

**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**

**ALANA MARIE DE CEZARO**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSORES E NANOIMUNOSENSORES**  
**DE CANTILEVERS PARA DETECÇÃO DE ESTRONA E 17  $\beta$ -ESTRADIOL EM**  
**ÁGUA**

**ERECHIM - RS**

**2019**

**ALANA MARIE DE CEZARO**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSORES E NANOIMUNOSSENSORES  
DE CANTILEVERS PARA DETECÇÃO DE ESTRONA E 17  $\beta$ -ESTRADIOL EM  
ÁGUA**

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

Orientadoras: Dr<sup>a</sup> Juliana Steffens  
Dr<sup>a</sup> Clarice Steffens  
Coorientador: Dr. Daniel Souza Corrêa

**ERECHIM – RS**

**2019**

**ALANA MARIE DE CEZARO**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSORES E NANOIMUNOSSENSORES  
DE CANTILEVERS PARA DETECÇÃO DE ESTRONA E 17  $\beta$ -ESTRADIOL EM  
ÁGUA**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora, 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, 11 de fevereiro de 2019.

Banca examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Juliana Steffens, Dra./  
URI- Erechim (orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Clarice Steffens, Dra./  
URI- Erechim (orientadora)

---

Daniel Souza Correa, Dr./ EMBRAPA  
INSTRUMENTAÇÃO (coorientador)

---

Prof. Rogério Marcos Dallago, Dr./  
URI- Erechim (membro da banca)

---

Prof. Luiz Ubiratan Hepp, Dr./  
URI- Erechim (membro da banca)

---

Elaine Cristina Paris, Dra./ EMBRAPA  
INSTRUMENTAÇÃO (membro da banca)

---

Prof<sup>a</sup>. Gean Delise Pasquali Vargas, Dra./  
UFFS - Erechim (membro da banca)

C425 Cezaro, Alana Marie de

Desenvolvimento de nanobiossensores e nanoimunossensores de cantilevers para detecção de estrona e 17  $\beta$  - estradiol em água / Alana Marie de Cezaro. – 2018. 110 f.

Tese (doutorado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2019.

“Orientação: Juliana Steffens; Clarice Steffens; Daniel Souza Corrêa”

1. Recursos hídricos 2. Hormônio 3. Biossensor 4. Qualidade da água I. Título

C.D.U.: 628

## AGRADEDIMENTOS

Um agradecimento especial à Deus, por todas as oportunidades que me deu ao longo destes anos, pelos desafios que cruzaram a minha vida e por estar sempre comigo na minha caminhada.

À minha família, meus pais Celso e Silvana e minhas irmãs Aline e Amanda, por sempre acreditarem no meu potencial e por todo carinho despendido neste período. Amo vocês!

Ao Jeferson, por nunca duvidar das minhas escolhas e por estar ao meu lado sempre, em todos os momentos. Pelos desabafos, pelas conversas e por todos os abraços de aconchego. Como é bom ter você ao meu lado!

As minhas colegas de doutorado e integrantes do grupo de nanotecnologia (Aline, Janine, Alexandra e Daniela). Agradeço vocês por todo o suporte nesta etapa, pelas trocas de experiências e experimentos compartilhados. Um agradecimento especial à Aline, que começou como uma colega e se tornou uma grande amiga. Obrigada por tudo, pela troca de conhecimento, pelos aprendizados e por toda ajuda neste período. Agradeço a companhia que se tornou fundamental para mim!

As minhas amigas de uma vida toda Aline Matuella, Nena e Rubia. Obrigada por todo o apoio, risadas e cafés que compartilhamos. Fica o meu abraço especial à Rubia, por toda a ajuda nesta etapa final do doutorado e por não medir esforços em não nos deixar desistir!

As minhas orientadoras, Clarice Steffens e Juliana Steffens, pela oportunidade de abraçar este desafio, pelo auxílio, pelas ideias e, especialmente pelo carinho e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu coorientador Daniel, por todo o esforço despendido para ajudar no desenvolvimento deste trabalho.

À Ilizandra Fernandes e Alexandra Manzoli pelas contribuições dadas em todas as etapas deste estudo.

Ao prof. Cláudio Zakrzewski, pela ajuda com o sistema de resfriamento do microscópio de força atômica e no suporte ao AFM.

Ao Carlos Costa (LNNano) pelo suporte com as análises do AFM e pela prontidão em ajudar, sempre que solicitado.

Aos colegas e professores do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URI – Erechim, Central de materiais, Embrapa instrumentação e USP que colaboraram direta ou indiretamente neste trabalho.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões de Erechim (URI) e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

À CAPES e Finep pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros que permitiram a realização deste trabalho.

À banca avaliadora, por fazer parte deste trabalho.

## RESUMO

A crescente expansão dos grandes centros urbanos e industriais tem promovido a degradação progressiva da qualidade dos recursos hídricos, devido ao aumento da contaminação da água. Alguns agentes poluidores têm causado preocupações e incentivado muitas pesquisas em todo o mundo. Os chamados desreguladores endócrinos incluem os hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona e oferecem risco à saúde humana e algumas espécies de animais, mesmo em pequenas quantidades. Na busca por alternativas para a detecção destes compostos, os biossensores apresentam-se como uma opção para a detecção dos desreguladores endócrinos. Neste contexto, o presente estudo desenvolveu diferentes nanobiossensores de cantilever (nanoimunossensor funcionalizado com anticorpos - anti-17  $\beta$ -estradiol e anti-estrona e nanobiossensor funcionalizado com enzima tirosinase) capazes de detectar os hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona em meio líquido, em escala de parte por bilhão (ppb), apresentando estabilidade no tempo de armazenamento avaliado. A funcionalização dos dispositivos foi realizada empregando a técnica de camadas automontadas (SAM) sobre a superfície de silício contendo ouro, ácido 16-mercaptohexadecanóico (AMHD), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC)/N-hidroxi-succinimida (NHS), anticorpo e a enzima tirosinase. Por meio das curvas de calibração foi possível observar limites de detecção na gama de ppb e a alta sensibilidade dos dispositivos, além da reversibilidade de 100%. Os resultados demonstraram que o método de imobilização foi utilizado com êxito, comprovado pelas técnicas de caracterização de superfície por espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS), microscopia de força atômica (AFM) e microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que os nanobiossensores de cantilever obtidos por meio da funcionalização com anticorpos e enzima peroxidase é uma ferramenta promissora para a detecção de hormônios em amostras de água.

*Palavras-chave:* Recursos hídricos, qualidade da água, desreguladores endócrinos, hormônio, AFM, biossensor.

## ABSTRACT

The increasing expansion of large urban and industrial centers has promoted the progressive degradation of the quality of water resources, due to the increase of water contamination. Some polluting agents have caused concerns and encouraged many surveys around the world. So-called endocrine disrupters include  $17\beta$ -estradiol and estrone hormones and pose a risk to human health and some animal species, even in small amounts. In the search for alternatives for the detection of these compounds, biosensors are presented as an option for the detection of endocrine disrupters. In this context, the present study developed different nanobiosensor cantilevers (nanoimmunosensor functionalized with antibodies - anti- $17\beta$ -estradiol and anti-estrone and nanobiosensor functionalized with enzyme tyrosinase) capable of detecting hormones  $17\beta$ -estradiol and estrone in liquid medium, in part-per-billion (ppb) scale, presenting stability in the storage time evaluated. The functionalization of the devices was performed using the self-assembled layer technique (SAM) on the silicon surface containing gold, 16-mercaptohexadecanoic acid (AMHD), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) / N-hydroxy-succinimide (NHS), antibody and the enzyme tyrosinase. By means of the calibration curves it was possible to observe limits of detection in the ppb range and the high sensitivity of the devices, besides the reversibility of 100%. The results demonstrated that the immobilization method was successfully used, demonstrated by the polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS), atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). The results found in the present work suggest that the cantilever nanobiosensors obtained through the functionalization with antibodies and enzyme peroxidase is a promising tool for the detection of hormones in water samples.

*Keywords:* Water resources, water quality, endocrine disrupters, hormone, AFM, biosensor.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas de exposição de hormônios no meio ambiente. ....	25
Figura 2 - Estrutura química dos esteroides sexuais (a) 17 $\beta$ -estradiol e (b) estrona. ....	29
Figura 3 - Diagrama esquemático para preparação e análise dos desreguladores endócrinos. ....	32
Figura 4 - Estruturas (I) centro ativo da tirosinase e (II) molécula de histidina. ....	36
Figura 5 - Esquema simplificado do mecanismo de ação da tirosinase. ....	36
Figura 6 - Região de ligação antígeno-anticorpo. ....	38
Figura 7 - Monitoramento da deflexão por meio do método de feixe óptico. ....	40
Figura 8 - Diagrama esquemático do corpo de um cantilever. ....	41
Figura 9 - Representação esquemática dos dois modos de operação do cantilever, (a) mudança da frequência devido à mudança da massa efetiva e (b) tensão na superfície devido à adsorção de moléculas. ....	42
Figura 10 - Canticlip usado em meio líquido. ....	45
Figura 11 - Leitura da deflexão do cantilever em uma amostra líquida. ....	47
Figura 12 - Esquema ilustrativo dos tipos básicos de métodos de imobilização enzimáticos: a) adsorção; (b) ligação covalente; (c) encapsulação, e (d) ligação covalente cruzada. ....	49
Figura 13 - Representação da técnica de monocamadas automontadas. ....	50
Figura 14 - Especificações do cantilever utilizado para funcionalização, onde (a) comprimento, (b) largura e (c) espessura da ponta do cantilever. ....	61
Figura 15 - Cantilever imerso durante a etapa de funcionalização, onde (a) vidro de relógio (100 mm de diâmetro), (b) cantilever imerso na solução durante a funcionalização. A moeda (24 mm de diâmetro) foi para fins de comparação de tamanho com o cantilever utilizado neste trabalho. ....	63
Figura 16 - Imersão do cantilever na solução de hormônio para obtenção da medida de voltagem: (a) Vista lateral do cabeçote; (b) Imersão do cantilever em meio líquido. ....	66
Figura 17 - Microscópio de força atômica (AFM) com sistema de resfriamento acoplado em uma caixa de MDF. (a) Controlador C3000, (b) Controlador da mesa anti-vibratória, (c) Mesa anti-vibratória, (d) Cabeçote, (e) Controlador Easyscan 2, (f) Fonte do sistema Pelti, (g) Controlador digital externo de temperatura, (h) Monitores de computador para controle das imagens (i) Caixa de MDF acoplada ao micro ventilador externo. ....	68
Figura 18 - Representação esquemática da funcionalização do cantilever com anticorpo. ....	71

Figura 19 - 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 + Anticorpo. ....	73
Figura 20 - Caracterização de superfície por análise topográfica obtida por meio de AFM em cada etapa de funcionalização (a) Silício; (b) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS + Anticorpo. ....	74
Figura 21 - Caracterização de superfície por análise de MEV em cada etapa de funcionalização (a) Silício; (b) Silício + Ouro; (c) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD; (d) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS; (e) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS + Anticorpo. ....	76
Figura 22 - Resposta de detecção do cantilever funcionalizado com anti-17 $\beta$ -estradiol em função do tempo com diferentes concentrações de 17 $\beta$ -estradiol. ....	77
Figura 23 - (a) Resposta de detecção do nanoimunossensor funcionalizado com anti-17 $\beta$ -estradiol em função do tempo com diferentes concentrações 17 $\beta$ -estradiol. (b) Curva de calibração das concentrações de 17 $\beta$ -estradiol versus voltagem do cantilever – $R^2$ : 0,98. ....	78
Figura 24 - (a) Resposta de detecção do nanoimunossensor funcionalizado com anti-estrona em função do tempo com diferentes concentrações de hormônio estrona. (b) Curva de calibração das concentrações de estrona versus voltagem do cantilever – $R^2$ : 0,98. ....	79
Figura 25 - Resposta de voltagem do cantilever de silício sem funcionalização exposto a água e 50 $\mu$ g/L de 17 $\beta$ -estradiol e estrona. ....	80
Figura 26 - Reversibilidade do nanoimunossensor funcionalizado com anti-estrona. ....	82
Figura 27 - 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 + Tirosinase. ....	93
Figura 28 - Caracterização de superfície por análise topográfica obtida por meio de AFM em cada etapa de funcionalização (a) Silício; (b) Silício + Ouro; (c) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD; (d) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS; (e) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS + Tirosinase. ....	94
Figura 29 - Caracterização de superfície por análise de MEV em cada etapa de funcionalização (a) Silício; (b) Silício + Ouro; (c) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD; (d) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS; (e) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS + Tirosinase. ....	96
Figura 30 - Resposta de detecção do cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase em função do tempo com diferentes concentrações testes de hormônio estrona. ....	98

Figura 31 - (a) Resposta de detecção do nanobiossensor funcionalizado com tirosinase em função do tempo com diferentes concentrações de hormônio 17 $\beta$ -estradiol. (b) Curva de calibração das concentrações de 17 $\beta$ -estradiol versus voltagem do cantilever – $R^2$ : 0,98.....	99
Figura 32 - (a) Resposta de detecção do nanobiossensor funcionalizado com tirosinase em função do tempo com diferentes concentrações de hormônio estrona. (b) Curva de calibração das concentrações de estrona versus voltagem do cantilever – $R^2$ : 0,92.....	99
Figura 33 - Resposta de voltagem do cantilever de silício sem funcionalização exposto a água e a 50 $\mu$ g/L de 17 $\beta$ -estradiol e estrona. ....	101
Figura 34 - Reversibilidade do nanobiossensor funcionalizado com a enzima tirosinase ao hormônio estrona. ....	102
Figura 35 - Resposta do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com enzima tirosinase aos interferentes. ....	104

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Excreção diária ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) dos hormônios por seres humanos.....	26
Tabela 2 - Principais fontes de perturbadores endócrinos em águas superficiais. ....	31
Tabela 3 - Principais biorreceptores utilizados para o desenvolvimento dos biossensores.....	34
Tabela 4 - Valores de desvio médio quadrático de rugosidade (Rms) obtido por meio de AFM para cada etapa de funcionalização dos nanoimunossensores.....	74
Tabela 5 - Valores de limite de detecção (LD), Sensitividade e R2 dos nanoimunossensores funcionalizados com anti-17 $\beta$ -estradiol e anti-estrona.....	81
Tabela 6 - Estabilidade do nanoimunossensor com anticorpo anti-estrona e anti-17 $\beta$ -estradiol, respectivamente. ....	83
Tabela 7 - Valores de desvio médio quadrático de rugosidade (Rms) obtido por meio de AFM para cada etapa de funcionalização dos nanobiossensores.....	95
Tabela 8 - Estabilidade dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com tirosinase aos hormônios estrona e 17 $\beta$ -estradiol.....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ácido 16-MHD – Ácido 16-mercaptohexadecanóico

AFM – Microscopia de Força Atômica (do inglês, *Atomic Force Microscopy*)

Anticorpo Monoclonal (do inglês, *mAbs*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CC – Corrente contínua

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

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

EEC – Comunidade Econômica Europeia

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

ETE – Estação de Tratamento de Esgotos

FDA – *Food and Drug Administration* (Agência dos EUA)

HPA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HPLC - Cromatografia líquida de alto desempenho (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)

Ig, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM – Imunoglobulinas

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LD – Limite de Detecção

MDF – Fibra de Média Densidade

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

NHS - N-hidroxisuccinimida

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCB – Bifenilas Policloradas

PM-IRRAS – Espectroscopia de Absorção de Reflexão por Infravermelho Modulada por Polarização (do inglês, *Polarization-Modulated Infrared Reflection Absorption Spectroscopy*)

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

SPE – Extração em Fase Sólida

$\mu\text{m}$  – micrômetro

mm - milímetros

N - Newton

nm – nanômetros

nN – nanonewtons

ppb – Partes por bilhão

ppt – Partes por trilhão

V - Volts

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 OBJETIVOS.....	20
1.1.1 Objetivo geral.....	20
1.1.2 Objetivos específicos.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
<b>CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>22</b>
2.1 OCORRÊNCIA DOS HORMÔNIOS NO MEIO AMBIENTE.....	23
2.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	26
2.2.1 Hormônios.....	27
2.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO.....	29
2.3.1 Métodos Cromatográficos.....	30
2.3.2 Método ELISA.....	31
2.4 BIOSSENSORES.....	32
2.4.1 Biossensores Enzimáticos.....	33
2.4.2 Enzima Tirosinase.....	34
2.4.3 Imunossensores.....	36
2.5 NANOBIOSENSORES.....	38
2.5.1 Cantilevers.....	38
2.5.2 Operação em meio líquido.....	44
2.5.3 Métodos de detecção em meio líquido.....	45
2.6 FUNCIONALIZAÇÃO DOS CANTILEVERS.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS.....	50
<b>CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DE NANOIMUNOSSENSORES DE CANTILEVERS PARA DETECÇÃO DE 17 <math>\beta</math>-ESTRADIOL E ESTRONA EM ÁGUA.....</b>	<b>57</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	58
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.2.1 Material.....	59

3.2.1.1 Cantilever.....	59
3.2.2. Métodos.....	60
3.2.2.1 Caracterização da superfície dos nanoimunossensores.....	62
3.2.2.1.1 Espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS) .....	62
3.2.2.1.2 Microscopia de força atômica (AFM).....	63
3.2.2.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	63
3.2.2.2 Medida de voltagem dos nanoimunossensores de cantilever.....	64
3.2.2.3 Resposta dos nanoimunossensores aos hormônios.....	64
3.2.2.4 Caracterização da resposta dos nanoimunossensores.....	67
3.2.2.4.1 Sensitividade.....	68
3.2.2.4.2 Limite de detecção (LD).....	68
3.2.2.4.3 Reversibilidade.....	68
3.2.2.4.4 Estabilidade.....	69
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
3.3.1 Funcionalização: Formação das ligações químicas dos nanoimunossensores.....	69
3.3.2 Caracterização da superfície.....	71
3.3.2.1 Espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS).....	71
3.3.2.2 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	72
3.3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	74
3.3.3 Avaliação das respostas na detecção dos hormônios.....	76
3.3.3.1 Nanoimunossensores funcionalizados com anti-17 $\beta$ -estradiol e anti-estrona.....	77
3.3.3.2 Sensitividade e Limite de Detecção (LD).....	79
3.3.3.3 Reversibilidade.....	80
3.3.3.4 Estabilidade.....	81
3.4 CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS.....	83

<b>CAPÍTULO IV - NANOBIOSENSORES DE CANTILEVERS FUNCIONALIZADOS COM ENZIMA TIROSINASE PARA DETECÇÃO DE HORMÔNIOS EM ÁGUA.....</b>	<b>87</b>
---	-----------

4.1 INTRODUÇÃO.....	88
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	89
4.2.1 Material.....	89
4.2.2. Métodos.....	89
4.2.2.1 Caracterização da superfície dos dispositivos.....	90
4.2.2.2 Resposta dos nanobiossensores de cantilever aos hormônios.....	91
4.2.2.3 Análise de Interferentes.....	91
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
4.3.1 Caracterização da superfície dos nanobiossensores.....	91
4.3.2 Resposta dos nanobiossensores de cantilever aos hormônios.....	96
4.3.3 Interferentes.....	102
4.4 CONCLUSÃO.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
<b>CAPÍTULO V – CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>107</b>
<b>CAPÍTULO VI – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>109</b>



## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO**

Esta tese está organizada em 5 capítulos. O Capítulo 1 apresenta uma introdução geral sobre hormônios, presença de desreguladores endócrinos no meio ambiente, métodos de detecção, biossensores e nanobiossensores de cantilever. Neste mesmo capítulo estão descritos os objetivos gerais e específicos. Na sequência, o Capítulo 2 apresenta os aspectos teóricos que fundamentam esta tese.

Os resultados obtidos estão divididos em dois capítulos, os quais tratam, de forma independente, cada um dos estudos realizados. Desta forma, os estudos experimentais apresentados nos Capítulos 3 e 4 serão estruturados com uma breve introdução, metodologia utilizada, apresentação e discussão dos resultados, as conclusões. No Capítulo 5 estão as conclusões gerais da tese e, por fim, as referências utilizadas.

## **1. INTRODUÇÃO**

A utilização de águas provenientes de bacias hidrográficas para o consumo humano, têm causado preocupação acerca da contaminação das fontes de água (CAPP et al., 2012).

O aumento da sensibilidade na detecção de poluentes químicos e seus efeitos biológicos, com o advento de novos métodos, preocupa a comunidade científica para os contaminantes que anteriormente não eram detectados ou considerados de risco (FAVERO et al., 2007). Os hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona pertencem a um grupo denominado desreguladores endócrinos, os quais possuem a capacidade de simular ou alterar a atividade hormonal de animais, incluindo os seres humanos. Mesmo em baixas concentrações (da ordem de  $\mu\text{g/L}$  e  $\text{ng/L}$ ) estes compostos podem estar relacionados ao aumento da detecção de anomalias em humanos e animais, chamando a atenção de muitos pesquisadores para a questão dos micropoluentes emergentes (PESSOA et al., 2012).

Existem estudos que demonstraram relacionamento de desreguladores endócrinos com diversos distúrbios do organismo humano. Segundo Reis Filho, Araújo e Vieira (2006), em nível de sistema reprodutor, podem aparecer cânceres de testículos e de mamas, infertilidade, irregularidade menstrual; em nível de sistema nervoso, podem surgir distúrbios nas diversas funções cerebrais responsáveis pelos controles homeostáticos e fisiológicos. Em ambientes aquáticos poluídos, foram identificados peixes machos com características sexuais femininas (REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006).

A detecção de hormônios em água tem sido realizada, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos. Contudo, estas técnicas apresentam algumas

limitações, pois os equipamentos são grandes, complexos e necessitam de um preparo de amostra, fatores que dificultam o monitoramento contínuo *in situ* (OLIVEIRA et al., 2015). Essa necessidade de métodos alternativos mais versáteis, simples e rápidos para a determinação analítica de poluentes em água gera grandes expectativas em relação aos biossensores, ilustrando sua importância como ferramenta para complementar outras técnicas analíticas (CHAVERO, 2013).

Dentro deste contexto, os nanobiossensores e nanoimunossensores de cantilever são exemplos de dispositivos sensíveis à diversos compostos mesmo em concentrações extremamente baixas, com algumas vantagens em sua utilização, como tamanho pequeno, baixo custo e alto desempenho (PAULI et al., 2015; BAI et al., 2014). Mas para que estes biossensores tenham eficiência na detecção de analitos é necessário que eles sejam funcionalizados, ou seja, recobertos com uma camada específica, como enzimas e anticorpos, que os tornem capazes de reconhecer a molécula de interesse (XUE et al., 2011; COSNIER, 2000).

Para a funcionalização a técnica de monocamadas automontadas (*self-Assembled Monolayer-SAM*) vem se destacando, pois permite a obtenção de uma estrutura multicamadas de maneira eficiente e com baixo custo experimental (MUENCHEN et al., 2016). A formação de SAM permite interações entre moléculas e superfícies, modificando suas propriedades físicas e químicas e tem se tornado um procedimento de imobilização bastante empregado para fixar o material biológico, devido à sua simplicidade, versatilidade e possibilidade de produzir estruturas altamente ordenadas. O processo de imobilização se dá em um ambiente favorável às biomoléculas, em solução aquosa, com pH e força iônica controlados, evitando a desnaturação e a perda de atividade (SANTOS, 2012).

Dada a importância que a detecção de hormônios representa para a saúde de humanos e animais, este estudo traz algumas alternativas que podem, em um futuro, ser aplicadas diretamente para o controle destes compostos em águas. A utilização de dispositivos de cantilever, que abrange a escala nano, é uma metodologia inovadora e que traz muitos benefícios em sua utilização, como o tamanho miniaturizado, limites de detecção baixos (na escala de ppb) e que utiliza materiais biológicos, como anticorpos e enzimas, sensíveis e seletivos ao analito de interesse.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nanobiossensores e nanoimunossensores de cantilever para detecção dos hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona em água. Para tanto, os dispositivos foram funcionalizados por meio da técnica SAM, utilizando a

enzima tirosinase e os anticorpos anti-17  $\beta$ -estradiol e anti-estrona e a superfície foi caracterizada por microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de absorção-reflexão no infravermelho com polarização modulada (PMIRRAS). A resposta dos mesmos foi estudada em relação ao limite de detecção, sensibilidade, estabilidade, reversibilidade. Os sensores desenvolvidos foram aplicados em amostras reais de água de abastecimento.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Este trabalho tem por objetivo desenvolver diferentes biossensores de cantilever (nanoimunossensor funcionalizado com os anticorpos anti – 17  $\beta$  estradiol e anti-estrona e nanobiossensor funcionalizado com enzima tirosinase) para detectar os hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona em amostras de águas.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Funcionalizar quimicamente a superfície do cantilever com anticorpos (anti-estrona e anti-17  $\beta$ -estradiol) e com a enzima comercial tirosinase por meio da técnica de monocamadas automontadas (SAM), utilizando agentes de reticulação (EDC/NHS).
- Caracterizar a superfície dos cantilevers.
- Verificar a resposta dos dispositivos de cantilever funcionalizados em função do tempo de contato com diferentes concentrações dos hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona, determinando o limite de detecção (LD), sensibilidade reversibilidade, estabilidade e tempo de resposta.
- Avaliar a eficácia dos dispositivos de cantilever quando em contato com possíveis interferentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAI, X., LU, B., CHEN, X., ZHANG, B., TANG, J. Reversible detection of vancomycin using peptide-functionalized cantilever array sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 62, p. 145–150, 2014.
- CHAVERO, L. N. Desenvolvimento e caracterização de plataformas nanoestruturadas de polipirrol para biossensores amperométricos não enzimáticos e enzimáticos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2013.
- CAPP, N., AYACH, L. R., SANTOS, T. M. P., GUIMARÃES, S. T. L. Qualidade da água e fatores de contaminação de poços rasos na área urbana de Anastácio (MS). **Geografia Ensino & Pesquisa**, v. 16 (3), p. 77 -92, 2012.
- COSNIER, S. Biosensors based on immobilization of biomolecules by electrogenerated polymer films. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 89 (2), p. 127 - 138, 2000.
- FAVERO, J. L., MUNIZ, A. R., SANTOS, R. P. B. Análise teórico-experimental da dispersão de poluentes líquidos em solos. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 12 (4), p. 410-416, 2007.
- MUENCHEN, D. K., MARTINAZZO, J., CEZARO, A. M., RIGO, A. A., BREZOLIN, A. N., MANZOLI, A., LEITE, F. L., STEFFENS, C., STEFFENS, J. Pesticide Detection in Soil Using Biosensors and Nanobiosensors. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v.6 (6), p. 1659 – 1675, 2016.
- OLIVEIRA, D. P. C.; RIBEIRO, F. W. P.; BECKER, H.; LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Biossensor eletroquímico baseado na enzima tirosinase para a determinação de fenol em efluentes. **Química Nova**, v. 38 (7), p. 924 – 931, 2015.
- PAULI, G. E. N., ARARUNA, F. B., EIRAS, C., LEITE, J. R. S. A., CHAVES, O. S., BRITO FILHO, S. G., SOUZA, M. F. V., CHAVERO, L. N., BECHTOLD, I. H. Nanostructured layer-by-layer films containing phaeophytin-b: Electrochemical characterization for sensing purposes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 47 (1), p. 339-344, 2015.
- PESSOA, G. P.; SANTOS, A. B.; SOUZA, N. C.; ALVES, J. A. C. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. **Química Nova**, v. 35 (5), p. 968 – 973, 2012.
- REIS FILHO, R. W., ARAÚJO, J.C., VIEIRA, E.M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29 (4), p. 817 - 822, 2006.
- SANTOS, J. C. C. Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2012.
- XUE, C., ZHAO, H., LIU, H., CHEN, Y., WANG, B., ZHANG, Q., WU, X. Development of sulfhydrylated antibody functionalized microcantilever immunosensor for taxol. **Sensors and Actuators B**, v.156, p. 863– 866, 2011.



## **CAPÍTULO 2**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

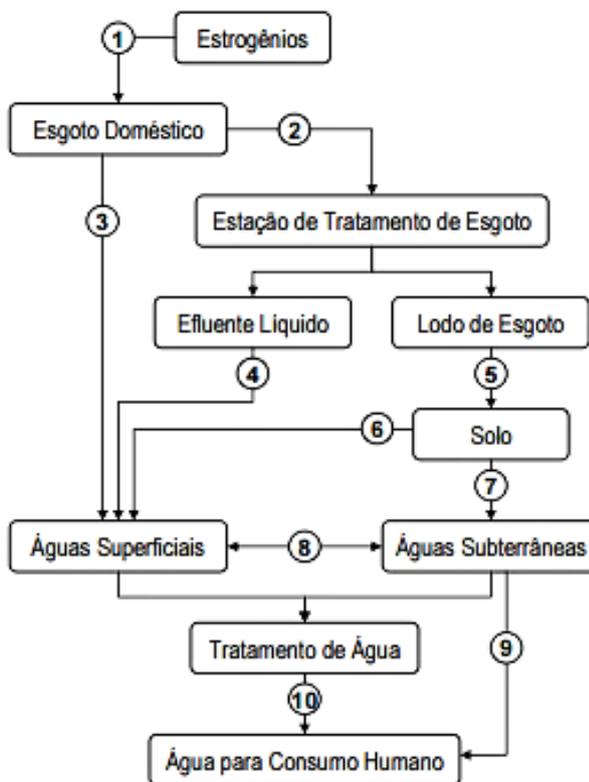
## 2.1 OCORRÊNCIA DOS HORMÔNIOS NO MEIO AMBIENTE

A concentração de poluentes de diversas origens vem crescendo e, com isso, aumentando a preocupação com relação aos efeitos causados no meio biótico. Micropoluentes como metais pesados, inseticidas, hormônios e fármacos podem contaminar as águas e seus efeitos são graves, podendo ser encontrados em concentrações traço e, mesmo em níveis muito baixos, estes apresentam risco à saúde humana e animal. As águas superficiais e de subsolo, principais fontes de água potável, podem ser contaminadas pela infiltração de micropoluentes através do solo, e muitos destes compostos não são totalmente removidos pelos processos convencionais de tratamento de água (BILA; DEZOTTI, 2007).

Em relação aos hormônios, estes podem contaminar a água através de duas formas: (a) Fontes pontuais – apresentam um ponto de entrada no meio ambiente bem caracterizado, geralmente através dos cursos d'água. Trata-se de descargas diretas para os corpos d'água como efluentes de estações de tratamento de águas residuais, de indústrias, de atividade agrícola, lixiviados, entre outros; e (b) Fontes difusas ou não pontuais – fontes que não apresentam um ponto de entrada no meio ambiente bem caracterizado (FEITOSA et al., 2013).

Dentre as diferentes rotas de exposição de hormônios ao meio ambiente, destacam-se as deposições parciais dos poluentes antes de atingirem os corpos d'água como deposições atmosféricas, infiltração no solo de compostos utilizados na agricultura, fossas sépticas, espalhamento de lodo proveniente do tratamento de águas residuais, etc. (GHISELLI; JARDIM, 2007; FERREIRA, 2012; MUENCHEN et al., 2016; STEFFENS et al., 2017). A Figura 1 ilustra as possíveis rotas de contaminação da água potável por hormônios no meio ambiente.

Figura 1 - Rotas de exposição de hormônios no meio ambiente.



Fonte: FEITOSA et al. (2013) com adaptações.

A rota ① representa o esgoto bruto com estrogênios a partir da secreção fecal e/ou urinária por seres vivos, além da contribuição do descarte de fármacos nos sistemas de captação de esgotos. Os serviços de esgotos sanitários estão representados pelas rotas ② e ③, sendo que a primeira corresponde à canalização do esgoto até as estações de tratamento (ETE), e a segunda corresponde ao serviço de coleta do esgoto bruto da população sem tratamento.

A rota ④ corresponde ao efluente líquido tratado descartado em sistemas de águas naturais superficiais, enquanto que o material sólido obtido, representado pela rota ⑤, pode ser utilizado para fertilização. Estrogênios presentes no lodo do esgoto descartado ao solo podem surgir em águas naturais por meio do escoamento superficial (rota ⑥) ou da percolação/lixiviação (rota ⑦). Na rota ⑧ há a interface existente entre os sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos; a água subterrânea pode ser bombeada e utilizada para fins de consumo (rota ⑨) ou submetida a algum tipo de tratamento. Águas superficiais são captadas e canalizadas para estações de tratamento de águas. Finalmente, a rota ⑩ representa a distribuição da água para o consumo humano por meio de redes municipais de distribuição ou caminhões-pipa (FEITOSA et al., 2013).

Em relação à contaminação de águas superficiais por hormônios sexuais femininos, a principal fonte é o lançamento de esgoto sem tratamento. Isto se deve pelo fato de que as pessoas eliminam quantidades diferentes de hormônios, dependendo da idade, do estado de saúde, da dieta ou do estado de gestação, sendo que esta eliminação ocorre diariamente pela urina e pelas fezes em menor quantidade, de acordo com a Tabela 1 (JOHNSON; SUMPTER, 2001). Conforme Ghiselli e Jardim (2007), a quantidade de estrogênio excretada por uma mulher grávida pode ser até mil vezes maior do que a de uma mulher em atividade normal, dependendo do estágio da gravidez.

Tabela 1 - Excreção diária ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) dos hormônios por seres humanos.

<b>Excreção (<math>\mu\text{g}/\text{dia}</math>)</b>	<b>17 <math>\beta</math>-estradiol</b>	<b>Estrona</b>	<b>Estriol</b>
Homens	1,6	3,9	1,5
Mulheres em menstruação	3,5	8	4,8
Mulheres em menopausa	2,3	4	1
Mulheres em gestação	259	600	6000

Fonte: JOHNSON; SUMPTER (2001) com adaptações.

Além disso, existe a disponibilidade de um grande número de anticoncepcionais orais e injetáveis contendo progestagênios e estrogênios para uso clínico. As concentrações de hormônios nos anticoncepcionais podem variar de 30 a 300  $\mu\text{g}$  por comprimido e somente uma parte é absorvida pelo organismo, sendo o resto eliminado pela urina. Além dos humanos, os animais também são uma fonte importante de poluição de estrogênios no ambiente, destacando-se os hormônios estrona e 17  $\beta$ -estradiol (FERNANDES; BRESAOLA JUNIOR, 2014).

Os estrogênios são classificados como os principais contribuidores, dentre os desreguladores endócrinos, em provocar alterações nos organismos. A ingestão de desreguladores endócrinos pode estar ligada a condições adversas de saúde humana, tais como declínio da fertilidade masculina, defeitos congênitos e câncer de mama e testicular (NIKOLAOU et al., 2007). Além disso, os impactos negativos da exposição aos desreguladores endócrinos em animais selvagens podem incluir consequências graves, como a efeminização em peixes (SUMPTER; JOHNSON, 2008).

Isso ocorre porque os estrogênios naturais e sintéticos são efetivos em níveis de ng/L, enquanto que a maioria dos compostos químicos apresenta atividade estrogênica em níveis de  $\mu\text{g}/\text{L}$  e o sistema hormonal dos organismos é estimulado por baixíssimas concentrações de esteroides, da ordem de partes por bilhão (ppb ou  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) ou partes por trilhão (ppt ou ng/L) (MANIERO et al., 2008). Contudo, deve-se levar em conta que os efeitos dos estrógenos não

dependem somente das concentrações presentes no ambiente, mas também de outros fatores, tais como, lipofilicidade, persistência, bioacumulação, tempo de exposição, mecanismos de biotransformação e de excreção, entre outros (BILA; DEZOTTI, 2007).

Cabe ainda salientar que a persistência e a capacidade de causar possíveis efeitos adversos estão relacionadas ao fato de serem continuamente introduzidos no ambiente e não pela estabilidade das moléculas, uma vez que podem ser facilmente degradados e suas altas taxas de remoção/transformação são compensadas pela introdução contínua, como resultado de processos industriais, descarte de produtos comerciais ou através da sua excreção na forma conjugada, livre ou metabolizada (DIRTU et al., 2012).

## **2.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS**

A crescente degradação dos corpos d'água tem gerado preocupações quanto ao uso e destino da água no meio ambiente. Muitas pesquisas têm se voltado a um grupo de substâncias químicas presentes em águas que podem interferir no sistema endócrino de humanos e de outros animais e, com isso, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução. Essas substâncias são conhecidas como desreguladores endócrinos (BILA; DEZOTTI, 2007; MOREIRA, et al., 2009).

Existem várias definições propostas na literatura para desreguladores endócrinos. Entretanto, em todas elas existe um ponto em comum: trata-se de uma substância química que pode interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, incluindo os seres humanos (GHISELLI; JARDIM, 2007; SCHIAVINI et al., 2011). Estes compostos possuem a capacidade de perturbar o sistema endócrino simulando a ação de hormônios naturais, inibindo-os ou alterando as funções regulares normais dos sistemas imunológico, nervoso e endócrino, causando efeitos adversos nos organismos ou em seus descendentes (REIS FILHO et al., 2006; CASTRO, 2002).

Em suma, os interferentes endócrinos podem intervir no funcionamento do sistema endócrino pelo menos de três formas possíveis: a) imitando a ação de um hormônio produzido naturalmente pelo organismo, como o estrogênio ou a testosterona, desencadeando deste modo reações químicas semelhantes no corpo; b) bloqueando os receptores nas células que recebem os hormônios, impedindo assim a ação dos hormônios naturais; e/ou c) afetando a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção dos hormônios naturais no organismo, alterando desta

forma as concentrações dos mesmos, dependendo da fase na qual um determinado organismo se encontra (GHISELLI; JARDIM, 2007).

### 2.2.1 Hormônios

O sistema endócrino é um mecanismo complexo que coordena e regula a comunicação entre as células, constituído por combinações de glândulas e hormônios, sendo responsável pelas funções biológicas normais, como a reprodução, o desenvolvimento embrionário, o crescimento e o metabolismo (REIS FILHO et al., 2006).

Quimicamente, os hormônios são proteínas derivadas de aminoácidos ou esteroides e estão envolvidos na reprodução sexual. Agem como uma espécie de mensageiros químicos, promovendo a comunicação entre diferentes partes do organismo. As células identificam os hormônios por meio de receptores, que são estruturas proteicas especializadas no reconhecimento molecular. Após a aproximação e interação hormônio-receptor, uma série de reações bioquímicas ocorre levando a respostas biológicas específicas (FROEHNER, et al., 2011; MACHADO, et al., 2014). Trata-se de uma espécie de mecanismo de chave e fechadura em que para cada hormônio há um receptor que o reconhece, onde o hormônio se encaixa para ser absorvido e agir no local específico (REIS FILHO et al., 2006; MACHADO, et al., 2014).

As substâncias que alteram o sistema endócrino podem ser divididas em duas classes: a) *Hormônios naturais*, que incluem estrogênio, progesterona e testosterona (presentes no corpo humano e nos animais) e os fitoestrogênios (substâncias contidas em algumas plantas, como nas sementes de soja, que apresentam uma atividade semelhante aos esteroides hormonais quando ingeridas por um determinado organismo); b) *Substâncias sintéticas*, que incluem os hormônios sintéticos (hormônios idênticos aos naturais, fabricados pelo homem e utilizados como contraceptivos orais e/ou aditivos na alimentação animal), bem como os xenoestrogênios ou externos (produzidos pelas modernas indústrias químicas e presentes em produtos de uso doméstico) e na agricultura (GHISELLI; JARDIM, 2007; AMÉRICO, et al., 2013; TORRES, et al, 2015).

São encontrados no meio ambiente, dadas às suas características físico-químicas e as suas origens, sendo possível encontrá-los em concentrações muito baixas ( $\mu\text{g/L}$  e  $\text{ng/L}$ ) em praticamente todas as matrizes ambientais, tais como solo, recursos hídricos e sedimentos (GHISELLI; JARDIM, 2007; SILVA, 2009). Essas substâncias geralmente são persistentes, pois se acumulam no solo e nos sedimentos e são facilmente transportadas por lixiviação para outras regiões, percorrendo a cadeia trófica e, por consequência, causando danos maiores aos

indivíduos do último nível trófico ou do topo da cadeia alimentar, constituída por poucos indivíduos, porém de grande porte (GUIMARÃES, 2008).

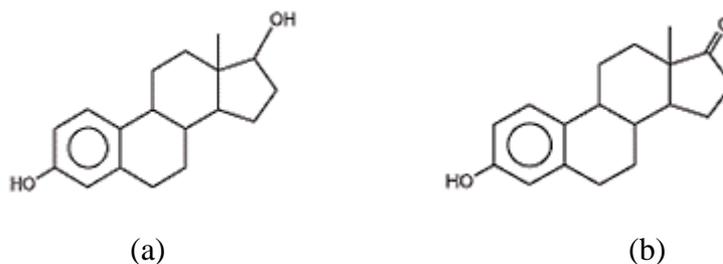
Os estrogênios naturais, ou seja, aqueles que ocorrem naturalmente no organismo são definidos como uma família de hormônios esteroides responsáveis pelo desenvolvimento das características secundárias femininas no início da puberdade. Agem no controle da ovulação, no desenvolvimento do sistema reprodutor para a fertilização e implantação do óvulo, no aumento das glândulas mamárias durante a gravidez e possuem influência sobre o crescimento, desenvolvimento e o comportamento (MACHADO, et al., 2014). Os estrogênios são também administrados no controle dos sintomas que envolvem a menopausa, distúrbios fisiológicos e no tratamento do câncer de próstata e de mama, e seus derivados sintéticos são empregados como contraceptivos (hormônios inibidores do processo de ovulação) (GHISELLI; JARDIM, 2007; TORRES, et al., 2012).

O hormônio 17  $\beta$ -estradiol é o hormônio estrogênico mais abundante no corpo humano. Possui massa molar de 272,38 g/mol, meia vida de 2 a 3 dias e se degrada facilmente por ação de uma dehidrogenase específica (NGHIEM et al., 2004; MANIERO et al., 2008).

O hormônio estrona é considerado um estrogênio natural feminino, mas está presente na circulação sanguínea de homens e mulheres e é excretado diariamente por ambos. Esse fato causa o aumento da concentração desse estrogênio em efluentes de águas residuais (ZHANG et al., 2013). A estrona pode ser proveniente da degradação por oxidação do 17  $\beta$ -estradiol. Possui peso molecular de 270,37 g/mol e meia vida de 2 a 3 dias (GHISELLI; JARDIM, 2007; PRATER; HORTON; THOMPSON, 2015).

A Figura 2 apresenta a estrutura dos hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona, os quais possuem grupamentos fenólicos, ou seja, a presença de anel aromático com duplas ligações conjugadas. Verifica-se que a enquanto o hormônio 17  $\beta$ -estradiol possui um grupo hidroxila (-OH) a sua forma metabolizada (estrona) possui um grupo carbonila (=O) na mesma posição.

Figura 2 - Estrutura química dos esteroides sexuais (a) 17  $\beta$ -estradiol e (b) estrona.



Fonte: GHISELLI; JARDIM (2007) com adaptações.

## 2.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO

A poluição ambiental tem despertado muitas preocupações, sobretudo no último século, pois muitos desses dejetos são derivados de compostos que apresentam elevada toxicidade, como fenóis e seus derivados, que são os poluentes químicos mais persistentes em meio aquoso, em função de seu uso extensivo. Desta forma, é necessário o monitoramento dessas substâncias em matrizes ambientais. Para tanto, é importante o desenvolvimento de metodologias rápidas e capazes de identificar de forma precisa e segura esses micro contaminantes em todos os compartimentos do sistema aquático (BEZERRA, 2014).

Visando garantir a segurança do ser humano e do meio ambiente, vários limites de detecção rigorosos foram regulamentados por agências estrangeiras para o 17  $\beta$ -estradiol em corpos aquáticos. Em particular, a União Européia, que estabeleceu um limite de detecção de 0,4 – 0,9 ng/kg, a FDA (*Food and Drug Administration* - USA) com um limite de 0,12  $\mu$ g/kg (120 pg/mL) e a *Codex Alimentarius Commission*, que fixou um limite de detecção de 5 pg/mL (SINGH, et al., 2017).

No Brasil, há a Resolução CONAMA 357/2005, que 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, a Resolução CONAMA 430/2011, que complementa e altera a Resolução CONAMA 357/2005 e a Portaria Nº 2.914/2011, do Ministério da Saúde. Nestas legislações, não há um limite específico para a quantidade de hormônios em corpos hídricos, mas em compensação, há um limite estabelecido para a quantidade de fenóis totais presentes na água doce (3  $\mu$ g/L). Este valor serviu de parâmetro para os experimentos propostos neste trabalho, já que os hormônios possuem grupamentos fenólicos em sua estrutura (CONAMA, 2005).

Deve-se levar em conta que a quantidade existente de um desregulador endócrino no ambiente depende muito do local. Lugares onde há uma forte presença da agricultura e pecuária possuem tendência de conterem pesticidas e hormônios, enquanto que esgotos domésticos possuem uma maior probabilidade de conter alquilfenóis (desreguladores endócrinos derivados de uso industrial e doméstico) (RAIMUNDO, 2007). A Tabela 2 resume os possíveis perturbadores endócrinos presentes de acordo com a fonte de poluição.

Tabela 2 - Principais fontes de perturbadores endócrinos em águas superficiais.

<b>Fontes</b>	<b>Tipos de Fontes</b>	<b>Perturbadores endócrinos</b>
Efluente Industrial	Pontual	Hormônios naturais e sintéticos, alquilfenóis, ftalatos, bisfenol A, fármacos, cafeína, pesticidas, bifenilas policloradas (PCB).
Esgoto Doméstico	Pontual	Hormônios naturais e sintéticos, alquilfenóis, ftalatos, bisfenol A, fármacos, cafeína.
Deflúvio pecuário	Difusa	Hormônios naturais e sintéticos, antibióticos, fármacos veterinários.
Natural	Difusa	Hidrocarboneto poliaromático (HPA), estrogênios naturais e fitoestrogênios.

Fonte: RAIMUNDO (2007).

Levando em conta a complexidade das matrizes ambientais e a baixa concentração de hormônios no ambiente, a sua determinação não é uma tarefa fácil. Concentrações destes interferentes endócrinos em matrizes complexas, tais como, esgotos domésticos e águas superficiais, que contém uma infinidade de compostos que podem interferir na análise, constitui um grande desafio analítico (GHISELLI; JARDIM, 2007; REIS FILHO et al., 2006).

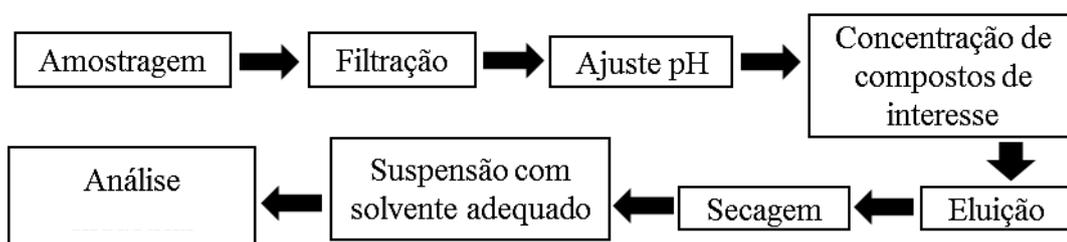
### 2.3.1 Métodos Cromatográficos

Diferentes métodos analíticos têm sido utilizados para a determinação de desreguladores endócrinos em amostras ambientais. As metodologias utilizadas para a análise destes compostos são, em sua maioria, técnicas cromatográficas que podem utilizar equipamentos de cromatografia líquida ou cromatografia gasosa, atingindo limites de detecção na ordem de picomolar (MOREIRA, et al., 2009; GROVER et al., 2009).

Os métodos cromatográficos estão classificados de acordo com o meio físico que a fase estacionária entra em contato. Em relação à fase móvel os métodos cromatográficos se dividem em cromatografia gasosa, cromatografia líquida e cromatografia com fluido supercrítico. No geral, a cromatografia é um método amplamente empregado que permite a separação, identificação e determinação de compostos químicos muito semelhantes em misturas complexas. Nessa técnica há duas fases, uma das fases permanece estacionária, imobilizada em uma coluna ou em uma superfície plana, enquanto a outra se move através dela. Em todas as separações cromatográficas a amostra é transportada pela fase móvel que é forçada a passar por uma fase estacionária (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

Basicamente, a determinação dos desreguladores endócrinos em amostras aquosas envolve três etapas: amostragem, pré-concentração e análise. É necessário usar critérios analíticos rigorosos para que as várias etapas, como amostragem, transporte, estocagem e análise, tenham o menor erro possível, tendo em vista as baixas concentrações dos desreguladores endócrinos (pg/L a µg/L) nas amostras ambientais (MOREIRA, et al., 2009). A Figura 3 mostra um diagrama simplificado do protocolo de preparo da amostra para análise desreguladores endócrinos.

Figura 3 - Diagrama esquemático para preparação e análise dos desreguladores endócrinos.



Fonte: MOREIRA (2008) com adaptações.

Em contrapartida, estes procedimentos de análise podem envolver etapas preliminares minuciosas de preparo de amostra ou envolver uma etapa de extração (GHISELLI; JARDIM, 2007). Existem diferentes técnicas para a extração de contaminantes presentes em amostras ambientais, como extração líquido-líquido, destilação a vapor, extração em fase sólida, ultrassonificação, extração com fluido supercrítico. Dentre elas, a extração em fase sólida é a mais comumente empregada (JEANNOT et al., 2002).

### 2.3.2 Método ELISA

O método de ELISA é um teste imunoenzimático que permite a detecção e quantificação de proteínas, peptídeos, anticorpos e hormônios, os quais são realizados em placas de plástico com 96 poços, e são baseados na interação altamente específica entre antígenos e anticorpos (BRAZACA, et al., 2016).

Neste ensaio o anticorpo específico para o antígeno de interesse é imobilizado nas placas. O antígeno então entra em contato e liga-se com o anticorpo imobilizado. A detecção desta interação é feita através de anticorpos complexados com enzimas, as quais reagem com seus substratos, gerando um sinal que pode ser quantificado, como o valor de absorvância da amostra em um comprimento de onda determinado. Apesar da grande sensibilidade e

confiabilidade envolvidas no método, os kits disponíveis comercialmente ainda são caros e demandam elevado tempo e material para a realização dos testes (BRAZACA, et al., 2016).

Na literatura, já existem trabalhos que reportam o uso da metodologia ELISA para a detecção de hormônios como o 17  $\beta$ -estradiol. É o caso de Silva et al. (2013) que propuseram o método de ELISA, baseado na seletividade e afinidade de antígenos e anticorpos, para a detecção direta de hormônios 17  $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol em matrizes aquosas. Neste estudo, os autores conseguiram limites de detecção na ordem de mg/L, e para obter limites de detecção mais baixos (ng/L) os autores concluíram que seria preciso realizar uma extração em fase sólida (SPE) antes de se utilizar a análise por ELISA, ou seja, este método não poderia ser aplicado diretamente na amostra.

## **2.4 BIOSENSORES**

Um biossensor é definido como um dispositivo que combina a especificidade de um elemento biológico ativo, para um determinado analito ou substrato, com a sensibilidade de um transdutor, que converte o sinal biológico produzido em um sinal elétrico, óptico, térmico, etc. Os elementos de reconhecimento biológico podem ser enzimas, anticorpos, microrganismos, enquanto os transdutores podem ser os detectores eletroquímicos, óticos, acústicos, dentre outros, que vão monitorar o desaparecimento de algum reagente ou o aparecimento de algum produto da reação do material biológico com o substrato de interesse (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002).

De acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como eletroquímico, óptico ou detector de massa (relaciona a oscilação da frequência dos cristais piezelétricos com variação da massa) (RICCARDI et al., 2002). Também podem ser classificados quanto ao tipo de biorreceptor, podendo ser biossensores enzimáticos, imunossensores, genossensores, entre outros (SANTOS, 2012), conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Principais biorreceptores utilizados para o desenvolvimento dos biossensores.

<b>Bioreceptor</b>	<b>Descrição</b>
<b>Enzimas</b>	Catalisadores de reações com um alto grau de especificidade por seus substratos.
<b>Anticorpos</b>	A relação entre um anticorpo e seu antígeno é muito específica.
<b>Ácidos Nucléicos</b>	Possuem alta especificidade dos pares de bases distribuídos ao longo da dupla hélice que forma a cadeia de DNA.
<b>Microrganismos (fungos, bactérias, etc)</b>	Podem assimilar compostos orgânicos e produzir enzimas que serão detectadas por um receptor.

Fonte: SANTOS (2012).

Estes dispositivos apresentam algumas vantagens sobre as análises cromatográficas usualmente empregadas, pois não demandam pré-tratamento de amostras (SILVA et al., 2011). Além disso, apresentam versatilidade, simplicidade, seletividade, potencial para miniaturização, facilidade de um monitoramento *in situ* (GALLI, 2016).

#### **2.4.1 Biossensores Enzimáticos**

Os biossensores são sensores modificados com material biológico intimamente ligado à superfície de um transdutor. Quando este material é uma enzima, estes sensores são denominados biossensores enzimáticos (MARQUES; YAMANAKA, 2008). No caso do biossensor enzimático, o componente biológico faz o reconhecimento da substância investigada por meio de uma reação química, gerando um sinal que pode resultar na variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação, entre outros (GALLI, 2016).

O fato das reações enzimáticas serem altamente específicas, possuindo um grande potencial catalítico, superior a qualquer catalisador sintético, possibilita que os biossensores baseados nestes biocatalisadores sejam utilizados mesmo na presença de outras substâncias na amostra. Tornam-se assim desnecessários os processos de separação e purificação das amostras, muitas vezes importantes em análises químicas. Ainda que a atividade enzimática seja reduzida até certo ponto pela imobilização, os biossensores enzimáticos têm vantagens como maior estabilidade conformacional e possível reutilização (SANTOS, 2012).

Comparadas aos catalisadores químicos, eles apresentam um alto nível de especificidade com o substrato, devido principalmente à forte ligação da molécula de substrato pelo seu sítio ativo, envolvendo fatores do meio ambiente reacional, tais como: tamanho da molécula do

substrato, polaridade, estereoquímica, grupos funcionais ligados e relativa energia de ligação (SILVA et al., 2011).

Em contrapartida, a maior desvantagem em relação ao uso de enzimas na construção de um biossensor é o fato de apresentarem uma estabilidade relativamente baixa, principalmente no que diz respeito à variação das condições físico-químicas do meio reacional, mas que pode ser contornada utilizando condições adequadas de pH, temperatura e força iônica que garantam a manutenção da atividade enzimática. Outra desvantagem é o fato de, muitas vezes, apresentarem um custo elevado, pois algumas reações precisam de cofatores que, se não foram facilmente regenerados, encarecem ainda mais o uso dos biossensores enzimáticos (SILVA et al., 2011).

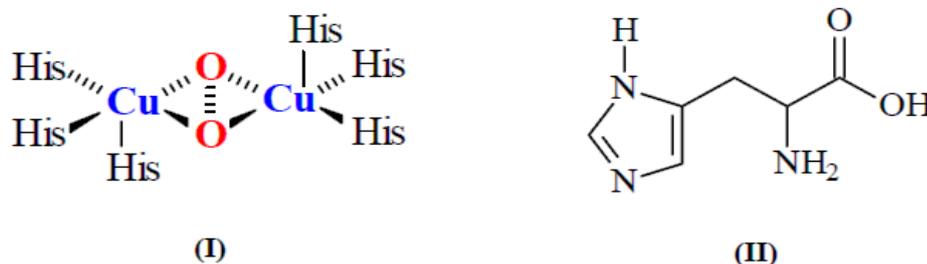
Quando se fala em desenvolvimento de biossensores para detecção de compostos fenólicos, incluindo nesta categoria os hormônios, a maioria deles utiliza a enzima tirosinase. Esta enzima tem o papel de catalisar a reação com compostos fenólicos, como por exemplo, catecol, resorcinol, hidroquinona, entre outros, todos formados basicamente por um anel aromático como cadeia principal com uma ou mais hidroxilas ligadas a ele (radicais) (CHAVERO, 2013).

#### **2.4.2 Enzima Tirosinase**

A seletividade, habilidade para discriminar um entre diferentes analitos, é uma das características mais importantes de um biossensor. Ocorre principalmente em função do componente biológico, embora algumas vezes o transdutor também contribua. Por isso, enzimas foram e continuam sendo o elemento biológico mais usado na construção de biossensores (DU et al., 2008).

As polifenoloxidasas formam uma família de enzimas oxidoredutases capazes de catalisar a oxidação de compostos fenólicos, reagindo com o oxigênio sem a necessidade de co-substratos. Ela é dividida em duas subclasses: lacases e tirosinases (DURÁN; ESPOSITO, 2000). A tirosinase é uma enzima que contém dois átomos de cobre (Cu (II)) como sítios ativos, cada um coordenado a três moléculas de histidinas, sendo duas ligações equatoriais fortes e uma axial mais fraca, como ilustra a Figura 4 (ALBUQUERQUE; FERREIRA, 2007).

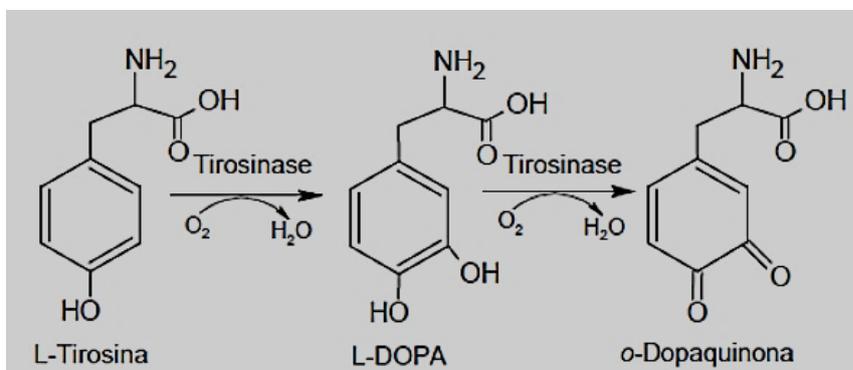
Figura 4 - Estruturas (I) centro ativo da tirosinase e (II) molécula de histidina.



Fonte: ALBUQUERQUE; FERREIRA (2007).

Esta enzima é amplamente distribuída na natureza, participando de um elevado número de reações biológicas. Verifica-se na literatura que a enzima tirosinase é bastante utilizada não só na determinação de compostos fenólicos, mas também na determinação de pesticidas, fármacos e até na avaliação de envelhecimento de bebidas alcoólicas, empregando os dispositivos conhecidos como língua eletrônica (OLIVEIRA et al., 2015). Esta enzima utiliza oxigênio molecular para oxidar fenóis catalisando duas reações distintas: a o-hidroxilação de monofenóis e a subsequente oxidação do o-difenol resultando em o-quinonas (Figura 5).

Figura 5 - Esquema simplificado do mecanismo de ação da tirosinase.



Fonte: SEO, SHARMA e SHARMA (2003).

As consecutivas atividades catalíticas da tirosinase são chamadas de cresolase e catecolase, respectivamente. Posteriormente as o-quinonas reagem com nucleófilos diferentes, produzindo intermediários que sofrem polimerização originando pigmentos (melaninas) que vão desde o vermelho até o preto. São responsáveis pelo escurecimento de alimentos durante a maturação, manuseio, processamento e armazenamento, além de exercerem um papel fundamental na biossíntese da melanina, que é responsável pela pigmentação em animais, pelas

cores das frutas e flores. Também podem atuar no escurecimento indesejável da pele, olhos, ouvido interno e cabelos (ALBUQUERQUE; FERREIRA, 2007; SANTOS et al., 2013).

Os sensores à base de tirosinase são utilizados para a detecção de compostos fenólicos (particularmente mono e difenóis). Como já comentado, a tirosinase possui a capacidade de catalisar fenóis e difenóis e, seguindo o mesmo princípio, outros compostos fenólicos, tais como os estrogênios fenólicos (ANDREESCU; SADIK, 2004).

### **2.4.3 Imunossensores**

Os imunossensores são biossensores altamente sensíveis e seletivos, onde o material biológico é composto por anticorpos que são capazes de reconhecer especificamente um determinado antígeno. O princípio da imunodeteção baseia-se em mensurar a intensidade de formação do imunocomplexo antígeno-anticorpo, podendo ser realizado pelo emprego de diferentes metodologias (RICCARDI et al., 2002).

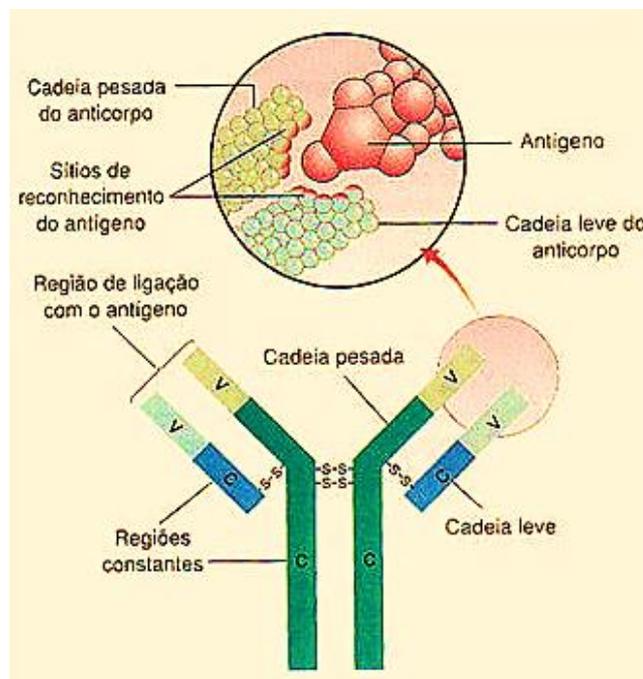
Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são proteínas de defesa produzidas pelos linfócitos B em decorrência da resposta imunológica a corpos estranhos - também chamados antígenos. Estes são usados pelo sistema imunológico para identificar e neutralizar objetos estranhos e são funcionalmente definidos pelo antígeno com o qual reagem. São divididos em cinco classes (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) e dentre elas a IgG é a mais abundante no organismo (BENJAMINI et al., 2000).

A forma dos anticorpos se assemelha a de um “Y”, sendo que na parte de “cima” se encontram dois sítios idênticos de ligação ao antígeno, o que possibilita a ligação cruzada entre eles. Dentre as principais características morfológicas dos anticorpos estão suas cadeias pesadas e suas cadeias leves. Essas cadeias podem ser divididas em duas classes: constantes e hipervariáveis. As regiões constantes, também denominadas de C-terminal, tem a função de ancorar o anticorpo. Já as regiões hipervariáveis (ou regiões determinantes de complementaridade), também denominadas de N-terminal ou de ligação, estão localizadas nos domínios VL e VH – variáveis, que é a superfície responsável pela ligação com o antígeno, e portanto, determina a especificidade do anticorpo (BENJAMINI et al., 2000).

A característica básica da reação antígeno-anticorpo é a especificidade, representada por uma estreita relação de complementaridade entre as estruturas tridimensionais das duas moléculas. Esta complementaridade permite a aproximação máxima do antígeno aos sítios de ligação das moléculas de anticorpo.

As ligações envolvidas na formação do imunocomplexo são de natureza não covalente, e, portanto, consideradas reversíveis. A interação antígeno-anticorpo é o resultado da somatória de forças intermoleculares, incluindo eletrostáticas (com exceção das ligações iônicas), forças de hidrogênio e forças de van der Waals. Embora as interações sejam individualmente fracas, a multiplicidade das uniões leva a uma considerável energia de coesão entre o antígeno e o anticorpo (RICCARDI et al., 2002). A Figura 6 representa a estrutura básica da molécula de anticorpo, mostrando a região de ligação com o antígeno.

Figura 6 - Região de ligação antígeno-anticorpo.



Fonte: AMABIS; MARTHO, 2004.

Existem basicamente dois tipos de anticorpos: os policlonais e os monoclonais, diferenciando-se entre eles apenas pela forma de produção e número de epítomos que o reconhecem (MOURA COSTA et al., 2016). A classe de anticorpos monoclonais é advinda de um único linfócito B, selecionado artificialmente e replicado inúmeras vezes como um clone, e em função disso, o mesmo só se liga a um epítopo de uma única forma, fato este que promove tal especificidade.

Os anticorpos podem ser utilizados como elemento de reconhecimento em imunossensores, e se baseia na alta sensibilidade e especificidade das interações com antígenos. As principais vantagens dos imunossensores são:

- Alta especificidade os torna ferramentas poderosas para a captura por afinidade dos ligantes em amostras impuras;

- Os anticorpos podem ter sua orientação controlada para interação mais eficiente com o analito;
- A maioria dos anticorpos monoclonais são facilmente regenerados;
- Disponibilidade comercial de materiais;
- Pequeno volume de amostra necessário para a análise (BRAZACA et al., 2016).

## **2.5 NANOBIOSENSORES**

Dependendo da natureza do elemento de reconhecimento do sistema transdutor escolhido, o significado de biossensor pode ser estendido. Quando se empregam materiais na escala nano (compreendidos na escala de 1-100 nm), estes dispositivos recebem o nome de nanobiossensores. Assim, podem-se definir os nanobiossensores como sendo materiais funcionais e sensíveis utilizados para transmitir informações químicas, físicas, quânticas ou biológicas sobre materiais e moléculas diversas. Utilizam e detectam fenômenos físicos, químicos, biológicos e quânticos na micro e na nanoescala (BUENO et al., 2013).

Eles podem ser classificados de acordo com quatro critérios fundamentais: a) quanto ao método utilizado para detectar a interação desejada; b) quanto ao tipo de interação que se estabelece entre o elemento sensor e o analito; c) quanto ao sistema de transdução e d) quanto à natureza do composto de reconhecimento (biológico ou não biológico). Através de diversas combinações entre esses critérios, podem surgir diferentes tipos de nanobiossensores que são definidos e categorizados por seus diferentes alvos de detecção, materiais que são feitos e pelos sinais que utilizam para transmitir informação (SWIERCZEWSKA et al., 2012).

Entre os vários tipos de biossensores, os baseados em cantilevers têm apresentado resultados muito interessantes na detecção de substâncias específicas. Eles podem fornecer dispositivos compactos e portáteis para a identificação específica de muitas substâncias (DEVREESE, 2007).

### **2.5.1 Cantilevers**

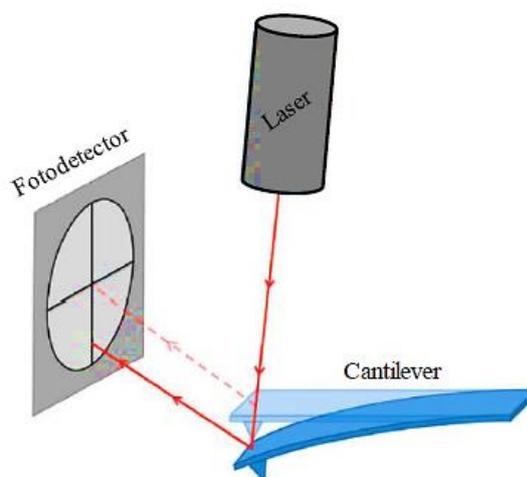
O Microscópio de Força Atômica (AFM) faz parte de um grupo de instrumentos denominados de microscópios de varredura por sonda. A microscopia de força atômica não oferece somente características morfológica e topográfica da amostra investigada, mas também fornece informações acerca da natureza das forças de interação de materiais e amostras

biológicas, através do controle das interações químicas entre a ponta do AFM e a amostra (OLIVEIRA, 2007).

Os sensores de cantilevers são um tipo de sistema com sensibilidade particularmente alta. Com uma constante de mola variando entre  $10^{-3}$  e  $10^1$  N/m, os sensores baseados nestas estruturas são capazes de detectar forças muito pequenas ( $10^{-12}$  a  $10^{-9}$  N), correspondentes às deflexões de ordem nanométrica ou às pequenas variações na frequência de ressonância (STEFFENS, 2012).

Esta técnica utiliza o método de feixe óptico, onde a deflexão do cantilever é acompanhada pelo monitoramento da posição do feixe de laser, o qual é refletido para um fotodetector de quatro quadrantes, que é sensível a posição (Figura 7) e a distância percorrida no fotodetector é proporcional à deflexão do cantilever (RAITERI et al., 2001; SANG, ZHANG, ZHAO, 2013).

Figura 7 - Monitoramento da deflexão por meio do método de feixe óptico.



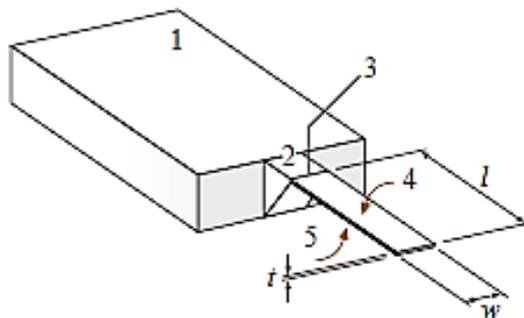
Fonte: CHOW, BUČAR, JONES (2012) com adaptações.

Uma das partes mais importantes do AFM é a ponta do cantilever. Esta parte é uma espécie de alavanca com elevada flexibilidade, ou seja, com uma constante elástica relativamente baixa (entre  $10^{-2}$  a  $10^2$  N/m), motivo pelo qual ela é passível à influência de forças na faixa de nN (OLIVEIRA, 2007). Quando a ponta do cantilever se aproxima de uma superfície, ela é sujeita a várias forças que produzem uma deformação.

A Figura 8 apresenta o diagrama esquemático da estrutura de um cantilever, com as seguintes partes: 1) corpo rígido do cantilever; 2) estrutura sólida de apoio do cantilever; 3) parte móvel do cantilever; 4) superfície superior do braço de suporte, que normalmente é

funcionalizado para a detecção de moléculas e 5) superfície inferior do braço de suporte e dimensões geométricas do sensor: comprimento  $L$ , largura  $W$  e a espessura  $T$ .

Figura 8 - Diagrama esquemático do corpo de um cantilever.



Fonte: LANG, HEGNER, GERBER (2010) com adaptações.

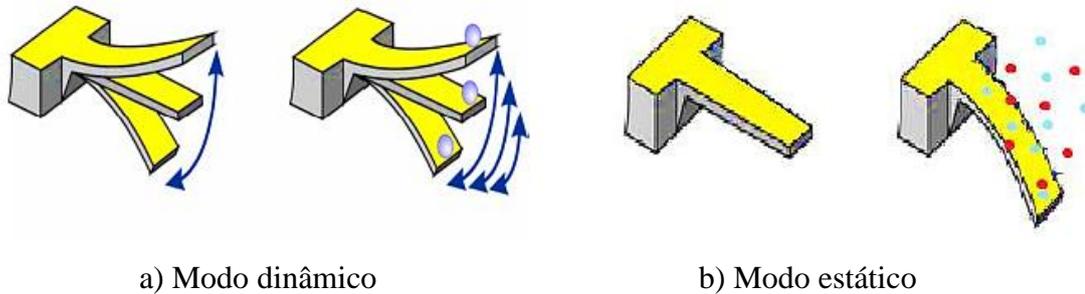
Os cantilevers são normalmente fabricados com silício e/ou nitreto de silício ou ainda com materiais poliméricos, com dimensões que variam de 100 a 500  $\mu\text{m}$  de comprimento e espessura de 0,5 a 5  $\mu\text{m}$ , podendo apresentar forma em “V” (triangular) ou em “T” (retangular) (CARRASCOSA et al., 2006). Estes fatores resultam em um rápido tempo de resposta, menor custo de fabricação e a possibilidade de um arranjo de sensores com pequenas dimensões.

Um biossensor de cantilever mede a flexão de um sistema nano mecânico, causada por mudanças na tensão superficial, induzidas pela ligação da molécula direcionada aos receptores biomoleculares ancorados em um lado do cantilever (lado ativo). O lado oposto (lado passivo) deve ser inerte para o alvo. Idealmente, a superfície passiva deve ser bloqueada para evitar a adsorção não específica. Os bioensaios mais sensíveis e significativos com sistemas nanomecânicos são baseados no mecanismo de estresse superficial (TAMAYO et al., 2013).

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).

O modo estático utiliza a variação da deflexão física do cantilever, enquanto que o modo dinâmico utiliza a variação da frequência de ressonância do cantilever, resultante do aumento de massa adsorvida na superfície (STEFFENS, 2012). Esses modos diferem entre si em função do princípio de transdução, da funcionalização e do mecanismo de detecção. A Figura 9 apresenta um esquema dos modos de operação dos cantilever em AFM.

Figura 9 - Representação esquemática dos dois modos de operação do cantilever, (a) mudança da frequência devido à mudança da massa efetiva e (b) tensão na superfície devido à adsorção de moléculas.



Fonte: STEFFENS (2012).

No modo de deflexão estático, a diferença entre a superfície funcionalizada em apenas um dos lados do cantilever (lado ativo) e a superfície não funcionalizada (lado passivo) causa uma mudança na tensão da superfície, ocasionando a deflexão do cantilever. A deflexão é em função da constante de mola ( $k$ ), das propriedades do material e da geometria do cantilever (STEFFENS, 2012). A variação de deflexão ( $\Delta d$ ) é dependente da intensidade da força aplicada ( $F$ ) e da constante de mola ( $k$ ) do cantilever, sendo representada pela Lei de Hooke (Equação 1) (FRITZ, 2008):

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

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 (Equação 2):

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

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  $1 \text{ N/m}$  (MANZOLI et al., 2010; WANG et al., 2007).

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

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

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).

O modo dinâmico monitora o cantilever em vibração, ou seja, a variação da frequência de ressonância do cantilever quando a sonda interage acima da superfície do analito. Neste caso, o cantilever se mantém vibrando em uma frequência próxima da ressonância acima da amostra, em uma distância maior do que aquela utilizada para monitorar a deflexão. A força intermolecular entre a sonda e a amostra irá variar a frequência de oscilação de maneira modelável (SANTOS; CASTANHO, 2004).

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 ( $f_0$ ) é descrita pela equação a seguir (Equação 4):

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

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:

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

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).

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

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.

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).

Dentre as principais vantagens dos sensores de cantilever estão os baixos limites de detecção e o desempenho/resposta instantânea em tempo real. Por serem dispositivos que permitem a imobilização de moléculas específicas, eles oferecem também um reconhecimento específico e direcionado, evitando assim ligações cruzadas não específicas (DEVREESE, 2007; BUENO et al., 2013). Conforme Hansen e Thundat (2005) nenhuma outra tecnologia de sensoriamento oferece tal versatilidade.

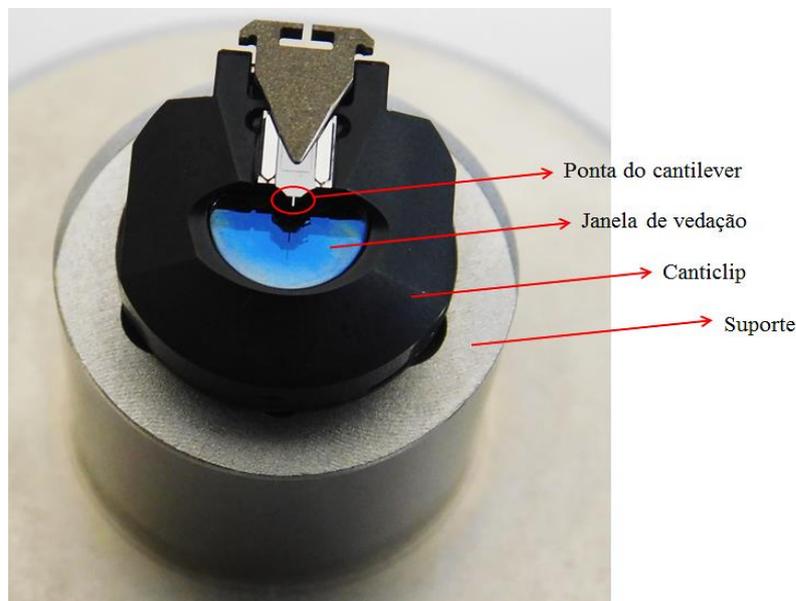
Em contrapartida, a desvantagem destes dispositivos está relacionada ao fato de que os sistemas de sensoriamento empregados para seu funcionamento precisam ser estudados extensiva e detalhadamente para que se possa escolher a melhor geometria da ponta e as moléculas apropriadas para desempenhar o papel de elemento sensível.

Além disso, é preciso também indicar o método de funcionalização adequado de modo que os sítios ativos ou os principais grupamentos químicos estejam disponíveis para promoverem as ligações (BUENO et al., 2013).

### 2.5.2 Operação do AFM em meio líquido

O funcionamento do AFM em condições líquidas requer modificações de algumas peças para evitar o encharque de componentes elétricos, como a cerâmica piezoelétrica em AFMs que possuem esse módulo. Por exemplo, o porta amostra deve ser grande o suficiente para acomodar a amostra e a solução em que está imerso. Alguns autores simplesmente usam uma pequena gota de algumas dezenas de microlitros que cobre a ponta, outros usam vários mililitros de solução que recobrem o cantilever por completo. A primeira abordagem tem a vantagem de usar uma massa menor (gotícula) no porta amostra, mas isso pode ocasionar a evaporação do líquido, e ocasionar uma indesejável mudança na concentração de solventes. Utilizando vários mililitros de solução, as concentrações são mantidas praticamente constantes. O suporte da ponta do cantilever, também conhecido como “canticlip”, deve ser projetado para evitar o contato entre o líquido e o pequeno piezo que conduz o movimento do cantilever (BARÓ; REIFENBERGER, 2012), conforme Figura 10.

Figura 10 - Canticlip usado em meio líquido.



Fonte: O autor.

Em solução, a carga de um objeto (da ponta e do cantilever) é normalmente rastreada por íons móveis no eletrólito circundante. Os íons com o mesmo sinal de carga são repelidos dos arredores do objeto. Já os íons com carga oposta são atraídos eletrostaticamente pelo objeto, mas essa atração diminui sua entropia (grandeza termodinâmica que mensura o grau de irreversibilidade de um sistema). Sua distribuição espacial é um compromisso entre essas duas

tendências opostas. O arranjo resultante da seleção dos íons em torno do objeto é conhecido como a dupla camada elétrica, e sua estrutura tem um impacto maior nas interações entre objetos carregados em solução (ARNTZ et al., 2003; CUBILLAS et al., 2014).

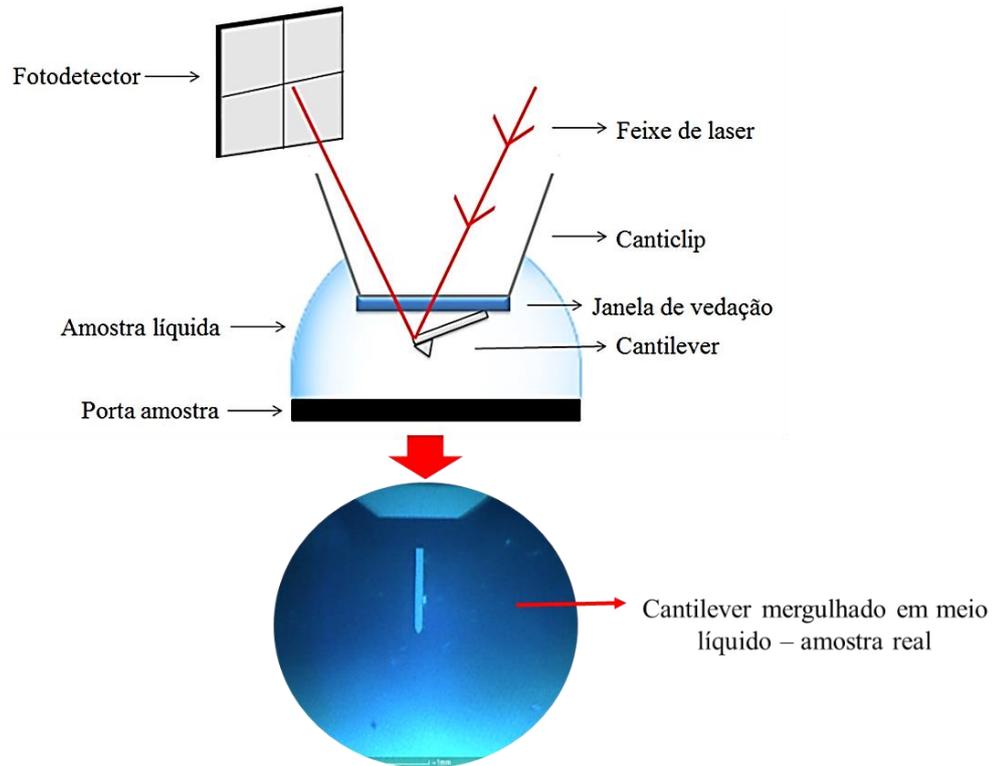
Portanto, em contraste com a imagem em ar, onde as forças capilares desempenham um papel central na interação da ponta-superfície, na imagem líquida, as forças eletrostáticas são as mais relevantes. O caráter dessas forças pode ser repulsivo ou atrativo, mudar de acordo com a natureza química do líquido (força iônica) ou devido à funcionalização da ponta (CUBILLAS et al., 2014).

### **2.5.3 Métodos de detecção em meio líquido**

Para operação em meio líquido, a ponta do cantilever é montada em um feixe flexível, cujas propriedades geométricas e materiais possibilitam a sondagem da força com alta sensibilidade. O papel do laser é traduzir a força que atua na ponta em uma deflexão que pode ser posteriormente monitorada por vários meios. Entre estes, o tunelamento de elétrons, capacitância, cantilevers piezoelétricos, interferometria óptica e deflexão do feixe óptico foram desenvolvidos com um alto grau de sofisticação. A força de interação é proporcional à deflexão do cantilever seguindo a lei de Hooke. Para a operação em meio líquido, a maioria dos AFMs usam o método de deflexão do raio laser (BARÓ; REIFENBERGER, 2012).

Em quase qualquer interface ar-líquido, pequenas instabilidades mecânicas dão origem a ondas de superfície no líquido que espalham a luz proveniente de um feixe de laser, produzindo um local ruidoso que é inútil para detectar a deflexão do cantilever. Ou seja, quando o cantilever "perfura o líquido" a intensidade do laser zera pois é desviado pela diferença do índice de refração. Desta forma, é necessário realizar o ajuste do laser antes de medir a deflexão, ao contrário será lido somente um sinal causado por ruído (LAVRIK; SEPANIAK; DATSKOS, 2004). Conforme a Figura 11, este problema é resolvido criando uma interface sólido-líquido bem definida com uma janela transparente. O feixe de laser que entra (linha vermelha) é transmitido no líquido sem ser afetado por qualquer onda de superfície, resultando em um ponto de estabilização adequado para detectar a deflexão do cantilever.

Figura 11 - Leitura da deflexão do cantilever em uma amostra líquida.



Fonte: O autor

Operar em meio líquido em modo dinâmico, traz algumas vantagens como, eliminação de forças capilares, a redução das forças de Van der Waals e a possibilidade de estudar importantes processos biológicos ou tecnológicos em uma interface entre líquido e sólido. Porém, existem complicações como, por exemplo, a dificuldade no tratamento de amostras biológicas mais vulneráveis (BARÓ; REIFENBERGER, 2012).

Trabalhar em modo dinâmico em meio líquido, envolve um maior grau de sofisticação no *design* dos componentes do AFM. Não é uma tarefa tão simples, pois o líquido pode facilmente entrar em contato com os componentes elétricos do AFM, criando potenciais vazamentos. Além disso, ao lidar com o modo dinâmico em meio líquido acaba-se produzindo “múltiplas ressonâncias”, na qual, em muitos casos, é quase impossível localizar o correto pico que corresponde à frequência de ressonância do cantilever (MOULIN et al., 1999; BARÓ; REIFENBERGER, 2012).

Existem algumas soluções para resolver o problema das “múltiplas ressonâncias”. O mais comum é usar a condução magnética, na qual uma bobina é colocada perto de um cantilever coberto com um material magnético (normalmente cobalto). Neste *design*, o cantilever é conduzido por um campo magnético induzido por uma corrente alternada que passa

pela bobina. Porém, esta alternativa não é acessível a qualquer laboratório de AFM (MOULIN et al., 1999; MOULIN; SHEA; WELLAND, 2000).

Por esta razão, ao contrário do modo dinâmico, o modo estático não apresenta limitações para operar em líquidos e por esse motivo é o mais explorado para realizar estudos *in situ* para detectar compostos químicos e biomoléculas (JI et al., 2000; ARNTZ et al., 2003).

## 2.6 FUNCIONALIZAÇÃO DOS CANTILEVERS

Para atuar como biossensores, os cantilevers, que em função do material da sua composição não possuem atributos sensoriais, devem ter sua superfície ou sua ponta recoberta com uma camada ativa, neste caso um elemento biológico, que seja altamente específico à molécula alvo, processo este chamado de funcionalização (LANG, HEGNER, GERBER, 2010). Esta funcionalização pode ser realizada com monocamadas orgânicas, as quais possuem terminações com grupos funcionais bem definidos e que viabilizam interações com moléculas-alvo (BUENO et al., 2013; LEITE et al., 2015).

Por isto, um passo importante para o desenvolvimento de biossensores relaciona-se à maneira pela qual o derivado biológico é imobilizado no cantilever. Muitos autores afirmam que a imobilização é um artifício que, normalmente, produz uma superfície altamente desorganizada, provocando mudanças conformacionais que afetam a atividade funcional do componente bioativo. Assim, somente uma porcentagem das biomoléculas na superfície sensora permanece ativa e mantém a sua capacidade de interagir seletivamente com as espécies de interesse analítico (MENDES, 2006).

Em projetos de biossensores é importante que seja encontrado um método adequado de imobilização, evitando o processo de desnaturação. 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 a resolução (MANZOLI et al., 2010; RAITERI et al., 2001).

Dentre os principais métodos de imobilização enzimática encontrados estão:

a) **Adsorção física:** É o método mais simples e rápido de imobilização enzimática, e baseia em interações físicas entre a enzima e a superfície onde a enzima será imobilizada. Nesse método a atividade enzimática observada é próxima à atividade natural da enzima. As principais vantagens desse método são a sua simplicidade e baixo custo experimental (SANTOS, 2012).

b) **Ligação covalente:** O método que emprega a formação de ligação covalente é o método que tem sido mais utilizado. Neste caso a retenção da enzima na superfície do suporte

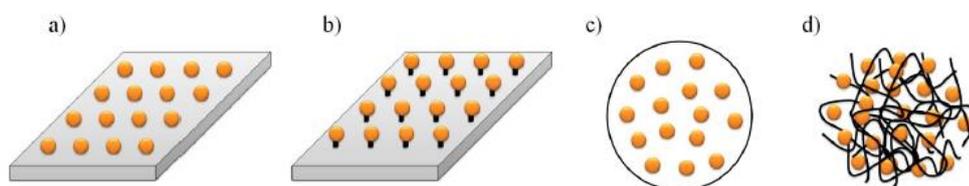
é efetuada por ligações entre os grupos funcionais da enzima e a superfície do suporte. Porém, a técnica apresenta como desvantagem a possibilidade de perda de parte da atividade enzimática devido a mudanças nas conformações dos sítios ativos das enzimas (SANTOS, 2012).

c) **Encapsulação:** No método de encapsulação é feito um confinamento da enzima em uma membrana localizada na superfície do eletrodo. Tal membrana irá reter a enzima de forma a permitir livre difusão do substrato e dos produtos da reação da mesma. A principal desvantagem desta técnica está associada aos fenômenos de transferência de massa do substrato, aos produtos da reação enzimática e ao crescimento de microrganismos na superfície da membrana (SANTOS, 2012).

d) **Entrecruzamento:** Este método é baseado na formação de um reticulado das moléculas da enzima de modo a formar uma rede rígida. Nesse processo tem-se a vantagem de uma ligação enzima-enzima mais sólida, porém, pode induzir a formação de barreiras de difusão, aumentando assim o tempo de resposta do biossensor (SANTOS, 2012).

Na Figura 12 estão ilustrados os procedimentos de imobilização enzimática.

Figura 12 - Esquema ilustrativo dos tipos básicos de métodos de imobilização enzimáticos: a) adsorção; (b) ligação covalente; (c) encapsulação, e (d) ligação covalente cruzada.



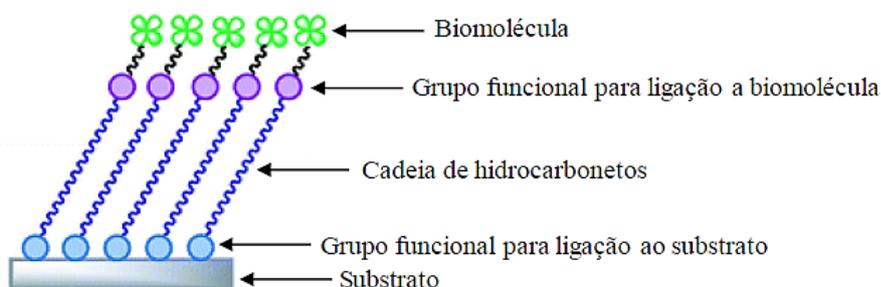
Fonte: SANTOS (2012).

Entre as ligações covalentes, a técnica de camadas automontadas (SAM) é uma das mais utilizadas. Ela é constituída por camadas moleculares formadas tipicamente a partir da exposição de uma superfície a moléculas com grupos funcionais que possuem afinidade por um determinado substrato usado como suporte, como por exemplo, o ouro. A formação de SAM permite interações entre moléculas e superfícies, modificando suas propriedades físicas e químicas e tem se tornado um procedimento de imobilização bastante empregado para fixar o material biológico, devido à sua simplicidade, versatilidade e possibilidade de produzir estruturas altamente ordenadas (MENDES, 2006).

Uma monocamada é composta por um grupo funcional que se liga a um substrato; uma cadeia de hidrocarbonetos que dá estabilidade ao conjunto formado por interações de van der

Waals e outro grupo funcional que é responsável pelo acoplamento da biomolécula a monocamada (ADAMKIEWICZ et al., 2012), como demonstrado na Figura 13.

Figura 13 - Representação da técnica de monocamadas automontadas.



Fonte: HUNT, ARMANI (2010).

A formação de SAM para funcionalização do cantilever pode ser feita a partir de moléculas de tióis (-SH) (ALVAREZ et al, 2003; MANZOLI et al., 2010) que interagem fortemente com superfícies de ouro para formar monocamadas estáveis e automontadas ou a partir de moléculas de silanos (-SiOx) que apresentam afinidade para substratos de silício (SILVA et al., 2013; BUENO et al., 2013). A automontagem da monocamada tiol em ouro é promovida pela forte interação química existente com o ouro e o enxofre (presente no tiol) situado na extremidade da cadeia (ALMEIDA, 2010).

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 o N-hidroxisuccinimida (NHS).

O EDC é uma carbodiimida usada para conjugar substâncias contendo grupos carboxilas e grupos amins e possui a função de ativar os grupos carboxílicos, enquanto que o NHS reage com as amins primárias, formando no final uma ligação amida (O=C-N-H) (HERMANSON, 2013).

A imobilização de grupamentos químicos em superfícies, como as das pontas de AFM, constituem um grande desafio analítico e assemelham-se a um jogo de peças de montar (BUENO et al., 2013).

Chaki e Vijayamohanan (2002) apontaram as vantagens de se utilizar as camadas automontadas para a imobilização de biomoléculas:

- São fáceis de serem formadas;

- Formam estruturas ordenadas;
- A versatilidade na variação, por meio de grupos funcionais diferentes, permite que se obtenham superfícies com características hidrofóbicas ou hidrofílicas e ainda permitindo reações de imobilização;
- Apresentam razoável estabilidade por um período longo de tempo, permitindo que sejam utilizadas para a realização de um grande número de medidas, não sendo necessário trocar a cada momento;
- Podem formar membranas que lembram ambientes celulares, tornando-se adequadas para a imobilização de biomoléculas;
- É necessária uma quantidade mínima de biomolécula para a imobilização na monocamada, diminuindo custos com reagentes.

Desta forma, percebe-se a importância de se conhecer bem a superfície do material que se deseja funcionalizar e escolher bem o método mais adequado, visto que sem passar por este processo, dificilmente os materiais biológicos serão fixados na superfície do cantilever, dificultando a detecção do analito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMKIEWICZ, M.; O'HARA, T.; O'HAGAN, D.; HAHNER, G. 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.
- ALBUQUERQUE, Y. D. T; FERREIRA, L.F. Amperometric biosensing of carbamate and organophosphate pesticides utilizing screen-printed tyrosinase-modified electrodes. **Analytica Chimica Acta (Print)**, v. 596, p. 210-221, 2007.
- ALMEIDA, I. B. B. (Bio) Funcionalização de superfícies de ouro via formação de ditio-carbamatos. 2010. 113 f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Lisboa, Lisboa/POR, 2010.
- ALVAREZ, M. CALLE, A.; TAMAYO, J.; LECHUGA, L. M.; ABAD, A.; MONTOYA, A. Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT. **Biosensors and Bioelectronics**, v.18, p. 649-653, 2003.
- AMABIS, J. M.; MARTHO, J. R. **Biologia Vol. 2 - Biologia dos Organismos**. Editora Moderna, 2004.
- AMÉRICO, J. H. P.; TORRES, N. H AMÉRICO, G. H. P.; CARVALHO, S. L. Ocorrência, destino e potenciais impactos dos fármacos no ambiente. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia.**, v.8, n.2, p.59-72, 2013.

- ANDREESCU, S.; SADIK, O. A. Correlation of Analyte Structures with Biosensor Responses Using the Detection of Phenolic Estrogens as a Model. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 552 – 560, 2004.
- ARNTZ, Y.; SEELIG, J. D.; LANG, H. P.; ZHANG, J.; HUNZIKER, P.; RAMSEYER, J. P. Label-free protein assay based on a nanomechanical cantilever array. **Nanotechnology**, v. 14, p. 86-90, 2003.
- BARÓ, A. M.; REIFENBERGER, R. G. Atomic Force Microscopy in Liquid – Biologic Applications. **Weinheim: Wiley-VCH**, 2012.
- BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. A Short Course, Fourth Edition. **Immunology**, John Wiley & Sons, Inc., 500 p., 2000.
- BEZERRA, D. S. S. Estrógenos na bacia hidrográfica Tietê-Jacaré: ocorrência e avaliação do impacto ambiental. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP, 2014.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30 (3), p. 651 - 666, 2007.
- BRAZACA, LAÍS C., JANEGITZ, BRUNO C., CANCINO-BERNARDI, J., ZUCOLOTTO, V. Transmembrane Protein-Based Electrochemical Biosensor for Adiponectin Hormone Quantification. **Chemelectrochem**, v. 3, p. 1006-1011, 2016.
- BUENO, C. C.; DEDA, D. K.; SOUZA, B. B.; DA SILVA, A. C. N.; RIBEIRO, G. A.; AMARANTE, A.; FRANCA, E. F.; LEITE, F. L. The use of functionalized AFM tips as molecular sensors in the detection of pesticides. **Materials Research (São Carlos. Impresso)**, v. 16, p. 683-687, 2013.
- CAMPBELL, C. G.; BORGLIN, S. E.; GREEN, F. B.; GRAYSON, A.; WOZEN, E.; STRINGFELLOW, W. T. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: a review. **Chemosphere**, v. 65, p. 1265, 2006.
- CARRASCOSA, L.G.; MORENO, M.; ÁLVAREZ, M.; LECHUGA, L. M. Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n 3, p. 196-206, 2006.
- CASTRO, C. M. B. Perturbadores endócrinos ambientais: uma questão a ser discutida. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.7 (1, 2), p. 4 - 5, 2002.
- CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 1 - 12, 2002.
- CHAVERO, L. N. Desenvolvimento e caracterização de plataformas nanoestruturadas de polipirrol para biossensores amperométricos não enzimáticos e enzimáticos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2013.
- 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.

- CUBILLAS, P.; ETHERINGTON, K.; ANDERSON, M. W.; ATTFIELD, M. P. Crystal growth of MOF-5 using secondary building units studied by in situ atomic force microscopy. **CrystEngComm**, v. 16, p. 9834 - 9841, 2014.
- DEVREESE, J.T. Importance of Nanosensors: Feynman's Vision and the Birth of Nanotechnology. **MRS Bulletin**, v. 32 (09), p. 718 – 725, 2007.
- DIRETIVA DO CONSELHO RELATIVA À QUALIDADE DAS ÁGUAS DESTINADAS AO CONSUMO HUMANO (80/778/CEE). **Publicada no Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, p. 174-192, 15/07/1980.
- DIRTU, A. C.; EEDE, N. V.; MALARVANNAN, G.; IONAS, A. C.; COVACI, A. Analytical methods for selected emerging contaminants in human matrices—a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404 (9), p. 2555 - 2581, 2012.
- DU, P.; ZHOU, B.; CAI, C. Development of an amperometric biosensor for glucose based on electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at the single-walled carbon nanotube/nile blue. A nanocomposite modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 614, p. 149 - 156, 2008.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potencial applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 30, p. 953 - 971, 2000.
- 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.
- FEITOSA, R. S.; SODRÉ, F. F.; MALDANER, A. O. Drogas de abuso em águas naturais e residuárias urbanas: ocorrência, determinação e aplicações forenses. **Química Nova**, v. 36 (2), p. 291-305, 2013.
- FERNANDES, R., BRESAOLA JUNIOR, R. Remoção de 17 $\Omega$ -etinilestradiol de águas de abastecimento, utilizando diferentes de tratamento físico-químico. **Revista Dae**, Edição nº: 187, p. 20-27, 2014.
- FERREIRA, A. P. Ocorrência e detecção de desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: complicações ao meio ambiente. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93 (2), p. 255 - 264, 2012.
- FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.
- FRITZ, J. Cantilever biosensors. **Analyst**, v. 133, p. 855-863, 2008.
- FROEHNER, S.; MACHADO, K. S.; STEFEN, E.; NOLASCO, M. Occurrence of Sexual Hormones in Sediments of Mangrove in Brazil. **Water Air Soil Pollut**, v. 219, p. 591–599, 2011.
- GALLI, A. Quantificação de Açúcares em Alimentos: uma proposta com biossensores. **01. Ed. Dusseldorf: novas edições acadêmicas**, v. 01. 124p., 2016.
- GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30 (3), p. 695 - 706, 2007.

- GROVER, D.P.; ZHANG, Z.L.; READMAN, J.W.; ZHOU, J.L. A comparison of three analytical techniques for the measurement of steroidal estrogens in environmental water samples. **Talanta**, v. 78 p.1204–1210, 2009.
- GUIMARÃES, T. A. Detecção e quantificação dos hormônios sexuais 17  $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3), estrona (E1) e 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) em água de abastecimento: Estudo de caso da cidade de São Carlos, com vistas ao saneamento ambiental. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2008.
- HANSEN, K.M.; THUNDAT, T. Microcantilever biosensors. **Methods**, v. 37, p. 57-64, 2005.
- 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**. 3rd ed. Tóquio: Academic Press, cap. 4, p. 259-273, 2013.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Introdução às Separações Cromatográficas. In: **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre: Bookman, ed. 6. p. 776-801, 2009.
- HUNT, H.K.; ARMANI, A.M. Label-free biological and chemical sensors. **Nanoscale**, v. 2, p. 1544–1559, 2010.
- JEANNOT, R., SABIK, H., SAUVARD, E., DAGNAC, T., DOHRENDORF, K. Determination of Endocrine-Disrupting Compounds in Environmental Samples using Gas and Liquid Chromatography with Mass Spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 974, p. 143 - 159, 2002.
- JI, H. F.; FINOT, E.; DABESTANI, R.; THUNDAT, T.; BROWN, G. M.; BRITT, P. F. A novel self-assembled monolayer (SAM) coat microcantilever for low level caesium detection. **Chemical Communications**, p. 457-458, 2000.
- JOHNSON, A.C.; SUMPTER, J.P. Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Activated Sludge Treatment. **Works Environmental Science Technology**, vol.35, p. 4697-4703, 2001.
- LANG, H. P.; HEGNER, M.; GERBER, C. Nanomechanical Cantilever Array Sensors. Springer Handbook of Nanotechnology. **Bhushan, Bharat** (Ed) 3rd ed.; Part B, p. 427 - 452, 2010.
- LAVRIK, N. V.; SEPANIAK, M. J.; DATSKOS, P. G. Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors. **Review of Scientific Instruments**, v. 75, n. 7, p. 2229-2253, 2004.
- LEITE, F. L.; MORAES, A. S.; PEREIRA, B. B. S.; MOREAU, A. L. D.; HAUSEN, M.; GARCIA, P. S.; RÓZ, A. L. Evidências de detecção do herbicida atrazina por espectroscopia de força atômica: uma ferramenta promissora para sensoriamento ambiental. **Acta Microscopica**, v. 24 (1), p. 53 - 63, 2015.
- MACHADO, K. S.; CARDOSO, F. D.; AZEVEDO, J. C. R.; BRAGA, C. B. Occurrence of female sexual hormones in the Iguazu river basin, Curitiba, Paraná State, Brazil. **Acta Scientiarum Technology**, v. 36, n. 3, p. 421-427, 2014.

- MANIERO, M. G.; MAIABILA, D.; DEZOTTI, M. Degradation and estrogenic activity removal of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by ozonation and O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 105-115, 2008.
- MANZOLI, A.; STEFFENS, C.; PASCHOALIN, R. T.; OLIVEIRA, J. E.; MATTOSO, L. H. C.; HERRMANN JUNIOR, P. S. P. Funcionalização da superfície de microcantilevers utilizados em microscopia de força atômica com biomoléculas. **Embrapa, Circular Técnica** 53, 2010.
- MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31 (7), p. 1791 – 1799, 2008.
- MENDES, R. K. Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2006.
- MOREIRA, D. S. Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia/espectrometria de massas para avaliação da ocorrência de perturbadores endócrinos em mananciais de abastecimento da região metropolitana de Belo Horizonte. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto/MG, 2008.
- MOREIRA, D. S.; AQUINO, S. F.; AFONSO, R. J. C. F. SANTOS, E. P. P. C.; PÁDUA, V. L. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil. **Environmental Technology**, v. 30, n. 10, p. 1041–1049, 2009.
- MOULIN, A. M.; SHEA, S. J.; BADLEY, R. A.; DOYLE, P.; WELLAND, M. E. Measuring surface-induced conformational changes in proteins. **Langmuir**, v. 15, n. 26, p. 8776-8779, 1999.
- MOULIN, A. M.; SHEA, S. J.; WELLAND, M. E. Microcantilever-based biosensor. **Ultramicroscopy**, v. 82, p. 23-31, 2000.
- MOURA COSTA, D. D.; BOZZA, D. A.; RIZZO, L. E.; GARCIA, J.; COSTA, M. D. M.; DE OLIVEIRA, R. C. A. Characterization, specificity and sensibility of produced anti-Rhamdia quelen vitellogenin in Brazilian fish species. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 1721-1732, 2016.
- MUENCHEN, D. K., MARTINAZZO, J., CEZARO, A. M., RIGO, A. A., BREZOLIN, A. N., MANZOLI, A., LEITE, F. L., STEFFENS, C., STEFFENS, J. Pesticide Detection in Soil Using Biosensors and Nanobiosensors. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v.6 (6), p. 1659 – 1675, 2016.
- NIKOLAOU, A.; MERIC, S.; FATTA, D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1225–1234, 2007.
- NGHIEM, L. D.; MANIS, A.; SOLDENHOFF, K.; SCHÄFER, A. I. Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 242, p. 37 - 45, 2004.
- OLIVEIRA, C. S. Caracterização por Microscopia de Força Atômica de Camadas Lipídicas Imobilizadas em Superfícies. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2007.

- OLIVEIRA, D. P. C.; RIBEIRO, F. W. P.; BECKER, H.; LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Biossensor eletroquímico baseado na enzima tirosinase para a determinação de fenol em efluentes. **Química Nova**, v. 38 (7), p. 924 – 931, 2015.
- OLIVEIRA, R.R.L.; ALBUQUERQUE, D.A.C.; CRUZ, T.G.S.; YAMAJI, F.M.; LEITE, F.L. Measurement of the Nanoscale Roughness by Atomic Force Microscopy: Basic Principles and Applications. In: BELLITTO, V. (Ed.). **Atomic Force Microscopy - Imaging, Measuring and Manipulating Surfaces at the Atomic Scale**. Rijeka, Croácia: InTech. cap 7, p. 147-174, 2012.
- PRATER, J. R.; HORTON, R.; THOMPSON, M. L. Reduction of estrone to 1717  $\beta$ -estradiol in the presence of swine manure colloids. **Chemosphere**, v.119, p. 642-645, 2015.
- 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, cap. 4, p. 89-110, 2013.
- SANTOS N, CASTANHO M. An Overview of the Biophysical Applications of Atomic Force Microscopy. **Biophysical Chemistry**, v. 107, p. 133 - 149, 2004.
- SANTOS, V. P. S., COSTA SILVA, L. M., SALGADO, A. M., PEREIRA, K. S. Application of *Agaricus bisporus* Extract for Benzoate Sodium Detection Based on Tyrosinase Inhibition for Biosensor Development. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 1831-1836, 2013.
- SANTOS, J. C. C. Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2012.
- SCHIAVINI, J. A.; CARDOSO, C. E.; RODRIGUES, W. C. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente e o Uso de Potenciais Bioindicadores. **Revista Eletrônica TECCEN**, v. 4 (3), p. 33 - 48, 2011.
- SILVA, A. L. Interferentes endócrinos no meio ambiente: um estudo de caso em amostras de água in natura e efluente de estação de tratamento de esgotos da Região Metropolitana de São Paulo. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, 2009.
- SILVA, C. P.; LIMA, D. L. D.; SCHNEIDER, R. J. S.; MARTA OTERO, M.; ESTEVES, V. I. Development of ELISA methodologies for the direct determination of 1717  $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in complex aqueous matrices. **Journal of Environmental Management**, v. 124, p. 121 - 127, 2013.
- SILVA, L. M. C., SALGADO, A. M., COELHO, M. A. Z. Amperometric biosensor for phenol determination. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 1249-1254, 2011.
- SINGH, A. C.; BACHER, G.; BHAND, S. A label free immunosensor for ultrasensitive detection of 1717  $\beta$ -estradiol in water. **Electrochimica Acta**, 2017.
- STEFFENS, C. Desenvolvimento de microcantilever funcionalizado com polímero condutor para a detecção de compostos orgânicos voláteis e umidade relativa. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP, 2012.

- STEFFENS, C., STEFFENS, J., GRABOSKI, A. M., MANZOLI, A., LEITE, F. L. Nanosensors for detection of pesticide in water. **New Pesticides and Soil Sensors**, p. 595-635, 2017.
- SUMPTER, J. P.; JOHNSON, A. C. Reflections on endocrine disruption in the aquatic environment: from known knowns to unknown unknowns (and many things in between). **Journal of Environmental Monitoring**, v.10, 1476–1485, 2008.
- SWIERCZEWSKA, M.; LIU, G., LEE, S.; CHEN, X. High-sensitivity nanosensors for biomarker detection. **Chemical Society reviews**, v. 41, p. 2641 - 2655, 2012.
- RAIMUNDO, C. C. M. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2007.
- RAITERI, R.; GRATTAROLA, M.; BUTT, H. J.; SKLADAL, P. Micromechanical cantilever-based biosensors. **Sensors and Actuators B**, v. 4010, p. 1-12, 2001.
- REIS FILHO, R. W., ARAÚJO, J.C., VIEIRA, E.M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29 (4), p. 817 - 822, 2006.
- RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v. 25 (2), p. 316 - 320, 2002.
- TAMAYO, J. KOSAKA, P. M.; RUZ, J. J., SAN PAULO, A.; CALLEJA, M. Biosensors Based on Nanomechanical Systems. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 3, p. 1287-1311, 2013.
- TORRES, N. H.; AGUIAR, M. M.; FERREIRA, L. F. R.; AMÉRICO, J. H. P.; MACHADO, A. M.; CAVALCANTI, E. B.; TORNISIELO, V. L. Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and cototoxicological assessment with *Daphnia magna*. **Environmental Monitoring and Assessment**, p. 187:379, 2015.
- TORRES, N. H.; FERREIRA, L. F. R.; AMÉRICO, J. H. P.; ANDRADE, G. C. R. M.; FREGUGLIA, R. M. O.; TORNISIELO, V. L. Analysis and occurrence of residues of the hormones estriol, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and 17 $\beta$ -estradiol in urban water supply by HPLC-DAD. **Journal of Engineering**, v. 2, n. 5, p. 984-989, 2012.
- ZHANG, J. et al. Study on the sorption behaviour of estrone on marine sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v.76, p. 220–226, 2013.
- WANG, C.; WANG, D.; MAO, Y.; HU, X. Ultrasensitive biochemical sensors based on microcantilevers of atomic force microscope. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 1, p. 1-11, 2007.

## **CAPÍTULO 3**

# **DESENVOLVIMENTO DE NANOIMUNOSSENSORES DE CANTILEVERS PARA DETECÇÃO DE 17 $\beta$ -ESTRADIOL E ESTRONA EM ÁGUA**

### 3.1 INTRODUÇÃO

Os contaminantes emergentes conhecidos como desreguladores endócrinos são substâncias potencialmente capazes de causar alguma disfunção no sistema endócrino em algumas espécies animais e em seres humanos (BILA; DEZOTTI, 2007; FERREIRA, 2012; PESSOA et al., 2012), e abrangem muitas classes de substâncias tais como, plastificantes, tensoativos, fármacos, produtos de higiene pessoal, hormônios estrogênicos, dioxinas, pesticidas, metais pesados e compostos policlorados (BILA; DEZOTTI, 2007).

Os desreguladores endócrinos chegam aos ambientes aquáticos por diferentes vias de contaminação, como esgotos domésticos, esgotos industriais e escoamentos agrários (ESPERANZA et al., 2007). Os hormônios estrogênicos naturais e sintéticos têm chamado a atenção de estudiosos da área, por serem detectados em águas de superfícies e por apresentarem efeitos perturbadores do sistema endócrino de organismos quando em contato com essas substâncias (SHIN; SHIN; OH, 2011). Os hormônios estrogênicos comumente encontrados em águas são: estrona, 17  $\beta$ -estradiol e estriol (hormônios naturais) e 17 $\alpha$ -etinilestradiol (hormônio sintético amplamente utilizado em pílulas anticoncepcionais) (RACZ; GOEL, 2010; YING; KOOKANA; RU, 2002).

Diversas metodologias têm sido estudadas para a detecção de hormônios em água, como cromatografia líquida de alta eficiência, quimiluminescência e radioimunoensaio, e dentre estas diferentes técnicas analíticas, os nanoimunossensores tem atraído cada vez mais atenção devido à sua excelente seletividade, alta sensibilidade e baixo limite de detecção (LIU et al., 2012). Estes dispositivos nano não são apenas sensores pequenos, mas sim sensores que utilizam e detectam fenômenos físicos, químicos, biológicos e quânticos na micro e na nano escala (BUENO et al., 2013). Mas para que estes dispositivos tenham um bom desempenho, é necessário que os elementos biológicos sejam imobilizados com eficiência na superfície dos eletrodos. A técnica de monocamadas automontadas (SAM) traz algumas vantagens em sua utilização, pois podem fornecer grupos funcionais úteis (por exemplo, grupo carboxila ou grupo amino) para a imobilização adicional de anticorpos, enzimas e proteínas durante a construção de biossensores (LIU et al., 2012).

Desta forma, em função da relevância da detecção de hormônios em ambientes aquáticos, este capítulo visa o desenvolvimento de nanoimunossensores de cantilever para a detecção dos hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona, em meio líquido.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Material

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

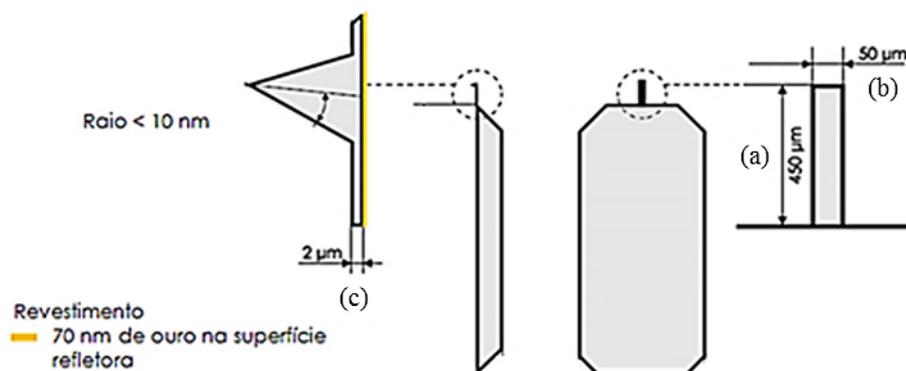
Todo material utilizado (balões volumétricos, espátulas, béqueres, vidro relógio, placa de petri, etc.) foi submetido a um procedimento de limpeza com solução de ácido nítrico 3 M, com posterior lavagem com água destilada (OS10LXE – Gehaka), deionizada (Permuton) e ultrapura (pelo sistema Millipore, com pureza medida pela manutenção da resistividade elétrica em 18,2 MΩ/cm à 25°C), para assegurar a ausência de quaisquer resíduos que pudessem interferir nas análises.

Os reagentes utilizados nos experimentos foram: Ácido Nítrico (65%) (Química Moderna - Brasil), Fosfato de potássio monobásico anidro (98%) (Nuclear - Brasil), Fosfato de potássio dibásico (98%) (Vetec- Brasil), Glicina (98,5%) (Dinâmica - Brasil), Tris-Hidroximetilaminometano (99%) (Sigma Aldrich - Brasil), Álcool absoluto (99,5%) (Quimex - Brasil), Álcool isopropílico (99,5%) (Vetec - Brasil), Ácido 16-mercaptohexadecanóico (AMHD) (90%) (Sigma Aldrich - Brasil), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (98%) (Sigma Aldrich - Brasil), N-hidroxisuccinimida (NHS) (98%) (Sigma Aldrich - Brasil), Anticorpo Anti-17 β-estradiol (95%) (Imuny - Brasil), Anticorpo Anti-Estrona (99%) (Imuny - Brasil), 17 β-estradiol 6-(O-carboxi-metil) oxima:BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma Aldrich - Brasil) e Estrona (99%) (Sigma Aldrich - Brasil).

#### 3.2.1.1 Cantilever

Os cantilevers (ContGD-G) usados para o desenvolvimento dos nanoimunossensores 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 (±4) kHz e constante de mola de 0,2 (0,07-0,4) N/m, apresentando as seguintes características geométricas: 450 μm de comprimento (± 10 μm), 50 μm de largura (± 5 μm) e 2 μm de espessura (± 1 μm), conforme ilustrado na Figura 14.

Figura 14 - Especificações do cantilever utilizado para funcionalização, onde (a) comprimento, (b) largura e (c) espessura da ponta do cantilever.



Fonte: BUDGETSENSORS (2017) com adaptações.

Os cantilevers com recobrimento de ouro foram escolhidos devido à alta afinidade que este metal tem 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 (CARRASCOSA et al., 2006; FRITZ, 2008).

### 3.2.2 Métodos

A funcionalização do cantilever foi realizada por meio da deposição de uma camada sensora no lado superior, onde se encontra depositado o ouro. Para tanto, a técnica de monocamadas automontadas (SAM) foi escolhida, pois segundo Galli (2016), em superfície metálica esta técnica permite a obtenção de uma superfície com alto grau de ordenação. Foram empregados agentes reticuladores (EDC/NHS) para promover a ligação covalente com moléculas de alcanotióis, a fim de favorecer a ligação entre o ácido 16-MHD e os agentes biológicos (anticorpos). O ácido 16-MHD é um alcanotiol de cadeia longa (16 carbonos), proporcionando uma superfície mais ordenada.

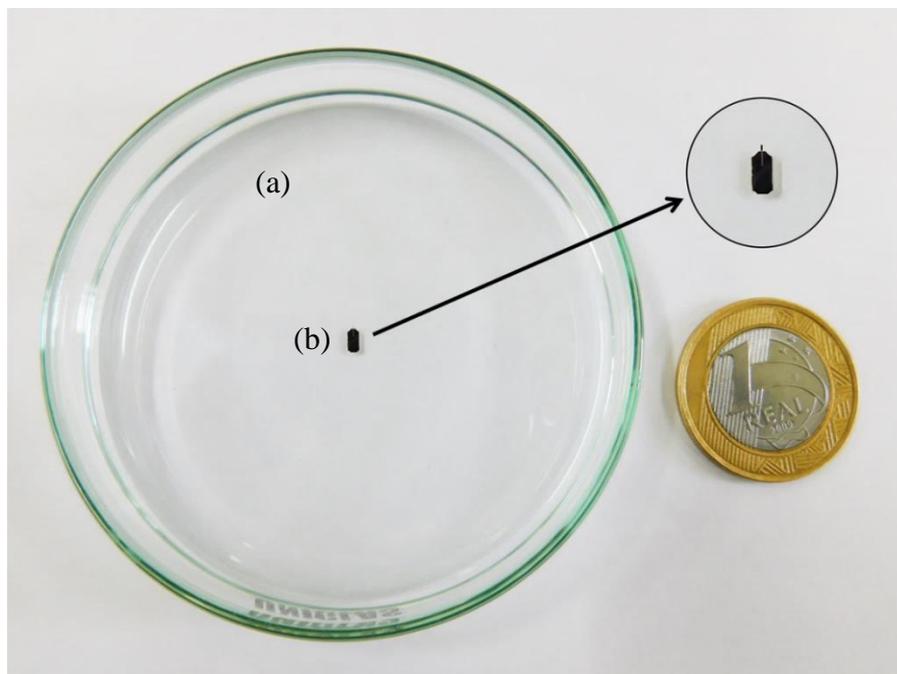
O procedimento de funcionalização do cantilever foi baseado no trabalho de Velanki e Ji (2006) e Martinazzo et al. (2018) com modificações, constituindo das seguintes etapas:

- Etapa 1: Os cantilevers foram transferidos individualmente para uma placa de Petri, onde foram imersos em álcool isopropílico por 2 min, para lavagem e remoção de interferentes da superfície. Depois, secos em temperatura de 20 °C, por cerca de 15 min.
- Etapa 2: Imersão dos cantilevers em uma solução de ácido 16-MHD 2 mM em meio etanólico, por *overnight* (16 h). Após, foi realizada a lavagem do cantilever com água ultrapura (2 min) e secagem em temperatura ambiente por 15 min.
- Etapa 3: Os cantilevers foram imersos em uma mistura de EDC 1 mM/NHS 1 mM 4:1 (v/v) durante 10 min. A mistura das soluções foi feita no momento da utilização, pois há diminuição da eficiência da imobilização se a mistura for preparada muito tempo antes (Tian et al., 2016). A seguir, foi realizada a lavagem com água ultrapura (2 min) e secagem em temperatura ambiente por 15 min.
- Etapa 4: Anticorpo (anti-17  $\beta$ -estradiol e anti-estrona): As soluções de anticorpos comerciais anti-17  $\beta$ -estradiol e anti-estrona (Imuny) foram diluídos em uma solução tampão Tris-glicina 50mM pH 7,4 na proporção de 1:10 (v/v). A imobilização foi realizada por meio da imersão do cantilever na solução durante 10 min. Posteriormente, foi realizada a lavagem dos mesmos com solução tampão Tris-glicina 50 mM pH 7,4 (2min) e secagem em temperatura ambiente por 15 min.

As lavagens realizadas após cada etapa tinham o objetivo de remover as moléculas que não ficaram quimicamente ligadas à superfície. As lavagens com solução tampão tinham o intuito de evitar que fossem arrastados componentes de interesse. As etapas de funcionalização foram realizadas utilizando como suporte um vidro relógio, onde o cantilever era imerso na solução, e então tampado com uma placa de petri durante o tempo de contato.

A Figura 15 representa esta etapa de funcionalização. Tais procedimentos foram realizados em uma sala climatizada a 20°C, pois temperaturas muito altas diminuem a eficiência da ligação dos grupamentos envolvidos. Os dispositivos foram armazenados sob refrigeração (4°C) a seco, dentro de placas de Petri, quando não estava sendo utilizado no AFM e, antes da sua utilização, os mesmos ficavam em temperatura de 25°C por 30 min, para estabilização térmica com o ambiente (Martinazzo et al., 2018).

Figura 15 - Cantilever imerso durante a etapa de funcionalização, onde (a) vidro de relógio (100 mm de diâmetro), (b) cantilever imerso na solução durante a funcionalização. A moeda (24 mm de diâmetro) foi para fins de comparação de tamanho com o cantilever utilizado neste trabalho.



Fonte: O autor.

### 3.2.2.1 Caracterização da superfície dos nanoimunossensores

As análises de caracterização da superfície dos dispositivos foram realizadas em cada etapa da funcionalização do cantilever. Para estas análises, a funcionalização foi feita em placas de silício ( $1 \text{ cm}^2$ ), material similar ao cantilever utilizado, onde depositou-se uma camada de 20 nm de ouro por meio da técnica *Sputtering*.

#### 3.2.2.1.1 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.

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

A técnica de Microscopia de força atômica (AFM) foi utilizada para avaliar a topografia e a rugosidade da superfície dos dispositivos, bem como medir a espessura total das camadas de todas as etapas de funcionalização.

As análises foram realizadas em um microscópio de força atômica (EasyScan 2 FlexAFM System, Nanosurf, Suíça), na Embrapa Instrumentação, em São Carlos/SP, utilizando um cantilever de silício, modelo Tap-150-G (BudgetSensors), de frequência de ressonância de 150 ( $\pm 75$ ) kHz e constante de mola de 5 (1,5-15) N/m. Todas as imagens foram obtidas em modo dinâmico e a varredura realizada no modo *tapping* (neste modo, o cantilever vibra em alta frequência, e quando se aproxima da superfície, sua ponta só faz um breve contato com a superfície da amostra).

Para as análises de topografia e rugosidade, as imagens foram obtidas em uma área de 25  $\mu\text{m}^2$ , com resolução de 515x512 pontos e velocidade de varredura de 0,8 a 0,9 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).

#### 3.2.2.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Visando inspecionar a morfologia da superfície dos nanoimunossensores em cada etapa de funcionalização, os sensores foram submetidos à análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (JEOL, modelo - JSM6510, Japão). Para recobrimento da superfície das amostras com ouro, utilizou-se uma metalizadora Balzer (SCD 050/LEICA). Este equipamento produz imagens de alta resolução e ampliação de 500 vezes. Esta análise foi realizada na Embrapa Instrumentação, em São Carlos – SP.

### 3.2.2.2 Medida de voltagem dos nanoimunossensores de cantilever

A resposta dos dispositivos, obtidos por meio da funcionalização dos cantilevers com anticorpo (anti-17  $\beta$ -estradiol e anti-estrona) para detecção de hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona foi avaliada no modo estático, em meio líquido, por meio da realização de uma imagem no AFM (Nanosurf - C3000 Controller, Suíça) em modo contato. Foi utilizado o método de feixe óptico, onde o laser refletido da superfície do cantilever atinge uma posição sensível do fotodetector, sendo que a distância percorrida é proporcional à deflexão da haste. Neste procedimento, o cantilever foi inserido no canticlip e depois colocado junto ao scanner do equipamento, onde o laser foi posicionado na extremidade final da haste do cantilever e na posição central do fotodetector, indicando intensidade em torno de 70%, sendo ambos calibrados apenas na primeira medida (água ultrapura).

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 realiza uma varredura nos eixos x e y dentro da gota de líquido), resolução de  $1800 \times 1800$  pontos (a imagem era formada por 1800 linhas, representando os pontos de resposta) e o tempo de 1 s/linha para a obtenção da resposta. Nestes parâmetros, a duração de cada análise era de 60 min. Transcorrido este tempo, a gota de líquido, com volume de  $\pm 0,5 \text{ mL}$ , era retirada com o auxílio de uma pipeta volumétrica e injetava-se outra gota com concentração diferente de hormônio.

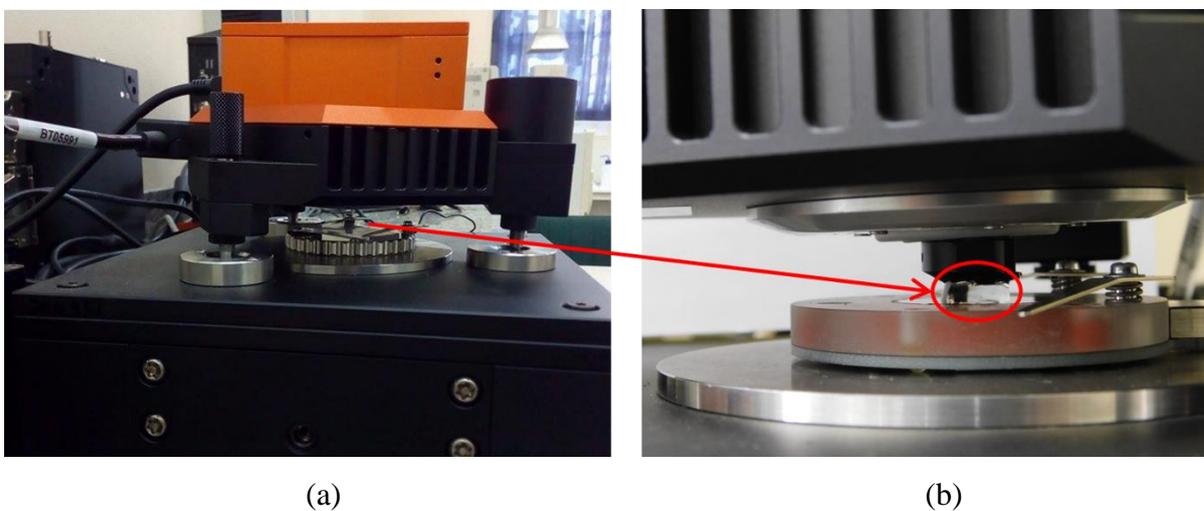
As imagens obtidas foram convertidas em um gráfico de voltagem, em Volts (V)  $\times$  tempo de contato (min), por meio do software Gwyddion (Versão 2.45) e exportado para o software Broffice (Versão 2010), onde os mesmos tomados em triplicata. A voltagem lida foi proveniente do sinal do fotodetector do equipamento.

### 3.2.2.3 Resposta dos nanoimunossensores aos hormônios

A fim de conhecer o comportamento do dispositivo funcionalizado, inicialmente foi proposto um experimento com o hormônio 17  $\beta$ -estradiol. Neste experimento, o dispositivo foi colocado em contato com 10 diferentes concentrações de hormônio (0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 10; 50; 100; 200 e  $500 \mu\text{g/L}$ ), colocadas em ordem crescente de concentração. Após este experimento inicial, foram escolhidas as seis concentrações para serem utilizadas nas curvas de calibração, tanto do hormônio 17  $\beta$ -estradiol quanto do hormônio estrona.

A faixa de concentração escolhida levou em consideração a Resolução Conama 357/2005 e a Resolução Conama 430/2011, que estabelecem as condições e padrões de qualidade da água e seus efluentes (CONAMA, 2005; CONAMA, 2011). Em cada análise realizada, uma gota ( $\pm 0,5$  mL) de cada concentração era injetada sobre uma placa de aço inoxidável no AFM, de modo que o cantilever ficasse totalmente imerso nesta gota para as medidas de voltagem (Figura 16).

Figura 16 - Imersão do cantilever na solução de hormônio para obtenção da medida de voltagem: (a) Vista lateral do cabeçote; (b) Imersão do cantilever em meio líquido.



Fonte: MARTINAZZO (2017) com adaptações.

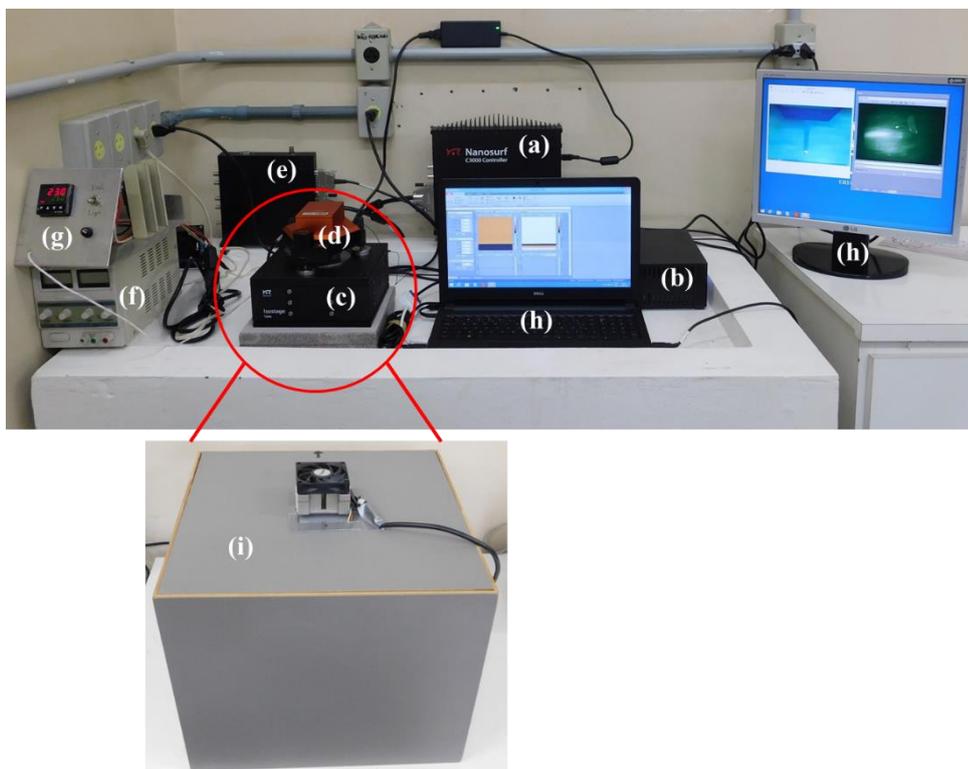
Além disso, para avaliar a resposta de interação dos dispositivos aos hormônios foi utilizado um cantilever de silício sem funcionalização (branco) - CONTR (Nano World, Suíça) com constante de mola  $0,2$  N/m e frequência de ressonância de  $13$  kHz, colocado em contato com as soluções de  $50$   $\mu\text{g/L}$  de  $17$   $\beta$ -estradiol e  $50$   $\mu\text{g/L}$  de estrona. O controlador de mesa anti-vibratória e a mesa anti-vibratória foram utilizados para evitar que possíveis ruídos pudessem alterar os resultados experimentais.

Diferentemente do cantilever de silício, o qual não possui características de sensoriamento, o cantilever com  $70$  nm de deposição de ouro funciona como uma camada sensora. Desta forma, um cantilever revestido com ouro em somente um dos lados ContGD-G (Budget Sensors), com constante de mola  $0,2$  N/m e frequência de ressonância de  $13$  kHz, sem funcionalizar (branco), foi colocado em contato com as soluções de hormônio ( $50$   $\mu\text{g/L}$ ), a fim de comprovar a efetividade da funcionalização.

As análises foram realizadas em temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} (\pm 0,3)$  através de um sistema de resfriamento no AFM. O sistema de resfriamento do AFM foi montado tendo por base uma pastilha Peltier com dimensões de  $50 \times 53$  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. Para minimização de ruídos e interferências nas respostas, usou-se uma caixa de fibra de média densidade (MDF) (comprimento = 40 cm, altura = 32 cm, largura = 40 cm e espessura = 10 mm) sobre a parte do equipamento onde ficava o cantilever em contato com a amostra. A face resfriada e seu dissipador ficaram na parte interna da caixa, enquanto que a face aquecida e seu dissipador ficaram na parte externa. O dispositivo foi montado na parte superior da caixa em uma abertura feita para sua fixação. Em cada dissipador de calor foi colocado um micro ventilador, ambos alimentados pela mesma fonte de energia que aciona a pastilha Peltier.

A tensão a que o sistema ficou submetido foi de 5,5 V (CC), o que garantiu o resfriamento e impulsionou os microventiladores com baixa velocidade, para não haver ruído que pudesse interferir nos experimentos. Para controlar a temperatura interna foi utilizado um sistema de controle baseado em um sensor PT100 situado no interior da caixa e conectado a um controlador digital externo que desligava a fonte do sistema Peltier caso a temperatura atingisse o valor mínimo programado (Figura 17).

Figura 17 - Microscópio de força atômica (AFM) com sistema de resfriamento acoplado em uma caixa de MDF. (a) Controlador C3000, (b) Controlador da mesa anti-vibratória, (c) Mesa anti-vibratória, (d) Cabeçote, (e) Controlador Easyscan 2, (f) Fonte do sistema Pelti, (g) Controlador digital externo de temperatura, (h) Monitores de computador para controle das imagens (i) Caixa de MDF acoplada ao micro ventilador externo.



Fonte: MUENCHEN (2017) com adaptações.

#### 3.2.2.4 Caracterização da resposta dos nanoimunossensores

Avaliou-se a resposta dos dispositivos expostos às diferentes concentrações dos hormônios (17  $\beta$ -estradiol e estrona). Os nanoimunossensores tiveram suas voltagens monitoradas, e a partir dos dados registrados durante a análise foi gerado um gráfico da voltagem *versus* o tempo de contato com cada hormônio. Posteriormente, as respostas foram caracterizadas quanto a sensibilidade, limite de detecção, reversibilidade e estabilidade. Todas as análises foram feitas em triplicata.

#### 3.2.2.4.1 Sensitividade

A sensibilidade demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e é expressa pelo coeficiente angular da curva analítica (PASCHOAL et al., 2008). A sensibilidade linear é, portanto, a razão entre a inclinação da curva de calibração e o desvio padrão do sinal analítico a uma dada concentração, e é geralmente, dependente da concentração (SKOOG, 2005). Neste trabalho, a sensibilidade dos nanobiossensores desenvolvidos foi atribuída ao coeficiente angular da curva de calibração dos mesmos.

#### 3.2.2.4.2 Limite de detecção (LD)

Pode ser entendido como a menor concentração que pode ser distinguida com certo nível de confiança. O limite de detecção (LD) foi calculado segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2003) e Skoog (2005). A partir da curva de calibração, o limite de detecção é definido como a concentração analítica que gera uma resposta com um fator de confiança  $k$  superior ao desvio padrão do branco ( $S_b$ ), de acordo com a Equação 6.

$$LD = \frac{KS_b}{m} \quad (\text{Equação 6})$$

onde:  $S_b$  é o desvio padrão do branco,  $m$  é sensibilidade da calibração,  $K$ : 3, correspondendo ao nível de confiança de 98%.

Os resultados de sensibilidade e limite de detecção foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de  $t$  student, a nível de 95% de confiança, utilizando o software Statistica 5.0.

#### 3.2.2.4.3 Reversibilidade

A reversibilidade ( $\eta$ ) é a capacidade dos sensores de voltar ou não à sua condição inicial depois de cessada a interação com a espécie química desejada (JANATA, 2009). A reversibilidade pode ser calculada por meio da Equação 7 (STEFFENS et al., 2009).

$$\eta(\%) = \frac{V-V_f}{V-V_0} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

onde:  $V_o$  é a voltagem inicial do nanoimunossensor/nanobiossensor;  $V$  é valor de voltagem após exposição aos hormônios e  $V_f$  é a voltagem final do nanoimunossensor/nanobiossensor.

A reversibilidade dos dispositivos desenvolvidos neste trabalho foi realizada com a maior concentração de hormônio, em triplicata, através dos seguintes procedimentos:

1<sup>o</sup> - Foi realizada uma análise no AFM com o cantilever funcionalizado com a anticorpo anti-estrona em contato com a água ultrapura, meio em que o hormônio estrona foi diluído.

2<sup>o</sup> - Foi realizada uma análise no AFM com a cantilever funcionalizado com o anticorpo anti-estrona em contato com a solução de hormônio estrona na concentração de 50  $\mu$ /L.

E assim sucessivamente, até completar os 6 ciclos ou a triplicata da análise. Cabe salientar que entre uma análise e outra, o cantilever não era lavado e cada análise foi feita com uma duração de 60 min.

#### 3.2.2.4.4 Estabilidade

A estabilidade dos dispositivos foi avaliada em relação a sua resposta no 1<sup>o</sup> dia da funcionalização (dia inicial). Foi feita uma comparação da leitura do nanoimunossensor no 1<sup>o</sup> dia da funcionalização (dia inicial) e após 30 dias sob armazenamento a seco a 4°C (em geladeira, devidamente fechado para evitar a entrada de umidade e interferentes). Estas análises foram feitas utilizando a faixa de concentração estabelecida para cada hormônio (17  $\beta$ -estradiol e estrona) e se fixou 30 dias a fim de verificar a atividade dos anticorpos após a imobilização no cantilever.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

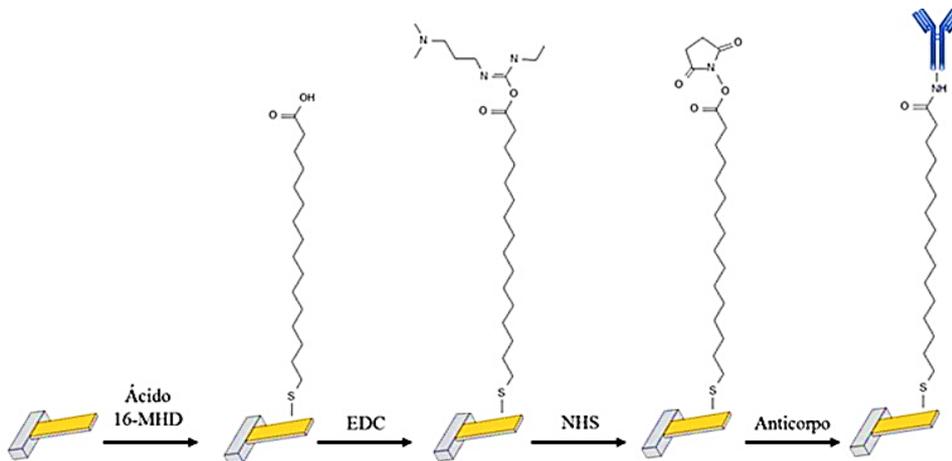
#### 3.3.1 Funcionalização: Formação das ligações químicas dos nanoimunossensores

Uma etapa importante no desenvolvimento de um nanoimunossensor é a definição do elemento biológico. Nesse caso os anticorpos anti-17  $\beta$ -estradiol e anti-estrona foram escolhidos por possuírem especificidade frente ao analito de interesse (hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona). Conhecendo a estrutura e características dos anticorpos e do cantilever, projetou-se um modo adequado para a funcionalização destes dispositivos, a qual envolveu adição e troca dos grupos químicos das superfícies das pontas de AFM. O principal objetivo da modificação química foi melhorar o comportamento químico das superfícies dando suporte para essas

reações e interações acontecerem em condições brandas de temperatura e pH, por exemplo, conforme ocorrem na natureza (BUENO et al., 2013). A Figura 18 apresenta o esquema da funcionalização do cantilever por meio da imobilização dos anticorpos na superfície do cantilever.

A montagem dos dispositivos se iniciou modificando quimicamente a superfície de ouro do cantilever com o ácido 16-MHD, a fim de formar as monocamadas automontadas. O ácido 16-MHD é um alcanotiol de cadeia longa (16 carbonos), e esta reação proporciona SAMs mais ordenadas. O grupo tiol (-SH), localizado em uma de suas extremidades, se liga a superfície do ouro através da formação de uma ligação tiolato enquanto o grupo carboxila presente na outra extremidade fica disponível (GOODING, HIBBERT, 1999).

Figura 18 - Representação esquemática da funcionalização do cantilever com anticorpo.



Fonte: O autor.

Para imobilizar covalentemente os anticorpos sobre a superfície do cantilever, os grupos carboxila do ácido 16-MHD foram acoplados aos grupos amina primário presentes na estrutura do anticorpo, através dos agentes de reticulação EDC e NHS. Dessa forma, o grupo carboxílico presente no ácido 16-MHD reagiu com o EDC, formando o intermediário instável o-ácilourea. Em solução aquosa, o intermediário instável é suscetível à hidrólise, estando sujeito à regeneração do grupo carboxílico. Desta forma, adiciona-se NHS para aumentar a eficiência da ligação, onde este reage com o composto intermediário formando um novo intermediário mais estável. Este novo intermediário, por sua vez, reage com a amina primária, que está presente nos anticorpos, fazendo com que a amina se ligue ao ácido carboxílico original, por meio de uma ligação amida (BRAZACA et al., 2016; PEPINO, 2016).

A proporção entre EDC e NHS é um fator que exerce grande influência no processo de imobilização de moléculas biológicas em biossensores. De acordo com Xia et al. (2013) a utilização de maiores razões de EDC para NHS favorecem a transformação do intermediário o-acilisourea em éster de NHS, e conseqüentemente contribuem para a imobilização da biomolécula. Entretanto, esta relação ótima pode diferir devido à diferença dos substratos utilizados (MARTINAZZO et al., 2018).

### **3.3.2 Caracterização da superfície**

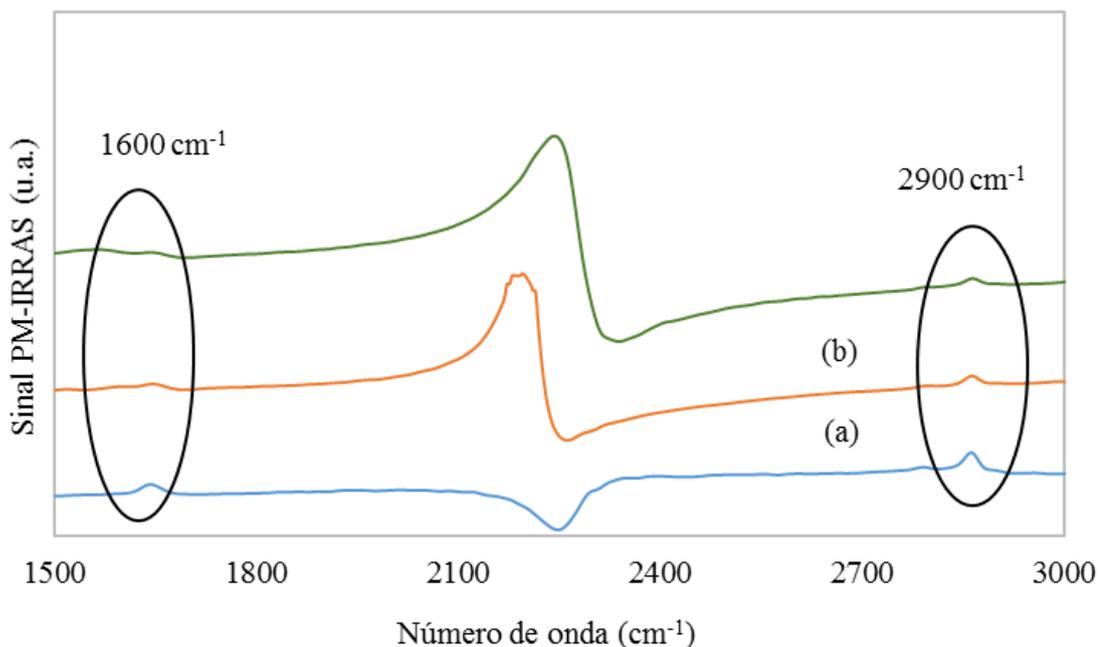
#### **3.3.2.1 Espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS)**

A análise de Espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS) foi utilizada para monitorar a funcionalização da superfície a fim de identificar os grupos funcionais responsáveis pelas propriedades modificadas das superfícies de ouro, além de verificar a organização da camada adsorvida. Os espectros de PM-IRRAS das etapas de funcionalização do cantilever são apresentados na Figura 24.

Em experimentos de espectroscopia na região do infravermelho, a luz incidente com comprimento de onda na região do infravermelho interage com os dipolos das ligações e grupos químicos das moléculas, sendo então absorvida. Como os diferentes grupos ou ligações químicas de uma molécula possuem frequência de oscilações características, cada molécula e grupo funcional possui um espectro típico de infravermelho. Assim, as informações químicas estruturais podem ser obtidas (BLAUDEZ et al., 1996).

De acordo com a Figura 19, nota-se a presença de pequenas bandas, em  $\pm 1600\text{ cm}^{-1}$  e em  $\pm 2900\text{ cm}^{-1}$ , que diminuem ao longo das deposições da funcionalização. Pode ser observado que conforme foram depositadas as camadas nas etapas de funcionalização do cantilever (b) e (c), houve uma interação entre os compostos, diminuindo a intensidade da banda e confirmando a eficiência do método utilizado para imobilizar os anticorpos na superfície do cantilever.

Figura 19 - 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 + Anticorpo.



Fonte: O autor.

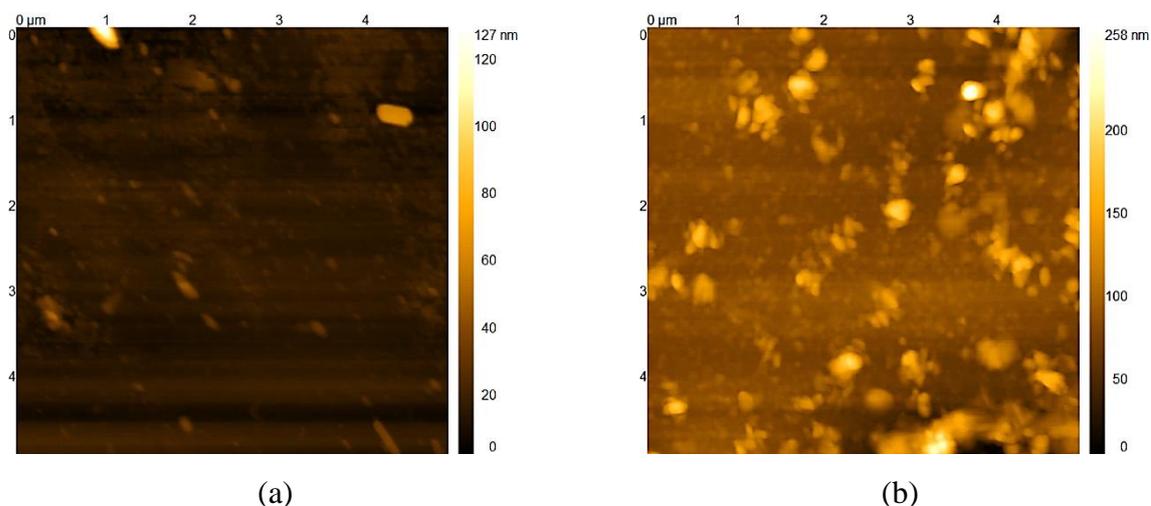
Nota-se que o espectro de PM-IRRAS encontrado para os anticorpos reduziu nas duas bandas ( $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $2900\text{ cm}^{-1}$ ), mostrando que houve uma deposição na superfície do nanobiossensor. Os resultados encontrados estão de acordo com alguns trabalhos relatados na literatura de espectros de PM-IRRAS em superfícies de cantilever, a fim de verificar a eficiência da funcionalização, como Martinazzo et al. (2018) e Muenchen (2017), que propuseram esta metodologia de PM-IRRAS para comprovar a funcionalização da ponta do cantilever através da imobilização de enzima com a técnica SAM.

### 3.3.2.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A técnica de AFM avalia como a deposição das moléculas durante a funcionalização altera a rugosidade da superfície. Esta deposição pode ocorrer nos vales ou nos picos, que são, respectivamente, regiões abaixo ou acima do plano médio da superfície (MUENCHEN, 2017). A Figura 20 e a Tabela 4 apresentam, respectivamente, as imagens topográficas obtidas nas diferentes etapas de funcionalização da superfície do cantilever com a técnica de SAM e os valores de desvio médio quadrático de rugosidade obtido nas etapas de funcionalização.

Observa-se pela Figura 20 que existem diferenças na topografia durante as etapas de funcionalização da superfície do dispositivo. A superfície de silício (Fig. 20.a) apresenta uma topografia mais homogênea, e após a funcionalização, observa-se uma morfologia mais heterogênea, oriunda da adsorção de materiais (Fig. 20.b).

Figura 20 - Caracterização de superfície por análise topográfica obtida por meio de AFM em cada etapa de funcionalização (a) Silício; (b) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS + Anticorpo.



Fonte: O autor.

Tabela 4 - Valores de desvio médio quadrático de rugosidade (Rms) obtido por meio de AFM para cada etapa de funcionalização dos nanoimunossensores.

<b>Etapa</b>	<b>Rms (nm)</b>
Silício	$3,87 \pm 0,21$
Silício + Ouro	$2,06 \pm 0,12$
Silício + Ouro + Ácido 16-MHD	$6,07 \pm 0,12$
Silício + Ouro + AMHD + EDC/NHS	$27,2 \pm 0,75$
Silício + Ouro + AMHD + EDC/NHS + Anticorpo	$17,80 \pm 0,36$

Rms: desvio médio quadrático da altura.

Fonte: O autor.

Verifica-se que a rugosidade da superfície de silício teve um valor médio de 3,87 nm, sendo este valor atribuído às características do material. A deposição da camada de ouro diminuiu a rugosidade da superfície ( $\pm 2,06$  nm), pois possivelmente o ouro preencheu os espaços vazios da superfície de silício, deixando a camada mais uniforme (YU-CHENG et al., 2008). Quando se adicionou a mistura dos agentes de reticulação EDC/NHS, houve um aumento da rugosidade da superfície ( $\pm 27,2$  nm), que pode ser explicado pelas alterações nos

grupos funcionais que ficam expostos na superfície, ou seja, mudança do ouro para o ácido carboxílico e, após, para o éster de NHS (MUENCHEN, 2017).

Por fim, a adição do anticorpo ocasionou em uma diminuição da rugosidade ( $\pm 17,8$  nm), que pode ser atribuída ao preenchimento dos vales na superfície do cantilever, tornando esta mais homogênea. 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 foi realizada de forma eficiente, o que corrobora com os resultados observados na análise de PM-IRRAS apresentada anteriormente.

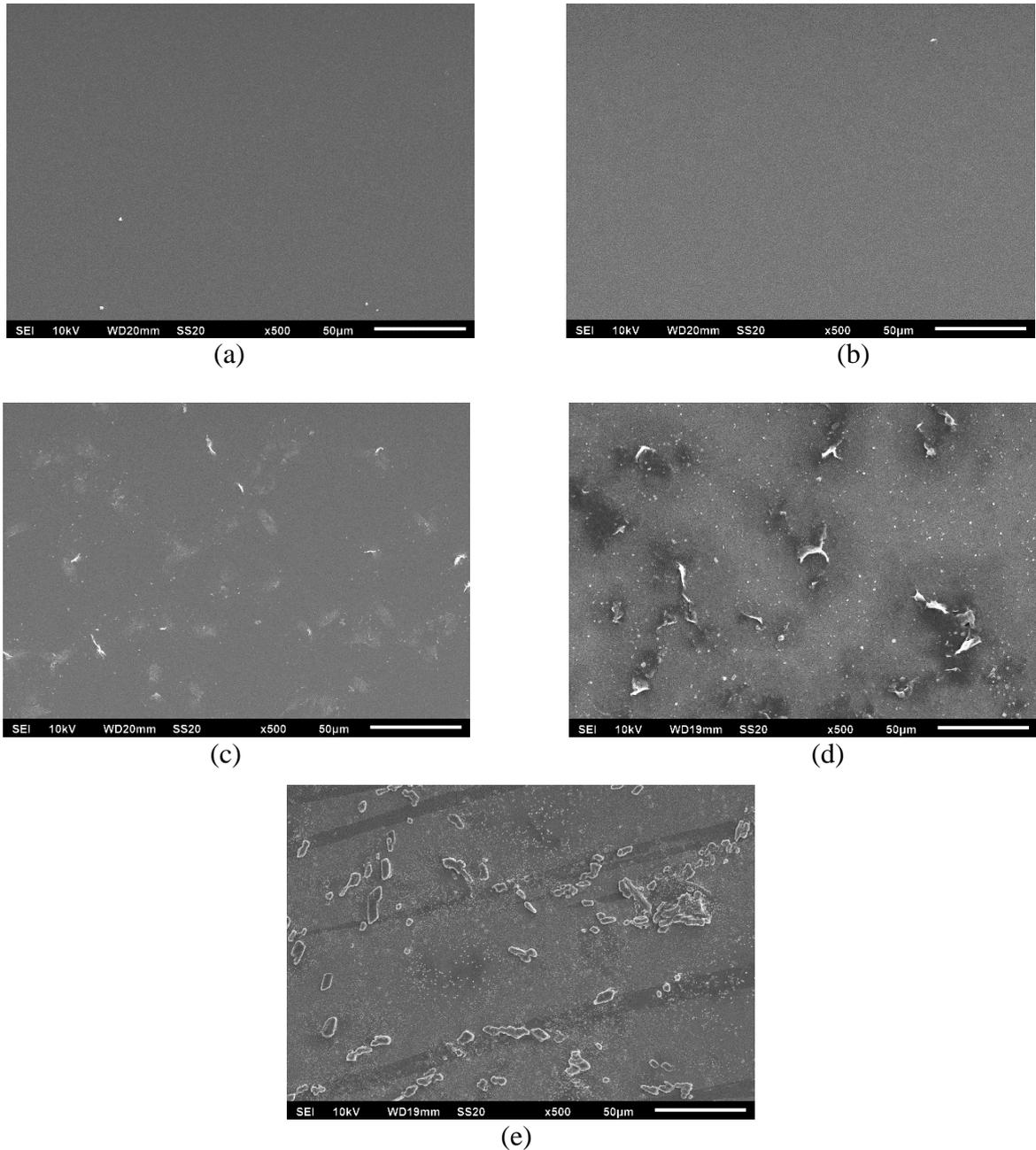
### 3.3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica de MEV permitiu avaliar a morfologia da superfície dos cantilevers submetidos às diferentes etapas de funcionalização. A Figura 21 apresenta a superfície dos cantilevers durante a funcionalização.

Observa-se através desta que houve alterações estruturais na morfologia da superfície do cantilever ao longo das etapas de funcionalização, sendo este um indicativo da imobilização dos elementos biológicos na superfície do mesmo.

A superfície de silício (Figura 21.a) assim como a superfície de ouro (Figura 21.b) apresentam uma área homogênea, sem a presença de aglomerados. Este comportamento já era esperado, pois não foram depositadas camadas nestas superfícies e o intuito era somente verificar como estava o cantilever antes de iniciar a funcionalização. A deposição de ácido 16-MHD (Figura 21.c) possibilitou a formação de pequenos aglomerados, como se fossem pequenas partículas, diferentemente da deposição de EDC/NHS (Figura 21.d) que apresentou a formação de partículas dispersas com uma pronunciada irregularidade.

Figura 21 - Caracterização de superfície por análise de MEV em cada etapa de funcionalização (a) Silício; (b) Silício + Ouro; (c) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD; (d) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS; (e) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS + Anticorpo.



A deposição do anticorpo na superfície do cantilever (Figura 21.e) formou um aglomerado de partículas mais homogêneas, com o aparecimento de pequenas placas menos irregulares. Este formato de superfície é diferente de todas as etapas da funcionalização do cantilever, demonstrando desta forma, que os anticorpos estavam aderidos na superfície do mesmo, sendo este um indicativo da eficiência da funcionalização dos nanoimunossensores. Além disso, percebe-se que nesta etapa de deposição do anticorpo, a rugosidade diminuiu

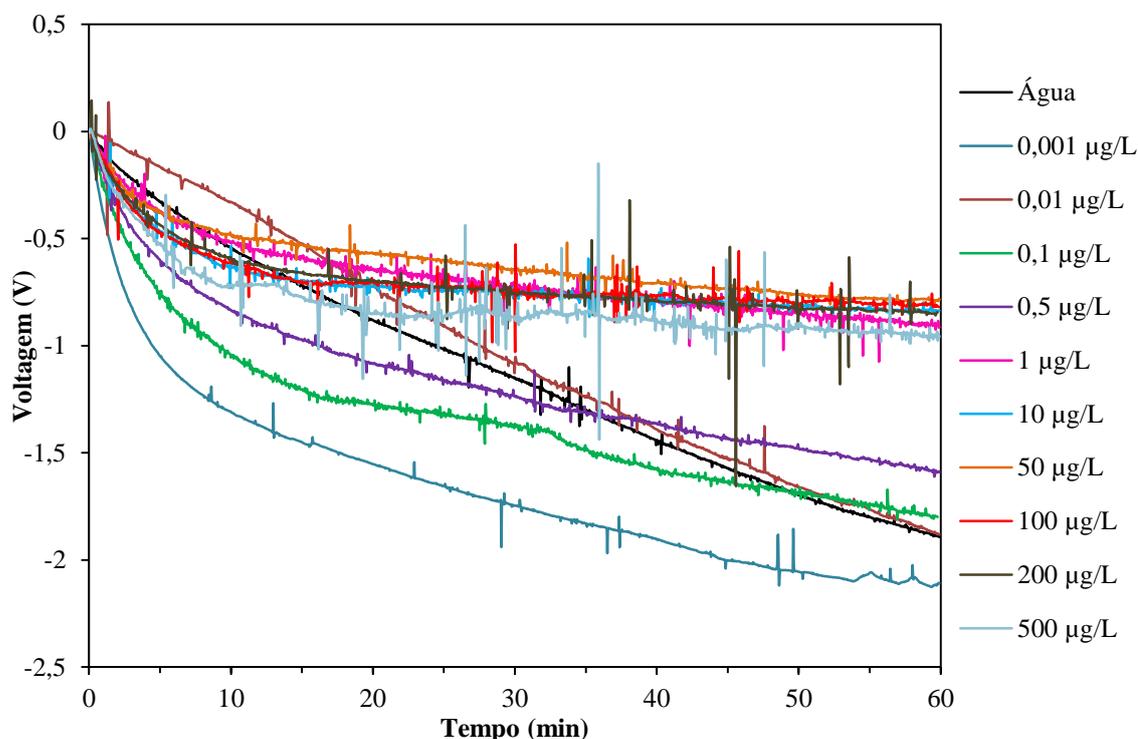
(Tabela 4), comparado a etapa anterior de deposição dos agentes de reticulação (EDC/NHS), confirmando mais uma vez a deposição do anticorpo à superfície do cantilever.

### 3.3.3 Avaliação das respostas na detecção dos hormônios

Para avaliar a resposta dos dispositivos na detecção dos hormônios em meio líquido, foi realizado um teste preliminar com o nanoimunossensor funcionalizado com 17  $\beta$ -estradiol, que posteriormente serviu de base para os outros biossensores desenvolvidos neste estudo.

Inicialmente, foi preparada uma “solução mãe” na concentração de 10 mg/L, para a solução de 17  $\beta$ -estradiol, e a partir desta, mediante sucessivas diluições quando necessário, as soluções de trabalho de 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 10; 50; 100; 200 e 500  $\mu$ g/L, utilizando-se água ultrapura. A faixa de estudo definida para esta primeira etapa tinha o objetivo de verificar o comportamento do nanoimunossensor quando em contato com as diferentes concentrações de hormônio, conforme ilustrado na Figura 22. Todas as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e sob refrigeração.

Figura 22 - Resposta de detecção do cantilever funcionalizado com anti-17  $\beta$ -estradiol em função do tempo com diferentes concentrações de 17  $\beta$ -estradiol.



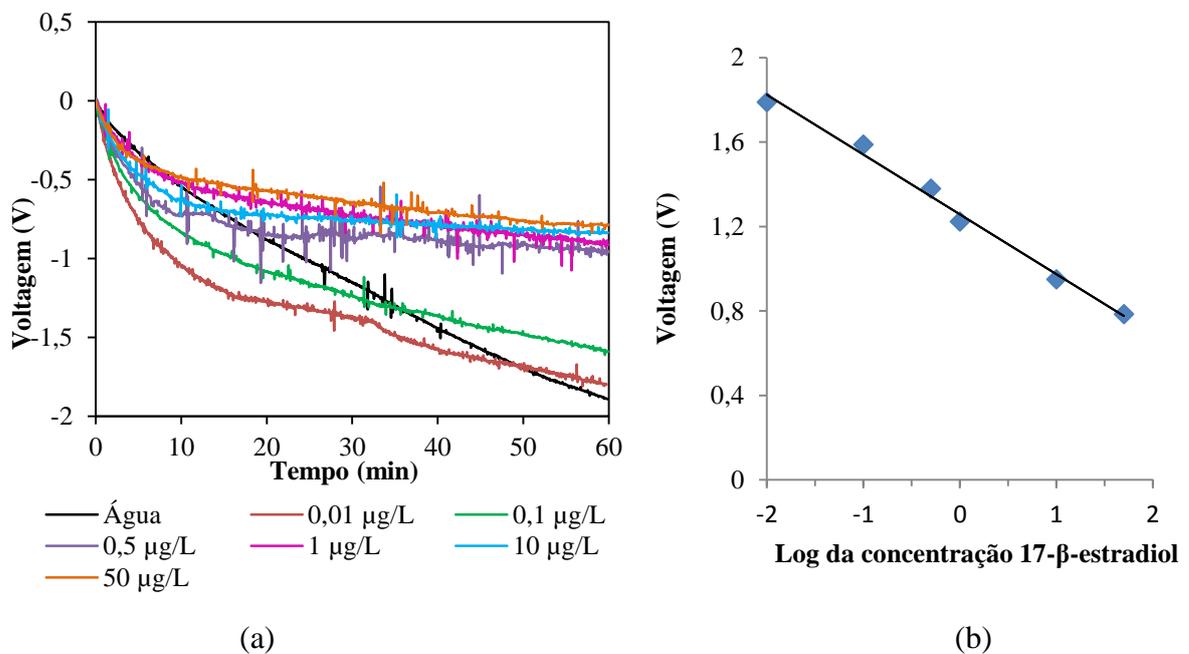
Fonte: O autor.

Foi observado que para a concentração de 0,001 µg/L a leitura do nanoimunossensor funcionalizado com anti-17 β-estradiol ficou abaixo da água ultrapura, indicando que o mesmo não consegue detectar esta concentração. Nas concentrações acima de 50 µg/L, a resposta do nanoimunossensor não apresentou resposta distinguível entre as concentrações analisadas, pois provavelmente o dispositivo tenha saturado neste meio. Dessa forma, a faixa de concentração utilizada para caracterizar a resposta dos nanoimunossensores foi de 0,01; 0,1; 0,5; 1; 10 e 50 µg/L, tanto para o hormônio 17 β-estradiol quanto para o hormônio estrona.

### 3.3.3.1 Nanoimunossensores funcionalizados com anti-17 β-estradiol e anti-estrona

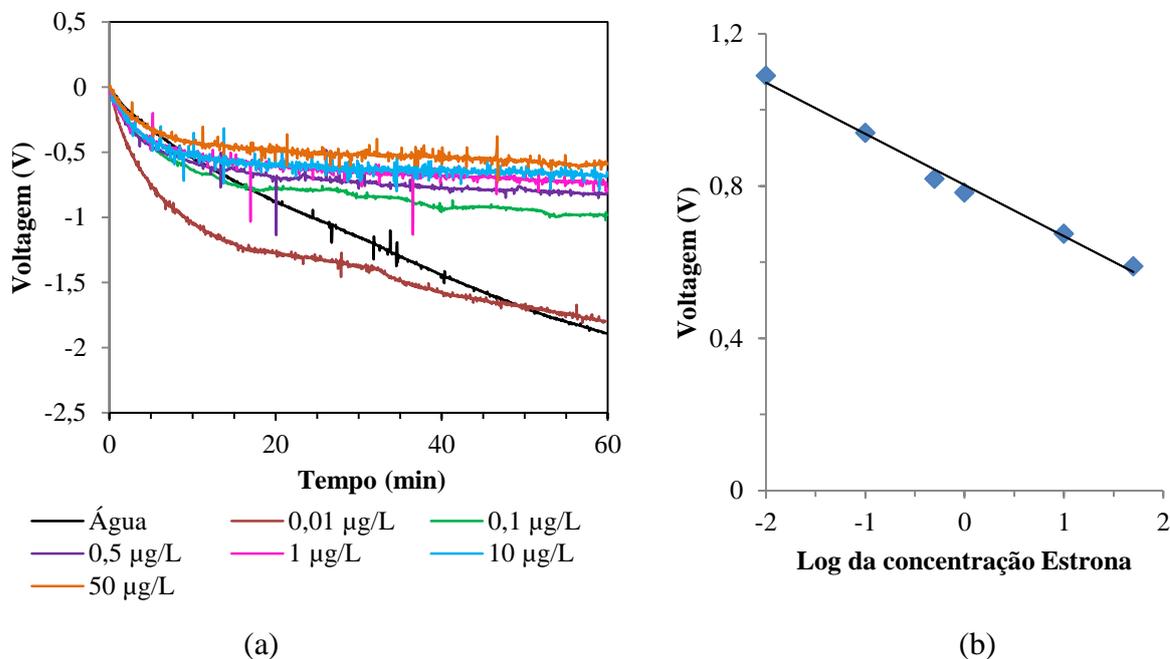
As Figuras 23 e 24 apresentam os resultados obtidos com os nanoimunossensores de cantilever funcionalizados com os anticorpos (anti-17 β-estradiol e anti-estrona) na presença dos respectivos hormônios (17 β-estradiol e estrona) e água ultrapura em função do tempo. As medidas de voltagem foram realizadas durante 60 min.

Figura 23 - (a) Resposta de detecção do nanoimunossensor funcionalizado com anti-17 β-estradiol em função do tempo com diferentes concentrações 17 β-estradiol. (b) Curva de calibração das concentrações de 17 β-estradiol versus voltagem do cantilever – R<sup>2</sup>: 0,98.



Fonte: O autor.

Figura 24 - (a) Resposta de detecção do nanoimunossensor funcionalizado com anti-estrona em função do tempo com diferentes concentrações de hormônio estrona. (b) Curva de calibração das concentrações de estrona versus voltagem do cantilever –  $R^2$ : 0,98.



Fonte: O autor.

A resposta dos nanoimunossensores, observada pelo sinal de voltagem ao longo do tempo, foi decorrente das mudanças de tensão da superfície provocadas pela adsorção do analito (hormônios) na camada sensora (anticorpos), causando a deflexão do cantilever. Como o anticorpo estava imobilizado na superfície inferior do cantilever, a tendência foi ele dobrar-se em decorrência da ligação antígeno-anticorpo, resultado do aumento da repulsão intermolecular entre os complexos. A força da ligação antígeno-anticorpo é denominada pela afinidade do anticorpo, sendo resultado da somatória das forças de atração e repulsão intermoleculares (WANG et al., 2007).

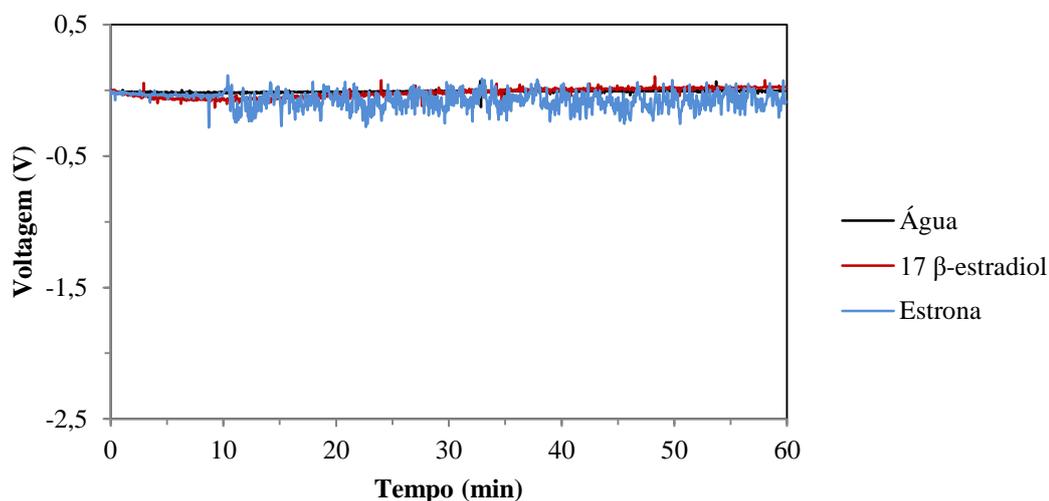
Segundo Karnati et al. (2007), na adsorção de analitos no lado da superfície recoberta com ouro ocorre uma curvatura para baixo, a qual é causada por uma tensão de compressão, resultante de uma repulsão ou expansão de moléculas. Para Xue et al. (2011) essa diferença de tensão de compressão com as diferentes concentrações de hormônios é decorrente da interação e da resposta de ligação dos anticorpos imobilizados no cantilever.

Os nanoimunossensores funcionalizados com anti 17  $\beta$ -estradiol e anti-estona apresentaram valores de voltagens (V) distintos quando em contato com diferentes as concentrações de hormônio estudada (0,01; 0,1; 0,5; 1, 10 e 50 µg/L) e estas concentrações

variaram linearmente com a concentração, apresentando uma tendência de comportamento semelhante.

Os dispositivos desenvolvidos apresentaram uma voltagem diferente entre as concentrações de hormônios e água ultrapura, meio em que o analito foi diluído, indicando que o mesmo consegue detectar a presença de hormônios no meio. Verifica-se também que os nanoimunossensores conseguem detectar satisfatoriamente a menor concentração estudada (0,01 µg/L). Na Figura 25 é apresentada a resposta de voltagem do cantilever de silício sem funcionalização (branco) exposto a 50 µg/L dos hormônios (17 β-estradiol e estrona).

Figura 25 - Resposta de voltagem do cantilever de silício sem funcionalização exposto a água e 50 µg/L de 17 β-estradiol e estrona.



Fonte: O autor.

Observa-se um comportamento linear ao longo do tempo, não havendo interação do cantilever com os analitos testados, ou seja, o sinal da voltagem ficou em zero. Este resultado já era esperado, pois os cantilevers de silício não possuem sítios de ligação sobre sua superfície, ou seja, não estão aptos para reconhecer o analito de interesse. Por esta razão é necessário que se faça a modificação química da superfície, tornando-os capacitados a serem sensores seletivos e sensíveis (LANG, HEGNER, GERBER, 2010).

### 3.3.3.2 Sensitividade e Limite de Detecção (LD)

A Tabela 5 apresenta os valores de limite de detecção, sensitividade e coeficiente de correlação ( $R^2$ ), obtidos por meio da curva de calibração dos hormônios (17 β-estradiol e

estrona) para os nanoimunossensores de cantilever funcionalizados com anti-17  $\beta$ -estradiol e anti-estrona.

Tabela 5 - Valores de limite de detecção (LD), Sensitividade e R<sup>2</sup> dos nanoimunossensores funcionalizados com anti-17  $\beta$ -estradiol e anti-estrona.

Hormônio	LD (ppb)	Sensitividade (V/ppb)	R <sup>2</sup>
17 $\beta$ -estradiol	0,013 $\pm$ 0,001	0,283 $\pm$ 0,002	0,98
Estrona	0,027 $\pm$ 0,003	0,134 $\pm$ 0,002	0,98

\* Dados apresentados como média (três repetições)  $\pm$  Desvio Padrão.

Fonte: O autor.

Observa-se que houve um ajuste satisfatório dos dados para a linha de regressão. O LD dos sensores é definido como a menor concentração do analito que pode ser distinguida com certo nível de confiança. Neste trabalho, foi usado o valor da linha base mais o múltiplo do desvio padrão. O valor do múltiplo utilizado foi 3, implicando em um nível de confiança de 99,6% (SKOOG, 2005).

Levando em consideração os limites máximos permitidos para compostos fenólicos (hormônios) em água potável, segundo a Resolução Conama 357/2005 e a Resolução Conama 430/2011, observa-se que os nanoimunossensores conseguem detectar a presença de hormônios de acordo com o limite definido pela legislação (3  $\mu$ g/L (3 ppb)), demonstrando a potencialidade desta técnica para a detecção de hormônios em águas (CONAMA, 2005).

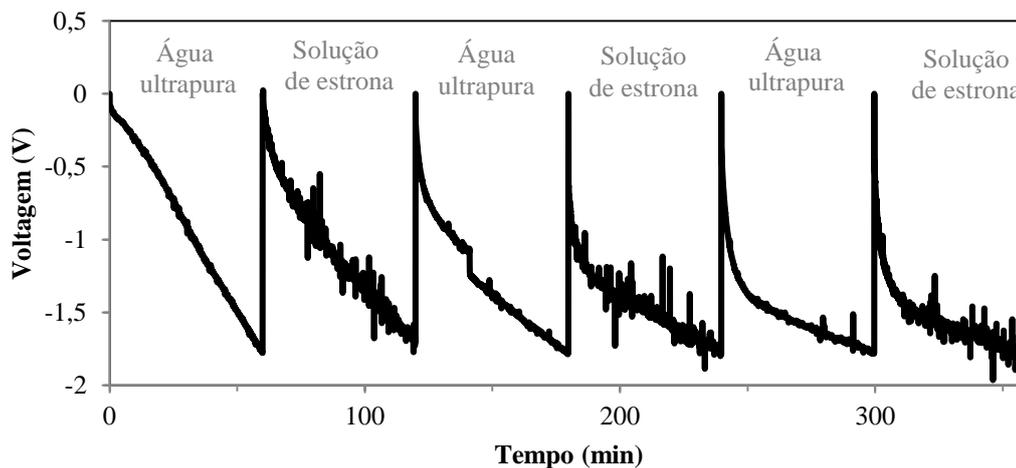
A sensibilidade dos dispositivos foi obtida por meio do coeficiente angular da curva da concentração *versus* voltagem. Observa-se que o nanoimunossensor funcionalizado com anti-17  $\beta$ -estradiol apresenta uma sensibilidade muito próxima ao nanoimunossensor funcionalizado com anti-estrona, levado em conta os valores apresentados em V/ppb. Neste sentido, a técnica empregada neste estudo para o desenvolvimento de nanoimunossensores, visando a detecção de hormônios em água, mostrou-se ser uma ferramenta promissora na área ambiental.

### 3.3.3.3 Reversibilidade

A Figura 26 apresenta os resultados experimentais para a reversibilidade do nanoimunossensor funcionalizado com anti-estrona. As concentrações de hormônio estrona estabelecidas para os experimentos de reversibilidade levaram em conta a maior concentração utilizada na curva de calibração do nanoimunossensor (50  $\mu$ g/L de hormônio estrona). Observa-se que quando submetido à concentração de 50  $\mu$ g/L de hormônio estrona ele foi 100% reversível, ou seja, retornou à posição de voltagem inicial durante os 6 ciclos realizados. Além

disso, verifica-se que o nanoimunossensor não apresenta perdas de sinal durante os sucessivos ciclos realizados, ou seja, pode ser utilizado por várias vezes consecutivas sem prejudicar o sinal do dispositivo.

Figura 26 - Reversibilidade do nanoimunossensor funcionalizado com anti-estrona.



Fonte: O autor.

#### 3.3.3.4 Estabilidade

Segundo Steffens (2012), a estabilidade de um sensor pode ser definida como o tempo que o sensor irá operar em diferentes condições sem alteração do sinal, mantendo as características (sensitividade e limite de detecção).

Desse modo, a estabilidade dos dispositivos, sob armazenamento a seco a 4°C, foi avaliada no 1º e no 30º dia de armazenamento (Tabela 6). O experimento foi realizado em triplicata, calculando limite de detecção e a sensitividade dos dispositivos no período avaliado.

Tabela 6 - Estabilidade do nanoimunossensor com anticorpo anti-estrona e anti-17  $\beta$ -estradiol, respectivamente.

Estocagem (dias)	Limite de detecção (ppb)		Sensitividade (V/ppb)	
	Estrona	17 $\beta$ -estradiol	Estrona	17 $\beta$ -estradiol
1	0,027 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	0,013 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,134 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,283 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>
30	0,009 $\pm$ 0,011 <sup>b</sup>	0,007 $\pm$ 0,010 <sup>b</sup>	0,348 $\pm$ 0,016 <sup>b</sup>	0,356 $\pm$ 0,074 <sup>b</sup>

\* Dados apresentados como média (três repetições)  $\pm$  Desvio Padrão. Letras iguais na coluna indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (t student) entre os diferentes dias avaliados.

Fonte: O autor.

Como observado na Tabela 6, os nanoimunossensores tiveram uma diminuição no valor do limite de detecção e um aumento na sensibilidade, apresentando diferença significativa entre os dias de estocagem ( $p < 0,05$ ). Esta tendência pode ser atribuída ao fato dos valores de limite de detecção e sensibilidade estarem inversamente correlacionados e, também à desorganização e/ou deterioração transitória dos anticorpos durante o armazenamento dos dispositivos (LIU; WONG, 2009).

Após a imobilização na superfície do cantilever, é necessário que os anticorpos mantenham sua atividade biológica. Apesar de haver perda da sensibilidade ao longo do armazenamento, os valores de limite de detecção e sensibilidade, depois dos 30 dias de armazenamento, ainda caracterizam os nanoimunossensores com boa resposta em ppb.

### 3.4 CONCLUSÃO

O desempenho dos nanoimunossensores propostos neste trabalho, baseados na imobilização dos anticorpos (anti-17  $\beta$ -estradiol e anti-estrona) sobre cantilevers de ouro modificados com monocamadas automontadas (SAM), mostrou-se promissor para a detecção de 17  $\beta$ -estradiol e estrona em meio líquido.

As análises de MEV e de PM-IRRAS, bem como as imagens topográficas obtidas através do AFM permitiram acompanhar as mudanças conformacionais da superfície ao longo das etapas de funcionalização, mostrando que os anticorpos ficaram imobilizados sobre os cantilevers em função da mudança de rugosidade e estrutura química, ao longo das etapas de montagem dos nanoimunossensores.

Os dispositivos apresentaram um limite de detecção de 0,013 ppb para o hormônio 17  $\beta$ -estradiol e 0,027 ppb para o hormônio estrona e sensibilidade de 0,283 V/ppb para 17  $\beta$ -estradiol e 0,134 V/ppb para estrona. Os experimentos realizados permitiram observar que os

nanoimunossensores desenvolvidos com anti-17  $\beta$ -estradiol e anti-estrona tiveram um comportamento semelhante, onde quanto maior a concentração de hormônio na faixa estudada, maior a voltagem do cantilever.

Desta forma, este trabalho demonstra o potencial destes dispositivos desenvolvidos para a detecção de hormônios em águas, alcançando baixos limites de detecção e sensibilidade, mesmo após um período de 30 dias de armazenamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003**. Brasil, 2003.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30 (3), p. 651 - 666, 2007.
- BLAUDEZ, D., J.-M. TURLET, J. DUFOURCQ, D. BARD, T. BUFFETEAU, B. DESBAT. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. **Journal of the Chemical Society**, v. 92, p.525–530, 1996.
- BRAZACA, LAÍS C., JANEGITZ, BRUNO C., CANCINO-BERNARDI, J., ZUCOLOTTI, V. Transmembrane Protein-Based Electrochemical Biosensor for Adiponectin Hormone Quantification. **Chemelectrochem**, v. 3, p. 1006-1011, 2016.
- BUDGETSENSORS. **AFM probe Model: ContGD-G**. Disponível em: <[http://www.budgetsensors.com/downloads/ContGD-G\\_Datasheet.pdf](http://www.budgetsensors.com/downloads/ContGD-G_Datasheet.pdf)>. Acesso em janeiro 2017.
- BUENO, C. C.; DEDA, D. K.; SOUZA, B. B.; DA SILVA, A. C. N.; RIBEIRO, G. A.; AMARANTE, A.; FRANCA, E. F.; LEITE, F. L. The use of functionalized AFM tips as molecular sensors in the detection of pesticides. **Materials Research (São Carlos. Impresso)**, v. 16, p. 683-687, 2013.
- CARRASCOSA. L.G.; MORENO, M.; ÁLVAREZ, M.; LECHUGA, L. M. Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n 3, p. 196-206, 2006.
- CONAMA, Resolução n° 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. **Publicada no DOU n° 053**, p. 58-63, 18/03/2005.
- ESPERANZA, M.; SUIDAN, M. T.; MARFIL-VEJA, R.; GONZALEZ, C.; SORIAL, G. A.; MCCAULEY, P.; BRENNER, R. Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: Conventional treatment. **Chemosphere**, v. 66, p. 1535–1544, 2007.

- FERREIRA, A. P. Ocorrência e detecção de desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: complicações ao meio ambiente. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93 (2), p. 255 - 264, 2012.
- 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.
- GALLI, A. Quantificação de Açúcares em Alimentos: uma proposta com biossensores. **01. Ed. Dusseldorf: novas edições acadêmicas**, v. 01. 124p., 2016.
- 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.
- JANATA, J. **Principles of Chemical Sensors**. Boston, MA: Springer US, 2009.
- KARNATI, C.; DU, H.; JI, H. F.; XU, X.; LVOV, Y.; MULCHANDANI, P.; CHEN, W. Organophosphorus hydrolase multilayer modified microcantilevers for organophosphorus detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2636-2642, 2007.
- LANG, H. P.; HEGNER, M.; GERBER, C. Nanomechanical Cantilever Array Sensors. Springer Handbook of Nanotechnology. **Bhushan, Bharat** (Ed) 3<sup>rd</sup> ed.; Part B, p. 427 - 452, 2010.
- LEITE, F. L.; PATERNO, L. G.; BORATO, C. E.; HERMANN, P. S. P.; OLIVERIA Jr, O. N.; MATTOSO, L. H. C. Study on the adsorption of poly(o-ethoxyaniline) nanostructured films using atomic force microscopy. **Polymer**, v. 46, n. 26, p. 12503-12510, 2005.
- LIU, X., WANG, X., ZHANG, J., FENG, H., LIU, X., WONG, D. K. Y. Detection of estradiol at an electrochemical immunosensor with a CuUPD|DTBP–Protein G scaffold. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, p. 56– 62, 2012.
- LIU, W.; WONG, D. K. Y. Picogram-detection of estradiol at an electrochemical immunosensor with a gold nanoparticle|Protein G-(LC-SPDP)-scaffold. **Talanta**, v. 77 p. 1437–1443, 2009.
- MARTINAZZO, J. Desenvolvimento de nanobiossensor de cantilever para detecção de atrazina em água. **Dissertação de mestrado**. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim/RS, 2017.
- MARTINAZZO, J.; MUENCHEN, D. K.; BREZOLIN, A. N.; CEZARO, A. M.; RIGO, A.; MANZOLI, A.; HOEHNE, L.; LEITE, F. L.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C. Cantilever nanobiosensor using tyrosinase to detect atrazine in liquid medium. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, p. 1-8, 2018.
- MUENCHEN, D. K. Desenvolvimento de biossensor nanoestruturado de cantilever utilizando peroxidase de fonte vegetal para detecção de glifosato em água. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim/RS, 2017.

- OLIVEIRA, R. M.; FERREIRA, J.; SANTOS, M. J. L.; FARIA, R. M.; OLIVEIRA JR, O. N. Probing the Functionalization of Gold Surfaces and Protein Adsorption by PM-IRRAS. **ChemPhysChem**, v. 12, p. 1736 – 1740, 2011.
- PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. DA S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.
- PEPINO, R. O. Desenvolvimento de géis e esponjas de quitosana e blendas quitosana/gelatina em ácido adípico. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- PESSOA, G. P.; SANTOS, A. B.; SOUZA, N. C.; ALVES, J. A. C. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. **Química Nova**, v. 35 (5), p. 968 – 973, 2012.
- RACZ, L. A. R.; GOEL, K. Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. **Journal of Environmental Monitoring**, n. 12, p. 58-70, 2010.
- SHIN, H-S.; SHIN, S. K.; OH, J-A. Sensitive Determination of Natural and Synthetic Steroidal Hormones of a Free and Conjugated Form in Surface Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 32, n. 3, p. 809- 814, 2011.
- SKOOG, D. A. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2005.
- STEFFENS, C. Desenvolvimento de microcantilever funcionalizado com polímero condutor para a detecção de compostos orgânicos voláteis e umidade relativa. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP, 2012.
- STEFFENS, C.; MANZOLI, A.; FRANCHESCHI, E.; CORAZZA, M. L.; CORAZZA, F. C.; OLIVEIRA, J. V.; HERRMANN, P. S. P. Low-cost sensors developed on paper by line patterning with graphite and polyaniline coating with supercritical CO<sub>2</sub>. **Synthetic Metals**, v. 159, n. 21-22, p. 2329–2332, 2009.
- TAMAYO, J. KOSAKA, P. M.; RUZ, J. J., SAN PAULO, A.; CALLEJA, M. Biosensors Based on Nanomechanical Systems. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 3, p. 1287-1311, 2013.
- TIAN, J.; BAI, Y.; TANG, X.; SANG, S.; WANG, S. A capacitive surface stress biosensor for CSFV detection. **Micro/Nano Devices and Systems**, v. 159, p. 55-59, 2016.
- VELANKI, S.; JI, H-F. Detection of feline coronavirus using microcantilever sensors. **Measurement Science and Technology**, v. 17, p. 2964-2968, 2006.
- WANG, C.; WANG, D.; MAO, Y.; HU, X. Ultrasensitive biochemical sensors based on microcantilevers of atomic force microscope. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 1, p. 1-11, 2007.
- XIA, N.; XING, Y.; WANG, G. 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.

XUE, C.; ZHAO, H.; LIU, H.; CHEN, Y.; WANG, B.; ZHANG, Q.; WU, X. Development of sulfhydrylated antibody functionalized microcantilever immunosensor for taxol. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v., B 156, p. 863– 866, 2011.

YING, G. G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v. 28, n. 6, p. 545-551, 2002.

YU-CHENG, L.; YU-CHIA, T.; WOO-DU, T.; TSUI-SHAN, H.; KO-SHAO, C.; SU-CHUAN, L. 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.

## **CAPÍTULO 4**

# **NANOBIOSENSORES DE CANTILEVERS FUNCIONALIZADOS COM ENZIMA TIROSINASE PARA DETECÇÃO DE HORMÔNIOS EM ÁGUA**

## 4.1 INTRODUÇÃO

Os biossensores são pequenos dispositivos que utilizam reações biológicas para detecção de analitos-alvo (OLIVEIRA et al., 2013). Tais dispositivos combinam um componente biológico, que interage com um substrato alvo, e um transdutor físico, que converte os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis (PATHAK et al, 2007; WANG, 2000;). Seu uso traz uma série de vantagens, pois são altamente sensíveis e seletivos, relativamente fáceis em termos de desenvolvimento, além de acessíveis e prontos para uso.

A atividade específica da enzima, sobre um determinado composto (substrato) ou uma determinada classe de compostos, em geral, é responsável pelos inúmeros biossensores enzimáticos, propostos na literatura para a determinação de uma grande diversidade de compostos em matrizes diversas. A enzima tirosinase é largamente explorada na preparação de biossensores eletroquímicos, visando a utilização destes na determinação de compostos fenólicos (classe onde os hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona estão inseridos), em amostras biológicas, alimentos e amostras ambientais (FERREIRA, 2005).

Os sensores e biossensores baseados em cantilevers, empregados na Microscopia de Força Atômica (AFM), vêm apresentando resultados promissores na detecção de substâncias na micro e nanoescala (GALLI, 2016; MARTINAZZO et al., 2018). Quando o uso de cantilevers quimicamente modificados é combinado com métodos de detecção específicos, obtém-se um sensor que pode detectar concentrações muito baixas de uma gama de substâncias variadas (BUENO et al., 2013).

Uma das etapas mais críticas que envolve a construção de biossensores é a imobilização dos compostos biológicos sobre a superfície dos cantilevers. Dentre as técnicas mais vantajosas está a técnica de camadas automontadas (SAM). A formação de SAM permite interações entre moléculas e superfícies, modificando suas propriedades físicas e químicas e tem se tornado um procedimento de imobilização bastante empregado para fixar o material biológico, devido a sua simplicidade, versatilidade e possibilidade de produzir estruturas altamente ordenadas (MENDES, 2006; SANG et al., 2013).

Pensando nisso, pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de identificar micro poluentes em águas, especialmente os hormônios, e verificar sua ocorrência, destino e os efeitos provocados em animais e homens, uma vez que são encontrados em estações de tratamento de esgoto e em águas superficiais, subterrâneas e potáveis.

Sendo assim, devido à grande importância que a detecção de hormônios em ambientes aquáticos apresenta para a saúde e bem-estar de animais e seres humanos, este trabalho visa o desenvolvimento de nanobiossensores de cantilever funcionalizados com a enzima tirosinase para a detecção dos hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona para serem utilizados em meio líquido. Esta metodologia proposta permite a obtenção de dispositivos miniaturizados, utilizando elementos biológicos com baixo limite de detecção.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Material**

Os reagentes utilizados nos experimentos foram: Ácido Nítrico (65%) (Química Moderna - Brasil), Fosfato de potássio monobásico anidro (98%) (Nuclear - Brasil), Fosfato de potássio dibásico (98%) (Vetec - Brasil), Glicina (98,5%) (Dinâmica - Brasil), Tris-Hidroximetilaminometano (99%) (Sigma Aldrich - Brasil), Álcool absoluto (99,5%) (Quimex - Brasil), Álcool isopropílico (99,5%) (Vetec - Brasil), Ácido 16-mercaptohexadecanóico (AMHD) (90%) (Sigma Aldrich - Brasil), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (98%) (Sigma Aldrich - Brasil), N-hidroxisuccinimida (NHS) (98%) (Sigma Aldrich - Brasil), Tirosinase de cogumelo (2687 U/mg) (Sigma Aldrich - Brasil), 17  $\beta$ -estradiol 6-(O-carboxi-metil) oxima:BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma Aldrich - Brasil), Estrona (99%) (Sigma Aldrich - Brasil), Cafeína anidra P.A. (Synth), Tiamina U.S.P. (Synth) e Ácido Ascórbico-L (Synth).

### **4.2.2 Métodos**

A metodologia proposta para o desenvolvimento dos nanobiossensores foi a mesma utilizada para o desenvolvimento dos nanoimunossensores, descrita no Capítulo 3 (item 3.3.2). A funcionalização dos cantilevers seguiu as mesmas etapas, diferindo somente na etapa 4, pois para a construção dos nanobiossensores foi utilizada a enzima comercial tirosinase (2687 U/mg) (Sigma Aldrich -Brasil).

Desta forma, na etapa 4 da funcionalização dos dispositivos, a enzima tirosinase foi diluída em uma solução tampão fosfato de potássio 50mM, pH 6,5 na concentração de 2 mg/mL, de acordo com o trabalho de Martinazzo et al. (2018). A imobilização foi realizada por meio da

imersão do cantilever na solução enzimática durante 10 min. Por fim, foi realizada a lavagem do cantilever com a solução tampão fosfato de potássio 50mM, pH 6,5 (2min) e secagem em temperatura ambiente por 15 min.

Os dispositivos foram armazenados sob refrigeração (4°C), a seco, dentro de placas de Petri, quando não estavam sendo utilizado no AFM e, antes da sua utilização, os mesmos ficavam em temperatura de 25°C por 30 min, para estabilização térmica com o ambiente.

#### 4.2.2.1 Caracterização da superfície dos dispositivos

As análises de caracterização da superfície dos dispositivos foram realizadas em cada etapa da funcionalização do cantilever. Estas metodologias estão descritas no Capítulo 3 (item 3.2.2.1). Foram realizadas análises de Espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS), Microscopia de Força Atômica (AFM) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

#### 4.2.2.2 Resposta dos nanobiossensores de cantilever aos hormônios

A resposta dos dispositivos, obtida por meio da funcionalização dos cantilevers com a enzima tirosinase foi avaliada no modo estático, em meio líquido, por meio da realização de uma imagem no AFM (Nanosurf - C3000 Controller, Suíça) em modo contato, de acordo com a metodologia proposta no Capítulo 3 (item 3.2.2.3 e item 3.2.2.4).

Para a detecção dos hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona em água, levou-se em consideração a Resolução Conama 357/2005, complementada e alterada pela Resolução Conama 430/2011. Ambas estabelecem as condições e padrões de qualidade da água em relação à diversas substâncias, dentre elas a quantidade de fenóis totais (3  $\mu\text{g/L}$ ), que foi levada em conta para a realização deste estudo (CONAMA, 2005).

Nesta etapa, fixou-se uma curva de calibração com seis diferentes concentrações de hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona (0,001; 0,01; 1; 10; 50 e 100  $\mu\text{g/L}$ ), com o intuito de avaliar o comportamento dos nanobiossensores quando em contato com eles. Durante estas análises, as soluções eram colocadas em ordem crescente de concentração, ou seja, da menor para a maior concentração de hormônio.

Para avaliar a resposta de interação dos nanobiossensores com os hormônios, foi realizado um teste “branco”, com um cantilever apenas de silício (CONTR (Nano World)), com

constante de mola 0,2 N/m e frequência de ressonância de 13 kHz, sem funcionalizar, na presença de soluções de 50 µg/L de 17 β-estradiol e 50 µg/L de estrona, a fim de comprovar a eficiência da funcionalização, pois o cantilever quando não funcionalizado emite um sinal diferenciado.

Os nanobiossensores também foram caracterizados quanto a sensibilidade, limite de detecção (LD), reversibilidade (utilizando a maior concentração de hormônio) e estabilidade. Todas as análises foram feitas em triplicata, conforme a metodologia descrita no Capítulo 3 (item 3.2.2.5.1 ao item 3.2.2.5.4).

Os resultados de sensibilidade e limite de detecção foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de t student, a nível de 95% de confiança, utilizando o software Statistica 5.0.

#### 4.2.2.3 Análise de interferentes

Para análise de interferentes foram selecionadas três diferentes substâncias comerciais (cafeína, tiamina e ácido ascórbico) comumente encontradas no ambiente aquático. Os interferentes foram diluídos em água ultrapura na concentração de 1% com intuito de verificar como a presença de outros componentes poderia afetar a resposta do nanobiossensor funcionalizado com a enzima tirosinase. As respostas obtidas foram comparadas com a solução de 10 µg/L do hormônio estrona.

A cafeína, o ácido ascórbico e a tiamina são substâncias facilmente encontrada no ambiente, incluindo o ambiente aquático. Cabe salientar que a cafeína é uma substância muito utilizada como indicativo de contaminação ambiental por esgoto doméstico. Ela não é eliminada no tratamento convencional da água e por isso foi uma das utilizadas na análise de interferentes.

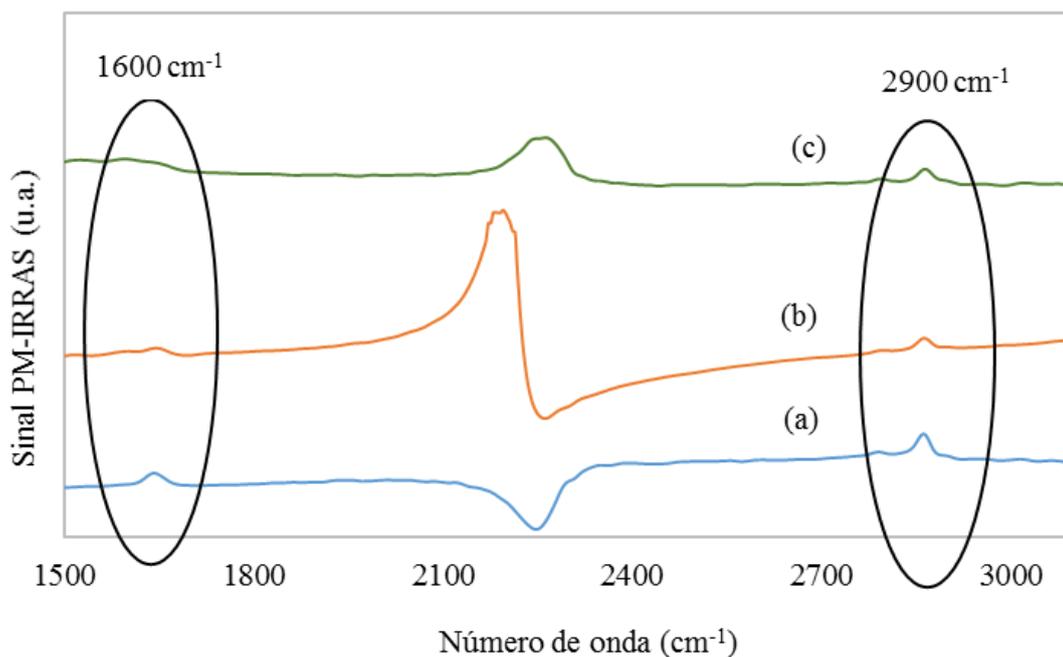
### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Caracterização da superfície dos nanobiossensores

A análise de PM-IRRAS foi utilizada para monitorar a funcionalização da superfície a fim de identificar os grupos funcionais responsáveis por as propriedades modificadas das

superfícies de ouro, além de verificar a organização da camada adsorvida. Os espectros de PM-IRRAS das etapas de funcionalização do cantilever são apresentados na Figura 27.

Figura 27 - 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 + Tirosinase.



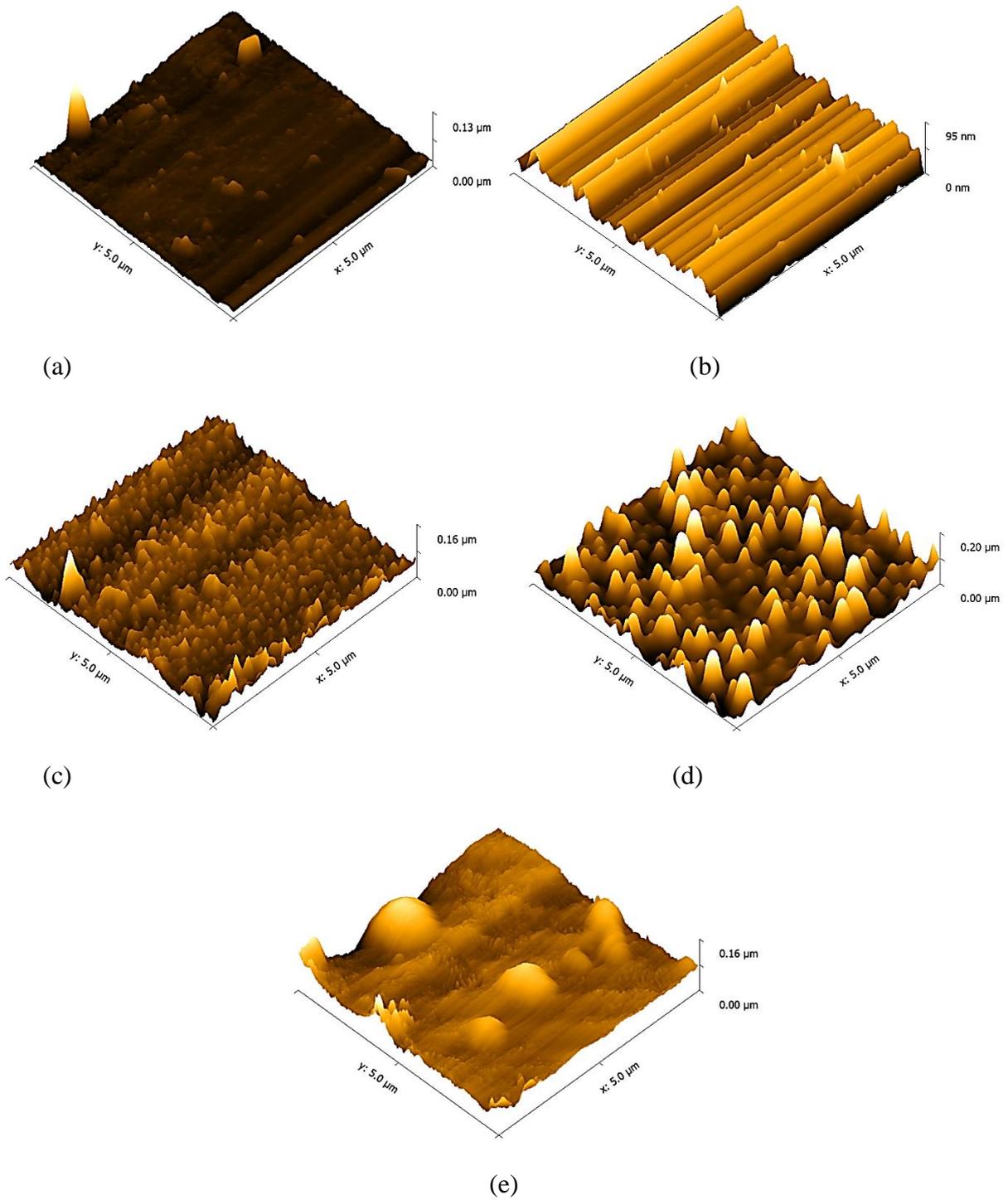
Fonte: O autor.

Observando a Figura 27, percebe-se que em ambas as bandas ( $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $2900\text{ cm}^{-1}$ ) conforme foram adicionadas as camadas das etapas de funcionalização do cantilever, houve interação entre os compostos, diminuindo assim a intensidade da banda e confirmando a eficiência da imobilização da enzima tirosinase na superfície do cantilever.

Os resultados encontrados estão de acordo com alguns trabalhos relatados na literatura para espectros de PM-IRRAS em superfícies de cantilever, como Martinazzo et al. (2018) e Muenchen (2017). Ambos utilizaram a técnica SAM para imobilizar sobre a superfície de cantilevers as enzimas tirosinase e peroxidase, respectivamente.

A técnica de Microscopia de Força Atômica avalia como a deposição de camadas na etapa de funcionalização altera a rugosidade da superfície, apresentada na Figura 28.

Figura 28 - Caracterização de superfície por análise topográfica obtida por meio de AFM em cada etapa de funcionalização (a) Silício; (b) Silício + Ouro; (c) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD; (d) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS; (e) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS + Tirosinase.



Fonte: O autor.

Observa-se na Figura 28 que existem diferenças na topografia durante as etapas de funcionalização da superfície do dispositivo. A superfície de silício (Fig. 28.a) apresenta uma área mais homogênea, com o aparecimento de camadas mais dispersas, enquanto que a camada com ouro (Fig. 28.b) exibe uma superfície mais lisa.

Na superfície funcionalizada com ácido 16-MHD (Fig. 28.c) e EDC/NHS (Fig. 28.d) é possível verificar agrupamentos em formato de irregularidades, sendo mais abundante na camada funcionalizada com EDC/NHS. Com a adição da enzima tirosinase, observa-se que a morfologia mais homogênea, com menos agrupamentos e com contornos maiores e mais definidos (Fig. 28.e).

Na Tabela 7 encontram-se os valores do desvio médio quadrático da rugosidade (Rms) obtido por meio de AFM para cada etapa de funcionalização.

Tabela 7 - Valores de desvio médio quadrático de rugosidade (Rms) obtido por meio de AFM para cada etapa de funcionalização dos nanobiossensores.

<b>Etapa</b>	<b>Rms (nm)</b>
Silício	3,87 ± 0,21
Silício + Ouro	2,06 ± 0,12
Silício + Ouro + Ácido 16-MHD	6,07 ± 0,12
Silício + Ouro + AMHD + EDC/NHS	27,2 ± 0,75
Silício + Ouro + AMHD + EDC/NHS + Tirosinase	11,6 ± 0,75

Rms: desvio médio quadrático da altura.

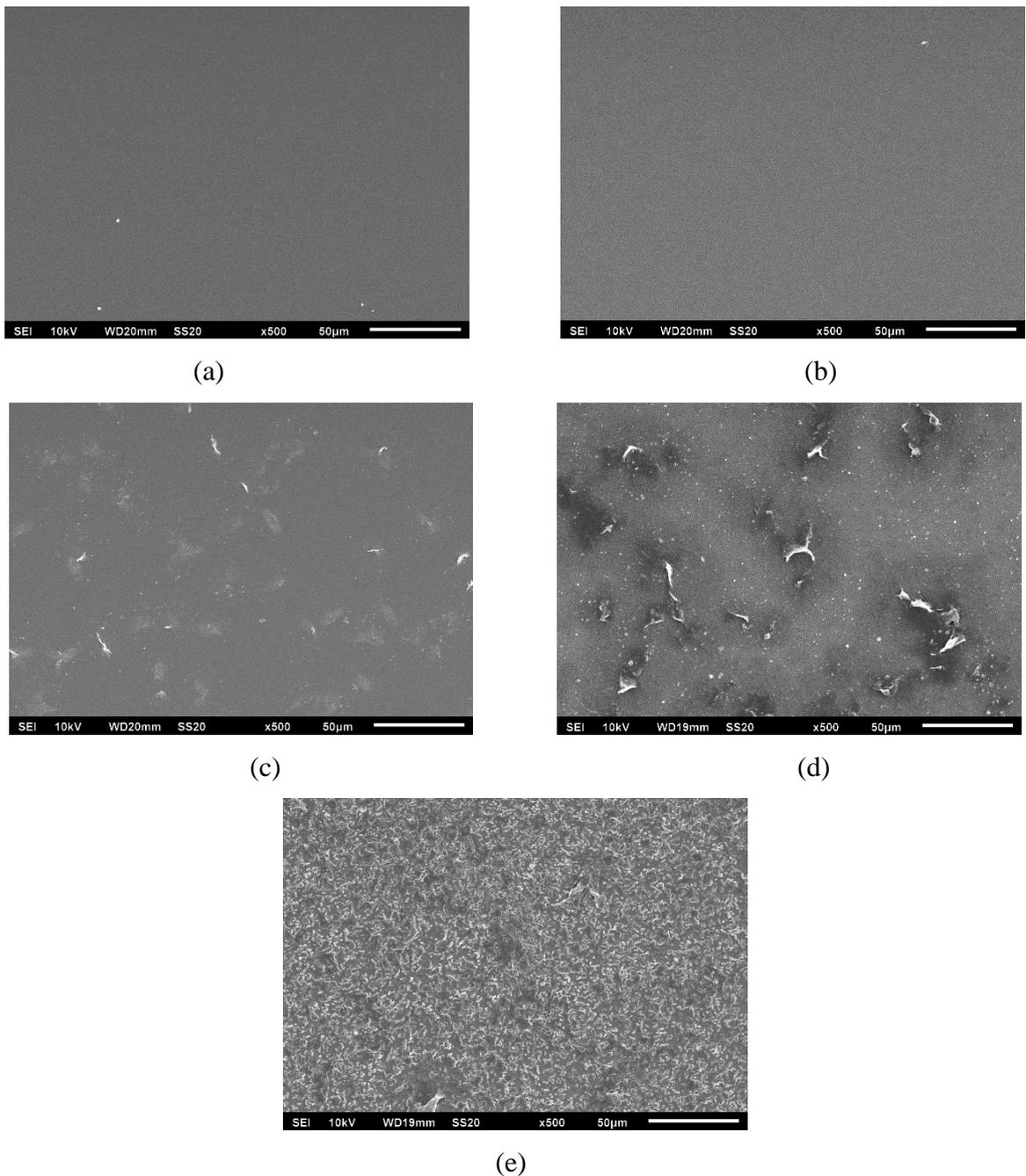
Fonte: O autor.

A rugosidade da superfície de silício apresentou um valor médio de 3,87nm. A deposição da camada de ouro acarretou em uma diminuição da rugosidade da superfície, e de acordo com Martinazzo (2018), esta diminuição é atribuída à função da formação de uma superfície mais lisa. O ácido 16-MHD é uma molécula de cadeia longa, e a sua deposição na camada de ouro levou ao aumento da rugosidade da superfície. Este aumento de rugosidade também foi observado quando se adicionou a mistura dos agentes de reticulação EDC/NHS. Este aumento da rugosidade é devido a acomodação das moléculas, em função da inserção de novos grupos funcionais que ficam expostos na superfície (MUENCHEN, 2017).

Por fim, a deposição de enzima ocasionou em uma redução da rugosidade da superfície, atribuída ao preenchimento dos espaços vazios que formaram uma camada mais homogênea. 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 foi realizada de forma eficiente.

A análise de Microscopia de Força Atômica (MEV) permitiu avaliar a morfologia da superfície dos cantilevers submetidos às diferentes etapas de funcionalização. A Figura 29 apresenta a superfície dos cantilevers durante a funcionalização.

Figura 29 - Caracterização de superfície por análise de MEV em cada etapa de funcionalização (a) Silício; (b) Silício + Ouro; (c) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD; (d) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS; (e) Silício + Ouro + Ácido 16-MHD + EDC/NHS + Tirosinase.



Nas microscopias verifica-se que houve alterações estruturais na morfologia da superfície do cantilever ao longo das etapas de funcionalização, sendo este um indicativo da

imobilização dos elementos biológicos na superfície do mesmo. A superfície de silício (Fig. 29.a) assim como a superfície de ouro (Fig.29.b) apresentam uma área homogênea, sem o aparecimento de aglomerados. Este comportamento já era esperado, pois não foram depositadas camadas nestas superfícies e o intuito era somente verificar como estava o cantilever antes de iniciar a funcionalização.

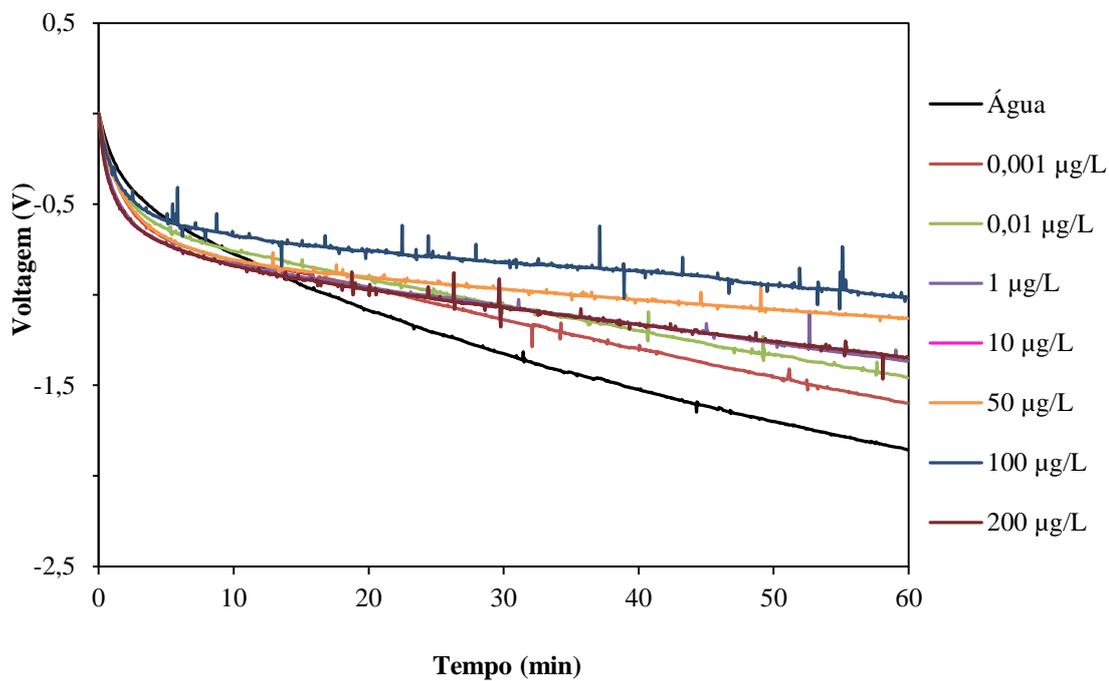
A deposição de ácido 16-MHD (Fig. 29.c) possibilitou a formação de pequenos aglomerados, como se fossem partículas com formas indefinidas, diferentemente da deposição de EDC/NHS (Fig. 29.d) que apresentou a formação de partículas diferentes, mais dispersas e irregulares. A deposição da enzima tirosinase (Fig. 29.e) deixou a superfície mais uniformemente distribuída, mostrando que a enzima tirosinase foi imobilizada com sucesso sobre a superfície do cantilever.

Estes resultados estão de acordo com as imagens de AFM, mostradas na figura anterior. Percebe-se que cada etapa da funcionalização teve uma superfície diferenciada e, na última etapa que corresponde a deposição da enzima (Figura 28.e), a superfície ficou mais homogênea, sem a presença de tantos agrupamentos.

#### **4.3.2 Resposta dos nanobiossensores de cantilever aos hormônios**

Para avaliar a resposta dos dispositivos na detecção dos hormônios em meio líquido, foi realizado um teste preliminar com o nanobiossensor funcionalizado com a enzima tirosinase em contato com o hormônio estrona (Figura 30). Observa-se que este conseguiu detectar a concentração de 0,001  $\mu\text{g/L}$  não distinguindo concentrações acima de 100  $\mu\text{g/L}$ . Desta forma, a faixa de concentração de hormônio fixada para trabalhar com os nanobiossensores e montar as curvas de calibração foi de 0,001; 0,01; 1; 10; 50 e 100  $\mu\text{g/L}$ .

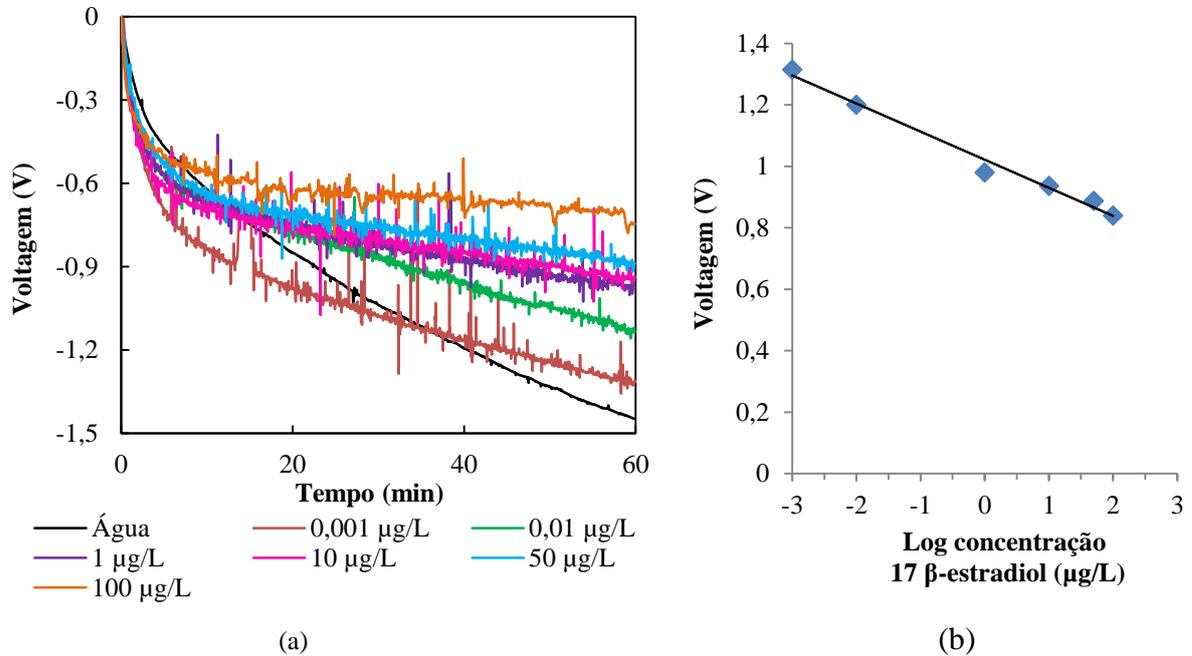
Figura 30 - Resposta de detecção do cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase em função do tempo com diferentes concentrações testes de hormônio estrona.



Fonte: O autor.

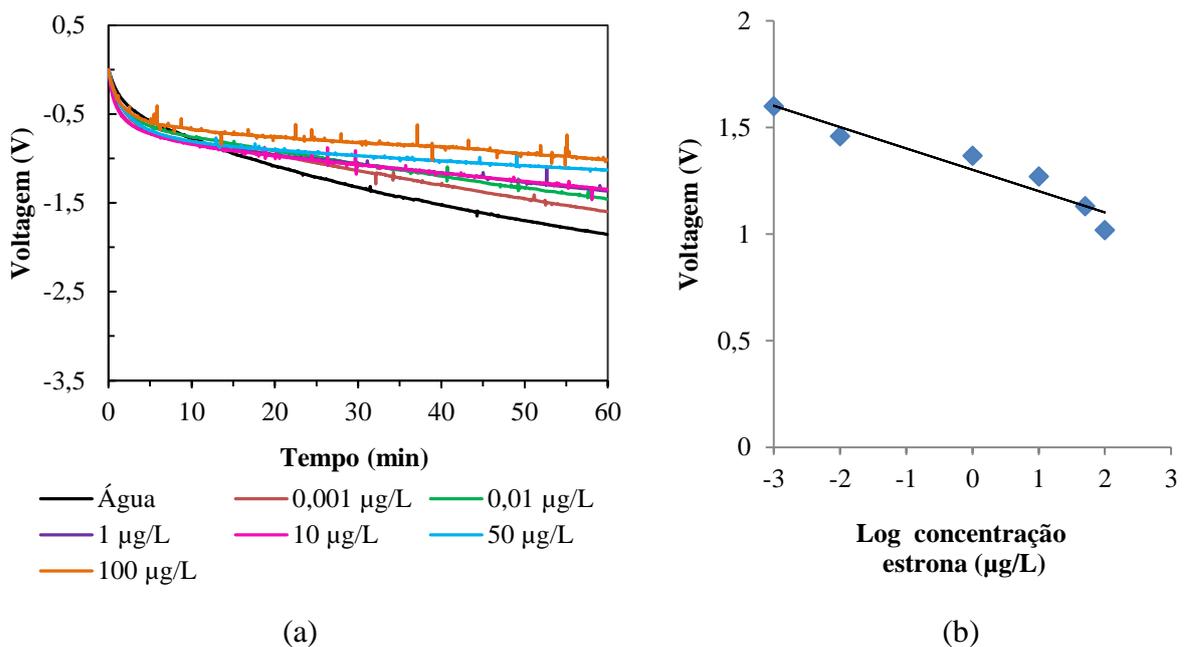
As Figuras 31 e 32 apresentam os resultados obtidos para as curvas de calibração do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase na presença dos respectivos hormônios, 17  $\beta$ -estradiol e estrona, e água ultrapura em função do tempo.

Figura 31 - (a) Resposta de detecção do nanobiossensor funcionalizado com tirosinase em função do tempo com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ -estradiol. (b) Curva de calibração das concentrações de 17  $\beta$ -estradiol versus voltagem do cantilever –  $R^2$ : 0,98.



Fonte: O autor.

Figura 32 - (a) Resposta de detecção do nanobiossensor funcionalizado com tirosinase em função do tempo com diferentes concentrações de hormônio estrona. (b) Curva de calibração das concentrações de estrona versus voltagem do cantilever –  $R^2$ : 0,92.



Fonte: O autor.

A camada biológica de detecção (enzima tirosinase) é uma oxidase que contém cobre e catalisa a redução do oxigênio molecular por diferentes doadores de elétrons, reconhecendo compostos fenólicos. A oxidação dos fenóis por esta enzima é dada por uma sequência de reações, onde os fenóis são convertidos em quinonas e / ou radicais livres (ROCKENBACH et al., 2008). A partir dessa interação entre a enzima e o composto fenólico (hormônio 17  $\beta$ -estradiol e estrona) o sinal foi reconhecido pelo nanobiossensor cantilever, obtendo-se uma diferença de tensão.

Como o tamanho dos nanobiossensores de cantilever se aproximam da nanoescala, seu comportamento mecânico começa a se assemelhar aos modos vibracionais de moléculas e átomos. O mecanismo de detecção baseia-se na adsorção do hormônio na camada sensível e nas tensões superficiais quimicamente induzidas, atribuídas a mudanças na energia livre de Gibbs. Segundo Lavrik, Sepaniak e Datskos (2004) os processos de adsorção na camada sensível são impulsionados por um excesso de energia livre interfacial e a superfície costuma tender a se expandir, o que resulta na redução do estresse interfacial, denominado estresse superficial compressivo. Este fenômeno também foi relacionado por Datskos, Egert e Sauers (1999) em cantilever revestido em um lado com ouro. Este processo pode ser relacionado ao resultado obtido pelos nanobiossensores neste trabalho, uma vez que o sinal de tensão diminui com o aumento da concentração de hormônio (Figura 31 e Figura 32).

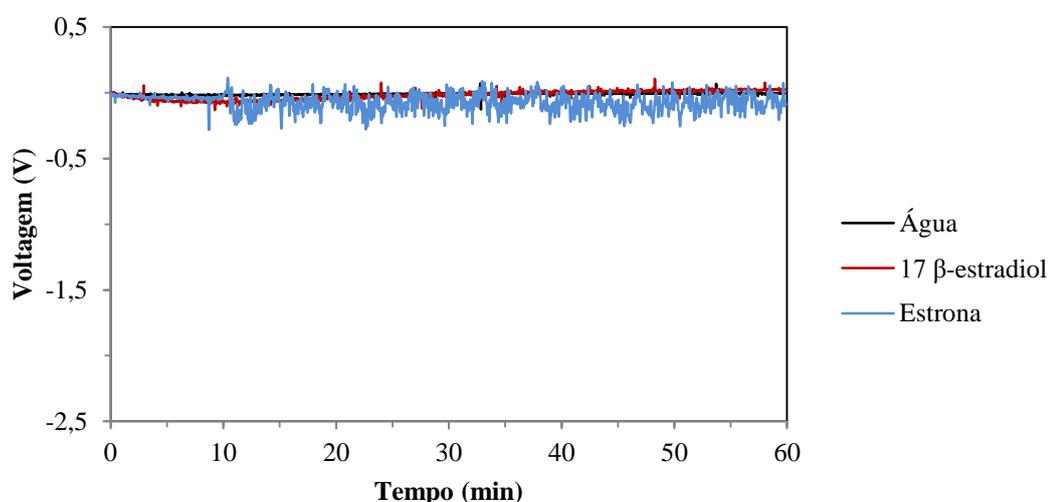
O nanobiossensor apresentou menor a voltagem com a menor concentração, e vice-versa, indicando que estes são sensíveis ao contato com os hormônios. De acordo com Oliveira et al. (2015), os menores valores de voltagem observados podem estar associados à baixa concentração de hormônio em solução, implicando conseqüentemente em uma menor quantidade do produto catalítico o-quinona, resultante da interação enzima-hormônio (OLIVEIRA et al., 2015).

No Brasil, as resoluções que levam em conta a qualidade da água e que foram utilizadas neste estudo são as Resoluções Conama 357/2005 e 430/2011, com um limite de detecção de 3 $\mu$ g/L para compostos fenólicos. Levando em conta estes os limites de detecção obtidos pelos nanobiossensores de cantilever e os valores estabelecidos pelas Resoluções, estes podem ser aplicados satisfatoriamente para detecção de hormônio em amostras de água.

Observa-se nas Figuras 31 e 32 que houve um ajuste satisfatório dos dados para a linha de regressão, conforme o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) recomenda, já que os valores de  $R^2$  para todos os dispositivos estudados ficaram acima de 0,9 (INMETRO, 2003).

Na Figura 33 é apresentada a resposta de voltagem do cantilever de silício sem funcionalização (branco) exposto a 50 µg/L dos hormônios (17 β-estradiol e estrona). Observa-se um comportamento linear ao longo do tempo, indicando não haver interação do cantilever com os analitos testados, ou seja, o sinal da voltagem ficou em zero, isto é, devido a superfície dos cantilevers não possuírem sítios de ligação para interagir com o analito de interesse.

Figura 33 - Resposta de voltagem do cantilever de silício sem funcionalização exposto a água e a 50 µg/L de 17 β-estradiol e estrona.



Fonte: O autor.

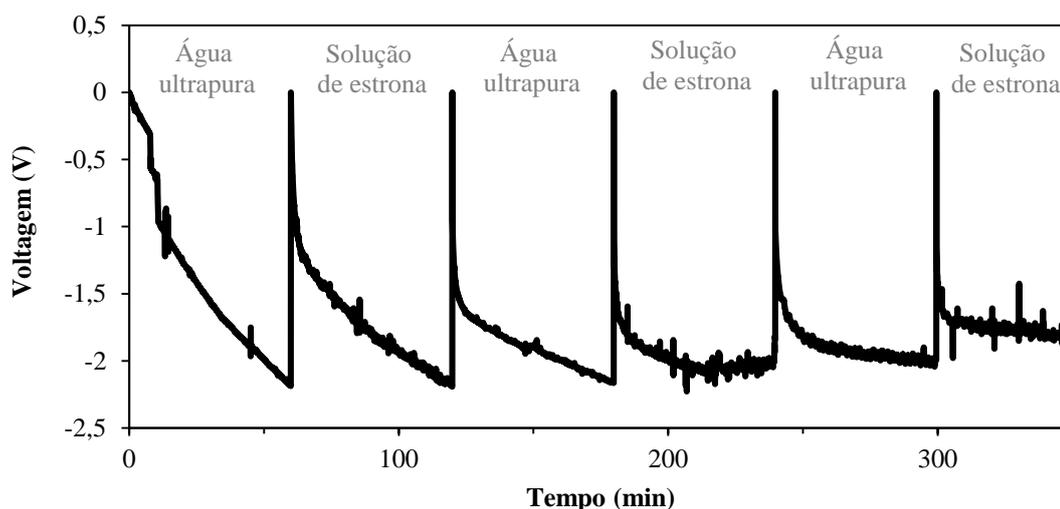
O limite de detecção dos sensores é definido como a menor concentração do analito que pode ser distinguida com certo nível de confiança. Neste trabalho, foi utilizada a equação da reta da curva de calibração mais o múltiplo do desvio padrão. O valor do múltiplo utilizado foi 3, o qual implica em um nível de confiança de 99,6% (SKOOG, 2005). O limite de detecção para ambos os nanobiossensores foi de 0,003 ppb para os dois hormônios (estrona e 17 β-estradiol).

Daniel e Lima (2014) reportam em seu trabalho a determinação simultânea de estriol, 17 β-estradiol, 17α-etinilestradiol e estrona empregando extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), obtendo um limite de detecção (LD) de 1,6 ppb e 1,5 ppb para 17 β-estradiol e estrona, respectivamente. Já Moraes et al. (2015) desenvolveram um sensor eletroquímico com grafeno para a detecção de 17 β-estradiol em águas de rios, e obtiveram um limite de detecção de 1,4 ppb de 17 β-estradiol. Esses valores quando comparados aos do presente estudo são maiores, indicando que os nanobiossensores apresentam limite de detecção maior que os métodos cromatográficos.

A sensibilidade dos dispositivos foi obtida por meio do coeficiente angular da concentração *versus* voltagem. Neste estudo, foi obtido valores de 0,100 V/ppb e 0,091 V/ppb para a estrona e 17  $\beta$ -estradiol, respectivamente. Quanto maiores os valores de sensibilidade e quanto menores os valores do limite de detecção (LD) mais apropriados os biossensores para a detecção de analitos de interesse (ANVISA, 2003; SKOOG, 2005; IUPAC, 2014).

A Figura 34 apresenta os resultados experimentais para a reversibilidade do nanobiossensor funcionalizado com a enzima tirosinase. Observa-se que o dispositivo funcionalizado submetido a concentração de 100  $\mu$ g/L de hormônio estrona se comportou de forma reversível, ou seja, retornou à posição de voltagem inicial durante 6 ciclos.

Figura 34 - Reversibilidade do nanobiossensor funcionalizado com a enzima tirosinase ao hormônio estrona.



Fonte: O autor.

Pode-se observar durante os 6 ciclos consecutivos, a resposta do nanobiossensor foi reversível, ou seja, conseguiu voltar à condição inicial, indicando que não houve perdas do sinal durante os sucessivos ciclos realizados.

A estabilidade dos dispositivos, sob armazenamento a seco a 4°C, foi avaliada no 1° e no 30° dia de armazenamento, conforme a Tabela 8. Este experimento foi realizado em triplicata e calculou-se o limite de detecção e a sensibilidade do dispositivo no período avaliado.

A estabilidade da resposta de um nanobiossensor durante a estocagem é de extrema importância, uma vez que, dependendo da situação, o ideal é que ele possa ser utilizado por mais tempo e que mantenha as características (sensibilidade e limite de detecção).

Tabela 8 - Estabilidade dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com tirosinase aos hormônios estrona e 17  $\beta$ -estradiol.

Estocagem (dias)	Limite de detecção (ppb)		Sensitividade (V/ppb)	
	Estrona	17 $\beta$ -estradiol	Estrona	17 $\beta$ -estradiol
<b>1</b>	0,003 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,003 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	0,100 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>	0,091 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>
<b>30</b>	0,001 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	0,001 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	0,321 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup>	0,214 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup>

\* Dados apresentados como média (três repetições)  $\pm$  Desvio Padrão. Letras iguais na coluna indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (t student) entre os diferentes dias avaliados.

Fonte: O autor.

Na Tabela 8 verifica-se que houve uma diminuição valor do limite de detecção e um aumento na sensibilidade do nanobiossensor para ambos os hormônios avaliados com o tempo de estocagem. Isto pode ter acontecido em função da estabilização das ligações, que se formaram durante a funcionalização, ao longo do tempo de armazenagem e pelo tipo de modificação a qual a superfície do cantilever foi submetida. Quando esta modificação é realizada com materiais na escala nano, isto pode levar a uma superfície com maior razão área por volume, fazendo com que suas propriedades elétricas sejam fortemente influenciadas por mínimas perturbações, o que pode resultar em um aumento da sensibilidade (WELCH e COMPTON, 2006; YOGESWARAN e CHEN, 2008).

Observa-se os valores de limite de detecção e de sensibilidade para o 1º e o 30º dia de estocagem apresentaram diferença significativa com um nível de confiança de 95%. Essa diferença pode estar relacionada com modificação da atividade enzimática durante o armazenamento do dispositivo. Segundo Sassolas et al. (2012) afirma de imobilização afeta a estabilidade e a sensibilidade dos biossensores enzimáticos, também a precisão das medidas, reprodutibilidade e tempo de vida do dispositivo.

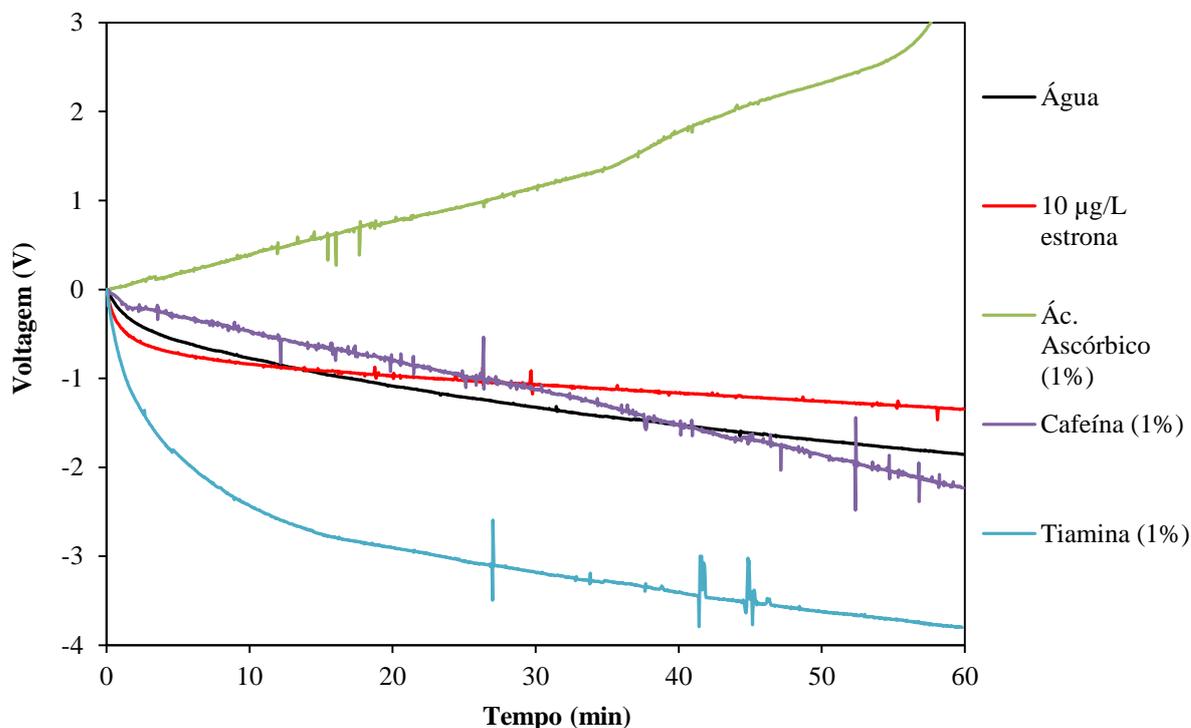
#### 4.3.3 Interferentes

Para esta etapa, foi utilizado somente o nanobiossensor funcionalizado com tirosinase, e a seletividade deste foi avaliada através das medições de resposta de três substâncias diferentes como potenciais interferentes, sendo elas a cafeína, a tiamina e o ácido ascórbico, comparando os resultados obtidos com a água ultrapura.

Os potenciais interferentes foram diluídos em água ultrapura, em uma concentração de 1% (v/v), com o intuito de ver a sensibilidade do nanobiossensor para outras substâncias. A

Figura 35 apresenta a resposta de leitura do nanobiossensor, quando em contato com estes interferentes.

Figura 35 - Resposta do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com enzima tirosinase aos interferentes.



Fonte: O autor.

Verifica-se que o nanobiossensor não conseguiu detectar a presença de tiamina e cafeína na água, pois a voltagem dos mesmos ficou baixo da análise realizada com água ultrapura (branco). Contudo, o nanobiossensor conseguiu detectar a presença do ácido ascórbico (Figura 35), apresentando uma resposta de 3 V indicando alta sensibilidade a esse composto. Essa alta resposta de voltagem pode ter acontecido pela grande afinidade e capacidade de absorção do ácido ascórbico pela enzima tirosinase, em função da interação com os grupamentos OH (SILVÉRIO et al., 2013).

Desse modo, pode-se dizer que o nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase consegue detectar outras substâncias, além dos hormônios investigados. Porém, apesar deste estudo indicar que o nanobiossensor consegue detectar um potencial interferente, não foram analisados em uma mesma solução (hormônio e interferente), e não se pode comprovar se haveria interferência em uma análise de hormônio.

#### 4.4 CONCLUSÃO

Os estudos comprovaram que os nanobiossensores foram eficientes na determinação de hormônios 17  $\beta$ -estradiol e estrona. Neste trabalho foi verificado que quanto maior a concentração de hormônio maior a resposta de voltagem do nanobiossensor. Os nanobiossensores apresentaram distinção entre as concentrações avaliadas, com sensibilidade de 0,497 e 0,100 V/ppb, limite de detecção de 0,001 e 0,003  $\mu\text{g/L}$  para o hormônio 17  $\beta$ -estradiol e estrona, respectivamente.

Tanto a reversibilidade quanto o tempo de estocagem dos dispositivos apresentaram resultados promissores, já que se mostraram 100% reversíveis, não apresentando perdas de sinal durante sucessivas medições, sendo que o tempo de estocagem afetou a resposta do mesmo, ocorrendo uma diminuição no limite de detecção e um aumento na sensibilidade durante 30 dias de armazenamento.

As análises de MEV e de PM-IRRAS, bem como as imagens topográficas obtidas através do AFM permitiram acompanhar as mudanças conformacionais da superfície ao longo das etapas de funcionalização, confirmando mais uma vez, o sucesso desta metodologia para a imobilização dos elementos biológicos sobre a superfície do cantilever.

Na análise de interferentes com o nanobiossensor, este foi capaz de identificar a amostra de ácido ascórbico, o qual possui em sua estrutura uma quantidade significativa de grupamentos OH. As demais substâncias não apresentaram sinal de voltagem significativo, ou seja, acima do branco da amostra (água ultrapura).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003.** Brasil, 2003.
- BUENO, C. C.; DEDA, D. K.; SOUZA, B. B.; DA SILVA, A. C. N.; RIBEIRO, G. A.; AMARANTE, A.; FRANCA, E. F.; LEITE, F. L. The use of functionalized AFM tips as molecular sensors in the detection of pesticides. **Materials Research (São Carlos. Impresso)**, v. 16, p. 683-687, 2013.
- CONAMA, Resolução n° 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. **Publicada no DOU n° 053**, p. 58-63, 18/03/2005.
- DATSKOS, P. G., RAJIC, S., EGERT, C. M., DATSKOU, I. Detection of infrared photons using the electronic stress in metal-semiconductor interfaces. **Infrared technology and applications XXV, SPIE**, v.3698, p.151-160, 1999.

- DANIEL, M. S.; LIMA, E. C. Determinação simultânea de estriol, 17  $\beta$ -estradiol, 17  $\alpha$ -etinilestradiol e estrona empregando-se extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). **Revista Ambiente e Água**, v. 9, n. 4, p. 689 – 694, 2014.
- FERREIRA, L. F. Biossensor amperométrico à base de Tirosinase aplicado na determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais. **Dissertação de Mestrado**, Uberlândia/SP, 2005.
- GALLI, A. Quantificação de Açúcares em Alimentos: uma proposta com biossensores. **01. Ed. Dusseldorf: novas edições acadêmicas**, v. 01. 124p., 2016.
- INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology Gold Book**. 2014.
- LANG, H. P.; HEGNER, M.; GERBER, C. Nanomechanical Cantilever Array Sensors. Springer Handbook of Nanotechnology. **Bhushan, Bharat** (Ed) 3rd ed.; Part B, p. 427 - 452, 2010.
- LAVRIK, NICKOLAY V.; SEPANIAK, MICHAEL J.; DATSKOS, PANOS G. Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors. **Review of Scientific Instruments**, v. 75 (7), p. 2229-2253, 2004.
- MARTINAZZO, J.; MUENCHEN, D. K.; BREZOLIN, A. N.; CEZARO, A. M.; RIGO, A.; MANZOLI, A.; HOEHNE, L.; LEITE, F. L.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C. Cantilever nanobiosensor using tyrosinase to detect atrazine in liquid medium. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, p. 1-8, 2018.
- MENDES, R. K. Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2006.
- MORAES, F. C.; ROSSI, B.; DONATONI, M. C.; OLIVEIRA, K. T.; PEREIRA, E. C. Sensitive determination of 17 $\beta$ -estradiol in river water using a graphene based electrochemical sensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 881, p. 37–43, 2015.
- MUENCHEN, D. K. Desenvolvimento de biossensor nanoestruturado de cantilever utilizando peroxidase de fonte vegetal para detecção de glifosato em água. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim/RS, 2017.
- OLIVEIRA, R. M.; FERREIRA, J.; SANTOS, M. J. L.; FARIA, R. M.; OLIVEIRA JR, O. N. Probing the Functionalization of Gold Surfaces and Protein Adsorption by PM-IRRAS. **ChemPhysChem**, v. 12, p. 1736 – 1740, 2011.
- OLIVEIRA, T. M. B. F.; BARROSO, M. F.; MORAIS, S.; LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. OLIVEIRA, M. B. P. P.; DELERUE-MATOS, C. Biosensor based on multi-walled carbono nanotubes paste electrode modified with laccase for pirimicarb pesticide quantification. **Talanta**, v. 106, p. 137-143, 2013.

- PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **AZojono Journal of Nanotechnology Online**, v.3, 2007.
- ROCKENBACH, I. I., SILVA, G. S., RODRIGUES, E., KUKOSKI, E. M., FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, p.238-244, 2008.
- SANG, S.; ZHANG, W.; ZHAO, Y. Review on the design art of biosensors. In **State of the Art in Biosensors – General Aspects**; Rinken, T., Eds.; InTech: Rijeka, Croatia, p. 89–110, 2013.
- SASSOLAS, A., BLUM, L.J., BOUVIER, B.D.L. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012.
- SILVÉRIO, M.D.O., CASTRO, C.F.S., MIRANDA, A.R. Avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15 (1), p. 59-65, 2013.
- SKOOG, D. A. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2005.
- VELANKI, S.; JI, H.-F. Detection of feline coronavirus using microcantilever sensors. **Measurement Science and Technology**, v. 17, p. 2964-2968, 2006.
- WANG, J. From DNA Biosensors to Gene Chips. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.16, p. 3011-3016, 2000.
- WELCH, C.M., COMPTON, R.G. The Use of Nanoparticles in Electroanalysis: A Review, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 3, p. 601-619, 2006.
- YOGESWARAN, U., CHEN, S.M. A Review on the Electrochemical Sensors and Biosensors Composed of Nanowires as Sensing Material, **Sensors**, v. 8, n. 1, p. 290-313, 2008.

## **CAPÍTULO 5**

### **CONCLUSÕES GERAIS**

A proposta principal deste estudo foi o desenvolvimento de dispositivos capazes de detectar hormônios em meio líquido. Para isto, os cantilevers foram escolhidos para serem utilizados como nanobiossensores sensíveis aos hormônios  $17\beta$ -estradiol e estrona, excretado por seres humanos e animais.

Esta técnica é relativamente nova na literatura e é muito promissora, pois permite a detecção de analito em uma escala muito pequena, através da utilização do microscópio de força atômica (AFM). A metodologia de Monocamadas Automontadas (SAM) foi usada com sucesso para imobilizar os elementos biológicos (anticorpos e enzima) na superfície do cantilever, devidamente comprovada pelas análises de PM-IRRAS, Microscopia de Força Atômica (AFM) e MEV.

Foram alcançados limites de detecção (LD) na ordem de ppb, tanto para os nanoimunossensores (0,013 e 0,027 ppb) quanto para os nanobiossensores (0,003 ppb). A sensibilidade dos dispositivos variou de 0,091 a 0,283 V/ppb. As análises de reversibilidade e estabilidade estudadas permitiram ver a potencialidade desta técnica para detectar hormônios em meio líquido, já que foram 100% reversíveis e tiveram resultados significativos mesmo após serem armazenados por 30 dias.

Quando o nanobiossensor foi colocado em contato com possíveis interferentes que poderiam estar presentes na água, este foi capaz de identificar, demonstrando que este dispositivo também poderá ser utilizado para detectar outras substâncias.

## **CAPÍTULO 6**

### **SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

A seguir são apresentadas sugestões de trabalhos futuros relacionadas a aplicação dos nanoimunossensores e nanobiossensores para a detecção de hormônios.

- Avaliar se os dispositivos desenvolvidos são capazes de detectar outros tipos de hormônios, sejam eles sintéticos ou naturais.
- Desenvolver dispositivos com diferentes enzimas e anticorpos e comparar o comportamento deles com os dispositivos desenvolvidos neste estudo.
- Avaliar o efeito de diferentes temperaturas na resposta dos dispositivos.
- Estudar o comportamento dos dispositivos em diferentes pH.
- Realizar análise cromatográfica nas amostras de águas.
- Verificar o tempo de estabilidade dos dispositivos.