição dos substituintes no anel heterocíclico [75]. Entretanto, a molécula de Fenazina (Figura 16) não apresenta rendimento quântico de fluorescência apreciável ($\phi_f \approx 10^{-5}$) [76].

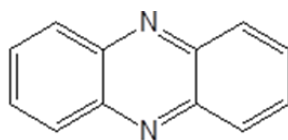


Figura 16. Estrutura da Fenazina.

Apesar disso, essa classe de moléculas continuou a ser estudada tanto por suas propriedades biológicas [77] quanto por suas propriedades fotofísicas [78]. Em relação às últimas, diversos estudos apontaram que derivados sintéticos dessas moléculas apresentaram altos valores de rendimento quântico (pelo menos 10.000 vezes maior que a Fenazina pura), o que as torna excepcionais candidatas para atuação como potenciais sondas fluorescentes e em diagnóstico por imagem.

Recentemente, Jardim e colaboradores [79] sintetizaram uma Fenazina a partir do lapachol e a utilizaram como sonda para detecção de diversos metais, dentre eles metais pesados, como o Cd^{2+} , pelo acoplamento desta com o ligante N,N-bis(2-picolil)amina. O rendimento quântico da nova molécula foi calculado em 0,35. A sonda fluorescente resultante apresentou-se muito promissora para o reconhecimento de íons Cd^{2+} . Pela utilização de espectroscopias de fluorescência e UV-Vis, os autores observaram altas seletividade e sensibilidade para o reconhecimento desses íons pela mudança de cor de azul para verde em uma mistura água/acetoneitrila.

Outras classe de moléculas altamente promissoras para utilização como marcadores fluorescentes é a das 2,1,3-benzotiadiazolas, ou BTD (Figura 17). A eficiência desses fluoróforos está diretamente ligada à possibilidade de extensão da ressonância dos elétrons π a partir do núcleo principal da BTD pela funcionalização lateral da molécula [80], tornando esses compostos extremamente versáteis. Outras características que tornam esse núcleo muito importante para a química de compostos luminescentes são o fato de que seus derivados possuem uma série de características desejáveis como (i) o sistema heterocíclico possui uma forte capacidade retiradora de elétrons, tornando-o bom candidato para sistemas carreadores de elétrons; (ii) são normalmente considerados fluoróforos eficientes, pois possuem características de emissão atrativas (por exemplo, apresentam boa faixa de cores e altos rendimentos quânticos); (iii) podem ser utilizados como unidade receptoras de elétrons para materiais condutores. Assim, sistemas envolvendo a BTD estão entre os mais importantes núcleos na química de compostos luminescentes.[81].

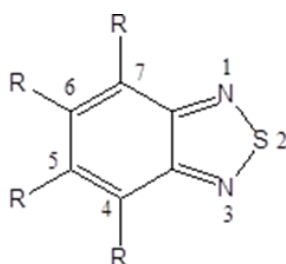


Figura 17. Núcleo básico da 2,1,3-benzotiadiazola.

Os núcleos derivados da BTD são utilizados em muitas áreas relacionadas à tecnologia de luz com uma gama de aplicações graças às suas impressionantes propriedades ópticas [82-84]. Dentre as aplicações da BTD na criação de dispositivos ópticos, encontram-se estudos visando suas potenciais aplicações em OLEDs (*organic light emitting diodes*). Thomas e colaboradores [85] sintetizaram uma série de derivados da BTD e estudaram suas propriedades ópticas, térmicas e elétricas. Rendimentos quânticos de fluorescência foram calculados em valores tão altos quanto 0,78. Os autores concluíram que os compostos sintetizados seriam bons candidatos para serem utilizados como uma única camada de material em OLEDs.

Na área de marcação celular, o uso da BTD é também muito popular. Neto e colaboradores [86] testaram duas novas moléculas sintetizadas a partir da BTD para a marcação seletiva de células. De um lado do núcleo da BTD foi ligado um grupo aminopiridina e, do outro, foi

ligado ou um H (dando origem a BTD-H) ou um Br (dando origem a BTD-Br). O rendimento quântico calculado para essas novas moléculas foi de 0,31 para BTD-H e 0,15 para BTD-Br. Cálculos teóricos foram usados para explicar a alta estabilidade das novas moléculas no estado excitado devido a processos de transferência intramolecular de próton no estado excitado, ou ESIPT (*excited-state intramolecular proton transfer*) e transferência de carga intramolecular, ou ICT (*intramolecular charge transfer*). Os compostos exibiram seletividade celular excepcional, pois conseguiram marcar somente mitocôndrias em diferentes linhagens celulares, e apresentaram vantagens como alta estabilidade à temperatura ambiente e facilidade de manuseio e estocagem.

2.5. Liberação controlada de fármacos e marcadores fluorescentes

Devido às características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa densidade e diversidade de fontes para extração de matéria-prima lignocelulósica, aliadas ao baixo custo de obtenção e ao fato de serem provenientes de fontes renováveis, os polissacarídeos naturais podem se constituir em uma importante ferramenta para aplicações farmacêuticas e biomédicas, como, por exemplo, na preparação de sistemas de liberação controlada de fármacos, encapsulamento de substâncias bioativas, bioimagem celular – como contraste ou marcadores celulares – e como tecidos biomiméticos [2], [49].

Atualmente, um dos ramos que mais se desenvolve na nanotecnologia diz respeito à formulação de agentes terapêuticos no interior de nanocompósitos biocompatíveis como nanopartículas, nanocápsulas, micelas e conjugados, atuando como sistemas de liberação controlada de fármacos. Como esses sistemas são, normalmente, poliméricos e submicrométricos, eles possuem vantagens multifacetadas. Em geral, eles podem ser utilizados para promover a liberação em tecidos/órgãos alvo, melhorar a biodisponibilidade oral, manter o efeito do fármaco ou do gene no tecido alvo, tornar os fármacos solúveis para liberação intravascular e melhorar a estabilidade dos agentes terapêuticos contra a degradação enzimática. Além disso, as dimensões nanométricas desses sistemas oferecem vantagens distintas para liberação controlada de fármacos. O tamanho sub-micro e sub-celular das nanopartículas permite a sua penetração em tecidos do corpo por capilares bem finos, o que permite boa absorção pelas células e consequente eficiência na liberação de agentes terapêuticos para sítios específicos no corpo. Adicionalmente, pela modulação das

características dos polímeros pode-se controlar a liberação dos agentes terapêuticos a partir das nanopartículas para otimizar a dose terapêutica liberada pelo período de tempo requerido para a máxima eficiência terapêutica. Os sistemas poliméricos mais utilizados para liberação controlada se constituem de polímeros biodegradáveis sintéticos ou derivados de fontes naturais. Da classe dos polímeros naturais pode-se citar o alginato, o colágeno, a quitosana e o amido [10]. Esses polímeros têm sido utilizados, individualmente ou em associações, na forma de cápsulas micro ou nanométricas, de pellets ou micelas para o estudo de liberação de diferentes fármacos [87-91].

Historicamente, a celulose microcristalina (CMC) é considerada o agente de ouro para a fabricação de pellets pelo processo de extrusão-esferonização, pois a CMC úmida possui propriedades reológicas adequadas, coesividade e plasticidade para fornecer partículas esféricas e resistentes, de forma que os pellets resultantes possuem a superfície relativamente lisa, baixa friabilidade e alta densidade. Além disso, do ponto de vista do processamento, amplas faixas de conteúdo de água e parâmetros de processamento podem ser utilizados para fornecer pellets com a qualidade adequada, indicando a robustez das formulações com CMC [6].

Apesar das características singulares apresentadas pela CMC que a coroaram como padrão na escolha de agentes para fabricação de pellets, os NCC ainda não compartilharam dessa fama, de forma que, até hoje, poucos são os trabalhos que relatam sua aplicação na fabricação de materiais para liberação controlada ou na formulação de pellets e micelas. Por isso, ainda são mais comumente encontrados artigos que relatam apenas a utilização de nanofibrilas de celulose ou de CMC como sistemas em estudo para liberação controlada, e poucos estudos envolvendo o uso de NCC para esse fim.

Os NCC podem servir como base para moléculas ligadas quimicamente em sua superfície ou mesmo como agentes utilizados na formulação de pellets, de forma que possam oferecer um padrão de liberação controlada. Nessa linha de pesquisa, alguns trabalhos podem ser citados como exemplos da utilização dos NCC como plataformas para liberação de fármacos.

Jackson e colaboradores [5] utilizaram os NCC na liberação controlada dos fármacos tetraciclina (TET), doxorubicina (DOX), docetaxel (DTX), paclitaxel (PTX) e etoposídeo (ETOP), sendo os quatro últimos fármacos utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer. Para que as formulações dos compostos hidrofóbicos DTX, PTX e ETOP fossem

eficientemente ligadas aos NCC, os nanocristais foram recobertos com o surfactante brometo de cetiltrimetilamônio, CTAB. Esse grupo apresentou um padrão de liberação controlada por até dois dias, com exceção dos NCC carregados com ETOP, para os quais a liberação ocorreu por até quatro dias. Para os fármacos TET e DOX, ligadas diretamente aos NCC sem auxílio do CTAB, o padrão de liberação atingiu o equilíbrio em um dia. Os autores realizaram a preparação dos pellets pela incubação de soluções de NCC e de cada fármaco por 30 minutos, seguida por floculação e centrifugação para precipitação dos pellets. Para a preparação dos pellets com os fármacos hidrofóbicas DTX, PTX e ETOP, as soluções de NCC foram previamente incubadas em uma solução de CTAB. A eficiência máxima de ligação dos fármacos aos NCC foi de 83% para DOX, 48% para TET, aproximadamente 90% para DTX e PTX, e 48% para ETOP. Além disso, os autores realizaram o estudo da ligação dos NCC recobertos com CTAB e fluoresceína em células cancerosas da bexiga (KU-7), demonstrando a liberação eficiente da sonda fluorescente para o citoplasma dessas células.

Além das aplicações em liberação controlada de fármacos, os NCC também podem ser modificados com moléculas fluorescentes e podem se tornar uma importante ferramenta na avaliação de interações com diferentes células e de biodistribuição *in vivo* de agentes terapêuticos e de diagnóstico. Dong e Roman [13], em 2007, realizaram um trabalho pioneiro ao ligarem aos NCC a molécula FITC (fluoresceína isotiocianato). Os NCC foram primeiramente funcionalizados com epícloridrina, seguido pela reação com hidróxido de amônio e, por última, ligação da FITC nos sítios funcionalizados. Com esse trabalho, os autores abriram os caminhos para aplicação de técnicas fluorimétricas de detecção, como espectrofluorimetria, espectroscopia de fluorescência e citometria de fluxo, em amostras contendo NCC marcados fluorescentemente.

Depois desse trabalho, outros seguiram e reportaram a utilização de outras moléculas fluorescentes. Nielsen e colaboradores [92] funcionalizaram os NCC com FITC e rodamina B isotiocianato (RBITC) utilizando duas rotas distintas. Pela primeira rota, a funcionalização realizado em uma única etapa, pela reação dos NCC com FITC e RBITC em uma solução básica, formando uma ligação tiocarbamato. Pela segunda rota, os NCC foram funcionalizados com ácido metacrílico, seguido pela reação com cisteamina, que introduz os grupos amino na superfície dos NCC. A ligação dupla introduzida nos nanocristais pelo ácido metacrílico se liga pela reação *click* conhecida por “tiol-eno” com o grupo tiol da cisteamina. Em um último

passo, os nanocristais funcionalizados com os grupos amino foram levados a reagir com dois fluoróforos distintos sensíveis a pH, o 5,6-carboxifluoresceína succinimidil éster (FAM-SE) e o Verde Oregon 488 ácido carboxílico succinimidil éster (OG-SE), juntamente com o fluoróforo de referência, 5,6-carboxitetrametilrodamina succinimidil éster (TAMRA-SE). Pelo fato de os fluoróforos serem sensíveis a mudanças de pH, os autores sugeriram a aplicação dos NCC marcados fluorescentemente com FAM-SE/TAMRA-SE e OG-SE/TAMRA-SE como sensores de pH.

Em um trabalho mais recente, Chen e colaboradores [93] realizaram o acoplamento de um dendrímero fluorescente aos NCC. O dendrímero poli(amidoamina) (PAMAM) foi enxertado nos NCC após oxidação dos grupos hidroxila na superfície dos nanocristais. Os autores reportaram que, para $4 \leq \text{pH} \leq 10$, a dispersão dos NCC ligados a PAMAM se mantinham translúcidas. Entretanto, nesse intervalo de pH, foi observada a formação de agregados e separação de fase. Em valores de pH abaixo de 4, os grupos amino nos dendrímeros se encontram protonados, resultando na estabilização da suspensão de NCC modificados por repulsão de carga. Analogamente, em valores pH maiores que 10, os autores alegaram que os grupos amino nos dendrímeros se encontravam desprotonados e comprimidos, permitindo maior exposição dos grupos sulfato residuais (presentes devido à hidrólise ácida dos NCC) e carboxilato que não reagiram com PAMAM, resultando em uma carga líquida negativa, que também mantém os NCC em suspensão por repulsão eletrostática.

Huang e colaboradores [94] prepararam NCC marcados fluorescentemente com fluoróforos da classe das cumarinas, 7-hidrazino-4-metilcumarina (HMC) e 7-amino-4-metilcumarina (AMC). A reação entre os NCC e os fluoróforos foi realizada em meio aquoso e em uma única etapa, sem necessidade de pré-funcionalização dos grupos hidroxila dos NCC. Para tanto, as extremidades redutoras das cadeias celulósicas foram aproveitadas devido à capacidade que os aldeídos têm em reagir com grupos amino ou hidrazino (ambos presentes nos fluoróforos). Esse trabalho provou, mais uma vez, a abrangência de reações de funcionalização que podem ser aplicadas aos NCC.

Em um trabalho mais aplicado, Dong e colaboradores [95] demonstraram a relevância de NCC fluorescentemente marcados para avaliação de ligação e absorção de sistemas de liberação controlada em sítios celulares específicos. Para fins de aplicação em liberação controlada de fármacos, a absorção dos NCC via caminhos de absorção celular seletivos,

como aqueles mediados por receptores específicos, é preferível em relação à absorção não-seletiva, pois permite o tratamento de células patológicas específicas. Nesse trabalho, os autores estudaram a ligação seletiva dos NCC à sítios receptores de folato em células cancerosas. O ácido fólico (AF) foi ligado à superfície dos nanocristais juntamente com fluoresceína isotiocianato (FITC). A marcação fluorescente com FITC permitiu a avaliação da absorção e distribuição dos NCC nas culturas celulares estudadas. Para realizar estudos de ligação seletiva a sítios receptores de folato, os NCC foram primeiramente funcionalizados com grupos amino, seguida pela marcação fluorescente com FITC e posterior funcionalização com AF, fornecendo NCC-FITC-AF. A ligação e absorção celular mediada por receptores de folato foi avaliada em linhagens de células cerebrais cancerosas humanas (DBTRG-05MG e H4) e de rato (C6). Os NCC conjugados somente com FITC e o FITC livre não se ligaram a nenhuma das linhagens celulares; em contrapartida, os NCC-FITC-AF foram ligados com sucesso aos receptores celulares de folato. Os autores demonstraram que os NCC podem também ser utilizados para ligação em sítios específicos de células cancerosas visando futuras aplicações em liberação controlada de drogas por caminhos seletivos no organismo.

Capítulo 3

Objetivos

3. Objetivos

Geral:

- Realizar a modificação química dos NCC por meio da ligação química de moléculas com atividade biológica e moléculas fluorescente em sua superfície através da reação *click*, promovendo a formação de nanopartículas naturais multifuncionais.

Específicos:

- Modificar a superfície dos NCC para obtenção de dois precursores: um contendo grupos azido terminais ($-N=N=N$, ou N_3), fornecendo NCC- N_3 ; e outro contendo grupos alcino, ou propargil terminais ($-CH_2-C\equiv CH$), fornecendo NCC-P;

- Modificação superficial do precursor contendo os grupos azido terminais (NCC- N_3) com as moléculas que contém o grupo alcino terminal (QA e BTD) via reação *click*, fornecendo NCC-QA e NCC-BTD;

- Modificação do precursor contendo os grupos alcino terminais (NCC-P) com as moléculas que contém o grupo azido terminal (QN₃ e Fenazina) via reação *click*, fornecendo NCC-QN₃ e NCC-Fen;

- Caracterização dos NCC, precursores e produtos *click* obtidos.

Capítulo 4

Metodologia

4. Metodologia

4.1. Materiais

A polpa kraft de eucalipto foi doada pela Bahia Pulp S/A. Os solventes e reagentes ácido sulfúrico 98%, acetato de etila 98%, diclorometano 100% e sulfato de cobre pentaidratado foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). Os reagentes clorito de sódio, cloreto de *p*-toluenossulfonila e brometo de propargila 80% (m/m) em tolueno e o solvente acetonitrila grau HPLC foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO – USA). O hidróxido de sódio em micropérolas foi comprado de F. Maia (São Paulo, Brasil). Os solventes piridina 99,94%, acetona 99,60%, etanol 99,80% e dimetilformamida 99,50% foram fornecidos pelo Neon (São Paulo, Brasil). O ácido acético glacial 99,95% foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os reagentes e solventes foram utilizados conforme recebidos.

Os reagentes azida de sódio, iodeto de cobre e ascorbato de sódio e as moléculas azido-1,4-naftoquinona (QN₃), alcino-1,4-naftoquinona (QA), 2,1,3-benzotiadiazola aminopiridina (BTD) e Fenazina-*nor*-β-N₃ (Fenazina) (Figura 18) foram fornecidos pelo grupo do Prof. Eufrânio Nunes da Silva Júnior, coorientador deste trabalho, e foram utilizados conforme recebidos.

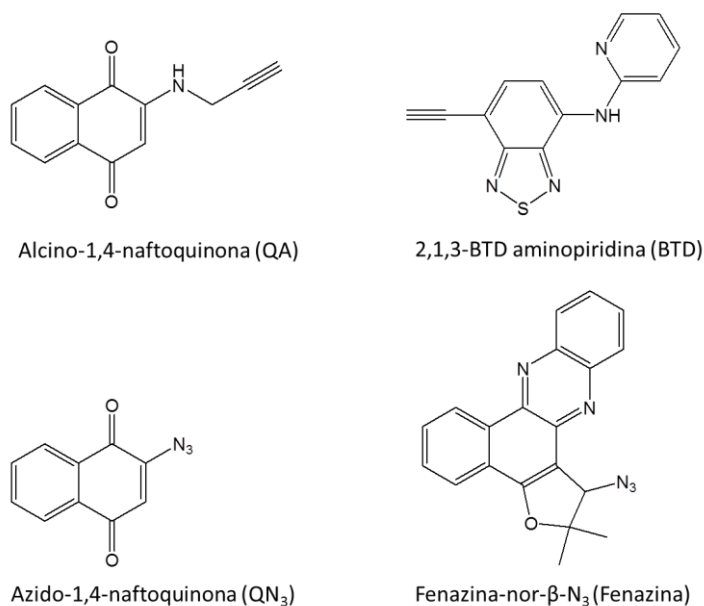


Figura 18. Moléculas utilizadas neste trabalho para obtenção dos produtos *click*.

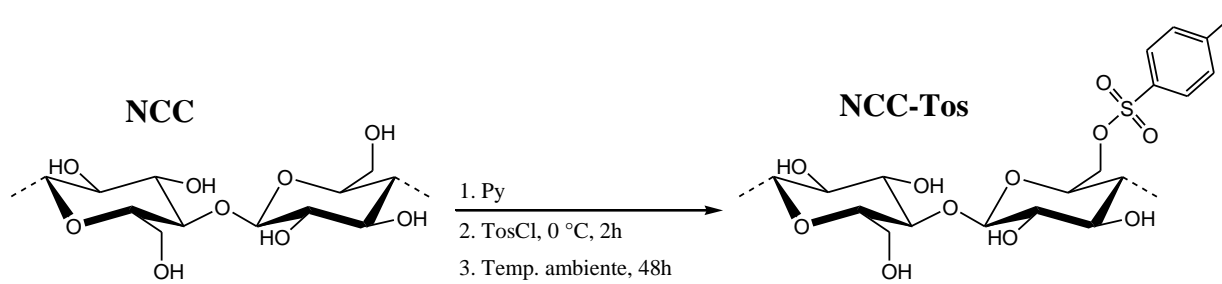
4.2. Obtenção dos NCC

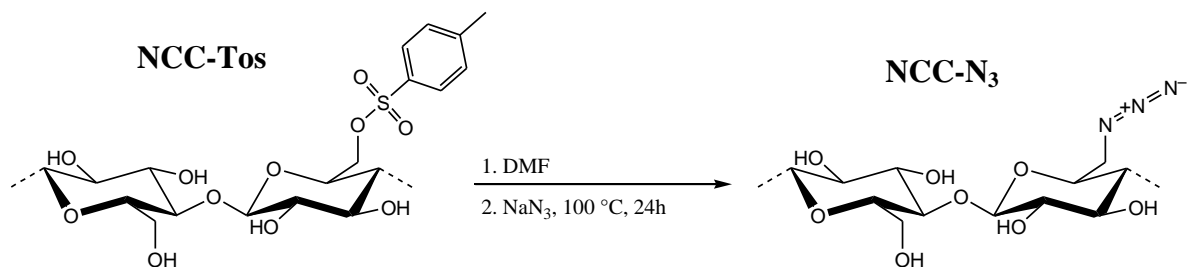
A extração dos NCC foi realizada meio de hidrólise da celulose (proveniente da polpa de eucalipto). Para isso, a polpa foi previamente mercerizada com NaOH e branqueada com NaClO. O processo de mercerização promove o intumescimento das fibras presentes na polpa e quebra de algumas das ligações de hidrogênio. A nível molecular, isso facilita reações químicas subsequentes, como hidrólise e oxidação. Para esse procedimento a polpa de celulose foi lavada com a solução de NaOH (2% m/v). Após essa etapa as fibras foram lavadas com água destilada e deionizada e, na sequência, 40 g dessa fibra foi dispersa em 500 mL de uma solução tampão acetato ($C_2H_4O_2$ 7,5% v/v + NaOH 2,7% m/v). Em seguida, foram adicionados 500 mL de uma solução de clorito de sódio a 1,7% m/v e a mistura foi aquecida a 80 °C durante 6 h. Por fim, a amostra foi lavada com água destilada e seca em estufa a 50 °C.

Para a obtenção dos NCC, 10,0 g da fibra branqueada foram adicionados a 80,0 mL de ácido sulfúrico 64% (m/m) sob forte agitação mecânica. A hidrólise foi realizada a 50 °C por aproximadamente 20 min. Após a hidrólise, a dispersão foi diluída e as suspensões foram então lavadas por três ciclos de centrifugação em uma centrífuga Eppendorf Centrifuge 5810 R. Uma última lavagem foi realizada por meio de diálise com água até a dispersão atingir pH ~ 6. Em seguida, a dispersão foi sonicada em um ultrassom de ponteira Cole Parmer Ultrasonic Processor Probe C334 por 1 min e, finalmente, filtrada através de filtro de papel Whatman 41 (tamanho dos poros de 20 μ m). A concentração final das dispersões de NCC era de cerca de 1% em massa. A dispersão de NCC foi então liofilizada em um liofilizador Terroni LC 3000 por 48 h.

4.3. Preparação dos precursores NCC-N₃ e NCC-P

4.3.1. Preparação de NCC-N₃

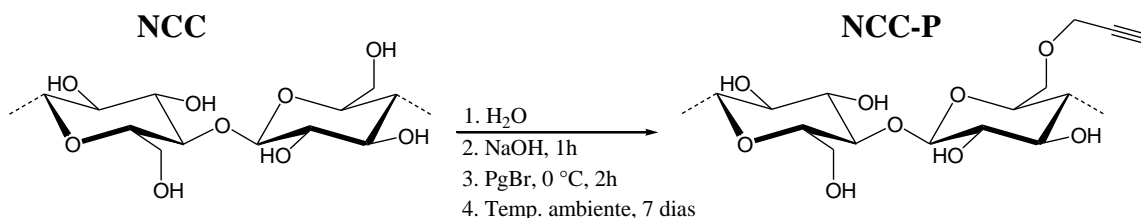




A preparação dos NCC modificados com grupo azido (NCC-N₃) ocorreu em duas etapas. Primeiramente, os NCC foram modificados com cloreto de *p*-toluenossulfonila (TosCl), fornecendo NCC-Tos. Para tanto, 4,0 g de NCC e 200 mL de piridina foram adicionados em um balão de 500 mL e deixados sob agitação mecânica por 6 h para que os nanocristais ficassem mais dispersos possível no solvente. Em seguida, 14,48 g de cloreto de *p*-toluenossulfonila foram lentamente adicionados ao balão (3 mols de TosCl por mol de unidade de anidroglicose, 3:1 TosCl:UAG) em banho de gelo a 0 °C. A reação foi mantida em banho de gelo por 2 h e depois à temperatura ambiente por 48 h. O produto foi lavado por centrifugação (8200 rpm, 10 min cada ciclo) por 4 vezes com 40 mL de uma mistura 1:1 de água Milli-Q e acetona, seguida por 4 lavagens somente com água Milli-Q. O produto foi liofilizado por 48 h. Rendimento em massa (em relação à massa inicial de NCC): 2,84 g (71%).

Para a síntese de NCC-N₃, 800 mg de NCC-Tos e 40 mL de dimetilformamida foram adicionados em um balão de 100 mL e deixados sob agitação magnética vigorosa (800 rpm) por 6h para auxiliar na dispersão dos nanocristais. Em seguida, o balão foi colocado em um banho de óleo mineral e 800 mg de azida de sódio (NaN₃) foram lentamente adicionados ao balão. Após adição da azida de sódio, a temperatura da chapa magnética foi ajustada para 100 °C e foi constantemente monitorada com auxílio de um termômetro imerso no banho de óleo. A reação permaneceu sob agitação a 100 °C por 24h. Após o término da reação, o produto foi lavado por centrifugação (8200 rpm, 10 min cada ciclo) por 3 vezes com 40 mL de água Milli-Q, 3 vezes com 40 mL de uma mistura 1:1 de etanol e água Milli-Q, e mais 2 vezes com 40 mL de água Milli-Q. O produto foi liofilizado por 48h. Rendimento em massa (em relação à massa inicial de NCC-Tos): 235 mg (29%).

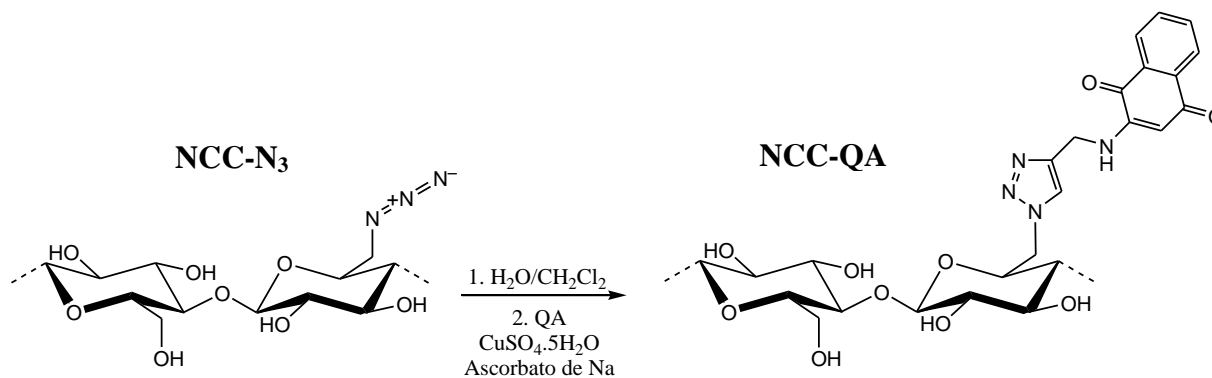
4.3.2. Preparação de NCC-P



Para a síntese dos NCC modificados com o grupo alcino (NCC-P), 2,0 g de NCC e 100 mL de água foram adicionados em um balão de 250 mL e deixados em agitação magnética vigorosa (800 rpm) por 6h, para auxiliar na dispersão dos nanocristais. Em seguida, 4,92 g de hidróxido de sódio foram adicionados ao balão (10 equivalentes mol/mol UAG). Após 1h da adição do hidróxido de sódio, o balão foi colocado em banho de gelo a 0 °C e 13,75 mL de brometo de propargila (10 equivalentes mol/mol UAG) foram adicionados à mistura reacional. A reação ficou sob agitação em banho de gelo por aproximadamente 2h. O restante da reação se processou em temperatura ambiente por 7 dias. Ao final, o produto foi lavado por centrifugação (8200 rpm, 10 min cada ciclo) por 4 vezes com 40 mL de acetona e mais 4 vezes com 40 mL de água Milli-Q. O produto foi liofilizado por 48h. Rendimento em massa (em relação à massa inicial de NCC): 1,14 g (57%).

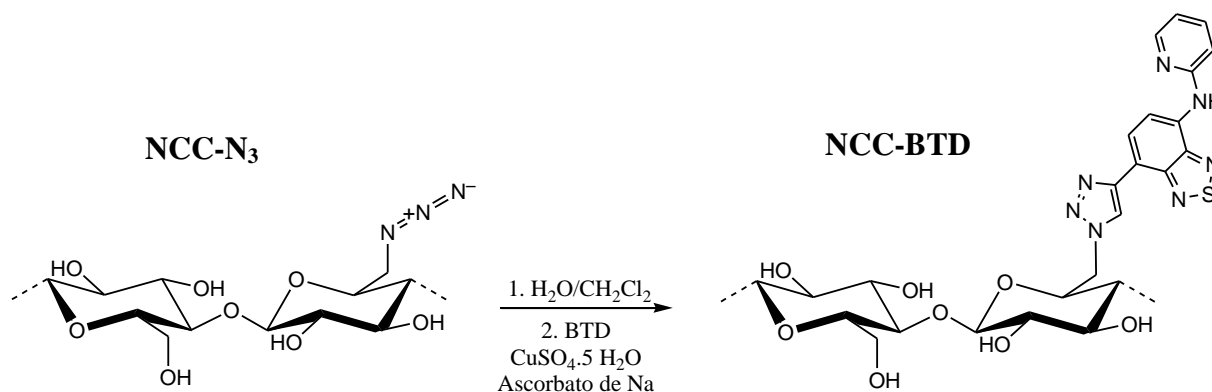
4.4. Reações *click*

4.4.1. NCC-QA



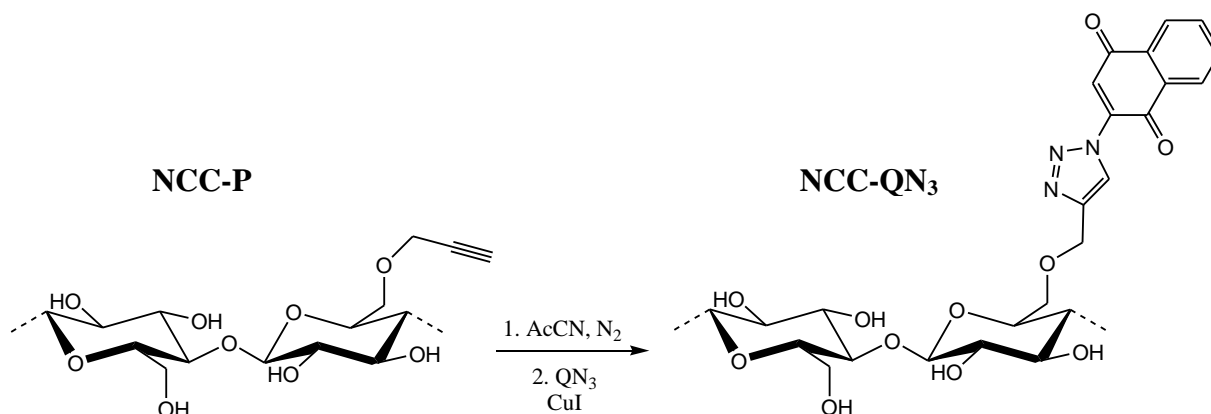
Para a reação *click* entre NCC-N₃ e alcino-1,4-naftoquinona (QA), 83 mg de NCC-N₃ (0,5 mmol) e 6,0 mL de uma mistura 1:1 de água deionizada e diclorometano foram adicionados a um balão de 50 mL e deixados sob agitação magnética vigorosa (800 rpm) por 6h para auxiliar na dispersão dos nanocristais. Em seguida, 109 mg de QA (0,5 mmol), 29 mg de ascorbato de sódio (0,15 mmol) e 25 mg de sulfato de cobre pentaidratado (0,1 mmol) foram adicionados ao balão, e a reação foi deixada sob agitação constante por três dias. Ao término da reação, o produto foi lavado por centrifugação (8200 rpm, 10 min cada ciclo) por 3 vezes com 40 ml de acetona e 3 vezes com 40 ml de água Milli-Q. O produto foi liofilizado por 48h. Rendimento em massa (em relação à massa inicial de NCC-N₃): 90 mg (108%).

4.4.2. NCC-BTD



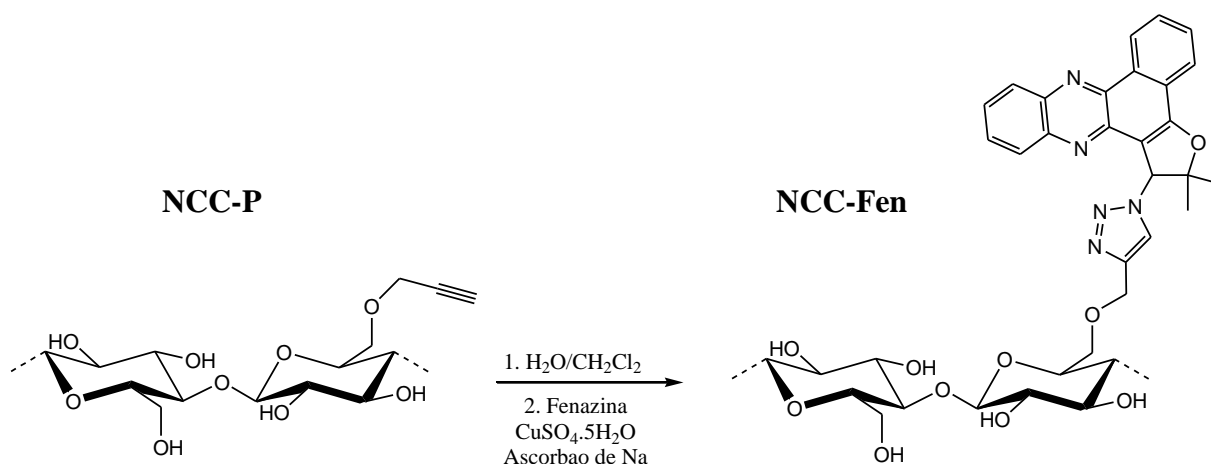
Para a reação *click* entre NCC-N₃ e BTDA aminopiridina (BTDA), 83 mg de NCC-N₃ (0,5 mmol) e 6,0 ml de uma mistura 1:1 de água deionizada e diclorometano foram adicionados a um balão de 50 ml e deixados sob agitação magnética vigorosa (800 rpm) por 6h para auxiliar na dispersão dos nanocristais. Em seguida, 126 mg de BTDA (0,5 mmol), 29 mg de ascorbato de sódio (0,15 mmol) e 25 mg de sulfato de cobre pentaidratado (0,1 mmol) foram adicionados ao balão, e a reação foi deixada sob agitação constante por três dias. Ao término da reação, o produto foi lavado por centrifugação (8200 rpm, 10 min cada ciclo) por 3 vezes com 40 ml de acetona e 3 vezes com 40 ml de água Milli-Q. O produto foi liofilizado por 48h. Rendimento em massa (em relação à massa inicial de NCC-N₃):88 mg (106%).

4.4.4. NCC-QN₃



Para a reação *click* entre NCC-P e azido-1,4-naftoquinona (QN₃), 83 mg de NCC-P (0,5 mmol) e 6,0 mL de acetonitrila grau HPLC foram adicionados, sob atmosfera de N₂, a um schlenk e deixados sob agitação magnética vigorosa (800 rpm) por 6h, para auxiliar na dispersão dos nanocristais. Em seguida, foram adicionados ao schlenk, sob atmosfera de N₂, 100 mg de QN₃ (0,5 mmol) e 19 mg de iodeto de cobre (CuI; 0,1 mmol), e a reação foi deixada sob agitação constante por 3 dias. Ao término da reação, o produto foi lavado por centrifugação (8200 rpm, 10 min cada ciclo) por 6 vezes com 40 ml uma mistura 3:1 de água Milli-Q e etanol e duas vezes com 40 ml de água Milli-Q. O produto foi liofilizado por 48h. Rendimento em massa (em relação à massa inicial de NCC-P): 70 mg (84%).

4.4.4. NCC-Fen



Para a reação *click* entre NCC-P e Fenazina-*nor*- β -N₃ (Fenazina), 83 mg de NCC-P (0,5 mmol) e 6,0 mL de uma mistura 1:1 de água deionizada e diclorometano foram adicionados a um balão de 50 mL e deixados sob agitação magnética vigorosa (800 rpm) por 6h para auxiliar na dispersão dos nanocristais. Em seguida, 170,5 mg de Fenazina (0,5 mmol), 29 mg de ascorbato de sódio (0,15 mmol) e 25 mg de sulfato de cobre pentaidratado (0,1 mmol) foram adicionados ao balão, e a reação foi deixada sob agitação constante por três dias. Ao término da reação, o produto foi lavado por centrifugação (8200 rpm, 10 min cada ciclo) por 3 vezes com 40 ml de acetona e 3 vezes com 40 ml de água Milli-Q. O produto foi liofilizado por 48h. Rendimento em massa (em relação à massa inicial de NCC-P):70 mg (84%).

4.5. Caracterização dos materiais

4.5.1. Birrefringência de fluxo

Uma suspensão aquosa de NCC de concentração aproximada 4% m/v foi preparada e fotografada entre lentes polarizadas em ambiente escuro. As imagens permitem a visualização da birrefringência de suspensões concentradas de NCC, que é a principal característica proveniente da dispersão e alinhamento momentâneo (durante agitação) dos bastões.

4.5.2. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros no infravermelho foram obtidos na região de 4000 a 400 cm⁻¹, em amostras na forma de filmes sobre KBr, em um aparelho Perkin Elmer FTIR Spectrum BX. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Infravermelho do Departamento de Química da UFMG.

4.5.3. Difração de raios X (DRX)

A técnica de Difração de raios X foi utilizada para estudar a cristalinidade dos nanocristais puros e modificados e foi realizada em um aparelho Shimadzu XRD-7000 com uma fonte de radiação de Cu ($\lambda = 0,154$ nm) com ângulo de incidência variando de 10° a 60° e velocidade de varredura de 2°/min. As análises foram realizadas no Laboratório de Difração de Raios X do Departamento de Química da UFMG.

4.5.4. Análise elementar (CHN)

A análise elementar foi realizada em um Analisador CHN Perkin Elmer. Os resultados obtidos por essas técnicas foram utilizados para se calcular o grau de substituição (GS) dos nanocristais após modificação química. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise Elementar do Departamento de Química da UFMG.

4.5.5. Análise termogravimétrica (TG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas em uma termobalança Shimadzu TGA50H, com fluxo de N₂ a 10 mL min⁻¹ e programação de aquecimento de 25 a 700 °C, com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise Termogravimétrica do Departamento de Química da UFMG.

4.5.6. Espectroscopia UV-Vis e espectroscopia de fluorescência

Os espectros UV-Vis foram feitos em um Espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 100. Os espectros de fluorescência foram feitos em um Espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse. Em ambos os aparelhos foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. As amostras de NCC modificadas fluorescentemente, NCC-BTD e NCC-Fen, foram preparadas em concentração 0,01% m/v em acetato de etila e deixadas sob agitação magnética vigorosa por 3h. Em seguida, foram colocadas em banho de ultrassom (Unique Ultracleaner 1400) com gelo por 30 min, seguido por um intervalo de descanso de 10 min e mais 30 min em banho de ultrassom com gelo. As amostras foram deixadas em repouso de um dia para o outro; o sobrenadante foi então pipetado e armazenado para leitura. Espectros de uma solução 10 μmol L⁻¹ de Fenazina em acetato de etila foram usados para comparação com NCC-Fen. As análises foram realizadas no Laboratório de UV-Vis e Fluorescência do Departamento de Química da UFMG.

4.5.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram produzidas no Centro de Microscopia da UFMG, utilizando um aparelho de 120 kV Tecnai G2-12 Spirit (FEI). As amostras dos nanocristais puros e modificados foram preparadas em concentração 0,01% m/v

em água e deixadas sob agitação magnética vigorosa por 3h. Em seguida, foram colocadas em banho de ultrassom com gelo por 30 min, seguido por um intervalo de descanso de 10 min e mais 30 min em banho de ultrassom com gelo. Foi utilizado acetato de uranila 2% m/v como contraste e grades de transmissão de cobre recobertas com filme de formvar para deposição das amostras.

4.5.8. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Análises por RMN CP/MAS de ^{13}C (polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico) foram realizadas sob a coordenação da Professora. Rosane A.S. San Gil em aparelho Bruker Avance III 400 MHz de 9,4 T, no Laboratório Multiusuário de RMN de sólidos do Instituto de Química da UFRJ.

4.5.9. Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)

As medidas de XPS foram realizadas no CDTN/CNEN em um aparelho XPS SPECS com analisador PHOIBOS 150 MCD-9.

Capítulo 5

Resultados e discussões

5. Resultados e discussões

5.1. Caracterização dos NCC

5.1.1. Birrefringência de fluxo

A Figura 19 mostra a suspensão de NCC a uma concentração de 4% m/v. Na figura pode-se perceber a birrefringência característica da fase nemática quiral dos NCC. Esta é igualmente uma evidência do sucesso da obtenção de nanocristais a partir da hidrólise da polpa de eucalipto, uma vez que o comportamento de cristal líquido é característico de nanoestruturas em formato de bastões [2][18].

Como explicitado anteriormente, a superfície dos NCC fica negativamente carregada após o processo de hidrólise ácida devido à incorporação de grupos sulfato na superfície dos nanocristais [41], o que garante a estabilidade das nanoestruturas em suspensão pela repulsão eletrostática entre as cargas negativas.



Figura 19. Birrefringência de uma suspensão de NCC à concentração de 4% m/v. Fotografia de uma dispersão obtida com os NCC utilizados neste trabalho.

5.1.2. Espectroscopia no infravermelho

O espectro infravermelho dos NCC é apresentado na Figura 20, e a Tabela 4 apresenta as principais bandas identificadas no espectro.

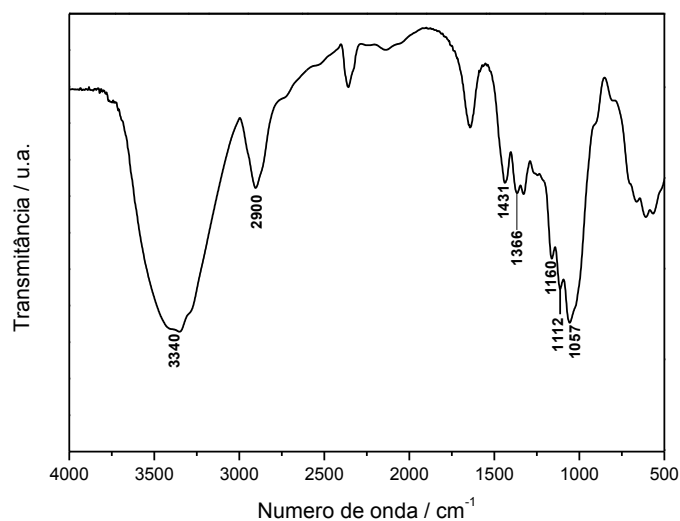


Figura 20. Espectro infravermelho dos NCC.

Tabela 4. Principais absorções no infravermelho para os NCC não modificados.

Nº de onda / cm^{-1}	Atribuição
3340	ν O-H
2900	ν C-H
1431	δ CH ₂
1366	δ CH ₂
1160	ν C-O-C
1112	ν do anel
1057	ν C-O

ν : estiramento; δ : deformação.

A banda larga em 3340 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação H-O dos grupos hidroxila da celulose. As bandas em 1431 e 1366 cm^{-1} são características das deformações assimétrica e simétrica, respectivamente, do grupo CH₂. Já a banda em 1160 cm^{-1} é típica do estiramento C-O da celulose. As bandas em 1160 e 1057 cm^{-1} correspondem ao estiramento das ligações C-O-C e C-O presentes na estrutura da celulose, enquanto a banda em torno de 1112 cm^{-1} é típica do estiramento assimétrico do anel [96-98]. Há ainda duas bandas

sobrepostas, uma em torno de 1337 e outra em torno de 1320 cm^{-1} (não apresentadas na Tabela), que são atribuídas às deformações das ligações C-O-H e CH_2 (“wagging”), respectivamente [97], [99]. A banda em 2360 cm^{-1} é devida a estiramentos simétrico e assimétrico de CO_2 [97], [100, 101] que, nesse caso, foi provavelmente adsorvido pela amostra de NCC. Já a banda observada em torno de 1643 cm^{-1} pode ser atribuída à presença de água na amostra [96].

5.1.3. Difração de raios X

A análise por difração de raios X auxilia na avaliação da integridade da estrutura cristalina dos NCC antes e após as modificações químicas realizadas, uma vez que os nanocristais apresentam padrões típicos e picos bem definidos de difração quando se encontram na forma cristalina. Um indício de que os NCC eventualmente perderam cristalinidade em modificações químicas é a sobreposição de picos de difração em $1\bar{1}0$, 110 e 200 e consequente formação de banda única e disforme. Idealmente, os NCC resultantes da hidrólise das regiões amorfas de fibrilas oriundas de fontes vegetais (madeira, fibras vegetais) consistem de cristalitos compostos por 36 cadeias celulósicas arranjadas em uma estrutura cristalina do tipo I β (monoclínica) [7].

A Figura 21 apresenta o difratograma de raios X obtido para a amostra de NCC não modificado em pó.

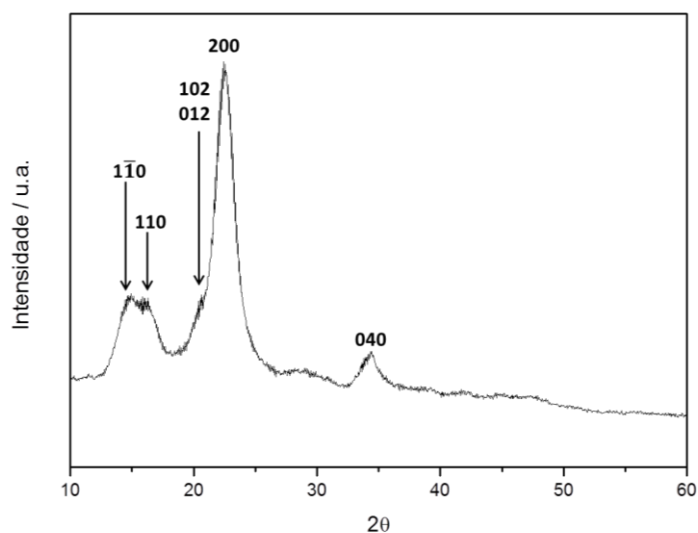


Figura 21. Difratograma de raios X dos NCC.

A amostra de NCC não modificado apresenta um padrão de difração típico de celulose I, com picos em 22,5° e 34,4°, correspondentes às difrações dos planos 200 e 040, respectivamente. Outros três picos significativos presentes no difratograma ocorrem a 14,8°, 16,2° e 20,5° e são referentes às difrações dos planos 1 $\bar{1}$ 0, 110 e 012, respectivamente. Esses valores são característicos da celulose tipo I [102].

De acordo com relação entre a intensidade relativa da difração em 200 e a intensidade da difração relativa às zonas amorfas, pode-se calcular o índice de cristalinidade (IC) dos NCC de acordo com a Equação [103]:

$$IC = \frac{(I_{002} - I_{AM})}{I_{002}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Na Equação 1, I_{002} representa a intensidade da difração relativa ao plano 200 e I_{AM} a intensidade da região amorfa (vale entre os picos 110 e 200). De acordo com essa equação, o índice de cristalinidade dos NCC não modificados obtidos nesse trabalho foi de 88%. Essa porcentagem é utilizada somente como um parâmetro de comparação entre a cristalinidade relativa dos NCC não modificados e dos NCC após modificações químicas, no intuito de fornecer uma ideia da extensão da variação de cristalinidade após cada reação. Entretanto, esse método pode superestimar a cristalinidade dos NCC, não devendo ser interpretada como um valor específico e absoluto [104]. Deve-se, portanto, salientar que o cálculo da cristalinidade para os NCC utilizados nesse trabalho tem como objetivo verificar se houve modificação na cristalinidade das nanopartículas após a sua modificação química, em relação aos NCC.

5.1.4. Morfologia dos NCC

A Figura 22 mostra as microscopias MET dos NCC não modificados. Nessa figura, pode-se perceber o formato de “bastões” dos nanocristais. Além disso, é também possível inferir que o comprimento médio dos NCC obtidos por hidrólise ácida está na faixa de 150 a 200 nm.

É possível notar também que os NCC encontram-se em grande parte agregados. Isso se deve às fortes interações intermoleculares oriundas das ligações de hidrogênio entre os NCC.

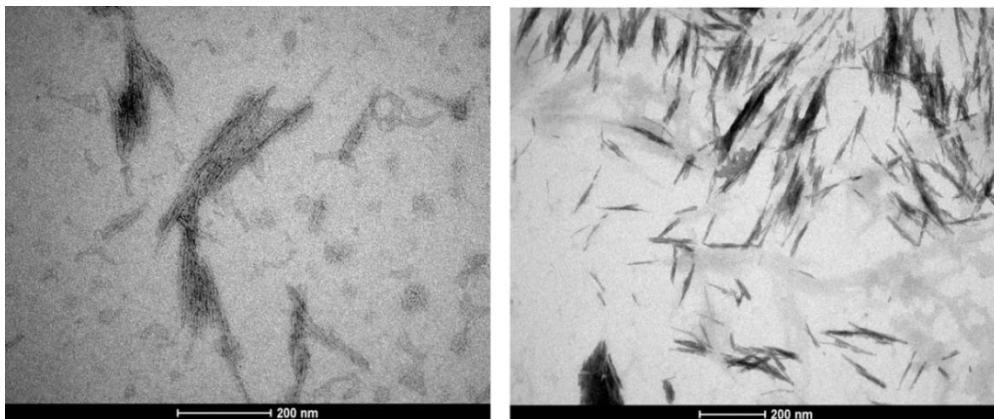


Figura 22. Imagens de MET dos NCC não modificados. A barra de escala está informada na figura.

5.1.5. Análise elementar

Os dados de análise elementar para os NCC não modificados são apresentados na Tabela 5. Os valores experimentais devem ser corrigidos por um fator de conversão que leva em conta o valor teórico da porcentagem mássica do elemento carbono em uma unidade de anidroglicose (UAG), representada na Figura 23. Essa correção é feita devido ao fato de que os valores obtidos experimentalmente não coincidem exatamente com os valores teóricos. A massa molar de uma UAG é 162 g mol^{-1} . Assim, a porcentagem de carbono em uma UAG é de 44,4%. Para se calcular o fator de conversão, basta dividir o valor teórico da porcentagem de carbono pelo valor obtido experimentalmente, ou seja, $44,4/39,4$, que fornece o fator de conversão 1,127. Os valores apresentados entre parêntesis na Tabela 5 são os valores corrigidos.

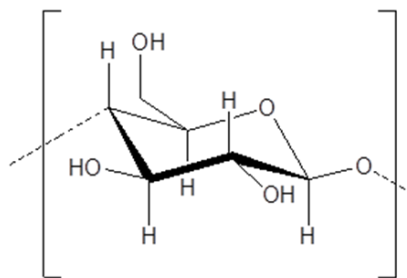


Figura 23. Unidade de anidroglicose (UAG).

Tabela 5. Dados de análise elementar para os NCC não modificados.

	% C	% H	% N	% O *
NCC	39,4	5,90	0	54,6
	(44,4)	(6,65)	(0)	(48,9)

*Calculado pela diferença $100\% - (\% C + \% H + \% N)$

5.1.6. Análise termogravimétrica

Na Figura 24 podem ser observadas as curvas TG e DTG dos NCC, em atmosfera de N_2 , cujos dados do principal evento térmico são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Dados dos principais eventos térmicos relacionado à degradação térmica dos NCC.

	$T_{onset} / ^\circ C$	$T_{m\acute{a}x} / ^\circ C$	Resíduo a $500 ^\circ C / \%$
NCC	245	271	17,8

T_{onset} : temperatura de início da perda de massa; $T_{m\acute{a}x}$: temperatura de máxima taxa de perda de massa.

A T_{onset} , ou seja, a temperatura em que ocorre o início do principal evento de perda de massa, é de $245 ^\circ C$. Pela curva DTG dos NCC, ilustrada na Figura 24, pode-se perceber que a temperatura em que a degradação térmica dos NCC é máxima, $T_{m\acute{a}x}$, ocorre em $271 ^\circ C$. Além disso, a DTG evidencia um segundo processo de perda de massa, por volta de $360 ^\circ C$. Os eventos térmicos em regiões distintas podem ser atribuídos a diferentes graus de sulfonação na superfície dos nanocristais [105]. Eventos térmicos dos NCC que ocorrem entre 250 e $325 ^\circ C$ foram atribuídos a diferentes processos de degradação da celulose, como despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas, seguidos pela formação de resíduo carbonáceo [40]. Adicionalmente, segundo Shafizadeh e Bradbury [106], a degradação térmica da celulose envolve mecanismos de formação de radicais livres.

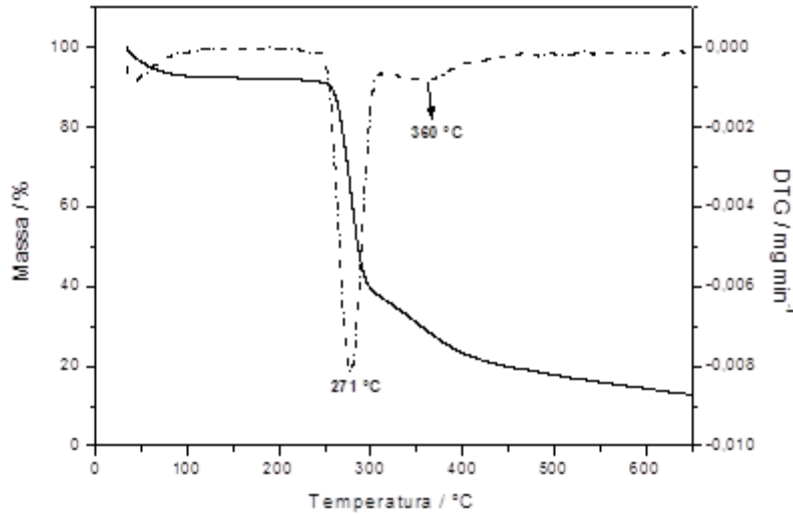


Figura 24. Curvas TG e DTG dos NCC. Atmosfera de N₂.

5.1.7. Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C

A Figura 25 mostra o espectro de RMN CP/MAS de ¹³C dos NCC. O dissacarídeo celobiose (composto por duas UAG) é mostrado com cada carbono da estrutura numerado. Os picos no espectro de RMN referentes aos átomos de carbono na estrutura da UAG foram identificados como se segue, da direita para a esquerda: a região entre 60 a 70 ppm é referente ao C6; o conjunto de ressonâncias de 70 a 81 ppm é designado a C2, C3 e C5; a região de 81 a 93 ppm corresponde ao C4 e, finalmente, a região de 96 até 108 ppm pode ser associada ao C1. Esses dados estão em concordância com os resultados apresentados por VanderHart e colaboradores [107]. Os dois ombros que são observados na região relativa a C4 e C6 referem-se às regiões amorfas da celulose [107]. As designações dos picos nos espectros de RMN CP/MAS de ¹³C da celulose nativa (não-hidrolisada) e de NCC são idênticos, variando somente em relação ao deslocamento químico dos picos que, conforme exposto acima, podem ocorrer dentro de uma faixa de deslocamentos químicos.

Desse modo, conforme esperado, o espectro dos NCC está de acordo com espectros CP/MAS ¹³C de estruturas nanocristalinas derivadas da celulose [102], [108, 109].

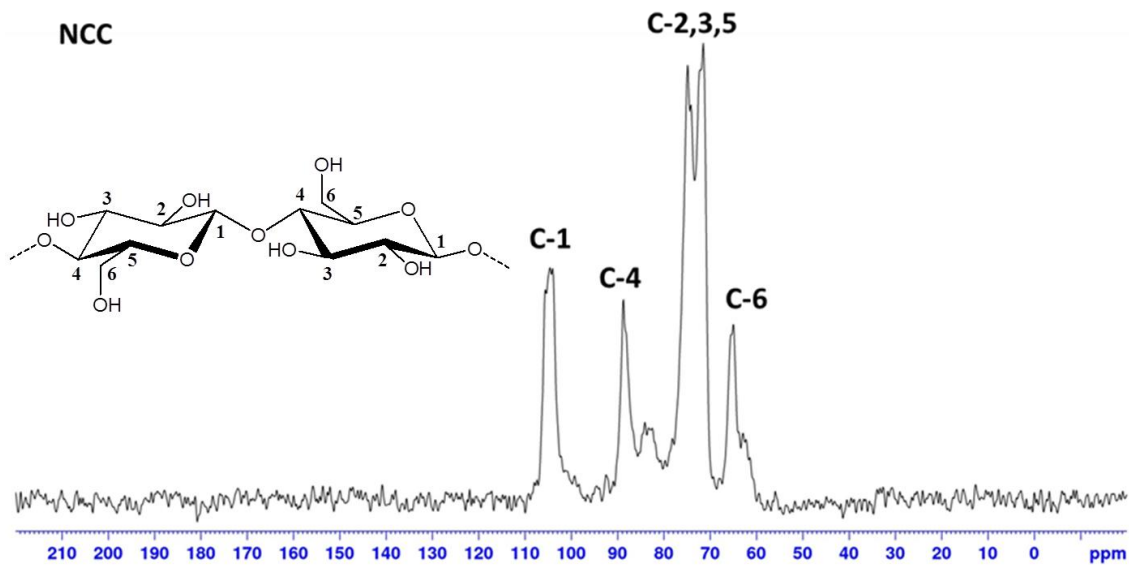


Figura 25. Espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C dos NCC.

5.2. Caracterização do precursor NCC- N_3

5.2.1. Obtenção do precursor NCC-Tos

No intuito de determinar a viabilidade de síntese do precursor NCC- N_3 a partir de NCC-Tos, este último foi caracterizado pelas técnicas de infravermelho e DRX. O espectro de infravermelho forneceu informações quanto à presença das bandas características dos grupos tosila nos nanocristais, que permitiu a posterior incorporação dos grupos N_3 nos NCC.

O espectro infravermelho comparativo entre NCC e NCC-Tos é apresentado na Figura 26.

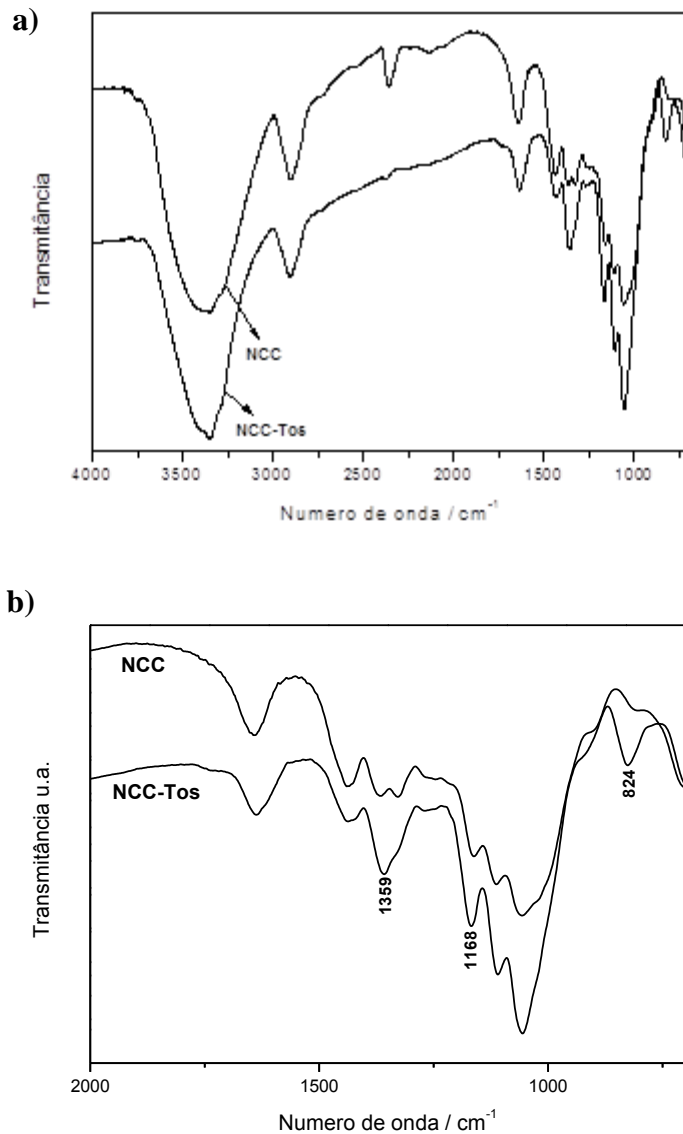


Figura 26. Espectros no infravermelho de NCC e NCC-Tos (a) com detalhe na região de 750 a 2000 cm^{-1} (b).

As principais bandas referentes aos grupos tosila ligados à superfície dos NCC são provenientes do grupo éster sulfonato. As bandas destacadas na Figura 26.b, 1359 cm^{-1} e 1168 cm^{-1} , representam, respectivamente, os estiramentos assimétrico e simétrico do grupo SO_2 . Outro indício do sucesso da incorporação do grupo tosila nos NCC é a presença de uma banda clara referente à presença de cloro na estrutura. Sabe-se que, durante a modificação superficial para inserção dos grupos tosila, o cloro proveniente do reagente também é incorporado à superfície dos NCC [110], ainda que em menor extensão que o grupo tosila. O

estiramento característico da ligação C-Cl encontra-se, conforme especificado na Figura 26.b, em 824 cm^{-1} .

No difratograma apresentado na Figura 27, pode-se observar que os principais picos de difração dos NCC permanecem no difratograma dos NCC-Tos. O índice de cristalinidade calculado para os NCC-Tos foi de 56%, indicando que, após a primeira modificação química, o material ainda se encontra na forma de nanocristais. Assim, foi possível prosseguir com a modificação química dos NCC para obtenção de NCC-N₃.

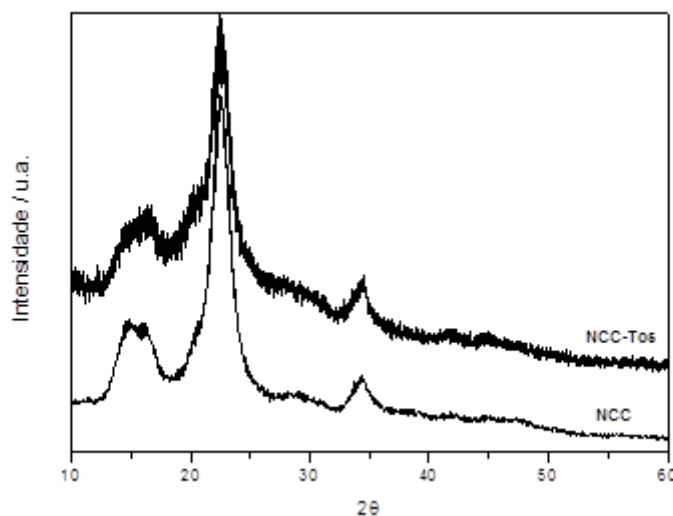


Figura 27. Difratogramas dos NCC e NCC-Tos.

É natural, como será demonstrado para todos os compostos obtidos por modificação química dos NCC neste trabalho, que as sucessivas reações por que passam os nanocristais causem diminuição do índice de cristalinidade. Isso ocorre porque, durante sucessivos processos de modificação química dos grupos OH superficiais, e com os crescentes tempos de reação, as regiões mais internas dos nanocristais podem ser progressivamente atacadas pelos reagentes, levando à erosão da estrutura cristalina original com consequente perda de cristalinidade [2].

5.2.2. Obtenção do precursor NCC-N₃ a partir de NCC-Tos

5.2.2.1. Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)

Após uma primeira modificação superficial dos NCC para fornecer NCC-Tos, este produto

passa por uma segunda modificação superficial, em que os grupos tosila são substituídos por grupos azido. A presença dos grupos azido na estrutura dos nanocristais é bem evidente pela forte banda característica do estiramento da ligação N=N=N, observada em 2119 cm^{-1} (Figura 28), evidenciando a presença desse grupo quimicamente ligado e/ou adsorvido nos NCC.

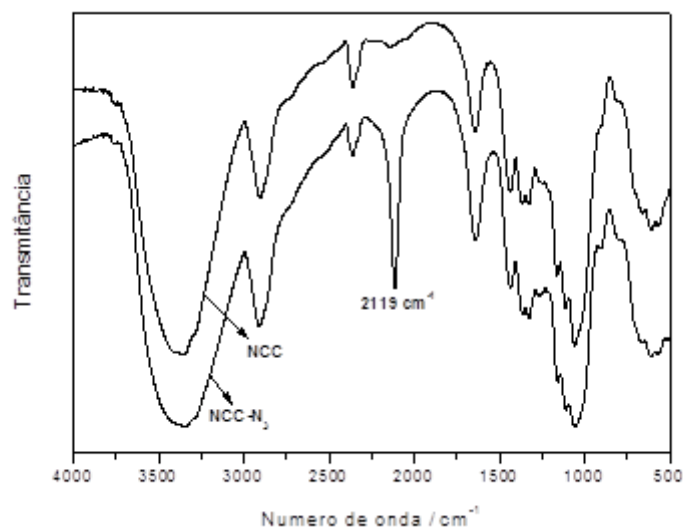


Figura 28. Espectros no infravermelho dos NCC e NCC-N₃ evidenciando a banda característica do grupo azido.

5.2.2.2. Difração de raios X

A Figura 29 apresenta os difratogramas de raios X do NCC e do precursor NCC-N₃.

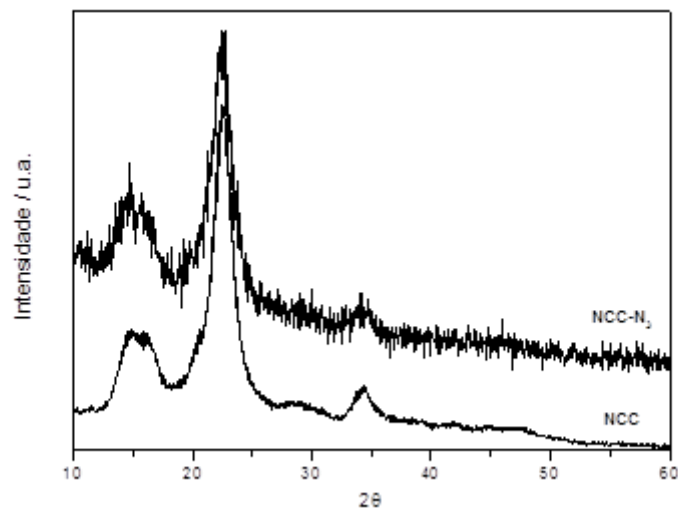


Figura 29. Difratogramas de NCC e NCC-N₃.

Nessa Figura, pode-se perceber que os principais picos de difração característicos dos NCC se mantêm no difratograma dos NCC-N₃. O índice de cristalinidade calculado para a amostra foi de 53%. Dentro dos erros associados ao cálculo do índice de cristalinidade de materiais celulósicos [103], esse valor pode ser considerado equivalente àquele calculado para NCC-Tos, indicando que, após a segunda modificação química dos nanocristais, a estrutura cristalina do material foi pouco afetada.

5.2.2.3. Análise elementar

A Tabela 7 apresenta os dados de porcentagem mássica obtidos por análise elementar do precursor NCC-N₃ em comparação às porcentagens para os NCC não modificados.

Tabela 7. Composição percentual dos NCC e NCC-N₃ obtida por análise elementar.

	% C	% H	% N	% O *
NCC	39,4 (44,4)	5,9 (6,6)	0 (0)	54,6 (48,9)
NCC-N ₃	39,0 (44,0)	5,6 (6,3)	2,9 (3,2)	52,5 (46,4)

*Calculado pela diferença 100% - (% C + % H + % N)

Em relação aos NCC não modificados, pode-se perceber que os NCC-N₃ contêm nitrogênio em sua composição química, o que é mais uma evidência de que houve modificação química das nanopartículas de celulose, já que os NCC, após a reação de modificação, foram exaustivamente lavados conforme descrito na seção 4.3.1. Sabendo-se que o precursor NCC-N₃ foi derivado de outro precursor, NCC-Tos, poder-se-ia esperar que a porcentagem de carbono na estrutura dos NCC-N₃ se mostrasse um pouco maior graças à presença de grupos tosila remanescentes provenientes da primeira modificação dos NCC com cloreto de *p*-toluenossulfonila. Entretanto, por simples inspeção dos dados apresentados na Tabela 7, pode-se inferir que a porcentagem de grupos tosila eventualmente presentes nos NCC-N₃, se existente, é muito baixa, visto que a porcentagem de carbono nos NCC-N₃ é virtualmente equivalente àquela dos NCC.

Os dados de análise elementar podem ser utilizados para se determinar o grau de substituição (GS) dos grupos OH superficiais dos NCC por outros grupos. Essencialmente, o

GS fornece o número de moléculas inseridas por UAG. O cálculo para obtenção do GS utilizado nesse trabalho foi derivado do procedimento proposto por Vaca-Garcia e colaboradores [111] e Feese e colaboradores [11], os quais propuseram uma equação para calcular o de grau de substituição de ésteres de celulose. Uma UAG possui três grupos OH disponíveis para a substituição por outros grupos. O cálculo de GS permite que se determine a porcentagem dos grupos OH que foram substituídos. Entretanto, não é possível determinar quais hidroxilas foram substituídas – se OH 2, OH 3 ou OH 6, conforme ilustrado na Figura 30. Levando-se em conta que cada UAG possui três grupos hidroxila, se esses três grupos forem substituídos, obter-se-á GS de 300%, ou 3. Se duas hidroxilas forem substituídas, o GS será igual a 2 e, se uma hidroxila for substituída, será igual a 1. Contudo, o GS pode ser, e frequentemente é, menor que 1. Adicionalmente, alguns autores consideram o GS igual a 100% quando os três grupos hidroxila foram substituídos.

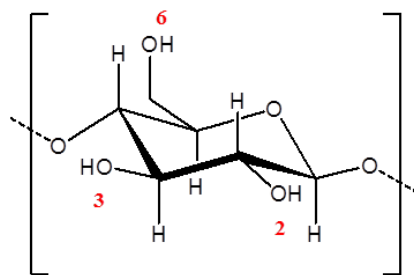


Figura 30. Estrutura da UAG evidenciando os grupos hidroxila passíveis de reagir.

A Equação para o cálculo do GS em se tratando da inserção de grupos azido nos NCC é dada pela Equação 2 [11]:

$$GS = \frac{162N}{42} \quad \text{Equação 2}$$

Na Equação 2, 42 é a massa do grupo azido, 162 é a massa molar da UAG e N é a porcentagem de nitrogênio presente na estrutura, fornecida pela análise elementar. Assim, utilizando 3,25 como a porcentagem de nitrogênio na amostra, o GS calculado para os NCC-N₃ foi de 13%. Esse valor indica que para cada 100 UAG existem 13 grupos azido. Entretanto, como dito anteriormente, não é possível determinar em quais grupos hidroxila ocorreu a substituição, tampouco se há mais de um grupo azido por UAG.

5.2.2.4. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica fornece mais um meio de comparação das características físico-químicas dos NCC antes e após as modificações químicas. Nas Figura 31.a e 31.b são apresentadas as curvas TG e DTG de NCC e NCC-N₃. Pode-se observar um evento térmico que não é característico dos NCC. No entanto, somente pela inspeção da DTG, mostrada na Figura 31.b, percebe-se que, na verdade, existem dois eventos térmicos associados aos NCC-N₃ que não são característicos dos NCC, em 483 e 524 °C. A temperatura inicial de degradação dos NCC-N₃, T_{onset}, foi de 255 °C, enquanto a temperatura em que a degradação é máxima, T_{máx}, foi de 291 °C. Esses valores são mostrados em comparação com os valores para os NCC não modificados na Tabela 8.

Tabela 8. Dados dos principais eventos térmicos dos NCC e NCC-N₃.

	T _{onset} / °C	T _{máx} / °C	Resíduo a 500 °C / %
NCC	245	271	17,8
NCC-N ₃	255	291	4,5

A diminuição de resíduos observada para o NCC-N₃ pode estar relacionada à presença de átomos de nitrogênio na estrutura do NCC modificado, que podem, provavelmente, induzir a formação de mais espécies gasosas, diminuindo, assim, a formação de resíduos carbonáceos.

A modificação superficial dos NCC implica a diminuição dos grupos hidroxila superficiais. Namazi e Dadkhah [112] relataram aumento na estabilidade térmica dos nanocristais após processo de modificação com cloreto de acila e posterior adição de grupos alquila na superfície dos NCC, atribuindo a maior estabilidade térmica à diminuição da concentração de grupos hidroxilas superficiais. Analogamente, pode-se supor que um aumento na estabilidade térmica dos NCC-N₃ esteja relacionado à diminuição da concentração de grupos hidroxila superficiais e, também, a uma variação no mecanismo de degradação advindo da presença de diferentes grupos na superfície dos nanocristais.

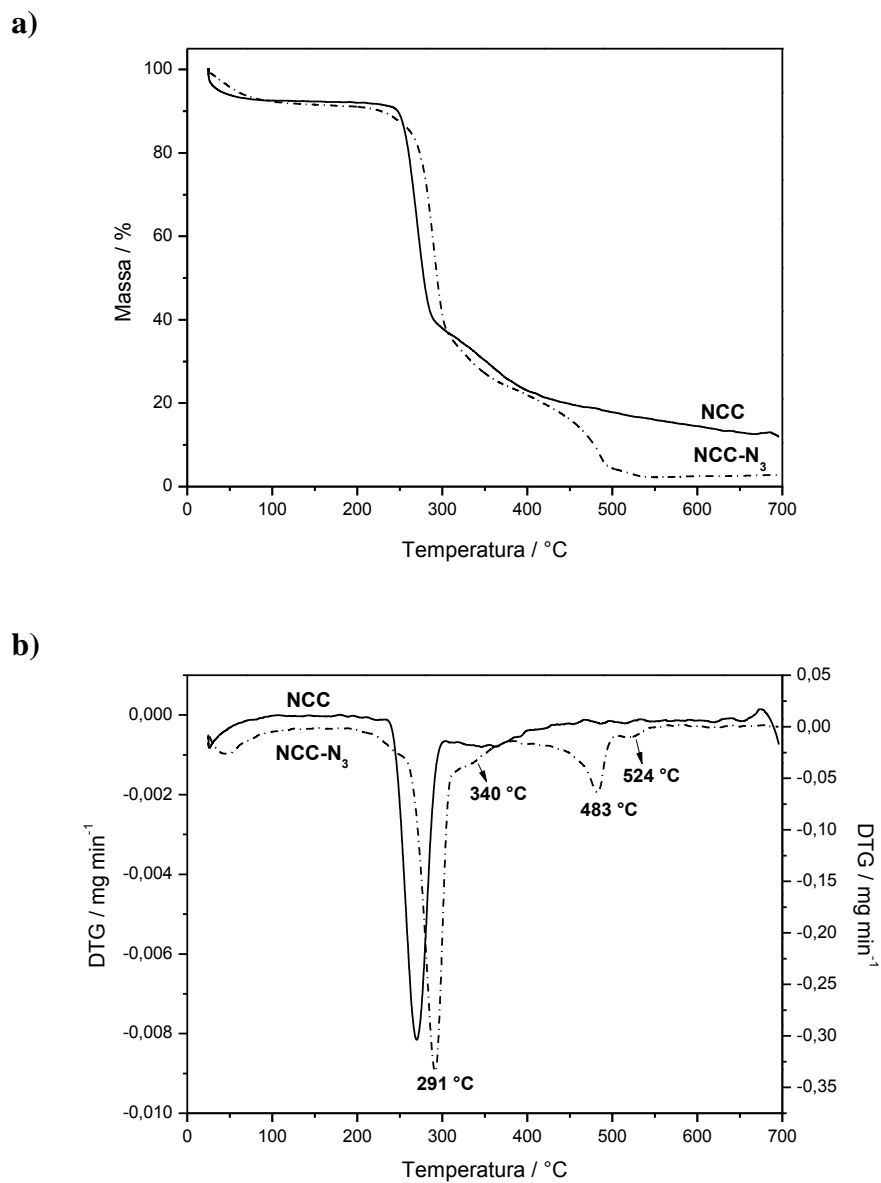


Figura 31. Curvas TG a) e DTG b) dos NCC e NCC-N₃.

5.3. Caracterização do precursor NCC-P

5.3.1. Espectroscopia no infravermelho

A Figura 32 apresenta o espectro infravermelho dos NCC-P. A banda presente em 2121 cm^{-1} é característica do estiramento da ligação $\text{C}\equiv\text{C}$. Diversos trabalhos descritos na literatura, de modificação de polissacarídeos com grupos alcino demonstraram resultados similares no que diz respeito à espectroscopia infravermelho [42, 43], [113-115].

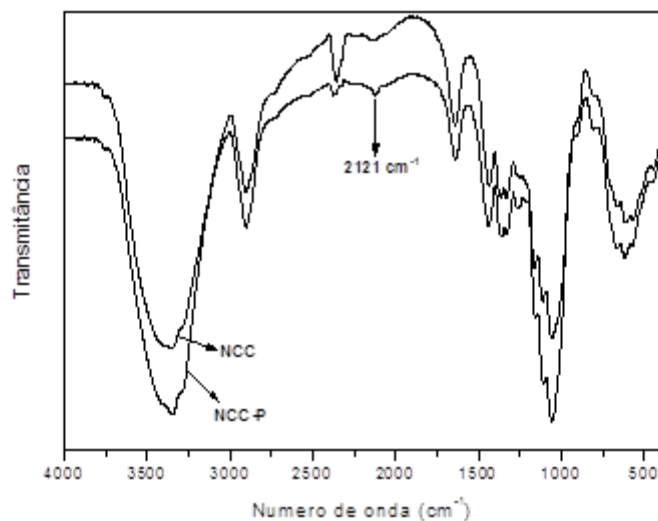


Figura 32. Espectros no infravermelho de NCC e NCC-P evidenciando a banda correspondente ao grupo alcino.

5.3.2. Difração de raios X

Os difratogramas de NCC e NCC-P são apresentados na Figura 33. É possível perceber que os NCC-P mantiveram os mesmos picos de difração característicos dos NCC. A partir dos dados do difratograma da amostra, o IC para NCC-P foi calculado em 60%, indicando que os nanocristais mantiveram a forma cristalina após essa modificação superficial.

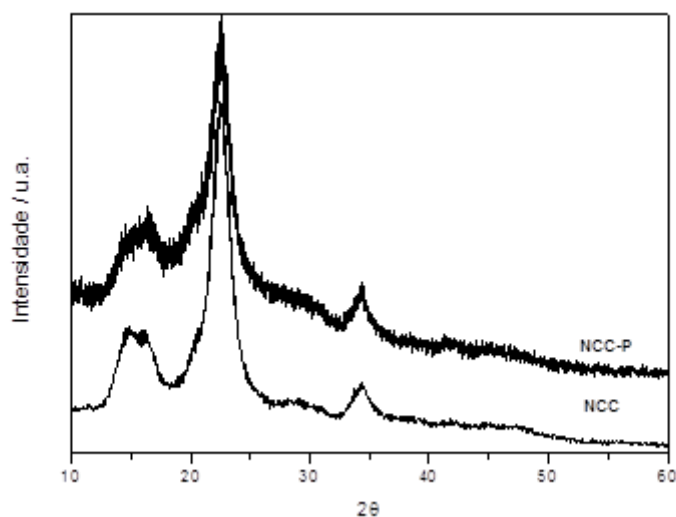


Figura 33. Difratogramas dos NCC e NCC-P.

5.3.3. Análise elementar

Os dados de análise elementar para os NCC-P são mostrados na Tabela 9, em comparação com os dados para os NCC não modificados. A Tabela 9 indica, conforme esperado, que os NCC-P possuem maior conteúdo de carbono (~48%) que os NCC não modificados (44,45%). Esses dados corroboram o resultado de infravermelho evidenciando a modificação química para a obtenção dos NCC-P.

Tabela 9. Composição percentual de NCC e NCC-P obtida por análise elementar.

	% C	% H	% N	% O *
NCC	39,4 (44,4)	5,9 (6,6)	0 (0)	54,6 (48,9)
NCC-P	42,7 (48,1)	5,6 (6,3)	0 (0)	51,7 (45,6)

*Calculado pela diferença 100% - (% C + % H + % N)

A Equação 3 derivada para o cálculo do grau de substituição das hidroxilas por grupos alcino (ou propargila) é dada por [111]:

$$GS = \frac{72 - 162C}{39C - 36} \quad \text{Equação 3}$$

Nessa equação, 72 é a massa dos átomos de carbono na estrutura da UAG, 162 é a massa molar da UAG, 39 é a massa molar do grupo propargil (-CH₂-C≡CH) e 36 é a massa dos átomos de carbono na estrutura do grupo propargil. O grau de substituição calculado com auxílio da Equação 3 foi de 30%, ou seja, 3 grupos alcino a cada 10 UAG.

5.3.4. Análise termogravimétrica

As Figuras 34.a e 34.b evidenciam que os perfis de decomposição dos NCC-P se mantiveram semelhantes, apesar da variação nas T_{onset} e T_{máx}.

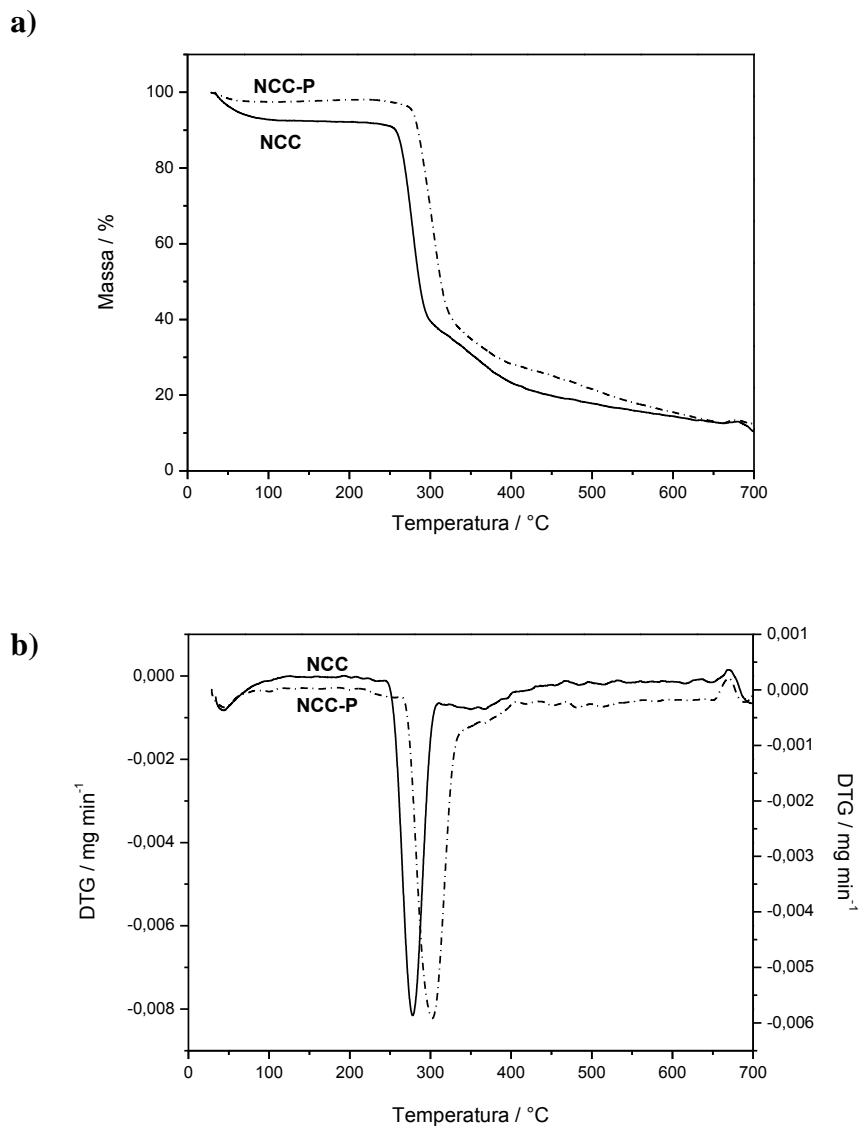


Figura 34. Curvas a) TG e b) DTG dos NCC e NCC-P.

Tabela 10. Dados dos principais eventos térmicos dos NCC e NCC-P.

	$T_{\text{onset}} / ^\circ\text{C}$	$T_{\text{máx}} / ^\circ\text{C}$	Resíduo a 500 $^\circ\text{C} / \%$
NCC	245	271	17,8
NCC-P	277	300	21,5

Alterações nas propriedades térmicas das nanopartículas também podem ser utilizadas para evidenciar a modificação química na superfície dos NCC. A Tabela 10 apresenta os principais dados extraídos das curvas TG e DTG dos NCC e NCC-P (Figuras 34.a e 34.b). É possível

perceber que os NCC-P possuem maior estabilidade térmica que os NCC, visto que o início da sua degradação térmica se dá em temperaturas mais altas (277 °C). Analogamente ao que foi discutido para os NCC-N₃, o aumento da estabilidade térmica dos NCC-P pode ser relacionado à variações no mecanismo de degradação dos nanocristais modificados. O aumento na porcentagem de massa residual a 500 °C, que foi de 17,8% para 21,5% fornece outra evidência para a inserção de grupos na superfície dos NCC.

5.4. Caracterização do produto *click* NCC-QA

Os NCC-QA foram obtidos pela *click* CuAAC a partir dos NCC-N₃ e da molécula alcino-1,4-naftoquinona (QA). A Figura 35 ilustra a representação esquemática do produto *click* obtido após a reação entre o NCC e QA; os NCC são representados pelo retângulo.

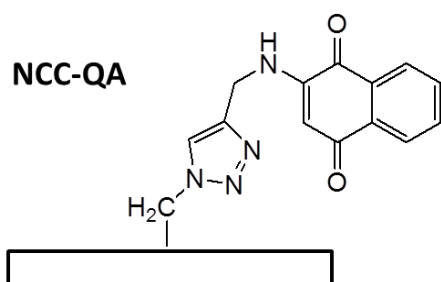


Figura 35. Representação esquemática dos NCC-QA.

5.4.1. Espectroscopia no infravermelho

A Figura 36.a apresenta os espectros no infravermelho de NCC, NCC-N₃ e NCC-QA. Nessa figura, é possível perceber claramente a diminuição do sinal relativo ao grupo azido (2119 cm⁻¹), que pode ser inicialmente atribuído a sua ligação com o grupo alcino terminal da molécula QA para formação do anel 1,2,3-triazólico. Observações mais detalhadas são possíveis a partir da inspeção das Figuras 36.b e 36.c, referentes aos espectros dos NCC-N₃ e NCC-QA e da molécula QA pura, respectivamente. Por comparação com o espectro da Figura 36.c, a modificação superficial dos NCC-N₃ com a molécula QA é confirmada na Figura 36.b pela presença das bandas a 1671, 1616, 1512, 1424, 1359 e 1260 cm⁻¹.

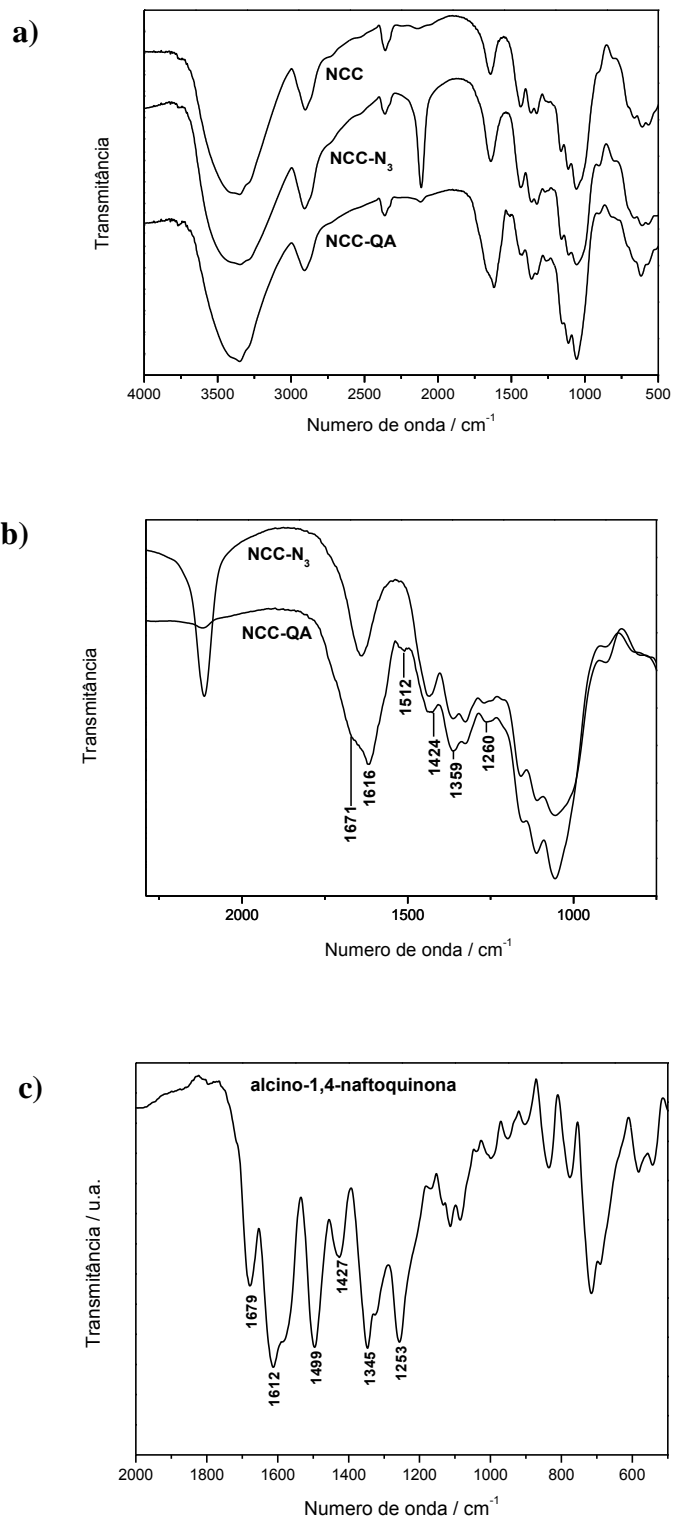


Figura 36. Espectros no infravermelho de **a)** NCC, NCC- N_3 e NCC-QA, **b)** NCC- N_3 e NCC-QA e **c)** alcino-1,4-naftoquinona.

5.4.2. Difração de raios X

Os dados de difração de raios X são apresentados na Figura 37. Nota-se, primeiramente, que os espectros praticamente se sobrepõem, indicando que os picos de difração característicos dos NCC se mantiveram para os NCC-QA, mesmo após três modificações químicas sucessivas. A cristalinidade do NCC-QA (56%) foi mantida em relação ao seu precursor NCC-N₃ (53%), como mostra a Tabela 11. O aparente aumento na cristalinidade pode ser creditado a erros inerentes à técnica utilizada para o cálculo de IC, como já explicitado para os NCC [104]. Em todos os casos, no entanto, o que se nota é que as reações de modificação superficial sempre levam a uma queda na cristalinidade em relação ao NCC de origem (88%). Esse comportamento é explicável pelo fato de que, a cada nova reação química para modificação superficial dos NCC, as nanoestruturas vão sendo progressivamente atacadas pelos reagentes e solventes, o que acarreta em diminuição da cristalinidade.

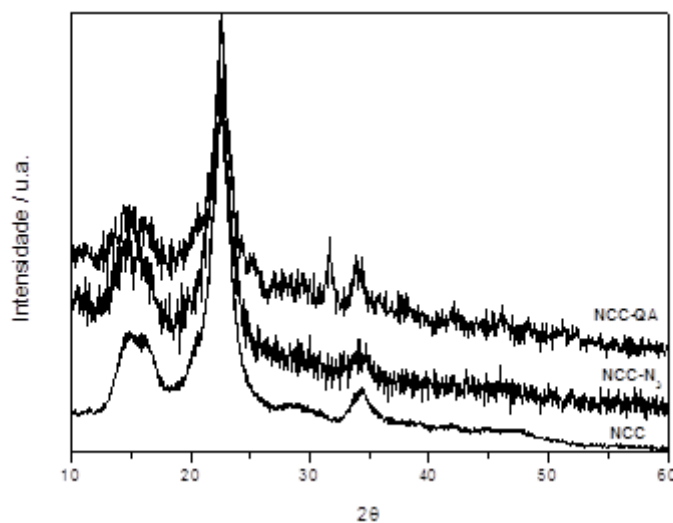


Figura 37. Difratogramas dos NCC, NCC-N₃ e NCCQA.

Tabela 11. Índices de cristalinidade de NCC, NCC-N₃ e NCC-QA obtidos por DRX.

	NCC	NCC-Tos	NCC-N ₃	NCC-QA
IC / %	88	56	53	56

Pode-se notar no difratograma dos NCC-QA a presença de um pico em 31,6°, aproximadamente. Uma vez que esse pico não se encontra presente nos difratogramas dos NCC, NCC-Tos e NCC-N₃, pensou-se na possibilidade de impurezas na amostra. Sabendo-se

que o sistema catalítico dessa reação *click* consiste em íons Cu(II) sendo reduzidos a íons Cu(I), pode-se sugerir a possibilidade de formação de CuO nanoparticulado a partir de íons Cu(II) remanescentes no meio reacional. Propõe-se essa hipótese baseando-se no fato de que nanocristais de óxido de cobre (II) apresentam um pico característico de difração por volta de 32,5 [116, 117].

5.4.3. Análise elementar

As composições percentuais de NCC, NCC-N₃ e NCC-QA, obtidas por análise elementar, são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Dados de análise elementar para NCC, NCC-N₃ e NCC-QA.

	% C	% H	% N	% O *
NCC	39,4 (44,4)	5,90 (6,65)	0 (0)	54,6 (48,9)
NCC-N ₃	39,0 (44,0)	5,60 (6,31)	2,88 (3,25)	52,5 (46,4)
NCC-QA	34,7 (39,1)	4,69 (5,29)	2,19 (2,47)	58,5 (53,2)

*Calculado pela diferença 100% - (% C + % H + % N)

Pode-se notar que a porcentagem de carbono diminui da amostra NCC-N₃ para a amostra NCC-QA (44,0 para 39,0%), bem como a porcentagem de nitrogênio (3,25 para 2,47%). A fórmula utilizada para o cálculo do grau de substituição para essa amostra é apresentada a seguir:

$$GS = \frac{72 - 162C}{211C - 156} \quad \text{Equação 4}$$

Na Equação 4, 72 é a massa dos átomos de carbono na UAG, 162 é a massa molar de uma UAG, *C* é a porcentagem experimental de carbono fornecida pelo CHN, 211 é a massa molar da QA e 156 é a massa dos átomos de carbono na QA. O GS calculado foi de 12%, o que fornece 12 moléculas QA para cada 100 UAG, ou 1 molécula QA para cada 8 UAG. Esse

cálculo pode indicar que aproximadamente 100% dos grupos azido nos NCC-N₃ reagiram com as moléculas QA. Contudo, deve-se levar em conta que os NCC passaram por 3 modificações superficiais para fornecer NCC-QA, de forma que o cálculo de GS baseado em dados de CHN fornece apenas uma aproximação do grau de substituição das hidroxilas após reação *click* e não deve ser encarado como um valor exato. À medida que os NCC vão sendo superficialmente modificados, muitos átomos comuns à sua estrutura e à das moléculas inseridas (como carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio) são adicionados heterogeneamente às cadeias celulósicas, de forma que as equações para o cálculo de GS tendem a ficar menos diretas e mais imprecisas. Esse raciocínio vale para todos os produtos *click*. Espera-se, assim, com os resultados de CHN, corroborar o resultado da inserção de novos grupos nos NCC, em vez de quantificá-los com precisão.

5.4.4. Análise termogravimétrica

A Tabela 13 resume os dados dos principais eventos térmicos associados aos NCC, NCC-N₃ e NCC-QA obtidos das curvas TG mostradas na Figura 38. Nota-se, primeiramente, um aumento da estabilidade térmica em relação aos NCC e aos NCC-N₃, uma vez que a T_{onset} para NCC-QA é de 280 °C. Uma hipótese que pode ajudar a explicar esse fato se refere à inserção de novos grupos superficialmente nos NCC. Esse raciocínio foi inicialmente desenvolvido para presença de grupos inorgânicos [118], mas, aqui ele é estendido a funcionalização por grupos orgânicos. À medida que o material é aquecido, a disponibilidade de energia suficiente para promoção de caminhos alternativos de decomposição à temperaturas mais altas resulta em uma séria de reações de decomposição concorrentes, consecutivas e complexas, o que leva também a uma variedade de produtos [118]. Assim, pode-se sugerir que o aumento na estabilidade térmica dos NCC modificados esteja relacionado a variações no mecanismo de degradação desses materiais que, conforme dito acima, se torna mais complexo.

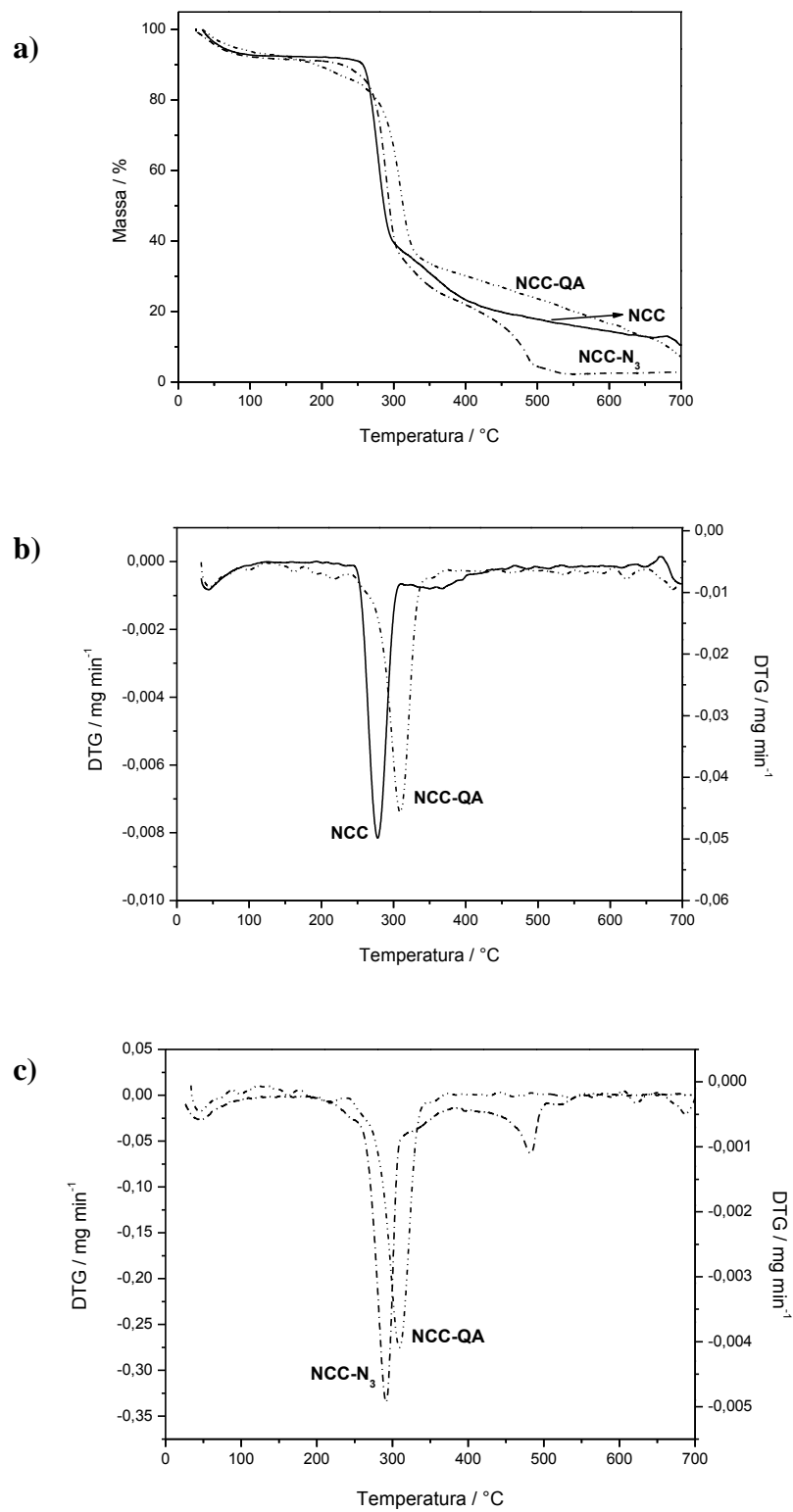


Figura 38. a) Curvas TG dos NCC, NCC-N₃ e NCC-QA e curvas DTG dos b) NCC e NCC-QA e c) NCC-N₃ e NCC-QA.

Tabela 13. Dados dos principais eventos térmicos dos NCC, NCC-N₃ e NCC-QA.

	T _{onset} / °C	T _{máx} / °C	Resíduo a 500 °C / %
NCC	245	271	17,8
NCC-N ₃	255	291	4,5
NCC-QA	280	310	23,5

O perfil de degradação dos NCC-QA sofreu alteração em relação aos NCC e NCC-N₃, conforme pode ser observado na Figura 38.a. O segundo evento térmico associado aos NCC (360 °C) não é mais observado para os NCC-QA, bem como os dois eventos térmicos associados aos NCC-N₃ (entre 450 e 550 °C), conforme ilustram as curvas DTG das Figuras 33.b e 33.c. Outro ponto importante a ser destacado é o fato de que os NCC-N₃ parecem sofrer mínima variação de massa após 500 °C, enquanto os NCC-QA continuam a apresentar perda de massa, como pode ser observado na Figura 38.a. Essa perda de massa contínua é um indício da variação estrutural por que passaram os NCC, e pode-se correlacioná-la à substituição superficial heterogênea nas hidroxilas superficiais, bem como à presença de grupos diferentes daqueles encontrados na superfície dos NCC e dos NCC-N₃. Destaca-se a grande quantidade de material residual que o NCC-QA apresenta à 500°C: em torno de 25 %. Uma alta massa residual já é característica dos NCC; entretanto, parte dessa massa residual pode também ser proveniente do catalisador de cobre, visto que ele representa 12% da massa dos NCC-N₃ na *click*.

5.4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A Figura 39 apresenta as imagens de microscopia MET para os NCC-QA. É possível notar a presença dos nanocristais intactos e com tamanho correspondente ao esperado para os NCC (150-200 nm). Assim, pode perceber que a inserção de diferentes grupos na superfície dos NCC após reação *click* não alterou a morfologia dos NCC.

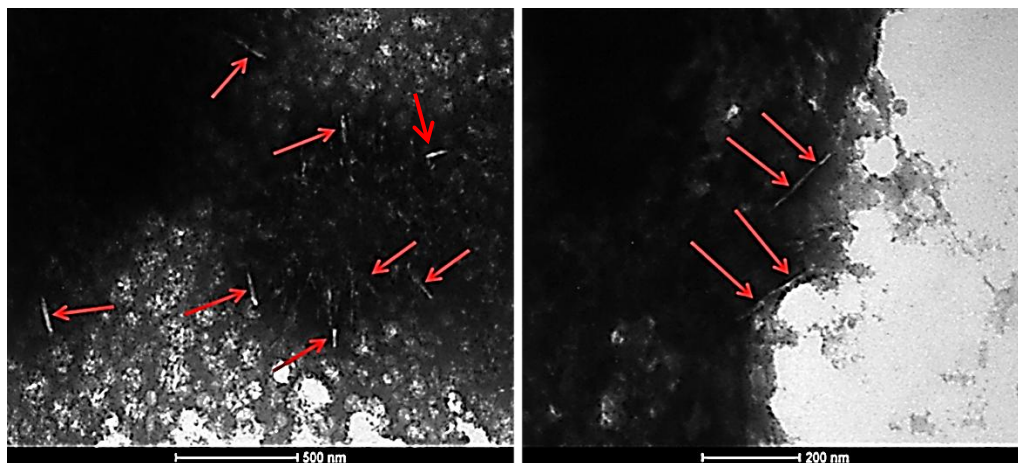


Figura 39. Micrografias MET dos NCCQA. A barra de escala está indicada na figura.

5.4.6. Ressonância Magnética Nuclear

A técnica de RMN CP/MAS de ^{13}C pode indicar, com um pouco mais de segurança, se houve formação do anel 1,2,3-triazólico na superfície dos NCC; ou seja, ela fornece maiores evidências da formação efetiva de ligação covalente entre os NCC e as moléculas de interesse. Entretanto, essa técnica possui uma séria desvantagem, pois frequentemente fornece uma evidência fraca ou indireta do acoplamento derivado da reação *click* devido à presença de picos por vezes muito fracos relacionados aos carbonos triazólicos [119]. Ainda assim, essa técnica é uma importante ferramenta a mais na caracterização dos NCC superficialmente modificados e, ao fazer uso dela, o mais importante é que se procure evidências espectrais que possam corroborar com a existência do anel 1,2,3-triazólico nos produtos *click*. Joubert e colaboradores [119] designam os picos em ~ 142 e 123 ppm aos carbonos triazólicos 1 e 2, respectivamente. Já Peng e colaboradores [66] designam os carbonos 1 e 2 pelos picos presentes em ~ 146 e 126 ppm, respectivamente. Pode-se perceber, assim, que os deslocamentos químicos referentes aos carbonos do anel triazólico ocorrem dentro de uma faixa mais ampla que engloba os deslocamentos na região em torno de 123 e 126 ppm para o C2 e em 142 e 146 ppm para o C1 (região de aromáticos).

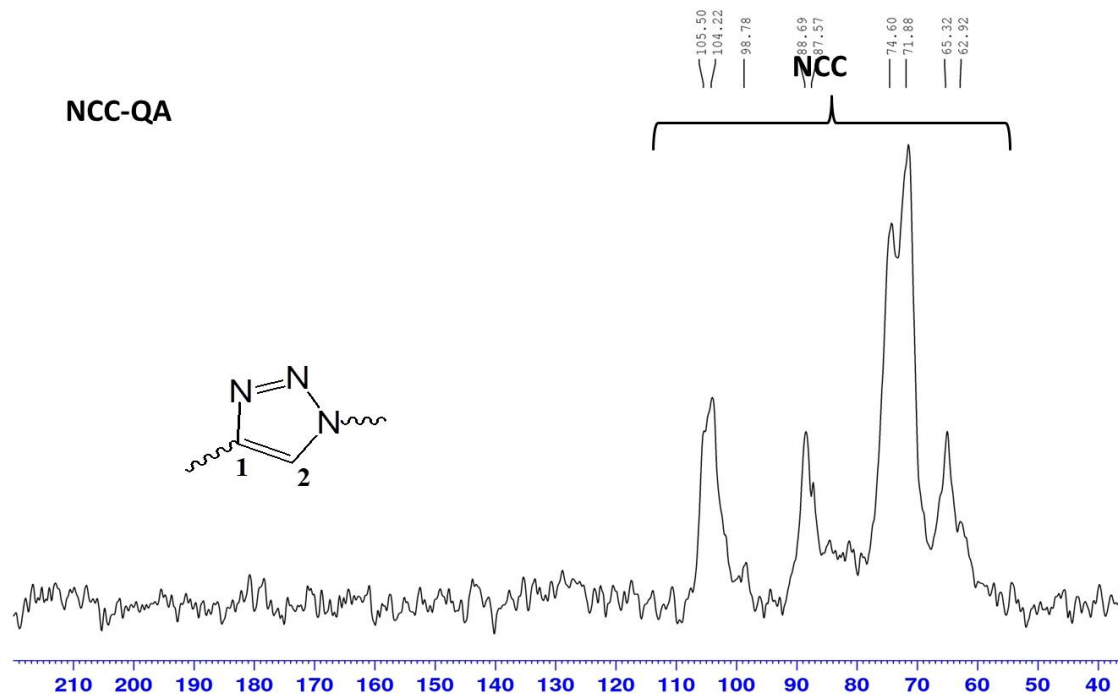


Figura 40. Espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C dos NCC-QA.

A Figura 40 ilustra o espectro de RMN de ^{13}C dos NCC-QA. No espectro não foi possível a visualização dos sinais relativos aos carbonos 1 e 2 da estrutura do anel 1,2,3-triazólico. No entanto, conforme descrito acima, os picos correspondentes aos carbonos triazólicos constantemente são tão fracos que podem não ser detectáveis no espectro. Nesse caso, as demais caracterizações apresentadas fornecem evidências mais seguras da ocorrência do acoplamento *click*.

5.4.7. Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)

A Tabela 14 mostra os dados de XPS relativos à N 1s do precursor NCC- N_3 e do produto *click* NCC-QA. À ligação do grupo azido em NCC- N_3 são atribuídas duas espécies químicas: $\underline{\text{N}}=\text{N}=\underline{\text{N}}$, de energia de ligação 400,7 eV, correspondente aos átomos de nitrogênio laterais; e $\text{N}=\underline{\text{N}}=\text{N}$, de energia de ligação 404,1 eV, correspondente ao átomo de nitrogênio central. Ao átomo de nitrogênio central do grupo azido é atribuída a maior energia de ligação devido à deficiência eletrônica dessa espécie [120, 121].

O sucesso da reação *click* pode ser determinado pela diminuição ou desaparecimento da porcentagem das espécies relacionadas ao grupo azido. No anel triazólico não estão mais presentes átomos de nitrogênio eletronicamente deficientes, de forma que a diminuição (ou mesmo desaparecimento) da concentração percentual referente à espécie $\text{N}=\underline{\text{N}}=\text{N}$ indica reação do grupo azido e formação de novas espécies de nitrogênio quimicamente ligadas. Pelos dados de concentração percentual das espécies $\underline{\text{N}}=\text{N}=\underline{\text{N}}$ e $\text{N}=\underline{\text{N}}=\text{N}$, apresentados na Tabela 14, calcula-se que a razão $\underline{\text{N}}=\text{N}=\underline{\text{N}}/\text{N}=\underline{\text{N}}=\text{N}$ é de aproximadamente 2:1 no precursor NCC-N₃, o que está condizente com os dados da literatura [120, 121]. Já para o produto *click* NCC-QA, a razão entre essas espécies é de aproximadamente 5:1. Esse resultado confirma a diminuição percentual da espécie de nitrogênio eletronicamente deficiente do grupo azido e é uma boa evidência da formação de uma nova ligação química (possivelmente do anel 1,2,3-triazólico). Além disso, a diferença de energia de ligação que se observou para a espécie $\text{N}=\underline{\text{N}}=\text{N}$, de 404,1 eV para os NCC-N₃ para 403,9 eV para os NCC-QA, ajuda a corroborar com a formação de uma nova espécie ligada de nitrogênio.

A contribuição de 29,2% de átomos de nitrogênio relacionados à espécie NH₂ nos NCC-N₃ pode estar relacionada à redução de alguns grupos azido na superfície dos nanocristais, o que também poderia explicar a redução da banda relacionada à esse grupo do espectro infravermelho dos NCC-QA em relação ao dos NCC-N₃ (Figura 36.a e 36.b).

Tabela 14. Dados de XPS de N 1s de NCC-N₃ e NCC-QA.

	Espécie	Energia de ligação / eV	Concentração / %
NCC-N ₃	NH ₂	398,9	29,2
	$\underline{\text{N}}=\text{N}=\underline{\text{N}}$	400,7	49,5
	$\text{N}=\underline{\text{N}}=\text{N}$	404,1	21,3
NCC-QA	NH ₂	398,9	30,3
	$\underline{\text{N}}=\text{N}=\underline{\text{N}}$	400,7	57,5
	$\text{N}=\underline{\text{N}}=\text{N}$	403,9	12,2

5.5. Caracterização do produto *click* NCC-BTD

Os NCC-BTD foram obtidos pela reação *click* CuAAC entre os NCC-N₃ e a molécula

BTD. A Figura 41 ilustra a representação esquemática do produto *click* obtido; os NCC são representados pelo retângulo.

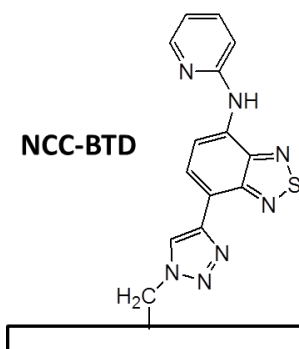


Figura 41. Representação esquemática dos NCC-BTD.

5.5.1. Espectroscopia no infravermelho

A Figura 42 a apresenta os espectros no infravermelho dos NCC, NCC-N₃ e NCC-BTD. A inspeção dos espectros revela que a banda característica de azida (2119 cm⁻¹) diminuiu consideravelmente do espectro do precursor, NCC-N₃, para o espectro do produto *click*, NCC-BTD. A Figura 42.b evidencia em maior detalhe a diminuição da banda característica do grupo azido, além de novas bandas que se apresentaram no espectro do composto NCC-BTD.

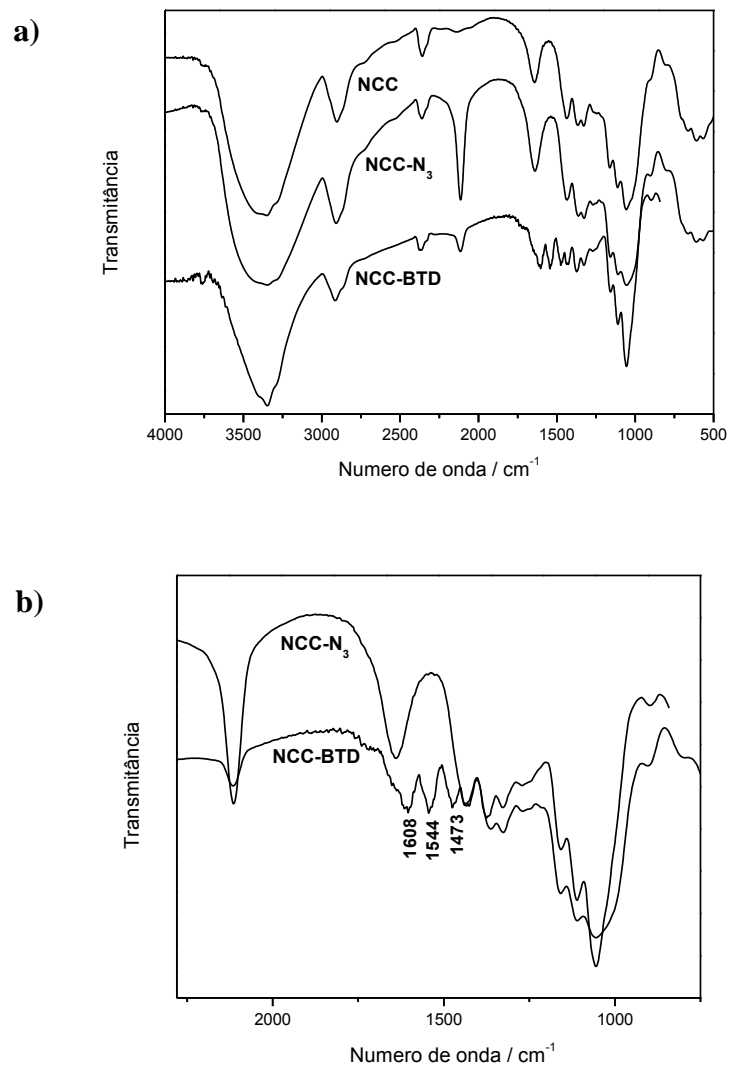


Figura 42. a) Espectros no infravermelho dos NCC, NCC-N₃ e NCC-BTD e b) região em detalhe dos espectros dos NCC-N₃ e NCC-BTD.

Pode-se notar nos espectros das Figuras 42.a e 42.b a forte diminuição da banda relacionada ao grupo azido do espectro dos NCC-N₃ para o espectro dos NCC-BTD. Essa diminuição pode estar relacionada tanto à diminuição da concentração de grupos azido na superfície dos NCC-N₃ devido à formação da ligação triazólica quanto à redução desses grupos à amina, em analogia ao que foi observado para os NCC-QA. Contudo, conforme foi igualmente observado para os NCC-QA, o espectro infravermelho dos NCC-BTD também acusou o aparecimento de bandas que podem ser atribuídas à molécula BTD.

Conforme observado acima, o espectro em detalhe dos NCC-N₃ e NCC-BTD (Figura 42.b) revela novas absorções em 1608, 1544 e 1473 cm⁻¹. Tem-se que o estiramento C=C de aromáticos ocorre na região entre 1600 e 1400 cm⁻¹ e que a deformação da ligação N-H de aminas dissustituídas ocorre próximo a 1500 cm⁻¹. Sendo assim, levando-se em consideração a estrutura molecular da BTD, pode-se supor que as bandas observadas em 1608, 1544 e 1473 cm⁻¹ sejam devido à presença da molécula de BTD na superfície dos NCC. Devido à baixa estabilidade da molécula BTD ligada ao grupo alcino, não foi possível obter seu espectro infravermelho para comparação com o espectro dos NCC e NCC-N₃, conforme foi feito para os NCC-QA e NCC-QN₃ (seção 5.6).

5.5.2. Difração de raios X

A Figura 43 apresenta o difratograma dos NCC, NCC-N₃ e NCC-BTD. A análise do gráfico permite concluir que os NCCBTD apresentam os mesmos picos principais de difração que os NCC e os NCC-N₃. O IC calculado para essa amostra foi de 55%, indicando que, após três sucessivas modificações superficiais, os NCC ainda mantiveram sua cristalinidade. A Tabela 15 mostra uma comparação entre a cristalinidade das amostras após sucessivas modificações superficiais. Da mesma forma que para a amostra NCC-QA, a NCC-BTD apresenta um pequeno aumento na cristalinidade de dois pontos percentuais em relação aos NCC-N₃. Analogamente ao que foi discutido para NCC-QA, essa variação se encontra dentro do erro experimental associado ao cálculo de IC pelos dados de DRX.

Tabela 15. Índices de cristalinidade dos NCC, NCC-N₃ e NCC-BTD.

	NCC	NCC-Tos	NCC-N ₃	NCC-BTD
IC / %	88	56	53	55

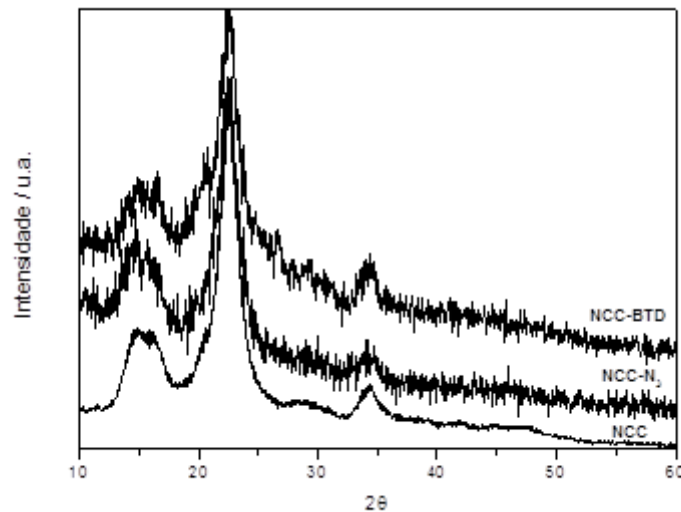


Figura 43. Difratogramas dos NCC, NCC-N₃ e NCC-BTD.

5.5.3. Análise elementar

A Tabela 16 apresenta os dados de análise elementar entre NCC, NCC-N₃ e NCC-BTD.

Tabela 16. Composição percentual de NCC, NCC-N₃ e NCC-BTD obtida por análise elementar.

	% C	% H	% N	% O *
NCC	39,44 (44,4)	5,90 (6,65)	0 (0)	54,6 (48,9)
NCC-N ₃	39,0 (44,0)	5,60 (6,31)	2,88 (3,25)	52,5 (46,4)
NCC-BTD	43,1 (48,6)	4,99 (5,18)	5,71 (6,44)	46,2 (39,8)

*Calculado pela diferença 100% - (% C + % H + % N)

Conforme esperado, a porcentagem de carbono aumentou dos NCC e NCCN₃ (essencialmente a mesma porcentagem para ambas) para os NCC-BTD, bem como a porcentagem de nitrogênio, uma vez que a molécula de BTM contribui com quatro átomos de nitrogênio. Para o cálculo do grau de substituição desse produto *click*, foi utilizada a equação a seguir:

$$GS = \frac{72 - 162C}{252C - 156} \quad \text{Equação 5}$$

Na Equação 5, o valor 72 representa a massa dos átomos de carbono na UAG, 162 é a massa molar da UAG, C é a porcentagem de carbono no composto NCC-BTD, 252 é a massa molar da BTD e 156 é a massa dos átomos de carbono da BTD. O GS calculado para essa amostra foi de 20%, ou seja, 2 moléculas de BTD para cada 10 UAG.

5.5.4. Análise termogravimétrica

A Tabela 17 apresenta os principais dados extraídos das TG e DTG dos NCC-BTD em comparação com os dados dos NCC e NCC-N₃. Foi observado um aumento na estabilidade térmica dos NCC-BTD em relação a ambos NCC e NCC-N₃. Observa-se um aumento crescente da T_{onset} a partir dos NCC até os NCC-BTD, para a qual a T_{onset} foi de 284 °C. Analogamente aos NCC-QA, o aumento na estabilidade térmica pode estar relacionado a variações no mecanismo de degradação dos NCC-BTD. As Figuras 44.b e 44.c ilustram com mais detalhe a diferença de comportamento térmico entre NCC-BTD, NCC e NCC-N₃.

Percebe-se também que, em contrapartida aos NCC-QA, os NCC-BTD apresentam menor porcentagem de resíduos a 500 °C. Uma hipótese para esse comportamento pode ser a de que a molécula de BTD fornece mais átomos de nitrogênio aos nanocristais além daqueles derivados dos grupos azido dos NCC-N₃. Os átomos de nitrogênio advindos da BTD não participam da formação do anel triazólico e podem estar mais disponíveis para a formação de mais espécies gasosas, o que contribui para a diminuição da porcentagem de massa residual dos NCC-BTD. Essa teoria é equivalente àquela proposta para os NCC-N₃. Supõe-se, com essa hipótese, que os átomos de nitrogênio que fazem parte do anel 1,2,3-triazólico não contribuam igualmente para a formação de espécies gasosas, podendo, assim, ser considerados termicamente mais estáveis.

Tabela 17. Principais eventos térmicos dos NCC, NCC-N₃ e NCC-BTD.

	$T_{onset} / ^\circ\text{C}$	$T_{m\acute{a}x} / ^\circ\text{C}$	Resíduo a 500 °C / %
NCC	245	271	17,8
NCC-N ₃	255	291	4,5
NCC-BTD	284	318	5,2

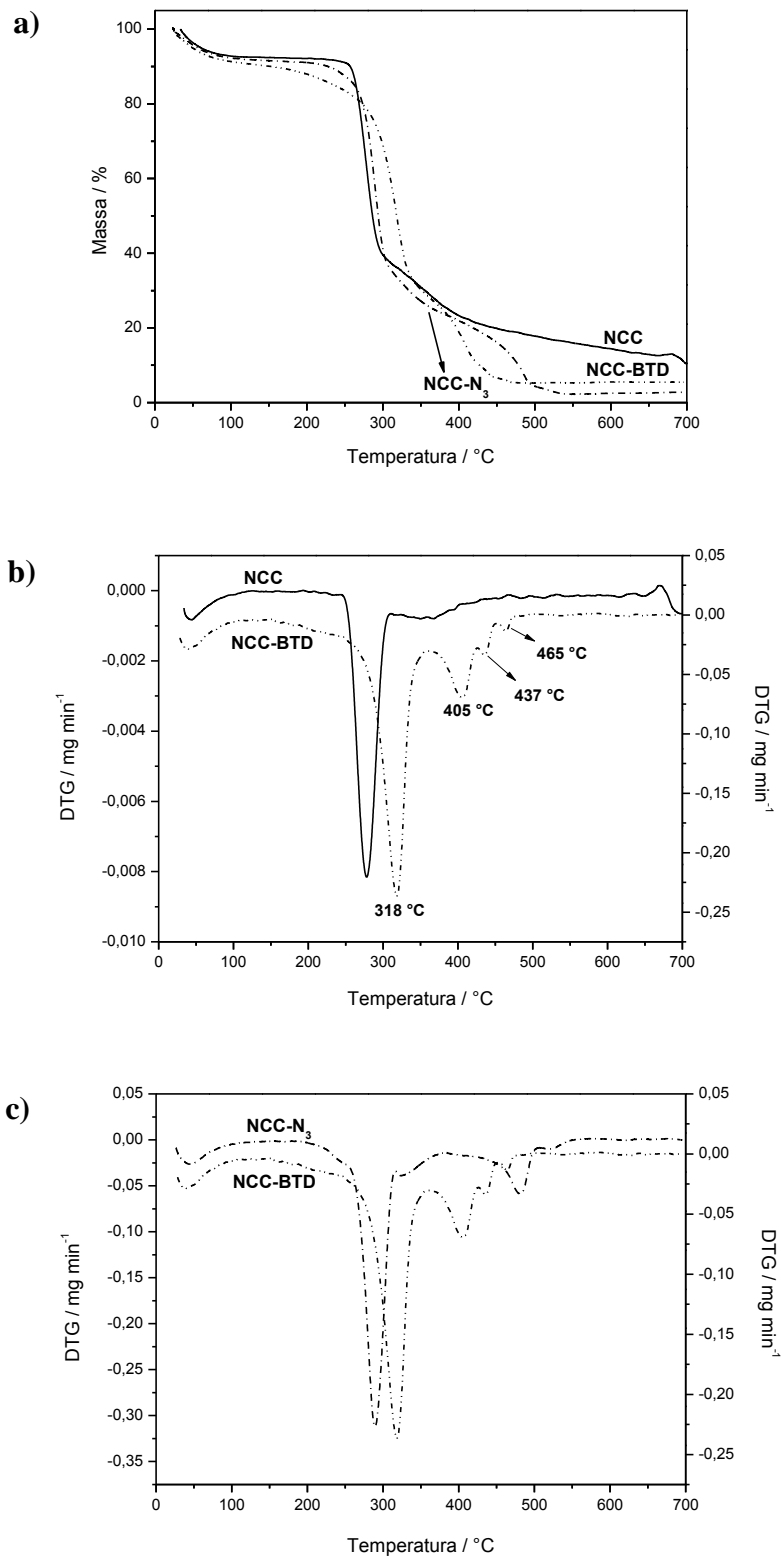


Figura 44.a) Curvas TG dos NCC, NCC-N₃ e NCC-BTD e curvas DTG dos **b)** NCC e NCC-BTD e **c)** NCC-N₃ e NCC-BTD.

A análise das curvas DTG das Figuras 44.b e 44.c evidencia que os NCC-BTD apresentam um padrão de decomposição térmica diferente dos NCC e do precursor NCC-N₃. A variação no comportamento de degradação térmica também é mais um indício de funcionalização ou variação na química de superfície dos nanocristais.

5.5.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A Figura 45 mostra as imagens de microscopia obtidas para os NCC-BTD. Devido à baixa solubilidade dos NCC quimicamente modificados, foi possível identificar somente alguns poucos nanocristais nas imagens dos NCC-BTD. É possível observar que o produto *click*, de fato, manteve a forma cristalina após três reações para modificação superficial sucessivas, corroborando com os resultados obtidos pelos difratogramas das amostras, que revelaram IC na faixa de 60–50%.



Figura 45. Imagens de MET para os NCC-BTD. A barra de escala está indicada na figura.

5.5.6. Espectroscopia UV-Vis e espectroscopia de fluorescência

A Figura 46 ilustra uma suspensão de NCC-BTD em acetona em uma concentração aproximada de 0,01% m/v.



Figura 46. NCC-BTD em suspensão de acetona.

Os espectro de UV-Vis e de fluorescência das soluções de NCC e NCC-BTD são mostrados nas Figuras 47.a e 47.b, respectivamente.

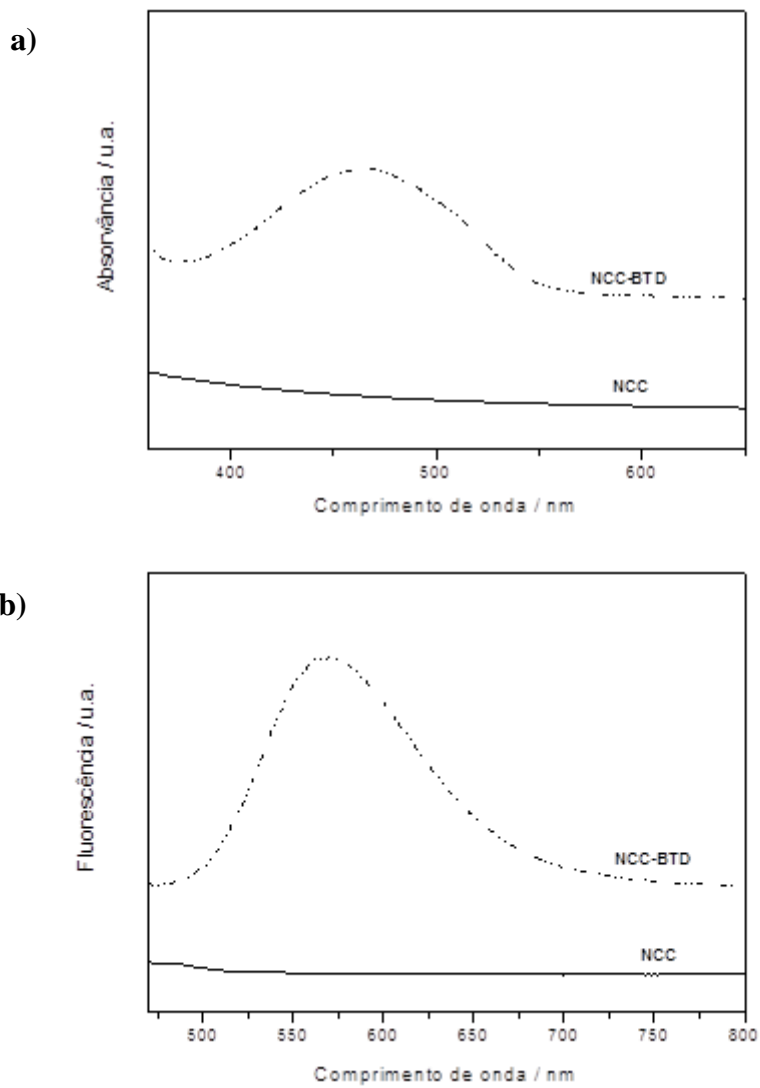


Figura 47. Espectros UV-Vis (a) e de fluorescência (b) dos NCC e NCC-BTD.

Para essa discussão, é necessário ressaltar que as nanopartículas modificadas foram exaustivamente lavadas após as reações, com sucessivos ciclos de centrifugação em acetona e água. Pode perceber claramente que os NCC antes da funcionalização não apresentam absorções nem emissões características. Já os NCC-BTD absorvem em 464 nm (Figura 47.a) e emitem em 568 nm (Figura 47.b). Idealmente, um espectro de absorção e emissão da BTD deveria ser feito para comparação mais detalhada com os NCC antes e após inserção da molécula fluorescente. Entretanto, a BTD com o grupo alcino terminal é instável e rapidamente perde o próton ácido do alcino de forma que, tão logo sintetizada, ela já era inserida no meio reacional, inviabilizando a leitura de quaisquer espectros dessa molécula e também seu armazenamento.

5.5.7. Ressonância Magnética Nuclear

A Figura 48 ilustra o espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C dos NCC-BTD.

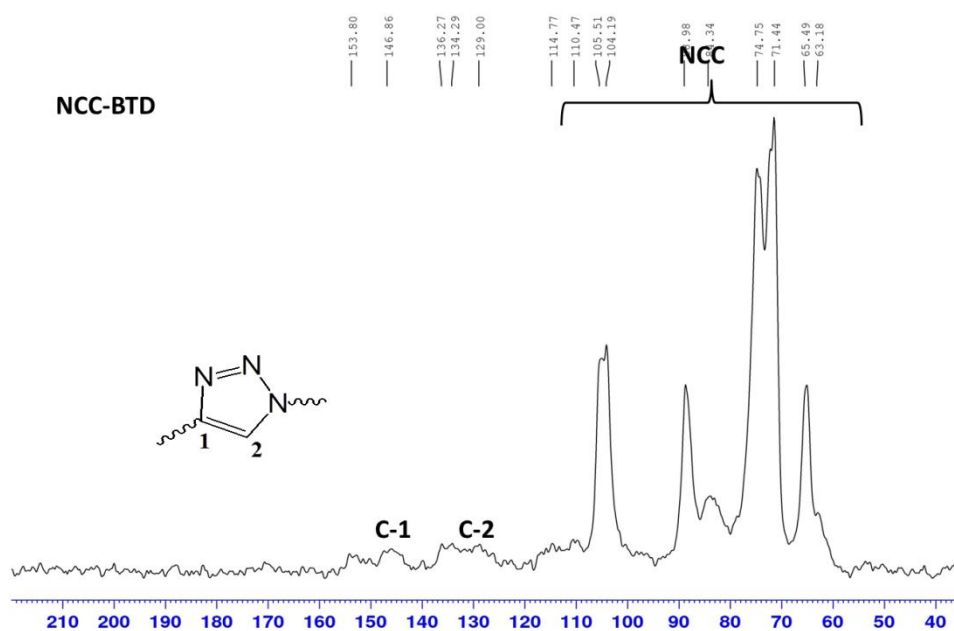


Figura 48. Espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C dos NCC-BTD.

Na Figura anterior, foi possível assinalar os picos em 146,86 e 129 ppm, referentes aos carbonos 1 e 2 do anel triazólico, respectivamente, indicando a formação de ligação entre os grupos azido dos NCC-N₃ e os grupos alcino da BTB.

5.5.8. Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

A Tabela 18 apresenta os dados de XPS relativos à N 1s do precursor NCC-N₃ e do produto *click* NCC-BTD. Conforme discutido anteriormente para os NCC-QA, a razão $\underline{N=N=N}/N=N=N$ para o precursor, NCC-N₃, comum à NCC-QA e NCC-BTD, é de 2:1. Assim, analogamente ao que havia sido discutido para os NCC-QA, um aumento nessa razão, que corresponde à diminuição na porcentagem da espécie $N=N=N$, confirma a formação de uma nova ligação química dos nitrogênios do grupo azido. Para NCC-BTD, a razão $\underline{N=N=N}/N=N=N$ é de aproximadamente 5:1, em consonância com o resultado obtido para os NCC-QA, corroborando com o sucesso da reação *click*.

Aqui também vale o mesmo raciocínio que foi desenvolvido para os NCC-QA. Parte dos grupos azido dos NCC-N₃ pode ter sido reduzido à amina, NH₂, deixando menos grupos azido livres para reagir com as moléculas BTB.

Tabela 18. Dados de XPS de N 1s dos NCC-N₃ e NCC-BTD.

	Espécie	Energia de ligação / eV	Concentração / %
NCC-N ₃	NH ₂	398,9	29,2
	$\underline{N=N=N}$	400,7	49,5
	$N=N=N$	404,1	21,3
NCC-BTD	NH ₂	398,5	32,5
	$\underline{N=N=N}$	400,1	56,7
	$N=N=N$	403,8	10,7

5.6. Caracterização do produto *click* NCC-QN₃

Os NCC-QN₃ foram obtidos pela reação *click* CuAAC entre os NCC-P e a molécula azido-1,4-naftoquinona (QN₃). A Figura 49 ilustra a representação esquemática do produto *click* obtido; os NCC são representados pelo retângulo.

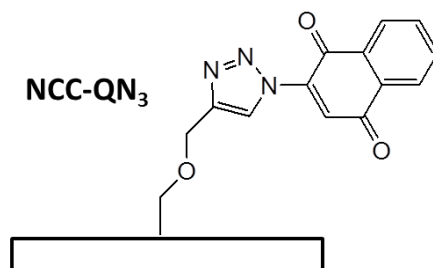


Figura 49. Representação esquemática dos NCC-QN₃.

5.6.1. Espectroscopia no infravermelho

A Figura 50 mostra os espectros no infravermelho de NCC, NCC-P e NCC-QN₃. Num primeiro momento, é possível notar o desaparecimento da banda referente ao grupo alcino (2121 cm^{-1}) dos NCC-P para os NCC-QN₃. Esse evento pode ser observado em maior detalhe na Figura 50.b. Adicionalmente, pela comparação dos espectros da azido-1,4-naftoquinona e dos NCC-QN₃, foi possível assinalar algumas bandas que podem ser identificadas como características da molécula QN₃. Essas bandas são assinaladas em detalhe na Figura 50.b, no espectro da NCC-QN₃, e na Figura 50.c, no espectro da QN₃ (azido-1,4-naftoquinona). Pode-se notar uma diferença clara nos espectros dos NCC-P e NCC-QN₃ na Figura 50.b, que evidencia o surgimento de absorções em 1665 , 1649 , 1593 , 1361 , 1274 e 710 cm^{-1} .

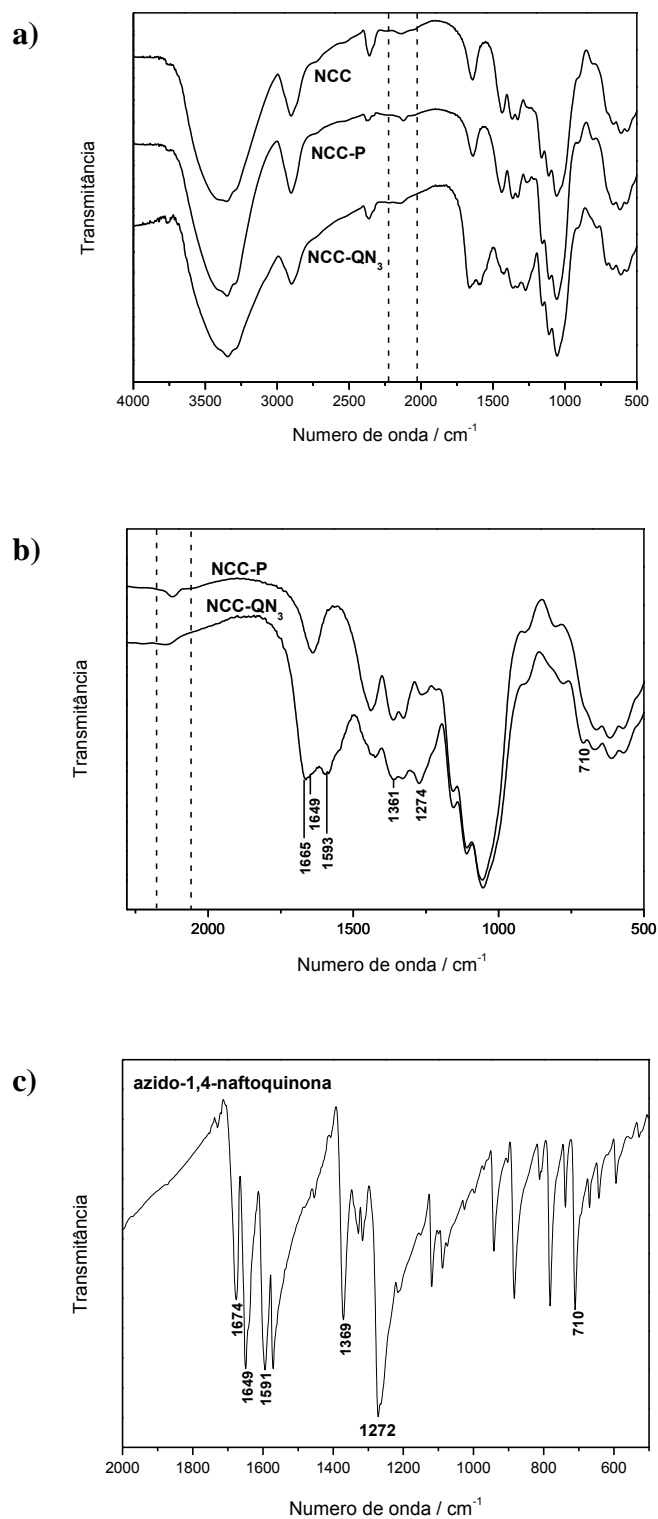


Figura 50. Espectros no infravermelho de (a) NCC, NCC-P e NCC-QN₃, (b) NCC-P e NCC-QN₃ e (c) azido-1,4-naftoquinona.

5.6.2. Difração de raios X

A Tabela 19 apresenta os IC de NCC, NCC-P e NCC-QN₃. Percebe-se que a cristalinidade diminui progressivamente de uma amostra para outra, analogamente aos outros produtos *click*, devido às sucessivas modificações superficiais. Além disso, a cristalinidade dos NCC-QN₃ é semelhante à dos outros produtos *click*, entre 50 e 55%, indicando também que a forma cristalina da amostra foi mantida.

Os picos de difração característicos dos NCC são visíveis também no difratograma dos NCC-QN₃, conforme ilustrado na Figura 51. Entretanto, nota-se um pico em aproximadamente 29° que não é característico dos NCC e tampouco dos NCC-P. Da mesma forma que para os NCC-QA, esse pico pode ser atribuído a uma impureza de Cu, desta vez o óxido de cobre(I), Cu₂O [122, 123]. É importante notar que o sistema catalítico para obtenção dos NCC-QN₃ é o único que parte diretamente de um sal de Cu(I), de forma que o único óxido que poderia ser formado neste caso é o Cu₂O.

Tabela 19. Índices de cristalinidade de NCC, NCC-P e NCC-QN₃.

	NCC	NCC-P	NCC-QN ₃
IC / %	88	60	51

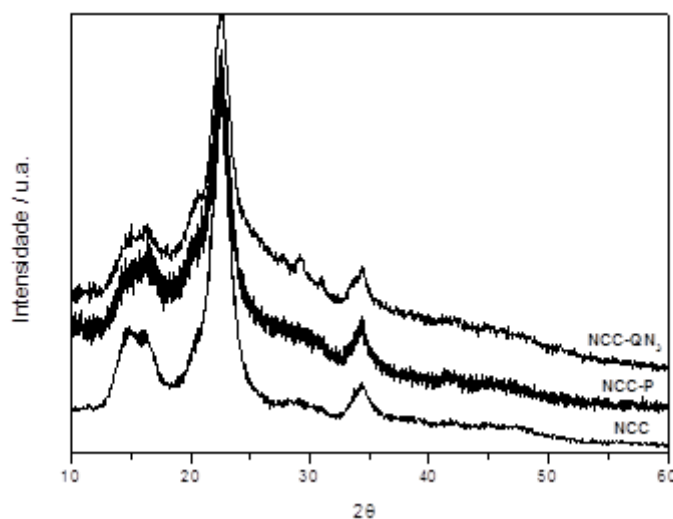


Figura 51. Difratogramas dos NCC, NCC-P e NCC-QN₃.

5.6.3. Análise elementar

A Tabela 20 apresenta os dados de análise elementar dos NCC, NCC-P e NCC-QN₃. Para o cálculo do grau de substituição foi utilizada a equação a seguir:

$$GS = \frac{72 - 162C}{199C - 120} \quad \text{Equação 6}$$

Na Equação 6, 72 representa a massa dos átomos de carbono na UAG, 162 é a massa molar da UAG, C é a porcentagem de carbono no composto NCC-QN₃, 199 é a massa molar da QN₃ e 120 é a massa dos átomos de carbono da QN₃. O GS calculado para essa amostra foi de 20%, o que pode indicar que dois terços dos grupos alcino na superfície dos NCC foram ligados às moléculas QN₃.

Tabela 20. Dados de análise elementar para NCC, NCC-P e NCC-QN₃.

	% C	% H	% N	% O *
NCC	39,4 (44,4)	5,90 (6,65)	0 (0)	54,6 (48,9)
NCC-P	42,7 (48,1)	5,62 (6,33)	0 (0)	51,7 (45,6)
NCC-QN ₃	42,2 (47,6)	4,09 (4,60)	3,10 (3,49)	50,6 (44,3)

*Calculado pela diferença 100% - (% C + % H + % N)

5.6.4. Análise termogravimétrica

A Tabela 21 apresenta os principais eventos térmicos de NCC, NCC-P e NCC-QN₃. Nota-se também para esse produto *click* um aumento da estabilidade térmica em relação aos NCC e ao precursor, NCC-P, pelo aumento na T_{onset} para 289 °C. Em analogia aos outros produtos *click* anteriores, a maior estabilidade térmica dos NCC-QN₃ pode ser associada a variações nos mecanismos de degradação do produto *click* devido à inserção de novas moléculas na superfície dos NCC-P.

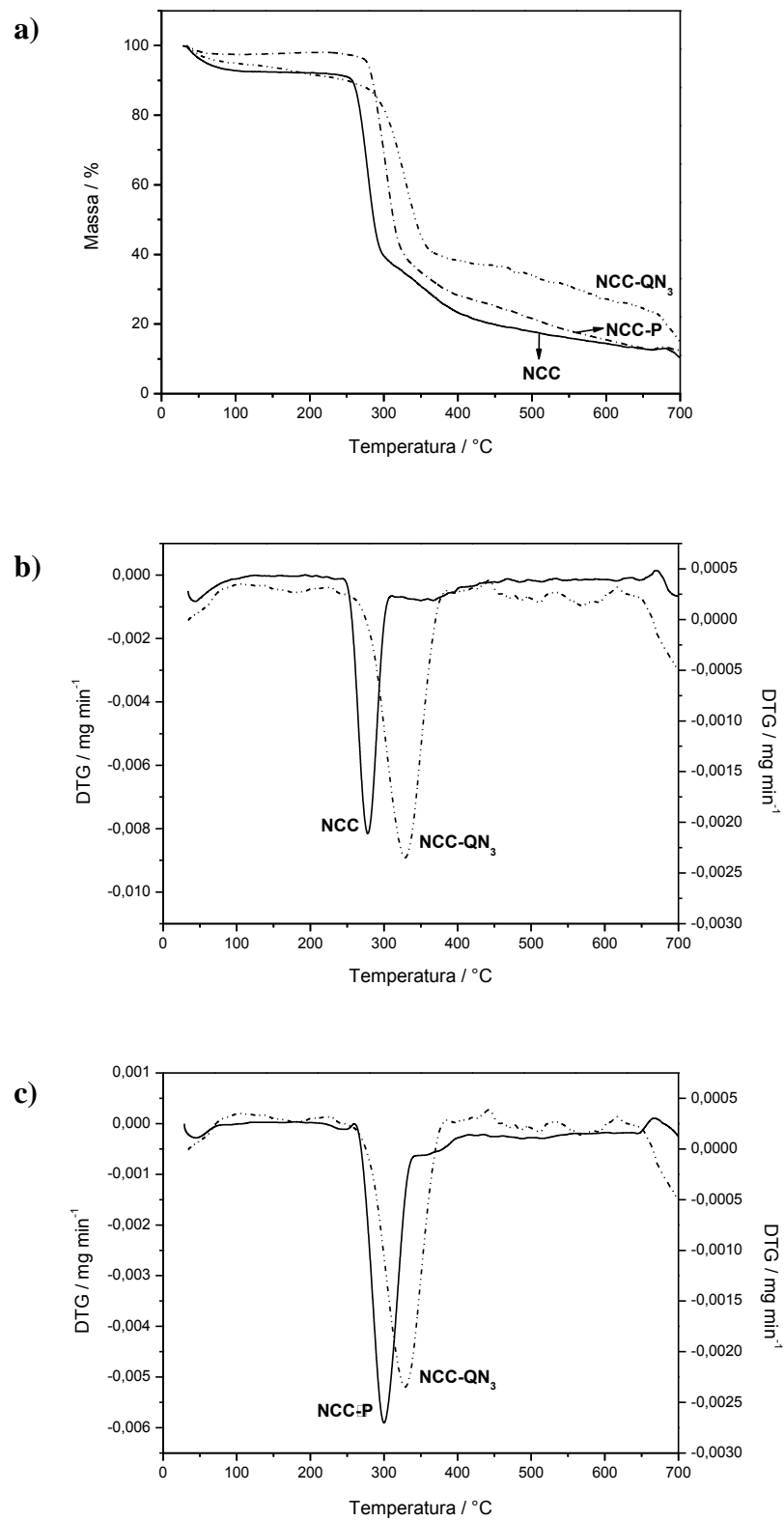


Figura 52. Curvas TG dos NCC, NCC-P e NCC-QN₃ **(a)** e curvas DTG dos NCC e NCC-QN₃ **(b)** e NCC-P e NCC-QN₃ **(c)**.

Tabela 21. Dados dos principais eventos térmicos dos NCC, NCC-P e NCC-QN₃.

	T _{onset} / °C	T _{máx} / °C	Resíduo a 500 °C / %
NCC	245	271	17,8
NCC-P	277	300	21,5
NCC-QN ₃	289	328	34

Foi observado também um aumento na porcentagem de resíduos a 500 °C, que é maior que a porcentagem encontrada para os NCC-QA (23,5%). Considerando que as moléculas QN₃ foram incorporadas em maior extensão do que as moléculas QA à superfície dos NCC-P, devido ao maior grau de substituição dos grupos alcino no precursor NCC-P (GS = 0,3) em comparação aos grupos azido no precursor NCC-N₃ (GS = 0,13), esse resultado está condizente com os diferentes graus de modificação superficial por que passaram esses dois precursores até chegarem aos produtos *click*. A perda de massa observada acima de 600 °C para os NCC-QN₃ (Figura 52.a), bem como a alta massa residual, pode ter relação com a formação de óxidos de cobre na amostra, da mesma forma que foi verificado para os NCC-QA. As Figuras 52.b e 52.c mostram, ainda, que na região de ~400 a 700 °C há uma série de eventos térmicos associados aos NCC-QN₃ que podem ser relacionados à funcionalização superficial do precursor NCC-P com as moléculas QN₃.

5.6.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A Figura 53 mostra as imagens de microscopia obtidas para os NCC-QN₃. É possível observar que os NCC mantiveram sua morfologia em forma de bastão intactos após as reações químicas.

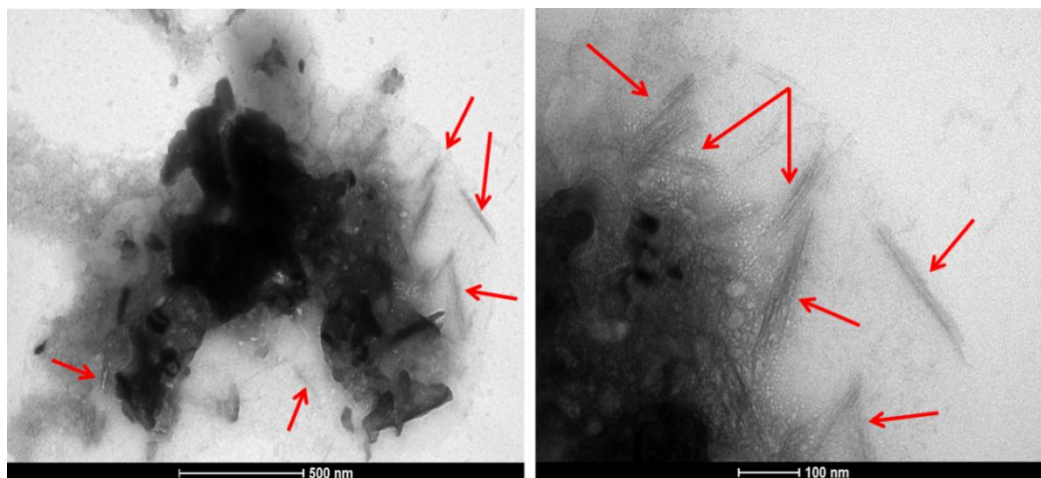


Figura 53. Imagens de MET para os NCC-QN₃. A barra de escala está indicada na figura.

5.6.6. Ressonância Magnética Nuclear

A Figura 54 ilustra o espectro de RMN CP/MAS de ¹³C dos NCC-QN₃.

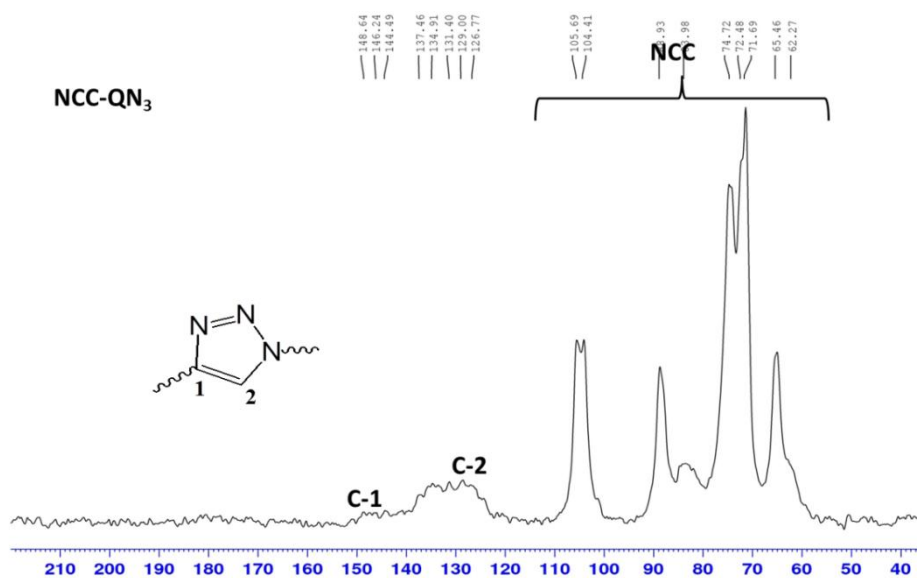


Figura 54. Espectro de RMN CP/MAS de ¹³C dos NCC-QN₃.

Nesse espectro também foi possível identificar os picos derivados dos carbonos triazólicos. Pode-se determinar que o pico referente ao C2 se encontra na região de 126,77 e 129 ppm, e o pico referente ao C1 na região de 144,49 a 148,64 ppm. Pode-se, assim, sugerir que foi bem

sucedida a reação *click* entre os grupos azido da molécula QN₃ e os grupos alcino dos NCC-P, fornecendo o produto *click* NCC-QN₃.

5.6.7. Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

A Tabela 22 apresenta os dados de XPS relativos à N 1s dos NCC-N₃. Diferentemente dos produtos *click* derivados dos NCC-N₃, os NCC-QN₃ foram derivados dos NCC-P, os quais possuem os grupos alcino superficialmente ligados. Assim, uma forma de se avaliar a existência de ligação química entre o precursor NCC-P e a molécula QN₃ é a presença de nitrogênio quimicamente ligado. O espectro de XPS (Figura 8 do Anexo) dos NCC-P não acusa a presença de nitrogênio, como era esperado. Já o espectro dos NCC-QN₃ indica a presença de nitrogênio (Figura 11 do Anexo) e a Tabela 22 discrimina a contribuição percentual de cada espécie.

Conforme pode ser observado na Tabela 22, 54% dos átomos de nitrogênio foram atribuídos à espécie N=N e 21% a N-C, o que está condizente com a formação do anel 1,2,3-triazólico que possui ambas espécies quimicamente ligadas [121]. O restante das espécies de nitrogênio (25%) pode ser devida à presença de amina nos NCC-QN₃ advinda da redução dos grupos azido de moléculas QN₃ que porventura ficaram adsorvidas na superfície dos NCC-P e não reagiram na *click*. Esses resultados estão em concordância com os resultados de RMN CP/MAS de ¹³C, os que confirmaram a presença do anel 1,2,3-triazólico e o sucesso da reação *click*.

Tabela 22. Dados de XPS de N 1s dos NCC-QN₃.

	Espécie	Energia de ligação / eV	Concentração / %
NCC-QN ₃	NH ₂	398,8	25
	N=N	400,6	54
	N-C	402,4	21

5.7. Caracterização do produto *click* NCC-Fen

Os NCC-Fen foram obtidos pela reação *click* CuAAC entre os NCC-P e a molécula QN₃. A Figura 55 ilustra a representação esquemática do produto *click*; os NCC são representados pelo retângulo.

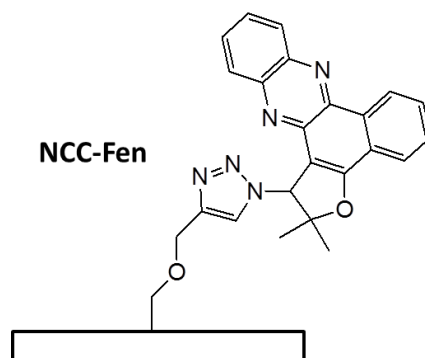


Figura 55. Representação esquemática dos NCC-Fen.

5.7.1. Espectroscopia no infravermelho

A Figura 56 ilustra os espectros no infravermelho de NCC, NCC-P e NCC-Fen. Uma inspeção mais detalhada do espectro ilustrado na Figura 56.b indica que não foi possível notar no espectro dos NCC-Fen nenhuma banda substancialmente diferente daquelas já presentes no espectro dos NCC-P e que pudesse ser atribuída aos NCC-Fen. Não se pode, contudo, descartar a possibilidade de formação de ligação química entre os grupos envolvidos. É necessário, portanto, que as outras caracterizações sejam avaliadas.

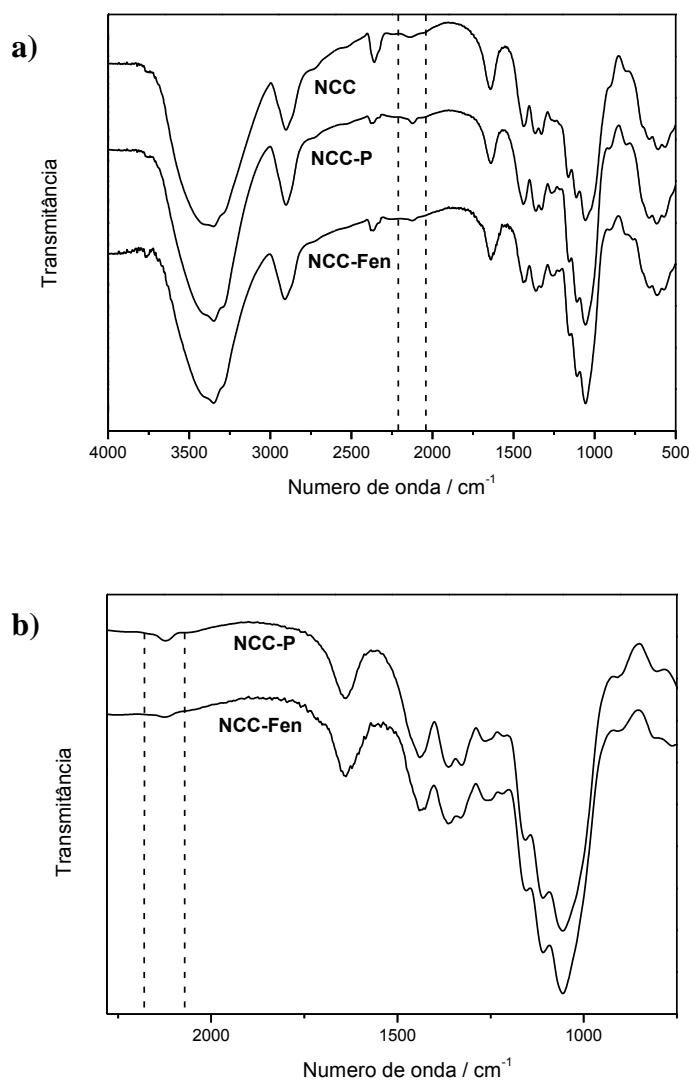


Figura 56. Espectros FT-IR de NCC, NCC-P e NCC-Fen (a) e NCC-P e NCC-Fen (b).

5.7.2. Difração de raios X

A Tabela 23 apresenta os índices de cristalinidade dos NCC, NCC-P e NCC-Fen. O índice de cristalinidade se manteve condizente com o de todos os outros produtos *click*, dentro da faixa de 50-56%.

No difratograma da Figura 57 pode-se notar que todos os picos característicos de difração dos NCC estão presentes no difratograma dos NCC-Fen. Adicionalmente, da mesma forma que para a amostra NCC-BTD, todos os picos no difratograma dos NCC-Fen coincidem com os dos NCC, ou seja, não há indício de impurezas. Isso parece sugerir que somente as

quinonas QA e QN₃ induzem a formação de óxidos de cobre, diferentemente da moléculas BTD e Fenazina.

Tabela 23. Índices de cristalinidade dos NCC, NCC-P e NCC-Fen.

	NCC	NCC-P	NCC-Fen
IC / %	88	60	55

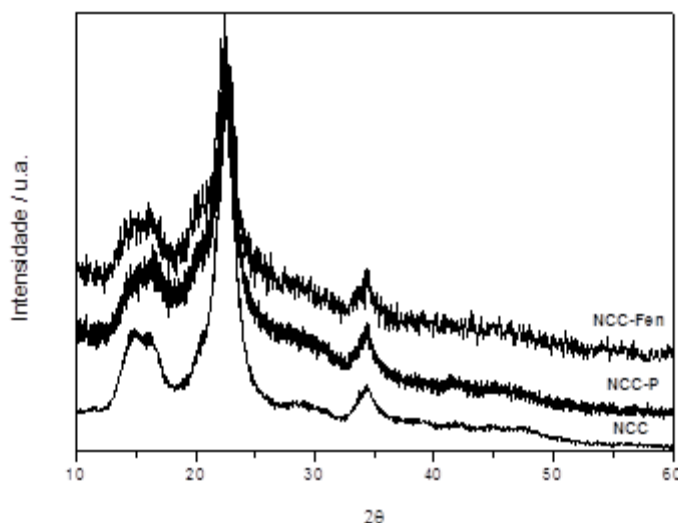


Figura 57. Difratogramas dos NCC, NCC-P e NCC-Fen.

5.7.3. Análise elementar

A Tabela 24 apresenta os dados de análise elementar dos NCC, NCC-P e NCC-Fen. Pode-se notar que a alteração na porcentagem de carbono dos NCC-P para os NCC-Fen foi relativamente pequena; mas, nota-se um aumento na porcentagem de nitrogênio, conforme esperado. A equação utilizada para o cálculo de GS é apresentada a seguir:

$$GS = \frac{72 - 162C}{341C - 240} \quad \text{Equação 7}$$

Na Equação 7, 72 representa a massa dos átomos de carbono da UAG, 162 é a massa molar da UAG, C é a porcentagem de carbono no composto NCC-Fen, 341 é a massa molar da Fenazina e 240 é a massa dos átomos de carbono da Fenazina.

O GS calculado para essa amostra foi de 10%, o que parece indicar que somente um terço dos grupos alcino superficiais dos NCC-P se ligaram às moléculas de Fenazina. O baixo rendimento dessa reação *click* poderia explicar o fato de que não foram observadas bandas de absorção diferentes daquelas que são características dos NCC e NCC-P no espectro infravermelho dos NCC-Fen. Nesse caso, pode-se concluir que a reação *click* em questão foi a de menor rendimento em comparação às demais estudadas, uma vez que o rendimento mínimo obtido até então para as outras reações *click* havia sido de aproximadamente 66% (para NCC-QN₃, em que dois terços dos grupos alcino na superfície dos NCC foram ligados às moléculas QN₃).

Tabela 24. Dados de análise elementar para os NCC, NCC-P e NCC-Fen.

	% C	% H	% N	% O *
NCC	39,4 (44,4)	5,90 (6,65)	0 (0)	54,6 (48,9)
NCC-P	42,7 (48,1)	5,62 (6,33)	0 (0)	51,7 (45,6)
NCC-Fen	43,5 (49,0)	5,40 (6,08)	1,67 (1,88)	49,5 (43,1)

*Calculado pela diferença 100% - (% C + % H + % N)

5.7.4. Análise termogravimétrica

Na Figura 58 são apresentadas as curvas TG dos NCC, NCC-P e NCC-Fen, cujos dados estão resumidos na Tabela 25.

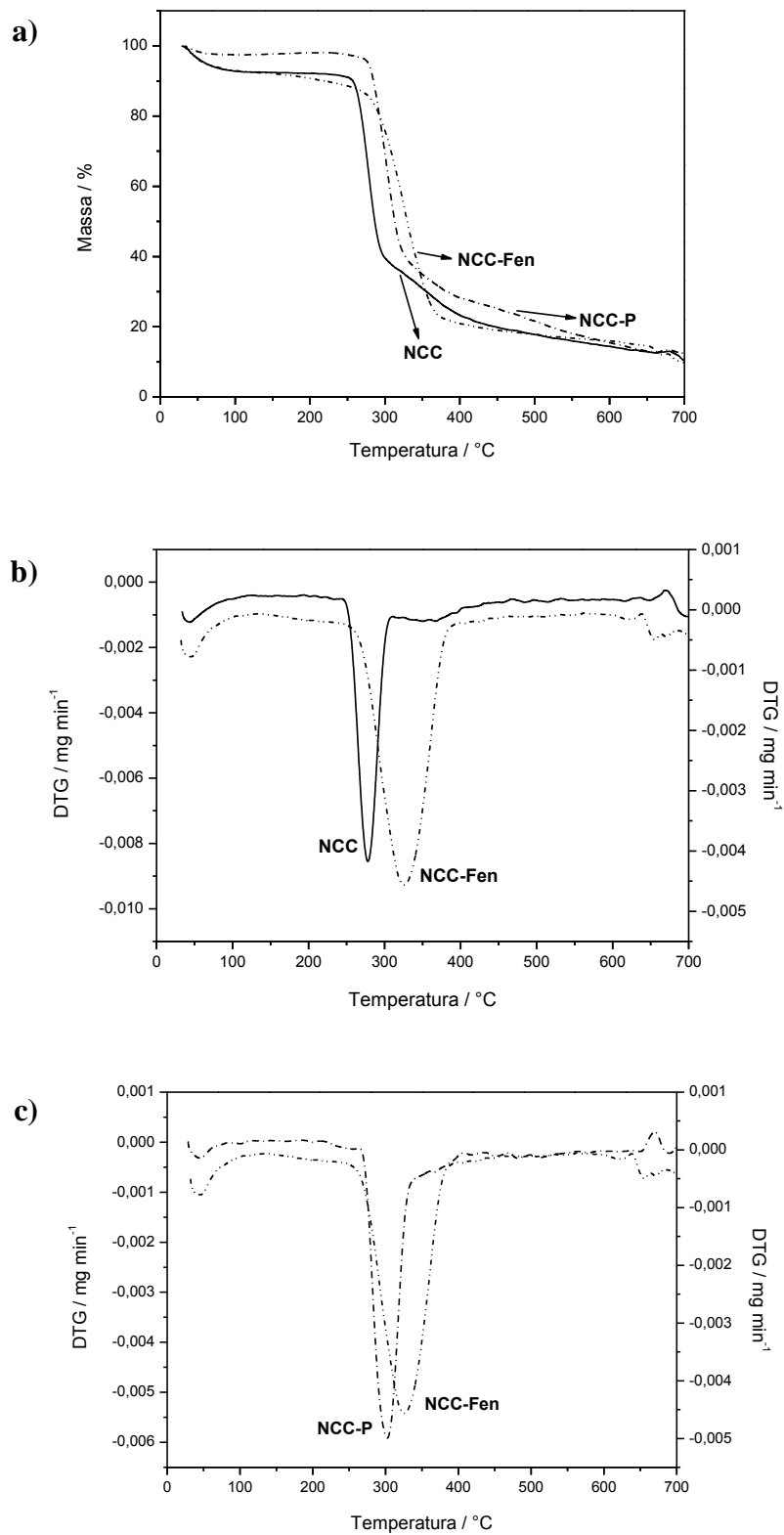


Figura 58. Curvas TG de NCC, NCC-P e NCC-Fen (a) e curvas DTG de NCC e NCC-Fen (b) e entre NCC-P e NCC-Fen (c).

Tabela 25. Dados dos principais eventos térmicos dos NCC, NCC-P e NCC-Fen.

	$T_{\text{onset}} / ^\circ\text{C}$	$T_{\text{máx}} / ^\circ\text{C}$	Resíduo a 500 $^\circ\text{C} / \%$
NCC	245	271	17,8
NCC-P	277	300	21,5
NCC-Fen	278	325	17,8

É notório o fato de que o comportamento térmico dos NCC-Fen em relação ao NCC-P não se alterou de forma tão significativa como nas demais reações *click* descritas anteriormente. Foi observado um aumento na $T_{\text{máx}}$ para o produto NCC-Fen em relação ao intermediário NCC-P. Observou-se também que o resíduo a 500 $^\circ\text{C}$ dos NCC-Fen é menor do que o dos NCC-P e se iguala ao dos NCC. A diminuição da porcentagem de massa residual em relação aos NCC-P pode estar relacionada à formação de mais espécies gasosas durante a decomposição térmica da amostra, conforme foi discutido para NCC- N_3 e NCC-BTD, uma vez que a molécula de Fenazina também apresenta átomos de nitrogênio em sua estrutura além dos que participam da formação do anel 1,2,3-triazólico.

Pela inspeção das Figuras 58.a e 58.b pode-se notar que os NCC-Fen não apresentam o mesmo perfil de degradação em dois estágios característico dos NCC, pois a perda de massa que tem início em 278 $^\circ\text{C}$ segue contínua para os NCC-Fen (Figura 58.a) e forma um único evento térmico na curva DTG (Figura 58.b). O mesmo comportamento é observado entre NCC-P e NCC-Fen (Figura 58.c).

5.7.5. Espectroscopia UV-Vis e espectroscopia de fluorescência

A Figura 59 ilustra a suspensão de NCC-Fen em acetona em uma concentração aproximada de 0,01% m/v sob luz UV.



Figura 59. Suspensão de NCC-Fen em acetona.

As Figuras 60.a e 60.b mostram os espectros UV-Vis e de fluorescência para as amostras NCC, NCC-Fen e Fenazina-*nor*- β - N_3 . É digno de nota que as amostras de NCC-Fen foram exaustivamente lavadas após a reação. Diferentemente da BTB, a molécula de Fenazina é estável, o que torna possível a preparação de soluções e leitura de espectros. Assim, foram feitos os espectros UV-Vis e de fluorescência de uma solução $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fenazina para comparação com os espectros de NCC e NCC-Fen. É evidente que, antes da reação *click*, os NCC não apresentam nenhuma banda de absorção no espectro de UV-Vis, tampouco apresentam uma banda de emissão no comprimento de onda característico da Fenazina. A solução de Fenazina apresentou dois máximos característicos no espectro UV-Vis: $\lambda_{\text{ex}} = 407$ e 428 nm. Esta solução foi excitada em ambos λ_{ex} no espectrofluorímetro, e descobriu-se que o comprimento de onda de emissão, λ_{em} , era o mesmo, 470 nm, independente do λ_{ex} utilizado. Optou-se por excitar as soluções de NCC e NCC-Fen em 428 nm e, conforme as figuras, percebe-se que os NCC não absorvem nem emitem radiação nos comprimentos de onda característicos da Fenazina, ao passo que os NCC-Fen possuem o mesmo perfil de absorção e emissão que a Fenazina.

Analogamente à solução de NCC-BTB, percebe-se que houve, de fato, mudança no perfil de absorção e emissão dos NCC-Fen em relação aos NCC, mas não é possível determinar se a Fenazina foi ligada covalentemente ou somente adsorvida na superfície dos nanocristais somente pelas espectroscopias UV-Vis e de fluorescência.

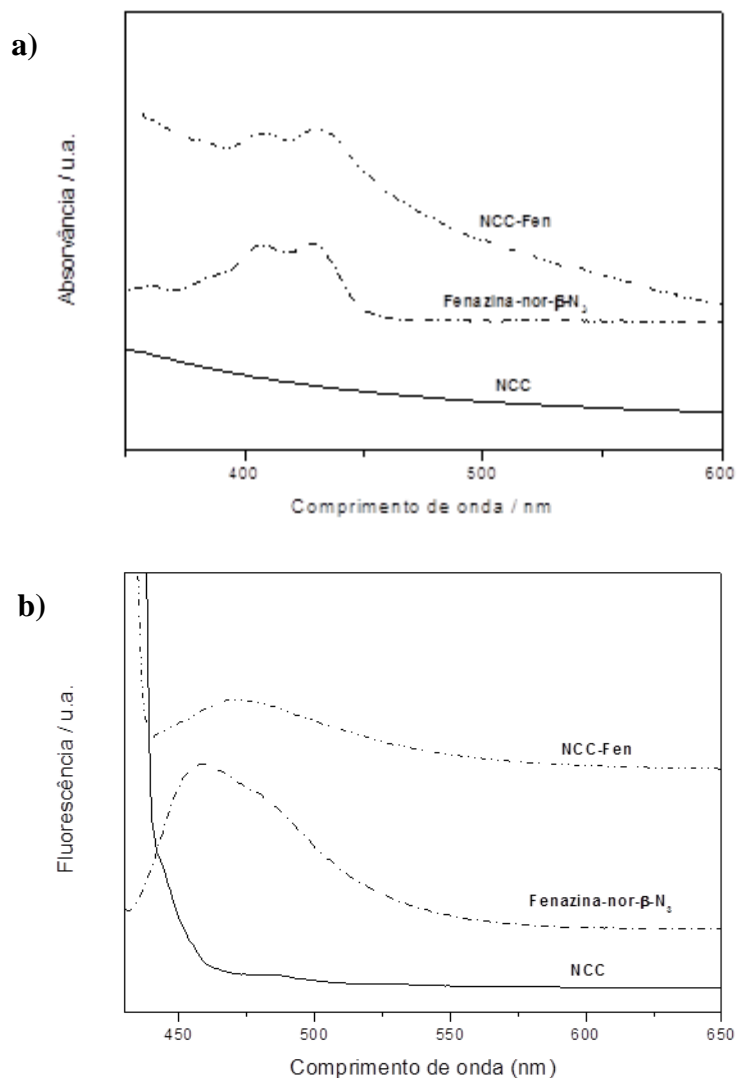


Figura 60 a) Espectros UV-Vis e b) de fluorescência de NCC, Fenazina-*nor*-β-N₃ e NCC-Fen.

5.7.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A Figura 61 mostra as imagens de microscopia obtidas para os NCC-Fen. Conforme discutido para os outros produtos *click*, eles também mantiveram a sua morfologia, em concordância com o IC calculado com auxílio de DRX, mesmo após 2 reações de modificação superficial.

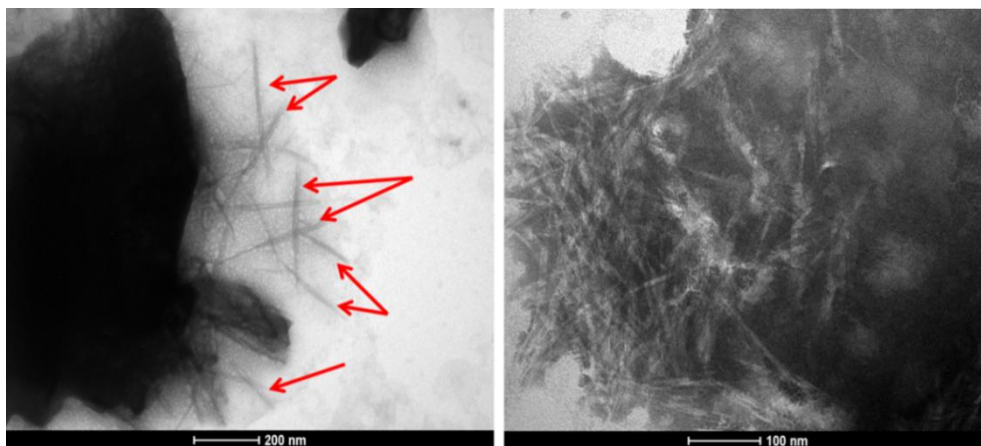


Figura 61. Micrografias de MET dos NCC-Fen. A barra de escala está indicada na figura.

5.7.7. Ressonância Magnética Nuclear

A Figura 62 ilustra o espectro RMN CP/MAS de ^{13}C dos NCC-Fen.

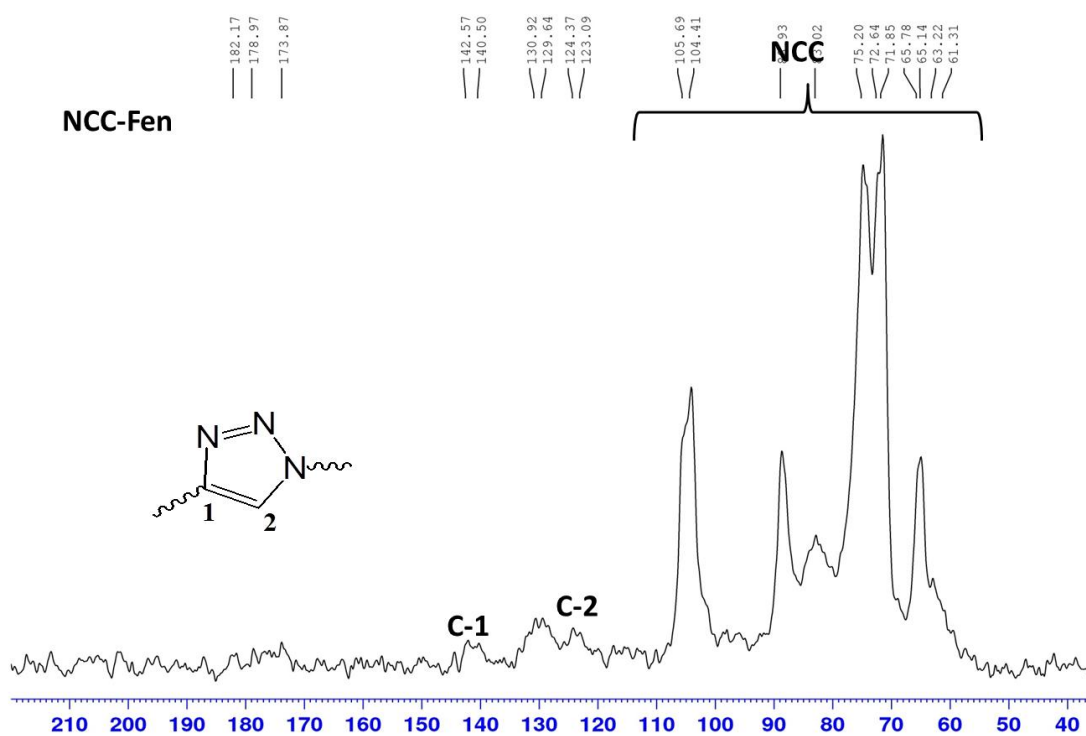


Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS dos NCC-Fen.

Foi possível identificar os picos referentes aos carbonos do anel triazólico na região de ~123 a 124,37 ppm, referentes ao C2, e 140,5 e 142,57 ppm referentes ao C1. Desse modo,

apesar de o espectro infravermelho dos NCC-Fen não acusar absorções que poderiam ser designadas à molécula de Fenazina, o espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C fornece evidências para indicar o sucesso da reação *click* entre os grupos alcino dos NCC-P e os grupos azido da molécula de Fenazina, fornecendo NCC-Fen.

5.7.8. Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

A Tabela 26 apresenta os dados de XPS para os NCC-Fen. Da mesma forma que para os NCC-QN₃, esse produto *click* foi derivado dos NCC-P que originalmente não continham nitrogênio. Assim, a presença de nitrogênio quimicamente ligado, conforme ilustra o espectro de XPS desse produto *click* (Figura 12 do Anexo), já atesta o sucesso da incorporação de moléculas de Fenazina à superfície dos nanocristais. Analogamente ao que foi discutido para o produto *click* anterior, os NCC-Fen apresentam 43% de átomos de nitrogênio que podem ser atribuídos à ligação N=N e 32% que podem ser atribuídos à ligação N-C. A presença dessas espécies está em consonância com a formação do anel 1,2,3-triazólico [121], justamente com os resultados obtidos pela técnica de RMN CP/MAS de ^{13}C .

Para essa amostra também se nota a presença de espécies de nitrogênio que podem ser relacionadas à ligação do tipo amina (25%), fato esse que pode também ser explicado pela presença de moléculas de Fenazina adsorvidas na superfície dos NCC-Fen que tiveram seus grupos azido reduzidos à amina e que, por isso, não reagiram na *click*.

Tabela 26. Dados de XPS de N 1s para NCC-Fen.

	Espécie	Energia de ligação / eV	Concentração / %
NCC-Fen	NH ₂	398,1	25
	N=N	400	43
	N-C	402	32

Capítulo 6

Conclusões

6. Conclusões

São poucos os trabalhos na literatura que relatam a funcionalização de celulose utilizando reações *click*, e se encontram em número ainda menos aqueles que relatam a funcionalização dos NCC via *click*. Sendo assim, esse trabalho possibilitou um estudo mais aprofundado na área de desenvolvimento de novos nanomateriais obtidos a partir de polissacarídeos de ocorrência natural, neste caso, a celulose. A funcionalização dos NCC via reação *click* com as moléculas utilizadas neste trabalho é inédita, pois não há relatos na literatura da funcionalização de NCC com as 1,4-naftoquinonas, a 2,1,3-BTD aminopiridina e a Fenazina-*nor*- β -N₃.

Foram obtidos nanocristais de celulose funcionais pelo acoplamento superficial de moléculas com atividade antitumoral e moléculas fluorescentes pela reação *click* CuAAC. Os nanocristais permaneceram praticamente intactos após as sucessivas modificações superficiais, comprovando que é possível obter biomateriais funcionais a partir da nanocelulose e com amplas possibilidades de aplicação. Dentre essas, podem-se citar aplicações em diagnóstico por imagem e encapsulamento de fármacos.

Foram sintetizados dois precursores versáteis para realizar reações *click* a partir dos NCC: NCC-N₃ e NCC-P. A caracterização desses precursores mostrou o sucesso da incorporação de grupos superficiais nos NCC que permitiram a ligação covalente de uma série de moléculas por meio da formação do anel 1,2,3-triazólico, demonstrando a versatilidade dos materiais que podem ser obtidos a partir dos NCC.

O sucesso da formação do anel 1,2,3-triazólico foi comprovado principalmente pelos resultados de RMN CP/MAS de ¹³C aliados aos de XPS. Os dados de XPS dos NCC-N₃ sugeriram que parte dos grupos azido foram reduzidos à amina, levando à diminuição da quantidade de grupos azido disponíveis para formação do anel triazólico que fornece os produtos NCC-QA e NCC-BTD.

Todos os precursores e todos os produtos *click* apresentaram maior estabilidade térmica em relação aos NCC não modificados. Pode-se atribuir esse comportamento a uma variação no mecanismo de degradação térmica causada pela incorporação de novos grupos à superfície dos nanocristais.

A funcionalização superficial dos NCC com formação de ligação covalente (formação do anel 1,2,3-triazólico) via *click* CuAAC se mostrou efetiva para todos os produtos *click* testados: NCC-QA, NCC-BTD, NCC-QN₃ e NCC-Fen. As condições heterogêneas de reação são o principal empecilho para funcionalização com maiores rendimentos dos NCC. Assim, novas rotas podem ser divisadas para promover sua funcionalização em um meio mais homogêneo no intuito de se atingir maior extensão de substituição dos grupos hidroxila dos NCC por grupos de interesse.

Como perspectivas deste trabalho, as rotas para obtenção dos nanomateriais funcionalizados produzidos a partir da celulose podem ser estudadas em maior profundidade no intuito de se obter NCC com maiores graus de substituição. Adicionalmente, os produtos *click* NCC-BTD e NCC-Fen podem ser testados em marcação celular. Os NCC-QA e NCC-QN₃ podem ser aplicados na fabricação de materiais com atividade biológica de longa duração, como tecidos ou revestimentos biomiméticos. Para esses materiais, a lixiviação ou perda das moléculas bioativas para o meio é indesejável, por isso é interessante que estas sejam covalentemente ligadas à superfície do material. Para tanto, novas sínteses devem ser realizadas na tentativa de assegurar a formação de ligação covalente entre os NCC e a molécula QA.

Capítulo 7

Referências bibliográficas

7. Referências bibliográficas

- [1] Y. Habibi, L. A. Lucia, and O. J. Rojas, "Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications," *Chem. Rev.*, vol. 110, pp. 3479–3500, 2010.
- [2] N. Lin, J. Huang, and A. Dufresne, "Preparation, properties and applications of polysaccharide nanocrystals in advanced functional nanomaterials: a review," *Nanoscale*, vol. 4, p. 3274, 2012.
- [3] S. J. Eichhorn, A. Dufresne, M. Aranguren, N. E. Marcovich, J. R. Capadona, S. J. Rowan, C. Weder, W. Thielemans, M. Roman, S. Renneckar, W. Gindl, S. Veigel, J. Keckes, H. Yano, K. Abe, M. Nogi, A. N. Nakagaito, A. Mangalam, J. Simonsen, A. S. Benight, A. Bismarck, L. A. Berglund, and T. Peijs, "Review: Current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites," *J. Mater. Sci.*, vol. 45, no. 1, pp. 1–33, 2010.
- [4] E. Lam, K. B. Male, J. H. Chong, A. C. W. Leung, and J. H. T. Luong, "Applications of functionalized and nanoparticle-modified nanocrystalline cellulose," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 5, pp. 283–290, 2012.
- [5] J. K. Jackson, K. Letchford, B. Z. Wasserman, L. Ye, W. Y. Hamad, and H. M. Burt, "The use of nanocrystalline cellulose for the binding and controlled release of drugs," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, pp. 321–330, 2011.
- [6] A. Dukić-Ott, M. Thommes, J. P. Remon, P. Kleinebudde, and C. Vervaet, "Production of pellets via extrusion-spheronisation without the incorporation of microcrystalline cellulose: A critical review," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 71, no. 1, pp. 38–46, 2009.
- [7] R. J. Moon, A. Martini, J. Nairn, J. Simonsen, and J. Youngblood, *Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites*, vol. 40. 2011.
- [8] M. A. S. A. Samir, F. Alloin, and A. Dufresne, "Review of Recent Research into Cellulosic Whisker, Their Properties and Their Application in Nanocomposites Field," *Biomacromolecules*, vol. 6, pp. 612–626, 2005.
- [9] M. A. Hubbe, O. J. Rojas, L. A. Lucia, and M. Sain, "Cellulosic Nanocomposites: a Review," *BioResources*, vol. 3, no. 3, pp. 929–980, 2008.
- [10] J. Panyam and V. Labhasetwar, "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, pp. 329–347, 2003.
- [11] E. Feese, H. Sadeghifar, H. S. . Gracz, D. S. . Argyropoulos, and R. A. Ghiladi, "Photobactericidal Porphyrin-Cellulose Nanocrystals: Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Properties," *Biomacromolecules*, no. 12, pp. 3528–3539, 2011.
- [12] K. a. Mahmoud, J. a. Mena, K. B. Male, S. Hrapovic, A. Kamen, and J. H. T. Luong, "Effect of surface charge on the cellular uptake and cytotoxicity of fluorescent labeled cellulose nanocrystals," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 2, no. 10, pp. 2924–2932, 2010.
- [13] S. Dong and M. Roman, "Fluorescently labeled cellulose nanocrystals for bioimaging applications," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, pp. 13810–13811, 2007.
- [14] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 40, pp. 2004–2021, 2001.
- [15] Z. A. Popper, "Evolution and diversity of green plant cell walls," *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 11, pp. 286–292, 2008.

- [16] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5^a ed. Nova York: W. H. Freeman and Company, 2008.
- [17] S. Barazzouk and C. Daneault, "Amino Acid and Peptide Immobilization on Oxidized Nanocellulose: Spectroscopic Characterization," *Nanomaterials*, vol. 2, pp. 187–205, 2012.
- [18] S. J. Eichhorn, "Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications," *Soft Matter*, vol. 7, no. 2, pp. 303–315, 2011.
- [19] D. N.-S. Hon, "Functional Natural Polymers: A New Dimensional Creativity in Lignocellulosic Chemistry," in *Chemical Modification of Lignocellulosic Materials*, Nova York: CRC Press, 1996, pp. 1–10.
- [20] D. J. Cosgrove, "Growth of the plant cell wall.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 11, pp. 850–861, 2005.
- [21] S. Dumitriu, "Conformations, Structures and Morphologies of Celluloses," in *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, 1^a ed., Nova York: CRC Press, 1998, pp. 41–68.
- [22] K. Hieta, S. Kuga, and M. Usuda, "Electron staining of reducing ends evidences a parallel-chain structure in Valonia cellulose," *Biopolymers*, pp. 1807–1810, 1984.
- [23] A. Maurer and D. Fengel, "Parallel orientation of the molecular chains in cellulose I and cellulose II deriving from higher plants," *Holz als Roh- und Werkst.*, vol. 50, p. 493, 1992.
- [24] H. Chanzy and B. Henrissat, "Unidirectional degradation of Valonia cellulose microcrystals subjected to cellulose action," *FEBS Lett.*, vol. 184, pp. 285–288, 1985.
- [25] P. Zugenmaier, *Crystalline Cellulose and Derivatives - Characterization and Structures*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.
- [26] D. Klemm, B. Heublein, H. P. Fink, and A. Bohn, "Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 44, pp. 3358–3393, 2005.
- [27] E. J. Vandamme, S. De Baets, and A. Steinbüchel, "Cellulose," in *Biopolymers, Vol. 6 Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes*, Weinheim: Wiley-VCH, 2002, pp. 275–312.
- [28] S. M. L. Rosa, N. Rehman, M. I. G. De Miranda, S. M. B. Nachtigall, and C. I. D. Bica, "Chlorine-free extraction of cellulose from rice husk and whisker isolation," *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 2, pp. 1131–1138, 2012.
- [29] A. Kumar, Y. S. Negi, V. Choudhary, and N. K. Bhardwaj, "Characterization of Cellulose Nanocrystals Produced by Acid-Hydrolysis from Sugarcane Bagasse as Agro-Waste," *J. Mater. Phys. Chem.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–8, 2014.
- [30] S. Mueller, C. Weder, and E. J. Foster, "Isolation of cellulose nanocrystals from pseudostems of banana plants," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 2, p. 907, 2014.
- [31] F. Fahma, S. Iwamoto, N. Hori, T. Iwata, and A. Takemura, "Effect of pre-acid-hydrolysis treatment on morphology and properties of cellulose nanowhiskers from coconut husk," *Cellulose*, vol. 18, no. 2, pp. 443–450, 2011.
- [32] D. Chen, D. Lawton, M. R. Thompson, and Q. Liu, "Biocomposites reinforced with cellulose nanocrystals derived from potato peel waste," *Carbohydr. Polym.*, vol. 90, no. 1, pp. 709–716, 2012.
- [33] H. Lu, Y. Gui, L. Zheng, and X. Liu, "Morphological, crystalline, thermal and physicochemical properties of cellulose nanocrystals obtained from sweet potato residue," *Food Res. Int.*, vol. 50, no. 1, pp. 121–128, 2013.
- [34] S. Iwamoto, W. Kai, A. Isogai, and T. Iwata, "Elastic modulus of single cellulose microfibrils from tunicate measured by atomic force microscopy," *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 2571–2576, 2009.

- [35] H. Wang, C. Qian, and M. Roman, "Effects of pH and salt concentration on the formation and properties of chitosan-cellulose nanocrystal polyelectrolyte-macroion complexes," *Biomacromolecules*, vol. 12, pp. 3708–3714, 2011.
- [36] R. Dash and A. J. Ragauskas, "Synthesis of a novel cellulose nanowhisker-based drug delivery system," *RSC Adv.*, vol. 2, p. 3403, 2012.
- [37] B. S. Lalia, Y. A. Samad, and R. Hashaiekeh, "Nanocrystalline cellulose-reinforced composite mats for lithium-ion batteries: Electrochemical and thermomechanical performance," *J. Solid State Electrochem.*, vol. 17, pp. 575–581, 2013.
- [38] L. Johnson, W. Thielemans, and D. a. Walsh, "Synthesis of carbon-supported Pt nanoparticle electrocatalysts using nanocrystalline cellulose as reducing agent," *Green Chem.*, vol. 13, p. 1686, 2011.
- [39] L. J. Nielsen, S. Eyley, W. Thielemans, and J. W. Aylott, "Dual fluorescent labelling of cellulose nanocrystals for pH sensing," *Chem. Commun. (Camb)*, vol. 46, no. 47, pp. 8929–8931, 2010.
- [40] M. Roman and W. T. Winter, "Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose," *Biomacromolecules*, vol. 5, pp. 1671–1677, 2004.
- [41] B. S. L. Brito, F. V. Pereira, J. L. Putaux, and B. Jean, "Preparation, morphology and structure of cellulose nanocrystals from bamboo fibers," *Cellulose*, vol. 19, no. 5, pp. 1527–1536, 2012.
- [42] H. Sadeghifar, I. Filpponen, S. P. Clarke, D. F. Brougham, and D. S. Argyropoulos, "Production of cellulose nanocrystals using hydrobromic acid and click reactions on their surface," *J. Mater. Sci.*, vol. 46, pp. 7344–7355, 2011.
- [43] M. A. Karaaslan, G. Gao, and J. F. Kadla, "Nanocrystalline cellulose/ β -casein conjugated nanoparticles prepared by click chemistry," *Cellulose*, vol. 20, pp. 2655–2665, 2013.
- [44] S. C. Espinosa, T. Kuhnt, E. J. Foster, and C. Weder, "Isolation of thermally stable cellulose nanocrystals by phosphoric acid hydrolysis," *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 4, pp. 1223–1230, 2013.
- [45] Z. Man, N. Muhammad, A. Sarwono, M. A. Bustam, M. V. Kumar, and S. Rafiq, "Preparation of Cellulose Nanocrystals Using an Ionic Liquid," *J. Polym. Environ.*, vol. 19, pp. 726–731, 2011.
- [46] B. Braun and J. R. Dorgan, "Single-Step Method for the Isolation and Surface Functionalisation of Cellulosic Nanowhiskers," *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 334–341, 2009.
- [47] F. V. Pereira, E. L. de Paula, J. P. de Mesquita, A. de A. Lucas, and V. Mano, "Bionanocompósitos preparados por incorporação de nanocristais de celulose em polímeros biodegradáveis por meio de evaporação de solvente, automontagem ou eletrofiação," *Quim. Nova*, vol. 37, no. 7, pp. 1209–1219, 2014.
- [48] G. H. D. Tonoli, E. M. Teixeira, a. C. Corrêa, J. M. Marconcini, L. a. Caixeta, M. a. Pereira-Da-Silva, and L. H. C. Mattoso, "Cellulose micro/nanofibres from Eucalyptus kraft pulp: Preparation and properties," *Carbohydr. Polym.*, vol. 89, no. 1, pp. 80–88, 2012.
- [49] G. Siqueira, J. Bras, and A. Dufresne, "Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications," *Polymers (Basel)*, vol. 2, pp. 728–765, 2010.
- [50] E. Luiz De Paula, V. Mano, and F. V. Pereira, "Influence of cellulose nanowhiskers on the hydrolytic degradation behavior of poly(d,l-lactide)," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 96, no. 9, pp. 1631–1638, 2011.

- [51] J. P. De Mesquita, C. L. Donnici, I. F. Teixeira, and F. V. Pereira, "Bio-based nanocomposites obtained through covalent linkage between chitosan and cellulose nanocrystals," *Carbohydr. Polym.*, vol. 90, no. 1, pp. 210–217, 2012.
- [52] Y. Habibi, "Key advances in the chemical modification of nanocelluloses.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, pp. 1519–42, 2014.
- [53] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless, "A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective 'ligation' of azides and terminal alkynes," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 41, no. 14, pp. 2596–2599, 2002.
- [54] J. E. Hein and V. V. Fokin, "Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 4, pp. 1302–1315, 2010.
- [55] C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal, "Peptidotriazoles on solid phase: triazoles by regiospecific copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides," *J. Org. Chem.*, vol. 67, no. 9, pp. 3057–64, 2002.
- [56] P. Wu and V. V. Fokin, "Catalytic azide - alkyne cycloaddition: Reactivity and applications," *Aldrichimica Acta*, vol. 40, pp. 7–17, 2007.
- [57] B. T. Worrell, J. a Malik, and V. V. Fokin, "Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions.," *Science (80-.)*, vol. 340, no. 1, pp. 457–460, 2013.
- [58] L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, and G. Jia, "Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 46, pp. 15998–15999, 2005.
- [59] K. V. Gothelf and K. A. Jørgensen, "Asymmetric 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions," *Chem. Rev.*, vol. 98, no. 2, pp. 863–909, 1998.
- [60] V. D. Bock, H. Hiemstra, and J. H. Van Maarseveen, "Cu I-catalyzed alkyne-azide 'click' cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective," *European J. Org. Chem.*, pp. 51–68, 2006.
- [61] T. Hasegawa, M. Umeda, M. Numata, C. Li, A. H. Bae, T. Fujisawa, S. Haraguchi, K. Sakurai, and S. Shinkai, "'Click chemistry' on polysaccharides: A convenient, general, and monitorable approach to develop (1→3)-β-d-glucans with various functional appendages," *Carbohydr. Res.*, vol. 341, no. 1, pp. 35–40, 2006.
- [62] T. Liebert, C. Hänsch, and T. Heinze, "Click chemistry with polysaccharides," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 27, no. 3, pp. 208–213, 2006.
- [63] N. Pahimanolis, A. H. Vesterinen, J. Rich, and J. Seppala, "Modification of dextran using click-chemistry approach in aqueous media," *Carbohydr. Polym.*, vol. 82, no. 1, pp. 78–82, 2010.
- [64] N. Pahimanolis, A. Sorvari, N. D. Luong, and J. Seppälä, "Thermoresponsive xylan hydrogels via copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition," *Carbohydr. Polym.*, vol. 102, no. 1, pp. 637–644, 2014.
- [65] P. H. Elchinger, H. Awada, C. Zerrouki, D. Montplaisir, and R. Zerrouki, "Kraft pulp-starch covalent linking: A promising route to a new material," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 53, no. 18, pp. 7604–7610, 2014.
- [66] P. Peng, X. Cao, F. Peng, J. Bian, F. Xu, and R. Sun, "Binding cellulose and chitosan via click chemistry: Synthesis, characterization, and formation of some hollow tubes," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 50, no. 24, pp. 5201–5210, 2012.
- [67] A. Koschella, M. Hartlieb, and T. Heinze, "A 'click-chemistry' approach to cellulose-based hydrogels," *Carbohydr. Polym.*, vol. 86, pp. 154–161, 2011.

- [68] P.-A. Faugeras, F. Brouillette, and R. Zerrouki, "Crosslinked cellulose developed by CuAAC, a route to new materials," *Carbohydr. Res.*, vol. 356, pp. 247–251, 2012.
- [69] I. Filpponen, H. Sadeghifar, and D. S. Argyropoulos, "Photoresponsive Cellulose Nanocrystals," *Nanomater. Nanotechnol.*, vol. 1, no. 1, pp. 34–43, 2011.
- [70] K. W. Wellington, "Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 26, pp. 20309–20338, 2015.
- [71] E. N. Da Silva, B. C. Cavalcanti, T. T. Guimarães, M. D. C. F. R. Pinto, I. O. Cabral, C. Pessoa, L. V. Costa-Lotufu, M. O. De Moraes, C. K. Z. De Andrade, M. R. Dos Santos, C. a. De Simone, M. O. F. Goulart, and A. V. Pinto, "Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 1, pp. 399–410, 2011.
- [72] E. N. da Silva Júnior, M. A. B. F. de Moura, A. V. Pinto, M. D. C. F. R. Pinto, M. C. B. V de Souza, A. J. Araújo, C. Pessoa, L. V. Costa-Lotufu, R. C. Montenegro, M. O. de Moraes, V. F. Ferreira, and M. O. F. Goulart, "Cytotoxic, trypanocidal activities and physicochemical parameters of nor- β -lapachone-based 1,2,3-triazoles," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 20, no. 4, pp. 635–643, 2009.
- [73] L. Wu, "Synthesis and biological evaluation of novel 1,2-naphthoquinones possessing tetrazolo[1,5-a]pyrimidine scaffolds as potent antitumor agents," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 32, pp. 24960–24965, 2015.
- [74] D. Chadar, M. Camilles, R. Patil, A. Khan, T. Weyhermüller, and S. Salunke-Gawali, "Synthesis and characterization of n-alkylamino derivatives of vitamin K3: Molecular structure of 2-propylamino-3-methyl-1,4-naphthoquinone and antibacterial activities," *J. Mol. Struct.*, vol. 1086, pp. 179–189, 2015.
- [75] D. V Mavrodi, W. Blankenfeldt, and L. S. Thomashow, "Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 44, pp. 417–445, 2006.
- [76] C. E. M. Carvalho, I. M. Brinna, A. V. Pinto, and M. do C. F. R. Pinto, "Fluorescent symmetric phenazines from naphthoquinones 3. Steady-state spectroscopy and solvent effect of seven phenazine derivatives: structure–photophysics correlations," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 136, pp. 25–33, 2000.
- [77] P. F. Carneiro, M. D. C. F. R. Pinto, T. S. Coelho, B. C. Cavalcanti, C. Pessoa, C. a de Simone, I. K. C. Nunes, N. M. de Oliveira, R. G. de Almeida, A. V. Pinto, K. C. G. de Moura, P. a da Silva, and E. N. da Silva Júnior, "Quinonoid and phenazine compounds: Synthesis and evaluation against H(37)Rv, rifampicin and isoniazid-resistance strains of *Mycobacterium tuberculosis*," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 9, pp. 4521–4529, 2011.
- [78] C. E. M. Carvalho, N. C. de Lucas, J. O. M. Herrera, A. V. Pinto, M. C. F. R. Pinto, and I. M. Brinn, "Fluorescent symmetric phenazines from naphthoquinones 4. Solvent effect on time-resolved fluorescence," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 167, no. 1, pp. 1–9, 2004.
- [79] G. A. M. Jardim, H. D. R. Calado, L. A. Cury, and E. N. da Silva Júnior, "Synthesis of a Phenazine-Based 1,2,3-Triazole from Naturally Occurring Naphthoquinone Designed as a Probe for Cd²⁺ Ions," *European J. Org. Chem.*, vol. 2015, no. 4, pp. 703–709, 2015.
- [80] B. A. D. Neto, J. R. Corrêa, P. H. P. R. Carvalho, D. C. B. D. Santos, B. C. Guido, C. C. Gatto, H. C. B. De Oliveira, M. Fasciotti, M. N. Eberlin, and E. N. Da Silva, "Selective and efficient mitochondrial staining with designed 2,1,3-benzothiadiazole derivatives as live cell fluorescence imaging probes," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 23, no. 4, pp. 770–781, 2012.

- [81] B. A. D. Neto, A. A. M. Lapis, E. N. Da Silva Júnior, and J. Dupont, “2,1,3-benzothiadiazole and derivatives: Synthesis, properties, reactions, and applications in light technology of small molecules,” *European J. Org. Chem.*, no. 2, pp. 228–255, 2013.
- [82] T. O. Lopes, D. A. da Silva Filho, A. A. M. Lapis, H. C. B. De Oliveira, and B. A. D. Neto, “Designed non-symmetrical 4,7-pi-extended-2,1,3-benzothiadiazole derivatives: Synthesis guided by DFT predictions,” *J. Phys. Org. Chem.*, vol. 27, pp. 303–309, 2014.
- [83] M. Zhang, Y. Wang, M. Xu, W. Ma, R. Li, and P. Wang, “Design of high-efficiency organic dyes for titania solar cells based on the chromophoric core of cyclopentadithiophene-benzothiadiazole,” *Energy Environ. Sci.*, vol. 6, no. 10, pp. 2944–2949, 2013.
- [84] E. H. G. da Cruz, P. H. P. R. Carvalho, J. R. Corrêa, D. a. C. Silva, E. B. T. Diogo, J. D. de Souza Filho, B. C. Cavalcanti, C. Pessoa, H. C. B. de Oliveira, B. C. Guido, D. a. da Silva Filho, B. a. D. Neto, and E. N. da Silva Júnior, “Design, synthesis and application of fluorescent 2,1,3-benzothiadiazole-triazole-linked biologically active lapachone derivatives,” *New J. Chem.*, pp. 2569–2580, 2014.
- [85] K. R. J. Thomas, J. T. Lin, M. Velusamy, Y.-T. Tao, and C.-H. Chuen, “Color Tuning in Benzo[1,2,5]thiadiazole-Based Small Molecules by Amino Conjugation/Deconjugation: Bright Red-Light-Emitting Diodes,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 14, no. 1, pp. 83–90, 2004.
- [86] B. A. D. Neto, P. H. P. R. Carvalho, D. C. B. D. Santos, C. C. Gatto, L. M. Ramos, N. M. De Vasconcelos, J. R. Corrêa, M. B. Costa, H. C. B. de Oliveira, and R. G. Silva, “Synthesis, properties and highly selective mitochondria staining with novel, stable and superior benzothiadiazole fluorescent probes,” *RSC Adv.*, vol. 2, no. 4, p. 1524, 2012.
- [87] B. Han, B. Shen, Z. Wang, M. Shi, H. Li, C. Peng, Q. Zhao, and C. Gao, “Layered microcapsules for daunorubicin loading and release as well as in vitro and in vivo studies,” *Polym. Adv. Technol.*, vol. 19, no. 2007, pp. 36–46, 2008.
- [88] A. Dukić, R. Mens, P. Adriaensens, P. Foreman, J. Gelan, J. P. Remon, and C. Vervaet, “Development of starch-based pellets via extrusion/spheronisation,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 66, no. 1, pp. 83–94, 2007.
- [89] P. Mukhopadhyay, S. Chakraborty, S. Bhattacharya, R. Mishra, and P. P. Kundu, “pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 72, pp. 640–648, 2015.
- [90] S. Biswas, M. Chattopadhyay, K. K. Sen, and M. K. Saha, “Development and characterisation of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 121, pp. 403–410, 2015.
- [91] M. Wu, H. Dong, K. Guo, R. Zeng, M. Tu, and J. Zhao, “Self-assembled nanocomplexes based on biomimetic amphiphilic chitosan derivatives for protein delivery,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 121, pp. 115–121, 2015.
- [92] L. J. Nielsen, S. Eyley, W. Thielemans, and J. W. Aylott, “Dual fluorescent labelling of cellulose nanocrystals for pH sensing,” *Chem. Commun. (Camb)*, vol. 46, no. c, pp. 8929–8931, 2010.
- [93] L. Chen, W. Cao, N. Grishkewich, R. M. Berry, and K. C. Tam, “Synthesis and characterisation of pH-responsive and fluorescent poly (amidoamine) dendrimer-grafted cellulose nanocrystals,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 450, pp. 101–108, 2015.
- [94] J. L. Huang, C. J. Li, and D. G. Gray, “Cellulose nanocrystals incorporating fluorescent methylcoumarin groups,” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 1, no. 9, pp. 1160–1164, 2013.

- [95] S. Dong, H. J. Cho, Y. W. Lee, and M. Roman, "Synthesis and cellular uptake of folic acid-conjugated cellulose nanocrystals for cancer targeting," *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 5, pp. 1560–1567, 2014.
- [96] M. Z. Karim, Z. Z. Chowdhury, S. B. A. Hamid, and M. E. Ali, "Statistical Optimization for Acid Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose and Its Physicochemical Characterization by Using Metal Ion Catalyst," *Materials (Basel)*, vol. 7, pp. 6982–6999, 2014.
- [97] K. K. Pandey, "A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 71, no. May, pp. 1969–1975, 1999.
- [98] D. Ciolacu, F. Ciolacu, and V. Popa, "Amorphous cellulose - structure and characterization," *Cellul. Chem. Technol.*, vol. 45, pp. 13–21, 2011.
- [99] S. Y. Oh, I. Y. Dong, Y. Shin, C. K. Hwan, Y. K. Hak, S. C. Yong, H. P. Won, and H. Y. Ji, "Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy," *Carbohydr. Res.*, vol. 340, no. 15, pp. 2376–2391, 2005.
- [100] R. Bodîrlău, C. A. Teacă, and I. Spiridon, "Preparation and characterization of composites comprising modified hardwood and wood polymers/poly(vinylchloride)," *BioResources*, vol. 4, no. 4, pp. 1285–1304, 2009.
- [101] K. Wu, M. M. Shen, Y. Hu, W. Xing, and X. Wang, "Thermal degradation and intumescent flame retardation of cellulose whisker/epoxy resin composite," *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 104, no. 3, pp. 1083–1090, 2011.
- [102] S. K. Haraguchi, A. A. Silva, E. T. Tenório-Neto, G. M. De Carvalho, E. C. Muniz, and A. F. Rubira, "Glycerol-derived polyurethane nanocomposites containing cellulose nanowhiskers," *Acta Sci. Technol.*, vol. 35, no. 4, pp. 747–755, 2013.
- [103] J. I. Morán, V. a. Alvarez, V. P. Cyras, and A. Vázquez, "Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers," *Cellulose*, vol. 15, no. 1, pp. 149–159, 2008.
- [104] S. Park, J. O. Baker, M. E. Himmel, P. A. Parilla, and D. K. Johnson, "Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance.," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 3, p. 10, 2010.
- [105] A. C. Corrêa, E. M. de Teixeira, L. A. Pessan, and L. H. C. Mattoso, "Cellulose nanofibers from curaua fibers," *Cellulose*, vol. 17, no. 6, pp. 1183–1192, 2010.
- [106] F. Shafizadeh and A. G. W. Bradbury, "Thermal degradation of cellulose in air and nitrogen at low temperatures," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 23, no. 5, pp. 1431–1442, 1979.
- [107] D. L. VanderHart and R. H. Atalla, "Studies of microstructure in native celluloses using solid-state carbon-13 NMR," *Macromolecules*, vol. 17, no. 8, pp. 1465–1472, 1984.
- [108] I. a. Sacui, R. C. Nieuwendaal, D. J. Burnett, S. J. Stranick, M. Jorfi, C. Weder, E. J. Foster, R. T. Olsson, and J. W. Gilman, "Comparison of the properties of cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils isolated from bacteria, tunicate, and wood processed using acid, enzymatic, mechanical, and oxidative methods," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 9, pp. 6127–6138, 2014.
- [109] C. H. Lemke, R. Y. Dong, C. a. Michal, and W. Y. Hamad, "New insights into nanocrystalline cellulose structure and morphology based on solid-state NMR," *Cellulose*, vol. 19, no. 5, pp. 1619–1629, 2012.
- [110] M. Gericke, J. Schaller, T. Liebert, P. Fardim, F. Meister, and T. Heinze, "Studies on the tosylation of cellulose in mixtures of ionic liquids and a co-solvent," *Carbohydr. Polym.*, vol. 89, no. 2, pp. 526–536, 2012.

- [111] C. Vaca-Garcia, M. E. Borredon, and A. Gaseta, "Determination of the degree of substitution (DS) of mixed cellulose esters by elemental analysis," *Cellulose*, vol. 8, no. 3, pp. 225–231, 2001.
- [112] H. Namazi and A. Dadkhah, "Convenient method for preparation of hydrophobically modified starch nanocrystals with using fatty acids," *Carbohydr. Polym.*, vol. 79, no. 3, pp. 731–737, 2010.
- [113] M. N. Tahir, C. Bork, A. Risberg, J. C. Horst, C. Komoß, A. Vollmer, and P. Mischnick, "Alkynyl ethers of glucans: Substituent distribution in propargyl-, pentynyl- and hexynyl-dextrans and -amyloses and support for silver nanoparticle formation," *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 211, pp. 1648–1662, 2010.
- [114] P. F. Tankam, R. Müller, P. Mischnick, and H. Hopf, "Alkynyl polysaccharides: synthesis of propargyl potato starch followed by subsequent derivatizations," *Carbohydr. Res.*, vol. 342, pp. 2049–2060, 2007.
- [115] J. Chen, N. Lin, J. Huang, and A. Dufresne, "Highly alkynyl-functionalization of cellulose nanocrystals and advanced nanocomposites thereof via click chemistry," *Polym. Chem.*, 2015.
- [116] J. Zhu, H. Bi, Y. Wang, X. Wang, X. Yang, and L. Lu, "CuO nanocrystals with controllable shapes grown from solution without any surfactants," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 109, no. 1, pp. 34–38, 2008.
- [117] A. S. Lanje, S. J. Sharma, R. B. Pode, and R. S. Ningthoujam, "Synthesis and optical characterization of copper oxide nanoparticles," *Adv. Appl. Sci. Res.*, vol. 1, no. 2, pp. 36–40, 2010.
- [118] F. Shafizadeh, "Introduction to pyrolysis of biomass," *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, vol. 3, no. 4, pp. 283–305, 1982.
- [119] F. Joubert, O. Musa, D. R. W. Hodgson, and N. R. Cameron, "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, no. 9, pp. 1567–1575, 2015.
- [120] E. W. Wollman, D. Kang, C. D. Frisbie, I. M. Lorkovic, and M. S. Wrighton, "Photosensitive Self-Assembled Monolayers on Gold: Photochemistry of Surface-Confined Aryl Azide and Cyclopentadienylmanganese Tricarbonyl," *Society*, no. 8, pp. 4395–4404, 1994.
- [121] A. C. Gouget-Laemmel, J. Yang, M. A. Lodhi, A. Siriwardena, D. Aureau, R. Boukherroub, J. N. Chazalviel, F. Ozanam, and S. Szunerits, "Functionalization of azide-terminated silicon surfaces with glycans using click chemistry: XPS and FTIR study," *J. Phys. Chem. C*, vol. 117, no. 1, pp. 368–375, 2013.
- [122] S. Cheng and M. Chen, "Fabrication, characterization, and kinetic study of vertical single-crystalline CuO nanowires on Si substrates," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 7, no. 1, p. 119, 2012.
- [123] X. Liu, B. Geng, Q. Du, J. Ma, and X. Liu, "Temperature-controlled self-assembled synthesis of CuO, Cu₂O and Cu nanoparticles through a single-precursor route," *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 448, no. 1–2, pp. 7–14, 2007.

ANEXO

Espectros de XPS de N 1s do precursor NCC-N₃ e dos produtos *click*.

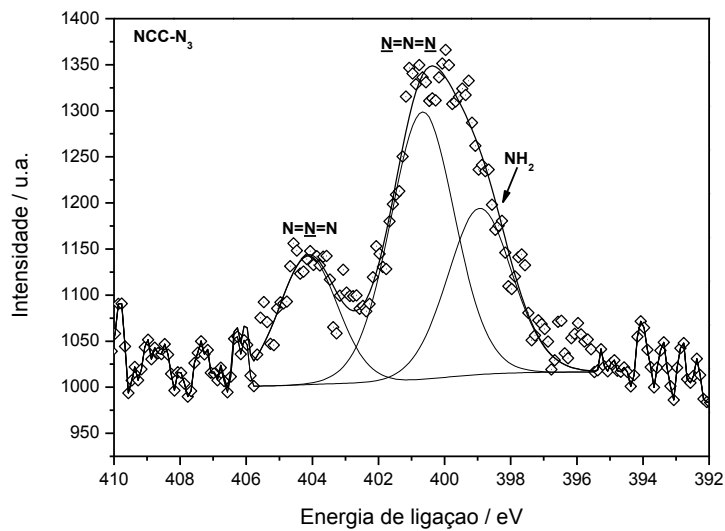


Figura 1. Espectro de XPS de N 1s dos NCC-N₃.

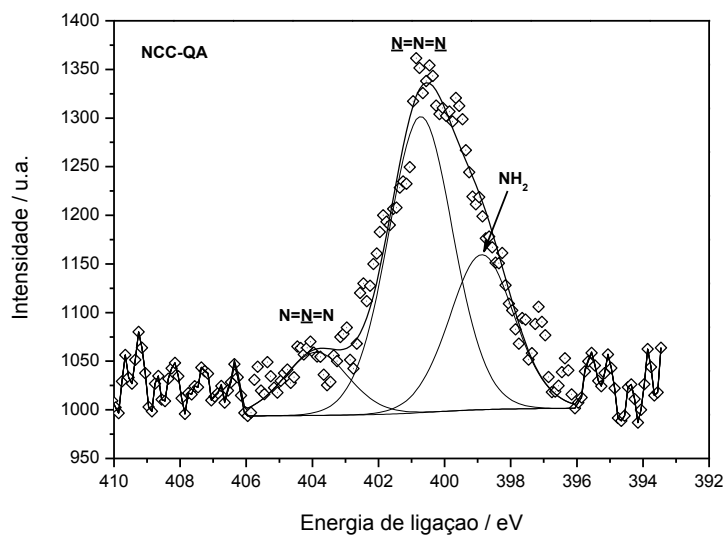


Figura 2. Espectro de XPS de N 1s dos NCC-QA.

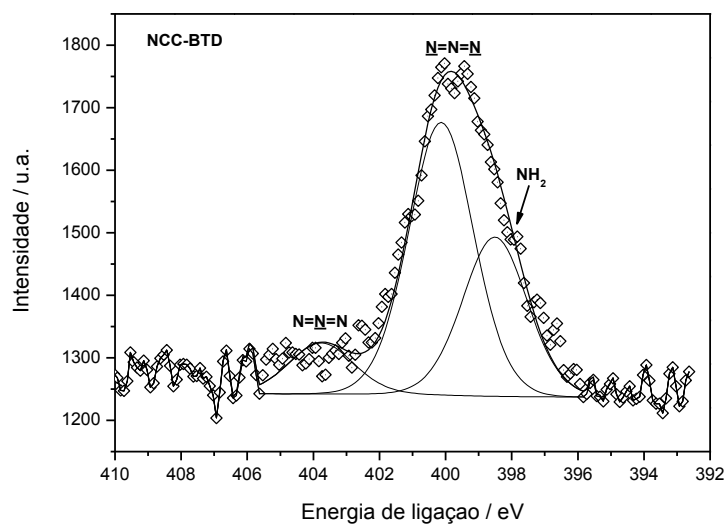


Figura 3. Espectro de XPS de N 1s dos NCC-BTD.

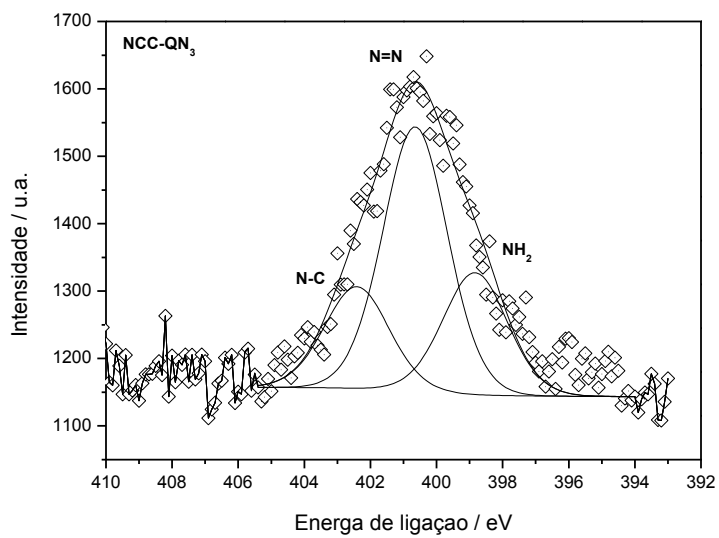


Figura 4. Espectro de XPS de N 1s dos NCC-QN₃.

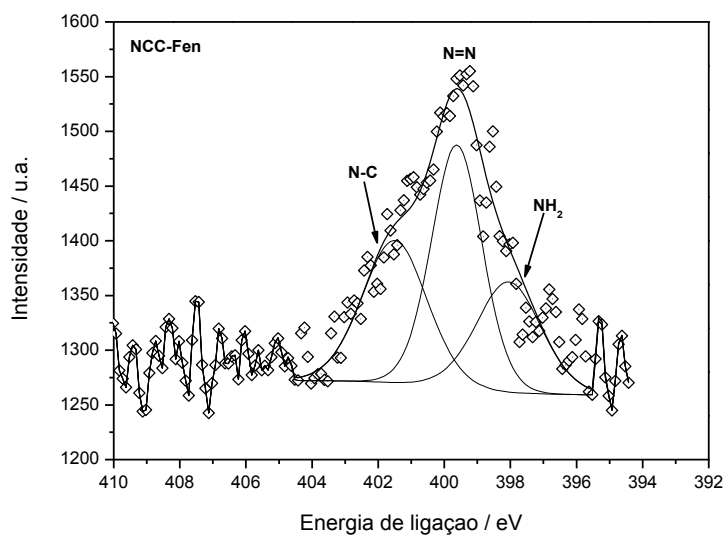


Figura 5. Espectro de XPS de N 1s dos NCC-Fen.

Espectros de XPS de varredura dos NCC, dos precursores NCC-N₃ e NCC-P e dos produtos *click*

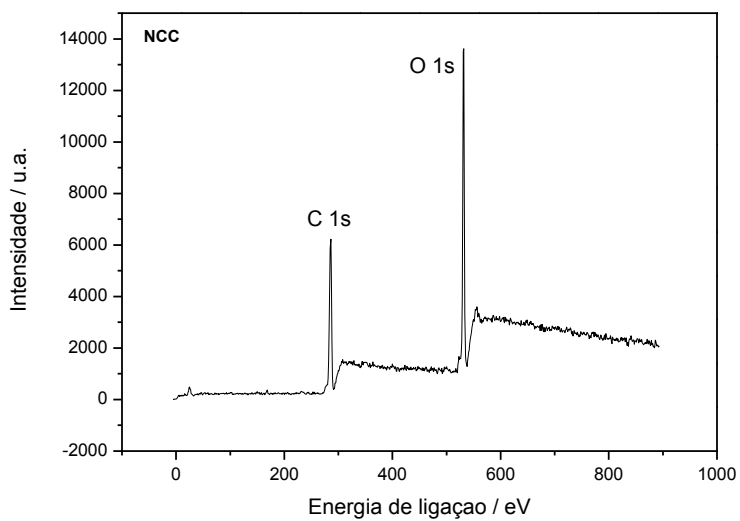


Figura 6. Espectro de XPS de varredura dos NCC. As principais espécies presentes na amostra são designadas no espectro.

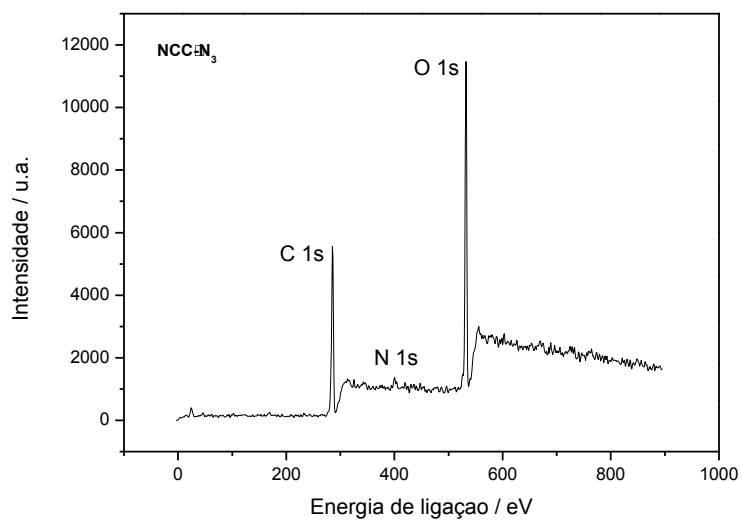


Figura 7. Espectro de XPS de varredura dos NCC-N₃. As principais espécies presentes na amostra são designadas no espectro.

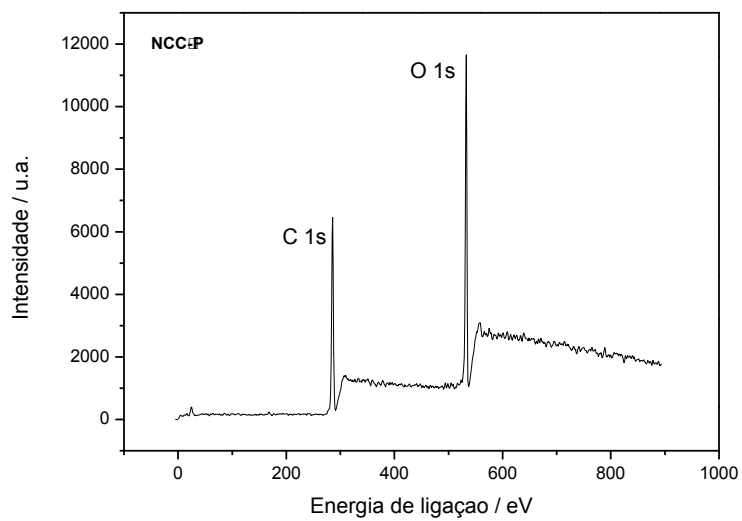


Figura 8. Espectro de XPS de varredura dos NCC-P. As principais espécies presentes na amostra são designadas no espectro.

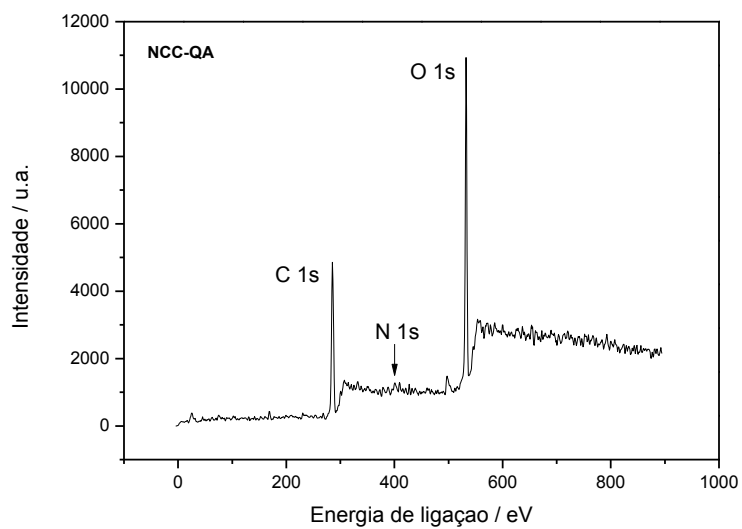


Figura 9. Espectro de XPS de varredura dos NCC-QA. As principais espécies presentes na amostra são designadas no espectro.

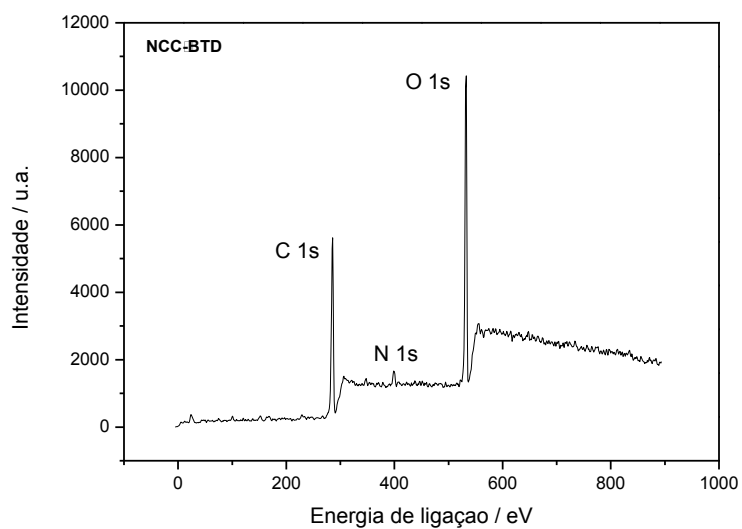


Figura 10. Espectro de XPS de varredura dos NCC-BTD. As principais espécies presentes na amostra são designadas no espectro.

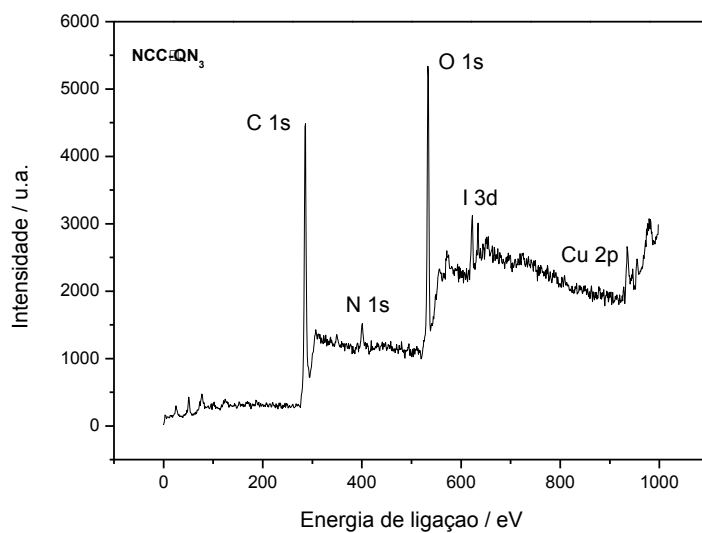


Figura 11. Espectro de XPS de varredura dos NCC-QN₃. As principais espécies presentes na amostra são designadas no espectro.

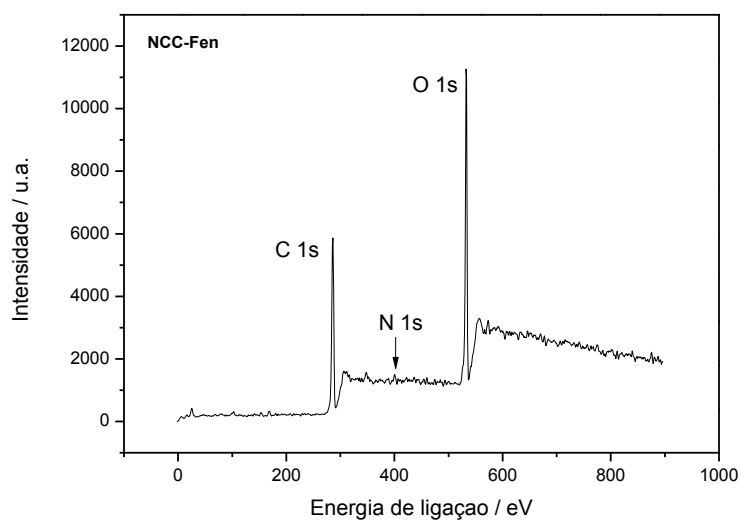


Figura 12. Espectro de XPS de varredura dos NCC-Fen. As principais espécies presentes na amostra são designadas no espectro.