



**Francisco Luís de Aragão Faísca**

Licenciado em Bioquímica

**Síntese de polímeros sustentáveis para  
a estabilidade proteica de vinhos  
brancos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Química Bioorgânica

Orientador: Luísa Pinto Ferreira, Professora Auxiliar, FCT  
- UNL

Co-orientador: Ricardo Chagas, Investigador, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Paula Cristina de Sérgio Branco

Arguente: Prof. Doutora Marial Manuel Martinho Sequeira Barata Marques

Vogal: Prof. Doutora Luísa Maria da Silva Pinto Ferreira



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Síntese de polímeros sustentáveis para a estabilidade proteica de vinhos brancos  
Francisco Faisca

## Resumo

A produção de vinho é um processo complexo e extenso que inclui diversos métodos de tratamento para melhorar a qualidade do produto durante o processo de produção, maturação, armazenamento e transporte, todos os quais podem afetar a qualidade e a longevidade do vinho em questão.

Uma das propriedades que requerem monitorização e tratamento é a estabilidade proteica do vinho branco, ou seja, a capacidade de um vinho para manter o seu conteúdo proteico dissolvido, evitando desnaturação e aglomeração que resulta em perturbações visuais com impactos negativos no valor atribuído ao vinho. Os testes de estabilidade proteica, sendo testes de desnaturação por aquecimento, têm um alcance limitado na previsão do comportamento do vinho a longo prazo, e o tratamento utilizado pela indústria enológica consiste na adição da argila bentonite. Esta adição, embora eficaz na remoção do conteúdo proteico, acaba por remover, também, outros compostos benéficos, e resulta na perda adicional de vinho aquando da remoção da bentonite no final do tratamento.

De forma a contornar este problema, foi desenvolvido um polímero à base de celulose, a dicarboximetilcelulose, (DCMC) na qual o grupo  $\beta$ -dicarboxilato tem um pKa baixo o suficiente para mimetizar a troca iónica realizada pela bentonite. Com a utilização de um polímero baseado numa matéria prima mais abundante e sustentável que a bentonite, pode ser obtido um efeito mais específico, e no geral, mais eficaz.

No entanto, até à data, a síntese de DCMC envolve a utilização sacrificial de átomos de bromo. Sendo uma substância altamente prejudicial, tanto no sentido direto como de sustentabilidade, a formulação de uma síntese alternativa “verde”, com reagentes alternativos, representa uma continuação dos esforços e intenções sustentáveis por trás da implementação deste novo polímero. A intenção desta tese é de desenvolver a síntese de um polímero com propriedades e usos semelhantes à DCMC, mas recorrendo a métodos e reagentes que aumentem a sustentabilidade do processo.

Foi realizada a funcionalização da celulose com cloreto de tosilato de forma a implementar um grupo de saída, a partir do qual, o grupo dicarboxilato pode ser implementado no esqueleto de celulose. Realizaram-se reações de substituição com o ácido malónico e análogos, como o ácido de meldrum, dimetilmalonato, ácido tartrónico e tert-butil malonato, de forma a produzir um leque abrangente de reações e polímeros que foram posteriormente testados através de testes de adsorção com azul de metileno e análises elementares de sódio, de forma a determinar quais os melhores compostos para alcançar o objetivo pretendido.

Foram produzidos 3 polímeros finais com capacidades de adsorção semelhantes, mas com características químicas diferentes da dicarboximetilcelulose original, resultantes dos passos sintéticos realizados que, até à data não representam um problema para a sua aplicação. No entanto, a reação de substituição com grupos dicarboxilato ainda não se encontra otimizada, estando relacionada a um nível substancial de descarboxilação, resultando em níveis comparativamente inferiores de adsorção. É, no entanto, possível que, com uma otimização da reação de substituição, as vias sintéticas e os polímeros desenvolvidos possam vir a ter uma performance mais em linha com o esperado para este polímero funcional.

## Summary

Winemaking is a complex and extensive process that entails several methods of treatment that better the quality of product throughout the course of production, maturation, storage and transport, all of which can negatively impact the quality and lifespan of wine.

One such property that requires monomerization and treatment is the protein stability of white wine, that is, the ability of any wine to keep its protein content dissolved, avoiding denaturation and agglomeration that result in visual disturbances that lower the perceived value of wine. Protein stability tests, being heat induced denaturation tests, have a limited scope in the assessment of wine's behavior over long periods of time, the associated treatment utilized by the winemaking industry consists in the addition of bentonite clay. This addition, while effective in the removal of wine's protein content, is also responsible for the removal of other beneficial wine compounds and results in the loss of overall wine production due to the bentonite waste produced during its removal.

To circumvent this problem a new cellulose-based polymer, dicarboxymethylcellulose, has been devised that, through the dicarboxylic group, has a low enough pKa to mimetize the ion exchange performed by bentonite. This material uses a far more abundant and sustainable natural resource and has a more specific and therefore effective performance.

However, to date the synthesis of DCMC requires the sacrificial use of bromide atoms. Being a highly harmful substance, both in the human and environmental sense, the development of a green synthetic pathway, with alternative reagents, represents a continuation of the ecological efforts behind this advancement. The intention of this thesis is to devise the synthetic pathway of a polymer with the same properties and uses similarly to DCMC but resorting only to reagents and methods that further the sustainability of the process.

Cellulose was functionalized using tosyl chloride from which an exit group was implemented and through which the dicarboxylate group introduced. Substitution reactions were designed with malonic acid and other analogues such as meldrum's acid, dimethylmalonate, tartronic acid and tert-butyl malonate in order to produce a wide array of reactions and polymers that were later tested through adsorption trials with methylene blue and sodium elemental analysis, through which the most promising products were selected.

The testing process resulted in 3 final polymers with similar adsorption performances but with physical and chemical properties that differ from the original dicarboxymethyl cellulose, these differences are due to inherent synthetic differences and, to date, do not represent a problem to their future application. However, the substitution reaction, has not yet been optimized, resulting in a substantial amount of decarboxylation and overall inferior performances when compared to the original polymer. It is possible that, with proper optimization, that the substitution reaction will achieve polymers with performances that are more in line with what is to be expected from a fully developed material and thus, validating the developed synthetic pathway for production and use.

## Índice de Conteúdos

Lista de abreviações .....	9
1. Introdução .....	10
1.1. O que são vinhos instáveis? .....	10
1.2. O processo de turvação.....	10
1.2.1. O que causa turvação?.....	11
1.3. Estado de Arte - Processos de estabilização de vinho .....	13
1.3.1. Bentonite .....	13
1.3.1.1. Tratamento com Bentonite.....	13
1.3.1.2. Adsorção por Troca Iónica .....	14
1.3.1.3. Desvantagens da Bentonite.....	14
1.3.2. Processos alternativos.....	15
1.4. Uso de dicarboximetil celulose como novo adsorvente de proteínas .....	18
1.4.1. Síntese de Dicarboximetilcelulose .....	18
1.5. Desenvolvimento de uma alternativa verde .....	19
1.5.1. Eterificações de Celulose.....	20
1.6. Síntese de um polímero alternativo.....	22
2. Métodos Laboratoriais .....	24
2.1. Preambulo.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2. Reações Realizadas .....	24
Síntese de ácido bromo malónico ( <b>1a</b> ) .....	24
Síntese de bromomalonato de sódio ( <b>1b</b> ) .....	24
Síntese de celulose tosilada em meio aquoso com ureia e polietileno glycol ( <b>2a</b> )...	25
Síntese de celulose tosilada em dimetilacetamida ( <b>2b</b> ) .....	25
Síntese de celulose tosilada em Dimetilacetamida Reformulada ( <b>2c</b> ).....	26
Síntese de celulose tosilada em meio aquoso reformulada ( <b>2d</b> ).....	26
Reação homogénea de celulose com sal de imidazole <b>5</b> em meio aquoso ( <b>2e</b> ) .....	27
Reação heterogénea de celulose com sal de imidazole <b>5</b> em meio aquoso ( <b>2f</b> ).....	27
Reação homogénea de celulose com sal de imidazole <b>5</b> em meio Orgânico ( <b>2g</b> )....	27
Reação da celulose tosilada <b>2b</b> com ácido malónico ( <b>3a</b> ).....	28
Reação da celulose tosilada <b>2b</b> com ácido malónico e Trietilamina ( <b>3b</b> ) .....	28
Reação de celulose mesilada <b>4</b> com ácido malónico ( <b>3c</b> ).....	29
Reação de celulose de Meldrum <b>23</b> com NaOH ( <b>3d</b> ).....	29

Reação de celulose de Meldrum <b>8b</b> com NaOH em Micro-ondas ( <b>3e</b> ) .....	29
Reação de Celulose de tertbutil malonato <b>10</b> com ácido trifluoroacético ( <b>3f</b> ) .....	30
Reação de Celulose de tertbutil malonato <b>10</b> com ácido trifluoroacético em micro-ondas ( <b>3g</b> ) .....	30
Reação de celulose de Meldrum <b>8b</b> com ácido clorídrico ( <b>3h</b> ) .....	30
Síntese de celulose mesilada em piridina ( <b>4</b> ) .....	30
Síntese de 1-(p-Toluenesulfonyl)imidazole ( <b>5</b> ) .....	31
Reação de celulose tosilada <b>2d</b> com azida de sódio ( <b>6</b> ) .....	31
Reação de malonato de etilo com Celulose tosilada ( <b>7</b> ) .....	32
Reação de celulose tosilada <b>2d</b> com ácido de meldrum ( <b>8a</b> ) .....	32
Adição de Ácido de Meldrum a Celulose Tosilada por Etóxido de Sódio ( <b>8b</b> ) .....	33
Síntese de tert-butilmalonato através da esterificação de ácido malónico com DCC ( <b>9a</b> ) .....	33
Síntese de tert-butilmalonato através de esterificação ácida ( <b>9b</b> ) .....	33
Reação de celulose tosilada <b>2d</b> com tert-butilmalonato ( <b>10</b> ) .....	34
Reação de celulose tosilada <b>2d</b> com ácido tartrónico ( <b>11</b> ) .....	34
2.3. Processos analíticos .....	36
Testes preliminares de atividade .....	36
Testes de adsorção .....	36
3. Discussão .....	37
3.1. Análise da síntese descrita de DCMC .....	37
3.2. Tosilação de Celulose .....	39
3.2.1. Tosilação em meio aquoso com ureia e polietileno glicol .....	40
3.2.2. Tosilação em Dimetilacetamida .....	41
3.2.3. Tosilação através de sal de imidazole .....	43
3.3. Reformulação das reações de Tosilação .....	45
3.4. Mesilação de celulose .....	49
3.5. Substituição da celulose tosilada .....	50
3.5.1. Substituição com Análogos de Ácido Malónico .....	50
3.6. Hidrólisis de ésteres de Malonato .....	57
3.7. Testes de Performance .....	59
4. Conclusão .....	63
5. Referencias .....	64

## Índice de Figuras

Figura 1 - Vinho com turvação proteica (A) e um vinho estável (B) do ponto de vista proteico <sup>5</sup> .....	10
Figura 2 - Conteúdo proteico de alguns vinhos monocasta produzidos em 1996 de vários locais do sul da Austrália adaptado <sup>11</sup> .....	11
Figura 3 - mecanismo de formação de turvação através da ação de sulfito <sup>15</sup> .....	12
Figura 4 - Sal de dicarboximetilcelulose (DCMC), polímero proposto como substituto de bentonite no tratamento de vinhos .....	18
Figura 5 <sup>47</sup> - reação de esterificação e crosslinking de DCMC.....	19
Figura 6 - Unidade de anidro glucose (AGU).....	20
Figura 7 <sup>50</sup> - a) eterificação via halogeneto b) eterificação via epóxido c) eterificação via adição de Michael.....	21
Figura 8 -3-oxooxirane-2-carboxylic ácido, epóxido necessário para levar à DCMC por ataque nucleófilo do hidroxilo da celulose ativada.....	22
Figura 9 – ácido metileno-malónico - dupla ativada do ácido malónico .....	22
Figura 10 - Proposta para a síntese de um polímero alternativo ao DCMC .....	23
Figura 11 - esquema da síntese de DCMC <sup>47</sup> .....	37
Figura 12 – Mecanismo proposto para a preparação de Ácido Bromo malónico .....	37
Figura 13 - FT-IR Síntese de <b>1b</b> ; neutralização do ácido bromo malónico com NaOH	38
Figura 14 - mecanismo da tosilação da celulose dos hidroxilos da celulose.....	40
Figura 15 - ativação de celulose com hidróxido de sódio <sup>50</sup> .....	40
Figura 16 - espectro de infravermelho da síntese de celulose tosilada ( <b>2a</b> ) .....	41
Figura 17 - RMN do produto da composto <b>2b</b> .....	42
Figura 18 – Espectros de infravermelho de reações de tosilação; Composto <b>2a</b> – Celulose tosilada em meio aquoso com polietileno glicol; Composto <b>2b</b> – Celulose tosilada em DMAc .....	43
Figura 19 - mecanismo para a reação de síntese do sal de imidazole e de regeneração de trietilamina com bicarbonato de sódio .....	44
Figura 20 - FT-IR resultantes das reações de tosilação com sal de tosilo e imidazole; Composto <b>2e</b> – tosilação de acordo com a funcionalização da ciclodextrina; Composto <b>2f</b> – tosilação em meio aquoso; Composto <b>2g</b> – celulose tosilada em DMAc.....	45
Figura 21 - Espectro de FT-IR das reações reformuladas.....	46
Figura 22 - RMN de celulose tosilada em dimetilacetamida <b>2c</b> .....	47
Figura 23 - RMN de celulose tosilada em meio aquoso <b>2d</b> .....	48
Figura 24 - gráfico de correlação da percentagem de enxofre de polímeros com o seu DS em grupos tosilo; Composto 2c – celulose tosilada em DMAc; Composto 2d – celulose tosilada em meio aquoso.....	48
Figura 25 - FT-IR de comparação da reação de mesilação e reação de tosilação .....	49
Figura 26 – Espectro de FT-IR antes e depois de lavagem com uma solução saturada de carbonato de sódio .....	50
Figura 27 - mecanismo do ataque nucleofílico da azida de sódio com a celulose tosilada .....	51
Figura 28 - Formação do enolato do malonato de etilo por ação de 1 equivalente de base .....	51
Figura 29 - Lavagem da celulose de malonato de etilo ( <b>7</b> ) com ácido acético.....	52
Figura 30 - esquema reacional do ataque nucleofílico do Ácido de Meldrum á da celulose tosilada .....	53

Figura 31 – Espectro de IV do Composto <b>8b</b> - Substituição com Ácido de Meldrum; e do Composto <b>7</b> - Substituição com Malonato de Etilo .....	53
Figura 32 - Mecanismo de Descarboxilação e Hidrólise do Ceteno resultante do Ácido de Meldrum; R - Unidade de AGU .....	54
Figura 33 - mecanismo de hidrólise do tert-butilmalonato por ácido trifluoroacético.....	54
Figura 34 - espectros de FT-IR da síntese de tert-butil malonato .....	55
Figura 35 - FT-IR da reação de substituição com tert-butil malonato (Composto <b>10</b> )...	56
Figura 36 - mecanismo de substituição de celulose tosilada com ácido tartrónico .....	56
Figura 37 - infravermelho de comparação de reações de substituição com ácido tartrónico ...	57
Figura 38 - FT-IR de abertura do Ácido de Meldrum; Composto <b>8b</b> – Celulose com Ácido de Meldrum; Composto <b>3d</b> – abertura com NaOH; Composto <b>3e</b> – hidrólise com NaOH em micro-ondas; Reação <b>3h</b> – hidrólise com HCIS .....	58
Figura 39 – FT-IR das reações de hidrólise do tert-butil malonato; Composto <b>10</b> – Celulose de tert-butil malonato; Composto <b>3f</b> : reação de hidrólise com ácido trifluoroacético; composto <b>3g</b> - hidrólise com ácido trifluoroacético em micro-ondas ...	58
Figura 40 - estrutura de azul de metileno .....	59
Figura 41 - fotografia dos testes de atividade preliminares .....	59
Figura 42 - resultados das adsorções com azul metileno; composto <b>8b</b> - Celulose de Meldrum; Composto <b>3d</b> - celulose ativada com NaOH; Composto <b>3h</b> - celulose ativada com HCl .....	61
Figura 43 - mecanismo de descarboxilação do ácido malónico .....	61

## Lista de abreviações

<b><sup>13</sup>C RMN</b>	Ressonância magnética nuclear de carbono	<b>TLP</b>	thaumatin-like protein; proteínas parecidas com Taumatinas
<b><sup>1</sup>H RMN</b>	Ressonância magnética nuclear de próton	<b>TS</b>	tosilo
<b>AGU</b>	unidade de anidrogucose	<b>δ</b>	Desvio químico
<b>CMC</b>	carboximetil celulose	<b>v<sub>máx</sub></b>	Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) máximo
<b>d</b>	Dupleto		
<b>DCM</b>	Diclorometano		
<b>DCM</b>	Diclorometano		
<b>DCMC</b>	dicarboximetilcelulose		
<b>dd</b>	Dupleto de dupletos		
<b>DEPT</b>	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”		
<b>DMAc</b>	dimetilacetamida		
<b>DMF</b>	Dimetilformamida		
<b>DMF</b>	Dimetilformamida		
<b>DMP</b>	Periodinano de Dess-Martin		
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido		
<b>DP</b>	grau de polimerização		
<b>DS</b>	grau de substituição		
<b>eq</b>	Equivalente molar		
<b>RDV</b>	(filtração) vácuo de tambor rotativo		
<b>Glu</b>	glucose		
<b>h</b>	Hora		
<b>Hz</b>	Hertz		
<b>IV</b>	Infravermelho		
<b>J</b>	Constante de acoplamento		
<b>KHMDS</b>	Bis(trimetilsilil)amida de potássio		
<b>LDA</b>	Di-isopropilamida de lítio		
<b>m</b>	Multiplete		
<b>m/z</b>	Razão massa/carga		
<b>min</b>	Minuto		
<b>MW</b>	microondas		
<b>n-Hex</b>	n-Hexano		
<b>PA</b>	Pró-análise		
<b>PCC</b>	Clorocromato de piridínio		
<b>PDC</b>	Dicromato de piridínio		
<b>q</b>	Quarteto		
<b>s</b>	Singuleto		
<b>sl</b>	Singuleto largo		
<b>S<sub>N</sub>2</b>	Substituição nucleofílica bimolecular		
<b>t</b>	Triplete		
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano		
<b>TLC</b>	Cromatografia de camada fina		

## 1. Introdução

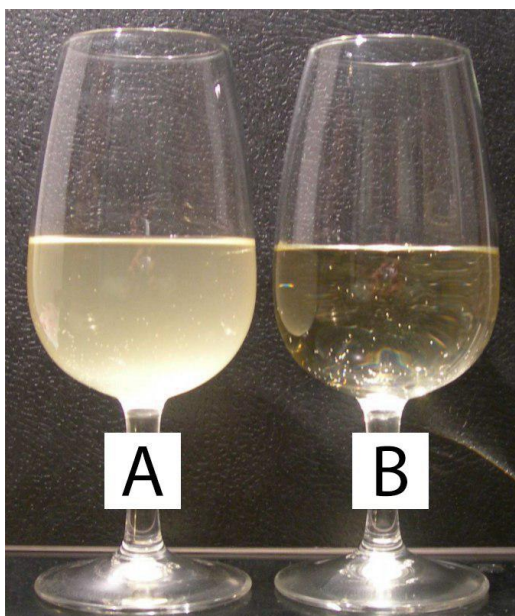
Neste trabalho pretende-se sintetizar e caracterizar polímeros de base celulósica capazes de promover a estabilização proteica de vinhos brancos instáveis por remoção das proteínas solúveis presentes nos mesmos após todos os processos responsáveis pela transformação da uva em vinho.

### 1.1. O que são vinhos instáveis?

Vinhos são soluções hidroalcoólicas complexas, compostas de uma grande variedade de compostos dependendo tanto da origem da uva como do fermento utilizado. A maioria das substâncias presentes no vinho são compostos orgânicos de baixo peso molecular como flavonoides, compostos fenólicos, ácidos carboxílicos e ainda uma pequena percentagem de proteínas.<sup>1,2</sup>

As proteínas presentes podem sofrer desnaturação térmica durante o armazenamento e transporte, mesmo que estes ocorram corretamente.<sup>1,3</sup> Ao desnaturarem, estas proteínas podem agregar e flocular provocando uma turvação do vinho, provocando um defeito visual comumente denominado de turvação proteica.

Dependendo da sua composição, quantidade e tipo de proteínas,<sup>4</sup> um vinho pode ser mais ou menos suscetível a turvação. Vinhos mais propensos a formarem turvação são considerados proteicamente instáveis.



*Figura 1 - Vinho com turvação proteica (A) e um vinho estável (B) do ponto de vista proteico<sup>5</sup>*

### 1.2. O processo de turvação

A turvação proteica de um vinho é causada pela agregação das proteínas desnaturadas do vinho após este ser exposto a um stress térmico.<sup>4</sup> Quando armazenados ou sujeitos a um stress térmico, dois vinhos diferentes com teores proteicos semelhantes podem apresentar graus de turvação diferentes, sugerindo que o ambiente químico do vinho leva a processos de desnaturação para além dos provocados pelo aquecimento.<sup>3,6</sup>

O processo de formação de turvação consiste em 3 passos cruciais, desnaturação, agregação, e crosslinking, Estes são os 3 passos do processo de turvação de vinhos.<sup>4</sup>

A desnaturação, sendo o primeiro passo, resulta de os componentes hidrofóbicos das proteínas, que geralmente se encontram no seu interior, a ficarem expostos para a solução aquosa.<sup>4</sup> Estes componentes hidrofóbicos formam interações com outros, de outras proteínas, o que leva ao segundo passo do processo, a agregação.<sup>7</sup> O último passo de crosslinking forma-se com ligações covalentes e não covalentes<sup>4</sup> entre os péptidos agregados como entre resíduos de cisteína<sup>8</sup> através de pontes de dissulfureto. A acumulação progressiva destes três passos produz corpos com dimensões crescentes que vão inevitavelmente precipitar no vinho, formando o efeito de turvação.

Outros compostos orgânicos, como polifenóis, sulfatos e polissacarídeos são fundamentais para a formação dos agregados observados nos vinhos<sup>9</sup> demonstrando que, embora se trate de um processo proteico, a turvação dos vinhos é resultante de um equilíbrio complexo dos rácios de compostos orgânicos e tipos de proteína presentes.<sup>10</sup>

### 1.2.1. O que causa turvação?

Uma vez que a turvação é uma degradação do conteúdo proteico dos vinhos, a presença relativa de diferentes tipos de proteínas de cada vinho é crucial para a sua estabilidade. Das diversas proteínas encontradas no vinho, quer provenientes da uva ou do processo de fermentação, as mais abundantes nos aglomerados são as quitinases e as taumatinas<sup>4</sup>, proteínas de peso molecular relativamente baixo, globulares, carregadas positivamente ao pH do vinho e resistentes a pH baixo. Estas são proteínas de proteção sistémica da planta na sua relação com patógenos.<sup>4</sup>

Estas duas classes de proteínas constituem a vasta maioria do peso proteico do vinho<sup>11</sup>, como descrito na figura 2, estas proteínas contêm uma grande quantidade de pontes de dissulfureto<sup>12</sup>, que as conferem uma conformação globular extremamente estável que resulta em resistência a hidrólise por outras enzimas<sup>4</sup>, mas também contribui para o passo de crosslinking. Por estas razões, as Taumatinas, também denominadas por TLP (*thaumatin-like proteins*) e as quitinases são geralmente aceites como as proteínas causadoras de turvação.

cultivar	protein concentration (mg/L)		
	thaumatin-like proteins	chitinases	total protein
Muscat of Alexandria	119	118	251
Sauvignon Blanc	119	76	191
Sultana	23	44	86
Pinot Noir	35	21	62
Shiraz	18	9	31

Figura 2 - Conteúdo proteico de alguns vinhos monocasta produzidos em 1996 de vários locais do sul da Austrália adaptado <sup>11</sup>

Embora as proteínas sejam os principais constituintes dos agregados, outros compostos têm papéis fundamentais para a sua formação.

De facto, os polifenóis são conhecidos como indutores de turvação em cervejas e sumos, particularmente aqueles com dois a três hidroxilos fenólicos demonstram-se propagadores do aparecimento de turvação na presença de proteínas com altos teores em prolina que aumentam grandemente com o nível de polimerização dos compostos em questão e pode aumentar dependendo das reações de polimerização que podem ocorrer, criando compostos que são altamente ativos da formação de agregados proteicos.<sup>13</sup> O nível de polimerização aumenta a capacidade de um polifenol de formar ligações com proteínas diferentes, iniciando o processo de agregação.<sup>13</sup>

Outro componente da formação de agregados proteicos é a presença de sulfatos<sup>4</sup>, aniões de Hofmeister conhecidos por precipitar proteínas<sup>14</sup>, cuja presença é garantida pelo processo de fermentação<sup>2</sup> O fermento utilizado não produz geralmente, grandes quantidades de sulfato, produzindo entre 10 e 30 miligramas por litro, mas dependendo da quantidade de açúcares em solução e da estirpe específica de fermento utilizado, as concentrações de sulfatos podem subir para concentrações tao altas como 100 miligramas por litro.<sup>2</sup>

Sulfatos têm um grande efeito na estabilidade proteica, tão grande que a sua capacidade de formar agregados não pode ser apenas atribuída a precipitação de proteínas via *salting out*.<sup>4</sup> Como exemplificado na figura 3, a presença de SO<sub>2</sub> torna a desnaturação de proteínas numa oportunidade de formar ligações covalentes com outras proteínas através da troca de ligações de dissulfureto.<sup>15</sup>

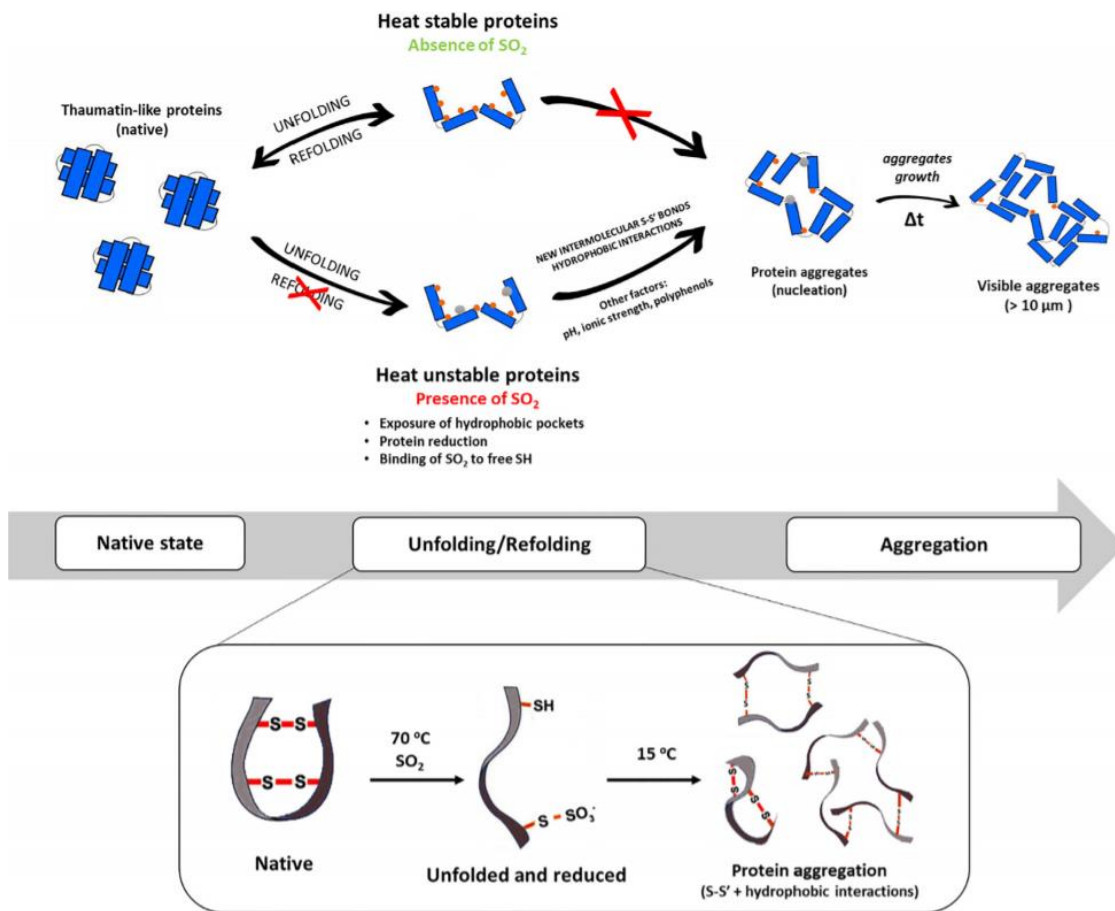


Figura 3 - mecanismo de formação de turvação através da ação de sulfito<sup>15</sup>

Finalmente, os polissacáridos também podem ser componentes causadores de turvação, sendo insolúveis em etanol a sua presença pode levar a turvação do vinho ou mesmo através da precipitação de glicoproteínas associadas. A maioria dos polissacáridos presentes no vinho provem da parede da uva ou de glicoproteínas, no entanto a maioria do conteúdo em polissacarídeos da uva são removidos durante o processo de fermentação quando a concentração de etanol sobe, causando a sua rápida precipitação. Das variadas formas de polissacarídeos e glicoproteínas, apenas as arabinogalactanas de tipo 2, proteínas altamente glicosiladas da parede celular,<sup>16</sup> é que permanecem no vinho depois de finalizado.<sup>17</sup>

### 1.3. Estado de Arte - Processos de estabilização de vinho

#### 1.3.1. Bentonite

A forma mais comum de impedir a turvação proteica de um vinho é removendo o seu conteúdo proteico uma vez que, sem proteínas, não vai ocorrer agregação das mesmas. na grande maioria dos casos, a remoção das proteínas causadoras de turvação, ocorre a partir do tratamento com bentonite.<sup>18</sup>

A bentonite é conhecida como “*the clay of a thousand uses*” devido a vasta variabilidade de usos desde lama de perfuração, a areia para gatos e agente de drenagem.<sup>19</sup> O seus diversos usos são geralmente atribuídos á sua capacidade como adsorvente, no entanto no caso da indústria do vinho, o seu uso é baseado nas suas capacidade como adsorvente.

Esta é uma argila de cinzas volcânicas geralmente minerada em minas de superfície como um mineral filossilicato suave.<sup>17</sup> A sua composição consiste numa combinação de sílica, alumínio e magnésio bem como alguns catiões como cálcio e sódio.<sup>17</sup>

Dependendo do tipo de catiões presentes, a bentonite pode ser caracterizada em dois tipos. Se a composição catiónica for maioritariamente em cálcio, denomina-se de bentonite não expansível dado que o seu volume não aumenta na presença de água. No caso do catião prevalente for o sódio, a bentonite classifica-se como expansível. As bentonites expansíveis formam apenas uma camada de partículas em contacto com a água com sódio, enquanto as bentonites não expansível formam uma dupla camada de partículas de superfície de cálcio.<sup>20</sup>

##### 1.3.1.1. Tratamento com Bentonite

O tratamento de vinhos com bentonite é um processo que permanece relativamente imutável desde a sua aplicação há cerca de 70 anos.<sup>18</sup> A sua aplicação consiste na adição de 0.1 a 1 g de bentonite por litro de vinho dependendo do produto como suspensão, mas não antes de passar por um período de hidratação durante cerca de 2 dias de forma a evitar que a bentonite adsorva água e outros compostos aromáticos e associados a sabores específicos do vinho.<sup>17</sup> Embora toda a bentonite seja insolúvel em vinho ou sumos, a forma de hidratação pode variar dependendo de fornecedores, podendo envolver apenas agitação ou adição de água a ferver.<sup>17</sup>

Devido á presença de catiões a bentonite não possui uma carga formal, mas o substrato da argila tem uma carga negativa devido á sua composição, desta forma a suspensão age através de um processo de troca iónica.<sup>17</sup> É indiferente quais os iões presentes para

a troca iónica, quer sódio ou cálcio, uma vez que ambos os tipos de bentonite têm vantagens e desvantagens. A bentonite de cálcio forma menos sedimento e consequentemente leva a menos problemas durante a sua remoção, o cálcio deixado pela troca iónica não tem um impacto negativo na qualidade do vinho diretamente, mas pode levar à formação de tartarato de cálcio que pode criar as suas próprias precipitações, denominadas de turvações tartáricas. Por outro lado as bentonites de sódio têm, segundo os fornecedores, uma maior capacidade de adsorção de proteínas, mas têm um aumento considerável no seu volume em contacto com a água o que leva a mais gastos em vinho preso na bentonite, adicionalmente resultam na adição de sódio ao vinho que pode reduzir a qualidade do vinho e cujo conteúdo é controlado por agências governamentais.<sup>21</sup>

O álcool presente em vinhos separa as camadas de silicatos o que aumenta a dimensão do espaço acessível para proteínas de maior dimensão, é também por este motivo que o tratamento com bentonite é eficaz. Em vinhos de maior concentração em etanol a capacidade de adsorção da bentonite é também maior.<sup>17</sup>

### 1.3.1.2. Adsorção por Troca Iónica

Adsorção é o processo de captar substâncias de um líquido ou gás num sólido a partir de uma seleção preferencial de um sólido para um ou vários compostos presentes no líquido em questão. Esta preferência pode ser gerada por materiais porosos cuja dimensão vai limitar a o volume dos materiais que se podem armazenar neles.<sup>22</sup>

No caso de troca iónica o material sólido capta substância devido á sua carga formal em vez do seu volume. Utiliza-se um sólido com uma determinada carga que se encontra equilibrada com um contra ião, quando submerso na amostra líquida de escolha, o sólido fica exposto a outros compostos da mesma carga ao contra ião, formando um equilíbrio de troca entre os dois. Para cada molécula de compostos carregado adsorvido para o material, um contra ião é cedido para o sobrenadante.<sup>22</sup>

Esta forma de adsorção não requer a utilização de materiais porosos, uma vez que a forma de captação é somente ligada a concentração de cargas formais no material e na solução, o material pode ser regenerado através da aplicação de uma outra solução de alta força iónica de um sal com o contra ião original. Desta forma o equilíbrio pode ser alterado de forma a prevalecer o contra ião os compostos anteriormente adsorvidos podem ser expulsos para o banho de regeneração.<sup>22</sup>

No caso da bentonite, a troca iónica consiste na substituição do ião positivo associado à bentonite, sódio ou cálcio, com as proteínas presentes no vinho. Como no final da fermentação os vinhos apresentam um pH entre 3 e 4 e a este valor de pH a maioria das proteínas causadoras de turvação encontram-se carregadas positivamente<sup>17</sup>, a bentonite é capaz de se associar aos resíduos carregados de proteínas levando a cabo a sua remoção do meio.

### 1.3.1.3. Desvantagens da Bentonite

Embora o tratamento com bentonite seja bastante eficaz na remoção das proteínas causadoras de turvação proteica, a sua utilização está associada a diversos problemas económicos, enológicos e mesmo ecológicos.<sup>18</sup>

É estimado que a utilização de bentonite resulte numa perda total de 1000 milhões de dólares anualmente na indústria enológica global como o processo com as perdas económicas de maior dimensão.<sup>18</sup> Esta perda é devida a uma combinação de perda literal de vinho e redução de valor devido a perda de qualidade de uma parte do vinho recuperado.

Uma vez que a bentonite é adicionada diretamente ao vinho, quando o processo é finalizado é necessário removê-la do meio. É impossível remover toda a argila que se encontrava suspensa no vinho, sem gerar perdas, uma vez que o vinho removido dos resíduos de bentonite não são da mesma qualidade que o vinho produzido, devido a perda de compostos aromáticos e de paladar importantes.<sup>18</sup> A perda de vinho associada a estes sedimentos é estimada a 5 a 10% do vinho introduzido que fica conseqüentemente perdido, quando extrapolado para os custos globais do processo, estima-se que se percam até 574 milhões de dólares em vinho dentro de sedimento de bentonite.<sup>18</sup>

É possível recorrer a processos para recuperar o vinho presente nas borras de bentonite através de filtração a vácuo de tambor rotativo (RDV), no entanto este processo pode provocar a oxidação do vinho presente, o que significa uma grande perda de qualidade. Os 4.2% do vinho que conseguem ser recuperados através de RDV, são obtidos com cerca de um terço do seu valor original devido a esta perda de qualidade.<sup>18</sup>

Estudos demonstram que o tratamento com bentonite retira mais do que apenas proteínas. Compostos relacionados com o aroma e sabor do vinho também são adsorvidos durante o tratamento com bentonite resultando num vinho inferior no final do processamento.<sup>18</sup>

Por fim, o uso crescente de bentonite tem produzido problemas ecológicos adicionais para além das preocupações regulares de mineração. A utilização de bentonite como matriz de troca iónica resulta num resíduo em forma de lama de que tem de ser removida para aterro. De momento os resíduos têm sido colecionados em locais devidos, no entanto, com o uso contínuo, os aterros tendem a esgotar, resultando num problema ecológico bem como logístico severo para a indústria de vinho.<sup>23</sup>

### 1.3.2. Processos alternativos

Uma vez que a bentonite, embora eficaz, apresenta várias desvantagens é necessário recorrer a processos alternativos de forma a tentar evitar ou remover os aglomerados proteicos do vinho.

A primeira estratégia envolve alterar as interações proteicas de forma a tornar a aglomeração menos favorável, evitando o desenrolamento das proteínas em questão, ou impedindo as suas interações hidrofóbicas.<sup>4</sup> De facto, já existem bebidas que utilizam esta forma de tratamento (e.g. caso do leite e cerveja) onde se utilizam polissacáridos como pectina ou carragenina para estabilizar as proteínas instáveis presentes.<sup>24,25</sup>

Alternativamente poder-se-ia implementar o uso de surfactantes, que embora não ajudassem a estabilizar as proteínas, poderiam ser úteis em limitar a sua agregação uma vez que já são utilizados na estabilização de emulsões.<sup>4</sup> No entanto, não só o uso de surfactantes não é permitido na produção do vinho, como as suas conseqüências na qualidade sensorial podem ser negativas e pode limitar severamente a espuma de espumantes.<sup>4</sup>

Uma segunda estratégia com potencial seria a degradação enzimática das proteínas do vinho. Utilizando enzimas capazes de hidrolisar as ligações peptídicas e sulfurosas, proteases e bissulfito redutases respetivamente, seria possível reduzir o conteúdo proteico do vinho e aumentar o conteúdo em compostos azotados na forma de péptidos e aminoácidos. Uma vez que compostos azotados já são recorrentemente adicionados ao vinho, a utilização de enzimas poderia ter um impacto positivo na sua qualidade, e em adição a remover as proteínas desestabilizadoras.<sup>26</sup>

Uma vez que a remoção de proteínas tem sido um problema na indústria do vinho, seria preferível se as enzimas utilizadas não fossem em si instáveis, e que pudessem permanecer no vinho após realizarem a sua função.

No entanto as proteínas responsáveis pela turvação proteica são difíceis de hidrolisar,<sup>27-29</sup>, quitinases e taumatinas têm um esqueleto péptido rígido e capacidade inibidora de proteases que as fazem resistentes a varias formas de enzima presentes na uva e responsáveis pela degeneração do conteúdo proteico<sup>4,30</sup> o que torna difícil o processo de encontrar enzimas adequadas ao desafio.

No caso das proteases, existem dois grupos que poderiam ser utilizados. As enzimas que reagem diretamente na ligação peptídica como a papaína ou bromelaina, e as proteases que reagem através de moléculas de água ativadas, como metaloproteases e proteases aspárticas.<sup>31</sup>

A cisteína protease que é utilizada na indústria da cerveja,<sup>32</sup> poderia ser implementada na produção de vinho.<sup>4</sup> No entanto tem havido pouco sucesso em encontrar dissulfito redutases eficazes nas condições da produção de vinho<sup>4</sup>. Estudos demonstram que a redução das pontes de dissulfureto são importantes na destabilização da conformação proteica das proteínas do vinho<sup>7</sup> e poderiam ser utilizadas para causar a sua precipitação precoce no vinho.<sup>4</sup> Infelizmente devido a falta de enzimas dissulfito redutases adequadas para a implementação industrial a maioria das aplicações e estudos têm-se focado nas proteases.<sup>4,33</sup>

Mais recentemente estudou-se a aplicação de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com grupos amina, carboxilo e oxazolina revestidas com alilamina, ácido acrílico e 2-etil-2-oxazolina. As partículas foram utilizadas para fazer uma superfície afinada especificamente para a captação de proteínas causadoras de turvação com a capacidade de regeneração com a aplicação de um campo magnético externo. Quando testada, a superfície demonstrou que as proteínas relacionadas com a turvação do vinho são capazes de se ligar tanto aos resíduos negativos dos grupos carboxílicos, mas também aos grupos amina e oxazolinos carregados positivamente. A aplicação de nanopartículas magnéticas demonstrou-se eficaz na remoção das proteínas problemáticas sem alteração do conteúdo fenólico do vinho testado.<sup>34</sup>

Talvez a estratégia mais simples, seria recorrer ao mesmo processo da bentonite, mas com agente de adsorção diferente. De facto já foram testados vários compostos a base de algas, quitina e dióxido de zircónio, zeólitos, bem como outras técnicas de troca iónica e ultrafiltração.<sup>4</sup> Esta ultima, sendo uma técnica com várias membranas e gradientes de pressão e concentração comum na purificação de águas publicas e investigação. A sua aplicação na indústria de vinhos para remoção de partículas parece obvia e de facto a técnica é eficiente na remoção do conteúdo proteico do vinho mas pouco seletiva para além disso.<sup>4,33</sup> No entanto, sua eficiência vem ao custo de seletividade, a ultrafiltração é tão eficaz a remover do compostos do vinho que remove

diversos compostos com propriedades aromáticas ou do sabor do vinho.<sup>33</sup> Adicionalmente, os equipamentos necessários para efetuar o processo são caros e não se adequam às condições da indústria enológica. Algumas destas dificuldades poderiam ser atenuadas através de adaptações para troca catiónica de permutadores de troca iónica de leito compactado, mas tais alterações não nunca foram feitas com sucesso na indústria.<sup>4,35</sup>

Outro composto testado foi o dióxido de zircónio, um composto com eficácia conhecida na adsorção proteica e com capacidade de regeneração.<sup>36</sup>

Demonstrando-se eficaz na remoção de proteínas relacionadas com a turvação do vinho em processos de tratamento vinho antes ou depois da fermentação,<sup>37,38,39</sup> este composto reutilizável é certamente interessante para a indústria, especialmente porque o método de regeneração é apenas uma lavagem.<sup>39</sup> O maior problema face a implementação geral é o facto que requer fluxos lentos com grandes dosagens para a sua eficácia pelo que não são ideais para a o processo industrial enológico.<sup>4</sup>

Dos diversos compostos naturais testados na estabilização proteica de vinhos, os mais prevalentes são zeólitos, a quitina, polissacarídeo estrutural de crustáceos, e a carragenina, um polissacarídeo de algas marinhas vermelhas.

Zeólitos são um mineral cristalino de aluminossilicatos hidratados de sódio e cálcio, a sua estrutura e composição resultam em capacidades de peneira molecular bem como de troca iónica já utilizados em tratamento de águas e esgotos. O excesso de carga negativa na superfície de zeólitos faz com que estes sejam bons candidatos para a captação de proteínas carregadas positivamente em solução sem o comportamento de expansão característico da bentonite.<sup>40</sup>

Embora a capacidade de adsorção proteica dos zeólitos seja menor, sendo necessário utilizar uma maior quantidade de zeólitos para a mesma concentração final de proteínas no vinho, a utilização de zeólitos também está associada a uma diminuição da concentração de potássio do vinho que poderá contribuir para a estabilização de tártaro. Adicionalmente, devido ao facto que os zeólitos não sofrem o mesmo tipo de expansão que a bentonite, o tratamento com estes está associado a uma perda de vinho inferior á associada com a bentonite sem afetar os níveis de fenóis e ácidos do vinho no processo.<sup>40</sup>

Por último, ao contrário da bentonite, os resíduos de zeólitos do tratamento do vinho podem ser reutilizados pela indústria agrícola para alterações do solo, abrindo uma oportunidade importante para a gestão de resíduos que não existe de momento para a bentonite.<sup>40</sup>

A quitina tem interesse particular na indústria enológica porque a sua conformação torna-a seletiva para quitinases, e outros sistemas proteicos que as incluem.<sup>41</sup> Desta forma o polissacarídeo poderia ser adicionado como uma forma relativamente eficaz para remover certas proteínas problemáticas,<sup>4</sup> especialmente porque se trata de um composto já utilizado na indústria alimentar e farmacêutica.<sup>42</sup>

No entanto, a sua especificidade para quitinases não é suficiente para impedir a sua interação com outro tipo de compostos e pode ter impactos significativos na qualidade do vinho removendo diversos outros compostos benéficos.<sup>43</sup>

A carragenina, por outro lado, evita uma grande parte destes problemas. Sendo também ela um polissacarídeo de carga negativa, já foi testada com sucesso para substituir a bentonite em vinhos brancos sem qualquer impacto negativo na sua qualidade sensorial.<sup>44,45,46</sup> Apesar da sua eficácia e seletividade, a carragenina, também é conhecida por deixar resíduos que são por si capazes de formar turvações.<sup>44,45</sup> Este defeito torna a sua utilização ineficaz e impede a sua aplicação geral.<sup>4</sup>

#### 1.4. Uso de dicarboximetil celulose como novo adsorvente de proteínas

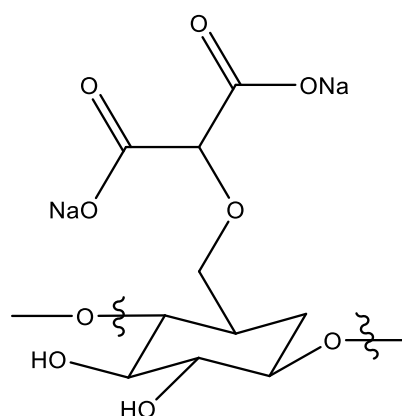


Figura 4 - Sal de dicarboximetilcelulose (DCMC), polímero proposto como substituto de bentonite no tratamento de vinhos

A proposta feita foi a dicarboximetilcelulose(DCMC), representada acima, obtida a partir da celulose um polímero de origem vegetal inofensivo e abundante.<sup>47</sup> . A capacidade de captação é baseada no pH do vinho branco, este vai determinar o estado de protonação das proteínas presentes e dos grupos ácidos carboxílicos da DCMC. A pH 3 as proteínas causadoras de turvação, taumatinas e quitinases,<sup>4</sup> encontram-se carregadas positivamente, <sup>4,48,49</sup> mas a dicarboximetilcelulose encontra se parcialmente desprotonada, devido ao primeiro pKa do ácido malónico.<sup>47</sup> Assim os resíduos protonados das proteínas podem-se associar aos ácidos desprotonados da celulose, descolando iões de sódio num processo reversível através de uma lavagem com uma solução de alta força iónica.<sup>47</sup> Deste modo seria possível levar a cabo o tratamento de vinhos brancos com uma substância inofensiva, eficaz, reciclável, sustentável e económica.

##### 1.4.1. Síntese de Dicarboximetilcelulose

A síntese de DCMC é feita em meio heterogéneo onde a celulose se encontra insolúvel numa mistura de meio aquoso e orgânico. A celulose é colocada numa solução alcalina de 12% a 50% (w/v) de NaOH com um solvente orgânico ,como isopropanol, metanol ou etanol, resultando na ativação da celulose para a reação de eterificação.<sup>47</sup>

O agente eterificante, sendo o eletrófilo da reação é uma forma halogenada do ácido malónico, a forma mais comum deste sendo como ácido bromo malónico, que é adicionado à reação sobre a forma de sal gota a gota numa solução orgânica com agitação e aquecimento. O ácido bromomalónico é atacado pelos grupos hidroxilo ativados da celulose e o grupo malónico é adicionado com a saída dos átomos de bromo como grupo de saída.

Com a reação finalizada o resíduo é protonado e aquecido novamente de forma a levar a cabo a reação de crosslinking por esterificação da dicarboximetilcelulose, representado na figura 5, após o qual o produto encontra-se insolúvel em água e pronto para realizar a troca iónica.

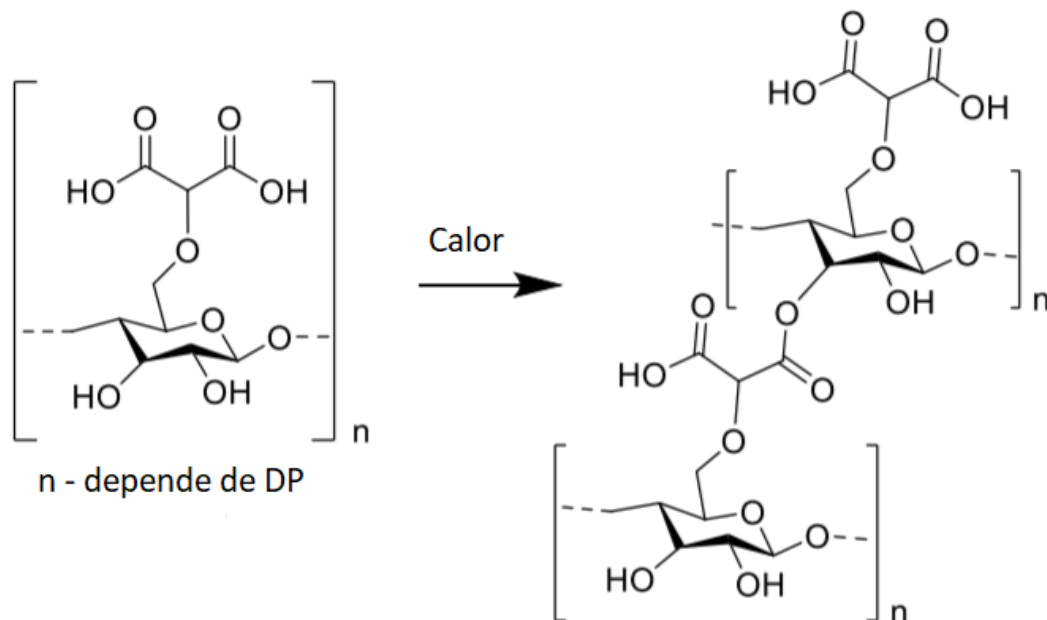


Figura 5<sup>47</sup> - reação de esterificação e crosslinking de DCMC

### 1.5. Desenvolvimento de uma alternativa verde

Quando falamos de química orgânica relacionada a celulose, estamos inevitavelmente a falar de química de polímeros, e conseqüentemente, todas as características e limitações acopladas. Em reações com polímeros a conclusão de uma reação pode ser pouco controlada, uma vez que a substituição de todas as unidades repetitivas de um composto pode ser difícil de exercer, podendo produzir uma grande quantidade de produtos derivados que não podem ser facilmente removidos.

Polímeros produzem conformações secundárias, e possivelmente terciárias, com interações intra e intermoleculares que podem esconder ou expor grupos que teriam conformações diferentes caso não fossem parte da estrutura macromolecular. Estas conformações podem ser alteradas com a progressão das reações e podem ter alterações drásticas nas suas interações com solventes podendo levar a alteração do número de fases presentes. No caso da celulose, existem duas vertentes de reações diferentes dependendo do estado de solubilidade, denominadas de reações homogêneas e heterogêneas.

Em reações homogêneas a celulose encontra-se dissolvida no meio antes da reação desencadear, geralmente envolvendo solventes orgânicos como a dimetilacetamida (DMAC) e o dimetilsulfóxido (DMSO) mas também em água através do congelamento da celulose sólida em solução.<sup>50,51</sup>

Reações heterogêneas ocorrem com celulose num estado de inchaço, onde a estrutura da celulose é alterada pelo uso de hidróxido de sódio de forma a abrir a sua estrutura

cristalina e dar acesso as partes interiores da estrutura secundária. Esta transformação é fundamental e vai determinar em grande parte o nível de substituição final da derivatização.<sup>50</sup>

### 1.5.1. Eterificações de Celulose

Os éteres de celulose podem ser feitos em condições homogêneas bem como heterogêneas, se bem que as produções de escala industrial ocorrem somente sobre a forma heterogênea.<sup>50</sup> Nestas sínteses a celulose é agitada com hidróxido de sódio entre 15-50% com um solvente orgânico como etanol ou isopropanol, a base age como ativador dos grupos hidroxilo da glucose e expande a conformação cristalina, reduzindo a força das pontes de hidrogénio, de forma a que os grupos que se encontram nas zonas interiores da celulose também reajam com o reagente. Quanto maior a quantidade relativa de hidróxido, maior a nucleofílica dos grupos hidroxilo. Os solventes orgânicos adicionados ajudam na dispersão do polímero, do reagente alquilante e no controle da temperatura da reação, bem como auxílio durante o processo de recuperação do produto.<sup>50</sup>

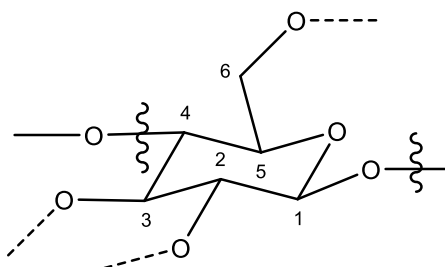


Figura 6 - Unidade de anidro glucose (AGU)

Uma vez que as reações de eterificação se baseiam na funcionalização dos grupos hidroxilo da glucose existem três posições da unidade repetitiva da celulose, a anidro glucose (AGU) (Figura 6, onde grupos podem ser adicionados, nos átomos de oxigênio ligados às posições 2, 3 e 6, resultando num DS máximo de 3, correspondendo a 3 grupos funcionalizados na AGU e 8 formas de derivação hipotéticas. Na realidade, os grupos hidroxilo não têm a mesma reatividade e o que leva a padrões de funcionalização conhecidos. Geralmente, o grupo hidroxilo 6, sendo um álcool primário é o nucleófilo mais reativo, bem como mais acessível, seguido dos álcoois secundários. No entanto, dependendo dos grupos pretendidos e das condições reacionais, a ordem de funcionalização pode alterar, como na produção heterogênea de dicarboximetil celulose onde o primeiro hidroxilo a ser funcionalizado é, ao contrário da previsão anterior, o 2 seguido pelo 6, e só depois o 3.<sup>50</sup>

A presença de hidróxido de sódio resulta na ativação da celulose, e deveria, conseqüentemente, levar ao aumento do grau de substituição com o aumento da sua concentração. No entanto, o aumento da concentração de hidróxido também pode resultar na hidrólise dos agentes de eterificação, diminuindo o nível de substituição, portanto, é importante encontrar um equilíbrio entre a ativação da celulose, as concentrações de reagente de derivatização e os tempos de reação.

A maioria das reações de eterificação de celulose baseiam-se num de três processos reacionais. Podem envolver o ataque dos grupos hidroxilo a um composto halogenado, no caso em se está perante uma eterificação de Williamson, podem resultar do ataque

dos mesmos grupos hidroxilo a um epóxido, ou da reação com uma ligação covalente dupla ativada numa reação de Michael

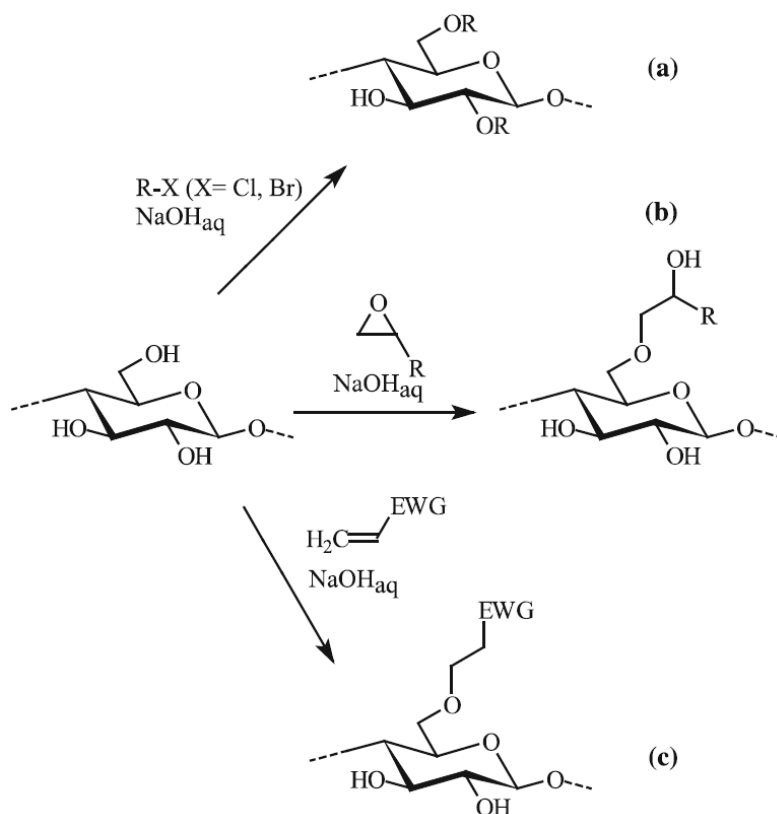


Figura 7<sup>50</sup> - a) eterificação via halogeneto b) eterificação via epóxido c) eterificação via adição de Michael

A síntese da dicarboximetilcelulose (DCMC) baseia-se na primeira estratégia usando o bromomalonato de sódio como eletrófilo. Como a bromação do ácido malónico é uma halogenação da posição  $\alpha$  do ácido, utilizando bromo molecular como reagente o isto implica que a molécula de bromo usada no processo é puramente sacrificial reduzindo a economia atómica e aumentando o fator E da síntese da DCMC.

Uma vez que a maioria dos halogenetos que pudessem substituir o bromo seriam semelhantes em impacto ambiental, esta via, pelo menos de forma tão direta, não é a melhor direção para uma síntese alternativa.

A utilização de um epóxido também não se adequa ao éter pretendido, uma vez que o composto que seria necessária sintetizar para que o ataque da celulose ocorra no carbono pretendido (Figura 8) não se encontra descrito na literatura e seria difícil de sintetizar e utilizar.

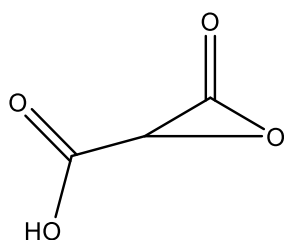


Figura 8 -3-oxoxirane-2-carboxylic ácido, epóxido necessário para levar à DCMC por ataque nucleófilo do hidroxilo da celulose ativada

A última estratégia corrente de eterificação de celulose que se pode aplicar na produção do polímero pretendido seria sobre a forma de uma ligação dupla ativada. Segundo Haines et al.<sup>50</sup> quando estas reações são realizadas, a ligação dupla age como um eletrófilo, ativada por um grupo eletroatrator, geralmente por um ataque uma ligação alfa beta insaturada o que seria possível para a estrutura do ácido metileno malónico (Figura 9), mas, tal como no caso anterior este não é um reagente disponível nem são descritos métodos de síntese viáveis.

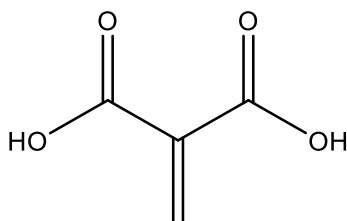


Figura 9 – ácido metileno-malónico - dupla ativada do ácido malónico

## 1.6. Síntese de um polímero alternativo.

As remoções dos átomos de bromo da síntese original implicam não só uma substituição da síntese desenhada procurando um mecanismo alternativo para a reação. Em si, a estratégia de halogenação implica a entrada de um elemento sacrificial, remover o bromo desta reação com um elemento menos problemático provavelmente levaria a um decréscimo de reatividade que não compensaria.

Uma vez que as formas de eterificação da celulose correntes são baseadas na transformação do agente eterificante<sup>50</sup> e que, das estruturas encontradas apenas uma é congruente a síntese e produção foi planeada uma síntese baseada na forma enólica do ácido malónico. Esta espécie é um nucleófilo que terá de atacar um eletrófilo.

A solução necessária é a transformação da celulose num eletrófilo. Os grupos hidroxilo da celulose podem ser protegidos com um grupo eletroatrator, transformando-os assim em bons grupos de saída (Figura 10).

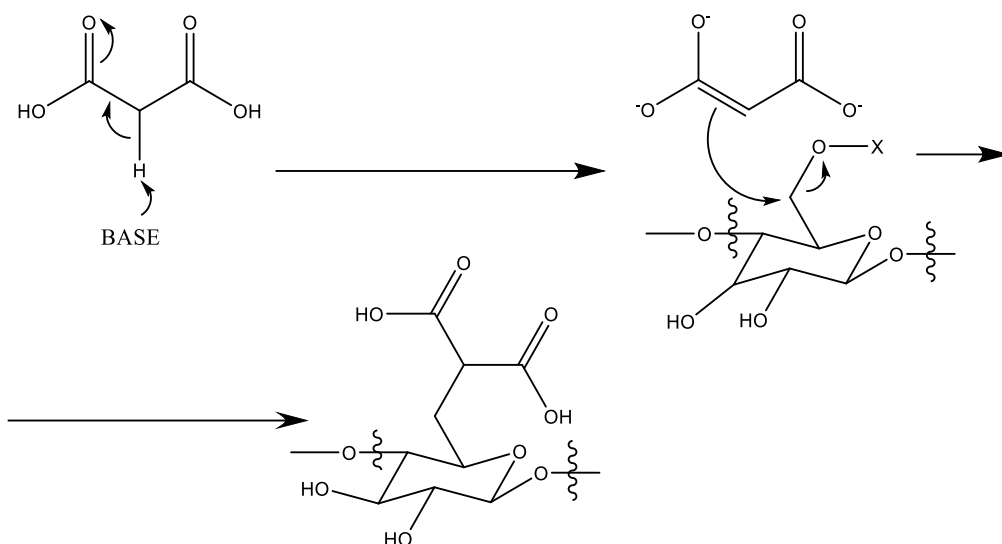


Figura 10 - Proposta para a síntese de um polímero alternativo ao DCMC

A derivatização da celulose com um grupo tosilo de forma a realizar a reação de substituição torna o grupo hidroxilo num grupo de saída, o que resulta num polímero diferente da DCMC original, uma vez que já não se caracteriza como um éter de celulose. Este polímero de celulose, denominado como celulose malónica, tem o grupo malonato a menos uma ligação de distância da DCMC, o que, ao contrário da falta do grupo éter, pode ter consequências negativas na performance da adsorção de proteínas, uma vez que pode estar relacionado a um impedimento estérico superior ao do polímero original.

Este é o ponto de partida para esta tese de mestrado: avaliação da síntese de um derivado malónico-celulósico com propriedades semelhantes à DCMC

## 2. Métodos Laboratoriais

### 2.1. Reagentes e Equipamento

As reações detalhadas decorreram utilizando material corrente de laboratório com solventes orgânico obtidos pelas vias habituais.

A Celulose Avicel PH-101 foi adquirida da Sigma Aldrich juntamente com o cloreto de tosilo, o cloreto de mesilo, o ácido de meldrum ácido tartrónico, o ácido malónico, o bicarbonato de sódio, o ácido trifluoroacético, o malonato de etilo, o polietileno glycol 400, o DCC, o imidazole, o cloreto de lítio, e o álcool tert-butilico. O hidróxido de sódio, o ácido clorídrico e o hidróxido de potássio foram obtidos da Pancreac. O azul de metileno, juntamente com o bromo, foi adquirido a partir da Merck, a trietilamina da Carlo Erba, o cloreto de amónio da Scharlau, o sódio da Riedel-de-Haën, a ureia da May & Baker,

Espectros de RMN foram obtidos em Acance 400 MHz com solventes deuterados apropriados e com tratamento de espectros ocorrendo em MestreNova. Espectros de FT-IR foram obtidos em Perkin Elmer Spectrum Two FT-IR espectrómetro com o acessório Universal ATR Sampler. Espectros e leituras de espectrofotómetro ultravioleta-visível foram obtidos a partir do Espectrofotómetro Spectronic Helios Gamma UV-Vis a 612,5 nm.

### 2.2. Reações Realizadas

#### Síntese de ácido bromo malónico (**1a**)

Para a síntese de ácido bromo malónico, 50 g de ácido malónico seco (em vácuo com aquecimento 60°C durante a noite na presença de KOH) (480,49 mmol, 1 eq) foram adicionados a em 175 mL de éter etílico sobre gelo em atmosfera inerte (N<sub>2</sub>) Após homogeneização da temperatura, foram adicionados 25 mL de Br<sub>2</sub> (76,79 g, 480,49 mmol, 1 eq) utilizando uma ampola isobárica. O bromo foi adicionado gota a gota e, após adição, a reação decorreu durante 1 hora.

O produto foi seco utilizando um evaporador rotativo, seguida de bomba de vácuo até a formação de um sólido nas paredes do balão. Posteriormente o sólido seco foi lavado em DCM, deixado em agitação durante 3 horas e filtrado novamente, sendo recolhido e seco, resultando em 73,4 g (401,19 mmol, rendimento de 83%). O produto apresenta-se como um pó granulado com uma tonalidade salmão.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ 3.38 (s, 10H), 2.09 (s, 1H).

IV: 2965, 2844, 2677, 2532, 1694, 1413, 1301, 1268, 1223, 1197, 1163, 1155, 889, 803, 772, 680, 632, 568 cm<sup>-1</sup>

#### Síntese de bromomalonato de sódio (**1b**)

Utilizaram-se 73,4 g (401,19 mmol, 1 eq) do composto **1a**, ácido bromo malónico, dissolvidos em 100 mL de água destilada com 32 g de NaOH (802,37 mmol, 2 eq) foram adicionadas diretamente no balão 250 mL em agitação sobre gelo.

A solução foi levada a secar até formar um sólido branco foi suspenso em 200 mL de acetona e deixado em agitação com um agitador mecânico durante 2 horas, sendo após o qual foi filtrado e congelado, sendo por fim levado para o liofilizado obtendo 88,85 g (391,55 mmol, 97%)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ 4.65 (d, J = 3.2 Hz, 1H).

IV: 2965, 2844, 2677, 2532, 1694, 1413, 1301, 1268, 1223, 1197, 1163, 1155, 947, 889, 803, 772, 680, 632, 568 cm<sup>-1</sup>

### Síntese de celulose tosilada em meio aquoso com ureia e polietileno glycol (2a)

A uma solução de NaOH (0,92 g, 23,00 mmol) e ureia (1,5 g, 24,98 mmol) num balão 100 mL com 10 mL de água destilada foram adicionados 500 mg de celulose Avicel (2.81mmol, 1 eq). A mistura foi agitada durante 30 min, após os quais a solução foi congelada via azoto líquido.

A solução de celulose foi deixada a descongelar a temperatura ambiente sobre agitação suave. O sólido descongelou numa solução translúcida branca sem precipitações. Foram adicionados 2 mL de polietilenoglicol 400 gota a gota sob agitação, após o qual foram adicionadas 3,79 g de cloreto de tosilo (18,88 mmol, 6,73 eq) resultando numa solução branca espessa.

No final de 5 horas de reação a solução foi precipitada por adição a 250 mL de etanol 80% e o precipitado recuperado por filtração num filtro de placa porosa. O precipitado foi lavado com 100 mL de etanol, e seco em linha de vácuo obtendo-se 1,31 g (73%, 2,05 mmol).

NMR: espectro não obtido

IV: 3340, 2829, 1598, 1359, 1174, 1020, 813, 666, 551 cm<sup>-1</sup>

### Síntese de celulose tosilada em dimetilacetamida (2b)

Foi suspenso 1 g de celulose Avicel (6,13 mmol, 1 eq) seco em 25 mL dimetilacetamida a 160°C com refluxo durante 1 h, após a qual a temperatura foi baixada para 100°C e foram adicionadas 1,96 g de LiCl (8% w/w). A solução foi deixada arrefecer a temperatura ambiente no final da qual se encontrava com uma consistência gelatinosa translúcida, mas com a celulose totalmente dissolvida.

Foram adicionados 1,4 mL de trietilamina (1,02 g, 10,4 mmol, 1,64 eq) para a solução e colocou-se o balão sobre um banho de gelo e água com uma temperatura média de cerca de 10°C para a adição lenta, gota a gota do cloreto de 1,75 g de cloreto de tosilo (9,19 mmol, 1,5 eq) dissolvido em um pouco de dimetilacetamida. Durante a qual se observou uma alteração severa da consistência e coloração da solução. Quando a adição terminou, foi removido o banho de gelo e a solução foi deixada em agitação durante a noite.

A solução foi precipitada gota a gota para 250 mL de água sobre gelo e agitação, resultando numa solução translúcida com flocos brancos precipitados. Estes foram consequentemente filtrados e lavados com água e metanol. O pó branco resultante foi

colocado em pistola de vácuo com KOH sem aquecimento do qual se obterão 1,58 g (6,13 mmol, 81,6%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.98 – 7.27 (m, 2H), 5.49 (s, 1H), 4.55 (d, J = 153.6 Hz, 4H), 2.42 (s, 2H).

IV: 3410, 1633, 1596, 1351, 1174, 1026, 814, 667, 552 cm<sup>-1</sup>

### Síntese de celulose tosilada em Dimetilacetamida Reformulada (2c)

Foram colocados 500 mg de celulose Avicel (2,82 mmol, 1 eq) seca em suspensão em 15 mL dimetilacetamida a 160 °C durante 1 h, deixou-se arrefecer para 100 °C para a adição de 1,18 g de LiCl (9% w/w). Foi removido o aquecimento e a solução foi deixada arrefecer a temperatura ambiente no final da qual se encontrava com uma consistência gelatinosa translúcida, mas com a celulose totalmente dissolvida. Foram adicionados 16 mL trietilamina (11,42 g, 112,88 mmol, 40 eq) para a solução e colocou-se o balão sobre um banho de gelo e água para a adição lenta, gota a gota do cloreto de tosilo (5,38 g, 28,22 mmol, 10 eq) dissolvido em um pouco de trimetilacetamida deixando em agitação durante a noite a temperatura ambiente.

A solução laranja acastanhada opaca com duas fases distintas foi precipitada em 150 mL de água destilada gelada. O precipitado castanho resultante foi filtrado e suspenso em etanol sobre uma placa de aquecimento a 50 °C com agitação durante 1 hora. Após filtração o procedimento foi repetido em água e de seguida etanol. Finalmente os flocos acastanhados recolhidos foram levados a secura em pistola de aquecimento a 50°C sobre vácuo resultando em 921,20 mg (67,2%, 1,9 mmol) de produto.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.02 – 7.21 (m, 9H), 5.50 – 3.89 (m, 5H), 2.45 – 2.38 (m, 9H).

IV: 1597, 1357, 1190, 1174, 1095, 975, 784, 809, 666, 550 cm<sup>-1</sup>

### Síntese de celulose tosilada em meio aquoso reformulada (2d)

Suspenderam-se 5 g de celulose Avicel (28,22 mmol, 1 eq) em 140 mL de água destilada com 12,5 g de NaOH (9% w/w), a solução foi congelada via azoto líquido e descongelada novamente produzindo uma solução límpida de celulose. Adicionaram-se 100 mL de água destilada formando uma solução composta por aproximadamente 2% de celulose e 5% de NaOH.

Foram adicionados 50 mL de trietilamina (34,27 g, 338,65 mmol, 12 eq) à solução e 64.56 g de cloreto de tosilo (338,65 mmol, 12 eq) foram adicionados lentamente sobre a solução sobre gelo tomando uma coloração branca opaca com precipitados visíveis, e deixado sobre agitação durante 24h

A solução branca com precipitados foi vertida sobre 1,5 L de água quente e deixada em agitação, seguida de filtração e suspensão em etanol quente sobre agitação, sendo filtrada uma última vez antes de ser colocada em pistola de vácuo a 50 °C obtendo 9,96 g (72,7%, 20,51 mmol) de pó branco fino.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.64 (d, J = 139.6 Hz, 19H), 5.46 (d, J = 38.5 Hz, 1H), 5.03 – 3.99 (m, 5H), 2.41 (s, 23H).

IV: 3445, 1597, 1356, 1174, 1050, 972, 813, 668, 552  $\text{cm}^{-1}$

### Reação homogênea de celulose com sal de imidazole **5** em meio aquoso (2e)

Suspenderam-se 60 mg de celulose Avicel (338,65  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) foram em 2 mL de água destilada, com 176.08 mg NaOH (4,40 mmol, 13 eq) que foi congelada e descongelada de forma a dissolver a celulose. Verteram-se 300 mg de sal de tosilo e imidazole **5** (1,35 mmol, 4 eq) sobre a solução aquosa de celulose e NaOH e deixado sobre agitação durante 20 min formando uma solução branca com precipitados de sal de imidazole que nunca dissolveram. Verteram-se 470.96 mg de cloreto de amônio (8.80 mmol, 26 eq) para a solução de forma a parar a reação.

O gel espesso formado com vários precipitados visíveis foi filtrada em água e colocado em água quente sobre agitação durante algumas horas, filtrado e posto em etanol quente durante algumas horas adicionais. Por fim foi posto em linha de vácuo para secar obtendo-se 28,43 mg (25,3%, 85,80  $\mu\text{mol}$ ).

NMR: espectro não obtido

IV: 3326, 2975, 2893, 1650, 1373, 1315, 1156, 1043, 997, 879, 671, 593  $\text{cm}^{-1}$

### Reação heterogênea de celulose com sal de imidazole **5** em meio aquoso (2f)

Suspenderam-se 60 mg de celulose Avicel (338,65  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) em 2 mL de água destilada, 300 mg do sal de tosilo e imidazole **5** (1,35 mmol, 4 eq) foram vertido sobre a solução aquosa de celulose e ficou em agitação duas horas, 176 mg NaOH (4.40 mmol, 13 eq) foram adicionado na menor quantidade de água possível e foi deixado em agitação durante 20 minutos, após o qual se parou o a reação adicionando 470 mg de cloreto de Amônio (8,80 mmol, 26 eq).

O gel espesso formado com vários precipitados visíveis foi filtrada em água e colocado em água quente sobre agitação durante 3 horas e etanol quente durante 1 hora, sendo depois filtrado e seco via linha de vácuo produzindo 95,6 mg (85,19%, 288,51  $\mu\text{mol}$ )

NMR: espectro não obtido

IV: 3335, 2898, 1640, 1428, 1315, 1160, 1106, 1054, 1031, 897, 665, 558  $\text{cm}^{-1}$

### Reação homogênea de celulose com sal de imidazole **5** em meio orgânico (2g)

Suspenderam-se 40 mg de celulose Avicel (225,76 $\mu\text{mol}$ , 1 eq) em 2 mL dimetilacetamida a 160 °C durante 1h, deixando arrefecer a 100 °C para a adição de 168 mg (9%, w/w DMAc) de LiCl, após o qual foi removido o aquecimento e a solução foi deixada arrefecer a temperatura ambiente. Ficando com uma consistência gelatinosa translúcida, mas com a celulose totalmente dissolvida.

Com a celulose completamente dissolvida, adicionaram-se os 200 mg do sal de imidazole (903,05  $\mu\text{mol}$ , 4 eq) e deixou-se a reação ocorrer durante a noite.

Adicionaram-se 117,39 mg de NaOH (2,93 mmol, 13 eq) à solução e foi deixado em agitação durante mais 20 minutos em agitação, após o qual se adicionou 313,97 mg de cloreto de amónio (5,87 mmol, 26 eq).

O gel espesso formado com vários precipitados visíveis foi filtrada em água e colocado em água quente sobre agitação durante algumas horas, filtrado e posto em etanol quente durante algumas horas adicionais após as quais foi filtrado e seco em linha de vácuo produzindo 35,75 mg (47,8%, 107,89 mmol) de produto.

NMR: espectro não obtido

IV: 3339, 2890, 1725, 1634, 1367, 1157, 1018, 897  $\text{cm}^{-1}$

### Reação da celulose tosilada **2b** com ácido malónico (**3a**)

Foram colocadas 150 mg do composto **2b** da num balão de 10 mL com 3 mL de DMSO e com 98 mg de ácido malónico, a 80°C durante a noite.

A solução foi deixada arrefecer à temperatura ambiente e foi precipitada em 10 mL de uma solução de 70% metanol/água gelada. O precipitado foi filtrado em filtro de placa e lavado com metanol adicional e finalmente secado a vácuo resultando em 58,9 mg (50%, 2,3636  $\mu\text{mol}$ ) composto isolado.

NMR: espectro não obtido

IV: 3367, 1734, 1638, 1596, 1351, 1174, 1014, 813  $\text{cm}^{-1}$

### Reação da celulose tosilada **2b** com ácido malónico e Trietilamina (**3b**)

Foram colocados 1,58 g de Celulose Tosilada **2b** (4,97 mmol, 1 eq) num balão 25 mL dissolvidas em 30 mL de DMSO formando novamente um gel espesso que eventualmente dissolveu a celulose totalmente, foram adicionados 12,5 mL de Trietilamina (89,47 mmol, 18 eq) e 3,10 g de Ácido Malónico (29,82 mmol, 6 eq) para a solução. Esperou-se em agitação que a solução chegasse a dissolução total de todos os compostos e iniciou-se aquecimento a 80°C durante a noite.

A reação foi arrefecida a temperatura ambiente, ficando translúcida amarelada. Esta foi pipetada gota a gota para uma solução de 50 mL de isopropanol gelado formando um precipitado branco que foi posteriormente filtrado e suspenso em 10 mL de uma solução saturada de Carbonato de Sódio.

No final de 3 horas de agitação, a solução foi precipitada com metanol e filtrada em filtro de placa e posto a secar em pistola de vácuo a 60°C para ser finalmente colocado em dialise com 300 mL de água destilada após a qual foi seco em linha de vácuo resultando em 1,22 g (98,2%, 4,88mmol) de pó branco.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.66 (dd,  $J = 140.2, 7.7$  Hz, 0H), 5.49 – 5.36 (m, 1H), 5.03 – 3.95 (m, 1H), 2.43 (d,  $J = 5.0$  Hz, 0H),

IV: 3370, 2888, 1732, 1642, 1367, 1258, 1156, 1012, 798,  $\text{cm}^{-1}$

### Reação de celulose mesilada **4** com ácido malónico (**3c**)

Dissolveu-se 1 g de celulose mesilada **4** em 20 mL de DMSO formando novamente um gel espesso que eventualmente dissolveu a celulose totalmente, foram adicionados 2.1 mL de trietilamina (1,51 g, 14.92 mmol, 18 eq) e 518 mg de ácido malónico (4,97 mmol, 6 eq) para a solução. Esperou-se em agitação que a solução chegasse a dissolução total de todos os compostos e iniciou-se aquecimento a 80°C no qual permaneceu durante a noite. Deixou-se a solução arrefecer, que estava opaca, preta, mas líquida. Esta solução foi adicionada gota a gota para uma solução de 150 mL de isopropanol gelado formando um precipitado fino que foi posteriormente filtrado. O sólido castanho resultante foi lavado mais uma vez com isopropanol e metanol em ultrassons e voltado a ser filtrado sendo posteriormente suspenso em 10 mL de uma solução saturada de carbonato de sódio em agitação durante 1 h. O sólido resultante foi lavado com 70 mL de metanol e seco durante a noite em pistola de secagem a 60 °C resultando em 972,2 mg (93,1%, 3,9 mmol) de produto.

NMR: espectro não obtido

IV: 3335, 1440, 1160, 1110, 1057, 1033, 877, 559 cm<sup>-1</sup>

### Reação de celulose de Meldrum **8b** com NaOH (**3d**)

Adicionaram-se 100 mg de celulose de Meldrum **23** (518,56 µmol, 1 eq) a 2 mL de água destilada e 40 mg de hidróxido de sódio (777,85 µmol, 1,5 eq) formando uma solução de 10% NaOH que foi aquecida a 50°C durante 48h.

A solução branca amarelada foi vertida lentamente sobre 10 mL de metanol quente e conseqüentemente centrifugado e lavado consecutivamente 3 vezes, após o qual foi filtrado e seco via linha de vácuo produzindo 121,30 mg (79,8%, 413,77 µmol) de pó branco.

NMR: espectro não obtido

IV: 3410, 1737, 1633, 1598, 1356, 1175, 1029, 813, 666, 552 cm<sup>-1</sup>

### Reação de celulose de Meldrum **8b** com NaOH em Micro-ondas (**3e**)

Suspenderam-se 145 mg de Celulose de Meldrum **8b** (345,71 µmol, 1 eq) em 3,5 mL de etanol com 1,5 mL de uma solução de 10% NaOH. A solução foi posta em agitação e colocada no micro-ondas de síntese sendo aquecida até aos 100°C o mais rápido possível, permanecendo 30 segundos e deixada a arrefecer, o processo foi repetido 6 vezes de forma a ter um tempo total de irradiação de 3 minutos.

A solução foi precipitada em metanol e deixada em agitação até ser filtrada, o processo foi repetido mais uma vez e o pó fino acastanhado claro resultante foi secado em linha de vácuo produzindo 32 mg (31,57%, 109,16 µmol) produto.

NMR: espectro não obtido

IV: 3377, 1725, 1627, 1598, 1363, 1023, 813, 667, 552 cm<sup>-1</sup>

### Reação de Celulose de tertbutil malonato **10** com ácido trifluoroacético (3f)

Suspendeu-se 200 mg de celulose de tert-butil malonato **10** (489,75  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) em 6 mL de metanol e 260 mL de ácido trifluoroacético (335,05 mg, 2,94 mmol, 6 eq). A reação permaneceu a 20°C durante 24h sobre agitação.

A solução branca amarelada foi vertida lentamente sobre 10 mL de metanol quente e consequentemente centrifugado, lavado com metanol e seco sobre linha de vácuo produzindo 171,60 mg (140,6%, 668,62  $\mu\text{mol}$ ) de produto.

NMR: espectro não obtido

IV: 3390, 1725, 1644, 1598, 1366, 1172, 1026, 922, 814, 667, 553  $\text{cm}^{-1}$

### Reação de Celulose de tertbutil malonato **10** com ácido trifluoroacético em micro-ondas (3g)

145 mg de Celulose de tert-Butilmalonato **10** (553,39  $\mu\text{mol}$ , 1 eq), foram suspensos em 6 mL de etanol com 0.2 mL de ácido trifluoroacético (378,59 mg, 3,32 mmol, 6 eq). A solução foi colocada no micro-ondas de síntese com agitação sendo aquecida até aos 100°C o mais rápido possível, permanecendo 30 segundos e deixada a arrefecer, o processo foi repetido 6 vezes de forma a ter um tempo total de irradiação de 3 minutos.

A solução foi precipitada em metanol e deixada em agitação até ser filtrada, o processo foi repetido mais uma vez e o pó fino acastanhado claro foi secado em coluna de vácuo produzindo 128,3 mg (93%, 514,84  $\mu\text{mol}$ ).

NMR: espectro não obtido

IV: 3397, 2892, 1726, 1645, 1595, 1365, 1176, 1058, 922, 814, 667, 553  $\text{cm}^{-1}$

### Reação de celulose de Meldrum **8b** com ácido clorídrico (3h)

Suspendeu-se 200 mg de celulose de Meldrum **8b** (518,56  $\mu\text{mol}$ ) em 25 mL com 10 mL de uma solução de 0.1M de ácido clorídrico 1h sem aquecimento.

A solução branca amarelada foi vertida lentamente sobre 100 mL de metanol quente e filtrado. O sólido branco foi colocado numa solução com 2 eq de NaOH em 0,2 M, durante 30min, após o qual se adicionou NaCl até saturação e na qual se deixou 30 minutos adicionais e foi posteriormente filtrado e seco em linha de vácuo produzindo 123,80 mg (95,8%, 496,80  $\mu\text{mol}$ ).

NMR: espectro não obtido

IV: 3366, 1730, 1634, 1366, 1176, 1019, 813, 666, 572  $\text{cm}^{-1}$

### Síntese de celulose mesilada em piridina (4)

Um grama de celulose Avicel (6,13 mmol, 1 eq) seca da pistola de vácuo com KOH 24h antes da reação foi, e posto em refluxo com 25 mL de dimetilacetamida a 160°C durante 1h, após a qual a temperatura foi baixada para 100°C e foram adicionadas 1,96 g de LiCl (8% w/w). Foi removido o aquecimento e a solução foi deixada arrefecer a

temperatura ambiente no final da qual se encontrava com uma consistência gelatinosa translúcida, mas com a celulose totalmente dissolvida.

Foram adicionados 7,5 mL de piridina (7,27 g, 91,94 mmol, 15 eq) para a solução e colocou-se o balão sobre um banho de gelo e água com uma temperatura média de cerca de 10°C para a adição gota a gota de 4,74 mL de cloreto de mesilo (7,02 g, 61,29 mmol, 10 eq) durante a qual se observou uma alteração severa da consistência e coloração da solução. Com a adição do cloreto de mesilo banho de gelo foi removido e a solução foi deixada em agitação durante a noite.

Com a reação finalizada foi adicionado 10 mL de água sobre gelo e agitação. A solução foi então levada a secar para remover água e quaisquer outros compostos que possam sair da solução.

A solução resultante foi precipitada gota a gota sobre 200 mL de metanol sobre gelo e agitação, resultando numa solução laranja escura com precipitados brancos que foram filtrados com filtro de placa, suspensos em metanol e lavados com ultrassons e finalmente filtrados novamente e secados.

O sólido foi lavado com uma solução de 1M de Carbonato de sódio e filtrado duas vezes, de seguida foi suspenso em 30 mL de água durante 2g, sendo finalmente seco e rota vapor e linha de vácuo resultando em 999 mg (73%, 4,47 mmol) de pó acastanhado.

NMR: espectro não obtido

IV: 3337, 2900, 1732, 1663, 1336, 1235, 1163, 1107, 1031, 837, 552 cm<sup>-1</sup>

### Síntese de 1-(p-Toluenesulfonyl)imidazole (5)

Foi colocado 1 g de cloreto de tosilo (5,25 mmol, 1 eq) em 5 mL de diclorometano em agitação até se dissolver, ao qual se adicionou 360 mg de imidazole (5,25 mmol, 1 eq) em agitação constante. Fez-se uma solução de 530 mg de bicarbonato de sódio (6,29 mmol, 1,2 eq) em 7 mL de água destilada que foi vertida na solução anterior, formando duas fases distintas, com a fase aquosa no topo.

Por fim adicionou-se 0.8 mL de trietilamina (524,55 µmol, 0,10 eq) para a solução e deixou-se em agitação a temperatura ambiente durante 72g.

A fase orgânica foi separada da aquosa e lavada 2 vezes com água destilada. O volume de DCM foi reduzido por evaporação até a coloração da solução ficar amarelada, mas sem precipitados, seguidamente foi adicionado hexano gota-a-gota até se formarem pequenos precipitados e deixou-se a solução cristalizar durante a noite obtendo 810,30 mg (69,5%, 3,65mmol) de cristais.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.03 (s, 1H), 7.85 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.31 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 2.46 (s, 3H).

IV: 3160, 3103, 3031, 1593, 1515, 1380, 1154 cm<sup>-1</sup>

### Reação de celulose tosilada 2d com azida de sódio (6)

Dissolveram-se 200 mg da celulose tosilada 2d (630,25 mmol, 1 eq) em 4 mL de DMF, após o qual se adicionou 103 mg de azida de sódio (1,58 mmol, 2,5 eq) sobre agitação.

A solução foi deixada em agitação a 100 °C durante 24 h. A solução acastanhada foi precipitada em 100 mL de água destilada gelada, seguida de filtração formando uma pasta castanha que foi suspensa em etanol sobre agitação e filtrada novamente e seca sobre linha de vácuo obtendo 68 mg (58%, 365,64  $\mu\text{mol}$ ) de pó acastanhado.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.68 (d, J = 124.5 Hz, 1H), 5.47 (d, J = 55.5 Hz, 1H), 5.01 – 3.94 (m, 4H), 2.45 (s, 1H),

IV: 3390, 2100, 1626, 1279, 1040, 813, 551  $\text{cm}^{-1}$

### Reação de malonato de etilo com Celulose tosilada (7)

Destilou-se e adicionou-se 500 mL de etanol seco a 15 mg de Sódio (630,25  $\mu\text{mol}$ , 2 eq) que foram deixadas reagir por completo, formando uma solução de cerca de 7% de etóxido de sódio em etanol que foi adicionada a 97 mL de malonato de etilo (630,25  $\mu\text{mol}$ , 2 eq) a temperatura ambiente, sobre agitação e deixada a reagir durante 2 h.

Dissolveram-se 100 mg de celulose tosilada **2d** (315,13  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) em 700 mL de DMF, e foram adicionadas gota-a-gota á solução de reação de etóxido de sódio, formando precipitados que se dissolveram com a adição contínua de mais celulose tosilada em DMF. Com a adição realizada, a solução foi colocada a 100 °C com agitação constante.

A solução amarela acastanhada foi precipitada sobre 20 mL de metanol sobre agitação, filtrado obtendo um sólido fino amarelado e vertido sobre metanol quente sobre agitação durante 1 hora antes de ser filtrado novamente e posto em linha de vácuo obtendo-se 35,4 mg (36,8%, 115,95  $\mu\text{mol}$ ).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.65 (d, J = 131.5 Hz, 3H), 4.56 (d, J = 359.3 Hz, 5H), 2.42 (s, 3H), -3.47 (s, 0H).

IV: 3445, 1721, 1587, 1359, 1175, 994, 813, 666, 572  $\text{cm}^{-1}$

### Reação de celulose tosilada **2d** com ácido de meldrum (8a)

Dissolveram-se 114 mg de ácido de meldrum (787,8  $\mu\text{mol}$ , 2,5 eq) em 3 mL de DMF no qual se adicionaram 131 mg de carbonato de potássio (130,66 mg, 945,38  $\mu\text{mol}$ ) que foram deixadas reagir durante 2 h. O sobrenadante foi recolhido e adicionado gota a gota sobre uma solução de 100 mg de celulose tosilada (315,13  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) em 2 mL de DMF durante um período de cerca de 2 h, após o qual foi deixado a reagir durante aproximadamente 96 h.

A solução gelatinosa translúcida foi precipitada, gota a gota, sobre 50 mL de metanol em agitação, o sólido foi recolhido por filtração e colocado em linha de vácuo produzindo 94.20 mg (103,4 %, 325,66  $\mu\text{mol}$ ) de produto.

NMR: espectro não obtido

IV: 3507, 1598, 1354, 1095, 1050, 1173, 970, 811, 667, 551  $\text{cm}^{-1}$

## Adição de Ácido de Meldrum a Celulose Tosilada por Etóxido de Sódio (8b)

Destilaram-se 500 mL de etanol adicionou-se 15 mg de sódio (630,25 $\mu$ mol, 2 eq) que foram deixadas reagir até não se observar qualquer sódio sólido formando uma solução de cerca de 7% de etóxido de sódio em etanol que foi adicionada a 91 mg de Ácido de Meldrum(630,25 $\mu$ mol, 2 eq) a temperatura ambiente, lentamente, sobre agitação e deixada a reagir durante 2g após as quais se observou que tinham formado precipitados brancos.

As 100 mg de celulose tosilada **14** (315,13  $\mu$ mol, 1 eq) foram dissolvidas parcialmente em 700m mL de DMF, e foram adicionadas gota-a-gota á solução de reação de etóxido de sódio, formando precipitados que se dissolveram com a adição continua de mais celulose em DMF. Com a adição realizada, a solução foi posta em aquecimento a 100°C sobre refluxo em atmosfera inerte N<sub>2</sub>.

A solução amarela acastanhada foi precipitada sobre 20 mL de metanol sobre agitação, filtrado obtendo um sólido fino amarelado e vertido sobre metanol quente sobre agitação no qual ficou algumas horas antes de ser filtrado novamente e posto em linha de vácuo 33,6 mg (36,9%, 116,16  $\mu$ mol).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  15.68 (s, 1H), 7.66 (d, J = 134.9 Hz, 6H), 5.54 – 3.90 (m, 5H), 2.42 (s, 4H), -3.45 (s, 1H).

IV: 3426, 1732, 1597, 1360, 1175, 1028, 814, 667, 552 cm<sup>-1</sup>

## Síntese de tert-butilmalonato através da esterificação de ácido malónico com DCC (9a)

Foi feita uma solução de 1 g de Ácido Malónico (9,61 mmol, 1 eq) e 2 mL de álcool tert-butílico (1,42 g, 19,22 mmol, 2 eq) em 30 mL de acetonitrilo e colocada a 30°C. A esta solução foi adicionada uma segunda solução de 4 g de DCC (19,22 mmol, 2 eq) em 20 mL de acetonitrilo, resultando numa solução branca espessa opaca imediatamente. A reação foi deixada em agitação a 30°C durante 20 minutos.

A solução branca espessa foi filtrada e evaporada, formando cristais precipitados. A solução amarela oleosa resultante foi lavada com diclorometano, filtrada e evaporada novamente até não se observar mais formação de cristais durante o processo de evaporação produzindo 1,74 g (83,5%, 8,03 mmol).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  3.72 (s, 4H), 3.20 (s, 2H),

IV: 2979, 2934, 2857, 1725, 1523, 1455, 1393, 1368, 1330, 1285, 1253, 1132, 1083, 1039, 970, 888, 873, 837, 765, 612, 459 cm<sup>-1</sup>

## Síntese de tert-butilmalonato através de esterificação ácida (9b)

Dissolveu-se 1 g de Ácido Malónico (9,61 mmol, 1 eq) em 5 mL de Acetonitrilo seco, foram adicionados 2 mL de álcool tert-butílico (1,42 g, 19,22 mmol, 2 eq) e 165 mg de ácido p-tolueno sulfónico (960,97 $\mu$ mol, 0,1 eq) e a reação foi colocada em agitação e refluxo a 90°C durante a noite.

A solução amarelada foi evaporada, suspendida e diclorometano, filtrada, evaporada levada a secura em linha de vácuo produzindo 1,77 g (85,2%, 8,18 mmol) de óleo.

NMR: espectro não obtido

IV: 3343, 2972, 1710, 1629, 1554, 1367, 1219, 1166, 1123, 1034, 1010, 911, 816, 683, 566, 481  $\text{cm}^{-1}$

### Reação de celulose tosilada **2d** com tert-butilmalonato (**10**)

Destilaram-se 5 mL de etanol que foram adicionados a 145 mg de Sódio (6,30 mmol, 2 eq) que foram deixadas reagir por completo formando uma solução de cerca de 7% de etóxido de sódio em etanol que foi adicionada a 1,5 mL de tert-Butilmalonato(1,36 g, 6,30 mmol, 2 eq) a temperatura ambiente, sobre agitação e deixada a reagir durante 2g.

Dissolveu-se 1 g de celulose tosilada **2d** (3,15 mmol, 1 eq) em 4 mL de DMF, e foram adicionou-se á solução de reação de etóxido de sódio, formando precipitados que se dissolveram com a adição continua de mais celulose em DMF. Com a adição realizada, a solução foi posta em aquecimento a 100°C sobre refluxo em atmosfera inerte durante 40h.

A solução foi precipitada sobre 200 mL de metanol sobre agitação, filtrado obtendo um solido fino amarelado e vertido sobre metanol quente sobre agitação no qual ficou 3 horas, resultando num produto amarelado claro que foi filtrado novamente e posto em linha de vácuo obtendo 404,70 mg (35,5%, 1,12 mmol) de pó claro.

NMR: espectro não obtido

IV: 3400, 2893, 1726, 1651, 1366, 1176, 1027, 813, 667, 553  $\text{cm}^{-1}$

### Reação de celulose tosilada **2d** com ácido tartrónico (**11**)

Destilaram-se 8 mL de etanol e adicionou-se a 435 mg de Sódio (18,91 mmol, 6 eq) que foram deixadas reagir com sódio solido formando uma solução de cerca de 7% de etóxido de sódio em etanol que foi adicionada a 757 mg de Ácido tartárico (6,30 mmol, 2 eq) a temperatura ambiente, lentamente, sobre agitação e deixada a reagir durante 2g após as quais se observou que tinham formado precipitados brancos.

Dissolveu-se 1 g de celulose tosilada **2d** (3,15 mmol, 1 eq) em 10 mL de DMF, e foi adicionado á solução de reação de etóxido de sódio, formando uma solução opaca que escureceu de coloração rapidamente sem aquecimento. Com a adição realizada, a solução foi posta em aquecimento a 50°C, 24h.

No final de 24h de reação, a solução acastanhada foi precipitada sobre 200 mL de metanol sobre agitação e ligeiramente aquecido, no qual foi lavado repetidamente até não se notar diferença de coloração no metanol filtrado, o solido pó acastanhado claro foi lavado com etanol e Iso propanol e finalmente com acetona de forma a produzir um pó solto claro que foi colocado em linha de vácuo produzindo 235 mg (28,1%, 886,14  $\mu\text{mol}$ ).

NMR: espectro não obtido

IV: 3391, 1633, 1360, 1024, 811, 553  $\text{cm}^{-1}$



## 2.3. Processos analíticos

### Testes preliminares de atividade

Os testes preliminares constituíram em colocar cerca de 4 mg de polímero num politop, no qual foram adicionados 2 mL de uma solução de azul metileno com 40 mg/L a pH3. A solução foi deixada durante 48 h sem agitação no final das quais se observou a tonalidade da solução de forma a determinar a sua capacidade de adsorção.

### Testes de adsorção

Os testes de adsorção foram realizados através da adição de 4mg de polímero colocadas em falcons, foram realizadas soluções de azul metileno de concentrações crescentes de 40 mg/L a 1200 mg/L a pH3, as amostras de polímero foram suspensas em triplicado em 2 mL de cada solução resultando em 18 amostras por polímero. ~

As amostras foram deixadas em repouso durante 48 horas com agitação ocasional a temperatura ambiente, no final das quais foram centrifugadas com o polímero sendo descartado e o sobrenadante guardado em *vials*. Cada amostra foi diluída, dependendo da concentração inicial, para um máximo de 10 mg/L e foram analisadas via espectrofotómetro onde as absorvâncias foram extrapoladas para concentrações de azul metileno finais através de uma reta de calibração.

As concentrações calculadas foram subtraídas as concentrações iniciais de cada amostra, e a diferença foi dividida por gramas de polímero utilizada, resultando em miligramas de azul metileno adsorvidas por grama de polímero.

### 3. Discussão

#### 3.1. Análise da síntese descrita de DCMC

O primeiro passo para a formulação de uma síntese alternativa da DCMC consiste na análise dos passos sintéticos e condições reacionais para preparar o polímero original (figura 11).

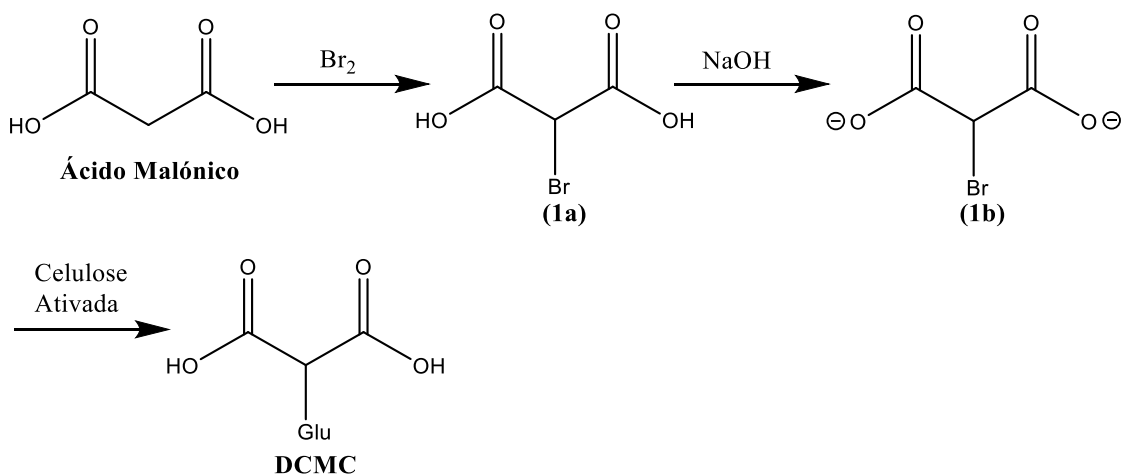


Figura 11 - esquema da síntese de DCMC<sup>47</sup>

A síntese da dicarboximetilcelulose começa não na celulose em si, mas na produção do agente eterificante, o bromomalonato de sódio que só depois pode ser adicionado à celulose com a qual vai reagir. Esta sucessão de três reações representada em cima na figura 11 corresponde à produção base da DCMC, e será a sucessão de reações que será analisada nesta discussão.

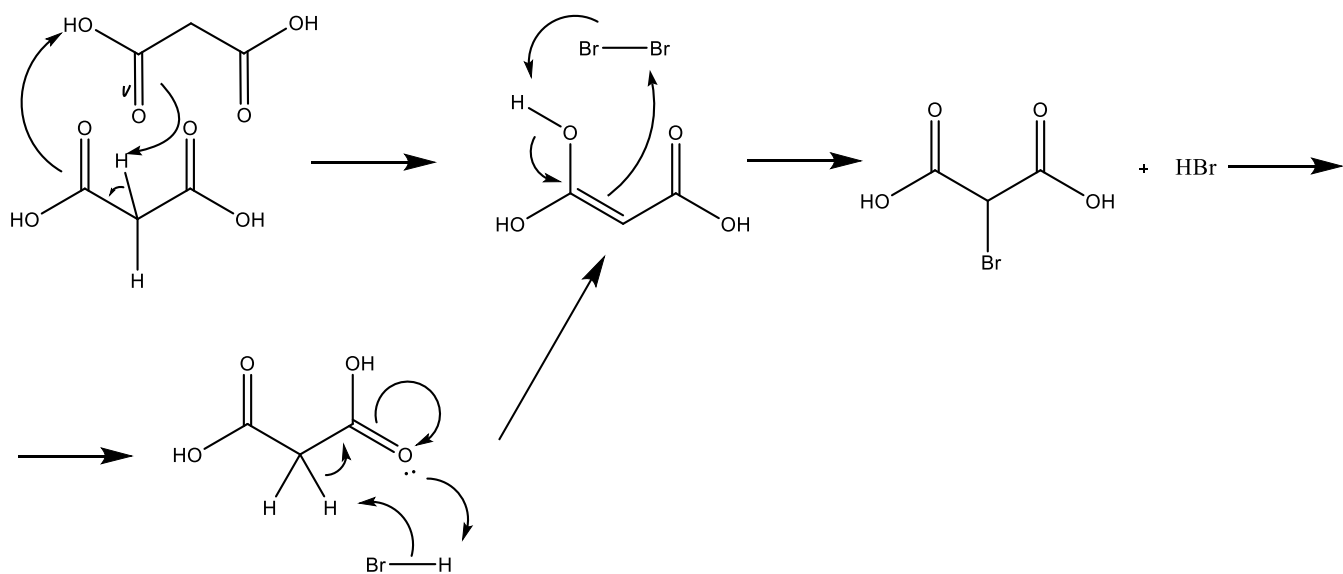


Figura 12 – Mecanismo proposto para a preparação de Ácido Bromo malónico

Da forma representada, o ácido bromo malónico é funcionalizado com o halogênio bromo, no carbono 2 via enol ácido autocatalisado. A reação é iniciada pela função ácida do ácido malónico, esta gera uma forma de enol inicial que tem a capacidade nucleofílica para atacar o bromo molecular. A halogenação resultante do ataque leva a produção de ácido bromídrico que vai continuar em solução e exercer o trabalho de ácido catalisador,

levando à formação de mais formas enólicas do ácido malónico que vão por sua vez levar a mais formas halogenadas que formam mais ácido bromídrico.

Na reação, este mecanismo é aparente pela alteração de coloração, a coloração laranja resultante da adição do bromo permanece relativamente igual durante os primeiros minutos enquanto as primeiras autocatálises de enol vão ocorrendo lentamente, quando estas chegam a um volume crítico a solução muda rapidamente de cor, ficando visivelmente mais clara. Isto pode ser explicado pela cinética das formações de enóis, o enol inicial produto de duas moléculas de ácido malónico, um ácido fraco, é mais vagaroso e difícil de ocorrer do que o enol levado a cabo pelo ácido bromídrico, um ácido forte.

A reação de halogenação ocorre em meio ácido de forma a limitar a derivatização do ácido malónico a um átomo de bromo. Se a bromação do ácido ocorresse em meio básico a introdução do primeiro átomo de bromo no ácido malónico iria aumentar a acidez do segundo átomo de hidrogénio alfa, pelo que seria facilitada a remoção de átomos de hidrogénio levando à formação de ácido malónico dibromado.

Adicionalmente a reação é feita em éter etílico, que embora não seja capaz de levar à dissolução do ácido malónico, é capaz de dissolver o ácido bromomalónico. Desta forma existe uma pressão entrópica para o consumo do reagente inicial.

O *work-up* do ácido bromo malónico tem de incluir, para além de diversos passos de limpeza para garantir que não existem restos bromo e ácido bromídrico, um passo de basificação do produto, uma vez que, como explicado anteriormente, a celulose tem que ser ativada numa solução alcalina para que esteja acessível e reativa para realizar um ataque nucleófilo.<sup>50</sup> A síntese do composto **1b** representa uma desprotonação do ácido bromomalónico para que este possa ser adicionado à solução de celulose ativada em solução aquosa.

Quando analisado por FT-IR, figura 13, a formação do sal pode ser confirmada através do *shift* do pico do carbonilo ácido a 1695  $\text{cm}^{-1}$  para 1585  $\text{cm}^{-1}$  no sal.

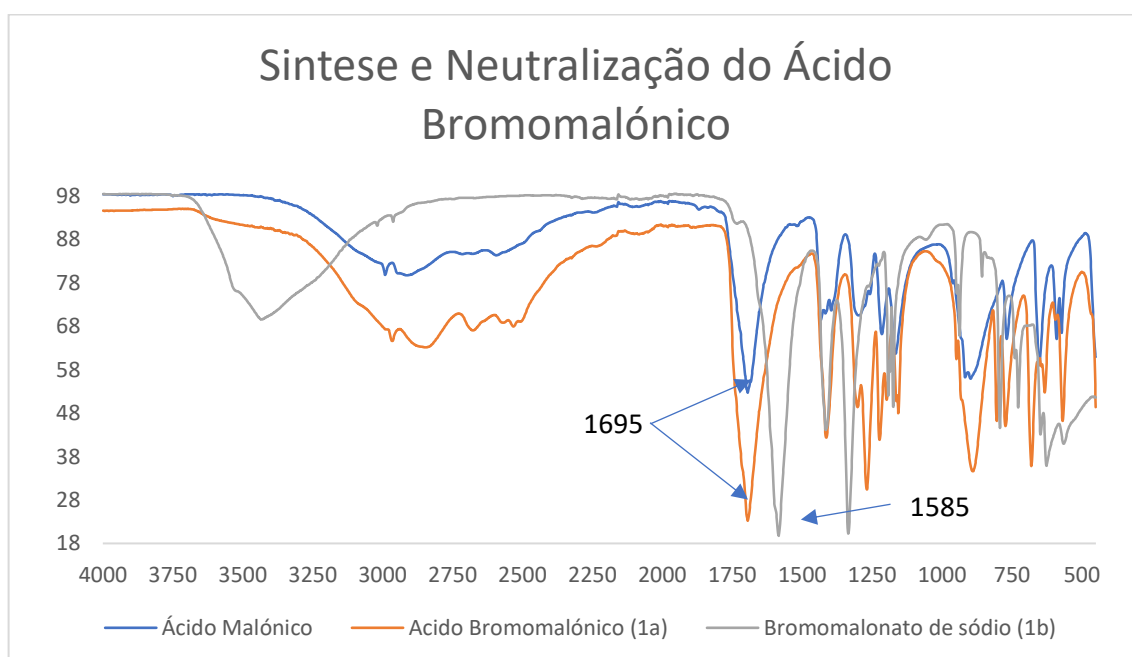


Figura 13 - FT-IR Síntese de **1b**; neutralização do ácido bromo malónico com NaOH

A reação de substituição da celulose depende da reatividade do nucleófilo que vai atacar o bromomalonato de sódio. A celulose ativada em NaOH garante a presença de grupos hidroxilo carregados negativamente que atacam o carbono halogenado do bromomalonato de sódio, com o átomo de bromo a ser removido para a solução e a celulose a ficar covalentemente ligada ao grupo malónico através de uma ligação éter.

### 3.2. Tosilação de Celulose

Tosilação é uma forma convencional de funcionalizar grupos hidroxilo de forma a torná-los disponíveis a ataques nucleofílicos,<sup>52</sup> a formação do éster sulfónico forma um bom grupo de saída que torna um álcool num centro capaz de reagir com nucleófilos em reações de S<sub>N</sub>2.<sup>53</sup> Uma vez que um enolato possui dois grupos carregados negativamente, o oxigénio e a ligação dupla, seria possível que numa reação de alquilação de um enol, que a ligação ocorra com o átomo de oxigénio carregado negativamente. No entanto, na reação de um enol com um grupo tosilado o centro nucleofílico mais macio do enol vai ter prioridade na reação, uma vez que a reação dá-se no carbono eletrodeficiente macio alfa ao éster sulfónico.<sup>53</sup>

O grupo tosilo fornece um reagente com a capacidade de funcionalizar os três grupos hidroxilo da celulose, mesmo com os álcoois secundários sendo capaz de realizar reações de substituição.<sup>54</sup> De facto, a síntese de celulose tosilada é geralmente associada à formação de derivados clorados na presença de calor, como consequência da substituição do grupo tosilo pelo ião cloreto<sup>50</sup> sugerindo que, se um nucleófilo consegue ultrapassar as restrições estereoquímicas da celulose, pode realizar reações de substituição com o polímero.

Finalmente é necessário averiguar se a tosilação da celulose é compatível com os aspetos fundamentais desta tese, especificamente se a utilização sacrificial do grupo tosilo é significativamente melhor do que a utilização sacrificial do bromo.

O cloreto de tosilo é considerado um irritante, podendo resultar em severa irritação dos olhos e das vias respiratórias,<sup>55</sup> o ácido para tolueno sulfónico, produto da hidrólise do halogenato, tem um pKa de -2.8<sup>47</sup> e está relacionado com todas as contra indicações relacionadas com ácidos fortes, inclusive é classificado como corrosivo e irritante, capaz de causar danos significativos a olhos, e tóxico para o fígado e rins caso ingerido.<sup>56</sup>

O bromo, por outro lado produz uma vasta quantidade de vapores que são altamente perigosos podendo provocar danos severos a olhos, e vias respiratórias, ou morte com efeitos que podem acumular, produzindo a dificuldades respiratórias. Está classificado como nocivo para o meio ambiente especialmente para vida marinha onde está associado à formação de água de bromo, devido a formação espontânea de ácido bromídrico quando em contacto com água, a presença deste é bastante prevalente na síntese atual da DCMC não por contacto com água mas pela substituição com o ácido malónico.<sup>55</sup>

Adicionalmente o cloreto de tosilo encontrado comercialmente, cloreto *para*-toluenosulfonilo, não é sintetizado diretamente, mas como um subproduto do cloreto de *orto*-toluenosulfonilo, significando que a utilização de cloreto de tosilo é, em efeito, reutilização de produtos residuais da indústria química.<sup>57</sup>

Como foi descrito, a tosilação da celulose é um método corrente de funcionalização da celulose, como descrito na figura 14 o mecanismo baseia-se no mesmo mecanismo de

celulose ativada que a síntese regular de DCMC, um ataque nucleofílico resulta na substituição do halogénio, neste caso um átomo de cloro concluindo com a funcionalização da celulose. Como pode ser observado o mecanismo de tosilização requer a utilização de uma base para captar o átomo de hidrogénio, no caso da celulose esta base é o hidróxido de sódio, utilizado para a ativação e dissolução da celulose.

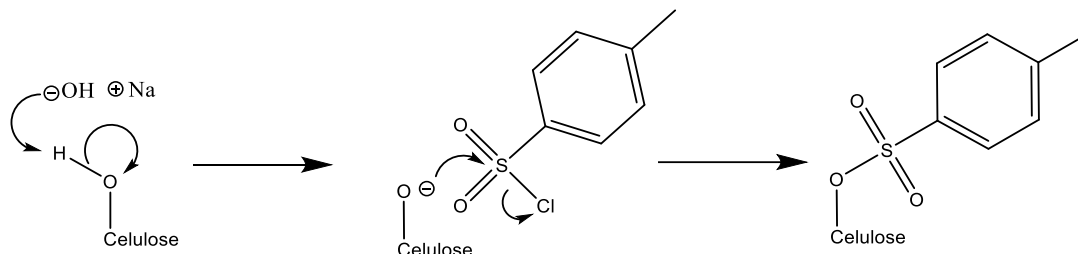


Figura 14 - mecanismo da tosilização da celulose dos hidroxilos da celulose

### 3.2.1. Tosilação em meio aquoso com ureia e polietileno glicol

A dissolução da celulose em NaOH, exemplificada na figura 15, baseia-se na capacidade do hidróxido de sódio de macerar as regiões polares do polímero, isto é, de interferir com as pontes de hidrogénio entre unidades de glucose pela captação dos átomos de hidrogénio dos grupos hidroxilo que conseqüentemente geram cargas negativas que são estabilizadas pelos iões de sódio dissolvidos em solução.<sup>58,50</sup>

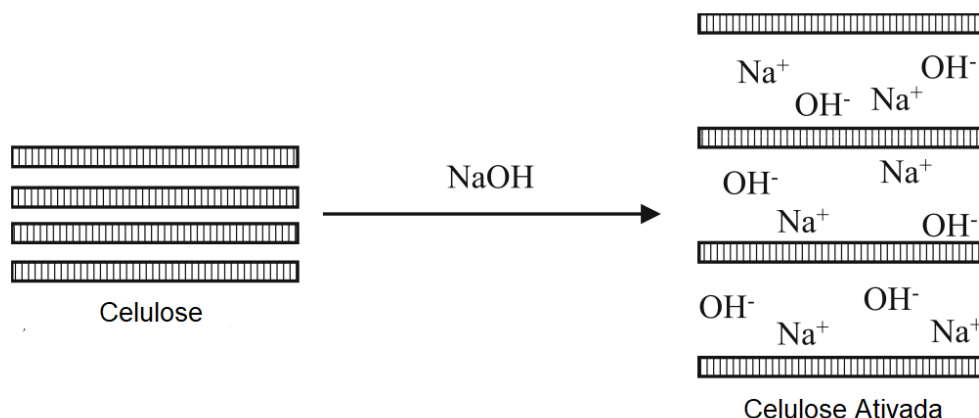


Figura 15 - ativação de celulose com hidróxido de sódio<sup>50</sup>

O papel da ureia e do polietileno glicol, é de auxiliares da ativação da celulose com a ação de hidróxido de sódio através da estabilização das suas regiões apolares.<sup>58,59</sup> No processo de ativação da celulose, o OH<sup>-</sup> quebra as ligações de hidrogénio, os iões Na<sup>+</sup> estabilizam os grupos hidroxilo hidrofílicos e a ureia e o polietileno estabilizam a parte hidrofóbica da celulose.<sup>58,59</sup>

A primeira tentativa de tosilização de celulose (**2a**) foi realizada duas vezes, em gelo e à temperatura ambiente, em meio aquoso heterogéneo, resultando no espectro de infravermelho em baixo na figura 16. A introdução de gelo teve um impacto significativo na tosilização da celulose, com a reação decorrida a temperatura baixa com bandas características do grupo tosilato, 1352 cm<sup>-1</sup> (vasO<sub>2</sub>), 1174 cm<sup>-1</sup> (vsO<sub>2</sub>) e 813 cm<sup>-1</sup> (vS-O-C)<sup>54</sup>, visivelmente mais intensas e definidas do que a reação que decorreu a

temperatura ambiente (figura 16). No entanto ambos os produtos obtidos revelaram inconsistências de textura e coloração 24h após a reação durante a secagem em linha de vácuo. Manchas acastanhadas que progrediam com tempo, particularmente no produto da reação a 25°C.

Como as propriedades da celulose sintetizada não estavam em concordância com as propriedades desejadas, incluindo dificuldade de manuseamento e descolorações indevidas sem a presença de impurezas que pudessem ser detetáveis ou removíveis, a via aquosa foi abandonada temporariamente por uma reação em condições orgânicas.

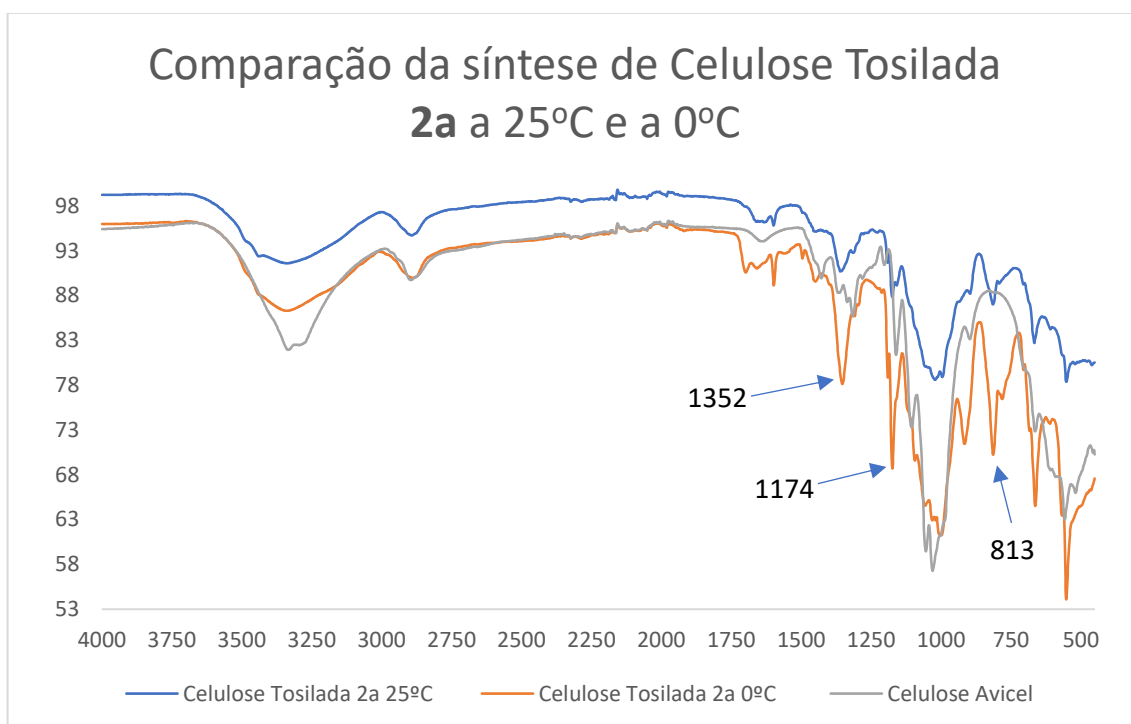


Figura 16 - espectro de infravermelho da síntese de celulose tosilada (2a)

### 3.2.2. Tosilação em Dimetilacetamida

A síntese da celulose tosilada em dimetilacetamida **2b** alterações de temperatura para a dissolução da celulose e a introdução de LiCl, que, ao contrário da síntese de **2a**, leva à dissolução completa da celulose. Era esperado que com a celulose dissolvida num meio que não requeria polietileno ou ureia, que o cloreto de tosilato tivesse mais sucesso em interagir com a celulose e que resultasse num produto mais substituído para as intenções seguintes. O produto obtido no final do *work-up* da reação com as lavagens em etanol e suspensão em acetona os precipitados filtrados ficaram progressivamente mais claros, mas com a uma textura fibrosa e com alguns aglomerados. Quando testado este produto foi revelado-se mais solúvel em DMSO que a celulose tosilada **2a**.

Com um produto pelo menos parcialmente solúvel em DMSO, foi possível fazer os primeiros espectros de RMN da celulose tosilada. Como é possível observar na imagem 17, o grande peso molecular da celulose leva a tempos de relaxação grandes que por sua vez levam a espectros de ressonância magnética com pouca definição. De qualquer modo, o espectro é perfeitamente capaz de demonstrar os sinais dos átomos de hidrogénio aromáticos a 7.82 e 7.48 ppm, infelizmente a perda de definição impede o uso de integrações para determinar o nível de substituição obtido com um elevado grau

de certeza mas, se para um DS de 1 teria que haver uma integração de 4 átomos de hidrogénio aromáticos para cada protão anomérico (a 5.47 ppm), uma integração de 2.73 sugere um nível de substituição de cerca de 0.7 grupos tosilo por unidade de glucose. De qualquer forma, devido a presença inequívoca dos sinais aromáticos, o espectro apresentado é suficiente para determinar que a reação foi um sucesso, o que é corroborado com a dissolução da celulose no solvente deuterado.

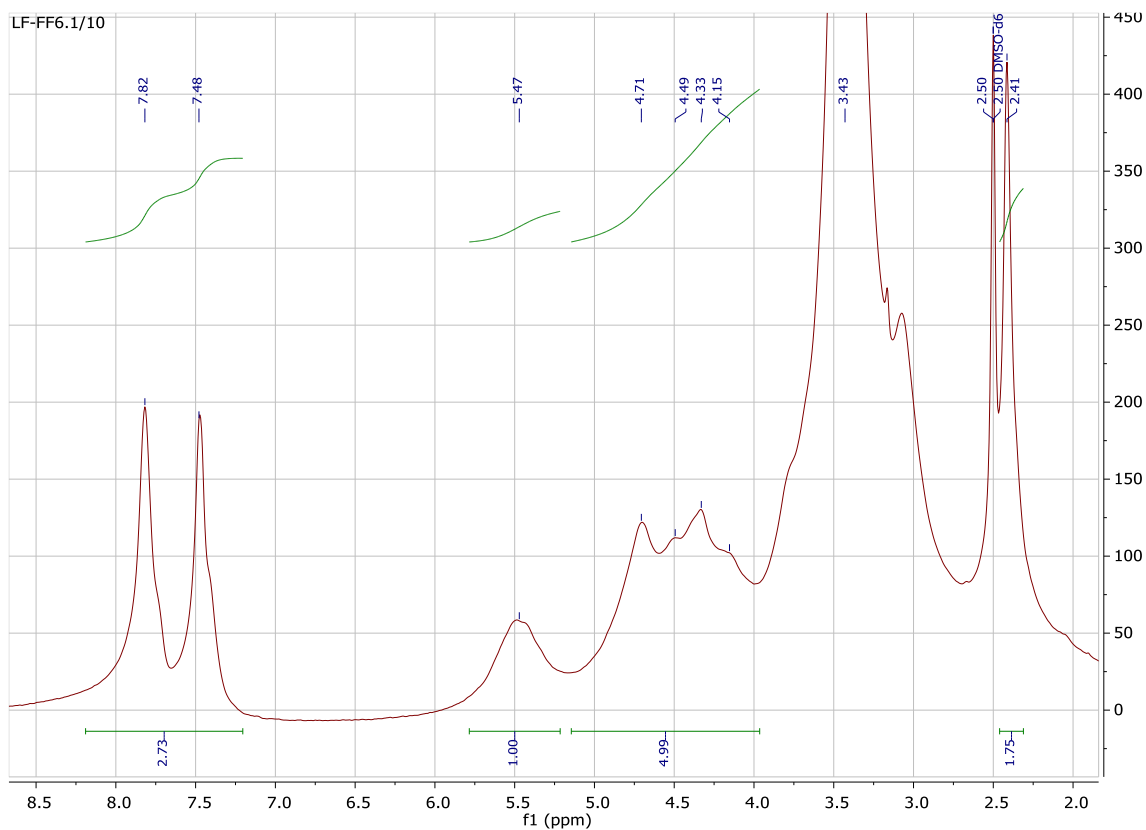


Figura 17 - RMN do produto da composto 2b

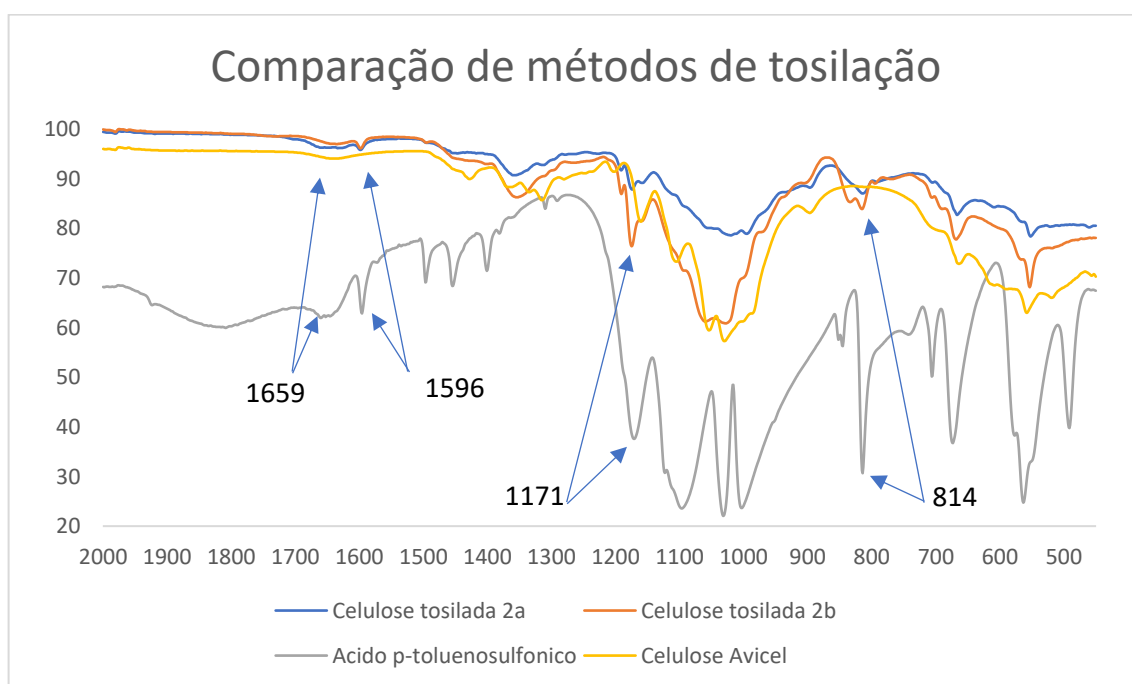


Figura 18 – Espectros de infravermelho de reações de tosilação; Composto **2a** – Celulose tosilada em meio aquoso com polietileno glicol; Composto **2b** – Celulose tosilada em DMAc

Uma vez que se obteve confirmação que o grupo tosilo foi integrado na celulose com sucesso é possível retornar aos espectros obtidos por FT-IR. Infelizmente como se pode observar na figura 18, quando comparado com o espectro do ácido p-tolueno sulfônico, muitos dos picos característicos do grupo tosilo não são intensos o suficiente para serem observados com a celulose, ou são pouco distinguíveis da mesma. Os picos mais característicos que podem ser observados como a banda a  $1596\text{ cm}^{-1}$  de ligação C=C aromática, aqui muito pouco definida. As bandas  $1171\text{ cm}^{-1}$  (vsSO<sub>2</sub>) e  $814\text{ cm}^{-1}$  (vS–O–C) coincidem com as esperadas da literatura.<sup>54</sup> A banda pequena na zona dos carbonilos,  $1659\text{ cm}^{-1}$ , pode ser uma evidencia de oxidação de celulose, a celulose pode ser oxidada através da adição de ácido sulfúrico, logo é possível que a presença de ácido p-tolueno sulfônico possa resultar na oxidação dos grupos hidroxilo da celulose a aldeído,<sup>60</sup> que pode por sua vez oxidar a ácido carboxílico, resultando em bandas de infravermelho características de carbonilo semelhantes as encontradas caso a reação de substituição tenha sucesso.

Uma vez que a reação de tosilação foi considerada um sucesso, foi testada uma reação de teste de substituição com o ácido malónico, de forma a sintetizar a celulose malónica **3a**. Sendo uma reação de tentativa de substituição com um enol que já foi demonstrado como possível na síntese de **1a**, através da autocatálise do ácido malónico foi apenas adicionado ácido malónico em DMSO num protocolo semelhante ao protocolo de substituição utilizado por T. Heinze<sup>54</sup>. Infelizmente o produto obtido não correspondia as características já previamente estudadas da DCMC, como solubilidade em água e coloração clara, características que não seriam de esperar que tivessem grandes alterações. Adicionalmente com o infravermelho sem sinais de carbonilo (ver anexo composto **3a**) a reação foi considerada um fracasso.

É possível que a formação de um enol sobre estas condições seja mais difícil as anteriores, mas o mais provável é que o enol formado não tenha conseguido remover o grupo tosilo da celulose devido a uma combinação de falta de nucleofilicidade e impedimento estéreo. A discussão de reações de substituições será continuada no capítulo seguinte.

### 3.2.3. Tosilação através de sal de imidazole

Foi descrito que, para a tosilação da ciclodextrina, certos protocolos faziam uma alteração do cloreto de tosilo de forma a aumentar a sua reatividade com os grupos hidroxilo.<sup>61</sup> Esta alteração baseia-se síntese do sal de imidazole (**5**) demonstrada em baixo (figura 19), formando uma espécie mais reativa que o cloreto.<sup>61</sup> Desta forma, seria possível obter um nível de substituição pelo grupo tosilo superior aos passados, que por si poderá levar a maiores níveis de substituição com o ácido malónico.

A reação para formar o intermediário contém uma fase orgânica (diclorometano) e uma fase aquosa de carbonato de sódio, com a trietilamina como catalisador de transferência de fase. Os reagentes encontram-se na fase orgânica, onde a reação S<sub>N</sub>2 ocorre, com a formação do sal de trietilamina. O sal é transferido para a fase aquosa onde ocorre transferência de próton entre a trietilamina e o bicarbonato de sódio e a trietilamina fica disponível para continuar a catalisar a reação na fase orgânica (figura 19).

A reação foi acompanhada através do uso de FT-IR a partir do qual foi confirmado que os cristais de produto isolado eram de facto o mesmo produto descrito por Timothy et al.<sup>61</sup> com as mesmas bandas características a  $3160$ ,  $3102$ ,  $3032\text{ cm}^{-1}$  características de

ligações C-H aromáticas, 1594 e 1516  $\text{cm}^{-1}$  das ligações C=C do grupo fenilo e, 1378 e 1151  $\text{cm}^{-1}$  do grupo sulfonamida (ver anexo).<sup>57,61</sup>

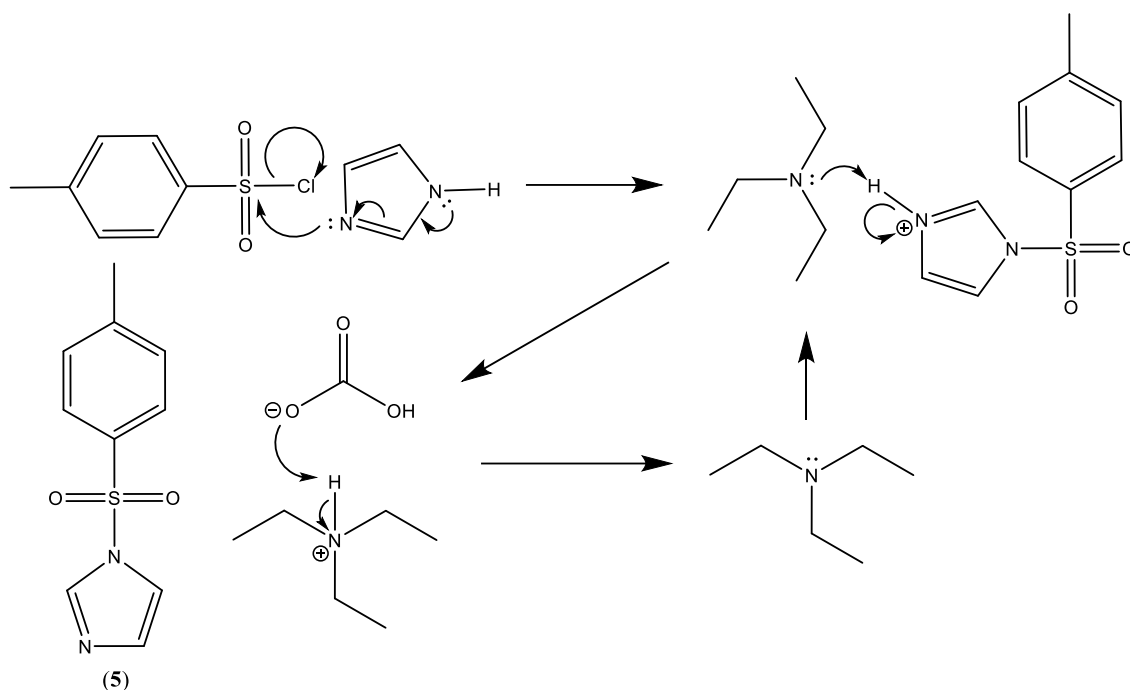


Figura 19 - mecanismo para a reação de síntese do sal de imidazole e de regeneração de trietilamina com bicarbonato de sódio

De forma a testar a viabilidade do sal de imidazole sintetizado para a funcionalização da celulose foram realizadas 3 formas distintas de realizar a reação de tosilção. A celulose tosilada **2e** foi realizada da mesma forma que a funcionalização da ciclodextrina foi descrita,<sup>61</sup> a celulose tosilada **2f** foi realizada em meio aquoso homogéneo, e a celulose tosilada **2g** foi realizada em meio orgânico homogéneo em dimetilacetamida.

A síntese do composto **2e** demonstrou moderado sucesso, os picos característicos da presença do grupo tosilo encontram-se presentes, particularmente a banda aromática a 880  $\text{cm}^{-1}$ , no entanto os restantes indícios de tosilção a 1375  $\text{cm}^{-1}$  e 1647  $\text{cm}^{-1}$  estão significativamente menos presentes que noutras reações de tosilção realizadas, sugerindo que embora possa ter havido tosilção, esta ocorreu em menor escala e, ou com mais contaminações (figura 20). O resultado da síntese de **2f** por outro lado não demonstrou qualquer sucesso na tosilção da celulose, a banda a 880  $\text{cm}^{-1}$  que geralmente é bastante visível devido a falta de sinal na celulose está ausente e sem quaisquer outras evidencias de funcionalização.

A reação feita em dimetilacetamida resultou numa pasta de manuseamento difícil a partir da qual não foi possível isolar produto.

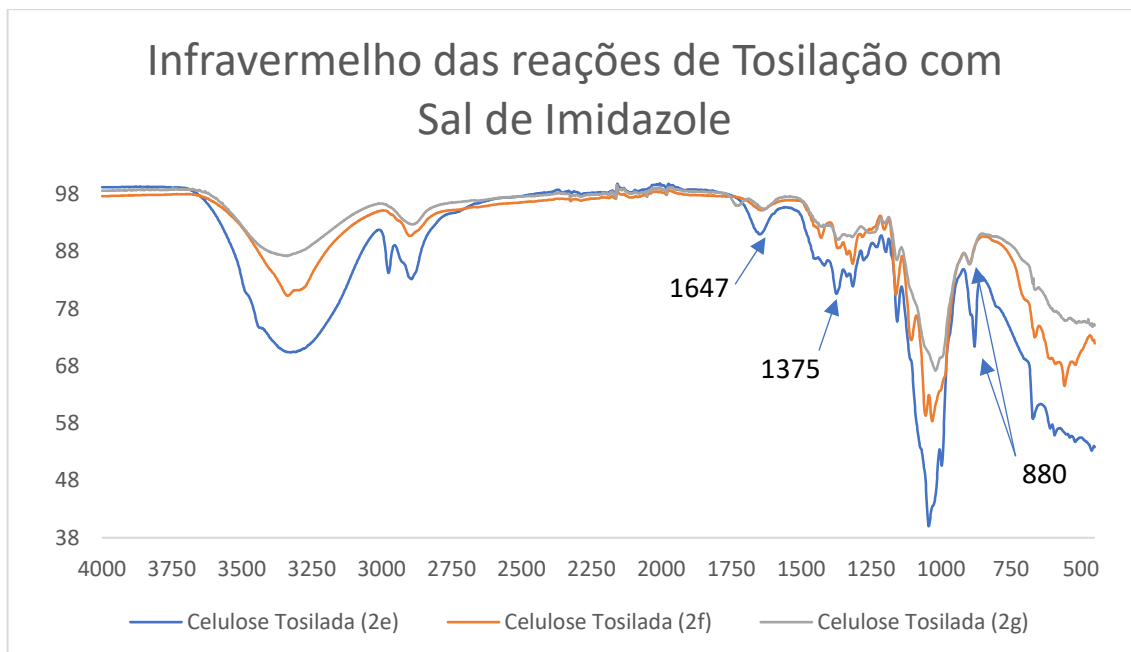


Figura 20 - FT-IR resultantes das reações de tosilção com sal de tosilato e imidazole; Composto **2e** – tosilção de acordo com a funcionalização da ciclodextrina; Composto **2f** – tosilção em meio aquoso; Composto **2g** – celulose tosilada em DMAc

### 3.3. Reformulação das reações de Tosilação

Uma vez que as reações de tosilção foram insuficientes no seu nível de substituição, foi necessário recorrer a reformulação dos protocolos realizadas até este ponto.

Na reação de tosilção em meio orgânico (**2c**) foi adicionado um excesso de trietilamina (TEA) de forma a evitar a oxidação da celulose que pode resultar em erros de interpretação no passo seguinte, e foi ainda adicionada uma reação em meio aquoso homogéneo (**2d**) de acordo com a tabela 1 em baixo. Para alcançar a dissolução da celulose, esta é congelada numa solução com NaOH, que quando descongelada, deixa a celulose está completamente dissolvida, abrindo a porta para reações de tosilção em meio aquoso homogéneo.<sup>51</sup>

Tabela 1 - reações de tosilção reformuladas homogêneas em dimetilacetamida (entrada 1) e numa solução aquosa de NaOH (entrada 2)

Entrada	1	2
Solvente	LiCl/DMAC ( <b>2c</b> )	NaOH/H <sub>2</sub> O( <b>2d</b> )
Condições	24h 5°C	24h RT
TsCl	10 eq	12 eq
TEA	40 eq	12 eq
AGU	1 eq	1 eq

A tosilção em água é utilizada geralmente com a introdução de uma base ou solventes orgânicos com um reagente de transferência de fases <sup>62,63</sup> no caso da celulose, como esta se encontra dissolvida em água não é necessário adicionar um segundo solvente mas é necessário adicionar trimetilamina de forma a neutralizar o ácido clorídrico produzido da saída dos aniões de cloro.

Tanto a reação em dimetilacetamida (**2c**) (Tabela 1, entrada 1) como a que decorreu em meio aquoso (**2d**) (Tabela 1, entrada 2) tiveram sucesso, o que foi denotado pelas bandas no espectro de IV a 1598, 1357 e 810 cm<sup>-1</sup> presentes na figura 21.

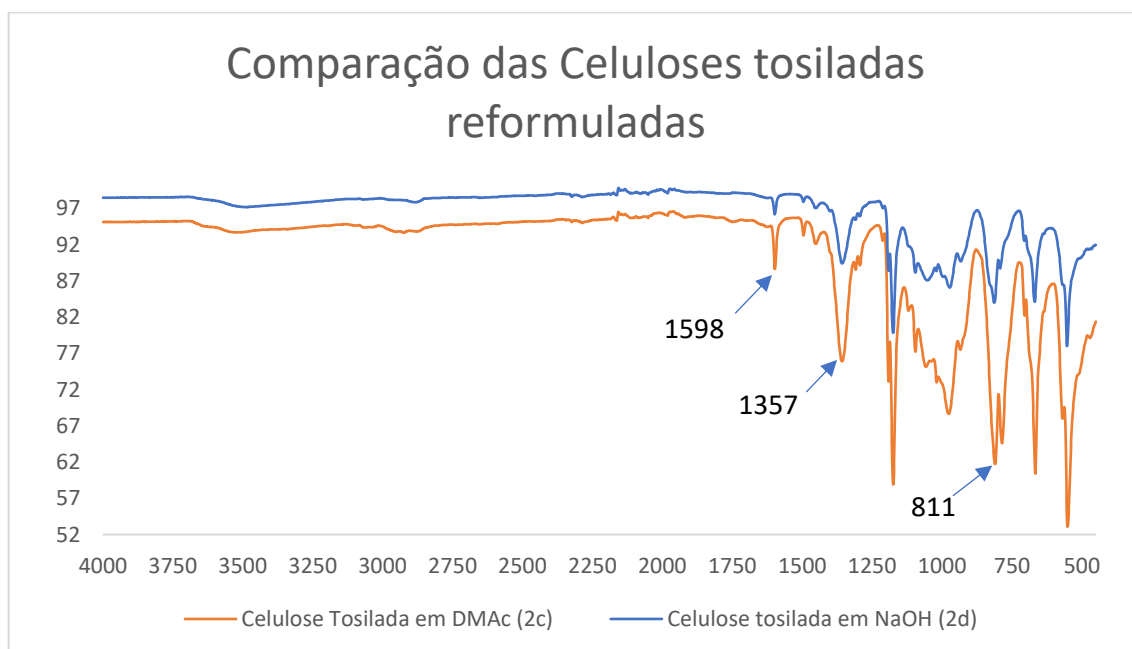


Figura 21 - Espectro de FT-IR das reações reformuladas.

Das sínteses realizadas, **2c** e **2d** produziram não só celulose tosilada com sucesso, com o nível de tosilção mais elevado até este ponto o que resultou em alguma solubilidade de ambos em DMF, DMSO e com o produto da reação em NaOH (**2d**) hidratando, mas não dissolvendo em acetona.

Através de análise por RMN (figuras 22 e 23) estimou-se o nível de substituição dos produtos realizados. Com o mesmo método de estimativa utilizado para a celulose tosilada **2b**, comparando as integrais dos sinais da celulose com os átomos de hidrogénio aromáticos e metilo do grupo tosilto, estimou-se que os níveis de substituição excedem as anteriores com DS de 2.6 para celulose tosilada em dimetilacetamida **2c** e 1.5 para a celulose tosilada em meio aquoso **2d**. No entanto, devido às dificuldades de

obtenção de espectros de RMN e o erro associado a estes recorreu-se a análise elementar de forma a determinar definitivamente qual a capacidade de tosilação das reações realizadas fez-se uma simulação do polímero com um número variável de grupos tosilo e construiu-se o gráfico de variação da S% em função do DS referido na figura 24.

A celulose tosilada em dimetilacetamida tinha um DS de cerca de 2 e a celulose tosilada em NaOH um DS de cerca de 1,4. Embora a via orgânica tenha um maior nível de substituição, é pouco provável que fosse possível levar a cabo a reação de substituição com o ácido malónico noutras posições para além da posição 6 das unidades de anidroglicose originais,<sup>54</sup> e uma vez que esta posição é a primeira a ser funcionalizada<sup>50,64</sup> um DS de 1.4 pode ser suficiente para alcançar um polímero funcional produzido utilizando unicamente água, NaOH, cloreto de tosilo e trietilamina, o que é extremamente atrativo no sentido de química verde. Por este motivo, a celulose tosilada formada através da diluição de celulose em meio aquoso (**2d**) foi considerada o polímero mais eficaz para as reações de tosilação.

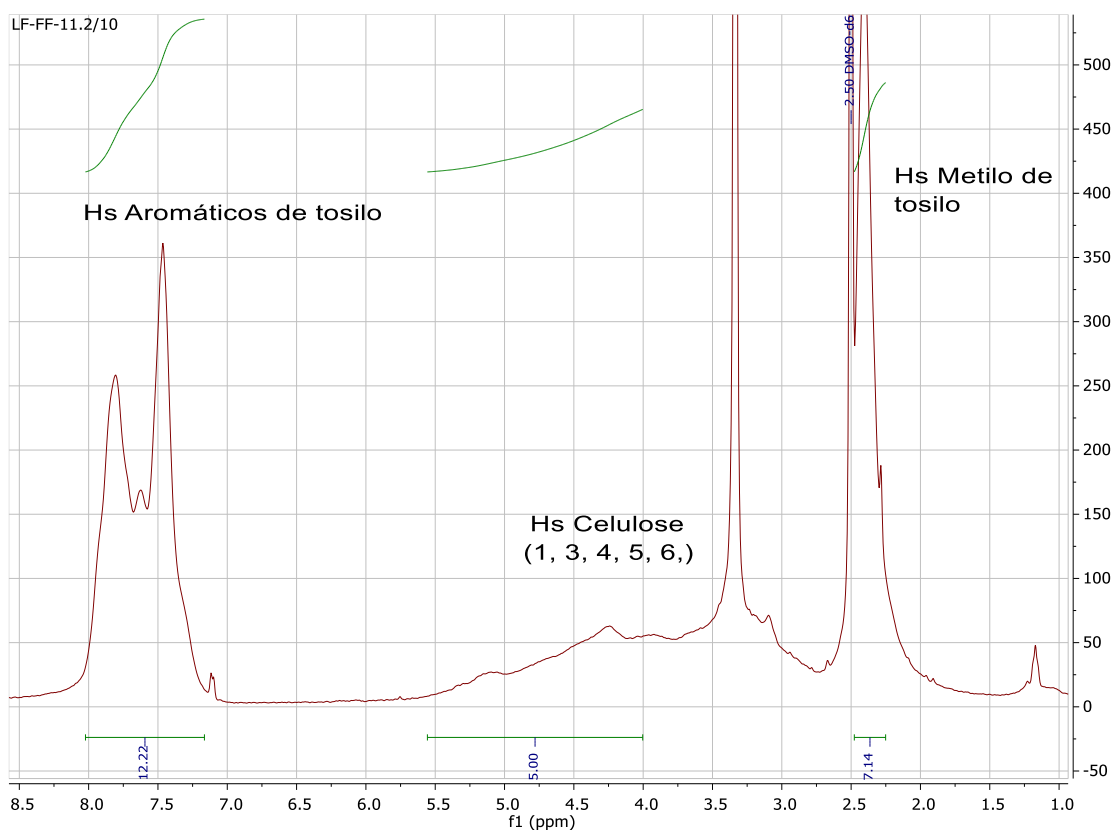


Figura 22 - RMN de celulose tosilada em dimetilacetamida **2c**

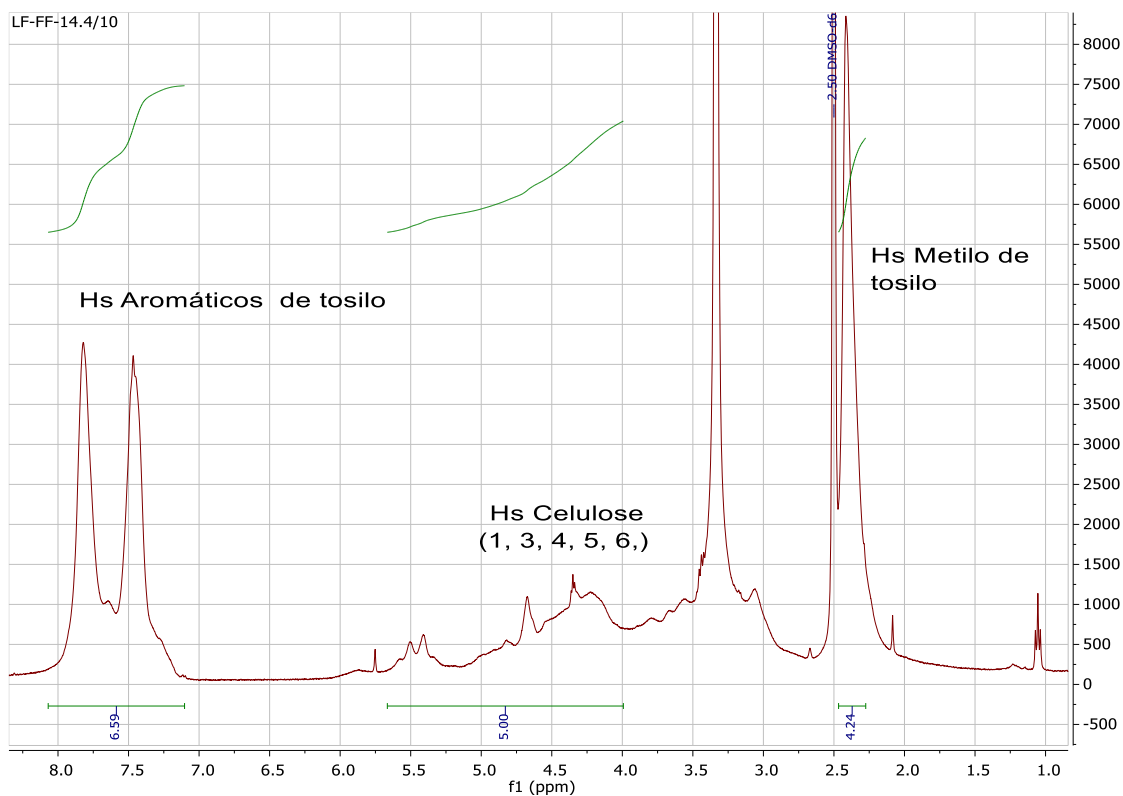


Figura 23 - RMN de celulose tosilada em meio aquoso 2d

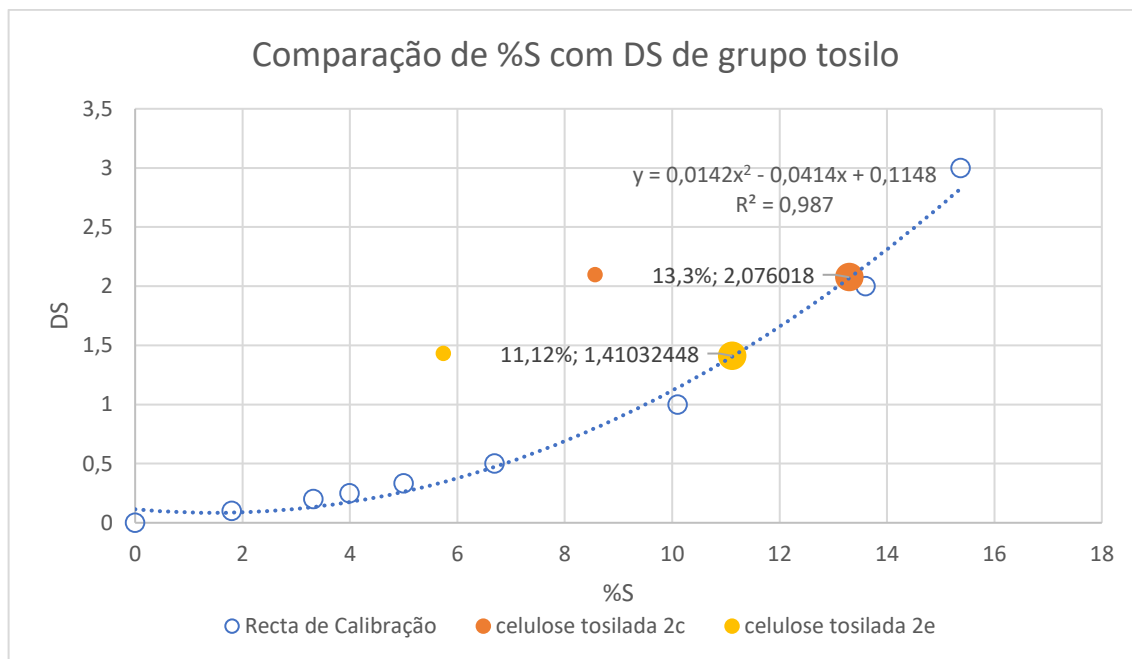


Figura 24 - gráfico de correlação da percentagem de enxofre de polímeros com o seu DS em grupos tosilo; Composto 2c – celulose tosilada em DMAc; Composto 2d – celulose tosilada em meio aquoso

### 3.4. Mesilação de celulose

Em alternativa à introdução do grupo tosilo, foi ensaiado o grupo mesilo. Este tem as mesmas propriedades de grupo protetor de álcoois e formação de bom grupo de saída,<sup>53</sup> no entanto, sem a presença do anel aromático é efetivamente um grupo de menor peso molecular que pode auxiliar a reação de substituição simplesmente por redução de impedimento estéreo, uma vez que a celulose por si já é um substrato difícil de modificar devido ao impedimento estéreo e pontes de hidrogénio dos grupos hidroxilo<sup>60</sup> é possível que, utilizando um grupo de saída de menor porte, a aproximação do ácido malónico seja facilitada.

O *work-up* da reação de mesilação teve diversos problemas, com o produto final acabando com uma coloração escura e com a possível presença de sais resultantes da piridina com metanossulfonato, que contribuem para filtrações lentas e difíceis devido a material contaminante insolúvel em metanol. Desta forma foi necessário adicionar um passo de com água no *work-up* de forma a dissolver a os sais formados que levavam a uma filtração difícil. Mesmo com a evaporação da água após a sua adição, a sua presença demonstrou-se um passo crucial na separação de compostos contaminantes da celulose mesilada, após a qual foi possível realizar uma precipitação eficaz com produto de coloração clara semelhante ao que foi obtido nas reações eficazes de tosilação.

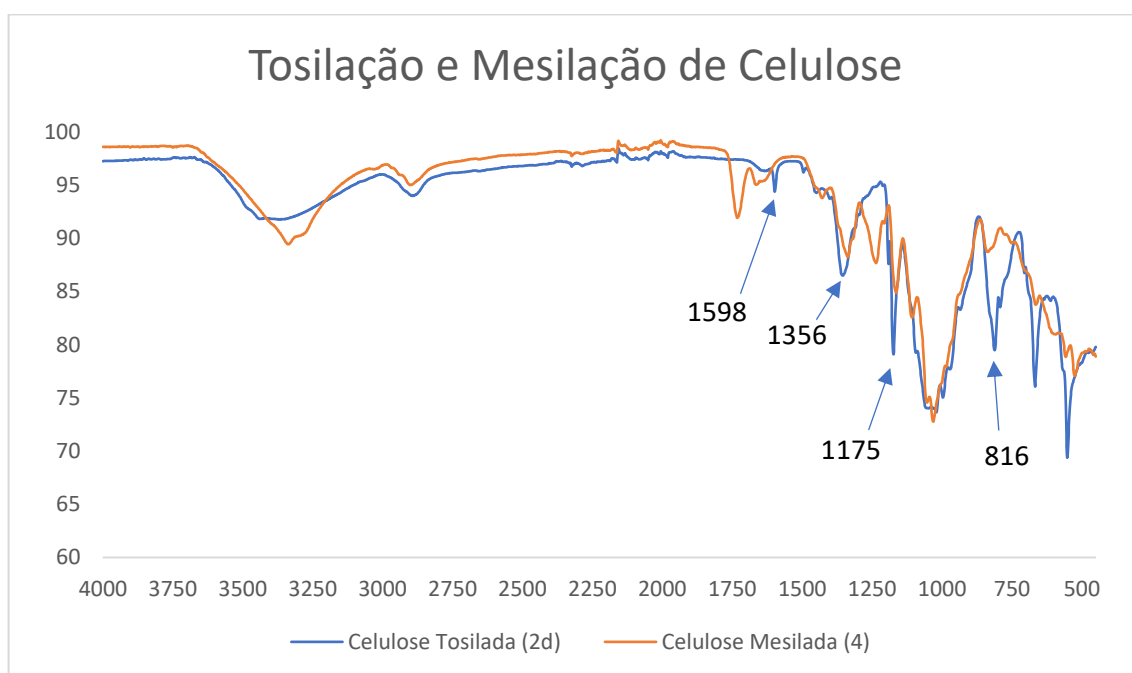


Figura 25 - FT-IR de comparação da reação de mesilação e reação de tosilação

As bandas 1356 cm<sup>-1</sup> (vasSO<sub>2</sub>), 1175 cm<sup>-1</sup> (vsSO<sub>2</sub>) e 816 cm<sup>-1</sup>(vS–O–C) presentes na figura 25 deveriam estar presentes em ambos os compostos, no entanto, o espectro do composto mesilado **4** demonstrou apenas bandas com pouca intensidade, pelo que foi concluído que a reação tinha ocorrido, mas de forma menos eficaz que a tosilação da celulose reformulada.

Foi realizado um protocolo idêntico ao da reação de substituição da celulose tosilada com ácido malónico **3b** como comparativo para a síntese da celulose malónica, mas com a celulose mesilada, denominada de celulose malónica **3c**.

Análise preliminar através de FT-IR demonstrou bandas de carbonilo presentes a  $1738\text{ cm}^{-1}$  (figura 26), no entanto, outras propriedades características do polímero pretendido não estavam presentes como a solubilidade em água. Seria possível que a falta de solubilidade fosse apenas devido a falta de substituição, uma vez que, embora presentes, as bandas de carbonilo ainda eram de baixa intensidade. Por outro lado, seria possível que, devido a alteração induzida pela alternativa, que a banda de carbonilos poderia ter sido modificada pela alteração do grupo éter e pelo encurtamento da distância entre o grupo malónico e a unidade de celulose modificada.

Foi então postulado que os ácidos carboxílicos presentes poderiam estar associados à trietilamina utilizada, através de ligações iónicas. O sal formado entre a base e o grupo malónico poderia ser estável o suficiente para resultar num composto insolúvel em água. De forma a confirmar esta hipótese o sólido foi vertido sobre uma solução saturada de carbonato de sódio. Com a efervescência e aroma a trietilamina foi concluído que, de facto seria o caso. No entanto, após a lavagem foi realizada uma segunda análise por FT-IR onde foi demonstrado que a banda de carbonilo tinha decrescido significativamente, e uma banda de bicarbonato em  $1429$  tinha aparecido, seria possível que embora tenha havido uma contaminação de trietilamina, a incongruência de propriedades físicas se devia primeiramente a um baixo, ou nulo, nível de substituição.

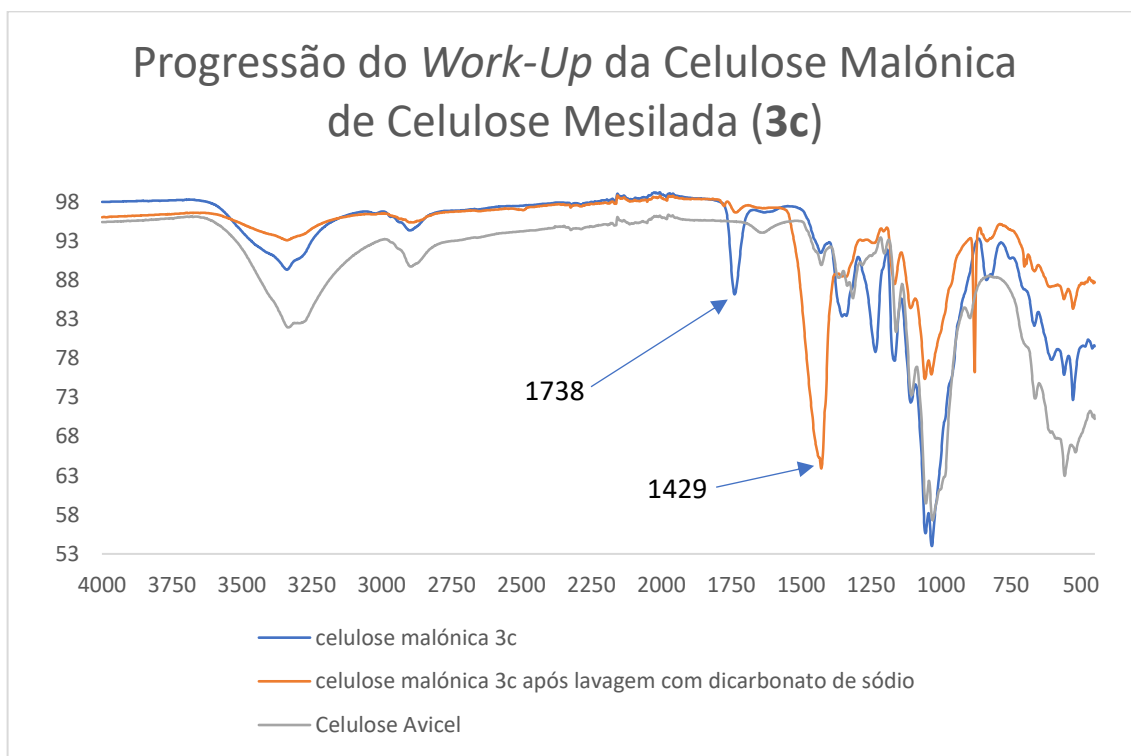


Figura 26 – Espectro de FT-IR antes e depois de lavagem com uma solução saturada de carbonato de sódio

### 3.5. Substituição da celulose tosilada

#### 3.5.1. Substituição com Análogos de Ácido Malónico

A capacidade do grupo tosilo como grupo de saída em reações de substituição no esqueleto de celulose foi confirmada com a síntese do composto **6**, onde a síntese de celulose azidada através do ataque nucleofílico da azida de sódio (figura 27) confirma

que um nucleófilo reativo o suficiente é capaz de levar a cabo a reação de substituição a níveis consideráveis, o que é possível verificar pela intensidade do pico de infravermelho a  $2102\text{ cm}^{-1}$  do espectro de FT-IR do composto **6**, característico do grupo azida (ver anexo).

Como foi visto nas sínteses de celulose malónica **3a**, **3b** e **3c** as reações de substituição com o ácido malónico foram um fracasso tanto em amostras de celulose tosilada como de celulose mesilada. A reação de substituição não ocorreu com a formação de enóis ácidos, através da autocatálise semelhante à presente na bromação do ácido bromo malónico, ou enol básico através do uso de trietilamina o que sugere que a formação de enol no ácido malónico não é estável ou nucleófilo o suficiente para levar a cabo o ataque nucleofílico na celulose.

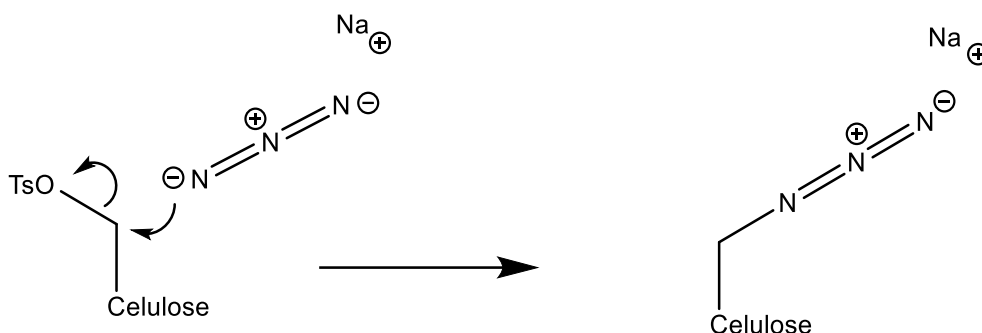


Figura 27 - mecanismo do ataque nucleofílico da azida de sódio com a celulose tosilada

Uma vez que a formação de enol ácido com a intervenção de ácidos mais fortes pode ter efeitos adversos com a celulose a temperaturas altas e longos tempos de reação,<sup>65</sup> a realização de reações alternativas com enóis básicos é favorável.

No caso do ácido malónico seriam necessárias 3 moléculas de base para formar cada forma enólica, o que significa que cada molécula reativa tem 3 cargas negativas, o que inviabiliza a formação da espécie. Deste modo foi realizada uma reação de substituição com o malonato de etilo, na síntese do composto **7**. Sendo análogo ao ácido malónico, este pode ser mais reativo devido ao facto que é necessário apenas uma molécula de base e uma carga negativa por molécula reativa, o que deve resultar num nucleófilo mais fácil de gerar (Figura 28).

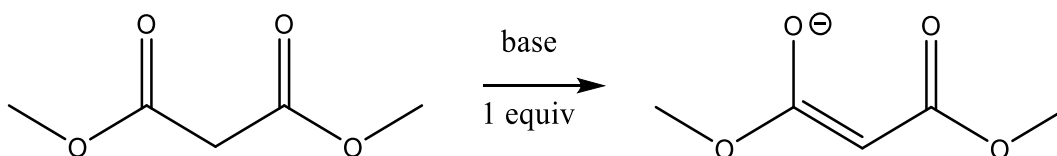


Figura 28 - Formação do enolato do malonato de etilo por ação de 1 equivalente de base.

Foi feito um espectro de infravermelho (figura 29) preliminar após a finalização do *work-up* de forma a determinar o sucesso da reação. Notou-se que a banda fina a  $1599\text{ cm}^{-1}$  característica do grupo tosilato ainda se encontrava presente sugerindo que, se a reação resultou, não foi suficiente para remover todos os grupos tosilato, mesmo as duas novas bandas a  $1721\text{ cm}^{-1}$  e a  $1631\text{ cm}^{-1}$  que poderão ser de um carbonilo de um éster e de um enolato de um éster respetivamente, não têm intensidades suficientes para considerar um grau significativo de substituição. A presença de bandas de enolato pode significar

que a reação se sucedeu, possivelmente resultando numa quantidade de Malonato de etilo que reagiu com a base depois de ocorrer a substituição com o grupo tosilo.

Também pode ser possível que, devido a impedimento estérico, que um grau de substituição de tosilo acima de 1 não corresponda a mais grupos que podem ser substituídos, uma vez que apenas o hidroxilo 6 da celulose é primário. Com a celulose tosilada utilizada com um DS superior a 1, é possível que existam grupos tosilo inseridos na celulose que não possam ser removidos pela reação de substituição, e podem ser estes mesmos responsáveis pela falta de solubilidade dos polímeros produzidos em água.

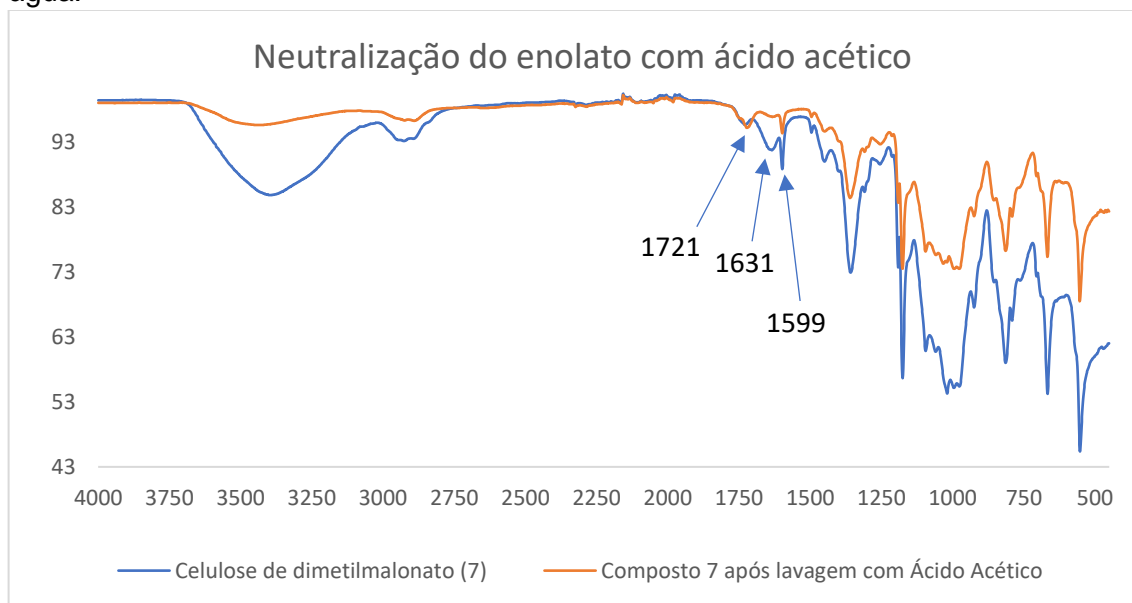


Figura 29 - Lavagem da celulose de malonato de etilo (7) com ácido acético

De forma a concluir se as duas bandas eram de facto devido à forma de enolato o composto **7** foi lavado com ácido acético. Como pode ser observado isto levou à alteração das bandas de IV, com a banda de  $1634\text{ cm}^{-1}$  diminuindo significativamente e a banda de  $1721\text{ cm}^{-1}$  aumentando. Podemos então concluir que as bandas são de facto devido a sinais de éster que são característicos do grupo malonato adicionado. Estes são bons indícios que a reação teve sucesso pelo que se iniciou a realização de reações com outros análogos que pudessem ser transformados num grupo malónico após a sua implementação na celulose.

O primeiro análogo testado como introdutor do grupo malónico em celulose tosilada foi o ácido de Meldrum (figura 30) que possui um grupo isopropilo que pode ser removido por hidrólise, formando o ácido malónico. Por outro lado o ácido de Meldrum pode levar a adições via descarboxilação<sup>66,67</sup> ou adições do grupo malónico através do átomo de oxigénio resultando em esterificação,<sup>66</sup> pelo que, na análise dos espetros de infravermelho desta substituição, não será suficiente encontrar uma banda de carbonilo para confirmar o sucesso da reação, como o pKa da do ácido malónico é baseado na acidez conjugada de ambos os ácidos,<sup>47</sup> descarboxilação, ou esterificação do grupo introduzido irá resultar num produto com um valor de pKa superior ao pretendido.

Realizou-se uma reação com um ácido fraco na síntese de celulose de Meldrum **8a**, no entanto, quando esta não demonstrou resultados foi revertido ao mesmo protocolo utilizado para o malonato de etilo com etóxido de sódio na síntese de **7**, produzindo a celulose de Meldrum **8b**. Usando etóxido de sódio como base é possível garantir que

ácido de Meldrum é desprotonado formando o enol reativo responsável pela reação de substituição.

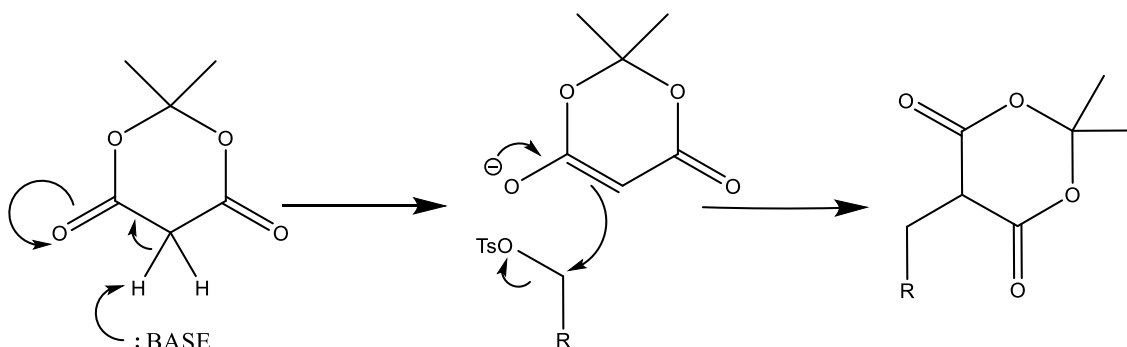


Figura 30 - esquema reacional do ataque nucleofílico do Ácido de Meldrum à da celulose tosilada

Na síntese de celulose de Meldrum **8b**, o ácido de Meldrum foi tratado com etóxido de sódio e o meio reacional da substituição foi mantido a uma temperatura de 80°C numa tentativa de contornar a baixa reatividade do grupo enol.

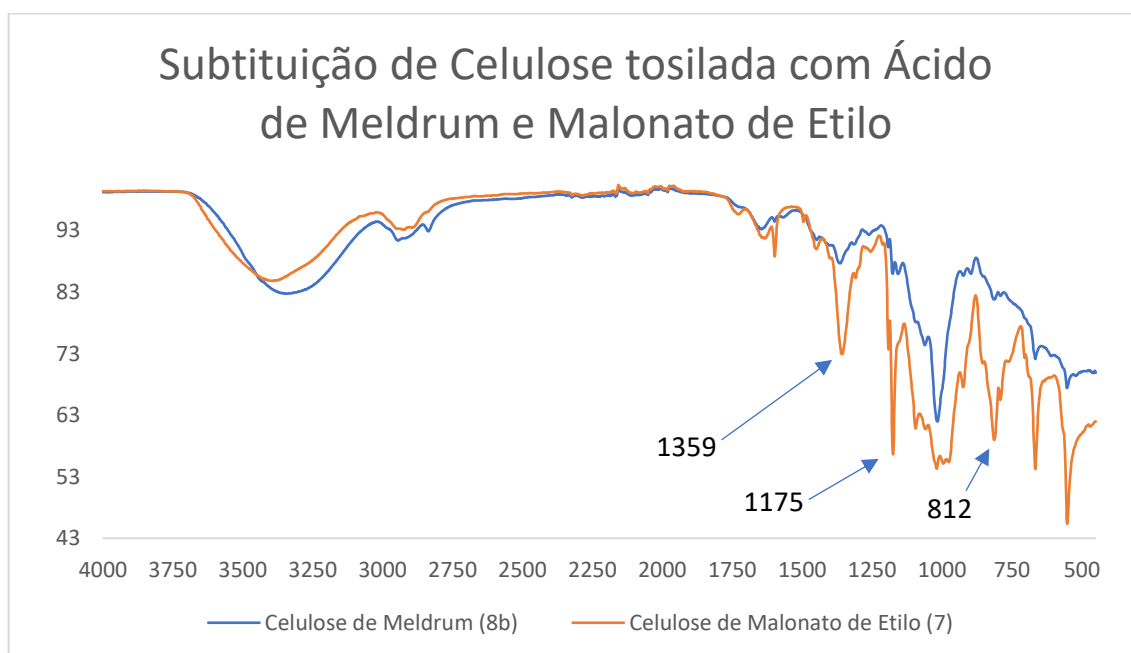


Figura 31 – Espectro de IV do Composto **8b** - Substituição com Ácido de Meldrum; e do Composto **7** - Substituição com Malonato de Etilo

A síntese do composto **8b** demonstrou capacidade de substituição, resultado num espectro (figura 31) semelhante ao da reação com o malonato de etilo demonstrada no espectro acima, que embora também não tenha bandas de carbonilo intensas, resultou num decréscimo significativo das bandas de tosilato a 1359, 1175 e 812 cm<sup>-1</sup> que ainda se encontravam claramente presentes no produto da substituição com malonato de etilo (**7**).

Como introduzido, a presença de bandas de carbonilo pode não ser representativa da formação do composto pretendido, mas de uma reação de substituição seguida de

descarboxilação. Seria necessária uma confirmação através de RMN onde o átomo de hidrogênio alfa ao grupo carbonilo iria ter um desvio químico diferente caso a descarboxilação tivesse ocorrido ou não. Uma vez que, com a hidrólise do ceteno formado, como descrito em baixo na figura 32, vai resultar em dois novos átomos de hidrogênio em posição alfa a um grupo carbonilo onde previamente só haveria um.

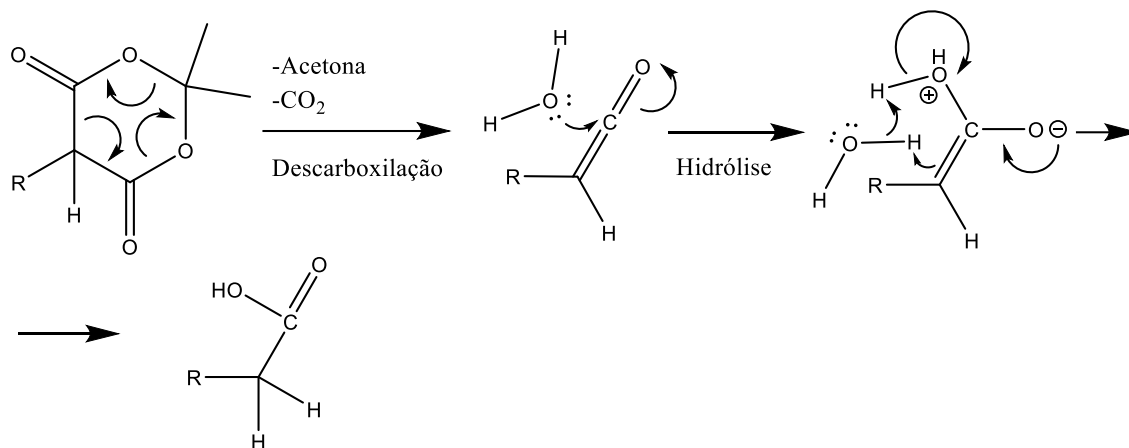


Figura 32 - Mecanismo de Descarboxilação e Hidrólise do Ceteno resultante do Ácido de Meldrum; R - Unidade de AGU

No entanto esta confirmação não foi possível de realizar, uma vez que o produto desta reação perdeu a solubilidade em solventes orgânicos apresentada pelo material de partida tosilado, por um lado a falta de solubilidade pode ser um bom indicador de substituição, uma vez que corresponde a uma remoção de grupos tosilo em número suficiente para anular a solubilidade orgânica conferida, mas devido á possibilidade de descarboxilação, a ausência de grupos tosilo não significa, necessariamente, a introdução de um grupo malônico.

Uma forma de determinar o sucesso da reação de substituição com o ácido de Meldrum com mais detalhe é recorrer a sua hidrose a malonato de sódio, de onde se poderá determinar a quantidade de sódio presente, no entanto, como grupos descarboxilados também têm a capacidade de captar sódio, a presença deste não irá diferenciar entre substituições com sucesso do grupo meldrum e de grupos descarboxilados.

O segundo análogo que foi utilizado para substituir a o ácido malônico foi o tert-butil malonato, um análogo do Ácido Malônico cujos substituintes ésteres deveram ser fáceis de remover sem perigo de descarboxilação devido ao mecanismo alternativo de eliminação to tert-butil malonato representado em baixo na figura 33.

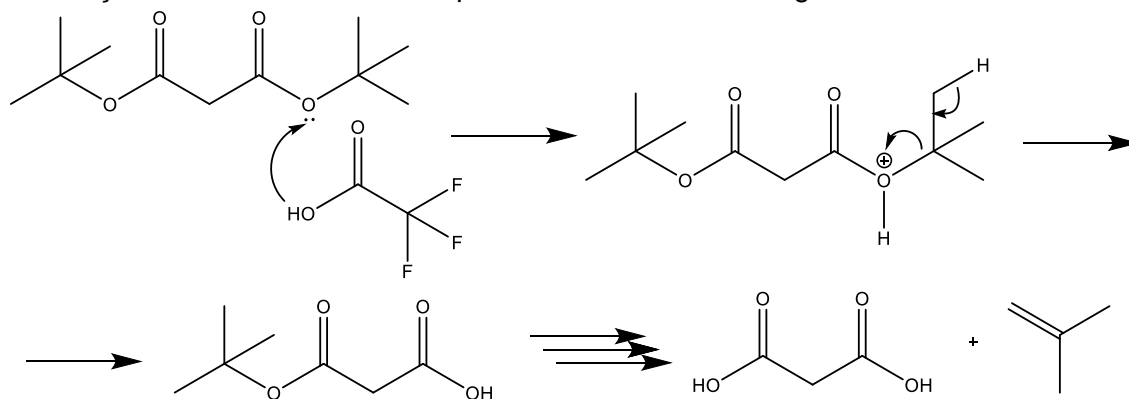


Figura 33 - mecanismo de hidrólise do tert-butilmalonato por ácido trifluoroacético

Devido a estabilidade dos produtos da hidrólise, é possível o tert-butil malonato é capaz de hidrolisar o grupo butilo através de um mecanismo  $S_N1$  sem levar a cabo a reação de descarboxilação.

Assim, recorreu-se a uma síntese do éster a partir de ácido malónico, álcool tert-butilico e DCC na síntese de tert-butil malonato **9a** e uma através de esterificação ácida para a síntese de tert-butil malonato **9b**, apenas com a primeira acabando com sucesso e com a qual se levou a cabo a síntese de celulose de tert-butil malonato **10** de substituição com o tert-butil malonato com uma adaptação do protocolo com etóxido de sódio utilizado para a substituição com o ácido de Meldrum.

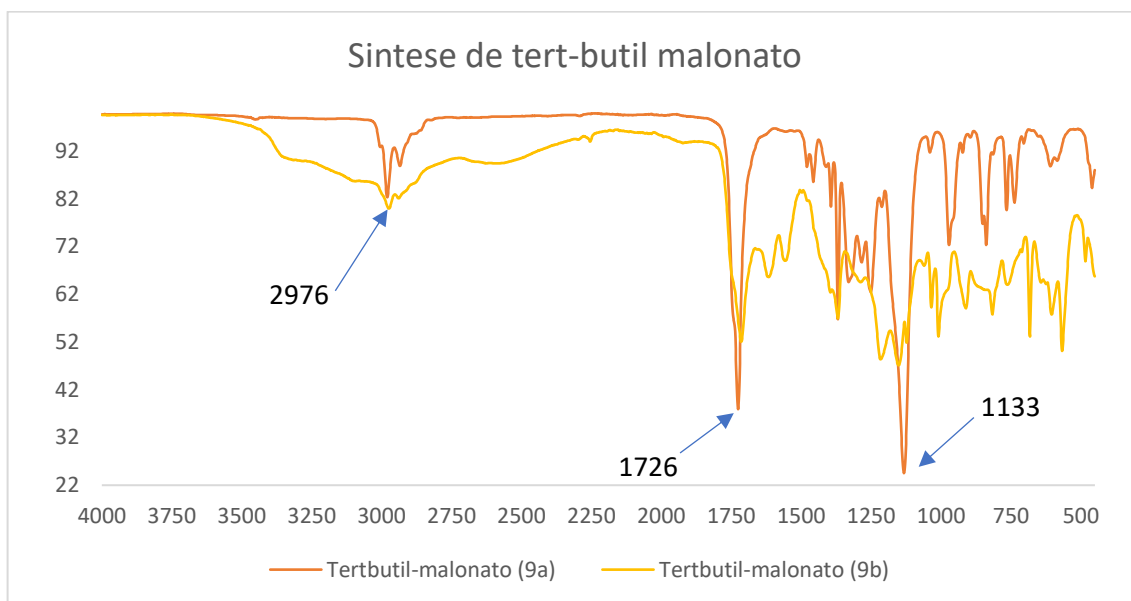


Figura 34 - espectros de FT-IR da síntese de tert-butil malonato

De acordo com a análise de infravermelho realizada (figura 34) ambas as vias sintéticas a via sintética com DCC **9a** foi superior na produção de um produto puro, com os picos característicos do éster de ácido malónico presentes em 2976, 1726 e 1133  $cm^{-1}$ .

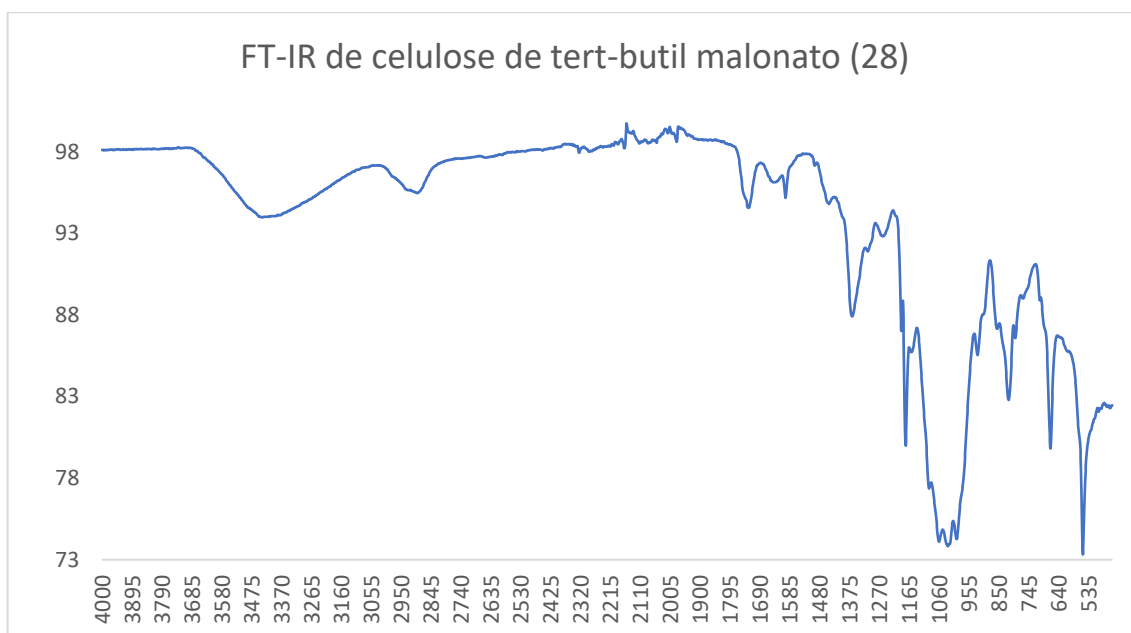


Figura 35 - FT-IR da reação de substituição com *tert*-butil malonato (Composto 10)

A reação de substituição foi analisada por FT-IR (imagem 35) pelo que se determinou um sucesso, os picos de carbonilo, tanto de éster como de enol, podem ser visualizados claramente, bem definidos e com uma intensidade relativa promissora em relação aos picos característicos do grupo tosilato.

O pico de carbonilo está mais intenso ao que se encontra nos outros análogos utilizados até a data, o que pode ser explicado ao facto que se trata do éster mais volumoso até a data que pode sustentar o enol mais estável. Se for o caso pode ser que leve a um nível de substituição maior, embora o análogo também seja o mais impedido utilizado significando que pode ser levado a reações de ativação.

Finalmente foi testada a substituição da celulose tosilada com o ácido tartrónico, este sendo um análogo algo diferente dos anteriores, não consiste numa alternativa devido à limitação de cargas negativas, mas, na adição de um átomo de oxigénio central que pode exercer a função de nucleófilo em vez da função enólica (figura 36).

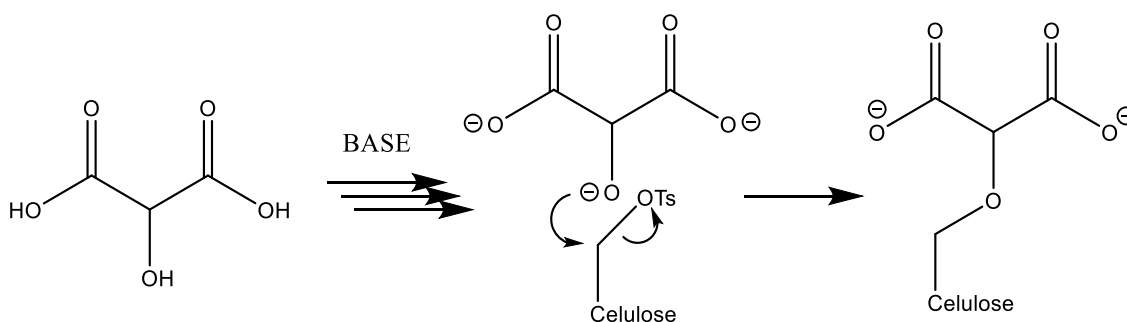


Figura 36 - mecanismo de substituição de celulose tosilada com ácido tartrónico

A utilização do ácido tartrónico é vantajosa porque evita a necessidade de formar um enol, com o átomo de oxigénio no centro reativo a carga negativa associada encontra-se centralizada e afastada dos grupos carboxilato, limitando o impedimento estérico necessário para a reação. Adicionalmente, embora este análogo também esteja associado a 3 cargas negativas, duas das quais poderiam reagir em vez da correta, o álcool secundário é significativamente menos ácido que os grupos vizinhos. Deste modo, quando todos os átomos de hidrogénio são removidos, é o ácido menos forte que

é mais provável de reagir primeiro, conferindo uma cinética útil que pode ser utilizada para garantir que o grupo malónico pode ficar livre para troca iônica.

Adicionalmente, o produto da reação de substituição com o ácido tartrônico resulta num grupo de dicarboxilato ligado a celulose via ligação éter, exatamente como a DCMC original. Embora isto não confira, necessariamente, uma vantagem no sentido de atividade, tem o potencial de produzir um polímero com propriedades já conhecidas.

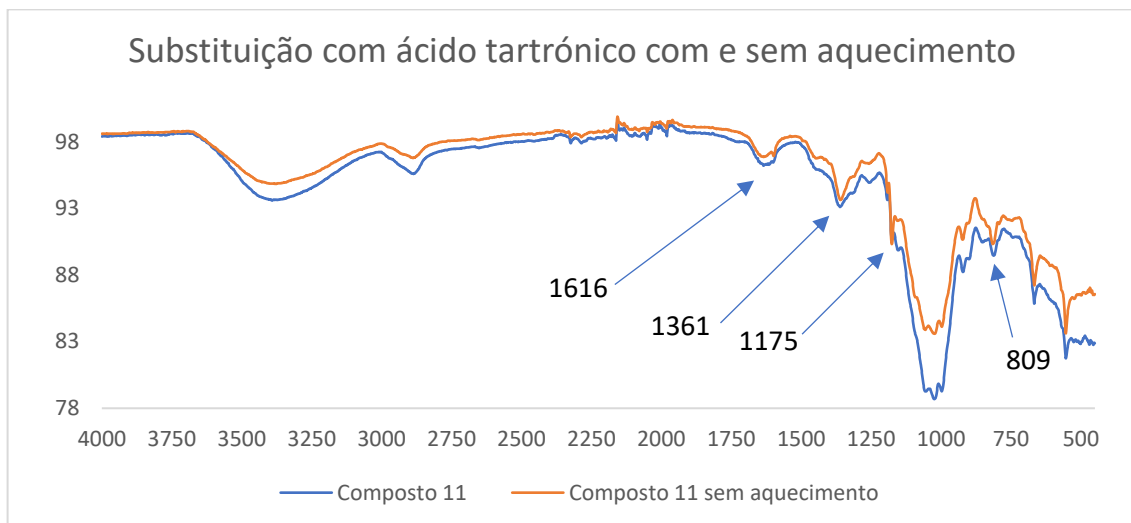


Figura 37 - infravermelho de comparação de reações de substituição com ácido tartrônico

A reação de substituição ocorreu com etóxido de sódio de forma a garantir que a remoção de todos os hidrogénios ácidos, com e sem a adição de aquecimento, infelizmente, embora tenha havido um decréscimo das bandas de tosilato a 1361, 1175, 809  $\text{cm}^{-1}$ , as bandas de carbonilo a 1616  $\text{cm}^{-1}$  não demonstram a intensidade esperada para um nível de substituição significativa na figura 37, e os produtos sintetizados não demonstraram solubilidade em solventes orgânicos ou aquosos, sugerindo o fracasso da reação.

### 3.6. Hidrólises de ésteres de Malonato

Como foi descrito a substituição de análogos constitui a alteração dos ácidos do grupo substituinte, o que torna o polímero inerte para como adsorvente. Por este motivo os produtos das reações de substituição têm de ser submetidos a uma reação de hidrólise onde os esteres introduzidos são hidrolisados de volta a ácidos carboxílicos.

Foram testadas diversas formas de hidrólise do ácido de Meldrum inclusive a utilização de base, ácido e a intervenção de micro-ondas. A utilização de micro-ondas, ou qualquer tipo de aquecimento, foi restringida à utilização de base de forma a evitar a descarboxilação ácida do ácido de Meldrum.

Como pode ser observado na figura 38 em baixo, a abertura do ácido de Meldrum resultou no decréscimo das bandas categorizadas como carbonilo 1634 e 1728  $\text{cm}^{-1}$ , este resultado pode ser explicado através de descarboxilação, uma vez que esta iria levar a uma diminuição de grupos carbonilo totais do polímero, com a exceção da síntese de celulose malónica **3h**, cuja utilização de ácido causa o aumento da intensidade das bandas de carbonilo em relação às bandas características da celulose. A abertura do ácido de Meldrum deveria causar um *shift* das bandas iniciais de éster

para ácido pelo que os resultados obtidos não foram suficientes para determinar quais das formas de hidrólise foram mais eficazes.

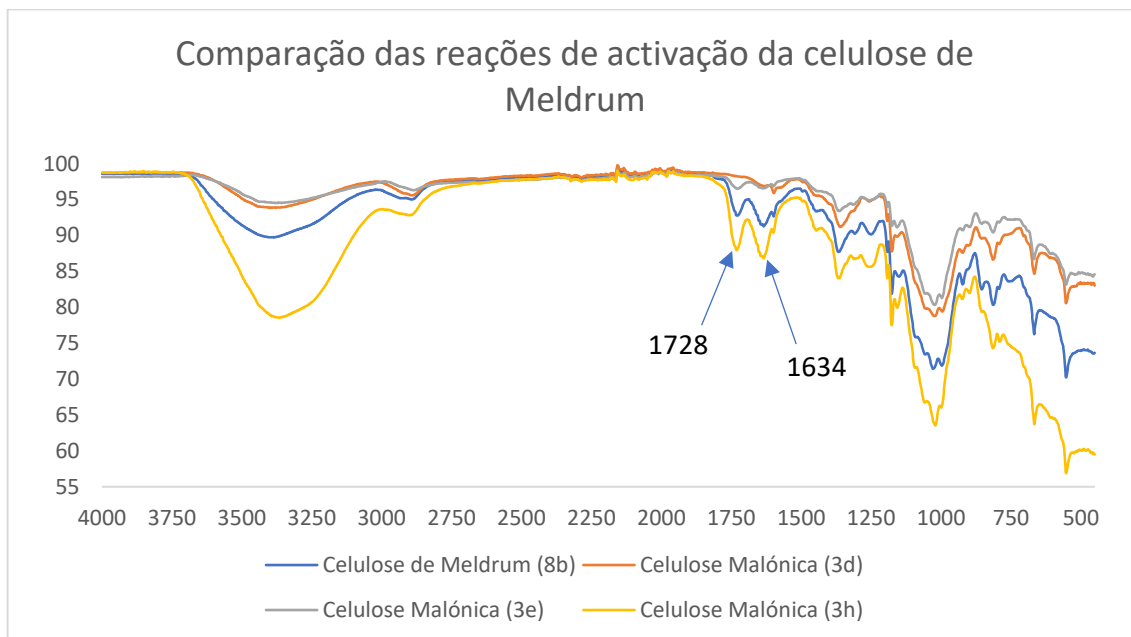


Figura 38 - FT-IR de abertura do Ácido de Meldrum; Composto **8b** – Celulose com Ácido de Meldrum; Composto **3d** – abertura com NaOH; Composto **3e** – hidrólise com NaOH em micro-ondas; Reação **3h** – hidrólise com HCl

A hidrólise do tert-butil malonato ocorreu com ácido trifluoroacético com e sem a utilização de micro-ondas, no entanto, ao contrário das reações de hidrólise do ácido de Meldrum, os espectros obtidos (figura 39) não demonstraram qualquer alteração dos espectros originais, sugerindo que a reação não se tinha realizado, o que torna a celulose de tert-butil malonato um mau candidato á forma de celulose necessária para formulação do polímero intendo.

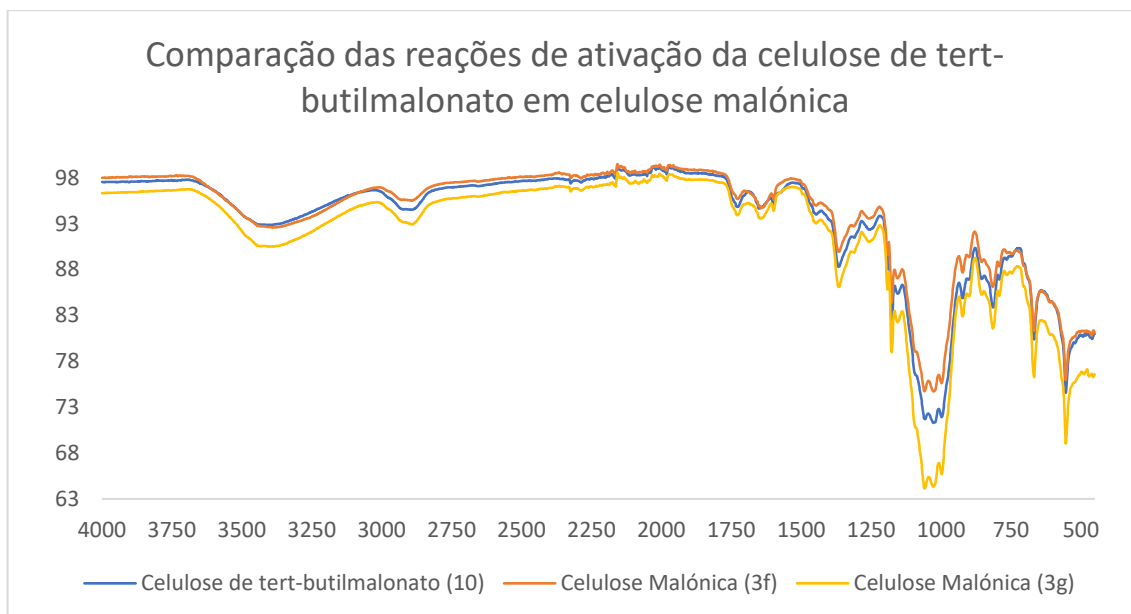


Figura 39 – FT-IR das reações de hidrólise do tert-butil malonato; Composto **10** – Celulose de tert-butil malonato; Composto **3f**: reação de hidrólise com ácido trifluoroacético; composto **3g** - hidrólise com ácido trifluoroacético em micro-ondas

### 3.7. Testes de Performance

O nível de substituição resultante de cada análogo e cada reação de ativação foi ainda analisado através da sua performance em adsorção de azul metileno (figura 40). Este pigmento, com absorção conhecida na região do visível, é um catião orgânico que pode ser usado como sonda de troca iónica.<sup>68,69</sup> A sua adsorção ao polímero a valores baixos de pH pode comprovar a presença significativa no mesmo de grupos de ácido malónico não descarboxilados ou esterificados.

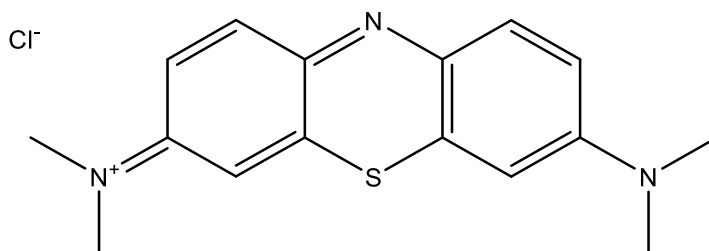


Figura 40 - estrutura de azul de metileno

De forma a determinar quais das reações e análogos possuem as propriedades pretendidas, realizaram-se testes preliminares nos quais cerca de 3mg de polímero foram colocados em contacto com 2 mL de uma solução de 40 mg/L de Azul Metileno a pH = 3 (correspondente ao pH do vinho branco) e a pH = 7. A mesma quantidade de DCMC convencional seria suficiente para reduzir a coloração da solução para transparente, pelo que, mesmo que a síntese alternativa não tenha o mesmo nível de substituição, ou devido as alterações consequentes, tenha menos atividade, a esta concentração seria possível detetar com alterações de coloração. Os resultados qualitativos dos testes podem ser observados na figura 41 encontram-se na tabela 2 em baixo, de acordo com análise visual das alterações observadas.

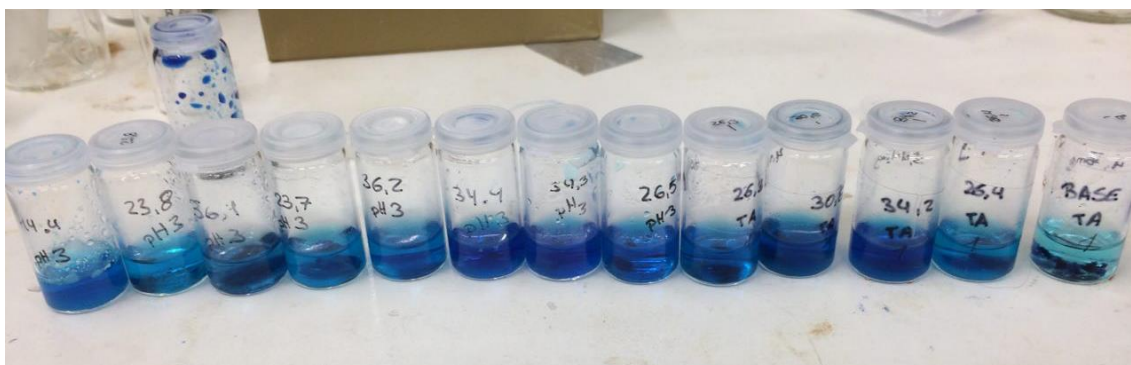


Figura 41 - fotografia dos testes de atividade preliminares

Tabela 2 - resultados dos testes de atividade preliminares, cada amostra foi testada com várias versões denominadas pelos números decimais associados a cada composto.

S – observou-se atividade; N – Não se observou atividade

Amostra	pH=3	pH=7
2d,4	N	-
8b,7	S	S
8b,8	S	-
3d,3	N	N
3d,4	S	S
3d,5	N	N
3e,5	N	-
11,1	-	N
11,2	N	N
11,3	N	N
11,4	N	N
3h,1	S	S
3h,2	S	S

De acordo com os testes de atividade preliminares (tabela 2), os compostos com mais atividade foram os polímeros de celulose de Meldrum hidrolisada com ácido **3h**, hidrolisada com base **3d** e a celulose de Meldrum sem reação de hidrólise **8b**, o que sugere que as condições reacionais utilizadas para a reação de substituição resultaram também na sua abertura. O teste preliminar é indicativo da presença de cargas negativas no polímero, a pH3 apenas o grupo malónico tem um pKa conjugado baixo o suficiente para assegurar a perda do próton, caso tenha ocorrido descarboxilação, o ácido carboxílico resultante não seria ácido o suficiente para manter a carga o que significa que o teste demonstra a presença não só de ácidos carboxílicos, mas de ácidos com um pKa semelhante ao pretendido. Assim, polímeros que resultaram em descarboxilação significativa não demonstram atividade a pH = 3, mas demonstram a pH = 7.

A partir dos resultados dos testes preliminares foram selecionados 3 polímeros com os melhores resultados para serem testados mais detalhadamente em testes de adsorção em azul metileno (figura 42), neste caso a celulose de Meldrum sem tratamento, e a mesma ativada com NaOH e HCl.

No entanto, no final dos testes ficou aparente que a sua distribuição não poderia ser inteiramente explicada como uma forma de Langmuir, uma vez que pode ser observado que a saturação do polímero parece ser alcançada por volta dos 800 mg/L mas apresenta um aumento significativo nos pontos seguintes, sugerindo que forma de adsorção pode depender de uma segunda camada de moléculas de Azul Metileno. Os polímeros testados demonstraram capacidades de adsorção bastante semelhantes o que sugere que a reação de hidrólise realizada no caso dos polímeros **3d** e **3h** não tiveram sucesso em abrir grupos meldrum na celulose, ou que, a reação de substituição não levou à adição de grupos de meldrum sem resultar na sua hidrólise.

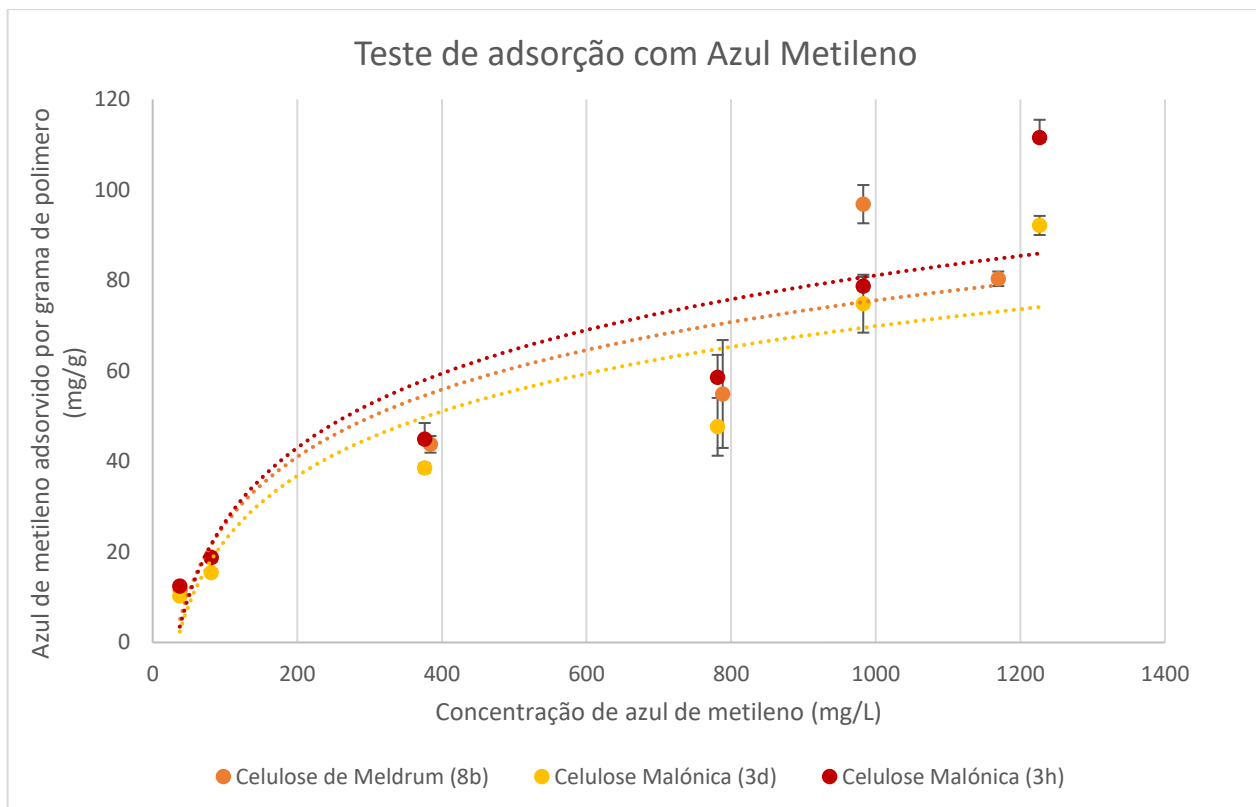


Figura 42 - resultados das adsorções com azul metileno; composto **8b**- Celulose de Meldrum; Composto **3d** - celulose ativada com NaOH; Composto **3h**- celulose ativada com HCl

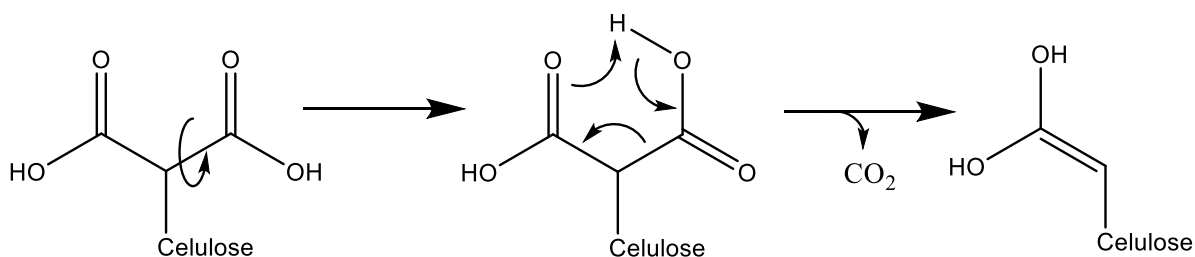


Figura 43 - mecanismo de descarboxilação do ácido malónico

O polímero com a melhor performance **3h**, com um máximo de 111 mg de azul metileno adsorvido por grama de polímero, teve resultados relativamente superiores, mas não diferentes o suficiente que não pudessem ser resultantes de erro, e o polímero **3d** resultou numa performance inferior, que pode potencialmente ser resultado de descarboxilação do grupo malónico (figura 43), ou da mesma forma que **3h**, produto de da margem de erro dos testes de adsorção.

Tabela 3 - resultados de análise elementar ICP dos polímeros desenvolvidos; Composto **8b** – celulose de meldrum; Composto **3d** – celulose de meldrum hidrolisada a Celulose malónica com NaOH; composto **3h** – celulose de meldrum hidrolisada a celulose malónica com HCl

Amostra	massa de polímero (mg)	Massa de Na <sub>2</sub> (µg)	Peso amostra (g)/ml	Conc. Na (ppm)	mmol Na <sub>2</sub> / polímero (g)
<b>8b</b>	2.4	24.16	0.0048	5034.2	231.58
<b>3d</b>	1.0	9.24	0.0020	4619.5	212.50
<b>3h</b>	1.4	3.06	0.0028	1091.3	50.20

Análise de ICP (tabela 3) dos polímeros efetivos demonstra um grande aumento na quantidade de sódio por grama de polímero em celuloses de Meldrum não hidrolisadas e hidrolisadas a partir de NaOH, o que não é consistente com os dados de adsorção (figura 39) que demonstram que estes polímeros têm capacidades de adsorção semelhantes. É possível que a discrepância se deva à presença de grupos malónicos ou meldrum descarboxilados, que embora sejam capazes de captar iões de sódio não contribuem para a função desejada. Se este for o caso, os 5034 ppm de sódio presentes na celulose de Meldrum **8b** provêm tanto de grupos malónicos ativos como de grupos carboxilato descarboxilados. Da hidrólise com hidróxido de sódio **3d** e ácido clorídrico **3h** não resulta numa abertura significativa de grupos meldrum, possivelmente porque não houve implementação de grupos meldrum, o que explica a atividade semelhante de todos os polímeros.

Desta forma, a baixa quantidade de sódio presente na celulose malónica **3h** não corresponde a uma diminuição de grupos ativos, mas apenas à baixa protonação dos grupos carboxilato, cuja regeneração não foi eficaz com a lavagem com hidróxido de sódio e cloreto de sódio. Isto significa que pelo menos 1091 ppm dos 5034 ppm, encontrados na celulose de Meldrum, correspondem a grupos malónico e o resto a grupos descarboxilados.

## 4. Conclusão

Durante a elaboração desta dissertação foram produzidos polímeros que demonstram capacidade para adsorver espécies carregadas positivamente sem a utilização de bromo, e com a utilização de solventes verdes como água e etanol. Adicionalmente os polímeros formados têm capacidade de adsorção sem reações de hidrólise e são insolúveis em água sem reações crosslinking, o que facilita o processo de produção.

No entanto, a reação de substituição é o passo crucial da síntese e ainda não se encontra otimizada. De momento a reação com o ácido de Meldrum tem a vantagem de realizar a reação de substituição e de hidrólise do grupo Meldrum para Malónico, no entanto a capacidade de adsorção obtida sugere um nível de substituição baixo ou a um alto nível de descarboxilação. Seria possível realizar um estudo bidimensional da reação, onde a temperatura e tempo de reação podem ser alterados de forma a encontrar as condições ideais para a reação de substituição de forma a limitar a descarboxilação.

Durante a síntese dos diversos análogos a análise de resultados foi dificultada de interpretação de FT-IR devido a ambiguidade de bandas de carbonilo e RMN devido a insolubilidade de produtos substituídos, a melhor forma encontrada para determinar a presença de grupos malónicos foi a utilização de testes preliminares onde o pH baixo garante a atividade de grupos com a acidez alta necessária para o funcionamento de DCMC.

Testes de adsorção com azul metileno demonstram que o polímero formado não tem a mesma capacidade de adsorção que a DCMC original, no entanto, esta capacidade depende da reação de substituição não otimizada, significando que a performance dos polímeros sintetizados pode ainda ser significativamente aumentado com a realização de reações com um menor nível de descarboxilação.

## 5. Referencias

1. Kwon, S. W. Profiling of soluble proteins in wine by nano-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 7258–7263 (2004).
2. Cheynier, V., Schneider, R., Salmon, J.-M. & Fulcrand, H. Chemistry of Wine. *Compr. Nat. Prod. II* 1119–1172 (2010). doi:10.1016/B978-008045382-8.00088-5
3. Dufrechou, M., Poncet-Legrand, C., Sauvage, F. X. & Vernhet, A. Stability of white wine proteins: Combined effect of pH, ionic strength, and temperature on their aggregation. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 1308–1319 (2012).
4. Van Sluyter, S. C. *et al.* Wine protein haze: Mechanisms of formation and advances in prevention. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 4020–4030 (2015).
5. Benucci, I. Removal of unstable proteins from white wine by immobilized acid protease. *Org. Process Res. Dev.* 8–9 (2009).
6. Marangon, M., Sauvage, F.-X., Waters, E. J. & Vernhet, A. Effects of ionic strength and sulfate upon thermal aggregation of grape chitinases and thaumatin-like proteins in a model system. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 2652–62 (2011).
7. Marangon, M., Vincenzi, S., Lucchetta, M. & Curioni, A. Heating and reduction affect the reaction with tannins of wine protein fractions differing in hydrophobicity. *Anal. Chim. Acta* **660**, 110–118 (2010).
8. Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W. & Carpenter, J. F. Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. *Pharm. Res.* **20**, 1325–1336 (2003).
9. Pocock, K. F., Alexander, G. M., Hayasaka, Y., Jones, P. R. & Waters, E. J. Sulfate - A candidate for the missing essential factor that is required for the formation of protein haze in white wine. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1799–1807 (2007).
10. Gazzola, D., Van Sluyter, S. C., Curioni, A., Waters, E. J. & Marangon, M. Roles of proteins, polysaccharides, and phenolics in haze formation in white wine via reconstitution experiments. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 10666–10673 (2012).
11. Pocock, K. F., Hayasaka, Y., McCarthy, M. G. & Waters, E. J. Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1637–1643 (2000).
12. Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Waters, E. J. & Menz, R. I. Structure of haze forming proteins in white wines: *Vitis vinifera* thaumatin-like proteins. *PLoS One* **9**, 1–21 (2014).
13. Siebert, K. J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 353–362 (1999).
14. Kunz, W., Henle, J. & Ninham, B. W. 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **9**, 19–37 (2004).
15. Chagas, R., Laia, C. A. T., Ferreira, R. B. & Ferreira, L. M. Sulfur dioxide induced aggregation of wine thaumatin-like proteins: Role of disulfide bonds.

- Food Chem.* **259**, 166–174 (2018).
16. Basu, D. *et al.* A small multigene hydroxyproline-O-galactosyltransferase family functions in arabinogalactan-protein glycosylation, growth and development in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* **15**, 1–23 (2015).
  17. Harbertson, J. A Guide to the Fining of Wine. *WSU Wine Grape Res. Ext. Newsl.* **118**, 1–10 (2008).
  18. Majewski, P., Barbalet, A. & Waters, E. J. \$1 Billion Hidden Cost of Bentonite Fining. *Aust. New Zeal. Grapegrow. Winemak.* **1307**, 58–62 (2011).
  19. Sutherland, W. M. & Geologist, M. Wyoming Bentonite. (1888).
  20. Kutlić, A., Bedeković, G. & Sobota, I. Bentonite processing. *Rud. Geol. Naft. Zb.* **24**, 61–65 (2012).
  21. Butzke, C. & Professor, E. Purdue extension Fining with Bentonite Clay is one way to remove proteins that could make wine hazy. (2009).
  22. Uop, T., The, A. E. & Iv, L. B. ADSORPTION AND ION EXCHANGE. *Adsorpt. J. Int. Adsorpt. Soc.* 523–554
  23. Uchiyama, N. & Horiuchi, S. In-situ utilization of waste bentonite slurry. *Stud. Environ. Sci.* **60**, 217–226 (1994).
  24. Schmidt, S. A. *et al.* Hpf2 glycan structure is critical for protection against protein haze formation in white wine. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3308–3315 (2009).
  25. Dickinson, E. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein± polysaccharide interactions. *Trends Food Sci. Technol.* **9**, 347–354 (1999).
  26. Pretorius-Isak-S. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16 (8)**, 675-729. (2000).
  27. Waters, E. J., Wallace, W. & Williams, P. J. Identification of Heat-Unstable Wine Proteins and Their Resistance to Peptidases. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1514–1519 (1992).
  28. Tattersall, D. B. *et al.* Pathogenesis Related Proteins — Their Accumulation in Grapes during Berry Growth and Their Involvement in White Wine Heat Instability. Current Knowledge and Future Perspectives in Relation to Winemaking Practices. *Mol. Biol. Biotechnol. Grapevine* 183–201 (2001). doi:10.1007/978-94-017-2308-4\_7
  29. Proteins in white wine, II: Their resistance to proteolysis is not due to either phenolic association or glycosylation. *Aust. J. Grape Wine Res.* **1**, 94–99 (1995).
  30. Taylor, P., D, H. J. M. L. P. & D, L. C. V. L. P. Critical Reviews in Plant Sciences Pathogenesis - related proteins of plants Pathogenesis-Related Proteins of Plants. 37–41 (2008).
  31. van der Hoorn, R. A. L. Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 191–223 (2008).
  32. Rehmanji, M., Gopal, C. & Mola, A. Beer Stabilization Technology gy - clearly a matter of choice Scope of Presentation. *Master Brew. Assoc. Am.* **42**, 332–338 (2005).
  33. HSU, J., HEATHERBELL, D., FLORES, J. & WATSON, B. Heat-unstable proteins in grape juice and wine. II. Characterization and removal by ultrafiltration. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**, 17–22 (1987).

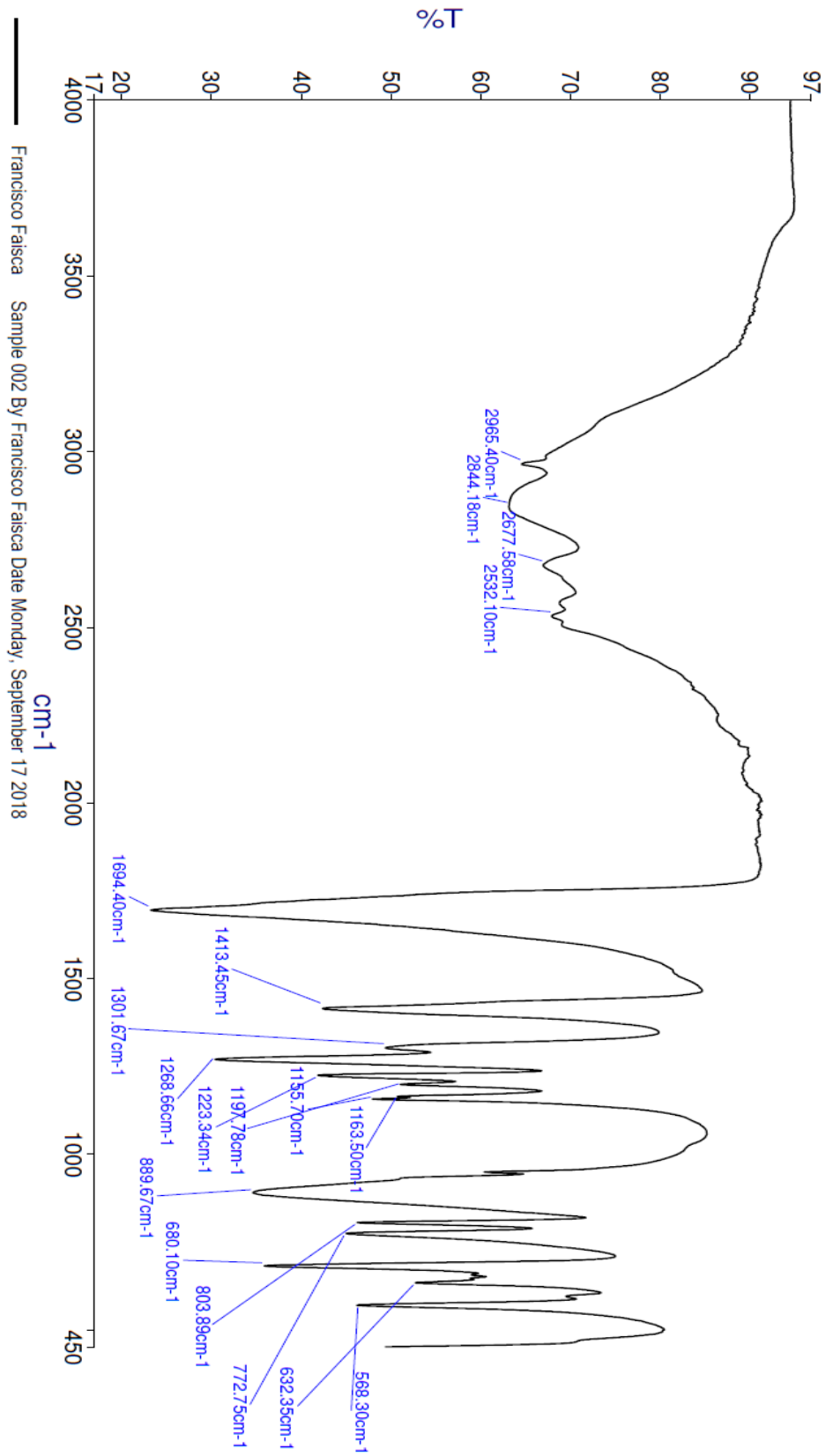
34. Mierczynska-Vasilev, A. *et al.* Magnetic separation technology: Functional group efficiency in the removal of haze-forming proteins from wines. *Food Chem.* **275**, 154–160 (2019).
35. Sarmiento, M. R., Oliveira, J. C. & Boulton, R. B. Selection of low swelling materials for protein adsorption from white wines. *Int. J. Food Sci. Technol.* **35**, 41–47 (2000).
36. Pashova, V., Güell, C. & López, F. White Wine Continuous Protein Stabilization by Packed Column. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1558–1563 (2004).
37. Salazar, F. N., de Bruijn, J. P. F., Seminario, L., Güell, C. & López, F. Improvement of wine crossflow microfiltration by a new hybrid process. *J. Food Eng.* **79**, 1329–1336 (2007).
38. Marangon, M., Lucchetta, M. & Waters, E. J. Protein stabilisation of white wines using zirconium dioxide enclosed in a metallic cage. *Aust. J. Grape Wine Res.* **17**, 28–35 (2011).
39. Lucchetta, M., Pocock, K. F., Waters, E. J. & Marangon, M. Use of zirconium dioxide during fermentation as an alternative to protein fining with bentonite for white wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **64**, 400–404 (2013).
40. Mierczynska-Vasilev, A., Wahono, S. K., Smith, P. A., Bindon, K. & Vasilev, K. Using Zeolites To Protein Stabilize White Wines. *ACS Sustain. Chem. Eng.* (2019). doi:10.1021/acssuschemeng.9b01583
41. Vincenzi, S., Polesani, M. & Curioni, A. Removal of specific protein components by chitin enhances protein stability in a white wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **56**, 246–254 (2005).
42. Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. & Jeon, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 37–51 (1999).
43. Spagna, G. *et al.* The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food Res. Int.* **29**, 241–248 (1996).
44. Cabello-Pasini, A., Victoria-Cota, N., Macias-Carranza, V., Hernandez-Garibay, E. & Muñoz-Salazar, R. Clarification of wines using polysaccharides extracted from seaweeds. *Am. J. Enol. Vitic.* **56**, 52–59 (2005).
45. Marangon, M. *et al.* Addition of carrageenan at different stages of winemaking for white wine protein stabilization. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 6516–6524 (2013).
46. Marangon, M. *et al.* Protein removal from a Chardonnay juice by addition of carrageenan and pectin. *Aust. J. Grape Wine Res.* **18**, 194–202 (2012).
47. L. M. Ferreira, R. Chagas, I. M Coelhoso, R. B. Ferreira, S. V. Patent. (2019).
48. McNamara, E. L. *et al.* Preventing protein haze in bottled white wine. *Neuromuscul. Disord.* **24**, 833 (2014).
49. Ferreira, R. B., Pic, M. A., Monteiro, S. & Teixeira, A. R. The wine proteins. *Food Sci. Technol.* **12**, 230–239 (2002).
50. Heinze, T., El Seoud, O. A. & Koschella, A. *Principles of Cellulose Derivatization.* (2018). doi:10.1007/978-3-319-73168-1\_4
51. Elchinger, P. H. *et al.* Tosylcellulose synthesis in aqueous medium. *Green Chem.* **14**, 3126–3131 (2012).
52. Jia, H. *et al.* Tosylation of alcohols: An effective strategy for the functional group

- transformation of organic derivatives of polyoxometalates. *Sci. Rep.* **7**, 2–10 (2017).
53. Clayden, J., Greeves, N. & Warren, S. Clayden, Warren: Organic Chemistry. (2000).
  54. Schmidt, S., Liebert, T. & Heinze, T. Synthesis of soluble cellulose tosylates in an eco-friendly medium. *Green Chem.* **16**, 1941–1946 (2014).
  55. Points, K. *Bromine Toxicological Overview*. (2009).
  56. FishVet. *Safety Data Sheet on p-Toluenesulfonic acid monohydrate. Industrial & Engineering Chemistry* **40**, (1948).
  57. Lindner, O. & Rodefeld, L. *Benzenesulfonic Acids and their Derivatives*. (ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, 2012). doi:10.1002/14356007.a03
  58. Xiong, B., Zhao, P., Hu, K., Zhang, L. & Cheng, G. Dissolution of cellulose in aqueous NaOH/urea solution: Role of urea. *Cellulose* **21**, 1183–1192 (2014).
  59. Medronho, B. & Lindman, B. Brief overview on cellulose dissolution/regeneration interactions and mechanisms. *Adv. Colloid Interface Sci.* **222**, 502–508 (2015).
  60. Huntley, C. J., Crews, K. D. & Curry, M. L. Chemical functionalization and characterization of cellulose extracted from wheat straw using acid hydrolysis methodologies. *Int. J. Polym. Sci.* **2015**, (2015).
  61. Lab), T. T. (Tan and N., Ng, S. (Tan and N. L., Wang, Y. & Xiao, Y. Synthesis of mono-6-tosyl- $\beta$ -cyclodextrin, a key intermediate for the functional cyclodextrin derivatives. *Synth. Chem.* (2011).
  62. Ugwu, D. I. *et al.* Synthesis, characterization, molecular docking and in vitro antimalarial properties of new carboxamides bearing sulphonamide. *Eur. J. Med. Chem.* **135**, 349–369 (2017).
  63. Kotaro, N. *et al.* Novel sulfoquinovosylacylglycerol derivative, and use thereof as medicaments. **2002052327**, 1–2 (2019).
  64. Heinze, T., Rahn, K., Jaspers, M. & Berghmans, H. p-Toluenesulfonyl esters in cellulose modifications: Acylation of remaining hydroxyl groups. *Macromol. Chem. Phys.* **197**, 4207–4224 (1996).
  65. Ioelovich, M. I. Study on Acidic Degradation of Cellulose. *Innov. Corros. Mater. Sci. (Formerly Recent Patents Corros. Sci.)* **7**, 62–65 (2017).
  66. Menezes, J. C. J. M. D. S. *et al.* Synthesis and antioxidant activity of long chain alkyl hydroxycinnamates. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 773–777 (2011).
  67. Zhou, D. *et al.* Small molecules inhibit STAT3 activation, autophagy, and cancer cell anchorage-independent growth. *Bioorganic Med. Chem.* **25**, 2995–3005 (2017).
  68. Li, H. *et al.* Anion exchange synthesis of hollow  $\beta$ -In 2 S 3 nanoparticles: Adsorption and visible light photocatalytic performances. *J. Environ. Chem. Eng.* **7**, (2019).
  69. Easwaramoorthi, S. & Natarajan, P. Spectral and electrochemical studies of methylene blue and thionine encapsulated in zeolite-Y. *J. Porous Mater.* **15**, 343–349 (2008).

## Anexo

Infravermelho 1 - Composto <b>1a</b> .....	69
Infravermelho 2 – Composto <b>1b</b> .....	70
Infravermelho 3 – Composto <b>2a</b> .....	71
Infravermelho 4 – Composto <b>2b</b> .....	72
Infravermelho 5 – Composto <b>2c</b> .....	73
Infravermelho 6 – Composto <b>2d</b> .....	74
Infravermelho 7 – Composto <b>2e</b> .....	75
Infravermelho 8 – Composto <b>2f</b> .....	76
Infravermelho 9 – Composto <b>2g</b> .....	77
Infravermelho 10 – Composto <b>3a</b> .....	78
Infravermelho 11 – Composto <b>3b</b> .....	79
Infravermelho 12 - Composto <b>3c</b> .....	80
Infravermelho 13 – Composto <b>3d</b> .....	81
Infravermelho 14 – Composto <b>3e</b> .....	82
Infravermelho 15 – Composto <b>3f</b> .....	83
Infravermelho 16 – Composto <b>3g</b> .....	84
Infravermelho 17 - Composto <b>4</b> .....	85
Infravermelho 18 – Composto <b>5</b> .....	86
Infravermelho 19 - Composto <b>6</b> .....	87
Infravermelho 20 – Composto <b>7</b> .....	88
Infravermelho 21 – Composto <b>8a</b> .....	89
Infravermelho 22 – Composto <b>8b</b> .....	90
Infravermelho 23 – Composto <b>9a</b> .....	91
Infravermelho 24 – Composto <b>9b</b> .....	92
Infravermelho 25 – Composto <b>10</b> .....	93
Infravermelho 26 – Composto <b>11</b> .....	94
Infravermelho 27 - Celulose Avicel .....	95
Infravermelho 28 - ácido malónico .....	96
Infravermelho 29 - ácido p-toluenosulfónico .....	97
Infravermelho 30 - ácido tartrónico .....	98
RMN 1 - Composto <b>1a</b> .....	99
RMN 2 - Composto <b>2b</b> .....	100
RMN 3 - Composto <b>2c</b> .....	101
RMN 4 - Composto <b>3b</b> .....	102
RMN 5 - Composto <b>5</b> .....	103
RMN 6 - Composto <b>6</b> .....	104
RMN 7 - Composto <b>7</b> .....	105
RMN 8 - Composto <b>8b</b> .....	106
RMN 9 - Composto <b>9a</b> .....	107

Infravermelho 1 - Composto 1a



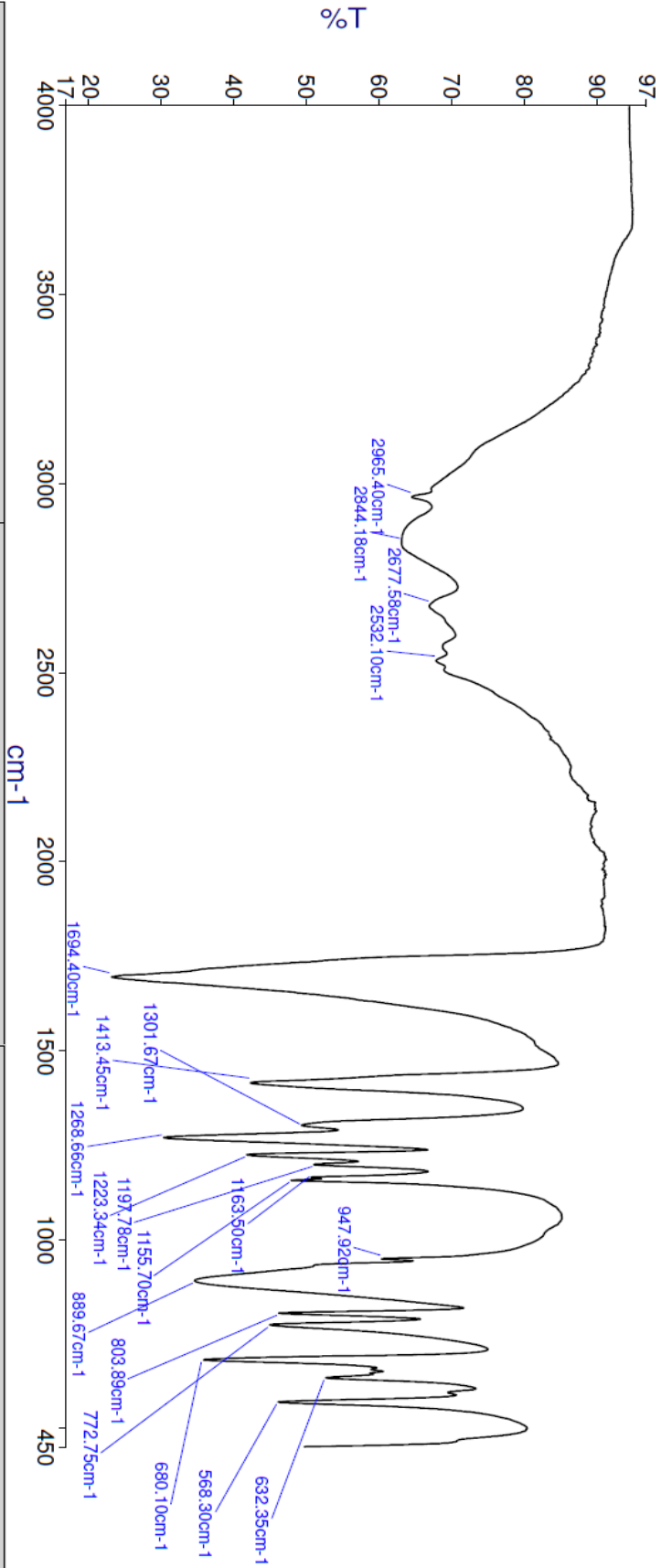
Francisco Faisca Sample 002 By Francisco Faisca Date Monday, September 17 2018

Infravermelho 2 – Composto 1b

Analyst  
Date

Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 10:37 AM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 10:37 AM



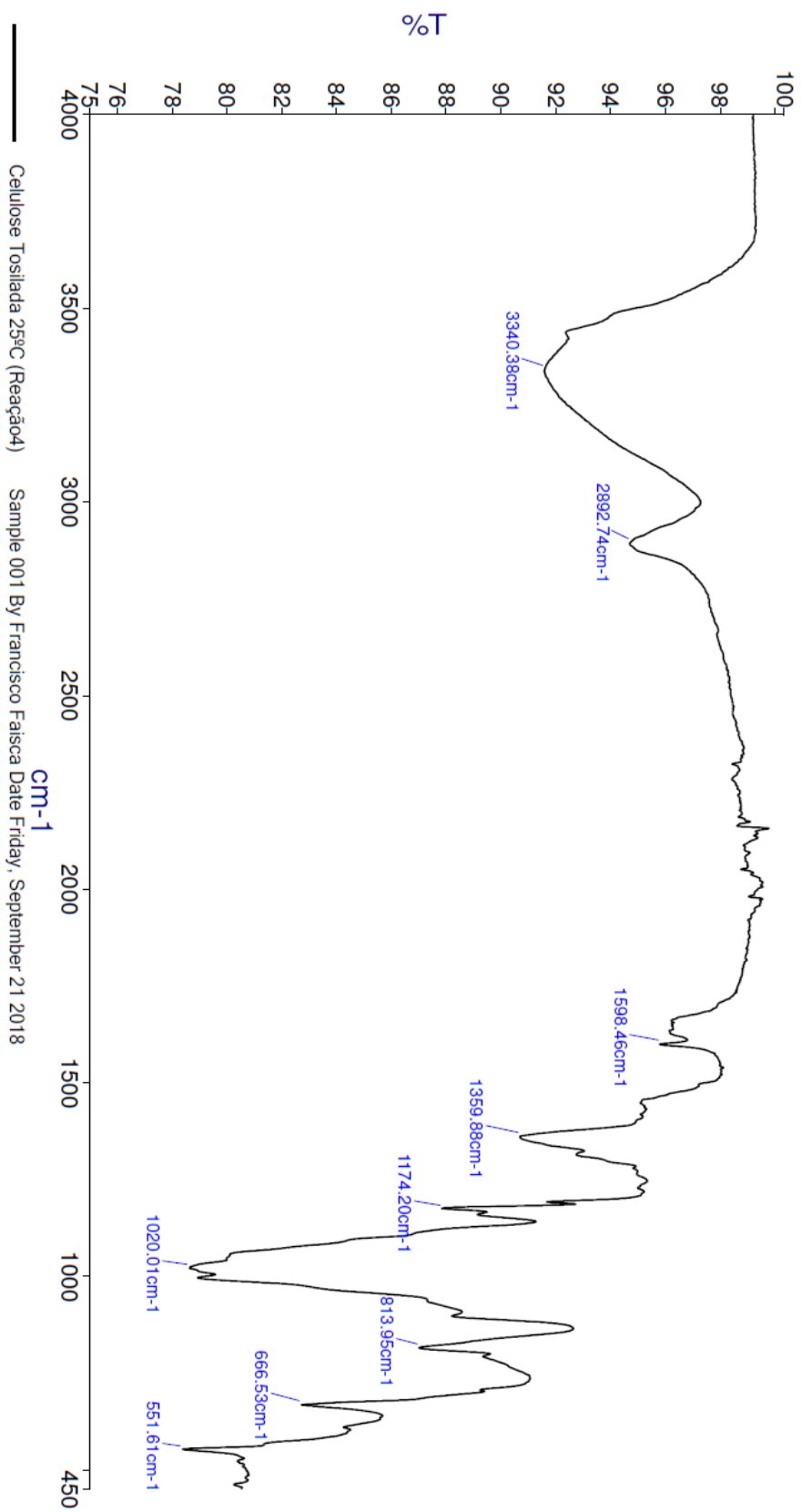
Sample Name	Description	Quality Checks
Acido Bromo Malonico (Reação2)	Sample 002 By Francisco Faisca Date Monday, September 17 2018	The Quality Checks do not report any warnings for the sample.

Infravermelho 3 – Composto 2a

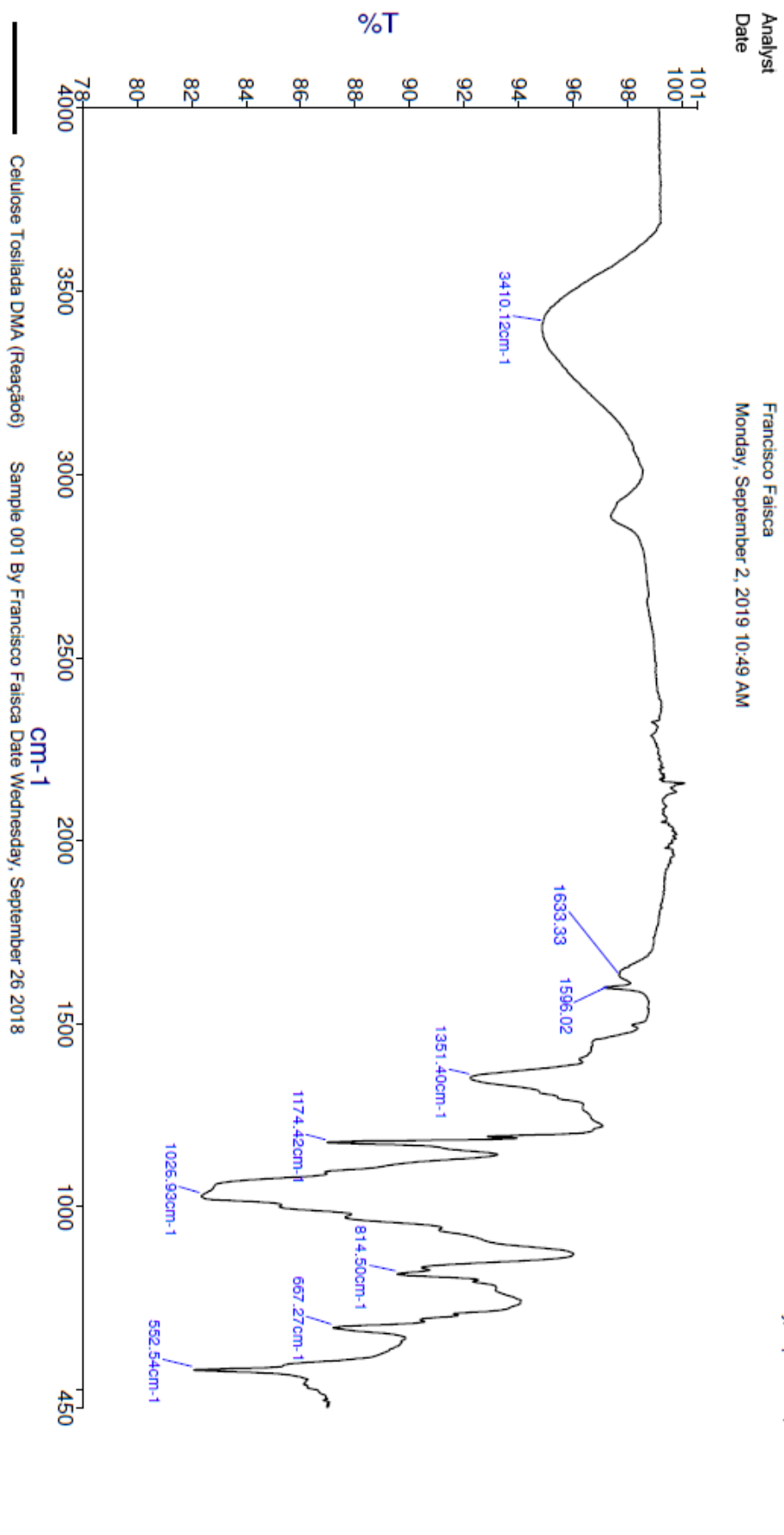
Analyst  
Date

Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 10:42 AM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 10:42 AM



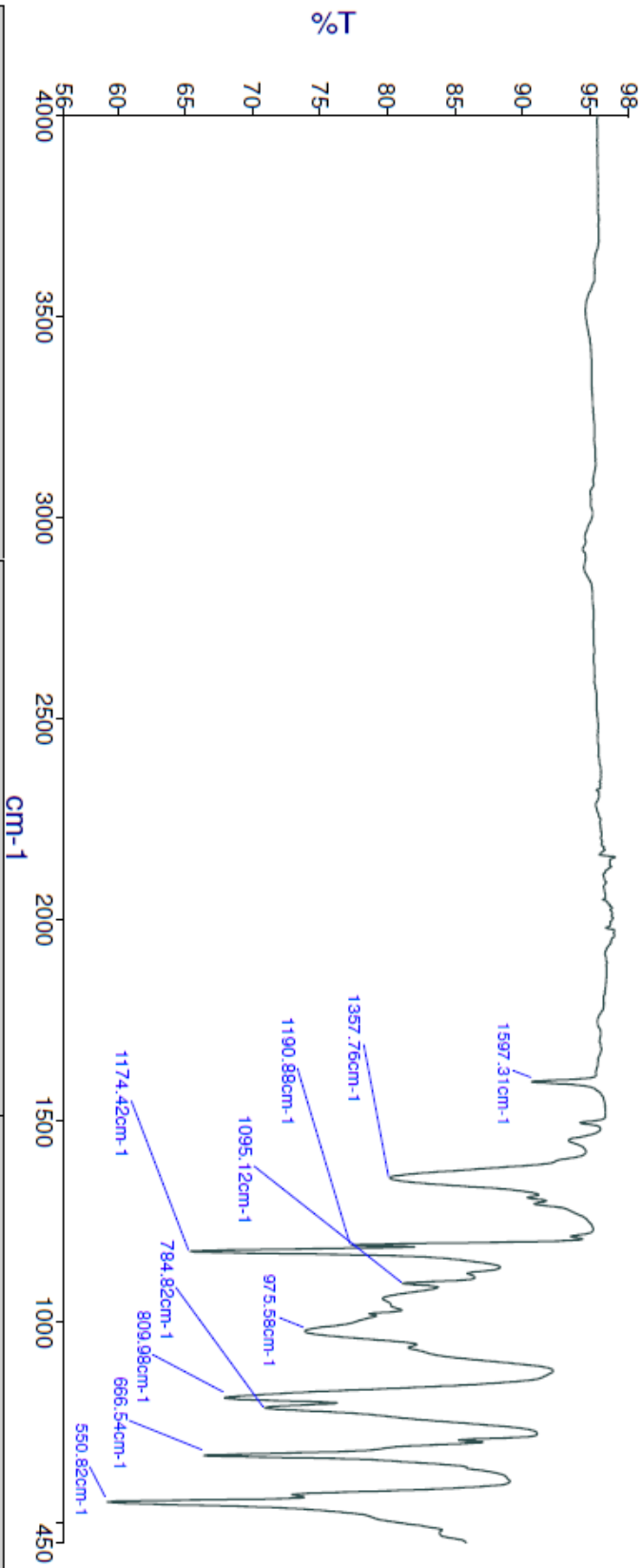
Infravermelho 4 – Composto 2b



Infravermelho 5 – Composto 2c

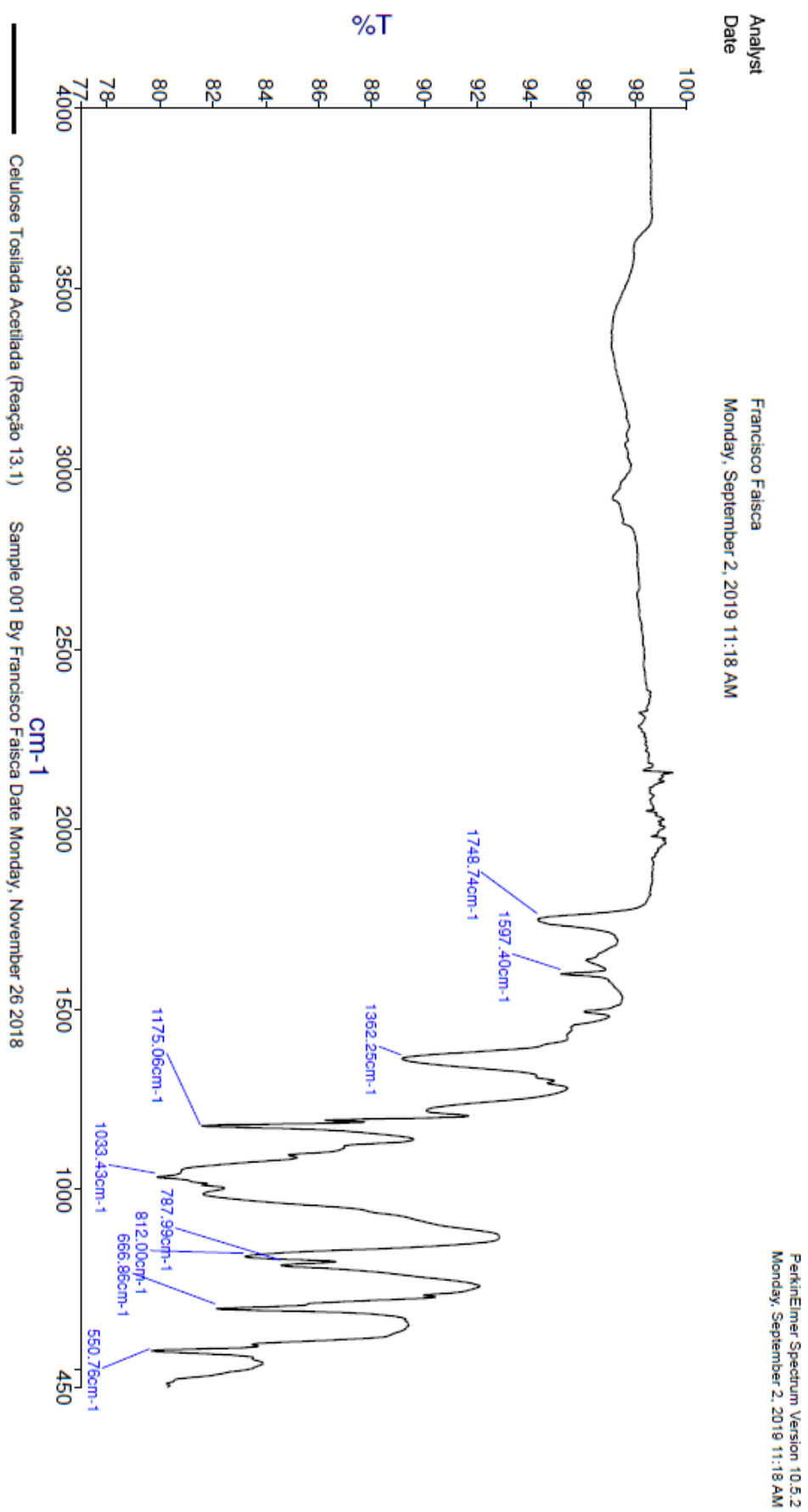
Analyst Francisco Faisca  
 Date Monday, September 2, 2019 11:02 AM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
 Monday, September 2, 2019 11:02 AM



Sample Name	Description	Quality Checks
Celulose Tosilada (Reação 11.1D)	Sample 001 By Francisco Faisca Date Thursday, November 29 2018	The Quality Checks give rise to a Weak Bands warning for the sample.

Infravermelho 6 – Composto 2d

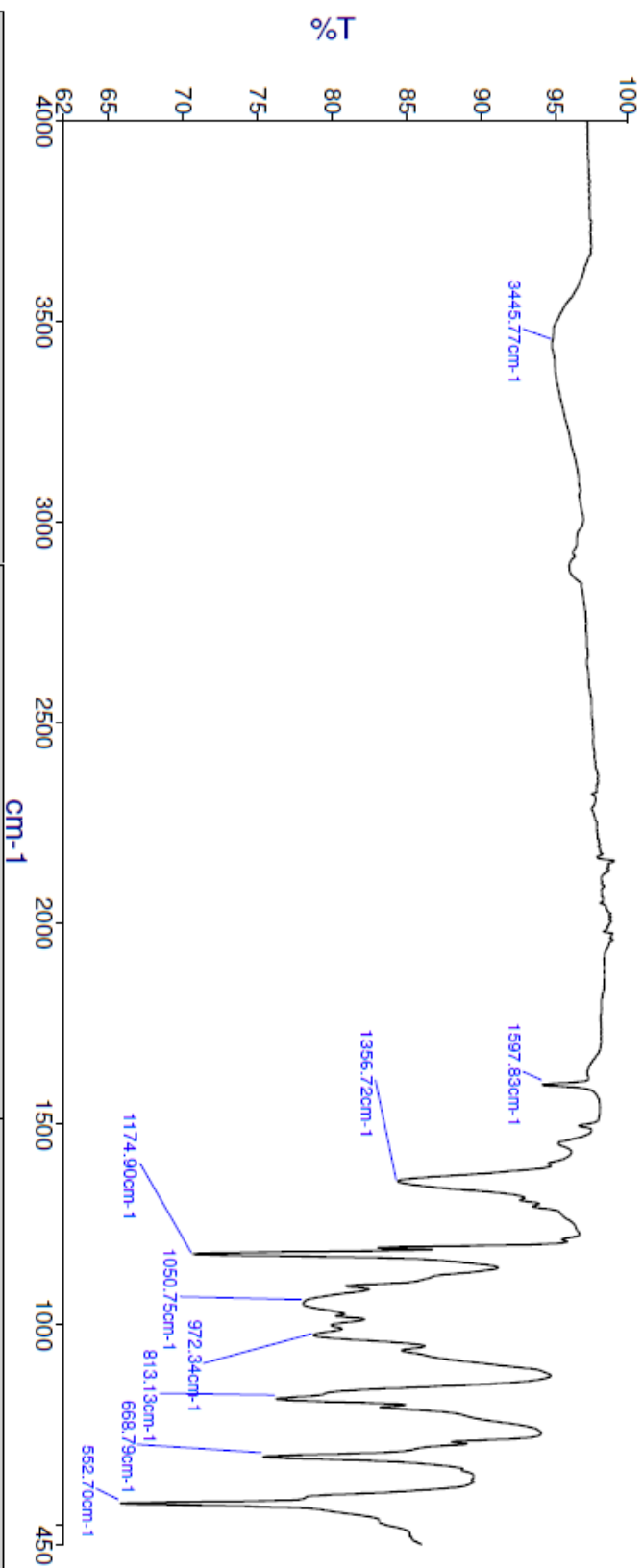


Infravermelho 7 – Composto 2e

Analyst  
Date

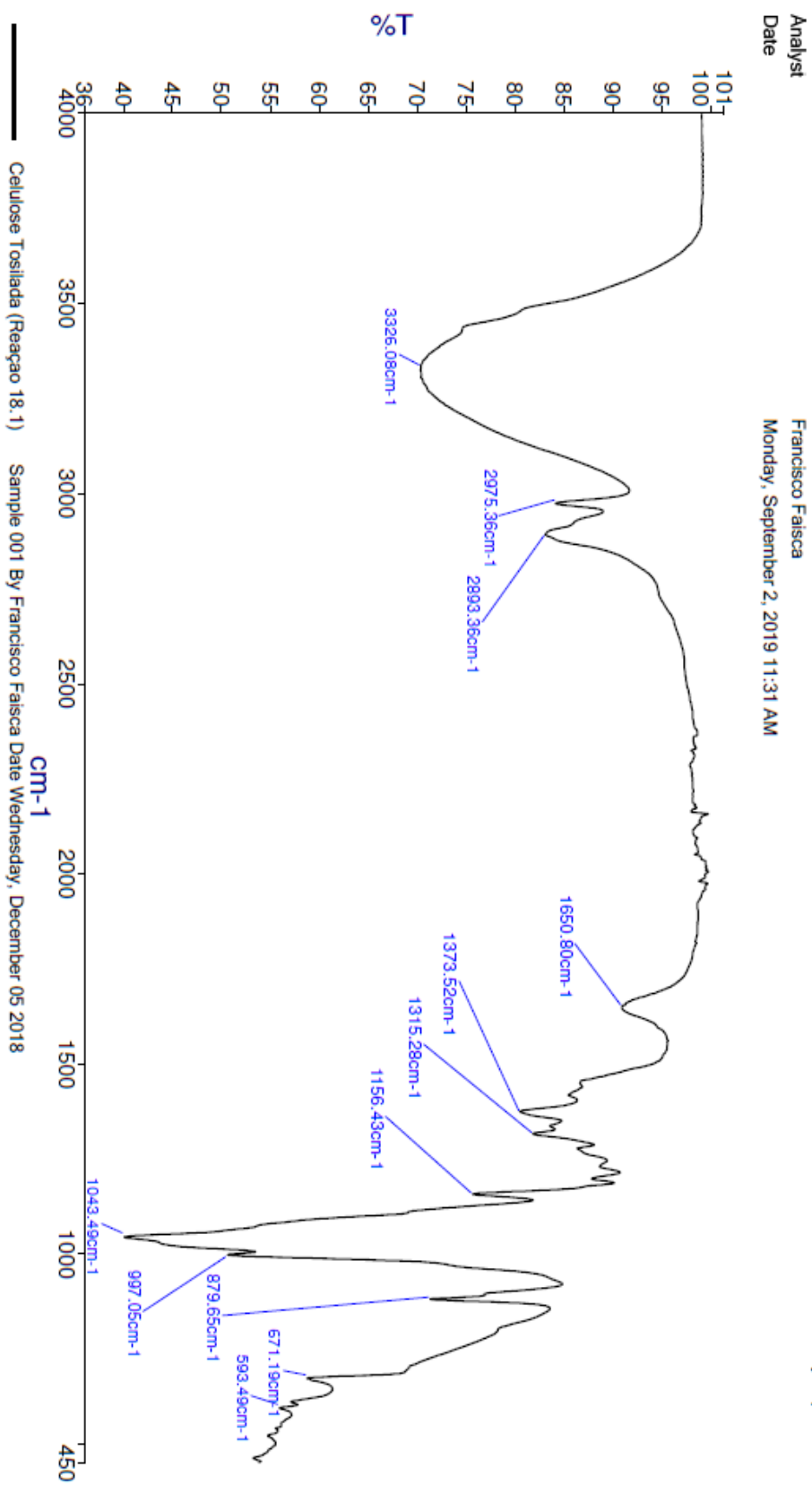
Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 11:21 AM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 11:21 AM

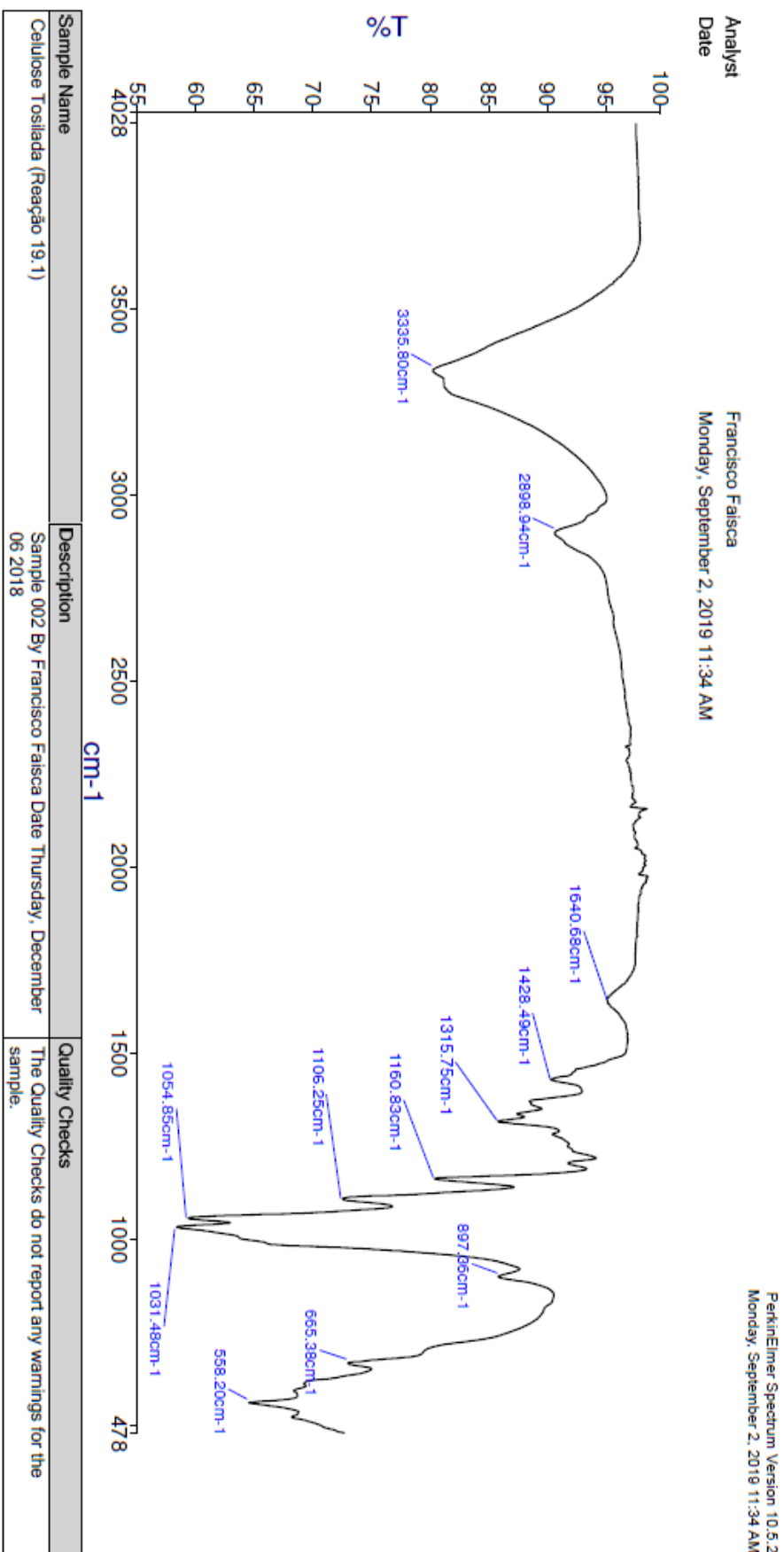


Sample Name	Description	Quality Checks
Celulose Tosilada (Reação 14.3)	Sample 001 By Francisco Faisca Date Monday, January 14 2019	The Quality Checks give rise to a Weak Bands warning for the sample.

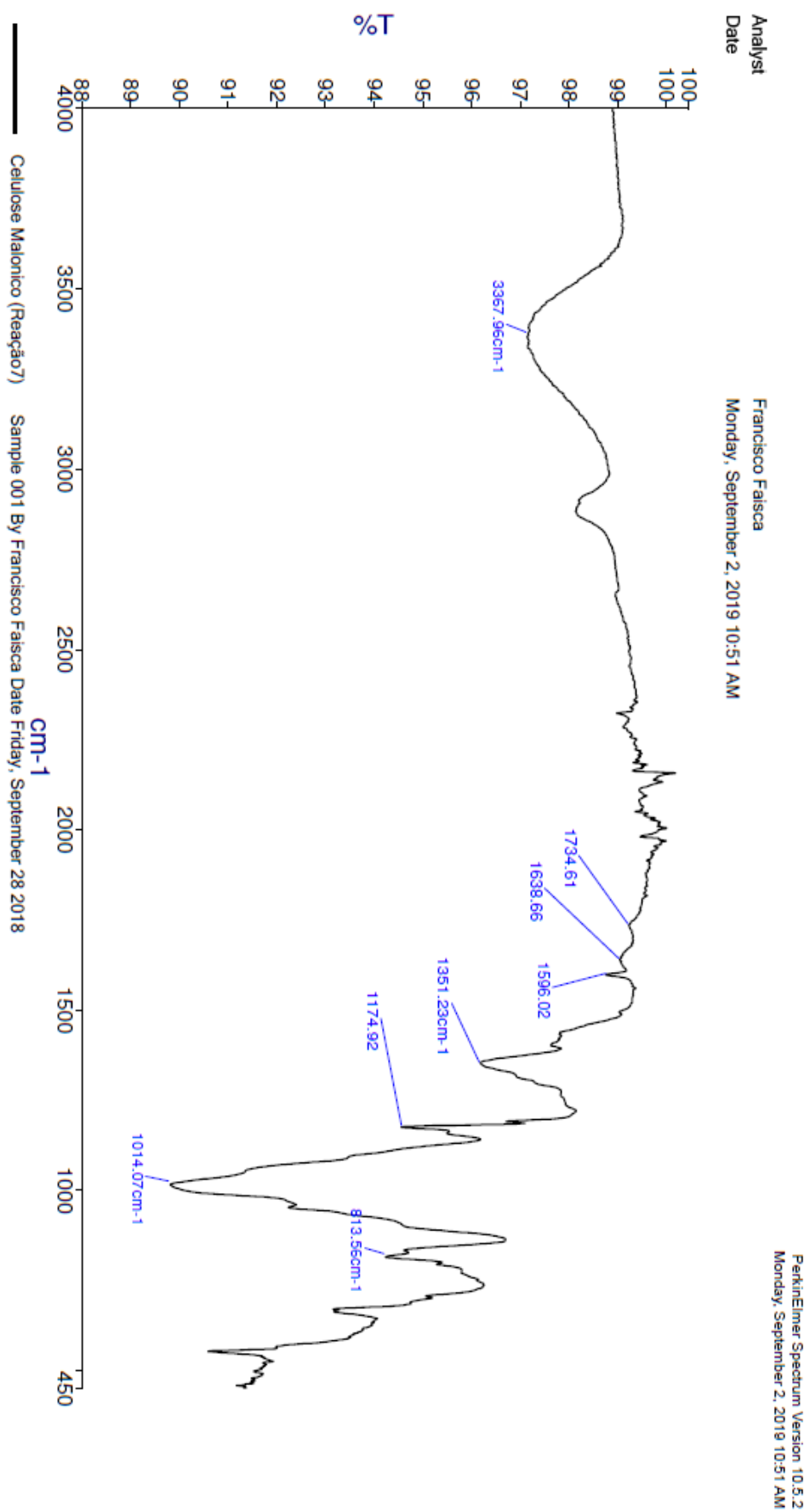
Infravermelho 8 – Composto 2f



Infravermelho 9 – Composto 2g



Infravermelho 10 – Composto 3a

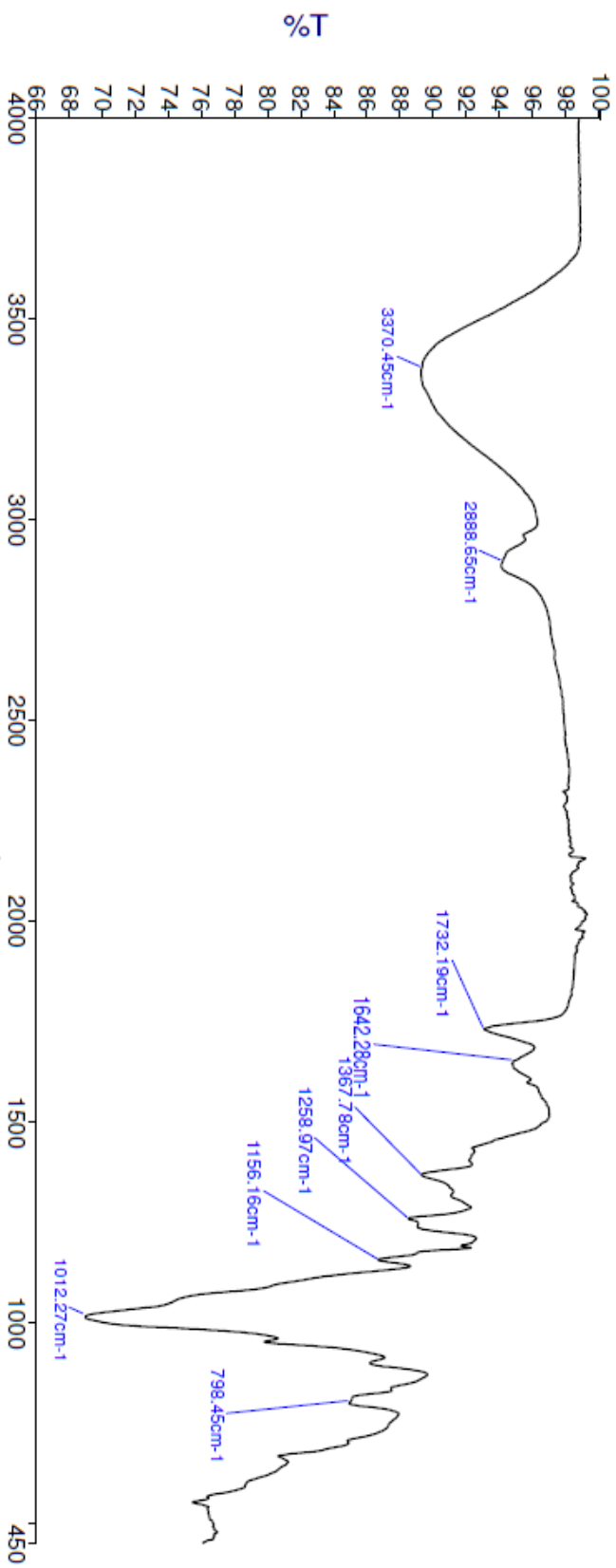


Infravermelho 11 – Composto 3b

Analyst  
Date

Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 10:54 AM

Parkinson Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 10:54 AM

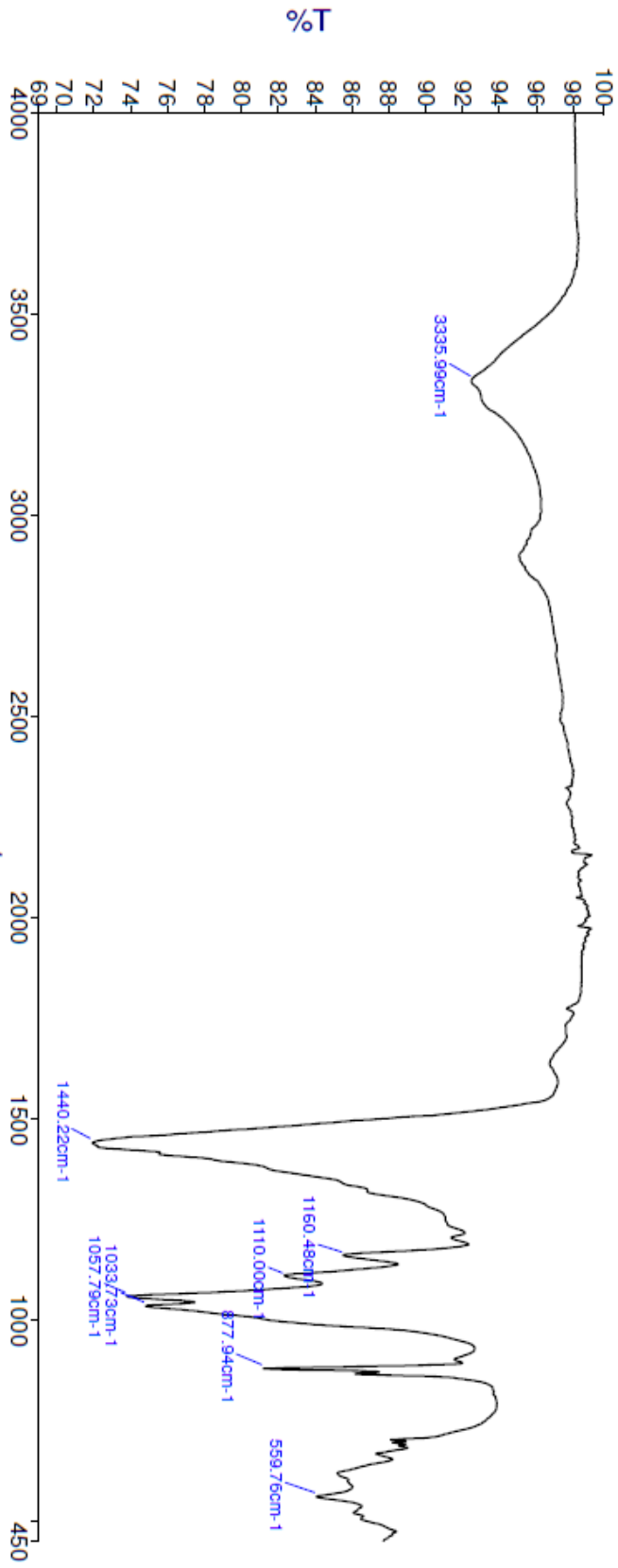


Sample Name	Description	Quality Checks
Celulose Malonica (Reação8.2)	Sample 001 By Francisco Faisca Date Tuesday, October 09 2018	The Quality Checks give rise to a Weak Bands warning for the sample.

Infravermelho 12 - Composto 3c

Analyst Francisco Faisca  
 Date Monday, September 2, 2019 10:58 AM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
 Monday, September 2, 2019 10:58 AM



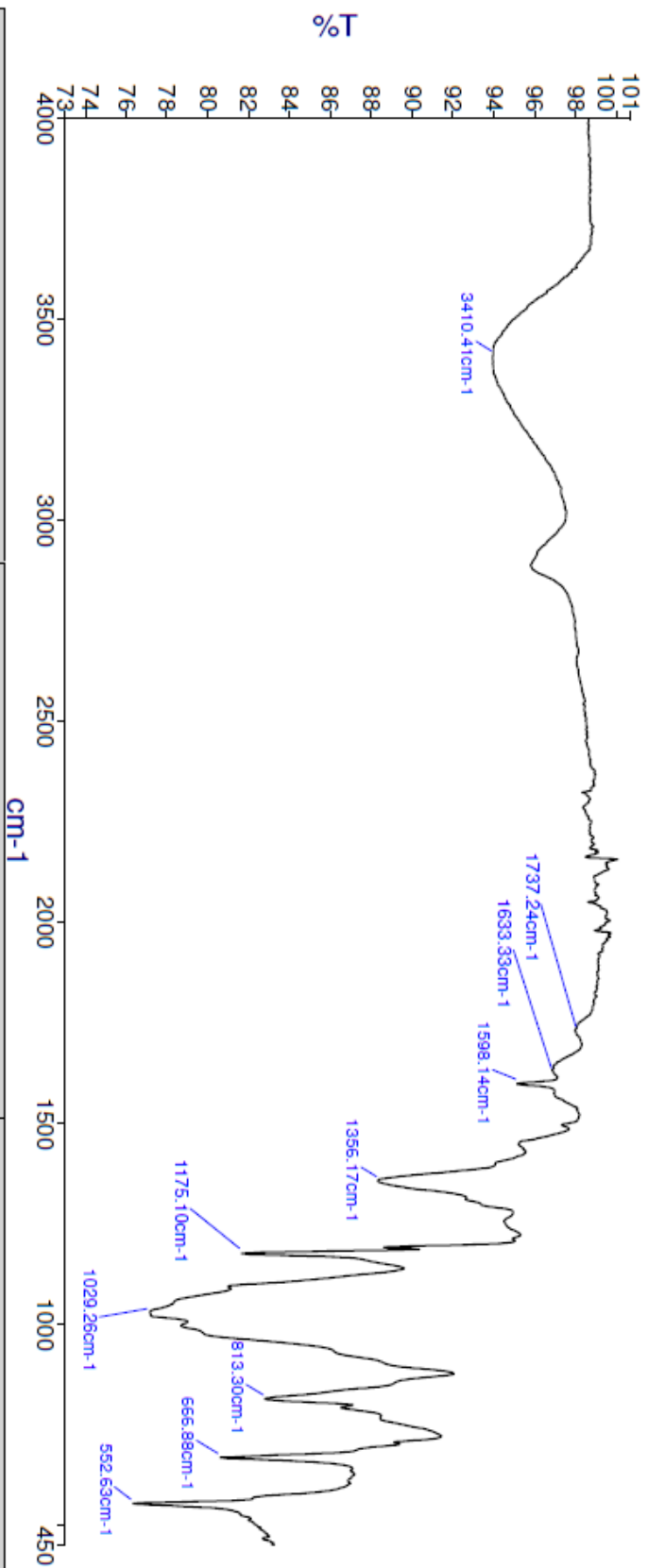
Sample Name	Description	Quality Checks
Celulose Malonica de Mesilo (Reação 10.2)	Sample 001 By Francisco Faisca Date Wednesday, November 07 2018	The Quality Checks give rise to a Weak Bands warning for the sample.

Infravermelho 13 – Composto 3d

Analyst  
Date

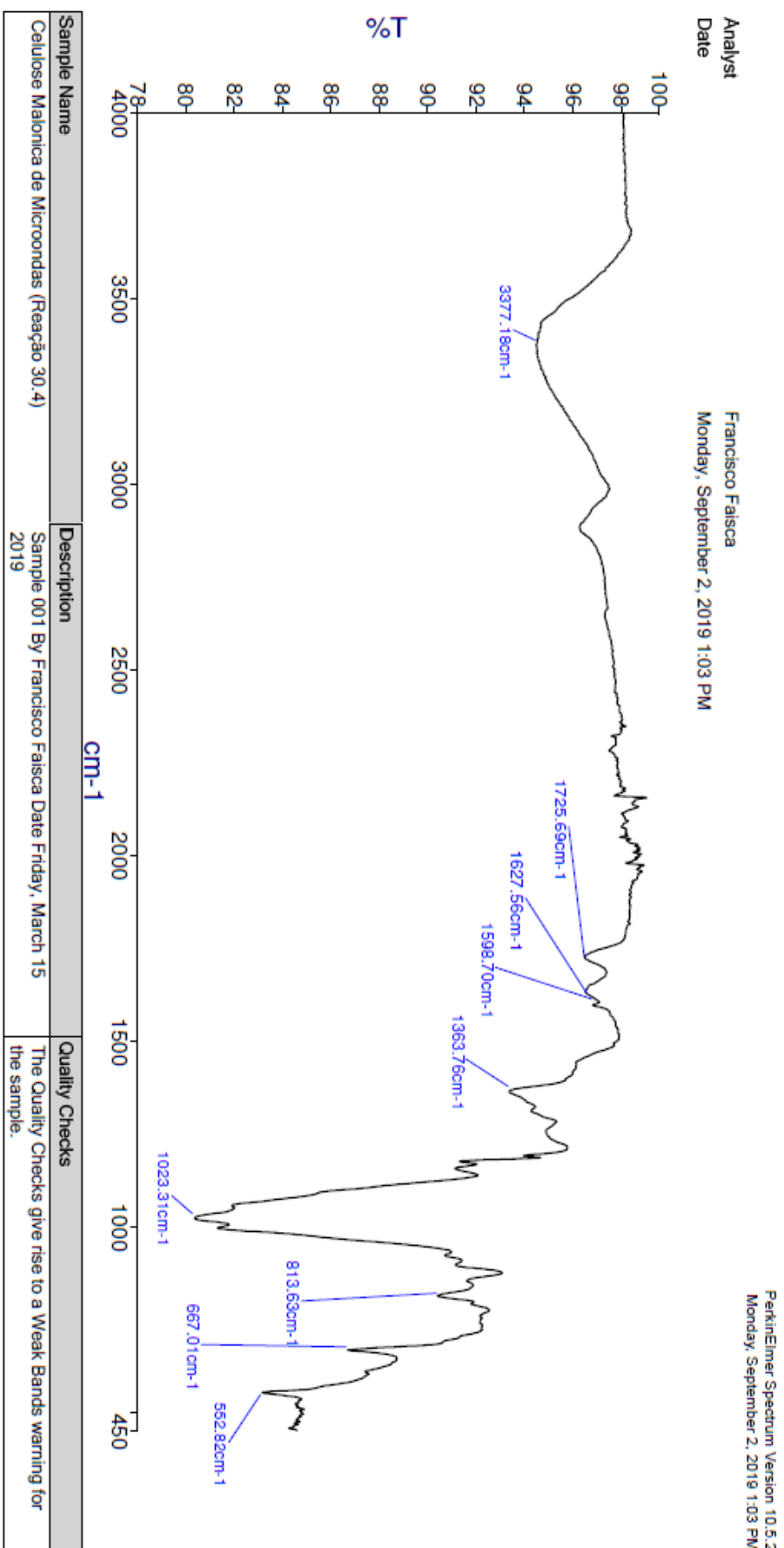
Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 11:51 AM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 11:51 AM



Sample Name	Description	Quality Checks
Celulose Malonica NaOH (Reação 26.6)	Sample 000 By Francisco Faisca Date Tuesday, May 28 2019	The Quality Checks give rise to a Weak Bands warning for the sample.

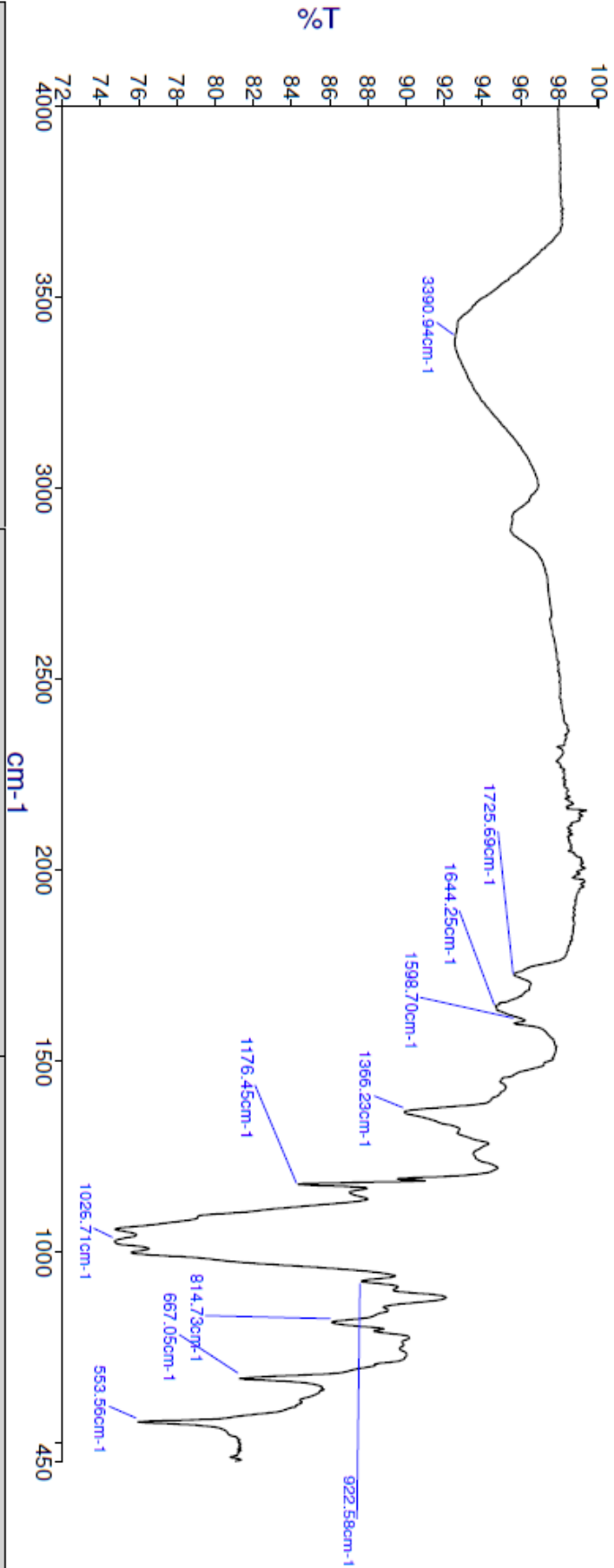
Infravermelho 14 – Composto 3e



Infravermelho 15 – Composto 3f

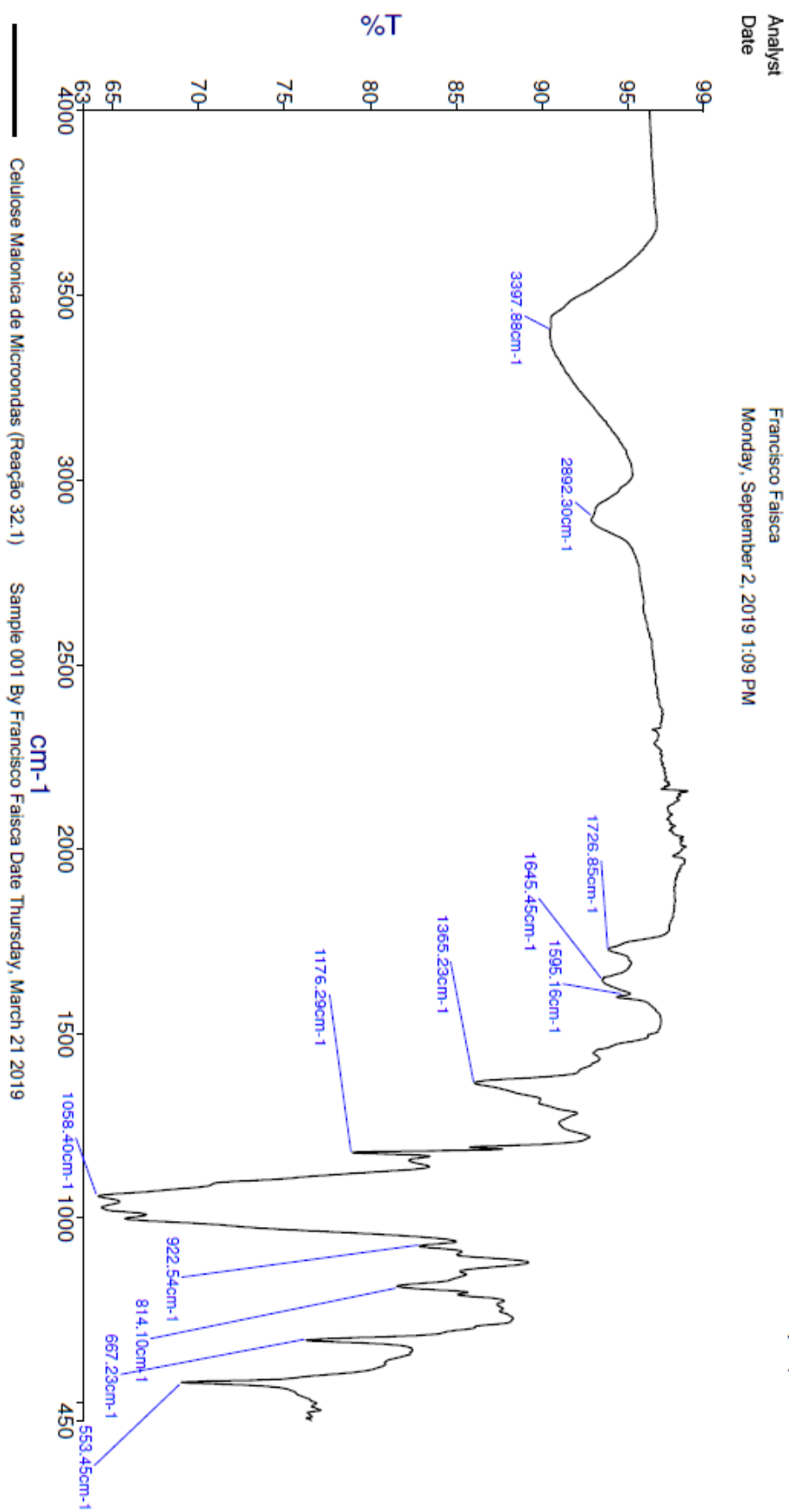
Analyst Francisco Faisca  
 Date Monday, September 2, 2019 1:05 PM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
 Monday, September 2, 2019 1:05 PM



Sample Name	Description	Quality Checks
Celulose Malionica de tert-butilo (Reação 31.1)	Sample 003 By Francisco Faisca Date Thursday, March 21 2019	The Quality Checks give rise to a Weak Bands warning for the sample.

Infravermelho 16 – Composto 3g

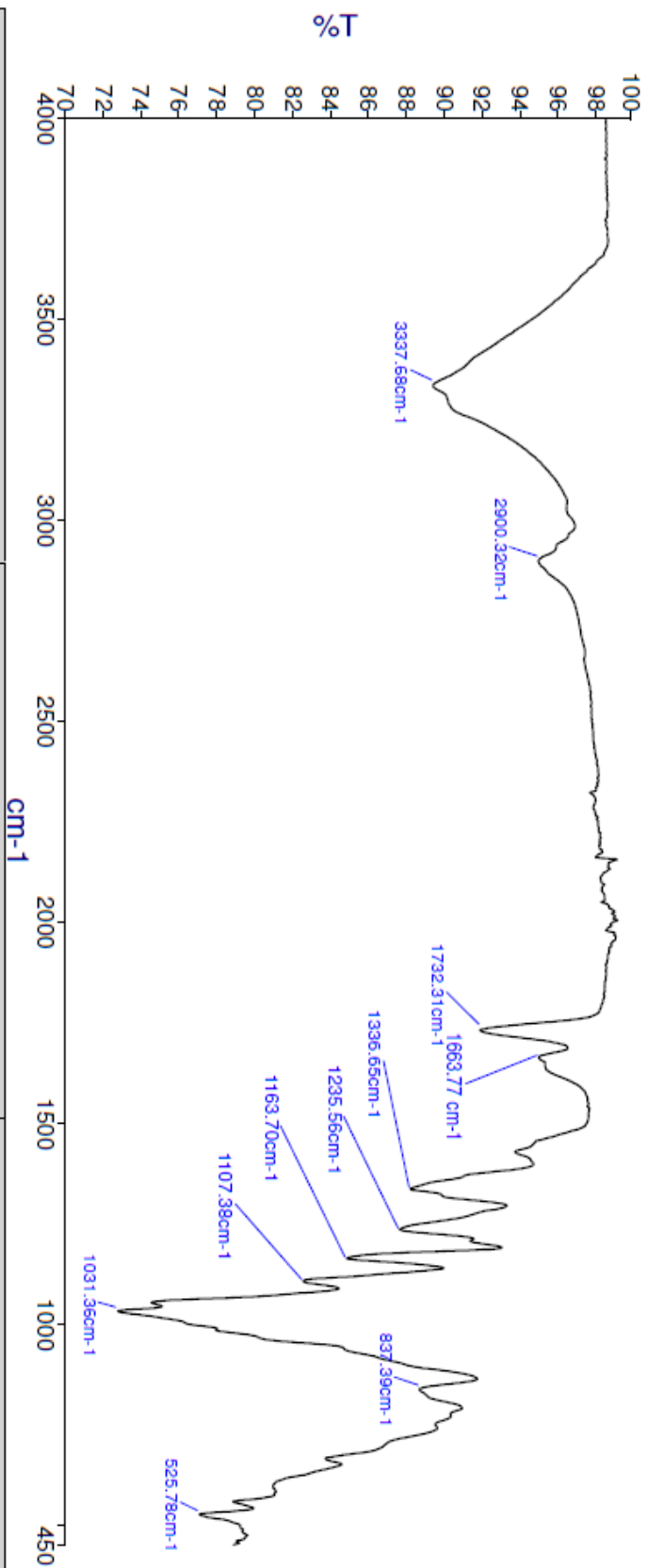


Infravermelho 17 - Composto 4

Analyst  
Date

Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 10:56 AM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 10:56 AM

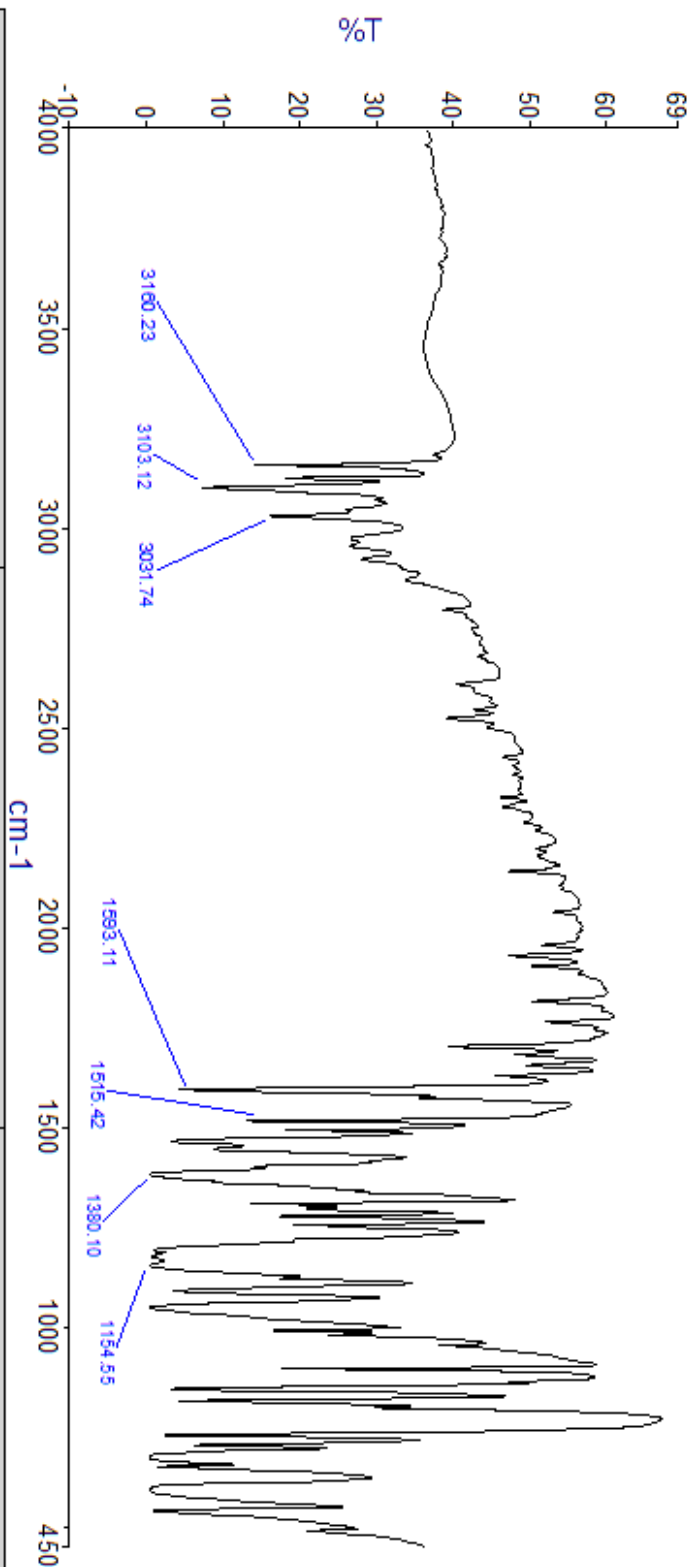


Sample Name	Description	Quality Checks
Celulose Mesclada (Reação:3)	Sample 001 By Francisco Faisca Date Friday, October 19 2018	The Quality Checks give rise to a Weak Bands warning for the sample.

**Analyst**  
**Date**

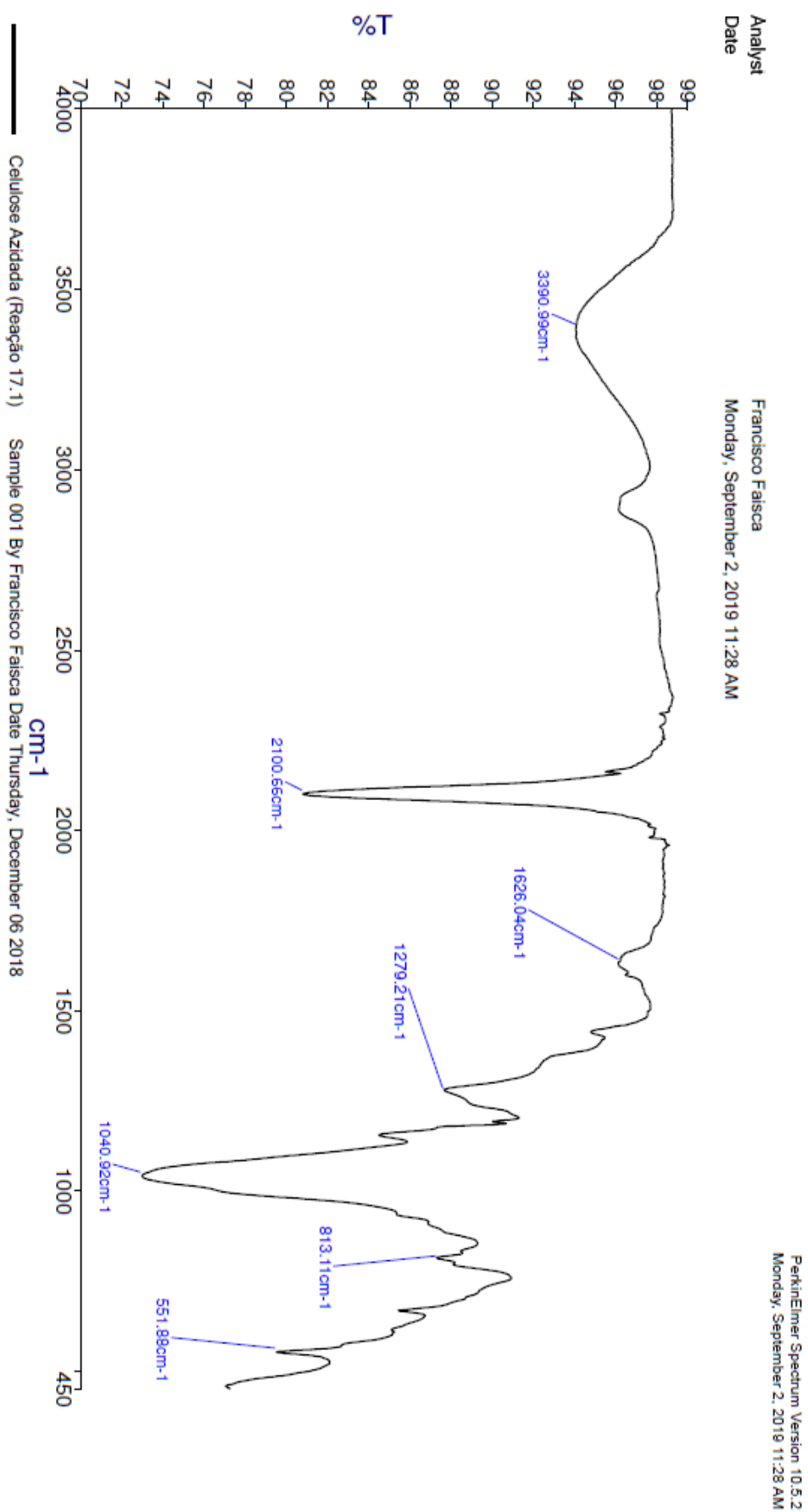
Francisco Faisca  
Tuesday, September 17, 2019 1:32 PM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Tuesday, September 17, 2019 1:32 PM



Sample Name	Description	Quality Checks
Sai de tosilo com imidazole KBr (Reação 16.1)	Sample 001 By Francisco Faisca Date Tuesday, December 04 2018	The Quality Checks give rise to multiple warnings for the sample.

Infravermelho 19 - Composto 6

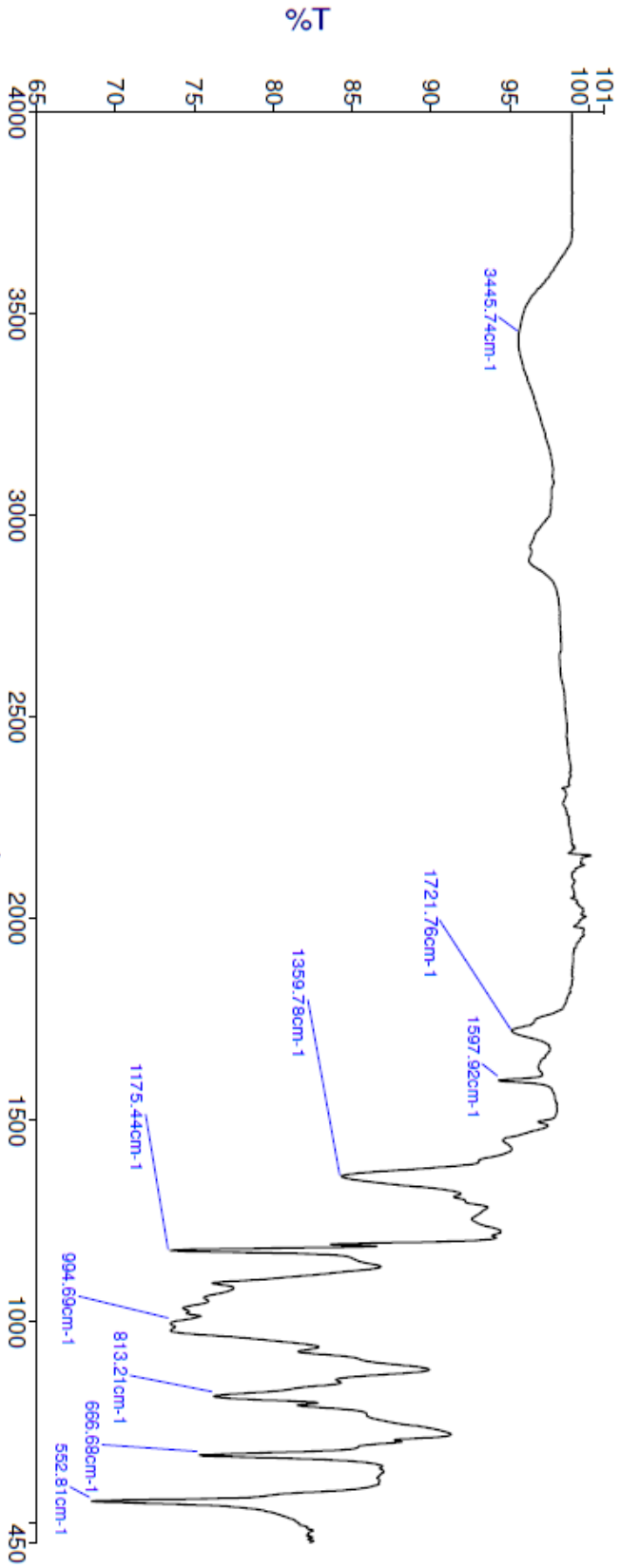


Infravermelho 20 – Composto 7

Analyst  
Date

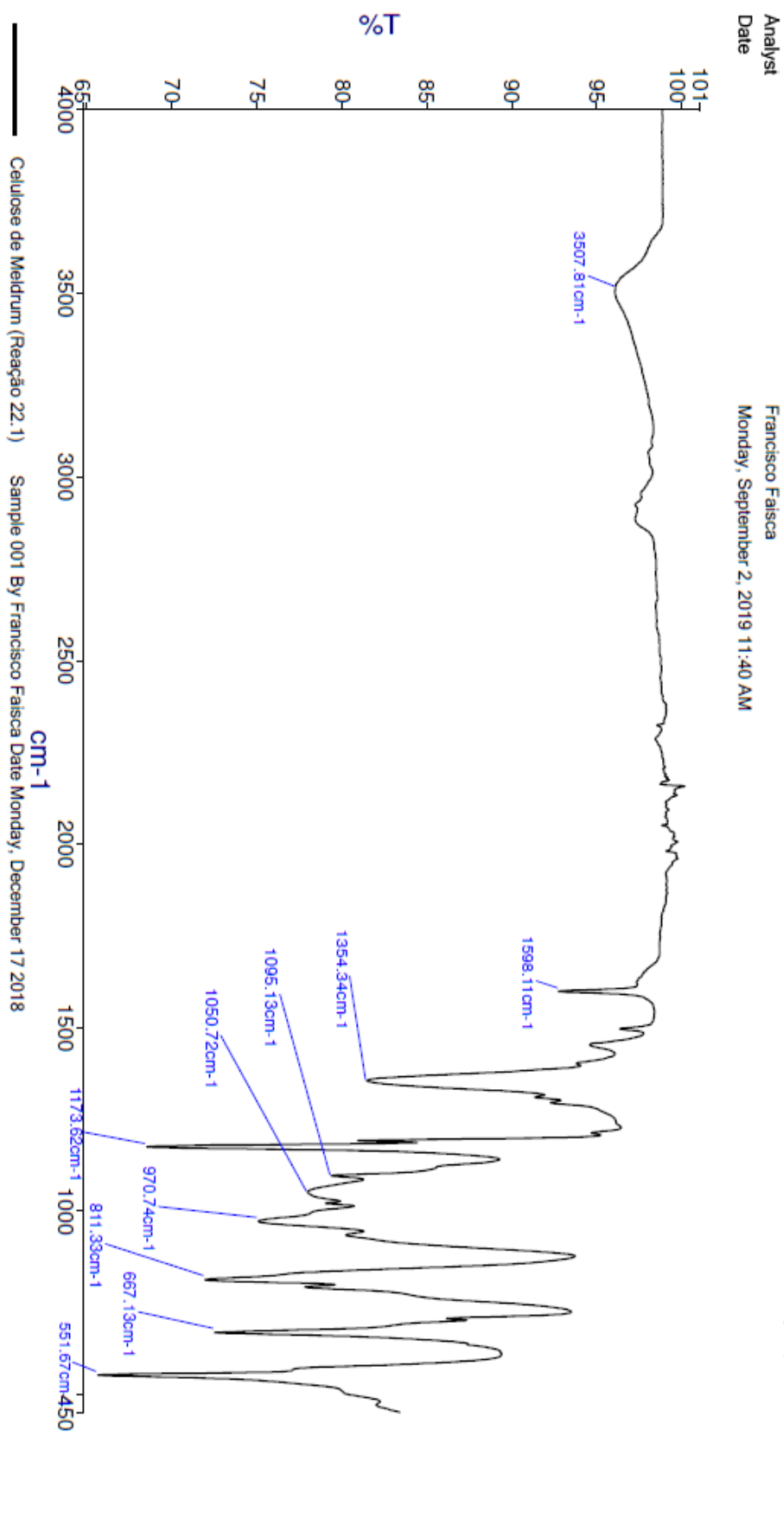
Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 11:38 AM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 11:38 AM



Sample Name	Description	Quality Checks
Celulose com Malonato de Etilo (Reação 21.1B)	Sample 001 By Francisco Faisca Date Friday, December 14 2018	The Quality Checks give rise to a Weak Bands warning for the sample.

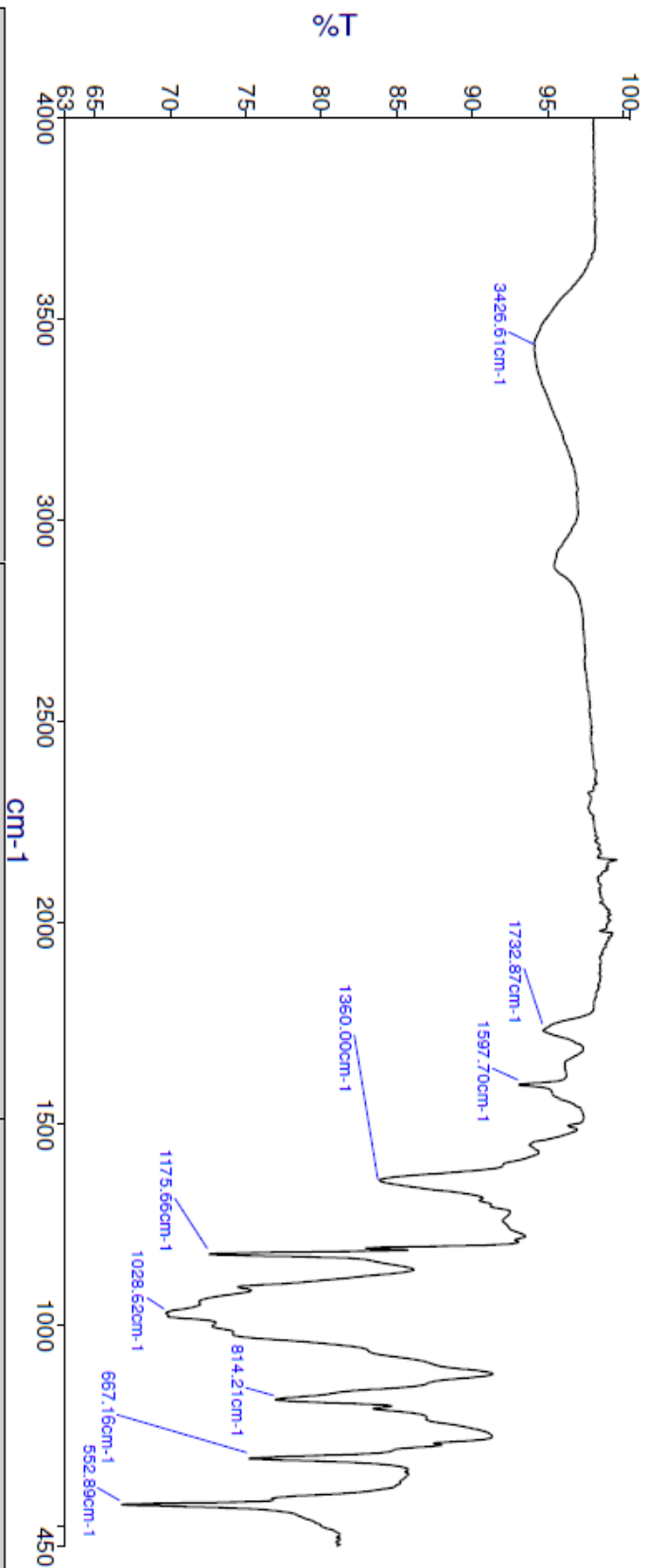
Infravermelho 21 – Composto 8a



Analyst  
Date

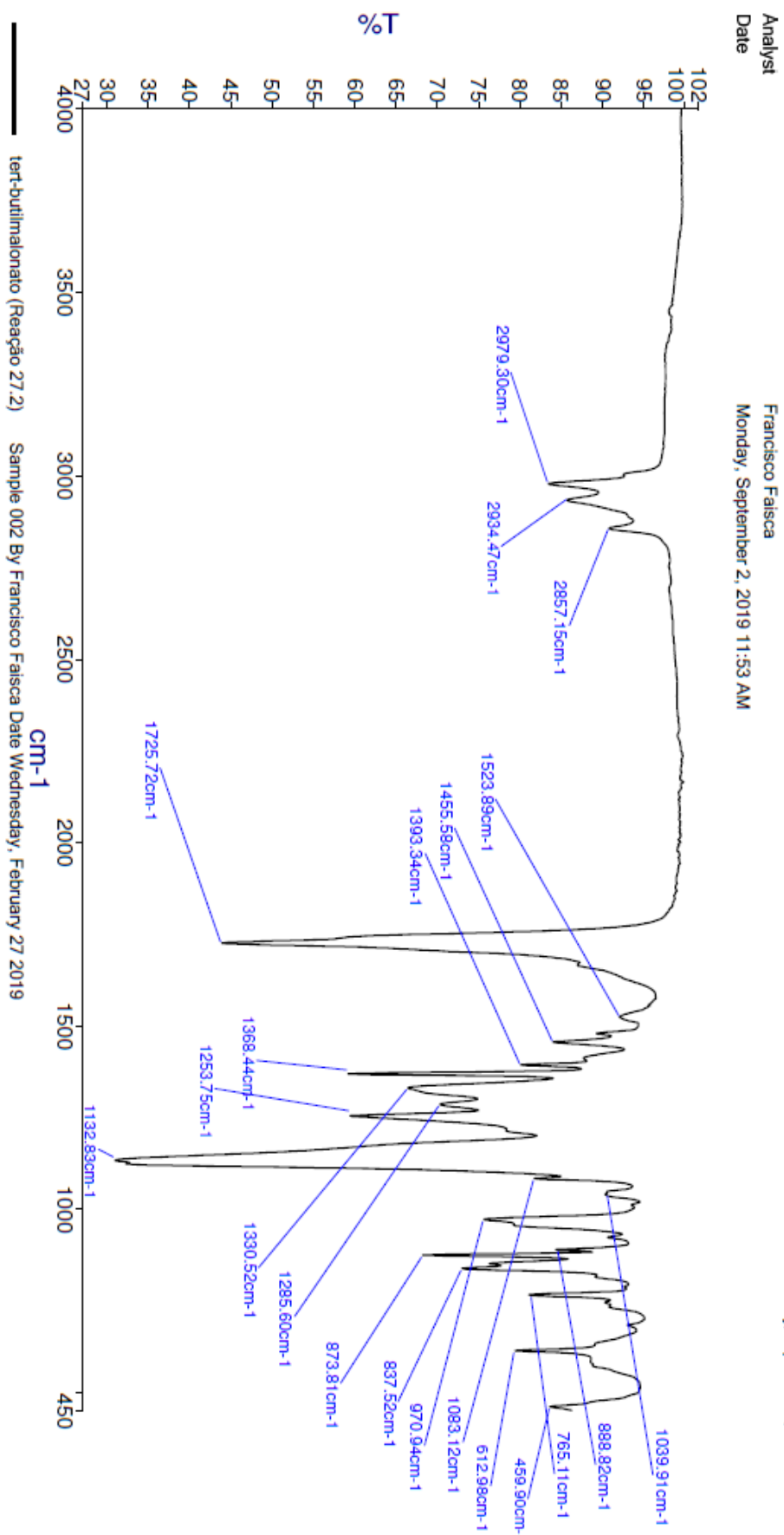
Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 11:43 AM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 11:43 AM



Sample Name	Description	Quality Checks
Celulose Meldrum (Reação 23.8B)	Sample 000 By Francisco Faisca Date Friday, May 24 2019	The Quality Checks give rise to a Weak Bands warning for the sample.

Infravermelho 23 – Composto 9a

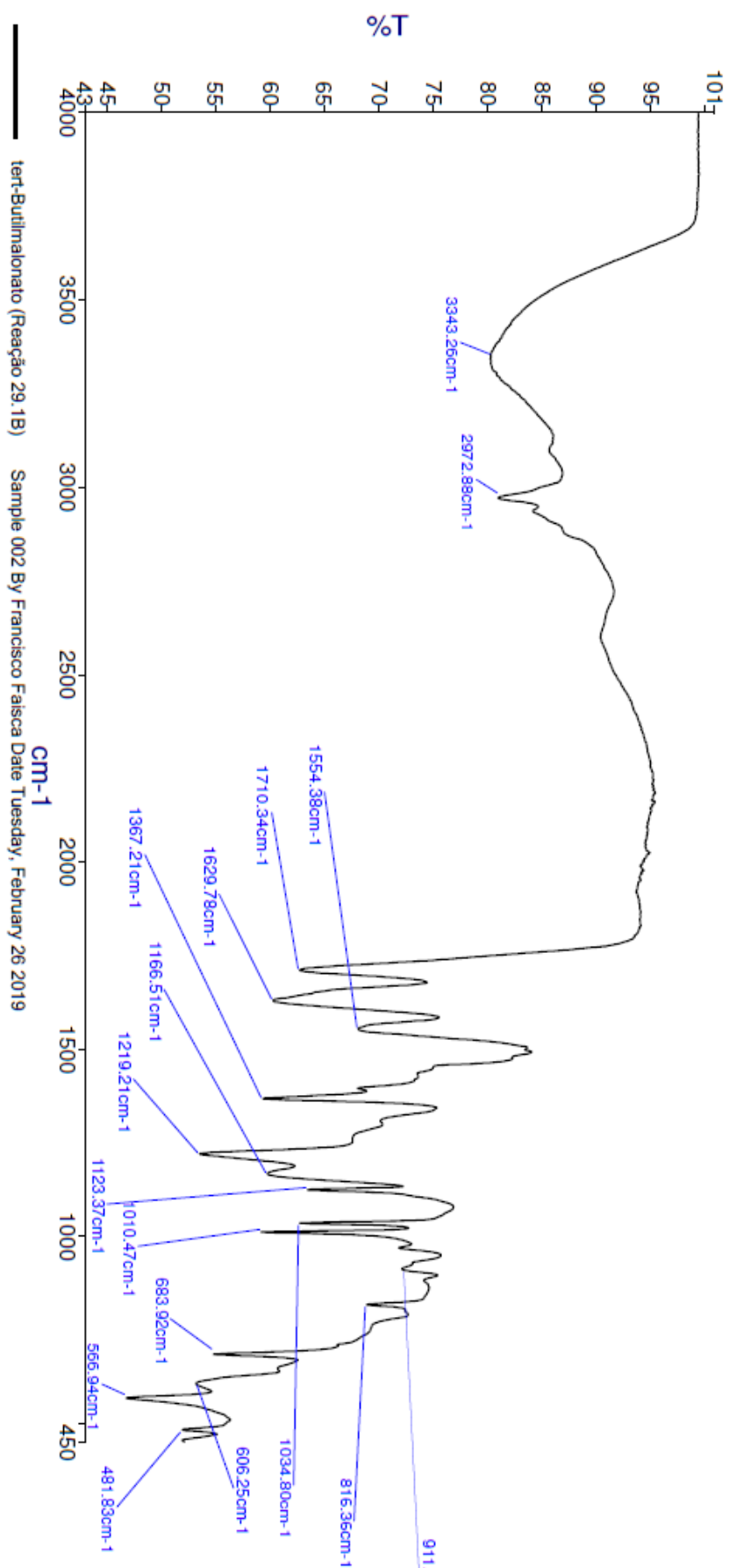


Infravermelho 24 – Composto 9b

Analyst  
Date

Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 11:59 AM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 11:59 AM

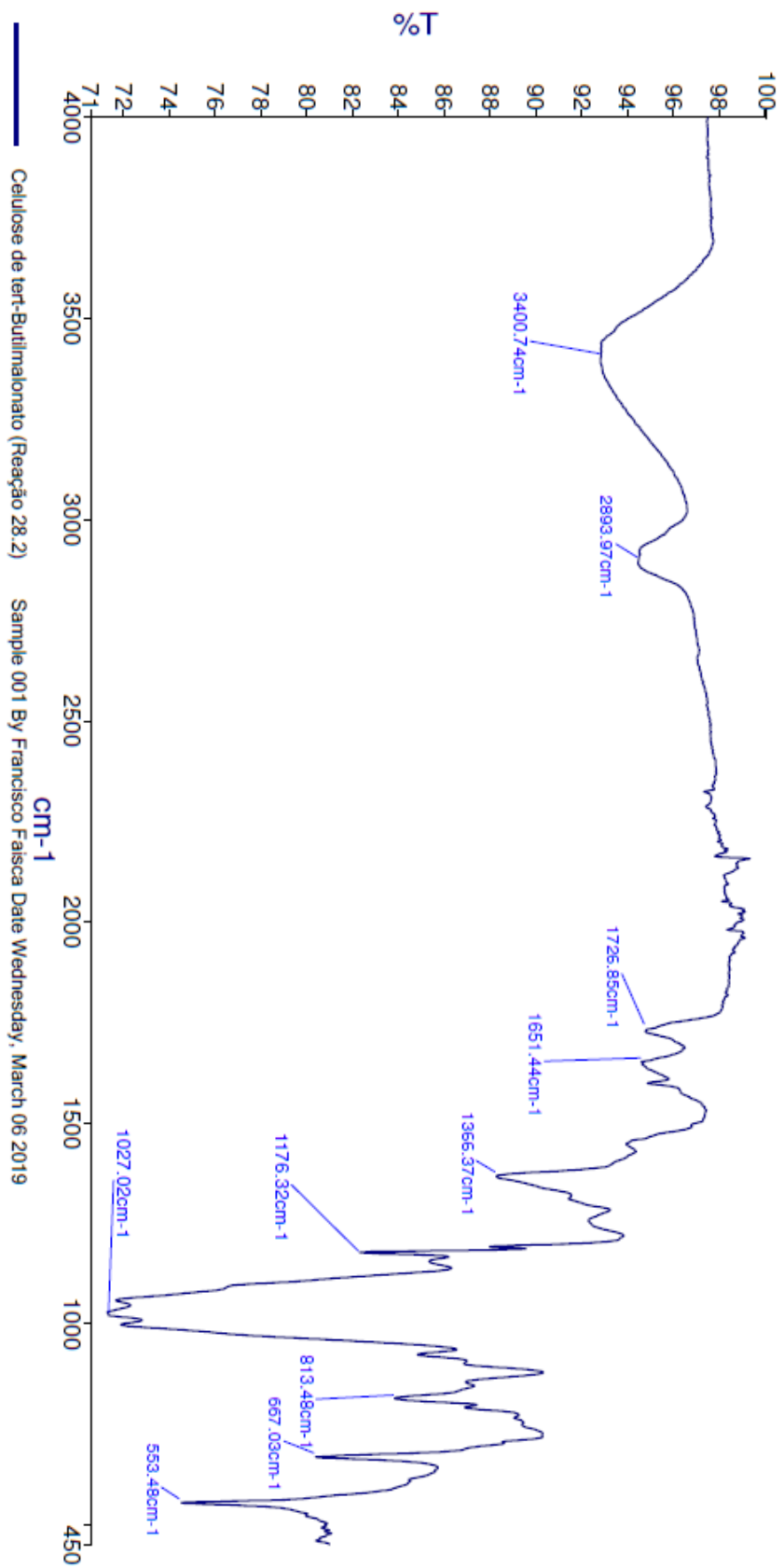


Infravermelho 25 – Composto 10

Analyst  
Date

Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 11:57 AM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 11:57 AM



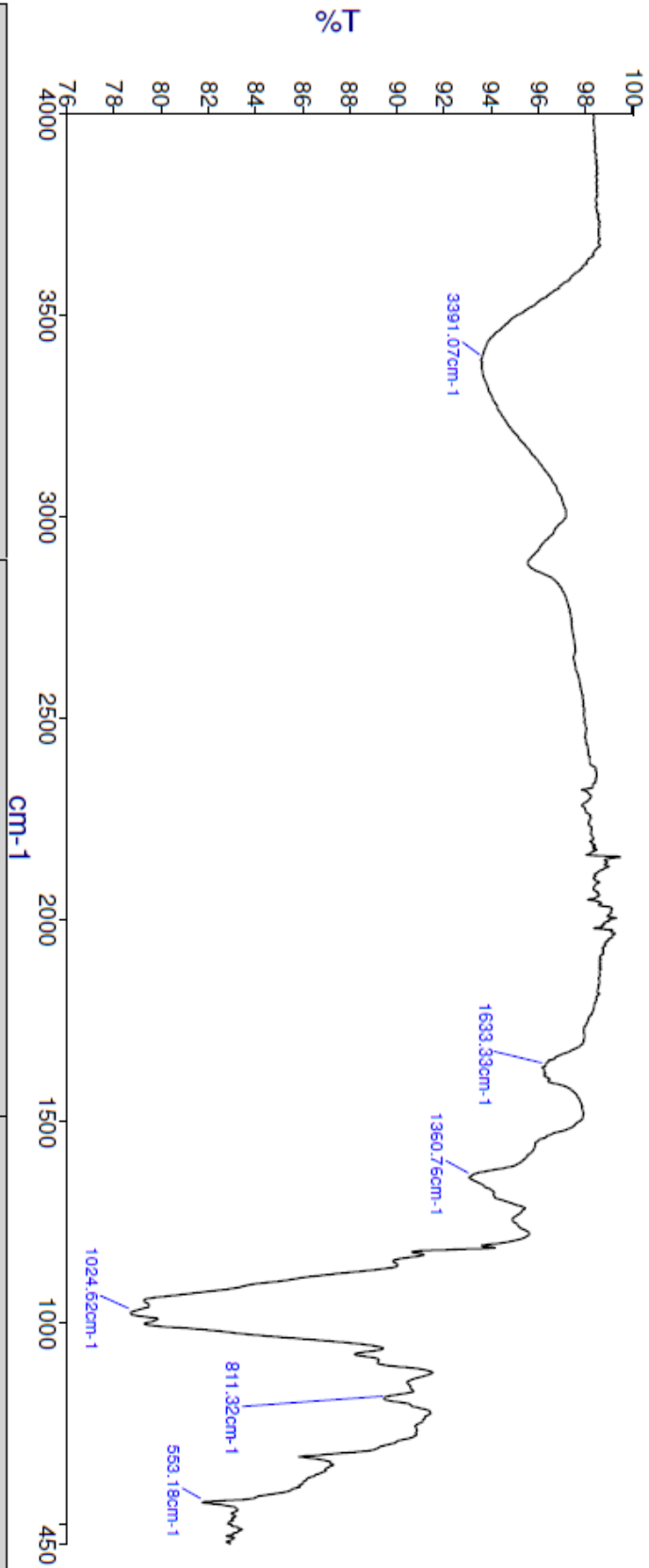
Celulose de tert-Butilmalonato (Reação 28.2) Sample 001 By Francisco Faisca Date Wednesday, March 06 2019

Infravermelho 26 – Composto 11

Analyst  
Date

Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 1:13 PM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 1:13 PM



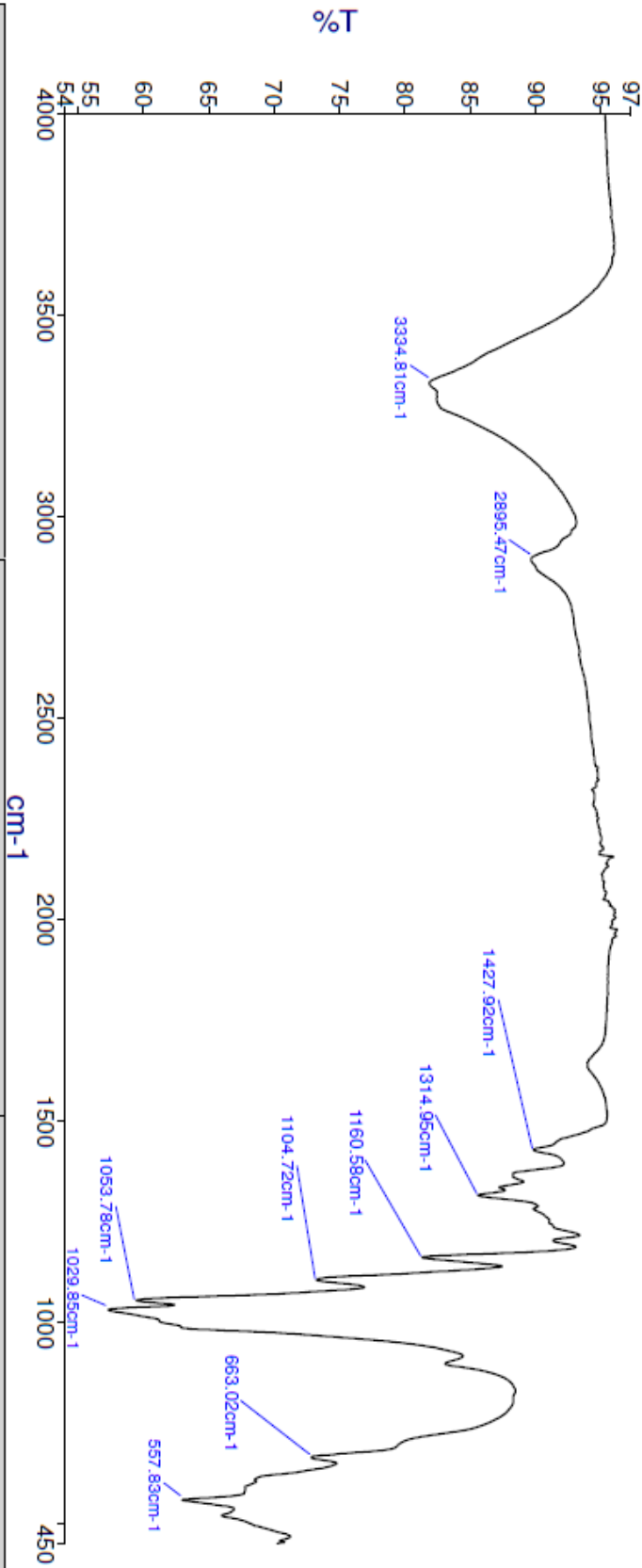
Sample Name	Description	Quality Checks
Celulose Tartronica (Reação 34.4)	Sample 000 By Francisco Faisca Date Tuesday, May 07 2019	The Quality Checks give rise to a Weak Bands warning for the sample.

Infravermelho 27 - Celulose Avicel

Analyst  
Date

Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 1:17 PM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 1:17 PM



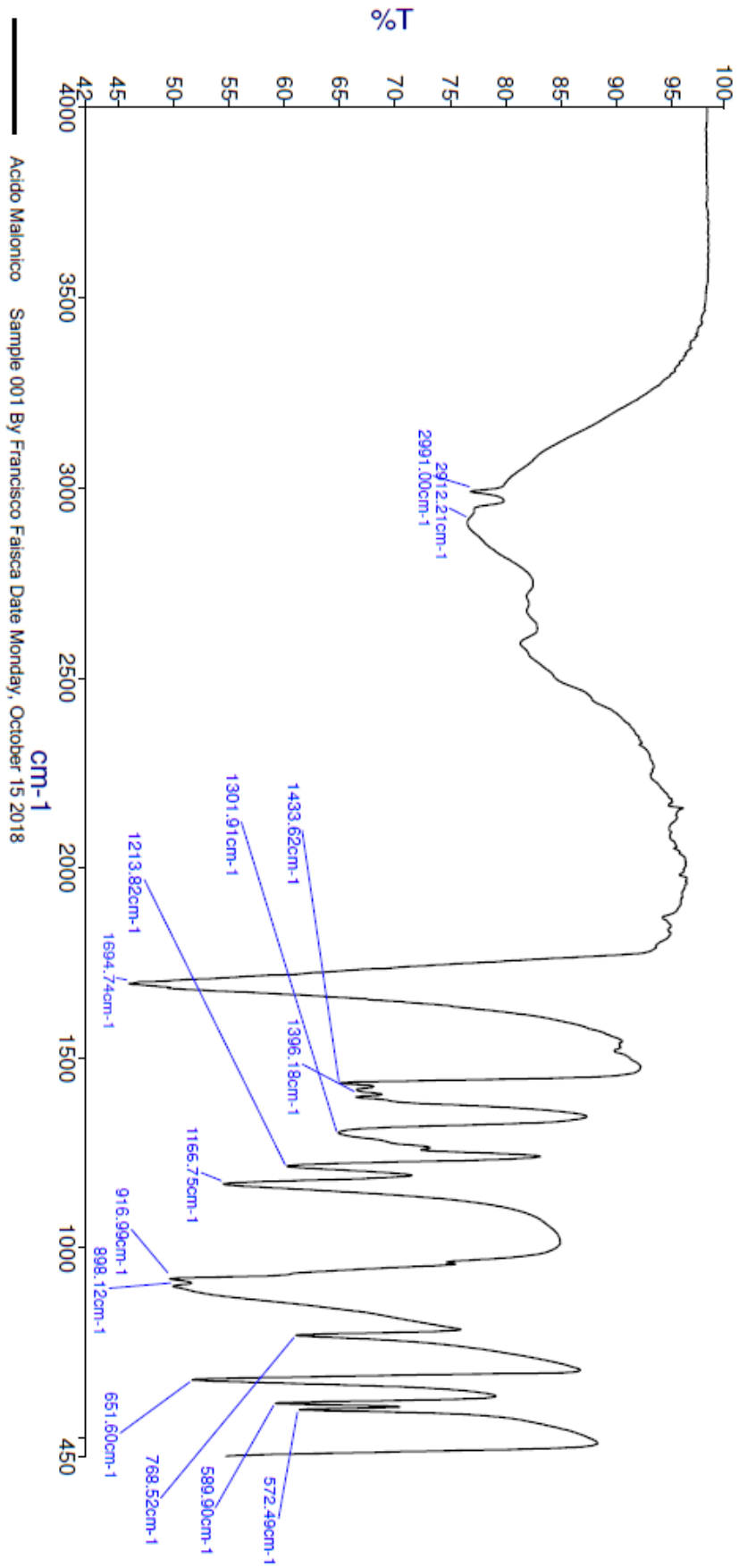
Sample Name	Description	Quality Checks
Celulose Avicel	Sample 001 By Francisco Faisca Date Monday, October 15 2018	The Quality Checks do not report any warnings for the sample.

Infravermelho 28 - ácido malónico

Analyst  
Date

Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 1:19 PM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 1:19 PM

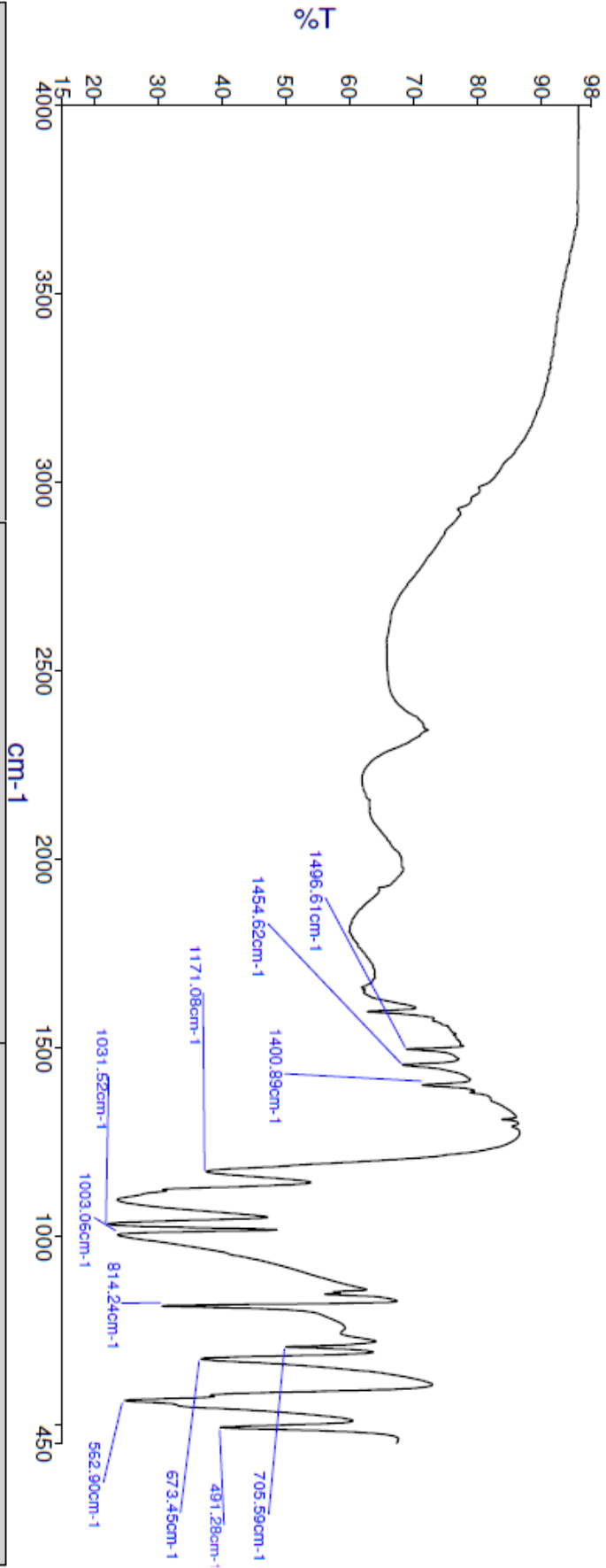


Infravermelho 29 - ácido p-toluenosulfônico

Analyst  
Date

Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 1:22 PM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 1:22 PM



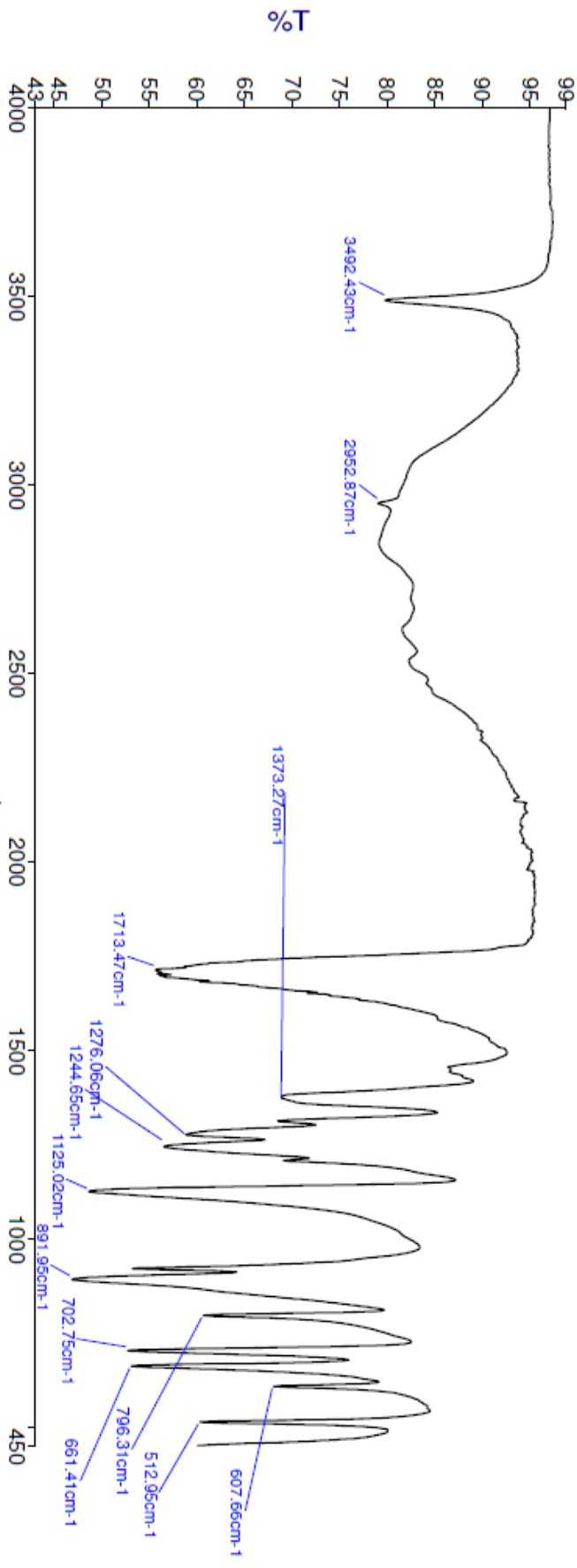
Sample Name	Description	Quality Checks
Acido p-toluenosulfonico	Sample 001 By Francisco Faisca Date Monday, November 19 2018	The Quality Checks do not report any warnings for the sample.

Infravermelho 30 - ácido tartrónico

Analyst  
Date

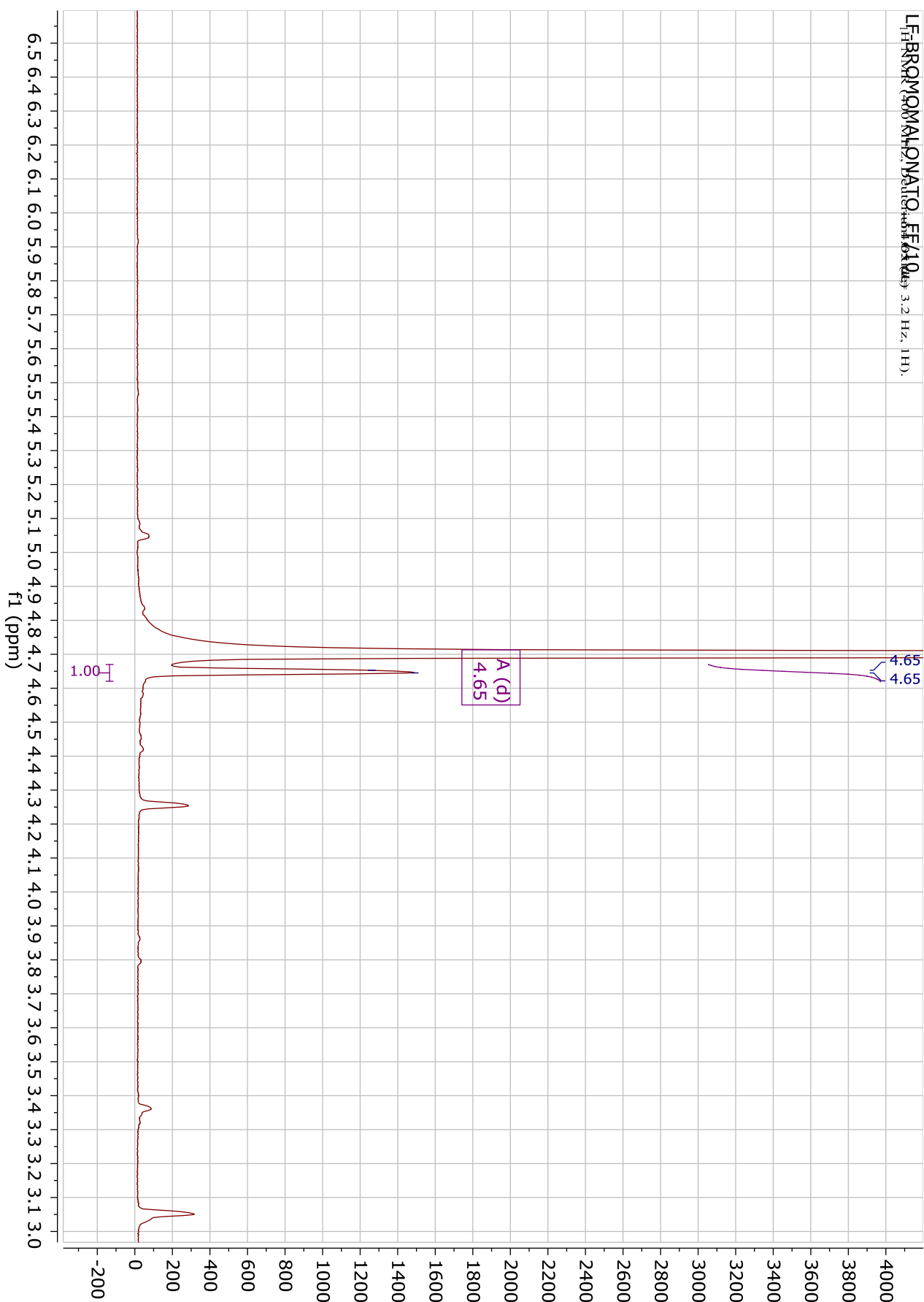
Francisco Faisca  
Monday, September 2, 2019 1:23 PM

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.2  
Monday, September 2, 2019 1:23 PM

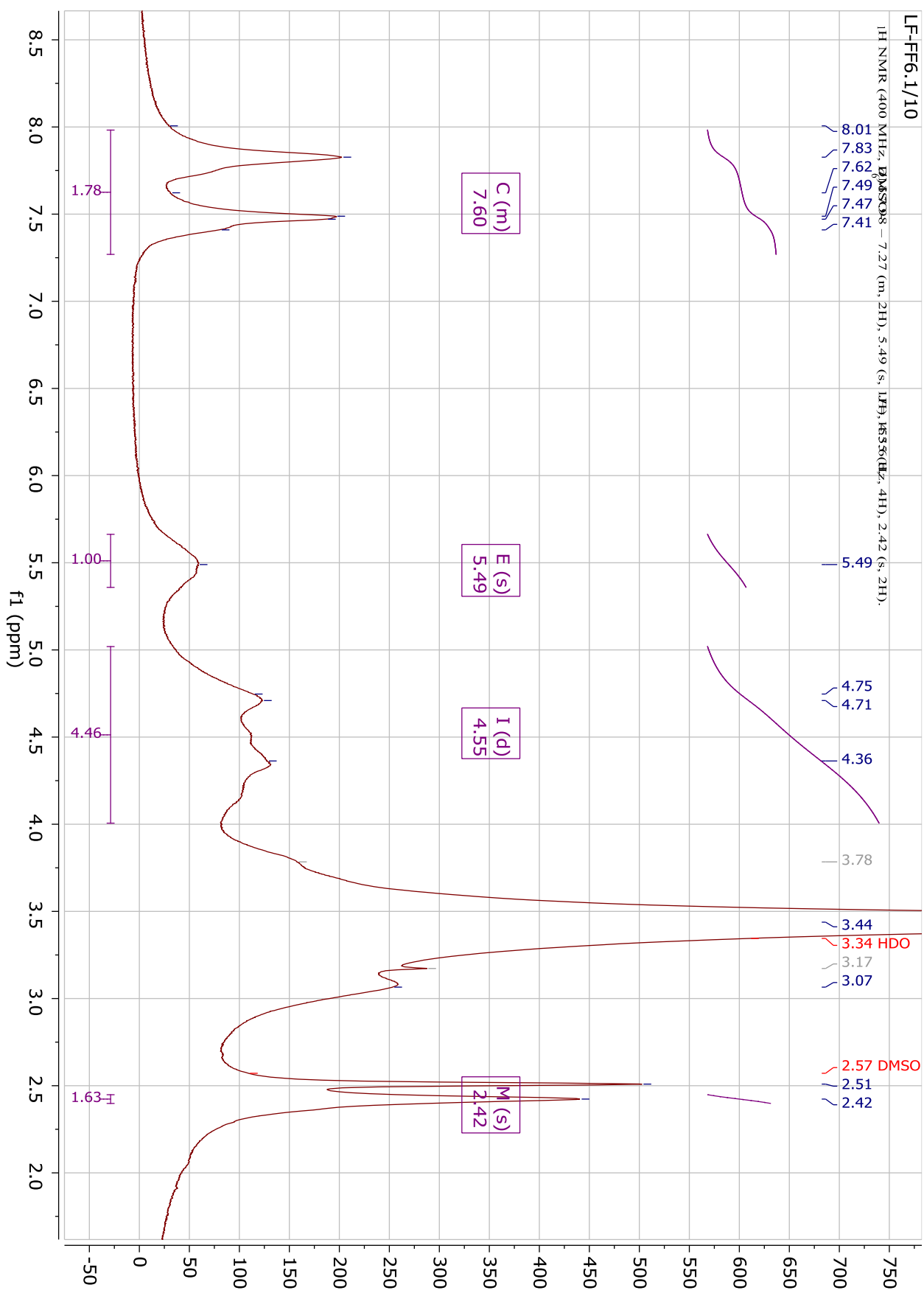


Sample Name	Description	Quality Checks
Acido Tartronico	Sample 006 By Francisco Faisca Date Monday, April 15 2019	The Quality Checks do not report any warnings for the sample.

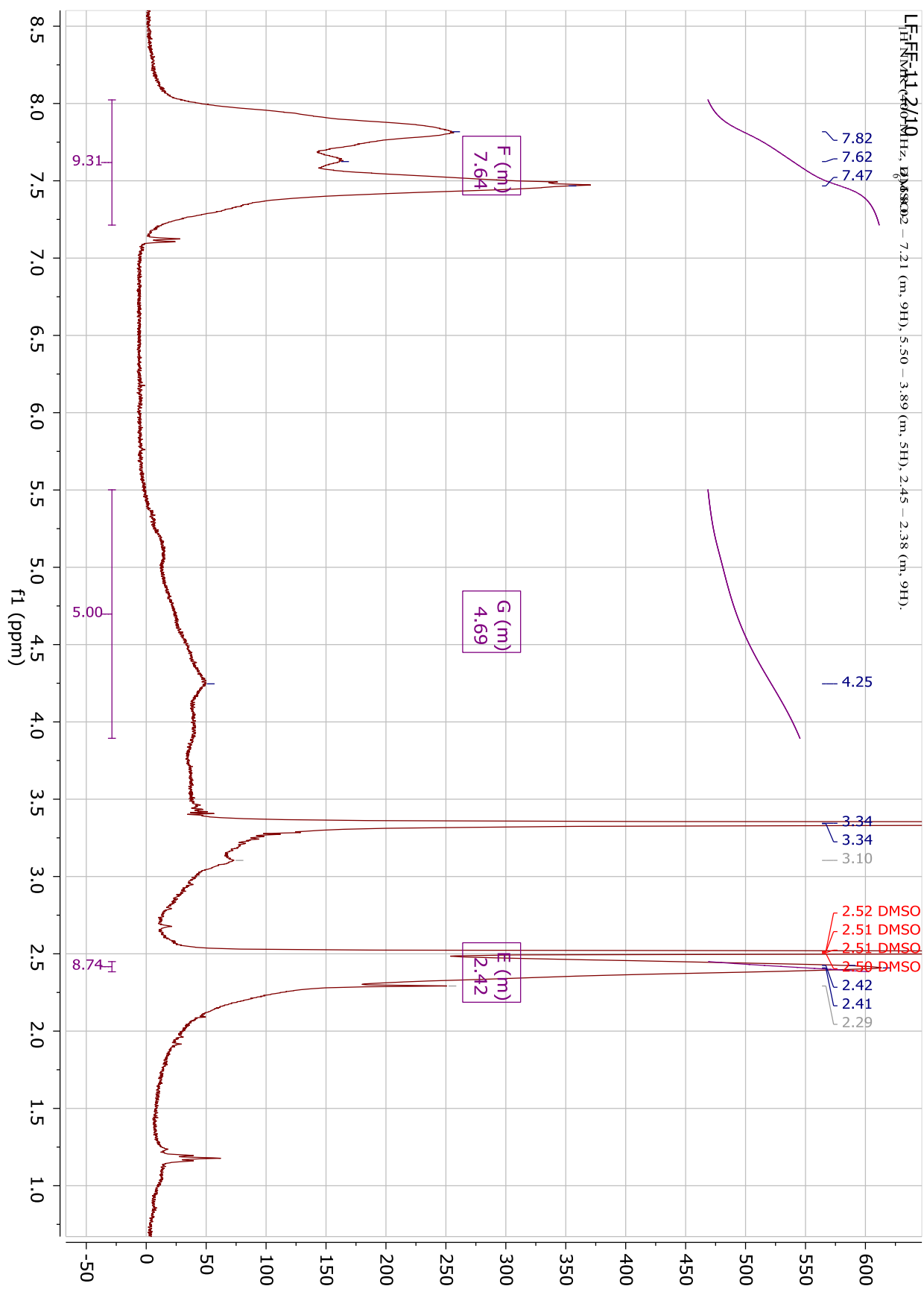
RMN 1 - Composto 1a



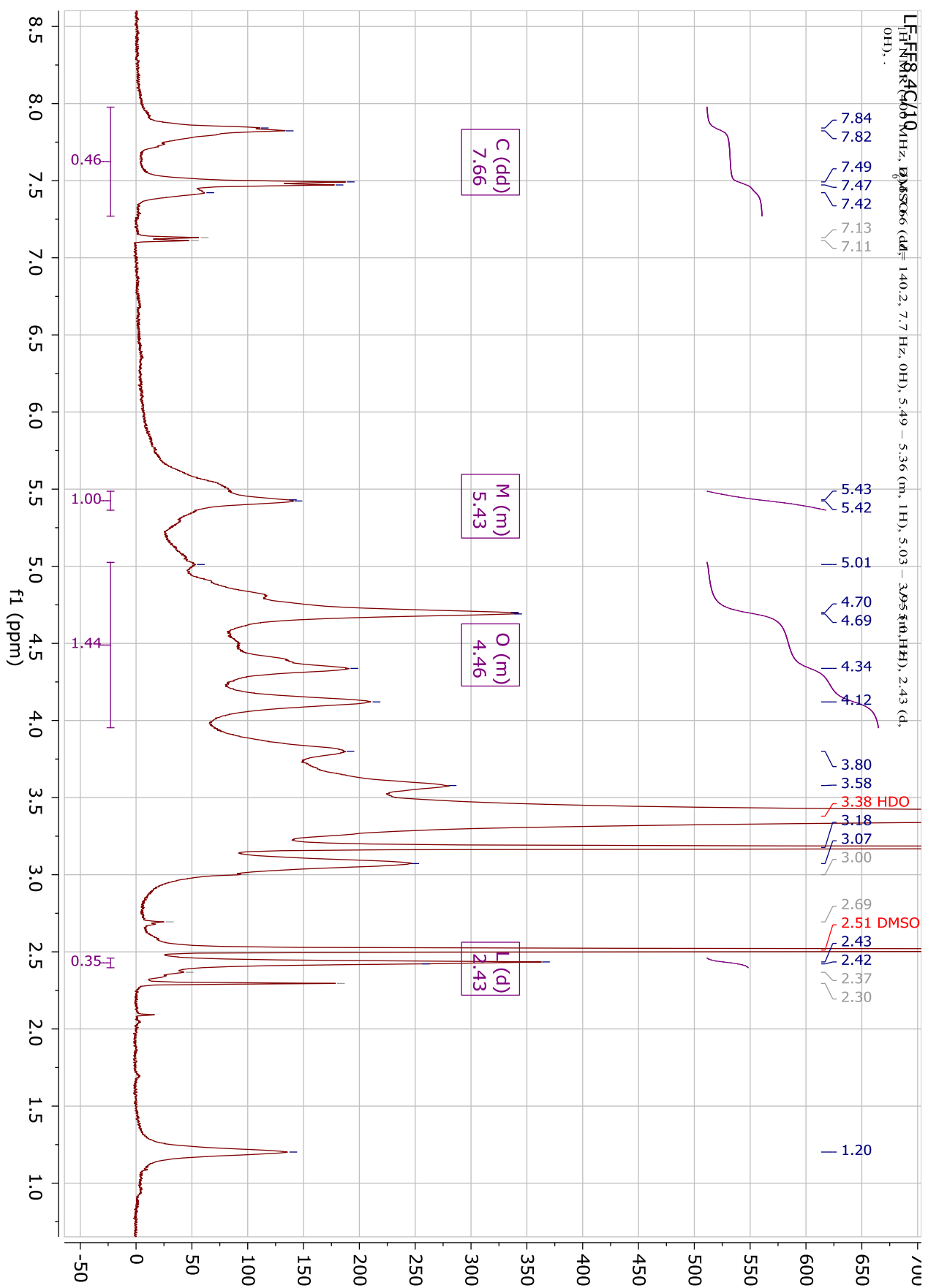
RMN 2 - Composto 2b



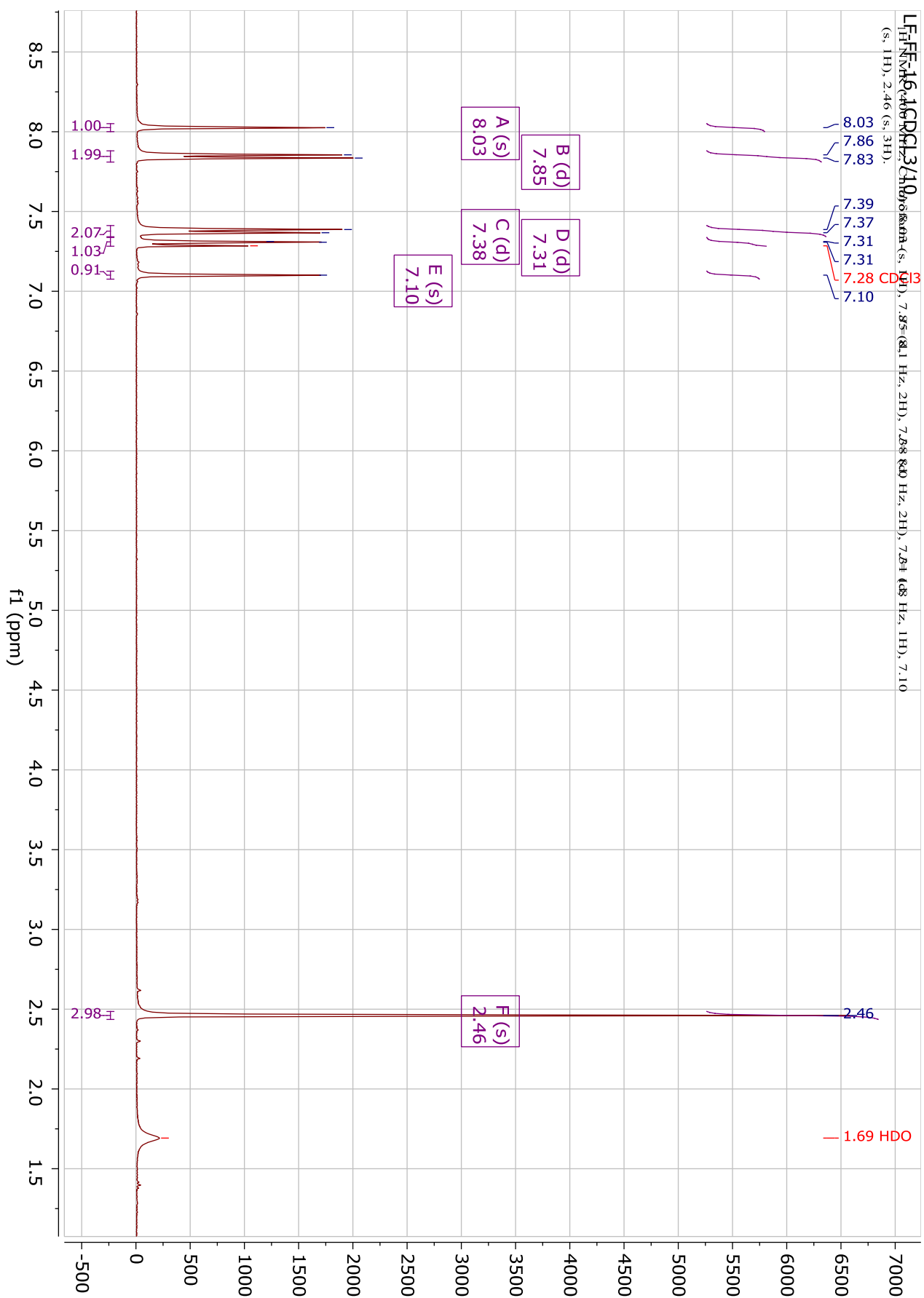
RMN 3 - Composto 2c



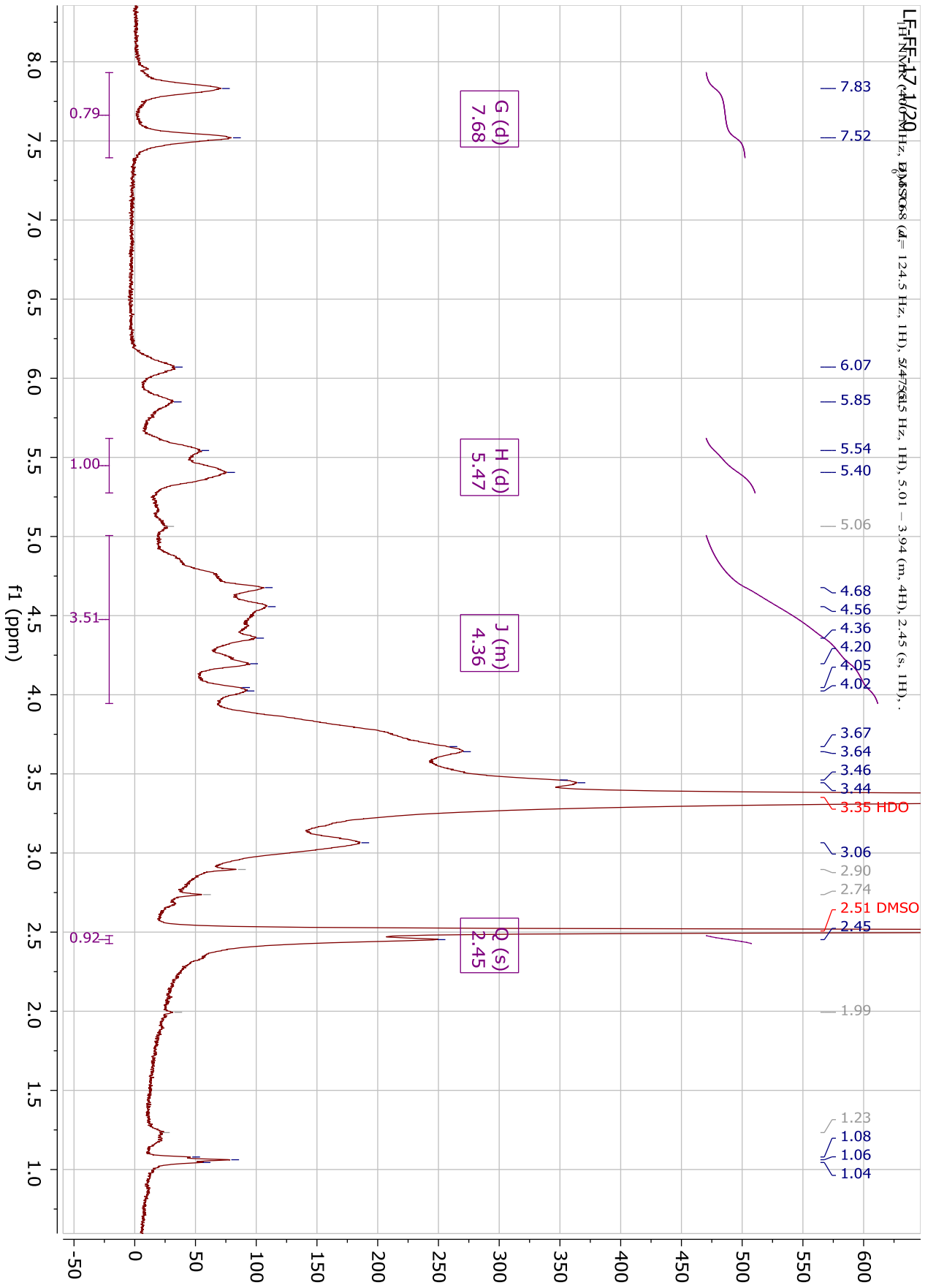
RMN 4 - Composto 3b



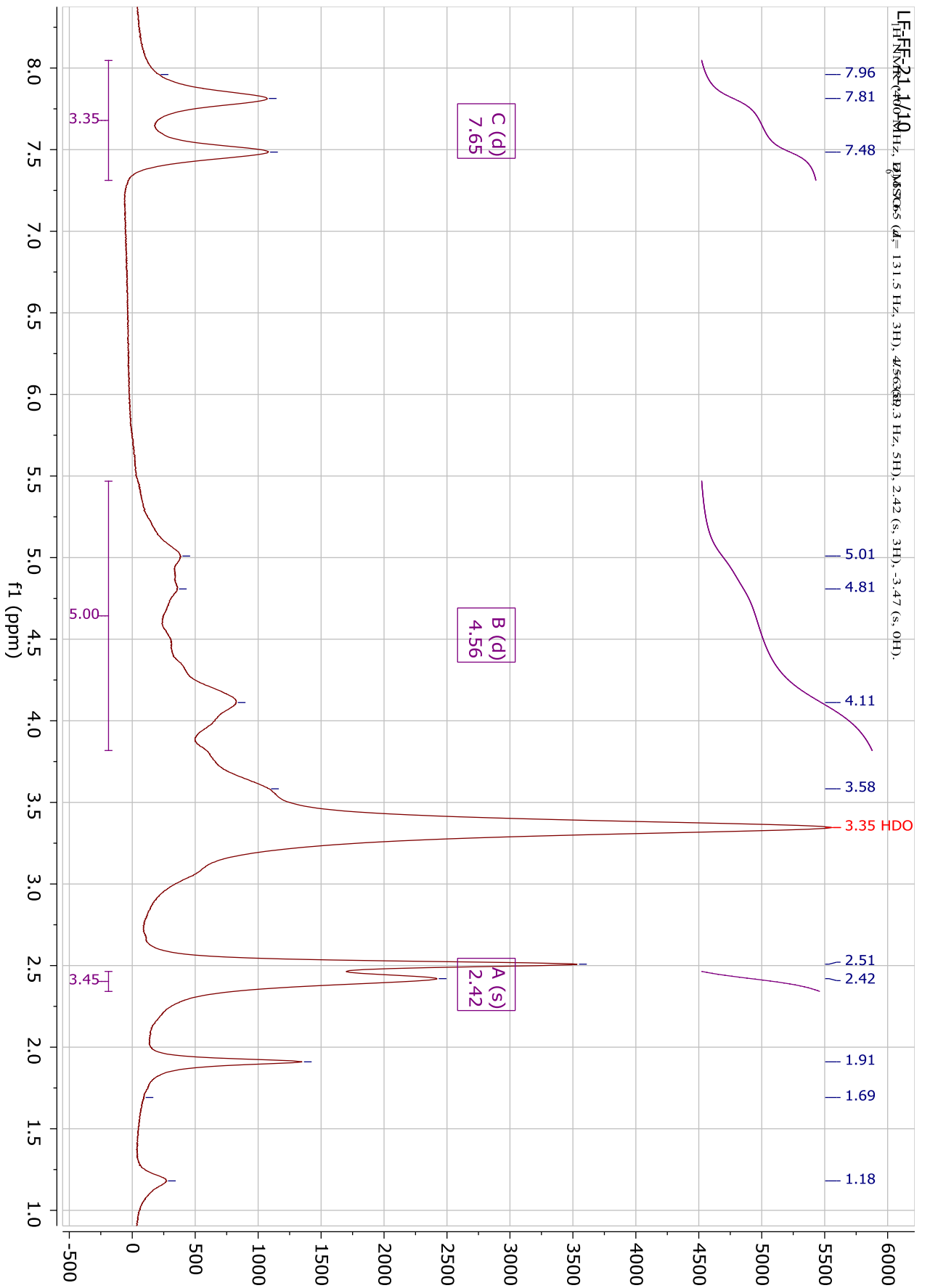
RMN 5 - Composto 5



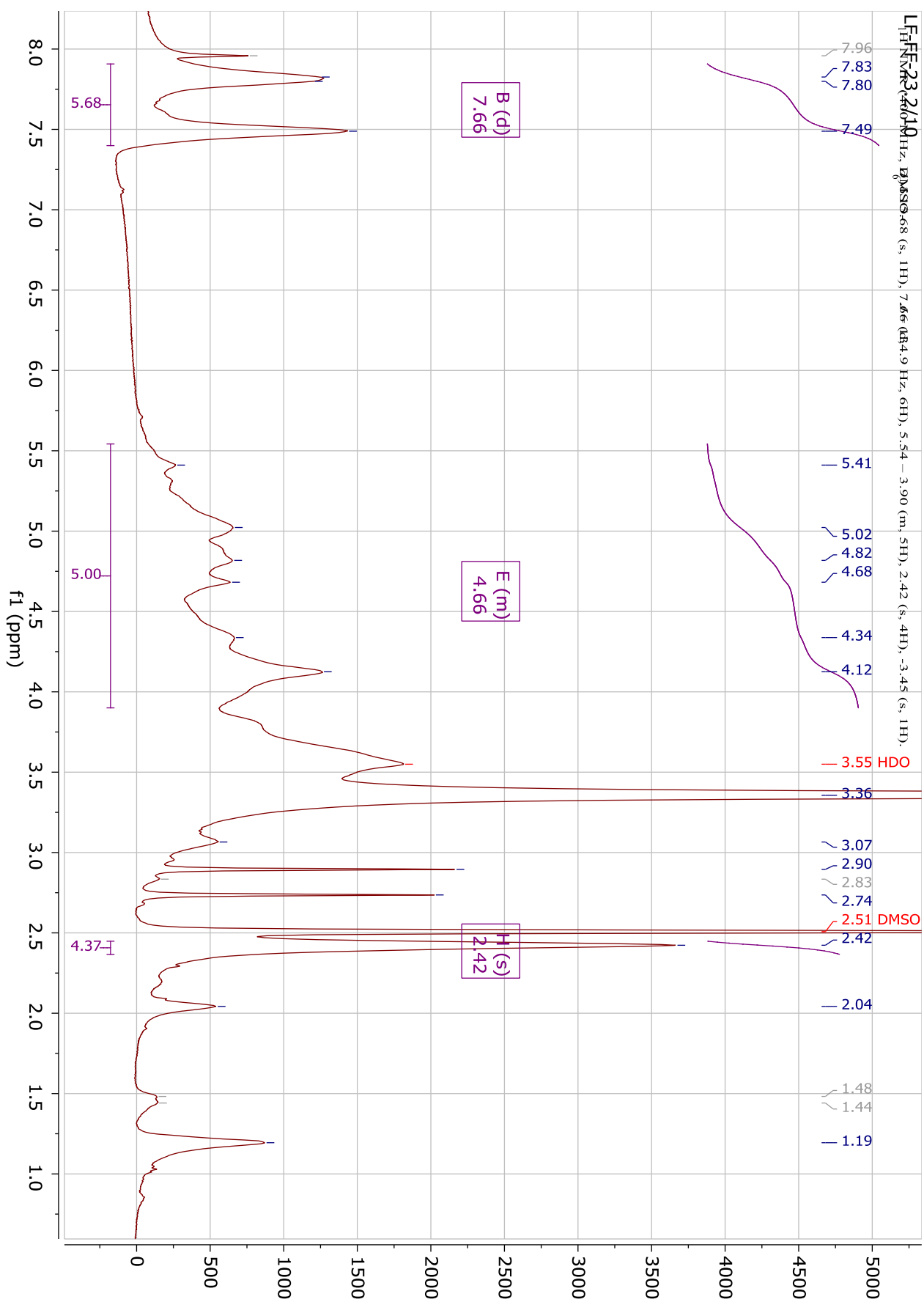
RMN 6 - Composto 6



RMN 7 - Composto 7



RMN 8 - Composto **8b**



RMN 9 - Composto 9a

