



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SIMONE BIRKHEUR DOS SANTOS

**ESTUDOS VISANDO À IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE
PROTEÍNA EM FILME DE CELULOSE BACTERIANA**

SIMONE BIRKHEUR DOS SANTOS

**ESTUDOS VISANDO À IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE
PROTEÍNA EM FILME DE CELULOSE BACTERIANA**

Dissertação de Mestrado em Química
apresentada ao Departamento de Química da
Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Anna Paola Butera.
Coorientador: Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro
Viana.

Londrina
2018

SIMONE BIRKHEUR DOS SANTOS

**ESTUDOS VISANDO À IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE PROTEÍNA
EM FILME DE CELULOSE BACTERIANA**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Química, no
Programa de Mestrado e Doutorado em
Química da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Anna Paola Butera
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Edvani Curti Muniz
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Prof^a. Dr^a. Marcelle de Lima Ferreira Bispo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de março de 2018

AGRADECIMENTOS

A minha família, por me darem total apoio e incentivo no decorrer de todo o mestrado.

Em especial, desejo agradecer a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Anna Paola Butera, que dividiu seu inestimável conhecimento e sabedoria ao longo destes anos de trabalho, assim como sua preocupação em orientar da forma mais correta e enriquecedora. Obrigada, foi um privilégio trabalhar com você.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana pela orientação, atenção e ajuda com todo o seu conhecimento e experiência.

Ao Prof. Dr. Cesar Tischer e aos integrantes do grupo Glico Tech pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora, por terem atendido ao convite para desempenhar este papel, dispondo de seu tempo e conhecimento para analisar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Laureto e aos integrantes do laboratório de óptica e optoeletrônica, que gentilmente disponibilizaram as fontes luminosas, o espaço do laboratório, equipamentos e seus conhecimentos. Essa parceria foi fundamental para a continuidade deste projeto.

Ao laboratório multiusuário de espectroscopia pelo auxílio prestado na caracterização de amostras e filmes.

As amigas que eu adquiri antes e no decorrer do mestrado, em especial a Camila Bernardes, Ingrid Barbosa, Paula Rivero, Priscila Goes, Jéseka Schirmann, Henrique Esteves, Tiago Brito, Cleiton Silveiro, Bruce Alan e Felipe Benatti. Obrigada por todas as crises de risos, hora do café, momentos memoráveis que vão deixar muita saudade.

As minhas duas melhores amigas, Lidiane Oliveira e Aline Barudi, que escutaram minhas intermináveis lamentações, sempre dando os melhores conselhos e me colocando pra cima.

Ao Pedro Ivo Bispo, pelas suas palavras de motivação, encorajamento e críticas construtivas. Cresci e evolui de todas as formas possíveis ao seu lado. Muito obrigada, meu amor.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho cujos os nomes não foram mencionados, o meu muito obrigada.

SANTOS, Simone Birkheur. **Estudos visando à imobilização covalente de proteína em filme de celulose bacteriana**. 2018. 58 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A celulose pode ser produzida por bactérias na forma de filme, com alta pureza e resistência mecânica. Estes filmes de celulose bacteriana têm aplicação biomédica, sendo utilizados como substituto de pele, curativo de ferimentos e queimaduras, produção de vasos sanguíneos, válvulas cardíacas e cartilagens. Com vistas a adicionar propriedades biológicas a filmes de celulose bacteriana e, com isto, ampliar seu potencial na área biomédica, pretendemos, neste trabalho, a aplicação de uma metodologia promissora para imobilizar covalentemente proteínas sobre sua superfície. Esta metodologia envolve a reação fotoquímica entre grupo sulfidril proteico e a funcionalidade tetrazol. Neste contexto, um derivado carboxílico, contendo o grupo tetrazol, foi sintetizado em duas etapas a partir de reagentes comerciais (39% de rendimento global). Grupos hidroxila superficiais dos filmes de celulose bacteriana foram esterificados pela reação com o derivado carboxílico, sob radiação ultrassônica, em presença de carbodiimida. A funcionalização da superfície dos filmes de celulose bacteriana foi caracterizada por espectroscopias UV-vis e FTIR. Sequencialmente, empregando-se espectroscopia UV-vis, determinou-se a concentração molar do derivado carboxílico em solução alcalina obtida pela hidrólise dos grupos ésteres de filmes funcionalizados, a fim de quantificar a extensão da funcionalização. O percentual molar determinado foi de 0,64 a 0,98% (em relação às unidades de D-glicose). A identificação da fonte de radiação UV adequada para promover o acoplamento fotoquímico tetrazol-tiol foi realizada a partir do estudo de reações entre derivados difeniltetrazóis e tióis de baixo peso molecular (L-cisteína e 2-mercaptoetanol). De acordo com os resultados deste estudo, utilizou-se um led de 309 nm na tentativa de imobilização de proteína sobre o filme de celulose funcionalizado, *via* acoplamento fotoquímico tetrazol-tiol. A reação foi conduzida com a albumina do soro bovino, que apresenta um grupo sulfidril livre, em tampão PBS, à temperatura ambiente. Entretanto, a avaliação deste processo pela espectroscopia dos filmes resultantes (UV-vis e FTIR), não forneceu evidências de que a imobilização proteica tenha ocorrido. As condições reacionais permitiram, no entanto, a degradação do grupo difeniltetrazol.

Palavras-chave: Celulose Bacteriana. Imobilização de Proteína. Difeniltetrazol. Biomaterial. Reação Fotoquímica.

SANTOS, Simone Birkheur. **Studies aiming at the covalent immobilization of protein in bacterial cellulose film**. 2018. 58 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Cellulose can be produced by bacteria as film form, with high purity and mechanical strength. These bacterial cellulose films have a biomedical application, and it can be used as skin substitute, wound and burn dressing, blood vessel production, heart valves and cartilage. In order to add biological properties to bacterial cellulose films and, with this, to extend their potential in the biomedical area, we intend, in this work, the application of a promising methodology to immobilize covalently proteins on its surface. This methodology involves the photochemical reaction between the sulfhydryl group and the tetrazole functionality. In this context, a carboxyl derivative containing the tetrazole group was synthesized in two steps from commercial reagents (39% overall yield). Surface hydroxyl groups of the bacterial cellulose films were esterified by reaction with the carboxyl derivative under ultrasonic radiation in the presence of carbodiimide. The surface functionalization of bacterial cellulose films was characterized by UV-vis and FTIR spectroscopies. Sequentially, using UV-vis spectroscopy, the molar concentration of the carboxyl derivative in alkaline solution obtained by the hydrolysis of the esterified groups of functionalized films was determined in order to quantify the extent of functionalization. The determined molar percentage was 0.64 to 0.98% (relative to the D-glucose units). The identification of the UV source adequate to promote the photochemical coupling tetrazol-thiol was performed from the study of reactions between diphenyltetrazole derivatives and low molecular weight thiols (L-cysteine and 2-mercaptoethanol). According to the results of this study, a led of 309 nm was used in the attempt to immobilize protein on the modified cellulose film via photochemical coupling tetrazol-thiol. The reaction was conducted with bovine serum albumin, which has a free sulfhydryl group, in PBS buffer, at room temperature. However, the evaluation of this process by the spectroscopic of the resulting films (UV-vis and FTIR) did not provide evidence that protein immobilization was achieved. The reaction conditions allowed, however, the degradation of the diphenyltetrazol group.

Keywords: Bacterial cellulose. Protein immobilization. Diphenyltetrazol. Biomaterial. Photochemical reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da celulose. As linhas tracejadas ilustram as ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares	12
Figura 2. Imobilização de enzima em suporte de celulose por distintos métodos (a) Ligação covalente; (b) Adsorção; (c) Aprisionamento (LIU; CHEN, 2016).	13
Figura 3. Processo de preparação do material obtido por Isobe e colaboradores (2011) a partir da imobilização em hidrogel de celulose dialdeído (fonte: ISOBE et al., 2011).	13
Figura 4. Processo de preparação do material obtido por Wen e colaboradores (2015); (a) Oxidação regioseletiva da celulose bacteriana; (b) Imobilização de Col-p por formação de iminas com grupos aminos d o peptídeo (fonte: WEN et al., 2015).	14
Figura 5. Processo de preparação do material obtido por Norberg e colaboradores (2009).	17
Figura 6. Reações <i>fotoclick</i> a partir de diariltetrazóis.	15
Figura 7. Processo de preparação do material obtido por Feng e colaboradores (2015).	16
Figura 8. Estratégia proposta para imobilização de proteínas sobre a superfície de filmes de celulose bacteriana.	16
Figura 9. Espectros de FTIR sobrepostos: Filme nativo de celulose bacteriana (CB) e filmes funcionalizados com o grupo difeniltetrazol (CB-Tz).	31
Figura 10. Espectros de UV-vis sobrepostos: Filme nativo de celulose bacteriana (CB) e filmes funcionalizados com o grupo difeniltetrazol (CB-Tz).	31
Figura 11. Espectros de FTIR sobrepostos do filme funcionalizado com o grupo difeniltetrazol (CB-Tz) e deste após hidrólise alcalina dos grupos éster.	34
Figura 12. Espectros de UV-vis sobrepostos do filme funcionalizado com o grupo difeniltetrazol (CB-Tz) e deste após hidrólise alcalina dos grupos éster.	35

Figura 13. Espectros de FTIR sobrepostos dos filmes CB-Tz controle e CB-Tz-BS	39
Figura 14. Espectros de UV-vis sobrepostos dos filmes CB-Tz controle e CB-Tz-BSA	39
Figura 15. Estrutura química do corante BG-250 (Coomassie brilliant blue)	41
Figura 16. Espectro FTIR e UV-vis sobrepostos dos filmes CB-Tz e CB-Tz hidrolisado	42
Figura 17. Espectro FTIR e UV-vis sobrepostos dos filmes CB-Tz-BSA e CB-Tz-BSA hidrolisado	42
Figura 18. Espectro UV-vis sobreposto dos filmes CB-Tz-BSA com CB-Tz-UV	43
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H do produto tosilidrazono 1	49
Figura 20. Espectro de FTIR do produto tosilidrazono 1	50
Figura 21. Espectro de RMN ¹ H do produto difeniltetrazol 2	51
Figura 22. Curva analítica da solução difeniltetrazol 2	2
Figura 23. Espectro de RMN ¹ H do difeniltetrazol 3	53
Figura 24. Espectro de RMN ¹ H do produto de acomplamento tetrazol-tiol 4	54
Figura 25. Curva analítica da solução de proteína BSA	55
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H do produto de reação do derivado difeniltetrazol 2 com L-cisteína (led 309 nm)	56
Figura 27. Espectro de RMN ¹³ C do produto de reação do derivado difeniltetrazol 2 com L-cisteína (led 309 nm)	57
Figura 28. Espectro de RMN HSQC do produto de reação do derivado difeniltetrazol 2 com L-cisteína (led 309 nm)	58

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese de 4-((2-tosilidrazono)metil)benzóico (1).....	27
Esquema 2. Síntese do derivado difeniltetrazol (2).....	28
Esquema 3. Mecanismo de reação para formação do difeniltetrazol 2 a partir de tosilidazona 1	29
Esquema 4. Acoplamento da estrutura 2 em filme de celulose bacteriana	30
Esquema 5. Estratégia empregada para a quantificação da funcionalização da celulose bacteriana com o difeniltetrazol 2 por espectrofotometria UV-vis	5
Esquema 6. Síntese do derivado éster difeniltetrazol 3 a partir de 2	37
Esquema 7. Acoplamento fotoclick tetrazol-tiol entre 3 e o mercaptoetanol	38
Esquema 8. Acoplamento de proteína via reação fotoclick em CB-Tz	39
Esquema 9. Estratégia empregada para a quantificação da funcionalização da celulose bacteriana com o difeniltetrazol 2 por espectrofotometria UV-vis	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio de cultura para o crescimento de <i>Gluconacetobacter hansenni</i>	22
Tabela 2. Valores de absorvância em 278 nm de soluções obtidas da diluição da solução resultante da hidrólise alcalina dos ésteres de CB-Tz	30
Tabela 3. Efeito do solvente, da temperatura, do tempo e da exposição à radiação ultrassônica para a esterificação da celulose bacteriana (CB) por reação com 2 e DCC/DMAP.....	33
Tabela 4. Valores de absorvância em 278 nm de soluções obtidas da diluição da solução resultante da hidrólise alcalina dos ésteres de CB-Tz	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ta	Temperatura ambiente
δ	Deslocamento químico
BSA	Albumina de soro bovino
BG-250	Corante Coomassie brilliant blue
CB	Celulose bacteriana
CB-Tz	Celulose bacteria funcionalizada com difeniltetrazol
CB-Tz-BSA	Celulose bacteriana imobilizada com BSA
CCD	Cromatografia de camada delgada
DCC	<i>N,N'</i> -Dicicloexilcarbodiimida
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N'</i> -Dimetilformamida
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilssulfóxido deuterado
EM-IES	Espectroscopia de massa com ionização por <i>electrospray</i>
FTIR	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformação de Fourier
PBS	Solução tampão fosfato-salina
RMN ¹³ C	Espectroscopia de ressonância magnética de carbono
RMN ¹ H	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton
RMN HSQC	Espectroscopia de ressonância magnética de correlação heteronuclear mono-quântica
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
UV-vis	Espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral.....	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	PARTE EXPERIMENTAL	19
3.1	Métodos gerais	19
3.2	Obtenção do composto (1) (HILTEBRANDT et al., 2015)	19
3.3	Obtenção do derivado difeniltetrazol (2) (HILTEBRANDT et al., 2015)	20
3.4	Obtenção do derivado difeniltetrazol (3) (DENMARK; REGENS; KOBAYASHI, 2007)	21
3.5	Obtenção de filmes de celulose bacteriana (CB) (GOELZER et al., 2009)	21
3.6	Obtenção do filme de celulose bacteriana funcionalizado com o grupo difeniltetrazol (CB-Tz)	22
3.7	Quantificação da extensão da funcionalização do filme CB-Tz	23
3.8	Reações modelo para estudo do acomplamento fotoquímico tetrazol-tiol sobre filme de celulose	24
3.9	Tentativa de imobilização de proteína BSA em filme CB-Tz	25
3.10	Avaliação da ocorrência da imobilização de BSA em filme CB-Tz por método colorimétrico	25
3.11	Controle negativo: Reação fotoquímica do filme CB-Tz sem a presença de proteína BSA	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	45
	ANEXO	48

1 INTRODUÇÃO

A incorporação de proteínas, providas ou não de atividade enzimática, à suportes poliméricos trata-se de uma estratégia amplamente explorada com vistas a aquisição de novos biomateriais com aplicações biomédicas diversas (ITO, 2008; JAGANATHAN et al., 2014; REN; OTT, 2014; YE et al., 2013).

Os suportes poliméricos empregados na imobilização de proteínas podem ser de natureza inorgânica ou orgânica, sendo estes últimos, sintéticos ou naturais. Entre as matrizes inorgânicas, a sílica mesoporosa SBA-15 é uma das mais empregadas, sendo inclusive útil para imobilizações de proteína em grande escala (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). Os polímeros sintéticos (resinas), ainda que sejam comercialmente disponíveis para este fim, como o metacrilato de epóxi ECR8205 (Purolite Life Sciences Co., EUA), e bastante utilizados apresentam a desvantagem de não serem biodegradáveis (ERHARDT; JÖRDENING, 2007). Os polímeros orgânicos naturais, por outro lado, são bastantes visados, devido a sua possibilidade de biodegradação, resultando em um baixo risco de contaminação ao meio ambiente. Dentre estas matrizes, destacam-se as de natureza polissacarídica, dentre as quais a agarose, a quitosana e a celulose são as mais comumente utilizadas (LIU; CHEN, 2016).

A celulose é o biopolímero mais abundante da Terra. Além de ser de baixo custo, é biodegradável e renovável. Estas características, somadas à hidrofiliabilidade, biocompatibilidade e à estabilidade química a diferentes condições, fazem da celulose um componente adequado para um biomaterial funcional (LIU; CHEN, 2016). A celulose é um polissacarídeo constituído por unidades D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, formando cadeias não ramificadas. Estas cadeias são mantidas unidas por ligações de hidrogênio intermoleculares (Figura 1).

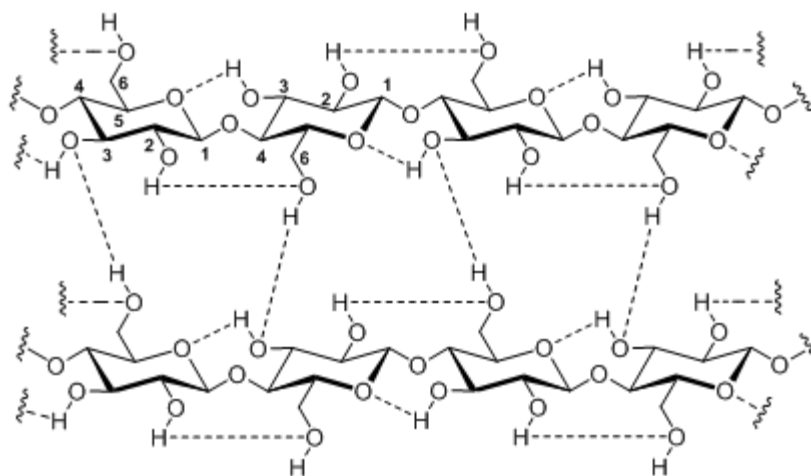


Figura 1. Estrutura química da celulose. As linhas tracejadas ilustram as ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares.

A celulose tem como principal fonte as plantas, mas também pode ser produzida na forma de filme, a partir de D-glicose, por bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Achromobacter* e *Escherichia* (SHODA; SUGANO, 2005). A celulose bacteriana (CB) é formada no meio de cultura com grande pureza, ao contrário da vegetal que é extraída de suas fontes naturais associada à pectina, lignina e hemicelulose (LIN et al., 2013). Além da pureza, a celulose bacteriana (CB) se destaca por seu alto grau de cristalinidade, por sua capacidade de retenção de água e por sua resistência mecânica. Filmes nativos de celulose bacteriana são comercializados para uso como substituto de pele, curativo de ferimentos e queimaduras, produção de vasos sanguíneos, válvulas cardíacas e cartilagens. Diversos trabalhos relatam o desenvolvimento de biomateriais à partir da celulose bacteriana, com as mais diversas funções (BARUD et al., 2013; FU; ZHANG; YANG, 2013; SASKA et al., 2011).

As técnicas de imobilização de proteínas, especialmente enzimas, em celulose podem envolver interações físicas, como adsorção ou aprisionamento, ou química, com a formação de ligações covalentes. Os processos de adsorção são reversíveis, promovida pela ocorrência de interações atrativas eletrostáticas relativamente fracas. Ainda que também envolvam as mesmas forças atrativas não covalentes, o aprisionamento é um processo irreversível. Os processos empregados permitem que as proteínas fiquem confinadas na rede polimérica (LIU; CHEN, 2016;

MOHAMAD et al., 2015; SINGH et al., 2013) . Na Figura 2 estão ilustrados os métodos usuais de imobilização de proteínas em celulose.

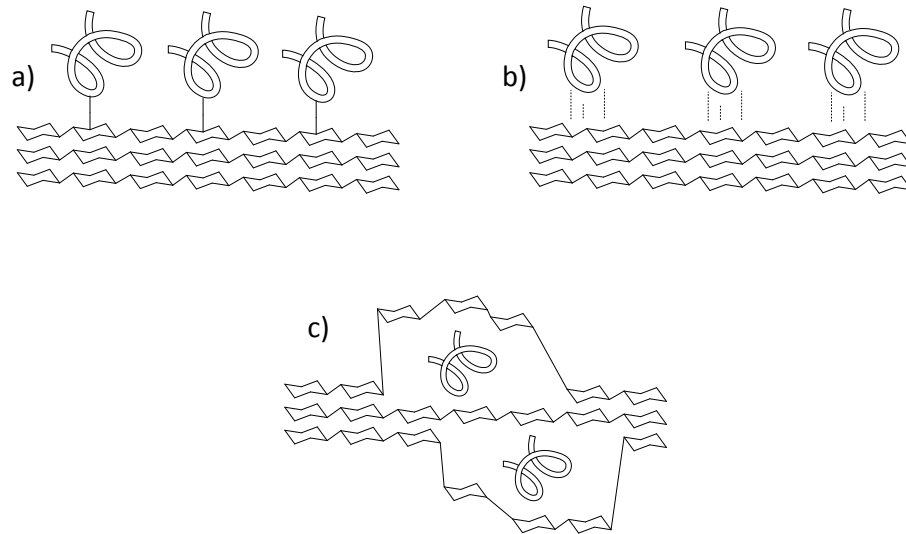


Figura 2. Imobilização de enzima em suporte de celulose (a) Ligação covalente; (b) Adsorção; (c) Aprisionamento.

A imobilização covalente de proteínas em suporte de celulose é um processo mais efetivo e conduz a um biomaterial mais estável. Entretanto, os grupos hidroxila da celulose não reagem diretamente com os grupos funcionais presentes em proteínas (amino, carboxila ou sulfidril), sendo necessária a funcionalização adequada da celulose (LIU; CHEN, 2016; TRAN; BALKUS, 2011).

A exemplo disto, a imobilização covalente de uma peroxidase foi conseguida a partir de um derivado oxidado de celulose (celulose dialdeído, resultante da clivagem oxidativa de C-2 e C-3). A imobilização da enzima ocorreu pela formação de bases de Schiff por reação com grupos amino protéicos, seguida de redução (Figura 3) (ISOBE et al., 2011). Com isto, esperava-se obter um material que pudesse ser útil como biosensor e bioreator.

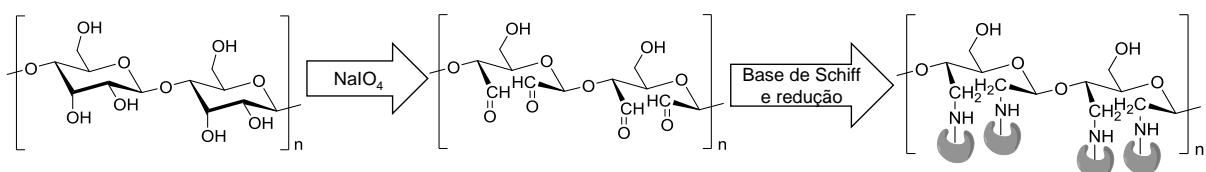


Figura 3. Processo de preparação do material obtido por Isobe e colaboradores (2011) a partir da imobilização em hidrogel de celulose dialdeído.

Seguindo uma abordagem semelhante, Wen e colaboradores (2015) imobilizaram covalentemente um fragmento peptídico de colágeno (Col-p) em nanofibras de celulose bacteriana oxidada regioseletivamente em C-2 e C-3 (Figura 4). Ensaio com células de fibroblastos revelou que o material obtido apresentou boa afinidade celular, contribuindo para os fenômenos de adesão e proliferação de fibroblastos, sendo um biomaterial com grande potencial para engenharia de regeneração de tecidos (WEN et al., 2015).

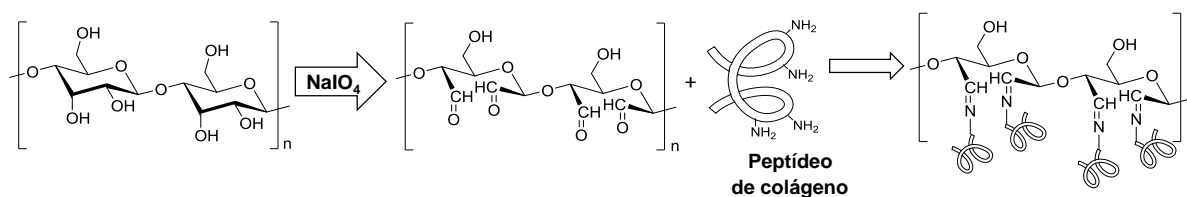


Figura 4. Processo de preparação do material obtido por Wen e colaboradores (2015); (a) Oxidação regioseletiva da celulose bacteriana; (b) Imobilização de Col-p por formação de iminas com grupos aminos do peptídeo.

Nas últimas décadas, as reações *fotoclick* foram amplamente estudadas na busca pela combinação da estereosseletividade e rapidez dos processos fotoquímicos, com o alto rendimento das reações *click* (FENG et al., 2015; HEIN; LIU; WANG, 2009). Na literatura pode ser encontrados inúmeros trabalhos que relatam a utilização das reações *fotoclick* para as mais variadas aplicações. A exemplo disto, foi desenvolvida uma metodologia para funcionalização de superfície polimérica para imobilização de carboidratos contendo grupo azida. Este material apresentou resultados positivos em testes com a lectina concanavalina A (Figura X) (NORBERG et al., 2009).

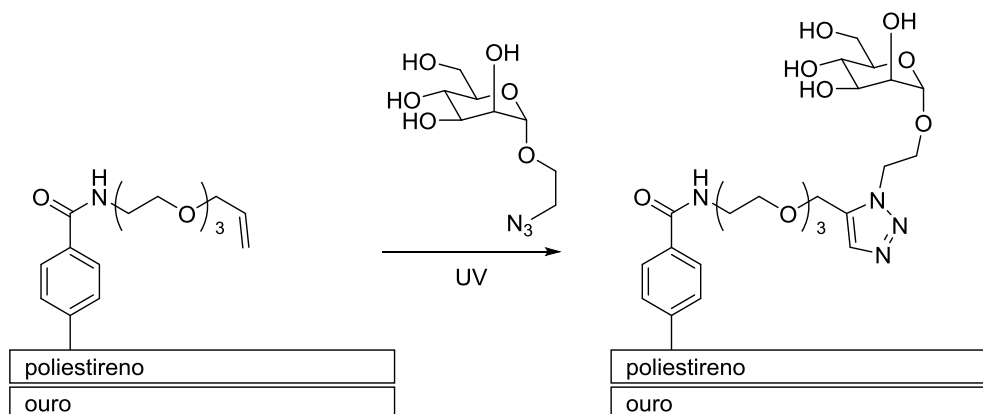


Figura 5. Processo de preparação do material obtido por Norberg e colaboradores (2009).

Lin e colaboradores (2011) relataram a produção de hidrogéis de polietilenoglicol a partir de reação *fotoclick* tiol-eno (Figura X). Sobre este suporte realizou-se o encapsulamento de células pancreáticas que liberaram insulina em resposta ao tratamento com glicose.

O grupo diariltetrazol foi reconhecido como uma funcionalidade versátil para reações *fotoclick*. O anel tetrazólico, constituído por quatro átomos de nitrogênio e um de carbono, é estável, mas sob irradiação ultravioleta forma um intermediário altamente reativo a nucleófilos (Figura 5) (LIM; LIN, 2011; VONHÖREN et al., 2016).

As reações que envolvem alcenos e alcino como nucleófilos, denominadas tetrazol-eno e tetrazol-ino, respectivamente, são bastante difundidas, tendo sido empregadas em bioconjugações e funcionalização da superfície (FAN et al., 2013; SONG et al., 2008; VONHÖREN et al., 2016).

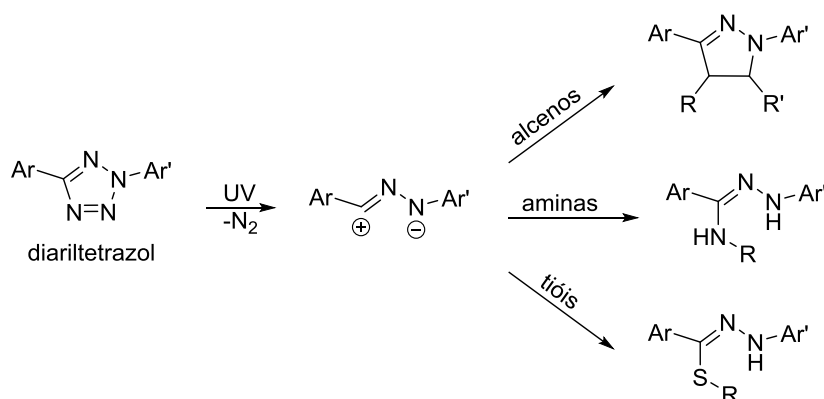


Figura 6. Reações fotoclick a partir de diariltetrazóis.

Feng e colaboradores (2015) inovaram ao empregar esta metodologia, desenvolvendo condições para o acoplamento seletivo de grupo tióis protéicos à matriz de polietilenoglicol funcionalizada com o grupo difeniltetrazol (FENG et al., 2015).

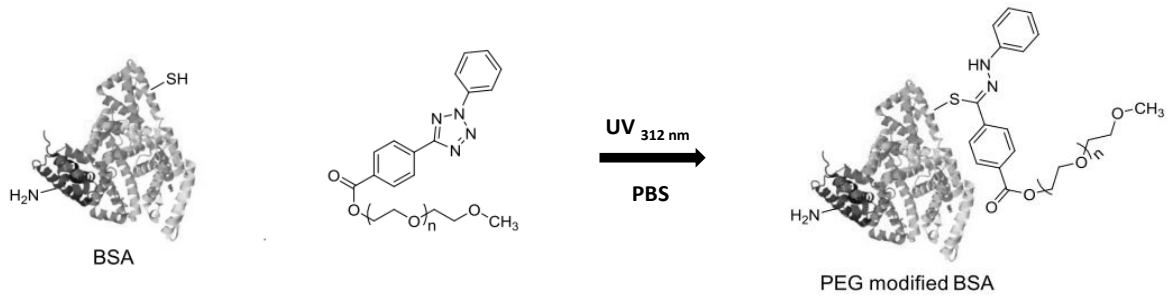


Figura 7. Processo de preparação do material obtido por Feng e colaboradores (2015).

Este processo mostrou-se muito vantajoso por ter alto rendimento, seletividade, livre de catalisador e por formar apenas um subproduto não nocivo (N_2). O solvente empregado foi água, o que é desejável em reações com biomoléculas, no sentido de prevenir a desnaturação protéica e a perda de atividade. Esta abordagem permite a imobilização direta de biomoléculas portadoras de grupos tiol periféricos, sem a necessidade de realizar modificações químicas na proteína (FENG et al., 2015)

O presente trabalho tem o objetivo de aplicar esta metodologia de imobilização de proteína, desta vez, sobre a superfície de filmes de celulose bacteriana funcionalizados com grupo difeniltetrazol, empregando-se a reação *fotoclick* terazol-tiol, de acordo com o esquema mostrado na Figura 7.

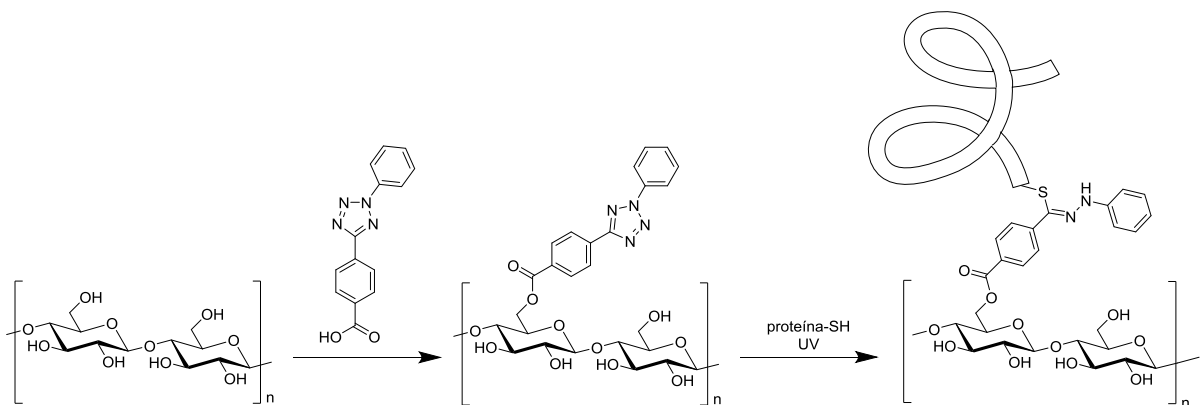


Figura 8. Estratégia proposta para imobilização de proteínas sobre a superfície de filmes de celulose bacteriana.

A imobilização direta de proteínas em filme de celulose bacteriana pode conduzir a diferentes biomateriais com aplicações biotecnológicas e biomédicas, uma vez que viabiliza a imobilização de um arsenal de biomoléculas funcionais que

contenham o grupo tiol periférico. Com base em resultados previamente obtidos pelo nosso grupo (BIRKHEUR et al., 2017) , pretendemos avaliar o potencial dos materiais de celulose bacteriana com proteínas imobilizadas como indutores de cicatrização, por ensaio de crescimento de fibroblastos. Estes serão realizados com a colaboração da equipe da Professora Denise Endringer da Universidade de Vila Velha, no Espírito Santo. Acreditamos que o processo de adesão celular possa ser favorecido pela interação com grupos ionizáveis em meio aquoso da proteína imobilizada sobre a superfície de filme de celulose funcionalizada (NEL et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver metodologia para imobilização covalente de proteínas em filme de celulose bacteriana via acoplamento *photoclick* tetrazol-tiol.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar o ácido 4-(2-fenil-2H-tetrazol-5-il)benzóico (espaçador para imobilização de proteínas);
- Funcionalizar filmes de celulose bacteriana por reação de esterificação com o derivado difeniltetrazol;
- Caracterizar por métodos espectroscópicos e quantificar a esterificação dos filmes de celulose bacteriana;
- Acoplar proteínas contendo grupo sulfidril em filme de celulose bacteriana funcionalizada com o grupo difeniltetrazol por reação fotoquímica;
- Caracterizar por métodos espectroscópicos e quantificar a imobilização de proteínas em filmes de celulose bacteriana;

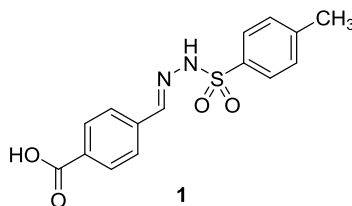
- Avaliar o potencial dos materiais obtidos como adjuvantes de cicatrização por ensaio de crescimento de fibroblasto.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Métodos gerais

Os pontos de fusão das substâncias sintetizadas foram determinados em aparelho digital da Microquímica Ltda. MQAPF-302. Os espectros de UV-vis foram registrados em um espectrofotômetro UV-2600 Shimadzu, na faixa de 200-700 nm. Os espectros de FTIR foram obtidos em um espectrômetro Shimadzu FTIR PRESTIGE, na faixa de 4000-400 cm^{-1} . Os espectros RMN ^1H foram registrados em um espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz operado a uma frequência de 400,6 MHz e 100,13 MHz para o carbono. Os espectros foram calibrados pelo sinal do tetrametilsilano, usado como referência interna, ou pelo sinal do solvente residual. Os solventes diclorometano e *N,N*-dimetilformamida secos, empregados nas reações, foram tratados com peneira molecular 3 Å, conforme descrito por Williams e colaborador (2010). As reações, exceto aquelas que envolveram a funcionalização dos filmes de celulose, foram monitoradas por CCD (placa da Macherey-Nagel DC-Fertigfolinen ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄). As placas preparativas empregadas para purificação de produtos foram preparadas com sílica gel 60 com gesso e com indicador UV₂₅₄ da Macherey-Nagel, em placa de vidro 10x20 cm (espessura de 1 mm). Nas reações induzidas por radiação UV foram empregados como fonte luminosa o led de alto brilho de 309 nm (marca Roithner). Para as reações de funcionalização da celulose bacteriana foi empregado o banho ultrassônico Unique (40 kHz - Modelo USC3300).

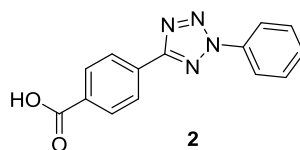
3.2 Obtenção do ácido 4-((2-tosilidrazono)metil)benzóico (HILTEBRANDT et al., 2015)



Em um balão de fundo redondo de 50 mL acoplado a um condensador de refluxo, uma mistura contendo 100 mg (0,6 mmol) de ácido 4-formilbenzóico e 148

mg (0,796 mmol) de *p*-toluenossulfonidrazida em 7,5 mL de etanol foi mantido sob agitação magnética e refluxo por 6 horas. Após esse período, foi verificado o consumo total da matéria prima através de CCD (acetato de etila/hexano (1:1)). Então, o produto foi precipitado em água, filtrado à vácuo, obtendo-se, 199 mg (0,626 mmol) de **1** como um sólido branco (94% de rendimento). Ponto de fusão: 181 °C. FTIR (KBr, cm^{-1}) 3513 (N-H), 1680 (C=O), 1326 (C-O), 1163 (C-H). RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,95 (t, 3 H, Ar), 7,77 (d, 2H, Ar), 7,66 (d, 2H, Ar), 7,41 (d, 2H, Ar), 2,36 (s, 3H, CH_3) (lit.:RMN ^1H (DMSO-d_6 , 250 MHz) δ 7,96 (s, 1H), 7,94 (d, 2H), 7,77 (d, 2H), 7,66 (d, 2H), 7,41 (d, 2H), 2,35 (s, 3H) (RODRIGUEZ-EMMENEGGER et al., 2013)).

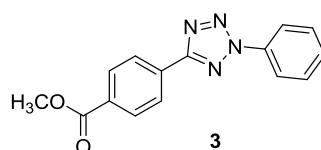
3.3 Obtenção do ácido 4-(2-fenil-2H-tetrazol-5-il)benzóico (**2**) (HILTEBRANDT et al., 2015)



Em um balão de fundo redondo de 25 mL, uma solução contendo 172 μL (1,89 mmol) de anilina, 1,5 mL de etanol absoluto, 1,5 mL de água destilada e 3,0 mL de HCl concentrado foi resfriado a 0 °C em um banho de gelo. em banho de gelo e mantido em sob agitação magnética por 20 minutos. Logo após, foram adicionados, gota a gota, 0,8 mL de solução aquosa de NaNO_2 (2,36 mol.L^{-1}). A solução resultante foi adicionada lentamente sobre uma solução contendo 400 mg (1,26 mmol) de **1** em 6,7 mL de piridina, em banho de gelo, sob agitação magnética, sendo deixada por 4 horas nesta condição, seguido de mais 22 horas à temperatura ambiente. Após esse período, o término da reação foi verificado por CCD (diclorometano/metanol (7:3)). Logo, adicionou-se 20 mL de CH_2Cl_2 à mistura reacional e a fase orgânica foi extraída com solução aquosa de HCl 0,1 mol.L^{-1} (7 vezes de 40 mL), seguido da lavagem com solução saturada aquosa de NaCl (3 vezes de 20 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente evaporado à pressão reduzida. O resíduo obtido foi recristalizado a partir da solubilização à quente em álcool etílico, seguida da adição de água. Foram obtidos 35 mg (0,131 mmol, 42% de rendimento) de **2** como um sólido avermelhado. Ponto

de fusão: 228 °C (lit.: 221-222°C (LI et al., 2014)). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,30 (d, 2H, Ar), 8,17 (t, 4H, Ar), 7,71 (t, 2H, Ar), 7,64 (t, 1H, Ar) (lit.: RMN ^1H (DMSO- d_6) δ 13,25 (s, 1H), 8,31 (d, 2H), 8,18 (t, 4H), 7,72 (t, 2H), 7,65 (t, 1H) (HILTEBRANDT et al., 2015).

3.4 Obtenção do 4-(2-fenil-2H-tetrazol-5-il)benzoato de metila (**3**) (DENMARK; REGENS; KOBAYASHI, 2007)



Em um balão tritubulado foram adicionados 100 mg (0,376 mmol) de ácido 4-(2-fenil-2H-tetrazol-5-il)benzóico (**2**). Sob atmosfera inerte, foram adicionados 2,7 mL de metanol e 0,1 mL (1,5 mmol) de cloreto de tionila. O meio reacional foi aquecido sob refluxo por 2 horas. Após o término da reação, verificado por CCD (acetato de etila/hexano (1:1)), o solvente foi evaporado à pressão reduzida. O resíduo obtido foi ressuspensionado em metanol (20 mL), sendo o solvente novamente removido sob pressão reduzida. O processo foi repetido mais duas vezes. Foram obtidos 100 mg (0,347 mmol) de **3** como um sólido bege (85% de rendimento). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,34 (d, 2H, Ar), 8,20 (m, 4H, Ar), 7,59 (t, 2H, Ar), 7,52 (t, 1H, Ar), 3,96 (s, 3H, OMe) (lit.: RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) δ 8,33 (d, 2H), 8,19 (t, 4H), 7,58 (t, 2H), 7,51 (t, 1H), 3,95 (s, 3H), (FENG et al., 2015)).

3.5 Obtenção de filmes de celulose bacteriana (CB) (GOELZER et al., 2009)

Bactérias do gênero *Gluconacetobacter hansenni* ATCC23769 foram utilizadas para a produção de filmes de celulose bacteriana. As amostras empregadas desta cepa foram provenientes da fundação André Toselho, Campinas-São Paulo, Brasil. A amostra de cepa *G. Hansenni* foi estocada em glicerol 30% a -80 °C, em microtubos de fundo cônico, contendo 2 mL de meio fermentado.

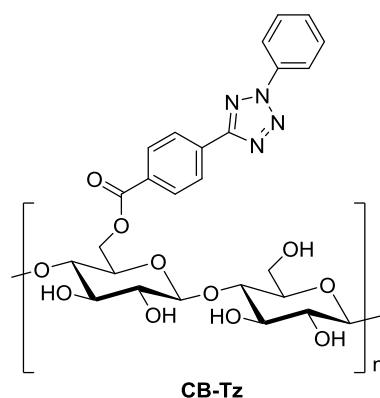
O meio de cultivo usado para a produção foi o de Hestrin-Schramm's modificado (HESTRIN; SCHRAMM, 1954), em que os reagentes utilizados estão descritos na Tabela 1. Os filmes de celulose bacteriana foram produzidos segundo a metodologia de Goelzer e colaboradores (2009). Para a ativação da cepa, foram

adicionados o conteúdo de quatro tubos de fundo cônico (Eppendorf) em 80 mL de meio de Hestrin-Schramm's modificado, mantendo-se a mistura sob agitação a 110 rpm a 28 °C, por 2 dias. Após os dois dias, o meio de cultura foi transferido para um erlenmeyer que continha 720 mL de meio Hestrin-Schramm's, onde foram homogenizados e depois transferidos para um recipiente de 22 x 36 x 5 cm e, por fim, acomodados em uma estufa a uma temperatura de 28 °C por 10 dias, em fermentação estática. Ao término do décimo dia, o filme produzido foi lavado com água destilada e acondicionado em solução de hidróxido de sódio 4% por um dia. Posteriormente, o filme foi lavado com água destilada exaustivamente, até atingir o pH 7, e então transferido para um recipiente em que continha uma solução aquosa de 20% (v/v) de metanol e guardado em câmara fria.

Tabela 1. Composição do meio de cultura para o crescimento de *Gluconacetobacter hanseni*.

Reagentes	Pré-Inóculo	Inóculo
	Quantidade	Quantidade
Glicose	0,4 g	4 g
Levedura	0,4 g	4 g
Fosfato dissódico	0,4 g	4 g
Peptona	0,4 g	4 g
Ácido cítrico	0,092 g	0,92 g
Água destilada	80 mL	800 mL

3.6 Obtenção do filme de celulose bacteriana funcionalizado com o grupo difeniltetrazol (CB-Tz)



Um filme **CB** de 10 mg (0,061 mmol, respectivo a uma unidade de D-glicose), previamente lavado com CH_2Cl_2 seco, foi colocado em tubo de ensaio e a este foram adicionados 1,5 mL de CH_2Cl_2 seco, 32 mg (0,123 mmol) do derivado difeniltetrazol **2**, 31 mg (0,148 mmol) de DCC e 15 mg (0,123 mmol) de DMAP. O tubo de ensaio foi acomodado em banho ultrassônico por 6 horas. Após este período, o filme obtido (**CB-Tz**, 10 mg) foi lavado com água destilada (3 vezes de 10 mL) e etanol (3 vezes de 10 mL) e seco em temperatura ambiente. FTIR (cm^{-1}) 1715 (C=O de éster) e UV-vis (nm): 280 (difeniltetrazol).

3.7 Quantificação da extensão da funcionalização do filme **CB-Tz**

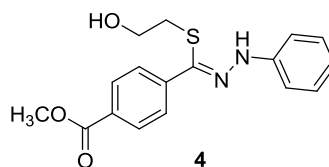
Em balão volumétrico de 50 mL, foi preparada uma solução a $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$, utilizando-se 2,66 mg do derivado difeniltetrazol **2** e solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 12,0), como diluente. A partir desta solução-estoque, foram obtidas soluções a 40, 35, 30, 25, 20, 15 e $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, por meio de diluições em solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Utilizando-se espectrofotômetro UV-vis, determinou-se a absorvância em 278 nm fornecida por cada solução diluída de **2** (Tabela 5). Os valores obtidos foram empregados para a construção de uma curva analítica de **2** (os dados foram tratados utilizando o programa Excel (2013)). Em um tubo de ensaio, um filme **CB-Tz** de 3,7 mg (0,0023 mmol de D-glicose) foi tratado com 1,0 mL de solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 12,0), permanecendo em banho ultrassônico por 6 horas. Subsequentemente, o sobrenadante foi recolhido juntamente com mais 1,0 mL de solução alcalina empregada na lavagem do filme de celulose resultante, perfazendo um volume final de 2,0 mL (*solução A*). A ocorrência extensiva da hidrólise dos grupos éster de **CB-Tz** foi verificada a partir de análise por FTIR e UV-vis do filme obtido seco à temperatura ambiente (espectros apresentados no Anexo). A *solução A* (2,0 mL) foi diluída, empregando-se 0,5 mL desta para se obter 5,0 mL, resultando na *solução B*. Este procedimento foi realizado em triplicata. Os valores de absorvância a 278 nm de cada *solução B* foram determinados (Tabela 4), sendo estes utilizados para se determinar a concentração molar de **2**, empregando-se a equação da reta da curva analítica (Tabela 3).

3.8 Reações modelo para estudo do acomplamento fotoquímico tetrazol-tiol sobre filme de celulose

3.8.1 Tentativa de acomplamento fotoquímico do derivado difeniltetrazol 2 com L-cisteína

Em um béquer, foram adicionados 8 mg (0,03 mmol) do derivado difeniltetrazol **2**, 5,0 mL de etanol e 3,64 mg (0,03 mmol) de L-cisteína. A solução reagente foi mantida sob agitação magnética e exposta a irradiação UV de 309 nm, a temperatura ambiente. No decorrer de 24 horas de reação sob agitação magnética, foram adicionados mais 14,56 mg (0,121 mmol) e L-cisteína a cada 4 horas. A reação foi acompanhada por CCD (diclorometano/metanol (95%)). Logo após, o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (200-400 mesh, acetato de etila/hexano (1:1)). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,19 (s, 1H, NH), 8,14 (d, 2H, Ar), 8,03 (d, 2H, Ar), 7,35 (t, 2H, Ar), 7,22 (d, 2H, Ar), 7,00 (t, 1H, Ar). RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) δ 130,2, 129,4, 126,1, 121,8, 113,6.

3.8.2 Acoplamento fotoquímico do derivado difeniltetrazol 3 com 2-mercaptoetanol: obtenção do composto 4 (FENG et al., 2015)



Em um béquer foram adicionados 10 mg (0,0357 mmol) do derivado difeniltetrazol **3**, 4,0 mL de acetato de etila e 13 μL (0,182 mmol) de 2-mercaptoetanol. Nitrogênio gasoso foi borbulhado no meio reacional por 10 minutos. A solução reagente, foi mantida sob agitação magnética e exposta a radiação 309 nm (led) por 4 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados mais 25 μL (0,351 mmol) de 2-mercaptoetanol. A reação foi mantida sob agitação magnética por mais 3 horas. Após o término da reação, o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por meio de cromatografia em camada delgada preparativa (acetato de etila/hexano (1:1)), tendo sido obtidos 5 mg

(0,0151 mmol) de **4** (42% de rendimento). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 9,20 (s, 1H, NH), 8,04 (m, 4H, Ar), 7,32 (t, 2H, Ar), 7,23 (t, 2H, Ar), 6,96 (m, 1H, Ar), 3,93 (s, 3H, CH_3), 3,69 (m, 2H, CH_2), 2,90 (t, 2H, CH_2). (lit.: RMN ^1H (CDCl_3) δ 9,24 (s, 1H), 8,06 (m, 4H), 7,33 (t, 2H), 7,25 (t, 2H), 6,96 (t, 1), 3,94 (s, 3H), 3,69 (t, 2), 2,90 (t, 2H).

3.9 Tentativa de imobilização de proteína BSA em filme CB-Tz

Um filme **CB-Tz** de 3,4 mg e 2,0 mL de tampão fosfato-salino (PBS) foram transferidos para um béquer. Em seguida, foram adicionados 2,0 mg (30,3 nmol) de BSA solubilizados em 300 μL de PBS. A sistema heterogêneo foi mantido à temperatura ambiente sob irradiação direta de 309 nm (led) por 7 horas. O filme **CB-Tz-BSA** obtido foi lavado com água destilada e seco à temperatura ambiente. FTIR (cm^{-1}) 1715 (C=O de éster). UV-vis (nm): 365.

3.10 Avaliação da ocorrência da imobilização de BSA em filme CB-Tz por método colorimétrico

Filmes de **CB-Tz** e **CB-Tz-BSA** foram dispostos em tubos de ensaios distintos, aos quais foram adicionados 1 mL de solução de NaOH 0,1 mol.L^{-1} (pH 12,0), e então permaneceram em banho ultrassônico por 6 horas. Posteriormente, o sobrenadante de cada tudo de ensaio foi recolhido juntamente com mais 1,0 mL de solução alcalina empregada na lavagem dos filmes de celulose resultante, perfazendo um volume final de 2,0 mL (*soluções Tz e Tz-BSA*). A ocorrência extensiva da hidrólise dos grupos éster de **CB-Tz** e **CB-Tz-BSA** foram verificados a partir de análise por FTIR e UV-vis dos filmes obtidos seco à temperatura ambiente (espectros apresentados no Anexo). Em um espectrômetro UV-vis, em 595 nm, foram obtidos valores de absorvância para soluções preparadas a partir de 100 μL de *solução Tz* e *solução Tz-BSA* e 1 mL de corante BG-250.

3.11 Controle negativo: Reação fotoquímica do filme CB-Tz sem a presença de proteína BSA

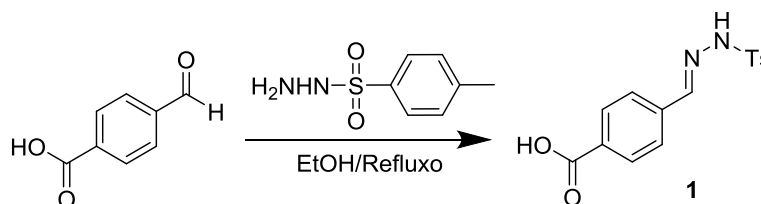
Um filme **CB-Tz** de 3,7 mg e 2,0 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) foram transferidos para um béquer. A sistema heterogêneo foi mantido à temperatura ambiente sob irradiação direta de 309 nm (Led) por 7 horas. O filme **CB-Tz-UV** obtido foi lavado com água destilada e seco à temperatura ambiente.

FTIR (cm^{-1}) 1715 (C=O de éster). UV-vis (nm): 365 (Espectro apresentado na Figura 16).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imobilização de proteínas sobre superfícies, de modo geral, requer condições aquosas para prevenir sua desnaturação ou perda de atividade e função. Neste contexto, foi demonstrado por Feng e colaboradores (2015), como alternativa de imobilização covalente de proteínas, que reações fotoquímicas sobre polímeros funcionalizados com o grupo tetrazol, envolvendo grupos sulfidril de proteínas, ocorrem em meio aquoso neutro. Neste trabalho, em primeiro momento, filmes de celulose bacteriana foram funcionalizados com o grupo difeniltetrazol. Sequencialmente, sobre o filme de celulose funcionalizado, buscou-se conduzir a conjugação da proteína BSA, que contém um grupo sulfidril livre, por meio de reação induzida por radiação UV.

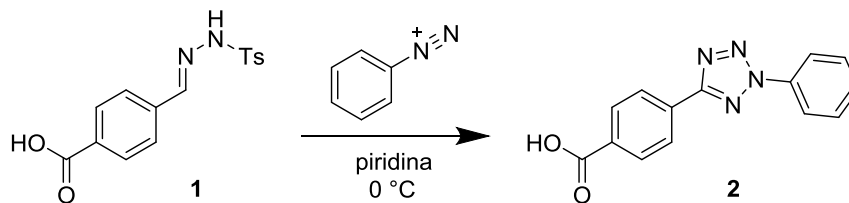
Para a funcionalização dos filmes de celulose bacteriana, empregou-se como reagente um derivado difeniltetrazol, que foi sintetizado em duas etapas, conforme a metodologia descrita por Hildebrandt e colaboradores (2015). Primeiramente, o precursor tosildrazono **1** foi obtido com 94% de rendimento pela condensação do ácido 4-formilbenzóico e *p*-toluenossulfonidrazina (Esquema 1).



Esquema 1. Síntese de 4-((2-tosilidrazono)metil)benzóico (**1**) a partir do ácido 4-formilbenzóico (HILTEBRANDT et al., 2015).

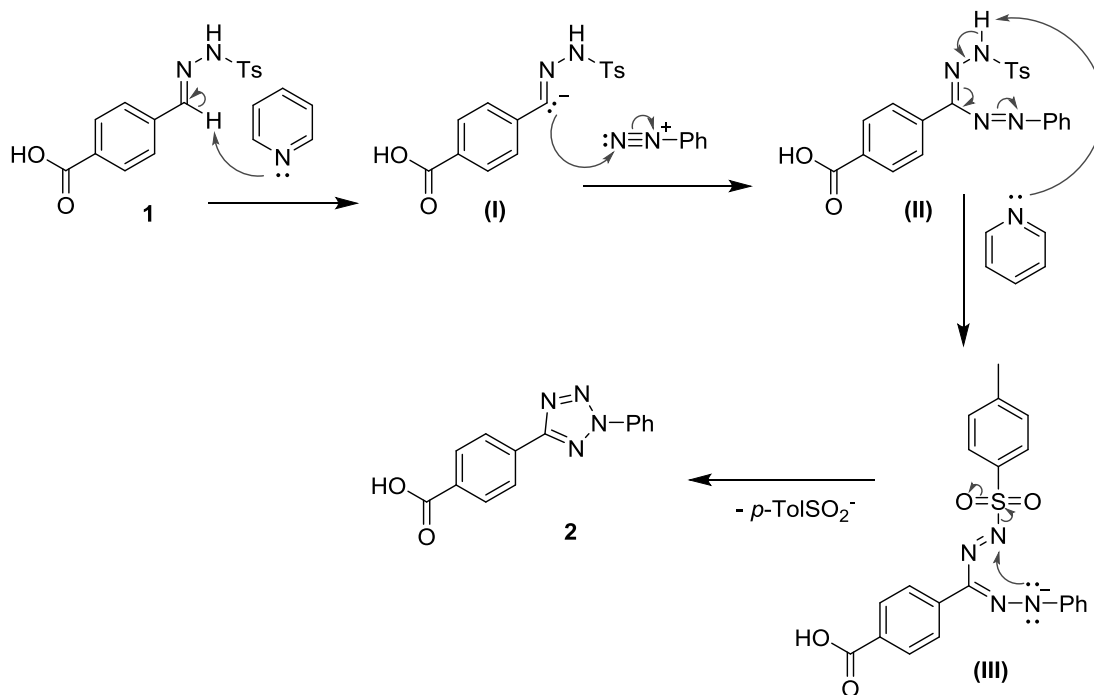
A estrutura do precursor **1** foi caracterizada por FTIR e RMN ^1H (os espectros estão apresentados no Anexo, Figuras 18 e 19), sendo os dados obtidos compatíveis com os descritos na literatura (RODRIGUEZ-EMMENEGGER et al., 2013). No espectro de FTIR de **1**, as bandas em 3513 e 1680 cm^{-1} que correspondem a deformações axiais das ligações N-H e C=O, caracterizam a carbonila de ácido carboxílico conjugado, respectivamente. No espectro de RMN ^1H , o sinal da metila em δ 2,36 e os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ 7,66 e 7,41 caracterizam o grupo toсила enquanto os sinais em δ 7,95 e 7,77 correspondem aos hidrogênios do grupo benzóico.

A reação do derivado tosilidrazono **1** com o sal de diazônio da anilina conduziu à obtenção de **2**, como um sólido avermelhado, com rendimento de 42% (Esquema 2).



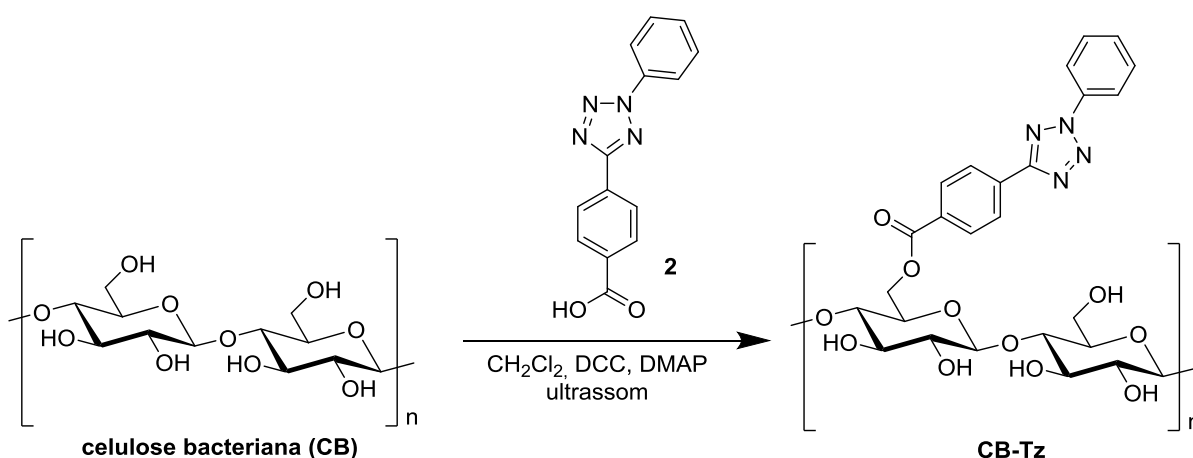
Esquema 2. Síntese do difeniltetrazol **2** a partir da tosilidrazona **1** (HILTEBRANDT et al., 2015).

Alternativamente, na busca de melhores rendimentos para a obtenção do difeniltetrazol **2**, foi empregada outra metodologia (LI et al., 2014), na qual a reação foi conduzida a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Entretanto, esta modificação não implicou em uma melhora no rendimento de **2** (15%). No mesmo sentido, empregou-se cromatografia em coluna (sílica gel, 230-400 mesh, acetato de etila/hexano (1:1)) como método alternativo de purificação do bruto de reação, sendo que este não se mostrou vantajoso em comparação com o processo de recristalização. Os dados de RMN ^1H obtidos para o derivado **2** são comparáveis com os descritos na literatura (HILTEBRANDT et al., 2015). No espectro de RMN ^1H (apresentado no Anexo, Figura 20) foram observados cinco sinais de hidrogênios aromáticos, em δ 8,30, 8,17, 7,71, 7,64 (estando dois sobrepostos em δ 8,17). O tripleto em δ 7,64 foi atribuído ao hidrogênio na posição *para* do grupo fenila, o tripleto em δ 7,71 aos hidrogênios em *meta*. O duplete em δ 8,30 foi atribuído aos hidrogênios da posição *meta* do grupo benzóico, e os sinais sobrepostos em δ 8,17 aos demais hidrogênios aromáticos. A síntese do difeniltetrazol **2** a partir de **1** ocorre por meio de um mecanismo complexo, de acordo com o que foi proposto por Ito e colaboradores (1976) (Esquema 3). A desprotonação do hidrogênio carbonílico de **1**, seguida do ataque nucleofílico do ânion formado (**I**) ao grupo diazônio, fornece o formazam (**II**), cuja desprotonação (do grupo hidrazono), gera o íon (**III**). A ciclização 1,5-dipolar promove a saída de benzenossulfinato, resultando no derivado difeniltetrazol **2**.



Esquema 3. Mecanismo de reação proposto para formação do difeniltetrazol **2** a partir de tosilidazon **1** (ITO et al., 1976)

Os filmes de celulose bacteriana foram produzidos pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii* de acordo com a metodologia descrita por Goelzer e colaboradores (2009). Após retirados do meio de cultura, os filmes foram lavados e secos à temperatura ambiente. A esterificação de hidroxilas primárias das unidades de glicose dos filmes de celulose bacteriana por reação com o derivado carboxílico difeniltetrazol **2**, foi conduzida empregando-se DCC e DMAP, resultando nos filmes **CB-Tz** (Esquema 4).



Esquema 4. Acoplamento da estrutura **2** em filme de celulose bacteriana

As condições reacionais foram estabelecidas a partir de um estudo em que se avaliou o efeito do solvente, da temperatura, do tempo e da exposição à radiação ultrassônica sobre o sucesso da reação (Tabela 2). A ocorrência da reação foi evidenciada pela análise comparativa dos espectros de FTIR e UV-vis dos filmes de celulose resultantes (após secagem) com os do filme *nativo* (seco).

Tabela 2. Efeito do solvente, da temperatura, do tempo e da exposição à radiação ultrassônica para a esterificação da celulose bacteriana (**CB**) por reação com **2** e DCC/DMAP.

Condição	Solvente	Temperatura	Tempo	Banho ultrassônico	Resultado
1	DMF	45° C	22 horas	não	negativo
2	DMF	ta	6 horas	sim	negativo
3	CH ₂ Cl ₂	ta	20 horas	não	positivo
4	CH ₂ Cl ₂	ta	6 horas	sim	positivo

Nas primeiras condições avaliadas, o solvente empregado foi a DMF (condições 1 e 2). Supostamente, a utilização deste solvente seria vantajosa por solubilizar bem os reagentes, e por não ser removido por evaporação quando aquecido no banho ultrassônico. Entretanto, foram bem sucedidas apenas as condições em que se empregou diclorometano como solvente (condições 3 e 4), sendo que o uso do banho ultrassônico promoveu a ocorrência de esterificações em maior extensão (condição 4), de acordo com o que foi observado a partir da análise comparativa dos espectros de FTIR e UV-vis dos filmes obtidos (**CB-Tz**). Nos espectros de FTIR dos filmes de **CB-Tz** (Figura 8), observa-se uma banda em 1715 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da carbonila do grupo éster formado (nos espectros de **CB-Tz** condição 3 observa-se apenas uma banda relativamente pouco intensa). A diferença entre as intensidades relativas destas bandas (comparando-se os espectros de **CB-Tz** condição 3 e 4) evidencia que a exposição à radiação ultrassônica favoreceu a ocorrência da funcionalização em maior extensão. Os dados obtidos pela análise por UV-vis dos filmes **CB-Tz** são concordantes com a análise feita por espectroscopia FTIR, na qual observa-se uma banda de absorção de $\lambda_{\text{máx}}$ 280 nm, correspondente ao cromóforo difeniltetrazol, mais intensa no espectro do filme obtido pelo emprego da condição 4 (Figura 9).

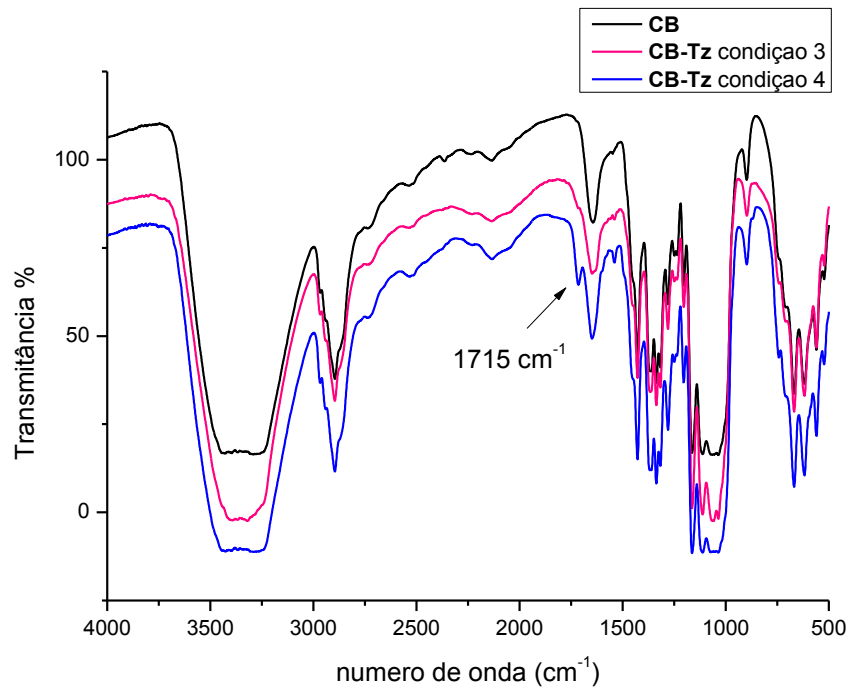


Figura 8. Espectros de FTIR sobrepostos: Filme nativo de celulose bacteriana (**CB**) e filmes funcionalizados com o grupo difeniltetrazol (**CB-Tz**).

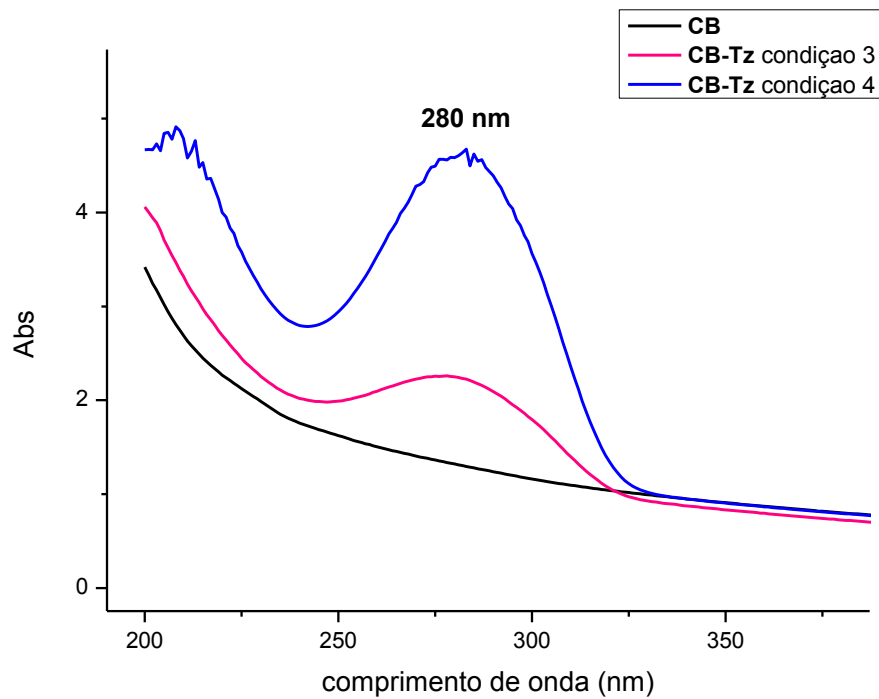


Figura 10. Espectros de UV-vis sobrepostos: Filme nativo de celulose bacteriana (**CB**) e filmes funcionalizados com o grupo difeniltetrazol (**CB-Tz**).

As modificações químicas dos filmes de celulose bacteriana apresentam uma dificuldade inerente, uma vez que a maior parte da superfície apresenta cristalinidade, em que as hidroxilas primárias estão associadas por ligações de hidrogênio estáveis. A funcionalização é passível de acontecer apenas no domínio amorfo, que ocorre em menor proporção. Ainda assim, a metodologia empregada, que visa a manutenção da forma do filme, requer que as reações ocorram no sistema heterogêneo, o que afeta a taxa de colisão dos grupos reativos. O uso da radiação ultrassônica mostrou-se importante para a funcionalização, pois propicia a ocorrência de choques mais numerosos e de maior energia. Em nosso trabalho anterior (BIRKHEUR et al., 2017) obtivemos sucesso no acoplamento por ligação amida de um manosídeo em filme de celulose bacteriana, somente conduzindo a reação em banho ultrassônico. Outros trabalhos relatam a importância do ultrassom também nas reações em sistemas homogêneos, como a de alquilação do indol, em que o rendimento aumentou de 19% para 90%. Na formação de quinona dimetídeo, a irradiação ultrassônica promoveu a limpeza da superfície do zinco metálico utilizado como catalisador na reação, facilitando o transporte dos reagentes sobre sua superfície (MARTINES et al., 2000).

A quantificação da extensão da funcionalização dos filmes **CB-Tz** foi feita pelo emprego de espectroscopia UV-vis, determinando-se a concentração molar do difeniltetrazol **2** em uma solução alcalina obtida pela hidrólise dos grupos éster. A curva analítica empregada como referência foi construída a partir de soluções alcalinas de **2** (pH 12, 10 a 40 μM) lidas a 278 nm ($\lambda_{\text{máx}}$ do grupo difeniltetrazol em meio alcalino, o gráfico e a equação estão apresentados no Anexo). Os valores de absorbância estão descritos na Tabela 3. O tratamento dos dados por regressão linear forneceu a equação $y = 0,0219x + 0,1515$, sendo x = concentração de **2** e y = absorbância. A linearidade correspondeu a $R^2 = 0,9924$

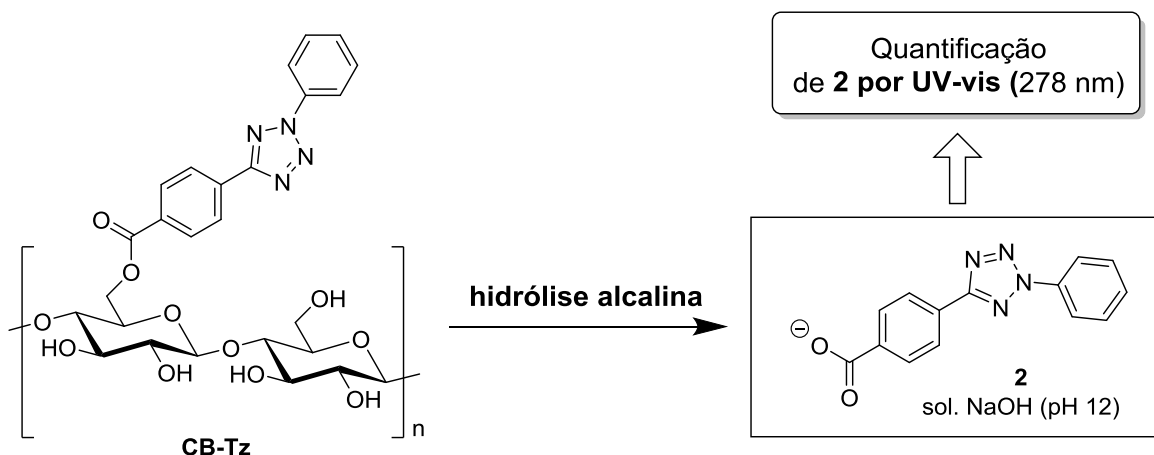
Tabela 3. Valores de absorvância em 278 nm de soluções diluídas do derivado difeniltetrazol **2** empregados na construção da curva analítica.

Solução de 2 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Absorvância
40	1,0491
35	0,8908
30	0,8089
25	0,6859
20	0,6212
15	0,4864
10	0,3574

Filmes **CB-Tz** foram hidrolisados em meio alcalino à temperatura ambiente (sol. de NaOH 0,1 mol.L⁻¹, pH 12). A partir dos valores de absorvância das soluções resultantes contendo **2**, descrito na Tabela 4 (em 278 nm), determinou-se a média dos valores de concentração molar, que foi de 73,67 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, correspondendo a 0,147 μmol de **2**, obtidos da hidrólise do filme **CB-Tz** contendo 22,8 μmol de D-glicose (0,64%). Este procedimento foi repetido para outros dois filmes **CB-Tz**, sendo obtidos os seguintes percentuais de funcionalização de 0,77% e 0,98%, estes valores indicam que a cada 1000 unidades de glicose, 6 a 10 unidades são funcionalizadas pelo derivado de difeniltetrazol **2**.

Tabela 4. Valores de absorvância em 278 nm de soluções obtidas da diluição da solução resultante da hidrólise alcalina dos ésteres de **CB-Tz**.

Solução	Absorvância
<i>B1</i>	0,7706
<i>B2</i>	0,7706
<i>B3</i>	0,8425



Esquema 5. Estratégia empregada para a quantificação da funcionalização da celulose bacteriana com o difeniltetrazol **2** por espectrofotometria UV-vis

A hidrólise extensiva dos ésteres de **CB-Tz** foi confirmada pela análise comparativa dos espectros de FTIR e UV-vis de um mesmo filme **CB-Tz** antes e depois do tratamento com a solução alcalina. No espectro FTIR do filme resultante, após secagem (**CB-Tz hidrolisado**), não se observa a banda em 1715 cm^{-1} do grupo éster, assim como, no espectro UV-vis observa-se a redução de intensidade, quase que completa, da banda em $\lambda_{\text{máx}} = 280\text{ nm}$ (Figuras 10 e 11).

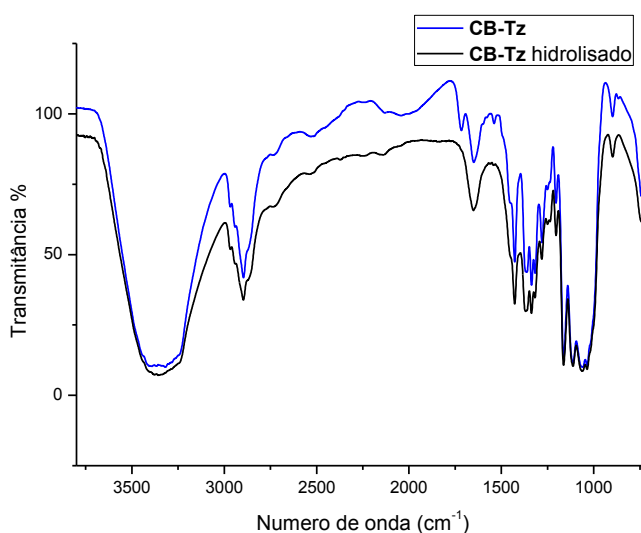


Figura 11. Espectros de FTIR sobrepostos antes e após à hidrólise alcalina do filme funcionalizado com o grupo difeniltetrazol (**CB-Tz**).

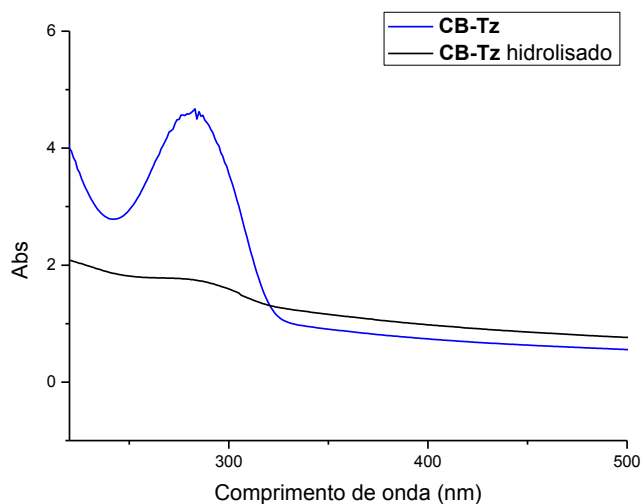


Figura 12. Espectros de UV-vis sobrepostos antes e após à hidrólise do filme funcionalizado com o grupo difeniltetrazol (**CB-Tz**).

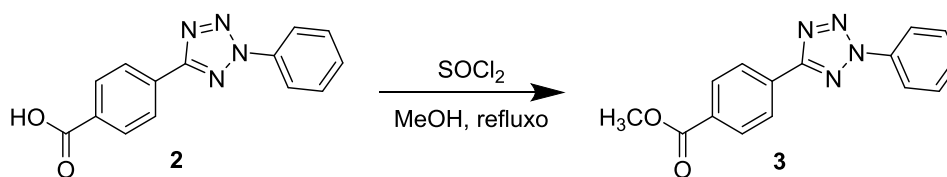
O acoplamento *fotoclick* tetrazol-tiol entre o derivado **2** e o aminoácido L-cisteína, em etanol, foi inicialmente empregado como sistema modelo para o estudo desta reação, com o intuito de se identificar a fonte luminosa mais adequada para o processo. Como fontes de radiação UV foram empregadas: uma lâmpada de vapor mercúrio (250 w) que emite radiação na região do UV e do visível e um led que emite em 309 nm (baixa intensidade). As fontes de radiação UV foram gentilmente cedidas pelo grupo do Professor Edson Laureto, do Departamento de Física da UEL.

A mistura reacional (contendo um equivalente molar de L-cisteína) irradiada pela lâmpada de mercúrio forneceu, em poucas horas, múltiplos produtos que não puderam ser isolados. Esta fonte luminosa além de apresentar uma ampla faixa de emissão, liberou calor durante o processo, o que levou ao aquecimento da mistura reacional. Estes fatores certamente favoreceram a baixa seletividade entre reações fotoquímicas. As reações sob irradiação pelo led de 309 nm mostraram-se bastante lentas. Pelo monitoramento por CCD de uma mistura reacional contendo um equivalente molar de L-cisteína, após quatro horas de exposição a esta radiação, à temperatura ambiente, não se observou consumo do material de partida (derivado **2**). À esta mistura, foram acrescentados outros cinco equivalentes molares de L-cisteína (um equivalente a cada quatro horas). O andamento de reação foi igualmente monitorado por CCD. Ao final de 24 horas de exposição ao led de 309 nm, não se observou o consumo completo do material de partida. Ainda assim, um produto majoritariamente formado foi isolado por cromatografia em coluna (item

3.8.1 da Parte Experimental). Este produto forneceu espectros de RMN ^1H , ^{13}C e HSQC (espectros em Anexo, Figuras 25-27), todavia, sua estrutura não foi completamente determinada. Em seu espectro de RMN ^1H foram observados os sinais de cinco hidrogênios aromáticos em δ 8,14, 8,03, 7,35, 7,22, 7,00, correspondentes ao grupo benzóico e fenila provenientes do precursor **2**. Além destes, foi observado outro sinal em δ 8,19, respectivo a um hidrogênio possivelmente ligado a nitrogênio, de acordo com o espectro de RMN HSQC, no qual não se observa uma correlação correspondente com qualquer frequência na região de ^{13}C . De toda forma, pela análise destes espectros, concluiu-se que o produto isolado não resultou do acoplamento entre o grupo tetrazol de **2**, e a sulfidril da L-cisteína, uma vez que os sinais correspondentes aos grupos metileno e metino do aminoácido não foram observados.

A partir deste resultado, resolvemos repetir o estudo da reação, para avaliar a eficiência de diferentes fontes de UV, para a promoção do acoplamento fotoquímico tetrazol-tiol, desta vez empregando o mesmo sistema utilizado por Feng e colaboradores (2015) para estabelecer a metodologia deste processo: o derivado éster metílico de **2** (o difeniltetrazol **3**) e 2-mercaptoetanol.

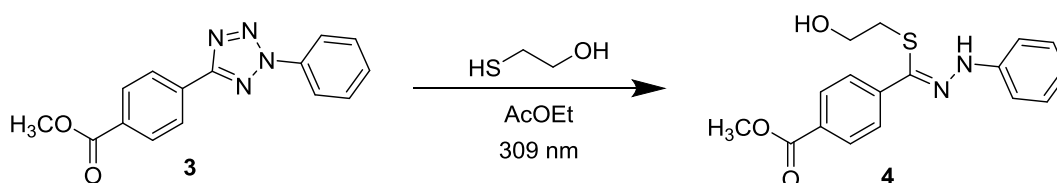
Para a síntese do derivado **3**, utilizou-se a metodologia descrita por Denmark e colaboradores (2007). A esterificação de **2** ocorreu por meio da sua reação com cloreto de tionila em metanol sob refluxo, tendo sido obtido 85% de rendimento (Esquema 6).



Esquema 6. Síntese do derivado éster difeniltetrazol **3** a partir de **2**

O éster **3** foi caracterizado por RMN ^1H , sendo os dados obtidos compatíveis com os descritos na literatura (FENG et al., 2015). Em seu espectro foi evidenciado o simpleto em δ 3,96, respectivo aos hidrogênios da metoxila e os quatro sinais dos hidrogênios aromáticos em δ 8,34, 8,20, 7,59, 7,52 (estando dois sobrepostos em δ 8,20) (Espectro em Anexo, Figura 22).

Nas tentativas de acoplamento de **3** e 2-mercaptoetanol, foram empregadas, alternativamente, duas fontes de radiação UV: led de 309 nm e lâmpada de xenônio com filtro em 312 nm. Os solventes estudados foram etanol e acetato de etila. A utilização com da lâmpada de xenônio não propiciou a ocorrência da reação. O material de partida (derivado **3**) não foi consumido (de acordo com monitoramento por CCD). Por outro lado, as condições em que se empregaram o led de 309 nm como fonte de radiação, conduziram ao produto de acoplamento **4**. Na condição em que se utilizou acetato de etila como solvente, este produto foi obtido com 42% de rendimento, ainda que material de partida não tenha sido consumido por completo mesmo após 7 horas e tendo sido adicionados até 15 equivalentes molares de 2-mercaptoetanol. Este resultado pode estar associado à acomodação do led mais próximo ao meio reacional, o que reduziu a dispersão da luz. A lâmpada de xenônio constitui de um aparato maior, o que limitou sua aproximação ao meio reacional.



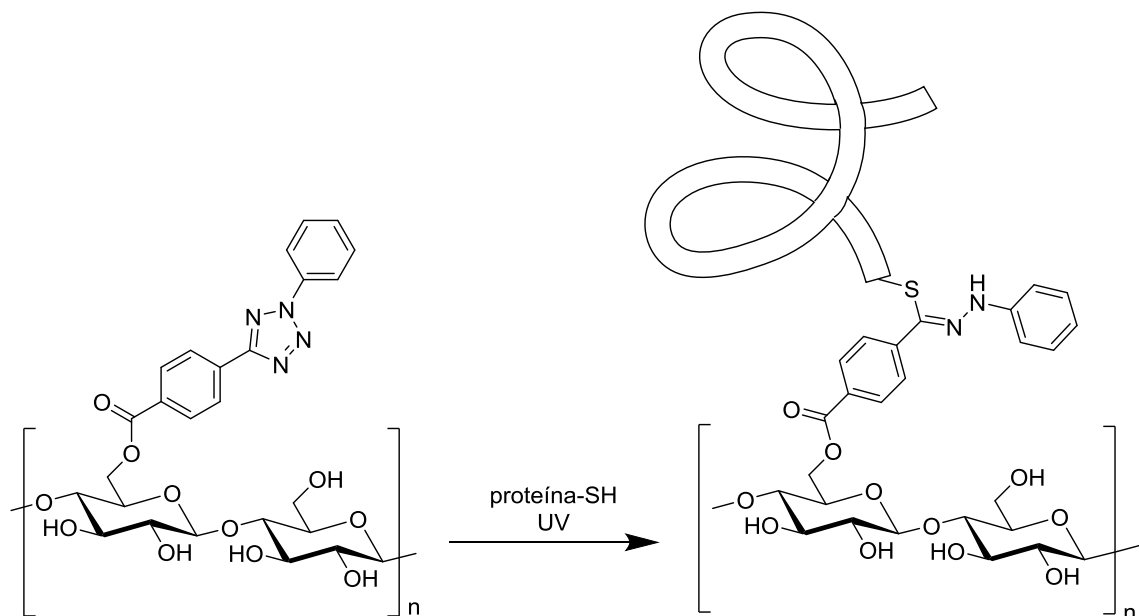
Esquema 7. Acoplamento *fotoclick* tetrazol-tiol entre **3** e o mercaptoetanol

O produto de acoplamento **4**, foi caracterizado por RMN ^1H . O espectro apresentou o sinal do hidrogênio do grupo amino em δ 9,20 e o sinal dos hidrogênios do grupo metoxila em δ 3,93. Os dois sinais referentes aos grupos metilenos foram observados em δ 3,69 e 2,90 e os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ 8,04, 7,32, 7,23 (o espectro está em Anexo, Figura 23).

Diante do resultado obtido para o sistema modelo (**3**/2-mercaptoetanol), para as reações *fotoclick* sobre a superfície de **CB-Tz**, empregou-se o led de 309 nm como fonte luminosa (Esquema 8). A proteína escolhida foi a albumina do soro bovino (BSA), visto que esta apresenta uma sulfidril livre em região periférica (DEMIAN et al., 2014).

A tentativa de imobilização de BSA via reação *fotoclick* em **CB-Tz** foi conduzida em tampão PBS (meio aquoso) e à temperatura ambiente. Dois sistemas contendo **CB-Tz** e BSA, em tampão PBS, foram mantidos durante o mesmo tempo

(7 horas), sendo que apenas um deles foi irradiado pelo led 309 nm. O outro sistema representou um controle negativo. Os filmes recuperados foram denominados **CB-Tz-BSA** e **CB-Tz controle**, respectivamente)



Esquema 8. Acoplamento de proteína via reação fotoclick em CB-Tz

Os filmes **CB-Tz controle** e **CB-Tz-BSA** foram caracterizados por FTIR e UV-vis. Não foram observadas diferenças entre os espectros FTIR destes filmes. Portanto, as informações geradas pelo espectro FTIR do filme liofilizado de **CB-Tz-BSA** não asseguram que ocorreu a imobilização efetiva da proteína BSA. Os grupos amida da proteína apresentam uma banda forte de estiramento da ligação C=O, na faixa de 1680 a 1630 cm^{-1} . Entretanto, ainda que tenha ocorrido a imobilização da proteína estas bandas podem sobrepor a banda de água do filme de celulose que aparece também nessa região, não evidenciando a ocorrência da conjugação (Figura 12).

Por outro lado, no espectro UV-vis de **CB-Tz-BSA** observa-se uma banda de absorção de $\lambda_{\text{máx}}$ 280 nm, referente ao cromóforo difeniltetrazol, com muito menor intensidade do que em **CB-Tz controle**, e também, uma banda em $\lambda_{\text{máx}}$ 365 nm, ausente no espectro do filme precursor (Figura 13). Esta banda foi observada no espectro de UV-vis do produto de acoplamento **4** obtido por Feng e colaboradores (2015).

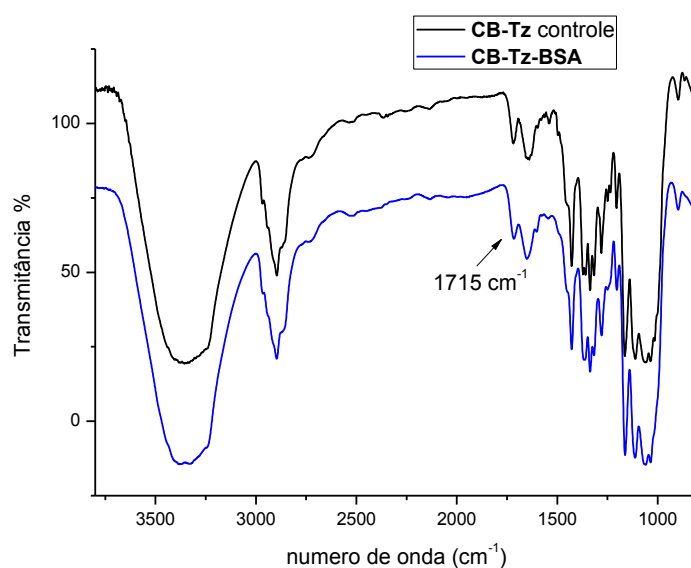


Figura 13. Espectros de FTIR sobrepostos dos filmes CB-Tz controle e CB-Tz-BSA

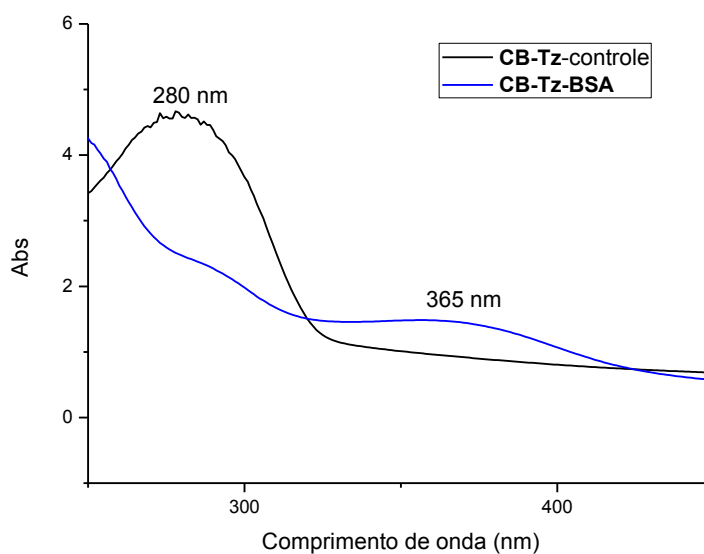
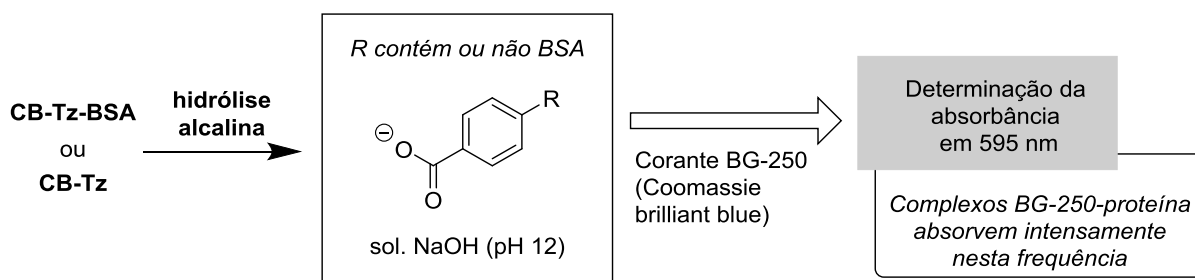


Figura 14. Espectros de UV-vis sobrepostos dos filmes **CB-Tz** controle e **CB-Tz-BSA**.

No sentido de se avaliar se as modificações químicas que resultaram no filme **CB-Tz-BSA** tratam-se do acoplamento de BSA, empregamos um método colorimétrico de identificação de proteínas na solução resultante da hidrólise alcalina dos ésteres de **CB-Tz-BSA** (Esquema 9). O mesmo procedimento foi aplicado para o filme **CB-Tz**, para fins de comparação. Este método se baseou na determinação das absorvâncias das soluções resultantes de hidrólise alcalina acrescidas do

corante BG-250 (Coomassie brilliant blue) (Figura 14). As interações não covalentes de BG-250 com as cadeias laterais básicas e anéis aromáticos das proteínas fornecem um complexo que absorve intensamente em 595 nm. Este é o princípio de uma técnica bastante sensível classicamente empregada na quantificação de proteínas, denominada método de Bradford (Esquema 9) (HAMMOND; KRUGER, 1988; ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).



Esquema 9. Estratégia empregada para a quantificação da funcionalização da celulose bacteriana com o difeniltetrazol **2** por espectrofotometria UV-vis

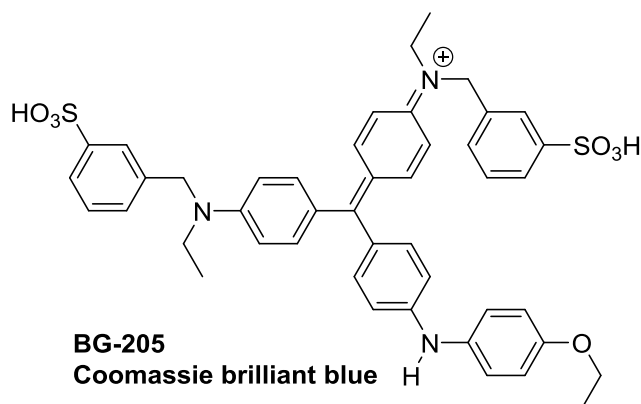


Figura 15. Estrutura química do corante BG-250 (Coomassie brilliant blue).

As hidrólises alcalinas dos filmes **CB-Tz** e **CB-Tz-BSA** foram feitas à temperatura ambiente pelo tratamento com solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹. A ocorrência extensiva da hidrólise dos grupos éster foi confirmada pela análise comparativa dos espectros FTIR e UV-vis destes filmes, antes e após ao tratamento com a solução alcalina (Figura 15 e 16), tendo sido observada a ausência da banda em 1715 cm⁻¹, característica do grupo éster, nos espectros de FTIR dos filmes **CB-**

Tz hidrolisado e CB-Tz-BSA hidrolisado. No espectro de UV-vis de **CB-Tz hidrolisado** observou-se a diminuição da intensidade da banda de absorção em 280 nm do cromóforo do difeniltetrazol, enquanto que, no espectro de **CB-Tz-BSA hidrolisado** não se observou a banda em 365 nm, presente no espectro de **CB-Tz-BSA**.

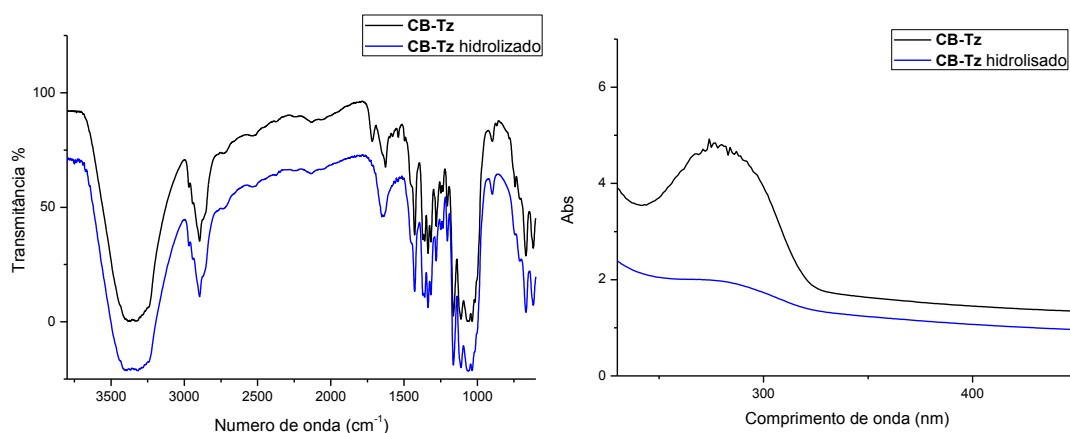


Figura 16. Espectro FTIR e UV-vis sobrepostos dos filmes **CB-Tz** e **CB-Tz hidrolisado**

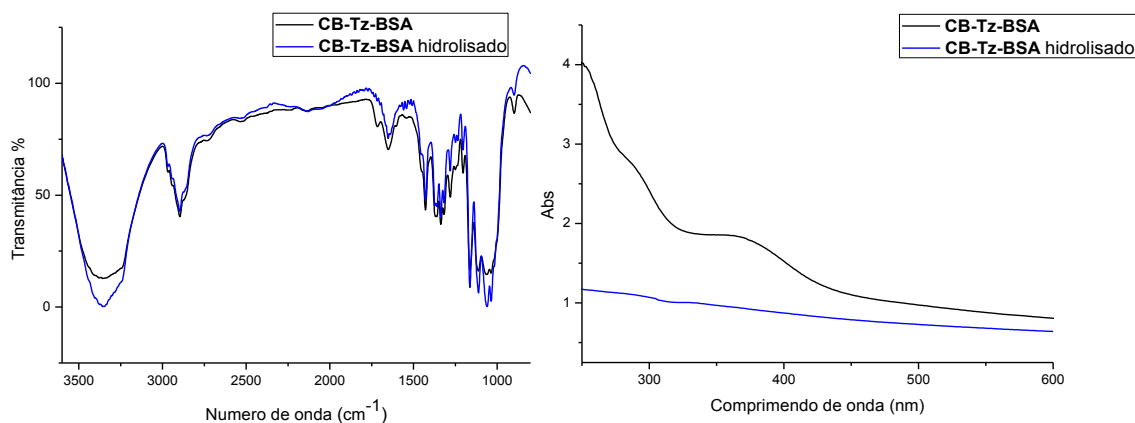


Figura 17. Espectro FTIR e UV-vis sobrepostos dos filmes **CB-Tz-BSA** e **CB-Tz-BSA hidrolisado**.

As soluções resultantes da hidrólise alcalina de **CB-Tz** e **CB-Tz-BSA**, foram acrescidas de uma solução contendo o corante BG-250 e analisadas por espectroscopia visível (595 nm). Para ambas as amostras, as absorbâncias determinadas foram muito baixas, com valores muito próximos entre si (0,0140 para a solução resultante da hidrólise de **CB-Tz** e 0,0159 para a de **CB-Tz-BSA**).

Indesejavelmente, estes resultados apontam para falta de êxito no acoplamento *fotoclick* tetrazol-tiol para conjugação de BSA sobre a superfície do filme de celulose bacteriana funcionalizado com derivado de difeniltetrazol. Caso tenha ocorrido imobilização protéica sobre a superfície do CB-Tz, isto aconteceu em extensão tão pequena, que não pôde ser identificado.

Finalmente, na tentativa de se compreender o perfil do espectro de UV-vis de CB-Tz-BSA, realizamos um segundo ensaio de controle negativo para reação de acoplamento *fotoclick* tetrazol-tiol. Um filme **CB-Tz**, em tampão PBS, foi irradiado pelo led de 309 nm por sete horas, na ausência de BSA. O filme recuperado foi denominado **CB-Tz-UV** e caracterizado por UV-vis. Seu espectro apresentou o mesmo perfil que **CB-Tz-BSA** (Figura 17). Isto demonstra que a degradação fotoquímica do grupo difeniltetrazol possa ter ocorrido, sem que tenha sido sucedido pela adição da sulfidril proteica.

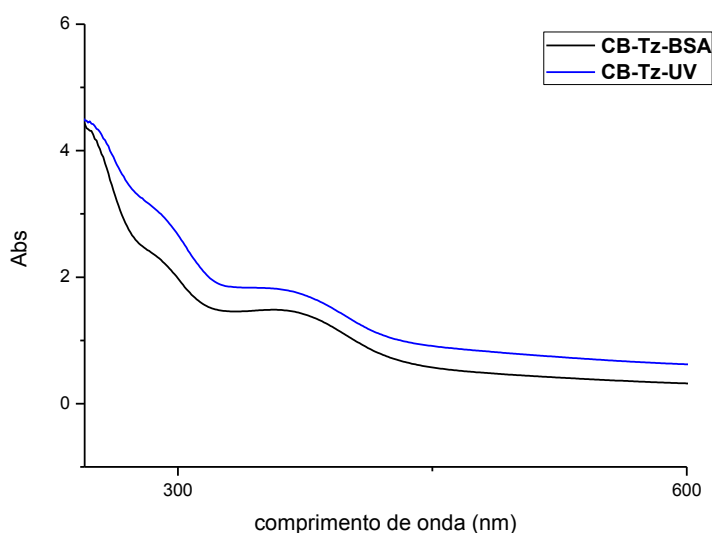


Figura 18. Espectro UV-vis sobreposto dos filmes **CB-Tz-BSA** com **CB-Tz-UV**.

Possivelmente, um dos fatores que desfavoreceu a imobilização da proteína BSA foi a baixa funcionalização do filme de celulose bacteriana pelo método empregado. Diante disto, uma perspectiva futura para este trabalho trata-se da otimização do processo de preparação de **CB-Tz**. Alternativamente, podem ser estudados os acoplamentos fotoquímicos de outros nucleófilos proteicos (grupos amina) ou de nucleófilos incorporados em proteínas quimicamente modificadas

(como o grupo maleimida) em **CB-Tz**, com vistas a se adquirir um método eficiente para a imobilização covalente de proteínas sobre filmes de celulose.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho resultou na obtenção de filme de celulose bacteriana funcionalizados com o grupo difeniltetrazol. Estes filmes podem ser considerados potenciais plataformas para imobilização covalente de proteínas. A utilização de banho ultrassônico se mostrou importante na promoção da reação de esterificação da superfície do filme de celulose pelo derivado carboxílico contendo o grupo difeniltetrazol. Entretanto, este processo ainda carece de otimização, tendo em vista que é desejável a funcionalização mais extensiva dos filmes de celulose visando-se a imobilização proteica. De toda forma, para fins de triagem, amostras destes filmes funcionalizados foram enviados para estudo de seu potencial como indutores de cicatrização, por ensaio de crescimento de fibroblastos. Estes ensaios serão realizados pela equipe da Professora Denise Endringer da Universidade de Vila Velha, no Espírito Santo.

Estudos em sistemas modelos permitiram identificar que o led de 309 nm possibilita a ocorrência do acoplamento fotoquímico tetrazol-tiol. Entretanto, mesmo que tenha sido empregada a mesma fonte luminosa, esta reação não ocorreu sobre o filme de celulose funcionalizado e a proteína BSA, não tendo sido realizado a imobilização de proteica em suporte polissacarídico.

Ainda assim, mantemos como perspectiva futura, pretende-se realizar o estudo de acoplamentos fotoquímicos envolvendo outros nucleófilo presentes naturalmente nas estruturas proteicas ou incorporados por modificação química.

REFERÊNCIAS

- BARUD, H. D. S. et al. Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- BIRKHEUR, S. et al. Enhancement of fibroblast growing on the mannosylated surface of cellulose membranes. **Materials Science & Engineering C**, v. 77, p. 672–679, 2017.
- DEMIAN, W. L. L. et al. Direct targeted glycation of the free sulfhydryl group of cysteine residue (Cys-34) of BSA. Mapping of the glycation sites of the anti-tumor Thomsen-Friedenreich neoglycoconjugate vaccine prepared by Michael addition reaction. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, n. 12, p. 1223–1233, 2014.
- DENMARK, S. E.; REGENS, C. S.; KOBAYASHI, T. Total Synthesis of Papulacandin D Total Synthesis of Papulacandin D. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. February, p. 2774–2776, 2007.
- ERHARDT, F. A.; JÖRDENING, H. J. Immobilization of dextranase from *Chaetomium erraticum*. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 4, p. 440–447, 2007.
- FAN, Y. et al. In situ forming hydrogels via catalyst-free and bioorthogonal “tetrazole-Alkene” photo-click chemistry. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2814–2821, 2013.
- FENG, W. et al. UV-Induced Tetrazole-Thiol Reaction for Polymer Conjugation and Surface Functionalization. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 30, p. 8732–8735, 2015.
- FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–1442, 2013.
- GOELZER, F. D. E. et al. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 546–551, 2009.
- HAMMOND, J. B.; KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantitation. **Methods in Molecular Biology**, v. 3, p. 25–32, 1988.
- HEIN, C.; LIU, X.-M.; WANG, D. Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 10, p. 2216–2230, 2009.
- HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345–352, 1954.
- HILTEBRANDT, K. et al. λ -Orthogonal Pericyclic Macromolecular Photoligation. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 9, p. 2838–2843, 2015.
- ISOBE, N. et al. Immobilization of protein on cellulose hydrogel. **Cellulose**, v. 18, n.

5, p. 1251–1256, 2011.

ITO, Y. Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering. **Soft Matter**, v. 4, n. 1, p. 46–56, 2008.

ito1976 outro. [s.d.].

JAGANATHAN, H. et al. Design and in vitro evaluation of layer by layer siRNA nanovectors targeting breast tumor initiating cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. **Adsorption**, v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 2014.

LI, J. et al. A supramolecular hydrogel as a carrier to deliver microRNA into the encapsulated cells. **Chemical Communications**, v. 50, n. 28, p. 3722, 2014.

LIM, R. K. V; LIN, Q. Photoinducible bioorthogonal chemistry: A spatiotemporally controllable tool to visualize and perturb proteins in live cells. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 9, p. 828–830, 2011.

LIN, C. C.; RAZA, A.; SHIH, H. PEG hydrogels formed by thiol-ene photo-click chemistry and their effect on the formation and recovery of insulin-secreting cell spheroids. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9685–9695, 2011.

LIN, S. P. et al. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 20, n. 5, p. 2191–2219, 2013.

LIU, Y.; CHEN, J. Y. Enzyme immobilization on cellulose matrixes. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 31, n. 6, p. 553–567, 2016.

MARTINES, M. A. U. et al. O Efeito Do Ultra-Som Em Reações Químicas. **Quimica Nova**, v. 23, n. 2, p. 251–256, 2000.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature materials**, v. 8, n. 7, p. 543–557, 2009.

NORBERG, O. et al. Photo-click immobilization of carbohydrates on polymeric surfaces - A quick method to functionalize surfaces for biomolecular recognition studies. **Bioconjugate Chemistry**, v. 20, n. 12, p. 2364–2370, 2009.

REN, X.; OTT, H. C. On the road to bioartificial organs. **Pflugers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 466, n. 10, p. 1847–1857, 2014.

RODRIGUEZ-EMMENEGGER, C. et al. Controlled Cell Adhesion on Poly(dopamine) Interfaces Photopatterned with Non-Fouling Brushes. **Advanced Materials**, v. 25, n. 42, p. 6123–6127, 2013.

SASKA, S. et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone

regeneration. **International Journal of Biomaterials**, v. 2011, 2011.

SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2005.

SINGH, R. K. et al. From Protein Engineering to Immobilization : Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 1232–1277, 2013.

SONG, W. et al. A photoinducible 1,3-dipolar cycloaddition reaction for rapid, selective modification of tetrazole-containing proteins. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 47, n. 15, p. 2832–2835, 2008.

TRAN, D. N.; BALKUS, K. J. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. **ACS Catalysis**, v. 1, n. 8, p. 956–968, 2011.

VONHÖREN, B. et al. Photochemical Microcontact Printing by Tetrazole Chemistry. **Langmuir**, v. 32, n. 9, p. 2277–2282, 2016.

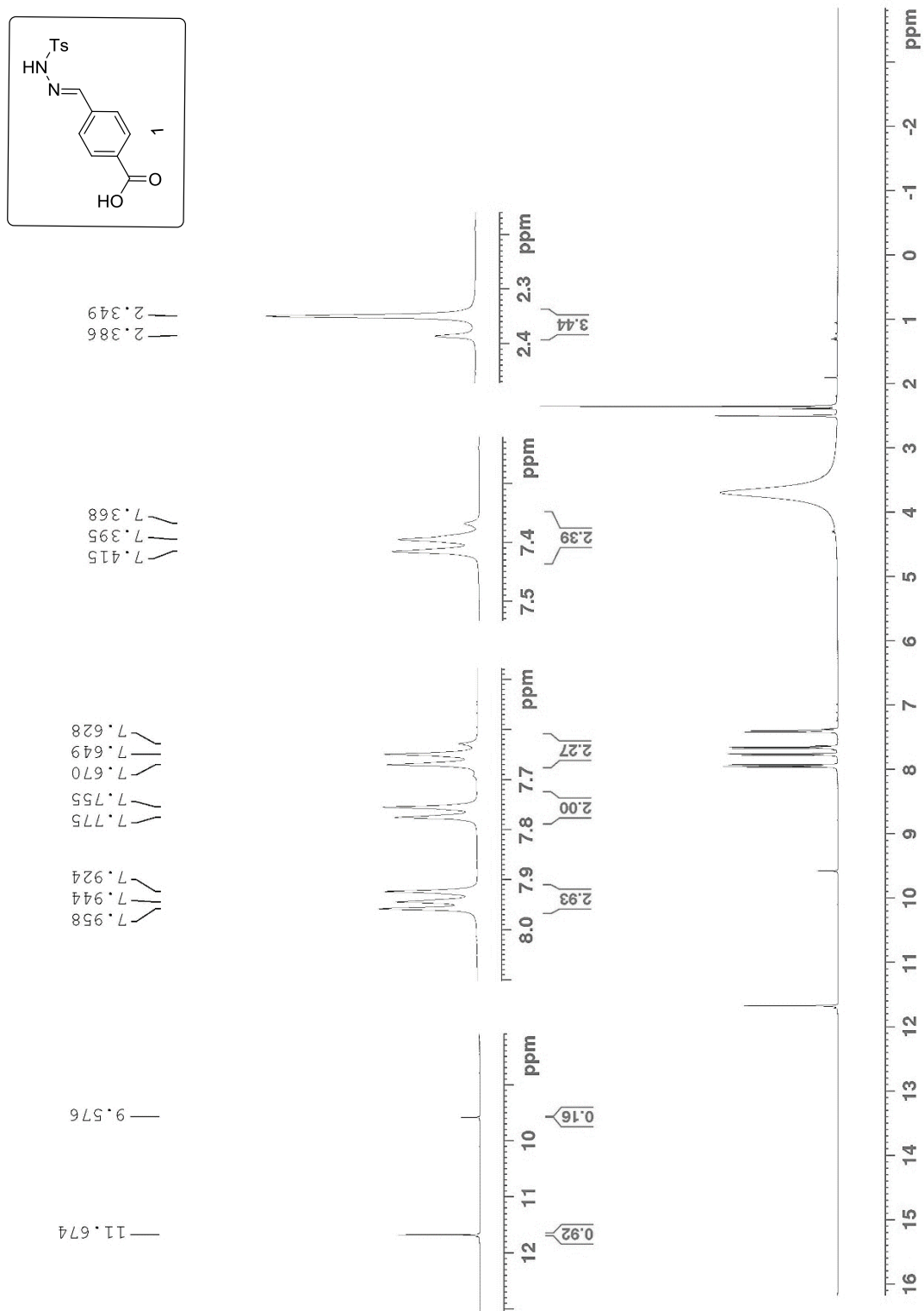
WEN, X. et al. Immobilization of collagen peptide on dialdehyde bacterial cellulose nanofibers via covalent bonds for tissue engineering and regeneration. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 4623–4637, 2015.

WILLIAMS, D. B. G.; LAWTON, M. Drying of organic solvents: Quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 24, p. 8351–8354, 2010.

YE, X. et al. The Effect of Heparin-VEGF Multilayer on the Biocompatibility of Decellularized Aortic Valve with Platelet and Endothelial Progenitor Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ANEXO

Figura 19. Espectro de RMN ^1H do produto tosilidrazono 1

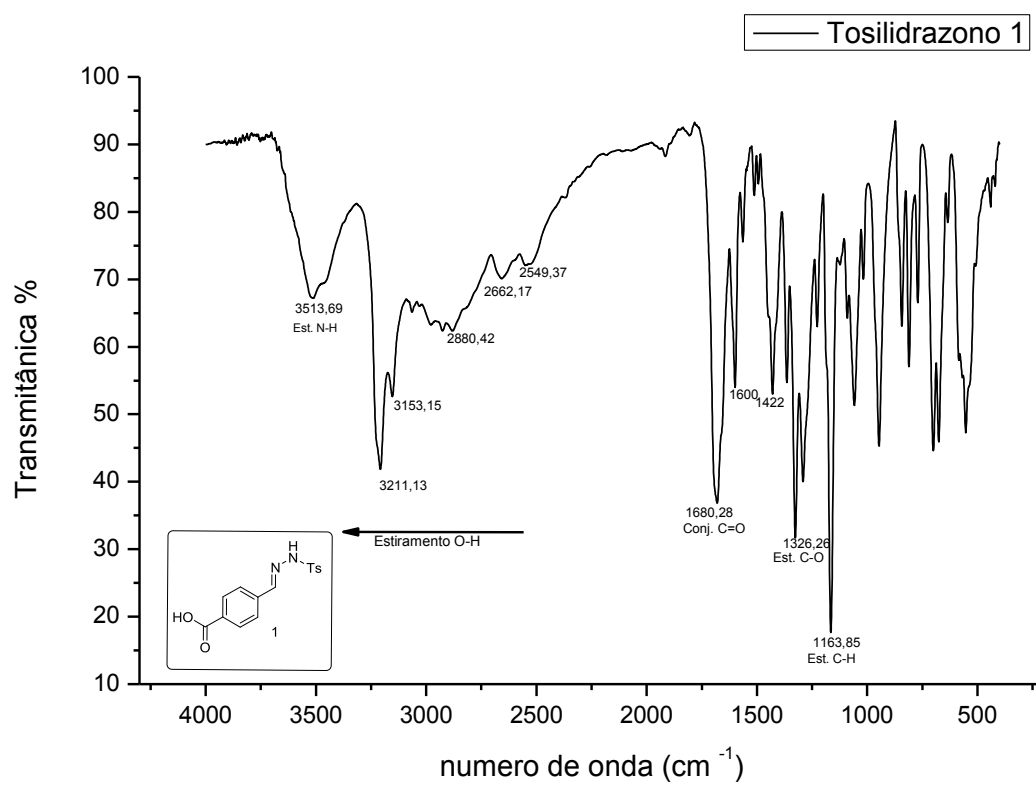


Figura 20. Espectro de FTIR do produto tosilidrazono 1

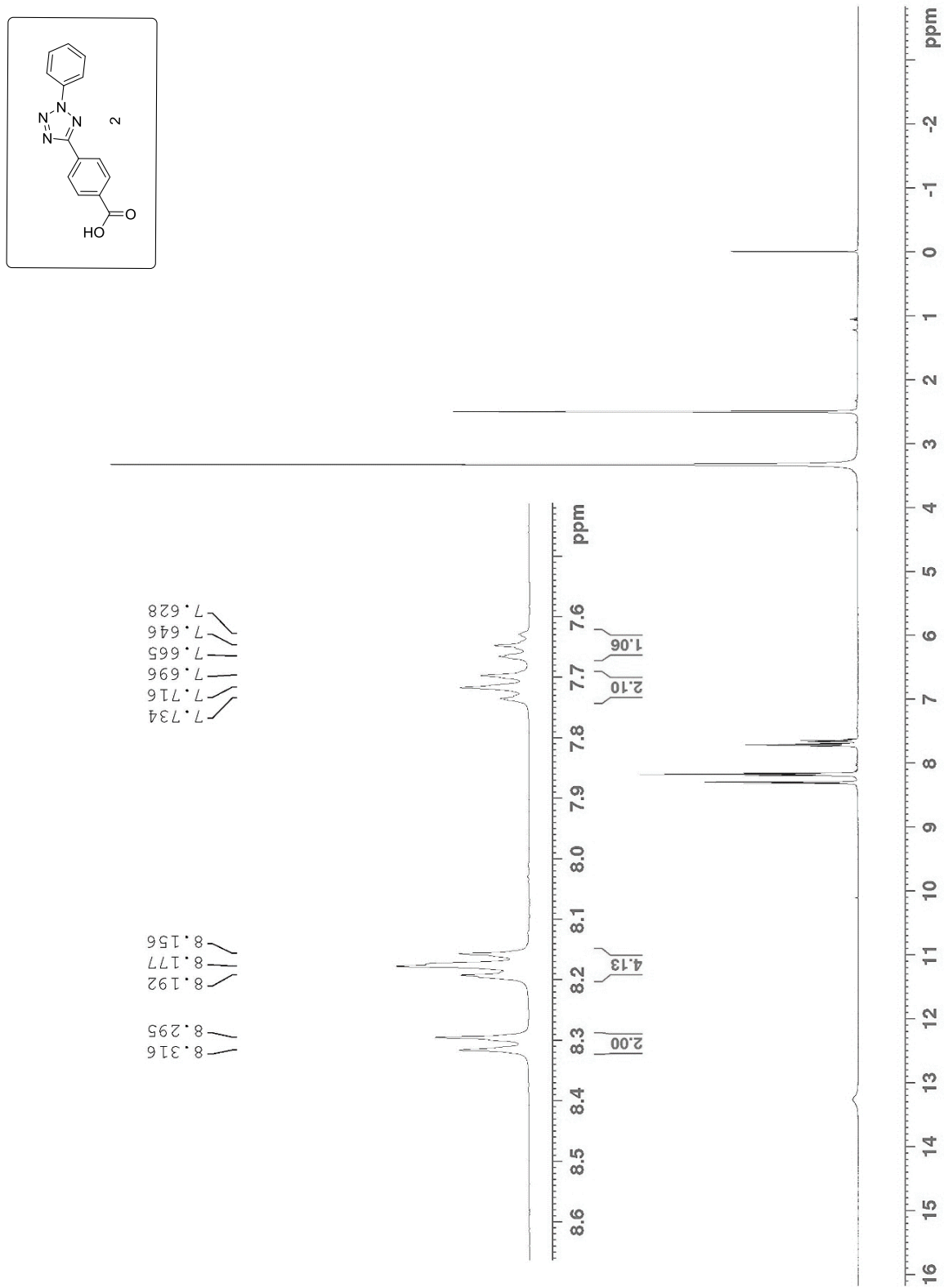


Figura 21. Espectro de RMN ^1H do produto difeniltetrazol 2

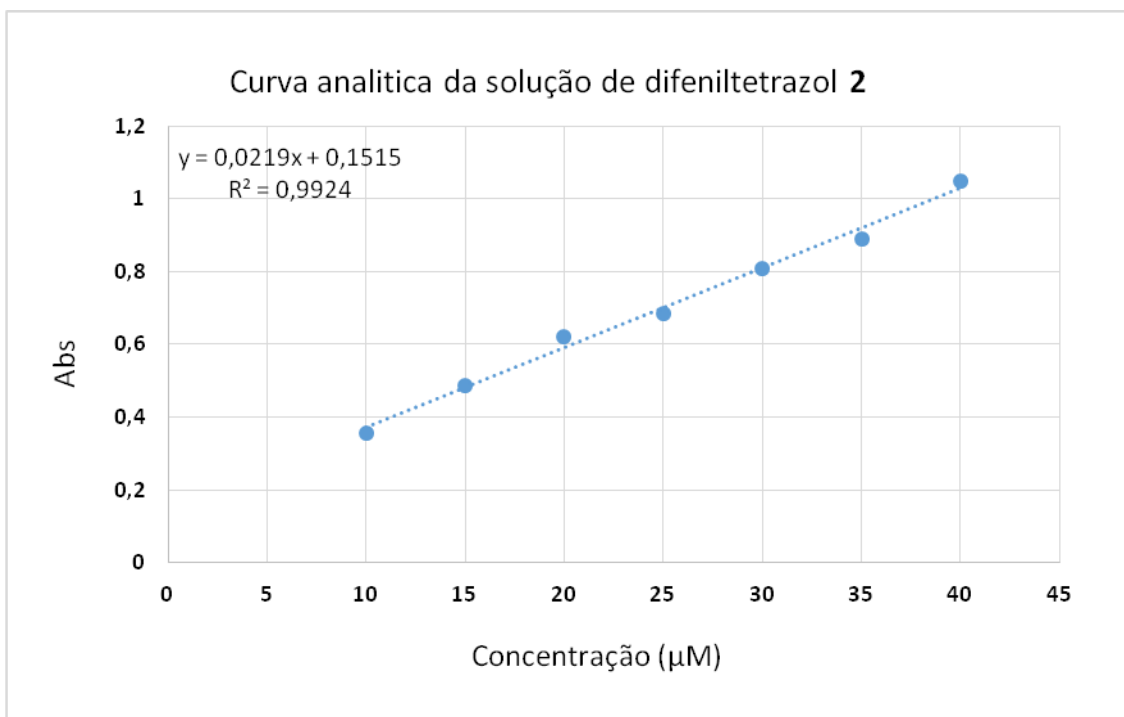


Figura 22. Curva analítica da solução difeniltetrazol 2

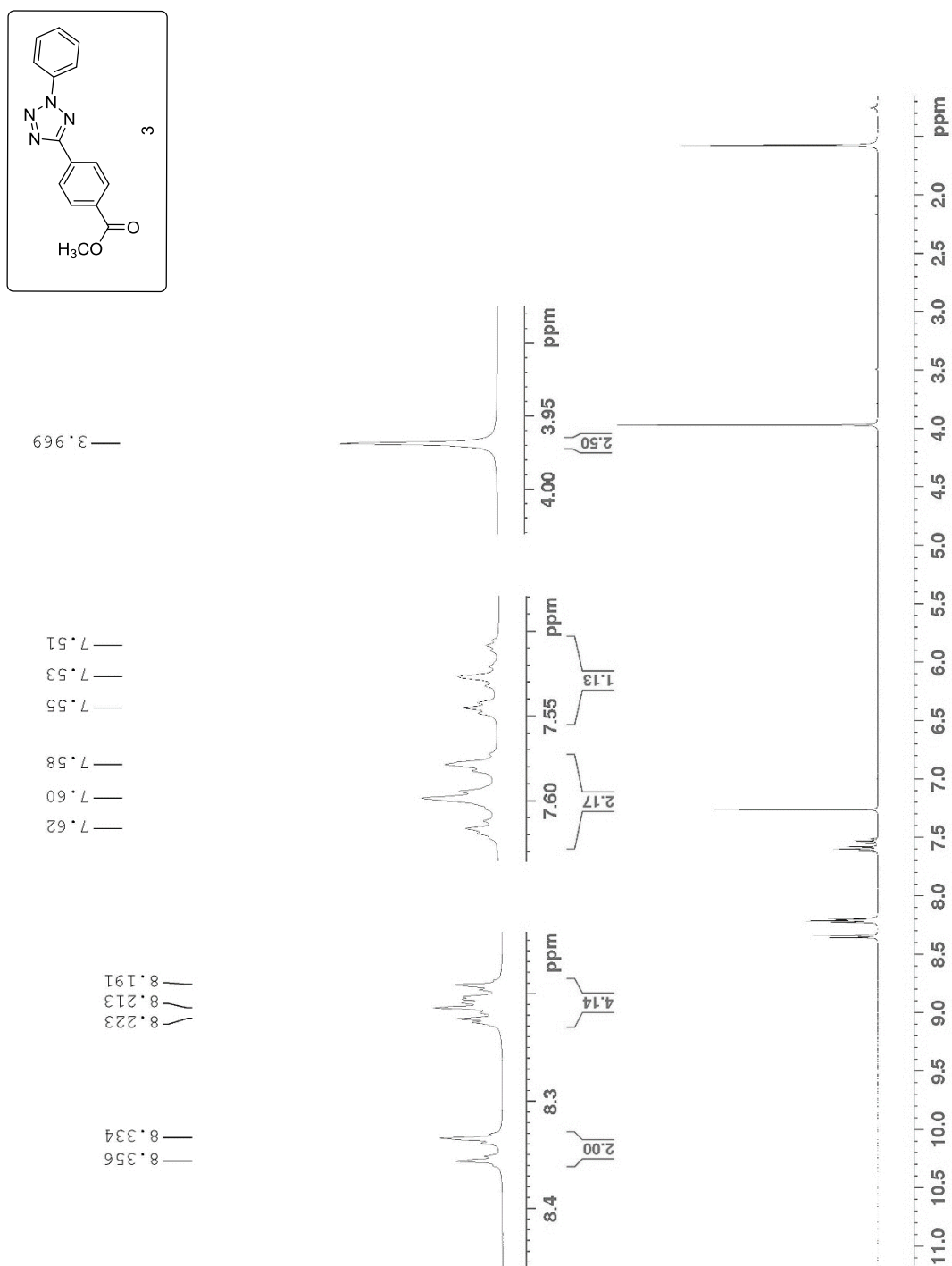


Figura 23. Espectro de RMN ^1H do difeniltetrazol 3

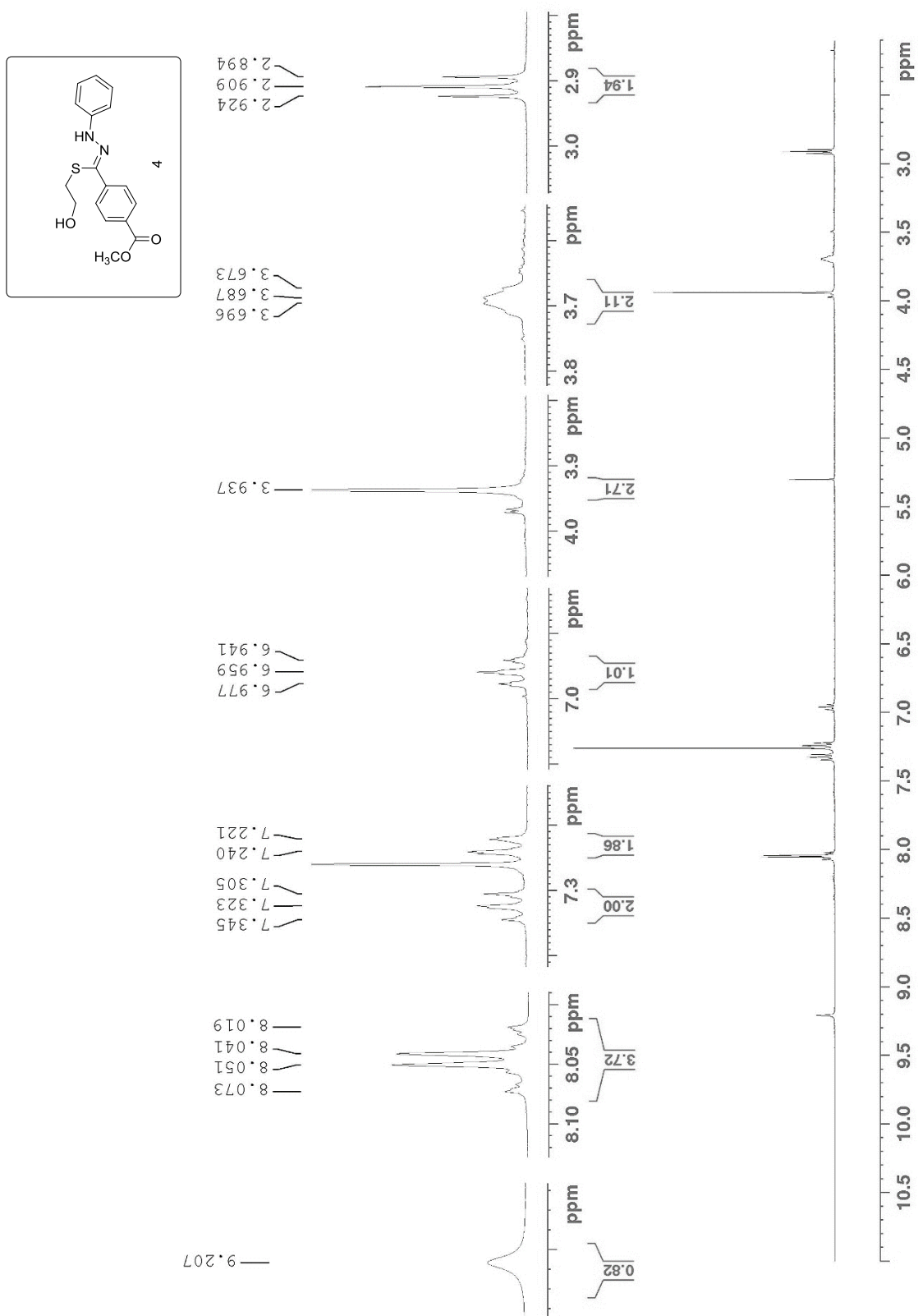


Figura 24. Espectro de RMN ^1H do produto de acomplemanto tetrazol-ylol 4

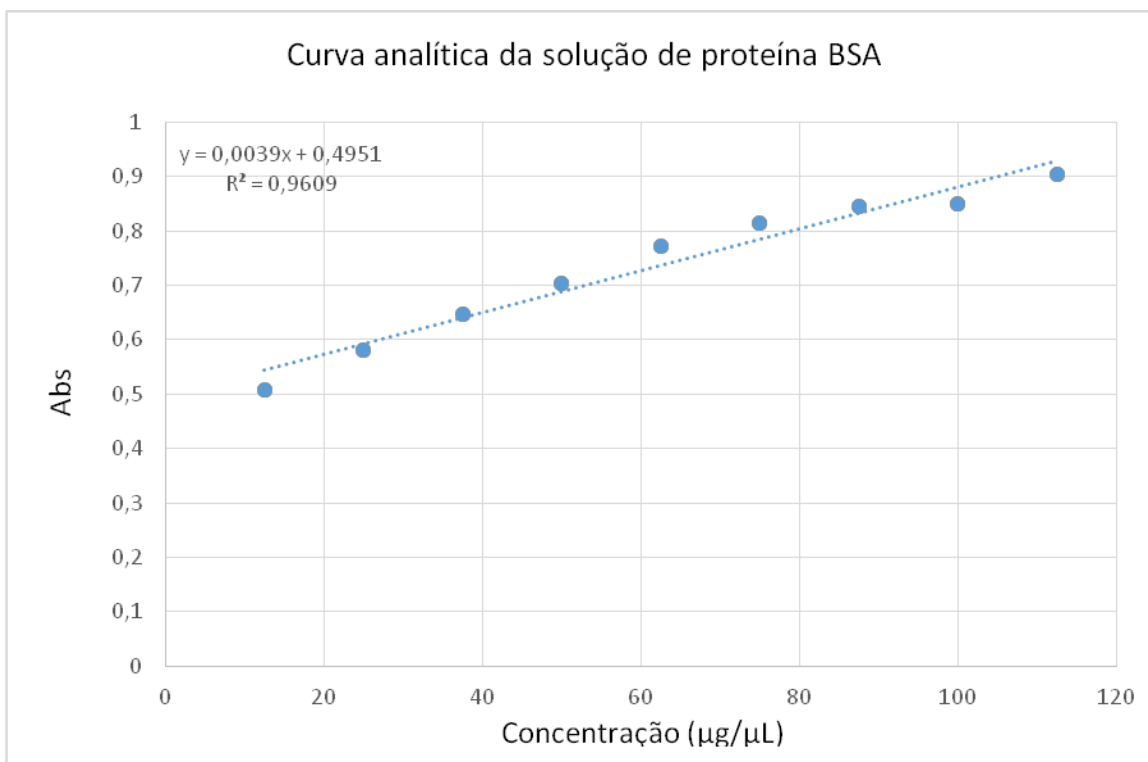


Figura 25. Curva analítica da solução de proteína BSA.

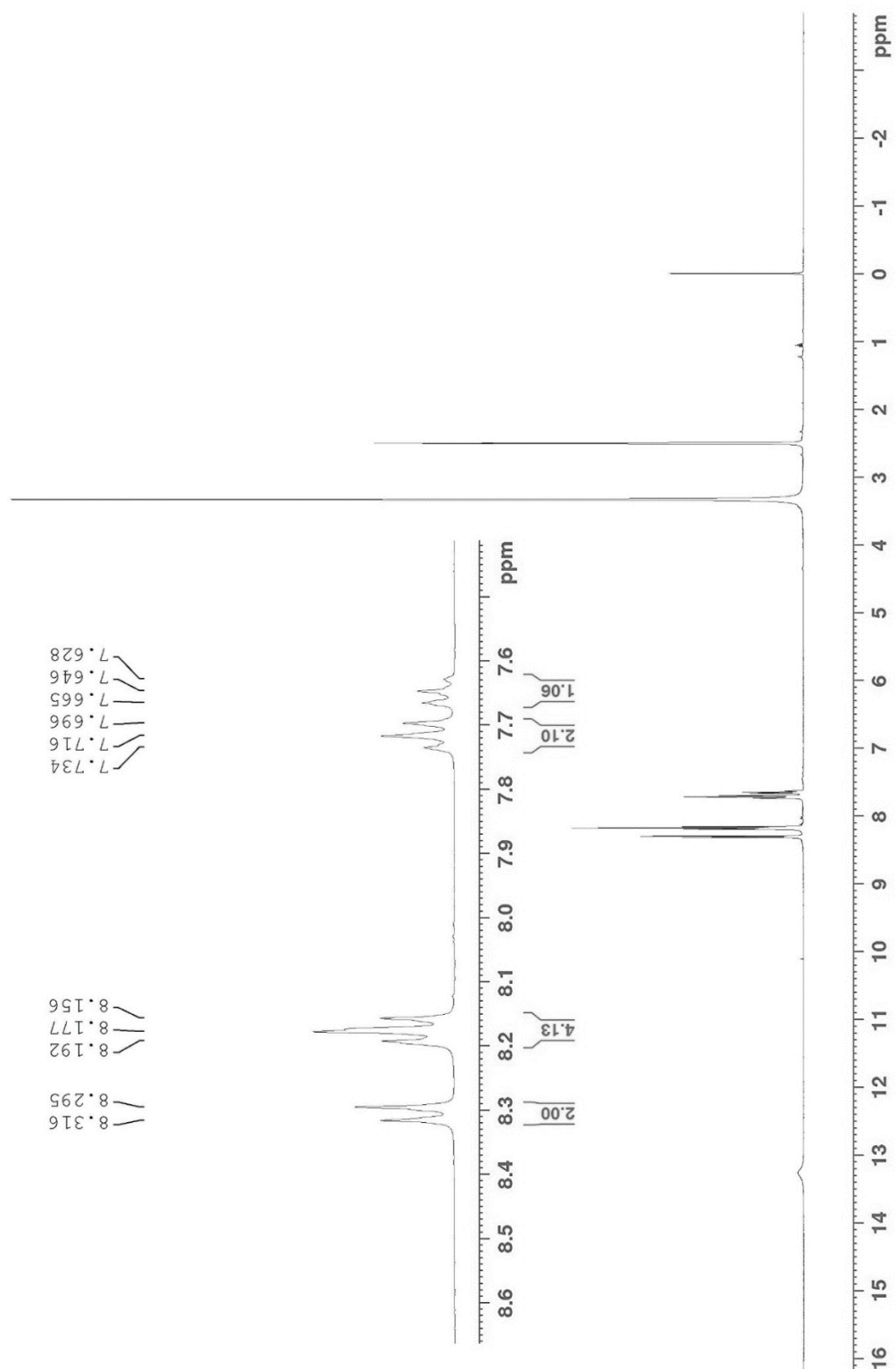


Figura 26. Espectro de RMN ^1H do produto de reação do derivado difeniltetrazol **2** com L-cisteína (led 309 nm).

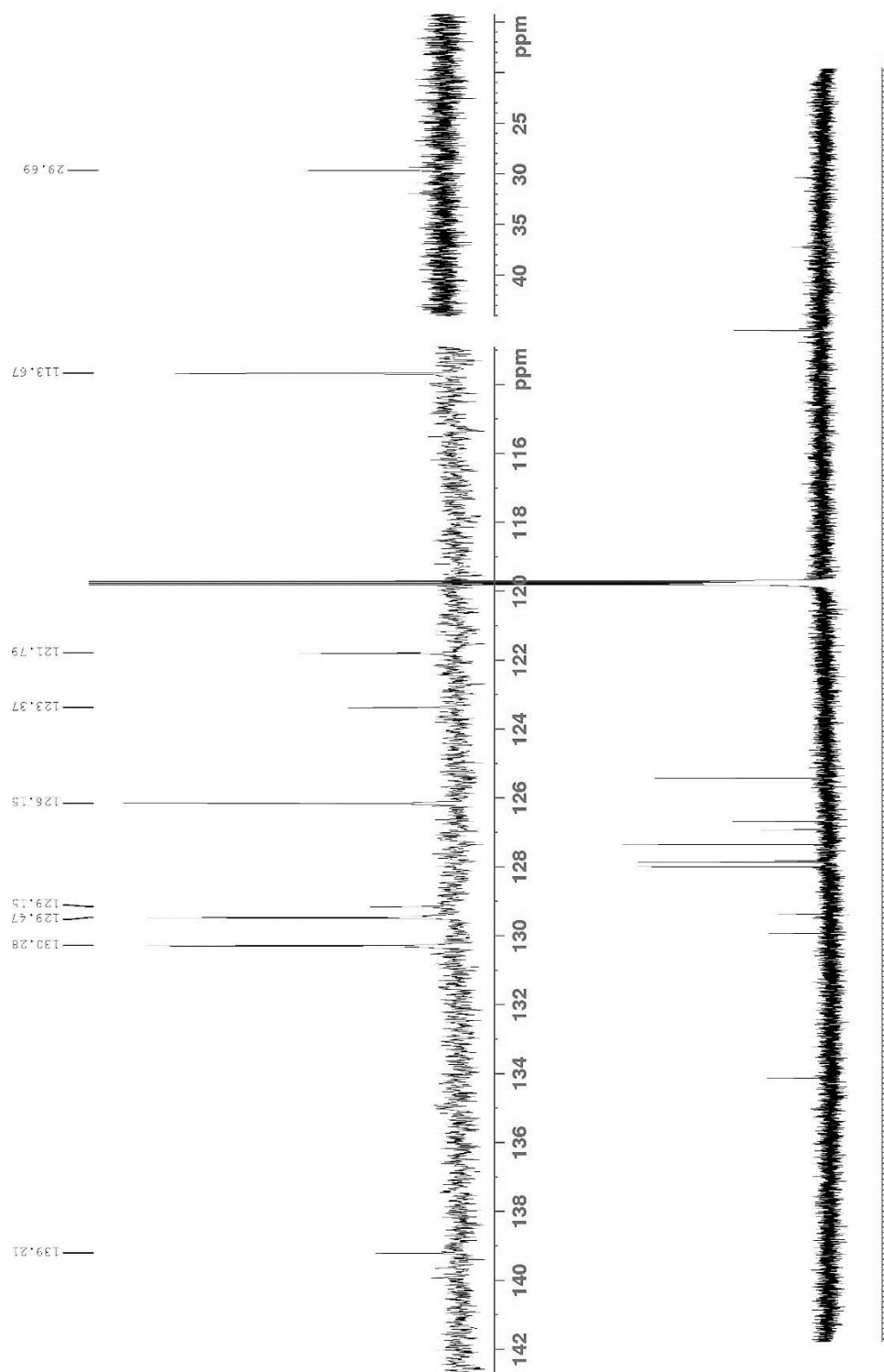


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C do produto de reação do derivado difeniltetrazol **2** com L-cisteína (led 309 nm).

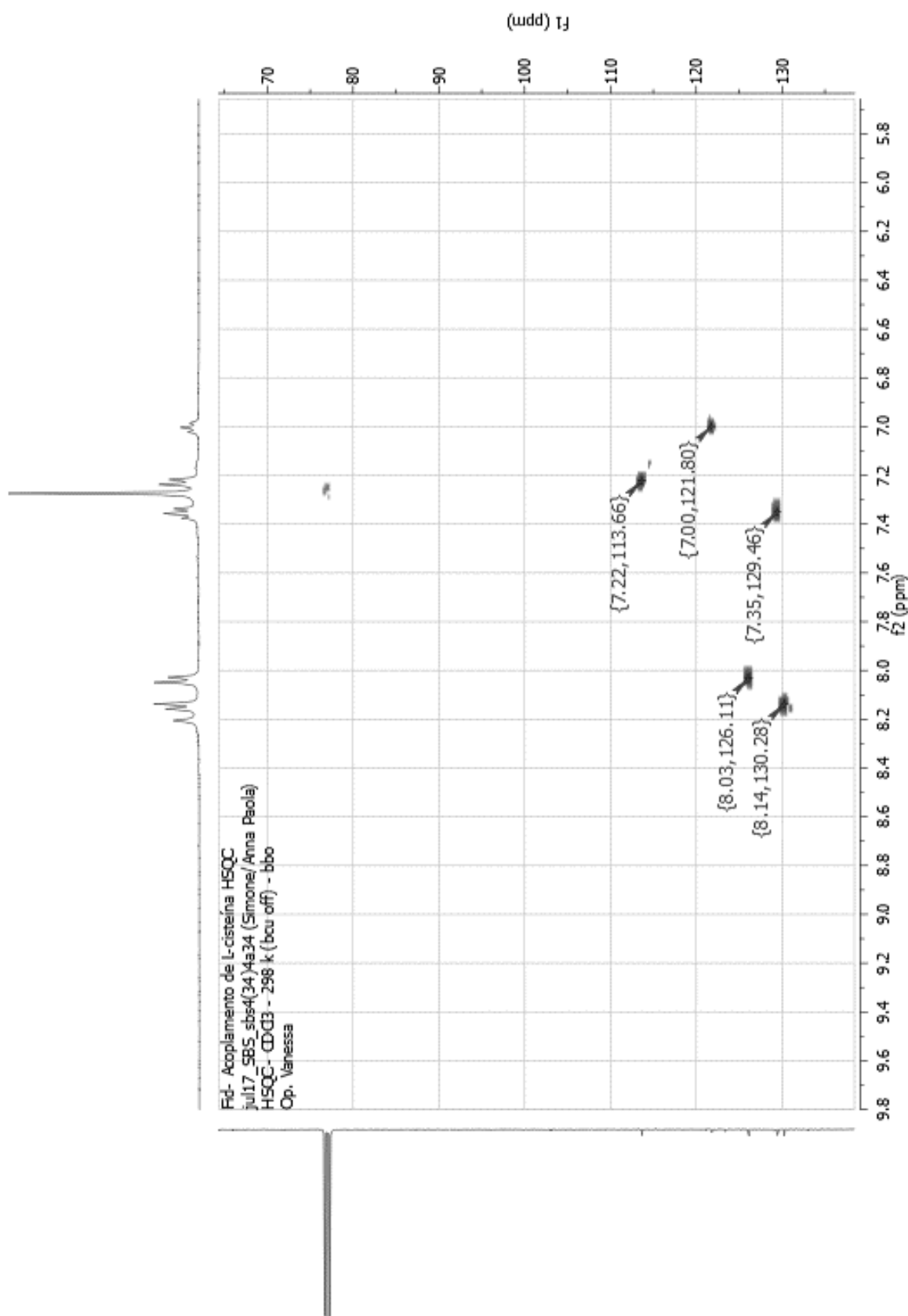


Figura 28. Espectro de RMN HSQC do produto de reação do derivado difeniltetrazol **2** com L-cisteína (led 309 nm).