

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CAMPUS DE ERECHIM  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**JANINE MARTINAZZO**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSOR DE CANTILEVER PARA DETECÇÃO  
DE ATRAZINA EM ÁGUA**

**ERECHIM - RS**

**2017**

**JANINE MARTINAZZO**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSOR DE CANTILEVER PARA DETECÇÃO  
DE ATRAZINA EM ÁGUA**

**Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de  
Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos,  
Departamento de Ciências Agrárias da  
Universidade Regional Integrada do Alto  
Uruguai e das Missões – Campus de Erechim**

**Orientadoras: Dr<sup>a</sup>. Juliana Steffens**

**Dr<sup>a</sup>. Clarice Steffens**

**Coorientador: Dr. Fabio de Lima Leite**

**ERECHIM – RS**

**2017**

**JANINE MARTINAZZO**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSOR DE CANTILEVER PARA DETECÇÃO  
DE ATRAZINA EM ÁGUA**

**Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de  
Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos,  
Departamento de Ciências Agrárias da  
Universidade Regional Integrada do Alto  
Uruguai e das Missões – Campus de Erechim**

Erechim, 06 de março de 2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Steffens  
URI - Erechim

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice Steffens  
URI - Erechim

---

Prof. Dr. Fábio de Lima Leite  
UFSCar - Sorocaba

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucélia Hoehne  
UNIVATES - Lajeado

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geciane Toniazco Backes  
URI – Erechim

---

Dr<sup>a</sup>. Alexandra Manzoli  
URI – Erechim

**NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – ERECHIM**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus. Pela minha vida, pelas oportunidades, pela sabedoria e proteção durante esta etapa.

À minha família, em especial meus pais Moacir e Marinês, e meu irmão Guilherme pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos. Foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Ao meu namorado Bruno, obrigada pelo carinho, auxílio, conselhos e paciência nesta etapa e por sempre acreditar em mim.

Às minhas orientadoras Juliana e Clarice Steffens, pela oportunidade de trabalharmos juntas, pela confiança em meu trabalho, por toda a ajuda prestada, ensinamentos, paciência e amizade. Obrigada por contribuírem para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu coorientador Fábio de Lima Leite, pelas orientações e compra de reagentes.

Ao professor Rogério Marcos Dallago por esclarecer as dúvidas e por estar sempre disponível, e ao professor Cláudio Zakrzewski pelo desenvolvimento do sistema de refrigeração do AFM.

Aos professores Renato Zanella da UFSM e Flávio Makoto Shimizu da USP pela doação de reagentes necessários.

Ao especialista em AFM Carlos Costa pela disposição e todos os ensinamentos prestados. Sem você não seria possível a realização deste trabalho.

Às minhas queridas colegas e eternas amigas Alexandra, Daniela, Aline e Alana. Obrigada pela parceria, por toda a ajuda prestada, por me ensinar quando precisei, pelos conselhos, pelas risadas e pelas lágrimas também. Sem vocês não seria possível! Estarão sempre em meu coração.

À Alexandra Manzoli obrigada por todas as orientações e ajudas.

Às meninas: Glaciela, Mariane, Sandi, Rúbia, Nádia, Naiara, Cindy e Raieli, obrigada pelo apoio, pelas dicas e por qualquer tipo de ajuda nesta etapa.

A todos os amigos que o mestrado me deu, que de alguma forma contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI – Erechim, pela estrutura ofertada e por possibilitar a realização deste trabalho.

À CAPES e à EMBRAPA pelo apoio financeiro.

À todos os professores, colegas, pessoal da Central de Materiais e Embrapa Instrumentação de São Carlos-SP que colaboraram diretamente ou indiretamente neste trabalho.

À banca avaliadora, por fazerem parte da mesma.

**Muito Obrigada!**

*“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”*

(Albert Einstein)

## RESUMO

Atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina) é um herbicida sistêmico, seletivo, utilizado no controle pré e pós-emergente de ervas de folhas largas, principalmente nas culturas de milho, cana-de-açúcar e soja. É muito utilizado na agricultura, sendo um fator preocupante para a saúde, pois permanece por muito tempo no ambiente, tornando-se responsável pela contaminação do solo, do ar e das águas. Métodos convencionais para detecção de atrazina em águas são métodos caros, com elevado tempo de análise. Por isso novos métodos de detecção vêm sendo estudados como os nanobiossensores de cantilever que estão tendo destaque por detectar substâncias na micro e nanoescala por meio do uso de camada sensoras. Neste trabalho, o objetivo foi desenvolver um nanobiossensor de cantilever para detecção de atrazina em água utilizando extrato bruto vegetal de enzima tirosinase. A funcionalização do cantilever foi realizada empregando dois modos pela técnica de camadas automontadas (SAM) em superfície de silício contendo ouro, ácido 16-mercaptohexadecanóico (AMHD), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC)/*N*-hidroxi-succinimida (NHS) e extrato bruto vegetal de tirosinase, obtido de banana nanica (*Musa acuminata*). A avaliação da estabilidade da enzima durante o tempo de armazenamento avaliado (150 dias) mostrou a adequação da mesma para o uso em nanobiossensores, apresentando alta atividade enzimática (16229 U/mL). A proporção de reagentes utilizados na SAM teve influência na diferença de voltagem do cantilever na detecção de atrazina, e a técnica utilizando 1 mM EDC/1 mM NHS (4:1 v/v) foi a que proporcionou um aumento da tensão de compressão de superfície do nanobiossensor de cantilever com o aumento da concentração de atrazina em água, onde foram observadas diferenças nos valores de voltagem, quando comparado aos valores obtidos do cantilever funcionalizado em água e do cantilever branco (não funcionalizado). Técnicas de caracterização de superfície por AFM e PM-IRRAS confirmaram a funcionalização do cantilever pela técnica de SAM, sendo possível verificar que ocorreu a deposição da camada sensora e, a espessura desta camada sensora apresentou a medida em escala manométrica ( $80,2 \pm 0,4$  nm). Assim, o nanobiossensor de cantilever desenvolvido mostrou-se adequado para a detecção de atrazina em águas, sendo uma ferramenta promissora na área ambiental.

**Palavras-chave:** Extrato bruto. Tirosinase. Microscopia de Força Atômica. SAM.

## ABSTRACT

Atrazine (2-chloro-4- (ethylamino) -6- (isopropylamino) -s-triazine) is a selective systemic herbicide used in the pre and post emergent control of broadleaf herbs, mainly in corn, sugarcane and soy. It is widely used in agriculture and is a worrying factor for health, because it remains in the environment for a long time, becoming responsible for soil, air and water contamination. Conventional methods for the detection of atrazine in water are expensive methods with high analysis time. Therefore, new detection methods have been studied, such as the nanobiosensor of cantilever, which are being highlighted by detecting substances in the micro and nanoscale through the use of sensor layers. In this work the objective was to develop a cantilever nanobiosensor for the detection of atrazine in water with a crude vegetal extract of enzyme tyrosinase. The cantilever functionalization was performed using two modes by the technique of Self-Assembled Monolayers (SAM) on silicon surface containing gold, 16-mercaptopentadecanoic acid (AMHD), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)/*N*-hydroxysuccinimide (NHS) and crude extract of tyrosinase from banana nanica (*Musa acuminata*). The evaluation of the stability of the enzyme during the storage time evaluated (150 days) showed its suitability for use in nanobiosensors, presenting high enzymatic activity (16229 U/mL). The ratio of reagents used in SAM had an influence on the cantilever voltage difference in atrazine detection, and the technique using 1mM EDC/1 mM NHS (4:1v/v) provided the increase in surface compression stress of the cantilever nanobiosensor with the increase of the atrazine concentration in water, where differences in voltage values were observed when compared to the values obtained from the water-functionalized cantilever and the white (non-functionalized) cantilever. Techniques of surface characterization by AFM and PM-IRRAS confirmed the functionalization of the cantilever by the technique of SAM, being thus possible to verify that the deposition of the sensor layer occurred and, the thickness of this sensor layer showed the measurement in nanoscale ( $80,2 \pm 0,4$  nm). Thus, the developed cantilever nanobiosensor proved to be suitable for the detection of atrazine in waters, being a promising tool in the environmental area.

**Keywords:** Crude extract. Tyrosinase. Atomic Force Microscopy. SAM.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química da atrazina .....	21
Figura 2 - Esquema de funcionamento de um biossensor .....	24
Figura 3 - Estrutura da enzima tirosinase (a); Representação esquemática da enzima tirosinase com seus dois átomos de Cu (II), como sítios ativos em verde (b) .....	26
Figura 4 - Esquema das reações catalisadas pela tirosinase .....	27
Figura 5 - Esquema do funcionamento do AFM .....	30
Figura 6 - Modos de operação de sensores de cantilever: modo estático e modo dinâmico .....	31
Figura 7 - Monocamadas automontadas sobre a superfície de ouro.....	33
Figura 8 - Esquema de reticulação mediada por EDC (a) e EDC/NHS (b).....	34
Figura 9 - Algumas etapas da extração do extrato bruto de tirosinase: (a) Banana nanica ( <i>Musa acuminata</i> ) madura; (b) Tempo de contato dos extratos em pH 6,5 com e sem PVP; (c) Filtração dos extratos brutos de tirosinase.....	37
Figura 10 - Especificações do cantilever utilizado para funcionalização.....	40
Figura 11 - Etapa de funcionalização pela técnica de SAM utilizando 1 mM EDC/1 mM NHS (4:1 v/v), onde o cantilever permanece em contato com o extrato enzimático de tirosinase .....	43
Figura 12 - Solução de atrazina em contato com o cantilever no equipamento de microscopia de força atômica (AFM) para medida de voltagem.....	44
Figura 13 - Sistema de resfriamento do equipamento de microscopia de força atômica desenvolvido para controle de temperatura e minimização de ruídos.....	45
Figura 14 - Estabilidade do extrato bruto de tirosinase obtido de banana nanica ( <i>Musa acuminata</i> ) em diferentes condições de extração .....	48
Figura 15 - Atividade enzimática do extrato bruto e do extrato diluído de tirosinase obtido de banana nanica ( <i>Musa acuminata</i> ) em pH 6,5, com PVP .....	50
Figura 16 - Estabilidade do extrato diluído de tirosinase obtido de banana nanica ( <i>Musa acuminata</i> ) em pH 6,5, com PVP .....	51
Figura 17 - Influência do pH na medida do potencial zeta para o extrato bruto de tirosinase obtida de banana nanica ( <i>Musa acuminata</i> ) .....	52
Figura 18 - Esquema da funcionalização do cantilever para detecção de atrazina em água .....	53

Figura 19 - Resposta do nanobiossensor de cantilever obtida pela técnica de SAM utilizando 0,1 M EDC/0,1 M NHS (1:1 v/v).....	55
Figura 20 - Resposta do nanobiossensor de cantilever obtida pela técnica de SAM utilizando 1 mM EDC/1 mM NHS (4:1 v/v).....	56
Figura 21 - Caracterização de superfície por análise topográfica obtida por meio de AFM em cada etapa de funcionalização (a) Silício; (b) Silício + Ouro; (c) Silício + Ouro + AMHD; (d) Silício + Ouro + AMHD + EDC/NHS; (e) Silício + Ouro + AMHD + EDC/NHS + Tirosinase.....	60
Figura 22 - Caracterização da funcionalização do cantilever pela técnica de PM-IRRAS .....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físicas e químicas da atrazina .....	22
Tabela 2 - Reagentes utilizados .....	36
Tabela 3 - Valores de desvio médio quadrático de rugosidade obtido por meio de AFM para cada etapa de funcionalização.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM - Microscopia de força atômica (*Atomic Force Microscope*)

AMHD - Ácido 16-mercaptohexadecanóico

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATZ - Atrazina

CC - Corrente Contínua

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cu - Cobre

EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FAO - Food and Agriculture Organization

GC - Cromatografia Gasosa

HCl - Ácido Clorídrico

HNO<sub>3</sub> - Ácido Nítrico

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

*k* - Constante de mola

log Kow - Coeficiente de partição octanol-água

MDF - Fibra de média densidade

NHS - *N*-hidroxi-succinimida

nm - Nanômetro

ONU - Programa da Organização das Nações Unidas

PA - Pureza analítica

pN - Piconewtons

PM-IRRAS - Espectroscopia de infravermelho de reflexão e absorção de modulação por polarização

ppm - Partes por milhão

PVP - Polivinilpirrolidona

Rms - Desvio médio quadrático da altura

SAM - Monocamadas Automontadas (*Self-Assembled Monolayers*)

U - Unidade de atividade

UV-Vis - Espectroscopia no ultravioleta – Visível

V - Volts

$\lambda$  – Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 Água e agrotóxicos</b> .....	<b>19</b>
3.1.1 Atrazina .....	20
<b>3.2 Nanotecnologia</b> .....	<b>23</b>
3.2.1 Biossensores e nanobiossensores .....	24
3.2.2 Biossensores enzimáticos .....	25
3.2.3 Tirosinase .....	26
<b>3.3 Nanobiossensores de cantileveres</b> .....	<b>29</b>
3.3.1 Funcionalização da superfície de nanobiossensores.....	32
<b>3.4 Considerações finais</b> .....	<b>35</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1 Materiais</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2 Métodos</b> .....	<b>36</b>
4.2.1 Extração Enzimática .....	36
4.2.1.1 Medida de Atividade Enzimática .....	38
4.2.1.2 Medida da Estabilidade Enzimática .....	39
4.2.1.3 Potencial Zeta .....	39
4.2.2 Cantileveres .....	39
4.2.3 Funcionalização dos cantileveres pela técnica de camadas automontadas (SAM) .....	41
4.2.4 Medida de deflexão do nanobiossensor de cantilever .....	43
4.2.5 Avaliação da resposta do nanobiossensor de cantilever na detecção de atrazina em água ..	44
4.2.6 Caracterização de superfície do nanobiossensor de cantilever.....	46
4.2.6.1 Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	46
4.2.6.2 Espectroscopia de Infravermelho de Reflexão e Absorção de Modulação por Polarização (PM-IRRAS).....	47

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1 Estabilidade enzimática .....</b>	<b>48</b>
<b>5.2 Potencial zeta.....</b>	<b>51</b>
<b>5.3 Avaliação da resposta do nanobiossensor de cantilever na detecção de atrazina em água .....</b>	<b>53</b>
<b>5.4 Caracterização de superfície do nanobiossensor de cantilever .....</b>	<b>59</b>
5.4.1 Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	59
5.4.2 Espectroscopia de Infravermelho de Reflexão e Absorção de Modulação por Polarização (PM-IRRAS).....	62
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>65</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina) é o segundo herbicida mais utilizado nos Estados Unidos (EUA). Cerca de 76,4 milhões de libras de atrazina são aplicados anualmente, e é o pesticida mais comumente detectado na água potável nos EUA (STAYNER et al., 2017).

O uso dos pesticidas na agricultura é fator preocupante para a saúde, pois estes permanecem por muito tempo no ambiente, contaminando do solo, o ar e também as águas. Observaram-se concentrações elevadas de atrazina nas águas superficiais em alguns países. De acordo com pesquisas e estudos realizados nos EUA, concentrações extremamente altas de atrazina (330 µg/L) foram observadas na água de algumas áreas agrícolas e urbanas do país (BONANSEA et al., 2013; LIU; FU; JIN, 2017).

A atrazina, um dos herbicidas mais utilizados, principalmente nas culturas de milho, cana-de-açúcar e sorgo. É caracterizado como herbicida pré e pós-emergente no controle de ervas daninhas, onde atua inibindo a atividade fotossintética da planta (JAVARONI; LANDGRAF; REZENDE, 1999; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2014; BIA et al., 2014; AQUINO et al., 2017). Por ser considerado um produto de elevada toxicidade, órgãos como o Ministério da Saúde e Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelecem limite máximo permitido para atrazina em águas para o consumo humano de 2 µg/L.

Para a detecção de agroquímicos, entre eles a atrazina, os métodos convencionais mais utilizados são a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massa, porém, são métodos caros, que exigem pessoas capacitadas e elevado tempo para análise (LOOS; NIESSNER, 1999; BARCHANSKA et al., 2012; KUKLENYIK et al., 2012; LEITE et al., 2015; LIU et al., 2015). Com isso, novos métodos de detecção vêm sendo estudados, para redução de tempo, custo, e também um maior limite de detecção para baixas concentrações.

Nos últimos anos, nanossensores e nanobiossensores de cantilever estão tendo grande destaque por detectar substâncias na micro e nanoescala, por meio do uso de camada sensoras biológicas, como célula, antígeno e anticorpo, ou enzima imobilizada.

A enzima tirosinase pode ser inibida por muitos poluentes, entre eles a atrazina (MARQUES; YAMANAKA, 2008). Vários estudos mostram a construção de biossensores

utilizando tirosinase para a detecção de atrazina, entre eles biossensor condutométrico (ANH et al., 2004), biossensor eletroquímico (GUAN et al., 2016), biossensor amperométrico (TORTOLINI et al., 2016;), utilizando a inibição enzimática em presença do herbicida com resultados satisfatórios.

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de nanobiossensor de cantilever funcionalizado com extrato enzimático vegetal de tirosinase para a detecção do herbicida atrazina em água e caracterizar a superfície do nanobiossensor bem como a resposta do dispositivo a diferentes concentrações de atrazina.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Este trabalho tem por objetivo principal o desenvolvimento de nanobiossensor de cantilever funcionalizado com extrato enzimático vegetal de tirosinase para a detecção de atrazina em água.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Obter um extrato bruto da enzima tirosinase de baixo custo utilizando um tecido vegetal;
- Avaliar a atividade e a estabilidade da enzima tirosinase com e sem agente protetor para posterior utilização no desenvolvimento do nanobiossensor de cantilever;
- Estudar duas formas de funcionalização do cantilever pela técnica de SAM (camadas automontadas) utilizando extrato enzimático de tirosinase;
- Caracterizar a superfície do nanobiossensor de cantilever antes e após a funcionalização com as técnicas de microscopia de força atômica (AFM) e espectroscopia de infravermelho de reflexão e absorção de modulação por polarização (PM-IRRAS);
- Avaliar a resposta do nanobiossensor de cantilever na detecção de atrazina em água.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Água e agrotóxicos

A água é um dos principais recursos naturais existentes, por ser essencial à vida no planeta e para o bem-estar da população, sendo importante na alimentação, nas atividades domésticas, industriais e químicas, para o setor agrícola e pecuário, geração de energia elétrica, entre outros. O aumento do uso de pesticidas na agricultura torna-se preocupante, devido a sua permanência no ambiente, podendo levar a contaminação das águas, além dos solos e ar (SEKHON, 2014).

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), Programa da Organização das Nações Unidas (ONU) responsável pelas áreas de agricultura e alimentação, os agrotóxicos são definidos como qualquer substância, ou mistura de substâncias, usadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas ou animais, causadoras de danos durante a produção ou interferindo na mesma, no processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e derivados, ou que deva ser administrada para o controle de insetos, aracnídeos e outras pestes que acometem os corpos de animais de criação (PERES; MOREIRA, 2003).

Existem inúmeras variedades de agrotóxicos, e podem ser classificados de acordo com três abordagens: no modo de ação; pragas que combatem e; grupo químico a que pertencem. De acordo com o modo de ação, eles podem ser sistêmicos ou não sistêmicos. Os primeiros entram no sistema vascular da planta, enquanto que os não sistêmicos não, afetando assim o local em que entram em contato (ZACHARIA, 2011).

Quanto à estrutura química são classificados como: carbamatos, piretróides, organofosforados, organoclorados e triazinas e, quanto à sua ação, de acordo com as pragas, são classificados como: herbicidas, para o controle de plantas daninhas; fungicidas, para o controle de fungos; inseticidas, para controle de insetos; acaricidas, para o controle de ácaros, entre outros (PEREIRA, 2011a; ZACHARIA, 2011).

Os pesticidas, em sua grande maioria, apresentam elevada toxicidade, tornando-os cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e mimetizadores de hormônios. Quando aplicados,

podem se acumular no ambiente, gerando sérios problemas na qualidade das águas superficiais e subterrâneas. Muitos desses pesticidas não são adsorvidos substancialmente ao solo, sendo frequentemente encontrados acima dos níveis toleráveis pelas agências de controle ambiental em águas superficiais e lençóis freáticos (RODRIGUES, 2015; ABATE; MASINI, 2005).

De acordo com estudos (PRIETO, 2013; INOUE et al., 2014; LIN et al., 2014; XING et al., 2015; VOGEL et al., 2015) herbicidas provocam alterações em animais, no seu desenvolvimento, nos sistemas colinérgico, imunológico, reprodutivo, causando alterações em órgãos como cérebro, fígado, rim, pulmão, entre outros, quando submetidos à exposição. Os principais efeitos adversos para a saúde humana causados por pesticidas são dificuldades na respiração, dores de cabeça, efeitos neurológicos ou psicológicos, irritação da pele e das membranas mucosas, declínio da função do sistema imunológico, alterações no crescimento e reprodução além de tumores (BRETVELD, 2006; LIU et al., 2015).

Dentre os pesticidas mais utilizados no mundo está a classe dos herbicidas triazínicos que estão na lista de poluentes químicos que precisam ser monitorados devido à sua toxicidade, persistência e acúmulo no meio ambiente. Estes são inibidores da fotossíntese, considerados inibidores do transporte de elétrons (ZHAO, 2008; OLIVEIRA, 2011; SILVA et al., 2013).

### 3.1.1 Atrazina

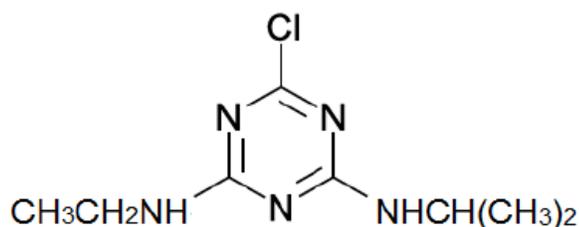
As triazinas possuem um anel composto de átomos alternados de nitrogênio e carbono, sendo que a maioria destas são simétricas (s-triazinas), onde no anel há a alternância de átomos de nitrogênio e carbono (CONSOLIN FILHO, 2002).

A atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina), pertence à classe química das triazinas e é a mais utilizada na agricultura. Sua estrutura química é representada por um anel triazínico substituído com cloro, etilamina e isopropilamina (Fig. 1), o que o torna recalcitrante para a degradação biológica no ambiente. É classificada como herbicida sistêmico, seletivo e utilizado no controle pré e pós-emergente de ervas de folhas largas, principalmente nas culturas de milho, cana-de-açúcar e soja (HALLBERG, 1989; JAVARONI; LANDGRAF; REZENDE, 1999; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2014; BIA et al., 2014; AQUINO et al., 2017).

Este herbicida inibe a atividade do fotossistema II pelo fato de ocorrer a substituição da ligação da plastoquinona com a quinona b. A atrazina substitui a forma oxidada da plastoquinona e ocupa o local de ligação específica no aceptor Q<sub>b</sub> da proteína D1. Dessa forma, a molécula do

herbicida está reduzida e não apta a receber elétrons, inibindo a fotossíntese (KLECZKOWSKI, 1994).

Figura 1- Estrutura química da atrazina



Fonte: PEREIRA (2011b)

Segundo Javaroni; Landgraf; Rezende (1999), atrazina é um composto polar, fracamente básico e sua estabilidade pode ser explicada pela configuração eletrônica de seu anel heterocíclico. Possui solubilidade em água relativamente baixa e é solúvel em alguns solventes orgânicos como éter, acetona, benzeno, clorofórmio, etanol e acetato de etila.

Devido à frequência de uso, a alta persistência deste herbicida no ambiente, pode ocorrer a permanência no sistema ecológico, podendo ser transferido para as águas superficiais pela enxurrada ou nas águas subterrâneas, através da infiltração, tornando-se prejudicial à saúde dos seres humanos, causando diversas alterações no funcionamento do organismo. Em países como EUA, já foi observado elevadas concentrações de atrazina (330 µg/L) em águas superficiais de áreas agrícolas e urbanas (BONANSEA et al., 2013; DELWICHE, 2014; LIU; FU; JIN, 2017).

A meia vida (tempo de dissipar a metade da quantidade inicial) da atrazina na literatura é bastante variável, pois depende das características do ambiente. Mas devido as suas características pode variar de vinte a mais de cem dias, tornando assim um poluidor potencial (EISLER, 1989; CONSOLIN FILHO, 2002; LOURENCETTI et al., 2005).

A baixa solubilidade da atrazina em água (33 mg/L) é justificada pela baixa polaridade medida pelo log Kow (2,61), que em uma partição do produto entre dois solventes existirá quase mil vezes mais atrazina solúvel em octanol (relativamente menos polar) do que em água (polar). Também possui volatilidade baixa, alto potencial de escoamento, hidrólise lenta, baixa pressão de vapor (EISLER, 1989; VASCONCELOS, 2007).

A Tabela 1 mostra as propriedades físicas e químicas da atrazina, tornando possível uma maior compreensão de seu elevado potencial poluidor.

Tabela 1 - Propriedades físicas e químicas da atrazina

<b>Propriedade</b>	<b>Informação</b>	<b>Referências</b>
Peso molecular	215,69 g mol <sup>-1</sup>	Javaroni; Landgraf; Rezende (1999).
Densidade	1,187 g/cm <sup>3</sup> a 20 °C	Tomlin (1994).
Volatilidade (pressão de vapor)	0,04 mPa a 20 °C	Tomlin (1994).
Solubilidade em água	33 mg/L	Javaroni; Landgraf; Rezende (1999).
Ponto de fusão	173 °C	Lide (1997).
Coeficiente de partição octanol-água (log Kow)	2,61	Hansch; Leo; Hoekman (1995).

Fonte: O autor

Devido à preocupação cada vez maior da população em relação aos agrotóxicos, foram definidos níveis máximos permitidos dessas substâncias em água potável (MALEKI et al., 2007). Segundo a Resolução n° 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (BRASIL, 2005) e as Portarias n° 1469, de 29 de dezembro de 2000 e n° 2914, de 12 de dezembro de 2011, ambas do Ministério da Saúde (BRASIL, 2000; BRASIL, 2011), trazem como limite máximo permitido para atrazina em águas doces de 2,0 µg/L. Desta forma, é muito importante encontrar métodos eficientes para detecção dessa substância em baixas concentrações.

Técnicas analíticas convencionais utilizadas para a detecção de agroquímicos, mais especificamente atrazina em amostras naturais, envolvem técnicas como a cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massa e teste ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (LOOS; NIESSNER, 1999; BARCHANSKA et al., 2012; KUKLENYIK et al., 2012; LEITE et al., 2015; LIU et al., 2015). No entanto, métodos de detecção mais baratos, precisos, de fácil utilização, possibilidade de portabilidade e miniaturização para a identificação de resíduos de pesticidas em amostras ambientais vem sendo estudados em nanoescala.

### 3.2 Nanotecnologia

Nanotecnologia é definida como “a tecnologia que permite compreender, medir, manipular e produzir a nível atômico, molecular e supramolecular visando à criação de materiais, dispositivos e sistemas com nova organização molecular, propriedades e funções” (CARNIEL, 2013).

Pode-se definir um nanômetro (nm) como a bilionésima parte de um metro, e como exemplo temos: um vírus (100 nm), uma proteína (pode variar de 5-50 nm), o DNA (Ácido Desoxirribonucléico) (2nm) e um átomo (0,1 nm) (ABDI, 2010; RODRIGUES, 2015). Segundo a ABDI (2010), o Brasil pode ocupar uma posição competitiva em médio prazo em nanobiotecnologia, com investimentos principalmente em imageamento molecular e materiais nanoestruturados biocompatíveis.

Para a confecção de sensores a nanotecnologia é utilizada, manipulando átomos e moléculas através de nanomateriais, ou seja, materiais que possuem dimensões entre 1 e 100 nm e que possuem características diferenciadas (propriedades físicas e eletrônicas) das em maior escala (ZHAO; JIANG, 2010; DURÁN; MARCATO, 2013), além de apresentarem elevadas proporções de área superficial, que especificamente possibilita a deposição de enzimas que podem ser usadas como transdutores em biossensores, tendo excelentes propriedades ópticas ou elétricas (MALIK et al., 2013).

Na agricultura, a aplicação da nanotecnologia é considerada como o próximo passo natural na ciência, já que esta é uma área multidisciplinar, integrando a engenharia com a biologia, química e física. Neste sentido, a nanotecnologia tem o potencial de aprimorar a indústria agrícola e de alimentos com novas ferramentas para o tratamento e detecção molecular de doenças e pragas (BUENO, 2013).

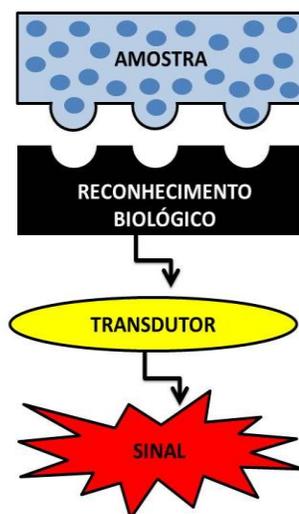
Segundo estudos, a nanotecnologia foi utilizada para identificação de resíduos de pesticidas em amostras ambientais, para otimizar e minimizar custos. Esses métodos utilizam sensores e, quando estes se encontram em escala nanométrica, são chamados de nanobiossensores (LIU et al., 2011; SILVA et al., 2013; WANG et al., 2014; GUPTA et al., 2015; LEITE et al., 2015).

### 3.2.1 Biossensores e nanobiossensores

De acordo com as divisões da Química Analítica e Físico-Química da IUPAC, um biossensor é o dispositivo capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa usando um elemento de reconhecimento biológico o qual está em contato direto com elemento de transdução (THÉVENOT et al., 1996; THÉVENOT et al., 2001). Quando a sensibilidade e a seletividade do biossensor são investigadas na escala nano (compreendidos na escala de 1-100 nm), estes dispositivos recebem o nome de nanobiossensores (SANG et al., 2013; BUENO, 2013; MALIK et al., 2013).

Um biossensor consiste de três componentes básicos (Fig. 2): a) elemento de reconhecimento biológico, através do qual o biossensor reconhece seletivamente um ou vários analitos entre um grande número de outras substâncias; b) transdutor físico, que processa o sinal produzido pela interação entre o elemento de reconhecimento e o analito de interesse num sinal; c) sistema eletrônico de amplificação de sinal e gravação de dados (KOROTKAYA, 2014).

Figura 2 - Esquema de funcionamento de um biossensor



Fonte: O autor

Estes biossensores para a determinação de pesticidas vêm ganhando interesse devido à sua confiabilidade, resposta rápida e alta sensibilidade e seletividade (PICHETSURNTHORN et al., 2012).

### 3.2.2 Biossensores enzimáticos

Enzimas são estruturas orgânicas, mais precisamente proteínas, que agem como catalisadores de reações em processos biológicos. São capazes de aumentar a velocidade da reação, diminuindo a energia de ativação, isto é, diminuindo o tempo total da reação. Em uma reação que utiliza uma enzima, a mesma se liga ao seu substrato, substância necessária para a formação de produto final, formando assim o complexo enzima-substrato. O substrato liga-se de forma covalente na enzima através de seus sítios ativos, e isto ocorre devido à alta especificidade entre ambos. O substrato é consumido para a formação do produto final (LEHNINGER et al., 1995; FOSCHINI, 2009).

Os biossensores baseados em enzimas estão em contato com os transdutores (equipamento que converte o produto da reação biológica em um sinal elétrico quantificável e processável), onde muitas pesquisas centraram-se no desenvolvimento destes para a detecção dos seus substratos. A detecção de compostos com biossensores baseados na inibição enzimática é recente e vem tendo um crescente avanço. Estes biossensores são ferramentas confiáveis para a detecção de uma grande quantidade de compostos tóxicos (WANG; LU; CHEN, 2014; AMINE et al., 2015).

Um inibidor enzimático refere-se a uma substância que é capaz de interferir na taxa de uma catálise enzimática, retardando ou reduzindo o processo, ou a especificidade biológica da reação. Vários pesticidas inibem a atividade de enzimas específicas, podendo interferir nos processos normais no núcleo da célula e competir com substratos por sítios ativos (LEHNINGER et al., 1995; MARQUES; YAMANAKA, 2008).

Os processos de inibição enzimática ocorrem de diferentes formas, como a inibição reversível competitiva, não competitiva e incompetitiva, além da inibição irreversível. A inibição reversível competitiva é aquela que o inibidor concorre com o substrato pelo sítio ativo da enzima, enquanto que a não competitiva ocorre quando o inibidor se liga em sítio ativo diferente daquele que se liga o substrato, podendo se ligar tanto na enzima livre como no complexo enzima-substrato. Já a inibição reversível incompetitiva também se liga em sítio ativo diferente daquele que se liga o substrato, porém o inibidor se ligará apenas no complexo enzima-substrato. A inibição irreversível ocorre quando o inibidor se combina com o grupo funcional da enzima,

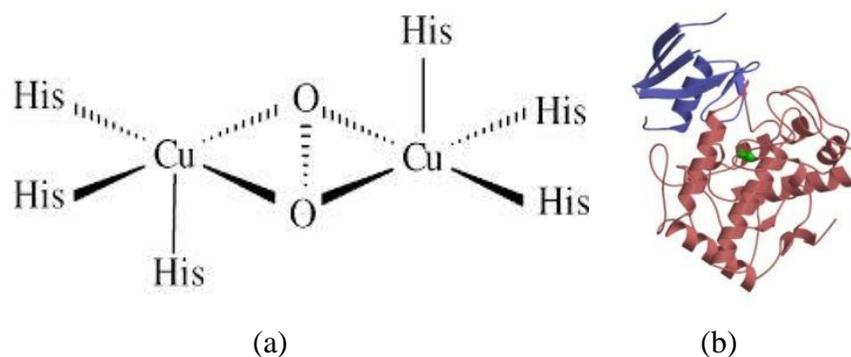
podendo promover a destruição de tal grupo, ocorrendo a inativação definitiva da enzima (LEHNINGER et al., 1995).

### 3.2.3 Tirosinase

A tirosinase (EC 1.14.18.1), também conhecida como polifenol oxidase, é uma metaloproteína binuclear, que possui dois átomos de Cu (II), como sítios ativos, cada um coordenado a três moléculas de histidinas, sendo duas ligações equatoriais fortes e uma axial mais fraca (FERREIRA, 2005), conforme demonstrado na Figura 3.

A tirosinase é encontrada em maior quantidade em cogumelos, mas também nos tecidos de banana, batata, inhame, maçã, pêra, abacate, berinjela, entre outros, sendo a responsável pelo aparecimento da pigmentação escura em vegetais e frutos e também envolvida na síntese da melanina (VIEIRA; FATIBELLO-FILHO, 1998; FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002; LUPETTI; RAMOS; FATIBELLO-FILHO, 2003; PERONE et al., 2005; MATUSCHEK; SVANBERG, 2005; POLESEL; SINHORINI; PERONE, 2010). Na forma comercial (obtida de cogumelo *Agaricus bisporus*) possui ponto isoelétrico entre 4,7 e 5,0 e um pH ótimo de atividade entre 6,0 e 7,0 (ROBB; GUTTERIDGE, 1981).

Figura 3 - Estrutura da enzima tirosinase (a); Representação esquemática da enzima tirosinase com seus dois átomos de Cu (II), como sítios ativos em verde (b)

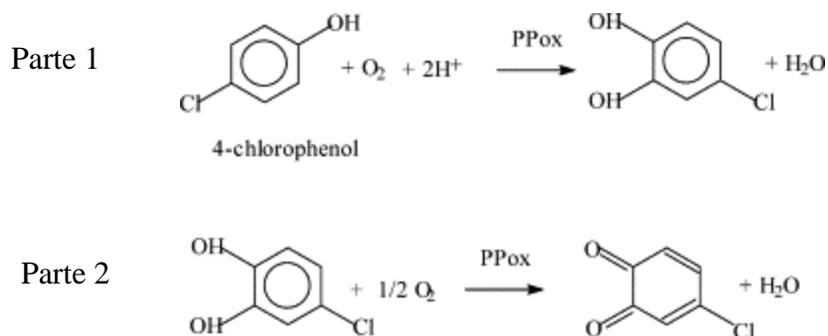


Fonte: Adaptado de FERREIRA (2005); (GASPAR, 2010)

Conforme Figura 4, na presença de oxigênio molecular, a enzima tirosinase, catalisa duas reações diferentes: a transformação de *o*-mono-fenóis em catecóis (parte 1, atividade cresolase) e

a oxidação do catecol para *o*-quinona (parte 2, atividade catecolase) (ANH et al., 2004; VIDAL et., 2006; MARQUES; YAMANAKA, 2008; FOSCHINI, 2009).

Figura 4 - Esquema das reações catalisadas pela tirosinase



Fonte: Adaptado de ANH et al., (2004)

A tirosinase pode ser inibida por muitos poluentes, tais como carbamatos, organofosforados, atrazinas, ácidos carboxílicos aromáticos, clorofenóis e agentes quelantes de cobre. Desta forma, biossensores baseados em enzimas tirosinases podem ser empregados com biossensores baseados em inibição enzimática, detectando tanto o decréscimo da quantidade de oxigênio no meio reacional, quanto a formação da quinona, em presença do agente inibidor (HIPOLITO-MORENO et al., 1998; YU et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2015; TORTOLINI et al.; 2016).

De acordo com Marques e Yamanaka (2008), a forma de como a enzima tirosinase é inibida baseia-se no bloqueio dos sítios ativos, formando o complexo enzima-inibidor, que bloqueia a transferência eletrônica entre a enzima e o substrato.

O sucesso do desempenho de um biossensor enzimático depende do adequado método de imobilização da enzima no dispositivo, pois irá definir a estabilidade, sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade do mesmo. A imobilização deve garantir o acesso da enzima ao analito, além da proximidade com o transdutor (LAGARDE; JAFFREZIC-RENAULT, 2011; ZHAO; JIANG, 2010; OLIVEIRA et al., 2013).

Geralmente são quatro os tipos de imobilização utilizados: a adsorção, o encapsulamento ou aprisionamento; a ligação covalente e a ligação covalente cruzada ou reticulação. A adsorção é uma forma simples, rápida e baseada em interações de baixa energia entre os grupos funcionais

do bioreceptor e do substrato, podendo ser adsorção física (fraca, através de Van der Waals) ou química (forte, ocorrendo a formação de ligações covalentes). O encapsulamento ou aprisionamento se refere à retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa. A ligação covalente imobiliza o grupo funcional da enzima à matriz do suporte, sendo que a ligação covalente cruzada ou reticulação forma um sistema reticulado das moléculas da enzima, formando uma rede rígida (BASED et al., 2008; LAGARDE; JAFFREZIC-RENAULT, 2011; ZHAO; JIANG, 2010; SYHG-YING et al., 2000; PANESAR et al., 2010; MENDES et al., 2011).

Em 1995, Besombes et al., utilizaram a tirosinase para detectar atrazina em água por meio de um biossensor amperométrico, onde a determinação do poluente se deu a partir do efeito inibidor sobre a atividade da enzima. A tirosinase foi dissolvida em uma dispersão aquosa de 1,30  $\mu\text{L}$  de mistura contendo 0,06 mg de enzima e 18 nmol do monômero de pirrol. A mistura foi espalhada num eletrodo de carbono vítreo (diâmetro 5 mm) e a água foi removida sob vácuo. A polimerização da película de l-enzima monômero adsorvida foi realizada por meio de potencial de eletrólise durante 30 min a + 0,75 V. O limite de detecção encontrado para o dispositivo na detecção de atrazina foi de 4  $\mu\text{M}$ .

Um biossensor amperométrico baseado em tirosinase retida em um polímero condutor para a determinação de atrazina foi desenvolvido por Védrine; Fabiano; Tran-Minh (2003). A enzima foi retida no polímero condutor poli 3,4-etilenodioxítiofeno (PEDT), eletroquimicamente gerado em um eletrodo de carbono vítreo. Eletrodos de discos de carbono vítreo foram utilizados para o processo de imobilização, onde uma solução contendo a enzima tirosinase foi depositada sobre o mesmo. O limite de detecção encontrado foi de 1 mg/L, onde a atrazina atuou como um inibidor competitivo sobre o sítio ativo da enzima, e os resultados demonstraram que a película de PEDT é um método promissor de imobilização de tirosinase.

No trabalho de Anh et al. (2004) a atividade da tirosinase na presença de atrazina foi investigada através de um biossensor condutométrico. A tirosinase foi imobilizada sobre a parte sensível do biossensor, por reticulação da mesma com albumina de soro bovino e vapor saturado de glutaraldeído. Os resultados mostraram que a atividade da tirosinase foi inibida com um limite de detecção de 1 ppb, na faixa de cerca de 2,15 - 2150 ppb.

Kim et al. (2008) desenvolveram um biossensor baseado em tirosinase com eletrodo revestido com nanopartículas de ouro caracterizado por medições de voltametria cíclica para

detecção de atrazina. A enzima foi imobilizada no eletrodo sobre uma camada de SAM por ligação covalente com o uso de EDC/NHS. Os resultados se deram a partir da inibição enzimática decorrente da presença do pesticida em amostras de água, onde o limite de detecção foi de 0,35 pg/mL e detecção na faixa de 0,001 – 0,5 ng/mL.

Em 2016, Tortolini et al., utilizaram biossensor amperométrico baseado em tirosinase para determinação de atrazina em águas. A enzima foi imobilizada em eletrodos serigrafados de carbonos por diferentes métodos. Devido à inibição da atividade da enzima, em presença do substrato catecol, os autores concluíram que, com uma incubação de 20 minutos, o dispositivo mostrou um limite mínimo de detecção igual a 0,03 ppm.

Utilizando estes dispositivos sensores na nanoescala (1 – 100 nm), a sensibilidade e o desempenho aumentam devido à miniaturização quando comparados a uma escala maior. Isso porque a área de superfície específica aumenta com a redução do tamanho, aumentando o número de locais disponíveis para as interações moleculares, tornando-se assim promissores na detecção de poluentes (WANG, 2005).

### **3.3 Nanobiossensores de cantileveres**

Por meio da microscopia de força atômica – AFM (do inglês *Atomic Force Microscope*) uma nova ferramenta de detecção de diversos analitos, através da funcionalização da haste ou da ponta do cantilever vem ganhando destaque (SHENGBO SANG, 2013). Sensores de cantilever são capazes de medir interações biomoleculares, em nível molecular, além de resposta em tempo real, reconhecimento específico, alta sensibilidade, com vantagem de miniaturização (CARRASCOSA et al., 2006; JOHNSON; MUTHARASAN, 2012).

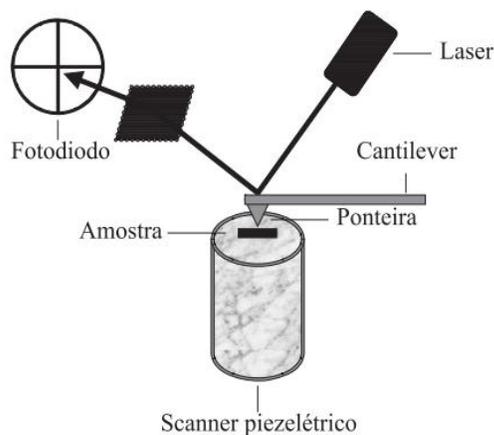
O cantilever consiste de uma haste móvel em que uma de suas extremidades é fixa a um suporte, podendo ter forma em “V” (triangular) ou em “T” (retangular) com uma ponta integrada na extremidade livre (RAITERI et al., 2001; CARRASCOSA et al., 2006; LANG et al., 2010). Podem ser fabricados de silício e outros materiais, mas os cantileveres de silício são comumente os mais usados em biossensores (THUNDAT; ODEN; WARMACK, 1997).

Seu funcionamento baseia-se na adsorção de analitos sobre uma superfície sensível que ocasionará uma mudança na frequência vibracional ou uma deflexão do mesmo. O AFM pode ser utilizado para varredura de superfícies e também medir forças entre o cantilever (constante de

mola) e a amostra a ser analisada. Para isso, a sensibilidade dos nanossensores irá depender da interação da camada ativa com o elemento a ser analisado (LANG; GERBER, 2007; STEFFENS et al., 2014). O funcionamento do AFM (Fig. 5) baseia-se em uma fonte de laser que incide sobre o cantilever, que possui uma camada refletora. O laser refletido é detectado por um fotodetector (fotodiodo) que indica sua posição (SILVA, 2012).

Com AFM pode-se analisar superfícies suficientemente rígidas em diferentes condições, em ar ou em meio líquido, podendo analisar amostras diretamente no seu ambiente natural, em diferentes temperaturas, obtendo-se uma resolução nanométrica lateral e uma resolução vertical à escala de angstroms, (GADEGAARD, 2006; TAMAYO et al., 2013; VAHABI; SALMAN; JAVANMARD, 2013). O campo de imagem pode variar desde a escala atômica e molecular até dimensões superiores a 100  $\mu\text{m}$  e podem ser analisadas superfícies com diferentes índices de rugosidade, uma vez que a gama de análise vertical pode ir até cerca 8-10  $\mu\text{m}$  (GADEGAARD, 2006). Um fator importante no funcionamento do AFM é o local onde o equipamento se encontra. Por ser muito sensível, este deve ficar sobre uma plataforma sem vibrações, pois uma pequena perturbação pode afetar seu funcionamento (SILVA, 2012).

Figura 5 - Esquema do funcionamento do AFM



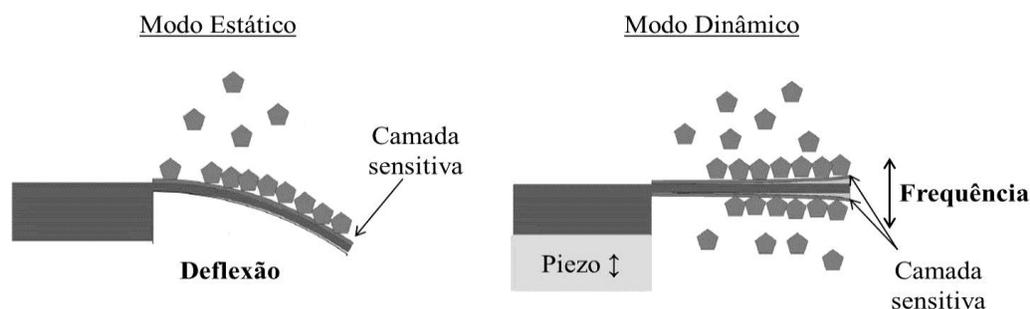
Fonte: FERREIRA; YAMANAKA, (2006)

Os nanobiosensores de AFM apresentam como principal vantagem maiores limites de detecção a nível molecular. Este sistema pode detectar interações na ordem de piconewtons (pN) (GRUBER et al., 2011). As interações entre moléculas e a superfície do cantilever, alteram as tensões de superfície sobre o braço de suporte. Diversas são as transduções provocadas por um

cantilever, entre elas as alterações de massa, temperatura, calor ou deflexão (modo estático) ou uma mudança de frequência de ressonância (modo dinâmico) (TANG et al., 2004; RAITERI et al., 2005).

No caso dos nanobiossensores de cantileveres, o princípio de funcionamento baseia-se na adsorção de analitos sobre a superfície funcionalizada, podendo ocorrer uma deflexão ou uma mudança da frequência de ressonância. No AFM podem ser utilizados alguns modos de operação, dentre eles encontram-se o modo estático e o modo dinâmico. No modo estático, apenas um lado da superfície do cantilever é funcionalizado, ocorrendo uma interação molecular (reconhecimento do analito) causando uma alteração na tensão, ocorrendo a deflexão. Já o modo dinâmico depende de alterações de frequência de ressonância causadas por adsorção de massa ou rigidez do cantilever (constante de mola). A frequência de ressonância diminui conforme aumenta a massa do cantilever (Fig. 6) (WANG et al., 2007; JOHNSON; MUTHARASAN, 2012; TAMAYO et al., 2013; SANG et al., 2014).

Figura 6 - Modos de operação de sensores de cantilever: modo estático e modo dinâmico



Fonte: Adaptado de HEGNER; ARNTZ (2004)

Para cada tipo de modo de operação é necessário um cantilever com características diferentes visando uma alta sensibilidade. Para que sejam alcançadas grandes deflexões no modo estático, o cantilever deve possuir uma haste longa e uma constante de mola baixa. Para que elevadas frequências de ressonância sejam alcançadas no modo dinâmico utiliza-se um cantilever com haste curta e constante de mola grande (MANZOLI et al., 2010).

A constante de mola representa uma medida da rigidez do mesmo, sendo determinada pelas suas propriedades geométricas (comprimento, largura e espessura) além do material do cantilever. Já a frequência de ressonância é o resultado do movimento vibratório do cantilever,

estando relacionada com a constante de mola, geometria e com a variação da massa adsorvida sobre o cantilever (WANG et al., 2007; LANG, HEGNER; GERBER, 2010).

A sensibilidade de medição, o ruído e a resolução não dependem apenas das propriedades do cantilever, pois estes parâmetros são fortemente influenciados pelo desempenho do sistema de instrumentação e das condições do ambiente externo, e por serem frágeis, devem ser operados cuidadosamente (TAMAYO et al., 2013; BAUSSELS, 2015).

### 3.3.1 Funcionalização da superfície de nanobiossensores

Os cantileveres de AFM podem ser funcionalizados ou imobilizados quimicamente, promovendo uma ligação covalente para imobilizar a enzima na superfície. Na maioria das vezes, as interações específicas entre o sistema e a amostra são reversíveis, permitindo seu monitoramento (ETCHEGARAY et al., 2010).

A técnica de camadas automontadas - SAM (do inglês *Self-Assembled Monolayers*) é constituída por camadas moleculares formadas tipicamente a partir da exposição de uma superfície a moléculas com grupos funcionais que possuem afinidade por um determinado substrato usado como suporte, como por exemplo, o ouro. A formação de SAM permite interações entre moléculas e superfícies, modificando suas propriedades físicas e químicas (MOCELLINI, 2011). No caso das enzimas, a imobilização por SAM pode ser vantajosa, uma vez que poderá ocorrer transferência direta de elétrons, para a qual a orientação, distribuição, e proximidade da biomolécula da superfície do eletrodo são parâmetros de grande importância (CABRITA; ABRANTES; VIANA, 2005).

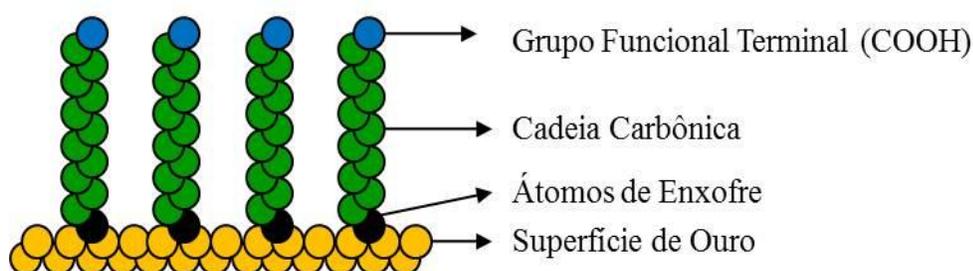
Segundo Galli (2009), a formação de SAM de tióis sobre superfície metálica constitui um método bastante interessante de obtenção de uma superfície com alto grau de ordenação controlada quimicamente. Os tióis apresentam uma forte afinidade com os metais de transição, provavelmente devido à possibilidade desses compostos formarem múltiplas ligações com a superfície metálica (LEE et al., 1991).

Algumas vantagens são apresentadas na utilização de camadas automontadas para imobilização de biomoléculas, como a facilidade de serem formadas e de formar estruturas ordenadas; apresentarem estabilidade razoável por um período longo de tempo; necessária uma

pequena quantidade de biomolécula para a imobilização na monocamada, diminuindo custos com reagentes (CHAKI; VIJAYAMOHANAN, 2002).

Segundo Carrascosa et al. (2006), normalmente o cantilever possui a superfície revestida com uma camada fina de ouro (20-100 nm) o que proporciona uma ótima oportunidade de utilizar a técnica de SAM. Os tióis são conhecidos por interagir fortemente com superfícies de ouro para formar monocamadas estáveis e automontadas (BAIN; EVALL; WHITESIDES, 1989). Na Figura 7 é possível observar um esquema da monocamada sobre a superfície de ouro. A automontagem da monocamada tiol em ouro é promovida pela forte interação química existente com o ouro e o enxofre (presente no tiol) situado na extremidade da cadeia (ALMEIDA, 2010).

Figura 7 - Monocamadas automontadas sobre a superfície de ouro



Fonte: O autor

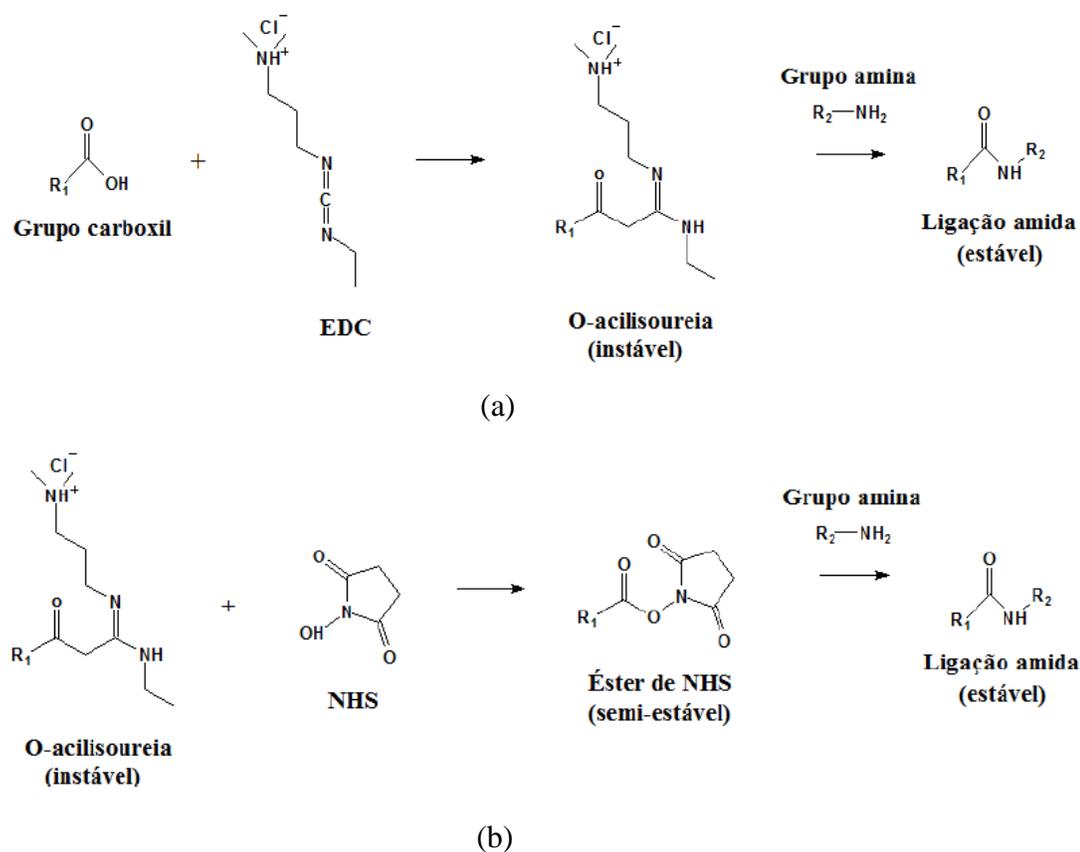
A utilização de agentes reticulantes (como EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida e NHS - *N*-hidroxi-succinimida), para a construção de biossensores é muito comum de acordo com a literatura (BRAZACA, 2015). Após a ligação covalente do tiol no ouro, há um grupo carboxílico disponível para a próxima etapa da técnica de SAM. O grupo carboxílico presente no tiol poderá reagir com o EDC, formando o grupo intermediário O-acilisourea, o qual é instável e reativo. A partir desse ponto, a reação poderá ocorrer de três maneiras:

- 1) Tendo disponível uma amina primária, ocorrerá uma ligação amida com o grupo carboxílico original, e um produto secundário do EDC é liberado.
- 2) O intermediário do EDC reage com o NHS presente, se ligando através do grupo carboxílico original. Neste caso um grupo reativo a amina que é mais estável que o O-acilisourea se forma.

3) Caso o intermediário não reaja quase imediatamente, este irá sofrer hidrólise, e o grupo carboxílico original se restaura.

Na utilização de EDC e NHS combinados o caminho de reação 2 é o favorecido. Posteriormente, aminas primárias do componente a ser imobilizado removem o NHS, liberando-o em solução, e se ligam ao ácido carboxílico original (JANEGITZ et al., 2011; BRAZACA, 2015; PEPINO, 2016). Um esquema desta reação pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema de reticulação mediada por EDC (a) e EDC/NHS (b)



Fonte: PEPINO (2016)

Na literatura poucos trabalhos são encontrados no desenvolvimento de nanobiossensores para detecção de atrazina através da técnica de SAM, porém outros trabalhos para a detecção de atrazina são encontrados, tal como o de Hleli et al. (2006), que desenvolveram um imunossensor eletroquímico na análise de atrazina, utilizando monocamada automontada (SAM) composta de

AMHD, anticorpo K47 e biotina, utilizando uma superfície de ouro em silício. Os resultados mostraram que o imunossensor apresentou elevada sensibilidade ao antígeno atrazina.

Em 2013, Deda et al., desenvolveram um nanobiossensor de ponta de AFM, funcionalizando 30  $\mu$ L da solução de anticorpo anti-atrazina e glutaraldeído para a detecção de atrazina. Foi comparada a curva de força entre as pontas não funcionalizada e funcionalizada com anticorpo e, a diferença da força de adesão foi de 16 e 44 pN, respectivamente, gerando um aumento de 175% de força de adesão, permitindo a detecção de atrazina em escala molecular.

Leite et al. (2015), estudaram a interação entre o herbicida atrazina e seu anticorpo específico (anti-atrazina) com a finalidade de desenvolver um nanobiossensor de AFM. Os resultados mostraram fortes evidências de que um nanobiossensor de AFM pode ser capaz de detectar atrazina em pequenas quantidades de forma precisa, pois o valor de interação apresentou força de adesão de  $172 \pm 26$  nN, muito maior quando comparado com outros herbicidas não-específicos.

### **3.4 Considerações finais**

A grande utilização de agrotóxicos torna-se um fator preocupante para a população, principalmente devido à capacidade de alguns permanecerem no sistema ecológico. Assim, a utilização da nanotecnologia vem ganhando espaço em diversas áreas, inclusive na área ambiental e na agricultura, podendo trazer avanços tecnológicos e econômicos, contribuindo no desenvolvimento do país.

Os nanobiossensores de cantileveres, desenvolvidos e funcionalizados em nanoescala, por meio do microscópio de força atômica – AFM, são alternativas viáveis e promissoras para tal, sendo altamente sensíveis e seletivos para a detecção do herbicida atrazina em águas em baixas concentrações, além de otimizar e minimizar custos.

Até o momento nenhum trabalho descrevendo o desenvolvimento de nanobiossensor de cantilever para detecção de atrazina através de um extrato bruto vegetal de enzima tirosinase, utilizando o modo de operação de deflexão ou frequência de ressonância foi encontrado na literatura, tornando assim este trabalho pioneiro. Esta revisão da literatura é essencial para entendimento e funcionamento do nanobiossensor desenvolvido neste trabalho e as etapas seguintes foram realizadas de acordo com os conceitos e técnicas aqui mencionadas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

Todo material utilizado (balões volumétricos, espátulas, béqueres, placas de petri, etc) foi submetido a um procedimento de limpeza com solução de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) (65%) com posterior lavagem com água destilada (OS10LXE - Gehaka), água deionizada (Permuton) e água milli-Q (Millipore) para assegurar a ausência de quaisquer resíduos orgânicos que pudessem interferir nas análises. Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de pureza analítica (PA) e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Reagentes utilizados

Nome	Procedência
HNO <sub>3</sub> (65%)	Química Moderna
Fosfato de sódio monobásico monohidratado	Synth
Fosfato de sódio dibásico anidro	Vetec
Polivinilpirrolidona (PVP)	Fluka Chemica
Catecol	Fluka Chemica
Álcool absoluto (99,5%)	Quimex
Álcool isopropílico	Vetec
Ácido 16-mercaptohexadecanóico (90%) – AMHD	Sigma Aldrich
N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC)	Sigma-Aldrich
N-hidroxisuccinimida (NHS)	Sigma-Aldrich
Atrazina (99,5%)	Dr. Ehrenstorfer GmbH

Fonte: O autor

### 4.2 Métodos

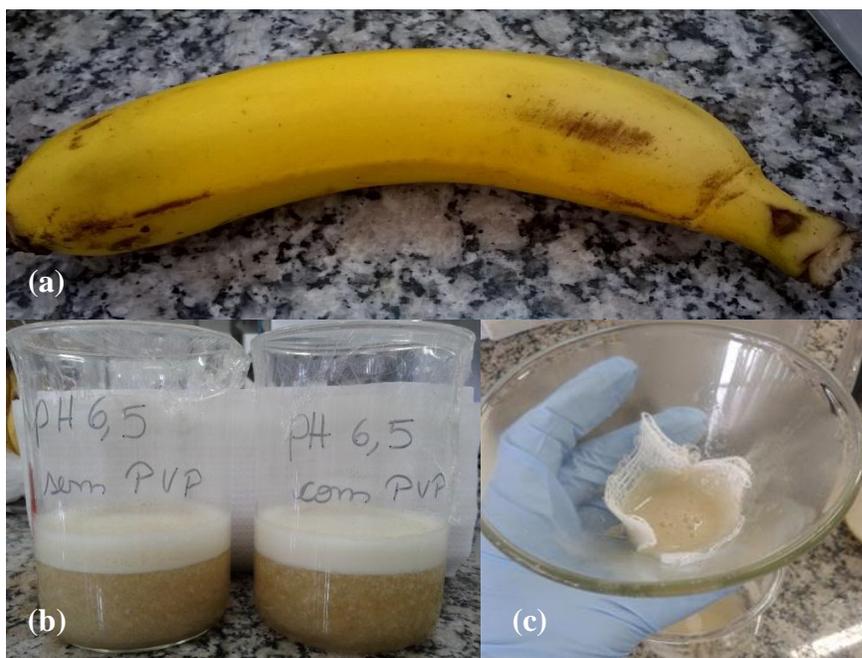
#### 4.2.1 Extração Enzimática

A tirosinase pode ser encontrada em diversos tecidos vegetais, especialmente em frutas (VIEIRA; FATIBELLO-FILHO, 1998; FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002; LUPETTI; RAMOS; FATIBELLO-FILHO, 2003; PERONE et al., 2005; MATUSCHEK; SVANBERG, 2005; POLESEL; SINHORINI; PERONE, 2010). A banana nanica (*Musa acuminata*) foi escolhida para extração de tirosinase por possuir grandes quantidades desta enzima, apresentar alta atividade enzimática e por possuir baixo custo (PERONE et al., 2005).

A extração enzimática de tirosinase da banana nanica (*Musa acuminata*) foi realizada segundo o método descrito por Perone et al. (2005) com modificações, onde foi utilizado solução tampão de fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 6,5 por ser considerado pH ótimo para esta enzima. A extração foi realizada na presença e ausência de agente protetor polivinilpirrolidona (PVP) para avaliar o comportamento da atividade enzimática.

A banana nanica (*Musa acuminata*) madura foi adquirida em um supermercado local e armazenada em temperatura ambiente até o momento da extração (Fig. 9 (a)). A fruta foi descascada e picada em pequenos pedaços. Em seguida 50 g foram homogeneizadas, em potência alta, em um liquidificador com 100 mL de tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 6,5 por 2 min. Após, permaneceu em tempo de contato por 30 min (Fig. 9 (b)).

Figura 9 - Algumas etapas da extração do extrato bruto de tirosinase: (a) Banana nanica (*Musa acuminata*) madura; (b) Tempo de contato dos extratos em pH 6,5 com e sem PVP; (c) Filtração dos extratos brutos de tirosinase



Fonte: O autor

Para avaliar a estabilidade da enzima foram realizados dois ensaios com a presença ou ausência do agente protetor polivinilpirrolidona (PVP), do tipo K-90. O polímero foi usado para remoção de compostos fenólicos naturais presentes nesse extrato, durante o processo. Para o

ensaio na presença de PVP utilizou-se 5 g de polivinilpirrolidona (PVP), diluído na quantidade de tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 6,5 mencionado acima (100 mL). Em seguida, os dois extratos brutos obtidos (com e sem PVP) foram filtrados 3 vezes, com gaze (Fig. 9 (c)), e centrifugados (Centrifuge MPW – 351R) a 10000 r.p.m., durante 28 min, a  $5^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi armazenado em *ependorfs*, envoltos por papel alumínio, em refrigerador a  $4^{\circ}\text{C}$ , e utilizados como fonte enzimática de tirosinase.

#### 4.2.1.1 Medida de Atividade Enzimática

A atividade enzimática da tirosinase foi determinada por meio da técnica de espectrofotometria no UV/Vis (Biosystems), de acordo com Perone et al. (2005). A absorbância das soluções foi medida em  $\lambda = 410 \text{ nm}$ , imediatamente após a mistura dos reagentes em uma cubeta de quartzo (2,8 mL de solução de catecol 0,05 M em tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 6,5 e 0,2 mL de extrato enzimático) a  $20^{\circ}\text{C}$ . Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto, nas condições mencionadas, sendo calculada pela Equação 1.

$$\textit{Atividade enzimática (U/mL)} = (\Delta \textit{ Absorbância} \times 1000 \times D / (\Delta t \times V)) \quad (1)$$

onde:  $\Delta$ Absorbância: variação de absorbância final e inicial; D: diluição da solução enzimática;  $\Delta t$ : variação do tempo reacional (final e inicial), em min; V: volume do extrato enzimático utilizado no ensaio, em mL.

A medida de atividade enzimática de tirosinase foi monitorada durante 2 minutos de acordo com Perone et al. (2005), sendo observada uma diminuição na absorbância após 1 minuto. Desta forma, o extrato enzimático foi diluído em tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 6,5, em uma concentração de 1:5, v/v (1 mL de extrato enzimático para 4 mL de solução tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , totalizando 5 mL de solução), para verificar possíveis diferenças na atividade enzimática.

#### 4.2.1.2 Medida da Estabilidade Enzimática

A estabilidade dos extratos enzimáticos foi avaliada durante 30 dias, sendo medidas no dia da extração (primeiro dia) quinto, décimo, vigésimo e trigésimo dias. Neste período estudado o extrato enzimático permaneceu armazenado em refrigerador a 4°C.

Para verificação da estabilidade, a atividade enzimática foi monitorada periodicamente e as atividades residuais foram determinadas por meio da Equação 2. No primeiro dia a atividade enzimática foi considerada 100%.

$$\text{Atividade residual (\%)} = (A_{\text{final}} / A_{\text{inicial}}) \times 100 \quad (2)$$

onde:  $A_{\text{inicial}}$  e  $A_{\text{final}}$  são as atividades no dia inicial e no dia definido para monitoramento, respectivamente.

#### 4.2.1.3 Potencial Zeta

O potencial zeta é uma técnica empregada para quantificar a carga elétrica em volta das partículas de um coloide. Os valores de potencial zeta podem ser positivos ou negativos e dependem da natureza da partícula. Partículas que apresentam valores maiores de potencial zeta apresentam uma camada maior de íons em sua superfície e vice-versa (VALENCIA, 2013). Esta análise é utilizada como parâmetro na determinação da carga eletrostática aproximada presente na superfície das partículas em suspensão, que por sua vez é útil na determinação do nível de interações repulsivas entre as partículas (FRANCO, 2009).

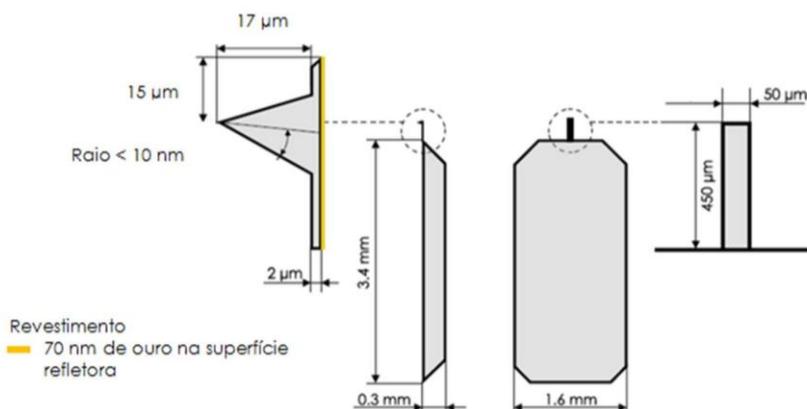
As análises do extrato bruto de tirosinase foram feitas em um aparelho zeta (Zetasizer Nano ZS), à temperatura ambiente e utilizando alíquotas de 1 mL de extrato bruto com valores do pH do meio previamente ajustados entre 1,0 e 5,0 com solução de HCl 0,1M. Essas análises do potencial zeta foram realizadas na Embrapa Instrumentação em São Carlos/SP.

#### 4.2.2 Cantilevers

Os cantilevers utilizados para detecção de atrazina eram de silício, revestidos com uma camada de ouro em somente um dos lados, foram obtidos comercialmente da BudgetSensors®,

modelo ContGD-G, com frequência de ressonância de 13 kHz e constante de mola de 0,2 N/m . Possui comprimento de 3,4 mm e largura de 1,6 mm., com haste de 450  $\mu\text{m}$  e 50  $\mu\text{m}$  de comprimento e largura, respectivamente (Fig. 10). O material escolhido, silício, bem como suas características geométricas, resultam em uma baixa constante de mola ( $k$ ), que traduz a rigidez da haste, ou seja, representa uma medida de dureza, e quanto mais flexível for a mola, mais facilmente consegue sentir alterações de massa, resultando em maior sensibilidade do sensor que será desenvolvido (THUNDAT, 2008).

Figura 10 - Especificações do cantilever utilizado para funcionalização



Fonte: Adaptado de BUDGETSENSORS (2016)

Para operações em modo estático, apenas um lado do cantilever deve ser sensível a presença do analito de forma a produzir variação na deflexão (LANG; HEGNER; GERBER, 2010; MOCELLINI, 2011), justificando o tipo de cantilever escolhido neste trabalho bem como o modo de operação, pois o modo estático não apresenta limitações para operar em líquidos (CHAUDHARY; GUPTA, 2009).

Para atuar como sensor de cantilever deve possuir uma camada refletiva, e possuir características para se ligar ao material da camada sensível, dessa forma o ouro foi escolhido por ser um metal inerte e possuir forte interação com o enxofre (suficiente para formar ligações covalentes) (CHEN; LI, 2006; HAN; UOSAKI, 2008). A camada refletiva apresentava 70 nm conforme instruções do fabricante (BudgetSensors®).

De acordo com as definições de nanotecnologia apesar do cantilever não estar compreendido em uma escala nanométrica, pôde-se considerar este como um nanobiossensor

devido a camada de ouro estar na escala nanométrica, fazendo parte da camada sensora. Do mesmo modo a enzima encontra-se na escala de angstroms, considerado menor que o nanômetro.

#### 4.2.3 Funcionalização dos cantileveres pela técnica de camadas automontadas (SAM)

A funcionalização do cantilever foi realizada em seu modo ativo, que consiste na deposição da camada sensora no lado superior, onde se encontra depositado o ouro. Para isso, a técnica de SAM foi escolhida por permitir interações entre moléculas e superfícies, modificando suas propriedades físicas e químicas, aumentando a sensibilidade pelo analito (NAKAMURA; ARAKI; TOMA, 2010; MOCELLINI, 2011), além de apresentarem estabilidade razoável por um período longo de tempo (CHAKI; VIJAYAMOHANAN, 2002). Segundo Galli (2009), a formação de SAM de tióis sobre superfície metálica constitui um método de obtenção de uma superfície com alto grau de ordenação controlada quimicamente.

Foram testadas duas formas diferentes de SAM segundo Velanki e Ji (2006), com adaptações: SAM utilizando 0,1 M EDC/0,1 M NHS (1:1 v/v) e SAM utilizando 1 mM EDC/1 mM NHS (4:1 v/v). A funcionalização foi realizada em ambiente de laboratório com luz, climatizado a 20 °C.

##### a) SAM utilizando 0,1 M EDC/0,1 M NHS (1:1 v/v)

Esta funcionalização foi realizada em quatro etapas descritas a seguir:

- *Etapa 1:* lavagem do cantilever com álcool isopropílico por 2 min em placa de petri para eliminar quaisquer sujidades presentes. Secagem durante 45 min.
- *Etapa 2:* imersão em AMHD (2 mM), aproximadamente 2 mL, em contato *overnight* (16 h). Lavagem com água milli-Q por 2 min e secagem por 45 min.
- *Etapa 3:* adição da solução de 0,1 M EDC/0,1 M NHS (1:1 v/v). Esta solução foi preparada no momento da funcionalização, onde 150 µL de EDC e 150 µL de NHS foram misturados em uma placa de petri e o cantilever permaneceu em contato por 6 h, seguido de lavagem com água milli-Q por 2 min e secagem por 45 min.
- *Etapa 4:* adição da solução com extrato da enzima tirosinase em tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 6,5 (1:5 v/v), em um placa de petri. Foi adicionado 1,3 mL do extrato enzimático,

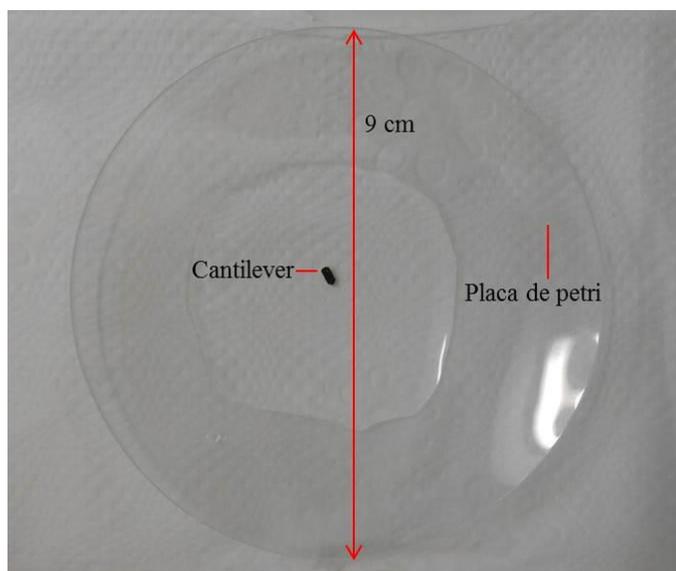
onde o cantilever permaneceu em contato *overnight* (16 h). Em seguida foi feita a lavagem do mesmo em tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 6,5 e secagem por aproximadamente 24 h. O nanobiossensor funcionalizado foi armazenamento à seco em placa de petri, sob refrigeração ( $4^\circ\text{C}$ ), para a realização das análises com a atrazina.

b) SAM utilizando  $1 \text{ mM EDC}/1 \text{ mM NHS}$  (4:1 v/v)

Esta funcionalização foi realizada em quatro etapas descritas a seguir:

- *Etapa 1*: lavagem do cantilever com álcool isopropílico por 2 min em placa de petri para eliminar quaisquer sujidades presentes. Secagem durante 15 min.
- *Etapa 2*: imersão em AMHD (2 mM), aproximadamente 2 mL, em contato *overnight* (16 h). Lavagem com água milli-Q por 2 min e secagem por 15 min.
- *Etapa 3*: adição da solução de  $1 \text{ mM EDC}/1 \text{ mM NHS}$  (4:1 v/v). Esta solução foi preparada no momento da funcionalização, onde  $200 \mu\text{L}$  de EDC e  $50 \mu\text{L}$  de NHS foram misturados em uma placa de petri e o cantilever permaneceu em contato por 10 min, seguido de lavagem com água milli-Q por 2 min e secagem por 15 min.
- *Etapa 4*: adição da solução com extrato da enzima tirosinase em tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 6,5 (1:5 v/v), em um placa de petri. Foi adicionado 1,3 mL do extrato enzimático, onde o cantilever permaneceu em contato por 10 min (Fig. 11). Em seguida foi feita a lavagem do mesmo em tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 6,5 e secagem por aproximadamente 24 h. O nanobiossensor funcionalizado foi armazenamento à seco em placa de petri, sob refrigeração ( $4^\circ\text{C}$ ), para a realização das análises com a atrazina.

Figura 11 - Etapa de funcionalização pela técnica de SAM utilizando 1 mM EDC/1 mM NHS (4:1 v/v), onde o cantilever permanece em contato com o extrato enzimático de tirosinase



Fonte: O autor

#### 4.2.4 Medida de deflexão do nanobiossensor de cantilever

Para as medidas de deflexão do nanobiossensor foi utilizado um AFM da Nanosurf (C3000 Controller) em modo contato, estático, em meio líquido, onde o laser refletido da superfície do cantilever atinge uma posição sensível do fotodetector, onde a distância percorrida é proporcional à deflexão da haste (HERRMANN et al., 2006). O cantilever foi inserido junto ao scanner do equipamento, onde o laser foi posicionado na extremidade final da haste do cantilever e na posição central do fotodetector, verificando sua intensidade. A deflexão do cantilever foi monitorada por 1,5 h por meio da criação de uma imagem com área de  $0 \mu\text{m}^2$  e velocidade de varredura de 1 s/linha, para posterior análise das diferenças de voltagem.

A deflexão foi medida em voltagem, com resolução em volts (V) proveniente do sinal do fotodetector. O perfil da curva de deflexão (V) x tempo (min) foi gerado com o software Gwyddion (Versão 2.47) e exportado para o software Excel (Versão 2010) para obtenção dos resultados.

#### 4.2.5 Avaliação da resposta do nanobiossensor de cantilever na detecção de atrazina em água

Para as análises do herbicida atrazina utilizou-se um padrão de atrazina de 99,5% de pureza da marca Dr. Ehrenstorfer GmbH. Em balança analítica (contendo 5 casas decimais após a vírgula) foi pesado 0,0015g de atrazina e preparada uma solução de 1500  $\mu\text{g/L}$ , diluindo a quantidade de herbicida em 1 L de água milli-Q. A partir desta, foi preparada a solução de 150  $\mu\text{g/L}$ , com 10 mL da solução anterior, diluída em 100 mL de água milli-Q. Assim, a partir da solução de 150  $\mu\text{g/L}$ , foram realizadas as diferentes diluições que foram testadas com o nanobiossensor: 0,75  $\mu\text{g/L}$ , 6,0  $\mu\text{g/L}$ , 22,0  $\mu\text{g/L}$  e 100  $\mu\text{g/L}$ .

A resposta do nanobiossensor foi avaliada com água milli-Q e com diferentes soluções de atrazina em ordem crescente de concentração (0,75  $\mu\text{g/L}$ , 6,0  $\mu\text{g/L}$  e 22  $\mu\text{g/L}$  e 100  $\mu\text{g/L}$ ). Cada amostra, 0,5 mL de cada solução, foi colocada sobre uma placa de aço inoxidável no AFM, formando uma gota onde permanecia em contato com o cantilever para as medidas de voltagem (Fig. 12).

Figura 12 - Solução de atrazina em contato com o cantilever no equipamento de microscopia de força atômica (AFM) para medida de voltagem



Fonte: O autor

As análises foram realizadas em temperatura constante de  $25,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5$  através de um sistema de resfriamento no AFM. O sistema de resfriamento do AFM foi montado tendo por base uma pastilha Peltier com dimensões de 50 x 53 mm. Este elemento, quando ligado a uma fonte de corrente contínua (CC) teve uma de suas faces resfriadas e a outra aquecida. Em ambas as faces

foram acoplados dissipadores de calor aletados. Para minimização de ruídos e interferências nas respostas, usou-se uma caixa de fibra de média densidade (MDF) sobre a parte do equipamento que ficava o cantilever em contato com a amostra. A face resfriada e seu dissipador ficaram na parte interna da caixa enquanto que a face aquecida e seu dissipador ficaram na parte externa. O dispositivo foi montado na parte superior da caixa em uma abertura feita para sua fixação. Em cada dissipador de calor foi colocado um microventilador, ambos alimentados pela mesma fonte de energia que aciona a pastilha Peltier.

A tensão a que o sistema ficou submetido era em torno de 5,5 V CC, o que garantiu o resfriamento e impulsionou os microventiladores com baixa velocidade, para não haver ruído que pudesse interferir nos experimentos.

Para controlar a temperatura interna foi utilizado um sistema de controle baseado em um sensor PT100 situado no interior da caixa e conectado a um controlador digital externo que desligava a fonte do sistema Peltier caso a temperatura atingisse o valor mínimo programado (Fig. 13).

Figura 13 - Sistema de resfriamento do equipamento de microscopia de força atômica desenvolvido para controle de temperatura e minimização de ruídos



Fonte: O autor

Para avaliar a resposta de interação do nanobiossensor com a atrazina, foi utilizado um cantilever apenas de silício, modelo CONTR (Nano World), de constante de mola 0,2 N/m e frequência de ressonância de 13 kHz, sem funcionalizar (branco) na presença da solução de 6,0  $\mu\text{g/L}$  de atrazina, e um cantilever funcionalizado, de silício, revestido com ouro em somente um

dos lados, modelo ContGD-G (BudgetSensors®), com frequência de ressonância de 13 kHz e constante de mola de 0,2 N/m para água milli-Q e diferentes concentrações de atrazina (0,75 µg/L, 6,0 µg/L, 22,0 µg/L e 100 µg/L) que foram preparadas de acordo com o limite máximo permitido para atrazina em água potável (2 µg/L).

O cantilever branco não possuía ouro, pois este poderia vir a apresentar alguma resposta por fazer parte da interação da camada sensora quando da funcionalização.

#### 4.2.6 Caracterização de superfície do nanobiossensor de cantilever

##### 4.2.6.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A varredura de uma superfície para formação de imagens é realizada localmente e fornece informações sobre a topografia desenvolvida no experimento, indicando altura, profundidade e rugosidade em escala nanométrica (STEFFENS et al., 2014). Dessa forma, as análises topográficas e a rugosidade foram utilizadas para caracterizar as etapas de funcionalização do nanobiossensor de cantilever. Estas análises foram realizadas em um microscópio de força atômica (EasyScan 2 FlexAFM System, Nanosurf), na Embrapa Instrumentação em São Carlos/SP, utilizando um cantilever de silício, modelo Tap-150-G (BudgetSensors), de frequência de ressonância de 150 ( $\pm 75$ ) kHz e constante de mola de 5 (1,5-15) N/m.

Para a caracterização foram utilizadas placas de silício e ouro (1 cm x 1cm), idênticos ao material do cantilever, onde as imagens foram obtidas em uma área de 25 µm<sup>2</sup>, com resolução de 512 x 512 pontos e velocidade de varredura de 0,8 a 0,9s/linha. Todas as imagens foram obtidas em modo dinâmico e a varredura realizada em modo *tapping*. O desvio médio quadrático da altura da rugosidade (Rms) é uma função da média do desvio dos picos e vales no perfil da superfície do material (LEITE et al., 2005) e foi calculada usando o software Gwyddion (Versão 2.47), em diferentes locais da imagem.

Para análise da espessura da camada sensora, uma parte desta foi removida da placa contendo todas as camadas de funcionalização por meio de uma agulha com ponta de aço, fazendo um risco na superfície. Após foi obtida uma imagem topográfica em uma área de 400 µm<sup>2</sup>, com resolução de 256 x 256 pontos e velocidade de varredura de 1,5s/linha e foi calculada a diferença de altura entre a superfície que continha a camada sensora e a camada removida (permanecendo somente silício), obtendo o valor da espessura por meio da diferença de

altura entre as duas regiões, em vários locais da imagem utilizando o software Gwyddion (Versão 2.47).

#### 4.2.6.2 Espectroscopia de Infravermelho de Reflexão e Absorção de Modulação por Polarização (PM-IRRAS)

Para análise da deposição das camadas de funcionalização a técnica de espectroscopia de infravermelho de reflexão e absorção de modulação por polarização (PM-IRRAS) foi utilizada.

A técnica de IRRAS permite avaliar a composição química e a orientação das moléculas na interface ar-água. Tem a vantagem da luz perpendicularmente polarizada ser preferencialmente absorvida na reflexão, enquanto que a luz paralelamente polarizada não é absorvida. Em contrapartida, a absorção em meios isotrópicos é independente da polarização, portanto qualquer diferença entre os sinais da luz paralela e da perpendicularmente polarizada pode ser atribuída à absorção específica da superfície. A modulação por polarização (PM) pode ser usada em conjunto com a espectroscopia de infravermelho, onde a luz incidente é continuamente modulada entre a luz paralelamente e luz perpendicularmente polarizadas a altas frequências. Isso permite a medida simultânea de modo eficiente do espectro das duas polarizações. A diferença fornece a informação específica de superfície e a soma fornece o espectro de referência (BLAUDEZ et al., 1996; DICKO; BOURQUE; PÉZOLET, 1998).

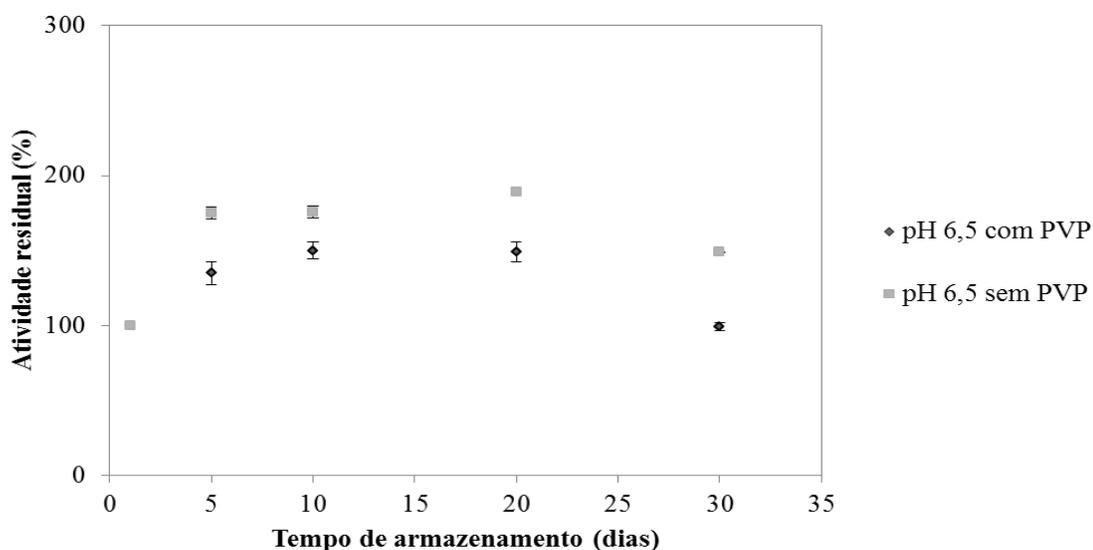
As análises foram realizadas no Instituto de Física da USP, São Carlos/SP, utilizando o ouro como substrato em um espectrofotômetro KSV, modelo PMI 550 (KSV Instruments, Finlândia), com resolução espectral de  $8\text{ cm}^{-1}$  e ângulo de incidência de  $81^\circ$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estabilidade enzimática

Os resultados obtidos para a estabilidade do extrato bruto de tirosinase, com e sem agente protetor em pH 6,5 durante 30 dias estão apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Estabilidade do extrato bruto de tirosinase obtido de banana nanica (*Musa acuminata*) em diferentes condições de extração



Fonte: O autor

A extração realizada com PVP foi a que apresentou menor variação durante o armazenamento, com 99,2% de atividade ao final dos 30 dias. A extração realizada sem PVP obteve boa atividade ao fim do tempo avaliado (148,9%), porém com uma maior variação, quando comparado a condição com PVP (Fig. 14).

Quando verificada a estabilidade, a condição de extração sem PVP mostrou uma maior variação de atividade no decorrer dos dias quando comparado com a extração realizada com PVP. Para aplicação em biossensores é interessante que a atividade enzimática se mantenha estável (com menor oscilação) permitindo o adequado funcionamento.

Foi possível observar que o agente protetor polivinilpirrolidona (PVP) utilizado pode ter causado uma maior estabilidade do extrato bruto enzimático durante o tempo avaliado, pois de acordo com a literatura, uma melhora na estabilidade da atividade enzimática é observada quando a extração é realizada na presença de agentes protetores (FATIBELLO-FILHO, VIEIRA, 2002). Sabe-se que o decréscimo da atividade enzimática em extratos brutos pode ser provocado pela reação da enzima com seus substratos naturais presente no tecido vegetal e até mesmo pela oxidação promovida pelo oxigênio do ar, e para minimizar estes efeitos, bem como para a remoção dos compostos fenólicos naturais presentes nos extratos (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002; PERONE et al., 2005).

A extração com PVP foi a escolhida para dar prosseguimento nos estudos pela grande estabilidade observada na condição estudada, apresentando potencial para ser aplicada como agente biológico na camada sensora do nanobiossensor de cantilever.

Perone et al. (2008) avaliaram a estabilidade da tirosinase obtida da casca de banana nanica (*Musa acuminata*) em pH 6,5 na presença de agente protetor, e ao final de 30 dias avaliados, obtiveram aproximadamente 93,6% de atividade enzimática, corroborando com o percentual obtido neste trabalho com polpa de banana nanica (*Musa acuminata*) em pH 6,5 com PVP (99,2%).

De acordo com Lupetti et al. (2003), a atividade enzimática de tirosinase encontrada através do extrato bruto de abacate (tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  em pH 7,0 e agente protetor) foi de 553 U/mL, enquanto que a obtida neste estudo, no dia da extração, foi de 3300 U/mL (pH 6,5) na presença do agente protetor. Isso pode justificar o que Vamos-Vigyazo (1981) afirmou que a atividade enzimática da tirosinase obtida de diferentes tecidos vegetais pode variar de acordo com a espécie, cultivar e maturação.

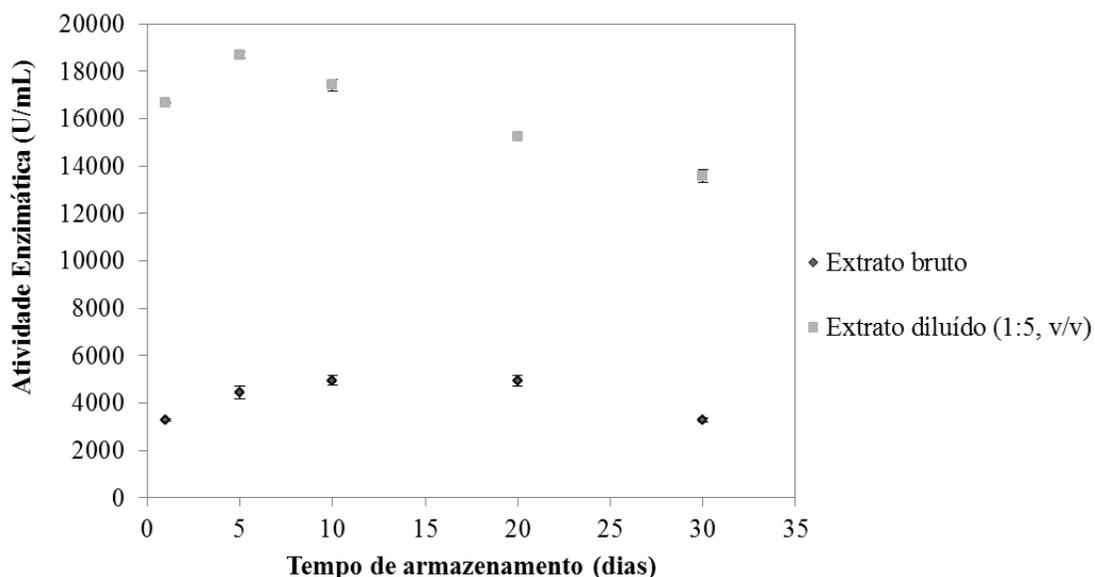
A Figura 15 apresenta a atividade enzimática do extrato bruto e do extrato diluído (em tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) de tirosinase de banana nanica (*Musa acuminata*) ambos obtidos em pH 6,5, na presença de agente protetor (PVP) a 20 °C.

Comparando-se a atividade enzimática do extrato bruto de tirosinase com o extrato diluído em tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 6,5 na concentração (1:5, v/v), observou-se que a atividade enzimática encontrada no dia da extração para o extrato bruto foi de 3300 U/mL enquanto que a atividade enzimática obtida para o extrato diluído no mesmo dia foi de 16662 U/mL. Como se trata de um extrato bruto pode haver mais substâncias presentes do que apenas a

enzima tirosinase, por isso um teste de diluição foi realizado, onde a atividade enzimática encontrada foi muito melhor da forma diluída do que na forma bruta, de acordo com a Figura 15.

Avaliando a atividade enzimática para ambos os extratos no decorrer de 30 dias (Fig. 15), verificou-se que a estabilidade foi mantida com uma redução de 0,8% e 18,4% para o extrato bruto e diluído, respectivamente. Porém o extrato diluído apresentou atividade 4,7 vezes maior que o extrato bruto.

Figura 15 - Atividade enzimática do extrato bruto e do extrato diluído de tirosinase obtido de banana nanica (*Musa acuminata*) em pH 6,5, com PVP



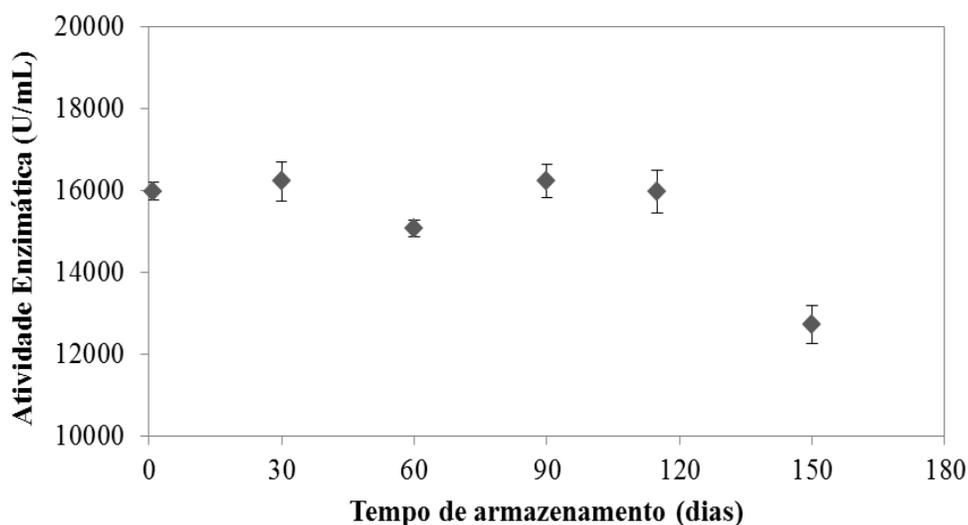
Fonte: O autor

Conforme observado, o extrato diluído de tirosinase apresentou ótimos valores de atividade e estabilidade durante os 30 dias avaliados, porém, a fim de analisar mais a fundo a estabilidade e obter resultados satisfatórios na resposta do nanobiossensor de cantilever, avaliou-se a estabilidade do extrato diluído de tirosinase por um período de tempo maior. A Figura 16 apresenta a estabilidade do extrato diluído de tirosinase obtida de banana nanica (*Musa acuminata*) em pH 6,5 com PVP durante 150 dias.

Analisando a Figura 16, a atividade enzimática se manteve estável durante os 150 dias de armazenamento, conferindo uma boa estabilidade enzimática. Em 90 dias após a extração, a

atividade enzimática obtida era praticamente a mesma do dia em que foi extraída (16229 U/mL) e com 150 dias, 12712 U/mL, o que corresponde a aproximadamente 80% de atividade enzimática. Como pode ser observado, também não ocorreram grandes oscilações de atividade enzimática no decorrer do armazenamento, justificando que os resultados obtidos tanto de estabilidade (Fig. 16) como os de atividade enzimática (Fig. 15) são satisfatórios para a utilização deste extrato enzimático vegetal na confecção do nanobiossensor de cantilever, pois a elevada atividade da enzima e sua estabilidade são de extrema importância para a utilização em biossensores, garantindo seu adequado desempenho e resposta (LAGARDE; JAFFREZIC-RENAULT, 2011).

Figura 16 - Estabilidade do extrato diluído de tirosinase obtido de banana nanica (*Musa acuminata*) em pH 6,5, com PVP



Fonte: O autor

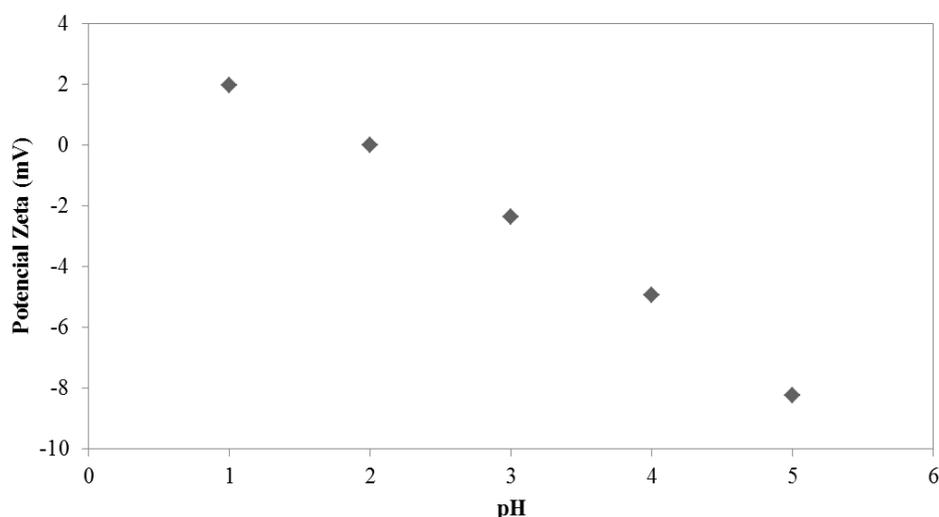
## 5.2 Potencial zeta

Na construção de biossensores enzimáticos a alta atividade e a estabilidade da enzima são fundamentais, por isso é necessário conhecer as propriedades do extrato enzimático de tirosinase, a fim de tornar efetiva a construção do biossensor.

Os resultados obtidos para a medida do potencial zeta, referente ao extrato enzimático de tirosinase de banana nanica (*Musa acuminata*) estão demonstrados na Figura 17. É possível

observar que quanto mais neutro o pH, mais cargas negativas a enzima apresenta, e quanto mais ácido o pH, menos cargas negativas para a enzima.

Figura 17 - Influência do pH na medida do potencial zeta para o extrato bruto de tirosinase obtida de banana nanica (*Musa acuminata*)



Fonte: O autor

Os valores de potencial zeta encontrados para o extrato bruto enzimático de tirosinase estão de acordo com Min et al. (2012), onde estudaram o comportamento da tirosinase, obtida de cogumelo, e observaram que houve um aumento das cargas negativas com o aumento do pH, ou seja, quanto mais próximo da neutralidade, maior a quantidade de cargas negativas presentes na enzima.

De acordo com a literatura, através das medidas de potencial zeta é possível conhecer as propriedades eletrostáticas da enzima e saber se a imobilização será efetiva nas etapas de construção de dispositivos para análise de componentes (MIN et al., 2012).

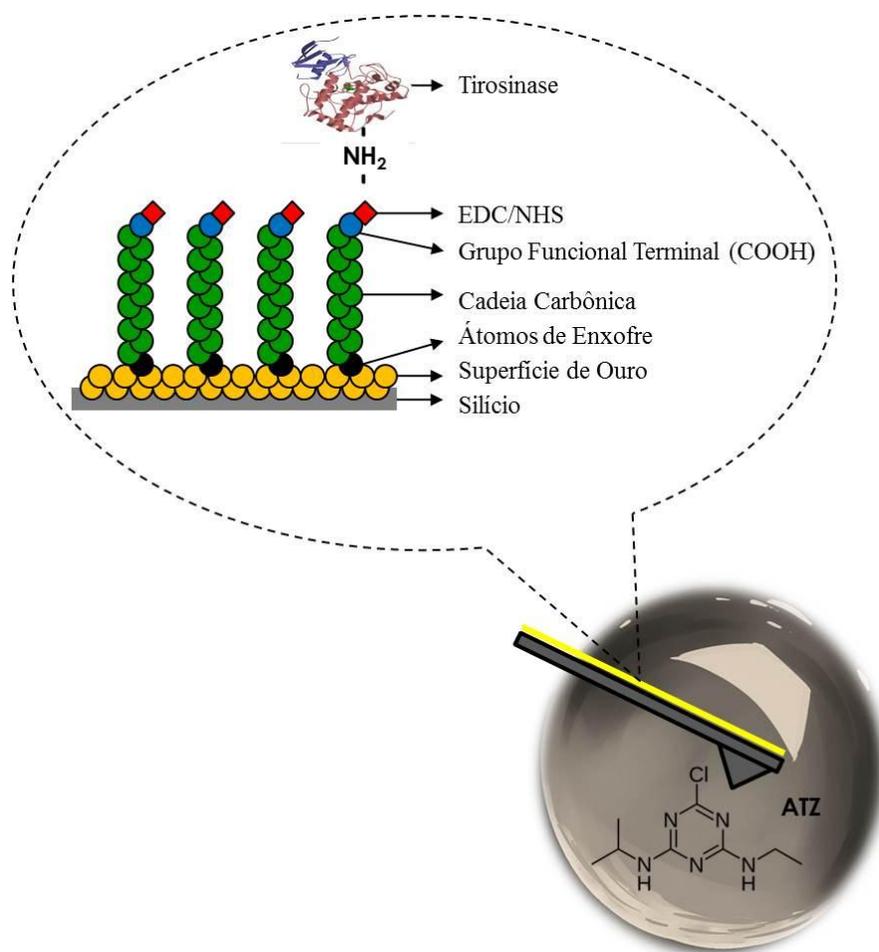
Além disso, uma das características importantes da enzima é o seu ponto isoelétrico, ou seja, o valor de pH ao qual uma molécula apresenta carga elétrica global igual a zero, e onde existe um equilíbrio entre as cargas negativas e positivas presentes na enzima. Alterando o pH, é possível tornar a molécula mais positiva ou mais negativa. No entanto, é necessário ter em conta que valores extremos de pH podem alterar ou até mesmo, suprimir a atividade da molécula (OLIVEIRA, 2008).

Pela Figura 17 observa-se que o ponto isoelétrico da tirosinase extraída de banana nanica (*Musa acuminata*) ficou em torno de 2,0, ao passo que o ponto isoelétrico da enzima comercial, obtida de cogumelo, gira em torno de 4,7 a 5,0 (ROBB; GUTTERIDGE, 1981), ou seja, este valor pode sofrer modificações de acordo com a matéria-prima utilizada na extração.

### 5.3 Avaliação da resposta do nanobiossensor de cantilever na detecção de atrazina em água

Para melhor compreensão deste trabalho, a Figura 18 apresenta um esquema da funcionalização do cantilever com a técnica de SAM para a detecção de atrazina em água.

Figura 18 - Esquema da funcionalização do cantilever para detecção de atrazina em água



A eficiência de um nanobiossensor de cantilever depende da adequada imobilização do agente biológico no suporte, a fim da obtenção de respostas adequadas. Para isso a técnica de SAM permite interações entre moléculas e superfícies, modificando suas propriedades físicas e químicas (MOCELLINI, 2011).

Na funcionalização do nanobiossensor de cantilever utilizou-se ouro na superfície de silício, AMHD, EDC/NHS e extrato bruto de tirosinase (com 15962 U/mL), onde a utilização de tióis é importante pois estes adsorvem espontaneamente em diversos metais. O ouro é o mais utilizado, pois forma monocamadas estáveis e é fácil de ser obtido (MENDES, 2014).

Quando o alcanotiol possui um grupo funcional, por exemplo, grupos ácidos carboxílicos ou aminas, o acoplamento peptídico da biomolécula pode ocorrer pela SAM (SHAN et al., 2010). As monocamadas automontadas de cadeias longas de alcanotiol em ouro têm sido mostradas estáveis em ar, água e solventes orgânicos à temperatura ambiente (TAN; TIEN; CHEN, 2002).

No entanto, a eficácia da reação química envolve a ativação de uma amina ou moléculas de ácidos carboxílicos na SAM através da utilização de agentes de acoplamento, tal como o glutaraldeído e os 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida/*N*-hidroxi-succinimida (EDC/NHS) (SHAN et al., 2010; ALMEIDA, 2010).

De acordo com Gooding e Hibbert (1999), alcanotiois de cadeia longa produzem SAM mais ordenadas do que aqueles com cadeias mais curtas, aumentando a estabilidade.

Hleli et al. (2006), no desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico na análise de atrazina, optaram pela utilização de uma monocamada composta de AMHD, assim permitindo a imobilização em superfícies de ouro com um grupo carboxílico terminal hidrofílico, garantindo a estabilidade final da camada de SAM através da interação hidrofóbica entre cadeias longas do AMHD, o que justifica a escolha do tipo de tiol utilizado neste trabalho.

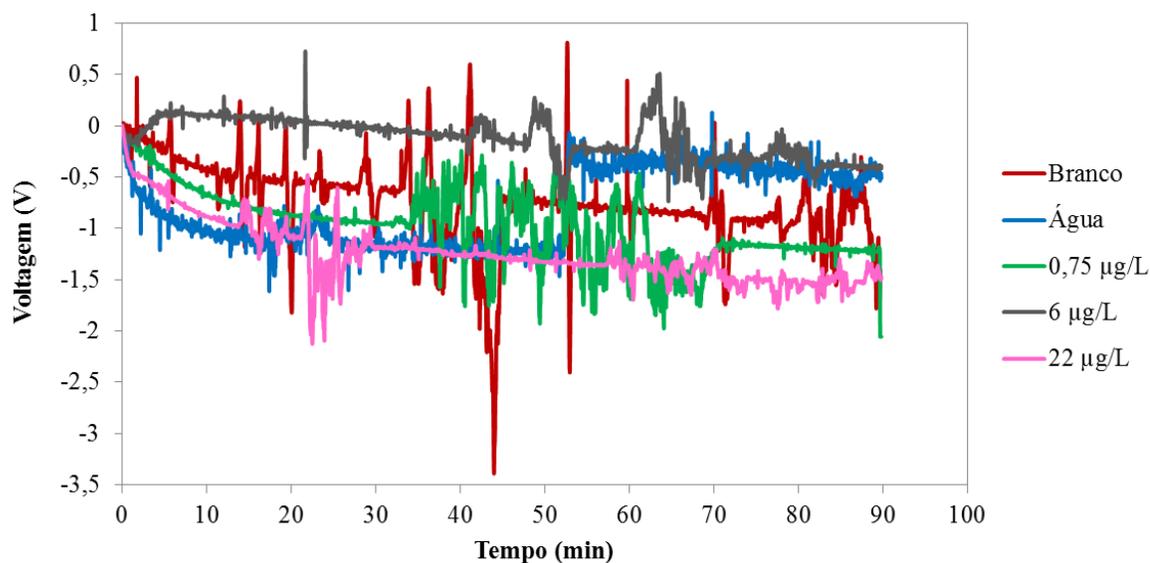
O grupo carboxílico presente no tiol reage com o EDC, formando o intermediário instável *O*-acilisourea, porém, em solução aquosa, o intermediário instável é suscetível à hidrólise, o que resultaria na regeneração do grupo carboxílico. Então se adiciona NHS para aumentar a eficiência da ligação, onde este reage com o composto intermediário formando um novo intermediário agora um pouco mais estável. Este novo intermediário, por sua vez, reage com a amina primária, presente na enzima, o que faz com que a amina se ligue ao ácido carboxílico original, por meio de uma ligação amida (JANEGITZ et al., 2011; BRAZACA, 2015; PEPINO, 2016).

Os resultados experimentais do nanobiossensor de cantilever na presença de atrazina com a técnica de SAM foram obtidos por meio da tensão superficial obtida utilizando a técnica de AFM no modo estático, onde se obteve os dados de voltagem em função do tempo.

a) SAM utilizando 0,1 M EDC/0,1 M NHS (1:1 v/v)

A Figura 19 apresenta a resposta do nanobiossensor de cantilever na presença de atrazina em função do tempo pela técnica de SAM utilizando 0,1 M EDC/0,1 M NHS (1:1 v/v).

Figura 19 - Resposta do nanobiossensor de cantilever obtida pela técnica de SAM utilizando 0,1 M EDC/0,1 M NHS (1:1 v/v)



Fonte: O autor

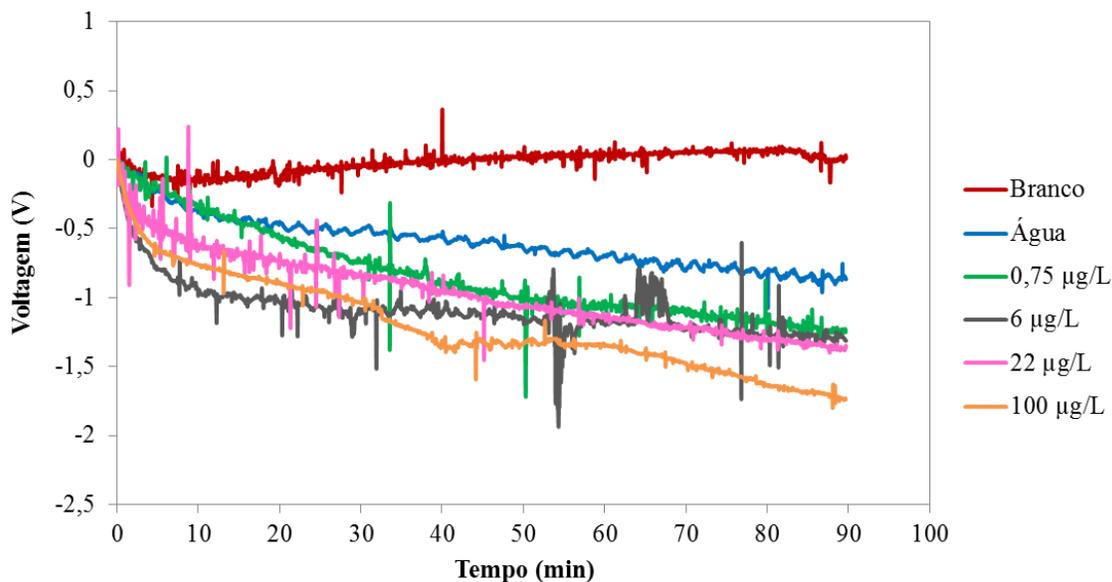
É possível observar que os resultados encontrados em voltagem (V) para as soluções de atrazina foram muito próximos aos da água e do cantilever branco (não funcionalizado). Apesar da temperatura ter sido mantida constante ( $25,5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ ) e do controle de ruídos, não foram obtidas respostas lineares e precisas, não sendo possível obter resultados conclusivos na detecção do herbicida atrazina com este modo de funcionalização. Isso pode ter ocorrido devido há uma funcionalização não eficiente da enzima no cantilever, onde ela pode ter sido lixiviada. Isso também pode ter ocorrido devido a utilização de concentrações não adequadas dos agentes

reticulantes EDC/NHS, onde a enzima não foi adequadamente imobilizada. Assim, uma nova funcionalização com a técnica SAM foi testada, utilizando diferentes proporções entre EDC/NHS.

b) SAM utilizando 1 mM EDC/1 mM NHS (4:1 v/v)

A Figura 20 apresenta os resultados obtidos do nanobiossensor de cantilever na presença de atrazina em função do tempo com a técnica de SAM utilizando 1 mM EDC/1 mM NHS (4:1 v/v). É possível verificar que houve diferenças na voltagem (V) do cantilever com este tipo de funcionalização em relação às diferentes concentrações de atrazina (0,75 µg/L; 6 µg/L; 22 µg/L e 100 µg/L), como também em relação à água e ao branco (cantilever não funcionalizado).

Figura 20 - Resposta do nanobiossensor de cantilever obtida pela técnica de SAM utilizando 1 mM EDC/1 mM NHS (4:1 v/v)



Fonte: O autor

Observa-se uma tendência no aumento da tensão de compressão de superfície (tensão superficial negativa) com o aumento da concentração de atrazina. Guang-Ping et al. (2017), utilizando sensores de cantileveres na detecção de  $Hg^{2+}$  em solução aquosa mostraram que os mesmos dobravam na mesma direção, com aumento da inclinação da curva de deflexão com o

aumento da concentração (1 ng/mL a 200 ng/mL), corroborando com os resultados encontrados neste trabalho. Essa diferença de tensão de compressão com as diferentes concentrações de atrazina é decorrente da interação da enzima tirosinase imobilizada no cantilever com o herbicida, conforme demonstrado na Figura 20. Segundo Karnati et al. (2007), na adsorção de analitos no lado da superfície recoberta com ouro ocorre uma tensão de compressão, resultante de uma repulsão ou expansão de moléculas. De acordo com a Figura 20 foi possível observar também que quanto maior a interação do herbicida (maior concentração) com o nanobiossensor de cantilever, maior a amplitude de voltagem observada.

Alterações na tensão superficial são resultantes da adsorção ou das interações eletrostáticas entre moléculas sobre a superfície do cantilever, bem como alterações na hidrofobicidade de superfície e mudanças conformacionais nas moléculas adsorvidas (MARGARIDO, 2016). Assim, quando há moléculas que interagem com a superfície funcionalizada do cantilever, uma tensão superficial pode ser induzida. A diferença de tensão superficial da parte funcionalizada induzida em relação à superfície passiva do cantilever resulta numa deflexão mecânica mensurável (modo estático) (GODIN et al., 2004).

Segundo Sang et al. (2014), a tensão superficial surge a partir da ligação química entre átomos na superfície que sofrem algum processo micro estrutural dinâmico, resultando em uma mudança na densidade. Do mesmo modo, uma camada ativa ligada de forma rígida a uma superfície criaria uma tensão de tração ou de compressão quando se contrai ou se expande, respectivamente (GODIN et al., 2004). Do exposto, observando a Figura 20 é possível observar que a tensão de superfície gerada pelo cantilever funcionalizado na presença de atrazina é uma tensão de compressão de superfície (tensão superficial negativa).

Kim et al. (2008), referem que o tipo de inibição da enzima tirosinase na presença de algum inibidor é do tipo reversível competitiva, onde o inibidor, na presença de substrato compete pelo sítio ativo da enzima (MARQUES; YAMANAKA, 2008). A ligação do inibidor à enzima pode ocasionar uma alteração conformacional na estrutura da mesma. Desta forma, a mudança de tensão superficial do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com tirosinase pode ser devido a uma alteração conformacional na estrutura da enzima em resposta a adsorção de atrazina, porém não havendo a presença do substrato na amostra avaliada. Esse mesmo mecanismo foi descrito por Buchapudi et al. (2012), ao modificarem um cantilever de ouro com

ácido 11-mercaptoundecanoico, EDC/NHS e proteína de ligação à acetilcolina (AChBP) como camada sensora para detecção do neurotransmissor acetilcolina.

Conforme a Figura 20, no tempo de 80 min, quando há uma estabilização da resposta, na maior concentração de atrazina testada (100 µg/L), o sinal de voltagem obtido é duas vezes maior que o sinal da água no mesmo tempo (- 1,62 V e - 0,81 V para atrazina e água, respectivamente). Este sinal de voltagem é ainda maior quando comparado ao cantilever branco (- 0,05 V), comprovando que a resposta do nanobiossensor do cantilever é decorrente da interação da enzima funcionalizada na superfície do sensor com o herbicida.

Segundo a Resolução nº 357 do CONAMA (BRASIL, 2005) e as Portarias nº 1469, de 29 de dezembro de 2000 e nº 2914, de 12 de dezembro de 2011, ambas do Ministério da Saúde (BRASIL, 2000; BRASIL, 2011), a máxima concentração de atrazina permitida em águas doces é de 2 µg/L e, conforme a Figura 20, é possível observar que o nanobiossensor de cantilever foi capaz de identificar concentrações maiores e menores que a permitida nas legislações.

Há trabalhos na literatura que utilizam biossensores eletroquímicos (YU et al., 2010; GUAN et al., 2016), condutométricos (ANH et al., 2004; ANH et al., 2006) e amperométricos (BESOMBES et al., 1995; KIM et al., 2008; TORTOLINI et al., 2016) na determinação de atrazina, baseados na inibição da tirosinase. A porcentagem de inibição é obtida através da reação da enzima com o substrato antes e após adição do pesticida em volumes e concentrações conhecidas (MARQUES; YAMANAKA, 2008).

O princípio de funcionamento dos nanobiossensores de cantilever, diferentemente dos biossensores descritos acima, baseia-se na adsorção de analitos sobre a superfície funcionalizada, ocasionando uma deflexão do cantilever (WANG et al., 2007; JOHNSON; MUTHARASAN, 2012). Além disso, neste tipo de detecção não há a presença do substrato da enzima no momento da interação com o herbicida.

Esta técnica de desenvolvimento de um nanobiossensor mecânico óptico é um método inovador, não encontrado ainda na literatura, onde foi possível detectar a presença de atrazina através de um extrato bruto vegetal de tirosinase de baixo custo, diferentemente dos trabalhos publicados, onde se é usada a enzima comercial.

## 5.4 Caracterização de superfície do nanobiossensor de cantilever

De acordo com os resultados obtidos com os dois modos de funcionalização, foram observados melhores resultados com a técnica que utilizou SAM contendo 1 mM EDC/1 mM NHS (4:1 v/v), assim foram realizadas as técnicas de caracterização de superfície somente para este tipo de funcionalização.

Segundo Bendo (2010), as monocamadas de SAM podem ser caracterizadas por diversos métodos, entre eles encontra-se a técnica de microscopia de força atômica (AFM) e espectroscopia de absorção e reflexão de infravermelho modulado por polarização (PM-IRRAS), por isso essas duas técnicas foram realizadas.

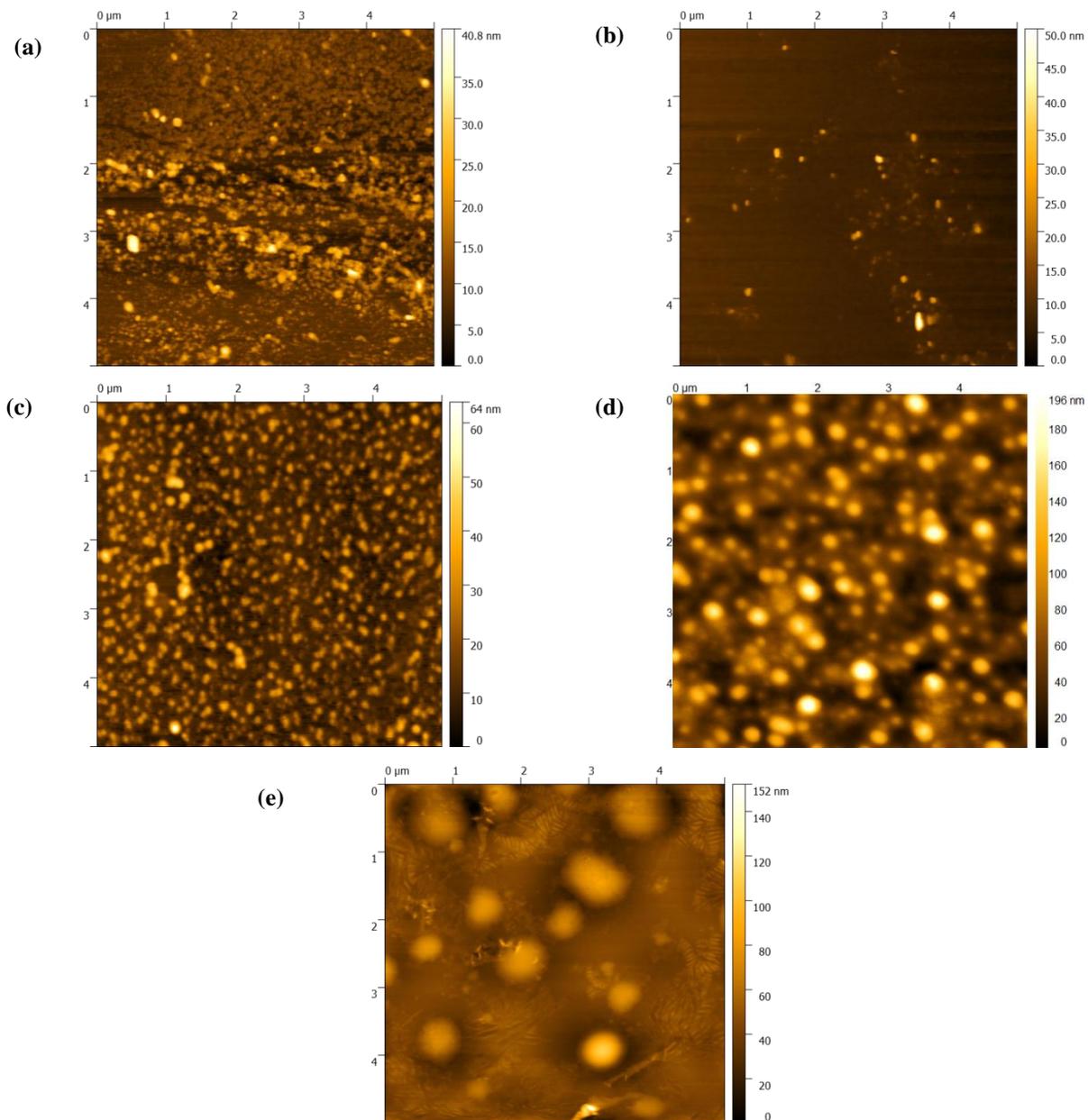
### 5.4.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A Figura 21 apresenta as imagens topográficas obtidas nas diferentes etapas de funcionalização da superfície do cantilever com a técnica de SAM, enquanto que a Tabela 3 apresenta os valores de desvio médio quadrático de rugosidade obtido na funcionalização.

Observando a Figura 21, há diferenças na topografia de cada etapa de funcionalização. Analisando o substrato de silício (Fig. 21 a), observa-se uma superfície com domínios dispersos, enquanto que a camada contendo ouro apresenta uma superfície mais lisa (Fig. 21 b). Na superfície funcionalizada com AMHD e EDC/NHS (Fig. 21 c e d) verifica-se um formato de agrupamentos em coluna, o que também foi observado por Mukherjee et al. (2010). No entanto, a última camada da funcionalização pela técnica de SAM (com a adição do extrato enzimático de tirosinase), apresenta uma morfologia com contornos maiores e mais definidos.

Por meio da medida de rugosidade (Tab. 3) verifica-se um decréscimo no Rms na superfície com a adição do ouro (2,14 nm). A diminuição da rugosidade nesta etapa pode ser explicada pelo fato do ouro se depositar nos vales existentes na superfície de silício, preenchendo os espaços vazios. O valor da rugosidade obtido com a adição do ouro pela técnica de SAM está de acordo com o trabalho de Yu-Cheng et al. (2008), onde relatam uma rugosidade média de 1 a 2 nm na superfície de ouro.

Figura 21 - Caracterização de superfície por análise topográfica obtida por meio de AFM em cada etapa de funcionalização (a) Silício; (b) Silício + Ouro; (c) Silício + Ouro + AMHD; (d) Silício + Ouro + AMHD + EDC/NHS; (e) Silício + Ouro + AMHD + EDC/NHS + Tirosinase



Fonte: O autor

Tabela 3 - Valores de desvio médio quadrático de rugosidade obtido por meio de AFM para cada etapa de funcionalização

<b>Etapa</b>	<b>Rms (nm)</b>
Silício	3,61 ± 0,52
Silício + Ouro	2,14 ± 0,20
Silício + Ouro + AMHD	6,35 ± 0,04
Silício + Ouro + AMHD + EDC/NHS	27,02 ± 0,82
Silício + Ouro + AMHD + EDC/NHS + Tirosinase	12,39 ± 0,59

Rms: desvio médio quadrático da altura

Fonte: O autor

Nas duas etapas seguintes, na adição do AMHD e dos agentes reticulantes EDC/NHS, há um aumento de Rms: 6,35 e 27,02 nm, respectivamente. Nestas etapas, a presença de AMHD, eleva a rugosidade indicando que ocorreu a deposição de tiol sobre a superfície. Comportamentos semelhantes de rugosidade do AMHD e EDC/NHS também foram observados no estudo de Kim et al. (2015), onde foi desenvolvido um biossensor de cantilever funcionalizado com a técnica de SAM. As imagens de AFM mostraram um aumento da rugosidade da superfície devido às mudanças nos grupos funcionais e a adição da camada por 11-MUA (ácido 11-mecaptoumdecanoico), bem como na presença dos mesmos agentes reticulantes.

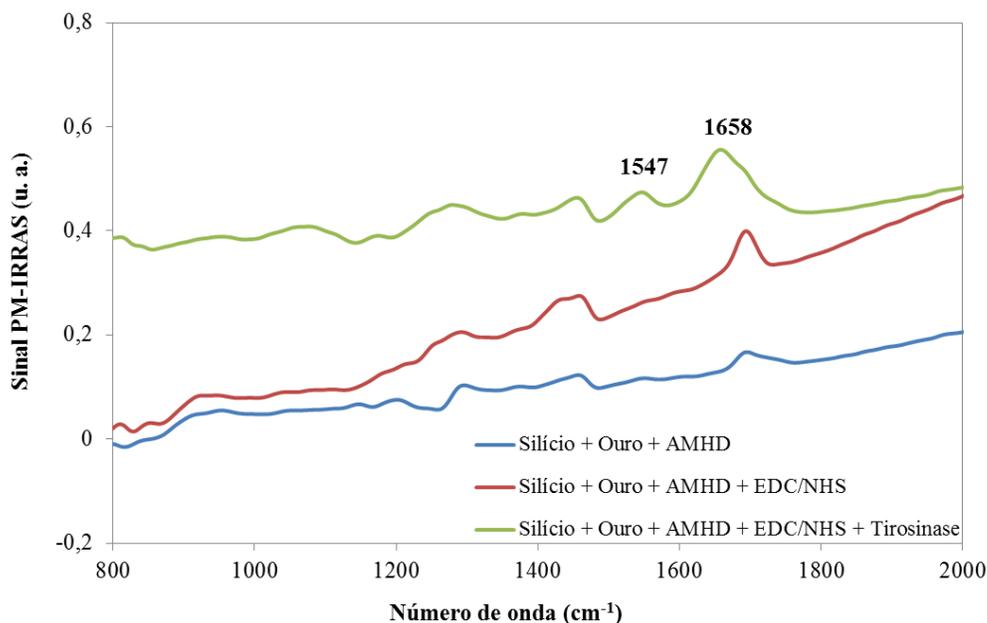
No final da funcionalização, com a etapa de adição do extrato de enzima tirosinase, foi possível observar uma redução na rugosidade, com Rms de 12,39 nm, o que pode ser devido ao preenchimento dos vales da superfície do cantilever. Alonso et al. (2016) também observaram a redução dos valores de rugosidade (Rms), realizando a deposição da enzima glicose oxidase (GOX) sobre uma superfície de platina por meio da técnica de SAM.

A medida da espessura entre a camada sensora e a superfície removida, ou seja, não funcionalizada (contendo somente silício), apresentou um valor médio de  $80,2 \pm 0,4$  nm. Desta forma, pode-se afirmar que o nanobiossensor de cantilever desenvolvido neste trabalho apresenta a camada sensora na escala manométrica (até 100 nm). Assim, a camada sensora desenvolvida é favorável para a construção de dispositivos de sensoriamento devido a grande área superficial, aumentando sua sensibilidade.

#### 5.4.2 Espectroscopia de Infravermelho de Reflexão e Absorção de Modulação por Polarização (PM-IRRAS)

O processo de imobilização da enzima tirosinase sobre a superfície de AMHD foi feito com o auxílio dos agentes reticulantes EDC/NHS, favorecendo a reação dos grupos carboxílicos do AMHD com os grupos amina da enzima, formando ligações amida estáveis. A funcionalização por meio do método de SAM também foi investigada com a técnica de PM-IRRAS como mostra a Figura 22.

Figura 22 - Caracterização da funcionalização do cantilever pela técnica de PM-IRRAS



Fonte: O autor

Observando a Figura 22, nota-se duas bandas, uma a  $1658 \text{ cm}^{-1}$  atribuída ao grupo carbonila da ligação amida (amida I) e outra em  $1547 \text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento C-N da amida (amida II). Estes resultados indicam a eficiência da funcionalização do cantilever, indicando que a enzima foi imobilizada na superfície contendo AMHD.

Bandas semelhantes foram encontradas no trabalho de Schmidt et al. (2008), onde a indicação da enzima peroxidase foi vista nas bandas  $1663 \text{ cm}^{-1}$  e  $1554 \text{ cm}^{-1}$ , correspondente a amida I e amida II respectivamente. Kreider et al. (2014), também confirmaram a presença da enzima peroxidase nas bandas de  $1659 \text{ cm}^{-1}$  para amida I e em  $1548 \text{ cm}^{-1}$  para amida II.

No desenvolvimento de um biossensor utilizando a técnica de SAM para imobilizar enzimas oxidases, a técnica de PM-IRRAS caracterizou a superfície obtendo resultados na banda de  $1653\text{ cm}^{-1}$  para amida I e  $1558\text{ cm}^{-1}$  para amida II (ALONSO et al., 2016).

Por meio de técnicas de análise de caracterização de superfície com AFM e PM-IRRAS, foi possível verificar que a funcionalização ocorreu de forma eficaz devido às diferenças apresentadas em cada etapa e também devido aos resultados de diferença de voltagem do cantilever na presença das concentrações de atrazina, havendo assim, a interação entre o herbicida e a enzima tirosinase.

## 6 CONCLUSÃO

A enzima tirosinase obtida por uma técnica de baixo custo, por meio de um extrato bruto vegetal de banana nanica (*Musa acuminata*) mostrou-se adequada para o uso no desenvolvimento do nanobiossensor de cantilever para detecção de atrazina em água, devido sua alta atividade enzimática (16229 U/mL) bem como estabilidade adequada durante o tempo de armazenamento avaliado (150 dias). A estabilidade enzimática que demonstrou melhores resultados foi a obtida com a utilização de PVP em pH 6,5.

O nanobiossensor de cantilever desenvolvido com a técnica de SAM utilizando 1 mM EDC/1 mM NHS (4:1 v/v) foi o que apresentou resultados na detecção de atrazina em água, pois foi possível observar as diferenças de voltagem do cantilever nas concentrações de atrazina quando comparadas a voltagem do cantilver funcionalizado na água e também do cantilever branco (não funcionalizado), o que resulta da interação do herbicida com a enzima tirosinase.

Por meio das técnicas de caracterização de superfície (AFM e PM-IRRAS) foi possível confirmar a eficiente funcionalização do cantilever através das proporções adequadas dos agentes reticulantes utilizados juntamente com o AMHD. Isso foi possível observar devido às mudanças de rugosidade nas etapas de funcionalização e pelos espectros de PM-IRRAS dos grupos amida I e amida II que são característicos da enzima tirosinase. Com a medida da espessura da camada sensora foi possível verificar que a mesma encontra-se na escala manométrica ( $80,2 \pm 0,4$  nm).

As concentrações de atrazina investigadas mostraram diferenças no aumento da tensão da compressão de superfície obtidas pelo nanobiossensor de cantilever por meio da técnica de AFM, mostrando ser um nanobiossensor capaz de detectar a presença do herbicida atrazina em água, diferenciando concentrações acima e abaixo do limite permitido de acordo com as legislações existentes.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos, sugere-se a realização dos seguintes tópicos para trabalhos futuros:

- Calcular a sensibilidade, reprodutibilidade; repetibilidade, estabilidade, histerese e limite de detecção do nanobiossensor de cantilever;
- Analisar possíveis herbicidas interferentes na resposta do nanobiossensor de cantilever;
- Analisar possível presença de atrazina em águas de rios e de torneira com o nanobiossensor de cantilever e realizar análise cromatográfica para comparação.
- Analisar possível presença de metabólitos de atrazina em águas de rios com o nanobiossensor de cantilever.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABATE, G.; MASINI, J., C. Adsorption of atrazine, hydroxyatrazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine onto poly (hydroxy iron) cations intercalated vermiculite and montmorillonite. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 5, n. 53, p.1612-1619, 2005.
- ABDI - Agência Brasileira do Desenvolvimento Industrial. **Estudo Prospectivo Nanotecnologia**. Série Cadernos da Indústria ABDI, v. XX. Brasília: ABDI, 2010.
- ALMEIDA, I. B. B. **(Bio)Funcionalização de superfícies de ouro via formação de ditiocarbamatos**. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Química e Bioquímica. Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.
- ALONSO, J. M. et al. Self-assembled monolayers of 1-alkenes on oxidized platinum surfaces as platforms for immobilized enzymes for biosensing. **Applied Surface Science**, v. 383, p. 283–293, 2016.
- AMINE, A. et al. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 180-194, 2016.
- ANH, T. M. et al. Detection of toxic compounds in real water samples using a conductometric tyrosinase biosensor. **Materials Science and Engineering C**, v. 26, n. 453 – 456, 2006.
- ANH, T. M. et al. Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites. **Talanta**, v. 63, p. 365-370, 2004.
- AQUINO, J. M. et al. Treatment of actual effluents produced in the manufacturing of atrazine by a photo-electrolytic process. **Chemosphere**, v. 172, p. 185- 192, 2017.
- ARNTZ, Y. et al. Label-free protein assay based on a nanomechanical cantilever array. **Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 86-90, 2003.
- BAIN, C. D. et al. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 18, p. 7155-7164, 1989.
- BARCHANSKA, H. et al. Monitoring of atrazine in milk using a rapid tube-based ELISA and validation with HPLC. **Chemosphere**, v. 87 p. 1330–1334, 2012.
- BAUSSELS, J. Piezoresistive cantilevers for nanomechanical sensing. **Microelectronic Engineering**, v. 145, p. 9-20, 2015.
- BENDO, L. **Estudo da imobilização do receptor tireoidiano humano TRβ1 em filmes finos nanoestruturados e aplicações em detecção de hormônios tireoidianos**. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

- BESOMBES, J. L. et al. A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides. **Analytica Chimica Acta**, v. 311, p. 255-263, 1995.
- BIA, G. et al. Multivariate optimization of square wave voltammetry using bismuth film electrode to determine atrazine. **Sensors and Actuators B**, v. 203, p. 396–405, 2014.
- BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic Force Microscope. **Physical Review Letters**, v. 56, n. 9, p. 930–933, 1986.
- BLAUDEZ, D. et al. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 92, n. 4, p. 525-530, 1996.
- BONANSEA, R. I.; AMÉ, M. V.; WUNDERLIN, D. A. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC–MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). **Chemosphere**, v. 90, p. 1860-1869, 2013.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. 18 mar. 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1469, de 29/12/2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. 10 jan. 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12/12/2001. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**. 14 dez. 2011.
- BRAZACA, L. C. **Desenvolvimento de um sistema para o diagnóstico precoce do diabetes mellitus tipo 2**. 2015. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Física Aplicada, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- BRETVELD, R. W. et al. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 30, 2006.
- BUCHAPUDI, K. et al. Micromechanical measurement of AChBP binding for label-free drug discovery. **Analyst**, v. 137, p. 263-268, 2013.
- BUDGETSENSORS. **AFM probe Model: ContGD-G**. 2016. Disponível em: <[http://www.budgetsensors.com/downloads/ContGD-G\\_Datasheet.pdf](http://www.budgetsensors.com/downloads/ContGD-G_Datasheet.pdf)>. Acesso em: 23 mai. 2016.

BUENO, C. C. **Desenvolvimento de um nanobiossensor para o monitoramento da qualidade ambiental no setor agrícola.** 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 2013.

BUTT, H. J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. **Surface Science Reports**, v. 59, p. 1-152, 2005.

CABRITA, J. F.; ABRANTES, L. M.; VIANA, A. S. *N*-Hydroxysuccinimide-terminated self-assembled monolayers on gold for biomolecules immobilization. **Electrochimica Acta**, v. 50, p. 2117–2124, 2005.

CARNIEL, B. F. **Avaliação de Impactos Ambientais e Sociais do Uso da Nanotecnologia na Agricultura: Uma Proposta Metodológica.** 2013. 232 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Avaliação de Impactos de Nanotecnologias, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

CARRASCOSA, L. G. et al. Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p.196-206, 2006.

CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p.1-12, 2002.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 6-7, p. 441–456, 2002.

CHAUDHARY, M.; GUPTA, A. Microcantilever-based Sensors. **Defence Science Journal**, v. 59, n. 6, p. 634-641, 2009.

CHEN, C D.; LI J. Interfacial design and functionization on metal electrodes through self-assembled monolayers. **Surface Science Reports**, v. 61, p. 445-463, 2006.

CONSOLIN FILHO, N. **Desenvolvimento de Novos Materiais para a Detecção de Pesticidas.** 2002. 152 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia dos Materiais) – Área de Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

CUBILLAS, P.; ANDERSON, M. W. Atomic Force Microscopy. In: BRUCE, D. W.; O'HARE, D.; WALTON, R. I. (eds.). **Multi Length-Scale Characterisation**. 1. ed. Walton Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons Ltda., 2014. cap. 3, p. 121-193.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

DEDA, D. K. et al. The Use of Functionalized AFM tips as Molecular Sensors in the Detection of Pesticides. **Materials Research**, v. 16, n. 3, p. 683-687, 2013.

DELWICHE, K. B.; LEHMANN, J.; WALTER, M. T. Atrazine leaching from biochar-amended soils. **Chemosphere**, v. 95, p. 346-352, 2014.

DÍAZ-GONZÁLEZ, M. et al. Electrochemical devices for the detection of priority pollutants listed in the EU water framework directive. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 186-202, 2016.

DICKO, A.; BOURQUE, H.; PÉZOLET, M. Study by infrared spectroscopy of the conformation of dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers at the air–water interface and transferred on solid substrates. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 96, p. 125-139, 1998.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D. Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 1127- 1134, 2013.

EISLER, R. Atrazine Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. **US Fish e Wildlife Publications**, v. 1, 1989.

ETCHEGARAY, A.; BUENO, C. D. C.; TESCHKE, O. Identificação de microcistina LR ao nível molecular empregando microscopia de força atômica. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1843-1848, 2010.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

FERREIRA, L. F. **Biossensor amperométrico à base de tirosinase aplicado na determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais**. 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Química Analítica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

FAO. **Agricultural data base**. 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

FOSCHINI, M. **Eletrossíntese e caracterização de filmes de polipirrol-2-ácido carboxílico para uso em biossensores amperométricos construídos em eletrodos miniaturizados**. 2009. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Física Aplicada, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

FRANCO, E. S. **Avaliação da influência dos coagulantes sulfato de alumínio e cloreto férrico na remoção de turbidez e cor da água bruta e sua relação com sólidos na geração de lodo em estações de tratamento de água**. 2009. 187 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Saneamento Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

GADEGAARD, N. Atomic force microscopy in biology: technology and techniques. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 81, n. 2-3, p. 87-97, 2006.

GALLI, A. **Desenvolvimento e caracterização de um biossensor bienzimático imobilizado sobre monocamadas auto-organizadas para determinação de açúcares em alimentos**. 2009. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Química Analítica, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

GASPAR, C. H. **Preparação e caracterização de nanocompósitos de nanopartículas metálicas com proteínas e suas aplicações em biossensores**. 2010. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Microelectrónica e Nanotecnologias) - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

GODIN, M. et al. Surface stress, kinetics, and structure of alkanethiol self-assembled monolayers. **Langmuir**, v. 20, n. 17, p. 7090-7096, 2004.

GOODING, J. J.; HIBBERT, D. B. The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 8; p. 525–533, 1999.

GRUBER, K. et al., Cantilever array sensors detect specific carbohydrate-protein interactions with picomolar sensitivity. **ACS Nano**, v. 5, n. 5, p. 3670–3678, 2011.

GUAN, Y. et al. Effective immobilization of tyrosinase via enzyme catalytic polymerization of L-DOPA for highly sensitive phenol and atrazine sensing. **Talanta**, v. 160, p. 125-132, 2016.

GUANG-PING, Z. et al. A Cantilever Array Sensor Platform Guided by Optical Fibers and Its Sensing Application. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 45, p. 42-47, 2017.

GUPTA, V. K. et al. Selective QCM sensor based on atrazine imprinted polymer: Its application to wastewater sample. **Sensors and Actuators B**, v. 218, p. 215-221, 2015.

HALLBERG, G. R. Pesticides pollution of groundwater in the humid United States. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 26, n. 3-4, p. 299-367, 1989.

HAN, Y.; UOSAKI, K. Effects of concentration and temperature on the formation process of decanethiol self-assembled monolayer on Au (111) followed by electrochemical reductive desorption. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 6196–6201, 2008.

HANSCH, C., LEO, A.; HOEKMAN, D. **Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants**, Washington DC: American Chemical Society, 1995.

HEGNER, M.; ARNTZ, Y. Advanced Biosensing Using Micromechanical Cantilever Arrays. **Methods in Molecular Biology**, v. 242, p. 39-49, 2004.

HERRMANN, P. S. P. et al. Microscopia de varredura por sonda: aspectos práticos e suas aplicações na nanociência e nanotecnologia. In: N. DURÁN, L.H.C.; MATTOSO, P.C. DE MORAIS. **Nanotecnologia Introdução, Preparação e Caracterização de Nanomateriais e Exemplos de Aplicação**. São Paulo: Artliber, 2006.

HIPOLITO-MORENO, A. et al. Non-aqueous flow-injection determination of atrazine by inhibition of immobilized tyrosinase. **Analytica Chimica Acta**, v. 362, p. 187-192, 1998.

HLELI, S. et al. Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated self-assembled monolayer. **Sensors and Actuators B**, v. 113, p. 711–717, 2006.

INOUYE, L. A. et al. Avaliação Morfológica do Fígado e do Pulmão Pós Intoxicação por Organofosforado, em Ratos Wistar. **Uniciências**, v. 18, n. 2, p. 103-109, 2014.

JANEGITZ, B. C. et al. Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 158, n.1, p. 411-417, 2011.

JAVARONI, A. C. R.; LANDGRAF, D. M.; REZENDE, O. O. M. Comportamento dos Herbicidas Atrazina e Alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 22, n. 1, 1999.

JOHNSON, B. N.; MUTHARASAN, R. Biosensing using dynamic-mode cantilever sensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 32, p. 1-18, 2012.

KARNATI, C. et al. Organophosphorus hydrolase multilayer modified microcantilevers for organophosphorus detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2636-2642, 2007.

KIM, G-Y. et al. Optimized coverage of gold nanoparticles at tyrosinase electrode for measurement of a pesticide in various water samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 156, p. 141-147, 2008.

KIM, H. H. et al. Highly sensitive microcantilever biosensors with enhanced sensitivity for detection of human papilloma virus infection. **Sensors and Actuators B**, v. 221, p.1372–1383, 2015.

KLECZKOWSKI, L. A. Inhibitors of photosynthetic enzymes/carriers and metabolism. **Plant Physiology Plant and Molecular Biology**, v. 45, p. 339-367, 1994.

KOROTKAYA, E. V. Biosensors: Design, Classification, and Applications in the Food Industry. **Foods and Raw Materials**, v. 2, n. 2, p. 161–171, 2014.

KREIDER, A. et al. Influence of immobilization protocol on the structure and function of surface bound proteins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 378–382, 2014.

KUKLENYIK, Z. et al. Two-dimensional high performance liquid chromatography separation and tandem mass spectrometry detection of atrazine and its metabolic and hydrolysis products in urine, **Journal of Chromatography B**, v. 901, p. 1–8, 2012.

LAGARDE, F.; JAFFREZIC-RENAULT, N. New Trends in Biosensors for Water Monitoring. In: Somerset, V. (Ed.), **Environmental Biosensors**. Croatia: InTech, 2011, cap. 6, p. 1-31.

LANG, H. P.; HEGNER, M.; GERBER, C. Nanomechanical Cantilever Array Sensors. In: Bhushan. B. (Ed.). **Springer Handbook of Nanotechnology**. Heidelberg, Berlin: Springer, 2010. cap. 15, p. 427-452.

LEATHERBARROW, R. J.; EDWARDS, P. R. Analysis of molecular recognition using optical biosensors. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 5, p. 544–547, 1999.

LEE, T. R. et al. Heterogeneous catalysis on platinum and self-assembled monolayers on metal and metal oxide surfaces. **Pure Applied Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 821-828, 1991.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEITE, F. L. et al. Evidências de detecção do herbicida atrazina por espectroscopia de força atômica: uma ferramenta promissora para sensoriamento ambiental. **Acta Microscopica**, v. 24, n. 1, p. 53-63, 2015.

LEITE, F. L. et al. Study on the adsorption of poly(o-ethoxyaniline) nanostructured films using atomic force microscopy. **Polymer**, v. 46, n. 26, p. 12503–12510, dez. 2005.

LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**, 78. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997.

LIN, Z. et al. Short-term oral atrazine exposure alters the plasma metabolome of male C57BL/6 mice and disrupts a-linolenate, tryptophan, tyrosine and other major metabolic pathways. **Toxicology**, v. 326, p. 130-141, 2014.

LIU, R. et al. Core-shell nanostructured molecular imprinting fluorescent chemosensor for selective detection of atrazine herbicide. **Analyst**, v. 136, n. 1, p. 184–90, 2011.

LIU, X. et al. SPR quantitative analysis of direct detection of atrazine traces on Au-nanoparticles: Nanoparticles size effect. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 218, p. 1-7, 2015.

LIU, Z.; FU, Z.; JIN, Y. Immunotoxic effects of atrazine and its main metabolites at environmental relevant concentrations on larval zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 166, p. 212-220, 2017.

LONG, F.; ZHU, A.; SHI, H. Recent Advances in Optical Biosensors for Environmental Monitoring and Early Warning. **Sensors**, v. 13, n. 10, p. 13928–13948, 2013.

LOOS, R.; NIESSNER, R. Analysis of atrazine, terbutylazine and their *N*-dealkylated chloro and hydroxy metabolites by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis–ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 835, p. 217-229, 1999.

LOURENCETTI, C. et al. Avaliação do potencial de contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: comparação entre métodos de previsão de lixiviação. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, 2005.

LUPETTI, K.O.; RAMOS, L.A.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*). **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 197-201, 2003.

MALEKI, N. et al. Ultra trace adsorptive stripping voltammetric determination of atrazine in soil and water using mercury film electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 581, p. 37–41, 2007.

MALIK, P. et al. Nanobiosensors: Concepts and Variations. **International Scholarly Research Notices**, vol. 2013, p. 1- 9, 2013.

MANZOLI, A. et al. Funcionalização da superfície de microcantilevers utilizados em microscopia de força atômica com biomoléculas. Embrapa, **Circular Técnica 53**, 2010.

MARGARIDO, A. **Desenvolvimento de biossensor baseado em microcantilever funcionalizado com biomoléculas para a detecção de alcoóis de cadeia curta**. 2016. 141 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

MATUSCHEK, E.; SVANBERG, U. The effect of fruit extracts with polyphenol oxidase (PPO) activity on the in vitro accessibility of iron in high-tannin sorghum. **Food Chemistry**, v. 90, p. 765-771, 2005.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENDES, C. C. A. **Estudo teórico da seletividade e do solvente em um nanobiossensor de herbicidas inibidores da acetil-coenzima a carboxilase**. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

MEYER, E. Atomic force microscopy. **Progress in Surface Science**, v. 41, p. 3-49, 1992.

MIN, K. et al. Enzyme immobilization on carbon nanomaterials: Loading density investigation and zeta potential analysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 83, p. 87-93, 2012.

MOCCELINI, S. K. **Sensores modificados com monocamadas autoorganizadas de tióis para determinação de dopamina, tiodicarbe e catequina.** 2011. 138 f. Tese (Doutorado em Química) – Química Analítica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MUKHERJEE, D. et al. Controlling the Morphology of Photosystem I Assembly on Thiol-Activated Au Substrates. **Langmuir**, v. 26, n. 20, p. 16048–16054, 2010.

NAKAMURA, M; ARAKI, K. E; TOMA, H. E. Probing magnetic and gold nanoparticles by using ultrasensitive sensors. **Nanoscale**, v. 2, n. 12, p. 2583-2586, 2010.

OLIVEIRA, D. P. C. et al. Biossensor eletroquímico baseado na enzima tirosinase para a determinação de fenol em efluentes. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 924-931, 2015.

OLIVEIRA, G. S. et al. Molecular modeling of enzyme attachment on AFM probes. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 45, p. 128-36, 2013.

OLIVEIRA JR, R. S. Mecanismo de Ação de Herbicidas. In: OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e Manejo de Planta Daninhas.** Curitiba, PR: Omnipax, 2011.

OLIVEIRA, M. D. L. **Estudo bioeletroquímico de nanosistemas híbridos de nanopartículas de ouro e lectinas para o desenvolvimento de sensores.** 2008. 174 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized  $\beta$  - Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-16, 2010.

PEPINO, R. O. **Desenvolvimento de géis e esponjas de quitosana e blendas quitosana/gelatina em ácido adípico.** 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Química Analítica e Inorgânica, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

PEREIRA, P. M. **Avaliação do potencial de fungos na degradação do herbicida atrazina.** 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011a.

PEREIRA, S. V. **Degradação da atrazina pelo processo uv/h<sub>2</sub>o<sub>2</sub> e ozônio, identificação dos intermediários e avaliação da atividade estrogênica.** 2011. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011b.

PERES, F; MOREIRA, J.C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PERONE, C.A.S.; CAPOBIANCO, M.P.; PAPARELI JUNIOR, S. Caracterização cinética da enzima polifenol oxidase, usando extrato bruto da casca de banana nanica (*Musa acuminata*). **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 201-206, 2008.

PERONE, C.A.S. et al. Determinação espectrofotométrica e amperométrica de compostos fenólicos em urina humana, usando extrato parcialmente purificado de banana nanica (*Musa acuminata*). **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 23, n. 4, p. 253-259, 2005.

PICHETSURNTHORN, P.; VATTIPALLI, K.; PRASAD, S. Nanoporous impedemetric biosensor for detection of trace atrazine from water samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 32, p. 155-162, 2012.

POLESEL, D. N.; SINHORINI, A. L. C.; PERONE, C. A. S. Caracterização cinética da enzima catecolase (*Polifenol oxidase*) em extratos brutos da polpa e da casca de berinjela (*Solanum melongena L.*). **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 28, n. 2, p. 175-180, 2010.

PRIETO, C. S. L.; **Neurotoxicidade de pesticidas organofosforados durante o desenvolvimento: alterações bioquímicas e comportamentais**. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2013.

RADOSEVICH, M. et al. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1; p. 297-302, 1995.

RAITERI, R.; GRATTAROLA, M.; BERGER, R. Micromechanics senses biomolecules. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 5, n. 1, p. 22-29, 2002.

RAITERI, R. et al. Micromechanical cantilever-based biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 79, n. 2-3, p. 115-126, 2001.

ROBB, D. A.; GUTERRIDGE, S. Polypeptide composition of two fungal tyrosinases. **Phytochemistry**, v. 20, n. 1, p. 1481- 1485, 1981.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, N. et al. Determination of triazine herbicides in seaweeds: Development of a sample preparation method based on Matrix Solid Phase Dispersion and Solid Phase Extraction Clean-up. **Talanta**, v. 121, p. 194-198, 2014.

RODRIGUES, L. F. **Desenvolvimento de nanobiossensores utilizando cantileveres inteligentes para detecção do herbicida mesotriona e do vírus da tristeza dos citros**. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2015.

RÓZ, A. L. et al. **Nanoestruturas: princípios e aplicações**. Nanociência e Nanotecnologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

RUMAYOR, V. G. et al. **Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria**. Madrid: Comunidad de Madrid y la Universidad Complutense de Madrid, 2005.

- SANG, S.; ZHANG, W.; ZHAO, Y. Review on the Design Art of Biosensors. In: Rinken, T. (Ed.), **State of the Art in Biosensors - General Aspects**. Croácia: InTech, 2013, cap. 4, p. 89-110.
- SANG, S. et al. Surface stress-based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 51, p. 124-135, 2014.
- SCHMIDT, T. F. et al. Enhanced activity of horseradish peroxidase in Langmuir–Blodgett films of phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, n. 2291–2297, 2008.
- SHAN, C. et al. Graphene/AuNPs/chitosan nanocomposites film for glucose biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 1070–1074, 2010.
- SEKHON, B. S. Nanotechnology in agri-food production: an overview. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 7, p. 31-53, 2014.
- SILVA, A. C. N. **Estudo de “superfícies inteligentes” para desenvolvimento de nanobiossensores**. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 2012.
- SILVA, A. C. N. et al. Nanobiosensors based on chemically modified AFM probes: a useful tool for metsulfuron-methyl detection. **Sensors**, v. 13, p. 1477-1489, 2013.
- SOLOMON, K. R. et al. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. Annual Review. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 15, n.1, p. 31-76, 1996.
- STAYNER, L. T. et al. Atrazine and nitrate in drinking water and the risk of preterm delivery and low birth weight in four Midwestern states. **Environmental Research**, v. 152, p. 294–303, 2017.
- STEFFENS, C. et al. Bio-inspired sensor for insect pheromone analysis based on polyaniline functionalized AFM cantilever sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 191, p. 643-649, 2014.
- TAMAYO, J. et al. Biosensors Based on Nanomechanical Systems. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 3, p. 1287-1311, 2013.
- TAN, J. L.; TIEN, J.; CHEN, C. S. Microcontact Printing of Proteins on Mixed Self-Assembled Monolayers. **Langmuir**, v. 18, n. 2, p. 519–523, 2002.
- TANG, Y. et al. Detection of Femtomolar Concentrations of HF Using an SiO<sub>2</sub> Microcantilever. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 9, p. 2478-2481, 2004.
- THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121–131, 2001.

THÉVENOT, D. R. et al. International Union of Pure and Applied Chemistry Physical Chemistry Division, Steering Committee on Biophysical Chemistry Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry) Electrochemical biosensors: proposed definitions and classification Synopsis of the report. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 30, n. 1, p. 81, 1996.

THUNDAT, T. Microcantilevers for physical, chemical, and biological sensing. **Sensors and Sensing in Biology and Engineering**, v. 63, p. 337-355, 2008.

THUNDAT, T.; ODEN, P. I.; WARMACK, R. J. Microcantilever sensors. **Microscale Thermophysical Engineering**, v. 1, p. 185-199, 1997.

TOMLIN, C. **The Pesticide Manual**. 10. ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1994.

TORTOLINI, C. et al. Inhibition-based biosensor for atrazine detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 224, p. 552-558, 2016.

VAHABI, S.; SALMAN, B. N.; JAVANMARD, A. Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 38, n. 2, p. 76-83, 2013.

VALENCIA, G. A. **Transporte eletrônico em biofilmes nanoestruturados para biossensores a base de enzimas**. 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Ciências da Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2013.

VAMOS-VIGYAZO, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, p. 49-127, 1981.

VASCONCELOS, F. C. W. **Transporte de atrazine influenciado por calagem e adubação fosfatada em ambientes de latossolos da Bacia do Rio das Mortes (MG)**. 2007. 119 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

VASILESCU, M. N.; MEDVEDOVICI, A. V. Herbicides General Considerations. **Biodegradation**. p. 243-260, USA: Elsevier, 2005.

VÉDRINE, C.; FABIANO, S.; TRAN-MINH, C. Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support. **Talanta**, v. 59, p. 535- 544, 2003.

VELANKI S.; JI, H. Detection of feline coronavirus using microcantilever sensors. **Measurement Science and Technology**, v. 17, p. 2964-2968, 2006.

VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of total phenols using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as enzymatic source. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, p. 111-118, 1998.

- VOGEL, A. et al. Effects of atrazine exposure on male reproductive performance in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 72, p. 14-21, 2015.
- WANG, C. et al. Ultrasensitive biochemical sensors based on microcantilevers of atomic force microscope. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 1, p. 1-11, 2007.
- WANG, J. Nanomaterial-Based Amplified Transduction of Biomolecular Interactions. **Small**, v. 1, n. 11, p. 1036 -1043, 2005.
- WANG, X.; LU, X.; CHEN, J. Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 2, p. 25-32, 2014.
- WHITEHOUSE, P., RANNARD, S. The application of nanodispersions to agriculture. **Outlook Pest Manag**, v. 21, n. 4, p. 190–192, 2010.
- XING, H. et al. Assessment of pesticide residues and gene expression in common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos: Health risk assessments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 491-498, 2015.
- YU, J.; LIU, S.; JU, H. Mediator-free phenol sensor based on titania sol–gel encapsulation matrix for immobilization of tyrosinase by a vapor deposition method. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 509-514, 2003.
- YU, Z. et al. Fabrication of a Novel Atrazine Biosensor and Its Subpart-per-Trillion Levels Sensitive Performance. **Environmental Science e Technology**, v. 44, n. 20, p. 7878-7883, 2010.
- YU-CHENG, L. et al. The enhancement method of optical fiber biosensor based on surface plasmon resonance with cold plasma modification. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 133, p. 370-373, 2008.
- ZACHARIA, J. T. Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides. In: Stoytcheva, M. (Ed.), **Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis, Dr. Margarita Stoytcheva**. Croácia: InTech, 2011, cap. 1, p. 1-19.
- ZHAO, R. S. et al. Application of bamboo charcoal as solid-phase extraction adsorbent for the determination of atrazine and simazine in environmental water samples by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detector. **Talanta**, v. 76, p. 956-959, 2008.
- ZHAO, Z.; JIANG, H. Enzyme-based Electrochemical Biosensors. In: Serra, P. A. (Ed.), **Biosensors**. Croatia: InTech 2010, cap. 1, p. 1-23.