

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLEVERTON LUIZ PIRICH

**NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA CARBOXILADOS PARA  
IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS E DESENVOLVIMENTO DE BIOCENSORES  
PIEZOELÉTRICOS**

CURITIBA

2017

CLEVERTON LUIZ PIRICH

**NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA CARBOXILADOS PARA  
IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS E DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSORES  
PIEZOELÉTRICOS**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Bioquímica), no Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Rita Sierakowski  
Coorientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Pirich, Cleverton Luiz

Nanocristais de celulose bacteriana carboxilados para imobilização de anticorpos e desenvolvimento de biossensores piezoelétricos. / Cleverton Luiz Pirich. – Curitiba, 2017.

134 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Maria Rita Sierakowski

Coorientador: Rilton Alves de Freitas

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Nanocristais 2. Celulose 3. Biossensores 4. Dengue I. Título II. Sierakowski, Maria Rita III. Freitas, Rilton Alves de IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.19254



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PROFETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Código CAPES: 40001016003P2

#### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **CLEVERTON LUIZ PIRICH**, intitulada: "Nanocristais de celulose bacteriana carboxilados para Imobilização de anticorpos e desenvolvimento de biosensores piezoelétricos", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua

APROVAÇÃO.

CURITIBA, 28 de Abril de 2017.

MARIA RITA SIERAKOWSK  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

JOANA TEÓMERA SILVEIRA  
Avaliador Interno (UFPR)

LUCY ONO  
Avaliador Externo (UFPR)

MIGUEL DANIEL NOEDA  
Avaliador Interno (UFPR)

CINTIA MARA RIBAS DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo (UFPR)

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família, principalmente a minha mãe Cláudia Stavacz, minha avó Maria Pirich, aos meus tios Cesar e Marcia Baron Pirih, Antônia e Pedro Pirih por toda ajuda e apoio.

A minha orientadora professora Dra. Maria Rita Sierakowski, pela amizade, apoio e valiosos ensinamentos, paciência e orientação que me proporcionaram grande crescimento.

Aos colaboradores do projeto, por todo incentivo e discussão e apoio dos resultados, Dr. Guilherme Fadel Picheth e professor Dr. Rilton Alves de Freitas.

A professora Dra. Denise F.S. Petri e professor Dr. Roberto Torresi do IQ-USP/SP, e ao doutorando Leandro Blachechen por permitirem o acesso e ajudarem na discussão das análises por elipsometria e na microbalança de cristal de quartzo.

A professora Dra. Joana Léa Meira Silveira e ao professor Dr. Miguel Daniel Nosedá por aceitarem fazer parte da banca e, também, por terem contribuído para melhorar este trabalho desde a apresentação do projeto.

Aos professores Dra Lucy Ono, Dra. Patrícia Stuelp Campelo e Dra. Cíntia Mara Ribas de Oliveira por aceitarem fazer parte da minha banca e contribuírem em meu trabalho

A Membracel Produtos Tecnológicos Ltda por fornecer as aparas de celulose bacteriana utilizadas neste trabalho.

A professora Dra. Graciela I. B- de Muniz, a MSc. Daniele Cristina Potulski e a Dra. Eliane Lopes da Silva do Departamento de Engenharia Florestal da UFPR por permitir, e auxiliarem na utilização do moinho Supermasscolloider para o processamento das aparas de celulose bacteriana.

Ao doutorando Fábio Lisboa e ao professor Dr. Fernando Wypych pelas análises de difratometria de raios-X.

Ao professor Dr. Lionel Gamarra (Instituto Cérebro, Hospital Albert Einstein, SP) por permitir as análises de potencial zeta.

Aos demais colegas do BIOPOL que me receberam e ajudaram em diferentes momentos.

A todos os professores e colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR que, de uma maneira ou outra, contribuíram para minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho.

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) da UFPR e a todos os demais colaboradores do Programa.

Ao Departamento de Química da UFPR pelo acesso aos equipamentos multiusuários.

A CAPES, CNPq, FINEP, FAPESP e ao programa REUNI, pelo auxílio financeiro.

*"I think and think for months and years.  
Ninety-nine times, the conclusion is  
false. The hundredth time I am right"*

**Albert Einstein.**

## RESUMO

Novos materiais desenvolvidos a partir de fontes naturais de origem renovável, biocompatíveis e de baixo custo vêm recebendo atenção da academia e da indústria, e duas fontes promissoras são os cristais de celulose (NC) e as xiloglucanas (XG) de sementes de *Tamarindus indica*. O objetivo desta tese se baseou no desenvolvimento de materiais suportes a base desses polissacarídeos e, de acordo com as publicações geradas, a tese foi dividida em três partes. Na primeira (1), foi realizada a adsorção de XG em camadas de NC com quatro diferentes graus de sulfatação e de potencial zeta [0%  $\text{SO}_3^-$ , isolado com HCl ( $\zeta$  -4,8 mV); 0,42%  $\text{SO}_3^-$ , usando uma mistura de HCl e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\zeta$  -39,6 mV); e 0,65%  $\text{SO}_3^-$ , usando somente  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\zeta$  -45,6 mV)]. A interação foi investigada através de várias técnicas [isotermas de Langmuir, microscopia de força atômica (AFM), ângulo de contato, espalhamento de luz dinâmico, elipsometria e medidas por microbalança de cristal de quartzo (QCM)]. Os experimentos de adsorção em água e por *layer by layer* (LbL) sugerem que o maior grau de esterificação na superfície de NC (0,65%  $\text{SO}_3^-$ ) prejudica a capacidade máxima de adsorção da XG e cria camadas adsorvidas instáveis. Entretanto, para o grupo 0,42%  $\text{SO}_3^-$  não foi verificada alterações significativas na adsorção da XG além de ter uma maior estabilidade coloidal do que o grupo 0%  $\text{SO}_3^-$  e de formar filmes mais estáveis, com menor rugosidade e espessura. Mas, testes iniciais de formação de filmes de XG com NC submetidos a oxidação com o reagente TEMPO apresentaram delaminação e foram descartados para a etapa de produção de biossensores bidimensionais. Na segunda parte (2), sensores piezoelétricos foram revestidos com filmes de NC e em seguida foi imobilizado anticorpos monoclonais IgG específicos para o antígeno NS1 do vírus da dengue. O revestimento do sensor foi acompanhado por AFM, QCM e QCM-D. O sensor desenvolvido foi capaz de detectar o antígeno NS1 em amostras de soros sanguíneos simulados no intervalo de concentração de 0,01 à 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O revestimento ainda proporcionou a capacidade de reconhecimento de NS1 através de ambos os equipamentos, QCM-D e QCM, com limites de detecção de 0,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 0,32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Na terceira parte (3), na tentativa de baratear o sensor desenvolvido na metodologia do artigo anterior, foi proposta a otimização do procedimento de obtenção de NC. Para isso, foi verificada a influência de pré-tratamentos mecânicos antes do procedimento de hidrólise da celulose. As amostras foram segregadas em relação ao grau de intensidade do tratamento mecânico, sendo: (a) agitação mecânica, (b) trituração, (c) cisalhamento por 20 passagens por moinho e (d) cisalhamento por 40 passagens por moinho. E foram caracterizadas por reologia, AFM, difração de raios-x e rendimento de NC isolados. De acordo com os resultados obtidos, não foi verificada diferença significativa do pré-tratamento para produção de NC. Assim, sugere-se que não é necessário um pré-tratamento mecânico e, com isso, o custo final da obtenção de NC pode ser diminuído.

Palavras-chave: Xiloglucana. Nanocristais de celulose. Biossensores. Dengue. Filmes finos. Proteína NS1



## ABSTRACT

Novel materials developed from renewable and natural sources with biocompatibility and low cost have receiving great attention from academia and industry. Two promises sources are cellulose nanocrystals (NC) and xyloglucan (XG) from *Tamarindus indica* seeds. At present thesis, the main goal was the development of support materials based on these two polysaccharides. In according to published papers, this thesis was organised in three sections. The first (1), the adsorption behavior of XG on layers of bacterial cellulose nanocrystals (BCN) with four different sulfate content and zeta potential ( $\zeta$ ) values [0%  $\text{SO}_3^-$ , using only HCl ( $\zeta$  -4.8 mV); 0.42%  $\text{SO}_3^-$ , using a mix of HCl and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\zeta$  -39.6 mV); and 0.65%  $\text{SO}_3^-$ , using only  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\zeta$  -45.6 mV)] was investigated. The adsorption was evaluated by several techniques (Langmuir isotherms, atomic force microscopy, contact angle, dynamic light scattering, ellipsometry and quartz crystal microbalance measurements). The experiments in water suspension and layer by layer (LbL) suggest that high sulfate substitution on BCN surface (0.65%  $\text{SO}_3^-$ ) impairs the original interaction with XG, resulting in lower maximum adsorbed amount ( $Q_{\text{max}}$ ) of XG on BCN and unstable deposited layers with desorption. Therefore, 0.42%  $\text{SO}_3^-$  did not significantly impair XG adsorption, and the greater colloidal stability than 0%  $\text{SO}_3^-$  resulted in higher XG mass adsorption in water suspension and thin films with lower roughness, thickness and without desorption. However, initial test of XG films with NC subjected to oxidation with the TEMPO reagent presented delamination and were discarded for the production stage of two-dimensional biosensors. In the second section (2), piezoelectric sensors were previously coated with thin films of bacterial cellulose nanocrystals (CN) to provide a more sensitive and adapted interface for the attachment of monoclonal immunoglobulin G (IgGNS1) and to favor specific detection of non-structural protein 1 (NS1) of dengue fever. The assembly of the immunochip surface was analyzed by atomic force microscopy (AFM) and the NS1 detection was followed by quartz crystal microbalance with (QCM-D) and without energy dissipation monitoring (QCM). The CN surface was able to immobilize IgGNS1, as confirmed by AFM topography and phase images along with QCM-D. The system was able to detect the NS1 protein in serum simulated in the range of 0.01- 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , by both QCM and QCM-D. The limits of detection of the two devices were 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for QCM-D and 0.32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for QCM. At last (3), in order to optimize and reduce the cost of piezoelectric immunochip, was proposed a study to optimize the hydrolysis procedure. For this, the influence of mechanical pretreatment before the hydrolysis procedure was verified on the pristine cellulose submitted to four different mechanical process: (1) magnetic stirring, (2) blender, and milled by (3) 20 and (4) 40 passages in supermasscolloider mill. All the samples were evaluated according to yield, morphology and size (atomic force microscopy), crystallinity (x-ray diffraction). Not all CNC differed in evaluated characteristics suggesting that, intense mechanical pretreatment are not exclusively required, prior to hydrolysis.

Key-words: Xyloglucan. Celulose nanocrystals. Biosensors. Dengue. Thin films. NS1 protein.

## LISTA DE ABREVEIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

### Gerais:

$\Delta f$ : variação de frequência de ressonância

$\Delta D$ : variação de dissipação de energia

$\Delta m$ : variação de massa na superfície

AFM: microscopia de força atômica

ATR-FTIR: reflectância total atenuada

BCN: bacterial cellulose nanocrystals

BCN 0% SO<sub>3</sub><sup>-</sup>: BCN with zero percent of sulfate esterification

BCN 0.42% SO<sub>3</sub><sup>-</sup>: BCN with zero point forty-two percent of sulfate esterification

BCN 0.65% SO<sub>3</sub><sup>-</sup>: BCN with zero point sixty-five percent of sulfate esterification

CB: celulose bacteriana

CN: cellulose nanocrystals

CNC: cellulose nanocrystals

CNC-St: CNC pre-treated with magnetic stirring

CNC-BI: CNC pre-treated with blender

CNC-20x: CNC pre-treated with twenty passages by mill

CNC-40x: CNC pre-treated with forty passages by mill

DENV: vírus da dengue

DRX: difração de raios-X

EDC: 1-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida

EIS: espectroscopia de impedância eletroquímica

ELISA: ensaio imunoabsorvente de enzima-ligada

Igs: imunoglobulinas

LFA: ensaio de fluxo lateral

NC: nanocristais de celulose

NHS: N-hidroxisuccinimida

NS1: proteína não estrutural 1

PCR: reação em cadeia da polimerase

PEI: polyethylene amide

PEG: polietilenoglicol

QCM: microbalança de cristal de quartzo

QCM-D: microbalança de cristal de quartzo com monitoramento de dissipação de energia

SPR: ressonância plasmônica de superfície

XG: xiloglucana

$\zeta$ : potencial zeta

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA CELULOSE.....	13
FIGURA 02 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA BIOSÍNTESE DA CELULOSE .	14
FIGURA 03 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA CRISTALINA DA CELULOSE EM VEGETAIS.....	15
FIGURA 04 – MODELO DAS ALOMORFIAS DA CELULOSE I.....	16
FIGURA 05 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CELULOSE BACTERIANA .....	18
FIGURA 06 – ILUSTRAÇÃO REPRESENTANDO REGIÕES CRISTALINAS E AMORFAS DA CELULOSE (GENÉRICA).....	19
FIGURA 07 – MECANISMO GERAL DE HIDRÓLISE DE REGIÕES AMORFAS DA CELULOSE GENÉRICA .....	21
FIGURA 08 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA XILOGLUCANA DE SEMENTES DE TAMARINDO.....	25
FIGURA 09 – CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DE TAMARINDUS INDICA E ILUSTRAÇÃO DAS PARTES DAS PLANTAS.....	26
FIGURA 10 – ESQUEMA DE ADSORÇÃO DE XILOGLUCANA (XG) EM NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NC).....	28
FIGURA 11 – ELEMENTOS BÁSICOS DE UM BIOSSENSOR.....	29
FIGURA 12 – ESQUEMA DE ATIVAÇÃO POR SOLUÇÃO DE EDC+NHS DA SUPERFÍCIE COM INTERFACE R-COO <sup>-</sup> PARA IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE MOLÉCULAS COM INTERFACE R-NH <sub>2</sub> . CAMINHOS ALTERNATIVOS DA REAÇÃO (SEM ADIÇÃO DE NHS) SEM A UTILIZAÇÃO DE NHS ESTÃO ILUSTRADOS. ....	32
FIGURA 13 – CRONOLOGIA DA HISTÓRIA SOBRE O DIAGNÓSTICO DA DENGUE. ....	34
FIGURA 14 – PRINCÍPIO BÁSICO DE FUNCIONAMENTO DE MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO COM (QCM-D) E SEM MONITORAMENTO DE DISSIPAÇÃO DE ENERGIA (QCM). ....	37
FIGURA 15 – EXEMPLIFICAÇÃO DE MUDANÇAS NOS VALORES DA FREQUÊNCIA E NA DISSIPAÇÃO DE ENERGIA EM FUNÇÃO DAS MUDANÇAS DE MASSAS.....	38

FIGURA 16 – COMPONENTES BÁSICOS DO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.....	41
FIGURA 17 – ESQUEMA DE FORÇAS PREDOMINANTES ENTRE A PONTA DO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA E A SUPERFÍCIE DA AMOSTRA COM BASE NA DISTÂNCIA. ....	42
FIGURA 18 – FORÇAS E MODOS DE IMAGEM DE MICROSCÓPIA DE FORÇA ATÔMICA BASEADOS NA DISTÂNCIA PONTA/AMOSTRA. ....	42
FIGURA 19 – MODO CONTATO DE VARREDURA POR MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.....	43
FIGURA 20 – MODO CONTATO INTERMITENTE DE VARREDURA POR MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA. ....	44
FIGURA 21 – MODO NÃO CONTATO DE VARREDURA POR MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA. ....	44
FIGURA 22 – DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES VISCOELÁSTICAS ATRAVÉS DE PERTURBAÇÕES NA OSCILAÇÃO DO CANTILEVER COM A AMOSTRA (ÂNGULO DE FASE) PELA TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	45
FIGURA 23 – MEDIDA DE ESPESSURA DE UM NANOFILME ATRAVÉS DE MEDIDAS DE VARREDURAS POR MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA. (A) CORTE REALIZADO SOBRE A SUPERFÍCIE, (B) (C) MEDIDA DE ALTURA ENTRE A REGIÃO REMOVIDA E A REGIÃO INTACTA.....	46
FIGURA 24 – DEMONSTRAÇÃO DE COMPONENTES BÁSICOS DE UM ELIPSÓMETRO.....	47
FIGURA 25 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM DIFRATOMETRO NA GEOMETRIA BRAGG-BRENTANO.....	48
FIGURA 26 – ESQUEMA BÁSICO DA DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM UM MATERIAL COM PLANOS CRISTALINO.....	49
FIGURA 27 – DEMONSTRAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DA DUPLA CAMADA ELÉTRICA, CONTENDO CAMADA DE STERN, CAMADA DIFUSA E O PLANO DE CISALHAMENTO, NO QUAL É AFERIDO O POTENCIAL ELÉTRICO (POTENCIAL ZETA).....	51
FIGURA 28 – ESQUEMA DE MÉTODO DE ELETROFORESE POR FEIXE DE LUZ POLARIZADA .....	52

FIGURA 29 – ILUSTRAÇÃO DE FORMAÇÃO DE DUPLA CAMADA ELÉTRICA  
SOBRE FILMES PELA APLICAÇÃO DE UM FLUXO CONSTANTE.

.....54

## LISTA DETABELA

TABELA 01 – COMPARAÇÃO DO MÉTODO DE POTENCIAL DE FLUXO EM RELAÇÃO A MÉTODOS ÓPTICOS PARA OBTENÇÃO DO POTENCIAL ZETA.....	53
--	----

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	13
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
3.1 CELULOSE .....	13
3.1.1 Celulose bacteriana (CB).....	17
3.1.2 Propriedades mecânicas da celulose .....	19
3.1.3 Isolamento de nanocristais de celulose (NC) por hidrólise ácida .....	20
3.1.4 Produção de nanocristais de celulose (NC).....	22
3.2 CELULOSE COMO SUPORTE PARA UTILIZAÇÕES EM IMUNODIAGNÓSTICOS .....	23
3.3 FILMES CELULÓSICOS NO USO DE DIAGNÓSTICO .....	23
3.4 XILOGLUCANA (XG).....	24
3.4.1 Xiloglucana de <i>Tamarindus indica</i> .....	26
3.5 INTERAÇÃO ENTRE XILOGLUCANA E CELULOSE .....	27
3.6 PRÍNCIPIOS BÁSICOS DE BIOSENSORES.....	28
3.6.1 Tipos de biossensores.....	29
3.6.2 Sondas: Anticorpos.....	30
3.6.3 Imobilização de anticorpos em filmes celulósicos .....	31
3.7 DENGUE .....	33
3.7.1 Diagnóstico de dengue utilizando métodos convencionais e biossensores..	34
3.7.2 Biossensores piezoelétricos para dengue .....	35
3.8 PRINCIPAIS TÉCNICAS PARA CARACTERIZAR BIOPOLÍMEROS E/OU BIOSSENSORES.....	36
3.8.1 Microbalança de cristal de quartzo .....	36
3.8.2 Microscopia de força atômica .....	40
3.8.3 Elipsometria .....	46
3.8.4 Difração de Raios-X.....	48
3.8.5 Potencial zeta .....	50
3.8.5.1. Potencial zeta por método eletroforético por efeito doppler a laser .....	52
3.8.5.2. Potencial zeta por método de potencial de fluxo .....	53



## 4. ARTIGOS

4.1 ARTIGO 1:.....	56
BACTERIAL CELLULOSE NANOCRYSTALS: IMPACT OF THE SULFATE CONTENT ON THE ADSORPTION WITH XYLOGLUCAN .....	56
INTRODUCTION.....	57
MATERIALS AND METHODS.....	59
Materials.....	59
Pretreatment of bacterial cellulose .....	59
Obtaining bacterial cellulose nanocrystals (BCN).....	60
Sulfur content of the BCN samples .....	60
X-ray powder diffraction (XRPD) analysis .....	60
Langmuir isotherm analysis of XG adsorption on BCN .....	61
Zeta potential analysis.....	63
Atomic force microscopy .....	63
Adsorption of XG on BCN analyzed in a real time by a quartz crystal microbalance.....	64
Layer by layer deposition and ellipsometry .....	64
Contact angle and surface free energy calculations.....	65
RESULTS AND DISCUSSION .....	66
Characterization of bacterial cellulose pulp and xyloglucan .....	66
Obtainment and characterization of bacterial cellulose nanocrystals .....	66
Influence of BCN sulfate content on xyloglucan adsorption .....	69
CONCLUSIONS .....	75
ACKNOWLEDGMENTS.....	75
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	76
4.2 ARTIGO 2:.....	83
PIEZOELECTRIC IMMUNOCHIP COATED WITH THIN FILMS OF BACTERIAL CELLULOSE NANOCRYSTALS FOR DENGUE DETECTION.....	83
ABSTRACT .....	83
INTRODUCTION.....	84
MATERIALS AND METHODS.....	88
Materials.....	88
Methods .....	88
Cellulose hydrolysis.....	88
Conductivity titration .....	89

ATR-FTIR spectroscopy.....	90
Immunochip surface assembly .....	90
QCM without energy dissipation monitoring .....	91
QCM with energy dissipation monitoring .....	91
Atomic force microscopy .....	92
RESULTS AND DISCUSSION .....	92
Isolation and characterization of cellulose nanocrystals .....	92
Immunochip assembly.....	94
CONCLUSION .....	103
ACKNOWLEDGMENTS.....	104
4.3 ARTIGO 3 .....	104
INFLUENCE OF MECHANICAL PRETREATMENT TO OBTAIN CELLULOSE NANOCRYSTALS BY SULFURIC ACID HYDROLYSIS.....	104
ABSTRACT .....	105
INTRODUCTION.....	106
Materials.....	109
Methods .....	109
Pretreatment.....	109
Cellulose hydrolysis.....	109
YIELD DETERMINATION .....	110
Sulfate group density measurements .....	110
X-ray powder diffraction analysis.....	111
Zeta Potential analysis .....	111
Rheology .....	112
Atomic force microscopy .....	112
RESULTS AND DISCUSSION .....	113
CONCLUSIONS .....	117
ACKNOWLEDGMENTS.....	118
<b>5. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>119</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>121</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>122</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das doenças que apresenta grande interesse no desenvolvimento de dispositivos para diagnósticos rápidos, simples e de baixo custo, como biossensores, é a infecção pelo vírus da dengue (DENV). O vírus é transmitido pela picada de mosquitos, sendo um dos arbovírus com maior disseminação no sul da Ásia, África e Américas do Sul e Central. No início, a doença resulta em uma febre moderada, a qual pode evoluir em sintomas mais severos como hemorragias e a síndrome do choque da dengue (baixa pressão, hemorragias, até a morte). Pacientes que são infectados uma segunda vez pelo vírus possuem um maior risco de desenvolver os quadros mais severos dessa doença. Esses sintomas, entretanto, podem ser confundidos como uma simples gripe. Com uma população susceptível de mais de 2 bilhões de contraírem a infecção no mundo, a dengue torna-se uma maior preocupação pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e torna-se crescente a necessidade do desenvolvimento de biossensores.

Entre diferentes biomarcadores que são utilizados para realizar o diagnóstico da dengue, a detecção da proteína não estrutural 1 do vírus da dengue (NS1,  $M_w \approx 45$  g/mol) está entre uma das estratégias mais empregadas (ALCON *et al.*, 2002, GELANEW *et al.*, 2015, LAPPHRA *et al.*, 2008). O NS1 é o antígeno mais conhecido e melhor estudado entre os biomarcadores empregados de dengue e, o mesmo, pode ser encontrado no soro sanguíneo humano em concentrações de 1 a 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , logo após o primeiro dia de infecção (DARWISH *et al.*, 2015). O NS1 pode ser encontrado de duas diferentes formas: (1) expressa na membrana celular e (2) forma livre ou secretada na corrente sanguínea (ALCON *et al.*, 2002, SAITO *et al.*, 2015). Adicionalmente, esse antígeno é uma proteína com estrutura altamente conservada entre os quatro diferentes sorotipos e, a maioria dos anticorpos monoclonais disponíveis para NS1, são capazes de reconhecer todos os sorotipos (PARKASH e SHUEB, 2015).

Ainda nos dias atuais, novas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de desenvolver novos biossensores visando o reconhecimento do antígeno NS1, através de diferentes estratégias (SINAWANG *et al.*, 2016, WONG *et al.*, 2016, ZHANG *et al.*, 2015). Particularmente, uma das estratégias com grande potencial para esse fim, visa

o desenvolvimento de biossensores piezoelétricos como, por exemplo, a utilização de microbalanças de cristal de quartzo (QCM). A QCM na pesquisa já vem sendo utilizada para o diagnóstico de diversas doenças, incluindo a dengue. Como vantagem, a QCM além de ser um equipamento relativamente barato e acessível à aquisição de clínicas de países em desenvolvimento, apresenta detecção rápida e em tempo real (média de 5-30 min), simples de ser operada, sem a necessidade de profissionais altamente qualificados (BRAGAZZI *et al.*, 2015).

Existem ainda, versões mais robustas da QCM, capazes de monitorar a dissipação de energia na superfície, sendo nomeada em literatura como microbalança de cristal de quartzo com monitoramento da dissipação de energia (QCM-D). Através do monitoramento da dissipação de energia, é possível detectar mudanças no comportamento viscoelástico, quantificar alterações de massa na superfície e/ou mesmo calcular a espessura de camada de materiais depositados. Embora o preço desse equipamento e a complexidade de análise aumentem significativamente (QCM: ~R\$ 12.000,00 QCM-D: ~R\$ 500.000,00), a QCM-D torna-se uma importante ferramenta de testes pioneiros para correta validação de novos biossensores piezoelétricos (BRAGAZZI *et al.*, 2015).

Embora a técnica de QCM apresente vantagens, o uso em clínicas ainda apresenta limitações como reconhecimento de moléculas indesejadas (reações inespecíficas) e alta necessidade de diluição (>100x) da amostra que apresenta a molécula alvo. Essas limitações se devem, principalmente, a superfície utilizada. A maioria dos sensores utilizados para QCM atualmente disponível no mercado tem a superfície composta por metais inertes como ouro, prata e platina. Embora já tenha sido demonstrado que esses sensores apresentem a capacidade de reconhecer moléculas isoladas, eles falham ao detectar as mesmas moléculas em amostras mais complexas, como em amostras de sangue ou urina (REIMHULT *et al.*, 2008). Essas superfícies sem nenhuma modificação ou revestimento, apresentam extensa interação não específica com diferentes biomoléculas, o que torna quase impossível discriminar entre interações não-específicas com as específicas. Na tentativa de contornar esses problemas, diferentes revestimentos desses sensores são propostos (ORELMA *et al.*, 2012; ORELMA *et al.*, 2012; ZHANG; ROJAS, 2016), como por exemplo, fornecendo uma maior quantidade de grupos ativos (ex. ácidos carboxílicos ou aminas) visando aumentar a quantidade de sondas ancoradas (enzimas, anticorpos específicos para o biomarcador) e/ou bloquear ou diminuir interações não

específicas. Por exemplo, polietileno glicol (PEG) é usualmente utilizado para revestir essas superfícies e evitar ligações não preferenciais, reduzindo as perturbações na frequência causadas e aumentando a confiabilidade de análises. Outros grupos como polilisina-b-PEG, albumina, poli(acrilamida) também são reportados por revestir a superfície de sensores de ouro aumentando a confiança da detecção do analito alvo (REIMHULT *et al.*, 2008; VUORILUOTO *et al.*, 2016).

Materiais celulósicos como nanoceluloses e nanocristais de celulose (NC) são promissores para o uso no desenvolvimento de biossensores. Suas principais características adequadas a esse propósito são: baixíssima toxicidade, fonte de extração sustentável, abundantes e baixo custo. Também, possuem alta razão de aspecto (comprimento/largura), boa estabilidade coloidal, boa adsorção a diferentes superfícies e capacidade de produção de superfícies mais rugosas (aumento de área superficial para imobilização de moléculas sondas), são facilmente funcionalizados e imobilizados a outras moléculas (ex. enzimas, anticorpos, lectinas). Com essas características e propriedades os NC já vêm sendo empregados para o desenvolvimento de diferentes biossensores, pela imobilização à sua superfície de macromoléculas funcionais como: antígenos (ORELMA *et al.*, 2012), enzimas (BARKER *et al.*, 1971; CHEN *et al.*, 2012), anticorpos (GENERALOVA *et al.*, 2009) e partículas magnéticas (MAHMOUD *et al.*, 2013). A interface dessas nanopartículas pode se tornar ainda mais atrativa para imobilização de sondas, através de adsorção ou reações de copolimerização aumentando sua área superficial e a heterogeneidade da superfície (MONTAÑEZ *et al.*, 2011; PIRICH *et al.*, 2015).

Devido ao potencial de uso dos NC no desenvolvimento de biossensores e a experiência do grupo Biotecnologia em Polissacarídeos (BioPol) da UFPR com materiais celulósicos, foram propostas novas formas para desenvolver biossensores aplicados para diagnóstico de DENV. A ideia principal dessa tese, foi a funcionalização de sensores de QCM disponíveis no mercado com nanofilmes de NC para imobilização de imunoglobulinas monoclonais específicas para reconhecimento do antígeno NS1 do vírus da dengue. A correlação da detecção do antígeno NS1 entre os equipamentos QCM e QCM-D foram avaliadas juntamente com análises de microscopia de força atômica (AFM).

## 2. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de biodispositivos com capacidade diagnóstica baseados em nanocristais de celulose bacteriana (NC) e/ou xiloglucana de sementes de *Tamarindus indica* (XG).

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento de nanocristais de celulose (NC) a partir de diferentes pré-tratamentos mecânicos precedidos da hidrólise da celulose com ácido sulfúrico;
- Obtenção e caracterização de NC com superfície carboxilada e sulfatada;
- Caracterização dos NC através de diferentes técnicas envolvendo microscopia de força atômica (AFM), espectroscopia de infravermelho com reflectância total atenuada (ATR-FTIR) e titulação condutométrica;
- Formação de nanofilmes com NC ou com NC e xiloglucana sobre cristais piezoelétricos de microbalança de cristal de quartzo (QCM);
- Ativação da superfície dos NC em presença de 1-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) (em dispersão líquida), e caracterização da reação de formação de amida, através de diferentes técnicas como: AFM, ATR- FTIR;
- Formação de nanofilmes sobre cristais piezoelétricos e ativação por EDC/NHS, avaliados por QCM e QCM-D;
- Imobilização dos anticorpos IgG anti-NS1 sobre nanofilmes de NC ativados por EDC/NHS, acompanhados em tempo real por QCM e QCM-D;
- Avaliação dos nanofilmes de NC com anticorpos IgG anti-NS1 imobilizados no reconhecimento da proteína sintética NS1 (adicionada ao soro de pacientes negativos para dengue), acompanhada em tempo real por QCM e QCM-D;

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CELULOSE

A celulose está entre os biopolímeros que se destacam tanto em abundância, quanto em possibilidades de utilização. Sua principal função em organismos pluricelulares é estrutural. Ela é produzida por uma grande variedade de organismos como: bactérias, algas, tunicados e vegetais superiores. Estima-se que, sua disponibilidade total na biosfera, seja da ordem de 20 a 30.10<sup>10</sup> t (FENGEL, 1989; MATHEW e DUFRESNE, 2002).

Esse carboidrato é um homopolissacarídeo linear constituído de unidades de D-glucopirranose unidas por ligação glicosídica do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). O fato da celulose, o biopolímero mais abundante na biosfera, ser constituída por moléculas de glucose não é fortuito. Isso é resultante da conformação excepcionalmente estável adquirida pela D-glucose em sua forma cíclica, constituindo a D-glucopirranose. Nela, as hidroxilas do anel hemiacetalico se encontram em posição equatorial ao plano do anel. Uma estabilidade adicional é dada a celulose em função das hidroxilas do carbono anomérico das glucoses também estarem em posição equatorial, resultando em uma ligação mais estável (ligação  $\beta$ ), do que se estivesse em posição axial (ligação  $\alpha$ ), como ilustrado na FIGURA 01-A.

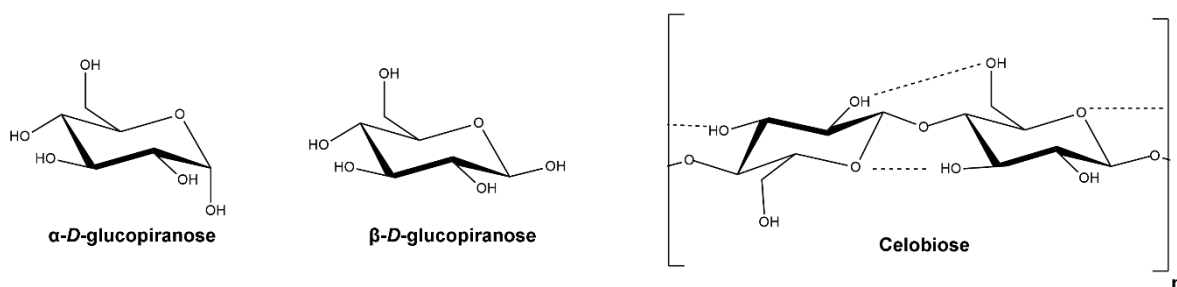


FIGURA 01 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA CELULOSE

FONTE: O Autor (2017)

(A) ISÔMEROS DA D-GLUCOSE E (B) DO DÍMERO DENOMINADO DE CELOBIOSE

A estrutura básica desse polissacarídeo consiste de duas unidades de glucose conectadas com orientação de  $180^\circ$  entre si, denominada de celobiose (4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-  $\beta$ -D-glucopiranosose, (FIGURA 01-B) (SOLOMONS, 1996).

Essa conformação adotada pode ser explicada ao analisar o modelo de biossíntese de celulose (KOYAMA *et al.*, 1997) ilustrado na FIGURA 02. Nela, duas unidades de uridina-difosfatoglucose (UDP-glucose) são ligadas com grande afinidade a dois sítios ativos da enzima celulose sintase (1), posicionados a  $180^\circ$  um do outro. Ao se ligarem as hidroxilas em C-5 das unidades de glucose então são ativadas por um mecanismo de catálise básica geral, promovendo a desfosforilação das unidades de UDP-glucose e a formação da ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (2). A  $\beta$ -glucana resultante, por apresentar baixa afinidade com os sítios de ligação a UDP-glucose, se desloca a uma região mais favorável (3), um sítio de ligação a  $\beta$ -glucana, podendo assim prosseguir a síntese com novas adições de celobioses.

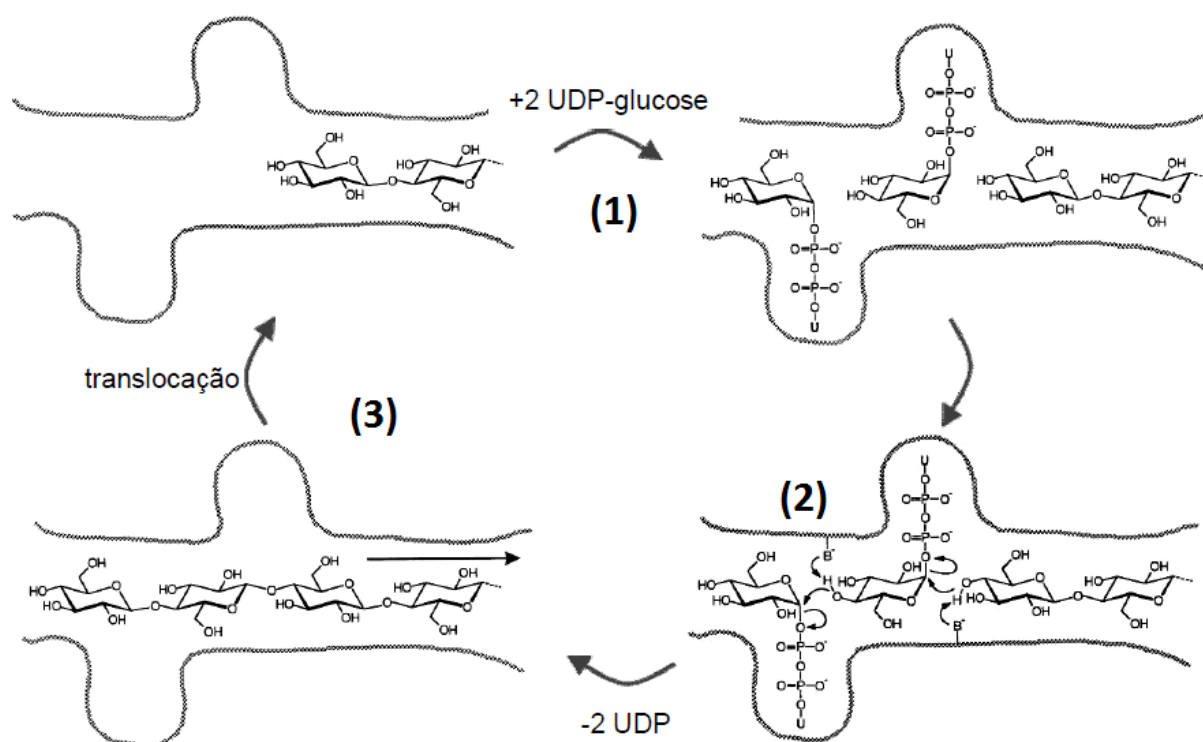


FIGURA 02 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA BISSÍNTESE DA CELULOSE  
 FONTE: Adaptado de Koyama *et al.* (1997)



Devido à conformação da celobiose, forças coesivas intracadeia são formadas, dadas por ligações de hidrogênio entre as hidroxilas, fazendo com que a cadeia adote uma conformação linear rígida, e cujo tamanho é variado e é classificado de acordo com o número de unidades de anidroglicose presentes, denominado grau de polimerização (DP). O DP pode variar desde 2.400, como na planta cavalinha (*Equisetum arvense*), até 15.300 na fibra de algodão (*Gossypium*) não tratada (FENGEL, 1989; SJÖSTRÖM, 1993; RAMOS, 2003). Entretanto, as cadeias de celulose, naturalmente, não são encontradas isoladas. Devido à conformação linear adotada e a posição espacial das hidroxilas, as cadeias conseguem interagir fortemente entre si através de ligações de hidrogênio intercadeias (FIGURA 03-A).

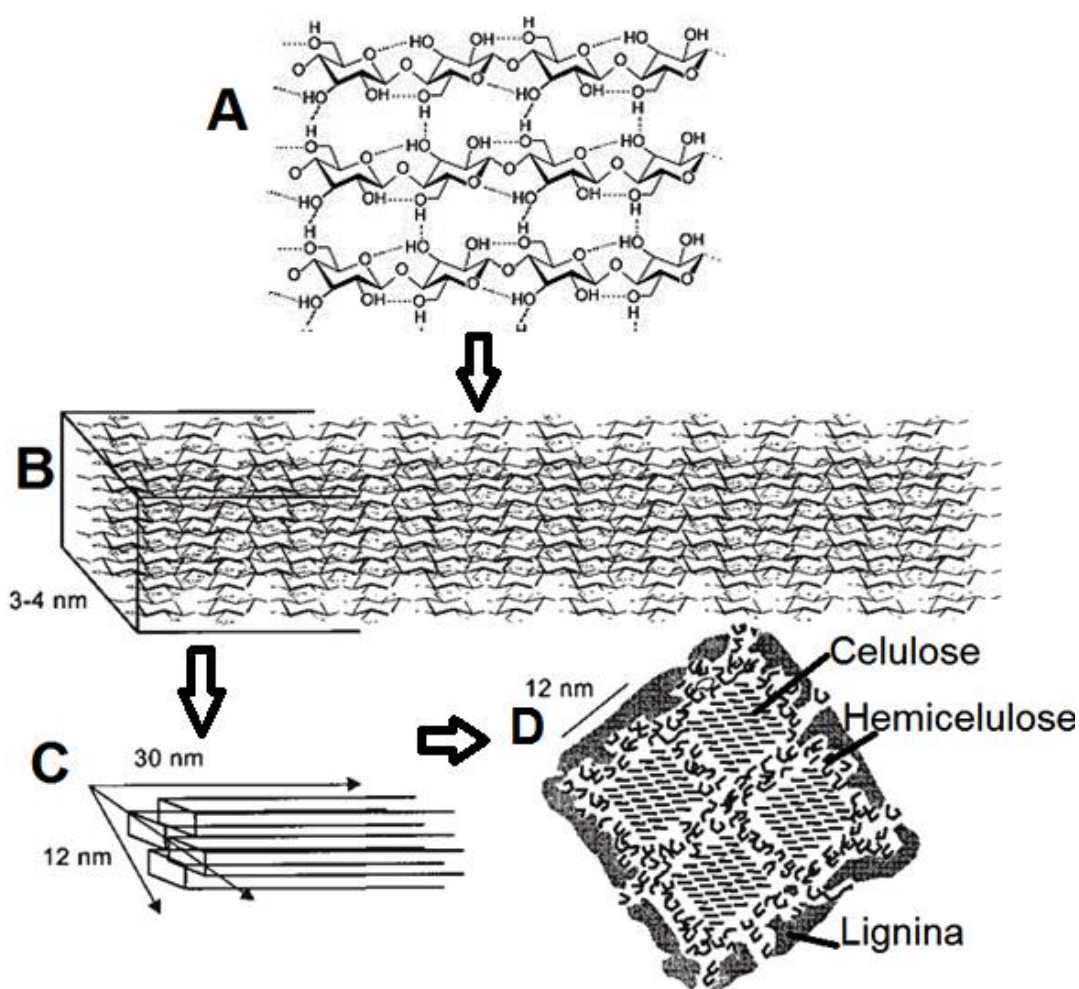


FIGURA 03 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA CRISTALINA DA CELULOSE EM VEGETAIS

FONTE: Adaptado de Ramos (2003)

A) INTERAÇÃO ENTRE AS CADEIAS DE CELULOSE B) FIBRAS ELEMENTARES C) CRISTALITOS E D) MICROFIBRILAS

E organizando-se em blocos cristalinos (denominados fibrilas elementares) com superfície hidrofílica e interior hidrofóbico, cuja espessura varia de 2 a 6 nm (FIGURA 03-B) (RAMOS, 2003).

Essas fibrilas associam-se em cristalitos (FIGURA 03-C) cuja seção transversal pode chegar a 12 nm. Em vegetais superiores, tais cristalitos encontram-se envoltos numa matriz de lignina, sendo que as hemiceluloses compatibilizam as duas fases dessa estrutura conhecida como microfibrila (FIGURA 03-D). As microfibrilas também apresentam regiões onde as moléculas são distribuídas ao acaso (regiões amorfas) (RAMOS, 2003).

Dependendo de como as cadeias de celulose estão orientadas entre si, essas associações podem ser divididas entre quatro tipos de celulose. A celulose nativa ou celulose I possui orientação paralela. A mercerizada (celulose II) possui orientação antiparalela e é resultante do tratamento alcalino da celulose I. O tratamento da celulose I com amônia líquida origina a celulose III. Ao submeter a celulose III a altas temperaturas com glicerol origina-se a celulose IV (HAYASHI *et al.*, 1975; ZUGENMAIER, 2001).

Attala e Vanderhart (1984) detectaram, a partir de análises de ressonância magnética nuclear de carbono-13, dois sistemas de cristalinidade na celulose nativa, uma monoclinica (celulose I $\beta$ ) e outra triclinica (celulose I $\alpha$ ), como ilustrados na FIGURA 04.

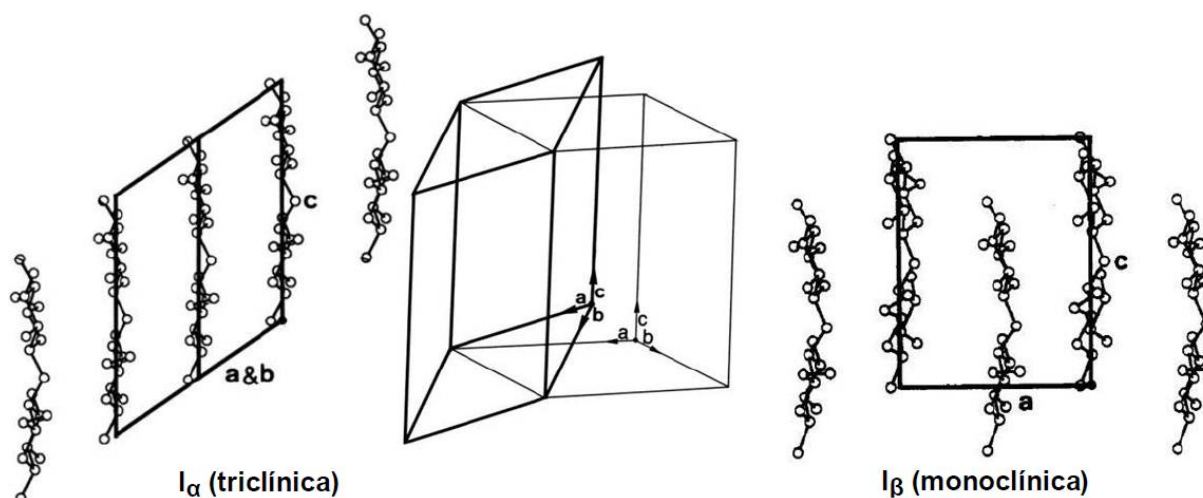


FIGURA 04 – MODELO DAS ALOMORFIAS DA CELULOSE I  
 FONTE: Adaptado de Zugenmaier (2001)

A diferença entre essas alomorfias é explicada pelos ângulos formados entre as ligações de hidrogênio das cadeias de celulose. A forma  $\alpha$  é menos estável termodinamicamente, sendo mais facilmente removida em tratamentos como hidrólise ácida (HORRI, 2001).

### 3.1.1 Celulose bacteriana (CB)

Conhecida desde os tempos antigos pelos produtores de vinagre e cerveja na Europa como “planta” ou “mãe” do vinagre, a celulose bacteriana (CB) é do tipo I e apresenta estrutura química idêntica à celulose vegetal. Atualmente, a CB vem atraindo a atenção de pesquisadores quanto à síntese de biocompósitos, devido a sua facilidade de obtenção, purificação, e por suas características físico-químicas como elevada cristalinidade, grau de polimerização (de 16.000 a 20.000), entre outras (MATHEW e DUFRESNE, 2002; LIMA *et al.*, 2004; ERONEN *et al.*, 2011).

Ela é produzida por cepas de bactérias do gênero *Acetobacter* sp. e aparece na superfície dessas colônias como uma película gelatinosa e translúcida formada por uma rede aleatória de microfibrilas com diâmetro inferior a 100 nm, entremeadas por regiões amorfas (FIGURA 05).

De acordo com Koizumi *et al.* (2008), a região amorfa das microfibrilas ocupa aproximadamente 90% do seu volume, entretanto, como o volume da CB é composto de até 99% de água, essa região contribui muito pouco para sua massa.

A grande vantagem da CB é sua obtenção de forma pura, isto é, não se encontra associada a outras macromoléculas como hemiceluloses, lignina e pectina, como ocorre na parede celular vegetal, fungos e alguns tipos de algas; ou envolta por uma camada grossa de cálcio como ocorre nos tunicados. Devido a essas impurezas, a celulose dessas fontes necessita de tratamentos químicos para a sua purificação. Tais tratamentos podem causar danos irreversíveis em sua estrutura (SHEYKHNAZARI *et al.*, 2011). Em relação as propriedades físico-químicas a CB, também, se destaca em relação a outras fontes. Ela possui um elevado DP (16.000 a 20.000), alta cristalinidade (>60%), alta proporção da alomorfia  $\alpha$  (44%), alto conteúdo de água (>99%).

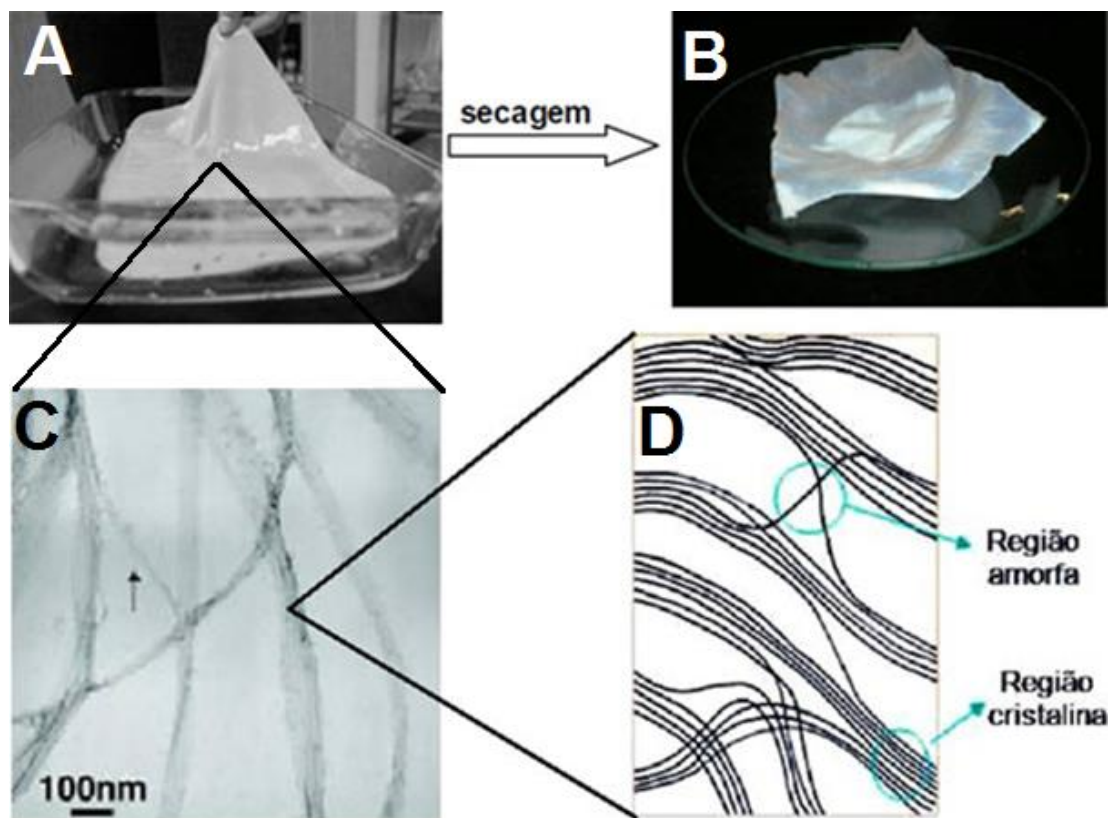


FIGURA 05 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CELULOSE BACTERIANA

FONTE: Adaptado de Iguchi *et al.* (2000)

A) MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA (CB), B) MEMBRANA DE CB APÓS SECAGEM, C) IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MICROFIBRILAS DA CB E D) ILUSTRAÇÃO DA DIFERENÇA DAS REGIÕES AMORFA E CRISTALINA NAS MICROFIBRILAS

Além disso, as películas de CB de acordo com o módulo de elasticidade (Young) possuem valores isotropicamente distribuídos ao longo da superfície entre 16 e 18 GPa, que é extraordinariamente alto para materiais biológicos bidimensionais. Essa propriedade a torna adequada para reforço de polpas de papel e outras aplicações, como a confecção de diafragmas acústicos para alto-falantes de alta fidelidade. Considerando somente as zonas cristalinas da CB, Hsieh *et al.* (2008) estimaram o módulo elástico das fibrilas de CB em 114 GPa através do espectro de Raman, com a CB relaxada e depois submetendo-a a esforços de tração, utilizando um desvio da banda em  $1095\text{ cm}^{-1}$  (HSIEH *et al.*, 2008).

### 3.1.2 Propriedades mecânicas da celulose

Comparativamente, as fibrilas de celulose apresentam um módulo de elasticidade elevado em relação ao de metais como o cobre (110 GPa) e o aço (207 GPa). No entanto, em materiais naturais como a madeira, o módulo de elasticidade é em torno de 10 GPa. Isso significa que, para aproveitar as propriedades mecânicas excepcionais da celulose, há a necessidade de aumentar a cristalinidade, removendo as zonas amorfas. Os fragmentos cristalinos isolados que apresentarem pelo menos uma de suas dimensões inferiores a 100 nm são denominados como nanocristais de celulose (NC) (SAMIR *et al.*, 2005).

Os NC podem ser isolados por diferentes estratégias, que visem priorizar o ataque das regiões amorfas e manter intactas as regiões cristalinas (Figura 06). Essa preferência existe, pois as zonas amorfas apresentam menor impedimento estereoquímico e menores forças coesivas de ligações de hidrogênio e van der Waals do que as zonas cristalinas (BATTISTA *et al.*, 1956; MARCHESSAULT *et al.*, 1961).

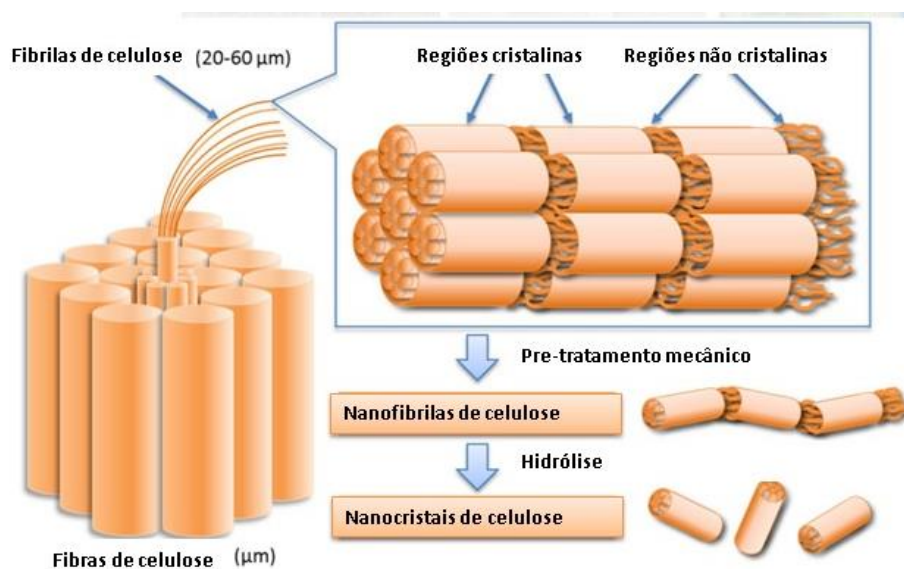


FIGURA 06 – ILUSTRAÇÃO REPRESENTANDO REGIÕES CRISTALINAS E AMORFAS DA CELULOSE (GENÉRICA).

FONTE: Adaptado de Rajala *et al.* (2015)

É possível realizar o ataque a regiões amorfas sob condições controladas, como: pela ação mecânica intensa (ABE *et al.*, 2007), tratamento com ultrassom (TISCHER *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2012), hidrólise ácida (BONDESON *et al.*, 2006) hidrólise enzimática (HAYASHI *et al.*, 2005) e mesmo por combinações dos métodos anteriores (PÄÄKKÖ *et al.*, 2007). O rompimento da celulose, por meios mecânicos, químicos ou enzimáticos, ocorre preferencialmente nas regiões amorfas.

### 3.1.3 Isolamento de nanocristais de celulose (NC) por hidrólise ácida

Nas hidrólises ácidas para o isolamento dos NC, geralmente, são utilizados o ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  – 64% m/m) (ARAKI *et al.*, 1999; ROMAN e WINTER, 2004; MAEDA *et al.*, 2007) em maior escala e, em menor proporção, o ácido clorídrico (HCl – 4 M) (BHATTACHARYA *et al.*, 1991; GEORGE e SIDDARAMAIAH, 2012). A hidrólise ocorre preferencialmente nas zonas amorfas (Figura 07-A), devido a razões já descritas (item 3.1.2).

O mecanismo é similar para ambos os ácidos (Figura 07-B) que quimicamente são fortes, pois em meio aquoso se ionizam, liberando prótons, que se ligam ao oxigênio glicosídico (caminho 1) ou ao oxigênio cíclico (caminho 2), seguido de quebra da ligação glicosídica pela água (RANBY *et al.*, 1949; MUKHERJEE e WOODS, 1953; BRAUN e DORGAN, 2009; LU e HSIEH, 2010).

No caso da hidrólise com ácido sulfúrico, produtos de sua ionização podem continuar reagindo (Figura 07-C), causando uma esterificação dos grupos hidroxilas na superfície dos NC, resultando numa adição de carga negativa aos NC (RANBY *et al.*, 1949; LU; HSIEH, 2010). Essa adição de carga gera uma suspensão mais estável do que a tratada com HCl, devido à repulsão eletrostática entre os grupos carregados, porém com estabilidade térmica inferior, sem contar a perda parcial das propriedades nativas da celulose (RANBY *et al.*, 1949; BECK-CANDANEDO *et al.*, 2005; BRAUN e DORGAN, 2009; LU e HSIEH, 2010).

Para que sejam produzidos os NC, as condições da hidrólise (temperatura, tempo de reação, concentração e quantidade do ácido) devem ser ajustadas. Caso

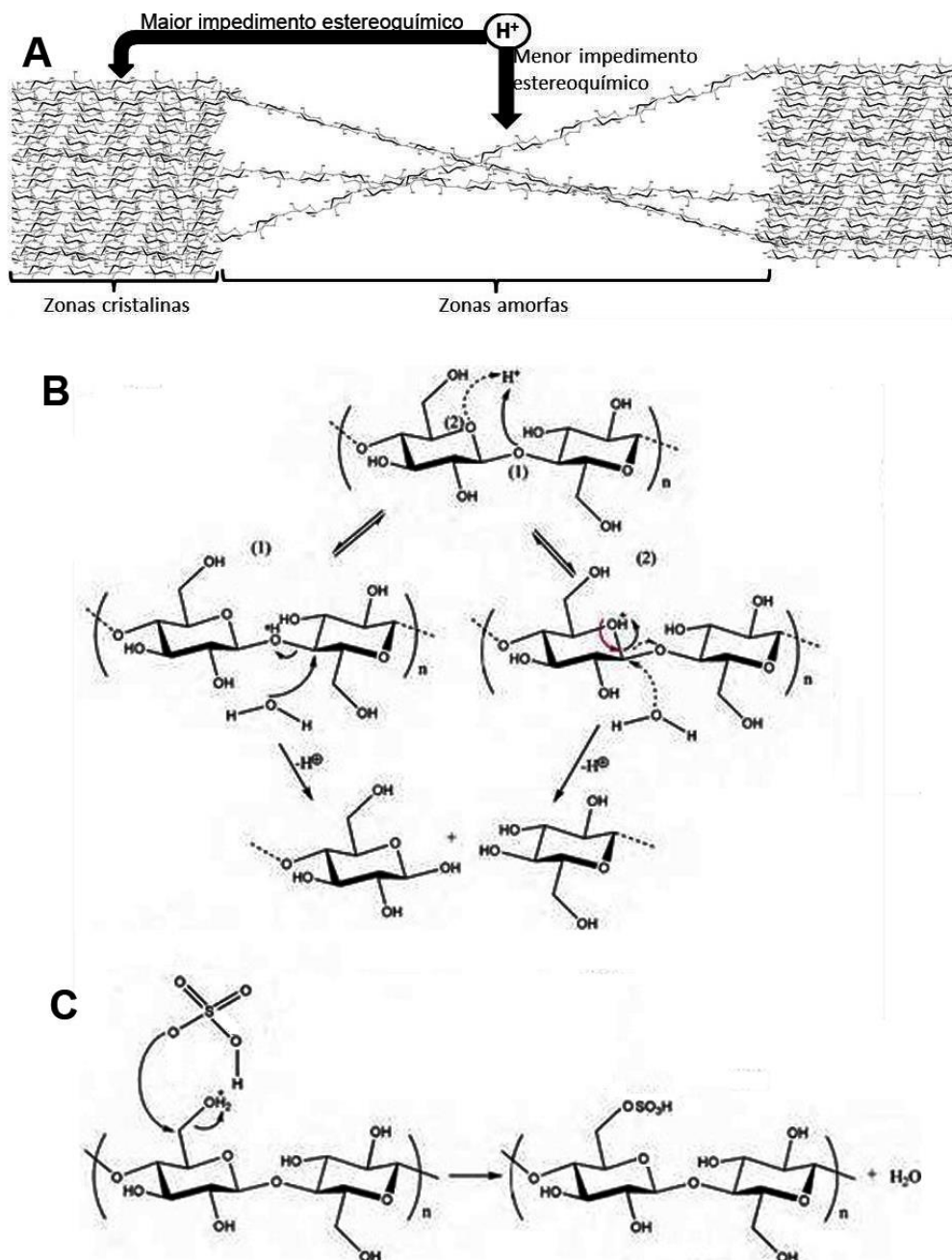


FIGURA 07 – MECANISMO GERAL DE HIDRÓLISE DE REGIÕES AMORFAS DA CELULOSE GENÉRICA

FONTE: Adaptado de Lu e Hsieh (2010)

MENOR IMPEDIMENTO ESTEREOQUÍMICO DAS REGIÕES AMORFAS PARA A REAÇÃO (A), MECANISMO DE DESPOLIMERIZAÇÃO DAS CADEIAS (B), E MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE POR PRODUTOS DA HIDRÓLISE COM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (C)

contrário, toda a celulose poderá ser hidrolisada em oligossacarídeos ou a celulose não ser hidrolisada suficiente para formar os NC.

A hidrólise ácida possui limitações para isolar os NC, como baixo rendimento ( $\pm 50\%$ ); e a perda da fidelidade da estrutura original feita por modificações como adições de carga a superfície dos NC (BRAUN e DORGAN, 2009; LU e HSIEH, 2010; KLEMM *et al.*, 2011; GEORGE e SIDDARAMAIAH, 2012). A hidrólise enzimática compensa essas limitações. As enzimas utilizadas (endoglucanases) se caracterizam por agir, geralmente, sobre as zonas amorfas, produzindo uma quebra aleatória das ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) e pouca liberação de carboidratos redutores (RAMOS *et al.*, 1992). Embora esse tipo de hidrólise apresente vantagens sobre a ácida, como maior rendimento e especificidade, ela apresenta um maior custo, o que ainda não é vantajoso industrialmente.

#### 3.1.4 Produção de nanocristais de celulose (NC)

Atualmente, a produção de NC representa um grande interesse na confecção de diferentes materiais diferentes aplicações, desde a utilização de materiais de reforço mecânico à produção de materiais biomédicos e mesmo materiais eletrônicos (GRISHKEWICH *et al.*, 2017). O método mais utilizado para o isolamento de NC consiste da hidrólise ácida da celulose por solução de ácido sulfúrico. A preferência desse método se deve, principalmente, à sua simplicidade e por resultar em NC com altíssima estabilidade coloidal em solução, devido a esterificação por grupamentos sulfatos em sua superfície (DONG *et al.*, 2016).

Embora a utilização de NC apresente um grande interesse, sua utilização e produção em escala industrial ainda são limitadas devido ao custo de produção (NC de origem vegetal custo  $\sim 10$  U\$/kg). Para os NC serem integrados e utilizados no mercado atual, existe uma necessidade da redução do preço a fim de se tornarem economicamente competitivos e comparáveis a outros produtos e nanopartículas (TRACHE *et al.*, 2017).

Existem diversas otimizações que estão sendo realizadas com o objetivo de diminuir o custo dos NC, visando principalmente otimizar as condições utilizadas durante o procedimento de hidrólise, como temperatura, concentração de ácido utilizada, tempo reacional (BRAUN e DORGAN, 2009; LU e HSIEH, 2010; KLEMM *et al.*, 2011; GEORGE e SIDDARAMAIAH, 2012). Entretanto, parte da metodologia



utilizada para o isolamento de NC, consiste de previamente submeter a celulose ao processamento mecânico com o objetivo de aumentar a área superficial das fibras em contato com a solução ácida. O processamento mecânico, muitas vezes, é realizado através de moinhos e sua utilização pode impactar no custo final de produção.

### 3.2 CELULOSE COMO SUPORTE PARA UTILIZAÇÕES DE IMUNODIAGNÓSTICOS

Testes imunodiagnósticos são testes capazes de realizar a detecção de moléculas alvos (ex. antígenos, anticorpos) em amostras complexas (ex. sangue, soro, urina), através de uma sonda (ex. anticorpos, enzimas, antígenos) que apresente uma altíssima afinidade com a molécula a fim de ser detectada (JOHNSON e KRAUSS, 2017). A sonda, geralmente, é imobilizada em um suporte sólido ou mesmo em micro ou nanopartículas. Devido as propriedades físico-químicas das amostras complexas, suportes com biocompatibilidade são requeridos. Tradicionalmente, devido a facilidade de produção em maior escala, polímeros sintéticos (de origem petrolífera) são utilizados. Recentemente, com o avanço da tecnologia, materiais de fonte renovável, como celulose nativa, estão mais próximos de serem utilizado em escala (JOHNSON e KRAUSS, 2017).

### 3.3 FILMES CELULÓSICOS NO USO DE DIAGNÓSTICO

A celulose nativa (celulose natural sem modificações) apresenta diversas propriedades físico-químicas interessantes no desenvolvimento de suportes para diagnóstico como, por exemplo, apresentar superfície hidrofílica, alto módulo de elasticidade (> 20 GPa), alta estabilidade, alta biocompatibilidade, baixo custo e abundância (produção de ~700 bilhões de toneladas por ano) (MOON *et al.*, 2011).

A sua primeira utilização descrita na literatura se dá no final da década de cinquenta por FREE *et al.* (1957), no qual os autores desenvolveram o primeiro suporte para diagnóstico, onde era possível verificar através da atividade da enzima glucose-oxidase imobilizada a presença de glucose em amostras de urina. A utilização

da celulose no desenvolvimento de testes de imunocromatografia por capilaridade foi demonstrada mais tarde primeiramente por Zuk *et al.* (1985), no qual era possível verificar a detecção do antígeno pela adição de um substrato adicional. Tornando o procedimento ainda mais barato, mais tarde foi realizada o desenvolvimento de testes diagnósticos a base de celulose pela imobilização de moléculas sonda através de jatos de tinta por impressoras comuns (BRUZEWICZ *et al.*, 2008).

Embora já tenha sido demonstrado a longa data o potencial da celulose nativa para utilização no desenvolvimento de testes imunodiagnósticos, conhecimentos específicos como, interação de superfície, reações de imobilizações de sonda, e caracterização da superfície das amostras ainda é escasso. Uma vez que existe um maior entendimento sobre essas características mencionadas acima, novos suportes podem ser desenvolvidos a fim de melhorar a capacidade de utilização desses testes.

Atualmente, vem sendo dada uma maior atenção a celulose na forma nanofibrilar e os NC. Esse interesse se deve principalmente as dimensões em escala nanométrica, o que permite a ampliação da aplicação como, por exemplo, a construção de nanofilmes com maior homogeneidade. Como a celulose nativa, a celulose nanofibrilar e os NC apresentam facilidade de modificação química, podendo ser adicionados grupos funcionais para serem adaptados a diferentes aplicações (ex: adição de grupamentos R-COOH, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) (MAJOINEN *et al.*, 2014).

Na presente tese foram realizados, testes de formação de nanofilmes à base de xiloglucana (XG) e NC.

### 3.4 XILOGLUCANA (XG)

As xiloglucanas (XG) são polissacarídeos que podem ser encontrados em fontes vegetais (por ex. *Tamarindus indica*, *Hymenaea courbaril*). Apresentam função estrutural e de reserva na parede celular e no endosperma de sementes de plantas mono e dicotiledôneas (HAYASHI *et al.*, 1987), constituindo até 25% em massa (HEINZE, 2005).

Devido as suas propriedades reológicas e por apresentarem baixa toxicidade, as XG têm um grande potencial de uso nas indústrias alimentícias (BHATTACHARYA

*et al.*, 1991; MAEDA *et al.*, 2007), farmacêutica, médica e cosmética, entre outras (BURGALASSI *et al.*, 1996; ITOH *et al.*, 2008).

Sua estrutura consiste em uma cadeia principal de glucopiranosos conectadas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) com ramificações em C-6 por  $\alpha$ -D-xilopiranosose. Dependendo da origem da fonte de XG ela ainda pode apresentar mais substituições no C-2 da xilose por  $\beta$ -D-galactopiranosose (Figura 08), ou ainda uma terceira substituição no C-2 da galactose por  $\beta$ -D-fucopiranosose (MCNEIL *et al.*, 1984; FRY, 1989; HAYASHI, 1989), ou outras combinações gerando estruturas mais complexas (YORK *et al.*, 1996; HANTUS *et al.*, 1997; JIA *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2005)..

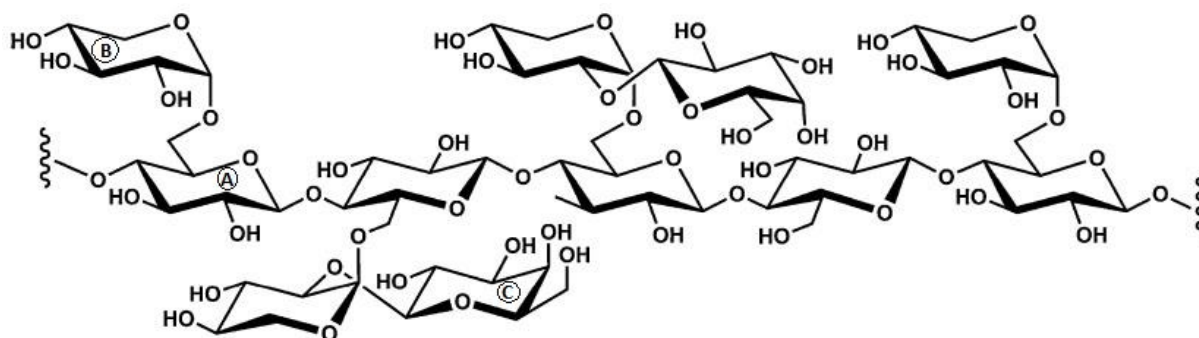


FIGURA 08 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA XILOGLUCANA DE SEMENTES DE TAMARINDO

FONTE: Adaptado de Eronen *et al.* (2011)

UNIDADES DE GLUCOSE (A), XILOSE (B) E GALACTOSE (C)

As ramificações presentes, nesse polissacarídeo, contribuem para sua solubilidade e controlam potencialmente a sua flexibilidade conformacional (O'NEILL *et al.*, 1989; HAYASHI *et al.*, 1994; FREITAS *et al.*, 2011).

As XG de reserva na parede celular vegetal se acumulam predominantemente nos tecidos dos cotilédones de algumas espécies de vegetais como tamarindo (*Tamarindus indica*) (KOOIMAN, 1960), jatobá (*Hymenaea courbaril*) (KOOIMAN, 1960; LIMA *et al.*, 1993; LIMA *et al.*, 1995; FREITAS *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2011), jojoba (*Simmond siachinensis*) (HANTUS *et al.*, 1997), jatobá mirin (*Guilbortia hymenefolia*) (LUCYSZYN *et al.*, 2011), e copaíba (*Copaifera langsdorfii*) (BUCKERIDGE *et al.*, 1992; STUPP *et al.*, 2008). Entretanto, a principal fonte explorada comercialmente é a de sementes de tamarindo, que é muito utilizada em

alimentos em países como o Japão (MICHAEL e REID, 2006) sendo, também, a mais estudada.

#### Xiloglucana de *Tamarindus indica*

O *Tamarindus indica* é popularmente conhecido como tamarindo e é classificado botanicamente de acordo com a Figura 09.



FIGURA 09 – CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DE *Tamarindus indica* E ILUSTRAÇÃO DAS PARTES DAS PLANTAS  
 FONTE: Raintree (2012)  
 A) ÁRVORE E TRONCO. B) FLORES, C) FLORES, D) VAGENS

Tem origem das savanas africanas, embora seja mais cultivada atualmente na Índia, as XGs das sementes dessa planta são utilizadas, principalmente, nas indústrias têxteis e alimentícias, e ainda como adesivo e agente emulsificante, em cosméticos, para preparar emulsões de óleos essenciais, cremes de barbear e dentifrícios, em produtos farmacêuticos, como ligantes em comprimidos e drágeas, em inseticidas, para emulsificar princípios ativos e óleos minerais. Por possuir muitas propriedades similares às pectinas, é usada em tratamento de colite, diarreia, disenteria e outras desordens intestinais (RAO, 1973).

### 3.5 INTERAÇÃO ENTRE XILOGLUCANA E CELULOSE

É sugerido, em literatura, que a interação irreversível em meio aquoso sob condições normais de temperatura e pressão entre XG e celulose, se deve a um grande número de ligações de hidrogênio entre esses polissacarídeos, dada pela similaridade da composição das unidades glucosídicas (LIMA e BUCKERIDGE, 2001). De fato, novos modelos moleculares suportaram essa hipótese, embora alguns estudos tenham divergido se a interação intercadeia era mediada pelo anel das unidades de glucose ou pelo empilhamento de ligações de hidrogênio (FINKENSTADT *et al.*, 1995; MICHAEL e REID, 2006). Alguns autores usando modelos computacionais e testes de adsorção sugeriram que a presença de unidades de fucose na XG determina a sua conformação planar e que essa propriedade estaria relacionada com a afinidade dela com a celulose. Substituições por galactomananas em altas quantidades, também, demonstraram alterar essa interação (FINKENSTADT *et al.*, 1995; SHIRAKAWA *et al.*, 1998; JEAN *et al.*, 2009; KÜMMERER *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011).

Lima, Loh e Buckeridge (2004) testaram a adsorção de diferentes oligossacarídeos de XGs (com e sem fucose) com diferentes massas molares em celulose microcristalina (semelhante aos NC, porém com tamanhos a partir de 1  $\mu\text{m}$ ) demonstrando que a capacidade de interação depende não somente das unidades das cadeias laterais, mas, também, da massa molar da XG. Sendo que, quanto menor a massa molar da XG, maior foi a interação com a celulose microcristalina. Cerclier *et al.* (2010) em testes de adsorção de XG em NC por automontagem (*Layer by Layer – LBL*), demonstraram que a adsorção de XG ocorre melhor em concentrações elevadas ( $\geq 1\text{mg.mL}^{-1}$ ), devido à forma entrelaçada que esse polímero se encontra, porém ocasionando camadas muito heterogêneas e menos estáveis (Figura 10).

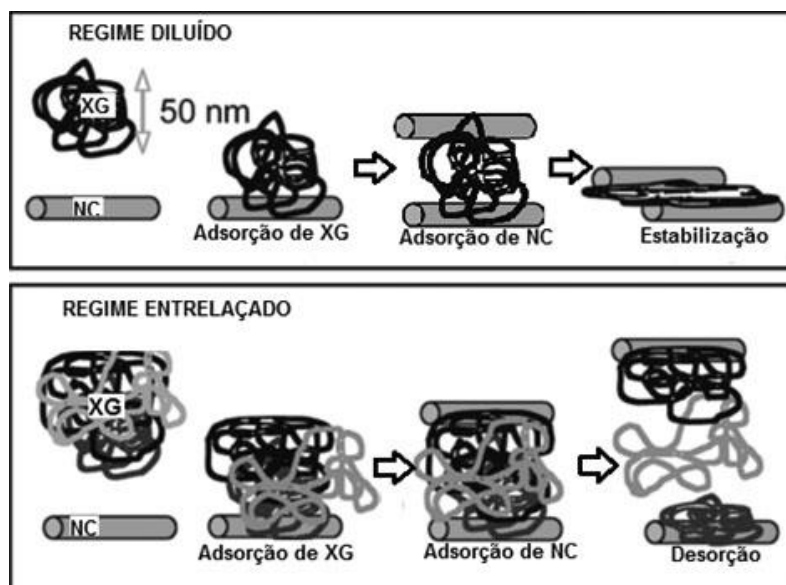


FIGURA 10 – ESQUEMA DE ADSORÇÃO DE XILOGLUCANA (XG) EM NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NC)  
 DIFERENÇA DA CONCENTRAÇÃO DE XG NA ESTABILIZAÇÃO ENTRE AS CAMADAS DEPOSITADAS EM **A) REGIME DILUÍDO E B) REGIME ENTRELAÇADO**  
 FONTE: Cerclier *et al.* (2010)

Bionanocompósitos na forma de filmes com microfibrilas de membrana de celulose bacteriana úmida e processada por agitação mecânica, com a incorporação de xiloglucana de tamarindo (XGT) foram desenvolvidos por de Souza *et al.* (2013) observando-se uma boa homogeneidade e melhoria do módulo de Young e das propriedades térmicas com a incorporação de 10% de XGT.

### 3.6 PRÍNCIPIOS BÁSICOS DE BIOSENSORES

Biossensores são dispositivos minituarizados, compostos basicamente de uma biomolécula sonda (ex. anticorpos, enzimas, antígenos, lectinas) capazes detectar com altíssima seletividade e afinidade moléculas alvos (ex. antígenos, sequências genéticas, anticorpos) características da presença de um microorganismo, patologias, contaminações. Para fins práticos, a sonda é imobilizada em um suporte e a detecção geralmente é acompanhada através de um equipamento que monitora a ligação da sonda com a molécula alvo, podendo o resultado ser quantitativo ou qualitativo (Figura 11). Os biossensores ainda podem ter um elemento adicional o transdutor, que

consiste de um suporte adicional no qual a detecção da molécula alvo é monitorada indiretamente.

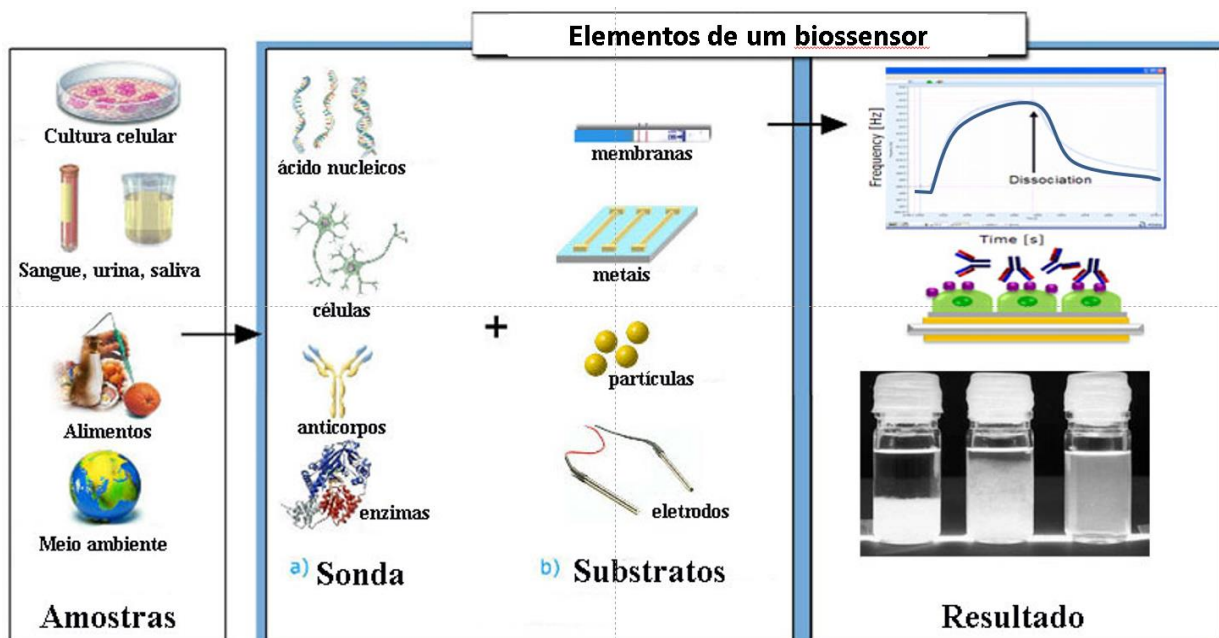


FIGURA 11 – ELEMENTOS BÁSICOS DE UM BIOSENSOR.  
 FONTE: Adaptado de Grieshaber *et al.* (2008)

### Tipos de biossensores

Dependendo da sonda utilizada no desenvolvimento do biossensor, os mesmos podem ser classificados em diferentes categorias (JOHNSON e KRAUSS, 2017):

- Enzimáticos: utilizam enzimas como sondas (ex. glucose oxidase para aferir concentração de glucose sanguínea) no qual o resultado é verificado pela ação da enzima no substrato;
- Imunobiossensores: utilizam antígenos ou anticorpos como sondas, no qual o resultado é verificado pela detecção da ligação antígeno-anticorpo (ex. detecção de proteína não-estrutural 1 (NS1) por anticorpo);
- Celulares: utilizam microorganismos como sondas, no qual o resultado é verificado pela ação dos microorganismos sob analitos investigados ou mesmo da alteração dos mesmo sobre a sonda;

Dependendo da estratégia pela qual o transdutor reconhece a molécula alvo, os biossensores ainda podem ser classificados em:

- Eletroquímicos: a detecção se dá por mudanças eletroquímicas avaliadas por potenciometria, amperometria e condutometria;
- Ópticos: a detecção se dá por mudanças nas propriedades ópticas das substâncias, como: absorção, índice de refração, fluorescência, fosforescência, refletividade e comprimento de onda ou mesmo alteração no comportamento coloidal de partículas (ex. aglutinação, precipitação, floculação);
- Calorimétricos: a detecção se dá através do monitoramento de trocas de calor (ex. reações enzimáticas exotérmicas acompanhadas de termosensores);
- Acústicos ou piezoelétricos: a detecção se dá por mudanças nos valores de frequência de cristais anisotrópicos (ex. quartzo) que apresentam propriedades piezoelétricas. O equipamento mais estudado e conhecido como biossensor acústico é a microbalança de cristal de quartzo (QCM), foco desta tese, e que será explicado em maiores detalhes a seguir.

#### Sondas: Anticorpos

As imunoglobulinas (Igs) ou anticorpos, são glicoproteínas apresentando morfologia em forma de Y, composta de uma ou mais unidades. Existem ao todo, cinco principais classes de Igs: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, discriminadas entre si de acordo com suas propriedades imunológicas e físico-químicas. As IgG, IgD e IgE são formadas por quatro cadeias polipeptídicas e IgA por duas e IgM geralmente por cinco. (JEFFERIS, 2009). Nessa tese, foram utilizadas Igs da classe IgG.

As IgG, como todas as proteínas, apresentam uma estrutura primária (compostas por sequência de aminoácidos), estrutura secundária (formada pelo enovelamento das cadeias polipeptídicas em  $\alpha$ -hélice ou  $\beta$ -folha), estrutura terciária (estrutura tridimensional) e estrutura quaternária (estrutura tridimensional formada por várias cadeias polipeptídicas). Sua estrutura tridimensional em morfologia de Y é composta pela união através de pontes dissulfeto e interações não-covalentes entre duas cadeias polipeptídicas pesadas idênticas ( $M_w$ : 50.000 g/mol cada) e duas cadeias leves ( $M_w$ : 25.000 g/mol cada) (BRADEN e POLJAK, 1995). As regiões amino



terminais das cadeias polipeptídicas apresentam maior variação na composição dos aminoácidos e as mesmas são denominadas como regiões variáveis, onde as outras regiões apresentam menor variação e são denominadas como regiões constantes. A composição de aminoácidos presente na região variável é a que determina a seletividade dos IgG com seu antígeno (PEAKMAN *et al.*, 2009). O ponto específico do antígeno que interage diretamente com a região variável do anticorpo é denominado de epítipo. A ligação antígeno-anticorpo, embora muito forte, é reversível principalmente em pH baixo (entre 2-3 dependendo do anticorpo) e forte força iônica (PEAKMAN *et al.*, 2009).

#### Imobilização de anticorpos em filmes celulósicos

Ligações covalentes são realizadas, principalmente, através de grupos nucleofílicos e eletrofílicos. Um grupo nucleófilo consiste de um átomo que contém um par de elétrons desemparelhados ou um excesso de elétrons livres disponíveis para doar um par de elétrons para um grupo eletrofílico (RITCHIE, 1972). A ordem relativa de nucleofilicidade da maioria dos grupos de biomateriais pode ser representada por:  $R-S^- > R-NH_2 > R-COO^- = R-O^- \gg -OH$  (RITCHIE, 1972).

A superfície de materiais celulósicos contém grandes quantidades de grupos -OH, os quais podem ser explorados para realizar a imobilização de proteínas. Entretanto, as proteínas apresentam em sua superfície uma grande quantidade de grupos  $R-NH_2$  (BORDO; ARGOS, 1991). A imobilização covalente de proteínas na superfície celulósica através de seus grupos -OH pode ser realizada através de um tratamento por diferentes reações químicas, como por carbonildiimidazol (STOLLNER *et al.*, 2002), epóxi (YOU *et al.*, 1995) e oxidação por periodato (VAN LEEMPUTTEN e HORISBERGER, 1974). Entretanto, todos esses tratamentos citados necessitam de um último passo de ativação em um solvente não polar. Esse problema pode ser contornado ao realizar a imobilização por grupos  $R-COO^-$  (AROLA *et al.*, 2012). Porém, a ligação covalente de  $R-COO^-$  não ocorre espontaneamente em água, devido à baixa nucleofilicidade desses grupos em água (HERMANSON, 2008).

Para realizar a imobilização de moléculas proteicas à grupos  $R-COO^-$  são geralmente utilizadas estratégias a fim de ativá-los, como a reação pelos reagentes 1-

etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (GRABAREK e GERGELY, 1990). O EDC reage com os grupos  $R-COO^-$  e adiciona um grupo intermediário O-acilureia, que é facilmente substituído por um ataque nucleofílico de uma molécula contendo um grupo  $R-NH_2$  (Figura 12).

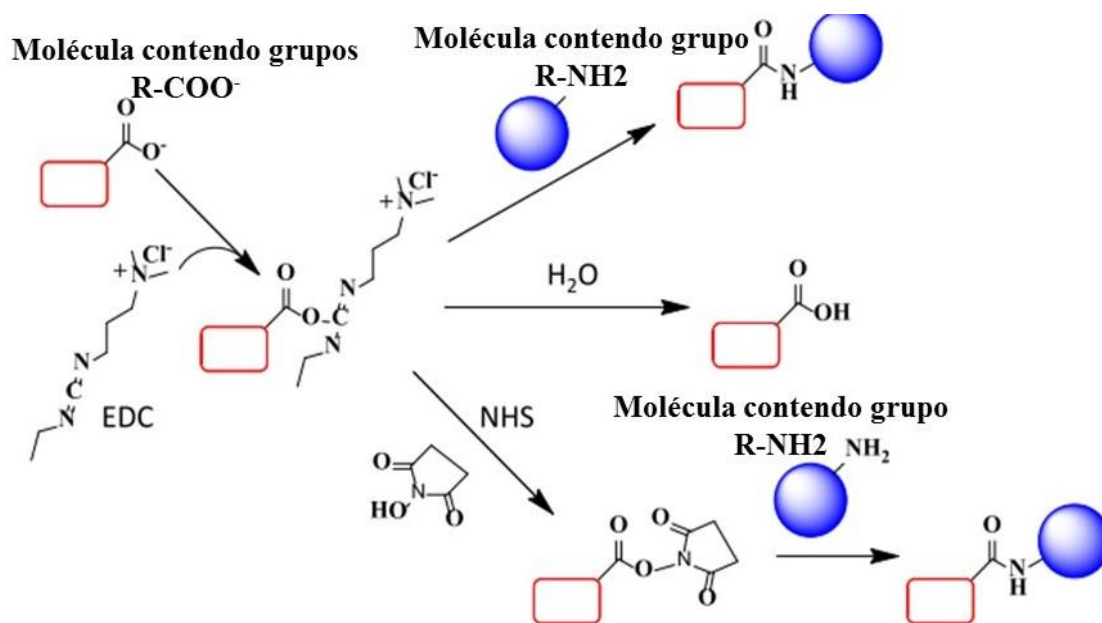


FIGURA 12 – ESQUEMA DE ATIVAÇÃO POR SOLUÇÃO DE EDC+NHS DA SUPERFÍCIE COM INTERFACE  $R-COO^-$  PARA IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE MOLÉCULAS COM INTERFACE  $R-NH_2$ . CAMINHOS ALTERNATIVOS DA REAÇÃO (SEM ADIÇÃO DE NHS) SEM A UTILIZAÇÃO DE NHS ESTÃO ILUSTRADOS.

FONTE: Adaptado de Orelma (2012).

Porém, o grupo O-acilureia formado é instável e sofre hidrólise rapidamente em meio aquoso, sendo liberado no meio antes de sofrer o ataque nucleofílico por  $R-NH_2$  (RITCHIE, 1972). Assim, a hidrólise da O-acilureia pode ser prevenida adicionando a reação o reagente N-hidroxissuccinimida (NHS), o qual substitui o grupo por um grupo amina reativo de éster de NHS (PALAZON *et al.*, 2014). Esse grupo de éster de NHS é mais estável em meio aquoso e gera maiores rendimentos na imobilização de moléculas proteicas. Recentemente, Palazon *et al.* (2014) realizaram uma nova otimização de imobilização de moléculas contendo grupos  $R-NH_2$  em superfícies com grupos  $R-COO^-$ , através da reação de ativação por EDC+NHS. Foi determinado que o meio de EDC+NHS, em  $pH < 5$ , é crucial para determinar o maior

rendimento da reação, e a utilização de um meio tampão como acetato de sódio (NaOAc) é recomendável para essa reação.

### 3.7 DENGUE

Os vírus da dengue (DENV) são arborvírus, classificados no gênero *Flavivirus*. São divididos em quatro principais tipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, numeração dada pelo número de antígenos que os vírus têm em comum (DARWISH *et al.*, 2015). Uma pessoa é infectada por DENV por picadas de mosquitos do gênero *Aedes*, o qual picou uma pessoa ou animal infectado. Uma pessoa que é infectada por um tipo de dengue adquire imunidade somente ao tipo infectado, e apresenta uma imunidade cruzada de curta duração contra outro sorotipo (DARWISH *et al.*, 2015). A infecção por dengue é classificada pela Organização Mundial da Saúde (2016) em dengue (D), dengue hemorrágica (DH) e síndrome do choque da dengue (DSH), sendo DH e DSH dado a complicações mais severas por reinfecções por outros tipos virais (DARWISH *et al.*, 2015).

Estruturalmente, os DENV apresentam envelope viral com morfologia esférica (50 nm de diâmetro) e possuem uma única sequência de RNA de aproximadamente 11.000 nucleotídeos com apenas uma janela de leitura. A sequência na célula infectada é traduzida em uma única poliproteína precursora que é composta da seguinte sequência NH<sub>2</sub>-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-COOH. Inicialmente, procedimentos proteolíticos pós e co-traducionais geraram três proteínas estruturais que compõe o vírus (C, prM e E). O nucleocapsídeo que envelopa o RNA viral é formado pela proteína C e é, em seguida, envelopado por uma bicamada lipídica, e pelas proteínas prM e proteína E. O restante das proteínas, são proteínas não estruturais e são essenciais para a replicação, montagem e proteção contra o sistema imunológico. As proteínas NS2A à NS5 são produzidas no citoplasma para auxiliar na síntese do RNA viral. A proteína NS1, entretanto, é sintetizada no retículo endoplasmático, e sua função ainda é foco de debate, embora seja conhecido que pequenas mutações nessa proteína levem a inibição da síntese do RNA viral, sendo uma proteína altamente conservada entre os quatro sorotipos (DARWISH *et al.*, 2015).

## Diagnóstico de dengue utilizando métodos convencionais e biossensores

Atualmente, os principais métodos disponíveis para o diagnóstico da infecção pelo DENV são o isolamento viral, a detecção por técnica de ELISA de IgM e IgG, a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e a imunocromatografia (PARKASH e SHUEB, 2015). Embora essas técnicas apresentem excelente precisão, às limitações como alto custo, necessidade de mão de obra altamente qualificada e elevado tempo de análise, o diagnóstico de pacientes em estágio inicial pós-infecção ainda representa um desafio (PARKASH e SHUEB, 2015). Assim, o desenvolvimento de métodos mais baratos e portáteis como biossensores e testes rápidos são uma prioridade para países afetados. Uma breve linha de tempo referente aos diferentes métodos propostos para o diagnóstico da dengue está ilustrada a seguir (Figura 13).

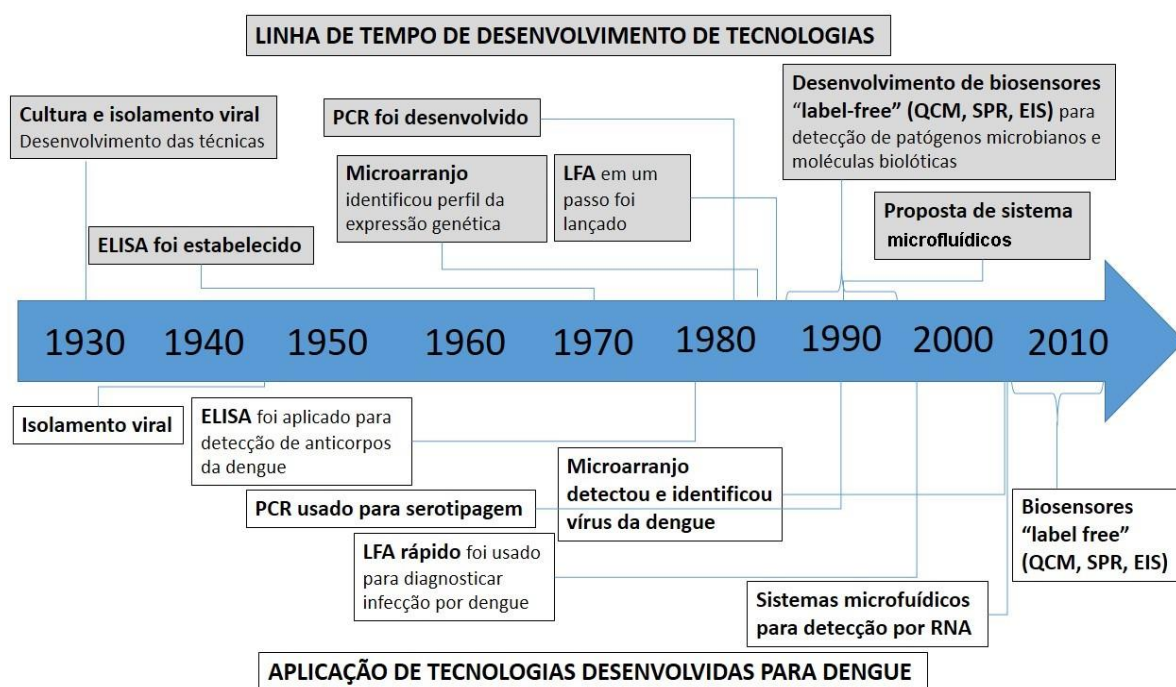


FIGURA 13 – CRONOLOGIA DA HISTÓRIA SOBRE O DIAGNÓSTICO DA DENGUE. ABREVIações: **ELISA**: ENSAIO IMUNOABSORVENTE DE ENZIMA-LIGADA, DO INGLÊS *ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*; **PCR**: REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE, DO INGLÊS *POLYMERASE CHAIN REACTION*; **LFA**: ENSAIO DE FLUXO LATERAL, DO INGLÊS *LATERAL FLOW ASSAY*; **SPR**: RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE, DO INGLÊS *SURFACE PLASMON RESONANCE*; **EIS**: ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA, DO INGLÊS *ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY*. **QCM**: MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO, DO INGLÊS *QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE*. FONTE: Adaptado de Zhang et al. (2015).

Existem diferentes marcadores que podem ser utilizados para a detecção do DENV. Entre eles, está a proteína NS1 que vem sendo utilizada principalmente como uma promissora estratégia para detecção da dengue. Por ser altamente conservada e presente nos 4 sorotipos da dengue, a detecção da NS1 pode ser utilizada para o diagnóstico de todos os sorotipos. Além disso, a NS1 pode ser empregada para o diagnóstico desde o primeiro dia de infecção, em primeira e mesmo em uma segunda infecção. Diferentes técnicas para imobilização de sondas contra o NS1 em diferentes superfícies estão atualmente em desenvolvimento e estudo. Ainda existe uma grande necessidade de melhorar a superfície desses suportes, com a introdução de grupamentos funcionais que possam facilitar a imobilização dessas sondas ou aumentar a área superficial para um melhor reconhecimento (PARKASH e SHUEB, 2015). Assim, tendo como objetivo facilitar o diagnóstico precoce de DENV, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novos biossensores.

#### Biossensores piezoelétricos para dengue

A ideia da utilização da técnica de QCM para diagnóstico de dengue não é algo novo. Su *et al.* (2003) demonstraram, inicialmente, a utilização de simples QCM para detecção dos antígenos NS1. Nesse estudo verificaram que esse imunossensor foi capaz de ampliar em 100 vezes a sensibilidade da técnica em relação aos métodos clássicos de detecção como o ELISA em um tempo reduzido de aproximadamente trinta minutos de ensaio.

Mais tarde, outro grupo de pesquisadores de forma similar, imobilizaram anticorpos específicos para reconhecimento dos antígenos da proteína E e NS1 de dengue (WU *et al.*, 2005). Entretanto, nesse estudo, conseguiram verificar a detecção não somente com antígenos purificados, mas também em amostras reais. Em tentativas de resolverem problemas de interferências causadas por amostras complexas como o soro sanguíneo humano, realizaram um pré-tratamento do soro com colunas de gel de azul de cibacron 3GA, com a finalidade de remover parcialmente albumina do soro. Com essa estratégia, conseguiram reduzir a necessidade de diluição do soro em dez vezes, comparativamente sem a utilização do pré-tratamento. Mais tarde, foi utilizada uma nova técnica de desenvolvimento de

biossensores, com receptores artificiais moldados em forma de filme com altíssima especificidade de reconhecimento ao antígeno NS1 (DIAS *et al.*, 2013). Nessa superfície foi possível detectar o NS1 sem a necessidade de diluição do soro sanguíneo, com um limite de detecção entre 1 a 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A sonda artificial é uma alternativa à imobilização de anticorpos, entretanto com maior custo. Em outro estudo, foi avaliada a imobilização de duas diferentes sondas à base oligonucleotídeos em superfície de ouro. Uma das sondas apresentava função de amplificação de bases oligonucleotídeos específicas de dengue e a outra sonda realizava a detecção através de oscilação na frequência no QCM (RAI *et al.*, 2012).

A utilização de QCM como biossensor para diagnóstico ainda está em desenvolvimento, apresentando problemas, principalmente, em relação à especificidade e seletividade em amostras complexas. Mas, essa técnica representa vantagens como baixíssimo custo, fácil operação, rápida detecção e portabilidade.

### 3.8 PRINCIPAIS TÉCNICAS PARA CARACTERIZAR BIOPOLÍMEROS E/OU BIOSSENSORES

#### Microbalança de cristal de quartzo

O efeito piezoelétrico de alguns materiais, descoberto no início do século 19, onde os físicos Jacques Curie e Pierre Currie verificaram que cristais anisotrópicos e sem um centro de simetria possuem a capacidade de formar um dipolo elétrico através de forças mecânicas. Esse efeito, conhecido como piezeletricidade também é válido para o estímulo reverso, onde os cristais podem apresentar oscilação mecânica repetitiva através da aplicação de voltagem oscilatória ao material. O ciclo de oscilação repetitivo foi, inicialmente, empregado para o desenvolvimento de relógios de altíssima precisão para navegação marítima. Entretanto, a oscilação gerada era extremamente sensível a estímulos externos, o qual mesmo massas na ordem de  $\text{ng.cm}^{-2}$  modificavam a frequência. Foi verificado, que era possível calcular indiretamente a massa depositada na superfície dos cristais piezoelétricos, e, já no início do século 20, esse efeito começou a ser utilizado em diferentes aplicações

tecnológicas (ex. interação entre moléculas, construção de filmes em nível molecular, biossensores) (JOHANNSMANN, 2015).

Entre os diferentes equipamentos que podem ser utilizados para construção de biossensores piezoelétricos, as microbalanças de cristal de quartzo (QCM) são as mais utilizadas devido a seu baixo custo, pois pode ser produzida em escala industrial e ser acessível a aquisição (JOHANNSMANN, 2015).

A técnica de QCM permite acompanhar mudanças de adsorção/dessorção de massa em tempo real com altíssima sensibilidade ( $\text{ng.cm}^{-2}$ ) e, no caso do QCM-D, obter informações a respeito de propriedades viscoelásticas da superfície dos filmes (Figura 14).

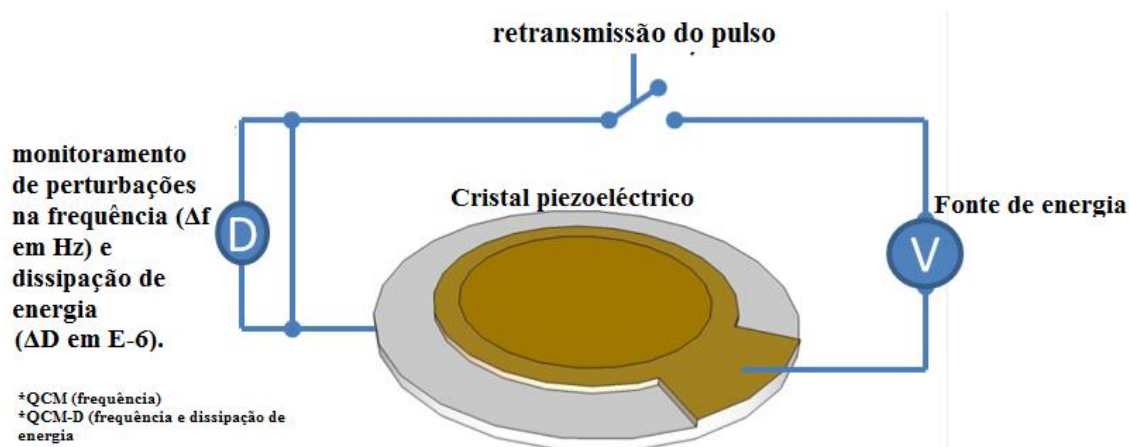


FIGURA 14 – PRINCÍPIO BÁSICO DE FUNCIONAMENTO DE MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO COM (QCM-D) E SEM MONITORAMENTO DE DISSIPACÃO DE ENERGIA (QCM).  
FONTE: Adaptado de Johannsmann (2015).

O procedimento de medida se baseia em monitorar mudanças na oscilação de frequência de ressonância ( $\Delta f$  em Hz) de um cristal de quartzo piezoelétrico e, no caso do QCM-D, na perturbação da dissipação de energia ( $\Delta D$  em  $E^{-6}$ ) (JOHANNSMANN, 2015). As alterações nesses dois valores ( $\Delta f$  e  $\Delta D$ ) estão em função do aumento e diminuição de massa adsorvida e mudanças nas propriedades viscoelásticas sobre a superfície do cristal, respectivamente (Figura 15).

A massa adsorvida na superfície ( $\Delta m$ ), para camadas rígidas é proporcional a perturbações na frequência de ressonância do cristal, de acordo com a equação de Sauerbrey (SAUERBREY, 1959):

$$\Delta m = -\frac{C\Delta f}{n}$$

Onde, C é uma constante relacionada a sensibilidade do dispositivo (17,7 ng. Hz<sup>-1</sup> para um cristal de quartzo de 5 MHz), e n é o número do harmônico. Entretanto, essa equação só é válida para camadas distribuídas homoganeamente sobre a superfície e se a camada adsorvida é pequena comparada à massa do cristal.

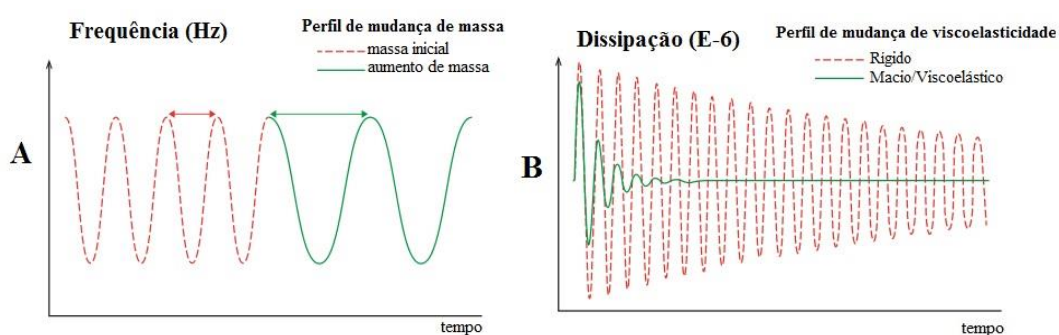


FIGURA 15 – EXEMPLIFICAÇÃO DE MUDANÇAS NOS VALORES DA FREQUÊNCIA E NA DISSIPAÇÃO DE ENERGIA EM FUNÇÃO DAS MUDANÇAS DE MASSAS. **(A)** PERTURBAÇÕES NA FREQUÊNCIA DE RESSONÂNCIA DO CRISTAL ( $\Delta f$ ) EM FUNÇÃO DE ALTERAÇÃO DE MASSA SOBRE A SUPERFÍCIE. **(B)** PERTURBAÇÃO NA FREQUÊNCIA DE RESSONÂNCIA DO CRISTAL APÓS RETIRAR A VOLTAGEM, OU PERTURBAÇÃO NA DISSIPAÇÃO DE ENERGIA ( $\Delta d$ ) EM MATERIAIS COM DIFERENTES VISCOELASTICIDADES. FONTE: Adaptado de Johannsmann (2015).

Para camadas que demonstram comportamentos viscoelásticos, a equação de Sauerbrey (SAUERBREY, 1959) pode gerar valores de massa superestimados. A dissipação de energia se baseia no perfil de decaimento em função do tempo da frequência de ressonância após realizar um breve desligamento do gerador piezoelétrico do equipamento. Materiais com alta viscoelasticidade terão uma maior dissipação de energia comparativamente a materiais mais rígidos. A dissipação de energia pode ser calculada a partir da seguinte equação:

$$D = \frac{E_{diss}}{2\pi E_{armaz}}$$



Onde,  $E_{\text{diss}}$  é a energia dissipada durante um ciclo de oscilação e  $E_{\text{armaz}}$  é a energia total armazenada pelo sistema.

Para a determinação real de massas adsorvidas em sistema viscoelásticos o modelo de Johansmann pode ser utilizado, o qual basicamente é uma extensão da equação de Sauerbrey (SAUERBREY, 1959) onde os coeficientes de viscoelasticidades são incluídos:

$$\delta f \approx -f_0 \frac{1}{\pi \sqrt{\rho_q \mu_q}} \left( f \rho d + J(f) \frac{f^3 \rho^3 d^3}{3} \right)$$

Onde,  $\delta f$  é a perturbação na frequência,  $f_0$  é a frequência fundamente do cristal piezoelétrico em ar,  $f$  é a frequência de ressonância em contato com o meio líquido,  $d$  é a espessura do filme,  $J(f)$  é o comprimento de cisalhamento e  $\rho$  é a densidade do fluido.  $\rho_q$   $\mu_q$  são a densidade e o módulo de cisalhamento do quartzo, respectivamente. Se a massa equivalente ( $m^*$ ) é introduzida na equação, é possível simplificá-la em uma equação mais prática:

$$m^* = - \frac{\sqrt{\rho_q \mu_q}}{2f_0} \frac{\delta f}{f}$$

Assim é possível obter:

$$m^* = \left( 1 + J(f) \frac{f^2 \rho d^2}{3} \right)$$

A verdadeira massa ( $m_0$ ) pode ser calculada assumindo que  $J(f)$  é independente da frequência. Dessa forma,  $m_0$  pode ser obtida através de um gráfico do intercepto de  $m^*$  versus o quadrado da frequência de ressonância ( $f^2$ ).

## Microscopia de força atômica

A técnica de microscopia de força atômica (AFM, do inglês *atomic force microscopy*) é uma técnica na qual através de interações (forças atrativas e repulsivas como Van der Waals, iônicas, pontes de hidrogênio), as distâncias muito curtas (0,2 a 10 nm) entre a ponta de uma sonda muito fina (feita geralmente por silício com um diâmetro inferior a 10 nm) com a superfície de um material, é possível obter dados de áreas nanométricas que incluem a topografia, a morfologia, e a homogeneidade de composição dessa superfície. O AFM foi inventado por Calvin Quate e Christoph Gerber em 1986 e se baseia no mesmo princípio da técnica de microscopia de tunelamento (desenvolvida no mesmo ano e premiada pelo prêmio Nobel em Física), embora a técnica de microscopia de tunelamento seja limitada somente para materiais bons condutores (ou semi) de eletricidade (BINNIG e ROHRER, 1987).

A sonda é suportada por um *cantilever* flexível, e, na análise, a ponta da sonda toca a superfície e o AFM registra as interações fracas entre a superfície do material e a sonda. Essas forças podem ser descritas pela lei de Hooke (RYCHLEWSKI, 1984):

$$F = -k x$$

Onde F é força, k é a constante de mola do cantilever e x é a deflexão gerada durante a varredura da superfície.

Os componentes básicos do equipamento AFM consistem de uma sonda, um cantilever, um escâner, um laser ( $\lambda = 635,5 \text{ nm}$ ), um processador de informações e um fotodetector (Figura 16).

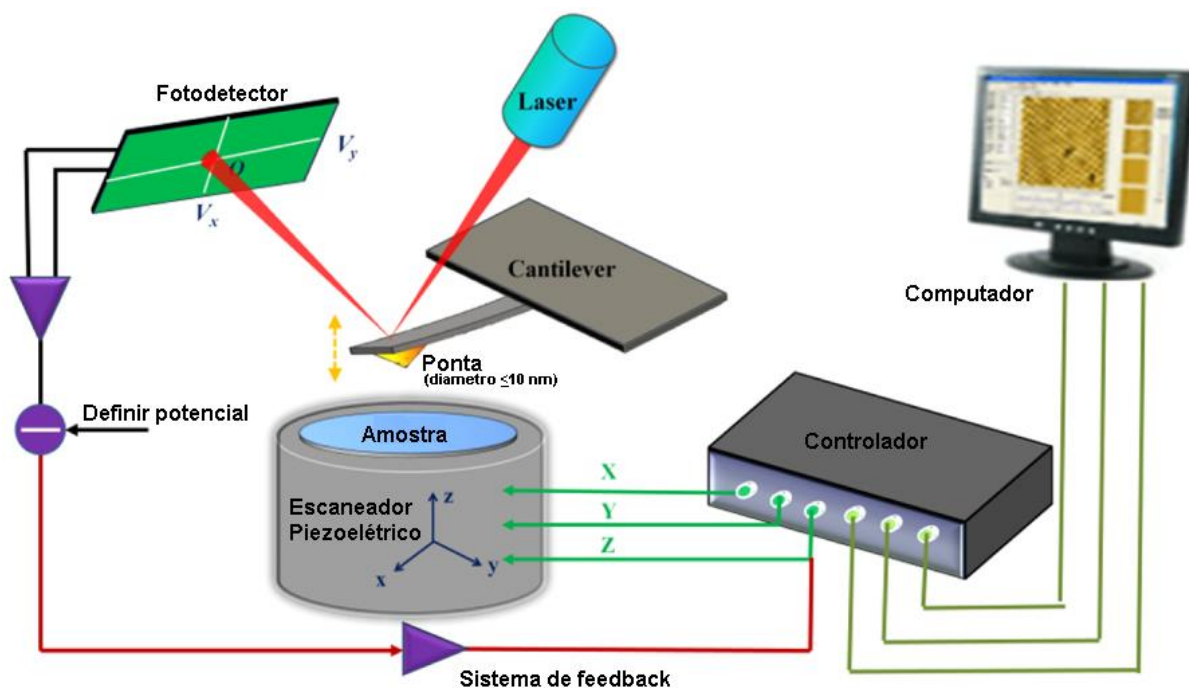


FIGURA 16 – COMPONENTES BÁSICOS DO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.  
 FONTE: Dan *et al.* (2014).

Interações entre a ponta-amostra geram oscilações horizontais e verticais no cantilever que são acompanhadas em tempo real através do reflexo do laser sobre a superfície do cantilever no fotodiodo. Existem diferentes formas de realizar “imagens” da superfície de uma amostra desejada. Esses modos podem fornecer diferentes informações da superfície e são dependentes da distância que a sonda fica da mesma, durante a análise. Há três principais modos, o modo contato (distância menor que 0,5 nm), modo contato intermitente (distância entre 0,5 a 2 nm) e modo não contato (distância entre 0,1 a 10 nm) (Figura 17 E Figura 18).

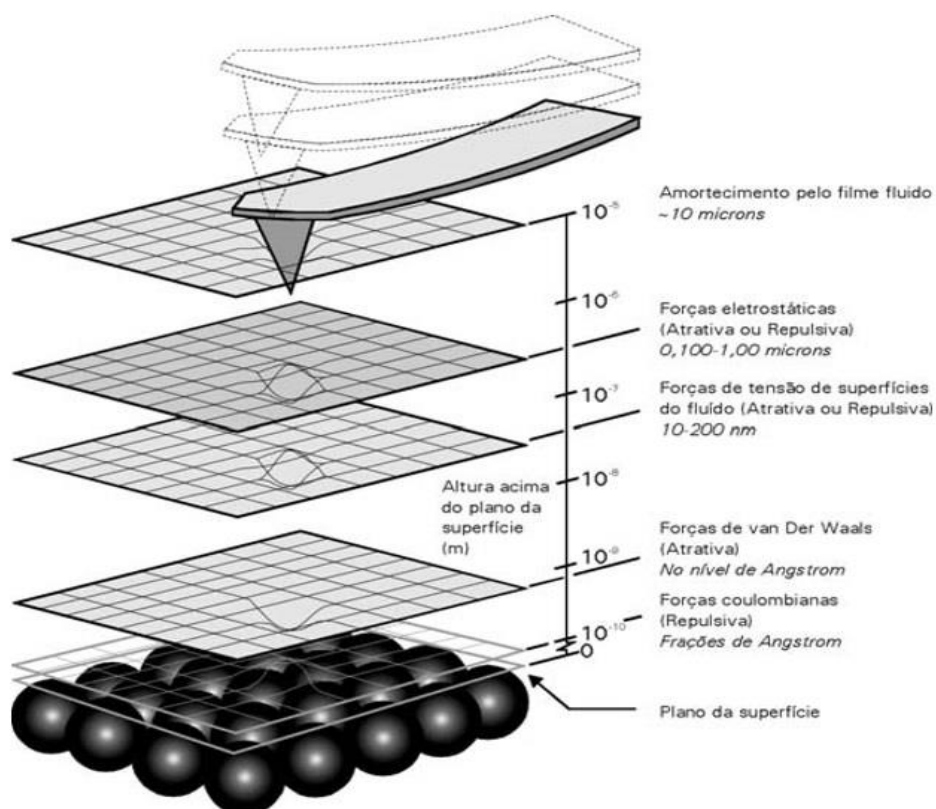


FIGURA 17 – ESQUEMA DE FORÇAS PREDOMINANTES ENTRE A PONTA DO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA E A SUPERFÍCIE DA AMOSTRA COM BASE NA DISTÂNCIA.  
 FONTE: Herrmann *et al.* (1999) .

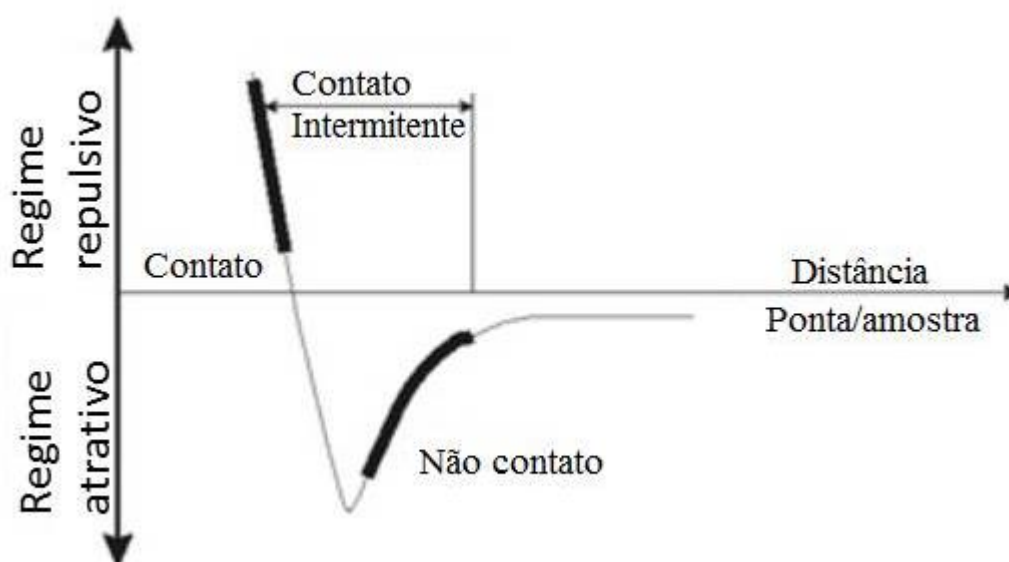


FIGURA 18 – FORÇAS E MODOS DE IMAGEM DE MICROSCÓPIA DE FORÇA ATÔMICA BASEADOS NA DISTÂNCIA PONTA/AMOSTRA.  
 FONTE: Fernandes *et al.* (2011).

No modo contato (regime repulsivo) se o valor da constante de mola do cantilever for menor do que da superfície ele irá oscilar. Nesse caso, a força exercida sobre a ponta será repulsiva (Figura 19). A imagem então é obtida indiretamente através das deflexões geradas no cantilever. Embora o modo contato apresente algumas vantagens por serem varreduras rápidas, as forças exercidas sobre a amostra (se for amostra macia) podem danificar a superfície (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

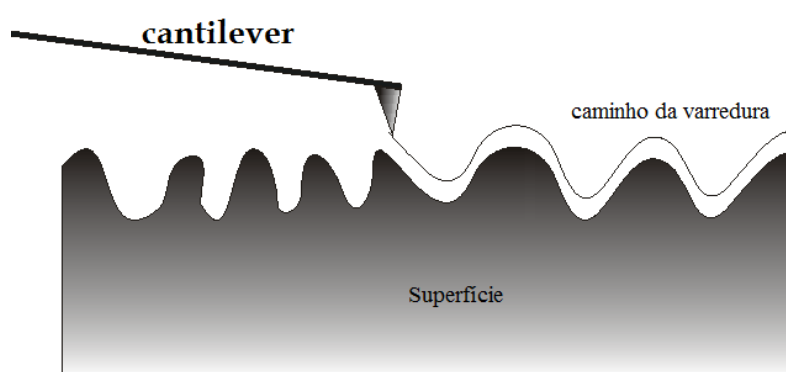


FIGURA 19 – MODO CONTATO DE VARREDURA POR MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.

FONTE: Adaptado de Oliveira *et al.* (2010).

O modo contato intermitente (Figura 20) é parecido com o modo contato, porém nesse modo o cantilever é submetido a uma frequência de ressonância constante e a topografia de imagem é formada através de alterações na frequência e deflexão do laser no fotodiodo. Devido a uma maior distância que a ponta fica da amostra, deflexões horizontais do cantilever são menos sensíveis, gerando um alargamento lateral da imagem real.

O modo contato é, geralmente, utilizado para amostras com estruturas frágeis (polímeros, filmes finos), que podem ser danificadas pela ponta da sonda. Esse modo apresenta ainda duas outras subdivisões das imagens obtidas pela varredura. As imagens de amplitude (ou altura), imagem obtida pelo ajuste verticais da oscilação do cantilever; e as imagens de fase, relacionadas a alterações na frequência de ressonância do cantilever ao varrer a superfície, que estão relacionadas à composição, homogeneidade, adesão e fricção da superfície analisada.

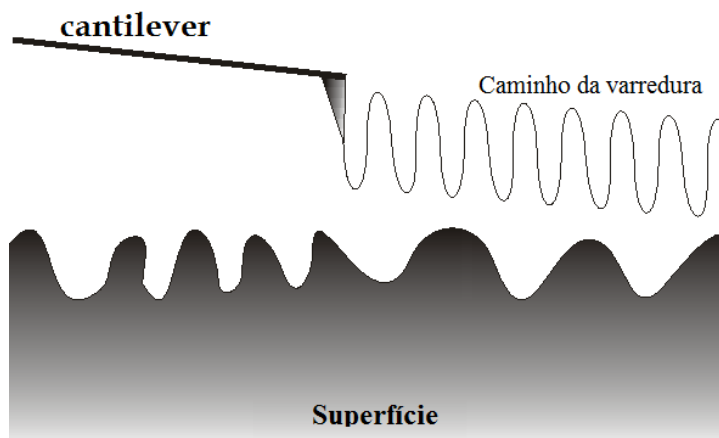


FIGURA 20 – MODO CONTATO INTERMITENTE DE VARREDURA POR MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.  
 FONTE: Adaptado de Oliveira *et al.* (2010).

O modo não contato (regime atrativo) é baseado no princípio que a ponta da sonda não toca a superfície da amostra, mas devido a forças atrativas ele oscila sobre a superfície (

Figura 21).

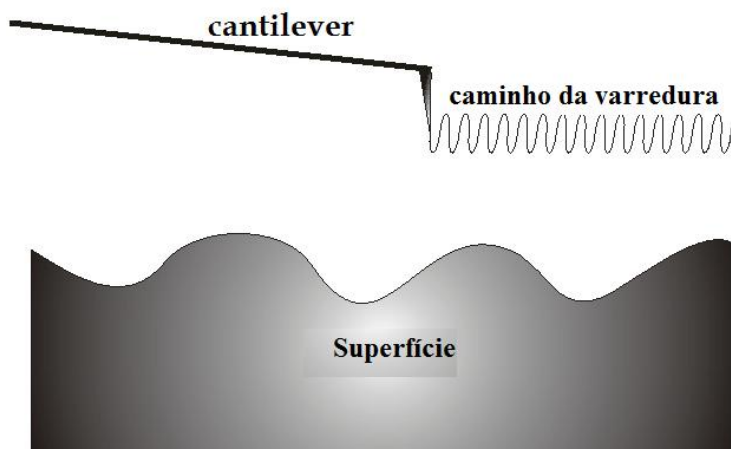


FIGURA 21 – MODO NÃO CONTATO DE VARREDURA POR MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.  
 FONTE: Adaptado de Oliveira *et al.* (2010).

Esse modo é o que menos exerce forças sobre a superfície, aumenta a vida útil da sonda e causa menores danos a superfície. Entretanto, varreduras realizadas por esse modo, devido à maior distância ponta-amostra são menos sensíveis, gerando imagens com menor resolução. Além disso, esse modo é sensível a quaisquer contaminantes na superfície (camadas de hidratação por H<sub>2</sub>O) e é preferível sua realização em atmosfera a vácuo (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Além das imagens utilizadas com base na deconvolução do cantilever é possível, ainda, obter informações relacionadas a viscoelasticidade da superfície da amostra, assim como mudanças em sua composição. A ponta irá interagir diferentemente em superfícies com diferentes composições, que gerará perturbações na frequência de ressonância do cantilever. Através do monitoramento das perturbações na frequência é possível estimar o grau de viscoelasticidade da superfície, através do ângulo de fase formado pela diferença da resposta na oscilação do cantilever com a amostra (Figura 22) (SCOTT; BHUSHAN, 2003).

Durante a varredura de uma superfície pela técnica de AFM, através deflexão do cantilever, é possível obter medidas em relação à altura e largura de uma superfície. Aproveitando-se da capacidade de medir a altura de uma superfície, alguns pesquisadores conseguiram realizar a medida da espessura de nanofilmes depositados sobre uma amostra (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

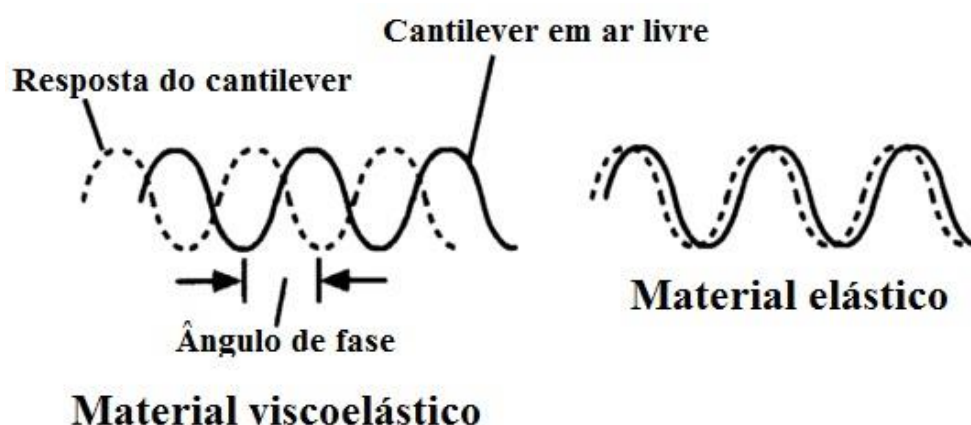


FIGURA 22 – DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES VISCOELÁSTICAS ATRAVÉS DE PERTURBAÇÕES NA OSCILAÇÃO DO CANTILEVER COM A AMOSTRA (ÂNGULO DE FASE) PELA TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.

FONTE: Adaptado de Scott e Bhushan (2003).

Realizando um corte retilíneo sobre um nanofilme (Figura 23-A), e medindo a diferença de altura entre a região removida e a superfície do nanofilme (Figura 23-B), é possível obter dados da espessura depositada sobre um substrato (Figura 23-C).

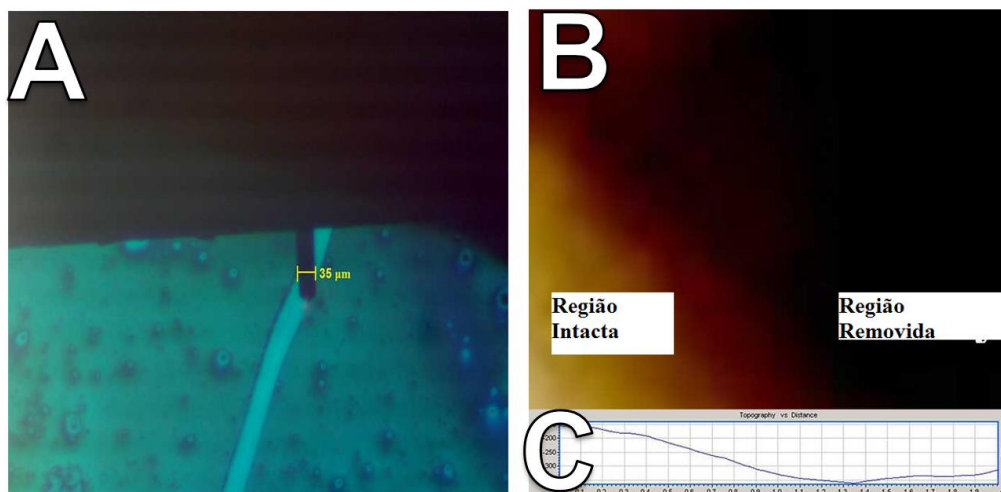


FIGURA 23 – MEDIDA DE ESPESSURA DE UM NANOFILME ATRAVÉS DE MEDIDAS DE VARREDURAS POR MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA. (A) CORTE REALIZADO SOBRE A SUPERFÍCIE, (B) (C) MEDIDA DE ALTURA ENTRE A REGIÃO REMOVIDA E A REGIÃO INTACTA.  
 FONTE: Pirich *et al.* (2015)

A ponta da sonda do AFM, geralmente, é composta por silício, e as forças exercidas entre amostra-ponta são causadas pelas interações desse material com a superfície desejada. Em aplicações mais sofisticadas, a ponta pode ser funcionalizada com outras moléculas que apresentem uma alta especificidade e seletividade para uma outra molécula como, por exemplo, a imobilização de anticorpos sob a superfície da sonda. Nesse exemplo, a sonda apresentará uma interação maior contra um antígeno específico (ex. específicos para diagnóstico de alguma doença, ou de materiais tóxicos em alimentos ou no meio ambiente). A exploração de uma superfície em busca pelo antígeno pode ser acompanhada em tempo real através de valores de espectroscopia de AFM, e apresentar alta sensibilidade na detecção e necessitar de pequenas quantidades de amostra (MAREAU, 2011).

Elipsometria



Na técnica de elipsometria (AZZAM; BASHARA, 1987) é medida a mudança do estado de polarização da luz após a reflexão de uma superfície isotrópica. Com essas mudanças, com um elipsômetro, é possível calcular mudanças na superfície refletora, como o crescimento de filmes com espessura na escala que pode chegar a ângstrons, dependendo da quantidade de ângulos e comprimentos de onda utilizado. O elipsômetro é composto basicamente de uma fonte de luz, um polarizador e um fotodetector da reflexão (Figura 24).

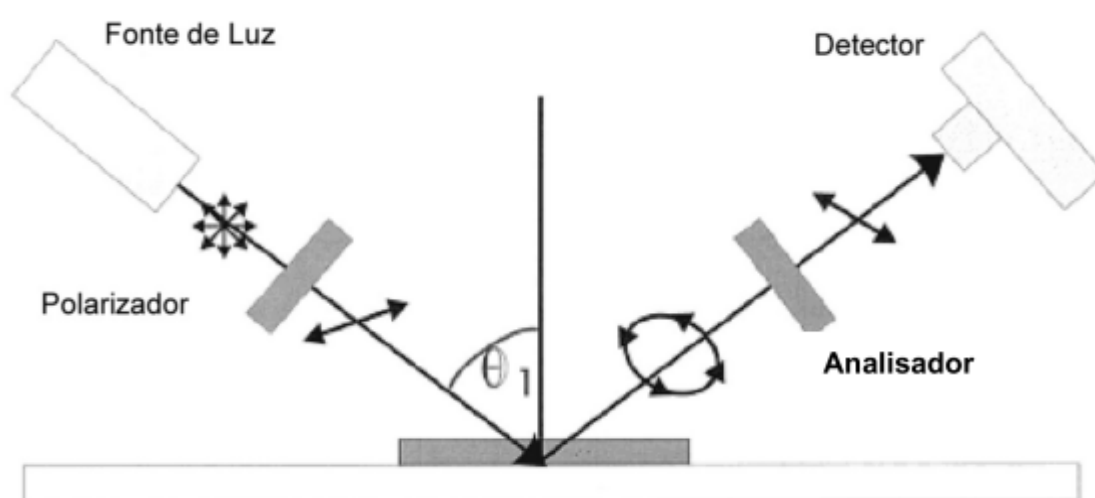


FIGURA 24 – DEMONSTRAÇÃO DE COMPONENTES BÁSICOS DE UM ELIPSÓMETRO.  
FONTE: ADAPTADO DE Ostroff *et al.* (1998)

Após a reflexão da luz polarizada com a superfície isotrópica ocorre um deslocamento de fase dos componentes paralelo e perpendicular do plano de incidência. A intensidade da reflexão é dependente das propriedades ópticas do material de base, da espessura e do índice de refração dos filmes sobre a superfície do material (OSTROFF *et al.*, 1998).

O aferimento do deslocamento de fase ( $\Delta$ ) e da amplitude da radiação ( $\psi$ ) é feito em relação à radiação incidente. Os parâmetros de  $\Delta$  e  $\psi$  são dependentes do comprimento de onda da radiação ( $\lambda$ ), do ângulo de incidência ( $\Phi$ ), da espessura ( $d$ ) e do índice de refração ( $n$ ) de um filme isotrópico e refletor. A equação que descreve essa relação, que é a fundamental da elipsometria está ilustrada a seguir:

$$\tan \psi e^{i\Delta} = f(n, d, \Phi \text{ e } \lambda)$$

Pela equação acima, da relação de Drude e Fresnel, de cálculos iterativos e das matrizes de Jones (AZZAM; BASHARA, 1987) é possível os cálculos dos valores de da espessura ( $d$ ) e do índice de refração ( $n$ ). Em casos que a espessura dos filmes possuem valores de  $\sim 1$  nm ou o contraste óptico não é suficiente para que os valores de  $n, d$  sejam calculados independentes um do outro, ainda é possível calcular a espessura do filme utilizando-se o índice de refração fixo, utilizando dados de literatura ou do fabricante.

### Difração de Raios-X

O fenômeno de difração é definido como o espalhamento da radiação eletromagnética obtido por centros de espalhamento com um arranjo periódico, apresentando essa, espaçamentos com mesma ordem de magnitude do comprimento de onda da radiação incidente (SMITH, 1981). Um difratômetro de raios-X é composto basicamente de uma fonte de emissão de raios-X e um detector giratório em graus em relação a radiação incidente (Figura 25).

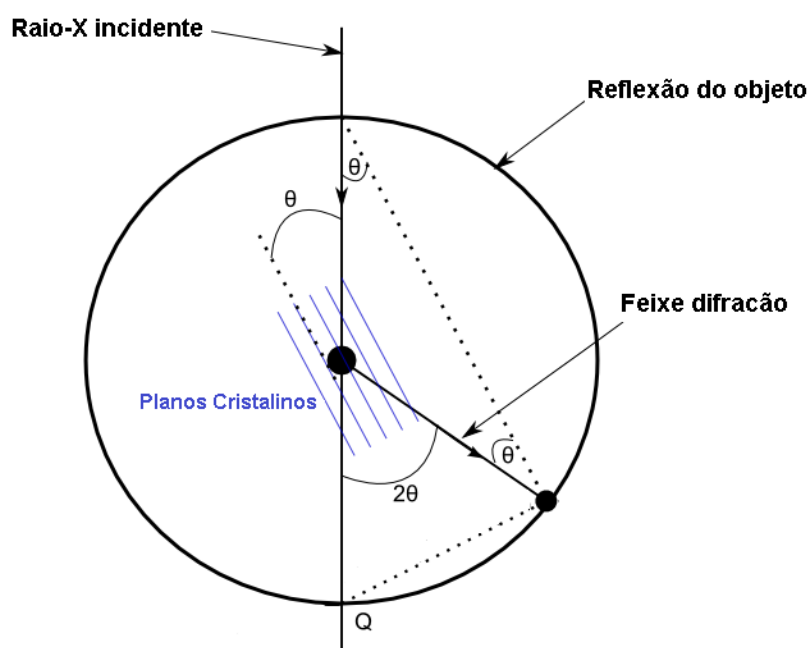


FIGURA 25 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM DIFRATOMETRO NA GEOMETRIA BRAGG-BRENTANO.  
FONTE: Smith (1981)

Em específico a radiação eletromagnética de comprimento de onda de raios-X, após ser difratada em uma amostra sólida, ela interfere de maneira construtiva e difrata pela rede cristalina do material.

Avaliando o perfil de difração em diferentes ângulos de observação, é possível obter algumas informações do material como: arranjo atômico e geometria Inter atômica (Figura 26). Essas informações podem ser utilizadas para calcular de forma quantitativa informações a respeito da cristalinidade de materiais, como tamanho dos cristalitos e/ou índice de cristalinidade do material.

Em meados de 1960, o perfil de difração de raio-X para polímeros foi intensamente estudado, em trabalhos em destaque de Ruland, Farrow e Wakellin (WŁOCHOWICZ; JEZIORNY, 1972). Trabalhos de Ruland resultaram na base de cálculo para interpretar os resultados obtidos pelo difratômetro de polímeros e foi a base para o desenvolvimento para determinar de forma quantitativa os valores de cristalinidade.

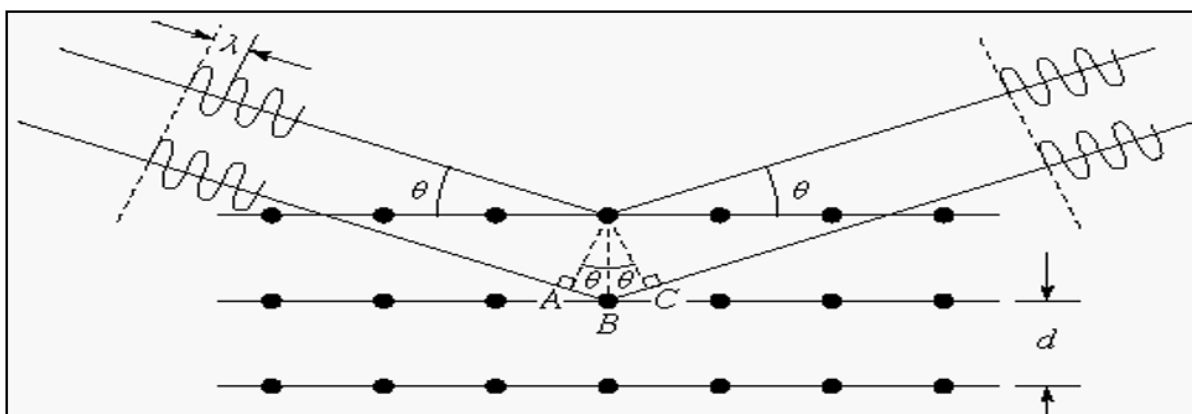


FIGURA 26 – ESQUEMA BÁSICO DA DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM UM MATERIAL COM PLANOS CRISTALINO  
FONTE: Smith (1981)

Através da relação entre as áreas dos picos cristalinos e do halo amorfo obtidos é possível calcular o índice total de cristalinidade (%C):

$$\%C = \left( \frac{I_c}{I_c + KI_a} \right) \cdot 100$$

Onde,  $I_c$  é a integração dos picos de difração;  $I_a$  é a integração do halo amorfo; e  $K$  é uma constante de proporcionalidade característica de cada polímero.

Em específico para celulose Segal *et al.* (1959) desenvolveram outro método para o cálculo do percentual das regiões cristalinas da celulose (%C). O método leva como base a diferença da intensidade entre o pico de maior intensidade ( $I_c + a$ ) e o pico de menor intensidade ( $I_c + a$ ) de acordo com equação:

$$\%C = \left( \frac{I_c + a - I_a}{I_c + a} \right) \cdot 100$$

#### Potencial zeta

O comportamento de coloides ou nanopartículas em suspensão, além das forças de van-der Waals, é influenciado por interações estéricas e eletrostáticas em sua superfície. O resultado da somatória de todas as forças exercidas sobre essas partículas, van-der Waals (negativa – atrativa) repulsão eletrostática (positiva – repulsiva), determinará a estabilidade das mesmas em suspensão, de acordo com a teoria da estabilidade de coloides pelas forças de van der Waals e as elétricas, mais conhecida como teoria de DLVO, em referência a Derjaguin-Landau e Verwey-Overbeek, que desenvolverem de forma independente a teoria nos anos 40 (OHSHIMA, 2010).

Além do efeito das forças repulsivas e atrativas, as partículas são influenciadas pela dupla camada formada por íons que a revestem (OHSHIMA, 2010). A primeira camada é composta por íons que se ligam fortemente à superfície das partículas, chamada camada de Stern e ao redor dessa camada, a camada difusa, é composta por íons fracamente atraídos pela camada Stern, que apresentam maior mobilidade (Figura 27).

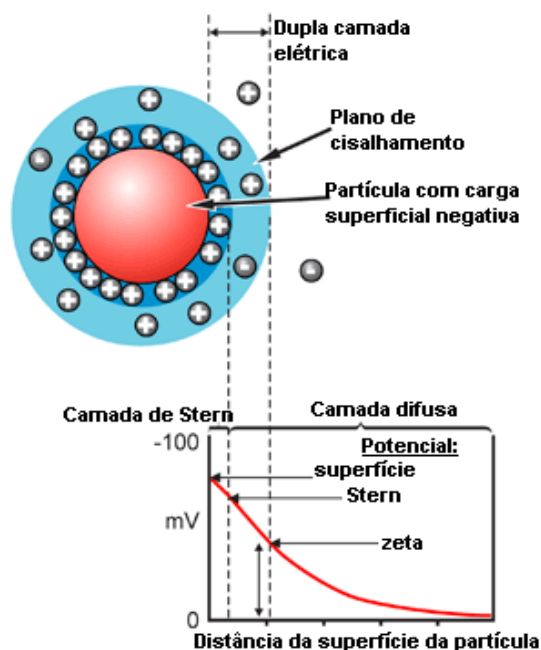


FIGURA 27 – DEMONSTRAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DA DUPLA CAMADA ELETRICA, CONTENDO CAMADA DE STERN, CAMADA DIFUSA E O PLANO DE CISALHAMENTO, NO QUAL É AFERIDO O POTENCIAL ELÉTRICO (POTENCIAL ZETA)

FONTE: Adaptado de Malvern (2017).

As duas camadas movem-se como se fossem parte da partícula em solução e do potencial elétrico formado no plano hidrodinâmico. O potencial elétrico (mV), localizado no plano de cisalhamento entre a camada difusa e a camada de Stern, é definido como potencial zeta ( $\zeta$ ) e seus valores estão relacionados principalmente a estabilidade de coloides e nanopartículas em solução, sendo definido genericamente um potencial de  $\pm 20$  mV para as partículas apresentarem estabilidade mínima. Além disso, é possível obter-se outras informações importantes, como interações com outros íons e macromoléculas adicionadas (OHSHIMA, 2010).

Existem vários métodos que podem ser empregados para medir o potencial zeta, sendo os mais utilizados: eletroforese, potencial de fluxo e instalações ultrassônicas. Na presente tese, foram utilizados os métodos eletroforético por efeito doppler a laser (**artigo 1**) e de potencial de fluxo (**artigos 2 e 3**).

### 3.8.1.1 Potencial zeta por método eletroforético por efeito doppler a laser

O método eletroforese por efeito doppler a laser, basicamente, consiste em aplicar-se uma diferença de potencial elétrico ao meio líquido e acompanhar o movimento eletroforético de partículas coloidais carregadas (positivamente ou negativamente) utilizando um feixe incidente de luz polarizada, e monitorar o espalhamento de luz das mesmas (Figura 28).

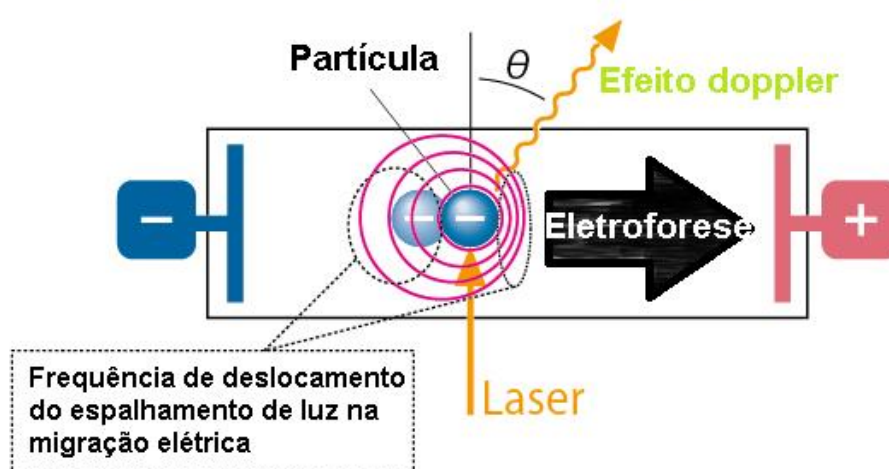


FIGURA 28 – ESQUEMA DE MÉTODO DE ELETROFORESE POR FEIXE DE LUZ POLARIZADA  
 FONTE: Adaptado de Malvern (2017).

O monitoramento da frequência de deslocamento de espalhamento de luz laser espalhada durante o movimento das partículas causa um efeito doppler, no qual é possível calcular o movimento eletroforético aparente pela seguinte equação.

$$\Delta v = 2V \cdot n \cdot \left( \frac{\sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda} \right)$$

Onde,  $\Delta v$  é a quantidade do efeito doppler,  $V$  é o movimento eletroforético,  $n$  é o índice de refração,  $\theta$  é o ângulo de luz espalhado e  $\lambda$  é o comprimento de onda da laser incidente. O movimento eletroforético real pode ser calculado descontando a velocidade da eletrosmose. Assim, é possível calcular-se o movimento eletroforético ( $U$ ) pela razão entre o campo elétrico ( $E$ ) expressão:

$$(U) = \frac{V}{E}$$

Partindo-se da premissa que as partículas irão se mover juntamente com a dupla camada elétrica em direção à carga oposta é possível calcular o potencial zeta ( $\zeta$ ) pela seguinte equação:

$$\zeta = 4\pi n \left( \frac{U}{\varepsilon} \right)$$

Onde  $n$  é a viscosidade do meio e  $\varepsilon$  é a constante dielétrica do meio

### 3.8.1.2 Potencial zeta por método de potencial de fluxo

O método de potencial de fluxo, semelhantemente ao método de eletroforese, consiste em aplicar-se uma diferença de potencial elétrico ao meio, adicionalmente um fluxo constante é empregado. Entretanto, o potencial zeta nesse caso em particular, não está relacionado diretamente ao potencial elétrico do plano de cisalhamento de partículas individuais, mas sim ao potencial elétrico do plano de cisalhamento do filme, composto de partículas, adsorvido na superfície da porta amostra. De maneira semelhante, filmes adsorvidos à superfície de materiais compostos de politetrafluoretileno, formarão uma dupla camada elétrica, semelhante à observada em partículas individuais. Sob a indução de um fluxo constante em condições controladas, é possível realizar o movimento da camada difusa ao longo da superfície do filme (Figura 29).

O potencial zeta, através do método de fluxo, pode ser calculado pela seguinte equação:

$$SP = k \Delta v - ZP$$

Onde,  $SP$  é o potencial de fluxo,  $k$  é uma constante do equipamento,  $\Delta v$  é a velocidade do fluido e  $ZP$  é o potencial zeta.

## Criando potencial zeta por aplicação de um fluxo constante

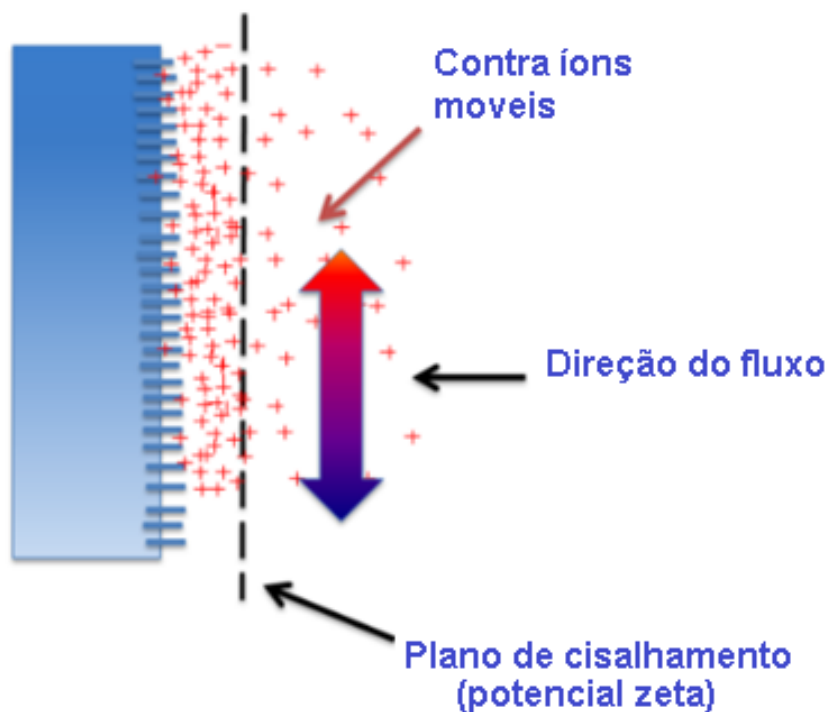


FIGURA 29 – ILUSTRAÇÃO DE FORMAÇÃO DE DUPLA CAMADA ELÉTRICA SOBRE FILMES PELA APLICAÇÃO DE UM FLUXO CONSTANTE.  
FONTE: Adaptado de Stabino (2017)

Comparativamente a outros métodos ópticos, como o eletroforético, o método de potencial de fluxo apresenta diversas vantagens, como resumidos na TABELA 01, a seguir:



TABELA 01 – COMPARAÇÃO DO MÉTODO DE POTENCIAL DE FLUXO EM RELAÇÃO A MÉTODOS ÓPTICOS PARA OBTENÇÃO DO POTENCIAL ZETA.

	<b>Potencial de fluxo</b>	<b>Métodos ópticos</b>
Taxa de tamanho de 0,3 nm à 300 µm	Sim	Não
Partículas grandes e sedimentares <300µm	Sim	Não
Carga total e densidade de carga (absoluta)	Sim	Não
Amostras translúcidas e opacas	Sim	Não
Presença de bolhas na amostra	Sim	Não
Intervalo de temperatura de 0 a 90°C	Sim	Não

## 4. ARTIGO 1:

### 4.1 BACTERIAL CELLULOSE NANOCRYSTALS: IMPACT OF THE SULFATE CONTENT ON THE ADSORPTION WITH XYLOGLUCAN

*Cellulose* (2015) 22:1773–1787 Fator de impacto: 3,19 Qualis – CB II: B1

Cleverton Luiz Pirich<sup>1,2</sup>, Rilton Alves de Freitas<sup>1</sup>, Marco Aurelio Woehl<sup>1</sup>, Guilherme Fadel Picheth<sup>1</sup>, Denise F.S. Petri<sup>3</sup> and Maria Rita Sierakowski<sup>1\*</sup>

#### ABSTRACT

Cellulose crystals produced from cellulose hydrolysis with sulfuric acid carry sulfate groups on the surface and are mainly used to study interactions with xyloglucan, mimetize cell wall enzymatic processes (e.g., to produce biofuels) and develop novel biocomposites (e.g., paper industry, biomedical devices). In this work, the adsorption behavior of a commercial XG from *Tamarindus indica* seeds on layers of bacterial cellulose nanocrystals (BCN) with sulfate content and zeta potential ( $\zeta$ ) values of 0%  $\text{SO}_3^-$ , using only HCl ( $\zeta$  -4.8 mV); 0.42%  $\text{SO}_3^-$ , using a mix of HCl and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\zeta$  -39.6 mV); and 0.65%  $\text{SO}_3^-$ , using only  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\zeta$  -45.6 mV), was investigated by several techniques (Langmuir isotherms, atomic force microscopy, contact angle, dynamic light scattering, ellipsometry and quartz crystal microbalance measurements). The adsorption experiments in water suspension and layer by layer (LbL) suggest that high sulfate substitution on BCN surface (0.65%  $\text{SO}_3^-$ ) impairs the original interaction with XG, resulting in lower maximum adsorbed amount ( $Q_{\text{max}}$ ) of XG on BCN and unstable deposited layers with desorption. Therefore, 0.42%  $\text{SO}_3^-$  did not significantly impair XG adsorption, and the greater colloidal stability than 0%  $\text{SO}_3^-$  resulted in higher XG mass adsorption in water suspension and thin films with lower roughness, thickness and without desorption. This is the first report of the effect of sulfur content on BCN surface related to XG adsorption. The results presented here might be useful for the development of more stable cellulose-xyloglucan based biocomposites, which can extend and enhance applicability of BCN as reinforcement or even lead to discovery of novel functions.

**Keywords:** coating, bacterial cellulose nanocrystals, xyloglucan, sulfate, thin films.

## Introduction

The development of environmentally friendly and sustainable materials is of great interest for industrial and scientific applications due to the use of materials from renewable sources. Among the potential candidates for biomedical devices, the combined use of cellulose and xyloglucan (XG) has great advantages due to their low toxicity, abundance in nature, easy chemical functionalization, good mechanical performance and strong chemical interaction (SHIRAKAWA *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 2007; KARAASLAN *et al.*, 2011; KUMMERER *et al.*, 2011). The high affinity between cellulose and XG is mainly due to the high content of hydrogen bonds between the similar backbone structures of these polysaccharides (D-anhydroglucopyranose chains bonded through  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) linkages) and hydrophobic interactions (MORRIS *et al.*, 2004). Additionally, XG backbone is partially substituted with  $\alpha$ -D-Xyl side-chains at the O-6 atoms and, depending on the source, the side-chains can be composed of  $\beta$ -D-Gal-1,2- $\alpha$ -D-Xyl,  $\alpha$ -L-Fuc-1,2- $\beta$ -D-Gal-1,2- $\alpha$ -D-Xyl (MCNEIL *et al.*, 1984; FRY, 1989; HAYASHI, 1989; CARPITA; GIBEAUT, 1993), or more complex chains (YORK *et al.*, 1996; HANTUS *et al.*, 1997; JIA *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2005).

In nature, cellulose and XG are found in plant cell walls associated in a supramolecular structure, which is the main factor promoting resistance and viscoelasticity in woods (MELLEROWICZ *et al.*, 2008). In order to simulate and enhance those properties, is preferred to using only the crystal domains of cellulose than intact cellulose (composed both of amorphous and crystalline zones). When isolated, the crystals exhibit increased crystallinity index (up to 10%) and elasticity (Young's modulus up to 100 GPa) in comparison to intact cellulose (IGUCHI *et al.*, 2000; HSIEH *et al.*, 2008). Indeed, several authors have reported that the interaction between cellulose crystals and XG improves colloidal and thermal stability, extensibility and Young's modulus of the resultant biocomposite (WHITNEY *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2004; JEAN *et al.*, 2009; CERCLIER *et al.*, 2010; LOPEZ *et al.*, 2010; ERONEN *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2013). Furthermore, XG subunits like galactose can be selectively modified to obtain substances with new applications, such as substrates for peptide-immobilization, anticoagulant and antithrombotic agents (DOLIŠKA *et al.*, 2012; PARIKKA *et al.*, 2012).

The crystalline domains of cellulose can be isolated by several chemical, mechanical and/or enzymatic treatments, to generate materials with distinct properties

(dimensions, morphology, crystallinity and surface chemical substitution), which in turn can affect XG adsorption (FILSON *et al.*, 2009; KALASHNIKOVA *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-SANZ *et al.*, 2011). Sulfuric acid hydrolysis is the most common technique because it creates cellulose crystals that are dispersible in water due to the small number of sulfate ester groups introduced on its surface during hydrolysis (RANBY *et al.*, 1949).

The use of sulfuric acid is due to simplicity, lower cost and, notably, obtainment of particles with high colloidal stability. In such reaction, the hydronium ions penetrate the cellulose's amorphous domains, promoting the hydrolytic cleavage of the glycosidic bonds and releasing individual crystallites. In this process, sulfate groups are randomly distributed on the cellulose surface (MARCHESSAULT *et al.*, 1959; DONG *et al.*, 1998). Under optimized conditions, crystals with controlled polydispersity and high amounts of sulfate groups can be obtained (BONDESON *et al.*, 2006; MARTÍNEZ-SANZ *et al.*, 2011; LIN; DUFRESNE, 2014).

Besides the improvement of colloidal stability through sulfate esterification on cellulose crystals, the sulfate introduction results in products with poor thermal stability (maximum degradation temperature ( $T_{\max}$ ) of 250 °C), which prevents using these crystals to make products through several melt processing techniques, such as injection molding, twin-screw compounding and extrusion (BONDESON *et al.*, 2006; BEN AZOUZ *et al.*, 2011).

LOPEZ *et al.* (2010) demonstrated that very low sulfate content ( $\leq 0.033\%$ ) on the cellulose crystals surface shows no significant impact on XG adsorption, although sulfated cellulose crystals exhibited slightly lower adsorption when compared to desulfated. However, in order to obtain cellulose crystals with minimum colloidal stability and/or a narrow size distribution, several authors have used sulfuric hydrolysis under more drastic conditions (longer time, higher temperatures or acid concentration), yielding up to 0.2% of sulfate content (BONDESON *et al.*, 2006; MARTÍNEZ-SANZ *et al.*, 2011; LIN; DUFRESNE, 2014). Moreover, other properties of cellulose crystals (e.g., size distribution, morphology and crystallinity) can significantly alter the adsorption to XG (ZHAO *et al.*, 2014). Even adsorption conditions like polymer critical concentration or production by spin-coating, solvent-casting and spraying techniques could engender different adsorption forces, e.g. centrifugal force (CERCLIER *et al.*, 2010).

In this study, the influence of sulfate esterification levels on cellulose crystals of bacterial cellulose (BCN) was evaluated and related with the XG adsorption in solution. We also investigated, in the same manner, the development of a self-assembly system composed of single or multiple layers, deposited by the layer-by-layer (LbL) technique (ILER, 1966). To the best of our knowledge, there are no studies that have evaluated the impact of high sulfate content (>0.1 %) on BCN surface in respect to XG adsorption. The results presented here can be important for the development of novel biocomposites based on these two biopolymers. Especially in aqueous systems, where sulfate groups play an important role for colloidal stability due to the electrostatic repulsion, the results could enable more efficient self-assembly BCN-XG particles, which could be applied in different areas, such as improvement of cellulose surface capability to immobilize biomolecules and biosensor build-up and for emulsion stabilization (e.g., Pickering emulsions).

## Materials and Methods

### Materials

Pieces of dried bacterial cellulose (BC) sheets were kindly provided by Membracel<sup>®</sup> Produtos Tecnológicos Ltda. (Almirante Tamandaré, Paraná, Brazil). Xyloglucan (XG) from *T. indica* seeds (Balasanka Mills, India) was purified and characterized according to the method described by JÓ *et al.* (2010), where the average molar mass ( $M_w$ ) was determined as 653,000 g.mol<sup>-1</sup> (value corresponds to molecularly dispersed chains instead of aggregates), Glc:Xyl:Gal ratios were 2.8:2.3:1 and critical concentration value was 1.38 mg.mL<sup>-1</sup>. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95-98% w/w - Sigma Aldrich<sup>®</sup>) and HCl (37% w/w - Merck) were used for BC hydrolysis to obtain BCN. Polyethyleneimine (PEI) (Polymin<sup>®</sup> SNA) was used as the anchoring substrate in the LbL assays. Ultrapure water (18.2 MΩ, Millipore Milli-Q purification system) was used to prepare aqueous BC and BCN suspensions and XG and PEI solutions.

### Pretreatment of bacterial cellulose

Pieces of dried bacterial cellulose sheets were suspended in water using a mechanical mixer (Philips-Walita, 400 W) and were then ground in a Supermass colloid mill (Masuko Sangyo MKCA6-2). After mechanical treatment, each sample (1 mg.mL<sup>-1</sup>) was submitted to ultrasound in an ice bath for 60 min using an ultrasonic processor

(Sonics VCX 750 at 20 kHz). Thus one drop of  $\text{CHCl}_3$  per 250 mL was added to the suspension for storage and kept at 4 °C until use (KALASHNIKOVA *et al.*, 2011) .

#### Obtaining bacterial cellulose nanocrystals (BCN)

The pretreated cellulose suspension was submitted to acid hydrolysis under three different conditions (all 8 mg.mL<sup>-1</sup>). For the sulfate-free sample (BCN-HCl), HCl (4 mol.L<sup>-1</sup>) was used at 80 °C for 120 min. (YU *et al.*, 2013); for the moderate sulfate content sample (BCN-HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), a mixture composed of H<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HCl in a proportion of 6:2.5:1.5 (v/v) was used at 60 °C for 120 min (adapted from ZHANG *et al.* (2007)); and for the high sulfate content sample (BCN-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5.2 mol.L<sup>-1</sup>) was used at 50 °C for 120 min. (MARTÍNEZ-SANZ *et al.*, 2011). All the suspensions were rinsed with ultrapure water using repeated centrifuge cycles of 10 min at 10,000 g (Sigma 4K15), i.e., the supernatant was removed from the sediment and replaced by fresh ultrapure water and mixed. The centrifuge step was stopped at pH >4, when the supernatant became turbid. The supernatant was dialyzed against ultrapure water to remove any remaining free acid until the collecting medium water reached the same conductivity as the ultrapure water. Afterward, the dispersions were sonicated (Ultracleaner 1650A) for 10 minutes and stored at 4 °C with one drop of  $\text{CHCl}_3$  per 250 mL (KALASHNIKOVA *et al.*, 2011).

#### Sulfur content of the BCN samples

Elemental analysis of sulfur on the lyophilized BCN powder samples (10 mg) was performed by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) using a Spectro spectroscope (Spectro Analytical Instruments GmbH, Germany). The atomic emission intensity of sulfur in each sample (10mg, in triplicate), after concentrated nitric acid digestion, was detected (wavelength of 180.7 nm) and the sulfate content measured was related to total mass.

#### X-ray powder diffraction (XRPD) analysis

For the BC and BCN samples suspended in water, the solvents were exchanged with tert-butanol using a stepwise gradient to minimize recrystallization and change of the crystallinity index of the cellulose chains (RAMOS *et al.*, 1993; WOEHLE *et al.*, 2010). The last washing step was performed with pure tert-butanol. The fiber suspension of each sample was centrifuged for 10 min at 10,000 g, and the recovered fibers were lyophilized in a bench-top freeze-drier (Thermo Electron Corporation). The XRPD experiments were performed in a Shimadzu XRD 6000 diffractometer operating at 40 kV and 30 mA with Cu K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 0.15418$  nm). The lyophilized samples

were positioned on an aluminum sample holder, and measurements were taken to estimate the crystallinity, as described previously by CHEN *et al.* (2007). Data were collected in reflectance mode in the 10–40° 2 $\theta$ -range with 0.5°/min. The diffractograms were fitted with the Gaussian model (Fityk 0.8.0). The crystallinity index (CrI, %) was calculated using the following method, as described by HERMANS (1946):

$$\text{CrI (\%)} = 100 \cdot \frac{A_c}{A_t} \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $A_c$  corresponds to the total crystalline area and  $A_t$  is the total area (amorphous and crystalline) under the diffractograms.

The peaks were also used to estimate the apparent crystal size (ACS), using Scherrer's formula according to the following equation:

$$\text{ACS} = \frac{0.9 \lambda}{\text{FWHM} \cos \theta} \quad (\text{Eq. 2})$$

where  $\lambda$  is the X-ray wavelength expressed in nm, FWHM is the peak width at half the maximum height and  $\theta$  is the diffraction angle expressed in radians. The form factor (0.9) is valid for spherical particles, which does not pose a problem because the results were used only for comparative purposes. To verify the curve resolution program routine and indexation of diffractograms, they were compared with crystal information file (.cif) for different cellulose polymorphs from supplementary material of FRENCH (2014), using the Mercury software (version 3.3). The  $d$  spaces between the crystal planes were determined using Bragg's law:

$$n \lambda = 2 d \sin \theta \quad (\text{Eq. 3})$$

where,  $n$  is an integral number (1, 2, 3...), and  $d$  represents the intersegment spacing between two polymer chains

Langmuir isotherm analysis of XG adsorption on BCN

The Langmuir isotherm model was applied to adsorptions according to HAYASHI *et al.* (1994) and LOPEZ *et al.* (2010) for native polymeric T. indica XG to cellulose. Were prepared different incubations, fixing the BCN concentration in solution at 1 mg.mL<sup>-1</sup> and varying the XG concentration from 0 to 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (a different concentration for each incubation experiment). In order to avoid aggregation between BCN particles, all BCN solutions were previously sonicated for 10 min, before adding XG. After incubation with continuous head-over-tail mixing at 25 °C for 30 min, the blends were centrifuged for 30 min at 13,000 g (Sigma 4K15), and the amount of XG

unbound to BCN present in the supernatant was quantified by the I<sub>2</sub>/KI colorimetric method (KOOIMAN, 1960). The centrifugation was necessary to precipitate all BCN and BCN bound to XG, whereas unbound XG remained free in solution (adapted from LIMA; BUCKERIDGE (2001)). The adsorption of XG onto BCN was evaluated following the Langmuir model:

$$Q_e = \frac{Q_{\max} K C_e}{1 + K C_e} \quad (\text{Eq.4})$$

where  $C_e$  is the amount of XG unbound to BCN quantified in the supernatant after centrifugation,  $Q_e$  is the mass ( $\mu\text{g}$ ) of XG adsorbed per  $\mu\text{g}$  of cellulose, and  $Q_{\max}$  and  $K$  are the maximum adsorption capacity and the adsorption energy, respectively.

The experimental binding isotherm data were analyzed by the linearized form of the Langmuir model:

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_{\max} K} + \frac{1}{Q_{\max}} \cdot C_e \quad (\text{Eq. 5})$$

The graph of  $C_e/Q_e$  vs.  $C_e$  provided a linear coefficient  $1/Q_{\max}$  and an angular coefficient  $1/Q_{\max} K$ .

### **Dynamic light scattering (DLS) analysis of polysaccharides**

The colloidal behavior of BCN particles as time dependent were determine in solution through average apparent hydrodynamic diameters using a nano DLS laser light-scattering apparatus from Brookhaven Instruments (Holtsville, New York) at a fixed angle of  $90^\circ$ . In order to avoid aggregation, and evaluate the colloidal stability in real time all BCN samples were sonicated for 10 min, before injection. Thus, the measurement at 632.8 nm was obtained using a 15 mW solid-state He–Ne laser. The sample results were evaluated by the DLS software (Brookhaven Instruments). All measurements were performed at  $25^\circ\text{C}$  in triplicate. The values of the intensity autocorrelation function between the light scattering intensity were correlated with the Stokes-Einstein equation:

$$D_h = \frac{k_B T}{3 \pi \eta D} \quad (\text{Eq. 6})$$

where  $D_h$  is the hydrodynamic diameter,  $k_b$  is the Boltzmann constant,  $T$  is the absolute temperature,  $\eta$  is the viscosity and  $D$  is the diffusion coefficient (BERNE; PECORA, 2000).



The Stokes–Einstein equation can be applied only for non-interacting spherically shaped particles. The  $D_h$  of BCN is not expected to be equal either to length or width of actual particles. It only correlates the average effective particle movement within a liquid. For this reason,  $D_h$  stands for the average apparent hydrodynamic diameters ( $D_{happ}$ ), which can be used to a comparative way to evaluate the colloidal stability.

#### Zeta potential analysis

The zeta potential ( $\zeta$ ) values were measured with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) based on the LDV technique (Laser Doppler Velocimetry). A DTS 1060c bucket (clear disposable zeta-cell) was utilized at 25 °C. The instrument measures electrophoretic light scattering of a 35 mW solid state laser beam at a 660 nm wavelength. The BCN solutions were prepared at concentrations of 1 mg.mL<sup>-1</sup>. All samples were stabilized inside the device for 30 seconds, and 100 measurements were collected with confidence intervals of 95%.

#### Atomic force microscopy

Aqueous dispersions of BCN and of BCN coated with XG were diluted to 125 µg.mL<sup>-1</sup> and spin-coated on a freshly cleaved mica surface and imaged in air by the tapping mode, as described below, to measure the variation in the dimensions of the isolated BCN upon XG adsorption.

The AFM images were obtained with an Agilent 5500 microscope (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using Mikromasch NSC14 silicon tips (Mikromasch USA, San Jose, CA, USA) with a nominal spring constant of 5.7 N.m<sup>-1</sup> and a resonance frequency of ~100 kHz. The scanning areas were 2.0 µm × 2.0 µm, 4.0 µm × 4.0 µm and 8.0 µm × 8.0 µm. The images were acquired using Pico Image software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and were processed with the Gwyddion software (Czech Metrology Institute). The dimensions of BCN and of BCN coated with XG were compared using Student's t test by assuming a significant difference if  $p \leq 0.01$ . Absolute width measurements by AFM are not reliable due to broadening caused by tip convolution, which does not pose a problem here because the results were used only for comparison to evaluate the adsorption. The apparent width of the CNCs is larger than the actual value because of AFM tip convolution (YANG *et al.*, 2001); and the height is not affected by tip broadening, so it can be used as a parameter to estimate the XG coating thickness.

The adsorptions of XG on BCN by the LbL technique were determined by the dipping deposition method with a rinsing step between each polymer deposition step. The substrate surface was produced as described next. PEI (1 mg.mL<sup>-1</sup>) was spin-coated (2 min at 3,000 rpm) on the freshly cleaved mica surface. Under the same conditions, BCN and XG solutions (1 mg.mL<sup>-1</sup>) were deposited alternately. AFM images of the PEI, BCN and XG layers were subsequently obtained in a liquid cell with ultrapure water in tapping mode with an oscillation frequency of ~100 kHz.

For the determination of the film thickness scratches were done on the film surface using a clean sharp blade and the residues were removed under a stream of N<sub>2</sub> (BLACHECHEN *et al.*, 2012). Then the peak-to-valley distances were measured by means of Gwyddion software, as shown in the supplementary material (SM4 and SM5).

Adsorption of XG on BCN analyzed in a real time by a quartz crystal microbalance

The adsorption of the XG on BCN was verified through QCM (SRS, Stanford research systems). AT-cut platinum crystal quartz of 5 MHz coated with titanium was cleaned in a piranha solution composed of H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7:1:1, v:v) for 30 min at 75°C in order to produce a anionic TiO<sub>2</sub> surface and rinsed with deionized water and vacuum dried in an oven. The substrate surface was produced on a SiO<sub>2</sub> quartz surface by depositing 1 mL of polycationic PEI solution (1 mg.mL<sup>-1</sup>) by 15 min followed by spin coating (40 s – 10 000 rpm) because was previously show that PEI is well-suited to obtain a uniform coating and, thus, favors subsequent multilayer buildup (KOLASIŃSKA; WARSZYŃSKI, 2005; JEAN *et al.*, 2008) followed by a similar process for the all BCN samples layer (1 mg.mL<sup>-1</sup>). Real-time QCM experiments were performed in a flow cell (SRS) connected to a syringe pump with a 100 µL.mL<sup>-1</sup> flow rate. The BCN and XG solutions (1 mg.mL<sup>-1</sup>) were injected separately, and the sample on the substrate was immediately rinsed with ultrapure water between each deposition of the biopolymer solutions.

Layer by layer deposition and ellipsometry

The alternated deposition of BCN and XG onto PEI coated Si wafers (1 cm X 1cm) was done following the LbL technique. The Si wafers were immersed in a mixture of NH<sub>3</sub> (25% in volume), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% in volume), and distilled water in the volume ratio of 1:1:5 and at the temperature of 70 °C during 20 min. Afterward, the wafers were washed with distilled water and dried by a stream of N<sub>2</sub>. The Si wafers were modified by depositing 1 mL of polycationic PEI solution (1 mg.mL<sup>-1</sup>) by 15 min followed by spin

coating (40 s – 10 000 rpm) (KOLASIŃSKA; WARSZYŃSKI, 2005; JEAN *et al.*, 2008) followed by a similar process for the all BCN samples layer (1 mg.mL<sup>-1</sup>). The next layers were deposited by dipping in a XG or BCN solutions (1 mg.mL<sup>-1</sup>) for 15 min, with rinsed process with ultrapure water between each deposition.

Ellipsometric measurements were performed in air using a vertical computer-controlled DRE-EL02 ellipsometer (Ratzeburg, Germany) (KOSAKA *et al.*, 2005). The angle of incidence was set at 70.0° and the wavelength,  $\lambda$ , of the He–Ne laser was 632.8 nm. A multilayer model composed of the substrate, the unknown layer and the surrounding medium was used for data interpretation. The thickness,  $d_x$  and the refractive index,  $n_x$ , of the unknown layer were calculated from the ellipsometric angles,  $\Delta$  and  $\Psi$ , using the fundamental ellipsometric equation and iterative calculations with Jones matrices (AZZAM; BASHARA, 1987):

$$e^{i\Delta} \tan \psi = \frac{R_p}{R_s} = (n_x, d_x, \lambda, \phi) \quad (\text{Eq. 7})$$

where  $R_p$  and  $R_s$  are the overall reflection coefficients for the parallel and perpendicular waves, respectively. These coefficients are functions of the angle of incidence,  $\phi$ ; the wavelength,  $\lambda$ ; the radiation; and the refractive index and thickness of each layer of the model, which are  $n_x$  and  $d_x$ , respectively.

From the ellipsometric angles,  $\Delta$  and  $\Psi$  and a multilayer model composed of silicon, silicon dioxide, the polysaccharide layer and air, it was possible to determine only the thickness of the polysaccharide layer. The thickness of the silicon dioxide layers was determined in air by assuming a refractive index of 3.88–0.018i and an infinite thickness for silicon (PALIK, 1985). The refractive index for the surrounding medium (air) was taken as 1.00. Because the native silicon dioxide layer was notably thin, its refractive index was taken to be 1.462 (PALIK, 1985). The mean thickness of the native silicon dioxide layer was 2.0 ± 0.2 nm. After determining the thickness of the silicon dioxide layer, the mean thicknesses of the adsorbed PEI, BCN and XG layers were determined in air by ellipsometry, considering the refractive index of PEI as 1.46 (IZQUIERDO *et al.*, 2005), BCN as 1.60 (NOGI; YANO, 2008) and XG as 1.50 (JÓ, 2009).

#### Contact angle and surface free energy calculations

Contact angle (CA) measurements (DataPhysics OCA 15 Plus tensiometer, Filderstadt, Germany) were performed for spin-coated films on silicon wafers, using the sessile drop method with MilliQ water droplets of 3  $\mu$ L. All measurements were

conducted at 25 °C. The CA calculations were performed with SCA 20 DataPhysics software (Filderstadt, Germany). Each CA value was the average of at least three drops of liquid per surface.

## Results and discussion

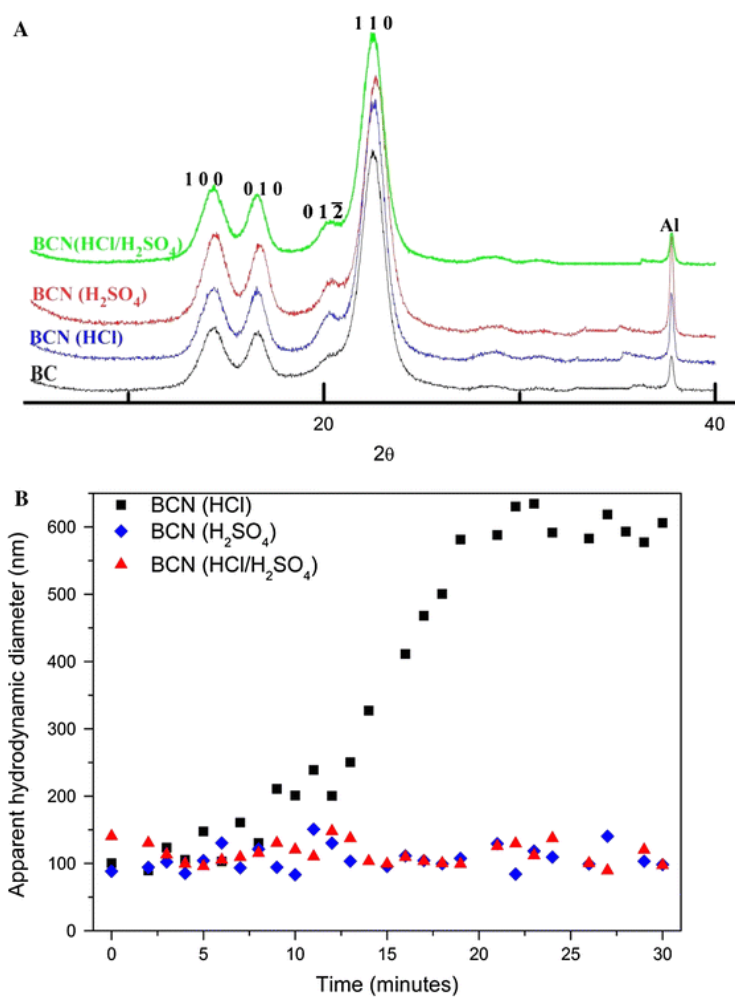
### Characterization of bacterial cellulose pulp and xyloglucan

The dried BC membrane pieces were initially dispersed in ultrapure water, milled and submitted to ultrasound treatment, resulting in a BC fiber pulp suspension. These processes were necessary to increase the surface area and enable effective acid hydrolysis. AFM topographic images (SM1) revealed particle size distributions ranging from 1 to 10  $\mu\text{m}$  in diameter of the fibers.

### Obtainment and characterization of bacterial cellulose nanocrystals

Bacterial cellulose nanocrystals (BCN) were obtained from pulp by three distinct processes: acid hydrolysis by HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and mixed HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. All products obtained presented similar crystallinity, morphology and size distribution. According to compared diffraction patterns obtained from crystal information file (.cif) for different cellulose polymorphs (FRENCH (2014), the patterns were indexed according to cellulose I $\alpha$  indexation as described by (SUGIYAMA *et al.*, 1991). The peaks used for crystallinity calculations were assigned to (1 0 0), (0 1 0) ( $\bar{1} \bar{1} 2$ ) and (1 1 0) crystallographic planes, corresponding to diffraction angles of 14.4°, 16.7°, 20.5° and 22.7°, respectively (Fig. 1). Although the strong uniplanarity in  $\bar{1} \bar{1} 2$  plane is due to the fact that the cellulose ribbons are preferentially oriented parallel to the film surface during drying (ELAZZOUZI-HAFRAOUI *et al.*, 2007). So they were used for calculations only for comparative purposes and not pose a problem. The contribution of the peak at 37.7° of 2 $\theta$  was attributed to the aluminum sample holder and was not used for calculations of crystallinity. As expected, the pretreatment (mill and ultrasound) and the hydrolysis of BC caused no alteration in the crystallinity polymorphy (I $\alpha$ ) as observed in the XRD pattern. But, without changes in the intensity of crystalline peaks and d-spaces (WADA *et al.*, 1997; CASTRO *et al.*, 2011; FRENCH, 2014) (Table 1). All BCN samples presented crystalline index (Crl) on average 10% larger than that observed for BC, in agreement to the results obtained by MARTÍNEZ-SANZ *et al.* (2011). Such increase in Crl corresponds to the decrease in the cellulose amorphous region after hydrolysis. As shown by the apparent crystalline size (ACS)

values determined for BCN samples, the hydrolysis processes were specific to the amorphous regions, as revealed by no significant statistical difference in the crystal sizes after the process. AFM topographic images (SM2 to SM4) exhibited the typical whisker aspect ratio with similar size dimensions (BATTISTA, 1950; ARAKI *et al.*, 1998; SOUZA LIMA; BORSALI, 2004).



**Fig. 1:** X-ray diffractograms obtained for the BC and BCN samples.

**Table 1:** Zeta ( $\zeta$ ) potential, sulfur content and x-ray diffraction analysis of pretreated bacterial cellulose pulp (BC) and cellulose nanocrystals (BCN) obtained by different processes (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Sample	Z (-mV)	S (%, w/w)	CrI (%)	1 0 0 ACS / d (nm)	0 1 0 ACS / d (nm)	1 1 0 ACS / d (nm)
BC	n.d	n.d	72.3	5.63/0.60	7.49/0.53	5.83/0.39
BCN-HCl	4.8	0	83.2	5.41/0.60	7.21/0.53	5.42/0.39
BCN-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	45.7	0.65	81.8	5.50/0.60	7.33/0.53	5.22/0.39
BCN-HCl/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	39.6	0.42	82.4	5.54/0.60	7.94/0.53	5.32/0.39

$\zeta$  : zeta potential;

S: sulfur content

CrI: crystallinity index

n.d: not determined.

ACS: apparent crystalline size. See XRPD method.

d: interplanar distances.

In contrast, the hydrolytic processes produced BCN with different sulfate contents in the range of 0 to 0.65% (Table 1). Despite the relatively low sulfate degree produced by this process when compared with the cellulose total mass, those values represent large functionalization concerning the material's surface, as already described by LIN; DUFRESNE (2014). Indeed, these little sulfate content difference between BCN resulted in distinct colloidal behaviors. As expected the HCl reaction generated BCN isolated by HCl (devoid of sulfate groups), which was characterized by zeta-potential near zero. Such low zeta potential value caused poor colloidal stability. As evidenced in Fig. 2, mean particle size started increasing due to aggregation. In such situation, the low electrostatic repulsion is overcome by hydrogen bonds and attractive van der Waals forces (MARCHESSAULT *et al.*, 1959; ARAKI *et al.*, 1998; JÓ *et al.*, 2010; WINTER *et al.*, 2010). On the other hand, BC samples hydrolyzed by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> exhibited zeta-potential values of -46 mV and -40 mV, respectively, due to the introduction of sulfate groups on the surface. In this case, the mean particle size during dynamic light scattering analyses did not change (Fig. 2) because the electrostatic repulsion among the SO<sub>3</sub><sup>-</sup> groups on BCN avoided aggregation and caused high colloidal stability. The relation of sulfate content, zeta potential and colloidal stability is according to sulfated cellulose nanocrystals described by LIN; DUFRESNE (2014), and WINTER *et al.* (2010), in which cellulose nanocrystals

require at least  $\pm 25$  mV of charge to achieve effective electrostatic repulsion within particles, and above this value, due to colloidal stability, increases do not cause a substantial difference.

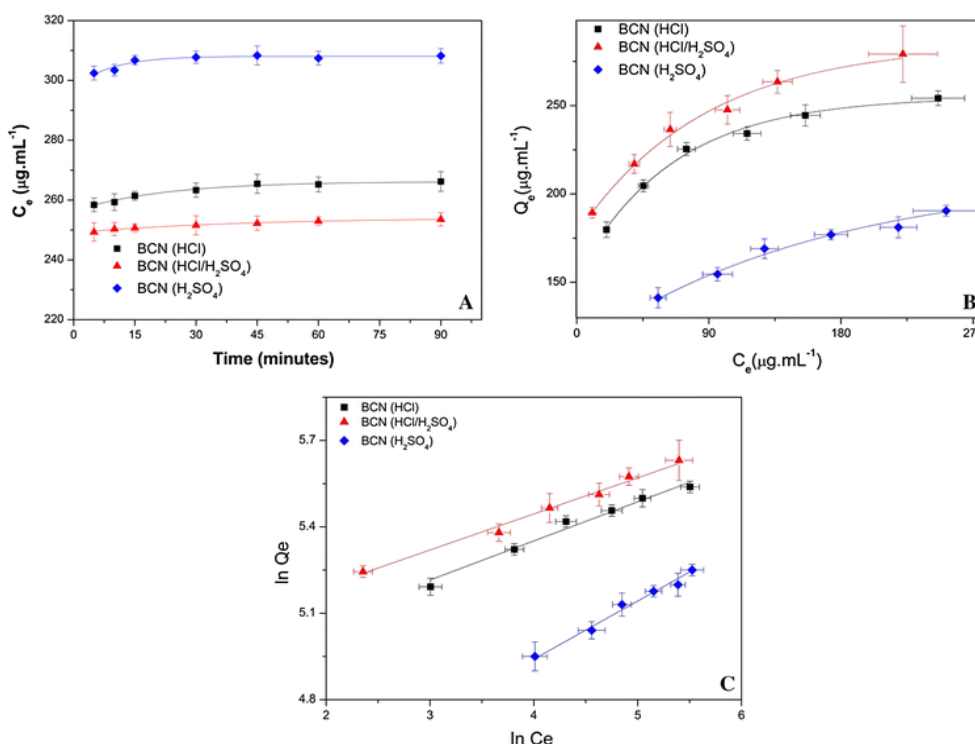
Among all characteristics determined for BCN particles, the crystalline index (CrI) and apparent crystal size (ACS) values and the morphological features were similar in all of them, except for the contents of  $\text{SO}_3^-$  groups on the particles. Therefore, from here on they will be renamed 0%  $\text{SO}_3^-$  (BCN-HCl), 0.42%  $\text{SO}_3^-$  (BCN-HCl/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) and 0.65%  $\text{SO}_3^-$  (BCN- $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), to facilitate reading.

#### Influence of BCN sulfate content on xyloglucan adsorption

In order to investigate the adsorption behavior of XG on BCN samples, XG solutions were prepared in the diluted range or below its critical concentration ( $<1.38$   $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (JÓ *et al.*, 2010). In the more concentrated range, XG aggregation leads to chain entanglement, resulting in a more disordered and unstable layer adsorbed onto BCN, as previously observed by CERCLIER *et al.* (2010).

Thus, the BCN samples with different amounts of sulfate groups produced by a single modification step were used as supports for the XG adsorption isotherms, following eq. 4. It is complicated to compare XG adsorption to BCN particles with distinct colloidal behavior because 0%  $\text{SO}_3^-$  aggregation results in larger BCN particles with lower surface area than sulfated groups (as seen previously by dynamic light scattering). Thus, in order to analyze XG adsorption on dispersed BCN particles, all groups were submitted to brief sonication (see dynamic light scattering analysis in materials and methods section). The Langmuir model was chosen because it is typically applied to adsorption of XG to cellulose nanocrystals (HAYASHI *et al.*, 1994; ZYKWINSKA *et al.*, 2008; LOPEZ *et al.*, 2010; GU; CATCHMARK, 2013) and the statistical measurement of  $R^2$  approached 1, indicating good fitting results. Results supported by Lima and Buckeridge (2001) demonstrated adsorption equilibrium between no sulfated cellulose microcrystals and XG is achieved after just 5 reach to equilibrium at only 5 min XG adsorption. In order to test this for the present cellulose nanocrystals, the effect of adsorption time on  $Q_e$  values was analyzed with a fix XG and BCN concentration in function of time. Fig. 3A shows the effect of adsorption time on  $Q_e$  values for XG at  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  and BCN at  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Regardless the BCN type, adsorption equilibrium was achieved after just 5 minutes, corroborating the XG-cellulose adsorption behavior observed by Lima and Buckeridge (2001). Desorption processes were negligible, corroborating previous findings that XG adsorption to

cellulose is a quasi-irreversible process (SHIRAKAWA *et al.*, 1998; LIMA; BUCKERIDGE, 2001; LIMA *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2007; KARAASLAN *et al.*, 2011; KUMMERER *et al.*, 2011).



**Fig. 3:** (A) Amount of XG unbound to BCN quantified in the supernatant ( $C_e$ ) after centrifugation as a function of time. (B) Adsorbed amount of XG per  $\mu\text{g}$  of cellulose ( $Q_e$ ) as a function of  $C_e$ . (C) Linearized form of (B). (D) Schematic representation of XG adsorption on BCN with 0% SO<sub>3</sub>, 0.42% SO<sub>3</sub> and 0.65% SO<sub>3</sub>.

Adsorption isotherms were determined for XG on BCN ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) with incubation period of 30 minutes, as shown in Fig. 3B. It was only possible to evaluate adsorption using XG concentrations above of  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Below this concentration, no XG chains could be detected in the supernatant ( $Q_e$ ), indicating that all XG chains were adsorbed on the BCN surface. On the other hand, between  $200$  to  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , it was possible to achieve different adsorption profiles (Fig. 3B.). The experimental data were fitted to eq. 5 (Fig 3C.), yielding the fit parameters adsorption constant ( $K$ ) and maximum adsorbed amount ( $Q_{\text{max}}$ ), as presented in Table 2.



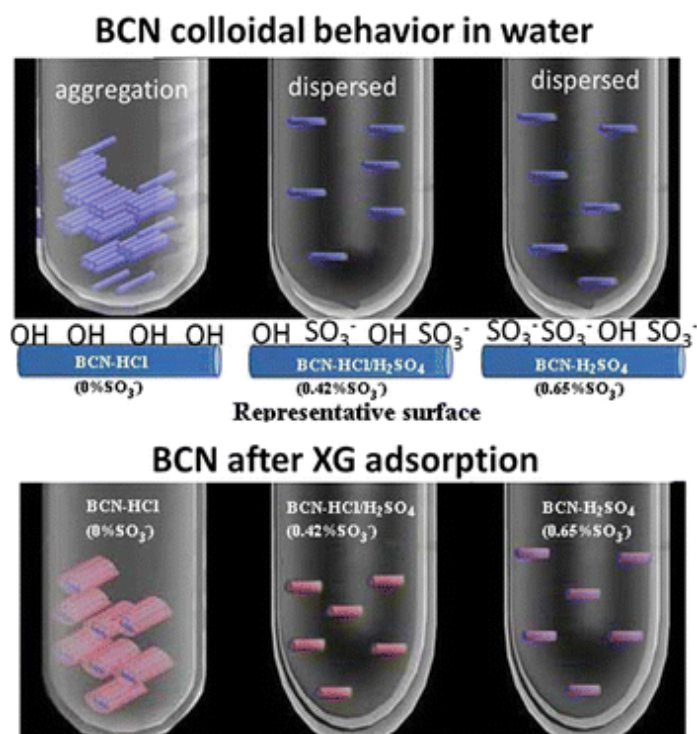
**Table 2.** Fitting parameters of Langmuir isotherm determined for the adsorption of xyloglucan (XG) on bacterial cellulose nanoparticles (BCN) 0%  $\text{SO}_3^-$ , 0.42%  $\text{SO}_3^-$  and 0.65 %  $\text{SO}_3^-$ . Mean nanoparticle height determined by atomic microscopic force measurements.

Sample	$Q_{\max}$ ( $\mu\text{g}_{\text{XG}} \cdot \text{mg}_{\text{BCN}}^{-1}$ )	K $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	****Height (nm)
0% +XG	-- 235 ± 6	-- 0.119 ± 0.04	8.98 ± 1.7 14.2 ± 2.1
0.65% +XG	-- 211 ± 2	-- 0.032 ± 0.01	9.21 ± 2.6 15.2 ± 2.1
0.42% +XG	-- 275 ± 6	-- 0.0304 ± 0.006	8.9 ± 2.2 13.9 ± 2.9

\*\*\*\* ( $p \leq 0.01$ )

The initial results suggest that the introduction of sulfate groups on the BCN surface could influence the  $Q_{\max}$ . Based on analysis of these results with the BCN colloidal behavior, the lower  $Q_{\max}$  value (0%  $\text{SO}_3^-$  instead of 0.42%  $\text{SO}_3^-$ ) is probably due the aggregation between the non-sulfated BCN particles. On the other hand, the 0.65%  $\text{SO}_3^-$  even though not showing aggregation of the particles, presented the lowest  $Q_{\max}$ , the  $\text{OSO}_3^-$  introduction probably interferes in the original interaction between OH groups of the native glycosidic backbones. Based on these results, we can speculate that 0%  $\text{SO}_3^-$  had lower  $Q_{\max}$  (than 0.42% $\text{SO}_3^-$ ) because these BCN particles adsorb with each other and also with XG, as opposed to sulfated BCN, in which the particles have electrostatic repulsion, resulting in preferred adsorption to XG.

Therefore, the introduction of  $\text{OSO}_3^-$  on the BCN surface appears to benefit the XG adsorption only by increasing the BCN surface area available to interact with XG. Despite the colloidal stability and  $Q_{\max}$ , the higher K value of the 0%  $\text{SO}_3^-$  suggests that introduction of  $\text{OSO}_3^-$  diminishes the affinity to XG, corroborating the hypothesis that  $\text{OSO}_3^-$  introduction improves  $Q_{\max}$  due only to the better colloidal stability of sulfated BCN particles. These findings corroborate the idea that the interaction between cellulose and XG is mainly due to the high content of hydrogen bonds (OH-OH) between the similar backbone structures of these polysaccharides (MORRIS *et al.*, 2004). A schematic representation of the probable effects of the BCN sulfur content on adsorption to XG is presented in Fig 3D.

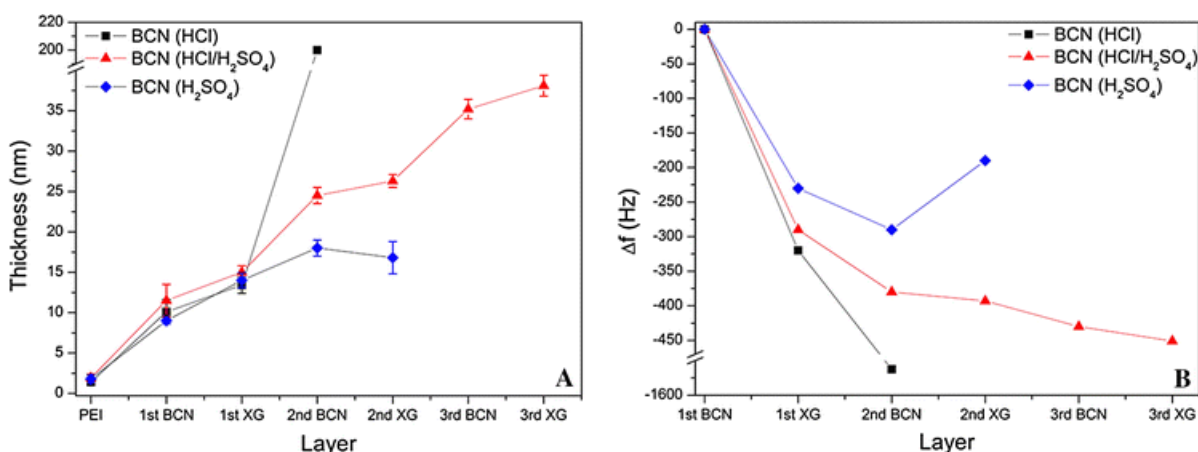


**Fig. 3** Schematic representation of XG adsorption on BCN-HCl, BCN-HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and BCN-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. In the picture, the BCN are represented by blue rectangles and XG is represented by red lines. The upper one demonstrates the colloidal behavior of BCN in water (at the bottom of the picture there is a representation of the BCN surface related to the sulfate content), and the lower one after XG adsorption. After XG adsorption, the BCN-HCl results in lower XG mass due to the lower surface area of aggregated BCN particles. On the other hand, the BNC-HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and BCN-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> adsorbed XG on dispersed BCN particles (with higher surface area due to the electrostatic repulsion of SO<sub>3</sub><sup>-</sup> groups). However, the BCN-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> presented lower XG adsorbed, probably due to the high sulfate content (0.65 %SO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

There were no detected significantly differences in the morphology of BCN coated with XG (data not show). All BCN samples revealed increased size after adsorption (width of  $16.6 \pm 1.2$  nm and height of  $5.4 \pm 0.4$  nm), suggesting, together with morphology analysis, that XG adopted the BCN-like conformation by monolayer coating (Table 2). This conformation is in agreement with several studies about XG-cellulose interactions (TAYLOR; ATKINS, 1985; OGAWA *et al.*, 1990; LEVY *et al.*, 1991; WHITNEY *et al.*, 1995; SOUZA *et al.*, 2013). Therefore, the dimensions were measured only for isolated particles, since it is difficult to evaluate aggregated particles in solution from those aggregated during the drying process.

In order to exclude the problem of aggregation in solution, thin layers of BCN were deposited onto a layer of polyethyleneimine (PEI). This layer is well suited to obtain a uniform coating and thus favors subsequent multilayer buildup

(KOLASIŃSKA; WARSZYŃSKI, 2005; JEAN *et al.*, 2008)) by spin coating. Indeed, this anchoring layer had roughness of  $0.7 \pm 3$  nm and thickness of  $1.5 \pm 0.4$  nm for all substrate samples. The roughness ( $8.1 \pm 2$  nm) and thickness of the first BCN film deposited did not differ significantly between the groups (Figure 4). The BCN layer deposited on PEI was  $(10 \pm 3)$  nm thick and changed the surface wettability. The PEI layer presented contact angle of  $69 \pm 1^\circ$  and, as expected, the sulfated BCN layers presented a low contact angle ( $22.0 \pm 0.4^\circ$ ) due to the high hydrophilic  $\text{OSO}_3^-$  charged surface, whereas the 0%  $\text{SO}_3^-$  layer presented  $43.0 \pm 0.9^\circ$  due to the absence of charges. The pronounced roughness increase after BCN deposition (0.7 to 9.8) suggested a porous surface for all BCN groups. The next depositions were made by alternative XG and BCN suspensions in constant flux.



**Fig. 4 a** Evolution of thickness (by ellipsometry) and **b** ( $\Delta f$ ) (by quartz crystal microbalance), of alternated layers of bacterial cellulose nanocrystals (BCN) and xyloglucan (XG).

The first deposited XG layer changed the contact angle to  $42 \pm 1^\circ$  for 0.42%  $\text{SO}_3^-$  and 0.65%  $\text{SO}_3^-$  and to  $34.0 \pm 0.7^\circ$  for 0%  $\text{SO}_3^-$  clearly showing the XG coverage. The QCM data presented an increase in mass deposition ( $-\Delta f$ ) but only slight increase in thickness for all BCN samples. This is probably due to the fact that the XG fills pores of the first BCN layer. The 0%  $\text{SO}_3^-$  surface presented the highest XG mass deposition and thickness increase, followed by 0.42%  $\text{SO}_3^-$ , corroborating the previous results seen in the water suspension, suggesting that introduction of  $\text{OSO}_3^-$  disturbs the original cellulose-XG interaction.

The second deposited BCN layer presented highly irregular coverage for 0%  $\text{SO}_3^-$  with a higher mass deposition and a macroscopically observable irregular

deposition (see SM4). The films' thickness in this case were evaluated also by atomic force microscopy (see the section on atomic force microscopy in the material and methods for more details) in order to confirm the large increase in thickness by ellipsometry (BLACHECHEN *et al.*, 2012). Although this measurement is not as accurate as ellipsometry, the height difference between the film surface and substrate after film scratching (peak-to-valley distance) provides an estimative of the thickness. The means of peak-to-valley were up to 200 nm (see SM5). The high thickness and irregular film deposition is due to 0%  $\text{SO}_3^-$  leakage of the electrostatic repulsion surface. The BCN 0%  $\text{SO}_3^-$  suspension already contained aggregated particles before adsorbance on the surface, as shown by the dynamic light scattering profiles. Furthermore, a 0%  $\text{SO}_3^-$  covered surface is attractive for continuous adsorption of other BCN particles or aggregates in a constant flux of BCN suspension. These results are in accordance with WINTER *et al.* (2010), whose demonstrated that BCN 0%  $\text{SO}_3^-$  aggregation results in irregular film deposition and high thickness. Thus, the next layers of 0%  $\text{SO}_3^-$  BCN cannot indicate a reliable comparative effect of surface interaction and were excluded from the next analysis.

In contrast, the sulfated BCN presented similar thin layer coverage, as confirmed by the thickness values measured by ellipsometry and QCM data. The sulfated BCN had high colloidal stability in water and were deposit on the surface with more homogeneity, as already demonstrated by JEAN *et al.*, 2009 and WINTER *et al.* (2010). Furthermore, the resulting surfaces covered by 0.42%  $\text{SO}_3^-$  and 0.65%  $\text{SO}_3^-$  presented electrostatic repulsion and avoid more BCN particles adsorption, as seen by reached a plateau on QCM (data not show) when was considered complete covered. On the other hand, the 0% $\text{SO}_3^-$  presented constant increase adsorption.

The second deposited XG layer on the 0.65%  $\text{SO}_3^-$  layer after 5 min of XG flushing followed by water washing resulted in desorption, as revealed by the decay of the resonance frequency ( $-\Delta f$ ) on QCM and decay of the thickness of the previous BCN layer measured by ellipsometry. Further attempts to cover with more XG solution resulted in more decay of  $-\Delta f$ , indicating new desorption process. On the contrary, the 0.42%  $\text{SO}_3^-$  presented an increase in thickness similar to first XG layer for 0.42%  $\text{SO}_3^-$ , with no desorption process. Additional alternate depositions of BCN and XG presented similar increase in thickness and mass quantity. Comparing the LbL deposition involving 0.42%  $\text{SO}_3^-$  and 0.65%  $\text{SO}_3^-$ , the latter yielded less stable layers due to the increase of surface sulfate content.

The high affinity between cellulose and XG has a well-known quasi-irreversible adsorption at room temperature (25 °C). This is mainly due to the high content of hydrogen bonds (cellulose-OH-OH-XG). Our results demonstrate for the first time that apparent introduction of sulfate groups on the surface of BCN can reduce adsorption of XG. However, through better control of the reaction conditions during isolation of the BCN, it is possible to isolate BCN with a lower degree of  $\text{OSO}_3^-$ , without significantly impairing the original adsorption with XG, preserving the advantages of high colloidal stability of the particles caused by the introduction of sulfate groups. Besides the extensive applicability of the individual particles (biosensors, enzyme supports), they might be used to coat (with single or multiple layers) different molecular architectures and surfaces (e.g., foams, micro bubbles, Pickering emulsions, biomedical devices), to reinforce thermoplastics (BLACHECHEN *et al.*, 2013) and to promote a barrier to control release (e.g., drug release, hydrogels).

## CONCLUSIONS

Sulfate esterification reaction during the isolation of cellulose crystals, by use of  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , modifies the adsorption between cellulose nanocrystals and XG in aqueous media. Using three distinct sulfate contents on cellulose nanocrystal surfaces (0, 0.42 and 0.65%), we demonstrated that 0.42% prevents particle aggregation and also does not significantly impair the adsorption to XG. Besides this, the 0.42% concentration produces better coverage composed of more homogeneous and intercalated layers of cellulose nanocrystals and XG (without desorption) than concentrations of 0% and 0.65%. Although the results presented here demonstrate clear adsorption difference caused by  $\text{OSO}_3^-$  esterification, more investigation is necessary to clarify what causes this different interaction between the BCN and XG interfaces.

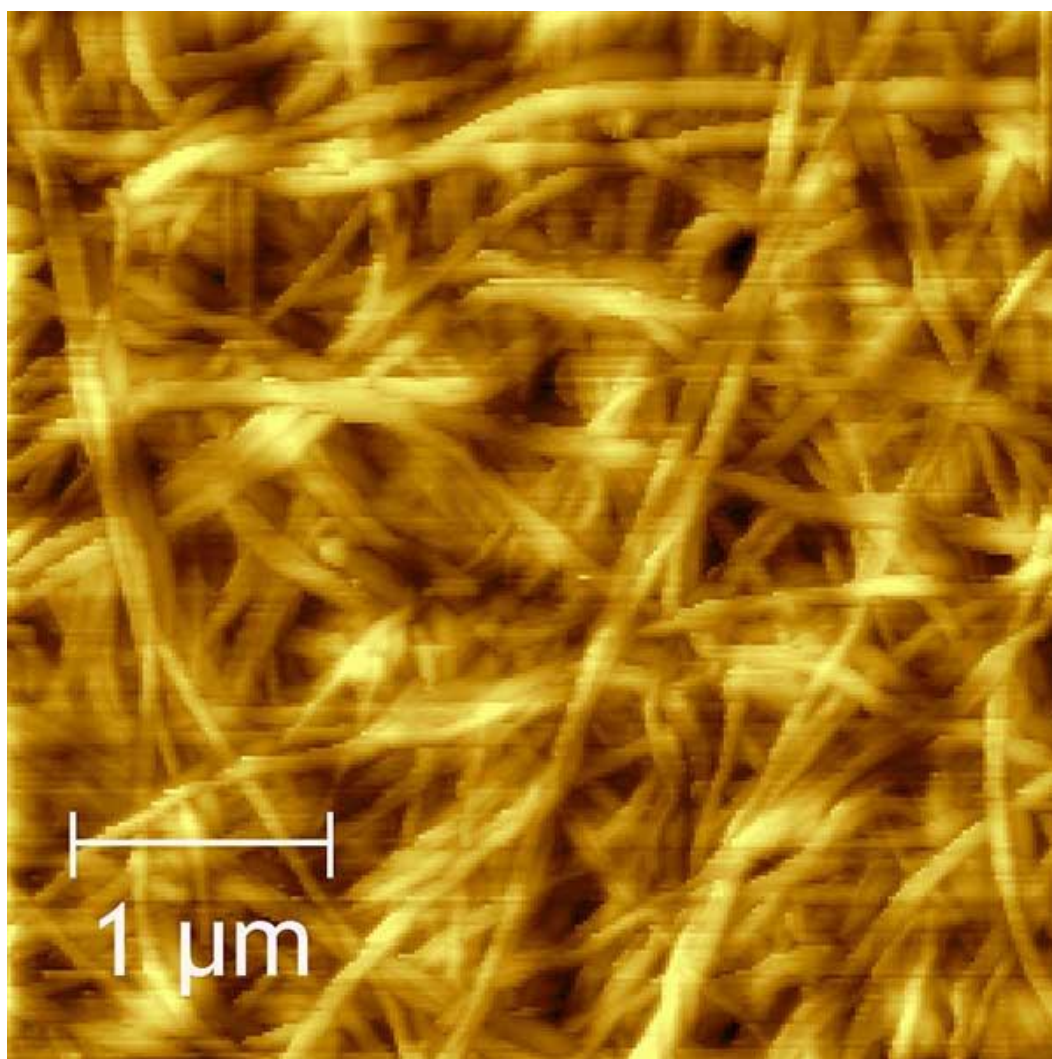
## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Brazilian funding agencies CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) and Rede Nanobiotec/Capes-Brazil and the REUNI program for financial support. We are grateful to Dr. Fernando Wypych and Dr. Fábio da Silva Lisboa for XRPD analysis, to Dr. Graciela B. Muniz (DEF, UFPR) for access to the supermass colloid mill, to Dr. Lionel Gamarra (Instituto Cérebro, Hospital Albert Einstein) for  $\zeta$ -

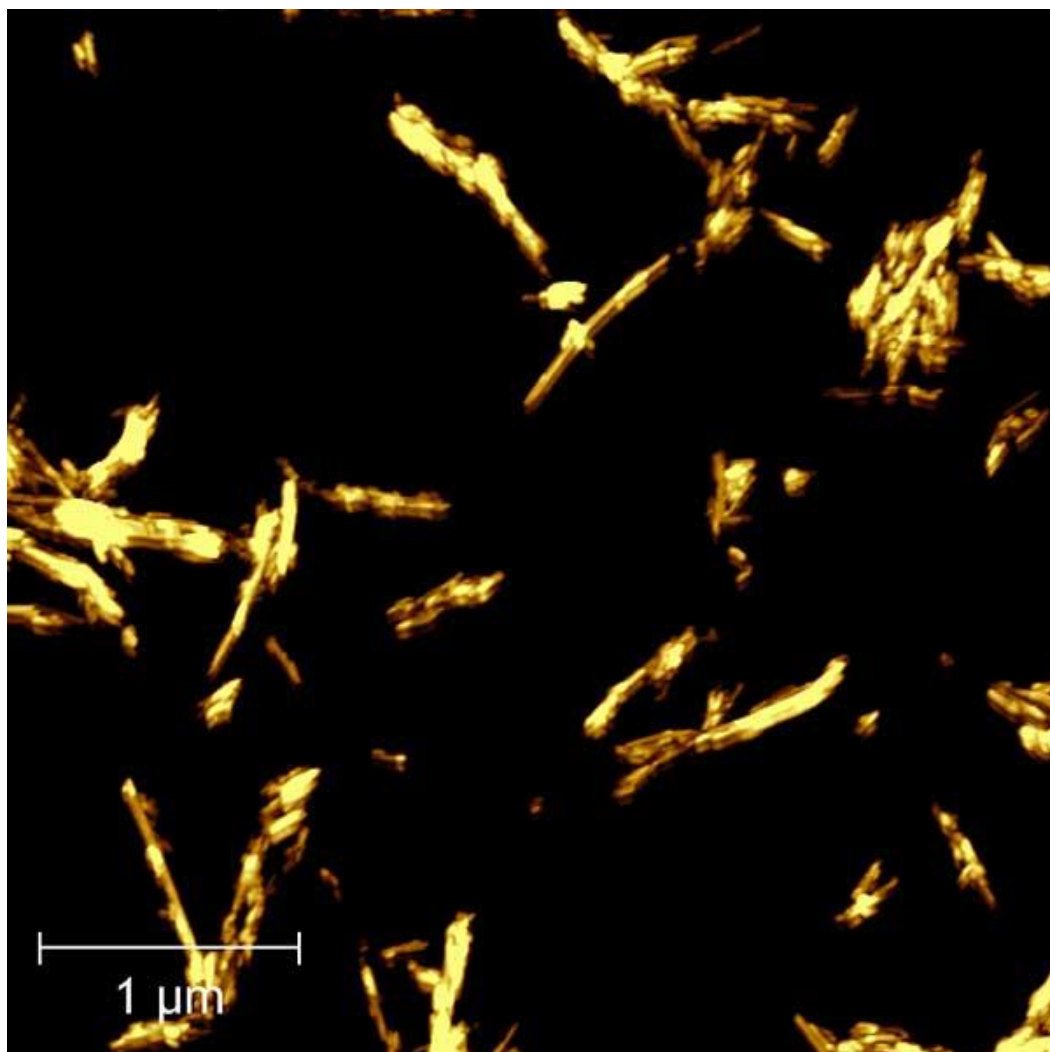
potential experiments, and to Membracel® (bacterial cellulose sample sheets) and Balasanka Mills (XG) for sample donations.

### Supplementary Material

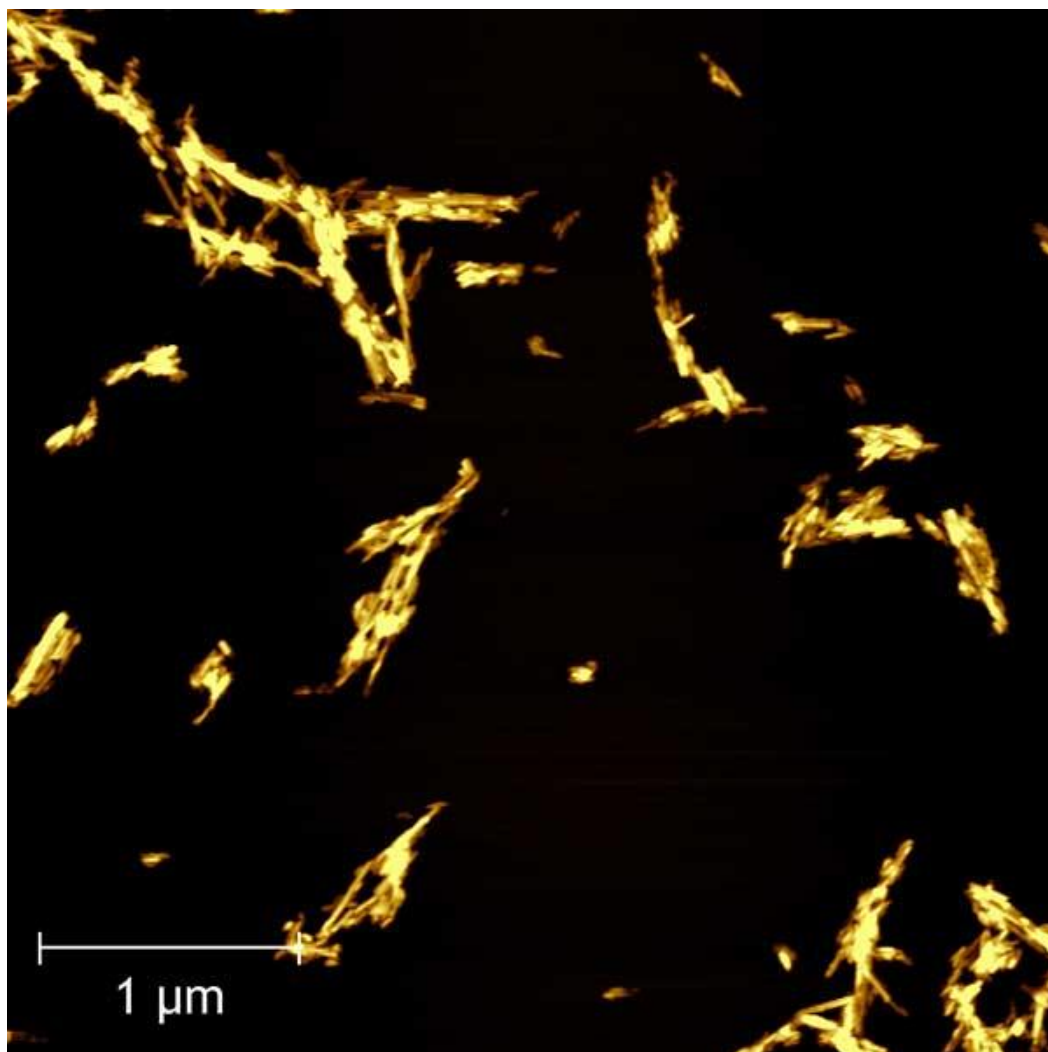
**SM1**- Bacterial cellulose morphology after milling and ultrasound treatment.



**SM2-** Bacterial cellulose nanocrystals isolated by HCl.

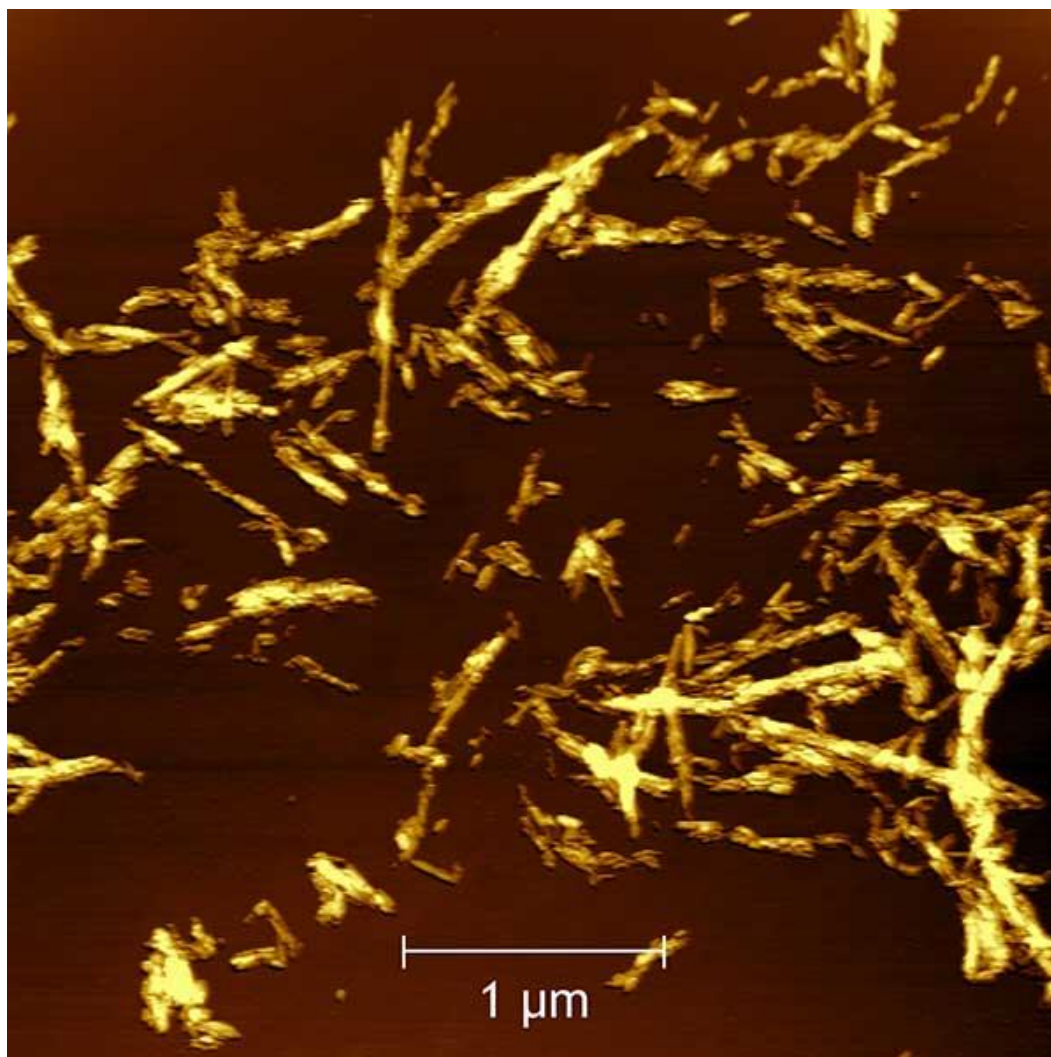


**SM3-** Bacterial cellulose nanocrystals isolated by a mix of HCl and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

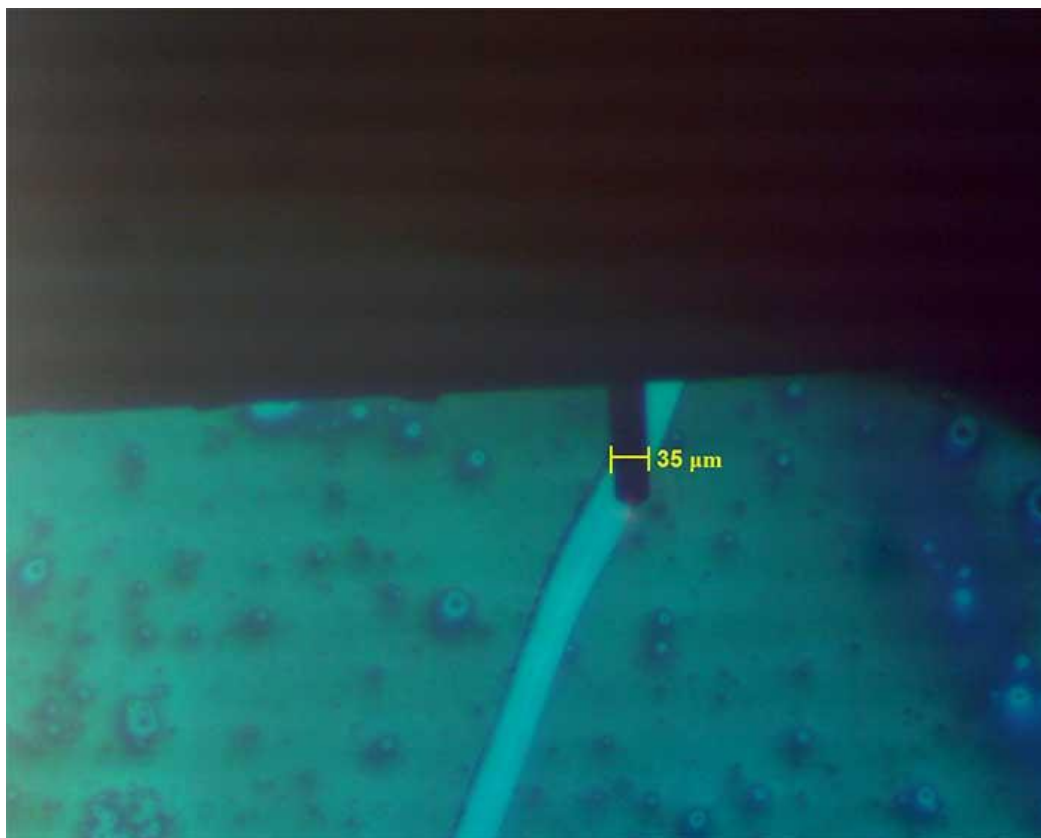




**SM4-** Bacterial cellulose nanocrystals isolated by  $H_2SO_4$ .



**SM5-** Optical microscopy image of scanned area of deposition (peak-to-valley) related to the second layer of bacterial cellulose nanocrystals isolated by HCl solution. The image shows the scratch produced by a clean sharp blade.



**SM6-** Determination of film thickness by means of AFM. In this example, BCN (isolated by HCl solution) film was scratched and the peak-to-valley distance corresponded to the film thickness (scan area  $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ )

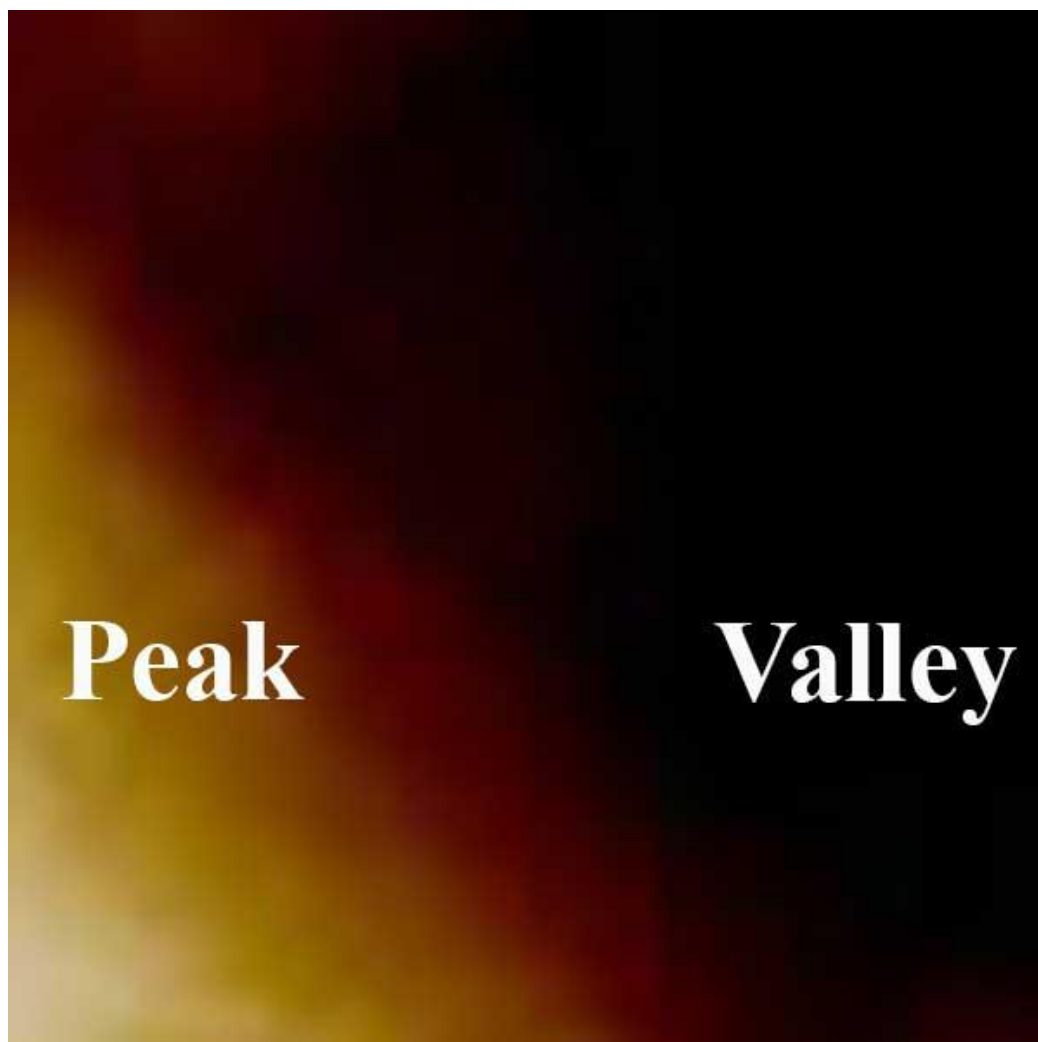


Table 1-SM. Change in the resonance frequency ( $\Delta f$ ), thickness and mean roughness (rms) determined for each deposited layer.

Deposition	Layer	$\Delta f$ (Hz)	Thickness (nm)	rms (nm)
-	PEI	0	$1.5 \pm 0.4$	$0.7 \pm 0.3$
1 <sup>st</sup>	BCN-HCl	0	10.1	$5.1 \pm 1.3$
1 <sup>st</sup>	XG	-320	13.4	$9.7 \pm 1.8$
2 <sup>nd</sup>	BCN-HCl	-1450	200	$32 \pm 15.3$
1 <sup>st</sup>	BCN-HCl/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	11.5	$8.7 \pm 1.9$
1 <sup>st</sup>	XG	-290	15.0	$7.1 \pm 0.9$
2 <sup>nd</sup>	BCN-HCl/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-380	24.5	$8.1 \pm 2.1$
2 <sup>nd</sup>	XG	-393	26.3	$6.7 \pm 1.4$
3 <sup>rd</sup>	BCN-HCl/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-430	35.2	$9.1 \pm 3.1$
3 <sup>rd</sup>	XG	-451	38.1	$7.3 \pm 1.9$
1 <sup>st</sup>	BCN-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	9.1	$7.9 \pm 1.8$
1 <sup>st</sup>	XG	-230	14.2	$6.8 \pm 1.2$
2 <sup>nd</sup>	BCN-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-290	18.1	$7.7 \pm 2.2$
2 <sup>nd</sup>	XG	-190	16.1	$7.1 \pm 3.2$

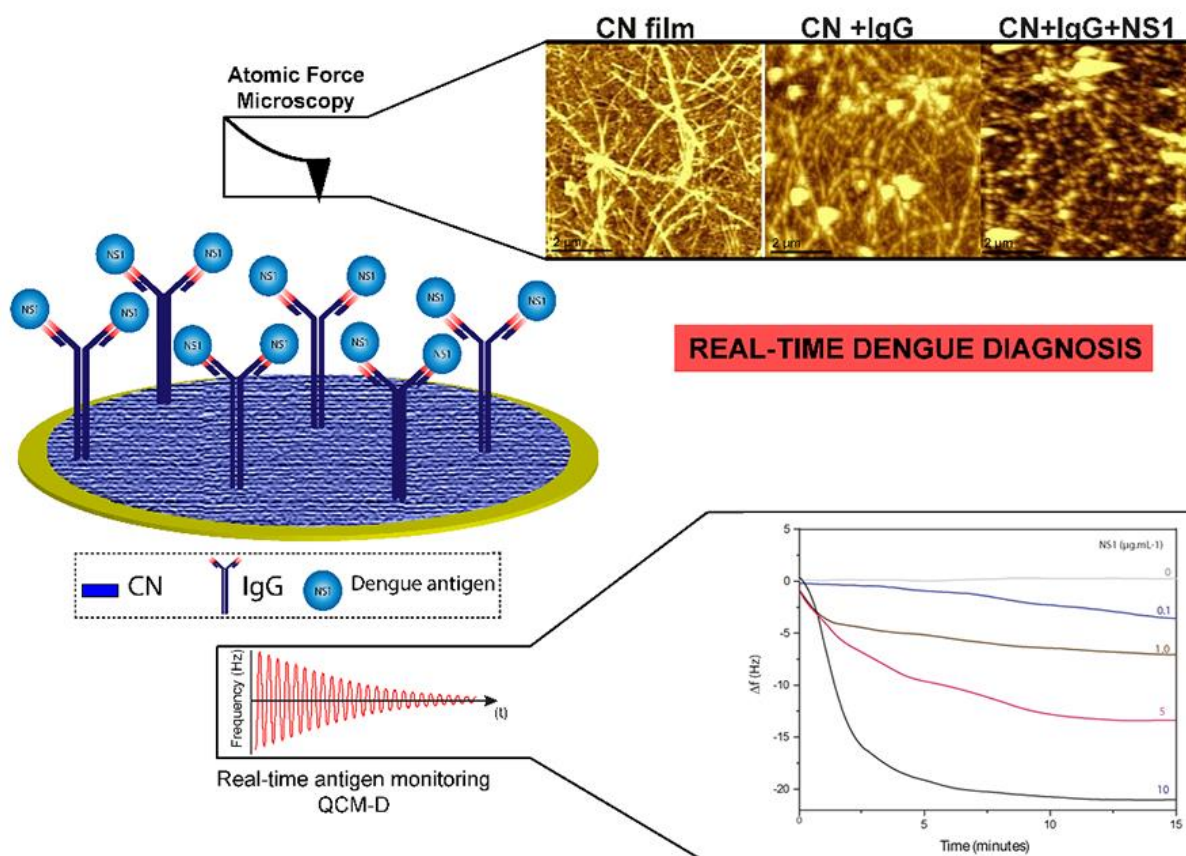
4.1

ARTIGO 2:

PIEZOELECTRIC IMMUNOCHIP COATED WITH THIN FILMS OF BACTERIAL CELLULOSE NANOCRYSTALS FOR DENGUE DETECTION

**Biosensors and Bioelectronics 92 (2017) 47–53 – Fator de impacto 7,78 Qualis A1 (CBII)**

Cleverton Luiz Pirich<sup>1,2</sup>, Rilton Alves de Freitas<sup>2</sup>, Roberto M. Torresi<sup>3</sup>, Guilherme Fadel Picheth<sup>2</sup>, Maria Rita Sierakowski<sup>1,2,\*</sup>



### Abstract

Low-cost piezoelectric devices, such as simple frequency monitoring quartz crystal microbalance (QCM) devices, have good clinical utility as fast diagnostic tools for the detection of several diseases. However, unspecific antigen

recognition, poor molecular probe adsorption and the need for sample dilution are still common drawbacks that hinder their use in routine diagnosis. In this work, piezoelectric sensors were previously coated with thin films of bacterial cellulose nanocrystals (CN) to provide a more sensitive and adapted interface for the attachment of monoclonal immunoglobulin G (IgGNS1) and to favor specific detection of non-structural protein 1 (NS1) of dengue fever. The assembly of the immuno chip surface was analyzed by atomic force microscopy (AFM) and the NS1 detection was followed by quartz crystal microbalance with (QCM-D) and without energy dissipation monitoring (QCM). The CN surface was able to immobilize  $2.30 \pm 0.5 \text{ mg.m}^{-2}$  of IgGNS1, as confirmed by AFM topography and phase images along with QCM-D. The system was able to detect the NS1 protein in serum with only 10-fold dilution in the range of  $0.01\text{-}10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  by both QCM and QCM-D. The limits of detection of the two devices were  $0.1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  for QCM-D and  $0.32 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  for QCM. As a result, QCM-D and QCM apparatuses can be used to follow NS1 recognition and have good potential for more sensitive, fast and/or less expensive diagnostic assays for dengue.

**Keywords:** Dengue; biosensors; quartz crystal microbalance; NS1 protein; cellulose nanocrystals.

## Introduction

Dengue fever affects over half of the world's population, causing thousands of deaths every year in urban and semi-urban areas (ANTUNES *et al.*, 2015; WHO, 2016). This disease is endemic and widespread in subtropical and tropical countries, with higher dissemination rates in South Asia, Africa and South and Central America (DECKER, 2012). The dengue virus (DENV) belongs to the

Flavivirus genus along with members responsible for yellow fever, Zika fever and West Nile fever, all transmitted by arthropods (KUHN *et al.*, 2002). In particular, DENV is transmitted by *Aedes* sp mosquitoes and four distinct serotypes are present (DENV I, II, III and IV), all capable of causing dengue fever. After infection with any of the DENV serotypes, the patient acquires long-term immunity, but against only one specific serotype (GUBLER, 2006).

The general symptoms of the disease are fever and severe joint pain, though more drastic ones can occur (e.g., shock syndrome) in a second infection caused by distinct DENV serotypes (KUHN *et al.*, 2002). Unfortunately, the correct diagnosis still represents a problem since the symptoms are nonspecific and can be easily confused with other diseases, such as the simple flu (BHATT *et al.*, 2013). The currently available diagnostic tools are viral isolation, detection of immunoglobulins by ELISA produced against DENV and the detection of virus molecules (e.g., RNA or DNA) by RT-qPCR. Although these techniques display high accuracy in dengue diagnosis, they are time-consuming, expensive and require highly trained personnel for correct execution (PARKASH; SHUEB, 2015).

According to the World Health Organization (WHO), 3.9 billion people in 128 countries are at risk of infection, so the development of faster, cheaper and more accurate diagnostic tools is necessary (WHO, 2016). Among the several biomarker methods utilized in dengue diagnosis, the detection of non-structural protein 1 (NS1) of DENV is one of the most employed strategies (ALCON *et al.*, 2002; LAPPHRA *et al.*, 2008; GELANEW *et al.*, 2015). The NS1 antigen is the best known and studied biomarker of dengue and is present in the blood serum at 1-10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  on the first day after infection (DARWISH *et al.*, 2015). Once

infected, the host cell expresses the virus's NS1 protein ( $M_w \approx 45$  kDa) and secretes it into the bloodstream (ALCON *et al.*, 2002; SAITO *et al.*, 2015). Furthermore, this antigen is highly conserved among the four serotypes, and many anti-NS1 monoclonal antibodies are currently able to distinguish the serotypes in a single test (PARKASH; SHUEB, 2015).

Recent efforts have been made to perform NS1 recognition through portable, low-cost and accurate biosensors (ZHANG *et al.*, 2015; SINAWANG *et al.*, 2016; WONG *et al.*, 2016). In particular, piezoelectric biosensors such as quartz crystal microbalance (QCM) sensors offer all of these technical advantages and combine fast analytical procedure with real-time monitoring of biomarker detection, allowing quantitative screening ( $\text{ng}/\text{cm}^2$ ) of adsorption phenomena (BRAGAZZI *et al.*, 2015). More sophisticated QCM analysis is able to follow several overtones, screen energy dissipation (QCM-D) and play an important role in the development and biosensor validation (BRAGAZZI *et al.*, 2015).

However, DENV diagnosis in complex samples requires the prevention of non-specific interactions along the sensor's surface, a usual drawback found in current QCM analysis. In fact, several studies describe further surface modifications of QCM sensors have been reported, such as improved sensitivity and reduced interference in NS1 recognition of serum samples after coating the sensor's surface with cibacron blue to remove serum albumin and IgG (WU *et al.*, 2005; CECCHETTO *et al.*, 2015). Distinct coating techniques can also provide more sensitivity and reduce sample interaction, such as improved roughness (more antibodies attach per unit of area) or greater surface area (CHENG *et al.*, 2012).



An attractive and functional material for biosensor coating is cellulose nanocrystals (CN). These can be isolated from pristine cellulose (extremely abundant, renewable and biocompatible) by several different treatments (e.g., chemical, enzymatic or mechanical), resulting in nanoparticles with needle shape (e.g., length: 200-1000 nm and width: 5-20 nm) and improved mechanical properties (>70% crystalline index and >100 mPa Young's modulus), providing a versatile surface to attach biomolecules (MARIANO *et al.*, 2014).

CN have also been described as forming thin nanofilms with different roughness and organization degrees on piezoelectric sensors by spin-coating techniques, providing a simple and fast way to functionalize these surfaces with different molecules. Furthermore, such films have been reported to exhibit piezoelectric properties comparable to piezoelectric sensors such as quartz (CSOKA *et al.*, 2012; RAJALA *et al.*, 2015).

In this paper, we propose the functionalization of existing piezoelectric sensors available in the market with thin films of CN to anchor monoclonal immunoglobulin against NS1 dengue antigen. The system was evaluated as a biosensor to recognize NS1 antigen in real time by piezoelectric disturbance. The correlation results between QCM with (QCM-D) and without (QCM) dissipation monitoring were evaluated along with surface analyses by atomic force microscopic (AFM) imaging. We found that thin films of CN present a more suitable platform to perform dengue diagnosis, with lower blood serum dilution than so far reported for piezoelectric sensors. The NS1 antigen was effectively recognized by the proposed platform without the requirement of dissipation monitoring, which can thereby open potential application to design cheaper and simpler piezoelectric devices for clinical diagnostics.

## Materials and Methods

### Materials

Bacterial cellulose was provided by Membracel<sup>®</sup> and converted into pulp by mechanical treatment (PIRICH *et al.*, 2015). Ammonium persulfate, acetic acid, sodium acetate, dihydrogen phosphate, hydrogen phosphate, ethanolamine chlorate, n-hydroxysuccinimide, n-ethyl-n´-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma Aldrich<sup>®</sup>. The monoclonal immunoglobulin anti-NS1 (IgGNS1) and NS1 antigen were purchased from ABD Serotec<sup>®</sup>. All solutions and dispersions were prepared with ultra-purified water (18.2 MΩ.cm<sup>-1</sup>, Millipore Milli-Q purification system). The pHs of phosphate buffer saline (PBS) and sodium acetate (NaOAC) buffers were adjusted to 7.4 and 4.5, respectively. Blood serum of healthy patients was collected to simulate testing with the addition of purified NS1 antigen in the concentrations of 0, 0.01, 0.1, 1.0 and 10.0 µg.mL<sup>-1</sup>. The serum samples were diluted with PBS, according to necessity.

### Methods

#### Cellulose hydrolysis

Dispersions of pulp sheets of bacterial cellulose (20 mg.mL<sup>-1</sup>) were ground in a Supermasscolloider mill (Masuko Sangyo MKCA6-2), 20 times at the lowest distance between the discs (~1 µm). The milled cellulose was added to a heated ammonium persulfate solution (1 mol.L<sup>-1</sup>, 60 ± 1 °C) during 120 min. The resulting dispersion was transferred to a cold ultrapure water bath (4 °C) for quenching.

Next, the suspension was centrifuged (4,600 x g for 15 min) and the supernatant was discarded. The sediment was redispersed in ultrapure water and centrifuged again (repeated 2x). Then, the sediment was redispersed in ultrapure water and submitted to dialysis (dialysis tubing with a molecular weight cutoff of 12-14 kDa) against ultrapure water, until the pH remained neutral for at least 12 hours. The resulting suspensions were then sonicated for 10 min and centrifuged at 4,600 x g for 15 min, to remove large particles. In this step, the sediment was discarded and the supernatant was collected. The resulting dispersion was stored at 4 °C with  $\text{CHCl}_3$  ( $20 \mu\text{l.mL}^{-1}$ ).

#### Conductivity titration

Conductivity titration was employed to determine the oxidation degree (OD) on the surface of the isolated CN. The carboxyl groups of CN dispersion ( $2.6 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) were converted to acidic form with hydrochloric acid to a final concentration of  $0.01 \text{ mol.L}^{-1}$ . Then, the dispersion was titrated with constant addition of NaOH solution ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) and the conductivity changes were monitored. The OD was calculated by the following equation:

$$\text{OD} = 162 (V_2 - V_1) c [w - 36(V_2 - V_1)c]^{-1} \quad (\text{eq. 1})$$

where,  $V_1$  and  $V_2$  are the amounts of NaOH (L),  $c$  is the NaOH concentration ( $\text{mol.L}^{-1}$ ), and  $w$  is the weight of the CN (g), 162 corresponds to glucose molecular weight and 36 is the difference of anhydroglucose molecular weight and glucuronic acid sodium salt moiety.

### ATR-FTIR spectroscopy

Infrared spectroscopy was used to confirm the oxidation of CN by ammonium persulfate. The spectra were recorded with a Vertex 70 FTIR spectrometer (Bruker Co., Billerica, USA) equipped with an attenuated total reflectance (ATR) accessory. All spectra were obtained using freeze-dried CN in acidic form (pH 2.0), with 16 scans and resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$  in the range of  $400 - 4,000\text{ cm}^{-1}$ .

### Immuno chip surface assembly

5 MHz AT-cut quartz crystals coated with gold were cleaned at  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  with a heated piranha solution composed of  $\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4:\text{H}_2\text{O}_2$  (7:1:1, v:v:v) for 30 min and rinsed with deionized water and vacuum dried in an oven. Next, the piezoelectric discs were mounted on a homemade spin-coating device and  $100\text{ }\mu\text{L}$  of polyethylenimine solution ( $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was added to its surface. The solution was kept static for 10 min for adsorption. Afterward, the piezoelectric disc was accelerated to 300 rpm for 30 s. This procedure was repeated once more using  $100\text{ }\mu\text{L}$  of CN dispersion ( $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). All crystals are kept in an oven at  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 8 h for water removal.

The immuno chips covered by CN films were placed on a QCM or QCM-D cell-flux. The reaction steps and interface modifications were the same for both devices. All the injections were performed in the cell flux with a flow rate of  $100\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . The first step consisted of NaOAc buffer injection for frequency stabilization. Then, a solution of EDC and NHS ( $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively) was added for 30 min, followed by injection of NaOAc buffer for 15 min. PBS buffer injection was employed to wash the surface for at least 15 min. Once the frequency was stabilized,  $100\text{ }\mu\text{L}$  of IgG-NS1 ( $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was added for 60 min, followed by PBS buffer for 15 min. After that, a solution of

ethanolamine chlorite ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) was injected for 15 min, also followed by PBS buffer for 15 min. Then, an albumin solution ( $100 \text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) was injected for 10 min, also followed by PBS buffer. Finally, NS1 antigen was injected in four different concentrations ( $0.01$ ,  $0.1$ ,  $1.0$  and  $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), followed by PBS buffer. All experiments were performed in triplicate.

#### QCM without energy dissipation monitoring

Changes in the frequency of the immunochips during the assembly process and antigen recognition were assessed by QCM (SRS, Stanford research systems). Real-time QCM experiments were performed in a flow cell (SRS) connected to a peristaltic pump with a  $100 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$  constant flow rate. This technique, without energy dissipation monitoring, was simple and termed QCM.

#### QCM with energy dissipation monitoring

Interaction and analyses of the activation of the CN thin films were carried out using a QCM-D E4 instrument (Biolin Scientific AB, Gothenburg, Sweden) with controlled flow. All measurements were performed using a constant  $100 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$  flow rate, at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . The measured frequency shift obtained in QCM-D experiments was fitted to the Johannsmann model (JOHANNSMANN *et al.*, 1992) to quantify changes in mass of the QCM-D sensors carrying the then CN films. The iterative process in the model used the third, fifth, and seventh frequency overtones of the QCM-D crystal. The data points were fitted with the four-parameter logistic equation (Equation 1) (FINDLAY; DILLARD, 2007). The limit of detection (LOD) was calculated according to the concentration given by the interpolation of the blank signal plus three times the standard deviation (WANG *et al.*, 2017).

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} \quad (\text{Eq. 2})$$

Where  $A_1$  and  $A_2$  are the zero and infinite concentration responses, respectively,  $p$  is the slope factor,  $x$  is the NS1 concentration and  $x_0$  is the inflection point.

#### Atomic force microscopy

Aqueous dispersions of CN were diluted to  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and spin-coated on a freshly cleaved mica surface. The dimensions and the root mean square values for surface roughness of the isolated CN and the immunochip surface assembly were determined by means of atomic force microscopic (AFM) images. All images were obtained in air in the intermittent contact mode with an Agilent 5500 microscope (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), using Mikromasch NSC14 silicon tips (Mikromasch USA, San Jose, CA, USA) with a nominal spring constant of  $5.7 \text{ N m}^{-1}$  and a resonance frequency of  $\sim 100 \text{ kHz}$ . The scanning areas were  $2.0 \mu\text{m} \times 2.0 \mu\text{m}$ ,  $4.0 \mu\text{m} \times 4.0 \mu\text{m}$  and  $8.0 \mu\text{m} \times 8.0 \mu\text{m}$ . The images were acquired using the Pico Image software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and processed with the Gwyddion software (Czech Metrology Institute).

## Results and discussion

### Isolation and characterization of cellulose nanocrystals

The binding of biomolecules (e.g., enzymes, antibodies) to cellulosic surfaces usually requires an oxidation process followed by activation steps, such as EDC/NHS and epoxidation, to provide available functional groups for optimal

binding efficiency. In particular, CN oxidation is usually done by an additional step after the hydrolysis process, treating CN with a 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO) solution (HABIBI *et al.*, 2006). Recently, LAM *et al.* (2013) treated pristine cellulose with a heated ammonium persulfate solution, obtaining oxidized CN with only one reaction step. Therefore, this process was employed to obtain pre functionalized CN with lower cost and greater production facility.

By applying that process, the CN products were characterized regarding morphology, size, surface charge and available functional groups. Initially, AFM topographies revealed dimensions in the range of  $5.0 \pm 2.0$  nm in width and 200-600 nm in length, thus confirming the CN isolation (Erro! Fonte de referência não encontrada.-A). Moreover, the CN FTIR spectra revealed strong absorption bands near  $3340\text{-}3338\text{ cm}^{-1}$ , related to the -OH groups, and between  $2900\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ , assigned to -CH stretching vibrations (Erro! Fonte de referência não encontrada.-B). The oxidation procedure was confirmed by the presence of an intense signal at  $1729\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to the stretching vibration of -COOH groups (FOLLAIN *et al.*, 2010; LAM *et al.*, 2013). The total surface charge was quantified by conductivity titration and exhibited an oxidation degree of  $0.187\text{ g}^{-1}$ , as shown in **Figure 1-C**.

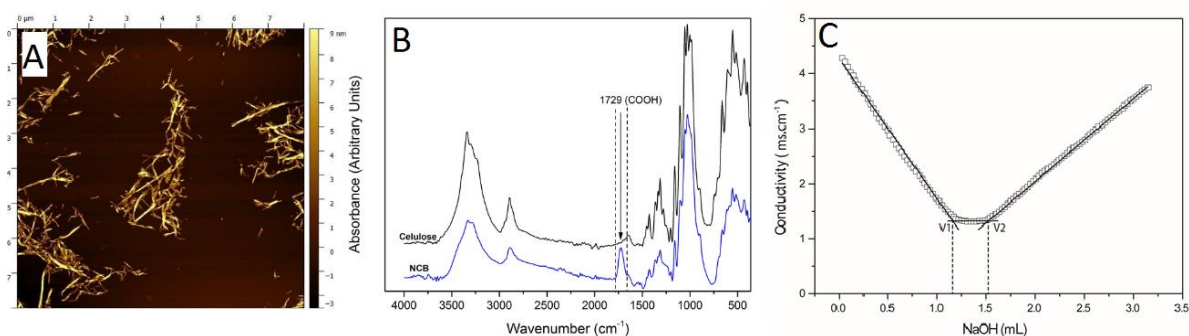


Figure 1: A) AFM topography image of CN, B) FTIR spectra of CN in acidic form (freeze-dried at pH 4) and C) conductivity titration profile of CN.

#### Immunochip assembly

Efficient and selective antigen recognition is a key factor for QCM-based diagnostic tools. Since the current systems lack interactivity between the surface and the target molecule, poor responses and intense signal interference are usually observed when analyzing complex biological samples. Although standard chip surfaces (e.g., gold) are already employed to recognize isolated molecules, they fail to detect targeted compounds in the blood serum or urine (REIMHULT *et al.*, 2008). To overcome this limitation, the QCM sensors were covered with CN with the aim of increasing the interface reactivity to antibodies (ORELMA *et al.*, 2012; ORELMA *et al.*, 2012). Therefore, all cellulosic model surfaces were developed on piezoelectric sensors with a gold interface. However, as previously described by JEAN *et al.*, 2009, gold surfaces are well known to hinder stable CN adsorption. Thus, a previous coating step employing polyethylenimine (PEI) on the piezoelectric sensors was necessary to guarantee the formation well anchored CN films. The sequential deposition of PEI and CN films was confirmed by topography and phase AFM images (**Figure 2**).

The topography images represent a 3D distribution (x, y and z axis, in nm) of the scanned surface generated by the cantilever horizontal and vertical movements followed by laser reflection in a photodiode sensor. In parallel, the cantilever frequency oscillation during the scan produces images based on phase angle variation. Such profile is a function of the viscoelastic properties relative to the surface behavior, distinguishing soft and hard regions. As a result, in a non-



uniform surface, the phase angle distribution can be used to discern differences in sample composition (SCOTT; BHUSHAN, 2003).

After each film deposition, the AFM scans displayed clear PEI and CN film formation on the piezoelectric sensor, demonstrated by morphological changes, roughness variation - piezoelectric sensor:  $3.5 \pm 0.4$  nm, PEI:  $2.4 \pm 0.5$  nm and CN:  $8.4 \pm 2.4$  nm – and phase angle distribution - gold:  $20 \pm 5^\circ$ , PEI:  $55 \pm 2^\circ$  and CN:  $145 \pm 20^\circ$ .

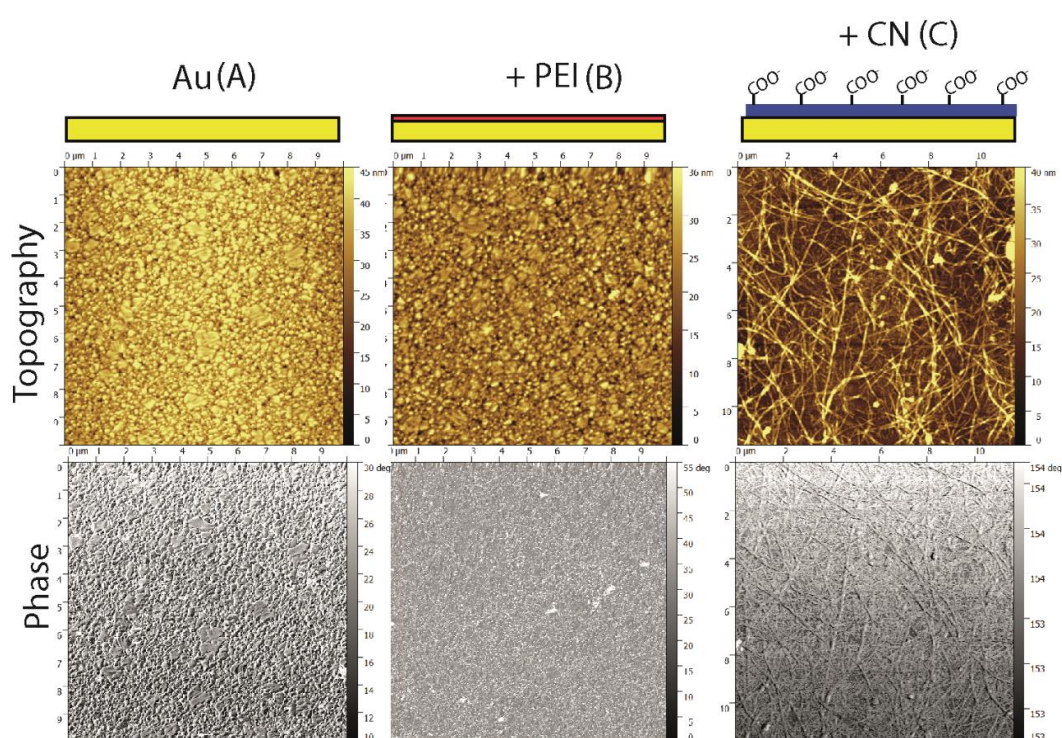
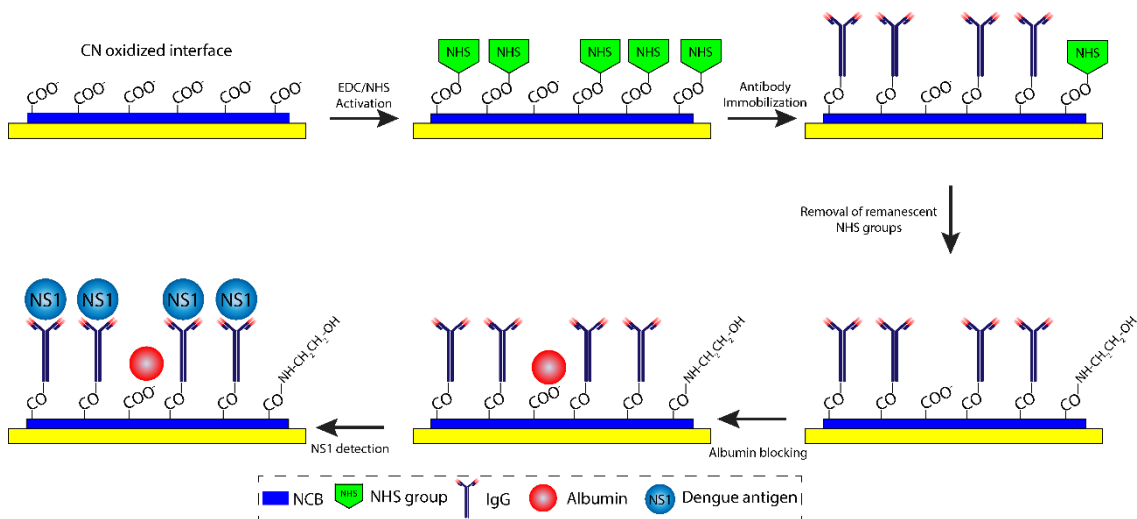


Figure 2: AFM topography (top) and phase (bottom) images of piezoelectric sensor surfaces: (A) gold, (B) PEI film and (C) CN film.

Once the cellulosic model surface was established on top of the piezoelectric sensors, they were transferred to a QCM-D cell flux. Scheme 1 is a schematic representation of the entire surface modifying steps. Initially, a solution of NaOAc buffer was infused during 8 h to stabilize the frequency because the

cellulosic fibers undergo a constant swelling process, which causes high frequency and dissipation disturbance (KITTLE *et al.*, 2011).



Scheme 1: Schematic representation of sequential immunochip assembly. (1) First the CN film is activated by an injection of EDC/NHS solution, (2) the IgGNS1 solution is injected for immobilization, (3) ethanolamine chloride solution is injected for removal of residual NHS groups, (4) unspecific regions are blocked by injection of albumin solution, and finally (5) the system is tested to recognize the NS1 antigens.

To give the cellulose interface more reactivity towards IgG immobilization, a solution composed of EDC/NHS was injected into the system (**Figure 3A – step 1**). During this step, the EDC reacts with the CN's carboxyl groups by nucleophilic addition and it is subsequently substituted by NHS groups, which are able to provide higher IgG anchoring yield (ORELMA *et al.*, 2012). A steep frequency decay –  $\sim 50$  Hz – and dissipation increase –  $\sim 12 \times 10^{-6}$  – were observed after EDC/NHS reaction. The surface was washed with NaOAc buffer at pH 5.0, resulting in  $1.84 \text{ mg.cm}^{-2}$  of NHS activation. AFM images revealed that the CN remained attached to the sensor's surface while maintaining the characteristic

morphology and roughness profile, though a clear shift in the phase angle distribution suggested the formation of a distinct interface (**Figure 3B**).

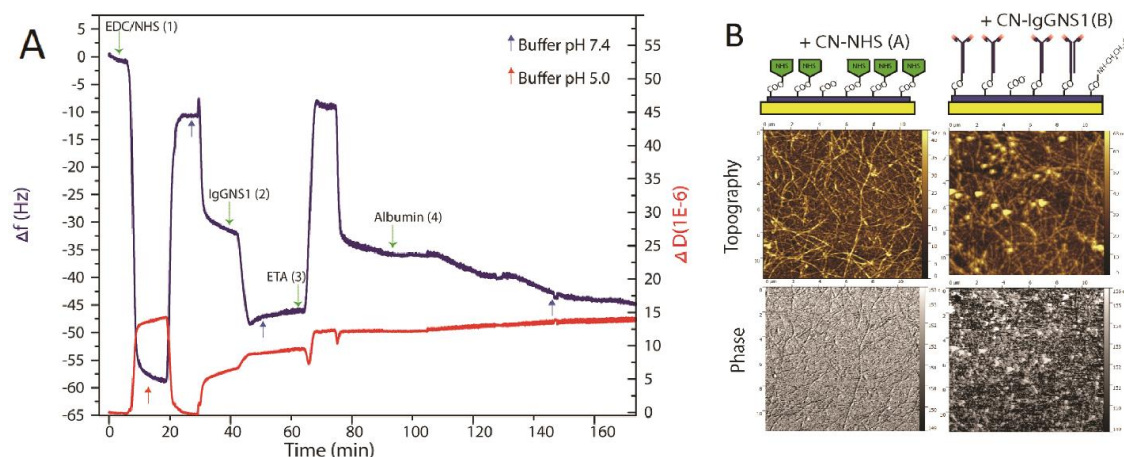


Figure 3: (A) Real-time immunoassembly followed by QCM-D (5<sup>th</sup> overtone). The steps are related to each sequential injection: (1) EDC/NHS, (2) IgGNS1, (3) ethanolamine chloride (ETA) and (4) albumin. (B) AFM topography and phase images of the interface obtained after (A) EDC/NHS activation and (B) IgGNS1 immobilization.

Since biological samples require physiological pH to maintain normal activity, the system was washed with PBS buffer at pH 7.4 until the frequency and dissipation values were stabilized. After that, a solution of IgGNS1 was continuously injected (**Figure 3A – step 2**). In this step, the IgGNS1 amine groups react with the n-hydroxysuccinimide groups of the CN films by nucleophilic substitution, generating a covalent bond between the amine and carboxyl groups. During this process, the frequency decayed – ~15 Hz – and the dissipation increased –  $\sim 6 \times 10^{-6}$  – indicating an effective IgGNS1 immobilization. The total IgGNS1 mass was  $2.30 \pm 0.5 \text{ mg.m}^{-2}$ , two-fold higher compared to other IgG of similar molecular weights (~50 kDa) deposited on cellulosic substrates

(CARRIGAN *et al.*, 2005; ORELMA *et al.*, 2012). This process was also confirmed by AFM images (**Figure 3B**): in this step, the AFM scans were performed in liquid media using PBS buffer to avoid possible denaturation. The CN films showed increased roughness and altered morphology, with globular structures randomly distributed along the surface – diameter  $55.5 \pm 15.4$  nm and height  $18.4 \pm 2$  nm. These globular structures also presented a different phase angle distribution compared to the CN films – CN:  $145 \pm 2.0^\circ$  and IgGNS1 immobilized:  $160 \pm 20.0^\circ$ . The film images were compared in PBS buffer and the globular structures appeared only in the CN films after IgGNS1 immobilization. Therefore, possible salt precipitation was discarded.

However, the remaining NHS groups might still be available on the surface and interfere with NS1 antigen recognition. These groups retain the ability to immobilize any molecule that possesses amine groups in its composition, such as free proteins present in a serum sample. To avoid this problem, a solution of ethanolamine chloride (ETA) was injected to react with NHS groups by nucleophilic substitution, blocking the reactive NHS groups to any unspecific coupling (**Figure 3A – step 3**). This step was followed by a frequency increase – 35 Hz – and a dissipation decrease –  $6 \times 10^{-6}$ . As the ethanolamine groups present a higher mass than NHS, the ethanolamine interact less with the PBS buffer, leading to a decrease in the solvent layer thickness and an increase of the frequency values. Similar behavior as observed by ORELMA *et al.* (2012).

Although the NHS are no longer available for cross-reaction with sample interference, the remaining hydroxyl and carboxyl groups on the cellulosic surface might provoke the same effect and lead to false NS1 biorecognition. Therefore, an albumin solution was injected to adsorb and avoid unspecific

protein anchoring (**Figure 3A – step 4**). The QCM-D profile was followed by frequency decay and energy dissipation. On the other hand, after PBS washing, the frequency and energy dissipation almost returned to their original values, indicating partial desorption of the albumin adsorbed in excess.

Once the immuno chip assembly was complete, the biorecognition with the NS1 antigen diluted in PBS was performed utilizing distinct concentrations, from 0.01 until 10.0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . This dilution range was employed to provide sensitive NS1 detection even after dilution of the blood serum, a required ( $10^4$  fold diluted) previous step used to reduce unspecific binding between the immuno chip and the sample's proteins.

**Figure 4A** presents distinct assays performed with several concentrations of purified NS1 antigen diluted in PBS buffer. Only 100  $\mu\text{L}$  of each solution was used and the volume was submitted to recirculation. All samples were submitted to normalization according to the moment of NS1 injection to facilitate further comparisons. After the injection, clear and abrupt frequency and dissipation disturbance was observed for all dilutions. The antigen-antibody interactivity presented similar adsorption kinetics, with dependence on both incubation period and NS1 concentration for the range of 0.01 to 0.1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Only the most concentrated sample, 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , exhibited steep frequency and dissipation shifts, illustrating that all available antibody binding regions were rapidly saturated. The final values of frequency and dissipation were used to calculate the final adsorbed mass: 15, 23, 40, 75, 100 and 260  $\text{mg.m}^{-2}$  for the concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 1.0, 5.0 and 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively. The response to blood serum samples contaminated with purified NS1 presented a similar trend – 12.5, 4.8, 73.5 and 113  $\text{mg.m}^{-2}$  for 0.1, 1.0, 5.0 and 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,

respectively – though they required 10-fold dilution to be effectively detected by the system, probably due to unspecific protein binding (**Figure 4B**). The results presented in **Figure 4A-B** were combined into Figure 4C, which exhibits the frequency shift according to NS1 concentration (**Figure 4C**). All parameters obtained by curve fitting are described in Table 1.

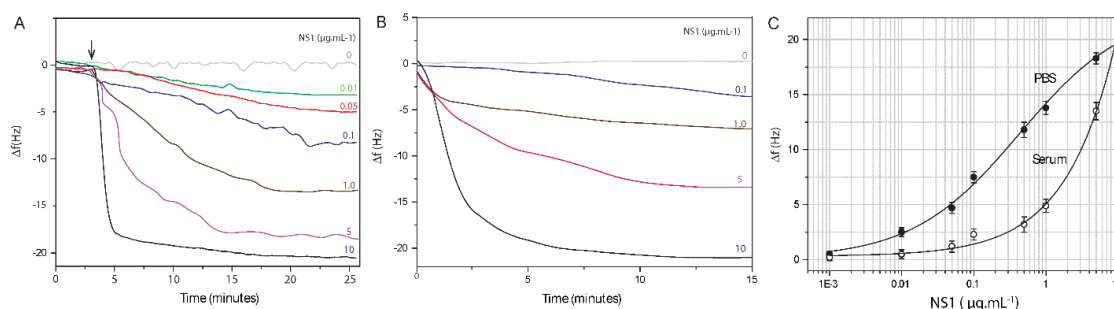


Figure 4: Frequency shift profile followed by QCM-D (5<sup>th</sup> overtone) during NS1 antigen recognition by the IgGNS1 immobilized on cellulosic surface. A) NS1 in PBS, B) NS1 in blood serum (diluted 10-fold in PBS) and C) NS1 frequency shift, in PBS and serum, according to employed dilutions (n. =3)

Table 1: Limit of detection (LOD), slope factor and coefficient of determination ( $r^2$ ) obtained by logistic curve fitting of NS1 detection performed in QCM-D and QCM.

Parameter	QCM-D		QCM	
	PBS	Serum	PBS	Serum
LOD ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	0.002	0.10	0.03	0.32
Slope factor	$0.58 \pm 0.1$	$0.63 \pm 0.2$	$1.22 \pm 0.27$	$0.86 \pm 0.19$
$r^2$	0.992	0.991	0.994	0.997

After the NS1 adsorption assay, the immunochips were removed from the cell flux and were thoroughly analyzed by AFM imaging. The roughness profile

showed no significant change and only the contrast images displayed a viscoelastic profile distinction – IgGNS1 immobilized:  $5.2 \pm 1.0^\circ$ , after NS1  $138 \pm 5.0^\circ$  – suggesting, along with the QCM-D results, effective NS1 binding to the surface.

The use of QCM as a biosensor device still presents several limitations, most of all related to the noise during the analysis, a common challenge for its application as a diagnostic tool. Undiluted and complex samples (e.g., serum blood, urine) interact strongly with the current generation of immunochip surfaces (e.g., gold interface), causing nonspecific adsorption that blocks active binding sites for target molecules and generates false positive results (VUORILUOTO *et al.*, 2016). WU *et al.* (2005) addressed this issue by performing surface coverage of piezoelectric sensors with pretreatment by cibacron blue 3GA gel-heat. After the coverage, the authors reported a lower surface interaction with non-specific proteins of the serum blood, therefore minimizing the need of high (100-fold) sample dilution. In fact, a previous study required more than 1000-fold dilution to avoid unspecific adsorption (WU *et al.*, 2005).

In this work, the immunochip composed of IgGNS1 immobilized on films of CN were able to detect NS1 in serum blood diluted 10-fold only, therefore representing an important advance in the diagnostic potential of piezoelectric biosensors. Besides the advantage of using CN (e.g., low cost, plentiful supply, biocompatibility and easy functionalization), the carboxyl groups at the CN interface provide an easy way to chemically modify and anchor bioactive molecules (ZHANG; ROJAS, 2016). Additionally, the coverage of the CN films showed an increase in the roughness and exhibited the formation of a porous

surface (**Figure 2**), which may augment the available area to immobilize a higher quantity of IgGNS1.

Therefore, the results obtained by QCM-D presented good sensitivity of the immunochip for bio recognition of NS1, although the QCM-D device is not yet ready for use in clinical practice due to its cost and inaccessibility to the diagnostic routine. Nonetheless, QCM devoid of dissipation monitoring (QCM) is cheaper, portable and might constitute a good candidate for this purpose. Although such simpler devices have the ability to follow the frequency of a piezoelectric sensor in real-time, they possess lower sensitivity and can only monitor fundamental frequency (1<sup>st</sup> harmonic). Hence, once the system is assembled and validated in a QCM-D, a similar response might be obtained and translated into a relevant diagnostic tool QCM. Such devices are simpler to operate and do not require trained personnel. Therefore, immunochips for QCM analysis were assembled exactly in the same conditions as QCM-D and the response was followed only by frequency shift (**Figure 5A**).

Then the immunochips were submitted to the bio recognition test with NS1 in PBS buffer with different concentrations (0.01, 0.05, 0.1, 1.0, 5.0 and 10.0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (**Figure 5B**). The QCM was able to detect concentrations from 0.03  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  in PBS according to the LOD presented in Table 1. As a result, the values obtained by QCM might be correlated with QCM-D and therefore have interesting potential for use in the clinical diagnosis of dengue. Finally, the immunochips were submitted to testing with NS1 in serum blood (**Figure 5C**). As previously observed in the QCM-D assays, the sensors were unable to distinguish the serum samples without dilution. When the serum was diluted 10-fold with PBS buffer, the QCM exhibited similar behavior of NS1 adsorption, with dependence on



concentration, and LOD of  $0.32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  was obtained (Table 1). The serum blood interference in the frequency was significantly higher in QCM.

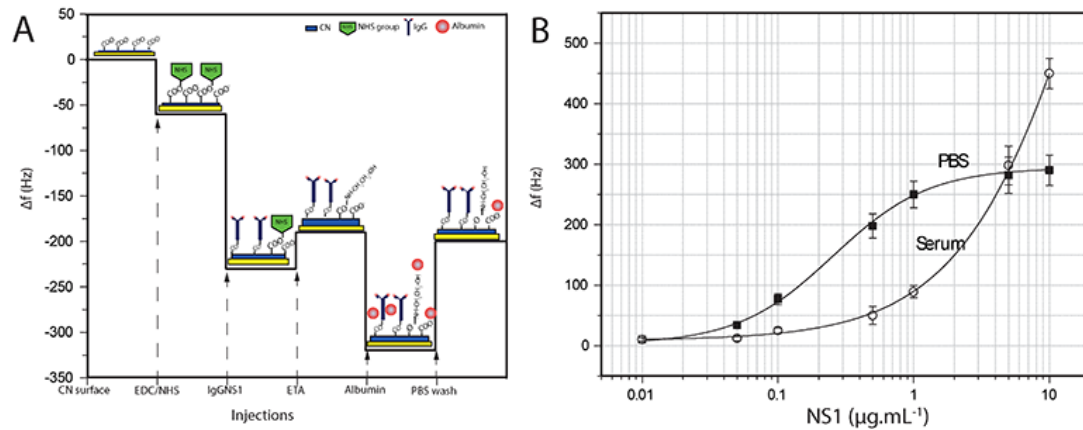


Figure 5: QCM assembly of immunochip (A), and NS1 frequency shift, in PBS and serum, according to employed dilutions (n=3) (B).

Comparatively, QCM has been shown to have the same sensitivity range as ELISA, as described by WU *et al.* (2005). Moreover, the average time for dengue diagnosis by ELISA is around 5 hours, against only 30 minutes when performed by QCM (Su, 2003). As the levels of NS1 in the bloodstream of patients during the acute phase of the disease oscillates from  $0.5$  to  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , our biosensor is fully capable of detecting NS1 down to  $0.31 \mu\text{g.mL}^{-1}$  in the serum either by QCM or QCM-D (ALCON *et al.*, 2002). As a result, QCM is able to provide a very sensitive and fast diagnosis of the disease, a crucial requirement to enable early treatment and avoid the manifestation of severe symptoms.

## Conclusion

In this study, we demonstrated the advantages offered by coating piezoelectric sensors with CN films. The proposed interface increased the total IgGNS1

immobilized mass by two-fold compared to cellulosic surfaces (CARRIGAN *et al.*, 2005; ORELMA *et al.*, 2012) and reduced the need of serum dilution for NS1 detection to 10-fold (usually up to 100-fold is required) (WU *et al.*, 2005). Furthermore, the NS1 detection in the serum (LOD of  $0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for QCM-D and  $0.32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for QCM) is compatible with the antigen concentration observed in the blood during the acute phase of dengue ( $0.5 - 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). With the comparative results between these two devices, we suggest that after proper validation of the immunochips by QCM-D and AFM, they can be effectively used in qualitative form in clinical diagnosis of dengue with greater confidence.

### **Acknowledgments**

We acknowledge the Brazilian funding agencies CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), process number 306245/2014-0, and Fapesp (2009/53199-3) for financial support, and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the fellowship to C.L. Pirich.

## 4.2

### ARTIGO 3

#### INFLUENCE OF MECHANICAL PRETREATMENT TO OBTAIN CELLULOSE NANOCRYSTALS BY SULFURIC ACID HYDROLYSIS

Em processo de submissão – Industrial Crops and Products – fator de impact 3,5  
Qualis A2 (CBII)

Cleverton Luiz Pirich<sup>a,b\*</sup>, Maria Rita Sierakowski<sup>a,b\*</sup>, Guilherme Fadel Picheth<sup>a</sup>, João Pedro Elias Machado<sup>a</sup>, Caroline Novak Sakakibara<sup>a</sup>, Andressa Amado Martin<sup>a</sup> and Rilton Alves de Freitas<sup>a</sup>

a: BioPol, Chemistry Department, Federal University of Paraná

b: Biochemistry and Molecular Biology Department, Federal University of Paraná

\* email address: cleverton.pirich@gmail.com;

## **Abstract**

The interest in cellulose nanocrystals at industrial scale is recently growing up, nevertheless, the actual price lacks is not commercially competitive. In order to change this scenario, several efforts have been made to optimize the reaction conditions. On the other hand, the effects of the pretreatment of starting material is rarely studied. In this work, we evaluated the impact of the mechanical process of pristine cellulose to obtain cellulose nanocrystals (CNC). Firstly, the pristine cellulose was submitted to four different mechanical process: (1) magnetic stirring, (2) blender, and milled by (3) 20 and (4) 40 passages in supermasscolloider mill. Next, all the samples were submitted to the same H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hydrolytic conditions and CNC were obtained, and then evaluated according to yield, morphology and size (atomic force microscopy), crystallinity (x-ray diffraction). Not all CNC differed in evaluated characteristics suggesting that, intense mechanical pretreatment are not exclusively required, prior to hydrolysis.

**Keywords:** cellulose nanocrystals, mechanical treatment, pretreatment, yield, optimization

## Introduction

Novel biomaterials developed from renewable and natural sources are receiving an unprecedented attention from the academia and industry to relieve the dependency on petrochemical-based feedstock and other derivatives produced from polluting origins. The growing interest in green chemistry and sustainable materials is also advantage for the non-toxic profile, biodegradability and low cost of related materials (SHELDON, 2017). Among them, cellulose is highlighted as the most abundant material obtained from several organisms, such as different plants, bacteria, tunicates and algae (TRACHE *et al.*, 2017). Because of these attributes, cellulose derivatives, such as methylcellulose, nitrocellulose and ester cellulose are highly explored industrially from a long date in many different applications (TRACHE *et al.*, 2017).

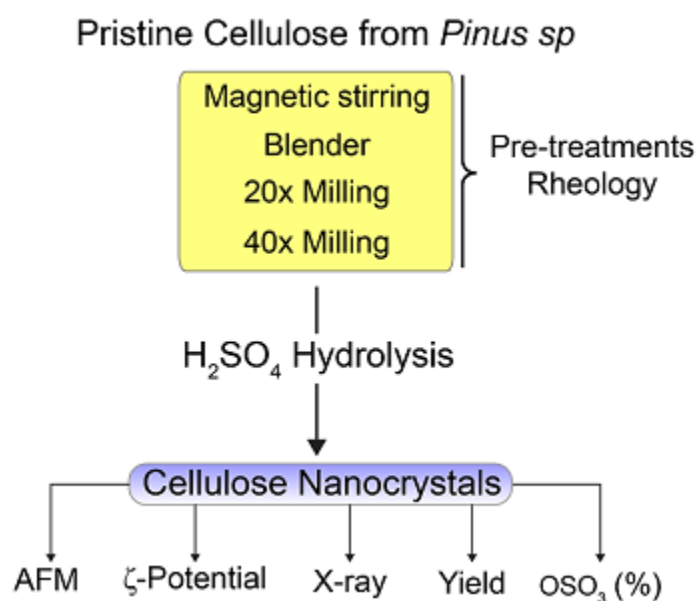
The crystalline regions of cellulose, defined as cellulose nanocrystals (CNC), displays remarkable mechanical and physic-chemical properties that are intensively explored in potential use in food, cosmetic and biomedical industries (TRACHE *et al.*, 2017). Recently, the advance of technology and comprehension of phenomenon's at the nanoscale has enabled the employment and expand the applicability of CNC (TRACHE *et al.*, 2017). CNC are highly ordered domains formed throughout the structure of pristine cellulose that presents at least one of its dimensions with a size  $\leq 100$  nm (TRACHE *et al.*, 2017). These CNCs are also biodegradable, biocompatible, feature a high surface area, low density as well as strength properties (TRACHE *et al.*, 2017). All such characteristics provide CNC with an unmatched potential to be used in several applications, ranging from mechanical reinforcement, bioengineering, pharmaceutical and biomedical technologies (TRACHE *et al.*, 2017). However, the cost to isolate such particles – from \$ 2 to 5 to produce 0.5 kg – is higher compared to the expense to produce other materials available on the market (TRACHE *et al.*, 2017).

The most widespread methodology to obtain CNC is the cellulose hydrolysis using sulfuric acid (DONG *et al.*, 2016). This process generates a sulfate esterification on the cellulose surface that results in high colloidal stability in aqueous media (pH >4) due to the repulsive negative charge between CNCs (DONG *et al.*, 2016). There are several experimental conditions that affect CNC obtainment, including the source of cellulose, type of acid and concentration employed, temperature, reaction time, pre-treatment and post-treatment (DONG *et al.*, 2016). In particular, several optimizations of the cellulose hydrolytic procedure are described in the literature. With the intent to reduce the cost of CNC production; one of the most prominent reports describes the use of a rotatable central composite to predict a maximum yield of CNC (66-69%) with an optimized conditions of acid concentration (57-58 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wt.%), temperature (64-67 °C) and hydrolysis time (134-156 min) of wood cellulose employing H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (DONG *et al.*, 2016).

Another factor that can also contribute to reduce the cost of CNC price regards the pretreatment procedure before the acid hydrolysis (ABDUL KHALIL *et al.*, 2014). Several authors used different pretreatments procedures (e.g. mill mechanical treatment or alkaline swelling treatment) of the pristine cellulose to increase the fiber surface area in contact with the acidic medium and diminish the time reaction interval (ABDUL KHALIL *et al.*, 2014). Unfortunately, a previous screening of the features presented before cellulose hydrolysis is, rarely, performed and/or displayed in scientific reports. Which represent a major limitation to guarantee a correct comparison among several optimizations, during the hydrolysis reactions. In fact, different results regarding the characteristic of the final CNC (e.g. yield, dimensions and sulfate esterification degree) are obtained by using the same parameters employed in the hydrolysis procedure, such as temperature, acid concentration and time (REVOL *et*

*al.*, 1992; REVOL *et al.*, 1994; DONG *et al.*, 1998; HAMAD; HU, 2010; WANG *et al.*, 2012). These discrepancies suggest that the initial pristine cellulose exhibit different characteristics and may cause a significant impact in the quality of the final CNC obtained.

In this paper, we evaluate the impact of mechanical pretreatments of varied intensities over the final quality of CNC. All pristine cellulose materials were initially pretreated either with magnetic stirring, blending and milled by 20 or 40-passages and, subsequently, submitted to the same acid hydrolysis procedure (DONG *et al.*, 2016). The final CNC obtained were evaluated with different characterizations techniques to verify the influence of these distinct treatments (**Scheme 1**). The results presented here are useful to the sequential optimization, in order to reduce the actual price of CNC and facilitate industrial production.



**Scheme 1:** Schematic representation of the experimental and characterizations steps performed

## Materials

Branched cellulose from *Pinnus* sp. was provided by Department of Engineering and Forest Technology, UFPR. Sulfuric acid (98%, Sigma Aldrich). The water used in all experiments procedures was ultrapurified (18.2 M $\Omega$ -cm resistivity at 25°C). All the reagents were purchased from Sigma Aldrich<sup>®</sup>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%), NaOH, Tert-butanol.

## Methods

### Pretreatment

The cellulose pulps were suspended in ultrapure water (20 mg.mL<sup>-1</sup>) and, then, submitted to four different processes prior to hydrolysis. The suspensions were: (1) magnetic stirred at 300 rpm for 60 min, (2) processed with a laboratory blender for 30 min (Waring commercial<sup>®</sup>), milled in a supermass colloid mill (Masuko Sangyo MKCA6-2) for (3) 20x and (4) 40x times.

### Cellulose hydrolysis

The procedure of cellulose hydrolysis was the optimized conditions related by DONG *et al.* (2016). Briefly, the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was diluted to 55wt% using ultrapure water and heated up to 65°C in a 1000 mL three-neck round bottom flask immersed in an oil bath. Then, 20 g of the desired pretreated sample was added to the warm acid solution. The resultant suspensions were constant stirred at 300 rpm with a magnetic bar. After 150 min of hydrolysis, the suspensions were diluted (10-fold) with 4°C ultrapure water to quench the reaction. Afterwards the suspension were centrifuged at 4,550 x g for 10 min (Sigma Aldrich<sup>®</sup>). The sediment was redispersed in a fresh ultrapure water and centrifuged again at 4,550 x g for 10 min. The supernatant was discarded and the sediment was redispersed again with a fresh ultrapure water. Then, the suspensions were transferred to dialysis tubing (cut off 12-14 kDa) and dialyzed against ultrapure water. The water was replaced until the conductivity reached a constant and neutral value (~0  $\mu$ S.cm<sup>-1</sup> for 8 hours). Finally, the suspensions were submitted to ultrasonic treatment for 10 min at 40% output (500 W, 20 kHz, Sonics Vibra cell<sup>®</sup>) and, then, recentrifuged again at 4,550 x g for 10 min. The resultant CNC were designated according with the name of the pretreat procedure employed.

## YIELD DETERMINATION

A volume of 1 mL of each pretreated cellulose sample and resulting CNC were transferred to aluminum recipients and weighted. Then, the recipients were placed in an oven at 80°C for 24 h. After water evaporation the recipients were again weighted. Determination of the sample concentration of each sample was determined by the follow Eq.(1)

$$C_s = \frac{W_r - W_0}{W_a - W_0} \times 100\% \quad (1)$$

Where,  $W_r$  is the weight residue after oven dry,  $W_0$  is the weight of empty aluminum recipient and  $W_a$  is the weight of the aluminum recipient with the suspension  
Then, the yield of each hydrolysis was calculated by the follow Eq. (2)

$$Y = \frac{W_s \times C_s}{W_p} \times 100\% \quad (2)$$

where  $W_s$  is the weight and  $C_s$  is the weight concentration of dried sample of the CNC concentration and  $W_p$  is weight of the pristine cellulose used.

## Sulfate group density measurements

The sulfate density was estimated by methodology adapted from (BECK *et al.* (2014)). Briefly, the sulfate group density of CNC samples of the pretreatment conditions were determined by conductivity titration with a Stabino® automatic titrator. All CNC suspensions were titrated with NaOH solution. The titration resulted in a V-shaped curved analyzed using two linear regressions. Sulfate group density ( $SO_3^-D$ ) was calculated according to the equation (3):

$$SO_3^-D = \frac{mL_{(NaOH)} \times M_{(NaOH)}}{mass_{CNC}} \quad (3)$$



Where,  $m_{L(\text{NaOH})}$  is the NaOH volume at the intersection of the two regressions,  $M_{(\text{NaOH})}$  is the molar concentration of the NaOH solution, and  $\text{mass}_{(\text{CNC})}$  is the total mass of CNC present in the flask.

### X-ray powder diffraction analysis

Pretreated cellulose and CNC samples were suspended in water, and the solvents were exchanged with tert-butanol using a stepwise gradient to minimize recrystallization and change of the crystallinity index of the cellulose chains (Ramos *et al.*, 1993; Woehl *et al.*, 2010). The last washing step was performed with pure tert-butanol. The fiber suspension of each sample was centrifuged for 10 min at 4,500x g and the recovered fiber were lyophilized in a bench-top freeze-dried (Thermo Electron Corporation). The XRPD experiments were performed in a Shimadzu XRD 6000 diffractometer operating at 40 kV and 30 mA with Cu Ka radiation ( $k = 0.15418$  nm). The lyophilized samples were positioned on an aluminum sample holder and measurements were taken to estimate the crystallinity, as described previously by Chen *et al.* (2007). Data were collected in reflectance mode in the 10-40  $2\theta$  range with  $0.5 \text{ min}^{-1}$ . The diffractograms were fitted with the Gaussian model with the Fityk software (Fityk 0.8.0).

The crystallinity index (CrI%) was calculated by the expression Hermans equation (1946) (equation 4):

$$\text{CrI}\% = 100 \cdot \left( \frac{A_c}{A_t} \right) \quad (4)$$

Where,  $A_t$  is the total area and  $A_c$  is the crystalline area.

### Zeta Potential analysis

The zeta potential of CNC suspensions ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) were achieved indirect by the streaming potential analysis by Stabino® by the following eq (5):

$$\text{SP} = k \Delta v \cdot \text{ZP} \quad (5)$$

Were, SP is the streaming potential, k is an instrument constant,  $\Delta v$  is fluid velocity and ZP is the zeta potential. The zeta values were acquired in real time for 15 min and the median of the zeta of 4 samples.

## Rheology

The analyzes were performed in a HAAKE rheometer model RS1, with adequate sensors, coupled to a microcomputer with software "Haake rheometer". The temperature was controlled by a Haake cooling bath, also, under conditions suitable for each temperature or ramp.

Mathematical models were used for the evaluation of flow behavior and the region of linear viscoelastic behavior. Also, experiments were performed for the analyzes interpreted using the Cox-Merz model (eq. 6):

$$[\eta (g) \sim \eta * (\omega = \dot{\gamma})] \quad (6)$$

Where,  $\eta$  = apparent viscosity,  $\dot{\gamma}$  = shear rate,  $\frac{1}{2}h * \frac{1}{2} =$  Complex viscosity,  $\omega$  = angular velocity ( $\text{rad.s}^{-1}$ ) (BARNES, HUTTON, WALTER, 1989).

## Atomic force microscopy

Aqueous dispersions of pretread cellulose and of CNC were diluted to  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and spin-coated on a freshly cleaved mica surface. The dimensions of the isolated fiber were determined by means of atomic force microscopy (AFM) images. Whose were obtained in the air in the intermittent contact mode with an Agilent 5500 microscope (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), using Mikromasch NSC14 silicon tips (Mikromasch USA, San Jose, CA, USA) with a nominal spring constant of  $5.7 \text{ N m}^{-1}$  and a resonance frequency of  $\sim 100 \text{ kHz}$ . The scanning areas were  $2.0 \times 2.0 \mu\text{m}$ ,  $4.0 \times 4.0 \mu\text{m}$ ,  $8.0 \times 8.0 \mu\text{m}$  and  $11.0 \times 11.0 \mu\text{m}$ . The images were acquired using Pico Image software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and were processed with the Gwyddion software (Czech Metrology Institute). The root means square values for surface roughness (RMS values), height and width were determined with the Gwyddion software (Czech Metrology Institute).

## Results and discussion

Initially, all pristine celluloses were characterized according to the rheological behavior after each one particular mechanical pretreatment. As previously described by QIAO *et al.* (2016) the viscosity profile of cellulose is an important parameter to define the macromolecular organization – such as fiber size and surface area - of the material in aqueous media. Recently, the LI *et al.* (2015) described that the rheology characterization of cellulose suspensions is an practical, fast and easy tool to characterize the cellulose fibers and these results are in agreement with the characterization by microscopic techniques. Nevertheless, the pretreatment conditions usually are not described in some details and the resultant cellulose is not as well characterized prior to hydrolysis.

Therefore, we have analyzed the rheological profile of all celluloses submitted to the distinct procedures (**Figure 1**). The materials that were treated by milling either with 40 or 20 passages in the Supermass colloid machine presented higher viscosity values (from  $3 \times 10^3$  to  $3 \times 10^2$  mPa.s<sup>-1</sup>) compared to the samples that were only suspended in ultrapure water and mixed by magnetic stirring and/or blended (30.0 to 5.0 mPa.s<sup>-1</sup>). In the case of the milled-samples, the increased viscosity values are related with the higher defibrillation degree of the fibers that also present reduced width, higher swelling and entanglement. All these features contribute to increase the flow resistance. Conversely, the blended and mechanically stirring processes were ineffective to efficiently defibrillate the fibers, which resulted in lower viscosity values.

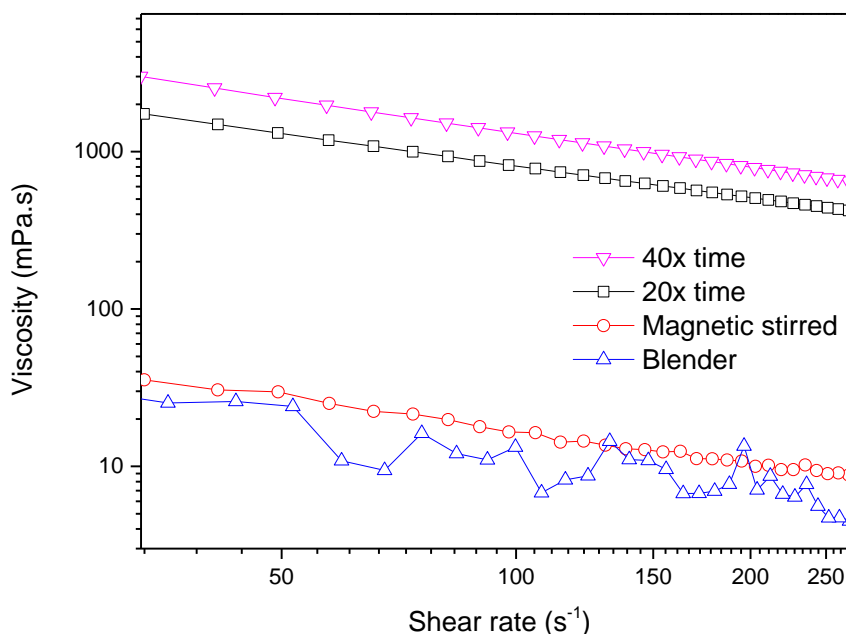


Figure 1: Viscosity (mpa.s) by the scaling rate ( $s^{-1}$ ) of the wood cellulose fixed at  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$  processed with magnetic stirring a 300 rpm during 60 min (red line), blended during 30 min (blue line), milled in a supermass colloidier for 20x (black line) and 40x times (pink line).

Then, all the characterized samples were submitted to the same optimized sulfuric acid hydrolysis procedure that presents the advantage of generating CNC with higher yields and stability as recently described (DONG *et al.*, 2016). AFM images revealed the presence of CNC with an average size range between 5-10 nm in height and 100-400 nm in length for all hydrolyzed samples (**Figure 2**). The yield was around 63% (w/w) as indicated in **Table 1** with the exception of the samples that were pretreated by magnetic-stirring (CNC-st) that resulted in 85% (w/w). Such difference may be related with the presence of fibers with a superior length of 600 nm as observed by AFM (indicated by white arrows in **Figure 2-A inserted**) – probably due to incomplete hydrolysis – that were, however, unable to alter the population average size. Once centrifuged at  $4,000 \times g$  during 10 min, these long fibers were eliminated and all samples displayed the same yield around 64%.

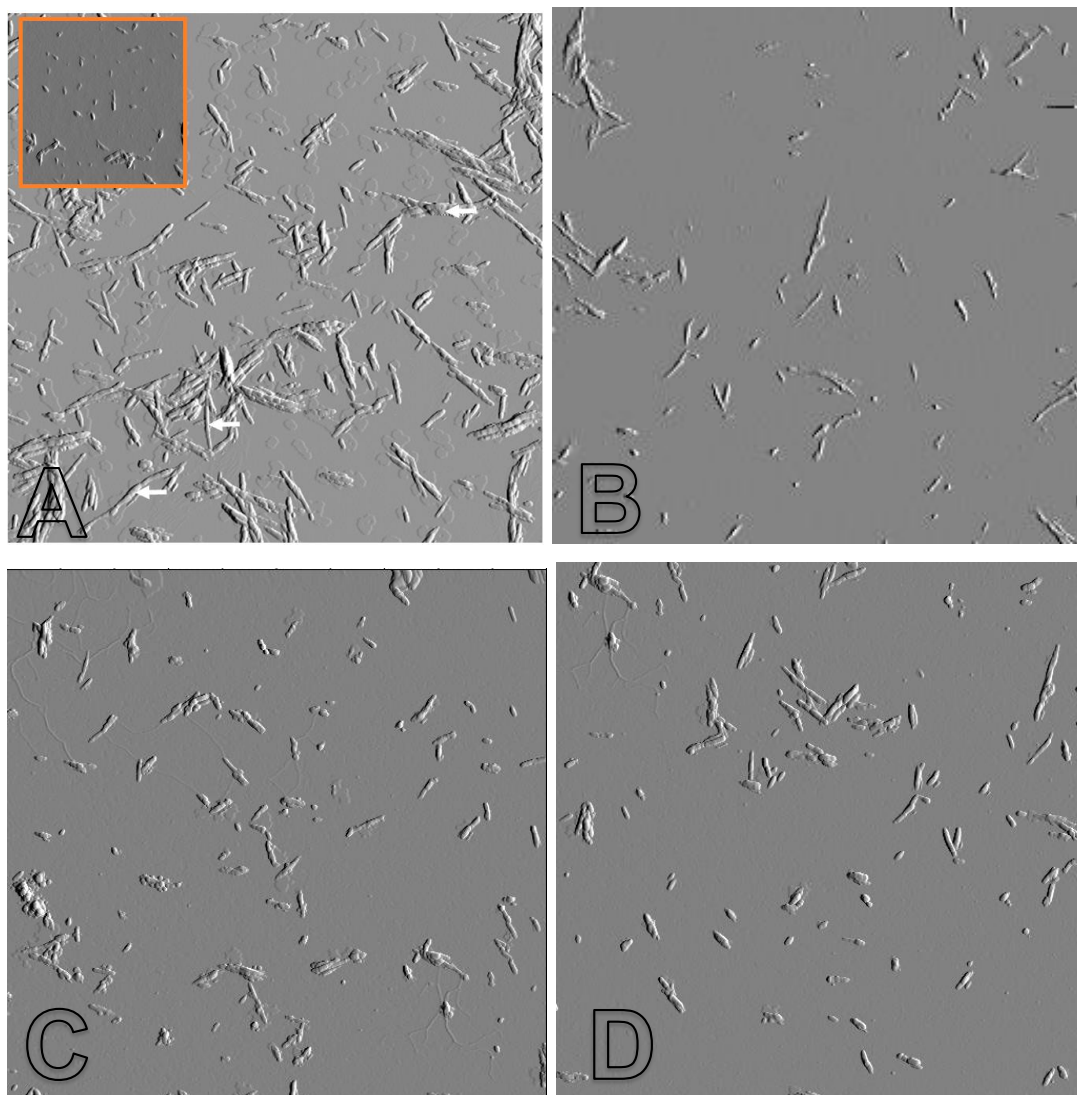


Figure 2: Amplitude AFM images of the CNC obtained from pretreated celluloses by: (A) mechanic stirring (inset: after additional centrifugal step), (B) blendered, (C) 20 passages in mill and (D) 40 passages in mill.

**TABLE 1: RESULTS OF CNC CHARACTERIZATIONS BY AFM, YIELD, X-RAY, ZETA POTENTIAL AND CONDUCTIVITY TITRATION.**

Sample	Height (nm)	Width (nm)	*Yield (%)	Yield (%)	CrI (%)	$\zeta$ (-mV)	SD (mmol.kg <sup>-1</sup> )
CNC-St	100-400	7-10	85.7	67.8	71	52	185
CNC-BI	100-400	7-10	66.6	64.4	71	55	190
CNC-20x	100-400	7-10	65.5	66.3	69	54	187
CNC-40x	100-400	7-10	58.5	59.4	69	55	192

The stand deviation of the analysis are: yield measurements have  $\pm 5\%$  and CrI have  $\pm 3\%$  and  $\zeta$  have  $\pm 1$  mV and SD  $\pm 10$  mmol.kg<sup>-1</sup> of standard deviation.

\*Yield (%) is the yield obtained from CNC suspension before an additionally ultrasonic and centrifuge treatment.

Yield (%) is the yield obtained from CNC suspension after a an additionally ultrasonic and centrifuge treatment.

All samples were analyzed by X-ray diffractograms. The crystalline area corresponds to the diffractions around  $2\theta$ :  $22^\circ$  (plane 0 0 2),  $21^\circ$  (plane 0 2 1),  $16^\circ$  (plane 1 0  $\bar{1}$ ),  $14^\circ$  (plane 1 0 1) and around  $19^\circ$  the amorphous halo (WANG *et al.*, 2007). The X-ray diffractograms confirmed the removal of amorphous domains in the cellulose structure (**Figure 3**). Accordingly, the crystallinity index raised from  $\sim 52\%$  to  $\sim 70\%$  after the hydrolytic procedure for all samples, which indicates that this parameter is not influenced by the different mechanical pretreatments.

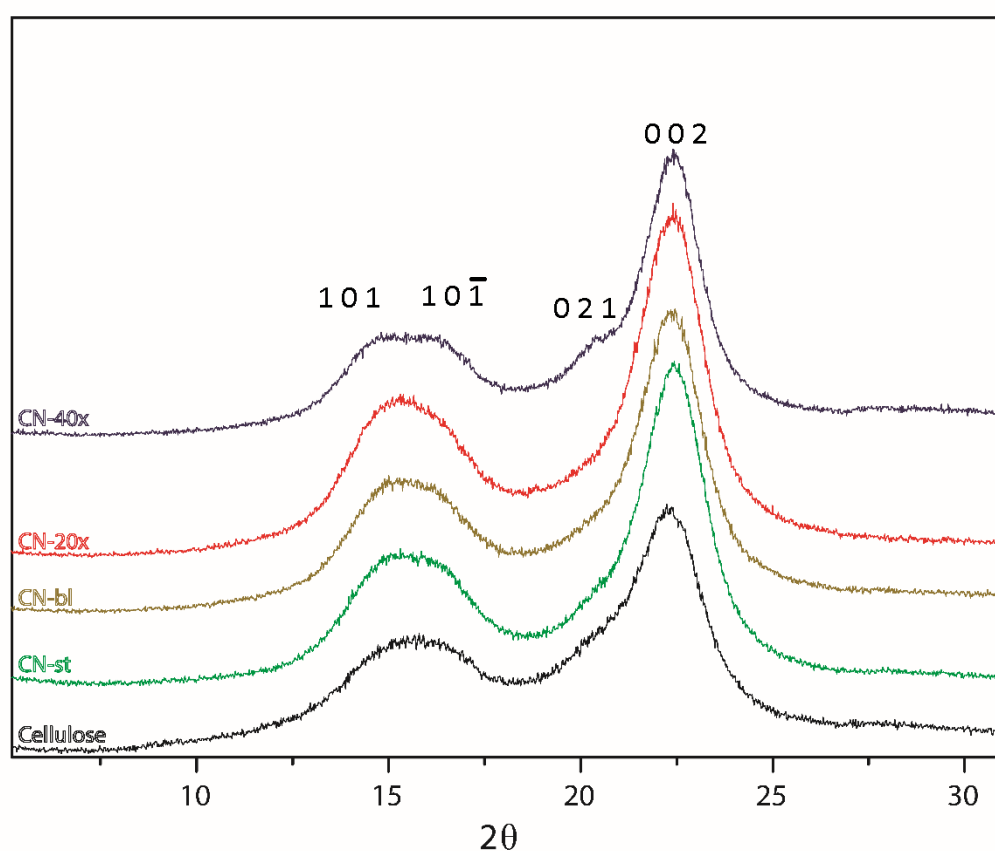


Figure 3: X-ray diffraction chart of the wood cellulose and processed by magnetic stirred at 300 rpm for 60 min (line green), with a blender for 10 min (line brown), milled in a supermass colloid mill for 20x (line red) and 40x times (line dark) and native cellulose (line blue).

Then, the total surface charge was quantified by conductometric titration, showing similar sulfate density around  $185 \text{ mmol.kg}^{-1}$  for all samples. Such  $\text{OSO}_3^-$  generated a negative zeta potential ( $\zeta$ ) around  $-53 \text{ mV}$ , which is compatible to maintain colloidal stability of CNC in aqueous systems due to the sulfate electrostatic repulsion.

CNC present a wide potential application range in the industry: food, cosmetics, electronics, oil and biomedical (TRACHE *et al.*, 2017). However, the price of 0.5 kg of CNC varies from \$ 2 to 5, which configures a major limitation for industrial scaled use, compared with other related materials (TRACHE *et al.*, 2017). As a result, several attempts to reduce the cost of CNC production has been explored (TRACHE *et al.*, 2017) .These investigations mainly rely on the hydrolytic procedure applied over pristine cellulose of distinct sources, optimizing several reaction parameters such as time, acid concentration and temperature (TRACHE *et al.*, 2017). Nonetheless, rarely, the mechanical pretreatment generally used before acidic reaction is taken into account to reduce the price and the complexity of the procedure.

In summary, we observed that the mechanical pretreatment followed by acid hydrolysis showed any significantly difference among the many parameters evaluated to generate stable and good yields of CNC. According to the morphological analysis, crystallinity index and stability we suggest that the obtention of CNC can be simplified using mechanical stirring or blended, depending on the final applicability. Comparatively, CNC produced by 20 or 40 millings are time consuming and represent an unnecessary step that, only, increases the final price. However, further studies are still required to ensure that more intense mechanical pretreatments might be able to reduce the cost related with the hydrolytic procedure, decreasing the required time, temperature or acid concentration employed.

## **Conclusions**

We have analyzed the impact of four distinct procedures of cellulose pretreatments on the final quality and yield of CNC produced by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hydrolysis. According to the stability profile, crystallinity index, morphology and yield, all samples presented similar character and are prone to generate CNC with adequate features. However, the cost associated to produce CNC by simple stirring of the cellulose is expected to greatly reduce the price, facilitate the process and allow industrial scale up.

## **Acknowledgments**

We acknowledge the Brazilian funding agencies CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), process number 306245/2014-0, and FINEP for financial support, and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the fellowship to C.L. Pirich. We are greatfull to Profa. Dr. Graciela B. de Muniz from Floresta Department University Federal for the cellulose donation.



## 5. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O objetivo inicial dessa tese foi o desenvolvimento de biossensores à base biopolímeros, como nanocristal de celulose e/ou xiloglucana. De acordo com os resultados obtidos durante o desenvolvimento dessa tese, e as publicações geradas por eles, o trabalho pode ser dividido em três partes.

A primeira etapa consistiu na formação de nanofilmes compostos por camadas intercaladas de NC e XG. Esse trabalho foi publicado em 2015 na revista *Cellulose* e pode ser visto em maiores detalhes nessa tese na seção **ARTIGO 1** (PIRICH *et al.*, 2015). O desenvolvimento desses filmes foi escolhido devido ao seu grande potencial no uso de desenvolvimento de biossensores. E o qual se deve principalmente a: (1) possibilidade de oxidação de XG, semelhantemente a celulose por uso de radical TEMPO; (2) aumento da área superficial de NC após a adsorção de XG, devido a sua estrutura ramificada, o que hipoteticamente aumentaria, conseqüentemente, a área para imobilização de moléculas sonda; (3) adsorção de XG a NC com altíssima estabilidade; e (4) elevado grau de porosidade conhecido de filmes de múltiplas camada de NC e XG, o que resultaria no aumento de moléculas sondas imobilizadas e maior resposta na detecção de moléculas alvo pelo sistema.

Durante os experimentos de *Layer-by-Layer* de NC e XG, acompanhado por QCM, AFM e elipsometria, foi verificado que os NC produzidos por hidrólise com ácido sulfúrico, formariam filmes com instabilidade após a formação de algumas camadas. Com isso foi hipotetizado, então, que o grau de esterificação da superfície dos NC poderia prejudicar a adsorção da XG. Para testar essa hipótese a adsorção foi repetida, utilizando três graus diferentes de sulfatação (0, 0,43 e 0,63%). E foi verificado que, filmes de NC com XG, com NC com maior grau de sulfatação (0,63%), apresentaram instabilidade de adsorção. Os NC sem esterificação, geraram camadas irreprodutíveis com alta espessura ( $\sim 200 \pm 100$  nm) e instabilidade de adsorção. Os NC com sulfatação intermediária (0,43%), geraram filmes finos reprodutíveis ( $15 \pm 2$  nm) sem desorção.

A segunda etapa do trabalho consistiu no desenvolvimento de imunossensores piezoelétricos para detecção de dengue. E foi publicada na revista *Biosensors and Bioelectronics* e pode ser vista em maiores detalhes na seção dessa tese em **ARTIGO 2** (PIRICH *et al.*, 2017). Para ser adequado a utilização em biossensores, foi almejado

a utilização somente do QCM sem dissipação de energia para utilização de diagnóstico. Cujo equipamento é de baixo custo e acessível para utilização em clínicas. Os filmes compostos por NC e XG, entretanto, apresentaram altíssima instabilidade no monitoramento da frequência, mesmo somente com injeção de água ultrapurificada ( $\pm 300$  Hz), devido a oscilação no comportamento viscoelástico desses filmes e atribuído à presença de XG. Com isso, foram produzidos nanofilmes compostos de NC isolados por persulfato de amônio. Os filmes apresentaram baixo comportamento viscoelástico, sendo possível sua utilização mesmo no QCM sem dissipação de energia. Inicialmente, foram imobilizados anticorpos monoclonais (IgG-NS1), específicos para reconhecimento de antígeno NS1 da dengue. A seguir, o imunochip foi testado no reconhecimento do antígeno tanto purificado em meio PBS, quanto em soro sanguíneo, e foi capaz de detectar tanto no QCM-D quanto no QCM o antígeno NS1, apresentando limites de detecção de 0,1 e 0,32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os resultados encontrados, sugerem que o revestimento de sensores de QCM disponíveis no mercado por filmes de NC, podem aumentar a sensibilidade no reconhecimento de antígenos, tanto em QCM-D quanto em equipamentos de baixo custo como o QCM.

A terceira etapa (ARTIGO 3 – em submissão) consistiu no desenvolvimento do melhor processo para o isolamento NC com alta razão de aspecto (comprimento:largura) e com baixa razão de aspecto, isolados de celulose de fonte bacteriana e fonte vegetal, respectivamente. Essa escolha de duas diferentes fontes de NC foi porque apresentam variação no comportamento coloidal, sendo que os com maior razão de aspecto, são os mais sensíveis a variações no meio, e os com menor razão de aspecto, menos sensíveis.

Com os NC já isolados de fonte bacteriana, foi realizado o isolamento de NC de fonte vegetal que, entretanto, apresentou maior resistência à hidrólise por persulfato de amônio, sendo necessário mais de 16 horas para se obter os NC com as mesmas características da fonte de celulose bacteriana (isolados e carboxilados). Portanto, optou-se para o isolamento de NC de celulose vegetal a utilização do método clássico: a hidrólise por ácido sulfúrico seguido de oxidação por radical TEMPO.

Foi verificado em literatura que, embora o método de ácido sulfúrico seja um método antigo, novas otimizações ainda estão sendo realizadas a fim de se reduzir o custo dos NC isolado por essa técnica e torná-los competitivos para a produção em escala industrial (DONG *et al.*, 2016). Com base na revisão das melhores condições,

nós verificamos que não existe nenhum estudo que leve em consideração às condições do pré-tratamento da celulose, geralmente realizada por moinho, para a produção dos NC. Assim, foi proposto que, pela otimização das condições do pré-tratamento, nós poderíamos reduzir ainda mais o custo de produção de NC. Os efeitos do pré-tratamento da celulose para obtenção de NC por ácido sulfúrico está em fase de submissão de um novo artigo (**ARTIGO 3** dessa tese), pois verificamos que, embora o pré-tratamento mecânico em condições drásticas (uso de moinho Supermasscolloider), muito utilizado para a desfibrilação e produção de nanocelulose seja eficiente, ele não apresenta impactos nas características finais dos NC isolados avaliados (dimensões, grau de sulfatação, estabilidade coloidal e cristalinidade). Com isso, é possível propor que a etapa de pré-tratamento pode ser reduzida a métodos de menor custo, como simples trituração por liquidificador, e onde o custo final dos NC pode ser reduzido.

## 6. CONCLUSÕES

Em dispersões, os NC com 0,43 % de grupamentos sulfato interferem na adsorção com a XG, pois aumentam a estabilidade das nanopartículas e atribuem maior área para a interação. Maior teor de carga diminui a adsorção;

Filmes finos desses NC aumentam a sua estabilidade, há produção de filmes homogêneos e deposição de várias camadas. Maior teor de sulfato causa menor dessorção e menor estabilidade;

Biosensores formados por filmes de NC modificada por oxidação imobilizaram  $>200 \text{ ng.cm}^{-2}$  de anticorpos (literatura  $< 150 \text{ ng.cm}^{-2}$ ), com menor diluição de soro sanguíneo: 1/10 (literatura  $>1/100$ ); e menor limite de detecção de antígeno:  $100 \text{ ng.mL}^{-1}$  (literatura  $> 750 \text{ ng.mL}^{-1}$ ). Provavelmente, por que formam filmes com maior rugosidade, maior área superficial para imobilizar as IgGs; e menor interação conhecida por adsorção não específica;

Foi possível reconhecer o antígeno NS1 em ambos os equipamentos (QCM e QCM-D), provavelmente porque filmes de CN apresentam menor energia de dissipação;

O Pré-tratamento da celulose vegetal utilizando moinho Supermasscolloider (20 e 40x) aumentou a viscosidade, e favoreceu a obtenção de celulose nanofibrilar. Mas, pode encarecer o custo da produção, sendo que o pré-tratamento utilizando Blender já foi suficiente para produzir nanopartículas com as mesmas características;

O pré-tratamento com agitação magnética, embora tenha apresentado nanocelulose com maiores comprimentos, a mesma pode ser fracionada com uma etapa de centrifugação adicional. Dependendo da utilização, esse pré-tratamento pode ser considerado mais vantajoso, já que apresenta um rendimento total de ~85%.

## REFERÊNCIAS

- ABDUL KHALIL, H. P. S.; DAVOUDPOUR, Y.; ISLAM, M. N.; MUSTAPHA, A.; SUDESH, K.; DUNGANI, R.; JAWAID, M. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. **Carbohydrate Polymers**. v. 99, n. p. 649-665, 2014.
- ABE, K.; IWAMOTO, S.; YANO, H. Obtaining Cellulose Nanofibers with a Uniform Width of 15 nm from Wood. **Biomacromolecules**. v. 8, n. 10, p. 3276-3278, 2007.
- ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.
- ANTUNES, P.; WATTERSON, D.; PARMVI, M.; BURGER, R.; BOISEN, A.; YOUNG, P.; COOPER, M. A.; HANSEN, M. F.; RANZONI, A.; DONOLATO, M. Quantification of NS1 dengue biomarker in serum via optomagnetic nanocluster detection. **Scientific Reports**. v. 5, n. p. 16145, 2015.
- ARAKI, J.; WADA, M.; KUGA, S.; OKANO, T. Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 142, n. 1, p. 75-82, 1998.
- ARAKI, J.; WADA, M.; KUGA, S.; OKANO, T. Influence of surface charge on viscosity behavior of cellulose microcrystal suspension. **Journal of Wood Science**. v. 45, n. 3, p. 258-261, 1999.
- AROLA, S.; TAMMELIN, T.; SETÄLÄ, H.; TULLILA, A.; LINDER, M. B. Immobilization–Stabilization of Proteins on Nanofibrillated Cellulose Derivatives and Their Bioactive Film Formation. **Biomacromolecules**. v. 13, n. 3, p. 594-603, 2012.
- ATALLA, R. H.; VANDERHART, D. L. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. **Science**. v. 223, n. 4633, p. 283-285, 1984.
- AZZAM, R. M. A.; BASHARA, N. M. **Ellipsometry and polarized light**. North Holland, Amsterdam, 1987.

- BARKER, S. A.; DOSS, S. H.; GRAY, C. J.; KENNEDY, J. F.; STACEY, M.; YEO, T. H.  $\beta$ -d-glucosidase chemically bound to microcrystalline cellulose. **Carbohydrate Research**. v. 20, n. 1, p. 1-7, 1971.
- BATTISTA, O. A. Hydrolysis and crystallization of cellulose. **Industrial & Engineering Chemistry**. v. 42, n. 3, p. 502-507, 1950.
- BATTISTA, O. A.; COPPICK, S.; HOWSMON, J. A.; MOREHEAD, F. F.; SISSON, W. A. Level-Off Degree of Polymerization. **Industrial & Engineering Chemistry**. v. 48, n. 2, p. 333-335, 1956.
- BECK-CANDANEDO, S.; ROMAN, M.; GRAY, D. G. Effect of Reaction Conditions on the Properties and Behavior of Wood Cellulose Nanocrystal Suspensions. **Biomacromolecules**. v. 6, n. 2, p. 1048-1054, 2005.
- BECK, S.; MÉTHOT, M.; BOUCHARD, J. General procedure for determining cellulose nanocrystal sulfate half-ester content by conductometric titration. **Cellulose**. v. 22, n. 1, p. 101-116, 2014.
- BEN AZOUZ, K.; RAMIRES, E. C.; VAN DEN FONTEYNE, W.; EL KISSI, N.; DUFRESNE, A. Simple method for the melt extrusion of a cellulose nanocrystal reinforced hydrophobic polymer. **ACS Macro Letters**. v. 1, n. 1, p. 236-240, 2011.
- BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics**. New York, 2000.
- BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**. v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.
- BHATTACHARYA, S.; BAL, S.; MUKHERJEE, R. K.; BHATTACHARYA, S. Rheological behaviour of tamarind (*Tamarindus indica*) kernel powder (TKP) suspension. **Journal of Food Engineering**. v. 13, n. 2, p. 151-158, 1991.
- BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy\char22{}from birth to adolescence. **Reviews of Modern Physics**. v. 59, n. 3, p. 615-625, 1987.
- BLACHECHEN, L.; DE MESQUITA, J.; DE PAULA, E.; PEREIRA, F.; PETRI, D. S. Interplay of colloidal stability of cellulose nanocrystals and their dispersibility in cellulose acetate butyrate matrix. **Cellulose**. v. 20, n. 3, p. 1329-1342, 2013.
- BLACHECHEN, L.; SOUZA, M.; PETRI, D. S. Effect of humidity and solvent vapor phase on cellulose esters films. **Cellulose**. v. 19, n. 2, p. 443-457, 2012.
- BONDESON, D.; MATHEW, A.; OKSMAN, K. Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis. **Cellulose**. v. 13, n. 2, p. 171-180, 2006.
- BORDO, D.; ARGOS, P. Suggestions for "safe" residue substitutions in site-directed mutagenesis. **J Mol Biol**. v. 217, n. 4, p. 721-729, 1991.
- BRADEN, B. C.; POLJAK, R. J. Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. **Faseb j**. v. 9, n. 1, p. 9-16, 1995.
- BRAGAZZI, N. L.; AMICIZIA, D.; PANATTO, D.; TRAMALLONI, D.; VALLE, I.; GASPARINI, R. (2015). Chapter Six - Quartz-Crystal Microbalance (QCM) for Public Health: An Overview of Its Applications. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. ROSSEN, D., Academic Press. **Volume 101**: 149-211.
- BRAUN, B.; DORGAN, J. R. Single-step method for the isolation and surface functionalization of cellulosic nanowhiskers. **Biomacromolecules**. v. 10, n. 2, p. 334-341, 2009.

- BRUZEWICZ, D. A.; RECHES, M.; WHITESIDES, G. M. Low-Cost Printing of Poly(dimethylsiloxane) Barriers To Define Microchannels in Paper. **Analytical Chemistry**. v. 80, n. 9, p. 3387-3392, 2008.
- BUCKERIDGE, M. S.; ROCHA, D. C.; REID, J. S. G.; DIETRICH, S. M. C. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savanna and forest populations. **Physiologia Plantarum**. v. 86, n. 1, p. 145-151, 1992.
- BURGALASSI, S.; PANICHI, L.; SAETTONE, M. F.; JACOBSEN, J.; RASSING, M. R. Development and in vitro/in vivo testing of mucoadhesive buccal patches releasing benzydamine and lidocaine. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 133, n. 1-2, p. 1-7, 1996.
- CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**. v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.
- CARRIGAN, S. D.; SCOTT, G.; TABRIZIAN, M. Real-Time QCM-D Immunoassay through Oriented Antibody Immobilization Using Cross-Linked Hydrogel Biointerfaces. **Langmuir**. v. 21, n. 13, p. 5966-5973, 2005.
- CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; PUTAUX, J.-L.; CARO, G.; MONDRAGON, I.; GAÑÁN, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**. v. 84, n. 1, p. 96-102, 2011.
- CECCHETTO, J.; CARVALHO, F. C.; SANTOS, A.; FERNANDES, F. C. B.; BUENO, P. R. An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 213, n. p. 150-154, 2015.
- CERCLIER, C.; COUSIN, F.; BIZOT, H.; MOREAU, C.; CATHALA, B. Elaboration of spin-coated cellulose-xyloglucan multilayered thin films. **Langmuir**. v. 26, n. 22, p. 17248-17255, 2010.
- CHEN, G.-J.; KUO, C.-H.; CHEN, C.-I.; YU, C.-C.; SHIEH, C.-J.; LIU, Y.-C. Effect of membranes with various hydrophobic/hydrophilic properties on lipase immobilized activity and stability. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 113, n. 2, p. 166-172, 2012.
- CHEN, Y.; STIPANOVIC, A.; WINTER, W.; WILSON, D.; KIM, Y.-J. Effect of digestion by pure cellulases on crystallinity and average chain length for bacterial and microcrystalline celluloses. **Cellulose**. v. 14, n. 4, p. 283-293, 2007.
- CHENG, M. S.; HO, J. S.; TAN, C. H.; WONG, J. P. S.; NG, L. C.; TOH, C.-S. Development of an electrochemical membrane-based nanobiosensor for ultrasensitive detection of dengue virus. **Analytica Chimica Acta**. v. 725, n. p. 74-80, 2012.
- CSOKA, L.; HOEGER, I. C.; ROJAS, O. J.; PESZLEN, I.; PAWLAK, J. J.; PERALTA, P. N. Piezoelectric Effect of Cellulose Nanocrystals Thin Films. **ACS Macro Letters**. v. 1, n. 7, p. 867-870, 2012.
- DAN, G.; GUOXIN, X.; JIANBIN, L. Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. **Journal of Physics D: Applied Physics**. v. 47, n. 1, p. 013001, 2014.
- DARWISH, N. T.; ALIAS, Y. B.; KHOR, S. M. An introduction to dengue-disease diagnostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v. 67, n. p. 45-55, 2015.
- DECKER, K. D. Dengue Fever: Re-Emergence of an Old Virus. **The Journal for Nurse Practitioners**. v. 8, n. 5, p. 389-393, 2012.
- DIAS, A. C.; GOMES-FILHO, S. L.; SILVA, M. M.; DUTRA, R. F. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosens Bioelectron**. v. 44, n. p. 216-221, 2013.

- DOLIŠKA, A.; WILLFÖR, S.; STRNAD, S.; RIBITSCH, V.; KLEINSCHEK KARIN, S.; EKLUND, P.; XU, C. Antithrombotic properties of sulfated wood-derived galactoglucomannans. **Holzforschung**. v. 66, n. 2, p. 149, 2012.
- DONG, S.; BORTNER, M. J.; ROMAN, M. Analysis of the sulfuric acid hydrolysis of wood pulp for cellulose nanocrystal production: A central composite design study. **Industrial Crops and Products**. v. 93, n. p. 76-87, 2016.
- DONG, X.; REVOL, J.-F.; GRAY, D. Effect of microcrystallite preparation conditions on the formation of colloid crystals of cellulose. **Cellulose**. v. 5, n. 1, p. 19-32, 1998.
- ELAZZOUI-HAFRAOUI, S.; NISHIYAMA, Y.; PUTAUX, J.-L.; HEUX, L.; DUBREUIL, F.; ROCHAS, C. The shape and size distribution of crystalline nanoparticles prepared by acid hydrolysis of native cellulose. **Biomacromolecules**. v. 9, n. 1, p. 57-65, 2007.
- ERONEN, P.; ÖSTERBERG, M.; HEIKKINEN, S.; TENKANEN, M.; LAINE, J. Interactions of structurally different hemicelluloses with nanofibrillar cellulose. **Carbohydrate Polymers**. v. 86, n. 3, p. 1281-1290, 2011.
- FENGEL, D. W., G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin. Walter de Gruyter, 1989.
- FERNANDES, M. C. S.; PAULIN FILHO, P. I.; MORELLI, M. R. Análise da superfície de grês porcelanato por microscopia de força atômica. **Cerâmica**. v. 57, n. p. 173-179, 2011.
- FILSON, P. B.; DAWSON-ANDOH, B. E.; SCHWEGLER-BERRY, D. Enzymatic-mediated production of cellulose nanocrystals from recycled pulp. **Green Chemistry**. v. 11, n. 11, p. 1808-1814, 2009.
- FINDLAY, J. W. A.; DILLARD, R. F. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. **The AAPS Journal**. v. 9, n. 2, p. E260-E267, 2007.
- FINKENSTADT, V. L.; HENDRIXSON, T. L.; MILLANE, R. P. Models of Xyloglucan Binding to Cellulose Microfibrils<sup>1</sup>. **Journal of Carbohydrate Chemistry**. v. 14, n. 4-5, p. 601-611, 1995.
- FOLLAIN, N.; MARAIS, M.-F.; MONTANARI, S.; VIGNON, M. R. Coupling onto surface carboxylated cellulose nanocrystals. **Polymer**. v. 51, n. 23, p. 5332-5344, 2010.
- FREE, A. H.; ADAMS, E. C.; KERCHER, M. L.; FREE, H. M.; COOK, M. H. Simple specific test for urine glucose. **Clin Chem**. v. 3, n. 3, p. 163-168, 1957.
- FREITAS, R. A.; BUSATO, A. P.; MITCHELL, D. A.; SILVEIRA, J. L. M. Degalatosylation of xyloglucan: Effect on aggregation and conformation, as determined by time dependent static light scattering, HPSEC-MALLS and viscosimetry. **Carbohydrate Polymers**. v. 83, n. 4, p. 1636-1642, 2011.
- FREITAS, R. A.; MARTIN, S.; SANTOS, G. L.; VALENGA, F.; BUCKERIDGE, M. S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources. **Carbohydrate Polymers**. v. 60, n. 4, p. 507-514, 2005.
- FRENCH, A. Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. **Cellulose**. v. 21, n. 2, p. 885-896, 2014.
- FRY, S. C. The Structure and Functions of Xyloglucan. **Journal of Experimental Botany**. v. 40, n. 1, p. 1-11, 1989.
- GELANEW, T.; POOLE-SMITH, B. K.; HUNSPERGER, E. Development and characterization of mouse monoclonal antibodies against monomeric dengue virus non-structural glycoprotein 1 (NS1). **Journal of Virological Methods**. v. 222, n. p. 214-223, 2015.
- GENERALOVA, A. N.; SIZOVA, S. V.; OLEINIKOV, V. A.; ZUBOV, V. P.; ARTEMYEV, M. V.; SPERNATH, L.; KAMYSHNY, A.; MAGDASSI, S. Highly fluorescent ethyl cellulose nanoparticles containing embedded semiconductor nanocrystals. **Colloids**

**and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.** v. 342, n. 1–3, p. 59-64, 2009.

GEORGE, J.; SIDDARAMAIAH. High performance edible nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers.** v. 87, n. 3, p. 2031-2037, 2012.

GRABAREK, Z.; GERGELY, J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. **Anal Biochem.** v. 185, n. 1, p. 131-135, 1990.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors (Basel, Switzerland).** v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.

GRISHKEWICH, N.; MOHAMMED, N.; TANG, J.; TAM, K. C. Recent advances in the application of cellulose nanocrystals. **Current Opinion in Colloid & Interface Science.** v. 29, n. p. 32-45, 2017.

GU, J.; CATCHMARK, J. The impact of cellulose structure on binding interactions with hemicellulose and pectin. **Cellulose.** v. 20, n. 4, p. 1613-1627, 2013.

GUBLER, D. J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Found Symp.** v. 277, n. p. 3-16; discussion 16-22, 71-13, 251-253, 2006.

HABIBI, Y.; CHANZY, H.; VIGNON, M. R. TEMPO-mediated surface oxidation of cellulose whiskers. **Cellulose.** v. 13, n. 6, p. 679-687, 2006.

HANTUS, S.; PAULY, M.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P.; YORK, W. S. Structural characterization of novel L-galactose-containing oligosaccharide subunits of jojoba seed xyloglucans. **Carbohydr Res.** v. 304, n. 1, p. 11-20, 1997.

HAYASHI, J.; SUFOKA, A.; OHKITA, J.; WATANABE, S. The confirmation of existences of cellulose III, IIII, IVI, and IVII by the X-ray method. **Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition.** v. 13, n. 1, p. 23-27, 1975.

HAYASHI, N.; KONDO, T.; ISHIHARA, M. Enzymatically produced nano-ordered short elements containing cellulose I beta crystalline domains. **Carbohydrate Polymers.** v. 61, n. 2, p. 191-197, 2005.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the Primary Cell Wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.** v. 40, n. 1, p. 139-168, 1989.

HAYASHI, T.; MARSDEN, M. P.; DELMER, D. P. Pea Xyloglucan and Cellulose: VI. Xyloglucan-Cellulose Interactions in Vitro and in Vivo. **Plant Physiol.** v. 83, n. 2, p. 384-389, 1987.

HAYASHI, T.; OGAWA, K.; MITSUISHI, Y. Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose. **Plant and Cell Physiology.** v. 35, n. 8, p. 1199-1205, 1994.

HAYASHI, T.; TAKEDA, T.; OGAWA, K.; MITSUISHI, Y. Effects of the degree of polymerization on the binding of xyloglucans to cellulose. **Plant Cell Physiol.** v. 35, n. 6, p. 893-899, 1994.

HEINZE, T. B., H.; EBRINGEROVÁ.; HARDING, S. E.; HDROMÁDKOVÁ, Z.; MUZZARELLI, C.; MUZZARELLI, R.A.A; PAULSEN, B.S.; EL SEOUD, O.A. **Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use.** Germany. Springer-verlag Berlin Heidelberg, 2005.

HERMANS, P. H. Deformation mechanism of cellulose gels. I. Present status of the problem. **Journal of Polymer Science.** v. 1, n. 5, p. 389-392, 1946.

HERMANSON. **Bioconjugate techniques.** San Diego (CA), 2008.

HERRMANN JR, P. S. P.; CAPPARELLI, L. H.; VAZ, C. M. P.; CRUVINEL, P. E. A potencialidade da microscopia de varredura por sonda na pesquisa agropecuária. **Embrapa: Circular Técnica.** v. 10, n. 99, p. 10-00, 1999.

HORRI, F. **Wood and Cellulosic Chemistry.** Basel. Marcel Dekker, 2001.



- HSIEH, Y. C.; YANO, H.; NOGI, M.; EICHHORN, S. J. An estimation of the Young's modulus of bacterial cellulose filaments. **Cellulose**. v. 15, n. 4, p. 507-513, 2008.
- IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**. v. 35, n. 2, p. 261-270, 2000.
- ILER, R. K. Multilayers of colloidal particles. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 21, n. 6, p. 569-594, 1966.
- ITOH, K.; YAHABA, M.; TAKAHASHI, A.; TSURUYA, R.; MIYAZAKI, S.; DAIRAKU, M.; TOGASHI, M.; MIKAMI, R.; ATTWOOD, D. In situ gelling xyloglucan/pectin formulations for oral sustained drug delivery. **Int J Pharm**. v. 356, n. 1-2, p. 95-101, 2008.
- IZQUIERDO, A.; ONO, S. S.; VOEGEL, J. C.; SCHAAF, P.; DECHER, G. Dipping versus spraying: exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly. **Langmuir**. v. 21, n. 16, p. 7558-7567, 2005.
- JEAN, B.; HEUX, L.; DUBREUIL, F.; CHAMBAT, G.; COUSIN, F. Non-Electrostatic Building of Biomimetic Cellulose–Xyloglucan Multilayers. **Langmuir**. v. 25, n. 7, p. 3920-3923, 2008.
- JEAN, B.; HEUX, L.; DUBREUIL, F.; CHAMBAT, G.; COUSIN, F. Non-electrostatic building of biomimetic cellulose-xyloglucan multilayers. **Langmuir**. v. 25, n. 7, p. 3920-3923, 2009.
- JEAN, B.; HEUX, L.; DUBREUIL, F.; CHAMBAT, G.; COUSIN, F. Non-Electrostatic Building of Biomimetic Cellulose–Xyloglucan Multilayers. **Langmuir**. v. 25, n. 7, p. 3920-3923, 2009.
- JEFFERIS, R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**. v. 8, n. 3, p. 226-234, 2009.
- JIA, Z.; QIN, Q.; DARVILL, A. G.; YORK, W. S. Structure of the xyloglucan produced by suspension-cultured tomato cells. **Carbohydrate Research**. v. 338, n. 11, p. 1197-1208, 2003.
- JÓ, A. **Desenvolvimento e aplicação de nanoestruturas a partir de xiloglucanas**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- JÓ, T. A.; PETRI, D. F. S.; BELTRAMINI, L. M.; LUCYSZYN, N.; SIERAKOWSKI, M. R. Xyloglucan nano-aggregates: physico-chemical characterisation in buffer solution and potential application as a carrier for camptothecin, an anti-cancer drug. **Carbohydrate Polymers**. v. 82, n. 2, p. 355-362, 2010.
- JOHANNSMANN, D. **The Quartz Crystal Microbalance in Soft Matter Research**. Soft and Biological Matter, 2015.
- JOHANNSMANN, D.; MATHAUER, K.; WEGNER, G.; KNOLL, W. Viscoelastic properties of thin films probed with a quartz-crystal resonator. **Physical Review B**. v. 46, n. 12, p. 7808-7815, 1992.
- JOHNSON, S.; KRAUSS, T. F. Label-free affinity biosensor arrays: novel technology for molecular diagnostics. **Expert Review of Medical Devices**. v. n. p. 1-3, 2017.
- KALASHNIKOVA, I.; BIZOT, H.; CATHALA, B.; CAPRON, I. New Pickering emulsions stabilized by bacterial cellulose nanocrystals. **Langmuir**. v. 27, n. 12, p. 7471-7479, 2011.
- KARAASLAN, M. A.; TSHABALALA, M. A.; YELLE, D. J.; BUSCHLE-DILLER, G. Nanoreinforced biocompatible hydrogels from wood hemicelluloses and cellulose whiskers. **Carbohydrate Polymers**. v. 86, n. 1, p. 192-201, 2011.
- KITTLE, J. D.; DU, X.; JIANG, F.; QIAN, C.; HEINZE, T.; ROMAN, M.; ESKER, A. R. Equilibrium Water Contents of Cellulose Films Determined via Solvent Exchange and

- Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. **Biomacromolecules**. v. 12, n. 8, p. 2881-2887, 2011.
- KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTROM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORRIS, A. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. **Angew Chem Int Ed Engl**. v. 50, n. 24, p. 5438-5466, 2011.
- KOIZUMI, S.; YUE, Z.; TOMITA, Y.; KONDO, T.; IWASE, H.; YAMAGUCHI, D.; HASHIMOTO, T. Bacterium organizes hierarchical amorphous structure in microbial cellulose. **The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics**. v. 26, n. 1, p. 137-142, 2008.
- KOLASIŃSKA, M.; WARSZYŃSKI, P. The effect of nature of polyions and treatment after deposition on wetting characteristics of polyelectrolyte multilayers. **Applied Surface Science**. v. 252, n. 3, p. 759-765, 2005.
- KOOIMAN, P. A method for the determination of amyloid in plant seeds. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**. v. 79, n. 7, p. 675-678, 1960.
- KOOIMAN, P. **On the occurrence of amyloids in plant seeds.**, 1960.
- KOSAKA, P. M.; KAWANO, Y.; SALVADORI, M. C.; PETRI, D. F. S. Characterization of ultrathin films of cellulose esters. **Cellulose**. v. 12, n. 4, p. 351-359, 2005.
- KOYAMA, M.; HELBERT, W.; IMAI, T.; SUGIYAMA, J.; HENRISSAT, B. Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 94, n. 17, p. 9091-9095, 1997.
- KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G.; PLETNEV, S. V.; CORVER, J.; LENCHES, E.; JONES, C. T.; MUKHOPADHYAY, S.; CHIPMAN, P. R.; STRAUSS, E. G.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. **Cell**. v. 108, n. 5, p. 717-725, 2002.
- KUMMERER, K.; MENZ, J.; SCHUBERT, T.; THIELEMANS, W. Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. **Chemosphere**. v. 82, n. 10, p. 1387-1392, 2011.
- KÜMMERER, K.; MENZ, J.; SCHUBERT, T.; THIELEMANS, W. Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. **Chemosphere**. v. 82, n. 10, p. 1387-1392, 2011.
- LAM, E.; LEUNG, A. C. W.; LIU, Y.; MAJID, E.; HRAPOVIC, S.; MALE, K. B.; LUONG, J. H. T. Green Strategy Guided by Raman Spectroscopy for the Synthesis of Ammonium Carboxylated Nanocrystalline Cellulose and the Recovery of Byproducts. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**. v. 1, n. 2, p. 278-283, 2013.
- LAPPHRA, K.; SANGCHARASWICHAI, A.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; TIENGRIM, S.; PIRIYAKARNSAKUL, W.; CHAKORN, T.; YOKSAN, S.; WATTANAMONGKOLSIL, L.; THAMLIKITKUL, V. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 60, n. 4, p. 387-391, 2008.
- LEVY, S.; YORK, W. S.; STUIKE-PRILL, R.; MEYER, B.; STAEHELIN, L. A. Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding. **Plant J**. v. 1, n. 2, p. 195-215, 1991.
- LI, M.-C.; WU, Q.; SONG, K.; LEE, S.; QING, Y.; WU, Y. Cellulose Nanoparticles: Structure–Morphology–Rheology Relationships. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**. v. 3, n. 5, p. 821-832, 2015.
- LI, W.; YUE, J.; LIU, S. Preparation of nanocrystalline cellulose via ultrasound and its reinforcement capability for poly(vinyl alcohol) composites. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 19, n. 3, p. 479-485, 2012.

- LIMA, D. U.; BUCKERIDGE, M. S. Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. **Carbohydrate Polymers**. v. 46, n. 2, p. 157-163, 2001.
- LIMA, D. U.; LOH, W.; BUCKERIDGE, M. S. Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. **Plant Physiol Biochem**. v. 42, n. 5, p. 389-394, 2004.
- LIMA, N. N.; RECHIA, C. G. V.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. Oligosaccharides derived from the xyloglucan isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 17, n. 6, p. 413-415, 1995.
- LIMA, N. N.; REICHER, F.; CORREA, J. B. C.; GANTER, J. L. M. S.; SIERAAKOWSKI, M. R. Partial Structure of xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* Var. *Stilbocarpa* (Jatoba). **Ciencia e Cultura**. v. 45, n. 1, p. 22-25, 1993.
- LIN, N.; DUFRESNE, A. Surface chemistry, morphological analysis and properties of cellulose nanocrystals with gradiented sulfation degrees. **Nanoscale**. v. 6, n. 10, p. 5384-5393, 2014.
- LIN, N.; DUFRESNE, A. Surface chemistry, morphological analysis and properties of cellulose nanocrystals with gradiented sulfation degrees. **Nanoscale**. v. n. p. 2014.
- LOPEZ, M.; BIZOT, H.; CHAMBAT, G.; MARAIS, M. F.; ZYKWINSKA, A.; RALET, M. C.; DRIGUEZ, H.; BULEON, A. Enthalpic studies of xyloglucan-cellulose interactions. **Biomacromolecules**. v. 11, n. 6, p. 1417-1428, 2010.
- LU, P.; HSIEH, Y.-L. Preparation and properties of cellulose nanocrystals: Rods, spheres, and network. **Carbohydrate Polymers**. v. 82, n. 2, p. 329-336, 2010.
- MAEDA, T.; YAMASHITA, H.; MORITA, N. Application of xyloglucan to improve the gluten membrane on breadmaking. **Carbohydrate Polymers**. v. 68, n. 4, p. 658-664, 2007.
- MAHMOUD, K. A.; LAM, E.; HRAPOVIC, S.; LUONG, J. H. T. Preparation of Well-Dispersed Gold/Magnetite Nanoparticles Embedded on Cellulose Nanocrystals for Efficient Immobilization of Papain Enzyme. **ACS Applied Materials & Interfaces**. v. 5, n. 11, p. 4978-4985, 2013.
- MAJOINEN, J.; HAATAJA, J. S.; APPELHANS, D.; LEDERER, A.; OLSZEWSKA, A.; SEITSONEN, J.; ASEYEV, V.; KONTTURI, E.; ROSILO, H.; ÖSTERBERG, M.; HOUBENOV, N.; IKKALA, O. Supracolloidal Multivalent Interactions and Wrapping of Dendronized Glycopolymers on Native Cellulose Nanocrystals. **Journal of the American Chemical Society**. v. 136, n. 3, p. 866-869, 2014.
- MARCHESSAULT, R. H.; MOREHEAD, F. F.; KOCH, M. J. Some hydrodynamic properties of neutral suspensions of cellulose crystallites as related to size and shape. **Journal of Colloid Science**. v. 16, n. 4, p. 327-344, 1961.
- MARCHESSAULT, R. H.; MOREHEAD, F. F.; WALTER, N. M. Liquid crystal systems from fibrillar polysaccharides. **Nature**. v. 184, n. 4686, p. 632 - 633, 1959.
- MAREAU, A. L. D. **Microscopia de Força Atômica em Materiais Biológicos: Biossensores e Nanoferramentas** Mestrado. Instituto de Física - UNICAMP, Campinas - São Paulo, 2011.
- MARIANO, M.; EL KISSI, N.; DUFRESNE, A. Cellulose nanocrystals and related nanocomposites: Review of some properties and challenges. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**. v. 52, n. 12, p. 791-806, 2014.
- MARTÍNEZ-SANZ, M.; LOPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**. v. 85, n. 1, p. 228-236, 2011.

- MATHEW, A. P.; DUFRESNE, A. Morphological Investigation of Nanocomposites from Sorbitol Plasticized Starch and Tunicin Whiskers. **Biomacromolecules**. v. 3, n. 3, p. 609-617, 2002.
- MCNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annu Rev Biochem**. v. 53, n. 1980s, p. 625-663, 1984.
- MELLEROWICZ, E. J.; IMMERZEEL, P.; HAYASHI, T. Xyloglucan: the molecular muscle of trees. **Ann Bot**. v. 102, n. 5, p. 659-665, 2008.
- MICHAEL, G.; REID, J. G. **Galactomannans and Other Cell Wall Storage Polysaccharides in Seeds**. CRC Press, 2006.
- MONTAÑEZ, M. I.; HED, Y.; UTSEL, S.; ROPPONEN, J.; MALMSTRÖM, E.; WÅGBERG, L.; HULT, A.; MALKOCH, M. Bifunctional Dendronized Cellulose Surfaces as Biosensors. **Biomacromolecules**. v. 12, n. 6, p. 2114-2125, 2011.
- MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**. v. 40, n. 7, p. 3941-3994, 2011.
- MORRIS, S.; HANNA, S.; MILES, M. J. The self-assembly of plant cell wall components by single-molecule force spectroscopy and Monte Carlo modelling. **Nanotechnology**. v. 15, n. 9, p. 1296, 2004.
- MUKHERJEE, S. M.; WOODS, H. J. X-ray and electron microscope studies of the degradation of cellulose by sulphuric acid. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 10, n. 0, p. 499-511, 1953.
- NOGI, M.; YANO, H. Transparent Nanocomposites Based on Cellulose Produced by Bacteria Offer Potential Innovation in the Electronics Device Industry. **Advanced Materials**. v. 20, n. 10, p. 1849-1852, 2008.
- O'NEILL, R. A.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. Purification and characterization of a xyloglucan oligosaccharide-specific xylosidase from pea seedlings. **J Biol Chem**. v. 264, n. 34, p. 20430-20437, 1989.
- OGAWA, K.; HAYASHI, T.; OKAMURA, K. Conformational analysis of xyloglucans. **Int J Biol Macromol**. v. 12, n. 3, p. 218-222, 1990.
- OHSHIMA, H. (2010). DLVO Theory of Colloid Stability. Biophysical Chemistry of Bointerfaces, John Wiley & Sons, Inc.: 420-430.
- OLIVEIRA, R. R. L.; ALBUQUERQUER, D. A. C.; CRUZ, T. G. S.; YAMAJI, F. M.; LEITE, F. L. Measurement of the Nanoscale Roughness by Atomic Force Microscopy: Basic Principles and Applications **Intechopen**. v. 1, n. 1-8, p. 2010.
- ORELMA, H.; FILPPONEN, I.; JOHANSSON, L.-S.; ÖSTERBERG, M.; ROJAS, O. J.; LAINE, J. Surface Functionalized Nanofibrillar Cellulose (NFC) Film as a Platform for Immunoassays and Diagnostics. **Biointerphases**. v. 7, n. 1, p. 61, 2012.
- ORELMA, H.; TEERINEN, T.; JOHANSSON, L.-S.; HOLAPPA, S.; LAINE, J. CMC-Modified Cellulose Bointerface for Antibody Conjugation. **Biomacromolecules**. v. 13, n. 4, p. 1051-1058, 2012.
- PÄÄKKÖ, M.; ANKERFORS, M.; KOSONEN, H.; NYKÄNEN, A.; AHOLA, S.; ÖSTERBERG, M.; RUOKOLAINEN, J.; LAINE, J.; LARSSON, P. T.; IKKALA, O.; LINDSTRÖM, T. Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels. **Biomacromolecules**. v. 8, n. 6, p. 1934-1941, 2007.
- PALAZON, F.; MONTENEGRO BENAVIDES, C.; LÉONARD, D.; SOUTEYRAND, É.; CHEVOLOT, Y.; CLOAREC, J.-P. Carbodiimide/NHS Derivatization of COOH-Terminated SAMs: Activation or Byproduct Formation? **Langmuir**. v. 30, n. 16, p. 4545-4550, 2014.
- PALIK, E. D. **Handbook of optical constants of solids**. Orlando, Florida, 1985.

- PARIKKA, K.; LEPPÄNEN, A.-S.; XU, C.; PITKÄNEN, L.; ERONEN, P.; ÖSTERBERG, M.; BRUMER, H.; WILLFÖR, S.; TENKANEN, M. Functional and anionic cellulose-interacting polymers by selective chemo-enzymatic carboxylation of galactose-containing polysaccharides. **Biomacromolecules**. v. 13, n. 8, p. 2418-2428, 2012.
- PARKASH, O.; SHUEB, R. H. Diagnosis of Dengue Infection Using Conventional and Biosensor Based Techniques. **Viruses**. v. 7, n. 10, p. 5410-5427, 2015.
- PEAKMAN, M.; VERGANI, D.; PYNE, D. J. **Basic and clinical immunology**. New York, 2009.
- PIRICH, C.; DE FREITAS, R.; WOEHL, M.; PICHETH, G.; PETRI, D. S.; SIERAKOWSKI, M. Bacterial cellulose nanocrystals: impact of the sulfate content on the interaction with xyloglucan. **Cellulose**. v. 22, n. 3, p. 1773-1787, 2015.
- PIRICH, C. L.; DE FREITAS, R. A.; TORRESI, R. M.; PICHETH, G. F.; SIERAKOWSKI, M. R. Piezoelectric immunochip coated with thin films of bacterial cellulose nanocrystals for dengue detection. **Biosens Bioelectron**. v. 92, n. p. 47-53, 2017.
- PIRICH, C. L.; DE FREITAS, R. A.; WOEHL, M. A.; PICHETH, G. F.; PETRI, D. F. S.; SIERAKOWSKI, M. R. Bacterial cellulose nanocrystals: impact of the sulfate content on the interaction with xyloglucan. **Cellulose**. v. 22, n. 3, p. 1773-1787, 2015.
- PIRICH, C. L.; FREITAS, R. A.; WOEHL, M. A.; PICHETH, G. F.; PETRI, D. F. S.; SIERAKOWSKI, M. R. Bacterial cellulose nanocrystals: impact of the sulfate content on the interaction with xyloglucan. **Cellulose**. v. 22, n. 3, p. 1773-1787, 2015.
- QIAO, C.; CHEN, G.; ZHANG, J.; YAO, J. Structure and rheological properties of cellulose nanocrystals suspension. **Food Hydrocolloids**. v. 55, n. p. 19-25, 2016.
- RAI, V.; HAPUARACHCHI, H. C.; NG, L. C.; SOH, S. H.; LEO, Y. S.; TOH, C.-S. Ultrasensitive cDNA Detection of Dengue Virus RNA Using Electrochemical Nanoporous Membrane-Based Biosensor. **PLOS ONE**. v. 7, n. 8, p. e42346, 2012.
- RAINTREE**. Disponível em: <http://www.rain-tree.com/Plant-Images/>. Data acessada: 02 de dezembro de 2012
- RAJALA, S.; VUORILUOTO, M.; ROJAS, O.; FRANSSILA, S.; TUUKKANEN, S. (2015). Piezoelectric sensitivity measurements of cellulose nanofibril sensors. IMEKO XXI World Congress, Proceedings, August 30 - September 4, 2015, Prague, Czech Republic.
- RAMOS, L.; BREUIL, C.; SADDLER, J. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 34-35, n. 1, p. 37-48, 1992.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**. v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.
- RAMOS, L. P.; NAZHAD, M. M.; SADDLER, J. N. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 15, n. 10, p. 821-831, 1993.
- RANBY, B. G.; BANDERET, A.; SILLÉN, L. G. Aqueous Colloidal Solutions of Cellulose Micelles. **Acta Chemica Scandinavica**. v. 3, n. p. 649-650, 1949.
- RAO, P. S. S., H.C. **Industrial Gums - Polysaccharides and Their Derivatives**. California. Academic Press, 1973.
- REIMHULT, K.; PETERSSON, K.; KROZER, A. QCM-D analysis of the performance of blocking agents on gold and polystyrene surfaces. **Langmuir**. v. 24, n. 16, p. 8695-8700, 2008.
- RITCHIE, C. D. Nucleophilic reactivities toward cations. **Accounts of Chemical Research**. v. 5, n. 10, p. 348-354, 1972.

- ROMAN, M.; WINTER, W. T. Effect of Sulfate Groups from Sulfuric Acid Hydrolysis on the Thermal Degradation Behavior of Bacterial Cellulose. **Biomacromolecules**. v. 5, n. 5, p. 1671-1677, 2004.
- RYCHLEWSKI, J. On Hooke's law. **Journal of Applied Mathematics and Mechanics**. v. 48, n. 3, p. 303-314, 1984.
- SAITO, Y.; MOI, M. L.; KOTAKI, A.; IKEDA, M.; TAJIMA, S.; SHIBA, H.; HOSONO, K.; SAIJO, M.; KURANE, I.; TAKASAKI, T. Detecting Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) in Urine Samples Using ELISA for the Diagnosis of Dengue Virus Infection. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. v. 68, n. 6, p. 455-460, 2015.
- SAMIR, M. A. S. A.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of Recent Research into Cellulosic Whiskers, Their Properties and Their Application in Nanocomposite Field. **Biomacromolecules**. v. 6, n. 2, p. 612-626, 2005.
- SCOTT, W. W.; BHUSHAN, B. Use of phase imaging in atomic force microscopy for measurement of viscoelastic contrast in polymer nanocomposites and molecularly thick lubricant films. **Ultramicroscopy**. v. 97, n. 1-4, p. 151-169, 2003.
- SCOTT, W. W.; BHUSHAN, B. Use of phase imaging in atomic force microscopy for measurement of viscoelastic contrast in polymer nanocomposites and molecularly thick lubricant films. **Ultramicroscopy**. v. 97, n. 1-4, p. 151-169, 2003.
- SHELDON, R. A. The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. **Green Chemistry**. v. 19, n. 1, p. 18-43, 2017.
- SHEYKHNAZARI, S.; TABARSA, T.; ASHORI, A.; SHAKERI, A.; GOLALIPOUR, M. Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**. v. 86, n. 3, p. 1187-1191, 2011.
- SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; NISHINARI, K. Tailoring of xyloglucan properties using an enzyme. **Food Hydrocolloids**. v. 12, n. 1, p. 25-28, 1998.
- SINAWANG, PRIMA D.; RAI, V.; IONESCU, R. E.; MARKS, R. S. Electrochemical lateral flow immunosensor for detection and quantification of dengue NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 77, n. p. 400-408, 2016.
- SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications**. San Diego. Academic Press, 1993.
- SOLOMONS, T. W. G. **Organic Chemistry**. New York. John Wiley, 1996.
- SOUZA, C. F.; LUCYSZYN, N.; WOEHL, M. A.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; BORSALI, R.; SIERAKOWSKI, M. R. Property evaluations of dry-cast reconstituted bacterial cellulose/tamarind xyloglucan biocomposites. **Carbohydr Polym**. v. 93, n. 1, p. 144-153, 2013.
- SOUZA, C. F.; LUCYSZYN, N.; WOEHL, M. A.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; BORSALI, R.; SIERAKOWSKI, M. R. Property evaluations of dry-cast reconstituted bacterial cellulose/tamarind xyloglucan biocomposites. **Carbohydrate Polymers**. v. 93, n. 1, p. 144-153, 2013.
- SOUZA LIMA, M. M.; BORSALI, R. Rodlike cellulose microcrystals: structure, properties, and applications. **Macromolecular Rapid Communications**. v. 25, n. 7, p. 771-787, 2004.
- STOLLNER, D.; SCHELLER, F. W.; WARSINKE, A. Activation of cellulose membranes with 1,1'-carbonyldiimidazole or 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate as a basis for the development of immunosensors. **Anal Biochem**. v. 304, n. 2, p. 157-165, 2002.
- STUPP, T.; DE FREITAS, R. A.; SIERAKOWSKI, M. R.; DESCHAMPS, F. C.; WISNIEWSKI JR, A.; BIAVATTI, M. W. Characterization and potential uses of

- Copaifera langsdorfii* seeds and seed oil. **Bioresource Technology**. v. 99, n. 7, p. 2659-2663, 2008.
- SU, C.-C.; WU, T.-Z.; CHEN, L.-K.; YANG, H.-H.; TAI, D.-F. Development of immunochips for the detection of dengue viral antigens. **Analytica Chimica Acta**. v. 479, n. 2, p. 117-123, 2003.
- SUGIYAMA, J.; VUONG, R.; CHANZY, H. Electron diffraction study on the two crystalline phases occurring in native cellulose from an algal cell wall. **Macromolecules**. v. 24, n. 14, p. 4168-4175, 1991.
- TAYLOR, I. E. P.; ATKINS, E. D. T. X-ray diffraction studies on the xyloglucan from tamarind (*Tamarindus indica*) seed. **FEBS Letters**. v. 181, n. 2, p. 300-302, 1985.
- TISCHER, P. C. S. F.; SIERAKOWSKI, M. R.; WESTFAHL, H.; TISCHER, C. A. Nanostructural Reorganization of Bacterial Cellulose by Ultrasonic Treatment. **Biomacromolecules**. v. 11, n. 5, p. 1217-1224, 2010.
- TRACHE, D.; HUSSIN, M. H.; HAAFIZ, M. K. M.; THAKUR, V. K. Recent progress in cellulose nanocrystals: sources and production. **Nanoscale**. v. 9, n. 5, p. 1763-1786, 2017.
- VAN LEEMPUTTEN, E.; HORISBERGER, M. Letter: Immobilization of trypsin on partially oxidized cellulose. **Biotechnol Bioeng**. v. 16, n. 7, p. 997-1003, 1974.
- VUORILUOTO, M.; ORELMA, H.; ZHU, B.; JOHANSSON, L.-S.; ROJAS, O. J. Control of Protein Affinity of Bioactive Nanocellulose and Passivation Using Engineered Block and Random Copolymers. **ACS Applied Materials & Interfaces**. v. 8, n. 8, p. 5668-5678, 2016.
- WADA, M.; OKANO, T.; SUGIYAMA, J. Synchrotron-radiated X-ray and neutron diffraction study of native cellulose. **Cellulose**. v. 4, n. 3, p. 221-232, 1997.
- WANG, L.; WANG, R.; CHEN, F.; JIANG, T.; WANG, H.; SLAVIK, M.; WEI, H.; LI, Y. QCM-based aptamer selection and detection of *Salmonella typhimurium*. **Food Chemistry**. v. 221, n. p. 776-782, 2017.
- WHITNEY, S. E. C.; BRIGHAM, J. E.; DARKE, A. H.; REID, J. S. G.; GIDLEY, M. J. In vitro assembly of cellulose/xyloglucan networks: ultrastructural and molecular aspects. **The Plant Journal**. v. 8, n. 4, p. 491-504, 1995.
- WHITNEY, S. E. C.; GOTHARD, M. G. E.; MITCHELL, J. T.; GIDLEY, M. J. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. **Plant Physiology**. v. 121, n. 2, p. 657-664, 1999.
- WHO. Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012–2020. v. 35, n. p. 43, 2016.
- WINTER, H. T.; CERCLIER, C.; DELORME, N.; BIZOT, H.; QUEMENER, B.; CATHALA, B. Improved colloidal stability of bacterial cellulose nanocrystal suspensions for the elaboration of spin-coated cellulose-based model surfaces. **Biomacromolecules**. v. 11, n. 11, p. 3144-3151, 2010.
- WŁOCHOWICZ, A.; JEZIORNY, A. Determination of crystallinity in polyester fibers by x-ray methods. **Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics**. v. 10, n. 8, p. 1407-1414, 1972.
- WOEHL, M. A.; CANESTRARO, C. D.; MIKOWSKI, A.; SIERAKOWSKI, M. R.; RAMOS, L. P.; WYPYCH, F. Bionanocomposites of thermoplastic starch reinforced with bacterial cellulose nanofibres: Effect of enzymatic treatment on mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**. v. 80, n. 3, p. 866-873, 2010.
- WONG, S.-S.; KASAPIS, S.; HUANG, D. Molecular weight and crystallinity alteration of cellulose via prolonged ultrasound fragmentation. **Food Hydrocolloids**. v. 26, n. 2, p. 365-369, 2012.

- WONG, W. R.; SEKARAN, SHAMALA D.; MAHAMD ADIKAN, F. R.; BERINI, P. Detection of dengue NS1 antigen using long-range surface plasmon waveguides. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 78, n. p. 132-139, 2016.
- WU, T.-Z.; SU, C.-C.; CHEN, L.-K.; YANG, H.-H.; TAI, D.-F.; PENG, K.-C. Piezoelectric immunochip for the detection of dengue fever in viremia phase. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 21, n. 5, p. 689-695, 2005.
- YANG, D.-Q.; XIONG, Y.-Q.; GUO, Y.; DA, D.-A.; LU, W.-G. Sizes correction on AFM images of nanometer spherical particles. **Journal of Materials Science**. v. 36, n. 1, p. 263-267, 2001.
- YORK, W. S.; KUMAR KOLLI, V. S.; ORLANDO, R.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. **Carbohydrate Research**. v. 285, n. 0, p. 99-128, 1996.
- YOU, H. X.; LIN, S.; LOWE, C. R. A scanning tunnelling microscopic study of site-specifically immobilized immunoglobulin G on gold. **Micron**. v. 26, n. 4, p. 311-315, 1995.
- YU, H.; QIN, Z.; LIANG, B.; LIU, N.; ZHOU, Z.; CHEN, L. Facile extraction of thermally stable cellulose nanocrystals with a high yield of 93% through hydrochloric acid hydrolysis under hydrothermal conditions. **Journal of Materials Chemistry A**. v. 1, n. 12, p. 3938-3944, 2013.
- ZHANG, B.; SALIEB-BEUGELAAR, G. B.; NIGO, M. M.; WEIDMANN, M.; HUNZIKER, P. Diagnosing dengue virus infection: rapid tests and the role of micro/nanotechnologies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v. 11, n. 7, p. 1745-1761, 2015.
- ZHANG, J.; ELDER, T. J.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. J. Facile synthesis of spherical cellulose nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**. v. 69, n. 3, p. 607-611, 2007.
- ZHANG, Q.; BRUMER, H.; AGREN, H.; TU, Y. The adsorption of xyloglucan on cellulose: effects of explicit water and side chain variation. **Carbohydrate research**. v. 346, n. 16, p. 2595-2602, 2011.
- ZHANG, Y.; ROJAS, O. J. Immunosensors for C-Reactive Protein Based on Ultrathin Films of Carboxylated Cellulose Nanofibrils. **Biomacromolecules**. v. n. p. 2016.
- ZHAO, Z.; CRESPI, V.; KUBICKI, J.; COSGROVE, D.; ZHONG, L. Molecular dynamics simulation study of xyloglucan adsorption on cellulose surfaces: effects of surface hydrophobicity and side-chain variation. **Cellulose**. v. 21, n. 2, p. 1025-1039, 2014.
- ZHOU, Q.; RUTLAND, M.; TEERI, T.; BRUMER, H. Xyloglucan in cellulose modification. **Cellulose**. v. 14, n. 6, p. 625-641, 2007.
- ZUGENMAIER, P. Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. **Progress in Polymer Science**. v. 26, n. 9, p. 1341-1417, 2001.
- ZUK, R. F.; GINSBERG, V. K.; HOUTS, T.; RABBIE, J.; MERRICK, H.; ULLMAN, E. F.; FISCHER, M. M.; SIZTO, C. C.; STISO, S. N.; LITMAN, D. J. Enzyme immunochromatography--a quantitative immunoassay requiring no instrumentation. **Clin Chem**. v. 31, n. 7, p. 1144-1150, 1985.
- ZYKWINSKA, A.; THIBAUT, J.-F.; RALET, M.-C. Modelling of xyloglucan, pectins and pectic side chains binding onto cellulose microfibrils. **Carbohydrate Polymers**. v. 74, n. 1, p. 23-30, 2008.