

**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**

**DANIELA KUNKEL MUENCHEN**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR NANOESTRUTURADO DE**  
**CANTILEVER UTILIZANDO PEROXIDASE DE FONTE VEGETAL PARA**  
**DETECÇÃO DE GLIFOSATO EM ÁGUA**

**ERECHIM – RS**

**2017**

**DANIELA KUNKEL MUENCHEN**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR NANOESTRUTURADO DE  
CANTILEVER UTILIZANDO PEROXIDASE DE FONTE VEGETAL PARA  
DETECÇÃO DE GLIFOSATO 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>. Clarice Steffens

Dr<sup>a</sup>. Juliana Steffens

**Co-orientador:** Dr. Fabio de Lima Leite

**ERECHIM – RS**

**2017**

**DANIELA KUNKEL MUENCHEN**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR NANOESTRUTURADO DE  
CANTILEVER UTILIZANDO PEROXIDASE DE FONTE VEGETAL PARA  
DETECÇÃO DE GLIFOSATO 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, 13 de março de 2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Fabio de Lima Leite  
UFSCar - Sorocaba

---

Prof. Dr. Rubens Bernardes Filho  
Embrapa Instrumentação

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geciane Toniazzo 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**

Dedico este trabalho aos meus pais, Neiva e Nelmo, por todo o amor e incentivo, por sempre acreditarem em minha capacidade. AMO VOCÊS!

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter colocado em meu caminho tantas pessoas especiais e momentos que me fizeram evoluir.

Aos meus pais, Neiva e Nelmo, que sempre apoiaram minhas escolhas e me motivaram a continuar, mesmo nos momentos em que a saudade de casa aparecia. Aos demais familiares, em especial a minha vó Nicolina pelo seu carinho, sorriso e orações, e ao meu vô Egon (*in memoriam*) por sempre ter incentivado meus estudos e, agora, iluminar meu caminho.

Ao meu namorado Rodrigo pelos abraços que traziam bem-estar, pelas viagens a Erechim, por sua compreensão e paciência em mais esta etapa. Como é bom ter você em minha vida! A família Wentroba, por entender os momentos de ausência e me apoiar.

As minhas orientadoras, Prof<sup>a</sup>. Clarice Steffens e Prof<sup>a</sup>. Juliana Steffens, pela orientação, auxílio, ideias, atenção e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho. Ao meu co-orientador, Prof. Fabio de Lima Leite, pela colaboração e suporte com reagentes.

As anjinhas Janine, Alexandra, Mariane e Glaciela pelos momentos compartilhados durante o mestrado. Com certeza, nossos caminhos não se cruzaram por acaso.

As companheiras do grupo de nanotecnologia (Janine, Alexandra, Aline e Alana) e ao bolsista Mateus pela ajuda durante os experimentos.

A Alexandra Manzoli pelas contribuições dadas em todas as etapas deste estudo.

A Ilizandra Fernandes por toda a colaboração e ajuda prestadas.

Ao Prof. Rogério Dallago (URI) e ao Prof. Renato Zanella (UFSC) pelo fornecimento do padrão analítico de glifosato.

Ao Flavio Makoto (USP) pela colaboração na funcionalização dos cantilevers.

Ao Prof. Claudio Zakrzewski (URI) pela ajuda com o sistema de resfriamento do microscópio de força atômica.

Ao Carlos Costa (LNNano) pela disponibilidade e suporte com as análises no microscópio de força atômica.

Ao pesquisador Rubens Bernardes Filho (Embrapa Instrumentação) pelo auxílio e disponibilidade na análise de topografia e de espessura.

Aos membros da banca avaliadora por suas sugestões.

Aos vizinhos de Roque Gonzales e Erechim pela amizade, apoio e momentos de diversão.

A URI – Erechim pela infraestrutura e a Capes/Embrapa pelo auxílio financeiro.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI – Erechim, pessoal da Central de Materiais, Embrapa Instrumentação e USP que colaboraram direta ou indiretamente neste trabalho.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse possível.

**Muito Obrigada!**

*“A vida é um grande espetáculo. Só não consegue homenageá-la quem nunca penetrou dentro de seu próprio ser e percebeu como é fantástica a construção da sua inteligência.”*

*(Augusto Cury)*

## RESUMO

O glifosato é o pesticida mais utilizado nas plantações agrícolas para controle de ervas daninhas, mas com sua utilização, os corpos d'água acabam sendo atingidos e a qualidade da água pode ficar comprometida. Neste contexto, dispositivos de sensoriamento têm surgido como uma alternativa aos métodos tradicionais de análise para monitoramento da contaminação nestes ambientes. No presente estudo, foi desenvolvido um biossensor nanoestruturado baseado em cantilever funcionalizado com peroxidase de fonte vegetal para a detecção do herbicida glifosato em água. Para isso, foi realizada uma investigação sistemática, desde a definição da camada sensora, sua forma de imobilização na superfície do cantilever até a etapa de reconhecimento do analito, por meio da análise no microscópio de força atômica. O extrato vegetal de peroxidase foi obtido a partir da abobrinha, em diferentes condições de extração (pH 7,0; 6,5 e 6,0 e na ausência ou presença de agente protetor), onde o extrato enzimático obtido a pH 7,0 na ausência de agente protetor apresentou a melhor estabilidade da atividade enzimática sob armazenamento a 4°C durante 70 dias, mantendo-se com cerca de 80% de atividade residual, sendo esta condição aplicada como camada sensora. A técnica empregada na funcionalização do cantilever foi a de monocamadas automontadas (SAM), onde a imobilização da peroxidase foi realizada por meio da utilização de agentes de reticulação. A análise de espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS) demonstrou a existência das bandas amida I e amida II, características da enzima peroxidase, sobre a superfície do cantilever, enquanto que pela microscopia de força atômica (AFM) foi possível verificar a presença de aglomerados no formato de colunas sobre a superfície e as alterações de rugosidade entre as etapas de funcionalização, bem como determinar a espessura total das camadas depositadas sobre o cantilever (80,48 nm). O biossensor nanoestruturado foi capaz de detectar, na ordem de ppb (0,01 mg/L), o herbicida glifosato em água, indicando que a camada sensora foi adequada para o monitoramento deste poluente ambiental e apresentando resposta durante 25 dias de armazenamento a seco a 4°C. A detecção baseou-se nas mudanças de tensão de superfície provocadas pela adsorção do glifosato na camada sensora, provavelmente ocasionando uma alteração conformacional na estrutura da enzima. Assim, o método de detecção proposto para o glifosato se apresenta como uma ferramenta analítica promissora na área ambiental.

**Palavras-chave:** Dispositivo de biossensoriamento. Abobrinha. Monocamadas automontadas. Agentes de reticulação. Microscópio de força atômica.

## ABSTRACT

Glyphosate is the most commonly used pesticide in agricultural crops for weed control, but with its use, water bodies are hit and water quality can be compromised. In this context, biosensing devices have emerged as an alternative to traditional methods of analysis to monitor contamination in these environments. In the present study, a nanostructured biosensor based on cantilever functionalized with vegetable source peroxidase was developed for the detection of glyphosate herbicide in water. A systematic investigation was carried out, from the definition of the sensor layer, its immobilization form on the surface of the cantilever, until the stage of recognition of the analyte through the analysis in the atomic force microscope. The vegetable extract of peroxidase was obtained from the zucchini under different extraction conditions (pH 7,0; 6,5 and 6,0 and absence or presence of protective agent), where the enzymatic extract obtained at pH 7,0 in the absence of protective agent showed the best stability of the enzymatic activity under storage at 4°C for 70 days, remaining with about 80% of residual activity, being this condition applied as a sensor layer. The technique employed in cantilever functionalization was that of self - assembled monolayers (SAM), and the immobilization of vegetable source peroxidase was carried out through the use of crosslinking agents. The analysis of polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS) demonstrated the presence of the amide I and amide II bands, characteristic of the peroxidase enzyme, on the cantilever surface, whereas by atomic force microscopy (AFM) it was possible to verify the presence of agglomerates in the column format on the surface and the roughness changes between the functionalization steps, as well as to determine the total thickness of the layers deposited on the cantilever (80,48 nm). The cantilever nanobiosensor, functionalized with peroxidase, was able to detect the glyphosate herbicide in water in the ppb range (0,01 mg/L), indicating that the sensor layer was adequate for the monitoring of this environmental pollutant and presenting a response during 25 days of dry storage at 4°C. Detection was based on the surface tension changes caused by adsorption of glyphosate in the sensor layer, probably leading to a conformational change in the structure of the enzyme. Thus, the proposed detection method for glyphosate appears as a promising analytical tool in the environmental area.

**Keywords:** Biosensing device. Zucchini. Self - assembled monolayers. Crosslinking agents. Atomic force microscopy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do glifosato.....	22
Figura 2 - Etapas da dissociação do glifosato .....	23
Figura 3 - Representação esquemática de um biossensor exposto a contaminantes ambientais .....	28
Figura 4 - Representação de um cantilever .....	31
Figura 5 - Principais modos de operação de um biossensor de cantilever .....	32
Figura 6 - Componentes do microscópio de força atômica.....	35
Figura 7 - Representação da técnica de monocamadas automontadas .....	37
Figura 8 - Representação da estrutura terciária da HRP contendo o grupo heme (vermelho), dois átomos de cálcio (azuis), estrutura hélice- $\alpha$ (roxo) e estrutura folha- $\beta$ (amarelo).....	39
Figura 9 - Ciclo catalítico da peroxidase.....	40
Figura 10 - Visão geral das etapas desenvolvidas no presente estudo.....	42
Figura 11 - (a) Aparência exterior e (b) interior da abobrinha .....	44
Figura 12 - Reação catalisada pela peroxidase .....	45
Figura 13 - (a) Vista lateral e (b) Vista superior com as características geométricas do cantilever utilizado para o experimento .....	47
Figura 14 - Modo de imersão do cantilever para funcionalização.....	49
Figura 15 - Monitoramento da deflexão por meio do método de feixe óptico.....	51
Figura 16 - Imersão do cantilever em meio líquido para obtenção da resposta no microscópio de força atômica.....	52
Figura 17 - Microscópio de força atômica com sistema de resfriamento acoplado em uma caixa de MDF. (a) Controlador C3000, (b) Mesa anti-vibratória, (c) Porta Amostra, (d) Cabeçote, (e) Controlador Easyscan 2, (f) Fonte do sistema Peltier, (g) Controlador digital externo de temperatura, (h) Caixa de MDF acoplada ao microventilador externo .....	54
Figura 18 - Estabilidade da atividade enzimática de peroxidase dos extratos brutos obtidos em solução tampão fosfato de sódio 0,1M (a) pH 7,0; (b) pH 6,5 e (c) pH 6,0.....	57
Figura 19 - Influência do pH na medida do potencial zeta do extrato bruto de abobrinha .....	59
Figura 20 - Representação esquemática da funcionalização do cantilever com peroxidase de fonte vegetal por meio da técnica de SAM. Deposição das camadas de (a) ácido 16-MHD, (b) EDC, (c) NHS, (d) peroxidase.....	61

Figura 21 - Espectro PM-IRRAS das etapas de funcionalização do cantilever. (a) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD; (b) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS; (c) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS + Peroxidase .....	62
Figura 22 - Imagens 2D da superfície do cantilever durante as etapas de construção do biossensor nanoestruturado. (a) Silício – cantilever não funcionalizado. Deposição das camadas de (b) ouro, (c) ácido 16-MHD, (d) EDC/NHS, (e) peroxidase .....	64
Figura 23 - Resposta do biossensor nanoestruturado exposto a água e a várias concentrações de glifosato e do cantilever não funcionalizado (branco) exposto a concentração de 0,1 mg/L de glifosato .....	68
Figura 24 - Resposta do biossensor nanoestruturado exposto a concentração de 0,1 mg/L de glifosato no dia inicial e no 8º e 25º dia de armazenamento .....	71
Figura 25 - Resposta do biossensor nanoestruturado exposto a concentração de 0,05 mg/L de mesotriona .....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos limites máximos permitidos para glifosato em água potável .....	26
Tabela 2 - Comparação de técnicas cromatográficas empregadas para a detecção de glifosato .....	27
Tabela 3 - Características dos biossensores relatados para a detecção de glifosato .....	30
Tabela 4 - Reagentes utilizados para a realização do trabalho experimental .....	43
Tabela 5 - Atividade enzimática e atividade residual de peroxidase no extrato bruto de abobrinha .....	58
Tabela 6 - Valores da raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) da superfície para as etapas de construção do biossensor nanoestruturado .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCCase – Acetil-coA Carboxilase

Ácido 16-MHD – Ácido 16-mercaptohexadecanóico

AFM – Microscopia de força atômica (do inglês, *Atomic Force Microscopy*)

ALS – Acetolactato sintase

AMPA – Ácido aminometilsulfônico (do inglês, *Aminomethylphosphonic acid*)

APTES – 3-aminopropiltrietoxissilano

CC – Corrente contínua

CG – Cromatografia gasosa

CI – Cromatografia de troca iônica

CL – Cromatografia líquida

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLUE – Cromatografia líquida de ultra eficiência

CNBF – 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

DQO – Demanda química de oxigênio

EDC – N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

EPSPs – enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (do inglês, *Enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase*)

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FIP – Coronavírus felino (do inglês, *Feline coronavirus*)

FMOC – 9-fluorenilmetoxicarbonil

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

HPPD – 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (do inglês, *4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase*)

HPV – Papilomavírus Humano (do inglês, *Human papillomavirus*)

HRP – Peroxidase extraída de rábano (do inglês, *Horseradish peroxidase*)

MDF – Fibra de média densidade (do inglês, *Medium-Density Fiberboard*)

MS – Espectrometria de massa (do inglês, *Mass Spectrometry*)

NHS – N-hidroxisuccinimida

OPH – Organosfosforado hidrolase (do inglês, *Organophosphorus hydrolase*)

P.A. – Padrão analítico

PEI – Polietilenoimina

pKa – Logaritmo negativo da constante de dissociação

PM-IRRAS – Espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (do inglês, *Polarization-Modulated Infrared Reflection Absorption Spectroscopy*)

ppb – Partes por bilhão

PSS – Poliestireno sulfonado

PVP – Polivinilpirrolidona

r.p.m. – Rotações por minuto

Rms – Raiz quadrada da média da rugosidade (do inglês, *Root mean square roughness*)

SAM – Monocamadas automontadas (do inglês, *Self-Assembled Monolayers*)

TFAA – Ácido trifluoroacético anidro (do inglês, *Trifluoroacetic anhydride*)

TFE – Trifluoroetanol

UV/Vis – Ultravioleta/visível

V – Volts

$\lambda$  – Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1 Pesticidas como contaminantes em águas</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2 Glifosato</b> .....	<b>21</b>
3.2.1 Comportamento ambiental.....	24
3.2.2 Métodos tradicionais de detecção.....	25
<b>3.3 Dispositivos de biossensoriamento</b> .....	<b>27</b>
3.3.1 Biossensores para a detecção de glifosato .....	29
<b>3.4 Biossensores de cantilever</b> .....	<b>30</b>
3.4.1 Funcionalização de cantileveres com biomoléculas .....	36
<b>3.5 Enzima peroxidase</b> .....	<b>39</b>
<b>3.6 Considerações sobre o estado da arte</b> .....	<b>41</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1 Extrato bruto contendo peroxidase</b> .....	<b>43</b>
4.1.1 Preparação do extrato bruto .....	44
4.1.1.1 Influência das condições de extração.....	44
4.1.2 Determinação da atividade enzimática .....	45
4.1.2.1 Estabilidade à armazenagem a 4°C .....	46
4.1.3 Potencial Zeta.....	46
<b>4.2 Desenvolvimento do biossensor nanoestruturado de cantilever</b> .....	<b>47</b>
4.2.1 Limpeza da superfície do cantilever .....	48
4.2.2 Funcionalização da superfície do cantilever para obtenção do biossensor.....	48
4.2.3 Caracterização da superfície do biossensor .....	49
4.2.3.1 Espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS) .....	50
4.2.3.2 Microscopia de força atômica (AFM).....	50
<b>4.3 Aplicação do biossensor nanoestruturado na detecção do herbicida glifosato</b> .....	<b>51</b>
4.3.1 Obtenção da resposta no microscópio de força atômica.....	52
4.3.2 Resposta ao herbicida glifosato.....	54

4.4 Teste complementar – resposta do biossensor nanoestruturado ao herbicida mesotriona .....	55
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
5.1 Obtenção e estabilidade do extrato bruto contendo peroxidase .....	56
5.1.1 Potencial Zeta.....	58
5.2 Desenvolvimento do biossensor nanoestruturado .....	60
5.2.1 Caracterização da superfície do biossensor .....	62
5.2.1.1 Espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS) .....	62
5.2.1.2 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	63
5.3 Aplicação do biossensor nanoestruturado na detecção do herbicida glifosato .....	67
5.4 Teste complementar – resposta do biossensor nanoestruturado ao herbicida mesotriona .....	72
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda por água doce, bem essencial à vida, vem aumentando em decorrência do rápido e elevado crescimento populacional. Além da maior necessidade de água para abastecimento humano e uso industrial, esse fator resulta também em um aumento da produção de alimentos, que por sua vez, exige a utilização da água para irrigação de culturas agrícolas e o uso abundante de produtos químicos, como os pesticidas, para aumentar a produtividade e garantir a colheita (WHO, 2015; WWAP, 2015).

Entre os pesticidas mais utilizados na agricultura, o herbicida glifosato ocupa a posição de destaque (DUN et al., 2014), apresentando elevada eficácia no controle de ervas daninhas em culturas como soja, milho e algodão (POLLEGIONI, SCHONBRUNN, SIEHL, 2011). Após a introdução de culturas geneticamente modificadas, sua utilização agrícola global aumentou rapidamente: em 1995 foram aplicados 51 milhões de kg enquanto que em 2014, 747 milhões de kg, um aumento de 14,6 vezes. Além disso, apenas na última década, o uso total mundial de glifosato (agrícola e não agrícola) foi de 6,1 bilhões de kg aplicados, representando 71,6% do consumo total entre os anos de 1974-2014 (BENBROOK, 2016).

Em razão destes dados, há uma grande probabilidade dos corpos d'água (rios e lagos) serem contaminados por esse composto e, como o sistema de tratamento convencional para água potável não o elimina, a qualidade da água para o uso, incluindo para os processos produtivos industriais, como nas indústrias de alimentos, pode ficar comprometida, representando um grave risco para a saúde.

A legislação brasileira atual estabelece como limite máximo permitido de glifosato em água potável o valor de 0,5 mg/L (BRASIL, 2011), ao passo que para águas superficiais, esse limite é ainda mais baixo, 0,065 mg/L para águas de classe 1 e 2, e 0,28 mg/L para águas de classe 3 (BRASIL, 2005). Assim, para sua detecção, são necessários métodos analíticos altamente sensíveis (GOMEZ-CABALLERO et al., 2016).

Os métodos tradicionais de análise, como a cromatografia, apesar de sensíveis, com limites de detecção na ordem de alguns  $\mu\text{g/L}$ , geralmente envolvem uma longa etapa de preparação de amostra em decorrência da necessidade de derivatizações, o que faz com que as análises sejam complexas e demoradas (ALEXA et al., 2015; APARÍCIO et al., 2013).

Desta forma, o desenvolvimento de metodologias mais rápidas, mas ainda assim sensíveis para a detecção de glifosato em águas é relevante. Neste sentido, com o avanço da nanotecnologia, a deposição de filmes nanoestruturados sobre cantileveres, derivados de experiências de microscopia de força atômica (AFM), para uso como biossensor, se apresenta

como uma alternativa promissora, pois estes dispositivos apresentam alta sensibilidade, por causa do seu tamanho miniaturizado, o que resulta em uma maior área superficial, e do uso de uma camada sensora específica, e permitem o processamento de amostras em tempo real (VASHIST, 2007).

Um biossensor consiste de um componente de reconhecimento biológico (enzima, célula, antígeno, entre outros) diretamente acoplado a um transdutor, como, por exemplo, o cantilever. Dependendo do analito de interesse, o cantilever necessita ser revestido (funcionalizado) com uma camada sensora biológica específica (SANG, ZHANG, ZHAO, 2013).

Dentre as técnicas que podem ser utilizadas para a funcionalização, encontra-se a de monocamadas automontadas (SAM), caracterizada pela formação espontânea de camadas ordenadas e organizadas sobre uma superfície sólida, por meio de interação entre grupos químicos (AWASTHI et al., 2016). Logo, ao se planejar a funcionalização da superfície do cantilever é essencial a seleção adequada e conhecimento das moléculas que irão fazer parte do sistema, para assim prever como os grupos presentes nas extremidades irão se ligar, e desse modo, tornar efetiva a imobilização do agente biológico.

Para a detecção do herbicida glifosato, a enzima peroxidase tem grande potencial para ser aplicada como camada sensora, em razão de que tem sua atividade inibida na presença do herbicida e também já ter sido utilizada como elemento de reconhecimento biológico em biossensores (OLIVEIRA et al., 2012a; SONGA et al., 2009). Além disso, a peroxidase é amplamente encontrada em tecidos vegetais, como por exemplo, na abobrinha, o que torna sua extração de tal fonte uma alternativa economicamente viável na construção de dispositivos de biossensoriamento (FATIBELLO-FILHO, VIEIRA, 2002).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo é desenvolver um biossensor nanoestruturado por meio da funcionalização de cantilever com o extrato bruto de abobrinha, fonte da enzima peroxidase, para aplicação na detecção do herbicida glifosato em água.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver um biossensor nanoestruturado baseado em cantilever funcionalizado com extrato vegetal de peroxidase para a detecção do herbicida glifosato em água.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*), em diferentes condições de extração (diferentes pHs e na ausência e presença de agente protetor), como fonte da enzima peroxidase.
- Avaliar a estabilidade da atividade da peroxidase nos extratos brutos sob armazenamento a 4°C.
- Funcionalizar quimicamente a superfície do cantilever com o extrato bruto de abobrinha por meio da técnica de monocamadas automontadas (SAM), utilizando agentes de reticulação (EDC/NHS).
- Caracterizar a superfície do biossensor por meio das técnicas de espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS) e microscopia de força atômica (AFM).
- Avaliar a resposta do biossensor nanoestruturado para a detecção do herbicida glifosato em água.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item será apresentada uma breve revisão bibliográfica a respeito da contaminação de corpos hídricos por pesticidas, dando ênfase nas características, toxicidade, comportamento e métodos de detecção do herbicida glifosato, além da importância da utilização da nanotecnologia em dispositivos de biossensoriamento como método alternativo no monitoramento desse poluente em águas.

#### 3.1 Pesticidas como contaminantes em águas

A água é um recurso natural essencial para a existência de todos os organismos vivos, porém é distribuída em quantidade desigual em relação ao tempo e espaço (TANG et al., 2014). Apenas 2,5% de toda a água que cobre a Terra é água doce, e desta, somente 0,4% se encontra como água de superfície ou atmosférica, e, portanto, disponível para uso (UNESCO, WMO, IAEA, 2006).

As águas de superfície, que são uma das principais fontes de água potável para abastecimento público e uso industrial (VAN TOAN et al., 2013), tem sua qualidade influenciada tanto por condições naturais, através da lixiviação natural da matéria orgânica e nutrientes do solo por fatores hidrológicos e dos processos biológicos no ambiente aquático, quanto de atividades humanas, industriais ou agrícolas, tais como geração de efluentes, contaminantes químicos ou resíduos diversos (UNEP GEMS/WATER PROGRAMME, 2008). Dentre os contaminantes químicos de ambientes aquáticos, os principais são os pesticidas, os hidrocarbonetos e os metais (DÍAZ et al., 2007).

Os pesticidas são substâncias ou misturas de substâncias, naturais ou sintéticas, utilizadas com o objetivo de controlar, eliminar ou alterar a fisiologia (evolução natural) de um organismo vivo capaz de afetar ambientes agrícolas, domésticos e comerciais (EPA, 2016b).

Embora o uso de pesticidas tenha se tornado essencial para a agricultura moderna, constituindo-se como estratégia de defesa agrícola (WAICHMAN, 2012), seu destino no ambiente pode ser diferente da espécie de praga-alvo, e dessa maneira, causar a contaminação do solo (SUN et al., 2016), do ar (YUSA, COSCOLLA, MILLET, 2014), da água (CCANCCAPA et al., 2016) e dos alimentos (TETTE et al., 2016).

Isso acontece porque, após atingirem o solo, seja por pulverização em plantas ou aplicação direta, o comportamento dos pesticidas é regido por processos físicos, químicos e

biológicos (ARIAS-ESTÉVEZ et al., 2008). Processos como adsorção-dessorção, volatilização, absorção pelas raízes da planta, escoamento superficial e lixiviação controlam diretamente o transporte do pesticida no solo e sua transferência para a água, ar ou alimentos, enquanto que sua transformação pode ocorrer pela degradação biológica, química e/ou fotoquímica (GAVRILESCU, 2005).

A transferência dos pesticidas do solo para as águas pode atingir tanto as águas superficiais como as subterrâneas. A contaminação das águas superficiais ocorre com o escoamento do pesticida na superfície do terreno, quando este se encontra adsorvido às partículas do solo em processo de erosão ou em solução na água de escoamento, enquanto que a contaminação das águas subterrâneas é resultado da lixiviação dos pesticidas, onde estes são carregados juntamente com a água que alimenta os aquíferos (SPADOTTO et al., 2004).

Além das atividades agrícolas, ocorre contaminação das águas superficiais e subterrâneas por pesticidas devido a liberação de efluentes das indústrias que os fabricam. Essas águas residuais, que possuem cor intensa e odor repugnante, geram problemas significativos de poluição em razão de apresentarem elevados valores de demanda química de oxigênio (DQO) e baixos de demanda biológica de oxigênio (DBO), por conseguinte, uma biodegradabilidade reduzida. Em razão disso, tratamentos biológicos convencionais não são eficazes para sua degradação (CHEN, SUN, CHUNG, 2007).

Dentre os pesticidas empregados na agricultura, os herbicidas, utilizados para controle de ervas daninhas, representam cerca de 44% do total comercializado mundialmente, enquanto que as vendas de inseticidas e fungicidas, produtos utilizados para controle de insetos e fungos, respectivamente, são quase iguais (cerca de 26%) (PESHIM, ZHANG, 2014).

O glifosato, pesticida pertencente a classe dos herbicidas, é aclamado como o pesticida da virada do milênio (SZEKACS, DARVAS, 2012) e o mais usado mundialmente (DUN et al., 2014) em função da sua eficácia no controle de ervas daninhas (POLLEGIONI, SCHONBRUNN, SIEHL, 2011), principalmente após a introdução de culturas transgênicas que são resistentes a ele (DUKE, POWLES, 2008).

### **3.2 Glifosato**

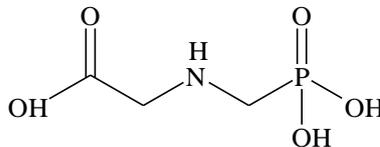
O glifosato (N-(fosfometil)glicina) é um herbicida organofosforado de amplo espectro, não-seletivo, sistêmico e pós-emergente (AMARANTE JUNIOR et al., 2002), derivado do aminoácido glicina e do ácido fosfônico, e comercializado desde 1974 (MONSANTO, 2014).

Em relação as suas propriedades físico-químicas, o glifosato possui fórmula molecular  $C_3H_8NO_5P$ , com massa molar de 169,1 g/mol, ponto de fusão de 230°C, densidade de 1,74 g/cm<sup>3</sup> (20°C) e pressão de vapor insignificante (25°C) (MACKAY et al., 2006).

É um ácido fraco, mas geralmente sua formulação contém sais monobásicos para aumentar a solubilidade em água (DILL et al., 2010), sendo que no Brasil são permitidas as formulações com sal de isopropilamina ( $C_6H_{17}N_2O_5P$ ), sal de potássio ( $C_3H_7KNO_5P$ ), sal de amônio ( $C_3H_7NO_5P \cdot xNH_3$ ) e sal de dimetilamina ( $C_5H_{15}N_2O_5P$ ) (ANVISA, 2015). Em condições ambientais tanto ele quanto os seus sais são sólidos cristalinos inodoros, muito solúveis em água (12 g/L a 25°C para o glifosato) e quase insolúveis em solvente orgânicos comuns, como em acetona e etanol (MACKAY et al., 2006).

A estrutura química do glifosato (Figura 1) contém um grupo amino, de caráter básico, no meio de um grupo carboxílico e de um grupo fosfato, ambos de caráter ácido, nas extremidades (SZEKACS, DARVAS, 2012).

Figura 1 - Estrutura química do glifosato

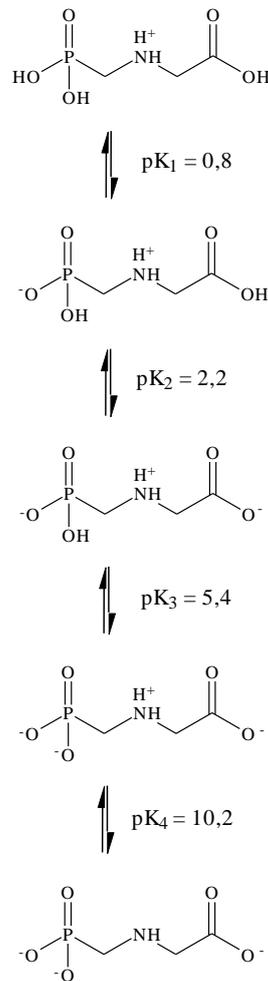


Fonte: DILL et al. (2010)

Em função disso, o glifosato é um composto com uma estrutura de zwitteriônico, ou também referido como “íon dipolar”, que significa uma molécula neutra com cargas elétricas positivas e negativas em diferentes locais dentro da mesma molécula. Diferentemente de compostos anfóteros, que se comportam como espécie básica ou ácida dependendo de condições externas, um zwitteriônico tem simultaneamente ambos os estados iônicos (catiônico e aniônico) dentro da mesma molécula (IUPAC, 2014; JAYASUMANA, GUNATILAKE, SENANAYAKE, 2014).

Esse comportamento zwitteriônico exerce influência na sua dissociação (SPRANKLE, MEGGITT, PENNER, 1975), tal como demonstrado na Figura 2, a qual apresenta as etapas de dissociação do herbicida glifosato em meio líquido, em função do pH do sistema, bem como a respectiva constante de dissociação, representada pelo logaritmo negativo da constante de dissociação (pKa).

Figura 2 - Etapas da dissociação do glifosato



Fonte: AMARANTE JÚNIOR et al. (2002)

Como os grupos fosfato e carboxílico tem maior caráter ácido que o grupo amino, nas primeiras dissociações o glifosato perde os hidrogênios ligados ao oxigênio (desprotonação do grupo carboxílico seguida do grupo fosfato) e, apenas na última dissociação, aquele ligado ao nitrogênio (desprotonação do grupo amino) (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002; SPRANKLE, MEGGITT, PENNER, 1975).

Após o glifosato ser pulverizado nas plantas, ele é absorvido, geralmente, através de suas folhas e dos caulículos novos e, então, transportado por toda a planta, onde age em sistemas enzimáticos (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002), inibindo a ação da enzima enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) (EC 2.5.1.19). Essa enzima está localizada no cloroplasto da planta e é responsável por catalisar a reação entre shiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato para produzir enolpiruvilchiquimato-3-fosfato e fosfato inorgânico, durante a sexta etapa da via do chiquimato, que por sua vez é a rota de síntese de aminoácidos

aromáticos essenciais, como a fenilalanina, tirosina e triptofano, em plantas, algas e micro-organismos, componentes estes necessários para a síntese de proteínas e importantes para o crescimento da planta (POLLEGIONI, SCHONBRUNN, SIEHL, 2011; TZIN, GALILI, 2010).

A ausência da via do chiquimato em mamíferos é o principal argumento para o glifosato ser considerado de baixo risco para a saúde de seres humanos e de animais (MONSANTO, 2014), sendo que, até o momento, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, classifica toxicologicamente o glifosato como um composto de classe IV – pouco tóxico (ANVISA, 2015).

Em contra partida, estudos tem demonstrado os efeitos nocivos do glifosato em relação ao meio ambiente, incluindo consequências sobre organismos aquáticos, como a diminuição da densidade de macroinvertebrados bentônicos, que são utilizados como bioindicadores para avaliar a qualidade da água (RZYMSKI et al., 2013); micro-organismos do solo (ANDRIGHETTI et al., 2014) e à saúde humana (MESNAGE et al., 2015), onde a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, após a avaliação da carcinogenicidade de cinco ingredientes ativos de agrotóxicos, classificou o herbicida glifosato como provável agente carcinogênico para humanos (INCA, 2015). Heu et al. (2012) avaliaram os efeitos da exposição do glifosato em células da epiderme humana usando a técnica de AFM. Após a exposição ao glifosato (15 mM por 6 e 18h) houve alterações nos perfis de topografia das células, com uma distribuição diferente de saliências, o que evidencia que o glifosato danifica as células.

### 3.2.1 Comportamento ambiental

As características do pesticida como solubilidade em água, tendência a adsorção no solo e persistência no ambiente (meia-vida) determinam seu destino no ambiente (GAVRILESCU, 2005). Em razão de o glifosato apresentar uma pressão de vapor muito baixa, a volatilização deste herbicida é inexistente; em contrapartida, a elevada solubilidade em água e a moderada persistência no solo tendem a resultar na solubilização na água e/ou na adsorção pelas partículas do solo (SCHUETTE, 1998).

No que se refere a sua presença em ambientes aquáticos, o glifosato tem sido encontrado tanto em águas doces superficiais como em águas salinas (MERCURIO et al., 2014).

Tzaskos et al. (2012) avaliaram o nível de contaminação de glifosato na água de um riacho na cidade de Arapoti (Paraná - Brasil), localizado entre plantações de soja transgênica. As amostras de água foram coletadas 18 horas após uma chuva de 40 mm, que ocorreu dois dias após a pulverização. Os autores verificaram que, nas condições mencionadas, a água continha glifosato em uma concentração de 1481 µg/L.

Em um estudo para avaliar a ocorrência de glifosato em águas de superfície da região sul de Ontário, Canadá, foram retiradas amostras de mais de 30 locais diferentes, incluindo rios e riachos, durante o período de abril a novembro de 2004 e 2005. Em 2004, o glifosato foi detectado em 16 locais, sendo que as concentrações médias foram na faixa de 10-20 µg/L e a concentração máxima observada foi de 41 µg/L. Já em 2005, as concentrações típicas foram na faixa de 20-30 µg/L, com concentração máxima de 30,5 µg/L (STRUGER et al., 2008).

A degradação do glifosato no ambiente ocorre principalmente através de microorganismos presentes no solo e na água, sendo que essa biodegradação pode ocorrer por dois processos, ambos com formação de metabólitos. Na desfosforilação há a transformação do glifosato no intermediário sarcosina, pela ação das bactérias *Agrobacterium radiobacter* e *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase); nesta rota ocorre a quebra da ligação C-P do glifosato. Na decarboxilação há a transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico (AMPA), seu principal metabólito, decorrente da degradação por ação microbiológica das bactérias *Arthrobacter atrocyaneus* e *Flavobacterium* sp., (enzimas oxirredutases); nesta rota acontece a quebra da ligação C-N do glifosato (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002; SZEKACS, DARVAS, 2012). Da mesma forma que o glifosato, o AMPA também pode ser distribuído para os diversos tecidos da planta (GOMES et al., 2014). Em águas doces, a meia-vida média do glifosato é em torno de 60 dias, variando de acordo com o local e suas características (MERCURIO et al., 2014).

### 3.2.2 Métodos tradicionais de detecção

Em vista da toxicidade e da persistência no ambiente, instituições e países estabelecem limites máximos permitidos para a concentração de pesticidas em várias fontes de exposição, incluindo na água potável (REBOLLAR-PÉREZ et al., 2015). Para o glifosato, tais limites são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Comparação dos limites máximos permitidos para glifosato em água potável

<b>Instituição/País</b>	<b>Concentração máxima permitida (mg/L)</b>	<b>Referência</b>
World Health Organization	*	WHO (2011)
União Europeia	0,0004	EUROPEAN UNION (1998)
Estados Unidos	0,7	EPA (2016a)
Austrália	1	NRMMC (2011)
Canadá	0,28	HEALTH CANADA (2014)
Brasil	0,5	BRASIL (2011)

\*Ocorre em água potável em concentrações bastante inferiores aos de preocupação da saúde.

Há também regulamentos para a contaminação de glifosato em águas de superfície. Em âmbito nacional, a Resolução CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005) define como valor máximo de glifosato em águas de superfície de classe 1 (águas destinadas para consumo humano após tratamento simplificado) ou de classe 2 (águas destinadas para o consumo humano após tratamento convencional) o valor de 0,065 mg/L, e para águas de classe 3 (águas destinadas para o consumo humano após tratamento convencional ou avançado) o valor de 0,28 mg/L.

A fim de determinar o glifosato em tais concentrações, são necessários métodos analíticos altamente sensíveis (GOMEZ-CABALLERO et al., 2016). Contudo, em comparação com todos os herbicidas utilizados na agricultura, o glifosato é um dos mais difíceis de analisar, principalmente em níveis-traço, devido a sua elevada solubilidade em água, baixa solubilidade em solventes orgânicos, baixa volatilidade e ausência de grupos cromóforos (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2005; GUO et al., 2016), tornando sua detecção um desafio (DING et al., 2013).

Entre as metodologias usadas para detecção e quantificação desse composto destacam-se os métodos cromatográficos: cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massa (CL-MS) e cromatografia de troca iônica (CI). A GC é raramente aplicada em vista de necessitar um processo de derivatização complicado para tornar o composto volátil. Para análise por CLAE é também necessário um método de derivatização pré-coluna ou pós-coluna devido à falta de grupamentos cromóforos na molécula. CL/MS não necessita da etapa de derivatização, simplificando a análise, entretanto o custo é maior. A CI, comparado aos outros três métodos, tem menor sensibilidade (DING et al., 2013).

De um modo geral, os métodos cromatográficos apresentam uma alta sensibilidade, em função dos baixos limites de detecção (Tabela 2). Entretanto, a análise é complexa e

demorada, exige operadores altamente qualificados e demanda altos custos com reagentes e materiais (WANG, LU, CHEN, 2014).

Tabela 2 - Comparação de técnicas cromatográficas empregadas para a detecção de glifosato

<b>Técnica cromatográfica utilizada</b>	<b>Reagente de derivatização</b>	<b>Limite de detecção (µg/L)</b>	<b>Referência</b>
CLUE-MS/MS	FMOC	0,1	APARÍCIO et al. (2013)
CLAE acoplada com detector UV/Vis	CNBF	9	QUIAN et al. (2009)
CL acoplada com detector de fluorescência	FMOC	0,03	ALEXA et al. (2015)
CG com coluna de permuta catiônica acoplada com detector por captura de elétrons	TFE e TFAA	0,1	ALEXA et al. (2015)
CG com coluna de permuta catiônica acoplada com detector de nitrogênio-fósforo	TFE e TFAA	1	ALEXA et al. (2015)
CLAE-MS/MS	-	0,1	GUO et al. (2016)

Onde: CLUE = cromatografia líquida de ultra eficiência; CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência; CL = cromatografia líquida; CG = cromatografia gasosa; FMOC = 9-fluorenilmetoxicarbonil; CNBF = 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto; TFE = trifluoroetanol; TFAA = ácido trifluoroacético anidro.

A fim de evitar demorados procedimentos de derivatização, métodos que utilizam análise direta para a análise quantitativa de resíduos de glifosato em amostras de água são desejáveis (GUO et al., 2016).

Nesse sentido, a utilização de dispositivos de sensoriamento para a detecção de poluentes ambientais vem ganhando espaço tanto como forma de complementar, quanto alternativa para substituir os métodos clássicos existentes (DHULL et al., 2013; KESTWAL, BAGAL-KESTWAL, CHIANG, 2015). Sensores são dispositivos que transformam uma informação do ambiente externo, como exemplo a concentração de um analito, em um sinal analiticamente útil e quantificável (HULANICKI, GEAB, INGMAN, 1991).

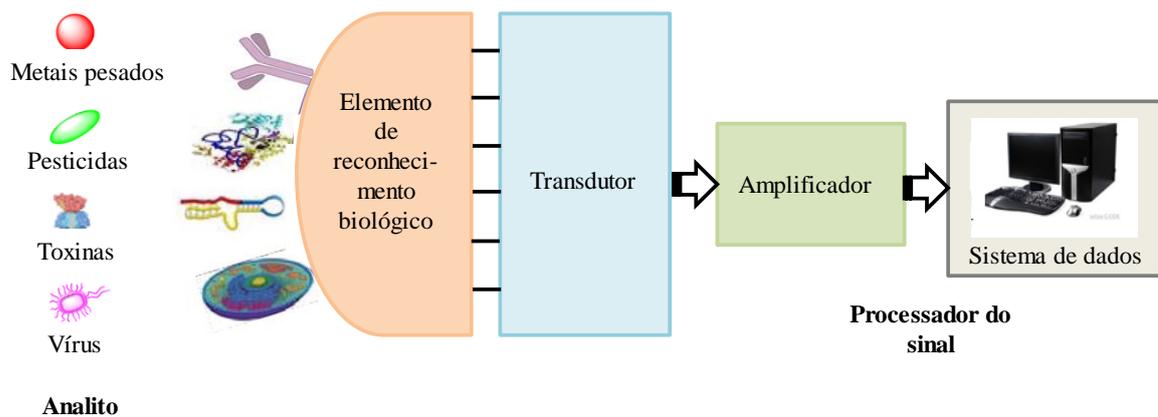
### 3.3 Dispositivos de biossensoriamento

O desenvolvimento de biossensores para detecção de pesticidas, em níveis-traço, tem aumentado de forma significativa para satisfazer a necessidade de métodos analíticos simples,

rápidos, sensíveis, de custos reduzidos e confiáveis. Tais dispositivos fornecem uma informação quantitativa ou qualitativa a respeito do analito com uma preparação mínima da amostra e em tempo real (SONGA, OKONKWO, 2016).

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo capaz de detectar um analito, como um contaminante ambiental, por meio de um componente biológico que está associado a um sistema de transdução (COLOMER-FARRARONS et al., 2011). Desse modo, os componentes básicos em um biossensor são o elemento de reconhecimento biológico, através do qual o biossensor reconhece seletivamente um ou vários analitos entre um grande número de outras substâncias; o transdutor, que transforma o sinal produzido pela interação entre o elemento de reconhecimento e o analito de interesse num sinal mensurável; e o sistema eletrônico de amplificação de sinal e gravação de dados (KOROTKAYA, 2014), conforme mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática de um biossensor exposto a contaminantes ambientais



Fonte: Adaptado de LONG, ZHU, SHI (2013)

As enzimas, conhecidas como catalisadores biológicos muito eficazes, são o elemento de reconhecimento mais comumente utilizado em biossensores, em razão da sua especificidade, seletividade e da grande variedade disponível (AN et al., 2015; REBOLLAR-PÉREZ et al., 2015; SASSOLAS, BLUM, LECA-BOUVIER, 2012).

Os biossensores enzimáticos podem atuar medindo a transformação catalítica do analito alvo pela enzima ou medindo a inibição da enzima devido à presença de um analito alvo (inibidor) (FARRÉ et al., 2009). Entre os inibidores de enzimas se encontram os poluentes ambientais, tais como compostos orgânicos, pesticidas e metais (KARUNAKARAN, MADASAMY, SETHY, 2015).

O desempenho de tais dispositivos está relacionado as condições físico-químicas do meio reacional, como pH e temperatura, as quais devem ser adequadas para manter a atividade enzimática. Além disso, pode ser necessário, também, a presença de um co-fator. Desse modo, a baixa estabilidade, aliada ao custo, são desvantagens que este biossensor pode apresentar (KARUNAKARAN, MADASAMY, SETHY, 2015; MONOŠÍK, STREĎANSKÝ, ŠTURDÍK, 2012; RUMAYOUR et al., 2005).

Todavia, em comparação com as enzimas comerciais purificadas, os extratos brutos de tecidos vegetais apresentam-se como uma alternativa economicamente viável de fonte enzimática na construção de biossensores e, por estarem em seu habitat natural, estão menos sujeitos a perda de estabilidade e geralmente possuem o co-fator disponível; entretanto, podem não ser tão seletivos. O procedimento para sua extração de tecidos vegetais, além do custo reduzido, é fácil e rápido, porém a sua atividade pode variar em função das características inerentes à sua origem ou das condições de extração (FATIBELLO-FILHO, VIEIRA, 2002).

Os dispositivos de biossensoriamento podem ter seu desempenho analítico, como a sensibilidade e o limite de detecção, melhorados significativamente ao se utilizar um nanomaterial ou a deposição de um filme na faixa de nm (JUSTINO et al., 2015), em razão de que os materiais em escala nanométrica, ou seja, materiais que possuem ao menos uma dimensão entre 1 a 100 nm, apresentam propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais diferenciadas daquelas conhecidas em escalas maiores, devido a maior área superficial ocasionada pelo seu tamanho reduzido. Dessa forma, quando o biossensor possuir um componente que apresente dimensões em nanoescala, ele é considerado um nanobiossensor (RAI et al., 2012).

### 3.3.1 Biossensores para a detecção de glifosato

Para a detecção do herbicida glifosato através de biossensores enzimáticos, a camada sensora é uma enzima que tem sua atividade inibida na presença deste analito. Dentre as enzimas empregadas, pode-se citar a peroxidase, a fosfatase alcalina e a acetilcolinesterase. A Tabela 3 apresenta informações relevantes sobre a preparação, utilização e características analíticas de biossensores preparados para a detecção de glifosato.

Tabela 3 - Características dos biossensores relatados para a detecção de glifosato

Preparação do biossensor	Técnica de medição do sinal	Limite de detecção ( $\mu\text{g/L}$ )	Armazenamento	Aplicação em amostra real	Referência
Biossensor preparado por deposição eletroquímica de poli(2,5-dimetoxianilina) dopada com poli(ácido 4-estireno) sobre a superfície de um eletrodo de ouro, seguido da ligação eletrostática da enzima peroxidase.	Eletroquímica (Voltametria Cíclica)	1,70	Solução tampão fosfato 0,1M, pH 6,0	Não	SONGA et al. (2009)
Nanoargila + extrato bruto de atemoeira (peroxidase) misturado com pó de grafite e nanotubos de carbono, adicionando-se óleo mineral para obtenção da pasta final, que foi acondicionada numa seringa de plástico e um fio de cobre foi inserido para estabelecer o contato elétrico externo.	Eletroquímica (Voltametria de onda quadrada)	30	A temperatura ambiente	Água potável fortificada com 0,20; 1,00 e 1,75 mg/L	OLIVEIRA et al. (2012a)
Eletrodo de carbono vítreo foi revestido com uma mistura de carbono poroso e quitosana; em seguida imerso em solução de íons $\text{Zn}^{2+}$ , e, por fim, em uma mistura de peroxidase, $\text{H}_2\text{O}_2$ e $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ .	Eletroquimioluminescência	-	O biossensor era utilizado uma única vez	Amostras de sucos fortificadas com 10 e 0,1 nM	ZHANG et al. (2015)
Aprisionamento de células de <i>Chlorella vulgaris</i> (fonte de fosfatase alcalina) em gel alginato de sódio.	Espectrofotometria UV-Vis	-	-	Não	SINGH (2014)

### 3.4 Biossensores de cantilever

Os avanços na área de nanotecnologia permitiram o desenvolvimento de dispositivos que podem atuar como sensores miniaturizados de alta sensibilidade (CARRASCOSA et al., 2006).

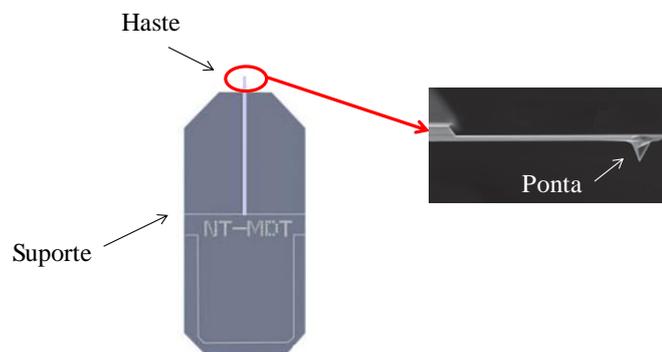
Um exemplo disso é a invenção, em 1986, do equipamento de microscopia de força atômica, o qual introduziu a possibilidade da criação de uma nova ferramenta de sensoriamento para a detecção de diversos analitos por meio da funcionalização de cantileveres, os quais passam então a funcionar como sensores (SANG, ZHANG, ZHAO, 2013). Nessa perspectiva, o cantilever atua como um transdutor mecânico, traduzindo o reconhecimento do analito pela camada sensora (CARRASCOSA et al., 2006).

Atualmente, os biossensores baseados em cantileveres apresentam-se como dispositivos versáteis, compactos e de alta sensibilidade (TOUHAMI, 2014; UZUNLAR et al., 2013) para a detecção de inúmeros analitos, entre eles poluentes ambientais, tais como pesticidas (DEDA et al., 2013; KARNATI et al., 2007) e metais pesados (CHEN *et al.*, 2012); compostos voláteis (STEFFENS et al., 2014) e agentes patogênicos (BRIDLE et al., 2016).

Além disso, exibem resposta rápida e em tempo real, utilizam pequenas quantidades de amostras, possuem reconhecimento específico e possibilidade de detecção de analitos múltiplos através da fabricação de arranjo de sensores (DEVREESE, 2007; LANG, HEGNER, GERBER, 2010; RAITERI et al., 2001). Conforme Hansen e Thundat (2005) nenhuma outra tecnologia de sensoriamento oferece tal versatilidade.

O cantilever (Figura 4) consiste de uma haste flexível, onde uma de suas extremidades é fixa a um suporte. Normalmente é feito de silício, possuindo um formato de barra retangular, sendo que quando utilizado em experiências de AFM pode possuir uma ponta integrada na extremidade livre (LANG, HEGNER, GERBER, 2010; RAITERI et al., 2001). Comercialmente, os cantileveres disponíveis possuem variedade de formas, dimensões e sensibilidades (NT-MDT, 2016).

Figura 4 - Representação de um cantilever



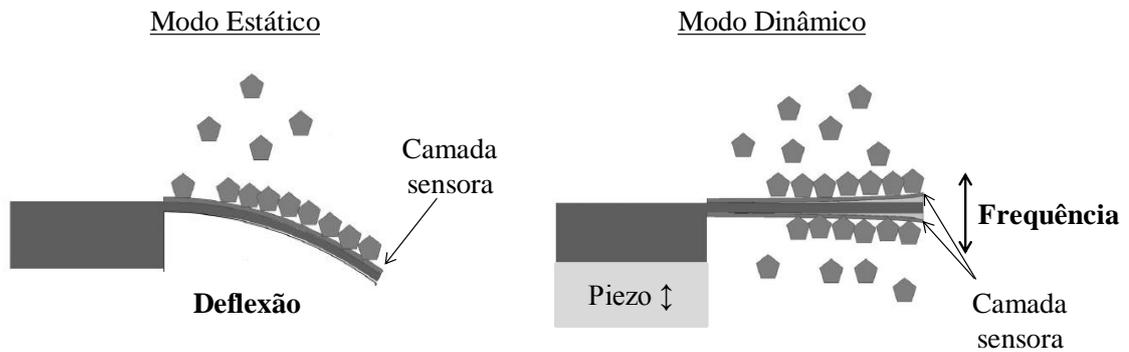
Fonte: Adaptado de NT-MDT (2016)

Para atuar como biossensores, os cantileveres, que em função do material da sua composição não possuem atributos sensitivos, devem ter sua superfície ou sua ponta recoberta com uma camada sensora, neste caso um elemento biológico, que seja altamente específica a molécula alvo, processo este chamado de funcionalização (LANG, HEGNER, GERBER, 2010), o qual será visto com mais detalhes no item 3.4.1.

No caso dos biossensores de cantilever, o princípio de funcionamento baseia-se na adsorção de analitos sobre a superfície funcionalizada quando há o seu reconhecimento,

podendo ocorrer uma deflexão ou uma mudança da frequência de ressonância. Assim, são distinguidos dois modos principais de operação: o modo estático e o modo dinâmico (HEGNER, ARNTZ, 2004) (Figura 5).

Figura 5 - Principais modos de operação de um biossensor de cantilever



Fonte: Adaptado de HEGNER, ARNTZ (2004)

No modo estático, apenas um lado da superfície do cantilever é funcionalizado e, com isso, quando ocorre a adsorção molecular na superfície, surgem forças intermoleculares que induzem tensões superficiais. A diferença na tensão entre as superfícies (funcionalizada e não funcionalizada) causa a deflexão do cantilever (TAMAYO et al., 2013; WANG et al., 2007). Ao mesmo tempo, a frequência de ressonância do cantilever também varia devido a massa adsorvida (CARRASCOSA et al., 2006).

A variação de deflexão ( $\Delta d$ ) é dependente da quantidade de força aplicada ( $F$ ) e da constante de mola ( $k$ ) do cantilever, sendo representada pela Lei de Hooke (Eq. 1) (FRITZ, 2008):

$$F = k \cdot \Delta d \quad (\text{Eq. 1})$$

A constante de mola representa uma medida da rigidez do cantilever, e é determinada em função das suas dimensões geométricas e parâmetros do material constituinte (Eq. 2):

$$k = \frac{E \cdot w \cdot t^3}{4 \cdot l^3} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde:  $w$ ,  $t$  e  $l$  são, respectivamente, a largura, espessura e comprimento do cantilever,  $E$  é o módulo de Young ( $E = 1,3 \times 10^{11} \text{ N/m}^2$  para silício no plano  $\langle 100 \rangle$  de sua estrutura cristalina)

(LANG, HEGNER, GERBER, 2010). Para que sejam alcançadas grandes deflexões no modo estático, o cantilever deve possuir uma haste longa e uma constante de mola baixa, menor que 1 N/m (MANZOLI et al., 2010; WANG et al., 2007).

A relação teórica entre  $\Delta d$  e a diferença da tensão entre as superfícies ativa (funcionalizada) e passiva (não funcionalizada) segue a equação de Stoney (Eq. 3):

$$\Delta d = \frac{3.l^2.(1-\vartheta)}{E.t^2}\Delta\sigma \quad (\text{Eq. 3})$$

onde:  $\vartheta$  é a razão de *Poisson* ( $\vartheta = 0,24$  para Silício) e  $\Delta\sigma$  é a tensão na superfície induzida pelo analito ( $\Delta\sigma$  lado ativo -  $\Delta\sigma$  lado passivo) (RAITERI et al., 2001).

No modo dinâmico, a superfície do cantilever é funcionalizada em ambos os lados, e o resultado da adsorção do analito é a alteração da massa, o que induz a uma diminuição na frequência de ressonância, que é o resultado do movimento vibratório do cantilever (TAMAYO et al., 2013). O cantilever comporta-se como um oscilador harmônico, ou seja, como um sistema oscilador massa-mola ideal. Para um cantilever retangular, a frequência de ressonância é descrita pela equação a seguir (Eq. 4):

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m^*}} \quad (\text{Eq. 4})$$

onde  $m^*$  é a massa eficaz, a qual leva em consideração a geometria do cantilever e a distribuição de massa ao longo do cantilever (FRITZ, 2008).

A alteração de massa ( $\Delta m$ ) durante a adsorção molecular pode ser relacionada com a mudança da frequência de ressonância, por meio da equação 5:

$$\Delta m \cong \frac{k}{4\pi^2} \cdot \left( \frac{1}{f_1^2} - \frac{1}{f_0^2} \right) \quad (\text{Eq. 5})$$

onde:  $f_0$  é a frequência de ressonância inicial e  $f_1$  a frequência de ressonância após a adição de massa (LANG, HEGNER, GERBER, 2010).

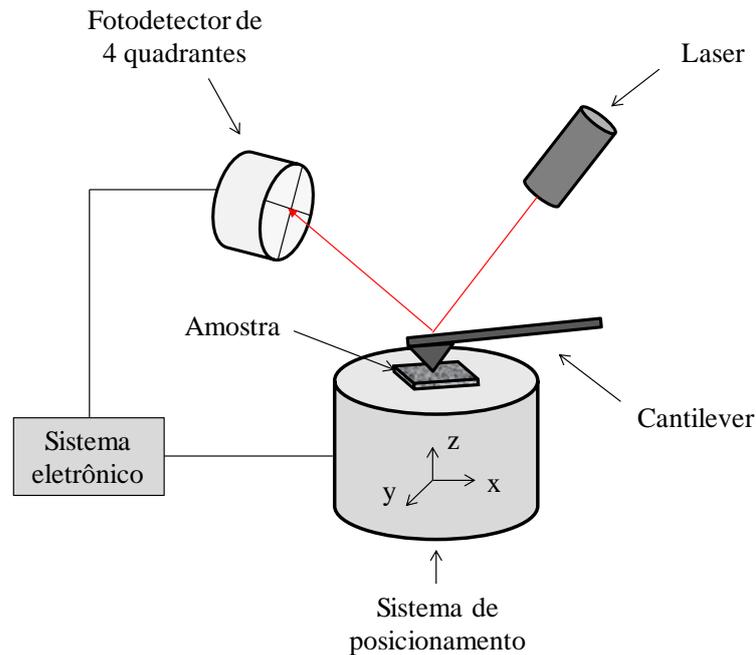
Para que elevadas frequências de ressonância sejam alcançadas no modo dinâmico utiliza-se um cantilever com haste curta e constante de mola grande, na faixa de 1 a 40 N/m (MANZOLI et al., 2010; WANG et al., 2007).

O reconhecimento do analito pela camada sensora pode ser monitorado, de forma simples, por um método óptico, como o utilizado nos equipamentos de AFM (SANG, ZHANG, ZHAO, 2013).

O microscópio de força atômica pode ser usado para análises topográficas (principal aplicação), onde a ponta do cantilever realiza uma varredura da superfície da amostra, produzindo imagens, e também para análises não-topográficas, as quais referem-se ao uso dos cantileveres como sensores (CUBILLAS, ANDERSON, 2014; RAITERI et al., 2001; SANTOS, CASTANHO, 2004). A técnica de AFM permite também realizar a manipulação de moléculas em nível nanométrico, o mapeamento de cargas elétricas em superfícies carregadas e medidas de força magnética em superfícies magnetizadas, bem como medidas de força lateral e de espectroscopia de força (BERNARDES FILHO, MATTOSO, 2003; VARIOLA, 2015).

Uma representação esquemática com os componentes principais do microscópio de força atômica é mostrada na Figura 6. Em síntese, o funcionamento do mesmo consiste de um sistema de posicionamento que proporciona um movimento nas direções x e y (para digitalização de amostra) e em z (para controlar a distância com a amostra) enquanto o feixe de laser incide sobre a parte superior do cantilever, que o reflete para um fotodetector de quatro quadrantes, responsável por medir as variações de posições produzidas pelo seu movimento – deflexão ou frequência de ressonância (CUBILLAS, ANDERSON, 2014; FERREIRA, YAMANAKA, 2006; VAHABI, SALMAN, JAVANMARD, 2013). A fim de aumentar a refletividade da superfície do cantilever, o mesmo é frequentemente revestido por uma fina camada de ouro (RAITERI et al., 2001).

Figura 6 - Componentes do microscópio de força atômica



Fonte: Adaptado de FERREIRA, YAMANAKA (2006)

De acordo com a distância existente entre a ponta do cantilever e a amostra, o microscópio de força atômica pode ser operado de três modos diferentes (FERREIRA, YAMANAKA, 2006; OLIVEIRA et al., 2012b):

- a) modo contato (distância inferior a 0,5 nm): a ponta do cantilever toca suavemente a amostra; as forças atuantes são repulsivas.
- b) modo não contato (distância 0,1 a 10 nm): o cantilever oscila sobre a superfície da amostra, mas sem tocá-la, sendo que as forças atuantes são atrativas (forças de Wan der Waals e forças eletrostáticas).
- c) modo intermitente ou *Tapping Mode* (distância entre 0,5 e 2 nm): o cantilever vibra em alta frequência, e quando se aproxima da superfície, sua ponta só faz um breve contato com a superfície da amostra.

O microscópio de força atômica é um instrumento capaz de operar em ar, vácuo ou líquido (TAMAYO et al., 2013) e estudar qualquer tipo de amostra diretamente no seu ambiente natural, o que diminuindo a necessidade de preparação da amostra (VAHABI et al., 2013). Quando o cantilever está imerso em meio líquido, o efeito do amortecimento torna difícil acompanhar o deslocamento de frequência de ressonância, entretanto, a resposta de deflexão permanece inalterada pela presença de um meio líquido, o que justifica o modo

estático ser a operação ideal quando o sensor de cantilever for usado nesse ambiente (CHAUDHARY, GUPTA, 2009).

Além disso, como os sistemas nanomecânicos são muito frágeis, devem ser operados cuidadosamente, independentemente do meio onde estão inseridos (TAMAYO et al., 2013). A sensibilidade de medição e o ruído destes dispositivos 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 (BAUSSELS, 2015).

#### 3.4.1 Funcionalização de cantileveres com biomoléculas

A funcionalização do cantilever para uso como biossensor compreende basicamente a modificação química da sua superfície para obter grupos funcionais reativos que se liguem ao elemento de reconhecimento biológico seguido da imobilização deste (TAMAYO et al., 2013), o qual deve ser excepcionalmente sensível e específico para um único analito ou um grupo similar de analitos (ARUGULA, SIMONIAN, 2014).

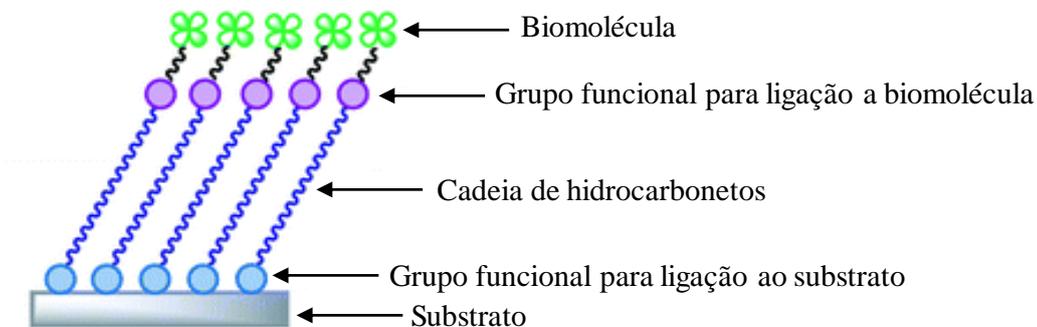
A integração entre o elemento de reconhecimento biológico e a superfície do material constituinte do cantilever é, sem dúvida, a etapa chave no desenvolvimento do dispositivo de sensoriamento, pois afeta diretamente a seletividade, reprodutibilidade e resolução (MANZOLI et al., 2010; RAITERI et al., 2001).

A escolha da técnica de funcionalização mais apropriada depende do tipo de elemento de reconhecimento biológico, do transdutor e do modo de detecção associado (SASSOLAS, BLUM, LECA-BOUVIER, 2012). Em relação aos pesticidas, a escolha do elemento biológico a ser utilizado como camada sensora geralmente é feita com base no seu mecanismo de ação nas plantas, pois este envolve uma ligação específica a uma biomolécula, frequentemente enzimas (SILVA et al., 2013). Porém, outras enzimas que sejam inibidas pelo pesticida, ou pelo seu grupo químico, também podem ser utilizadas. Um exemplo é a enzima acetilcolinesterase que é inibida pelos organofosforados (DYK, PLETSCHKE, 2011).

Sassolas, Blum e Leca-Bouvier (2012) fornecem uma visão geral de diferentes técnicas que podem ser empregadas para a imobilização de enzimas, entre as quais adsorção (técnica de deposição camada por camada) e ligação covalente (técnica de SAM), além de sua combinação com nanomateriais, como polímeros condutores, nanofios, nanotubos de carbono ou nanopartículas. A redução das dimensões dos materiais que são utilizados para a funcionalização aumenta a eficiência biocatalítica, promovendo uma maior interação com o elemento de reconhecimento e reduzindo as limitações difusionais (OLIVEIRA et al., 2012a).

A SAM é um método de funcionalização prático e flexível, que se caracteriza pela formação de camadas monomoleculares que exibem uma alta organização, através de quimissorção de moléculas orgânicas sobre uma superfície sólida. Uma monocamada é composta por um grupo funcional que se liga a um substrato; uma cadeia de hidrocarbonetos que dá estabilidade ao conjunto por interações de van der Waals e um outro grupo funcional que é responsável pelo acoplamento da biomolécula a monocamada (ADAMKIEWICZ et al., 2012; ARYA et al., 2009), como demonstrado na Figura 7. Segundo Freire, Pessoa e Kubota (2003), a SAM permite a orientação da enzima sobre a superfície do eletrodo sem que haja sua desnaturação.

Figura 7 - Representação da técnica de monocamadas automontadas



Fonte: Adaptado de HUNT, ARMANI (2010)

A formação de SAM para funcionalização do cantilever pode ser feita a partir de moléculas de tióis (-SH) (ALVAREZ *et al.*, 2002; MANZOLI *et al.*, 2010), as quais tem alta afinidade para substratos metálicos, especialmente o ouro, onde formam monocamadas muito estáveis (ARYA *et al.*, 2009), ou a partir de moléculas de silanos (-SiOx) que apresentam afinidade para substratos de silício (BUENO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2013).

Uma metodologia usual para a funcionalização de cantilever de silício por SAM consiste da evaporação gasosa de 3-aminopropiltrióxissilano (APTES) na presença de trietilamina, seguido da imersão em solução de glutaraldeído e após na enzima. Para a detecção do herbicida metsulfuron-metílico utilizou-se a enzima acetolactato sintase (ALS) (SILVA *et al.*, 2013) enquanto para o herbicida diclofop a enzima utilizada foi a Acetil-coA Carboxilase (ACCCase) (BUENO *et al.*, 2014).

Para unir quimicamente enzimas a moléculas de alcanotióis com grupo terminal -COOH podem ser utilizados agentes de acoplamento de comprimento zero, os quais realizam, com maior eficiência, a ligação dos grupamentos -NH<sub>2</sub> e -COOH, mas que ao final não

fazem parte da ligação. Exemplos de tais agentes são o N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). O EDC possui a função de ativar os grupos carboxílicos enquanto o NHS reage com aminas primárias, sendo que no produto final é formada uma ligação amida (O=C-N-H) (HERMANSON, 2013). Velanki e Ji (2006) ao utilizarem cantilever de silício revestido com ouro para detecção do coronavírus felino (FIP), relataram a utilização de EDC e NHS para acoplar o anti-corpo anti-FIP ao ácido 11-mercaptopundecanoico. O limite de detecção do biossensor foi de 0,1 µg/ml, com tempo de análise inferior a uma hora, sendo os experimentos realizados por deflexão.

Outra técnica comumente utilizada é a de camada por camada (do inglês, *layer by layer*), que se baseia na formação de filmes organizados em escala nanométrica por meio da adsorção alternada de componentes com cargas opostas sobre a superfície. Neste caso, ocorre uma imobilização eletrostática (SASSOLAS, BLUM, LECA-BOUVIER, 2012; YAN, JI, LVOV, 2004).

Karnati et al. (2007) estudaram a deflexão de cantilveres funcionalizados com multicamadas da enzima organofosforado hidrolase (OPH) para a detecção do organofosforado paraoxon. Um lado da superfície do cantilever de SiO<sub>2</sub> foi revestido com cromo (melhoramento da aderência) e ouro e funcionalizado através da técnica “*layer by layer*”, com a deposição de três duplas camadas de polietilenoimina (PEI)/poliestireno sulfonado (PSS) seguida de três camadas duplas de OPH/PSS. A amplitude de deflexão aumentou à medida que a concentração de paraoxon aumentou, sendo o limite de detecção igual a 10<sup>-7</sup>M. Os cantilveres modificados mostraram uma estabilidade de 2 meses quando armazenados a seco, a 4°C.

Entretanto, independente do modo de funcionalização utilizado é imprescindível que a camada de deposição seja fina e uniforme (RAITERI *et al.*, 2001), além de que as biomoléculas imobilizadas devem manter a sua estrutura, função e atividade biológica, onde para isso geralmente trabalha-se com o uso de agentes tamponantes e à temperatura fisiológica, bem como devem permanecer fortemente ligadas à superfície para não serem lixiviadas, permitir a acessibilidade para o analito e serem estáveis para aplicação a longo prazo (CARRASCOSA et al., 2006; DUFRÊNE et al., 2013; KORAYEM; NAHAVANDI, 2015; SASSOLAS, BLUM, LECA-BOUVIER, 2012), o que se constitui em um dos maiores desafios nessa área (WANG, LU, CHEN, 2014).

### 3.5 Enzima peroxidase

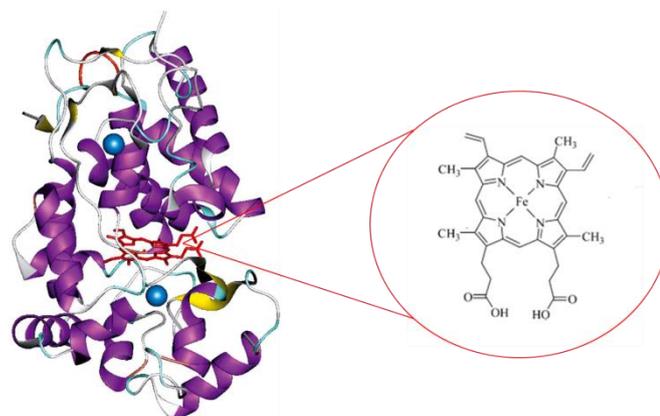
Tal como mostrado na Tabela 3, a enzima peroxidase é frequentemente utilizada como camada sensora na funcionalização de biossensores para detecção do glifosato em águas, em virtude da sua inibição por este pesticida.

As peroxidases (EC 1.11.1.x) são um grupo muito grande de enzimas oxirredutases, que, na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), catalisam a oxidação de substratos doadores de elétrons, tais como compostos orgânicos, como compostos aromáticos (fenóis); inorgânicos, como cátions ( $Mn^{2+}$ ) e ânions (ascorbato), e proteínas, como citocromo c (FATIBELLO-FILHO et al., 2007; ZÁMOCKÝ et al., 2015).

Estas enzimas podem ser isoladas a partir de tecidos vegetais, animais ou micro-organismos (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2008). Nas plantas, as peroxidases estão envolvidas em diversas reações, como na síntese da lignina e de componentes da parede celular, na defesa contra patógenos (KOUA *et al.*, 2009) e na oxidação de fenóis, a qual leva a degradação da cor e do sabor de produtos hortícolas (AMIOUR, HAMBABA, 2016).

A grande maioria das peroxidases são hemeoproteínas, ou seja, apresentam um grupo prostético heme ( $Fe^{3+}$ ) no seu sítio ativo (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2008), onde a enzima peroxidase extraída de rábano (HRP) é a mais estudada e a de maior valor comercial (KRAINER, GLIEDER, 2015). Além do grupo heme, essa enzima é formada por uma cadeia de polipeptídeos, dois átomos de cálcio e cadeias laterais de hidratos de carbono (VEITCH, 2004), sendo sua estrutura terciária representada na Figura 8.

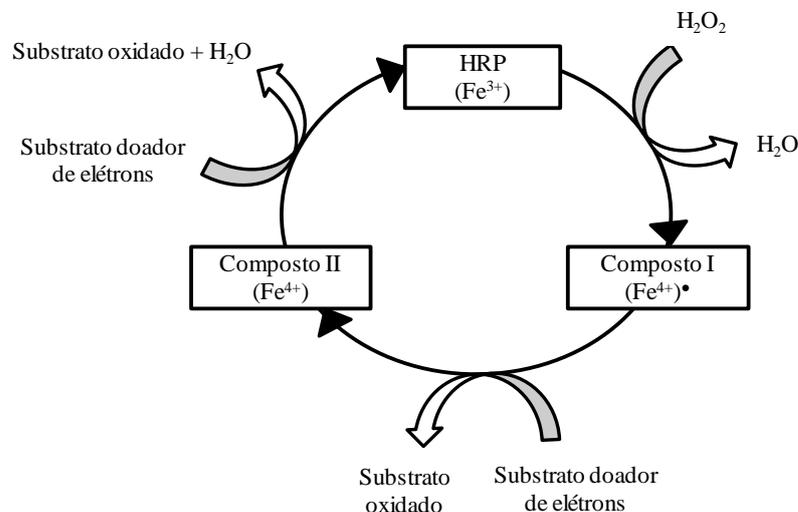
Figura 8 - Representação da estrutura terciária da HRP contendo o grupo heme (vermelho), dois átomos de cálcio (azuis), estrutura hélice- $\alpha$  (roxo) e estrutura folha- $\beta$  (amarelo)



Fonte: VEITCH (2004)

No ciclo catalítico das peroxidases (Figura 9), a forma férrica da peroxidase, aqui denominada de HRP ( $\text{Fe}^{3+}$ ), é oxidada pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  ao composto I (radical oxiferril), formando a espécie  $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$  radicalar, que apresenta alta capacidade oxidante. Um substrato doador de elétrons (exemplo: guaiacol) reduz o composto I à composto II, porém o ferro continua na forma de  $\text{Fe}^{4+}$ . Com uma transferência de elétrons a partir de outra molécula do substrato para a enzima, a peroxidase volta a sua forma nativa, ou seja, o ferro volta ao seu estado de oxidação  $\text{Fe}^{3+}$  (MARCOS et al., 2014).

Figura 9 - Ciclo catalítico da peroxidase



Fonte: Adaptado de MARQUES, YAMANAKA (2008)

Segundo Marques e Yamanaka (2008), quando um inibidor é introduzido no meio reacional, ele pode se coordenar com o composto intermediário I, o que acarretará em um decréscimo da atividade enzimática, caracterizando-se como um tipo de inibição incompetitiva. Entretanto, as peroxidases também são inibidas com facilidade por agentes químicos que se ligam ao grupo prostético heme (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2008).

Além da atemóia, vários extratos vegetais estão sendo usados como fonte enzimática de peroxidase em biossensores, tais como de jiló (OLIVEIRA, FERNANDES, VIEIRA, 2006), pinhão (FRITZEN-GARCIA et al., 2009), alfafa (MOCCELINI et al., 2010), ingá-cipó (OLIVEIRA et al., 2014) e abobrinha (LUPETTI et al., 2005).

Em relação a abobrinha, esse vegetal pode ser encontrado em muitas formas, de esférico a alongado, e variar na cor da casca de verde escuro a claro, as vezes com manchas ou listras finas brancas (ISWALDI et al., 2013). Na literatura é reportado que o extrato

enzimático de peroxidase obtido de abobrinha através de extração com solução tampão fosfato de sódio, com posterior filtração e centrifugação, apresenta uma alta atividade enzimática de peroxidase: 330,3 U/mL (abobrinha de extremidades alongadas), 2762,8 U/mL (abobrinha com uma das extremidades arredondadas com superfície rajada) (FATIBELLO-FILHO, SOUZA, VIEIRA, 2002); 6726 U/mL (FATIBELLO-FILHO, VIEIRA, 2002) e 3515 U/mL (FERNANDES, OLIVEIRA, VIEIRA, 2007).

### **3.6 Considerações sobre o estado da arte**

A importância da preservação dos recursos hídricos tem levado à necessidade de monitorar a contaminação nestes ambientes, onde a leitura do estado da arte revelou que mesmo o glifosato sendo um pesticida tão presente na agricultura e, dessa forma, presente indiretamente na vida da população mundial, há poucos estudos realizados utilizando dispositivos de biossensoriamento para sua detecção e destes, nenhum utiliza um cantilever como transdutor de sinal, ou seja, como forma de transformar o reconhecimento do analito pela camada sensora em um sinal analítico. Para a detecção de glifosato em água, os métodos analíticos tradicionais são os cromatográficos, que apesar de eficientes, apresentam limitações, sendo a principal a necessidade de derivatizações.

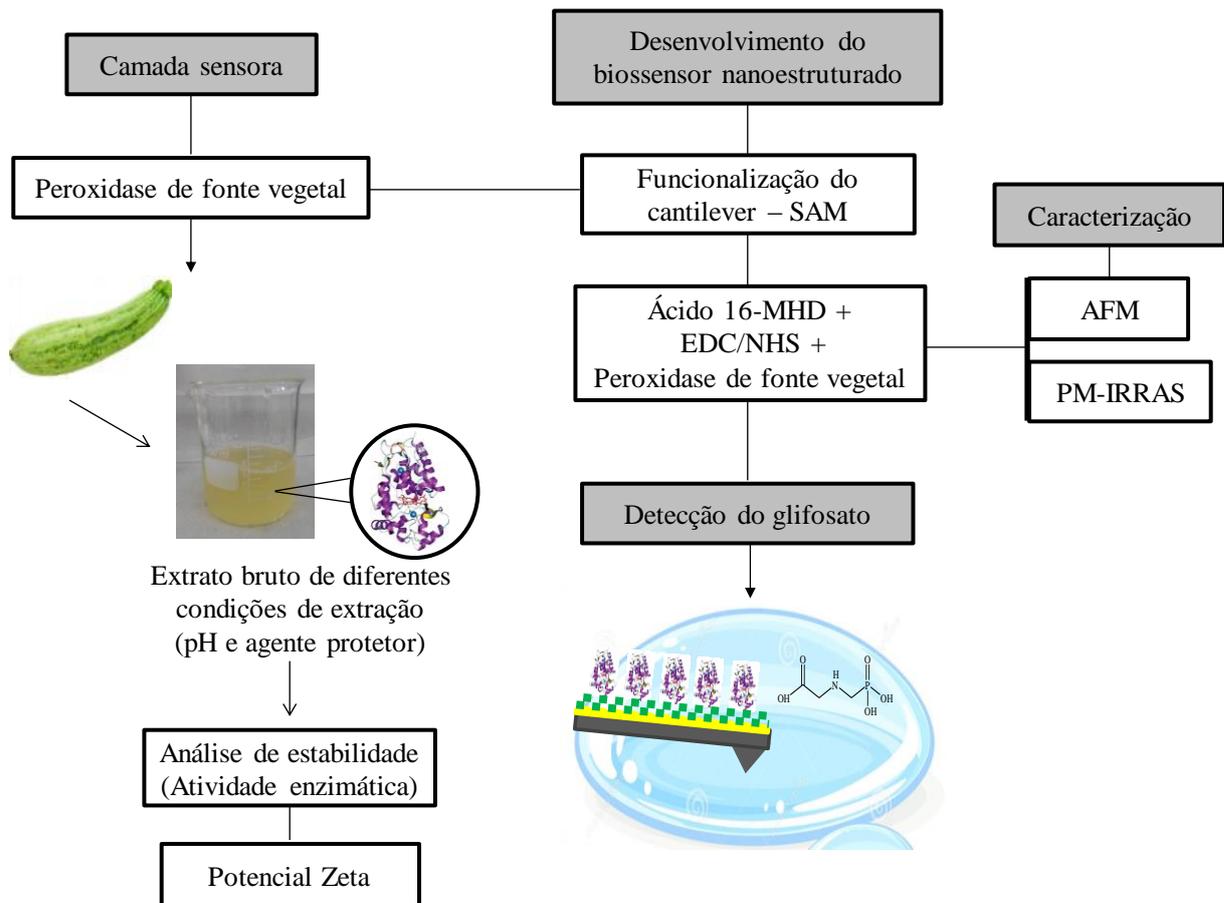
A aplicação de nanobiossensores baseados em cantileveres já vem sendo empregada com sucesso para a detecção de outros pesticidas, pois são dispositivos versáteis, compactos e que exibem resposta em tempo real, porém como mostrado no estado da arte, uma etapa crítica é a escolha de uma molécula biológica que possua especificidade para o analito.

Diante disso, a aplicação de biossensores de cantilever para a detecção de glifosato é uma tecnologia emergente que possibilitará o desenvolvimento de uma técnica analítica alternativa aos métodos tradicionais. Cabe ressaltar que a enzima peroxidase, amplamente encontrada em tecidos vegetais, apresenta grande potencial para ser aplicada como camada sensora, visto da sua inibição na presença do analito. Como até o presente momento não foram encontrados trabalhos na literatura utilizando extrato enzimático bruto para aplicação como camada sensora em biossensores de cantilever, seu emprego conferirá originalidade ao trabalho proposto.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item serão descritos os materiais e métodos utilizados para a obtenção do extrato vegetal de peroxidase bem como sua utilização no desenvolvimento do biossensor de cantilever e a avaliação da resposta do biossensor na detecção do herbicida glifosato em água. Um esquema das etapas envolvidas neste estudo está ilustrado na Figura 10.

Figura 10 - Visão geral das etapas desenvolvidas no presente estudo



Fonte: O autor

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram realizados nos Laboratórios de Biotecnologia de Alimentos, Processos de Separação/Termodinâmica e de Instrumentação Analítica, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, exceto quando mencionado outro local.

Todo material utilizado (balões volumétricos, espátulas, béqueres, vidro relógio, placa de petri, etc) foi submetido a um procedimento de limpeza com solução de ácido nítrico 3M, com posterior lavagem exaustiva com água destilada (OS10LXE – Gehaka), deionizada

(Permutation) e Milli-Q (Millipore), para assegurar a ausência de quaisquer resíduos orgânicos que pudessem interferir nas análises.

Todos os reagentes utilizados nos experimentos estão descritos na Tabela 4.

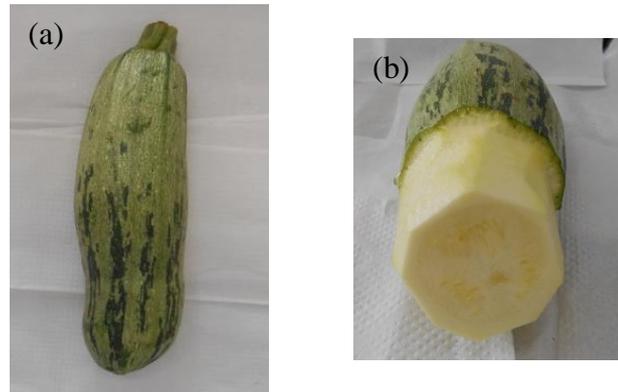
Tabela 4 - Reagentes utilizados para a realização do trabalho experimental

Nome	Marca
Ácido nítrico (65%)	Química Moderna
Fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A.	Synth
Fosfato de sódio dibásico anidro	Vetec
Polivinilpirrolidona K 90 (PVP)	Fluca Chemica
Guaiacol	Sigma-Aldrich
Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (29%)	Synth
Álcool absoluto (99,5%)	Quimex
Álcool isopropílico	Vetec
Ácido 16-mercaptohexadecanóico (16-MHD) (90%)	Sigma Aldrich
N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC)	Sigma-Aldrich
N-hidroxisuccinimida (NHS)	Sigma-Aldrich
Glifosato (98,5%)	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Mesotriona	Sigma-Aldrich

#### 4.1 Extrato bruto contendo peroxidase

Para o desenvolvimento deste trabalho foi selecionada a abobrinha (*Cucurbita pepo*) como fonte vegetal de peroxidase, em razão de sua fácil aquisição, custo reduzido e por estar disponível comercialmente durante todo o ano. As abobrinhas, tipo Itália, foram adquiridas no comércio local e escolhidas por padronização da aparência exterior (casca verde escura com listras brancas finas, sem lesões, com textura firme e brilhosa) e interior (polpa clara, com sementes pequenas) conforme Figura 11.

Figura 11 - (a) Aparência exterior e (b) interior da abobrinha



Fonte: O autor

#### 4.1.1 Preparação do extrato bruto

Os extratos vegetais contendo peroxidase foram obtidos segundo o método descrito por Fatibello-Filho e Vieira (2002) e Oliveira et al. (2012a), com modificações.

As abobrinhas foram lavadas em água corrente, descascadas e picadas em cubos, sendo que 25g do tecido vegetal foi homogeneizado em um liquidificador (potência alta) com 100 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1M, por 1 min. Em seguida, o extrato foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado (Centrifuge MPW – 351R) a 4°C. A solução sobrenadante foi dividida em diversas alíquotas e armazenada em eppendorfs envoltos por papel alumínio em refrigerador, com temperatura monitorada em 4°C, sendo utilizada como fonte enzimática de peroxidase.

##### 4.1.1.1 Influência das condições de extração

Para avaliar a influência das condições de extração sobre a estabilidade foram realizados ensaios em diferentes pHs de solução tampão fosfato de sódio 0,1M (7,0; 6,5 e 6,0), em razão de que na literatura são encontrados trabalhos que reportam a obtenção do extrato bruto de peroxidase a partir de abobrinha utilizando soluções tampão fosfato de sódio com pHs que variam entre 6,0 e 7,0 (FATIBELLO-FILHO, SOUZA, VIEIRA, 2002; FATIBELLO-FILHO, VIEIRA, 2002; FERNANDES, OLIVEIRA, VIEIRA, 2007), e também na presença e na ausência de um agente protetor (2,5 g de PVP). O agente protetor é empregado para remover compostos fenólicos naturais dos extratos enzimáticos, para estes não serem oxidados pela enzima peroxidase. Na etapa de obtenção do extrato bruto, após

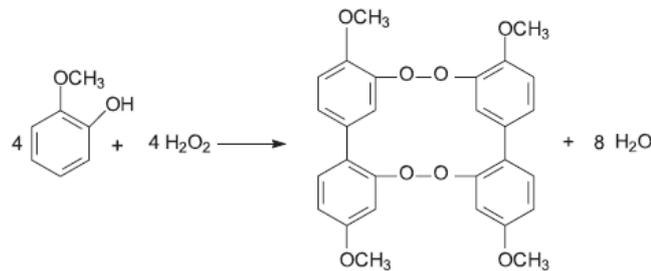
centrifugação, o agente protetor é separado do sobrenadante que contém a peroxidase, em razão da sua baixa solubilidade (ZERAİK et al., 2008).

Nos ensaios realizados na ausência de agente protetor foi utilizada uma centrifugação de 2000 r.p.m. durante 20 min (OLIVEIRA et al., 2012a), enquanto que nos ensaios realizados na presença de agente protetor, a centrifugação foi a 10000 r.p.m. durante 36 min (FATIBELLO-FILHO, VIEIRA, 2002), ambos a 4°C.

#### 4.1.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade da peroxidase nos extratos brutos foi determinada pela técnica de espectrofotometria no UV/Vis, baseada na reação entre o guaiacol e o peróxido de hidrogênio, a qual é catalisada pela peroxidase, formando como produto o tetraguaiacol, de coloração alaranjada (Figura 12) (ZERAİK et al., 2008).

Figura 12 - Reação catalisada pela peroxidase



Fonte: ZERAİK *et al.* (2008)

A metodologia empregada foi a descrita por Fatibello-Filho e Vieira (2002), que consistia da mistura de 2,7 mL de guaiacol 0,05M, 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01M e 0,2 mL do extrato enzimático, diretamente na cubeta de quartzo, de 1 cm de caminho óptico, realizando duas agitações manuais com a cubeta.

A absorbância foi lida no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 470 nm (espectrofotômetro da Espectro Vision), imediatamente após a mistura dos reagentes até um tempo reacional de 2 minutos. As medidas foram realizadas em uma sala climatizada a 20°C e em triplicata.

Uma unidade de atividade (U/mL) é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto nas condições mencionadas (OLIVEIRA et al., 2012a), sendo calculada a partir da equação 6.

$$\text{Atividade enzimática (U/mL)} = \frac{\Delta \text{Absorbância} \times 1000}{\Delta t \times v} \quad (\text{Eq. 6})$$

onde:  $\Delta$ Absorbância = variação de absorbância;  $\Delta t$  = variação do tempo reacional, em minutos (2 minutos);  $v$  = volume do extrato enzimático utilizado no ensaio, em mL (0,2 mL).

#### 4.1.2.1 Estabilidade à armazenagem a 4°C

Periodicamente, a atividade enzimática foi monitorada para verificação da estabilidade, sendo que as atividades residuais foram determinadas pela equação 7. No dia inicial, a atividade enzimática foi considerada 100%.

$$\text{Atividade residual (\%)} = \frac{A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

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

Do 1º até o 30º dia, a atividade foi avaliada de 5 em 5 dias, e após esse período foram feitas análises no 40º e no 70º dia, em função de um tempo de armazenamento maior.

#### 4.1.3 Potencial Zeta

Para a utilização de extratos vegetais como fonte enzimática em biossensores é importante conhecer suas propriedades, entre elas o potencial zeta, a fim de tornar efetiva sua imobilização na superfície do biodispositivo.

O potencial zeta pode ser entendido como o potencial existente no local onde os íons formam uma entidade estável ao redor de uma partícula de carga oposta, local este denominado de “plano deslizante”. Tal parâmetro determina uma repulsão ou atração eletrostática entre partículas ou entre uma partícula e uma superfície (DOUGHERTY et al., 2008).

Neste caso, a análise do potencial zeta visou calcular o ponto isoelétrico e caracterizar o tipo de carga superficial do extrato bruto de abobrinha na condição utilizada na funcionalização do cantilever.

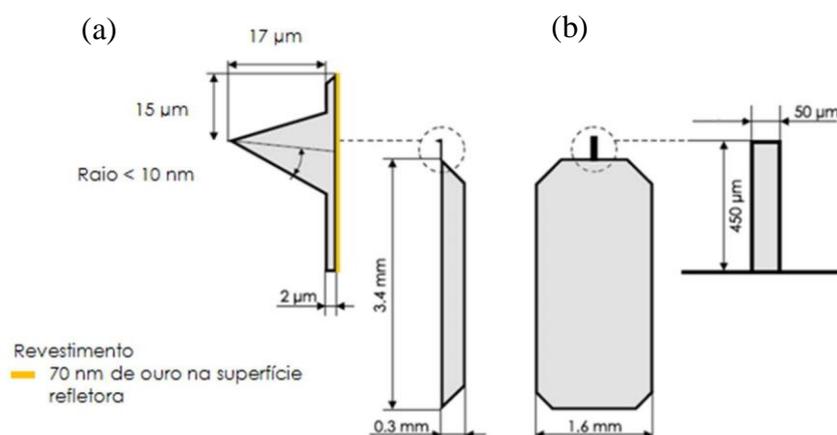
Um frasco de vidro âmbar contendo cerca de 60 mL do extrato bruto de abobrinha (extração com solução tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 na ausência de agente protetor), fonte da enzima peroxidase, foi acondicionado em uma caixa de isopor com bolsa de gelo e enviado a EMBRAPA Instrumentação, em São Carlos – SP, onde foram realizadas as medidas do potencial zeta.

Tal análise foi realizada em equipamento Zetasizer Nano ZS Zen3600 (Malvern Instruments Ltd.), a temperatura de 25°C, e utilizando alíquotas de 1 mL de extrato bruto com valores do pH do meio previamente ajustados com solução de ácido clorídrico 0,1M até pH 1,0.

#### 4.2 Desenvolvimento do biossensor nanoestruturado de cantilever

Os cantileveres (ContGD-G) usados para o desenvolvimento do biossensor foram adquiridos comercialmente (BudgetSensors), com as seguintes especificações do fabricante: material de silício revestido com 70 nm de ouro em um lado da superfície, frequência de ressonância de 13,0 ( $\pm 4$ ) kHz e constante de mola de 0,2 (0,07-0,4) N/m, apresentando as seguintes características geométricas: 450  $\mu\text{m}$  de comprimento ( $\pm 10 \mu\text{m}$ ), 50  $\mu\text{m}$  de largura ( $\pm 5 \mu\text{m}$ ) e 2  $\mu\text{m}$  de espessura ( $\pm 1 \mu\text{m}$ ), conforme ilustrado na Figura 13.

Figura 13 - (a) Vista lateral e (b) Vista superior com as características geométricas do cantilever utilizado para o experimento



Fonte: Adaptado de BUDGETSENSORS (2016)

Os cantileveres com recobrimento de ouro foram escolhidos devido a alta afinidade que este metal têm com o grupo tiol (-SH), e por isso esta camada já faz parte das etapas de

funcionalização. Como a camada de ouro está presente apenas no lado superior do cantilever, isso proporcionará a funcionalização unicamente deste lado e, assim, o mesmo poderá ser operado no modo estático (TAMAYO et al., 2013).

O cantilever escolhido apresenta uma baixa constante de mola, o que resulta em uma maior sensibilidade para as medições no modo estático em meio líquido, ou seja, maiores deflexões. Apesar de cantileveres longos e finos serem mais sensíveis para esse modo de operação, tais características aumentam a amplitude de oscilação térmica e o nível de ruído durante a medida (CARRASCOSA et al., 2006; FRITZ, 2008), o que não é desejável.

#### 4.2.1 Limpeza da superfície do cantilever

Os cantileveres foram transferidos individualmente para uma placa de petri, onde foram imersos em álcool isopropílico, durante 2 min, para lavagem, assim removendo interferentes da superfície, e então secos, a temperatura de 20°C, por cerca de 15 min.

#### 4.2.2 Funcionalização da superfície do cantilever para obtenção do biossensor

A imobilização da peroxidase de fonte vegetal na superfície do cantilever foi realizada por meio da técnica de SAM, empregando agentes reticuladores (EDC/NHS) para ligação covalente com moléculas de alcanotóis. O procedimento de funcionalização do cantilever foi realizado de acordo com Velanki e Ji (2006), com modificações, consistindo das seguintes etapas:

1<sup>a</sup> Etapa: Imersão do cantilever em uma solução de ácido 16-MHD 2mM em meio etanólico, por *overnight* (16h). Após, foi realizada a lavagem do cantilever com água Milli-Q (2 min) e secagem em temperatura ambiente por 15 min.

2<sup>a</sup> Etapa: Imersão do cantilever em uma mistura de EDC 1mM/NHS 1mM 4:1 (v/v) durante 10 min. A mistura das soluções foi feita no momento da utilização, pois se a mistura for preparada muito tempo antes, há diminuição da eficiência da imobilização (TIAN et al., 2016). A seguir, foi realizada a lavagem com água Milli-Q (2 min) e secagem em temperatura ambiente por 15 min.

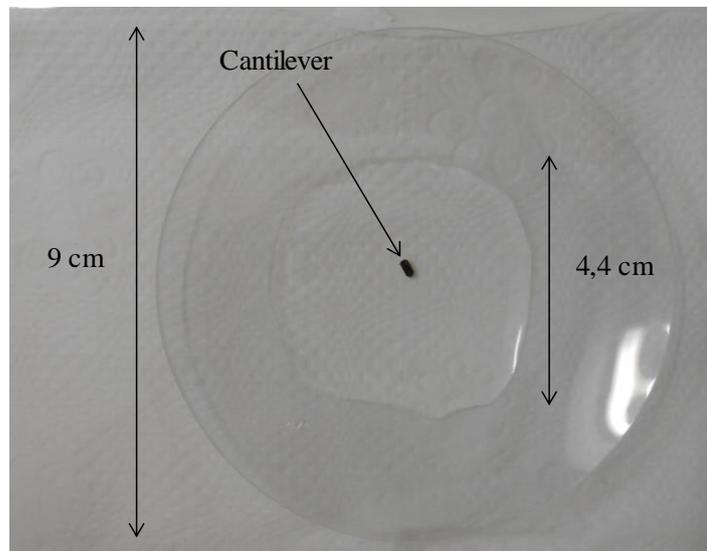
3<sup>a</sup> Etapa: Imersão do cantilever no extrato bruto de abobrinha (extração com solução tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 na ausência de agente protetor), utilizado como fonte enzimática de peroxidase, contendo 1550 unidades de peroxidase, durante 10 min. Posteriormente, foi

realizada a lavagem do cantilever com solução tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (2 min) e secagem em temperatura ambiente por 15 min.

As lavagens realizadas após cada etapa tinham o objetivo de remover as moléculas que não ficaram adsorvidas na superfície.

As etapas de funcionalização foram realizadas utilizando como suporte um vidro relógio, onde o cantilever era imerso na solução (Figura 14), e então tampado com uma placa de petri durante o tempo de contato. Tais procedimentos foram realizados em uma sala climatizada a 20°C, pois temperaturas maiores que esta diminuem a eficiência da reticulação (WANG et al., 2011).

Figura 14 - Modo de imersão do cantilever para funcionalização



Fonte: O autor

O biossensor foi armazenado sob refrigeração (4°C), a seco, dentro de placas de petri, quando não estava sendo utilizado no microscópio de força atômica e, antes da sua utilização, o mesmo ficava em temperatura de 25°C por 30 min, para estabilizar sua temperatura com a do ambiente.

#### 4.2.3 Caracterização da superfície do biossensor

As análises de caracterização da superfície do biossensor foram realizadas antes e após cada etapa da funcionalização do cantilever. Para estas análises, a funcionalização foi realizada em placas de silício (1 cm<sup>2</sup>), onde foi depositada uma camada de 20 nm de ouro por

meio da técnica *Sputtering*. Assim, o material da placa ficou similar ao do cantilever utilizado, permitindo realizar as demais etapas da funcionalização.

#### 4.2.3.1 Espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS)

A espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS) é uma técnica sensível utilizada para caracterizar a estrutura química de monocamadas adsorvidas sobre superfícies metálicas, como de ouro (FREY, CORN, WEIBEL, 2006).

Os espectros PM-IRRAS foram obtidos num espectrofotômetro KSV, modelo PMI 550 (KSV Instruments), com resolução espectral de  $8\text{ cm}^{-1}$  e ângulo incidente de  $81^\circ$ . Tal análise foi realizada no Instituto de Física, da Universidade de São Paulo – USP, campus São Carlos – SP.

#### 4.2.3.2 Microscopia de força atômica (AFM)

A técnica de AFM foi utilizada para avaliar a topografia e a rugosidade da superfície do biossensor, bem como medir a espessura total das camadas de funcionalização.

Nesta análise, a ponta de um cantilever realiza uma varredura na superfície da amostra para medir sua topografia. A mudança na altura da superfície é medida pela localização do feixe de laser refletido no fotodetector, o que gera um mapa topográfico da superfície, permitindo assim calcular os valores de rugosidade superficial, a qual é devida a presença de irregularidades na superfície, bem como calcular a espessura da camada depositada (GODDARD, HOTCHKISS, 2007; GUO, ZHU, LOH, 2017).

As 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  $150 (\pm 75)\text{ kHz}$  e constante de mola de  $5 (1,5-15)\text{ N/m}$ . Todas as imagens foram obtidas em modo dinâmico e a varredura realizada no modo *tapping*.

Para as análises de topografia e rugosidade, as imagens foram obtidas em uma área de  $25\text{ }\mu\text{m}^2$ , com resolução de  $515 \times 512$  pontos e velocidade de varredura de  $0,8$  a  $0,9\text{ s/linha}$ . A raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) foi calculada usando o software Gwyddion

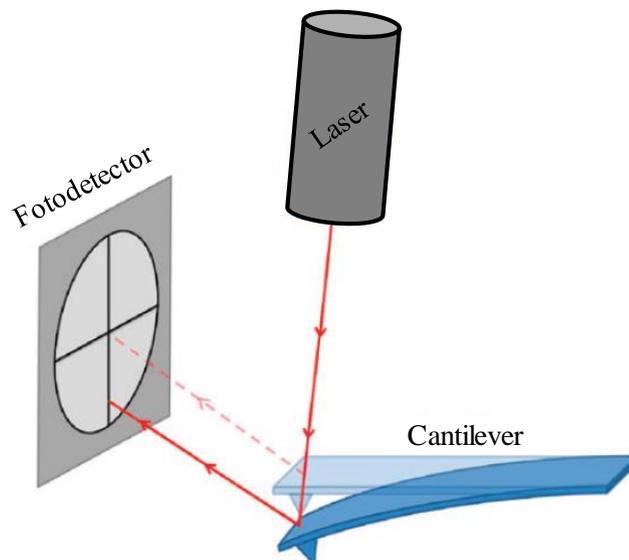
(Versão 2.45), em diferentes locais da imagem. Rms é uma função da média do desvio dos picos e vales presentes no perfil da superfície do material (LEITE et al., 2005).

Para a medida de espessura, utilizou-se uma agulha de aço para fazer um risco sobre a placa contendo todas as camadas de funcionalização. A imagem topográfica (área de  $400 \mu\text{m}^2$ , com resolução de  $515 \times 512$  pontos e velocidade de varredura de 1,5s/linha) foi obtida na interface entre a região da superfície que continha a camada sensora e a que teve a camada removida, mas permanecendo com a camada de ouro. A espessura foi calculada utilizando o software Gwyddion (Versão 2.45), por meio da diferença de altura entre as duas regiões, em vários locais da imagem.

### 4.3 Aplicação do biossensor nanoestruturado na detecção do herbicida glifosato

A resposta do biossensor nanoestruturado, obtido por meio da funcionalização do cantilever com peroxidase de fonte vegetal, em relação ao herbicida glifosato foi avaliada no modo estático, por meio da realização de uma imagem no microscópio de força atômica (Nanosurf), em modo contato, utilizando o método de feixe óptico, onde a deflexão do cantilever é obtida por meio do acompanhamento da posição do feixe de laser, o qual é refletido para um fotodetector de quatro quadrantes, sensível a posição (SANG, ZHANG, ZHAO, 2013) (Figura 15), sendo que a distância percorrida no fotodetector é proporcional à deflexão do cantilever (RAITERI et al., 2001).

Figura 15 - Monitoramento da deflexão por meio do método de feixe óptico



Fonte: Adaptado de CHOW, BUČAR, JONES (2012)

Para as análises foi preparada uma solução de glifosato na concentração de 100 mg/L, e a partir desta, as soluções de trabalho de 0,01; 0,1; 0,5; 1,0 e 10 mg/L utilizando-se água Milli-Q. Estas soluções apresentam concentrações abaixo e acima do limite máximo permitido de glifosato em águas pelas legislações brasileiras (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011). Todas as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e sob refrigeração (4°C).

#### 4.3.1 Obtenção da resposta no microscópio de força atômica

Para obter as respostas no microscópio de força atômica, o cantilever, acoplado a um suporte denominado de canticlip, foi inserido junto ao scanner do equipamento, ajustando-se o laser na extremidade final da haste, verificando sua intensidade, seguido do alinhamento do laser no centro do fotodetector. Após isso, uma gota de líquido (0,5 mL) era injetada sobre uma placa de aço inoxidável, de modo que o cantilever ficasse totalmente imerso nesta gota (Figura 16), sendo o laser novamente alinhado no centro do fotodetector.

Figura 16 - Imersão do cantilever em meio líquido para obtenção da resposta no microscópio de força atômica



Fonte: O autor

Então, a resposta era monitorada por meio da criação de uma imagem, realizada nos seguintes parâmetros: área de  $0 \mu\text{m}^2$  (o cantilever não realizava uma varredura nos eixos x e y dentro da gota de líquido), resolução de 2700 x 2700 pontos (a imagem era formada por 2700 linhas, representando os pontos de resposta) e tempo de 1s/linha para obtenção da resposta.

Nestes parâmetros, a duração de cada análise era de 90 min. Transcorrido este tempo, a gota de líquido era retirada e injetava-se outra gota.

As imagens obtidas foram convertidas em um gráfico de Voltagem, em volts (V) x Tempo de contato, em segundos, por meio do software Gwyddion (Versão 2.45), sendo os dados exportados para o software Origin (versão 6.0), onde foram tratados. A voltagem lida foi proveniente do sinal do fotodetector do equipamento.

No decorrer do trabalho foi constatado que como os cantileveres são dispositivos muito sensíveis e levando em consideração a própria eletrônica do equipamento de AFM, qualquer vibração do ambiente externo bem como variações de temperatura no momento da realização da imagem podem influenciar no resultado da análise, comprometendo os dados. Diante disso foi necessário projetar uma caixa para ser colocada em cima do cabeçote do microscópio de força atômica durante a realização das imagens, de modo a diminuir a influência de vibrações externas. Essa caixa foi feita com fibra de média densidade (MDF) (comprimento = 40 cm, altura = 32 cm, largura = 40 cm e espessura = 10 mm), em razão do baixo custo do material.

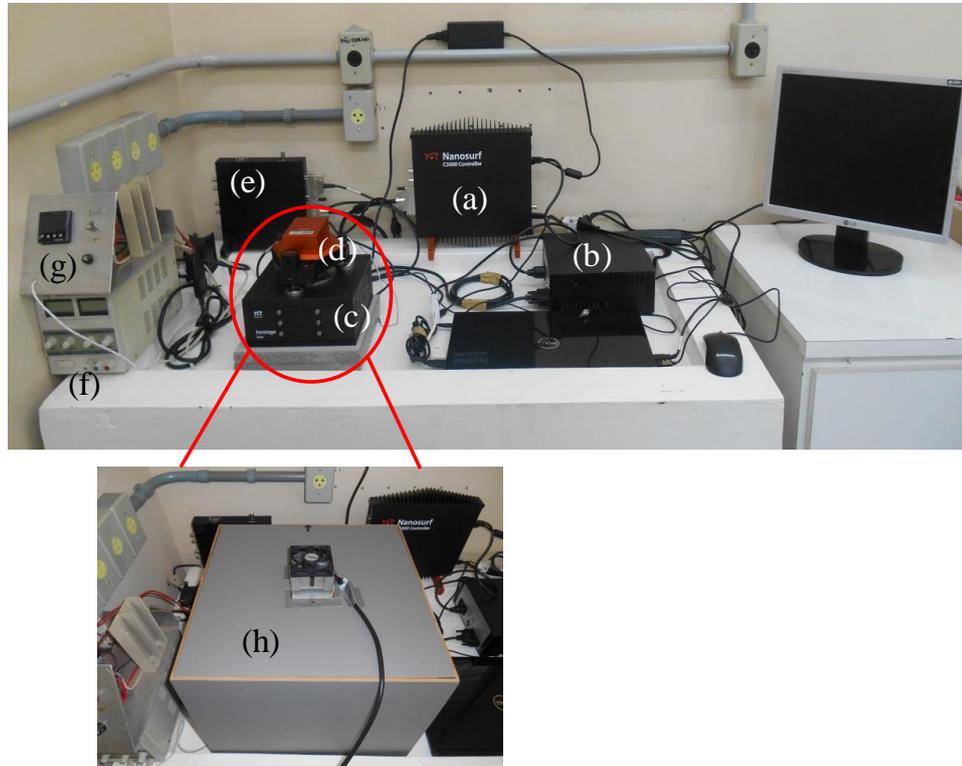
Nesta caixa de MDF foi acoplado um sistema de resfriamento, tendo por base uma pastilha Peltier com dimensões de 50 x 53 mm. Este elemento, quando ligado a uma fonte de corrente contínua (CC) tem uma de suas faces resfriadas e a outra aquecida. Em ambas as faces foram acoplados dissipadores de calor aletados. A face resfriada e seu dissipador ficou na parte interna da caixa de MDF e a face aquecida e seu dissipador ficou na parte externa da caixa de MDF. O dispositivo foi montado na parte superior da caixa de MDF 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 durante as análises foi em torno de 5,5 V CC, o que garante o resfriamento e impulsiona os microventiladores com baixa velocidade, minimizando o ruído para não interferir nos experimentos.

Para controlar a temperatura interna da caixa de MDF, para que não abaixe além do necessário, foi utilizado um sistema de controle baseado em um sensor PT100 situado no interior da caixa e conectado a um controlador digital externo, o qual desliga a fonte do sistema Peltier caso a temperatura atinja o valor mínimo programado. Assim a temperatura de realização dos ensaios foi mantida a 25,0 ( $\pm 0,3$ ) °C.

Uma imagem das partes que compõem o microscópio de força atômica e o sistema de resfriamento é mostrada na Figura 17.

Figura 17 - Microscópio de força atômica com sistema de resfriamento acoplado em uma caixa de MDF. (a) Controlador C3000, (b) Mesa anti-vibratória, (c) Porta Amostra, (d) Cabeçote, (e) Controlador Easyscan 2, (f) Fonte do sistema Peltier, (g) Controlador digital externo de temperatura, (h) Caixa de MDF acoplada ao microventilador externo



Fonte: O autor

#### 4.3.2 Resposta ao herbicida glifosato

A resposta do biossensor nanoestruturado (cantilever funcionalizado com extrato bruto de abobrinha, fonte enzimática de peroxidase) foi avaliada em água Milli-Q e nas diferentes concentrações de glifosato preparadas (0,01; 0,1; 0,5; 1,0 e 10 mg/L).

Foi também avaliada a resposta de um cantilever de silício (CONTR – NanoWorld) não funcionalizado, o qual não continha nem mesmo a camada de ouro sobre um lado da superfície, pois esta camada já faz parte da funcionalização. Este teste foi denominado de “branco” e realizado utilizando a concentração de 0,1 mg/L de glifosato.

A durabilidade do biossensor nanoestruturado, sob armazenamento a seco a 4°C, foi avaliada em relação a sua resposta no dia inicial. Essa análise foi realizada no 8º e 25º dia de armazenamento, utilizando uma concentração de 0,1 mg/L de glifosato.

#### **4.4 Teste complementar – resposta do biossensor nanoestruturado ao herbicida mesotriona**

Como teste complementar para avaliar a possível interação da camada sensora com outro herbicida, o mesmo biossensor aplicado para análise de glifosato foi submetido a uma análise com o herbicida mesotriona, em uma concentração de 0,05 mg/L, no 25º dia de armazenamento a seco a 4°C. Para esta análise, a resposta foi obtida da mesma maneira demonstrada no item 4.3.1.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção e estabilidade do extrato bruto contendo peroxidase

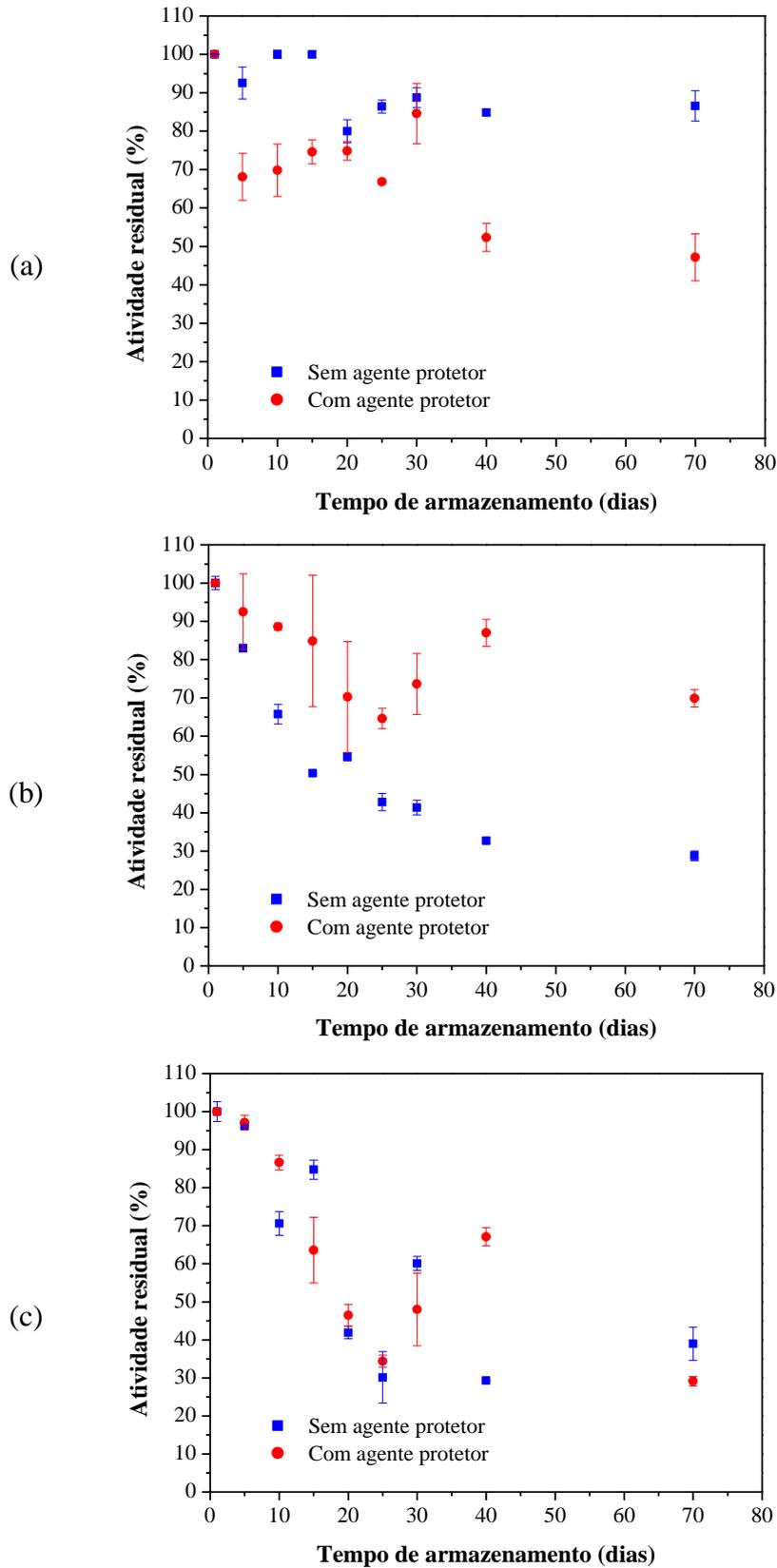
A presença da enzima peroxidase nos extratos brutos obtidos da abobrinha por meio de um método simples, rápido e de custo reduzido foi confirmada pela análise de atividade enzimática realizada periodicamente para monitoramento da estabilidade. Os resultados da estabilidade da atividade enzimática de peroxidase nos extratos brutos obtidos em diferentes condições de extração e armazenados a 4°C são mostrados na Figura 18.

Para as extrações realizadas a pH 7,0 (Figura 18.a), observou-se que o extrato que apresentou a melhor estabilidade da atividade da peroxidase foi o obtido na ausência do agente protetor, permanecendo com 87% de atividade residual ao final do tempo avaliado (70 dias). Apesar de que na literatura é citada uma melhora na estabilidade da atividade enzimática quando a extração é realizada na presença de agentes protetores (FATIBELLO-FILHO, VIEIRA, 2002), o contato da enzima com o agente protetor pode apresentar efeito antagônico, conforme também verificou Garcia (2010) ao extrair a peroxidase do pinhão em solução tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 na ausência e presença de diversos aditivos, tais como o PVP, onde a peroxidase extraída na presença desse agente protetor apresentou uma menor atividade e uma maior variação de atividade durante o período analisado (21 dias).

Para os extratos brutos obtidos a pH 6,5 (Figura 18.b), o uso do agente protetor causou uma melhora na estabilidade da atividade da peroxidase (70% de atividade residual ao final dos 70 dias de armazenamento), porém, esta condição apresentou maiores desvios nas medidas de atividade enzimática para o mesmo dia.

Os extratos brutos obtidos a pH 6,0 (Figura 18.c), tanto na ausência quanto na presença de agente protetor, foram os que apresentaram as maiores oscilações de atividade residual de peroxidase durante o período de armazenamento. Tais resultados diferem de Vieira, Lupetti e Fatibello-Filho (2003), que ao avaliarem a estabilidade da peroxidase obtida de abobrinha (extração com solução tampão fosfato 0,1M pH 6,0 na presença de agente protetor) observaram uma boa estabilidade ao longo de 80 dias de armazenamento, sendo que a atividade residual apresentou oscilações de cerca de 20%. A diferença encontrada para uma mesma condição de extração pode ser explicada em razão do tipo de abobrinha utilizada (variedade) e condições geográficas (clima e solo de plantio), fatores estes que também influenciam no comportamento da estabilidade da atividade enzimática do extrato bruto.

Figura 18 - Estabilidade da atividade enzimática de peroxidase dos extratos brutos obtidos em solução tampão fosfato de sódio 0,1M (a) pH 7,0; (b) pH 6,5 e (c) pH 6,0



Em vista de que o extrato bruto de abobrinha obtido a pH 7,0 na ausência de agente protetor apresentou a melhor estabilidade da atividade enzimática de peroxidase ao longo de 70 dias de armazenamento, nas condições estudadas, mantendo-se, durante este período, com cerca de 80% de atividade residual, e também para eliminar possíveis interferentes da utilização de agente protetor, essa condição de extração foi definida para ser utilizada nas etapas posteriores, com a aplicação do extrato bruto de abobrinha como fonte enzimática de peroxidase na funcionalização do cantilever para obtenção de um biossensor com vistas a detecção do herbicida glifosato.

Uma nova extração na condição definida foi realizada para a utilização como camada sensora no cantilever. A atividade enzimática da peroxidase neste extrato também foi avaliada e os resultados são mostrados na Tabela 5. Tais resultados mostram uma alta atividade enzimática e estão de acordo com o esperado em relação a sua estabilidade, já que em 120 dias de armazenamento, o extrato apresentava 66% de atividade residual.

Tabela 5 - Atividade enzimática e atividade residual de peroxidase no extrato bruto de abobrinha

<b>Dia</b>	<b>Atividade enzimática (U/mL)</b>	<b>Atividade residual (%)</b>
1	1633 ± 54	100 ± 3
40	1554 ± 30	95 ± 3
60	1384 ± 162	85 ± 10
120	1088 ± 25	66 ± 2

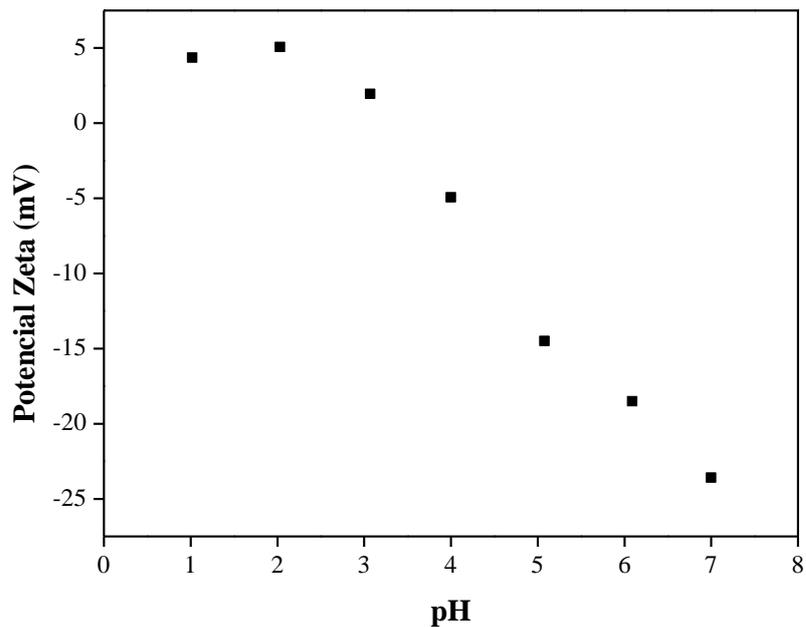
Média (3 repetições) ± Desvio padrão

Fonte: O autor

### 5.1.1 Potencial Zeta

Os resultados para a medida do potencial zeta do extrato bruto de abobrinha, fonte vegetal da enzima peroxidase, obtido a pH 7,0 na ausência de agente protetor, ao se variar o pH do meio são mostrados na Figura 19, onde é possível observar que em regiões mais ácidas, o extrato tornou-se mais carregado positivamente, enquanto que próximo a neutralidade, o mesmo adquiriu mais cargas negativas. Conforme Kirkwood et al. (2015), as proteínas podem adquirir mais cargas positivas ou negativas por ganhar ou perder prótons devido ao pH do seu ambiente.

Figura 19 - Influência do pH na medida do potencial zeta do extrato bruto de abobrinha



Fonte: O autor

A partir da inflexão da curva de potencial zeta *versus* pH determinou-se o ponto isoelétrico, que é compreendido como o pH em que ocorre um equilíbrio entre as cargas positivas e negativas, sendo a carga líquida igual a zero, ou seja, é o pH em que o potencial zeta é igual a zero (KIRKWOOD et al., 2015). Conforme Figura 19, o valor do ponto isoelétrico para o extrato bruto de abobrinha, fonte enzimática de peroxidase, está localizado em pH 3,3.

As peroxidases encontradas em vegetais são constituídas por uma série de isoenzimas, que variam em função da fonte vegetal, e que assim podem apresentar diferentes pontos isoelétricos (THONGSOOK, BARRETT, 2005). Casella et al. (1993) ao realizarem a extração da peroxidase da casca de abobrinha em fase inicial de crescimento utilizando água com posterior purificação e eletroforese preparativa, relataram a existência de isoenzimas aniônicas e catiônicas, com pontos isoelétricos de 3,8 e 9,0, respectivamente, porém a quantidade da isoenzima catiônica foi muito baixa em comparação com a forma aniônica. Deste modo, o ponto isoelétrico de 3,8 é próximo ao resultado obtido no presente estudo (3,3).

Segundo Bhattacharjee (2016), a caracterização dos materiais quanto ao potencial zeta permite ainda determinar o tipo de carga predominante em uma condição específica e assim prever quais moléculas ligantes podem ser usadas para sua aplicação na funcionalização de superfícies. Como em valores de pH acima do ponto isoelétrico, a carga superficial é negativa,

isso indica que em pH 7,0, pH do extrato bruto que será utilizado como fonte enzimática de peroxidase na funcionalização do cantilever, há a predominância de cargas negativas.

## 5.2 Desenvolvimento do biossensor nanoestruturado

Uma etapa chave para o desenvolvimento de qualquer biossensor é a definição de um elemento biológico que possua especificidade para o analito de interesse. Conhecendo a estrutura e características dessa molécula e também do eletrodo onde deverá ser imobilizado, projeta-se um modo adequado para sua funcionalização.

Neste sentido, a Figura 20 mostra um esquema proposto para a funcionalização do cantilever por meio da imobilização do extrato bruto de abobrinha, fonte enzimática de peroxidase, para a posterior detecção do glifosato.

Inicialmente, a superfície de ouro do cantilever foi modificada quimicamente com o ácido 16-MHD para formar as monocamadas automontadas (Figura 20.a). O ácido 16-MHD é um alcanotiol de cadeia longa (16 carbonos), proporcionando SAMs mais ordenadas. O grupo tiol (-SH), localizado em uma de suas extremidades, adsorve na superfície do ouro através da formação de uma ligação tiolato (GOODING, HIBBERT, 1999) enquanto o grupo carboxila presente na outra extremidade fica disponível.

Para imobilizar covalentemente a enzima peroxidase sobre a superfície do cantilever, os grupos carboxila do ácido 16-MHD foram acoplados aos grupos amina primário presente na estrutura da peroxidase por meio dos agentes de reticulação EDC e NHS, em razão de que a análise de potencial zeta mostrou que o extrato bruto de abobrinha, utilizado como fonte enzimática de peroxidase, continha disponível mais cargas negativas na condição que estava sendo utilizado. Essas cargas negativas são provenientes do grupo COOH, também presente na estrutura da enzima, assim tornando menos favorável a ligação direta entre o ácido 16-MHD e a enzima e aumentando as chances da mesma não se ligar de forma efetiva.

O EDC é a carbodiimida mais popular usada para conjugar substâncias contendo grupos carboxilas e grupos aminas. Este agente de reticulação reage com o grupo carboxila formando o-acilisourea, um intermediário instável e reativo (Figura 20.b).

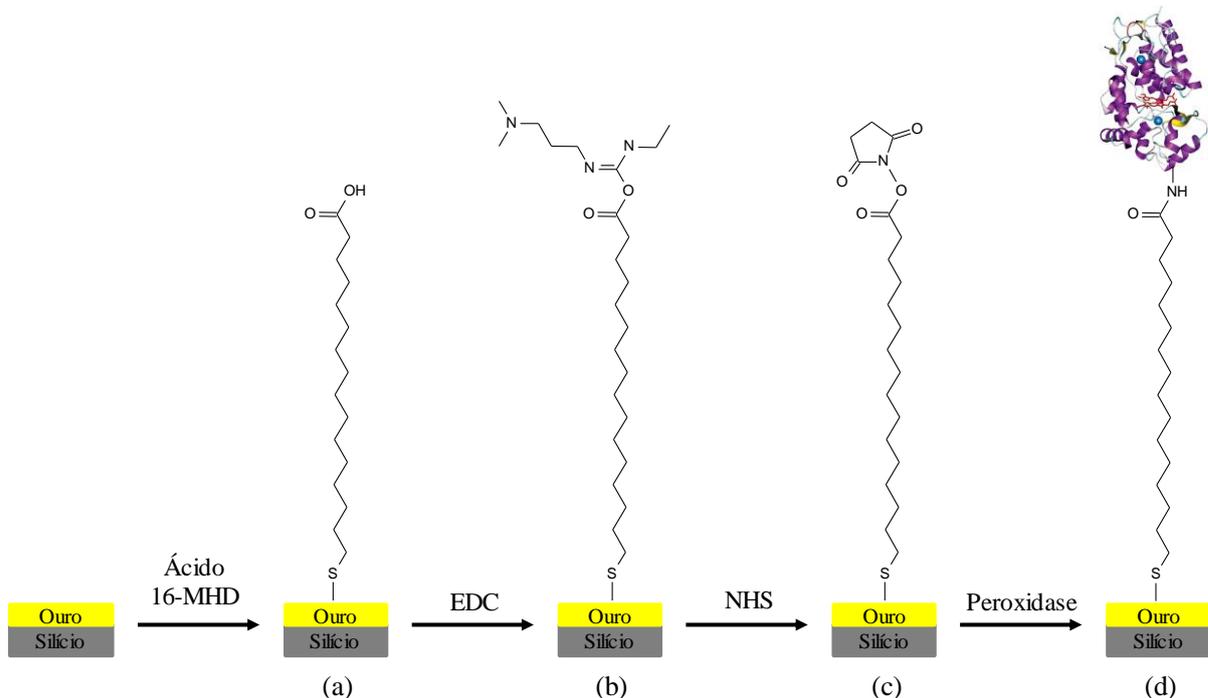
Na presença de uma amina primária, proveniente de uma enzima, por exemplo, tal espécie reage com esse intermediário instável, formando uma ligação amida estável e o subproduto de EDC é liberado na forma de um composto solúvel. Entretanto, em solução aquosa, o intermediário pode rapidamente sofrer hidrólise, regenerando o grupo carboxila.

Para aumentar a estabilidade do intermediário e favorecer a reação posterior com a enzima, adiciona-se o NHS, que é um agente de reticulação que reage com aminas primárias. A amina terciária presente no NHS ao reagir com o intermediário o-acilisourea, se liga ao grupo carboxila formando um éster de NHS, intermediário semi-estável, e liberando o EDC (Figura 20.c).

Assim, a amina primária presente na enzima, neste caso a peroxidase de fonte vegetal, reage com esse intermediário de forma mais eficiente, ligando-se ao grupo carboxila, do ácido 16-MHD, pela formação de uma ligação amida estável (O=C-N-H) (Figura 20.d), enquanto o NHS é liberado em solução.

O produto final da reação utilizando o NHS é idêntico ao obtido na reação utilizando somente EDC, porém aquela é altamente eficiente e com maior rendimento na conjugação. (HERMANSON, 2013).

Figura 20 - Representação esquemática da funcionalização do cantilever com peroxidase de fonte vegetal por meio da técnica de SAM. Deposição das camadas de (a) ácido 16-MHD, (b) EDC, (c) NHS, (d) peroxidase



Fonte: O autor

Um fator que exerce influência durante a ativação dos agentes de reticulação no processo de imobilização de moléculas biológicas em biossensores é a proporção existente entre EDC e NHS. Xia et al. (2013) relatam que a utilização de maiores razões de EDC para

NHS favorecem a transformação do intermediário o-acilisourea em éster de NHS, e consequentemente contribuem para a imobilização da biomolécula. Entretanto, os mesmos autores afirmam que a relação ótima pode diferir devido à diferença dos substratos utilizados.

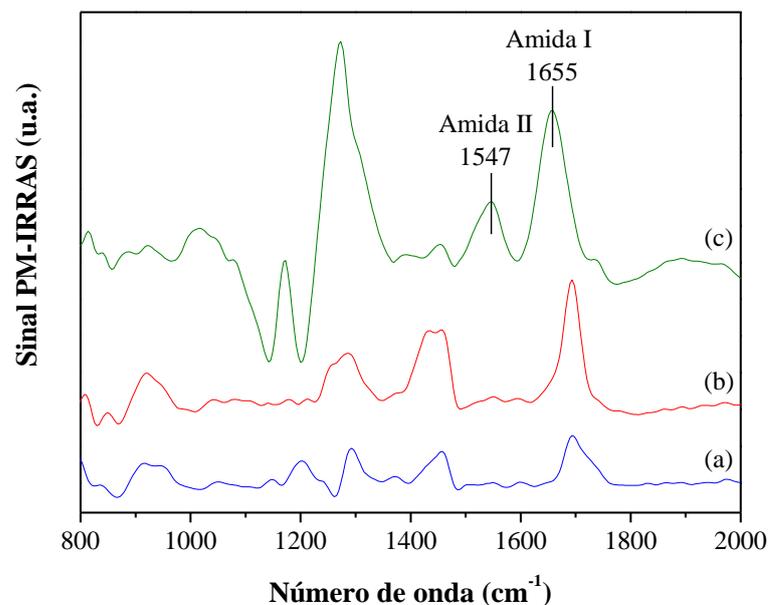
### 5.2.1 Caracterização da superfície do biossensor

No desenvolvimento de biossensores é necessário realizar análises que confirmem que as etapas utilizadas na funcionalização do transdutor foram bem sucedidas, ou seja, que o elemento biológico está imobilizado no cantilever.

#### 5.2.1.1 Espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS)

Os espectros de PM-IRRAS das etapas de funcionalização do cantilever são apresentados na Figura 21.

Figura 21 - Espectro PM-IRRAS das etapas de funcionalização do cantilever. (a) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD; (b) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS; (c) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS + Peroxidase



Fonte: O autor

Por meio do espectro PM-IRRAS obtido na etapa de deposição do extrato vegetal de peroxidase sobre a superfície de ouro previamente funcionalizada com ácido 16-MHD e EDC/NHS (Figura 21), observa-se a presença de bandas típicas de enzimas: uma banda em  $1655\text{ cm}^{-1}$ , a qual é atribuída ao grupo carbonila (C=O) da ligação amida, frequentemente denominada de amida I, e uma banda em  $1547\text{ cm}^{-1}$ , pertencente ao estiramento C-N da amida, denominada de amida II.

Kreider et al. (2014) relataram as bandas amida I a  $1659\text{ cm}^{-1}$  e a banda de amida II a  $1548\text{ cm}^{-1}$ , como indicativas da presença de HRP.

Como tais bandas não aparecem nos espectros PM-IRRAS das etapas de deposição do ácido 16-MHD e do EDC/NHS, isso demonstra que a enzima foi imobilizada no substrato.

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

Por meio da técnica de AFM foi possível avaliar como a deposição das moléculas durante a funcionalização altera a rugosidade da superfície. A deposição de moléculas sobre uma superfície pode ocorrer nos vales ou nos picos, que são, respectivamente, regiões abaixo ou acima do plano médio da superfície (RODRIGUES, 2015). Assim, o cálculo da rugosidade leva em conta a diferença entre a dimensão destes componentes da superfície (KLAPETEK, NEČAS, ANDERSON, 2016).

A Figura 22 e a Tabela 6 apresentam, respectivamente, as imagens de topografia, em 2D, e os valores de rugosidade da superfície do cantilever não funcionalizado (silício) e após cada etapa da funcionalização para a construção do biossensor nanoestruturado.

Verifica-se por meio da Figura 22 que existem diferenças na topografia das etapas de funcionalização da superfície do dispositivo. O substrato de silício (Figura 22.a) apresenta uma superfície com domínios dispersos, enquanto que a camada contendo ouro (Figura 22.b) exibe uma superfície mais lisa. Na superfície funcionalizada com ácido 16-MHD (Figura 22.c) e EDC/NHS (Figura 22.d) verifica-se agrupamentos em formato de coluna. Com a adição do extrato vegetal de peroxidase, observa-se que a superfície tornou-se mais homogênea, com menos agrupamentos (Figura 22.e). Esse formato da topografia, referente a funcionalização do cantilever por meio da técnica de SAM, utilizando um alcanotiol, agentes reticuladores (EDC/NHS) e enzima, é semelhante ao encontrado na literatura (STEUDE et al., 2011).

Figura 22 - Imagens 2D da superfície do cantilever durante as etapas de construção do biossensor nanoestruturado. (a) Silício – cantilever não funcionalizado. Deposição das camadas de (b) ouro, (c) ácido 16-MHD, (d) EDC/NHS, (e) peroxidase

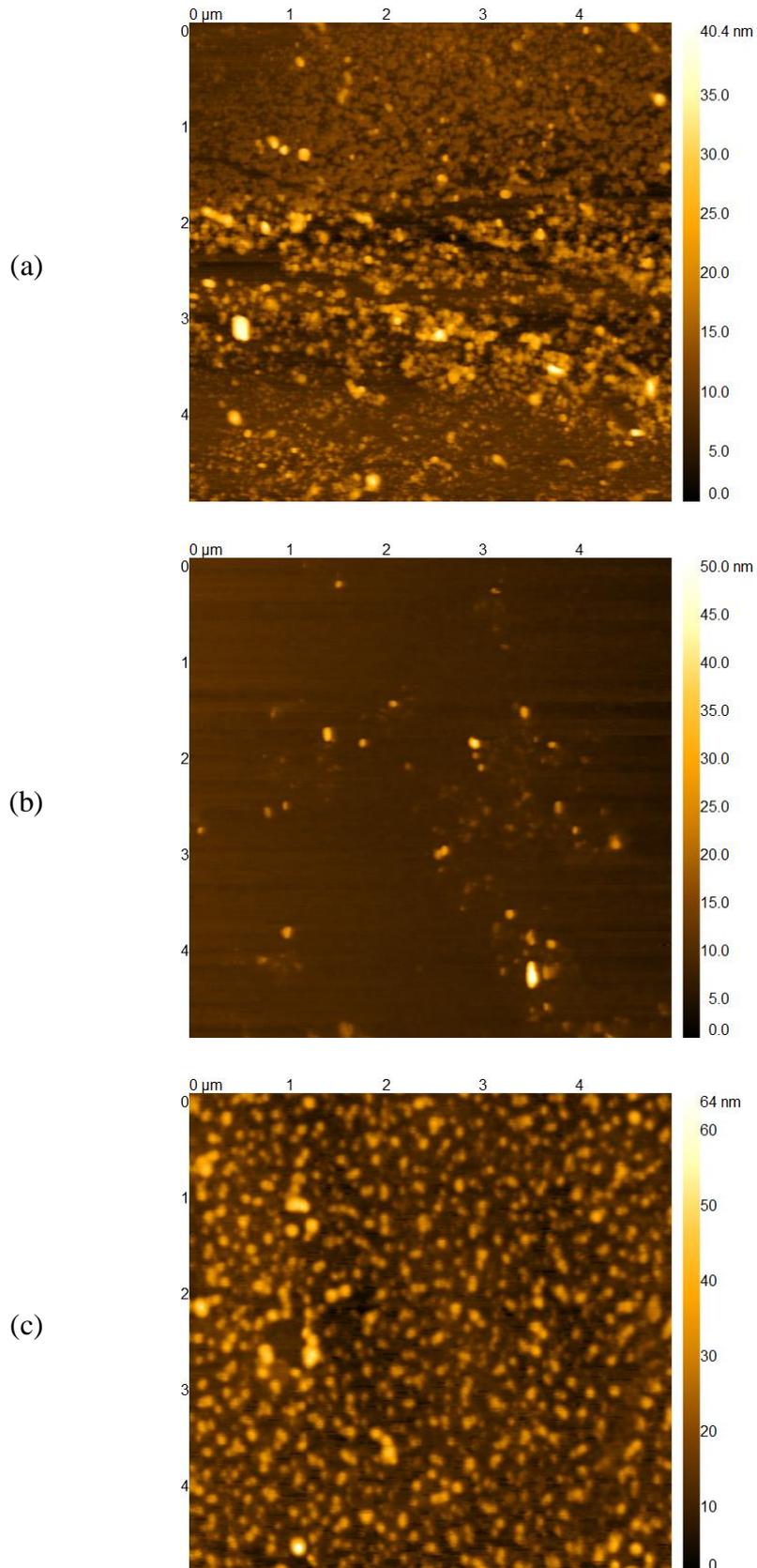
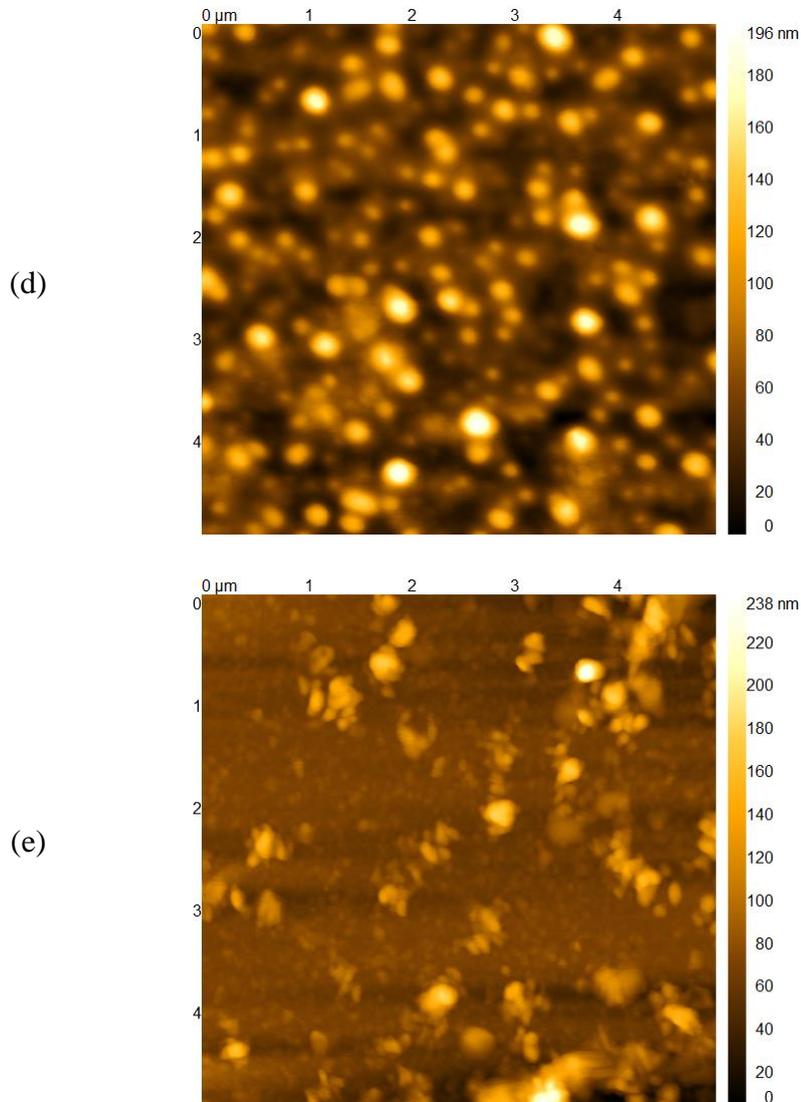


Figura 22 - Imagens 2D da superfície do cantilever durante as etapas de construção do biossensor nanoestruturado. (a) Silício – cantilever não funcionalizado. Deposição das camadas de (b) ouro, (c) ácido 16-MHD, (d) EDC/NHS, (e) peroxidase (continuação)



Fonte: O autor

Tabela 6 - Valores da raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) da superfície para as etapas de construção do biossensor nanoestruturado

<b>Etapa</b>	<b>Rms (nm)</b>
Silício (sem funcionalização)	$3,61 \pm 0,52$
Silício + Ouro	$2,14 \pm 0,20$
Silício + Ouro + Ácido 16-MHD	$6,35 \pm 0,04$
Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS	$27,02 \pm 0,82$
Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS + Peroxidase	$18,27 \pm 0,31$

Média (3 repetições)  $\pm$  Desvio padrão

Fonte: O autor

Ao analisar a Tabela 6, observa-se que a superfície de silício apresenta rugosidade de 3,61 ( $\pm 0,52$ ) nm mesmo sem haver a deposição de moléculas. Essa rugosidade pode ser considerada uma característica intrínseca do material.

A deposição da camada de ouro diminuiu a rugosidade da superfície para 2,14 ( $\pm 0,20$ ) nm, como mostrado na Tabela 6. Como por meio da técnica de *Sputtering* pode haver a deposição de átomos de ouro sob a forma de conglomerados (RODRIGUES, 2015), possivelmente esses conglomerados se depositaram nas regiões de vale, o que tornou a superfície mais lisa (Figura 22.b). Yu-Cheng et al. (2008) ao desenvolverem um biossensor óptico, também citam uma rugosidade baixa, cerca de 1-2 nm, para a camada de ouro depositada pela técnica de *Sputtering* sobre uma superfície de silício.

A deposição da camada de ácido 16-MHD levou ao aumento da rugosidade da superfície para 6,35 ( $\pm 0,04$ ) nm, como evidenciado na Tabela 6. Em razão do ácido 16-MHD possuir alta afinidade pelo ouro, há uma grande probabilidade de o mesmo se depositar nas regiões de picos, as quais estão mais expostas, e, por ser uma molécula de cadeia longa, isso também influencia para o aumento da rugosidade (Figura 22.c).

Quando se adicionou a mistura dos agentes de reticulação EDC/NHS, houve um aumento da rugosidade da superfície para 27,02 ( $\pm 0,82$ ) nm, conforme observado na Tabela 6. Kim et al. (2015) utilizaram a técnica de SAM para a construção de um biossensor de cantilever para a detecção do papilomavírus humano (HPV), os quais relataram um aumento na rugosidade superficial quando houve a deposição das camadas de ácido 11-mercaptopundecanoico e EDC/NHS sobre a superfície de ouro do cantilever. Este aumento da rugosidade é devido à ocorrência de alterações nos grupos funcionais que ficam expostos na superfície, ou seja, da mudança do ouro para o ácido carboxílico e, após, para o éster de NHS.

A deposição, em seguida, do extrato bruto de abobrinha, fonte enzimática de peroxidase, reduziu a rugosidade da superfície para 18,27 ( $\pm 0,31$ ) nm. Essa diminuição da rugosidade indica a formação de uma camada de preenchimento, a qual preencheu os espaços vazios, formando assim uma superfície mais homogênea (Figura 22.e). A deposição de enzima como camada de preenchimento também foi observada por Alonso et al. (2016), quando a glucose oxidase foi imobilizada por meio de SAM baseada em alcenos sobre uma superfície de platina oxidada para a construção de um biossensor.

Desta forma, a diferença nos valores de rugosidade da superfície é um indicativo de que ocorreu a deposição de camadas sobre a superfície do silício, sugerindo assim que a funcionalização (Figura 20) foi realizada de forma eficiente.

A espessura total das camadas de funcionalização, obtida por imagem topográfica na região de interface entre a superfície que continha a camada sensora e a que teve a camada removida (mas permanecendo com a camada de ouro), acrescidos os 70 nm da camada de ouro presente no cantilever, foi de 80,48 ( $\pm 0,39$ ) nm, ou seja, ela está compreendida na escala nanométrica (1 a 100 nm) (RAI et al., 2012). Por esta razão, denominou-se o dispositivo de sensoriamento desenvolvido como um biossensor nanoestruturado de cantilever. A diminuição de tamanho resulta em uma maior área superficial para a detecção do analito.

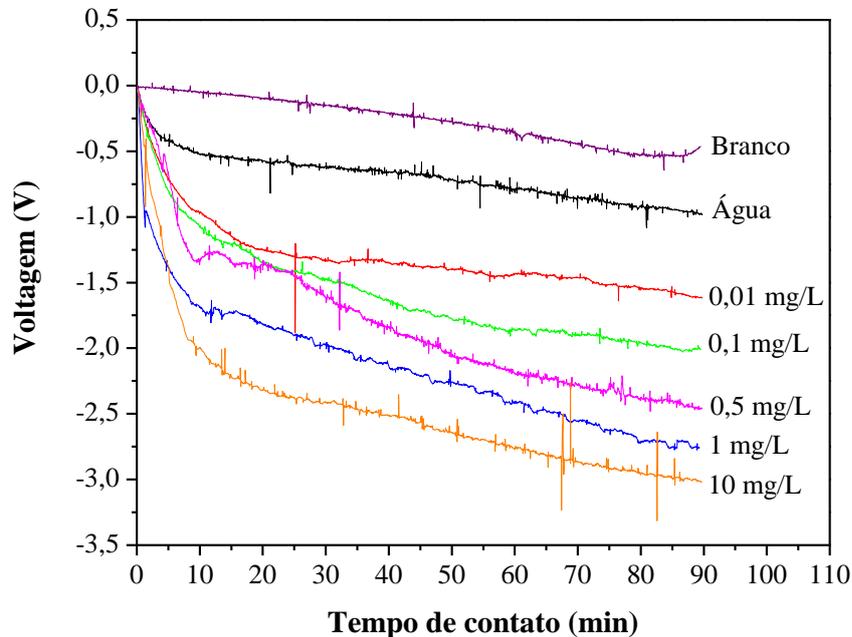
### **5.3 Aplicação do biossensor nanoestruturado na detecção do herbicida glifosato**

O glifosato é o herbicida mais utilizado mundialmente em plantações agrícolas e, por isso, é inevitável que os corpos d'água sejam atingidos por ele. Assim, técnicas analíticas para sua detecção e quantificação em água se tornam relevantes.

Neste estudo, o cantilever funcionalizado com extrato bruto de abobrinha, fonte enzimática de peroxidase de baixo custo, foi utilizado, de forma inédita, como um biossensor nanoestruturado para detectar a presença de glifosato em meio líquido, sendo a análise realizada no microscópio de força atômica.

A Figura 23 mostra a resposta, em termos de voltagem, do biossensor nanoestruturado em função do tempo, para a análise de água Milli-Q e das diferentes concentrações de glifosato. Para verificar se a resposta foi causada pela interação específica enzima-analito, um cantilever não funcionalizado (branco) foi exposto a uma concentração de 0,1 mg/L de glifosato, o que também é mostrado na Figura 23.

Figura 23 - Resposta do biossensor nanoestruturado exposto a água e a várias concentrações de glifosato e do cantilever não funcionalizado (branco) exposto a concentração de 0,1 mg/L de glifosato



Fonte: O autor

Conforme a Figura 23, a resposta do biossensor nanoestruturado, observada pelo sinal de tensão, ao longo do tempo, é decorrente das mudanças de tensão de superfície provocadas pela adsorção do analito (glifosato) na camada sensora (peroxidase de fonte vegetal), causando a deflexão do cantilever, pois o cantilever estava funcionalizado somente de um lado da superfície. Segundo Karnati et al. (2007), na adsorção de analitos no lado da superfície recoberta com ouro ocorre uma curvatura para baixo, a qual é causada por uma tensão de compressão, resultante de uma repulsão ou expansão de moléculas.

A resposta do biossensor nanoestruturado (Figura 23) apresentou um comportamento diferente para as concentrações de glifosato do que para a água Milli-Q, meio em que o analito foi diluído, indicando que o mesmo consegue detectar a presença de glifosato no meio.

A resposta para a experiência de controle (branco), também apresentada na Figura 23, mostrou que o cantilever não funcionalizado exposto a uma concentração de 0,1 mg/L de glifosato apresentou um comportamento similar a leitura da água com o biossensor, tendo uma pequena diferença ( $\sim 0,4V$ ) após 60 min, o que é um indicativo da alta especificidade entre analito-enzima.

Pela Figura 23 é possível observar que a resposta do biossensor nanoestruturado aumentou em curvatura, no sentido “para baixo”, com o aumento da concentração de glifosato, na faixa estudada, pois o aumento da concentração ocasiona uma maior diferença na tensão entre as superfícies funcionalizada e não funcionalizada. Constata-se ainda que houve uma tendência de estabilização da resposta após transcorridos 60 min.

Verifica-se também que o biossensor nanoestruturado consegue detectar satisfatoriamente a menor concentração estudada (0,01 mg/L), sendo assim capaz de detectar a presença do analito em partes por bilhão (ppb). Esta concentração, em termos de molaridade ( $10^{-8}\text{M}$ ), compara-se a detectada em outros biossensores de cantilever que utilizaram a medida deflexão como resposta a interação do analito com a camada sensora (BUCHAPUDI et al., 2012; KARNATI et al., 2007).

Levando em consideração os limites máximos permitidos de glifosato em água potável apresentados na Tabela 1, observa-se que a concentração permitida nos Estados Unidos (0,7 mg/L), Austrália (1 mg/L), Canadá (0,28 mg/L) e Brasil (0,5 mg/L) se encontra dentro da faixa de concentração utilizada neste estudo (0,01 – 10 mg/L), assim mostrando que o biossensor nanoestruturado consegue detectar a presença de glifosato na concentração máxima definida pela legislação desses países. Além disso, o biossensor desenvolvido pode também detectar a presença de glifosato abaixo dos valores máximos permitidos pela legislação brasileira para águas de superfície de classe 1 ou 2 (0,065 mg/L) e classe 3 (0,28 mg/L), as quais se destinam ao abastecimento (BRASIL, 2005).

Nos biossensores relatados na literatura, o glifosato é detectado com base no seu efeito inibitório sobre a atividade da peroxidase (OLIVEIRA et al., 2012a; SONGA et al., 2009).

Songa et al. (2009) ao desenvolverem um biossensor eletroquímico para detecção de glifosato concluíram que o analito, através do seu grupo  $\text{NH}_2^+$ , ou seja, quando o grupo amino está protonado (Figura 2), coordena-se com os átomos de oxigênio dos grupos carbonila da peroxidase, formando um complexo de HRP-glifosato, responsável por mudanças conformacionais na estrutura de HRP. Essas alterações na estrutura de HRP obstruem a transferência de elétrons do Fe (III) no seu ciclo catalítico, por conseguinte, inibindo a atividade catalítica de HRP. Os autores relatam ainda que a inibição da enzima pelo glifosato é do tipo reversível e não competitiva, ou seja, o glifosato se liga a enzima num local diferente do centro ativo.

Desta forma, o mecanismo responsável pela resposta do biossensor nanoestruturado obtido por meio da funcionalização do cantilever com peroxidase de fonte vegetal pode ser devido a uma alteração conformacional na estrutura da enzima quando ocorre a adsorção do

glifosato. Buchapudi et al. (2012) relataram esse mesmo mecanismo para a detecção do neurotransmissor acetilcolina utilizando um cantilever de ouro com ácido 11-mercaptopundecanoico, EDC/NHS e proteína de ligação à acetilcolina como camada sensora.

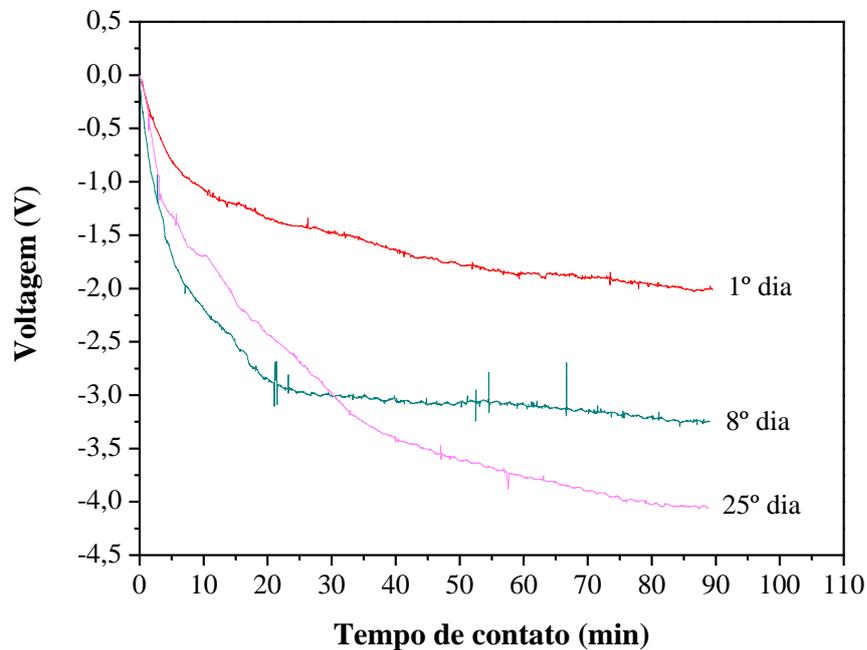
Nos biossensores eletroquímicos utilizados para a detecção de glifosato (OLIVEIRA et al., 2012a; SONGA et al., 2009), o biossensor é inicialmente imerso em uma solução contendo o substrato, numa concentração definida e na ausência de inibidor (solução 1) e o sinal de base ( $I_0$ ) é medido. Em seguida, o biossensor é incubado em uma solução de trabalho, contendo uma concentração específica de glifosato, por um tempo pré-determinado e, após, transferido para uma solução contendo o substrato enzimático (mesma concentração da solução 1) e o sinal de base ( $I_i$ ) é novamente medido. Dessa forma, a quantidade de glifosato pode ser relacionada com a porcentagem de inibição (%IR) obtida (Eq. 8), sendo que o aumento da concentração de glifosato no meio reacional acarreta em um decréscimo da atividade enzimática.

$$\% \text{ IR} = \frac{I_0 - I_i}{I_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

Como pode ser observado, este procedimento de análise envolve 3 etapas para cada concentração em estudo, tornando-se assim trabalhoso, e em razão da necessidade de substrato, gera um volume maior de resíduos. Nesse sentido, a detecção de glifosato baseada em um transdutor mecânico, como é o caso do cantilever, é vantajosa já que a presença do analito foi detectada sem utilizar substrato, somente a partir da interação com a camada sensora.

As respostas, em termos de voltagem, obtidas quando o biossensor nanoestruturado foi exposto a concentração de 0,1 mg/L de glifosato no dia inicial e no 8º e 25º dia de armazenamento são mostradas na Figura 24. Para as medidas do dia 8 e 25, foi possível realizar a análise em duplicata, sendo a resposta expressa como a média. Nestes dias, os mesmos apresentaram respostas próximas: no 8º dia, o desvio padrão da voltagem, após 60 min, foi de cerca de  $\pm 0,2V$ ; enquanto que no 25º dia, o desvio padrão ficou em torno de  $\pm 0,4V$ .

Figura 24 - Resposta do biossensor nanoestruturado exposto a concentração de 0,1 mg/L de glifosato no dia inicial e no 8º e 25º dia de armazenamento



Fonte: O autor

Durante o período de armazenamento avaliado (25 dias), o biossensor nanoestruturado continuou apresentando o mesmo comportamento em relação ao tempo de análise (Figura 24), detectando assim a presença de glifosato no meio. Entretanto, o sinal de tensão aumentou, no sentido “para baixo”, com o passar dos dias de armazenamento.

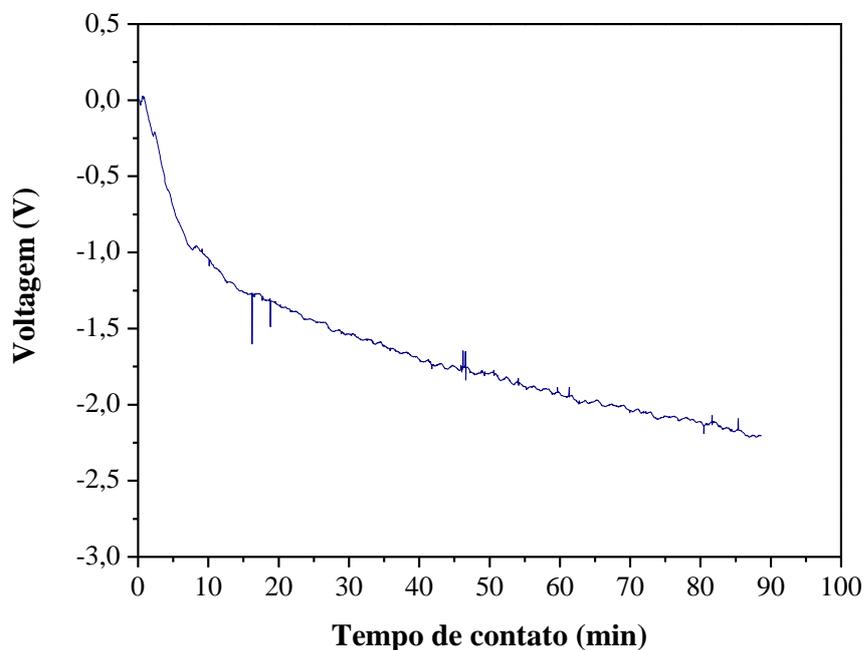
Uma possível explicação para esse comportamento pode ser devido a variação da atividade enzimática da peroxidase durante o armazenamento do biossensor, o que foi observado durante o armazenamento dos extratos brutos (Figura 18). Diante disso, um estudo mais aprofundado deve ser realizado para elucidar esse comportamento.

De modo geral, esse estudo mostrou que o biossensor nanoestruturado obtido por meio da funcionalização do cantilever com extrato vegetal de peroxidase de baixo custo foi capaz de detectar a presença de glifosato na ordem de ppb em amostra de água, além de mostrar durabilidade durante o armazenamento, assim apresentando grande potencial de utilização futura.

#### 5.4 Teste complementar – resposta do biossensor nanoestruturado ao herbicida mesotriona

A resposta, em termos de voltagem, quando o biossensor nanoestruturado foi exposto ao herbicida mesotriona em uma concentração de 0,05 mg/L, para avaliar a possível interação da camada sensora com outro herbicida, é apresentada na Figura 25.

Figura 25 - Resposta do biossensor nanoestruturado exposto a concentração de 0,05 mg/L de mesotriona



Fonte: O autor

Neste teste complementar, verificou-se pelo comportamento da resposta do biossensor nanoestruturado ao longo do tempo de análise (Figura 25), que a camada sensora também foi capaz de interagir com o mesotriona.

O herbicida mesotriona, com fórmula molecular  $C_{14}H_{13}NO_7S$ , pertence ao grupo químico das tricetonas. É classificado como herbicida seletivo e pós-emergente, utilizado para controlar folhas largas anuais e gramíneas na cultura do milho e cana de açúcar (KARAM, CRUZ, 2004).

O modo de ação do herbicida mesotriona consiste na inibição da biossíntese de carotenoides, por meio da inibição da enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD), localizada no cloroplasto da planta. Quando em contato com as plantas, o mesotriona pode

resultar em um estresse oxidativo, ocasionado através da geração desregulada de espécies reativas de oxigênio (EROs), que aumentam em concentração como resultado da exposição a substâncias tóxicas, neste caso, o herbicida. Enzimas antioxidantes, como exemplo a peroxidase, atuam na defesa e eliminação do excesso de EROs (OLCHANHESKI et al., 2014). Diante disso, como citado por Ogliari (2007), são requeridos estudos para determinar de que forma a enzima peroxidase se conjuga ao mesotriona.

Este teste complementar mostrou uma alternativa interessante do uso do extrato bruto de abobrinha, fonte enzimática de peroxidase, para a detecção do herbicida mesotriona.

## 6 CONCLUSÃO

O cantilever funcionalizado com extrato vegetal de peroxidase foi utilizado, de maneira inovadora, como um biossensor nanoestruturado para a detecção do herbicida glifosato em água.

A partir de um método simples, rápido e de custo reduzido e utilizando a abobrinha (*Cucurbita pepo*) como fonte vegetal foi possível obter extratos brutos contendo a enzima peroxidase. A análise de estabilidade da atividade enzimática de peroxidase nos extratos brutos mostrou que, entre as condições de extrações testadas (pH 7,0; 6,5 e 6,0 na ausência ou presença de agente protetor), a realizada em pH 7,0 na ausência de agente protetor, apresentou a melhor estabilidade, mantendo-se com cerca de 80% de atividade residual durante o período de armazenamento avaliado (70 dias). Esta condição foi selecionada para aplicação como camada sensora no cantilever.

Por meio da técnica de SAM, utilizando os agentes de reticulação EDC/NHS e extrato bruto de abobrinha como fonte enzimática de peroxidase, foi possível realizar a funcionalização do cantilever, o qual foi denominado de biossensor nanoestruturado em razão da espessura da camada sensora estar compreendida na nanoescala (80,48 nm). A análise de PM-IRRAS da etapa de deposição do extrato bruto de abobrinha demonstrou que as bandas típicas da enzima peroxidase (bandas amida I e amida II) estavam presentes sobre a superfície do cantilever. Observou-se pela técnica de AFM a formação de aglomerados no formato de colunas sobre a superfície, típicos da funcionalização pela técnica de SAM, bem como que os valores de rugosidade foram diferentes para cada camada depositada.

O biossensor nanoestruturado desenvolvido foi capaz de detectar a presença de glifosato em água na ordem de ppb (0,01 mg/L), apresentando durabilidade no tempo de armazenamento avaliado (25 dias).

Os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que o biossensor nanoestruturado obtido por meio da funcionalização de cantilever com extrato vegetal de peroxidase é uma ferramenta promissora para a detecção de glifosato em amostras de água.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados alcançados no presente estudo, sugere-se a realização dos seguintes tópicos para trabalhos futuros:

- Determinar parâmetros analíticos como sensibilidade, limite de detecção, repetibilidade, reprodutibilidade e histerese do biossensor nanoestruturado em relação a resposta ao herbicida glifosato.
- Verificar a resposta do biossensor nanoestruturado a outros pesticidas, como forma de avaliar possíveis interferentes.
- Avaliar a resposta do sensor com peroxidase em relação ao herbicida mesotriona, em diferentes concentrações.
- Aplicar análise de componentes principais para verificar a discriminação da resposta em diferentes herbicidas.
- Analisar amostras de águas de abastecimento e de água potável com o biossensor nanoestruturado e realizar análise cromatográfica para comparação.
- Analisar soluções preparadas a partir do herbicida comercial utilizado para aplicação em lavouras agrícolas com o biossensor nanoestruturado.
- Testar o biossensor nanoestruturado para o metabólito do glifosato, o AMPA, devido a rápida meia-vida do herbicida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMKIEWICZ, M. et al. A vapor phase deposition of self-assembled monolayers: Vinyl-terminated films of volatile silanes on silicon oxide substrates. **Thin Solid Films**, v. 520, p. 6719-6723, 2012.
- ALEXA, E. et al. HPLC and GC Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) in Water Samples. Proceedings. **43<sup>rd</sup> Croatian and 3<sup>rd</sup> International Symposium on Agriculture**. p. 100-105, 2015.
- 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.
- ALVAREZ, M. et al. Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT. **Biosensors and Bioelectronics**, v.18, p. 649-653, 2003.
- AMARANTE JUNIOR, O.P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- AMIOUR, S.D.; HAMBABA, L. Effect of pH, temperature and some chemicals on polyphenoloxidase and peroxidase activities in harvested Deglet Nour and Gharsdate. **Postharvest Biology and Technology**, v. 111, p. 77-82, 2016.
- AN, N. et al. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. **Applied Clay Science**, v. 114, p. 283-296, 2015.
- ANDRIGHETTI, M.S. et al. Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 1643-1653, 2014.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Índice Monográfico G-01 Glifosato**. 2015. Disponível em:  
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4e789280484701079bb2bfbd15bfe28/G01++Glifosato.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 12 ago. 2015.
- APARÍCIO, V.C. et al. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. **Chemosphere**, v. 93, p. 1866-1873, 2013.
- ARIAS-ESTÉVEZ, M. et al. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 123, p. 247-260, 2008.
- ARUGULA, M.A.; SIMONIAN, A. Novel trends in affinity biosensors: current challenges and perspectives. **Measurement Science and Technology**, v. 25, p. 1-22, 2014.
- ARYA, S.K. et al. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2810-2817, 2009.
- AWASTHI, A.P. et al. Nanoscale mechanical tailoring of interfaces using self-assembled monolayers. **Mechanics of Materials**, v. 98, p. 71-80, 2016.

BAUSSELS, J. Piezoresistive cantilevers for nanomechanical sensing. **Microelectronic Engineering**, v. 145, p. 9-20, 2015.

BENBROOK, C.M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 3, p. 1-15, 2016.

BERNARDES FILHO, R.; MATTOSO, L.H.C. Estudo de Polímeros por Microscopia de Força Atômica. Embrapa, **Comunicado Técnico 53**, 2003.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

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 2.914, de 12 de dezembro de 2011. 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.

BRIDLE, H. et al. Static mode microfluidic cantilevers for detection of waterborne pathogens. **Sensors and Actuators A**, v. 247, p. 144-149, 2016.

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. et al. Nanobiosensor for Diclofop Detection Based on Chemically Modified AFM Probes. **IEEE Sensors Journal**, v. 14, n. 5, p. 1467-1475, 2014.

CARRASCOSA, L.G. et al. Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n 3, p. 196-206, 2006.

CASELLA, L. et al. Purification, characterization and catalytic activity of anionic zucchini peroxidase. **BioMetals**, v. 6, p. 213-222, 1993.

CCANCCAPA, A. et al. Spatio-temporal patterns of pesticide residues in the Turia and Júcar Rivers (Spain). **Science of the Total Environment**, v. 540, p. 200-210, 2016.

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

CHEN, S.; SUN, D.; CHUNG, J.-S. Treatment of pesticide wastewater by moving-bed biofilm reactor combined with Fenton-coagulation pretreatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 144, 577-584, 2007.

CHEN, X. et al. Application of displacement principle for detecting heavy metal ions and EDTA using microcantilevers. **Sensors and Actuators B**, v. 161, p. 203-208, 2012.

CHOW, E.H.H; BUČAR, D.-K.; JONES, W. New opportunities in crystal engineering – the role of atomic force microscopy in studies of molecular crystals. **Chemical Communications**, v. 48, p. 9210-9226, 2012.

COLOMER-FARRARONS, J. et al. Portable Bio-Devices: Design of Electrochemical Instruments from Miniaturized to Implantable Devices. In: SERRA, P.A. (Ed.). **New Perspectives in Biosensors Technology and Applications**. Rijeka, Croácia: InTech, 2011. cap. 18, p. 373-400.

CUBILLAS, P.; ANDERSON, M.W. Atomic Force Microscopy. In: BRUCE, D.W.; O'HARE, D.; WALTON, R.I. (Eds.). **Multi Length-Scale Characterisation**. 1<sup>st</sup> 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, 2015.

DEVREESE, J. T. Importance of Nanosensors: Feynman's Vision and the Birth of Nanotechnology. **Materials Research Society Symposium Proceedings**, v. 952, p. 718-725, 2007.

DHULL, V. et al. Acetylcholinesterase biosensors for electrochemical detection of organophosphorus compounds: a review. **Biochemistry Research International**, v. 2013, p. 1-18, 2013.

DÍAZ, E.D.A. et al. Utilización de adsorbentes basados en quitosano y alginato sódico para la eliminación de iones metálicos:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ . **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 8, p. 20-37, 2007.

DILL, G.M. et al. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In: NANDULA, V.K. (Ed.). **Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2010. cap. 1, p. 1-33.

DING, J. et al. Current progress on the detection of glyphosate in environmental samples. **Journal of Science and Applications: BioMedicine**, v. 3, n. 6, p. 88-95, 2015.

DOUGHERTY G.M. et al. The zeta potential of surface-functionalized metallic nanorod particles in aqueous solution. **Electrophoresis**, v. 29, p.1131-1139, 2008.

DUFRENE, Y.F. et al. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM. **Nature Methods**, v. 10, n. 9, p. 847-854, 2013.

DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, p. 319-325, 2008.

DUN, B. et al. Development of highly glyphosate-tolerant tobacco by coexpression of glyphosate acetyltransferase *gat* and EPSPS *G2-aroA* genes. **The Crop Journal**, v. 2, p. 164-169, 2014.

DYK, J.S.V.; PLETSCHE, B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. **Chemosphere**, v. 82, p. 291–307, 2011.

EPA – United States Environmental Protection Agency. **Table of Regulated Drinking Water Contaminants**, Feb. 2016a. Disponível em: <<https://www.epa.gov/your-drinking-water/table-regulated-drinking-water-contaminants>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

EPA – United States Environmental Protection Agency. **What are pesticides and how do they work?** Mar. 2016b. Disponível em: <<http://www.epa.nsw.gov.au/pesticides/pestwhattrhow.htm#pestdefns>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

EUROPEAN UNION. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. **Official Journal of the European Communities**, 330, p. 32–54, dec. 1998. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0083&from=ES>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

FARRÉ, M. et al. Sensors and biosensors in support of EU Directives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 170-185, 2009.

FATIBELLO-FILHO, O. et al. Electrochemical biosensors based on vegetable tissues and crude extracts for environmental, food and pharmaceutical analysis. In: ALEGRET, S.; MERKOÇI, A. (Eds.). **Comprehensive Analytical Chemistry – Electrochemical Sensor Analysis**. 1<sup>st</sup> ed., v. 49. Oxford: Elsevier, 2007. cap. 17, p. 357-380.

FATIBELLO-FILHO, O.; SOUZA, M.G. de; VIEIRA, I. da C. Determinação espectrofotométrica por injeção em fluxo de compostos fenólicos em águas residuárias empregando peroxidase de abobrinha (*Cucurbita pepo*). **Eclética Química** (online), v. 27, 2002.

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.

FERNANDES, S.C.; OLIVEIRA, I.R.W.Z. de; VIEIRA, I.C. A green bean homogenate immobilized on chemically crosslinked chitin for determination of caffeic acid in white wine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 661-668, 2007.

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

FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A.; KUBOTA, L.T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.

FREY, B.L.; CORN, R.M.; WEIBEL, S.C. Polarization-modulation Approaches to Reflection–Absorption Spectroscopy. **Handbook of Vibrational Spectroscopy**, p. 1042-1056, 2006.

FRITZ, J. Cantilever biosensors. **Analyst**, v. 133, p. 855-863, 2008.

FRITZEN-GARCIA, M. et al. Carbon paste electrode modified with pine kernel peroxidase immobilized on Pegylated polyurethane nanoparticles. **Sensors and Actuators B**, v. 139, p. 570-575, 2009.

GARCIA, M.B.F. **Imobilização de enzimas em materiais nanoestruturados: atividade, estabilidade e aplicação da peroxidase imobilizada em bicamadas lipídicas e nanopartículas poliméricas**. 2010. 122 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 6, p. 497-526, 2005.

GODDARD, J.M.; HOTCHKISS, J.H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 7, p. 698-725, 2007.

GOMES, M.P. et al. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 17, p. 4691-4703, 2014.

GOMEZ-CABALLERO, A. et al. Water compatible stir-bar devices imprinted with underivatized glyphosate for selective sample clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 1451, p. 23-32, 2016.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M.A. et al. Glyphosate Immunosensor. Application for Water and Soil Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 4219-4227, 2005.

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

GUO, H. et al. Direct and sensitive determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples by high performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1443, p. 93-100, 2016.

GUO, S.; ZHU, X.; LOH, X.J. Controlling cell adhesion using layer-by-layer approaches for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 70, p. 1163-1175, 2017.

HANSEN, K.M.; THUNDAT, T. Microcantilever biosensors. **Methods**, v. 37, p. 57-64, 2005.

HEALTH CANADA. **Guidelines for Canadian Drinking Water Quality** – Summary Table. Water and Air Quality Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch. Canadá, 2014. Disponível em: <[http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt\\_formats/pdf/pubs/water-](http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/pdf/pubs/water-)

eau/sum\_guide-res\_recom/sum\_guide-res\_recom\_2014-10\_eng.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2016.

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

HERMANSON, G.T. Zero-Length Crosslinkers. In: HERMANSON, G.T. (Ed.). **Bioconjugate Techniques**. 3<sup>rd</sup> ed. Tóquio: Academic Press, 2013. cap. 4, p. 259-273.

HEU, C. et al. Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a Peak Force Tapping study on living cells. **Journal of Structural Biology**, v. 178, p.1-7, 2012.

HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical Sensors Definitions and Classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 9, 1247-1250, 1991.

HUNT, H.K.; ARMANI, A.M. Label-free biological and chemical sensors. **Nanoscale**, v. 2, p. 1544–1559, 2010.

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. **Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos**. 2015. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento\\_do\\_inca\\_sobre\\_os\\_agrotoxicos\\_06\\_abr\\_15.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf)>. Acesso em: 31 jul. 2015.

ISWALDI, I. et al. Profiling of phenolic and other polar compounds in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Food Research International**, v. 50, p. 77-84, 2013.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology** (the "Gold Book"), 2<sup>nd</sup> ed. Feb. 2014. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/Z06752.html>>. Acesso em: 18 ago. 2015.

JAYASUMANA, C.; GUNATILAKE, S.; SENANAYAKE, P. Glyphosate, Hard Water and Nephrotoxic Metals: Are They the Culprits Behind the Epidemic of Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology in Sri Lanka? **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 2, p. 2125-2147, 2014.

JUSTINO, C.I.L. et al. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 68, p. 2-17, 2015.

KARAM, D.; CRUZ, M.B. da. Características do herbicida mesotriona na cultura do milho. Embrapa, **Circular Técnica 52**, 2004.

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

KARUNAKARAN, C.; MADASAMY, T.; SETHY, N.K. Enzymatic Biosensors. In: KARUNAKARAN, C.; BHARGAVA, K.; BENJAMIN, R. (Eds.). **Biosensors and Bioelectronics**. Waltham, USA: Elsevier, 2015. cap. 3, p. 133-204.

KESTWAL, R. M.; BAGAL-KESTWAL, D.; CHIANG, B.-H. Fenugreek hydrogel-agarose composite entrapped gold nanoparticles for acetylcholinesterase based biosensor for carbamates detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 886, p. 143-150, 2015.

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

KIRKWOOD, J. et al. Using isoelectric point to determine the pH for initial protein crystallization trials. **Bioinformatics**, v. 31, p. 1444-1451, 2015.

KLAPETEK, P.; NEČAS, D.; ANDERSON, C. **Gwyddion user guide**. 2016. Disponível em: <http://gwyddion.net/documentation/user-guide-en/>. Acesso em: 02 fev. 2017.

KORAYEM, M.H.; NAHAVANDI, A. Modeling and simulation of AFM cantilever with two piezoelectric layers submerged in liquid over rough surfaces. **Precision Engineering**, v. 42, p. 261-275, 2015.

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

KOUA, D. et al. PeroxiBase: a database with new tools for peroxidase family classification. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 261-266, 2009.

KRAINER, F.; GLIEDER, A. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 1611-1625, 2015.

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.

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.

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, 2005.

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

LUPETTI, K.O. et al. A zucchini-peroxidase biosensor applied to dopamine determination. **II Farmaco**, v. 60, p. 179-183, 2005.

MACKAY, D. et al. **Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals**. Vol. 4 – Nitrogen and Sulfur Containing Compounds and Pesticides. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: Taylor e Francis, 2006.

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

- MARCOS, S. et al. An optical sensor for pesticide determination based on the autoindicating optical properties of peroxidase. **Talanta**, v. 122, p. 251-256, 2014.
- MARQUES, P.R.B.O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.
- MERCURIO, P. et al. Glyphosate persistence in seawater. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, p. 385-390, 2014.
- MESNAGE, R. et al. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 133-153, 2015.
- MOCCELINI, S.K. et al. Determination of thiodicarb using a biosensor based on alfalfa sprout peroxidase immobilized in self-assembled monolayers. **Talanta**, v. 82, p. 164-170, 2010.
- MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M.; ŠTURDÍK, E. Biosensors – classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109-120, 2012.
- MONSANTO. **What is Glyphosate?** Site oficial, Ago. 2014. Disponível em: <<http://www.monsanto.com/sitecollectiondocuments/glyphosate-safety-health.pdf>>. Acesso em: 04 ago. 2015.
- NRMMC – National Resource Management Ministerial Council. **Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 - National Water Quality Management Strategy**. Commonwealth of Australia, 2011. Disponível em: <[https://www.clearwater.asn.au/user-data/resource-files/Aust\\_drinking\\_water\\_guidelines.pdf](https://www.clearwater.asn.au/user-data/resource-files/Aust_drinking_water_guidelines.pdf)>. Acesso em: 27 abr. 2016.
- NT-MDT. **AFM Probes & Accessories Catalogue**. 2016. Disponível em: <[http://www.ntmdt.ie/data/media/files/accessories/afm\\_probes\\_accessories\\_catalogue.pdf](http://www.ntmdt.ie/data/media/files/accessories/afm_probes_accessories_catalogue.pdf)>. Acesso em: 16 mai. 2016.
- OGLIARI, J. **Envolvimento do sistema primário de translocação de prótons na desintoxicação do herbicida mesotrione em plantas de milho**. 2007. 126 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2007.
- OLCHANHESKI, L.R. et al. Mechanisms of Tolerance and High Degradation Capacity of the Herbicide Mesotrione by *Escherichia coli* Strain DH5- $\alpha$ . **Plos One**, v. 9, n. 6, p. 1-8, 2014.
- OLIVEIRA, G.C. et al. Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. **Talanta**, v. 98, p. 130-136, 2012a.
- OLIVEIRA, I.R.W.Z. de; FERNANDES, S.C.; VIEIRA, I.C. Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 366-372, 2006.
- OLIVEIRA, R.R.L. de. et al. Measurement of the Nanoscale Roughness by Atomic Force Microscopy: Basic Principles and Applications. In: BELLITTO, V. (Ed.). **Atomic Force**

**Microscopy - Imaging, Measuring and Manipulating Surfaces at the Atomic Scale.**  
Rijeka, Croácia: InTech, 2012b. cap 7, p. 147-174.

OLIVEIRA, T.R. et al. Enzymatic biosensors based on *ingá-cipó* peroxidase immobilised on sepiolite for TBHQ quantification. **Analyst**, v. 139, p. 2214-2220, 2014.

PESHIN, R.; ZHANG, W. Integrated Pest Management and Pesticide Use. In: PIMENTEL, D.; PESHIN, R. (Eds.). **Integrated Pest Management – Pesticides problems**. Vol. 3. Heidelberg, Berlin: Springer, 2014. cap. 1, p. 1-46.

POLLEGIONI, L; SCHONBRUNN, E.; SIEHL, D. Molecular basis of glyphosate resistance – different approaches through protein engineering. **FEBS Journal**, v. 278, p. 2753-2766, 2011.

QIAN, K. et al. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 222-226, 2009.

RAI, M. et al. Biomedical Applications of Nanobiosensors: the State-of-the-Art. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 1, p. 14-24, 2012.

RAITERI, R. et al. Micromechanical cantilever-based biosensors. **Sensors and Actuators B**, v. 4010, p. 1-12, 2001.

REBOLLAR-PÉREZ, G. et al. Biosensors based on oxidative enzymes for detection of environmental pollutants. **Biocatalysis**, v. 1, p. 118-129, 2015.

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.

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

RZYMSKI, P. et al. The effect of glyphosate-based herbicide on aquatic organisms – a case study. **Limnological Review**, v. 13, n. 4, p. 215-220, 2013.

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**. Rijeka, Croácia: InTech, 2013. cap. 4, p. 89-110.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. **Biophysical Chemistry**, v. 107, p. 133-149, 2004.

SASSOLAS, A.; BLUM, L.J.; LECA-BOUVIER, B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 489-511, 2012.

- SCHUETTE, J. **Environmental Fate of Glyphosate**. Environmental Monitoring & Pest Management, 1998. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/glyphos.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2016.
- 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.
- SINGH, C. **Development of optical biosensor for the detection of pesticides**. 2014. Thesis (Master of Science in Chemistry) – School of Chemistry & Biochemistry, Thapar University, Patiala, 2014.
- SONGA, E.A. et al. Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. **Bioelectrochemistry**, v. 75, p. 117-123, 2009.
- SONGA, E.A.; OKONKO, J.O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review. **Talanta**, v. 155, p. 289-304, 2016.
- SPADOTTO, C.A. et al. Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente, **Documentos 42**, 2004.
- SPRANKLE, P.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Adsorption, Mobility, and Microbial Degradation of Glyphosate in the Soil. **Weed Science**, v. 23, n. 3, p. 229-234, 1975.
- 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.
- STEUDE, A. et al. An electrode array for electrochemical immuno-sensing using the example of impedimetric tenascin C detection. **Lab on a Chip**, v. 11, p. 2884-2892, 2011.
- STRUGER, J. et al. Occurrence of Glyphosate in Surface Waters of Southern Ontario. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, p. 378-384, 2008.
- SUN, J. et al. Contamination of phthalate esters, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in agricultural soils from the Yangtze River Delta of China. **Science of the Total Environment**, v. 544, p. 670-676, 2016.
- SZEKACS, A.; DARVAS, B. Forty Years with Glyphosate. In: HASANEEN, M.N. (Ed.). **Herbicides – Properties, Synthesis and Control of Weeds**. Rijeka, Croácia: InTech, 2012. cap. 14, p. 247-284.
- TAMAYO, J. et al. Biosensors Based on Nanomechanical Systems. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 3, p. 1287-1311, 2013.
- TANG, C. et al. Water pollution risk simulation and prediction in the main canal of the South-to-North Water Transfer Project. **Journal of Hydrology**, v. 519, p. 2111-2120, 2014.

- TETTE, P. A. S. et al. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. **Talanta**, v. 149, p. 124-141, 2016.
- THONGSOOK, T.; BARRETT, D.M. Purification and Partial Characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) Peroxidases. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3206-3214, 2005.
- TIAN, J.; A capacitive surface stress biosensor for CSFV detection. **Micro/Nano Devices and Systems**, v. 159, p. 55-59, 2016.
- TOUHAMI, A. Biosensors and Nanobiosensors: Design and Applications. In: SEIFALIAN, A.; MEL, A. de.; KALASKAR, D.M. (Eds.). **Nanomedicine**. Manchester: One Central Press, 2014. cap. 15, p. 374-403.
- TZASKOS, D.F. et al. Development of sampling for quantification of glyphosate in natural waters. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 4, p. 399-405, 2012.
- TZIN, V.; GALILI, G. New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 956-972, 2010.
- UNEP GEMS/WATER PROGRAMME. **Water Quality for Ecosystem and Human Health**. 2<sup>nd</sup> ed. Ontario, 2008. Disponível em: <[http://www.ais.unwater.org/ais/pluginfile.php/496/course/section/149/water\\_quality\\_human\\_health.pdf](http://www.ais.unwater.org/ais/pluginfile.php/496/course/section/149/water_quality_human_health.pdf)>. Acesso em: 31 jul. 2015.
- UNESCO – United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization; WMO – World Meteorological Organization; IAEA – International Atomic Energy Agency. The State of the Resource. In: UNESCO – United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization; WWAP – United Nations World Water Assessment Programme. **Water a shared responsibility**. Barcelona: Berghahn Books, 2006. cap. 4, p. 121-156.
- UZUNLAR, E. et al. Frequency response of microcantilevers immersed in gaseous, liquid, and supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 81, p. 254-264, 2013.
- 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.
- VAN TOAN, P. et al. Pesticide management and their residues in sediments and surface and drinking water in the Mekong Delta, Vietnam. **Science of the Total Environment**, v. 452-453, p. 28-39, 2013.
- VARIOLA, F. Atomic force microscopy in biomaterials surface science. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, p. 2950-2959, 2015.
- VASHIST, S. A. Review of Microcantilevers for Sensing Applications. **Journal of Nanotechnology Online**, v. 3, p. 1-15, 2007.
- VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, p. 249-259, 2004.

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

VIEIRA, I.C.; LUPETTI, K.O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). **Química Nova**, v. 26, p. 39-43, 2003.

WAICHMAN, A.V. A problemática do uso de agrotóxicos no Brasil: a necessidade de construção de uma visão compartilhada por todos os atores sociais. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 17-50, 2012.

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, C. et al. Different EDC/NHS Activation Mechanisms between PAA and PMAA Brushes and the Following Amidation Reactions. **Langmuir**, v. 27, p. 12058-12068, 2011.

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.

WHO – World Health Organization. **Guidelines for Drinking-water Quality**. 4<sup>th</sup> ed. 2011. Disponível em:

<[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf)>. Acesso em: 27 abr. 2016.

WHO – World Health Organization. **Water** (online). 2015. Disponível em:

<<http://www.who.int/topics/water/en/>>. Acesso em: 13 set. 2015.

WWAP – United Nations World Water Assessment Programme. **The United Nations World Water Development Report 2015: Water for a Sustainable World**. Paris: UNESCO, 2015.

XIA, N. et al. Probing of EDC/NHSS-Mediated Covalent Coupling Reaction by the Immobilization of Electrochemically Active Biomolecules. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 2459-2467, 2013.

YAN, X.; JI, H.-F.; LVOV, Y. Modification of microcantilevers using layer-by-layer nanoassembly film for glucose measurement. **Chemical Physics Letters**, v. 396, n.1-3, p. 34-37, 2004.

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**, v. 133, p.370-373, 2008.

YUSA, V.; COSCOLLA, C.; MILLET, M. New screening approach for risk assessment of pesticides in ambient air. **Atmospheric Environment**, v. 96, p. 322-330, 2014.

ZÁMOCKÝ, M. et al. Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 574, p.108-119, 2015.

ZERAIK, A.E. et al. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

ZHANG, Q. et al. An enzyme-assisted electrochemiluminescent biosensor developed on order mesoporous carbons substrate for ultrasensitive glyphosate sensing. **Electrochimica Acta**, v. 186, p. 624-630, 2015.