

**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**

**ALINE ANDRESSA RIGO**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSORES DE CANTILEVER PARA  
DETECÇÃO DE METAIS PESADOS EM ÁGUA**

**ERECHIM – RS**

**2019**

**ALINE ANDRESSA RIGO**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSORES DE CANTILEVER PARA  
DETECÇÃO DE METAIS PESADOS EM ÁGUA**

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

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

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

**ERECHIM – RS**

**2019**

**ALINE ANDRESSA RIGO**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSSENSORES DE CANTILEVER PARA  
DETECÇÃO DE METAIS PESADOS EM ÁGUA**

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

**Erechim, 18 de fevereiro de 2019.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Juliana Steffens, D. Sc.  
(Orientadora)

---

Alexander Junges, D.Sc.  
URI –Erechim

---

Clarice Steffens, D. Sc.  
(Orientadora)

---

Vanderlei Secretti Decian, D. Sc.  
URI – Erechim

---

Fábio de Lima Leite, D. Sc.  
UFSCar – São Carlos

---

Lucélia Hoehne, D. Sc.  
UNIVATES – Lajeado

R572d Rigo, Aline Andressa

Desenvolvimento de nanobiossensores de cantilever para detecção de metais pesados em água / Aline Andressa Rigo. - 2019.  
126 f.

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

“Orientação: Juliana Steffens ; Clarice Steffens”

1. Microscópio de força atômica 2. Fosfatase alcalina 3. Urease  
Dispositivo de nanobiossensoriamento I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, por ter colocado em meu caminho tantas coisas boas, cada uma delas, ao seu modo, que me fizeram evoluir e chegar onde cheguei.

Aos meus pais, Inelda e Luiz, que sempre apoiaram minhas escolhas e me motivaram a continuar, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu marido Ricardo, pelos finais de semana dedicados aos estudos sempre me incentivando e auxiliando, muito obrigada por sua compreensão e paciência em mais esta etapa. Como é bom ter você em minha vida!

As companheiras do grupo de nanotecnologia (Alana, Janine, Daniela e Alexandra) por todos os momentos compartilhados durante o doutorado, em especial a Alana, minha companheira de experimentos, muito obrigada pela sua amizade e pelas muitas horas de estudos.

As minhas colegas de doutorado e amigas de longa data, Keli e Adriana, que de uma forma ou de outra acabaram contribuindo para realização deste projeto, por meio do seu incentivo, amizade, conselhos e sempre estarem prontas para me auxiliar sempre que preciso.

As minhas orientadoras, Prof<sup>ª</sup>. Clarice Steffens e Prof<sup>ª</sup>. Juliana Steffens, pela orientação, auxílio, ideias, atenção e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Ilizandra Fernandes, Rúbia Mores e Alexandra Manzoli pelas contribuições dadas em todas as etapas deste estudo.

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

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

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

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões de Erechim pela infraestrutura.

À CAPES pela concessão da bolsa que permitiu a realização dos estudos, CNPQ, FINEP e FAPERGS.

À banca avaliadora, por fazer parte deste trabalho.

**Muito Obrigada!**

## RESUMO

Os metais pesados podem ser altamente tóxicos aos seres humanos e outras formas de vida animal e vegetal, dependendo da dose e da forma química. A industrialização e a urbanização aumentam a concentração destes contaminantes nos corpos hídricos o que acaba comprometendo a qualidade da água. Neste contexto, dispositivos de sensoriamento têm surgido como uma alternativa aos métodos convencionais de análise para monitoramento da contaminação nestes ambientes, como os nanobiossensores de cantilever, que estão tendo destaque por detectar substâncias na micro e nanoescala por meio do uso de camadas sensoras. No presente estudo foi desenvolvido e aplicado em amostras de água, nanobiossensores de cantilever para detecção de metais pesados ( $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$ ), utilizando como camadas sensoras as enzimas fosfatase alcalina e urease. A funcionalização dos nanobiossensores foi realizada empregando a técnica de monocamadas automontadas (SAM) sobre a superfície de silício contendo ouro, ácido 16-mercaptohexadecanóico (AMHD), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC)/*N*-hidroxi-succinimida (NHS) e as enzimas fosfatase alcalina e urease. Aplicação dos nanobiossensores de cantilever em amostras reais de água ocorreu em diferentes usos e ocupação no entorno destes corpos hídricos, localizado no município de Erechim e comparado a um método convencional de detecção, levando em consideração os efeitos matriciais. Por meio das curvas de calibração, utilizando o método estatístico da Análise de Componentes Principais (PCA), foi possível observar que os nanobiossensores foram altamente eficientes na discriminação dos metais pesados e suas diferentes concentrações. Além disto, foram obtidos limites de detecção na gama de  $\mu\text{g/L}$  e alta sensibilidade para os dois nanobiossensores, além de serem 100% reversíveis, porém o tempo de estocagem afetou a resposta dos mesmos. As 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) confirmaram a funcionalização do cantilever pela técnica de SAM, sendo possível verificar que ocorreu a deposição da camada sensora e, a espessura desta camada sensora, apresentou a medida em escala nanométrica (80,48 nm). Em relação a aplicação dos nanobiossensores em amostra real de água, pode-se dizer que os parâmetros físico-químicos das águas coletadas ficaram dentro da legislação vigente para águas de rios e potável, a resposta de detecção de chumbo pelos nanobiossensores desenvolvidos se mostrou satisfatória, o efeito da matriz pode ser minimizado com a diluição da água de rio na proporção 1:1 com a solução de trabalho e os nanobiossensores promoveram uma adequada verificação de chumbo em amostras reais de água. Assim, os nanobiossensores de cantilever desenvolvidos mostraram-se apropriados para a detecção de metais pesados em águas, sendo uma ferramenta promissora na área ambiental.

**Palavras-chave:** Microscópio de força atômica. Monocamadas automontadas. Dispositivo de nanobiossensoriamento. Fosfatase alcalina. Urease.

## ABSTRACT

Heavy metals can be highly toxic to humans and other animal and plant life forms, depending on the dose and the chemical form. Industrialization and urbanization increase the concentration of these contaminants in the water bodies, which end up compromising the quality of the water. In this context, sensing devices have emerged as an alternative to conventional methods of monitoring contamination in these environments, such as cantilever nanobiosensors, which are highlighting detecting substances at the micro and nanoscale through the use of sensor layers. In the present study, nanobiosensor of cantilever for the detection of heavy metals ( $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II and  $\text{AlCl}_3$ ) was developed and applied in water samples using the alkaline phosphatase and urease enzymes as sensor layers. The functionalization of the nanobiosensors was performed using the technique of self-assembled monolayers (SAM) on the silicon surface containing gold, 16-mercaptohexadecanoic acid (AMHD), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS) and the enzymes alkaline phosphatase and urease. Application of cantilever nanobiosensors in real water samples occurred in different uses and occupation around these water bodies, located in the municipality of Erechim and compared to a conventional method of detection, taking into account the matrix effects. By means of the calibration curves, using the statistical method of Principal Component Analysis (PCA), it was possible to observe that nanobiosensors were highly efficient in the discrimination of heavy metals and their different concentrations. In addition, detection limits were obtained in the  $\mu\text{g/L}$  range and high sensitivity for the two nanobiosensors, in addition to being 100% reversible, but storage time affected their response. The techniques of surface characterization by polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS), atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM) confirmed the cantilever functionalization by the SAM technique, being possible and the thickness of this sensor layer showed the measurement at nanoscale (80.48 nm). Regarding the application of the nanobiosensors in a real water sample, it can be said that the physicochemical parameters of the collected waters were within the current legislation for river and drinking water, the response of detection of lead by the nanobiosensors developed was satisfactory, the matrix effect can be minimized by diluting the river water in a 1:1 ratio with the work solution and the nanobiosensors promoted an adequate lead check on actual water samples. Thus, the developed cantilever nanobiosensors proved to be suitable for the detection of heavy metals in waters, being a promising tool in the environmental area.

**Keywords:** Atomic force microscope. Self-assembled monolayers. Nanobiosensor device. Alkaline phosphatase. Urease.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Representação esquemática de um biossensor exposto a contaminantes .....	33
Figura 2.2 – Dispositivo responsável pelas medidas de AFM, bem como de sensoriamento na nanoescala, constituído de um cantilever e uma ponta.....	34
Figura 2.3 – Ilustração do princípio de funcionamento do AFM .....	35
Figura 2.4 – Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não-contato e (c) modo intermitente .....	36
Figura 2.5 – Principais modos de operação de um biossensor de cantilever.....	37
Figura 2.6 – Canticlip utilizado em meio líquido.....	40
Figura 2.7 – Leitura da deflexão do cantilever em amostra líquida .....	41
Figura 2.8 – Molécula da urease.....	45
Figura 2.9 – Molécula da fosfatase alcalina .....	46
Figura 2.10 – Esquema ilustrativo dos métodos de imobilização enzimática: (A) adsorção; (B) encapsulação; (C) ligação covalente, e (D) ligação covalente cruzada.....	47
Figura 2.11 – Representação da técnica de monocamadas automontadas .....	48
Figura 3.1 – Especificações do cantilever utilizado para o desenvolvimento de nanobiossensores: (a) Vista lateral; (b) Vista superior.....	63
Figura 3.2 – Fluxograma do processo de funcionalização dos nanobiossensores de cantilever. ....	65
Figura 3.3 – Cantilever imerso em solução durante as etapas de funcionalização.....	66
Figura 3.4 – Imersão do cantilever na solução de metal pesado para obtenção da medida de voltagem: (a) Vista frontal do cabeçote; (b) Imersão do cantilever em meio líquido .....	68
Figura 3.5 – 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 Peltier, (g) Controlador digital de temperatura, (h) Monitores (i) Caixa de MDF acoplada ao micro ventilador externo .....	70
Figura 3.6 – Representação esquemática da funcionalização do cantilever com as enzimas fosfatase alcalina e urease.....	75
Figura 3.7 – Resposta de detecção do nanobiossensor funcionalizado com a enzima fosfatase alcalina em função do tempo com a injeção de diferentes concentrações testes de PbCl <sub>2</sub> II...	77

Figura 3.8 – Resposta de detecção do nanobiossensor funcionalizado com a enzima fosfatase alcalina em função do tempo com a injeção de diferentes concentrações de PbCl <sub>2</sub> II (a), NiCl <sub>2</sub> II (b), CdCl <sub>2</sub> (c), ZnCl <sub>2</sub> (d), CoCl <sub>2</sub> II (e), AlCl <sub>3</sub> (f) e água ultrapura.....	78
Figura 3.9 – Resposta de detecção do nanobiossensor funcionalizado com a enzima urease em função do tempo com a injeção de diferentes concentrações de PbCl <sub>2</sub> II (a), NiCl <sub>2</sub> II (b), CdCl <sub>2</sub> (c), ZnCl <sub>2</sub> (d), CoCl <sub>2</sub> II (e), AlCl <sub>3</sub> (f) e água ultrapura. ....	81
Figura 3.10 – Gráficos de PCA dos nanobiossensores de fosfatase alcalina (a) e urease (b), para os metais PbCl <sub>2</sub> II, NiCl <sub>2</sub> II, CdCl <sub>2</sub> , ZnCl <sub>2</sub> , CoCl <sub>2</sub> II e AlCl <sub>3</sub> em diferentes concentrações (0,01; 0,1; 1; 10; 50 µg/L) .....	83
Figura 3.11 – Resposta de voltagem do cantilever de silício sem funcionalização exposto a água ultrapura e a 50 µg/L de diferentes metais pesados .....	85
Figura 3.12 – Resposta de voltagem do cantilever de silício sem funcionalização recoberto com 70 nm de ouro exposto diferentes concentrações da solução de PbCl <sub>2</sub> II e água ultrapura. ....	85
Figura 3.13 – Reversibilidade dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina (a) e urease (b) avaliados em 3 ciclos, alternado a exposição a solução de PbCl <sub>2</sub> II (0,01 µg/L) e água ultrapura (branco) .....	89
Figura 3.14 – Representação esquemática da detecção dos íons metálicos por meio da funcionalização do cantilever com enzimas .....	91
Figura 3.15 – Espectro PM-IRRAS das etapas de funcionalização do cantilever. (a) Funcionalização com a enzima fosfatase alcalina e (b) Funcionalização com a enzima urease .....	92
Figura 3.16 – Imagens 2D da superfície do cantilever durante as etapas de construção dos nanobiossensores. (a) Silício – cantilever não funcionalizado, deposição das camadas de (b) ouro, (c) AMHD, (d) EDC/NHS, (e) Fosfatase alcalina, (f) Urease .....	94
Figura 3.17 – Micrografias superfície do cantilever durante as etapas de construção dos nanobiossensores. (a) Silício (sem funcionalização), deposição das camadas de (b) Ouro, (c) AMHD, (d) EDC/NHS, (e) Fosfatase alcalina, (f) Urease, em resolução de 50 µm.....	97
Figura 4.1 – Resposta de detecção dos nanobiossensores funcionalizados com a enzima fosfatase alcalina (a) e urease (b) em função do tempo para diferentes concentrações de PbCl <sub>2</sub> II e água ultrapura.....	113
Figura 4.2 – Resposta dos nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina (a) e urease (b) ao efeito da matriz com diferentes quantidades de água de rio em uma	

solução de 10 µg/L de PbCl <sub>2</sub> II, na proporção de 1:1, 1:5 e 1:10 (v:v) (10 µg/L de PbCl <sub>2</sub> II:amostra 1), amostra 1, solução de 10 µg/L de PbCl <sub>2</sub> II e água ultrapura .....	115
Figura 4.3 – Resposta dos nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina (a) e urease (b) ao efeito da matriz com diferentes quantidades de água de rio em uma solução de 10 µg/L de PbCl <sub>2</sub> II, na proporção de 1:1, 1:5 e 1:10 (v:v) (10 µg/L de PbCl <sub>2</sub> II:amostra 2), amostra 2, solução de 10 µg/L de PbCl <sub>2</sub> II e água ultrapura .....	116
Figura 4.4 – Resposta dos nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina (a) e urease (b) em função do tempo, com a injeção das 4 diferentes amostras, diluídas na proporção 1:1 (v:v) (água ultrapura:amostra de água), a concentração de 1 µg/L de PbCl <sub>2</sub> II e água ultrapura .....	118

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Síntese das fontes de contaminação e efeitos sobre a saúde humana dos metais mais frequentes no meio ambiente .....	26
Tabela 2.2 – Limites de lançamento de efluentes e de potabilidade de água de alguns metais	27
Tabela 2.3 – Principais componentes que originam os nanossensores.....	33
Tabela 3.1 – Valores de limite de detecção (LD), sensibilidade e coeficiente de correlação ( $R^2$ ), dos nanobiossensores de cantilever funcionalizado com as enzimas fosfatase alcalina e urease, dos diferentes metais pesados. ....	86
Tabela 3.2 – Durabilidade dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease .....	90
Tabela 3.3 – Valores da raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) das superfícies em cada etapa de construção dos nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease .....	94
Tabela 4.1 – Localização das amostras de água .....	107
Tabela 4.2 – Turbidez, condutividade elétrica e pH das amostras de água coletadas. ....	111

## LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 6.1 – Curvas de calibração da concentração logarítmica <i>versus</i> voltagem, para os metais pesados PbCl <sub>2</sub> II (a), NiCl <sub>2</sub> II (b), CdCl <sub>2</sub> (c), ZnCl <sub>2</sub> (d), CoCl <sub>2</sub> II (e), AlCl <sub>3</sub> (f), do nanobiossensor funcionalizado com a enzima fosfatase alcalina.....	125
Apêndice 6.2 – Curvas de calibração da concentração logarítmica <i>versus</i> voltagem, para os metais pesados PbCl <sub>2</sub> II (a), NiCl <sub>2</sub> II (b), CdCl <sub>2</sub> (c), ZnCl <sub>2</sub> (d), CoCl <sub>2</sub> II (e), AlCl <sub>3</sub> (f), do nanobiossensor funcionalizado com a enzima urease .....	126

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

AMHD – Ácido 16-mercaptohexadecanóico

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

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

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

ETEs – Estações de tratamento de esgoto

FAAS – Espectrometria de absorção atômica com chama (*Flame Atomic Absorption Spectrometry*)

GF AAS – Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*)

ICP OES – Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

ICP MS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (*Inductively coupled plasma mass spectrometry*)

LD – Limite de detecção

LIBS – Espectrometria de emissão com plasma induzido por laser (*Laser Induced Breakdown Spectrometry*)

MDF – Fibra de média densidade

MEV – Microscópio eletrônico de varredura

NHS – *N*-hidroxi-succinimida

nm – Nanômetro

NTA – 4-aminotiofenol (*4-aminothiophenol*)

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

ppb – Partes por bilhão

ppm – Partes por milhão

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

U – Unidade de atividade

V – Volts

XRF – Fluorescência de Raios-X (*X-ray Fluorescence*)

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>17</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Introdução geral .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Objetivos.....</b>	<b>19</b>
1.2.1 Objetivo geral .....	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
<b>1.3 Referências bibliográficas.....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>22</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Contaminação da água com micropoluentes .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Metais pesados .....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Implicações na saúde humana .....	24
2.2.2 Contaminação nos ecossistemas aquáticos.....	28
<b>2.3 Detecção dos metais pesados.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4 Nanotecnologia.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5 Nanobiossensores de cantileveres.....</b>	<b>34</b>
2.5.1 Operação em meio líquido.....	39
2.5.1.1 Métodos de detecção de analitos em meio líquido .....	40
<b>2.6 Funcionalização dos nanobiossensores de cantileveres.....</b>	<b>42</b>
2.6.1 Agentes biológicos .....	43
2.6.2 Imobilização das biomoléculas sobre a superfície sensora .....	46
<b>2.7 Aplicação dos nanobiossensores de cantileveres.....</b>	<b>50</b>
<b>2.8 Considerações sobre o estado da arte .....</b>	<b>52</b>
<b>2.9 Referências bibliográficas.....</b>	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>61</b>
<b>3. DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSOR DE CANTILEVER UTILIZANDO AS ENZIMAS FOSFATASE ALCALINA E UREASE PARA DETECÇÃO DE METAIS PESADOS EM ÁGUA .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1 Introdução .....</b>	<b>61</b>

<b>3.2 Material e métodos .....</b>	<b>62</b>
3.2.1 Material.....	62
3.2.2 Métodos .....	63
3.2.2.1 Desenvolvimento do nanobiossensor de cantilever.....	63
3.2.2.2 Funcionalização da superfície dos nanobiossensores de cantilever .....	64
3.2.2.3 Medida de voltagem dos nanobiossensores de cantilever .....	66
3.2.2.4 Resposta dos nanobiossensores aos metais pesados.....	67
3.2.2.5 Análise de componentes principais (PCA).....	70
3.2.2.6 Resposta dos cantileveres sem funcionalização .....	71
3.2.2.7 Caracterização das respostas dos nanobiossensores.....	71
3.2.2.8 Caracterização das superfícies dos nanobiossensores .....	73
<b>3.3 Resultados e discussão.....</b>	<b>74</b>
3.3.1 Funcionalização dos nanobiossensores de cantilever.....	74
3.3.2 Avaliação das respostas na detecção dos metais pesados.....	76
3.3.3 Resposta da análise de componentes principais (PCA).....	82
3.3.4 Resposta dos cantileveres sem funcionalização .....	84
3.3.5 Sensitividade e limite de detecção.....	86
3.3.6 Resposta de reversibilidade dos nanobiossensores de cantilever .....	88
3.3.7 Resposta da durabilidade dos nanobiossensores de cantilever.....	90
3.3.8 Mecanismo de detecção de metais pesados pelos nanobiossensores desenvolvidos.....	91
3.3.9 Espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS).....	91
3.3.10 Microscopia de força atômica (AFM) .....	93
3.3.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	96
<b>3.4 Considerações parciais .....</b>	<b>97</b>
<b>3.5 Referências bibliográficas.....</b>	<b>98</b>
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>105</b>
<b>4 NANOBIOSENSORES DE CANTILEVER FUNCIONALIZADOS COM AS ENZIMAS FOSFATASE ALCALINA E UREASE PARA DETECÇÃO DE CHUMBO EM AMOSTRAS REAIS DE ÁGUA .....</b>	<b>105</b>
<b>4.1 Introdução .....</b>	<b>105</b>
<b>4.2 Material e métodos .....</b>	<b>106</b>
4.2.1 Localização e coleta das amostras de água.....	106

4.2.2 Análise físico-química das águas .....	108
4.2.2.1 Turbidez.....	108
4.2.2.2 pH .....	108
4.2.2.3 Condutividade elétrica.....	108
4.2.3 Detecção de chumbo (Pb) por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) .....	109
4.2.4 Análise de detecção de chumbo (Pb) pelos nanobiossensores de cantileveres .....	109
4.2.5 Aplicação dos nanobiossensores em amostras reais de água .....	110
<b>4.3 Resultados e discussão.....</b>	<b>111</b>
4.3.1 Análise dos parâmetros físico-químicos.....	111
4.3.2 Resposta dos nanobiossensores em amostras reais.....	114
4.3.2.1 Efeito da matriz .....	114
4.3.2.2 Determinação do chumbo em amostras reais de água.....	117
<b>4.4 Considerações parciais .....</b>	<b>118</b>
<b>4.5 Referências bibliográficas.....</b>	<b>119</b>
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>123</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>123</b>
<b>5.1 Trabalhos futuros .....</b>	<b>124</b>
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>125</b>
<b>6 APÊNDICES .....</b>	<b>125</b>

## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO

Esta tese está organizada em 6 capítulos. O **Capítulo I** apresenta uma introdução geral sobre o uso de nanosensores para detecção de metais pesados em água. Também neste mesmo capítulo os objetivos gerais e específicos são expostos. Na sequência, o **Capítulo II** apresenta os aspectos teóricos que fundamentam esta tese.

Os resultados, obtidos estão divididos em 2 capítulos, estes tratam, de forma independente, cada um dos estudos realizados. Desta forma, os estudos experimentais apresentados nos **Capítulos III e IV** foram estruturados com uma breve introdução, metodologia utilizada, apresentação e discussão dos resultados, as conclusões e, por fim, as referências utilizadas. No **Capítulo V**, é apresentada uma conclusão geral da tese e no **Capítulo VI** são apresentados os apêndices.

#### 1.1 Introdução geral

O padrão de qualidade de vida de uma população está diretamente relacionado à disponibilidade e à qualidade de sua água, sendo esta, o recurso natural mais crítico e mais susceptível a impor limites ao desenvolvimento, em muitas partes do mundo (MAGALHÃES, 2004).

A industrialização e a urbanização, juntamente com a intensificação das atividades agrícolas, têm resultado no aumento da demanda de água, e por consequência aumentam a contribuição de contaminantes nos corpos d'água, dentre eles os metais pesados. Estes possuem como maior e mais significativas rotas de contaminação, a emissão direta e indireta dos esgotos tratados e não-tratados, o escoamento e deposição atmosférica e o processo de lixiviação do solo. Além disto, agrega-se a estes problemas, o fato da grande maioria da população brasileira estar concentrada em cidades, próximos de rios e mananciais, desencadeando um duplo impacto negativo para os recursos hídricos: a intensificação do uso e o aumento da poluição (HOLT, 2000; RICO; VIGHI, 2016).

Em vista disso, um dos campos mais proeminentes da área ambiental é o estudo de micropoluentes presentes em ambientes aquáticos, onde os metais pesados são contaminantes tóxicos e persistentes deste ecossistema. Seu monitoramento ambiental em águas é estritamente regulamentado (BRASIL, 2004; 2005; 2011), uma vez que estes metais têm sido

associados a várias patologias, pois seus traços são persistentes, tóxicos e bioacumulativos (DESHOMMES et al., 2016).

Dessa forma a importância da conservação dos recursos hídricos tem levado à necessidade de monitorar e controlar a contaminação destes ambientes. Níveis elevados de metais pesados, por exemplo, o chumbo, podem provocar mudanças de comportamento e comprometimento intelectual nos seres humanos, pois provoca alterações no sistema nervoso central (BEREZHETSKYY et al., 2008; DESHOMMES et al., 2016).

Para detecção destes metais pesados em águas, geralmente são empregados os métodos de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS - do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*), que é um dos equipamentos mais utilizados para análise de metais em níveis de parte por milhão (ppm), ou por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES - do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*), com a vantagem da determinação multielementar dos elementos em quantidades maiores, menores, traços e ultraços, sem mudanças nos parâmetros experimentais (ROBIN, 1988).

Porém estas técnicas são sofisticadas, a detecção é demorada, as etapas de pré-tratamento são complexas e necessita-se volumosas quantidades de amostra (50 – 200 mL). Uma alternativa seria o uso de nanobiossensores baseados em hastes ultra-sensíveis, chamadas cantileveres, que originam-se da microscopia de força atômica (AFM - do inglês *Atomic Force Microscope*), que estão apresentando resultados promissores na detecção de substâncias químicas, toxinas, poluentes e analitos em geral na micro e nanoescala, além de fornecerem recursos sensíveis para medir e mapear a informação química da superfície e quantificar as forças repulsivas e atrativas associadas a materiais inorgânicos e amostras biológicas, por meio de interações químicas entre o cantilever e a amostra (SMITH et al., 2003; LEITE; HERRMANN, 2005; STEFFENS et al., 2012; MUENCHEN et al., 2016; MARTINAZZO et al., 2018).

Entretanto, para atuar como excelentes nanobiossensores, os cantileveres necessitam ser recobertos com uma camada sensível (funcionalizados), a qual deve ser específica e capaz de reconhecer moléculas de interesse. A adsorção dessas moléculas no cantilever causa uma tensão superficial, resultando na curvatura do cantilever (deflexão) (VLADKOVA et al., 2009; SHARMA et al., 2010). A funcionalização consiste em ligar quimicamente à superfície do cantilever a uma camada de moléculas, cujos grupos funcionais reajam com o material biológico, de forma a imobilizá-lo na superfície. Dentre as técnicas que podem ser utilizadas para a funcionalização, encontra-se a de monocamadas automontadas (SAM - do inglês *Self-*

*Assembled Monolayers*), caracterizada pela formação espontânea de camadas ordenadas e organizadas sobre uma superfície sólida, por meio de interação entre grupos químicos (AWASTHI et al., 2016).

Para a detecção dos metais pesados várias enzimas têm sido utilizadas, dentre elas a urease e a fosfatase alcalina, por apresentarem grande potencial de aplicação como camada sensora, em razão de sua atividade ser inibida na presença desses metais e também já terem sido utilizadas como elemento de reconhecimento biológico em biossensores, apresentando como vantagem a detecção de baixas concentrações do analito ( $10^{-9}$  –  $10^{-21}$  g), alta sensibilidade, especificidade e resposta rápida (AYENIMO; ADELOJU, 2015).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de nanobiossensores de cantilever funcionalizado com enzimas comerciais (fosfatase alcalina e urease) para detecção de metais pesados ( $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$ ), em amostras de água, bem como, a aplicação dos mesmos em amostras reais.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver e aplicar um biossensor nanoestruturado baseado em cantilever funcionalizado com as enzimas fosfatase alcalina e urease para a detecção de metais pesados ( $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$ ) em águas.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Estudar o processo de funcionalização da superfície do cantilever com as enzimas comerciais, fosfatase alcalina e urease, por meio da técnica de monocamadas automontadas (SAM).
- Avaliar a resposta de voltagem dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados em função do tempo de contato em diferentes concentrações dos metais pesados ( $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$ ).
- Verificar a resposta dos nanobiossensores de cantilever quanto ao limite de detecção (LD), sensibilidade, reversibilidade e durabilidade.
- Caracterizar a camada sensora dos nanobiossensores de cantilever por meio das técnicas de espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização

(PM-IRRAS), microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

- Desenvolver metodologia para avaliar a qualidade das águas de rios que abastecem a bacia de captação de água de Erechim/RS, em relação a presença de chumbo, utilizando os nanobiossensores desenvolvidos.
- Avaliar o efeito matricial da água de rio nos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease.
- Comparar a técnica de detecção de metal pesado por nanobiossensor de cantilever com a técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS).

### 1.3 Referências bibliográficas

- AWASTHI, A. P.; GEUBELLE, P. H.; GRADY, M. E.; KIM, I. E.; SOTTOS, N. R. Nanoscale mechanical tailoring of interfaces using self-assembled monolayers. **Mechanics of Materials**, v. 98, p. 71-80, 2016.
- AYENIMO, J. G.; ADELOJU, S. B. Inhibitive potentiometric detection of trace metals with ultrathin polypyrrole glucose oxidase biosensor. **Talanta**, v. 137, p. 62–70, 2015.
- BEREZHETSKYY, A. L.; SOSOVSKA, O. F.; DURRIEU, C.; CHOVELON, J.-M.; DZYADEVYCH, S.V.; TRAN-MINH, C. Alkaline phosphatase conductometric biosensor for heavy-metal ions determination. **IRBM**, v. 29, n. 2–3, p. 136-140, 2008.
- BRASIL. **Portaria n° 518 em 25 de março de 2004**. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>> Acesso em: 25 de agosto de 2015.
- BRASIL. **Portaria n° 2914 de 12 de dezembro de 2011**. Ministério da Saúde. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html)> Acesso em: 25 de agosto de 2015.
- BRASIL. **Resolução n° 357, de 17 de março de 2005**. CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> Acesso em: 25 de agosto de 2015.
- DESHOMMES, E.; ANDREWS, R. C.; GAGNON, G.; MCCLUSKEY, T.; MCILWAIN, B.; DORÉ, E.; NOUR, S.; PREVOST, M. Evaluation of exposure to lead from drinking water in large buildings. **Water Research**, v. 99, p. 46-55, 2016.
- HOLT, M. S. Sources of Chemical Contaminants and Routes into the Freshwater Environment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 21-27, 2000.
- LEITE, F. L.; HERRMANN, P. S. P. Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: A review. **Journal of Adhesion Science Technology**, v. 19, p. 365–405, 2005.
- MAGALHÃES, P. C. **O custo da água gratuita**. In: *Ciência Hoje*, v. 36, n. 211, p.45-49, 2004.

- MARTINAZZO, J.; MUENCHEN, D. K.; BREZOLIN, A. N.; CEZARO, A. M.; RIGO, A. 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**, v. 53, p. 229-236, 2018.
- 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, p. 1659 – 1675, 2016.
- RICO, A.; VAN DEN BRINK, P. J.; GYLSTRA, R.; FOCKS, A.; BROCK, T.; Developing ecological scenarios for the prospective aquatic risk assessment of pesticides. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 12, p. 510–521, 2016.
- ROBIN, J. **The Determination of Traces Metals in Natural Waters**. IUPAC, West, T. S. & Nürnberg, H. W., London, p. 362, 1988.
- SHARMA, P.; GANDHI, S.; CHOPRA, A.; SEKAR, N.; RAMAN SURI, C. Fluoroimmunoassay based on suppression of fluorescence self-quenching for ultra-sensitive detection of herbicide diuron. **Analytica Chimica Acta**, v. 676, p. 87-92, 2010.
- SMITH, D. A.; CONNELL, S. D.; ROBINSON, C.; KIRKHAM, J. Chemical force microscopy: Applications in surface characterisation of natural hydroxyapatite. **Analytica Chimica Acta**, v. 479, p. 39–57, 2003.
- STEFFENS, C.; LEITE, F. L.; BUENO, C. C.; MANZOLI, A.; HERRMANN, P. S. P. Atomic Force Microscopy as a Tool Applied to Nano/Biosensors. **Sensors**, v. 12, 2012.
- VLADKOVA, R.; IVANOVA, P.; KRASTEVA, V.; MISRA, A. N.; APOSTOLOVA, E. Assessment of chlorophyll fluorescence and photosynthetic oxygen evolution parameters in development of biosensors for detection of q(b) binding herbicides. **Comptes Rendus De L Academie Bulgare Des Sciences**, v. 62, p. 355-360, 2009.

## CAPÍTULO II

### 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item será apresentada uma breve revisão da literatura sobre a contaminação do ambiente aquático por metais pesados, suas implicações na saúde humana e no meio ambiente. Posteriormente será discutido sobre os métodos mais comumente utilizados para a detecção destes metais pesados, e os avanços na área da nanotecnologia para se obter uma detecção mais precisa por meio de nanobiossensores de cantilever.

#### 2.1 Contaminação da água com micropoluentes

O conceito qualidade da água é muito mais amplo do que a simples caracterização da água pela fórmula  $H_2O$ . Isso porque a água, devido às suas propriedades de solvente e à sua capacidade de transportar partículas, incorpora a si diversas impurezas, as quais definem a qualidade da água, o qual é resultante de fenômenos naturais (estiagens, inundações, composição e estruturas geológicas, bem como as rochas preexistentes) e da atuação do homem (MHLONGO; MATIVENGA; MARNEWICK, 2018).

A água, um recurso indispensável para a sobrevivência humana e de todas as espécies vivas, é o constituinte inorgânico mais abundante na matéria viva: no homem, mais de 60% do seu peso são constituídos por água, e em certos animais aquáticos esta porcentagem sobe a 98% (VON SPERLING, 2005). Além disso, é um importante insumo para a grande maioria das atividades econômicas, nomeadamente da agricultura e da indústria, exercendo influência decisiva na qualidade de vida das populações, especialmente ao tanger a área do abastecimento, o qual tem forte impacto sobre a saúde pública (NETO; FERREIRA, 2007; BEHMEL et al., 2016).

A falta de manejo e controle industrial, com processos mal estruturados e licenças ambientais flexíveis quanto a categorização de emissões e volumes, têm sido um dos principais responsáveis pela contaminação das águas e dos solos, seja pela negligência no seu tratamento antes de despejá-las nos rios ou por acidentes e descuidos cada vez mais frequentes, que propiciam o lançamento de muitos poluentes nos ambientes aquáticos e terrestres (KAWAI et al., 2012). Sendo que a concentração, transporte, transformação e disposição final de um contaminante introduzido no ambiente aquático dependem, principalmente, das propriedades do ambiente e das características do contaminante (BEHMEL et al., 2016).

Um dos problemas que mais afetam o meio ambiente é a poluição química de natureza orgânica ou inorgânica, decorrente dos despejos residenciais e industriais. Estas emissões de contaminantes no ar, no solo e principalmente nas águas estão relacionadas principalmente às atividades humanas (HOLT, 2000; AGUIAR; NOVAES; GUARINO, 2002).

As fontes de poluição podem ser classificadas em pontuais e difusas. Um exemplo típico de uma fonte pontual é uma estação de tratamento de águas residuais. Fontes pontuais e difusas também diferem na maneira que os poluentes são liberados para o corpo receptor. Fontes pontuais geralmente resultam em descargas diretas para os cursos de água, enquanto que a rota para as fontes difusas podem envolver um caminho que resulta na deposição parcial antes de chegar ao curso de água. Além disso, as concentrações de contaminantes provenientes de fontes difusas podem variar significativamente com o tempo e o espaço que reflete tanto os padrões de uso sazonal e da contribuição relativa dos processos destino (HOLT, 2000; JADHAV; MARATHE; RATHOD, 2016).

Dentre as fontes pontuais podemos citar as estações de tratamento de efluentes industriais, redes de esgoto doméstico, derramamentos acidentais e mineração. As emissões de fontes pontuais são mais facilmente detectadas e controladas e, geralmente, resultam em descargas diretas dos contaminantes nos corpos d'água. Ao contrário, as emissões de fontes difusas que são de difícil controle, variam com o tempo e espaço e podem envolver rotas que resultem na deposição parcial dos contaminantes antes deles atingirem os corpos d'água. As principais fontes difusas estão relacionadas a falta de manutenção e controle de estruturas como redes de coleta de efluentes, lagoas de decantação e deposição de efluentes, estações de tratamento de efluentes sem manutenção e que geram infiltração, além de esterqueiras no meio rural. Um exemplo típico de fonte difusa é a utilização de pesticidas e adubação no solo (HOLT, 2000; NAPOLEÃO, 2011).

A contaminação por pesticidas, metais pesados, hormônios, o tratamento inadequado de efluentes industriais e a aplicação indiscriminada destes produtos têm contribuído para o agravamento de problemas ambientais, notadamente nos grandes centros urbanos (GONÇALVES JÚNIOR, 2013). Além disso, estes micropoluentes (pesticidas, metais pesados, hormônios) podem ainda ser encontrados na água mesmo após a realização dos tratamentos convencionais (NAPOLEÃO, 2011).

Entre os contaminantes mais importantes presentes em águas subterrâneas e superficiais, estão os metais pesados (como chumbo, arsênio, cádmio e mercúrio); agrotóxicos (nitratos, compostos organoclorados, organofosforados ou carbamatos) e compostos orgânicos

voláteis (como produtos combustíveis e solventes halogenados) (HU; KIM, 1994; CLARKE; KING, 2005).

O motivo da preocupação é que estes elementos são resistentes aos tratamentos convencionais de água. A biodegradação total dessas substâncias em cada ecossistema não fica garantida, visto que seus coadjuvantes também geram produtos de transformação que por sua vez interagem com a matéria orgânica em condições específicas. Podem, inclusive, tornarem-se cada vez mais tóxicos e recalcitrantes poluindo nossos recursos naturais mais caros: a água e os alimentos. Por isso, a água, mesmo tratada, pode conter contaminantes residuais que, ao atingir seus limites de concentração, passam a ser tóxicos (BERNSTEIN, 2013).

Estudos mostram que várias dessas substâncias são resistentes ao processo das estações de tratamento de esgoto (ETEs), permanecendo no meio ambiente por longos períodos. Isso pode acarretar dois sérios riscos à população e à natureza. O primeiro é a contaminação dos recursos hídricos; o outro é que esses produtos destroem os micro-organismos mais sensíveis, deixando vivos apenas os mais resistentes (KAWAI et al., 2012; BERNSTEIN, 2013).

## **2.2 Metais pesados**

Os metais pesados e/ou metais tóxicos possuem diversas definições encontradas na literatura para sua caracterização, porém segundo Duffus (2002), metais pesados são elementos químicos com elevado número atômico (maior que 20), elevada massa atômica (massa atômica igual ou maior a 23) e elevada massa específica, sendo maior ou igual a um determinado valor de referência que, em função de cada publicação, varia entre 3,5 e 7,0 g/cm<sup>3</sup>.

### **2.2.1 Implicações na saúde humana**

As principais implicações dos metais são: toxicidade aos seres humanos e a outras formas de vida animal e vegetal, dependendo da dose e da forma química. Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde as bactérias até mesmo o ser humano, mas eles são requeridos em baixas concentrações e podem danificar sistemas biológicos e são conhecidos como micronutrientes, caso suas concentrações ultrapassem a

chamada concentração limite eles se tornam tóxicos e com riscos para a saúde (VON SPERLING, 2005; KAWAI et al., 2012).

De acordo com Von Sperling (2005) e Kawai et al. (2012), os metais podem ser classificados como:

- Elementos essenciais: sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), níquel (Ni) e magnésio (Mg);
- Microcontaminantes ambientais: arsênico (As), chumbo (Pb), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), alumínio (Al), titânio (Ti), estanho (Sn) e tungstênio (W) (são encontrados naturalmente no solo em concentrações variáveis, porém são inferiores aquelas consideradas tóxicas para diferentes organismos vivos).
- Elementos essenciais e simultaneamente microcontaminantes: cromo (Cr), zinco (Zn), ferro (Fe), cobalto (Co), manganês (Mn) e níquel (Ni).

A maioria dos organismos vivos precisa apenas de alguns poucos metais, e em doses muito pequenas, caracterizando o conceito de micronutrientes, como é o caso do Zn, Mg, Co e Fe. Estes metais tornam-se tóxicos e perigosos para a saúde humana quando ultrapassam determinadas concentrações limite. O Pb, Hg e Cd são metais que não existem naturalmente em nenhum organismo, e tampouco desempenham funções nutricionais ou bioquímicas em microrganismos, plantas ou animais, ou seja, a presença destes metais em organismos vivos é prejudicial em qualquer concentração (VON SPERLING, 2005).

No ser humano, o metal pode produzir vários efeitos, resultados da ação sobre moléculas, células, tecidos, órgãos ou mesmo sistemas inteiros. Além disso, a presença de um metal pesado pode limitar a absorção de outros nutrientes essenciais à atividade do organismo. Os metais, não podendo ser metabolizados, permanecem no organismo e exercem seus efeitos tóxicos, combinando-se com um ou mais grupos reativos, os quais são indispensáveis para as funções fisiológicas normais. Dependendo do material envolvido e da intensidade da intoxicação, o efeito pode ser desde uma manifestação local na pele, membrana pulmonar ou trato intestinal, até efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos, ou mesmo a morte. Cabe ressaltar que o sinergismo é uma importante consideração em qualquer estudo sobre composto tóxico. Efeitos sinérgicos, em muitos casos, podem ser muito superiores à simples soma dos efeitos individuais (VON SPERLING, 2005; BERNSTEIN, 2013).

No entanto, nos tecidos vegetais o acúmulo de metais tóxicos provoca modificação em vários processos metabólicos da planta, como a redução na taxa fotossintética líquida, acarretando diminuição no crescimento e na produtividade, diminuição na concentração de

carboidratos solúveis totais, e ainda, um declínio significativo na concentração de proteínas e atividades enzimáticas, sugerindo uma possível interferência de íons metálicos na síntese de proteínas (ALMEIDA et al., 2007).

A Tabela 2.1 apresenta uma síntese das principais fontes de contaminação e efeitos sobre a saúde humana dos metais mais frequentes no meio ambiente, revelando os sistemas mais sensíveis à contaminação que são: sistema nervoso (central e periférico), sistema gastrointestinal, cardiovascular e sistema renal.

Tabela 2.1 – Síntese das fontes de contaminação e efeitos sobre a saúde humana dos metais mais frequentes no meio ambiente

<b>Metal</b>	<b>Fontes de contaminação</b>	<b>Efeitos sobre a saúde</b>
Cádmio	Farinhas refinadas, cigarros, materiais odontológicos, indústrias de aço, efluentes gasosos industriais, fertilizantes, materiais cerâmicos, solda, fundição. Derivados de cádmio são utilizados em pigmentos e pinturas, baterias, estabilizadores de PVC, reatores nucleares.	É cancerígeno, provoca elevação da pressão sanguínea e aumento do coração. Queda da imunidade. Aumento da próstata. Enfraquecimento ósseo. Dores nas articulações. Anemia. Enfisema pulmonar. Osteoporose. Perda de olfato.
Chumbo	Baterias de automóveis, tintas, combustíveis, vegetais tratados com agrotóxicos, cigarros, pesticidas, fertilizantes, poluição do ar.	Irritabilidade e agressividade, indisposição, dores de cabeça, convulsões, fadiga, sangramento gengival, dores abdominais, náuseas, fraqueza muscular, perda de memória, insônia, acidente vascular cerebral, alteração de inteligência, osteoporose, doenças renais. Afeta o sistema digestivo e reprodutor, e acarreta mutação genética.
Níquel	Utensílios de cozinha, baterias níquel – cádmio, jóias, cosméticos, óleos hidrogenados, trabalhadores de cerâmica, soldas.	Cancerígeno, pode causar: dermatite de contato, gengivite, erupções na pele, estomatite, tonturas, dores articulares, osteoporose e fadiga crônica.
Zinco	Metalurgia (fundição e refinação), indústrias recicladoras de chumbo.	Sensações como paladar adocicado e secura na garganta, tosse, fraqueza, dor generalizada, arrepios, febre, náuseas, vômito.
Alumínio	Água, queijos fundidos, farinha de trigo branca, painéis de alumínio, cosméticos, antiácidos, pesticidas e antitranspirante, fermento de pão, sal.	Constipação intestinal, perda de energia, cólicas abdominais, hiperatividade infantil, perda de memória, dificuldade de aprendizado, osteoporose, raquitismo e convulsões. Doenças relacionadas: Alzheimer e Parkinson.
Cobalto	Metalurgia (produção de ligas metálicas), sinterização e posterior usinagem do aço na produção de ferramentas e peças para maquinários, tais como brocas e discos para polimento, na produção de catalisadores e pigmentos.	É bem absorvido pelo trato gastrointestinal e pela via respiratória, podendo causar fibrose pulmonar, inflamação da nasofaringe ou rinite alérgica, produzir lesões no miocárdio, eczema e urticária na pele e, em casos mais graves, câncer no pulmão.

Fonte: Alves e Della Rosa (2003); Silva et al. (2005)

Devido as suas altas toxicidades, os níveis de metais pesados são duramente controlados nas legislações vigentes como, a Portaria 2914 do Ministério da Saúde, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, a Resolução do CONAMA N° 357, de 17 de março de 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, e dá outras providências, dentre outras legislações presentes no meio e a Portaria N° 518 de 25 de março de 2004 que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. A Tabela 2.2 apresenta os limites máximos permitido para o lançamento de metais pesados por estas legislações, onde os mesmos variam de 5 mg/L para o zinco e 0,0002 mg/L para o mercúrio.

Tabela 2.2 – Limites de lançamento de efluentes e de potabilidade de água de alguns metais

Metais pesados	Concentração em mg/L			
	Portaria N° 2914	Resolução N° 357 Classe 1-2      Classe 3		Portaria N° 518
Alumínio (Al)	0,2	0,1	0,2	0,2
Antimônio (Sb)	0,005	0,005	Não consta	0,005
Arsênio (As)	0,01	0,01	0,033	0,01
Cádmio (Cd)	0,005	0,001	0,01	0,005
Chumbo (Pb)	0,01	0,01	0,033	0,01
Cobalto (Co)	Não consta	0,05	0,2	Não consta
Cromo (Cr)	Não consta	0,05	0,05	0,05
Ferro (Fe)	Não consta	0,3	5,0	0,3
Mercúrio (Hg)	0,001	0,0002	0,002	0,001
Níquel (Ni)	0,07	0,025	0,025	Não consta
Selênio (Se)	0,01	0,01	0,05	0,01
Zinco (Zn)	5	0,18	5	5

Fonte: Brasil (2004, 2005, 2011)

### 2.2.2 Contaminação nos ecossistemas aquáticos

Alguns metais pesados, como já dito anteriormente, são substâncias altamente tóxicas e não são compatíveis com a maioria dos tratamentos biológicos de efluentes existentes. Dessa forma, efluentes contendo esses metais não devem ser descartados na rede pública, para tratamento em conjunto com o esgoto doméstico e industrial, pois na maioria das cidades, após o tratamento prévio, é permitido que as empresas emitam seus efluentes aos corpos receptores. Sendo que as principais fontes de poluição por metais pesados são provenientes dos efluentes industriais, de mineração e das lavouras (AGUIAR; NOVAES; GUARINO 2002).

De maneira geral, os metais que mais representam risco ambiental são, em ordem decrescente de toxicidade: Cd, Pb, Hg, Cr, Co, Cu, Ni, Zn e Al. Os três primeiros são os mais prejudiciais tanto ao homem quanto ao meio ambiente, enquanto cobre, cromo, zinco e níquel afetam os humanos por contato direto pois são muito utilizados na fabricação de diversos acessórios (adornos e utensílios domésticos) (VOLESKY, 2001).

Os metais pesados, também ocorrem no ambiente aquático sob diversas formas: em solução na forma iônica ou na forma de complexos solúveis orgânicos ou inorgânicos; formando ou ficando retidos às partículas coloidais minerais ou orgânicas, permanecendo retidos no sedimento incorporados à biotas. A interconversão entre essas diferentes formas é dependente, principalmente, das condições de pH, força iônica, temperatura, as presenças de ligantes disponíveis, da velocidade das correntezas e da atividade biológica. As formas em que os metais encontram-se em solução determinam o tratamento específico a ser escolhido ou a adaptação do tratamento convencional (JORDÃO et al., 1999; AGUIAR; NOVAES; GUARINO 2002; SCHULZ et al., 2015).

Estes metais podem ser introduzidos nos ecossistemas aquáticos de maneira natural ou artificial. Naturalmente, por meio do aporte atmosférico e chuvas, pela liberação e transporte a partir da rocha matriz ou outros compartimentos do solo onde estão naturalmente (PAULA, 2006). De modo artificial, por fontes antropogênicas de diversos ramos: esgoto *in natura* de zonas urbanas, efluentes de indústrias, atividades agrícolas, e rejeitos de áreas de mineração e garimpos (MORAES; JORDÃO, 2002; GOMES; SATO, 2011; ARENAS-SÁNCHEZ; RICO; VIGHI, 2016).

A agricultura constitui uma das mais importantes fontes não pontuais de poluição por metais em corpos d'água. A aplicação de agroquímicos aos solos e culturas se tornou uma prática comum na agricultura. Os principais objetivos do uso desses agroquímicos são o

aumento do suprimento de nutrientes, correção do pH do solo, através do uso de fertilizantes e corretivos (Cd, Cr, Pb e Zn) e a proteção das lavouras pelo controle de doenças e pragas utilizando agrotóxicos (Mn, Cu, Pb e Zn). Além disso, os preservativos de madeira (Cu e Cr) e dejetos de produção intensiva de bovinos, suínos e aves (Cu, As e Zn) contribuem ainda mais para a degradação química do solo, como resultado do acúmulo de elementos e/ou compostos tóxicos em níveis indesejáveis (RAMALHO; SOBRINHO; VELLOSO, 2000; PEDROSO; LIMA, 2001; SANTOS et al., 2002; DATRY; BONADA; HEINO, 2016).

Estes metais lançados no solo, principalmente a partir desta atividade, são lixiviados para os rios pelo escoamento de águas superficiais provenientes das chuvas, persistindo no meio aquático, podendo também ocorrer a contaminação de águas subterrâneas, dessa forma causando outros problemas ambientais (RIBEIRO-FILHO et al., 2000; VINODHINI; NARAYANAN, 2008).

Vários mananciais necessitam de estudo da geologia prevendo esta forma de contaminação, gerando zonas de controle de usos antrópicos devido ao potencial de infiltração e transporte das águas contaminadas pelos sistemas fraurados.

Dependendo da espécie metálica, a disponibilidade de absorção do elemento e sua acumulação pela biota irão variar, prejudicando, assim, o ecossistema, pois os metais possuem características atômicas peculiares, dando-lhes elevada resistência à degradação química, física e biológica no sistema aquático. Isto os leva a persistirem no ambiente aquático por muito tempo, mesmo depois da proibição de sua utilização ou despejo nos cursos d'água (MORTIMER, 2000; MORAES; JORDÃO, 2002). Por exemplo, elementos como o cromo, que não se decompõem, ou que apresentam baixa degradabilidade, se acumulam no meio ambiente, sendo transferidos através da cadeia alimentar (MERLINO et al., 2010).

Para acompanhar o destino de espécies metálicas depois de entrar no ecossistema torna-se muito difícil, pelo fato de se moverem de uma camada trófica ecológica para outra. Estes metais podem se acumular em tecidos vivos ao longo da cadeia alimentar dos seres humanos, multiplicando o perigo de eventualmente os seres humanos tenderem a receber os problemas associados com a toxicidade dos metais pesados pré-concentrados de muitas direções diferentes. Portanto controlar as descargas de metais pesados de soluções aquosas tornou-se um desafio (VOLESKY, 2001; RICO et al., 2016).

### 2.3 Detecção dos metais pesados

Ao longo do tempo estudos vêm demonstrando a importância da análise histórica das concentrações de metais pesados em águas superficiais. Isto, possibilita o modelamento de emissões e deposição nas décadas passadas, indo ao encontro de estratégias de controle na emissão de metais pesados e monitoramento, que são de suma importância para saúde dos seres vivos e também do meio ambiente (HUNGSPREUGS et al., 1990; YABE; OLIVEIRA, 1998; RICO et al., 2016).

Várias técnicas foram surgindo ao longo do tempo para detecção dos metais pesados. As técnicas multielementares como espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), que apresenta capacidade multielementar e determina com boa sensibilidade elementos refratários, e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado ou ICP-MS (do inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry*), que é uma técnica para a determinação de elementos em nível de traços e para análises isotópicas, porém um dos aspectos críticos para esta técnica é a ocorrência de severos processos de interferências matriciais, que exige criteriosa seleção de condições de calibração (CORNELIS et al., 2003; CADORE; MATOSO; SANTOS, 2008).

Ainda é possível detectar metais através das técnicas monoelementares como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), que é uma técnica de fácil operação e com um custo relativamente reduzido em comparação com as técnicas anteriormente citadas, onde a célula de atomização é a chama, porém possui uma baixa sensibilidade, principalmente para os elementos mais refratários, tratando-se de uma técnica ideal para análise elementar em níveis de mg/L (HARRIS, 2005). A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite ou GF AAS (do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*), difere da FAAS principalmente em relação ao sistema de introdução de amostras e à célula de atomização que, ao invés de uma chama, consiste em um tubo de grafite. A GF AAS apresenta limites de detecção da ordem de µg/L e, além da sensibilidade, apresenta vantagens em relação à FAAS pelo reduzido volume de amostra requerido e também pelo baixo consumo de gases (argônio) (SETTLE, 1997).

As técnicas de ICP OES, FAAS e GF AAS possuem procedimentos bem estabelecidos e bastante utilizados em laboratórios de pesquisa, desenvolvimento e prestação de serviços. No entanto, as técnicas de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), a espectrometria de emissão com plasma induzido por laser ou LIBS (do inglês *Laser Induced Breakdown Spectrometry*), a fluorescência de Raios-X ou XRF (do inglês X-

*ray Fluorescence*) e a análise por ativação com nêutrons ou NAA (do inglês *Neutron Activation Analysis*) também são utilizadas, porém em menor escala, devido a diferentes fatores como complexidade da técnica, custo operacional, limite de detecção, etc (CADORE; MATOSO; SANTOS, 2008).

Além destas técnicas possuem diferentes procedimentos para a análise dos metais, elas também se diferenciam pelo nível de detecção, que é particular de cada técnica e também pode variar conforme a marca e modelo do equipamento. Dessa forma a escolha de uma técnica analítica adequada para a determinação de elementos metálicos depende de vários fatores: preparo de amostra, limite de detecção das técnicas disponíveis, precisão, exatidão, faixa de concentração, interferências e tempo de análise (CADORE; MATOSO; SANTOS, 2008). Além disto, deve ser considerado as condições de complexidade que prevalecem em torno do meio ambiente devido à forte toxicidade dos metais pesados, o qual devem ser acoplados com novas abordagens de detecção, utilizando diferentes instrumentações para sua detecção mais seletiva. Para superar as limitações dos métodos comumente utilizados e melhorar os limites de detecção os nanobiossensores podem ser empregados trazendo uma análise quantitativa rápida e com melhor sensibilidade, pois mesmo concentrações muito baixas de metais pesados têm elevada afinidade com o DNA e sua interação pode conduzir a mutações e só a detecção ultra-sensível destes metais, por meio da nanotecnologia, é possível obter resultados bastante significativos (GUMPUA et al., 2015).

## **2.4 Nanotecnologia**

Nanotecnologia consiste na habilidade de manipular a matéria em nanômetros para criar estruturas com uma organização molecular diferenciada. Nanômetro (nm) é uma unidade de medida que corresponde à bilionésima ( $10^{-9}$ ) parte do metro, com comprimentos típicos que não excedam 100 nm em comprimento em pelo menos uma direção. É tipicamente o tamanho de uma molécula pequena. Para se ter uma idéia, os átomos têm dimensões de aproximadamente 0,1 a 0,4 nm, já um vírus tem de 10 a 100 nm (PINA et al., 2006; USKOKOVIC, 2007).

As três principais áreas nas quais podemos esperar grandes benefícios provenientes da nanotecnologia são: na prevenção de poluição ou dos danos indiretos ao meio ambiente, no tratamento ou remediação de poluição e na detecção e monitoramento de poluição, o qual a nanotecnologia vem permitindo a fabricação de sensores cada vez menores, mais seletivos e

mais sensíveis para a detecção e monitoramento de poluentes orgânicos e inorgânicos no meio ambiente (MUENCHEN et al., 2016; MARTINAZZO et al., 2018).

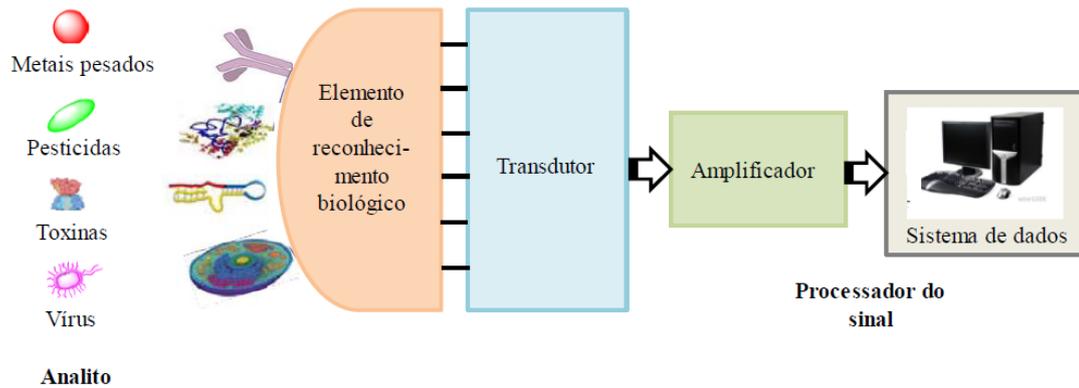
Avanços em nanosensores para a detecção de poluentes implicam diretamente em um melhor controle de processos industriais, na detecção mais precoce e precisa da existência de problemas de contaminação, no acompanhamento, em tempo real, do progresso dos procedimentos de tratamento e remediação de poluentes, em um monitoramento mais efetivo dos níveis de poluentes em alimentos e outros produtos de consumo humano, na capacidade técnica de implementar normas ambientais mais rígidas, etc (QUINA, 2004; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012).

Já a nanobiotecnologia é um ramo da nanotecnologia que funde a ciência dos materiais com as ciências biológicas, gerando conhecimento e desenvolvimento de novos materiais, produtos e processos baseados na crescente capacidade da tecnologia moderna de ver e manipular átomos e moléculas (PINA et al., 2006; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012).

Vindo ao encontro da nanobiotecnologia, surgem os nanobiossensores, que podem ser definidos como sendo qualquer material sensível utilizado para transmitir informações químicas, físicas ou biológicas sobre nanomateriais e moléculas. Eles também podem ser definidos como dispositivos moleculares de análises que incorporam um elemento de sensoriamento associado a um sistema de transdução que permite processar o sinal produzido pela interação entre o elemento sensor e o analito (RUMAYOR et al., 2005).

Dessa maneira, o princípio de funcionamento de um biossensor está fundamentado na utilização de um sistema que contém dois componentes: o biorreceptor, que pode ser um organismo vivo ou produtos derivados de sistemas biológicos (enzimas, anticorpos, DNA, etc), sendo este, o elemento de reconhecimento que permite ocorrer a reação bioquímica ou a ligação específica com o alvo (amostra-analito); e o transdutor, que recebe o sinal produzido entre o biorreceptor e a amostra, e o quantifica, gerando o resultado em um sinal mensurável e o sistema eletrônico de amplificação de sinal e gravação de dados (GASPAR, 2010), conforme mostrado na Figura 2.1. Com base nisso, os nanobiossensores são biossensores que utilizam e detectam fenômenos físicos, químicos, biológicos e quânticos na nanoescala (BUENO, 2013).

Figura 2.1 – Representação esquemática de um biossensor exposto a contaminantes



Fonte: Adaptado de Long, Zhu, Shi (2013)

De acordo com Rumayor et al. (2005), os nanobiossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de interação estabelecida entre o elemento de reconhecimento e o analito, o método utilizado para detectar tal interação, a natureza do elemento de reconhecimento ou sistema de transdução.

Por meio de diversas combinações entre esses parâmetros, podem surgir diferentes tipos de nanobiossensores que são definidos e categorizados por seus diferentes alvos de detecção, materiais que os compõem e pelos sinais que utilizam para transmitir informação (Tabela 2.3) (SWIERCZEWSKA et al., 2012).

De acordo com a teoria que envolve os nanobiossensores, os componentes mostrados na Tabela 2.3 se ajustam a várias combinações. Contudo, na prática, a escolha da molécula biológica sensorial depende dos atributos da molécula alvo de interesse.

Tabela 2.3 – Principais componentes que originam os nanossensores

Nanossensores		
Sinal	Sensor e/ou Camada Sensora	Moléculas Alvo
Óptico		Anticorpos
Mecânico	Nanobiossensor de cantilever	Peptídeos
Piezoelétrico		Enzimas
Elétrico	Nanopartículas metálicas/ magnéticas	Moléculas biológicas diversas
Magnético	Nanotubos	Analitos inorgânicos
Eletroquímico	Nanocanais	Aptâmero

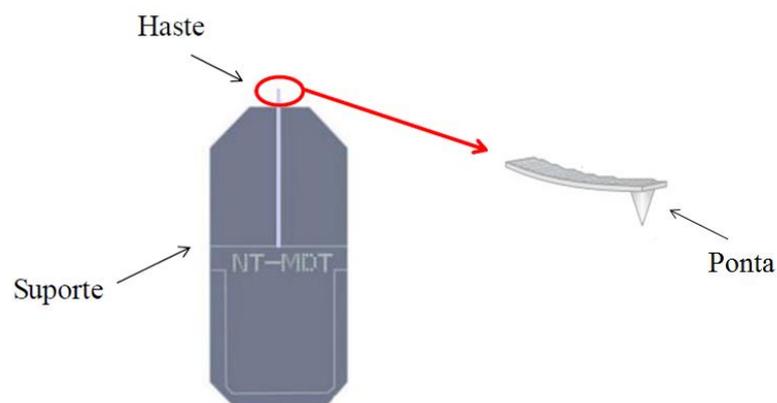
Fonte: Swierczewska et al. (2012)

## 2.5 Nanobiossensores de cantileveres

Existe uma família de microscópios de varredura por sonda ou SPM (do inglês *Scanning Probe Microscope*) entre os quais é possível citar o Microscópio de Tunelamento ou STM (do inglês *Scanning Tunneling Microscope*) e o Microscópio de Força Atômica (AFM). Essa classe de microscópios tem como componente essencial uma ponta ou sonda acoplada a um cantilever que varre a superfície da amostra detectando mudanças em seu relevo por meio de variações de grandezas físicas (PINTO; RAMOS; FONSECA FILHO, 2013).

O cantilever utilizado em AFM consiste de uma haste fina e flexível e em sua parte inferior contém uma agulha piramidal, cujo raio do vértice final da ponta apresenta uma dimensão de alguns nanômetros (Figura 2.2). Os cantileveres são acoplados a um “chip”, pastilha ou suporte. O “chip” pode conter uma ou mais hastes de silício ou de nitreto de silício que apresentam em média um comprimento entre 100 a 500  $\mu\text{m}$ , espessura entre 0,5 a 5  $\mu\text{m}$  e a ponta tem que terminar em um conjunto de átomos, para alcançar resolução atômica. Podem ter formato “V” (triangular) ou “T” (retangular). Além disso a fabricação dos cantileveres consistem de tecnologias de processamento de filmes finos bem estabelecidos que fornecem baixo custo, alto rendimento e boa reprodutibilidade (CARRASCOSA et al., 2006; FERREIRA; YAMANAKA, 2006).

Figura 2.2 – Dispositivo responsável pelas medidas de AFM, bem como de sensoriamento na nanoescala, constituído de um cantilever e uma ponta

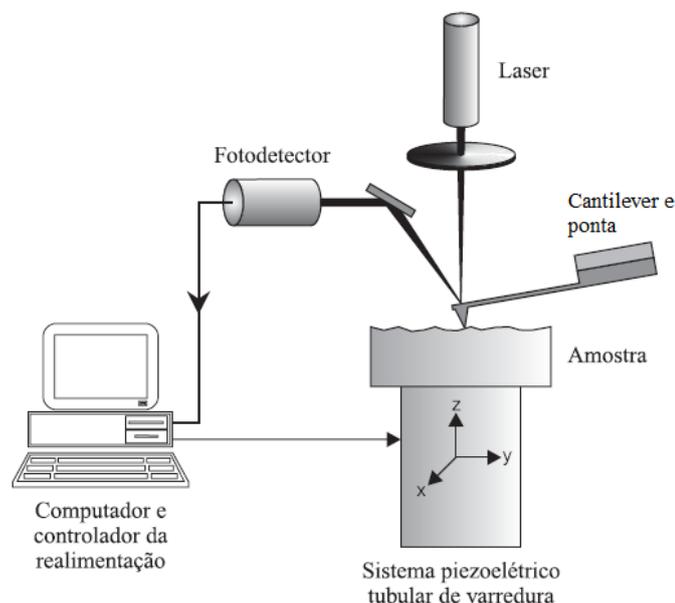


Fonte: Nanosensors. Disponível em: <<http://www.nanosensors.com>>

O princípio de funcionamento do AFM baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal, integrada ao cantilever, sendo este o componente básico do AFM. Esta varredura é feita, por intermédio de um sistema piezoelétrico, com deslocamento, nas posições x, y e z com precisão de décimo de Angstrom, o que se dá por meio da variação

da tensão aplicada no mesmo. O deslocamento é controlado por um circuito de realimentação cuja função é manter a força e/ou altura constante. Sendo que as forças envolvidas são da ordem de  $10^{-12}$  N, um sistema de detecção ultra sensível. Um sistema óptico, com feixe a laser incide sobre a parte superior do cantilever, que o reflete para um fotodetector de quatro quadrantes, responsável por medir as variações de posições produzidas pelo seu movimento – deflexão ou frequência de ressonância. Com os dados da deflexão do cantilever nos eixos x, y e z, reconstrói-se a imagem por intermédio de um *software*, transformando em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais, como pode ser observado na Figura 2.3 (HERRMANN et al., 1997; FERREIRA, YAMANAKA, 2006; VAHABI, SALMAN, JAVANMARD, 2013; CUBILLAS, ANDERSON, 2014). A fim de aumentar a refletividade da superfície do cantilever, o mesmo é frequentemente revestido por uma fina camada de ouro (20 – 80 nm) (RAITERI et al., 2001).

Figura 2.3 – Ilustração do princípio de funcionamento do AFM



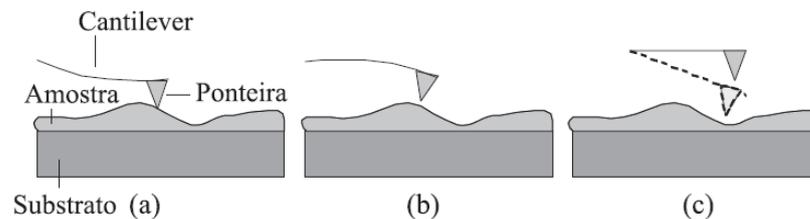
Fonte: Herrmann et al. (1997)

De acordo com a distância existente entre a ponta do cantilever e a amostra, o microscópio de força atômica pode ser operado de três modos diferentes (Figura 2.4) (FERREIRA, YAMANAKA, 2006; OLIVEIRA et al., 2012):

- No modo contato (distância inferior a 0,5 nm): o cantilever é mantido a poucos ângstrons da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é repulsiva.

- No modo de não-contato (distância 0,1 a 10 nm): a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa. Este modo não sofre os efeitos do atrito sobre a amostra.
- O modo contato intermitente (distância entre 0,5 e 2 nm): a ponta vibrante fica mais próxima da amostra, de forma que tenha um contato intermitente e é utilizado para contornar as limitações impostas pelo modo contato.

Figura 2.4 – Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não-contato e (c) modo intermitente



Fonte: Ferreira e Yamanaka (2006)

O AFM não se limita apenas à obtenção de imagens, sendo uma técnica poderosa que também permite a análise de forças e propriedades em escala nanométrica (HERRMANN et al., 1997; FERREIRA; YAMANAKA, 2006).

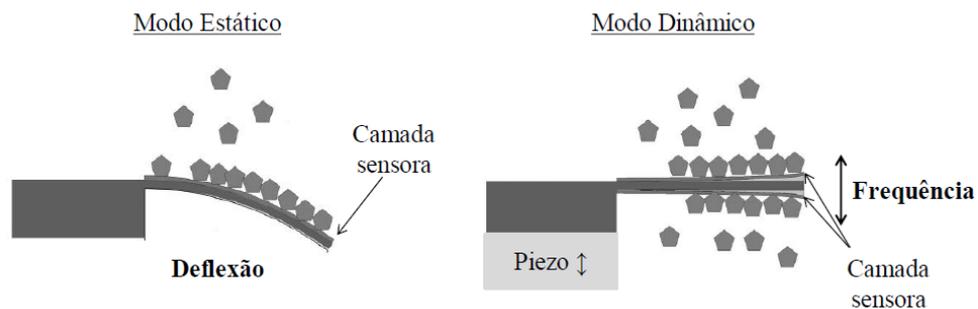
Por conseguinte, sensores de cantileveres de AFM têm recebido uma maior atenção nos últimos anos por apresentarem alta sensibilidade em área pequena, podendo detectar substâncias em escalas de nanograma (ng) ( $10^{-9}$  g), picograma (pg) ( $10^{-12}$  g), femtograma (fg) ( $10^{-15}$  g), attograma (ag) ( $10^{-18}$  g) e até zeptograma (zg) ( $10^{-21}$  g), quando comparados com outros biossensores, além de serem dispositivos versáteis e compactos (SWIERCZEWSKA et al., 2012; UZUNLAR et al., 2013; TOUHAMI, 2014; MUENCHEN et al., 2016).

Com o desenvolvimento destes nanobiossensores de cantilever, utilizando tecnologias de nanofabricação maximizando as vantagens que os dispositivos miniaturizados oferecem, a fim de integrar o baixo custo e a eficiência desses sistemas, é possível fazer uma varredura de superfícies, e medir a interação e reconhecimento de analitos (BASHIR, 2004).

Neste contexto, sabe-se que os cantileveres são baseados na tecnologia do silício ( $\text{SiO}_2$ , Si,  $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) e que não possuem, por si só, características de sensoriamento. Para capacitar tais materiais a serem sensores altamente seletivos e sensíveis, geralmente suas superfícies são modificadas quimicamente (funcionalizadas), para dessa forma atuarem como sensores de alta qualidade sensitiva, podendo ser capaz de reconhecer moléculas de interesse. A adsorção dessas moléculas na haste causa uma tensão na superfície resultando na curvatura

do cantilever (LANG; HEGNER; GERBER, 2010) se a mesma ocorrer preferencialmente em um dos lados da superfície. A adsorção seletiva geralmente é controlada funcionalizando-se somente a superfície superior do cantilever (LANG; GERBER, 2008). Dessa forma, os biossensores de cantilever também podem ser distinguidos por dois modos principais de operação: o modo estático e o modo dinâmico (HEGNER; ARNTZ, 2004) (Figura 2.5).

Figura 2.5 – Principais modos de operação de um biossensor de cantilever



Fonte: Adaptado de Hegner e Arntz (2004)

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

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

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

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):

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

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

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

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

No modo dinâmico, a superfície do cantilever é funcionalizada em ambos os lados, e o resultado da adsorção do analito é a alteração da massa, o que induz a uma diminuição na frequência de ressonância, que é o resultado do movimento vibratório do cantilever (TAMAYO et al., 2013). O cantilever comporta-se como um oscilador harmônico, ou seja, como um sistema oscilador massa-mola ideal. Para um cantilever retangular, a frequência de ressonância ( $f_0$ ) é descrita pela 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:

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

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).

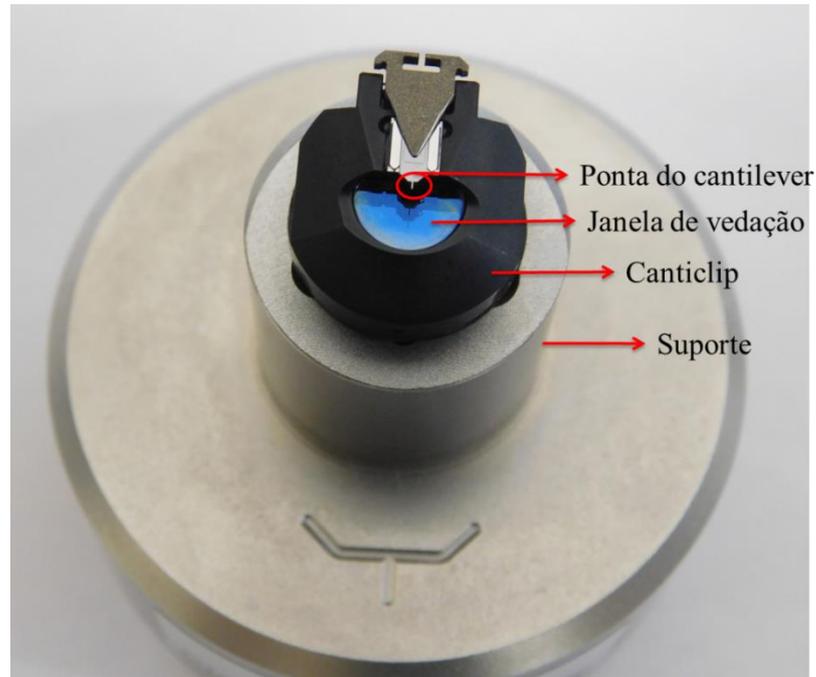
Por meio destes princípios, os cantileveres podem ser utilizados como elemento sensorial para detectar tanto analitos inorgânicos, como orgânicos, podendo ser construídos por meio da funcionalização química de sua superfície com elementos de sensoriamento biológicos (biomoléculas) ou biomiméticos, constituindo os nanobiossensores (RUMAYOR et al., 2005; FRANCA et al., 2011).

Para aplicações em diferentes amostras os sensores de cantilevers podem ser utilizado em ambiente líquido, ar e vácuo (TAMAYO et al., 2013). Quando o cantilever está imerso em meio líquido, o efeito do amortecimento torna difícil acompanhar o deslocamento de frequência de ressonância, entretanto, a resposta de deflexão permanece inalterada pela presença de um meio líquido, o que justifica o modo estático ser a operação ideal quando o sensor de cantilever for usado nesse ambiente (CHAUDHARY, GUPTA, 2009).

### 2.5.1 Operação em meio líquido

O funcionamento 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. 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, recobrando o cantilever por completo. A primeira abordagem tem a vantagem de uma massa menor (gotícula) adicionada ao porta amostra, mas isso pode ocasionar a evaporação, o que resulta em uma mudança na concentração de solventes. Utilizando vários mililitros de solução, as concentrações são mantidas praticamente constantes. O suporte 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, conforme pode-se observar na Figura 2.6 (BARÓ; REIFENBERGER, 2012).

Figura 2.6 – Canticlip utilizado 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. 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, pode mudar de acordo com a natureza química do líquido (força iônica) ou devido à funcionalização da ponta (CUBILLAS et al., 2014).

#### 2.5.1.1 Métodos de detecção de analitos em meio líquido

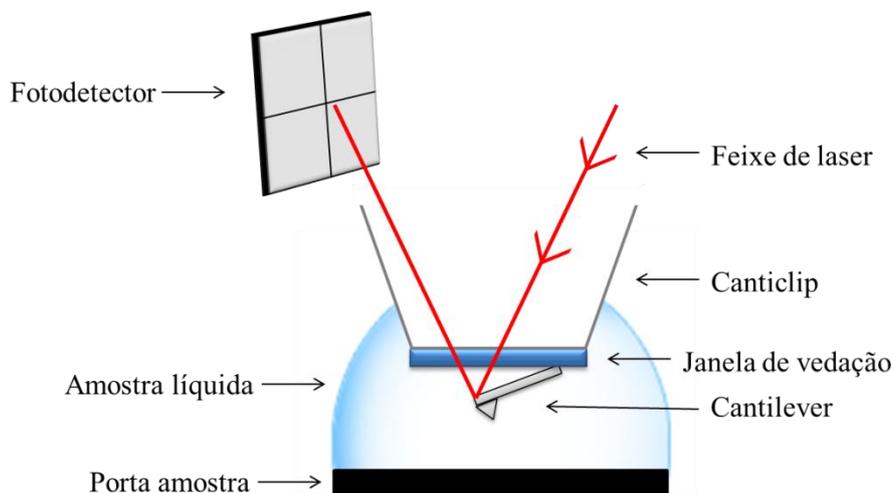
Para operação em meio líquido um feixe de laser é ajustado na extremidade do cantilever que possui uma ponta, cujas propriedades geométricas e materiais possibilitam a sondagem da força com alta sensibilidade. O papel do laser é traduzir a força que atua na

ponta em uma deflexão que pode ser posteriormente monitorada por tunelamento de elétrons, capacitância, piezoelétrico, interferometria óptica e deflexão do feixe óptico. 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).

Porém, na 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 algum ruído (LAVRIK; SEPANIAK; DATSKOS, 2004).

Como pode ser observado na Figura 2.7, este problema é resolvido utilizando um canticlip com uma janela transparente de vedação. 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 2.7 – Leitura da deflexão do cantilever em 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. As considerações sobre as medidas neste meio começam com o fator de qualidade  $Q$ , que é inversamente proporcional à constante de amortecimento do meio

sobre o sistema. Quanto maior for o fator  $Q$ , menor é a dissipação de energia no sistema. Quando o AFM é operado no vácuo, o fator de qualidade pode ser muito alto. Quando operado no ar,  $Q$  permanece entre 10 e 1000, já dentro de soluções aquosas, raramente se verifica  $Q$  maior do que 10 (BARÓ; REIFENBERGER, 2012).

Trabalhando em modo dinâmico em meio líquido, envolve um maior grau de sofisticação no *design* dos componentes do AFM. A maneira mais comum de oscilar um cantilever no ar ou vácuo é usar a condução acústica, em que um pequeno elemento piezoelétrico com uma frequência de ressonância alta está localizado logo abaixo da ponta do cantilever. Trabalhar em líquido não é 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 uma “floresta de 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 da “floresta de 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 nanobiossensores de cantileveres**

Para atuar como sensores, os cantileveres necessitam ser recobertos com uma camada sensitiva (funcionalizados), a qual deve ser específica e capaz de reconhecer moléculas de interesse (LANG; HEGNER; GERBER, 2010). Sendo este, um dos maiores desafios nesse processo, pois além de adaptar o revestimento do biossensor de modo que as biomoléculas fiquem firmemente ligadas à superfície do sensor, o mesmo deve permanecer funcional como no seu ambiente natural (NUGAEVA et al., 2005).

A funcionalização do cantilever pode ser aplicada para o estudo de análise de amostras biológicas, quantificação de forças de interações intermoleculares (NUGAEVA et al., 2005),

monitoramento de reações químicas em tempo real na superfície das pontas (DORDI et al., 2004) e detecção de substâncias (WAGGONER; CRAIGHEAD, 2007). Esta técnica é ideal no desenvolvimento de nanobiossensores, pois tem a possibilidade de identificação de uma única molécula em um substrato, e também apresentam resposta rápida e seletiva (NOY et al., 1995).

### 2.6.1 Agentes biológicos

A escolha do material biológico é a primeira etapa para a confecção de biossensores. O elemento biológico deverá reagir seletivamente com o analito a ser determinado (FATIBELLO-FILHO; CAPELATO, 1992). O sistema de reconhecimento biológico transforma as informações do domínio bioquímico, gerando sinais químicos ou físicos com sensibilidade definida. O principal propósito deste sistema é permitir ao sensor um elevado grau de seletividade para uma determinada espécie de interesse analítico. Os elementos biológicos mais regularmente empregados são as enzimas, que podem ser utilizadas na sua forma purificada, estarem presentes em microorganismos ou em porções de tecido animal ou vegetal. As enzimas são proteínas que catalisam reações químicas nos seres vivo e são usadas em reações em conjunto a um substrato específico (CUNNINGHAM, 1998).

A utilização de enzimas na construção de biossensores apresenta como vantagens a formação de complexos estáveis com a espécie de interesse, sensibilidade, respostas rápidas e baixo custo, detecção de baixas concentrações do analito, número variável de enzimas disponíveis comercialmente, além de uma variedade de metodologias empregadas na construção destes sensores biológicos, porém podem perder atividade após imobilização e são estáveis por um período relativamente curto de tempo (RUMAYOR et al., 2005).

Outra vantagem importante é o fato de reações enzimáticas serem altamente específicas, possuindo um grande potencial catalítico, superior a qualquer catalisador sintético, possibilitando que biossensores baseados nestes biocatalizadores sejam utilizados mesmo na presença de outras substâncias na amostra. Tornam-se assim desnecessários os processos de separação e purificação das amostras muitas vezes necessários em análises químicas. Ainda que a atividade enzimática seja reduzida até certo ponto pela imobilização (FERNANDES, 2005).

Neste contexto, um elevado grau de interesse na utilização de biossensores enzimáticos, para análises de rastreio de metais pesados, têm sido demonstrados por um grande número de estudos. Entre as várias abordagens para biossensoriamento de detecção de

metais pesados, a inibição da atividade enzimática tem sido escolhida por ser de detecção simples e rápida de íons metálicos (AYENIMO; ADELOJU, 2015; MEHTA et al., 2016).

O princípio de inibição da atividade enzimática na presença de metais pesados é importante no desenvolvimento desta classe de biossensores. Ensaio baseado em inibição enzimática oferecem seletividade e sensibilidade melhoradas devido à ligação específica dos inibidores, no caso os metais, com enzima. Sendo que a redução consequente da atividade da enzima pode ser lida como um sinal, que pode ser convenientemente amplificado para atingir a sensibilidade do sensor desejado. A inibição da atividade enzimática baseia-se, pelo menos em parte, na ligação dos íons metálicos com os grupos sulfidrilo presentes no sítio ativo da enzima (VEL KRAWCZYK; MOSZCZYŃSKA; TROJANOWICZ 2000; MEHTA et al., 2016).

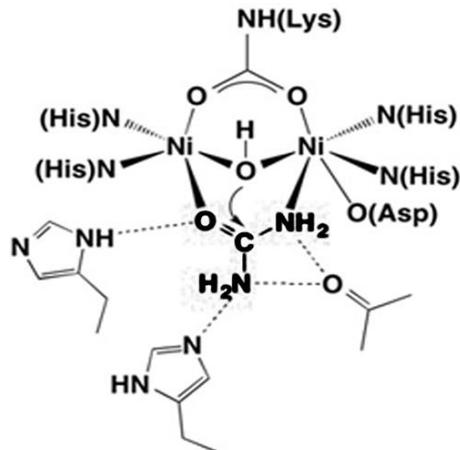
Em muitos casos as enzimas inibidas através da interação com os metais pesados podem ser regeneradas por tratamento com agentes quelantes, tais como, por exemplo, EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético). Desta forma, a enzima imobilizada pode ser reutilizada, tornando a sua aplicação economicamente viável (POGORILYI et al., 2016).

Várias enzimas têm sido exploradas para a biossensoriamento de metal pesado incluindo a fosfatase alcalina, catalase, glucose-oxidase, peroxidase, invertase, acetilcolinesterase, xantina oxidase, urease, butirilcolinesterase, ascorbato oxidase, desidrogenase isocítrica, polifenoloxidase, entre outras (PIRVUTOIU et al., 2002; OGOŃCZYK et al., 2005; KONCKI; RUDNICKA; TYMECKI, 2006; AYENIMO; ADELOJU, 2015; MEHTA et al., 2016). Porém, as enzimas mais amplamente divulgadas para a determinação de metais pesados são urease e a fosfatase alcalina (AYENIMO; ADELOJU, 2015).

A urease (EC 3.5.1.5) é amplamente distribuída em bactérias, fungos e plantas, e se apresenta como um elemento de detecção enzimática popular na detecção de vários metais pesados (mercúrio, cádmio, cobalto, chumbo, etc.) em amostras de água, isto se deve ao seu custo benefício e alta sensibilidade, o que explica seu sucesso na aplicação prática (VEL KRAWCZYK et al., 2000; BEREZHETSKYY et al., 2008; MEHTA et al., 2016; POGORILYI et al., 2016). Esta enzima pertence ao grupo das aminohidrolases, possui dois átomos de Ni no seu sítio ativo, onde o primeiro centro metálico de Ni da urease é coordenado a dois átomos de nitrogênio histidínicos e um átomo de oxigênio do aminoácido lisina. A esfera de coordenação do segundo átomo de Ni é composta por dois átomos de nitrogênio histidínicos e por três átomos de oxigênio, sendo dois deles provenientes de resíduos dos

aminoácidos aspartato e lisina e um proveniente de uma molécula de água (FOLLMER; CARLINI, 2005), conforme observado na Figura 2.8.

Figura 2.8 – Molécula da urease

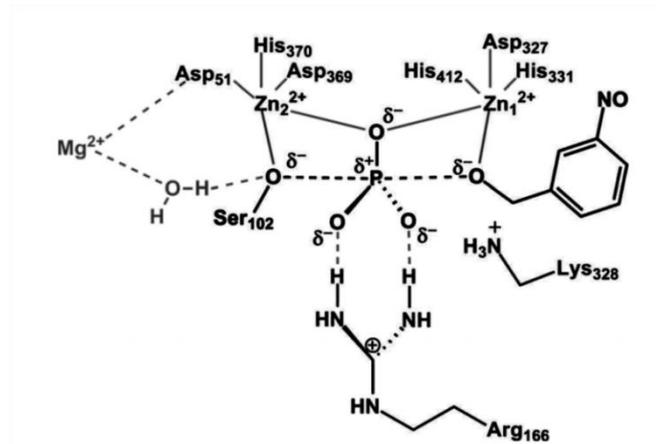


Fonte: Proteopedia. Disponível em: < <http://www.proteopedia.org> >

Por sua vez, a fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1) é uma das hidrolases mais estudadas (STEC et al., 2000) dentre os catalisadores de íons metálicos, sua utilização é amplamente reportada na determinação de metais pesados em água, onde a mesma é imobilizada em diversas matrizes para o desenvolvimento de biossensores para detecção de metais como Cd, Co, Zn, Ni e Pb em água (BEREZHETSKYY et al., 2008).

A fosfatase alcalina compreende uma ampla classe de enzimas distribuídas em células de diversos mamíferos (associadas com as membranas celulares) e bactérias (COLEMAN, 1992). Independentemente de sua origem, esta enzima é uma metaloenzima e cada sítio catalítico contém três íons metálicos (dois íons de Zn e um íon de Mg), necessários para a atividade da enzima (DUARTE; AMREIN; KAMERLIN, 2013). A Figura 2.9 ilustra a conformação da fosfatase alcalina.

Figura 2.9 – Molécula da fosfatase alcalina



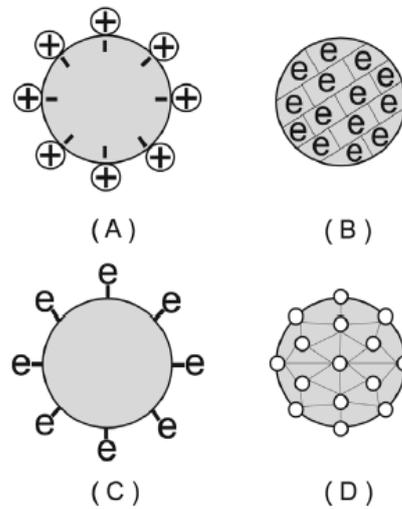
Fonte: Duarte, Amrein e Kamerlin (2013)

A estabilidade dessas enzimas também é um fator limitante para o tempo de vida da mesma que irá atuar como um biossensor e várias técnicas têm sido utilizadas para não comprometer esse tempo de vida, entre elas a mais comumente utilizada é a imobilização. No projeto de biossensores enzimáticos é importante que seja encontrado um método adequado de imobilização enzimática que se tenha alta atividade enzimática e estabilidade, evitando o processo de desnaturação (RUMAYOR et al., 2005).

### 2.6.2 Imobilização das biomoléculas sobre a superfície sensora

Para a construção de biossensores mais sensíveis e robustos é essencial a incorporação estável dos elementos de reconhecimento com uma comunicação direta entre biomoléculas e a superfície do sensor. Isso porque os biocomponentes, quando imobilizados, precisam reter a maior parte de sua atividade biológica, para que o biossensor possa apresentar sensibilidade significativa para o composto alvo. Dessa forma, a imobilização consiste em uma etapa crítica na construção de qualquer biossensor. Diversos procedimentos têm sido empregados na construção de biossensores enzimáticos como: (A) adsorção; (B) encapsulação; (C) ligação covalente, e (D) ligação covalente cruzada (*crosslinking*) como demonstrado na Figura 2.10 (MARQUES; YAMANAKA, 2008).

Figura 2.10 – Esquema ilustrativo dos métodos de imobilização enzimática: (A) adsorção; (B) encapsulação; (C) ligação covalente, e (D) ligação covalente cruzada



Fonte: Marques e Yamanaka (2008)

Dentre as metodologias utilizadas para imobilização de enzimas sobre a superfície de cantileveres, a mais explorada são as monocamadas auto-organizadas ou SAM (do inglês *Self-Assembled Monolayers*) (MANDLER; TURRYAN, 1996; TANINAKA; TAKEUCHI; SHIGEKAWA, 2010; MANDLER; KRAUS-OPHIR, 2011; MARTINAZZO et al., 2018). Este sistema de imobilização enzimática consiste na formação de camadas moleculares a partir da exposição de uma superfície a moléculas com grupos funcionais que possuem forte afinidade por um determinado substrato usado como suporte (MANDLER; KRAUS-OPHIR, 2011).

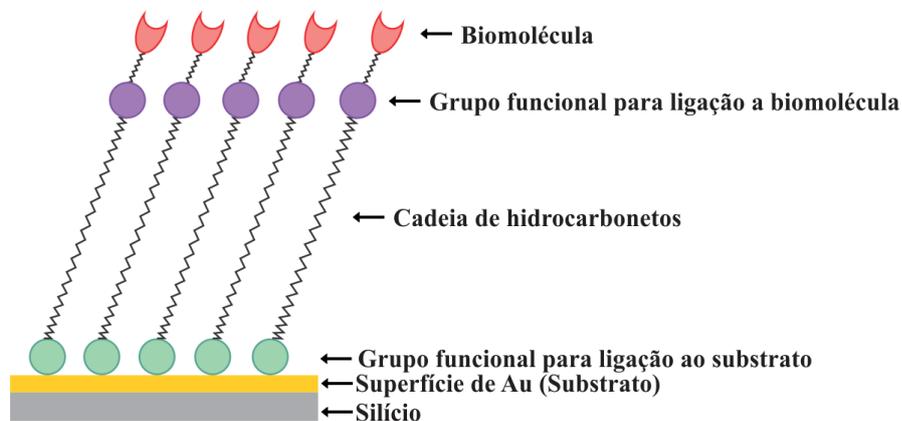
Desta forma, existe uma variedade de materiais utilizados como suporte (Pt, Au, Ag, Cu, etc.) e de moléculas anfóteras (como derivados alquil, álcoois, aminas, tióis, etc.) que têm sido empregadas na confecção destes sistemas organizados. Assim, as SAMs proporcionam um sistema conveniente, simples e flexível, envolvendo um grande número de substratos e adsorbatos, aumentando o número de suas aplicações. Sendo que a maior parte dos trabalhos relatam o uso de cantileveres de Au, ou recobertas com ouro, e grupos tióis ligados covalentemente para a funcionalização das biomoléculas de interesse (MANDLER; TURRYAN, 1996; TANINAKA; TAKEUCHI; SHIGEKAWA, 2010).

Outras vantagens na utilização de SAM para imobilização de biomoléculas são: a facilidade de formar estruturas ordenadas; estabilidade razoável por um longo período de tempo; requerem uma pequena quantidade de biomoléculas para a imobilização e formação da monocamada, diminuindo os custos com reagentes (CHAKI; VIJAYAMOHANAN, 2002).

A formação de monocamadas espontaneamente adsorvidas, utilizando tióis sobre superfície metálica, constitui um método bastante interessante de obtenção de uma superfície com alto grau de ordenação controlada quimicamente (ULMAN, 1996; AZZARONI; SCHILARDI; SALVAREZZA, 2003). Além disso, os tióis apresentam uma forte afinidade com os metais de transição, provavelmente devido à possibilidade desses compostos formarem múltiplas ligações com a superfície metálica (LEE et al., 1991). Assim, como a maioria dos cantileveres possuem a sua superfície revestida com uma camada fina de ouro (20-100 nm), é possível proporcionar uma ótima oportunidade de utilizar a técnica de SAM (CARRASCOSA et al. 2006).

Na Figura 2.11 é possível observar um esquema da formação de monocamadas sobre a superfície de ouro (substrato). A automontagem da monocamada é composta por um grupo funcional que se liga a superfície de ouro; uma cadeia de hidrocarbonetos que dá estabilidade ao conjunto por interações de Van Der Waals e um outro grupo funcional que é responsável pelo acoplamento da biomolécula a monocamada (ARYA et al., 2009; ADAMKIEWICZ et al., 2012). Segundo Freire, Pessoa e Kubota (2003), a SAM permite a orientação da enzima sobre a superfície do eletrodo sem que haja sua desnaturação.

Figura 2.11 – Representação da técnica de monocamadas automontadas



Fonte: O autor

Uma das estratégias mais comuns para unir quimicamente as enzimas à moléculas de alcanotióis com grupo terminal – COOH, é utilizar agentes de acoplamento de comprimento zero, os quais realizam, com maior eficiência, a ligação dos grupamentos –NH<sub>2</sub> e –COOH, mas que ao final não fazem parte da ligação. Exemplos de tais agentes são o N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). O EDC é muito utilizado para ligar proteínas aos substratos, tipicamente usado para acoplar grupos carboxílicos à aminas primárias. Neste processo geralmente o NHS é utilizado em conjunto,

pois a adição do mesmo na reação aumenta a eficiência da ligação, além de permitir com que os grupos sejam ativados e armazenados a seco para uso posterior (HERMANSON, 2013).

Dessa forma, a técnica SAM foi bastante estudada, nas últimas décadas, para a imobilização de diferentes moléculas sobre um substrato sólido (GOODING; HIBBERT, 1999; FERRET et al., 2000), e vem sendo cada vez mais utilizada para a construção de biossensores enzimáticos (CAMPUZANO et al., 2002; NAKANO et al., 2003; LIU; LIN, 2006; ALONSO et al., 2016; LIU et al., 2017).

Um dos grandes desafios para a construção de biossensores mais sensíveis, e robustos é a imobilização das biomoléculas sobre superfícies sólidas, em sua forma estável e com a manutenção de suas propriedades biológicas de reconhecimento. Dessa forma, o método de construção de biossensores utilizando SAM é muito promissor, pois permite orientar as enzimas sobre a superfície do sensor sem desnaturação (CAMPUZANO et al., 2002; LIU et al., 2017).

Manzoli et al. (2010) realizaram a deposição de biomoléculas sobre a superfície de um cantilever, por meio da técnica SAM, e efetuaram a avaliação das suas características vibracionais, com o objetivo de detecção de íons de Pb. Primeiramente os autores depositaram uma camada de 20 nm de ouro sobre a superfície do cantilever por meio da técnica de *sputtering*. A seguir adicionaram tiol (ácido 16-mercaptohexadecanóico) e na etapa seguinte imobilizaram por gotejamento da enzima fosfatase alcalina sobre a superfície do ouro modificada com tiol. E por fim adicionaram cloreto de chumbo ( $PbCl_2$ ) sobre a superfície da enzima. Os resultados demonstraram que foi possível funcionalizar o cantilever com a biomolécula, e que a enzima manteve-se imobilizada no decorrer das diversas medições. Os autores concluíram então, que é possível a utilização desse dispositivo de biossensoriamento para a determinação de  $PbCl_2$ .

Outros trabalhos relatam a imobilização de biomoléculas na ponta de cantilever com a modificação química do sensor de cantilever com organossilanos, utilizando o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), que carregam grupos quimicamente ativos para providenciar uma interface apropriada entre o transdutor de silício e as moléculas imobilizadas (BIZZARRI; CANNISTRARO, 2010; MOREAU, 2011). O APTES promove uma ligação cruzada com a superfície do metal e o grupamento carboxila (ou amina) de uma molécula ou biomolécula, por exemplo uma proteína, promovendo a imobilização. Na maioria das vezes, uma das etapas de funcionalização é a adição de um elemento que seja flexível, que possa atuar como um espaçador (*linker*), como por exemplo, o glutaraldeído, alcanotóis e o polietileno glicol (PEG). As funções desses espaçadores em um sistema de sensoriamento na

nanoescala são fornecer mobilidade e liberdade de orientação estrutural para as moléculas, ajudar a diferenciar os reconhecimentos específicos dos não específicos, prevenir distorções estruturais e desnaturação de moléculas, contribuir para a orientação uniforme das moléculas na superfície, além de agirem como uma ponte entre as superfícies inorgânicas e as biomoléculas (BIZZARRI; CANNISTRARO, 2010).

## **2.7 Aplicação dos nanobiossensores de cantileveres**

Os nanossensores de cantileveres podem ser utilizados em diversas áreas, como na detecção química: em diferentes tipos de gases (vapor de água, hidrogênio, vapores metálicos, compostos orgânicos voláteis), íons metálicos (metais pesados), substâncias tóxicas; na detecção bioquímica: como no controle de pH (importante nas reações bioquímicas), concentrações de glicose e peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), na hibridização específica do DNA, desdobramento de proteínas e peptídeos, na detecção quantitativa de esporos de fungos, bactérias e vírus; e também é possível detectar alterações em propriedades físicas nos meios circundantes, tais como gás ou líquido, ou de camadas depositadas sobre o próprio braço de suporte (LANG; HEGNER; GERBER, 2010; STEFFENS et al., 2014; ZHANG; CHEN; CHU, 2017).

Em relação a detecção de metais pesados utilizando nanobiossensores de cantilever em AFM, podemos citar alguns trabalhos bem distintos encontrados na literatura. Como o trabalho de Cherian et al. (2003), o qual realizaram a detecção de metais utilizando cantilever funcionalizado com uma nova classe de proteínas que podem realizar ligação metálicas, a AgNt84-6, rica em glicina e histidina. No trabalho foram utilizados cantileveres de nitreto de silício, com um lado da superfície recoberto 2 nm de cromo e mais 30 nm de ouro, funcionalizados por imersão em uma solução de 2% de 4 ATP (4-aminotiofenol) em etanol. Sendo que a ligação covalente da proteína com a monocamada 4ATP foi realizada através da reação de acoplamento do EDC com o NHS. Após a funcionalização os autores observaram que no momento em que o cantilever foi exposto a soluções de 0,1 mM de  $HgCl_2$  e 0,1 mM  $ZnCl_2$ , os mesmos apresentaram sinal de deflexão. Já a exposição a uma solução de 0,1 mM de  $MnCl_2$  não resultou em uma deflexão semelhante, indicando uma fraca ou nenhuma interação de íons de  $Mn^{2+}$  com a proteína AgNt84-6. Assim, demonstra-se que a deflexão do cantilever pode ser utilizado para discriminar entre os íons metálicos que se ligam e não se ligam à proteína AgNt84-6 em tempo real.

Já no trabalho de Velankia et al. (2007), os autores empregaram sensores de cantilever modificados por anticorpos monoclonais para detecção de Cd II. Sendo um dos lados do cantilever recoberto com 3 nm de crómio e 20 nm de Au. O complexo Cd (II) -EDTA-BSA e o anticorpo 2A81G5, específico para esse complexo, foram preparados. Para funcionalizar o sensor de cantilever os autores realizaram três abordagens diferentes, modificando a superfície do sensor utilizando técnicas distintas. A primeira modificação foi conjugar o anticorpo 2A81G5 no lado do cantilever com silício, a segunda conjugar o anticorpo 2A81G5 no lado do cantilever com ouro e a terceira foi imobilizar o anticorpo 2A81G5 no lado do cantilever com ouro pela técnica *layer-by-layer* de automontagem de múltiplas camadas. Por fim os autores concluíram que a interação anticorpo-antígeno utilizando a técnica *layer-by-layer* de automontagem de múltiplas camadas é mais eficaz no desenvolvimento de sensores para detectar  $\text{Cd}^{2+}$ , obtendo um limite de detecção de  $10^{-9}$  M.

Além da utilização de proteínas e anticorpos monoclonais na detecção de metais pesados por sensores de cantilever, também é possível empregar um sistema composto por íons de Ni, NTA (ácido nitrilotriacético) e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), como no trabalho de Chena et al. (2012). A superfície do cantilever revestida com 60 nm de ouro, foi funcionalizada pela técnica SAM, utilizando o agente quelante NTA. Os íons Ni, presentes no fluxo de água, causaram uma tensão no cantilever, resultante da adsorção dos mesmos pela camada sensora de NTA. Quando a injeção de EDTA foi utilizada para remover íons de Ni do cantilever através da competição com NTA outra deflexão do cantilever foi observada. Desta forma, o íon de Ni e as moléculas de EDTA foram especificamente reconhecidos, e a concentração também foi quantificada, apresentando limites de detecção de 0,5  $\mu\text{M}$  para o Ni e 5  $\mu\text{M}$  para o EDTA. Por meio deste experimento os autores afirmaram que este sistema de detecção pode ser regenerado e reutilizado, economizando tempo, trabalho e os custos de materiais, podendo também ser utilizado para detectar outros reagentes.

Em estudos mais recentes podemos citar o trabalho de Guang-Ping et al. (2017), o qual propôs um arranjo de oito cantilever, construídos por fotolitografia, desenvolvidos para detecção quantitativa de íons de  $\text{Hg}^{+2}$  em solução aquosa. A plataforma de detecção apresentada no estudo demonstrou-se adequada na determinação do metal pesado, apresentando um limite de detecção na gama de ppt.

## 2.8 Considerações sobre o estado da arte

Baseados nos relatos obtidos da literatura percebe-se que a nanobiotecnologia é uma área em desenvolvimento que tem contribuído e trará avanços significativos para diferentes áreas, como medicina preventiva, curativa ou diagnóstica, farmacêutica, agricultura, alimentos, embalagens, entre outros. Em vista disso, não há dúvida de que a nanotecnologia oferece a perspectiva de grandes avanços que permitam melhorar a qualidade de vida e ajudar a conservar o meio ambiente.

Por conseguinte a crescente expansão demográfica e industrial gerou um comprometimento da qualidade das águas dos rios, lagos e reservatórios, devido a despejo de efluentes domésticos e industriais, além de carga urbana e agrícola. Tendo com um dos maiores problemas o despejo de água contaminada por metais pesados, proveniente de lançamento de efluentes, como os gerados em indústrias extrativistas de metais, de tintas e galvanoplastias, além das químicas, do ferro, do aço e das petroquímicas. Devido a sua alta toxicidade e as rigorosas legislações que regem seus padrões de emissão, seu monitoramento se faz necessário.

Em vista disto, o desenvolvimento de nanobiossensores para detecção de metais pesados em águas pode ser aplicado na detecção precoce e precisa do lançamento de metais pesados nos corpos hídricos, possibilitando o modelamento de emissões, bem como estratégias mais efetivas de controle e monitoramento. O qual se reflete diretamente na saúde dos seres vivos e também do meio ambiente.

## 2.9 Referências bibliográficas

- ADAMKIEWICZ, M.; O'HARA, T.; O'HARA, D.; HÄHNER, 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.
- AGUIAR, M. R. M. P.; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1145-1154, 2002.
- ALMEIDA, A. F.; VALLE, R. R.; MIELKE, M. S.; GOMES, F. P. Tolerance and prospection of phytoremediator woody species of Cd, Pb, Cu and Cr. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 2, p. 83-98, 2007.
- ALONSO, J. M.; BIELEN, A. A. M.; OLTHUIS, W.; KENGEN, S. W. M.; ZUILHO, H.; FRANSSEN, M. C. R. Self-assembled monolayers of 1-alkenes on oxidized platinum surfaces as platforms for immobilized enzymes for biosensing. **Applied Surface Science**, v. 383, p. 283 – 293, 2016.

- ALVES, A. N. L.; DELLA ROSA, H. V. Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 2, p. 129-139, 2003.
- ARENAS-SÁNCHEZ, A.; RICO, A.; VIGHI, M. Effects of water scarcity and chemical pollution in aquatic ecosystems: State of the art. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 390-403, 2016.
- 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.
- ARYA, S. K.; SOLANKI, P. R.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2810-2817, 2009.
- AYENIMO, J. G.; ADELOJU, S. B. Inhibitive potentiometric detection of trace metals with ultrathin polypyrrole glucose oxidase biosensor. **Talanta**, v. 137, p. 62-70, 2015.
- AZZARONI, O.; SCHILARDI, P. L.; SALVAREZZA, R. C. Metal electrodeposition on self-assembled monolayers: a versatile tool for pattern transfer on metal thin films. **Electrochimica Acta**, v. 48, p. 3107-3114, 2003.
- BARÓ, A. M.; REIFENBERGER, R. G. **Atomic Force Microscopy in Liquid – Biologic Applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2012.
- BASHIR, R. BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 11, p. 1565-1586, 2004.
- BEHMEL, S.; DAMOUR, M.; LUDWIG, R.; RODRIGUEZ, M. Water quality monitoring strategies-A review and future perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 571, p. 1312-1329, 2016.
- BEREZHETSKYY, A. L.; SOSOVSKA, O. F.; DURRIEU, C.; CHOVELON, J.-M.; DZYADEVYCH, S.V.; TRAN-MINH, C. Alkaline phosphatase conductometric biosensor for heavy-metal ions determination. **IRBM**, v. 29, n. 2-3, p. 136-140, 2008.
- BERNSTEIN, A. **Uma nova preocupação com a água que bebemos**. Publicado em 14 de maio de 2013. ISSN: 1984-6290. Disponível em: <<http://www.educacaopublica.rj.gov.br/biblioteca/quimica/0013.html>>. Acesso em: 24 de agosto de 2015.
- BIZZARRI, A. R.; CANNISTRARO, S. The application of atomic force spectroscopy to the study of biological complexes undergoing a biorecognition process. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 2, p. 734-749, 2010.
- BRASIL. **Portaria nº 518 em 25 de março de 2004**. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>> Acesso em: 25 de agosto de 2015.
- BRASIL. **Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011**. Ministério da Saúde. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html)> Acesso em: 25 de agosto de 2015.
- BRASIL. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> Acesso em: 25 de agosto de 2015.

- BUENO, C. C. **Desenvolvimento de um nanobiossensor para o monitoramento da qualidade ambiental no setor agrícola**. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade. Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2013.
- CADORE, S.; MATOSO, É.; SANTOS, M. C. A espectrometria atômica e a determinação de elementos metálicos em material polimérico. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1533-1542, 2008.
- CAMPUZANO, S.; GÁLVEZ, R.; PEDRERO, M.; VILLENA, F. J.; PINGARRÓN, M. Preparation, characterization and application of alkanethiol self-assembled monolayers modified with tetrathiafulvalene and glucose oxidase at a gold disk electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 526, p. 92-100, 2002.
- CARRASCOSA, L. G.; MORENO, M.; ÁLVAREZ, M.; LECHUGA, L. M. Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 196-206, 2006.
- CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p.1-12, 2002.
- CHAUDHARY; M.; GUPTA, A. Microcantilever-based Sensors. **Defence Science Journal**, v. 59, n. 6, p. 634-641, 2009.
- CHENA, X.; CHENB, W.; MULCHANDANIB, A.; MOHIDEENA, U. Application of displacement principle for detecting heavy metal ions and EDTA using microcantilevers. **Sensors and Actuators**, v. B 161, p. 203 – 208, 2012.
- CHERIAN, S.; GUPTA, R. K.; MULLIN, B. C.; THUNDAT, T. Detection of heavy metal ions using protein-functionalized microcantilever sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 411-416, 2003.
- CLARKE, R.; KING, J. **O atlas da água**. São Paulo: Publifolha, 2005.
- COLEMAN, J. E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 21, p. 441-483, 1992.
- CORNELIS, R.; CARUSO, J.; CREWS, H.; HEUMANN, K. **Handbook of Elemental Speciation**. Techniques and Methodology, John Wiley: Chichester, 2003.
- CUBILLAS, P.; ANDERSON, M. W. Atomic Force Microscopy. In: BRUCE, D. W.; O'HARE, D.; WALTON, R. I. (eds.). **Multi Length-Scale Characterisation**. 1. ed. Walton Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons Ltda. cap. 3, p. 121-193, 2014.
- CUNNINGHAM, A. J. **Introduction to bioanalytical sensor**. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 19-21.
- DATRY, T.; BONADA, N.; HEINO, J. Towards understanding the organisation of metacommunities in highly dynamic ecological systems. **Oikos**, v. 125, n. 2, p. 149–159, 2016.
- DORDI, B.; PICKERING, J. P.; SCHÖNHERR, H.; VANCOSO, G. J. Inverted chemical force microscopy: following interfacial reactions on the nanometer scale. **European Polymer Journal**, v. 40, n. 5, p. 939-947, 2004.
- DUARTE, F.; AMREIN, B. A.; KAMERLIN, S. C. L. Modeling catalytic promiscuity in the alkaline phosphatase superfamily. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 27, p. 11145–11588, 2013.

- DUFFUS, J. H. Heavy metals - A meaningless term? **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.
- FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotechnology, biomaterials and biological application of nanostructures. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n.1, p. 32-53, 2012.
- FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p.28-39, 1992.
- FERNANDES, E. G. R. **Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose. 175 p. Dissertação** (Mestrado). Departamento de Física e Química, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2005.
- FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.
- FERRET, S.; PAYNTER, S.; RUSSEL, D. A.; SAPSFORD, K. E.; RICHARDSON, D. J. Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 530-540, 2000.
- FOLLMER, C.; CARLINI, C. R. Effect of chemical modification of histidines on the copper-induced oligomerization of jack bean urease (EC 3.5.1.5). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n. 435, p. 15-20, 2005.
- FRANCA, E. F.; LEITE, F. L.; CUNHA, R. A.; OLIVEIRA, O. N. JR.; FREITAS, L. C. Designing an enzyme-based nanobiosensor using molecular modeling techniques. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 19, p. 8894-8899, 2011.
- FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A.; KUBOTA, L.T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.
- FRITZ, J. Cantilever biosensors. **Analyst**, v. 133, p. 855-863, 2008.
- GASPAR, C. H. **Preparação caracterização de nanocompósitos de nanopartículas metálicas com proteínas e suas aplicações em biossensores**. 2010. 39 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Microelectrónica e Nanotecnologias) – Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.
- GOMES, M. V. T.; SATO, Y. Avaliação da contaminação por metais pesados em peixes do Rio São Francisco à jusante da represa de Três Marias, Minas Gerais, Brasil. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 6, n. 1, p. 24-30, 2011.
- GONÇALVES JÚNIOR, A. C. Descontaminação e monitoramento de águas e solos na região amazônica utilizando materiais adsorventes alternativos, visando a remoção de metais pesados tóxicos e pesticidas. **Inclusão Social**, v. 6, n. 2, 2013.
- 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.
- GUANG-PING, Z.; CHAO, L.; WEI, M.; SHANG-QUAN, W.; QING-CHUAN, Z. A Cantilever array sensor platform guided by optical fibers and its sensing application. **Chinese Journal Of Analytical Chemistry**, v. 45, p. 42-47, 2017.
- GUMPUA, M. B.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAN, U. M.; RAYAPPANA, J. B. B. A review on detection of heavy metal ions in water – An electrochemical approach. **Sensors and Actuators**, v. B 213, p. 515–533, 2015.

- HARRIS, D. C.; **Análise Química Quantitativa**, 5ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 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.
- HERRMANN, P. S. P.; SILVA, M. A. P.; BERNARDES, R.; JOB, A. E.; COLNAGO, L. A.; FROMMER, J. E.; MATTOSO, L. H.C. Microscopia de Varredura por Força: uma Ferramenta Poderosa no Estudo de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.7, n.4, p. 51-61, 1997.
- HOLT, M. S. Sources of Chemical Contaminants and Routes into the Freshwater Environment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 21-27, 2000.
- HU, H.; KIM, N. K. **Drinking-water pollution and human health**. In: CHIVIAN, E. et al. (Ed.). *Critical condition: human health and the environment*. 2nd ed. Cambridge, MA: MIT Press, 1994.
- HUNGSPREUGS, M.; DHARMVANJI, S.; UTOOMPrukPOM, W.; WINDOM, H. A comparative study of the trace metal fluxes of the Bang Pakong and the mae Klong River, Thailand. **The Science of the Total Environment**, v. 89, p. 97-98, 1990.
- JADHAV, S. V.; MARATHE, K. V.; RATHOD, V. K. A pilot scale concurrent removal of fluoride, arsenic, sulfate and nitrate by using nanofiltration: Competing ion interaction and modelling approach. **Journal of Water Process Engineering**, v. 13, p. 153-167, 2016.
- Jl, 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.
- JORDÃO, C. P.; SILVA, A. C.; PEREIRA, J. L.; BRUNE, W. Contaminação por cromo de águas de rios proveniente de curtumes em Minas Gerais. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 47-52, 1999.
- KAWAI, B.; URIAS, C.; LEONEL, L.; ALMADO M. **Poluição ambiental por metais**. Disponível em: <<http://www.fernandosantiago.com.br/met90.htm>>. Acesso em: 24 de agosto de 2015.
- KONCKI, R.; RUDNICKA, K.; TYMECKI, L. Flow injection system for potentiometric determination of alkaline phosphatase inhibitors. **Analytica Chimica Acta**, v. 577, p. 134-139, 2006.
- LANG, H.; GERBER, C. Microcantilever Sensors. In: SAMORÌ, P. (Ed.). *STM and AFM Studies on (Bio)molecular Systems: Unravelling the Nanoworld*: Springer Berlin Heidelberg, v. 285, cap. 28, p.1-27. (Topics in Current Chemistry). ISBN 978-3-540-78394-7, 2008.
- LANG, H.; HEGNER, M.; GERBER, C. Nanomechanical Cantilever Array Sensors. In: BHUSHAN, B. (Ed.). **Springer Handbook of Nanotechnology: Springer Berlin Heidelberg**. cap. 15, 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

- LEE, T. R.; LAIBINIS, P. E.; FOLKERS, J. P.; WHITESIDES, G. M. Heterogeneous catalysis on platinum and self-assembled monolayers on metal and metal oxide surfaces. **Pure Applied Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 821-828, 1991.
- LIU, D.; LUO, Q.; DENG, F.; LI, Z.; LI, B.; SHEN, Z. Ultrasensitive electrochemical biosensor based on the oligonucleotide self-assembled monolayer-mediated immunosensing interface. **Analytica Chimica Acta**, v. 971, p. 26 – 32, 2017.
- LIU, G.; LIN, Y. Amperometric glucose biosensor on self-assembling glucose oxidase on carbon nanotubes. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 251-256, 2006.
- LONG, F.; ZHU, A.; SHI, H. Recent Advances in Optical Biosensors for Environmental Monitoring and Early Warning. **Sensors**, v. 13, p. 13928-13948, 2013.
- MANDLER, D.; TURKMAN, I. Applications of self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry. **Electroanalysis**, v. 8, n. 3, p. 207-213, 1996.
- MANDLER, D.; KRAUS-OPHIR, S. Self-assembled monolayers (SAMs) for electrochemical sensing. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 15, p. 1535, 2011.
- MANZOLI A.; STEFFENS C.; PASCHOALIN R. T.; OLIVEIRA J. E.; MATTOSO L. H. C.; HERMANN P. S. P. Funcionalização da superfície de microcantileveres utilizados em microscopia de força atômica com biomoléculas. **Circular Técnica Embrapa**, n. 53, 2010.
- MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.
- MARTINAZZO, J.; MUENCHEN, D. K.; BREZOLIN, A. N.; CEZARO, A. M.; RIGO, A. 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**, v. 53, p. 229-236, 2018.
- MEHTA, J.; BHARDWAJ, S. K.; BHARDWAJ, N.; PAUL, A. K.; KUMAR, P.; KIM, K. H.; DEEP, A. Progress in the biosensing techniques for trace-level heavy metals. **Biotechnology Advances**, v. 34, p. 47–60, 2016.
- MERLINO, L. C. S.; MELO, W. J.; MACEDO, F. G.; GUEDES, A. C. T. P.; RIBEIRO, M. H.; MELO, V. P.; MELO, G. M. P. Bário, cádmio, cromo e chumbo em plantas de milho e em latossolo após onze aplicações anuais de lodo de esgoto. **Revista Brasileira Ciência Solo**, v. 34, p. 2031-2039, 2010.
- MHLONGO, S.; MATIVENGA, P. T.; MARNEWICK, A. Water quality in a mining and water-stressed region. **Journal of Cleaner Production**, v.171, p. 446-456, 2018.
- MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 370-374, 2002.
- MOREAU, A. L. D. **Microscopia de força atômica em materiais biológicos: biossensores e nanoferramentas**. (2011). 100f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2011.
- MORTIMER, M. R. Pesticide and trace metal concentrations in Queensland Estuarine Crabs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, p. 7-12, 2000.
- 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.
- 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, p. 1659 – 1675, 2016.
- NAKANO, N.; DOI, K.; TAMURA, K.; KATSUMI, Y.; TAZAKI, M. Self-assembling monolayer formation of glucose oxidase covalently attached on 11-aminoundecanotiol monolayers on gold. **Chemical Communication**, n. 13, p. 1544-1545, 2003.
- NAPOLEÃO, D. C. **Avaliação e tratamento de contaminantes emergentes ácido acetilsalicílico, diclofenaco e paracetamol em soluções aquosas utilizando processos oxidativos avançados.** (2011). 96f. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- NETO, M. L. F; FERREIRA, A. P. Perspectivas da sustentabilidade ambiental diante da contaminação química da água: Desafios normativos. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, v. 2, n. 4, seção 1, 2007.
- NOY, A.; FRISBIE, C. D.; ROZSNYAI, L. F.; WRIGHTON, M. S.; LIEBER, C. M. Chemical Force Microscopy: Exploiting Chemically-Modified Tips to Quantify Adhesion, Friction, and Functional Group Distributions in Molecular Assemblies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 7943-7951, 1995.
- NUGAEVA, N.; GFELLER, K. Y.; BACKMANN, N.; LANG, H. P.; DÜGGELIN, M.; HEGNER, M. Micromechanical cantilever array sensors for selective fungal immobilization and fast growth detection. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 6, p. 849-856, 2005.
- OGOŃCZYK, D.; TYMECKI, L.; WYŻKIEWICZ, I.; KONCKI, R.; GLAB, S. Screen-printed disposable urease-based biosensors for inhibitive detection of heavy metal ions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, n. 106, p. 450–454, 2005.
- 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.
- PAULA, M. Inimigo invisível: metais pesados e a saúde humana. **Tchê-Química**, v. 3, n. 6, p. 37-44, 2006.
- PEDROSO; M. F. M.; LIMA, I. V. **Ecotoxicologia do cobre e seus compostos.** Salvador: CRA, v. 2, p.128, 2001.
- PINA, K. V.; PINTO, L. R.; MORATORI, R. B.; SOUZA, C. G.; BARBASTEFANO R. G. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: estado da arte, perspectivas de inovação e investimentos. **Revista Gestão Industrial**, v. 02, n. 02, p. 115-125, 2006.
- PINTO, E. P.; RAMOS, G. Q.; FONSECA FILHO, H. D. O. Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. **Macapá**, v. 3, n. 2, p. 41-50, 2013.
- PIRVUTOIU, S.; DEY, E.; BHAND, S.; CIUCU, A.; MAGEARU, V.; DANIELSSON, B. Application of the enzyme thermistor for determination of mercury and other heavy metals

- using free and immobilised alcohol oxidase. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 7, p. 975–986, 2002.
- POGORILYI, R. P.; MELNYK, I. V.; ZUB, Y. L.; SEISENBAEVA, G. A.; KESSLER, V. G. Enzyme immobilization on a nanoadsorbent for improved stability against heavy metal poisoning. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 144, p. 135–142, 2016.
- QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.
- RAITERI, R.; GRATAROLA, M.; BUTT, H. J.; SKLÁDAL, P. Micromechanical cantilever-based biosensors. **Sensors and Actuators B**, v. 4010, p. 1-12, 2001.
- RAMALHO, J. F. G. P.; SOBRINHO, N. M. B. A.; VELLOSO, A. C. X. Contaminação da microbacia de caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 1289-1303, 2000.
- RIBEIRO-FILHO, M. R.; SIQUEIRA, J. O.; CURI, N.; SIMÃO, J. B. P. Fracionamento e biodisponibilidade de metais pesados em solo contaminado, incubado com materiais orgânicos e inorgânicos. **Revista Brasileira Ciência e Solo**, n. 25, p. 495-507, 2000.
- RICO, A.; VAN DEN BRINK, P. J.; GYLSTRA, R.; FOCKS, A.; BROCK, T.; Developing ecological scenarios for the prospective aquatic risk assessment of pesticides. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 12, p. 510–521, 2016.
- RUMAYOR, V. G.; IGLESIAS, E. G.; GALÁN, O. R.; CABEZAS, L. G. **Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria**. Madri: Elecé Industria Gráfica, p. 113, 2005.
- SANTOS, A.; ALONSO, E.; CALLEJÓN, M.; JIMÉNEZ, J. C. **Distribution of Zn, Cd, Pb and Cu metals in groundwater of the guadamar river basin**. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 134, p. 275-286, 2002.
- SCHULZ, R.; BUNDSCHUH, M.; GERGS, R.; BRÜHL, C. A.; DIEHL, D.; ENTLING, M. N. H.; FAHSE, L.; FRÖR, O.; JUNGKUNST, H. F.; LORKE, A.; SCHÄFER, R. B.; SCHAUMANN, G. E.; SCHWENK, K. Review on environmental alterations propagating from aquatic to terrestrial ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 538, p. 246–261, 2015.
- SETTLE, F.; **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**. Prentice Hall PTR: New Jersey, 1997.
- SILVA, S. M. C. P.; FERNANDES, F.; SOCCOL, V.; MORITA, D.M. **Main contaminants in sludge In: Biological wastewater treatment in warm climate regions**. Londres: IWA Publishing, 1 ed., v.2, p. 1197-1213, 2005.
- STEC, B.; HOLTZ, K. M.; KANTROWITZ, E. R. A Revised Mechanism for the Alkaline Phosphatase Reaction Involving Three Metal Ions. **Journal of Molecular Biology**, v. 23, n. 5, p. 1303-1311, 2000.
- STEFFENS, C.; MANZOLI, A.; LEITE, F. L.; FATIBELLO, O.; HERRMANN, P. S. P. Atomic force microscope microcantilevers used as sensors for monitoring humidity. **Microelectronic Engineering**, v. 113, p. 80–85, 2014.
- SWIERCZEWSKA, M.; LIU, G.; LEE, S.; CHEN, X. High-sensitivity nanosensors for biomarker detection. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2641-2655, 2012.
- TAMAYO, J.; KOSAKA, P. M.; RUZ, J. J.; PAULO, A. S.; CALLEJA, M. Biosensors Based on Nanomechanical Systems. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 3, p. 1287-1311, 2013.

- TANINAKA, A.; TAKEUCHI, O.; SHIGEKAWA, H. Reconsideration of Dynamic Force Spectroscopy Analysis of Streptavidin-Biotin Interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, p. 2134-2151, 2010.
- TOUHAMI, A. Biosensors and Nanobiosensors: Design and Applications. In: SEIFALIAN, A.; MEL, A. de.; KALASKAR, D.M. (Eds.). **Nanomedicine**. Manchester: One Central Press, cap. 15, p. 374-403, 2014.
- ULMAN, A. **Formation and structure of self-assembled monolayers**. Chemical Reviews, v. 96, p. 1533-1554, 1996.
- USKOKOVIC, V. Nanotechnologies: What we do not know. **Technology in Society**, v. 29, n.1, p. 43-61, 2007.
- UZUNLAR, E.; UZUNLAR, E.; BEYKAL, B.; EHRLICH, K.; SANLI, D.; JONÁS, A.; ALACA, E.; KIRAZ, A.; UREY, H.; ERKEY, C. Frequency response of microcantilevers immersed in gaseous, liquid, and supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 81, p. 254-264, 2013.
- VAHABI, S.; SALMAN, B.N.; JAVANMARD, A. Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 38, n. 2, p. 76-83, 2013.
- VEL KRAWCZYK, T. K.; MOSZCZYŃSKA, M.; TROJANOWICZ, M. Inhibitive determination of mercury and other metal ions by potentiometric urea biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, p. 681-691, 2000.
- VELANKIA, S.; KELLYA, S.; THUNDATB, T.; BLAKEC, D. A.; JI, H. F. Detection of Cd(II) using antibody-modified microcantilever sensors. **Ultramicroscopy**, v. 107, p. 1123-1128, 2007.
- VINODHINI, R.; NARAYANAN, M. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). **Intitute Journal Environment Science Technology**, v. 5, n. 2, p. 179-182, 2008.
- VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 203-216, 2001.
- VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgoto**. 3. ed. – Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Minas Gerais, p. 452, 2005.
- WAGGONER, P. S.; CRAIGHEAD, H. G. **Micro and nanomechanical sensors for environmental, chemical, and biological detection**. Lab on a Chip, Cambridge, v. 7, n. 10, p. 1238-1255, 2007.
- 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.
- YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 551-556, 1998.
- ZHANG, W.; CHEN, Y.; CHU, J. Cantilever optimization for applications in enhanced harmonic atomic force microscopy. **Sensors and Actuators A**, v. 255, p. 54-60, 2017.

## CAPÍTULO III

### 3. DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSOR DE CANTILEVER UTILIZANDO AS ENZIMAS FOSFATASE ALCALINA E UREASE PARA DETECÇÃO DE METAIS PESADOS EM ÁGUA

#### 3.1 Introdução

A poluição ambiental é frequentemente acompanhada pela liberação de diversas formas de poluentes, incluindo os metais pesados e poluentes orgânicos perigosos. Porém os metais pesados, são um dos poluentes que mais causam danos aos organismos vivos e no ambiente, por possuírem a peculiaridade de se acumularem nestes locais, contribuindo para um amplo espectro de efeitos adversos, incluindo consequências ecológicas e as doenças humanas (DEEP et al., 2015; KUMAR et al., 2015; MEHTA et al., 2016).

Muitas técnicas foram propostas para a detecção de metais pesados (SATOFUKA et al., 1999; BLAKE et al., 2001; BONTIDEAN et al., 2003; CASTILLO et al., 2004), no entanto o desenvolvimento de biossensores tem apresentado muitas vantagens em relação aos métodos clássicos (GF AAS, FAAS e ICP OES), tais como a construção otimizada, resposta rápida e aumento da sensibilidade. Tais características estão contidas em uma técnica atual de desenvolvimento de nanobiossensores de cantilever, com pontas modificadas quimicamente, utilizando a microscopia de força atômica (AFM).

Por conseguinte, os sensores de cantilever já provaram ser uma excelente plataforma para detecção química e biológica (BUTT, 1996; JI et al., 2000; CHERIAN et al., 2003; VELANKIA et al., 2007; CHENA et al., 2012; MUENCHEN et al., 2016; MARTINAZZO et al., 2018). Os cantileveres são essencialmente estruturas em miniatura e podem ser produzidos em massa, o que os torna uma alternativa econômica aos sensores padrão que geralmente são caros. Os cantileveres são extremamente sensíveis e têm um curto tempo de resposta. Eles podem ser seletivos para diferentes entidades químicas e biológicas, modificando suas superfícies (VELANKIA et al., 2007). Possuem diversas aplicações que variam desde o campo da medicina (WANG et al., 2015) até o monitoramento ambiental (CHENA et al., 2012; MUENCHEN et al., 2016;), o qual requerem sensores *in situ* e em tempo real.

Biossensores baseados nas enzimas fosfatase alcalina e urease, na detecção de metais pesados, são amplamente reportados na literatura (KONCKI; RUDNICKA; TYMECKI, 2006; AYENIMO; ADELOJU, 2015; MEHTA et al., 2016), devido a sua alta especificidade a este analito. No entanto, para a modificação química dos nanobiossensores de cantilever, a

imobilização destas enzimas, é o processo mais importante na produção deste biossensor, já que características como tempo de vida e a sensibilidade dependem exclusivamente da metodologia de imobilização (MEHTA et al., 2016).

Em vista disto, a imobilização das enzimas por meio da técnica das monocamadas automontadas (SAM), fornece uma via simples para funcionalizar a superfície do nanobiossensor de cantilever. Isso se deve ao fato do SAM ser uma camada de espessura molecular formada por auto-organização de moléculas de uma maneira ordenada em uma superfície sólida, resultando em uma maior estabilidade na formação das ligações (ARYA et al., 2009; ALONSO et al., 2016).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de nanobiossensores de cantilever funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease, utilizando a técnica SAM, para detecção de metais pesados ( $PbCl_2$  II,  $NiCl_2$  II,  $CdCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $CoCl_2$  II e  $AlCl_3$ ) em água e caracterizar a superfície dos nanobiossensores bem como a resposta do dispositivo a diferentes concentrações desses metais pesados.

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1 Material

Os procedimentos experimentais 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 – URI Erechim, exceto quando mencionado outro local.

Todo material utilizado (balões volumétricos, espátulas, béqueres, placas de petri, etc) foi submetido a um procedimento de limpeza com solução de  $HNO_3$  (ácido nítrico) 3 M (65%) com posterior lavagem com água destilada (OS10LXE - Gehaka), água deionizada (Permutation) e água ultrapura (Millipore Co. 18,2  $M\Omega/cm$ ), para assegurar a ausência de quaisquer resíduos orgânicos que pudessem interferir nas análises.

Os reagentes utilizados neste trabalho foram:  $HNO_3$  (Ácido Nítrico) (Química Moderna, 65%), fosfato de sódio monobásico monohidratado (Synth, 98%), fosfato de sódio dibásico anidro (Vetec, 98%), álcool absoluto (Quimex, 99,5%), álcool isopropílico (Vetec, 99,5%), ácido 16-mercaptohexadecanóico (AMHD) (Sigma Aldrich, 90%), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (Sigma Aldrich, 98%), N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma Aldrich, 98%), fosfatase alcalina de mucosa intestinal bovina (10 U/mg)

(Sigma Aldrich), urease de *Canavalia ensiformis* (75,26 U/mg) (Sigma Aldrich), Cloreto de Chumbo II ( $\text{PbCl}_2$  II) (Alamar Tecno Científica, 99%), Cloreto de Níquel II ( $\text{NiCl}_2$  II) (Alamar Tecno Científica, 97%), Cloreto de Cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) (Alamar Tecno Científica, 99%), Cloreto de Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ) (Alamar Tecno Científica, 98%), Cloreto de Cobalto II ( $\text{CoCl}_2$  II) (Santa Cruz Biotechnology, 100%), Cloreto de Alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) (Synth, 99%).

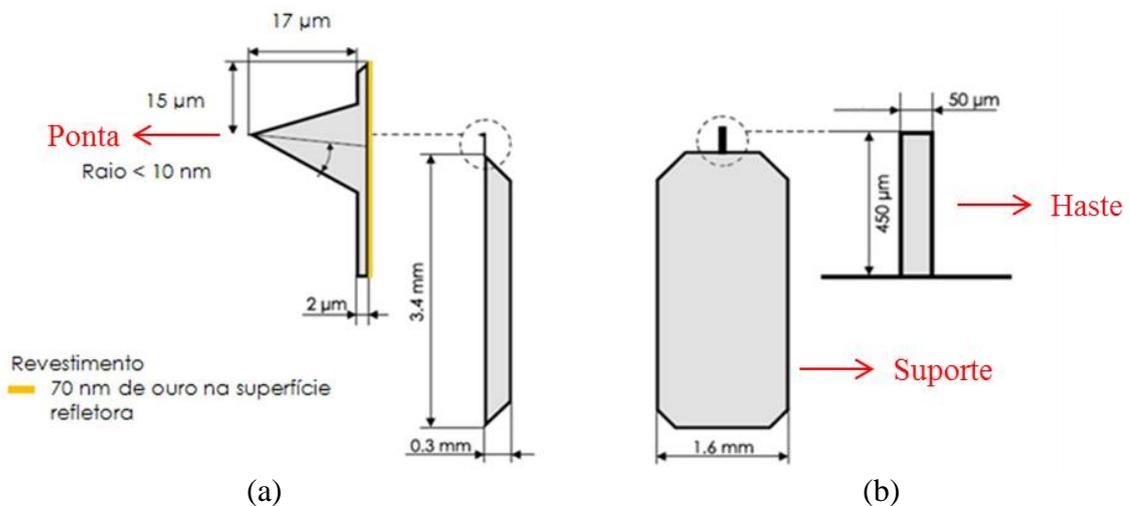
### 3.2.2 Métodos

#### 3.2.2.1 Desenvolvimento do nanobiossensor de cantilever

Os cantileveres (ContGD-G) usados para o desenvolvimento dos nanobiossensores foram adquiridos comercialmente (BudgetSensors), com as seguintes especificações do fabricante: material de silício revestido com 70 nm de ouro em um lado da superfície, frequência de ressonância de 13,0 ( $\pm 4$ ) kHz e constante de mola de 0,2 (0,07-0,4) N/m.

Na Figura 3.1 é possível observar as dimensões do cantilever, onde a vista lateral (Figura 3.1a) apresenta o comprimento e a espessura do suporte, com 3,4 e 0,3 mm, respectivamente, bem como a espessura da haste (2  $\mu\text{m}$ ) e o comprimento da ponta (17  $\mu\text{m}$ ). Na vista superior (Figura 3.1b), observa-se que o suporte possui a largura de 1,6 mm e a haste apresenta 450  $\mu\text{m}$  de comprimento e 50  $\mu\text{m}$  de largura.

Figura 3.1 – Especificações do cantilever utilizado para o desenvolvimento de nanobiossensores: (a) Vista lateral; (b) Vista superior



Fonte: Adaptado de Budgetsensors (2016)

Os cantileveres com recobrimento de ouro (Au) foram escolhidos devido a 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 Au está presente apenas no lado superior do cantilever, a funcionalização ocorre unicamente neste lado e, assim, o mesmo pode ser operado no modo estático (TAMAYO et al., 2013).

O cantilever escolhido apresenta baixa constante de mola (0,2 N/m), o que resulta em maior sensibilidade para as medições no modo estático em meio líquido. Apesar de cantileveres longos e finos serem mais sensíveis para esse modo de operação, tais características aumentam a amplitude de oscilação térmica e o nível de ruído durante a medida (CARRASCOSA et al., 2006; FRITZ, 2008), o que não é desejável.

### 3.2.2.2 Funcionalização da superfície dos nanobiossensores de cantilever

A funcionalização do cantilever foi realizada por meio da deposição da camada sensora no lado superior, onde se encontra depositado o Au. Para isso, a técnica de SAM foi escolhida, empregando agentes reticuladores (EDC/NHS) para ligação covalente com moléculas de alcanotióis. Segundo Galli (2009), esta técnica de formação de SAM com tióis sobre superfície metálica, constitui um método de obtenção de uma superfície com alto grau de ordenação controlada quimicamente.

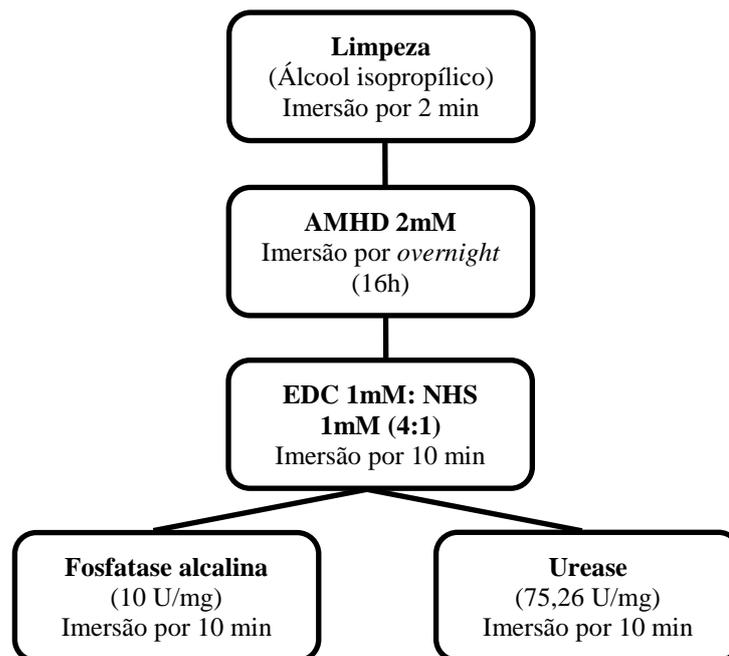
O procedimento de funcionalização do cantilever foi fundamentado nos trabalhos de Velanki e Ji (2006) e Martinazzo et al. (2018), e está esquematizado na Figura 3.2, consistindo das seguintes etapas:

- **Etapa 1:** Limpeza dos cantileveres, os quais foram transferidos individualmente para uma placa de petri, onde foram imersos em álcool isopropílico, durante 2 min, para lavagem, assim removendo interferentes da superfície, e então secos, a temperatura de 20 °C, por cerca de 15 min.
- **Etapa 2:** Imersão do cantilever em uma solução de ácido 16-mercaptohexadecanóico (AMHD) 2 mM em meio etanólico, por *overnight* (16 h). Após, foi realizada a lavagem do cantilever com água ultrapura (2 min) e secagem a 20 °C por 15 min.
- **Etapa 3:** Imersão do cantilever em uma mistura de EDC 1 mM/NHS 1 mM 4:1 (v/v) durante 10 min. A mistura das soluções foi realizada no momento da utilização, pois se a mistura for preparada muito tempo antes, há diminuição da eficiência da imobilização (TIAN et al., 2016). A seguir, foi realizada a lavagem com água ultrapura (2 min) e secagem a 20 °C por 15 min.

- **Etapa 4:** Esta etapa foi realizada de forma individual para cada enzima:
  - a) Fosfatase alcalina: Imersão do cantilever na enzima comercial fosfatase alcalina (10 U/mg) diluída em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 na concentração de 5 mg/mL durante 10 min. Posteriormente, foi realizada a lavagem do cantilever com solução tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 (2 min) e secagem a 20 °C por 15 min.
  - b) Urease: Imersão do cantilever na enzima comercial urease (75,26 U/mg) diluída em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0 na concentração de 10 mg/mL durante 10 min. Posteriormente, foi realizada a lavagem do cantilever com solução tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0 (2 min) e secagem a 20 °C por 15 min.

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

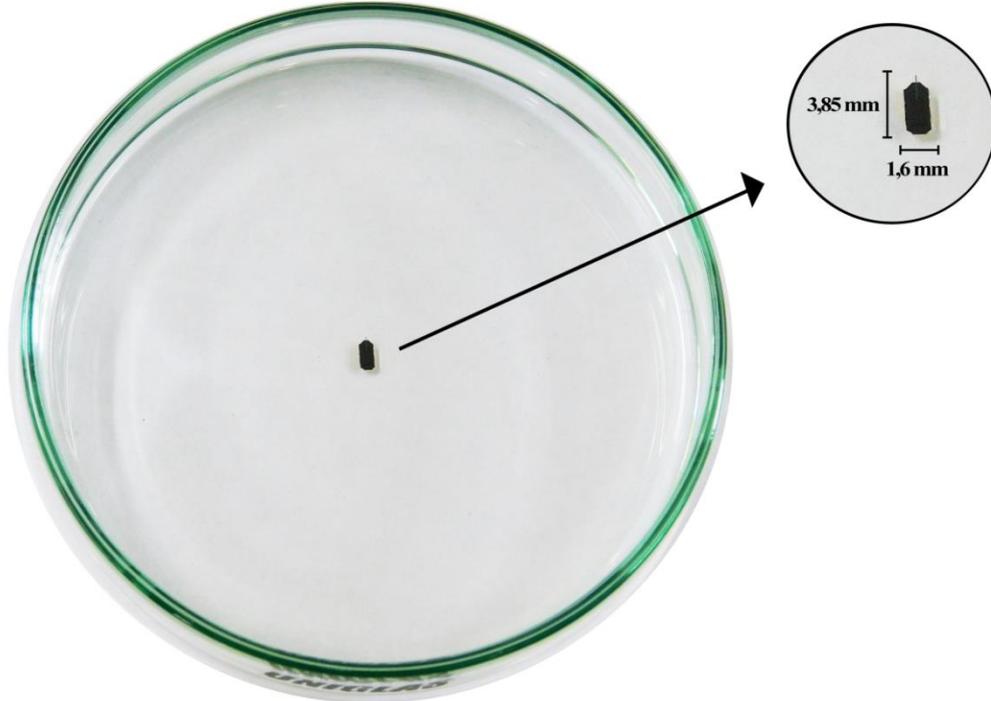
Figura 3.2 – Fluxograma do processo de funcionalização dos nanobiossensores de cantilever.



Fonte: O autor

Por meio da Figura 3.3, é possível verificar como foram realizadas as etapas de funcionalização utilizando como suporte uma placa de petri, onde o cantilever era imerso na solução, e posteriormente tampado com outra placa de petri durante o tempo de contato.

Figura 3.3 – Cantilever imerso em solução durante as etapas de funcionalização



Fonte: O autor

Os procedimentos de funcionalização foram realizados em uma sala climatizada a 20 °C, pois temperaturas muito altas diminuem a eficiência das ligações dos grupamentos envolvidos. Posteriormente, os nanobiossensores foram armazenados sob refrigeração (4 °C), a seco, dentro de placas de petri. Sendo que antes da realização de experimentos, os mesmos permaneciam a 25 °C por 30 min, para estabilizar sua temperatura.

### 3.2.2.3 Medida de voltagem dos nanobiossensores de cantilever

A resposta dos nanobiossensores, obtido por meio da funcionalização dos cantileveres com as enzimas comerciais, fosfatase alcalina e urease, para detectar os metais pesados ( $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$ ), foi avaliada em meio líquido, em modo estático, por meio da realização de uma imagem em AFM Nanosurf (C3000 Controller). As imagens foram realizadas em modo contato, utilizando o método de feixe óptico, o qual o feixe de laser é focado na extremidade final do cantilever e refletido para um fotodiodo de quatro quadrantes que monitora a voltagem, onde o alcance do fotodetector é de 0 a 12 Volts, sendo que a distância percorrida pela haste é proporcional ao sinal de voltagem do AFM.

O nanobiossensor de cantilever, previamente funcionalizado e acoplado a um suporte denominado de canticlip, foi inserido junto ao cabeçote (*scanner*) do equipamento, onde o

laser foi posicionado na extremidade final da haste do cantilever e na posição central do fotodetector, verificando sua intensidade, que ficou em torno de 70%, sendo ambos calibrados apenas na primeira medida (água ultrapura). Então, a resposta era monitorada por meio da criação de uma imagem, realizada nos seguintes parâmetros: área de  $0 \mu\text{m}^2$  (o cantilever não realizava uma varredura nos eixos x e y dentro da gota de líquido), resolução de  $1800 \times 1800$  pontos (a imagem era formada por 1800 linhas, representando os pontos de resposta) e velocidade de varredura de 1 s/linha para obtenção da resposta. Nestes parâmetros, a duração de cada análise era de 60 min. Transcorrido este tempo, a gota de líquido era retirada e injetava-se outra gota em ordem crescente de concentração para cada metal pesado.

As imagens obtidas foram convertidas em um gráfico de voltagem (V) *versus* tempo de contato (min), por meio do *software* Gwyddion (Versão 2.45). E então, os dados das imagens foram exportados para o *software* Excel (Versão 2010) para obtenção dos gráficos. A voltagem lida foi proveniente do sinal do fotodetector do equipamento. Todos os dados foram tomados em triplicata.

#### 3.2.2.4 Resposta dos nanobiossensores aos metais pesados

Para realização deste trabalho foram utilizados os sais dos metais pesados, sendo eles:  $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$ . A razão pela qual foi utilizado os sais em questão é por serem solúveis em água, facilitando a realização dos experimentos.

Além disto, a escolha deles se deve ao fato de que, estes metais são os que mais apresentam riscos ambientais, por meio do descarte indevido nos cursos d'água através dos processos de produção envolvendo as indústrias metalúrgicas, de tintas, de plástico PVC, entre outras. Além disso, estes metais são os principais elementos tóxicos despejados neste ambiente, trazendo como consequência diversos problemas sérios ao ser humano, como disfunções do sistema nervoso e aumento da incidência de câncer (VOLESKY, 2001; MHLONGO; MATIVENGA; MARNEWICK, 2018).

Para avaliar a resposta dos nanobiossensores na detecção dos metais pesados, baseando-se na legislação vigente para água de rios e potável, foi testada uma faixa de concentração dos mesmos diluídos em água ultrapura, que contemplava o limite máximo permitido para todos os metais estudados (BRASIL, 2004; 2005, 2011).

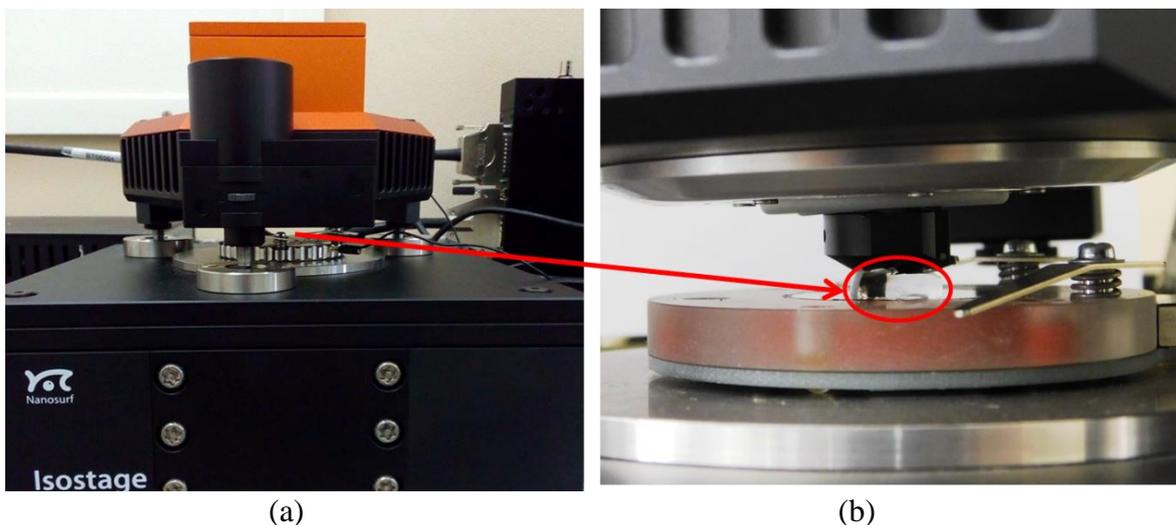
Desta forma, foi preparada uma solução estoque na concentração de 10 mg/L, para o metal  $\text{PbCl}_2$  II, e a partir desta, as concentrações de 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 1; 10; 50; 100 e 200  $\mu\text{g/L}$ , diluídas em água ultrapura. Com essa faixa de concentração foram realizados testes

preliminares a fim de verificar o comportamento do nanobiossensor. Logo, a concentração de 0,001 e 0,05  $\mu\text{g/L}$  não foram detectadas e as concentrações acima de 50  $\mu\text{g/L}$  saturaram o nanobiossensor. O  $\text{PbCl}_2$  II foi selecionado para a realização desta avaliação prévia, por possuir um menor grau de toxicidade para enzima em comparação com os demais metais (BEREZHETSKYY et al., 2008; HOMA EI, 2017), assim o nanobiossensor pode ser utilizado nas demais análises, sem comprometimento da resposta.

Então, foi montada uma nova faixa de concentração para o nanobiossensor funcionalizado com as enzimas fosfatase alcalina e urease, sendo assim foram utilizadas as concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10; 50  $\mu\text{g/L}$  para os metais  $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$ . Todas as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e em temperatura ambiente.

Para realização das análises da resposta do nanobiossensor de cantilever, uma gota ( $\cong 0,5$  mL) de cada concentração era injetada, com o auxílio de uma pipeta de pasteur, sobre uma placa de aço inoxidável no AFM, de modo que o nanobiossensor de cantilever ficasse totalmente imerso nesta gota para posterior leitura direta das medidas de voltagem, conforme pode ser observado na Figura 3.4.

Figura 3.4 – Imersão do cantilever na solução de metal pesado para obtenção da medida de voltagem: (a) Vista frontal do cabeçote; (b) Imersão do cantilever em meio líquido



Fonte: O autor

As análises foram realizadas em temperatura constante de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3$  através de um sistema de resfriamento. O sistema de resfriamento do AFM foi montado tendo por base uma pastilha Peltier com dimensões de 50 x 53 mm. Este elemento, quando ligado a uma fonte de corrente contínua (CC) teve uma de suas faces resfriadas e a outra aquecida. Em ambas as

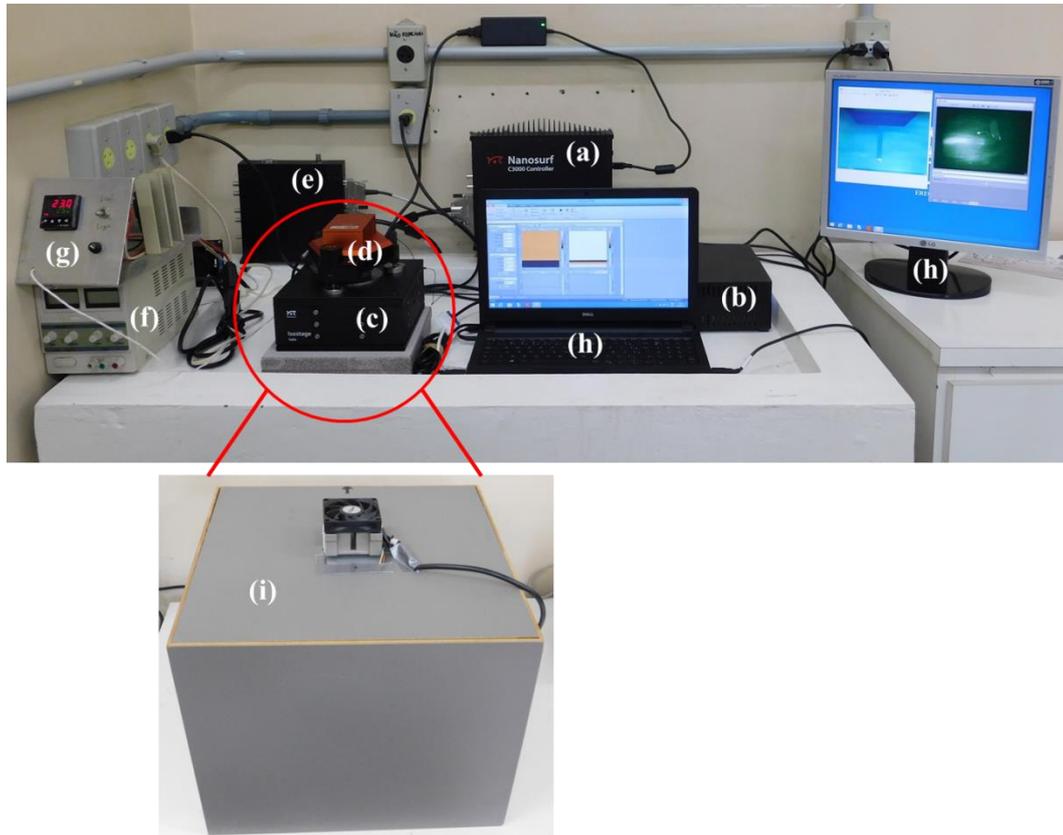
faces foram acoplados dissipadores de calor aletados. Desta forma, usou-se uma caixa de fibra de média densidade (MDF) (comprimento = 40 cm, altura = 32 cm, largura = 40 cm e espessura = 10 mm) sobre a parte do equipamento que ficava o cantilever em contato com a amostra (cabecote). A face resfriada e seu dissipador ficaram na parte interna da caixa enquanto que a face aquecida e seu dissipador ficaram na parte externa. O dispositivo foi montado na parte superior da caixa em uma abertura feita para sua fixação. Em cada dissipador de calor foi colocado um microventilador, ambos alimentados pela mesma fonte de energia que aciona a pastilha Peltier. A tensão a que o sistema ficou submetido era em torno de 5,5 V CC, o que garantiu o resfriamento e impulsionou os microventiladores com baixa velocidade, para não haver ruído que pudesse interferir nos experimentos.

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

A Figura 3.5 mostra as partes que compõem o microscópio de força atômica (AFM) e o sistema de resfriamento, utilizadas neste trabalho.

A caixa de MDF (Figura 3.5i) e a mesa anti-vibratória (Figura 3.5c), também tinham a função de minimizar ruídos e vibrações mecânicas, respectivamente. Contribuindo para diminuição das interferências nas respostas. Pois, os sistemas nanomecânicos são muito frágeis e 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).

Figura 3.5 – 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 Peltier, (g) Controlador digital de temperatura, (h) Monitores (i) Caixa de MDF acoplada ao micro ventilador externo



Fonte: O autor

### 3.2.2.5 Análise de componentes principais (PCA)

Os dados obtidos na detecção das diferentes concentrações dos metais pesados em estudo ( $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$ ) foram submetidos a técnica de reconhecimento de padrões, sendo utilizada a Análise de Componentes Principais ou PCA (do inglês *Principal Component Analysis*) através do programa OriginPro9.0 (© OriginLab Corporation). Este é um método de projeção que permite a fácil visualização de todas as informações contidas em um conjunto de dados, auxilia na descoberta de qual amostra é diferente das outras e quais as variáveis que mais contribuem para essa diferença (YU et al., 2009).

As respostas dos sensores são geralmente apresentadas fazendo uso da PCA, a qual transforma os sinais do sensor em variáveis originais (combinações lineares dos sinais

originais). Estas variáveis, chamadas pontuações, podem ser representadas em um plano bidimensional. As parcelas de pontuações da PCA são então interpretadas assumindo que a distância no plano é uma medida da semelhança entre as amostras, como consequência aglomerados nas parcelas de pontuação, que são interpretados como classes de amostras semelhantes (SANTONICO et al., 2008). A análise multivariada foi realizada por meio da PCA para avaliar a discriminação entre as diferentes concentrações de metais pesados (0,01; 0,1; 1; 10; 50 µg/L) e os diferentes metais pesados (PbCl<sub>2</sub> II, NiCl<sub>2</sub> II, CdCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> II e AlCl<sub>3</sub>).

### 3.2.2.6 Resposta dos cantileveres sem funcionalização

Para avaliar a resposta de interação dos nanobiossensores com os metais pesados, foi utilizado 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 (branco) na presença de soluções de 50 µg/L dos metais (PbCl<sub>2</sub> II, NiCl<sub>2</sub> II, CdCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> II e AlCl<sub>3</sub>), a fim de comprovar a eficiência da funcionalização, pois o cantilever quando não funcionalizado emite um sinal diferenciado.

Diferentemente do cantilever de silício, o qual não possui característica de sensoriamento, o cantilever com 70 nm de deposição de ouro, funciona como uma camada sensora, podendo emitir um sinal de voltagem. Desta forma, um cantilever revestido com ouro em somente um dos lados - ContGD-G (BudgetSensors), com constante de mola 0,2 N/m e frequência de ressonância de 13 kHz, sem as demais etapas de funcionalização (AMHD, EDC/NHS e enzima), foi colocado em contato com a solução de metal pesado (PbCl<sub>2</sub> II) em diferentes concentrações (0,01; 0,1; 1; 10; 50 µg/L), para avaliar a sua resposta.

### 3.2.2.7 Caracterização das respostas dos nanobiossensores

Avaliou-se características de sensibilidade, limite de detecção, reversibilidade e durabilidade dos nanobiossensores expostos a diferentes concentrações dos metais pesados (PbCl<sub>2</sub> II, NiCl<sub>2</sub> II, CdCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> II e AlCl<sub>3</sub>). Para isso, os nanobiossensores tiveram suas voltagens monitoradas e registradas, gerando um curva de calibração da concentração logarítmica dos metais *versus* voltagem. Todas as análises foram realizadas em triplicata e estão descritas a seguir:

- **Sensitividade:** 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 do analito, é geralmente, fortemente dependente da concentração (SKOOG et al., 2005).
- **Limite de detecção (LD):** foi calculado segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), (2003) e Skoog et al. (2005), o qual pode ser entendido como a menor concentração que pode ser distinguida com um certo nível de confiança. A partir da curva de calibração, o limite de detecção foi 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 99,6%.

- **Reversibilidade ( $\eta$ ):** demonstra a resposta do sensor de retornar ou não a sua condição inicial depois de interrompido o contato com o analito em questão (JANATA, 2009). Os sensores foram expostos a uma concentração de 0,01  $\mu\text{g/L}$  da solução de  $\text{PbCl}_2$  II (menor concentração estudada) e a água ultrapura (branco) em triplicata, com temperatura monitorada (25 °C), e a partir destes dados foi calculada a reversibilidade por meio da Equação 7 (STEFFENS et al., 2009).

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

Onde:  $V_0$  é a voltagem inicial do nanobiossensor;  $V$  é valor de voltagem após exposição aos metais pesados e  $V_f$  é a voltagem final do nanobiossensor.

- **Durabilidade:** foi avaliada nos nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease, estocados a seco à 4 °C, no 1º e 30º dia de armazenamento. O experimento foi realizado em triplicata, calculando limite de detecção e sensibilidade dos nanobiossensores no período avaliado, sendo que, os resultados foram submetidos a análise de

variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 95% de confiança, utilizando o *software* Statistic 8.0.

### 3.2.2.8 Caracterização das superfícies dos nanobiossensores

As análises de caracterização da superfície dos nanobiossensores 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 foi depositada uma camada de 20 nm de ouro por meio da técnica *Sputtering*. As análises estão descritas a seguir:

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

As análises foram realizadas em um AFM (EasyScan 2 FlexAFM System, Nanosurf), na Embrapa Instrumentação, em São Carlos – SP, utilizando um cantilever de silício, modelo Tap-150-G (BudgetSensors), de frequência de ressonância de 150 ( $\pm 75$ ) kHz e constante de mola de 5 (1,5-15) N/m. Todas as imagens foram obtidas em modo dinâmico e a varredura realizada no modo *tapping*. Para as análises de topografia e rugosidade, as imagens foram obtidas em uma área de  $25 \mu\text{m}^2$ , com resolução de 512 x 512 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).

Para a medida de espessura, utilizou-se uma agulha de aço para fazer um risco sobre a placa contendo todas as camadas de funcionalização. A imagem topográfica (área de  $400 \mu\text{m}^2$ , com resolução de  $256 \times 256$  pontos e velocidade de varredura de 1,5 s/linha) foi obtida na interface entre a região da superfície que continha a camada sensora e a que teve a camada removida, mas permanecendo com a camada de ouro. A espessura foi calculada utilizando o *software* Gwyddion (Versão 2.45), por meio da diferença de altura entre as duas regiões, em vários locais da imagem.

- **Microscopia eletrônica de varredura (MEV):** visando avaliar a morfologia da superfície dos nanobiossensores em cada etapa de funcionalização, os mesmos foram submetidas à análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (JEOL, modelo - JSM6510). As amostras foram recobertas com uma camada de 20 nm de ouro usando um metalizador Balzer (SCD 050/LEICA). Esta análise foi realizada na Embrapa Instrumentação, em São Carlos – SP.

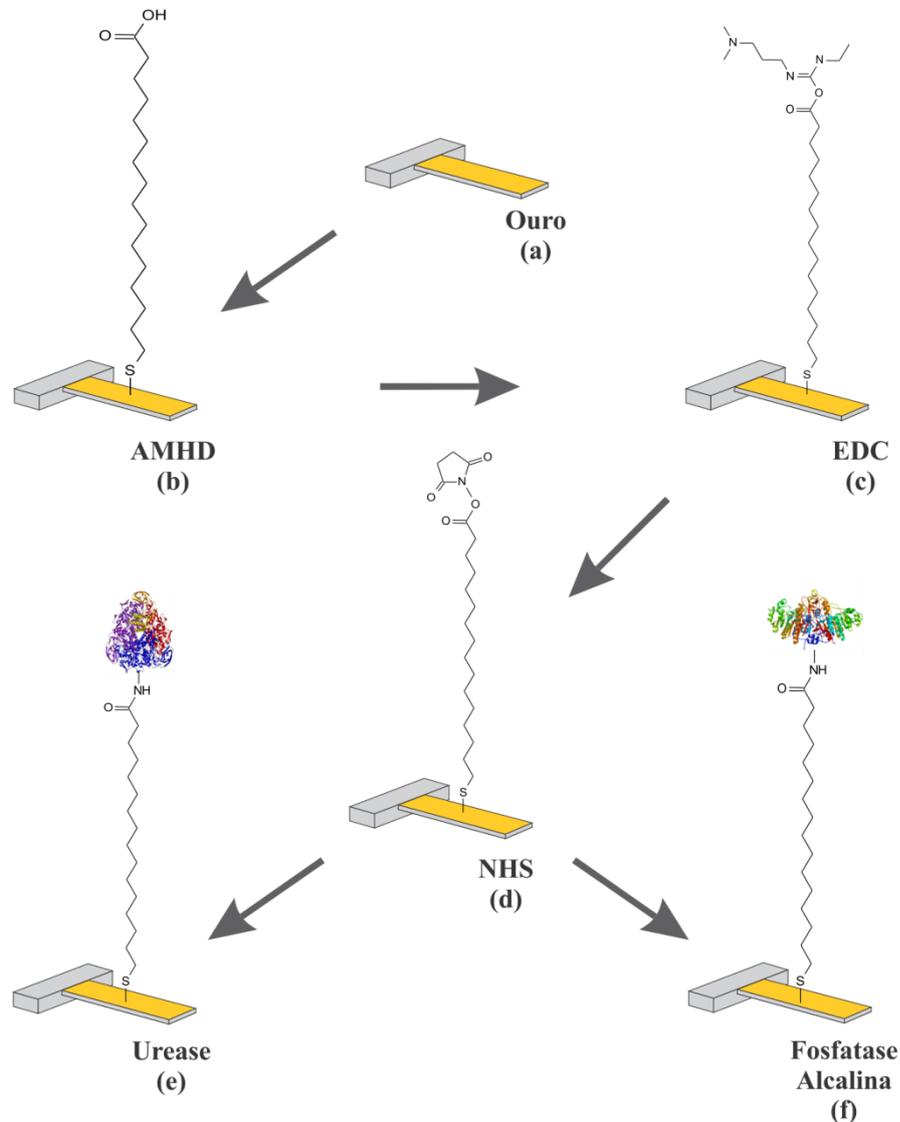
### 3.3 Resultados e discussão

#### 3.3.1 Funcionalização dos nanobiossensores de cantilever

Uma etapa importante no desenvolvimento do nanobiossensor é a definição do elemento biológico, para posterior funcionalização em sua superfície. Nesse caso as enzimas fosfatase alcalina e urease, foram escolhidas por serem metaloenzimas, ou seja, enzimas que contém íons metálicos em sua estrutura (sítio ativo). As mesmas possuem uma alta especificidade com o analito de interesse (metais pesados), por meio das ligações dos íons metálicos com os grupos químicos presentes em seus sítios ativos (MEHTA et al., 2016).

Neste sentido, a Figura 3.6 mostra um esquema proposto para a funcionalização do cantilever por meio da imobilização das enzimas fosfatase alcalina (Figura 3.6f) e urease (Figura 3.6e), para a posterior detecção dos metais pesados ( $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$ ).

Figura 3.6 – Representação esquemática da funcionalização do cantilever com as enzimas fosfatase alcalina e urease



Fonte: O autor

A primeira etapa da funcionalização do cantilever foi a modificação química, da superfície de ouro (Figura 3.6a), com o AMHD (Figura 3.6b), para a posterior formação das monocamadas automontadas (SAM). O grupo tiol (-SH), localizado em uma das extremidades do AMHD, adsorve na superfície do ouro por meio da formação de uma ligação tiolato, enquanto o grupo carboxila presente na outra extremidade fica disponível. Além disso, o AMHD é um alcanotiol de cadeia longa (16 carbonos), e por esse motivo, o mesmo proporciona SAMs mais ordenadas (GOODING; HIBBERT, 1999).

Para imobilizar covalentemente as enzimas sobre a superfície do cantilever, os grupos carboxila do AMHD foram acoplados aos grupos amina primário presentes nas estruturas das enzimas por meio dos agentes de reticulação EDC e NHS.

Desta forma, o grupo carboxílico presente no AMHD reage com o EDC (Figura 3.6c), formando o intermediário instável O-acilisourea, porém, em solução aquosa, o intermediário instável é suscetível à hidrólise, o que resultaria na regeneração do grupo carboxílico. Então se adiciona NHS (Figura 3.6d) para aumentar a eficiência da ligação, onde este reage com o composto intermediário formando um novo intermediário agora um pouco mais estável. Este novo intermediário, por sua vez, reage com a amina primária, presente na enzima, o que faz com que a amina se ligue ao ácido carboxílico original, por meio de uma ligação amida (Figura 3.6e,f) (JANEGITZ et al., 2011; BRAZACA, 2015; PEPINO, 2016).

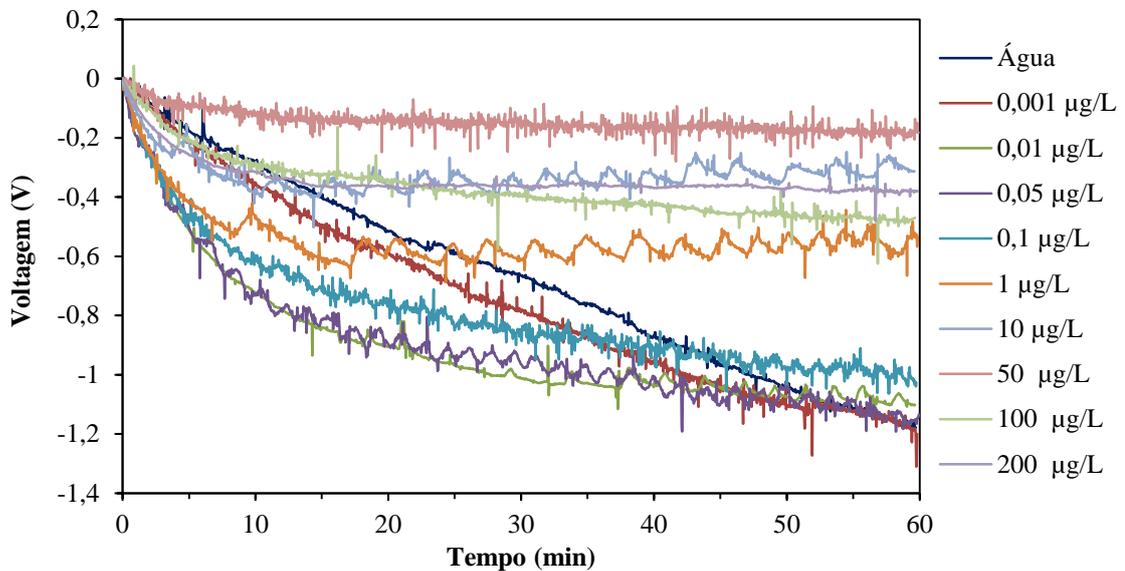
O emprego de enzimas na elaboração de biossensores apresenta como benefício a resposta rápida, maior sensibilidade, detecção de baixas concentrações do analito além de serem altamente específicas, possibilitando que os biossensores sejam utilizados mesmo na presença de outras substâncias na amostra (FERNANDES, 2005; RUMAYOR et al., 2005).

Para detecção de metais pesados, a inibição da atividade enzimática, lida como um sinal, tem sido a abordagem mais escolhida, por ser de detecção simples e rápida, oferecendo seletividade e sensibilidade melhoradas devido à ligação específica dos íons metálicos com a enzima (MEHTA et al., 2016).

### 3.3.2 Avaliação das respostas na detecção dos metais pesados

Para definir a melhor faixa de detecção dos metais pesados, foram realizados testes preliminares para verificar o comportamento do nanobiossensor à essas concentrações. Assim, a Figura 3.7, mostra as diferentes concentrações de cloreto de chumbo ( $\text{PbCl}_2$  II) (0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 1; 10; 50; 100 e 200  $\mu\text{g/L}$ ), testadas para o nanobiossensor funcionalizado com fosfatase alcalina.

Figura 3.7 – Resposta de detecção do nanobiossensor funcionalizado com a enzima fosfatase alcalina em função do tempo com a injeção de diferentes concentrações testes de  $\text{PbCl}_2$  II



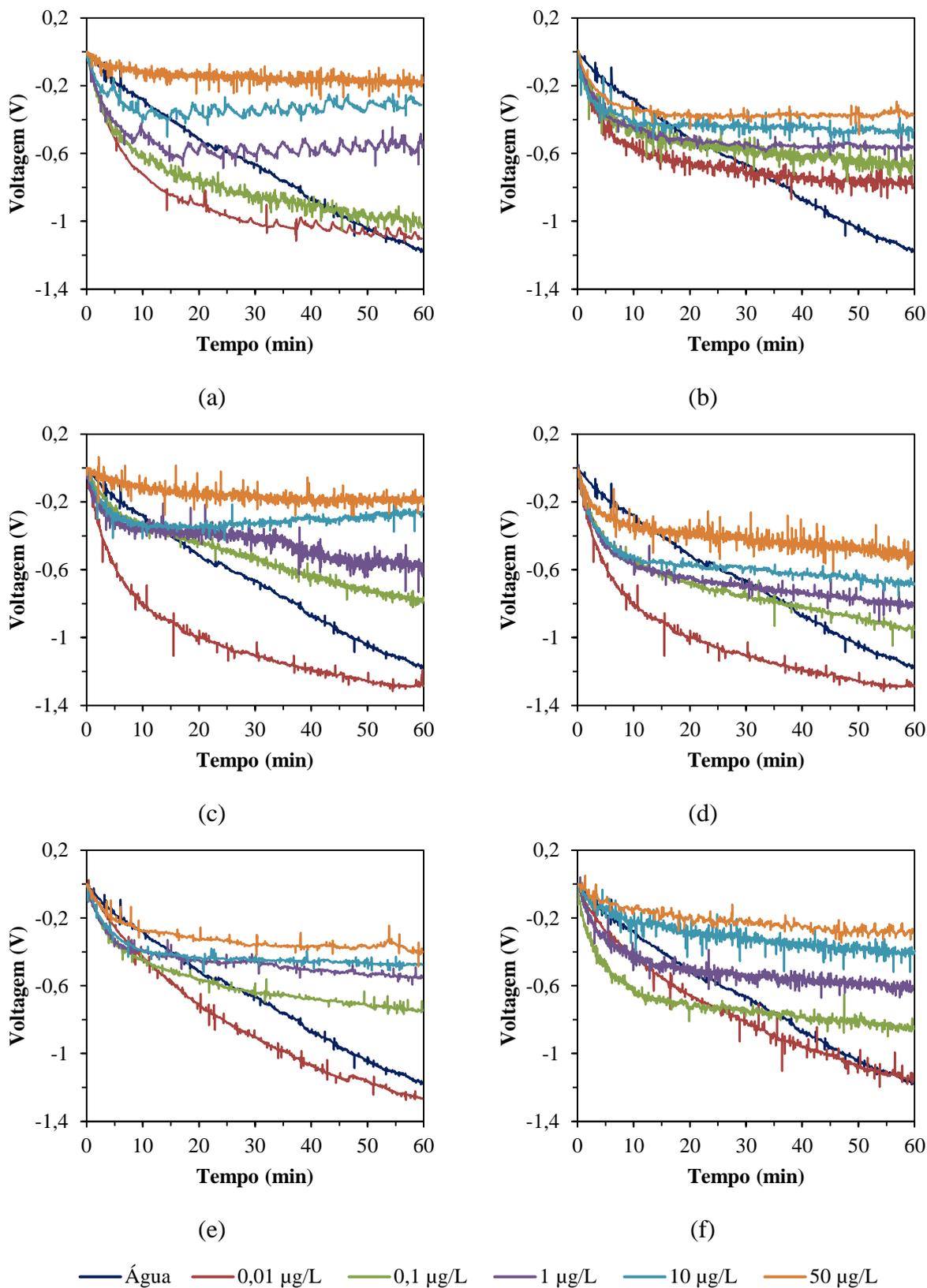
Fonte: O autor

Como observado na Figura 3.7, a concentração de  $0,001 \mu\text{g/L}$  não foi detectada, pois apresentou um comportamento similar ao da água ultrapura, indicando que o nanobiossensor não apresenta detecção nesta concentração. A concentração de  $0,01$  e  $0,05 \mu\text{g/L}$ , ficaram sobrepostas, em vista disso a menor concentração ( $0,01 \mu\text{g/L}$ ) foi a escolhida para compor a curva de calibração. Percebe-se também que concentração acima de  $50 \mu\text{g/L}$ , a resposta do nanobiossensor satura, não apresentando resposta distinguível, com uma tendência ao decaimento.

Desta forma, uma nova faixa de concentração foi definida para aplicar o nanobiossensor funcionalizado com as enzimas fosfatase alcalina e urease ( $0,01$ ;  $0,1$ ;  $1$ ;  $10$ ;  $50 \mu\text{g/L}$ ).

A Figura 3.8 apresenta as respostas de detecção do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com enzima fosfatase alcalina ( $10 \text{ U/mg}$ ) na presença dos respectivos metais ( $\text{PbCl}_2$  II (a),  $\text{NiCl}_2$  II (b),  $\text{CdCl}_2$  (c),  $\text{ZnCl}_2$  (d),  $\text{CoCl}_2$  II (e) e  $\text{AlCl}_3$  (f)) e água ultrapura em função do tempo. Sendo que as curvas de calibração, apresentadas no Apêndice 6.1, foram construídas com as concentrações em escala logarítmica, o qual permitem uma melhor visualização da faixa linear.

Figura 3.8 – Resposta de detecção do nanobiossensor funcionalizado com a enzima fosfatase alcalina em função do tempo com a injeção de diferentes concentrações de  $\text{PbCl}_2$  II (a),  $\text{NiCl}_2$  II (b),  $\text{CdCl}_2$  (c),  $\text{ZnCl}_2$  (d),  $\text{CoCl}_2$  II (e),  $\text{AlCl}_3$  (f) e água ultrapura.



Fonte: O autor

As medidas de voltagem foram realizadas durante 60 min, e no decorrer deste tempo, é possível verificar que houve diferença na voltagem (V) do nanobiossensor em relação às diferentes concentrações dos metais (0,01; 0,1; 1, 10 e 50 µg/L).

Observa-se também, que as concentrações são diretamente proporcionais à voltagem (V), ou seja, quanto maior a concentração maior a voltagem, e que a diferença de voltagem (V) entre a maior (50 µg/L) e a menor (0,01 µg/L) concentração dos metais analisados ficou em torno de 0,80 V. Zhao et al. (2010), em seu estudo, utilizando a medida de deflexão como resposta a interação do analito com a camada sensora, observaram que houve um aumento da deflexão do cantilever com o aumento da concentração, empregando um imunossensor de cantilever para detecção de íons de cobre em água de torneira, revelando assim, um comportamento similar ao encontrado neste trabalho.

Segundo Karnati et al. (2007), a resposta do nanobiossensor, observada pelo sinal de voltagem, ao longo do tempo, é decorrente na adsorção de analitos (metais pesados) no lado da superfície funcionalizada, onde ocorre uma curvatura do cantilever, a qual é causada por uma tensão de compressão, resultante de uma repulsão ou expansão de moléculas.

O nanobiossensor apresentou uma voltagem diferente entre as concentrações dos metais pesados e a água ultrapura, meio em que o analito foi diluído, indicando que o mesmo consegue detectar a presença dos metais pesados no meio. Verifica-se também que o nanobiossensor consegue detectar satisfatoriamente a menor concentração estudada (0,01 µg/L).

Songa e Okonkwo (2016) relatam que a atividade de fosfatase alcalina diminui na presença dos íons metálicos e a extensão da inibição é diretamente proporcional à concentração desses íons em solução, porém essa inibição é reversível e não requer reativadores como o EDTA (BEREZHETSKYY et al., 2008). Dessa forma, a ligação do inibidor à enzima pode ocasionar uma alteração na estrutura da mesma (BUCHAPUDI et al., 2013). Assim, a mudança de tensão superficial do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a fosfatase alcalina pode ser devido a uma alteração conformacional na estrutura da enzima em resposta a adsorção do metal pesado (inibidor).

Homaei (2017) relata que o emprego de fosfatase alcalina para avaliação da toxicidade de metais pesados, é um instrumento simples e sensível para a quantificação, o qual é um método baseado basicamente no forte efeito inibitório destes íons metálicos na atividade da fosfatase alcalina. Em seu trabalho, o mesmo estudou a potência de inibição de vários íons de metais pesados utilizando um sistema de biossensor enzimático com a enzima fosfatase

alcalina. A partir dos dados experimentais ele pode estabelecer a seguinte escala de inibição da fosfatase alcalina:  $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ .

Já no trabalho de Berezhetsky et al. (2008), os mesmos criaram um biossensor condutimétrico para a determinação de íons de metais pesados com base na imobilização da enzima fosfatase alcalina. O qual constatou a toxicidade relativa desses íons em relação à enzima da seguinte forma:  $\text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ .

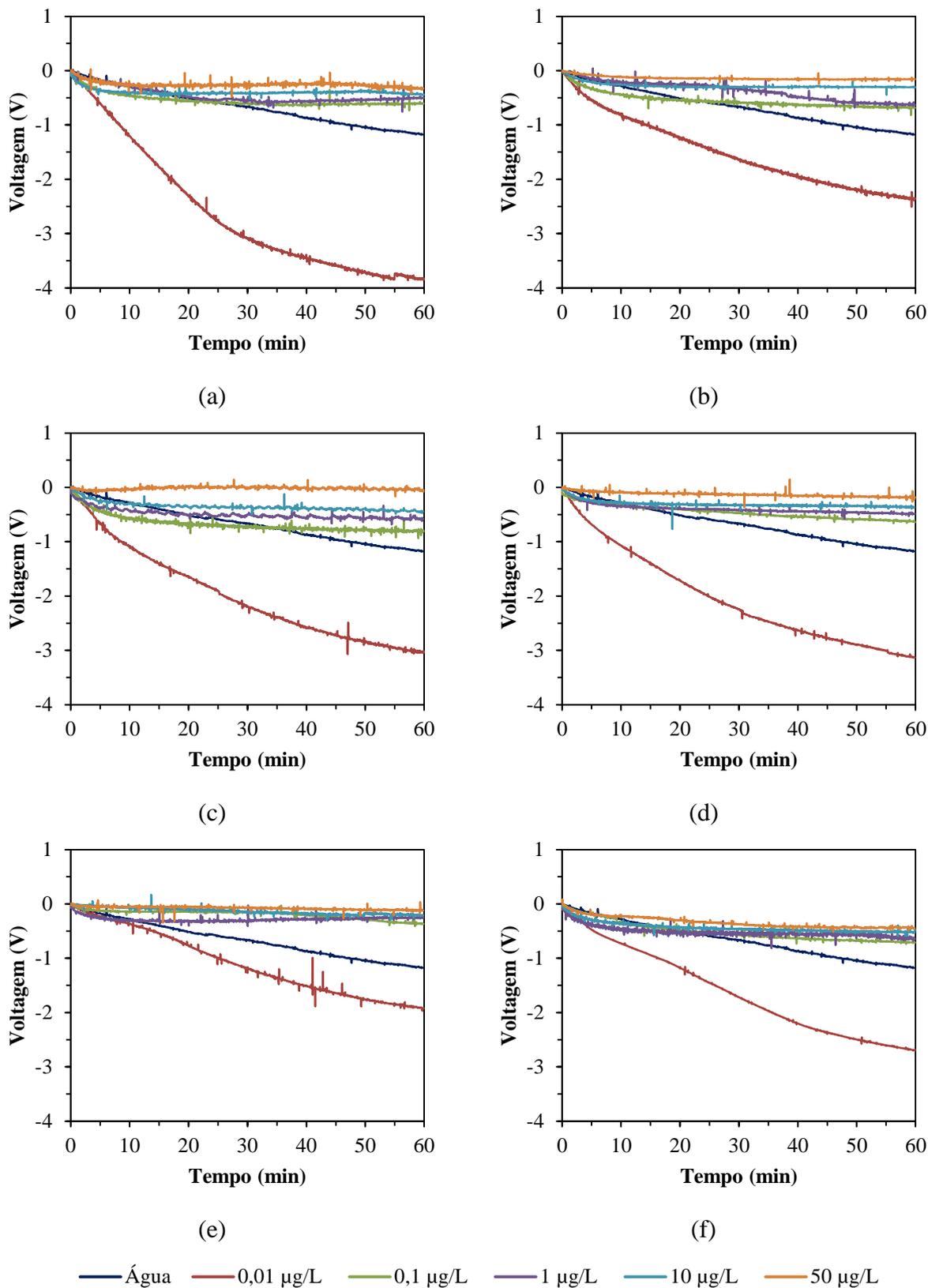
A Figura 3.9 apresenta as respostas de detecção dos metais pesados para o nanobiossensor de cantilever funcionalizado com enzima urease (75,26 U/mg) na presença dos respectivos metais ( $\text{PbCl}_2$  II (a),  $\text{NiCl}_2$  II (b),  $\text{CdCl}_2$  (c),  $\text{ZnCl}_2$  (d),  $\text{CoCl}_2$  II (e) e  $\text{AlCl}_3$  (f)) e água ultrapura em função do tempo. Sendo que as curvas de calibração, estão apresentadas no Apêndice 6.2.

As medidas de voltagem do nanobiossensor funcionalizado com a enzima urease também foram realizadas no tempo de 60 min, sendo possível verificar que, ao decorrer deste monitoramento, houve diferenças na voltagem (V) do nanobiossensor em relação às diferentes concentrações de metais (0,01; 0,1; 1, 10 e 50  $\mu\text{g/L}$ ).

A diferença de voltagem entre a maior (50  $\mu\text{g/L}$ ) e a menor concentração (0,01  $\mu\text{g/L}$ ) ficou em torno de 2,6 V, sendo que a concentração de 0,01  $\mu\text{g/L}$ , teve uma maior discrepância na voltagem em relação as demais concentrações.

Assim como nas respostas de detecção do nanobiossensor funcionalizado com a fosfatase alcalina, nesse nanobiossensor as concentrações são diretamente proporcionais à voltagem (V). A resposta desse nanobiossensor também se apresentou diferente entre as concentrações dos metais pesados e a água ultrapura, revelando que o mesmo consegue detectar a presença dos metais pesados no meio. O nanobiossensor alcança a detecção da menor concentração avaliada (0,01  $\mu\text{g/L}$ ), identificando os mesmos bem abaixo das concentrações máximas definidas pela legislação (BRASIL, 2004, 2005, 2011).

Figura 3.9 – Resposta de detecção do nanobiossensor funcionalizado com a enzima urease em função do tempo com a injeção de diferentes concentrações de  $\text{PbCl}_2$  II (a),  $\text{NiCl}_2$  II (b),  $\text{CdCl}_2$  (c),  $\text{ZnCl}_2$  (d),  $\text{CoCl}_2$  II (e),  $\text{AlCl}_3$  (f) e água ultrapura.



Fonte: O autor

A urease é um receptor biocatalítico comum, o qual tem o poder de reconhecer íons de metais pesados, por meio do mecanismo de inibição da enzima, baseando-se nas interações entre íons dos metais pesados e grupos químicos apresentados no centro ativo da enzima (OGONCZYK et al., 2005). Dessa forma, Gabrovska e Godjevargova (2009) afirmam que a redução da atividade da urease na presença de diferentes concentrações de metais pesados pode ser utilizadas para análises quantitativas destes metais em solução. Portanto, vários biossensores baseados em urease são relatados na literatura sendo utilizados na detecção destes íons tóxicos.

Entre os vários trabalhos encontrados na literatura para detecção de metais pesados baseados em biossensores utilizando a urease, pode-se citar alguns deles, como o de Ogonczyk et al. (2005), o qual produziram, por meio de serigrafia, um biossensor potenciométrico baseados na enzima urease, onde a detecção dos metais pesados era demonstrada por meio do sinal do biossensor em função da atividade enzimática. Os autores observaram que após cinco ciclos de detecção e lavagem, houve um decaimento desprezível do sinal, significando que a detecção não é destrutivo para a enzima urease. Isso também pode ser observado neste trabalho, onde o nanobiossensor funcionalizado com a enzima urease emitiu sinal em Volts para seis diferentes metais em seis diferentes concentrações de cada metal, mesmo após consecutivas lavagens.

Já no trabalho de Gabrovska e Godjevargova (2009) utilizando, biossensor baseado na redução da atividade da enzima urease para determinação das concentrações de metais pesados, os autores ordenaram os metais de acordo com seus efeitos inibitórios, seguindo a seguinte sequência:  $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Pb}$ .

Porém esses trabalhos citados anteriormente, tanto para fosfatase alcalina quanto para urease, limitam o seu sinal apenas na mudança da atividade enzimática, apresentando uma resposta pouco precisa em comparação com o método de detecção dos metais pesados utilizando um nanobiossensor de cantilever funcionalizado com uma enzima. Este método garante uma melhor detecção desses metais, pois identifica os mesmos por meio de uma pequena mudança de tensão superficial do nanobiossensor em resposta a adsorção do metal pesado, o que foi constatado nas Figuras 3.8 e 3.9.

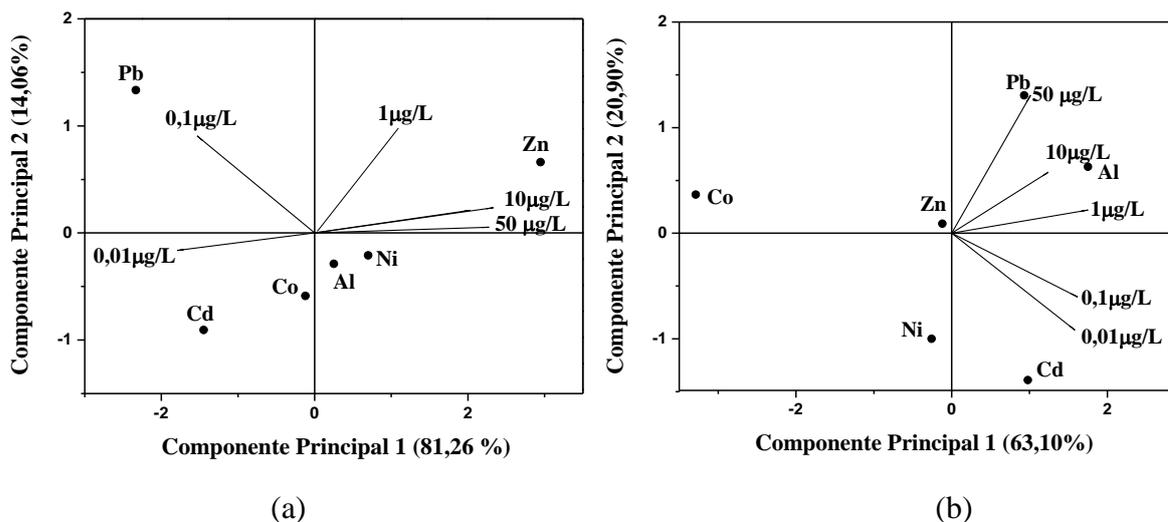
### 3.3.3 Resposta da análise de componentes principais (PCA)

As respostas dos nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease foram analisadas pela técnica estatística PCA, que se trata de uma técnica de

reconhecimento de padrões que reduz o número de variáveis com informações redundante e utiliza apenas os dados mais importantes (RAÑOLA; SANTIAGO; SEVILLA, 2016).

Os valores finais de voltagem, durante o tempo de contato de 60 min, para cada concentração dos metais pesados, foram utilizados para as análises estatísticas. A Figura 3.10 mostra os gráficos de PCA dos nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina (Figura 3.10a) e urease (Figura 3.10b), para os metais  $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$  em diferentes concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10 e 50  $\mu\text{g/L}$ . As concentrações que mais contribuem para a discriminação são determinados pelo gráfico de *Loading Plot* o qual também está demonstrado na Figura 3.10.

Figura 3.10 – Gráficos de PCA dos nanobiossensores de fosfatase alcalina (a) e urease (b), para os metais  $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$  em diferentes concentrações (0,01; 0,1; 1; 10; 50  $\mu\text{g/L}$ )



Fonte: O autor

A Figura 3.10a apresenta o gráfico de PCA dos diferentes metais ( $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$ ) em diferentes concentrações (0,01; 0,1; 1; 10; 50  $\mu\text{g/L}$ ) para o nanobiossensor funcionalizado com a enzima fosfatase alcalina. Sendo possível observar por meio do gráfico de *Loading Plot*, o qual representa a influência de cada variável no mesmo plano do gráfico de componentes principais, que as concentrações de 0,01, 10, 50  $\mu\text{g/L}$  são as que mais contribuem para a diferenciação (melhor detecção), pois estão mais próximas do eixo zero. Já as concentrações 0,01, 0,1 e 1  $\mu\text{g/L}$ , estão bem discriminadas em diferentes quadrantes. Em relação aos metais, o  $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$  e  $\text{ZnCl}_2$ , possuem uma maior

diferenciação, quando comparados ao  $\text{CoCl}_2$  II,  $\text{AlCl}_3$  e  $\text{NiCl}_2$  II o qual apresentam uma maior proximidade.

A Figura 3.10b apresenta a análise de componentes principais (PCA) dos diferentes metais ( $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$ ) em diferentes concentrações (0,01; 0,1; 1; 10; 50  $\mu\text{g/L}$ ) para o nanobiossensor funcionalizado com a enzima urease. Por meio do gráfico de *Loading Plot* é possível observar que as concentrações de 0,1 e 1  $\mu\text{g/L}$  são as que mais contribuem para a diferenciação e que as menores concentrações (0,01 e 0,1  $\mu\text{g/L}$ ) ficaram no quadrante direito negativo e as maiores (1, 10 e 50  $\mu\text{g/L}$ ) no quadrante direito positivo. No que se refere aos metais, pode-se verificar que nanobiossensor funcionalizado com a enzima urease conseguiu discriminar os diferentes metais pesados, pois os mesmos estão localizados em diferentes quadrantes possuindo uma maior intervalo entre eles.

O gráfico PCA do nanobiossensor funcionalizado com a enzima fosfatase alcalina (Fig. 3.10a) e urease (Fig. 3.10b), obtiveram 95,32% e 84% do total das informações coletadas pela matriz (PC1 + PC2), respectivamente. Entretanto neste caso o PC1 possui maior quantidade de informação (81,26% - fosfatase alcalina; 63,10% - urease), e, portanto, a análise dos metais pesados e das concentrações devem ser baseados neste eixo, embora pequena a contribuição da PC2 deve ser considerada para análise. Vale salientar que a quantidade de informações em PC1 e PC2 são relevantes e, portanto, ambas contribuem para a análise no plano cartesiano, e neste caso é possível discriminar tanto os metais pesados ( $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$ ), quanto as diferentes concentrações de cada metal (0,01; 0,1; 1; 10; 50  $\mu\text{g/L}$ ).

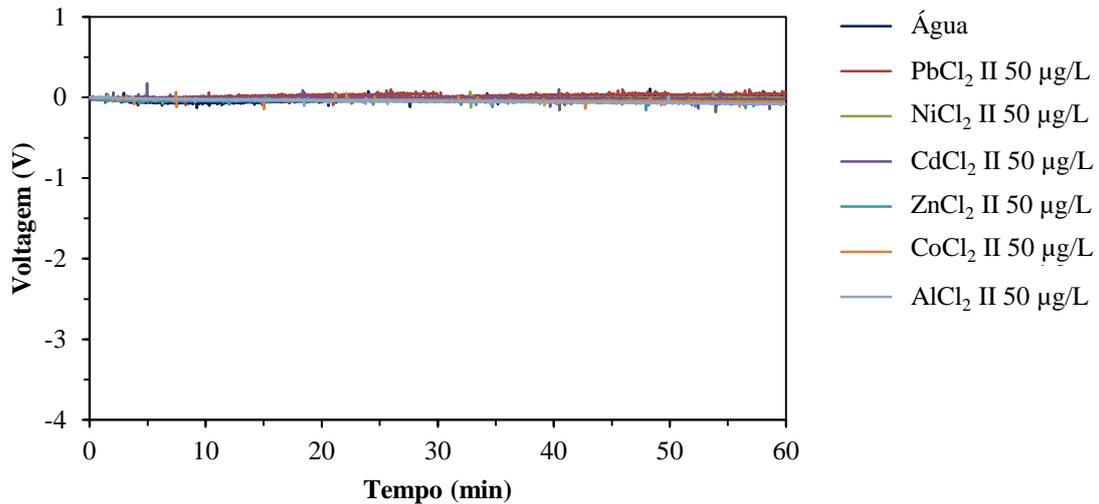
Dos resultados mostrados na Figura 3.10, os nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease apresentaram boa resposta, sendo possível discriminar os diferentes metais pesados em diferentes concentrações, oferecendo um bom desempenho para a construção de nanobiossensores de cantilever na detecção de metais pesados em meio líquido.

### 3.3.4 Resposta dos cantileveres sem funcionalização

A Figura 3.11 apresenta as respostas de voltagem do cantilever de silício sem funcionalização (branco) exposto a 50  $\mu\text{g/L}$  dos diferentes metais pesados ( $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$  II,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  II e  $\text{AlCl}_3$ ). Observa-se que o cantilever não funcionalizado apresentou um comportamento linear não havendo interação do cantilever de silício com os analitos testados, ou seja, o sinal da voltagem ficou em zero. Este resultado já era esperado, pois os

cantileveres de silício não possuem sítios de ligação sob sua superfície, ou seja, não estão aptos para reconhecer o analito de interesse.

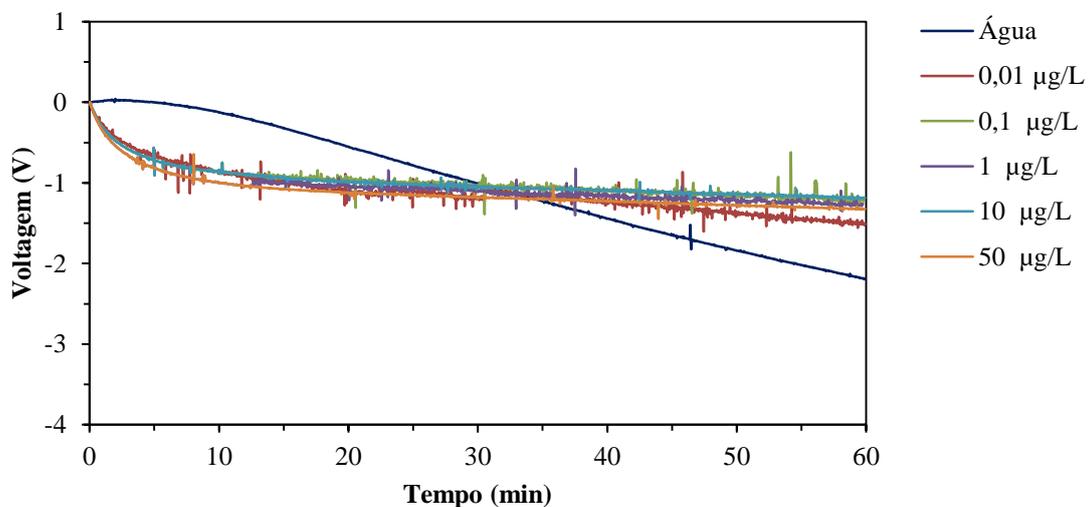
Figura 3.11 – Resposta de voltagem do cantilever de silício sem funcionalização exposto a água ultrapura e a 50  $\mu\text{g/L}$  de diferentes metais pesados



Fonte: O autor

A Figura 3.12 apresenta as respostas de voltagem do cantilever recoberto com 70 nm de ouro em um dos lados, exposto a diferentes concentrações da solução de  $\text{PbCl}_2$  II.

Figura 3.12 – Resposta de voltagem do cantilever de silício sem funcionalização recoberto com 70 nm de ouro exposto diferentes concentrações da solução de  $\text{PbCl}_2$  II e água ultrapura.



Fonte: O autor

Diferentemente do cantilever de silício, o qual não possui o atributo de sensoriamento, o cantilever com 70 nm de deposição de ouro, funciona como uma camada sensora, emitindo um sinal de voltagem, que variou de 1,18 a 1,50 V, quando entrou em contanto com os analitos em questão.

O ouro é um dos metais mais utilizados na formação de SAM por ser um metal inerte, de fácil obtenção e possui forte interação com o enxofre (suficiente para formar ligações covalentes), resultando em uma estrutura altamente ordenada e estável (CHEN; LI, 2006; HAN; USKOKOVIC, 2007). Porém, o ouro, por si só, não é capaz de distinguir as diferentes concentrações da solução de metal pesado, como quando funcionalizado com o AMHD e enzima (Figura 3.12). Por esta razão é necessário que se faça a modificação química da superfície do cantilever, tornando-os capacitados a serem sensores seletivos e sensíveis (LANG; HEGNER; GERBER, 2010).

### 3.3.5 Sensitividade e limite de detecção

A Tabela 3.1 apresenta os valores de limite de detecção (LD), sensitividade e coeficiente de correlação ( $R^2$ ), obtidos por meio da curva de calibração dos metais pesados ( $PbCl_2$  II,  $NiCl_2$  II,  $CdCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $CoCl_2$  II e  $AlCl_3$ ), para os nanobiossensores de cantilever funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease.

Tabela 3.1 – Valores de limite de detecção (LD), sensitividade e coeficiente de correlação ( $R^2$ ), dos nanobiossensores de cantilever funcionalizado com as enzimas fosfatase alcalina e urease, dos diferentes metais pesados.

Metais Pesados	Fosfatase alcalina			Urease		
	LD ( $\mu\text{g/L}$ )	Sensitividade (V/ppb)	$R^2$	LD ( $\mu\text{g/L}$ )	Sensitividade (V/ppb)	$R^2$
$PbCl_2$ II	0,323±0,06	0,284±0,07	0,968	0,286±0,06	0,321±0,04	0,937
$NiCl_2$ II	0,868±0,03	0,106±0,03	0,983	0,362±0,08	0,254±0,03	0,932
$CdCl_2$	0,336±0,01	0,273±0,03	0,954	0,413±0,01	0,223±0,01	0,789
$ZnCl_2$	0,481±0,01	0,191±0,01	0,962	0,392±0,02	0,234±0,07	0,922
$CoCl_2$ II	0,426±0,04	0,216±0,02	0,851	0,751±0,02	0,122±0,03	0,931
$AlCl_3$	0,393±0,04	0,234±0,05	0,984	0,604±0,08	0,152±0,07	0,922

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

Fonte: O autor

Em relação ao coeficiente de correlação ( $R^2$ ), de forma geral, obteve-se valores acima de 0,9, o qual é considerado como um ajuste satisfatório dos dados para a linha de regressão

conforme recomendado pelo INMETRO (2003), apenas o  $\text{CoCl}_2$  II (fosfatase alcalina) e o  $\text{CdCl}_2$  (urease), apresentaram o  $R^2$  abaixo, que foram 0,851 e 0,789, respectivamente.

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 utilizado o valor da linha base mais o múltiplo do desvio padrão. O valor do múltiplo utilizado foi 3, pois é fortemente recomendado, o qual implica em um nível de confiança de 99,6%.

Os valores de LD variaram de 0,286  $\mu\text{g/L}$  para o  $\text{PbCl}_2$  II, utilizando o nanobiossensor funcionalizado com a enzima urease e 0,868  $\mu\text{g/L}$  para o  $\text{NiCl}_2$  II utilizando o nanobiossensor funcionalizado com a enzima fosfatase alcalina. Levando em consideração os limites máximos permitidos destes metais pesados em água potável, o qual estão compreendidos na faixa de 1 a 5000  $\mu\text{g/L}$  (Tabela 2.2), observa-se que os nanobiossensores conseguem detectar a presença dos metais pesados bem abaixo das concentrações máximas definidas pela legislação (BRASIL, 2004, 2005, 2011).

Desta forma, pode-se dizer que os limites de detecção encontrados neste trabalho foram satisfatórios, em comparação com outros trabalhos na literatura como, por exemplo, o de Ogonczyk et al. (2005), o qual encontraram limites de detecção na gama de mg/L (ppm), para os metais pesquisados, utilizando um biossensor potenciométrico baseados na enzima urease. Já no trabalho de Tsai et al. (2003), desenvolvendo um biossensor óptico de urease para determinação de metais pesados por meio da técnica de imobilização sol-gel, obteve limites de detecção de 5 mg/L para o Zn, 12 mg/L para o Ni e 27 mg/L para o Pb. Em relação aos limites de detecção utilizando um biossensor com a enzima fosfatase alcalina para determinação de íons de metais pesados pode-se citar o trabalho de Berezhetsky et al. (2008), o qual também obteve um LD na escala de mg/L (0,5 para Cd, 2 para Zn, 5 para Ni e 40 para Pb).

No que se refere aos métodos convencionais de detecção de metais Yabe e Oliveira (1998), utilizando o ICP OES, obtiveram limites de detecção de Cd: 3,3  $\mu\text{g/L}$ , Ni: 9,7  $\mu\text{g/L}$ , Pb: 2,1  $\mu\text{g/L}$ , Zn: 2,2  $\mu\text{g/L}$ , Al: 14  $\mu\text{g/L}$ . Ramalho, Sobrinho e Velloso (2000), empregaram em seu trabalho a técnica de FAAS, obtiveram o LD de Cd: 2,2  $\mu\text{g/L}$ , Ni: 70  $\mu\text{g/L}$ , Pb: 15  $\mu\text{g/L}$ , Zn: 1,2  $\mu\text{g/L}$ , Cu: 4,5  $\mu\text{g/L}$ , Mn: 3  $\mu\text{g/L}$  e Co: 7,5  $\mu\text{g/L}$ . E por fim, Oshita et al. (2003), utilizando GF FAAS, obtiveram valores de limite de detecção de Al: 9,7  $\mu\text{g/L}$ , As: 2,3  $\mu\text{g/L}$ , Fe: 12  $\mu\text{g/L}$ , Mn: 14  $\mu\text{g/L}$  e Ni: 0,8  $\mu\text{g/L}$ . Esses valores demonstram que o nanobiossensor de cantilever funcionalizado com uma enzima, obteve limites de detecção muito menores que os métodos comumente empregados em métodos convencionais de análise

de metais. Indicando assim, o enorme potencial da técnica desenvolvida nesse trabalho, o qual consegue detectar quantidade mínimas dos metais pesados.

Quanto a sensibilidade dos nanobiossensores de cantilever, a mesma foi obtida por meio do coeficiente angular da concentração *versus* voltagem. O nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima urease foi o que mostrou maior sensibilidade (0,321 V/ppb) e menor limite de detecção (0,286 µg/L) (PbCl<sub>2</sub> II), quando comparado aos outros metais e também com o nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima fosfatase alcalina, o qual apresentou a menor sensibilidade (0,106 V/ppb) e maior limite de detecção (0,868 µg/L) (NiCl<sub>2</sub> II).

Foi apresentado dificuldade de comparação entre as sensibilidades dos nanobiossensores de cantilever, o qual é compensada pelo alto nível de detecção, na ordem de µg/L, dificilmente alcançada por outros tipos de sensores. Além disso, a sensibilidade dos nanobiossensores de cantileveres está diretamente relacionada com a camada sensível (STEFFENS, 2012).

Vale salientar que quanto maior os valores de sensibilidade, mais sensíveis são os sensores e, conseqüentemente, melhor são suas respostas. Quanto ao limite de detecção, quanto menores os seus valores, menores as concentrações mínimas que o sensor consegue detectar. Então, sensores com maiores valores de sensibilidade e menores valores de LD são mais adequados para detecção de metais pesados (ANVISA, 2003; SKOOG et al., 2005; IUPAC, 2014). Neste sentido o nanobiossensor desenvolvido neste estudo apresenta grande potencialidade de detecção dos metais pesados em águas.

### 3.3.6 Resposta de reversibilidade dos nanobiossensores de cantilever

A reversibilidade ( $\eta$ ) é a capacidade dos nanobiossensores de voltar ou não à sua condição inicial depois de cessada a interação da superfície do cantilever funcionalizada e o metal pesado, durante várias medições.

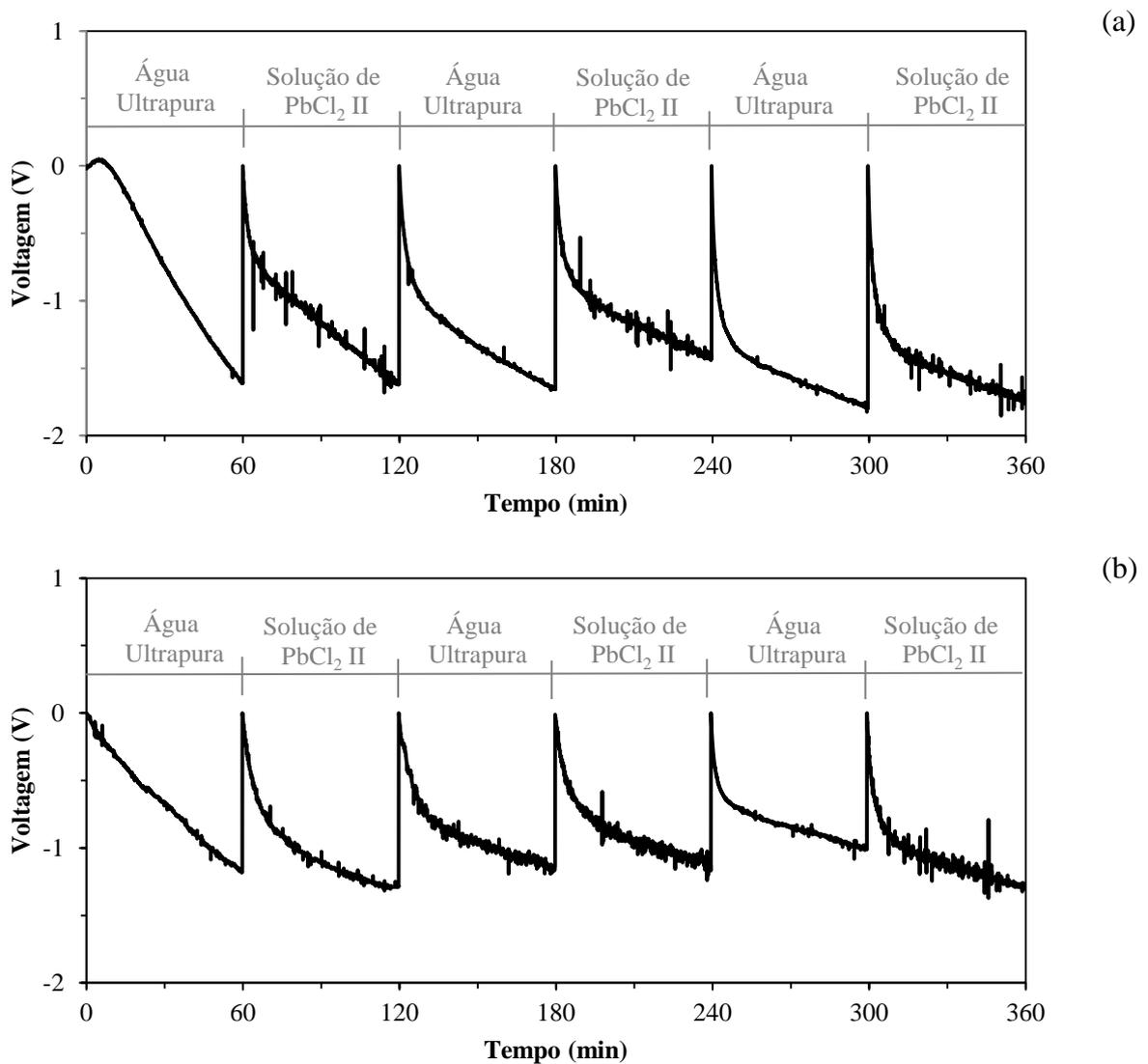
O PbCl<sub>2</sub> II foi o metal selecionado para a realização da análise de reversibilidade por apresentar os menores limites de detecção (0,323 µg/L – fosfatase alcalina e 0,286 µg/L – urease) e maiores valores de sensibilidade (0,284 V/ppb – fosfatase alcalina e 0,321 V/ppb – urease) para os dois nanobiossensores desenvolvidos.

Desta forma, a reversibilidade foi calculada a partir da Equação 7 e foi verificado que os nanobiossensores funcionalizados com fosfatase alcalina e urease submetidos a concentração de 0,01 µg/L da solução de PbCl<sub>2</sub> II e a água ultrapura (branco), durante 3

ciclos, foram reversíveis, ou seja, retornaram 100% à condição inicial, como pode ser observado na Figura 3.13.

Este resultado indica que os nanobiossensores desenvolvidos neste trabalho não apresentam perdas do sinal durante as diversas medições, além disso pode-se dizer que as enzimas mantiveram-se imobilizadas na superfície do cantilever no decorrer da análise.

Figura 3.13 – Reversibilidade dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina (a) e urease (b) avaliados em 3 ciclos, alternado a exposição a solução de  $\text{PbCl}_2$  II ( $0,01 \mu\text{g/L}$ ) e água ultrapura (branco)



Fonte: O autor

### 3.3.7 Resposta da durabilidade dos nanobiossensores de cantilever

A vida útil de um sensor é de extrema importância, uma vez que, dependendo da situação, o ideal é que o sensor possa ser utilizado por mais tempo e que mantenha as características em relação a sensibilidade e limite de detecção. A Tabela 3.2 apresenta a estabilidade da resposta dos nanobiossensores, avaliados no 1° e 30° dia de estocagem.

Tabela 3.2 – Durabilidade dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease

Estocagem (dias)	Limite de detecção ( $\mu\text{g/L}$ )		Sensibilidade (V/ppb)	
	Fosfatase Alcalina	Urease	Fosfatase Alcalina	Urease
<b>1</b>	0,481 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,413 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,190 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,223 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
<b>30</b>	0,628 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,744 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,146 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,123 $\pm$ 0,02 <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% (teste t de student) entre os diferentes dias avaliados.

Fonte: O autor

Como observado na Tabela 3.2, após 30 dias de armazenamento ocorre um aumento no limite de detecção, e uma diminuição na sensibilidade, para os nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease, respectivamente. Sendo que os valores de limite de detecção e sensibilidade para o 1° e o 30° dia de estocagem, apresentam diferença significativa com 95% de confiança, para ambos os nanobiossensores.

Na literatura também foram relatados decréscimos na estabilidade de biossensores após o armazenamento, como no trabalho de Homaei (2017), onde seu estudo tinha por objetivo a imobilização da enzima fosfatase alcalina em um biossensor, a fim de avaliar o potencial de inibição de vários íons de metais pesados. Este autor observou que após 90 dias de estocagem a 4 °C, a enzima imobilizada no biossensor teve sua atividade diminuída, causando uma perda de sensibilidade do mesmo. Já no trabalho de Upadhyay e Verma, (2015), o qual desenvolveram um biossensor baseado em fosfatase alcalina para determinação de fosfato em soro e água de torneira, constataram que o biossensor apresentou um decaimento de 12% na resposta quando armazenado a 4 °C em tampão, durante 30 dias.

Com base nestes estudos é possível afirmar que o tempo de estocagem afeta a resposta do nanobiossensor, ocorrendo a diminuição da qualidade da resposta do mesmo por meio do decréscimo da atividade da enzima. Porém, mesmo observando essas diferenças significativas em relação ao limite de detecção e a sensibilidade, os resultados mostram que mesmo após 30 dias, os nanobiossensores conseguem detectar pequenas quantidades dos metais pesados, na

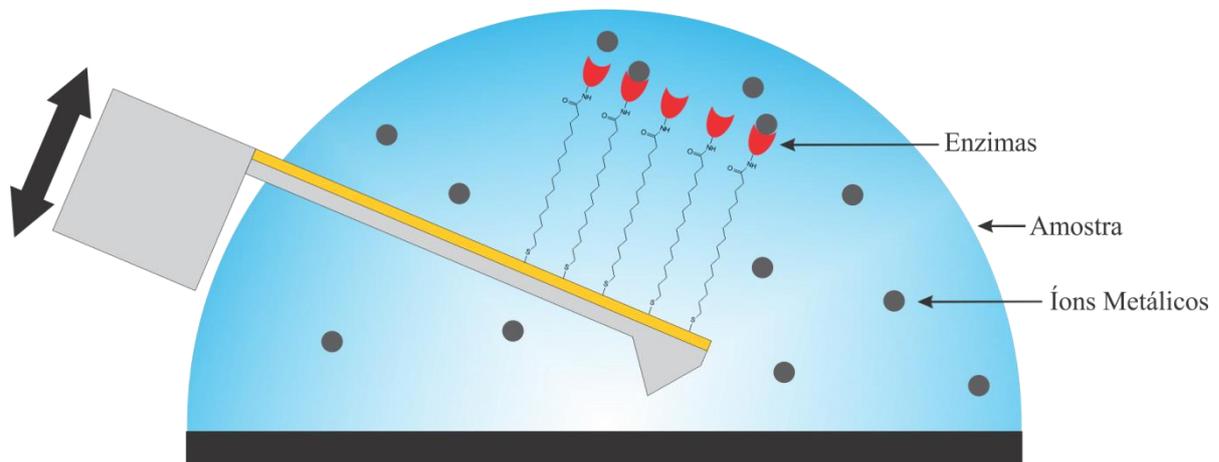
ordem de  $\mu\text{g/L}$ , características excelentes quando comparado com outros métodos de detecção.

### 3.3.8 Mecanismo de detecção de metais pesados pelos nanobiossensores desenvolvidos

A Figura 3.14 expõe a representação esquemática do mecanismo de detecção dos íons metálicos por meio da funcionalização desenvolvida neste trabalho.

Como pode ser observado, os íons metálicos, presentes na solução de trabalho, se ligam ao sítio ativo da enzima, causando uma alteração conformacional na estrutura da mesma, resultando em mudanças de tensão na superfície funcionalizada do nanobiossensor. Sendo que, a diferença de tensão entre a superfície funcionalizada, o qual ocorre adsorção do analito na camada sensora, e não funcionalizada, é lida como um sinal de voltagem (VEL KRAWCZYK; MOSZCZYŃSKA; TROJANOWICZ 2000; KARNATI et al., 2007; BUCHAPUDI et al., 2013; MEHTA et al., 2016)

Figura 3.14 – Representação esquemática da detecção dos íons metálicos por meio da funcionalização do cantilever com enzimas



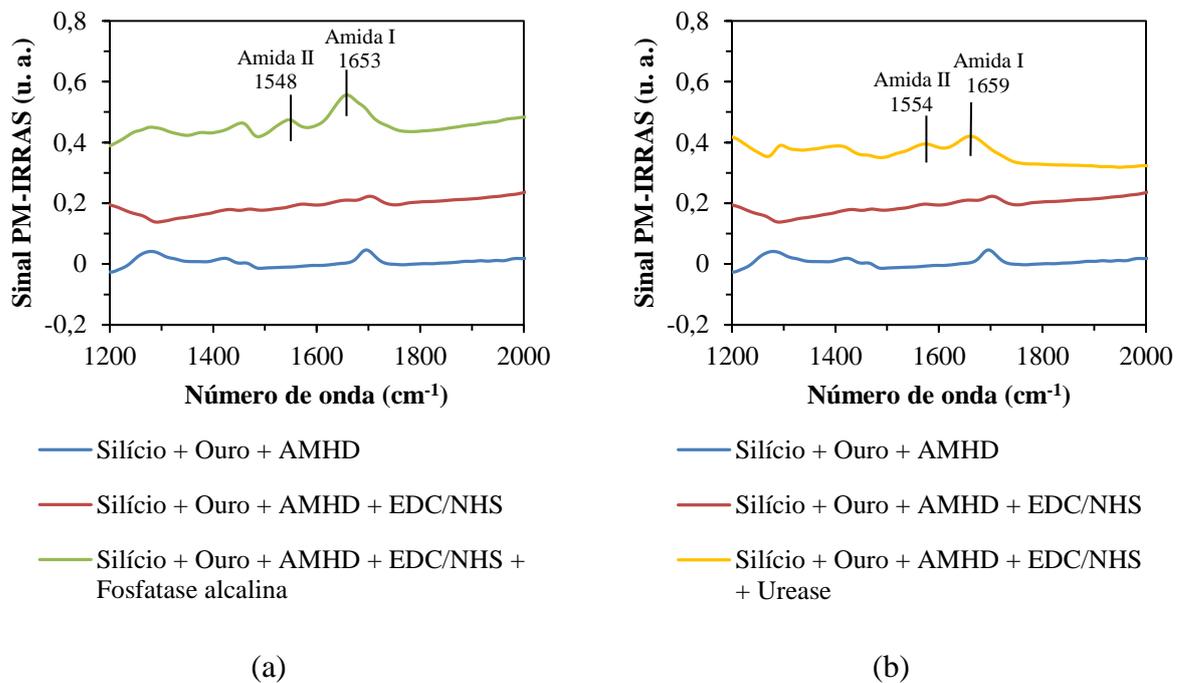
Fonte: O autor

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

O processo de imobilização das enzimas fosfatase alcalina e urease sobre a superfície do AMHD foi realizado com o auxílio dos agentes reticulantes EDC/NHS, favorecendo a reação dos grupos carboxílicos do AMHD com os grupos amina da enzima, formando

ligações amida estáveis. A funcionalização por meio do método de SAM foi investigada com a técnica de PM-IRRAS como mostra a Figura 3.15.

Figura 3.15 – Espectro PM-IRRAS das etapas de funcionalização do cantilever. (a) Funcionalização com a enzima fosfatase alcalina e (b) Funcionalização com a enzima urease



Fonte: O autor

Na espectroscopia da região do infravermelho, a luz, com um determinado comprimento de onda, interage com a matéria e entra em ressonância com os dipolos das ligações e grupos químicos das moléculas, sendo absorvida. Como os diferentes grupos ou ligações químicas de uma molécula possuem frequência de oscilações características, cada molécula possui um espectro típico de infravermelho. Assim, as informações químicas estruturais podem ser obtidas (BLAUDEZ et al., 1996; DICKO; BOURQUE; PÉZOLET, 1998). Desta forma, na Figura 3.15, é possível observar um pico a  $1700\text{ cm}^{-1}$  na banda correspondente ao Silício+Ouro+AMHD, em ambas funcionalizações, isto é uma indicação de que o AMHD foi depositado na superfície do cantilever. Uma diminuição deste pico na mesma banda (Silício+Ouro+AMHD+EDC/NHS), é uma indicação de que esta camada é coberta com a deposição dos agentes reticuladores EDC/NHS. Na imobilização do cantilever com as enzimas, é possível identificar duas bandas de maior intensidade, que correspondem aos grupos amida da cadeia enzimática. As bandas  $1653$  e  $1659\text{ cm}^{-1}$ , correspondente a funcionalização com as enzimas fosfatase alcalina e urease, respectivamente, representam o grupo amida I da cadeia, a qual é atribuída ao grupo carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ) da ligação amida. Já as

bandas em 1548 e 1554  $\text{cm}^{-1}$  (fosfatase alcalina e urease, respectivamente) correspondem ao grupo amida II, pertencente ao estiramento C-N da amida.

Segundo Cornut et al. (1996), as bandas do grupo amida I podem ser vistas entre 1662 e 1649  $\text{cm}^{-1}$  para proteínas. Kreider et al. (2014) relataram as bandas amida I em 1659  $\text{cm}^{-1}$  e amida II em 1548  $\text{cm}^{-1}$ , como indicativas da presença da enzima peroxidase. Bandas semelhantes também foram encontradas no trabalho de Schmidt et al. (2008), onde a indicação da enzima investigada por eles foi vista nas bandas 1663  $\text{cm}^{-1}$  e 1554  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a amida I e amida II, respectivamente. E por fim, no trabalho de Alonso et al. (2016), onde utilizando a técnica de PM-IRRAS para caracterizar a superfície de diferentes métodos de acoplamento enzimático, os mesmos obtiveram bandas de 1653  $\text{cm}^{-1}$  (amida I) e 1558  $\text{cm}^{-1}$  (amida II), para as enzimas oxidases.

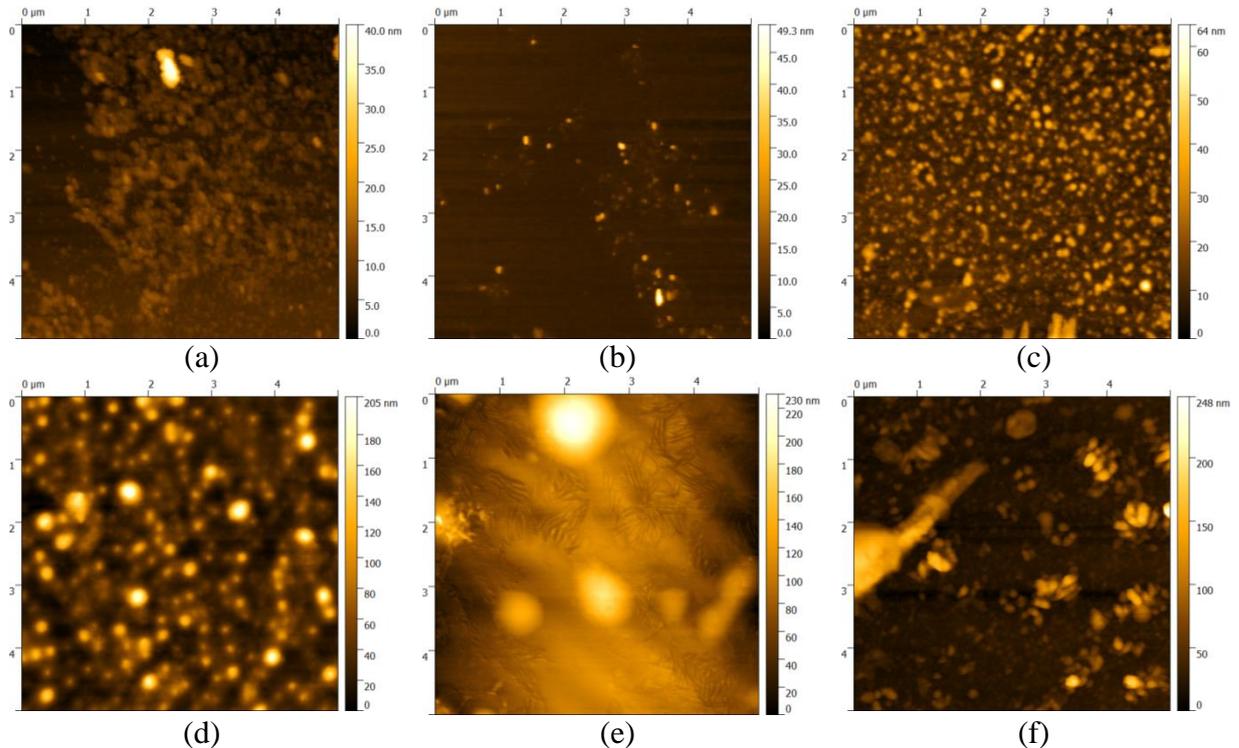
Portanto, como as bandas das etapas de deposição do AMHD e do EDC/NHS não aparecem nos espectros PM-IRRAS, quando adicionado as enzimas, isso demonstra que as mesmas foram imobilizadas no substrato, demonstrando a eficiência da funcionalização.

### 3.3.10 Microscopia de força atômica (AFM)

Utilização do AFM para o estudo de superfícies de nanoestruturas, é uma ferramenta robusta que permite avaliar como que a deposição das moléculas durante a funcionalização altera a rugosidade da superfície. A deposição de moléculas sobre uma superfície pode ocorrer nos vales ou nos picos, que são, respectivamente, regiões abaixo ou acima do plano médio da superfície (RODRIGUES, 2015). Assim, o cálculo da rugosidade leva em conta a diferença entre a dimensão destes componentes da superfície (KLAPETEK, NEČAS, ANDERSON, 2016).

A Figura 3.16 apresenta as imagens topográficas, em 2D, obtidas nas diferentes etapas de funcionalização da superfície do cantilever com a técnica de SAM, enquanto que a Tabela 3.3 apresenta os valores de rugosidade da superfície do cantilever não funcionalizado (silício) e após cada etapa da funcionalização para a construção dos nanobiossensores.

Figura 3.16 – Imagens 2D da superfície do cantilever durante as etapas de construção dos nanobiossensores. (a) Silício – cantilever não funcionalizado, deposição das camadas de (b) ouro, (c) AMHD, (d) EDC/NHS, (e) Fosfatase alcalina, (f) Urease



Fonte: O autor

Tabela 3.3 – Valores da raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) das superfícies em cada etapa de construção dos nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease

Etapa	Rms (nm)
Silício	$3,96 \pm 0,19$
Silício + Ouro	$2,02 \pm 0,17$
Silício + Ouro + AMHD	$5,67 \pm 0,30$
Silício + Ouro + AMHD + EDC/NHS	$27,13 \pm 1,35$
Silício + Ouro + AMHD + EDC/NHS + Fosfatase alcalina	$12,83 \pm 2,53$
Silício + Ouro + AMHD + EDC/NHS + Urease	$17,90 \pm 1,67$

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

Fonte: O autor

Observando a Figura 3.16, há diferenças na topografia de cada etapa de funcionalização da superfície do dispositivo. Analisando o substrato de silício (Figura 3.16a), observa-se uma superfície com domínios dispersos, enquanto que a camada contendo ouro apresenta uma superfície mais lisa (Figura 3.16b). Na superfície funcionalizada com AMHD (Figura 3.16c) e EDC/NHS (Figura 3.16d) verifica-se um formato de agrupamentos em coluna, o que também foi observado por Mukherjee et al. (2010). No entanto, a última camada

da funcionalização pela técnica de SAM, com a adição das enzimas fosfatase alcalina (Figura 3.16e) e urease (Figura 3.16f) apresenta uma morfologia mais homogênea com contornos maiores, mais definidos e com menos agrupamentos. Esse formato da topografia, referente a funcionalização do cantilever por meio da técnica de SAM, utilizando um alcanotiol, agentes reticuladores (EDC/NHS) e enzima, é semelhante ao encontrado na literatura (STEUDE et al., 2011).

Ao analisar a Tabela 3.3, observa-se que a superfície de silício apresenta rugosidade de 3,96 ( $\pm 0,19$ ) nm mesmo sem haver a deposição de moléculas. Essa rugosidade pode ser considerada uma característica do material. A deposição da camada de ouro diminuiu a rugosidade da superfície para 2,02 ( $\pm 0,17$ ) nm. Como por meio da técnica de *Sputtering* pode haver a deposição de átomos de ouro sob a forma de conglomerados (RODRIGUES, 2015), possivelmente esses conglomerados se depositaram nas regiões de vale, existentes na superfície de silício, preenchendo os espaços vazios, o que tornou a superfície mais lisa (Figura 3.16b). O valor da rugosidade obtido com a adição do ouro pela técnica de SAM está de acordo com o trabalho de Yu-Cheng et al. (2008), onde relatam uma rugosidade média de 1 a 2 nm na superfície de ouro.

A deposição da camada de AMHD levou ao aumento da rugosidade da superfície para 5,67 ( $\pm 0,30$ ) nm (Tabela 3.3). Em razão do AMHD possuir alta afinidade pelo ouro, há uma grande probabilidade de o mesmo se depositar nas regiões de picos, as quais estão mais expostas, e, por ser uma molécula de cadeia longa, isso também influencia para o aumento da rugosidade (Figura 3.16c).

Quando se adicionou a mistura dos agentes de reticulação EDC/NHS, houve um aumento da rugosidade da superfície para 27,13 ( $\pm 1,35$ ) nm, conforme observado na Tabela 3.3. Comportamento semelhantes de rugosidade do AMHD e EDC/NHS também foram observados no estudo de Kim et al. (2015), onde foi desenvolvido um biossensor de cantilever funcionalizado com a técnica de SAM, os autores relataram um aumento na rugosidade superficial quando houve a deposição das camadas de ácido 11-mercaptopundecanoico e EDC/NHS sobre a superfície de ouro do cantilever. Este aumento da rugosidade é devido à ocorrência de alterações nos grupos funcionais que ficam expostos na superfície, ou seja, da mudança do ouro para o ácido carboxílico e, após, para o éster de NHS.

No final da funcionalização, com a etapa de adição das enzimas fosfatase alcalina e urease, foi possível observar uma redução na rugosidade, com Rms de 12,83 ( $\pm 2,53$ ) nm e 17,90 ( $\pm 1,67$ ), respectivamente. Essa diminuição da rugosidade indica a formação de uma camada de preenchimento, a qual preencheu os espaços vazios, formando assim uma

superfície mais homogênea (Figura 3.16e/Figura 3.16f). Alonso et al. (2016) também observaram a redução dos valores de rugosidade (Rms), realizando a deposição da enzima glicose oxidase (GOX) sobre uma superfície de platina por meio da técnica de SAM.

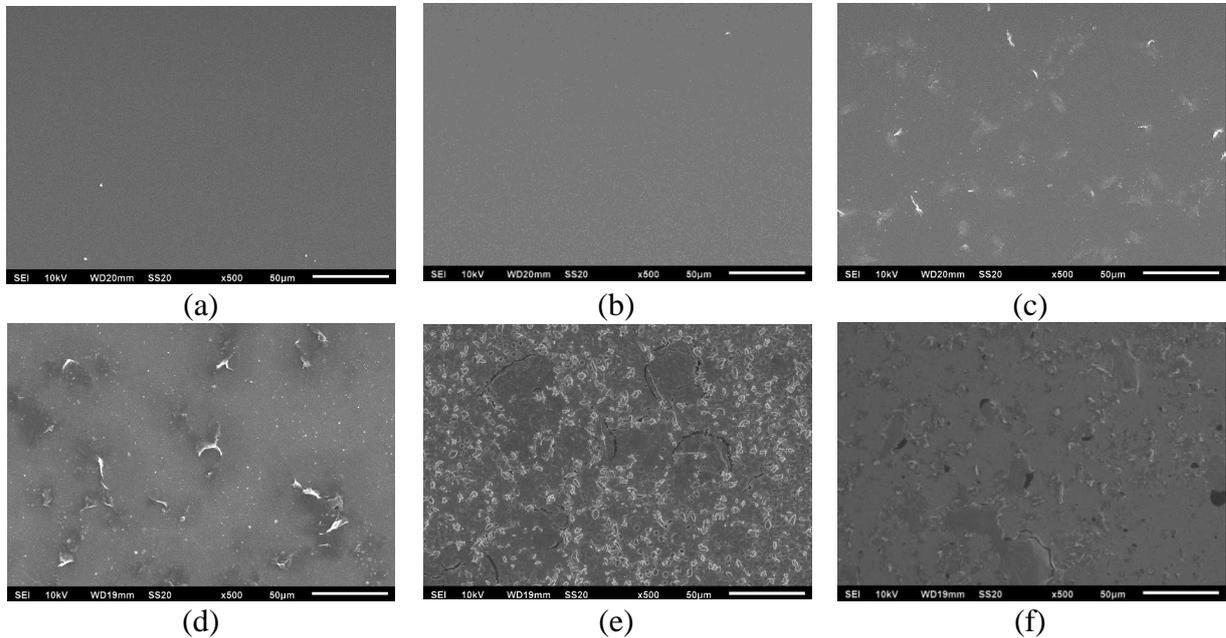
Desta forma, a diferença nos valores de rugosidade da superfície é um indicativo de que ocorreu a deposição de camadas sobre a superfície do silício, sugerindo assim que a funcionalização (Figura 3.16) foi realizada de forma eficiente.

A medida da espessura entre a camada sensora e a superfície removida, ou seja, não funcionalizada (contendo somente silício), apresentou um valor médio de 80,48 ( $\pm$  0,46) nm. Desta forma, pode-se afirmar que o nanobiossensor de cantilever desenvolvido neste trabalho apresenta a camada sensora na escala nanométrica (até 100 nm) (RAI et al., 2012). Assim, a camada sensora desenvolvida é favorável para a construção de dispositivos de sensoriamento devido a grande área superficial, aumentando sua sensibilidade.

### 3.3.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 3.17 apresenta as micrografias da superfície do cantilever durante as etapas de construção dos nanobiossensores. As micrografias da Figura 3.17a e Figura 3.17b correspondem a superfície do silício (sem funcionalização) e a deposição da camada de ouro, respectivamente, onde pode ser observado uma superfície lisa. A partir da deposição do AMHD (Figura 3.17c) e do EDC/NHS (Figura 3.17d), começa a ser observado a formação de agrupamentos dispersos. Porém na última camada de funcionalização, incorporando as enzimas fosfatase alcalina (Figura 3.17e) e urease (Figura 3.17f), apresenta uma formação mais uniforme, com grupamentos menores sobre a superfície. Esta morfologia é análoga ao encontrado na literatura (STEUDE et al., 2011). Desta forma, a funcionalização dos nanobiossensores de cantilever, por meio da técnica SAM, resulta em uma camada homogênea em somente um dos lados do sensor, o que é muito importante, devido o controle da adsorção de moléculas na superfície.

Figura 3.17 – Micrografias superfície do cantilever durante as etapas de construção dos nanobiossensores. (a) Silício (sem funcionalização), deposição das camadas de (b) Ouro, (c) AMHD, (d) EDC/NHS, (e) Fosfatase alcalina, (f) Urease, em resolução de 50  $\mu\text{m}$



Fonte: O autor

Segundo Lang e Gerber (2008) a adsorção de moléculas na superfície (funcionalizada em somente um lado) irá resultar em uma deflexão para cima ou para baixo devido à formação da tensão na superfície entre o lado funcionalizado e o não funcionalizado. Se a situação oposta ocorrer, ou seja, quando ambos os lados do cantilever (superior e inferior) são funcionalizados, ambos os lados estarão expostos a uma tensão de compressão predominante na superfície inferior do cantilever e, também, uma tensão de tração na superfície superior. Por esta razão, é extremamente relevante ter-se uma funcionalização adequada da superfície, de modo que o lado não funcionalizado não apresente resposta na exposição a um analito, nas medidas de voltagem do sensor de cantilever em modo estático.

### 3.4 Considerações parciais

O desempenho dos nanobiossensores baseados nas enzimas fosfatase alcalina e urease, imobilizadas sobre um cantilever de ouro modificado com camada auto-organizada do AMHD, posteriormente, utilizando os agentes de reticulação EDC/NHS, mostrou-se eficiente para a determinação dos metais pesados. Sendo possível verificar, por meio da análise de PCA, que os nanobiossensores mostraram uma boa discriminação dos metais  $\text{PbCl}_2$  II,  $\text{NiCl}_2$

II, CdCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> II e AlCl<sub>3</sub> em diferentes concentrações, revelando serem potenciais sensores na detecção de metais pesados em água.

Além disto, apresentaram respostas rápidas com limites de detecção na gama de µg/L (0,286 µg/L) e uma alta sensibilidade (0,321 V/ppb). Comparando-se o limite de detecção desse trabalho com os dados da literatura, observou-se que os mesmos, foram menores que os valores obtidos, tanto, por meio dos procedimentos convencionais de determinação de metais, utilizando a técnica de ICP OES, FAAS e GF FAAS, quanto, por meio de biossensores potenciométricos, reforçando o sucesso do procedimento desenvolvido.

O cantilever de silício não teve interação com os metais pesados e o cantilever revestido apenas com 70 nm de ouro, não conseguiu distinguir as diferentes concentrações do mesmo, demonstrando que a funcionalização empregada foi efetiva, desta forma, as enzimas escolhidas apresentaram afinidade com as soluções de metais pesados empregados.

Os nanobiossensores se mostraram 100% reversíveis, não apresentando perdas de sinal durante sucessivas medições, porém o tempo de estocagem afetou a resposta do mesmo, ocorrendo um aumento no limite de detecção e diminuição da sensibilidade durante 30 dias de armazenamento.

Em relação a caracterização da superfície dos nanobiossensores, a análise de PM-IRRAS das etapas de deposição das enzimas fosfatase alcalina e urease demonstrou as bandas típicas das enzimas (bandas amida I e amida II), o qual estavam presentes sobre a superfície do cantilever. Observou-se também, tanto pela técnica de AFM quanto por MEV, uma morfologia homogênea com contornos maiores e mais definidos, quando adicionado as enzimas. Sendo que por meio da técnica AFM, foi possível verificar valores de rugosidade diferentes para cada camada depositada e uma espessura compreendida na nanoescala, com cerca de 80,48 nm.

Sendo assim, podemos afirmar que a metodologia desenvolvida é viável e promissora na detecção de metais pesados em água.

### 3.5 Referências bibliográficas

ALONSO, J. M.; BIELEN, A. A. M.; OLTUIS, W.; KENGEN, S. W.M.; ZUILHOF, H.; FRANSSEN, M. C. R. Self-assembled monolayers of 1-alkenes on oxidized platinum surfaces as platforms for immobilized enzymes for biosensing. **Applied Surface Science**, v. 383, p. 283–293, 2016.

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no 899, de 29 de maio de 2003**. Brasil, 2003.

- ARYA, S. K.; SOLANKI, P. R.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2810–2817, 2009.
- AYENIMO, J. G.; ADELOJU, S. B. Inhibitive potentiometric detection of trace metals with ultrathin polypyrrole glucose oxidase biosensor. **Talanta**, v. 137, p. 62–70, 2015.
- BAUSSELS, J. Piezoresistive cantilevers for nanomechanical sensing. **Microelectronic Engineering**, v. 145, p. 9-20, 2015.
- BEREZHETSKYY, A. L.; SOSOVSKA, O. F.; DURRIEU, C.; CHOVELON, J.-M.; DZYADEVYCH, S.V.; TRAN-MINH, C. Alkaline phosphatase conductometric biosensor for heavy-metal ions determination. **IRBM**, v. 29, n. 2–3, p. 136-140, 2008.
- BLAKE, D. A.; JONES, R. M.; BLAKE II, R. C.; PAVLOV, A. R.; DARWISH, I. A.; YU, H. Antibodybased sensors for heavy metal ions. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 799–809, 2001.
- BLAUDEZ, D. TURLET, J. M.; DUFOURCQ, J.; BARD, D.; BUFFETEAU, T.; DESBAT, B. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. **Journal of the Chemical Society Faraday Transactions**, v.29, n.4, p. 525-530, 1996.
- BONTIDEAN, I.; AHLQVIST, J.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W.; BAE, W.; MEHRA, R. K. Novel synthetic phytochelatin-based capacitive biosensor for heavy metal ion detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 547–553, 2003
- BRASIL. **Portaria nº 518 em 25 de março de 2004**. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>> Acesso em: 25 de agosto de 2015.
- BRASIL. **Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011**. Ministério da Saúde. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html)> Acesso em: 25 de agosto de 2015.
- BRASIL. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> Acesso em: 25 de agosto de 2015.
- BRAZACA, L. C. **Desenvolvimento de um sistema para o diagnóstico precoce do diabetes mellitus tipo 2**. 2015. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Física Aplicada, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- BUCHAPUDI, K.; XU, X.; ATAIAN, Y.; JI, H.; SCHULTE, M. Micromechanical measurement of AChBP binding for label-free drug discovery. **Analyst**, v. 137, p. 263-268, 2013.
- BUDGETSENSORS. **AFM probe Model: ContGD-G**. 2016. Disponível em: <[http://www.budgetsensors.com/downloads/ContGD-G\\_Datasheet.pdf](http://www.budgetsensors.com/downloads/ContGD-G_Datasheet.pdf)>. Acesso em: 23 mai. 2016.
- BUTT, H. J. A Sensitive Method to Measure Changes in the Surface Stress of Solids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 180, p. 251-260, 1996.
- CARRASCOSA, L. G.; MORENO, M.; ÁLVAREZ, M.; LECHUGA, L. M. Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 196-206, 2006.

- CASTILLO, J.; GÁSPÁR, S.; LETH, S.; NICULESCU, M.; MORTARI, A.; BONTIDEAN, I. Biosensors for life quality: design, development and applications. **Sensors Actuators B Chemical**, v. 102, p. 179–194, 2004.
- CHEN, C. D.; LI J. Interfacial design and functionization on metal electrodes through self-assembled monolayers. **Surface Science Reports**, v. 61, p. 445-463, 2006.
- CHENA, X.; CHENB, W.; MULCHANDANIB, A.; MOHIDEENA, U. Application of displacement principle for detecting heavy metal ions and EDTA using microcantilevers. **Sensors and Actuators**, v. B 161, p. 203 – 208, 2012.
- CHERIAN, S.; GUPTA, R. K.; MULLIN, B. C.; THUNDAT, T. Detection of heavy metal ions using protein-functionalized microcantilever sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 411-416, 2003.
- CORNUT, I.; DESBAT, B.; TURLET, J. M.; DUFOURCQ, J. In situ study by polarization modulated Fourier transform infrared spectroscopy of the structure and orientation of lipids and amphipatic peptides at the air-water interface. **Biophysics Journal**, v. 70, p. 305-312, 1996.
- DEEP, A.; BHARDWAJ, S. K.; PAUL, A. K.; KIM, K.-H.; KUMAR, P. Surface assembly of nano metal organic framework on amine functionalized indium tin oxide substrate for impedimetric sensing of parathion. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 65, p. 226–231, 2015.
- DICKO, A.; BOURQUE, H.; PÉZOLET, M. Study by infrared spectroscopy of the conformation of dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers at the air-water interface and transferred on solid substrates. **Chemistry and Physics of lipids**, v. 96, n.1-2, p.125-139, 1998.
- FENG, J.; MACDIARMID, A. G. Sensors using octaaniline for volatile organic compounds. **Synthetic Metals**, v. 102, n. 1–3, p. 1304–1305, 1999.
- FERNANDES, E. G. R. **Biosensores nanoestruturados para monitoração de glicose. 175 p. Dissertação** (Mestrado). Departamento de Física e Química, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2005.
- 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.
- GABROVSKA, K.; GODJEVARGOVA, T. Optimum immobilization of urease on modified acrylonitrile copolymer membranes: Inactivation by heavy metal ions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 69–75, 2009.
- GALLI, A. **Desenvolvimento e caracterização de um biossensor bienzimático imobilizado sobre monocamadas auto-organizadas para determinação de açúcares em alimentos.** 2009. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Química Analítica, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- GODDARD, J. M.; HOTCHKISS, J. H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 7, p. 698-725, 2007.
- GOODING, J. J.; HIBBERT, D. B. The application of alkanethiol selfassembled monolayers to enzyme electrodes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 525-533, 1999.

- GUO, S.; ZHU, X.; LOH, X.J. Controlling cell adhesion using layer-by-layer approaches for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v, 70, p. 1163-1175, 2017.
- HAN, Y.; UOSAKI, K. Effects of concentration and temperature on the formation process of decanethiol self-assembled monolayer on Au(111) followed by electrochemical reductive desorption. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 6196–6201, 2008.
- HERRMANN, P. S. P.; SILVA, M. A. P.; BERNARDES, R.; JOB, A. E.; COLNAGO, L. A.; FROMMER, J. E.; MATTOSO, L. H.C. Microscopia de Varredura por Força: uma Ferramenta Poderosa no Estudo de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.7, n.4, p. 51-61, 1997.
- HOMAEI, A. Immobilization of *Penaeus merguensis* alkaline phosphatase on gold nanorods for heavy metal detection. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 1–7, 2017.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, Gold Book. 2014.
- JANATA, J. **Principles of Chemical Sensors**. Boston, MA: Springer US, 2009.
- JANEGITZ, B. C.; PAULIUKAITE, R.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 158, n.1, p. 411-417, 2011.
- JI, H. F.; DABESTANI, R.; FINOT, E.; THUNDAT, T.; BROWN, G. M.; BRITT, P. F. A. Novel SelfAssembled Monolayer (Sam) Coated Microcantilever for Low Level Caesium Detection. **Chemical Communications**, v. 6, p. 457-458, 2000
- KARNATI, C.; DU, H.; JI, H. F.; XU, X.; LVOV, Y.; MULCHANDANI, A.; MULCHANDANI, P.; CHEN, W. Organophosphorus hydrolase multilayer modified microcantilevers for organophosphorus detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2636-2642, 2007.
- KIM, H. H.; JEON, H. J.; CHO, H. K.; CHEONG, J. H.; MOON, H. S.; GO, J. S. Highly sensitive microcantilever biosensors with enhanced sensitivity for detection of human papilloma virus infection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 221, p. 1372-1383, 2015.
- KLAPETEK, P.; NEČAS, D.; ANDERSON, C. **Gwyddion user guide**. 2016. Disponível em: <http://gwyddion.net/documentation/user-guide-en/>. Acesso em: 02 fev. 2017.
- KONCKI, R.; RUDNICKA, K.; TYMECKI, L. Flow injection system for potentiometric determination of alkaline phosphatase inhibitors. **Analytica Chimica Acta**, v. 577, p. 134–139, 2006.
- KREIDER, A.; SELL, S.; KOWALIK, T.; HARTWIG, A.; GRUNWALD, I. Influence of immobilization protocol on the structure and function of surface bound proteins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 378–382, 2014.
- KUMAR, P.; DEEP, A.; KIM, K.-H.; BROWN, R. J. C. Coordination polymers: opportunities and challenges for monitoring volatile organic compounds. **Progress in Polymer Science**, v. 45, p. 102–118, 2015.

- LANG, H.; GERBER, C. Microcantilever Sensors. In: SAMORÌ, P. (Ed.). *STM and AFM Studies on (Bio)molecular Systems: Unravelling the Nanoworld*: Springer Berlin Heidelberg, v. 285, cap. 28, p.1-27. (Topics in Current Chemistry). ISBN 978-3-540-78394-7, 2008.
- LANG, H.; HEGNER, M.; GERBER, C. Nanomechanical Cantilever Array Sensors. In: BHUSHAN, B. (Ed.). **Springer Handbook of Nanotechnology**: Springer Berlin Heidelberg. cap. 15, p.427-452, 2010.
- LEITE, F. L.; PATERNO, L. G.; BORATO, C. E.; HERMANN, P. S. P.; OLIVEIRA, 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.
- MARTINAZZO, J.; MUENCHEN, D. K.; BREZOLIN, A. N.; CEZARO, A. M.; RIGO, A. 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**, v. 53, p. 229-236, 2018.
- MEHTA, J.; BHARDWAJ, S. K.; BHARDWAJ, N.; PAUL, A. K.; KUMAR, P.; KIM, K. H.; DEEP, A. Progress in the biosensing techniques for trace-level heavy metals. **Biotechnology Advances**, v. 34, p. 47-60, 2016.
- MHLONGO, S.; MATIVENGA, P. T.; MARNEWICK, A. Water quality in a mining and water-stressed region. **Journal of Cleaner Production**, v.171, p. 446-456, 2018.
- MUENCHEN, D. K. **Desenvolvimento de biossensor nanoestruturado de cantilever utilizando peroxidase de fonte vegetal para detecção de glifosato em água** (2017). Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2017.
- MUKHERJEE, D.; MAY, M.; VAUGHN, M.; BRUCE, B. D.; KHOMAMI, B. Controlling the Morphology of Photosystem I Assembly on Thiol-Activated Au Substrates. **Langmuir**, v. 26, n. 20, p. 16048-16054, 2010.
- OGOŃCZYK, D.; TYMECKI, L.; WYŻKIEWICZ, I.; KONCKI, R.; GLAB, S. Screen-printed disposable urease-based biosensors for inhibitive detection of heavy metal ions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, n. 106, p. 450-454, 2005.
- OSHITA, D.; OLIVEIRA, A. P.; GOMES NETO, J. A.; MORAES, M. Determinação direta e simultânea de Al, As, Fe, Mn e Ni em cachaça por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. **Eclética Química**, v. 28, n. 1, p. 91-96, 2003.
- 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**. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Química Analítica e Inorgânica, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- RAI, M.; GADE, A.; GAIKWAD, S.; MARCATO, P. D.; DURÁN, N. Biomedical Applications of Nanobiosensors: the State-of-the-Art. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 1, p. 14-24, 2012.
- RAMALHO, J. F. G. P.; SOBRINHO, N. M. B. A.; VELLOSO, A. C. X. Contaminação da microbacia de caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 1289-1303, 2000.

- RAÑOLA, R. A. G.; SANTIAGO, K. S.; SEVILLA, F. B. Use of array of conducting polymers for differentiation of coconut oil products. **Talanta**, v. 146, p. 75–82, jan. 2016.
- RODRIGUES, L. F. **Desenvolvimento de Nanobiossensores Utilizando Cantileveres Inteligentes Para Detecção do Herbicida Mesotriona e do Vírus da Tristeza dos Citros**. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2015.
- RUMAYOR, V. G.; IGLESIAS, E. G.; GALÁN, O. R.; CABEZAS, L. G. **Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria**. Madri: Elecé Industria Gráfica, p. 113, 2005.
- SANTONICO, M.; PITTIA, P.; PENNAZZA, G.; MARTINELLI, E.; BERNABEI, M.; PAOLESSE, R.; D’AMICO, A.; COMPAGNONE, D.; DI NATALE, C. Study of the aroma of artificially flavoured custards by chemical sensor array fingerprinting. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 133, n. 1, p. 345–351, 2008.
- SATOFUKA, H.; AMANO, S.; ATOMI, H.; TAKAGI, M.; HIRATA, K.; MIYAMOTO, K.; IMANAKA, T. Rapid method for detection and detoxification of heavy metal ions in water environments using phytochelation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, p. 287–292, 1999.
- SCHMIDT, T. F.; CASELI, L.; VIITALA, T.; OLIVEIRA, O. N. Enhanced activity of horseradish peroxidase in Langmuir–Blodgett films of phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, n. 2291–2297, 2008.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2005.
- SOARES, B. M. C.; SARON, E. S. Microanálise Elementar de Materiais: Aplicações do Sistema MEV-EDX. **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 4, 2010.
- SONGA, E. A.; OKONKWO, J. O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: a review. **Talanta**, v. 155, p. 289–304, 2016.
- STEFFENS, C. **Desenvolvimento de Microcantilever Funcionalizado com Polímero Condutor para a Detecção de Compostos Orgânicos Voláteis e Umidade Relativa**. (2012). 180f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 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.
- STEUDE, A.; SCHMIDT, S.; ROBITZKI, A. A.; PÄNKE, O. An electrode array for electrochemical immuno-sensing using the example of impedimetric tenascin C detection. **Lab on a Chip**, v. 11, p. 2884-2892, 2011.
- TAMAYO, J.; KOSAKA, P. M.; RUZ, J. J.; PAULO, A. S.; CALLEJA, M. Biosensors Based on Nanomechanical Systems. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 3, p. 1287-1311, 2013.
- TIAN, J.; **A capacitive surface stress biosensor for CSFV detection**. *Micro/Nano Devices and Systems*, v. 159, p. 55-59, 2016.

- TSAI, H. C.; DOONG, R. A.; CHIANG, H. C.; CHEN, K. T. Sol-gel derived urease-based optical biosensor for the rapid determination of heavy metals. **Analytica Chimica Acta**, v. 481, p. 75–84, 2003.
- UPADHYAY, L. S. B.; VERMA, N. Alkaline phosphatase inhibition based conductometric biosensor for phosphate estimation in biological fluids. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 611–616, 2015.
- VEL KRAWCZYK, T. K.; MOSZCZYŃSKA, M.; TROJANOWICZ, M. Inhibitive determination of mercury and other metal ions by potentiometric urea biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, p. 681–691, 2000.
- VELANKI, S.; JI, H. F. Detection of feline coronavirus using microcantilever sensors. **Measurement Science and Technology**, v. 17, p. 2964–2968, 2006.
- VELANKIA, S.; KELLYA, S.; THUNDATB, T.; BLAKEC, D. A.; JI, H. F. Detection of Cd(II) using antibody-modified microcantilever sensors. **Ultramicroscopy**, v. 107, p. 1123–1128, 2007.
- VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 203–216, 2001.
- WANG, S.; WANG, J.; ZHU, Y.; YANG, J.; YANG, F. A new device for liver cancer biomarker detection with high accuracy. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 4, p. 40–45, 2015.
- XIA, N.; XING, Y.; WANG, G.; FENG, Q.; CHEN, Q.; FENG, H.; SUN, X.; LIU, LIN. 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.
- YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 551–556, 1998.
- YU, H.; WANG, J.; XIAO, H.; LIU, M. Quality grade identification of green tea using the eigenvalues of PCA based on the E-nose signals. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 140, n. 2, p. 378–382, 2009.
- YU-CHENG, L.; YU-CHIA, T.; WOO-HU, T.; TSUI-SHAN, H.; KO-SHAO, C.; SHU-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.
- ZHAO, H.; XUE, C.; NAN, T.; TAN, G.; LI, Z.; LI, Q. X.; ZHANG, Q.; WANGA, B. Detection of copper ions using microcantilever immunosensors and enzyme-linked immunosorbent assay. **Analytica Chimica Acta**, v. 676, p. 81–86, 2010.

## CAPÍTULO IV

### 4 NANOBIOSENSORES DE CANTILEVER FUNCIONALIZADOS COM AS ENZIMAS FOSFATASE ALCALINA E UREASE PARA DETECÇÃO DE CHUMBO EM AMOSTRAS REAIS DE ÁGUA

#### 4.1 Introdução

A liberação antropogênica de metais pesados para o ambiente, contribui no agravamento da contaminação dos corpos hídricos. Entre os problemas de saúde associados ao desenvolvimento industrial, os metais pesados lançados no ambiente causam uma ameaça significativa para a saúde pública. Quantidades excessivas de íons de metais pesados na água potável resultam em várias doenças (VERMA; GUPTA, 2015; ULLAH et al., 2018).

O chumbo (Pb) é um metal utilizado no fabrico de variados produtos (baterias, munições, soldas, tintas, etc.) e grande parte do chumbo utilizado na sua forma metálica é recuperado para posteriores reutilizações. No entanto, o Pb usado em formas compostas é mais difícil de recuperar e perdem-se grandes quantidades, que encontram o seu destino final no meio ambiente (ADDO et al., 2012). Desta forma, a presença deste metal, no ambiente aquático, é uma grande preocupação devido aos seus efeitos nocivos, capacidade de se acumular nos tecidos da biota aquática e considerável não-degradabilidade (BENSON et al., 2018). Além disto, a ingestão de Pb pode provocar lesões no sistema nervoso, causando convulsões, irritabilidade, perda de memória, déficit intelectual e até mesmo mutações genéticas (DESHOMMES et al., 2016; LUZARDO et al., 2017).

Consequentemente, por razões de proteção à saúde humana e ao meio ambiente, existe uma necessidade de monitorar o teor de íons de metais pesados, principalmente em ambientes aquáticos. Desta forma, foram desenvolvidos vários métodos para detecção de metal pesado, como a espectrometria de absorção atômica (BANNON; CHISOLM, 2001), espectroscopia de fluorescência (HE et al., 2006), a espectroscopia de massa de plasma acoplada indutivamente (CORBISIER et al., 1999), entre outros. Embora esses métodos estejam bem estabelecidos, eles são complexos, demorados, volumosos e necessitam etapas de pré-tratamento da amostra. Portanto, o desenvolvimento de metodologias mais rápidas, mas ainda assim sensíveis para a detecção de Pb em águas é relevante. Neste sentido, com o avanço da nanotecnologia, a deposição de filmes nanoestruturados sobre cantileveres, derivados de experiências de microscopia de força atômica (AFM), para uso como biossensor, se apresenta como uma alternativa promissora, pois estes dispositivos apresentam alta sensibilidade, por causa do seu

tamanho miniaturizado, o que resulta em uma maior área superficial (VASHIST, 2007; ULLAH et al., 2018).

Os nanobiossensores de cantileveres apresentam-se como dispositivos versáteis e compactos (UZUNLAR et al., 2013; TOUHAMI, 2014) para a detecção de inúmeros analitos, entre eles poluentes ambientais, tais como metais pesados (CHEN et al., 2012). Além disso, exibem resposta rápida e em tempo real, proporcionando uma oportunidade futura para a análise no local onde encontram-se os poluentes. Outras vantagens desses dispositivos são a utilização de pequenas quantidades de amostras (1-2 mL), o reconhecimento específico e possibilidade de detecção de analitos múltiplos através da fabricação de arranjo de sensores (RAITERI et al., 2001; CASTILLO et al., 2004; DEVREESE, 2007; LANG, HEGNER, GERBER, 2010;). Conforme Hansen e Thundat (2005) nenhuma outra tecnologia de sensoriamento oferece tal versatilidade.

Também é importante ressaltar que a aplicação de amostras ambientais em novos biossensores é fundamental nas etapas finais do desenvolvimento. Grande número dos sistemas analisados atualmente ainda tem um caminho a percorrer antes que a aplicação às amostras reais possa ser realizada, sendo que o estudo dos efeitos de matriz, questões de estabilidade e comparação cuidadosa com os métodos estabelecidos são passos cruciais nesse sentido (KURBANOGLU; OZKAN; MERKOÇI, 2017; MALEKI et al., 2017).

Neste contexto, este estudo tem por objetivo a aplicação dos nanobiossensores de cantilever, funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease, na detecção de chumbo em amostras reais de água e comparar com um método convencional de detecção, bem como investigar o efeito da matriz sobre a resposta dos nanobiossensores em amostra real.

## **4.2 Material e métodos**

### **4.2.1 Localização e coleta das amostras de água**

A escolha do local para a coleta de amostras de água, para aplicação dos nanobiossensores na detecção do Pb, foi a cidade de Erechim, localizada na região norte do estado do Rio Grande do Sul, a 27°37'54" de latitude sul e a 52°16'52" de longitude oeste. Possui uma área de 425,86 Km<sup>2</sup> e situa-se a 768 m acima do nível do mar, apresentando um clima subtropical com temperatura média anual de 18,7 °C (PREFEITURA MUNICIPAL DE ERECHIM, 2011).

Uma parte da microbacia do rio Tigre, é responsável pelo fornecimento e manutenção do abastecimento de água potável à população domiciliada na área urbana, localiza-se na porção Centro-Occidental, apresentando uma área de 90,71 Km<sup>2</sup>, que acompanha o referido rio. Este recebe cinco bacias contribuintes, destacando-se os rios Ligeirinho e Leãozinho, que abastecem o reservatório da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN). A microbacia abriga mais de 90% do perímetro urbano de Erechim (RAMPAZZO, 2003)

A Tabela 4.1 apresenta a localização dos 4 pontos de amostragem, sendo a amostra 1 proveniente de efluente urbano, a amostra 2 responsável pelo abastecimento do reservatório da CORSAN, a amostra 3 pertencente a água de torneira e a amostra 4 referente a água mineral comercial.

Tabela 4.1 – Localização das amostras de água

Amostras	Latitude (Datum – WGS84)	Longitude (Datum – WGS84)	Características
1	27°38'35.32"S	52°14'49.34"W	Rio Tigre – Afluente da Margem Esquerda (Urbano)
2	27°40'57.01"S	52°14'39.50"W	Rio Leãozinho – Abastece Barragem Corsan
3	27°38'57.07"S	52°16'09.52"W	Água de torneira – Laboratório da URI
4	27°55'33.00"S	53°02'13.00"W	Água mineral comercial

Fonte: O autor

A coleta das amostras de águas foi realizada observando 15 dias sem precipitação pluviométrica, pois assim a análise se torna mais precisa, não ocorrendo a lixiviação dos compostos de interesse pelas águas da chuva.

A amostragem foi realizada a uma profundidade 10 a 15 cm abaixo da superfície da água, para evitar contaminantes superficiais. As amostras foram armazenadas em frascos de polietileno, com capacidade para 500 mL, previamente descontaminados com ácido nítrico a 3 M (Química Moderna – 65%) e enxaguados vigorosamente com água destilada, deionizada e ultrapura.

Todas as amostras foram identificadas com o local da coleta e transportadas ao abrigo da luz solar até o Laboratório de Termodinâmica da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim. Todas as amostras coletadas foram filtradas com papel filtro qualitativo com gramatura de 80 g/m<sup>2</sup>, para garantir a remoção de possíveis interferentes da amostra, aumentando assim a seletividade do método de detecção.

#### 4.2.2 Análise físico-química das águas

Foram analisados alguns parâmetros físico-químicos das águas, tais como turbidez, pH e condutividade elétrica, estas análises foram realizadas por leitura direta, ou seja, as amostras não passaram por nenhum pré-tratamento. Os métodos para análise destes parâmetros estão descritos no Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998). Todas as análises foram submetidas a análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 95% de confiança, utilizando o *software* Statistic 8.0.

##### 4.2.2.1 Turbidez

A análise de turbidez foi realizada com auxílio de um turbidímetro (Poli Control, Modelo AP – 2000). Por meio desta análise é possível detectar a presença de partículas em suspensão, relativa à cor, o qual pode concorrer para o agravamento da poluição. A turbidez limita a penetração de raios solares, restringindo a realização da fotossíntese que, por sua vez, reduz a reposição do oxigênio (AZHAR et al., 2015).

##### 4.2.2.2 pH

O pH foi obtido por meio de um pHgâmetro (Digimed, Modelo DM – 22). As medidas de pH, são de extrema utilidade, pois fornecem inúmeras informações a respeito da qualidade da água. Nas águas naturais às variações deste parâmetro é ocasionado geralmente pelo consumo e/ou produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), realizados pelos organismos fotossintetizadores e pelos fenômenos de respiração/fermentação de todos os organismos presentes na massa de água, produzindo ácidos orgânicos fracos (EFFENDI, 2016).

##### 4.2.2.3 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica foi analisada por meio de um condutivímetro (Meter, Modelo 8306). Essa análise corresponde a uma medida resultante da aplicação de uma dada força elétrica, que é diretamente proporcional à quantidade de sais presentes em uma solução. Devido à facilidade e rapidez de determinação da condutividade elétrica, este se tornou um

parâmetro padrão para expressar a concentração total de sais para classificação de solos e das águas destinadas à irrigação (SHRESTHA; KAZAMA, 2007).

#### 4.2.3 Detecção de chumbo (Pb) por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS)

Por meio da análise de GF AAS foi realizada a quantificação do Pb, nos diferentes pontos de amostragem (Tabela 4.1), utilizado a metodologia recomendada pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998).

Para tanto, 150 mL das amostras foram digeridas em 10 mL de HNO<sub>3</sub> (ácido nítrico) (Química Moderna – 65%) em chapa de aquecimento (Fisatom, modelo 752A) até o volume final ficar em 50 mL. Posteriormente o volume final obtido foi analisado em um espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), (PerkinElmer, Modelo PinAAcle 900T). Esta análise foi realizada no laboratório da Embrapa Instrumentação em São Carlos/SP. As análises foram tomadas em triplicata.

Esta análise que possui procedimentos bem desenvolvidos e estabelecidos, tem por objetivo a comparação com a resposta obtida pelos nanobiossensores de cantilever, visando a comprovação da eficiência da técnica de detecção de metais pesados desenvolvida neste trabalho.

#### 4.2.4 Análise de detecção de chumbo (Pb) pelos nanobiossensores de cantileveres

Para a realização da análise de detecção de PbCl<sub>2</sub> II (Cloreto de Chumbo II) (Alamar Tecno Científica – 99%) por meio dos nanobiossensores de cantilever, primeiramente os cantileveres (ContGD-G, BudgetSensors<sup>®</sup>), com frequência de ressonância de 13,0 (±4) kHz e constante de mola de 0,2 (0,07-0,4) N/m, foram funcionalizados com as enzimas comerciais fosfatase alcalina de mucosa intestinal bovina (10 U/mg) (Sigma Aldrich) e urease de *Canavalia ensiformis* (75,26 U/mg) (Sigma Aldrich), utilizando a técnica SAM para a imobilização, conforme a metodologia de Velanki e Ji (2006) e Martinazzo et al. (2018).

Então foi preparada uma solução estoque na concentração de 10 mg/L de PbCl<sub>2</sub> II, e a partir desta, foram preparadas as concentrações 0,01, 0,1, 1, 10 e 50 µg/L, em água ultrapura (Millipore Co. 18,2 MΩ/cm). Posteriormente, para a leitura das amostras utilizou-se em torno de 0,5 mL de cada concentração, o qual foram injetadas, com o auxílio de uma pipeta de pasteur, sobre uma placa de aço inoxidável no AFM (Nanosurf, C3000 Controller).

As soluções foram analisadas em ordem crescente de concentração, ou seja, injetava-se a menor concentração (0,01 µg/L), efetuava-se a leitura do sinal de voltagem por 60 min, em modo estático. Após a leitura, a solução era retirada, com o auxílio de uma pipeta de pasteur, e injetava-se a próxima solução, assim sucessivamente até a última solução (50 µg/L). A análise era efetuada por meio da realização de uma imagem gerada pelo *software* do AFM, a partir dos parâmetros: área de 0 µm<sup>2</sup>, resolução de 1800 x 1800 pontos e velocidade de varredura de 1 s/linha.

As imagens geradas pelo AFM foram convertidas em um gráfico de voltagem (V) *versus* tempo de contato (min) por meio do *software* Gwyddion (Versão 2.45). Os valores de voltagem obtidos foram provenientes do sinal do fotodetector do equipamento. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.2.5 Aplicação dos nanobiossensores em amostras reais de água

A primeira etapa para a aplicação dos nanobiossensores em amostras reais de água é a investigação do efeito da matriz, o qual é um aspecto importante da avaliação dos métodos analíticos, sendo caracterizada por ser um tipo de interferência gerada pela combinação de todos os outros componentes da amostra que diminuem ou aumentam o sinal analítico detectado e afetam diretamente a quantificação do analito de interesse (SILVA; PAZ; CAVALCANTE, 2017).

Desta forma, as amostras 1 e 2 (Tabela 4.1), foram escolhidas para realização do efeito matricial, por serem amostras pertencentes a pontos de coleta bem distintos, o primeiro proveniente de efluentes urbanos e o segundo proveniente da barragem de abastecimento do município.

Para tanto, foram preparadas soluções com diferentes quantidades de água de rio em uma solução padrão de 10 µg/L de PbCl<sub>2</sub> II, na proporção de 1:1, 1:5 e 1:10 (v:v) (solução padrão: água de rio). Além disso, também foram testadas, a água ultrapura (branco), água de rio sem adição da solução padrão (amostras 1 e 2) e a solução padrão de 10 µg/L de PbCl<sub>2</sub> II, a fim de comparação, as quais foram submetidas a leitura dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease em AFM, como descrito no item 4.2.4.

Por fim, a resposta de detecção do Pb utilizando os nanobiossensores de cantilever funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease, foi realizada por meio da diluição das amostras coletadas (Tabela 4.1) em água ultrapura na proporção 1:1, a fim de minimizar

os efeitos matriciais. A água ultrapura foi utilizada neste caso, como solução padrão, para que não houvesse nenhuma interferência do metal analisado (Pb) na resposta dos nanobiossensores.

### 4.3 Resultados e discussão

#### 4.3.1 Análise dos parâmetros físico-químicos

A Tabela 4.2 apresenta os resultados de turbidez, condutividade elétrica e pH das amostras de água.

Tabela 4.2 – Turbidez, condutividade elétrica e pH das amostras de água coletadas.

Amostras	Turbidez (NTU)	Condutividade ( $\mu$ s)	pH
1	47,56 $\pm$ (1,25) <sup>a</sup>	186,10 $\pm$ (8,87) <sup>b</sup>	6,85 $\pm$ (0,05) <sup>c</sup>
2	11,06 $\pm$ (0,90) <sup>b</sup>	50,46 $\pm$ (0,05) <sup>d</sup>	7,15 $\pm$ (0,11) <sup>b</sup>
3	0,01 $\pm$ (0,18) <sup>c</sup>	61,40 $\pm$ (0,10) <sup>c</sup>	6,95 $\pm$ (0,08) <sup>bc</sup>
4	0,00 $\pm$ (0,12) <sup>c</sup>	315,00 $\pm$ (8,08) <sup>a</sup>	9,27 $\pm$ (0,03) <sup>a</sup>

\* Dados apresentados como média (três repetições)  $\pm$  Desvio Padrão. Letras iguais na coluna indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey) entre os diferentes os parâmetros físico-químicos.

Fonte: O autor

De modo geral o pH não apresentou uma grande variação entre as 2 primeiras amostras coletadas, mesmo apresentando diferença significativa a nível de 5%. As amostras 1 e 2 estão dentro dos padrões permitidos pela resolução nº 357 do CONAMA (BRASIL, 2005), que considera os valores de pH entre 6,0 a 9,0. Já para as amostras 3 e 4, onde corresponde água de torneira e água mineral, respectivamente, a legislação que rege os padrões de potabilidade é a Portaria nº 2914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) e segundo a ela, para a água ser potável, a mesma deve se apresentar na faixa de pH de 6,0 a 9,5. Dessa forma as amostras 3 e 4 estão dentro da legislação apresentando um pH de 6,95 e 9,27, respectivamente.

Os valores de pH apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as amostras de coleta de água, e isto se deve ao fato de que, as águas superficiais possuem um pH que varia de 4,0 a 9,0. Às vezes são ligeiramente alcalinas devido à presença de carbonatos e bicarbonatos. Naturalmente, nesses casos, o pH reflete o tipo de solo por onde a água percorre. Geralmente um pH muito ácido ou muito alcalino está associado à presença de despejos industriais (EFFENDI, 2016).

Em relação a turbidez, as amostras 1 e 2 apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), porém seus valores são inferiores a 100 NTU, os quais encontram-se dentro da legislação (BRASIL, 2005). Esta diferença no valor da turbidez, se deve ao fato de que a amostra 1 é proveniente de um corpo hídrico (Rio Tigre) com alta carga de efluente urbano, apresentando uma baixa vazão causando uma turbidez mais elevada, já a amostra 2 pertence ao rio Leãozinho, o qual está localizado na zona rural e é responsável pelo abastecimento de água potável do município, por este motivo a turbidez da amostra 2 é em torno de 20% menor que a da amostra 1.

As amostras 3 e 4 apresentaram valores nulos de turbidez, por serem águas próprias para o consumo humano (torneira e mineral, respectivamente).

A água é turva quando recebe certa quantidade de partículas que permanecem, por algum tempo, em suspensão, sendo que estas partículas podem ser do próprio solo quando não há mata ciliar, ou provenientes de atividades minerais, como portos de areia, exploração de argila, indústrias, ou mesmo de esgoto das cidades (AZHAR et al., 2015).

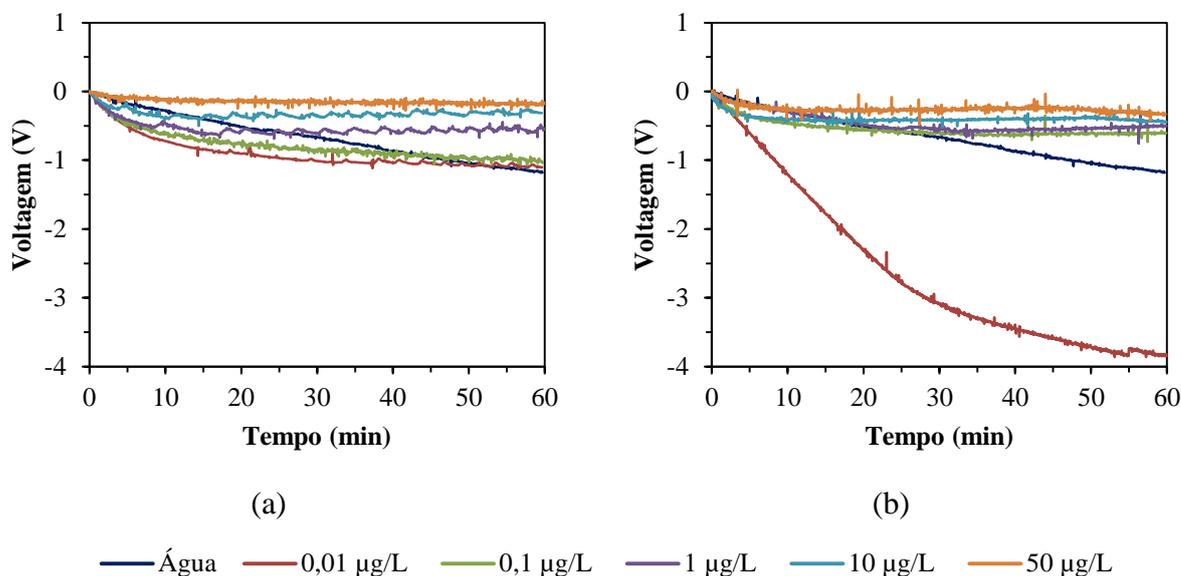
A condutividade elétrica não possui valores preconizados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), contudo, verifica-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras de água analisadas. Sendo a amostra 4 a que possui o maior valor (315,00  $\mu\text{s}$ ) e a amostra 2 o menor (50,46  $\mu\text{s}$ ). Desta forma, quanto maior for a quantidade de íons dissolvidos, maior será a condutividade elétrica da água. O parâmetro de condutividade elétrica não determina, especificamente, quais os íons que estão presentes em determinada amostra de água, mas pode contribuir para possíveis reconhecimentos de impactos ambientais que ocorram na bacia de drenagem ocasionada por lançamentos de resíduos industriais, mineração, esgotos, etc. (SHRESTHA; KAZAMA, 2007).

A condutividade elétrica da água pode variar de acordo com a concentração total de substâncias ionizadas dissolvidas. Em águas cujos valores de pH se localizam nas faixas extremas ( $\text{pH} > 9$  ou  $\text{pH} < 5$ ), os valores de condutividade são devidos apenas às altas concentrações de poucos íons em solução, dentre os quais os mais frequentes são o  $\text{H}^+$  e o  $\text{OH}^-$  (SHRESTHA; KAZAMA, 2007; AZHAR et al., 2015).

#### 4.3.2 Resposta dos nanobiossensores de cantilever na detecção de chumbo (Pb)

A Figura 4.1 apresenta as respostas de detecção das diferentes concentrações de  $\text{PbCl}_2$  II em função do tempo, dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com a enzima fosfatase alcalina e urease.

Figura 4.1 – Resposta de detecção dos nanobiossensores funcionalizados com a enzima fosfatase alcalina (a) e urease (b) em função do tempo para diferentes concentrações de  $\text{PbCl}_2$  II e água ultrapura



Fonte: O autor

As medidas do sinal de voltagem foram realizadas durante 60 min, sendo possível verificar que houve diferença no sinal de voltagem na resposta dos nanobiossensores em relação às diferentes concentrações do metal (0,01; 0,1; 1, 10 e 50  $\mu\text{g/L}$ ), apresentando um comportamento diretamente proporcional ao sinal de voltagem (quanto maior a concentração do metal maior o sinal).

Observa-se também que a concentração de 0,01  $\mu\text{g/L}$ , foi a que apresentou uma maior discrepância entre os dois nanobiossensores, exibindo uma diferença de 2,74 V entre eles. Além disso, os nanobiossensores apresentaram uma voltagem diferente entre as concentrações de  $\text{PbCl}_2$  II e a água ultrapura, indicando a detecção da presença deste metal no meio.

Desta forma é possível relatar que, a adsorção do metal no lado da superfície funcionalizada, causa uma tensão de compressão, o qual é lida como um sinal de voltagem, correspondente a detecção das diferentes concentrações de  $\text{PbCl}_2$  II pelos nanobiossensores (KARNATI et al., 2007).

O limite de detecção e sensibilidade para o nanobiossensor funcionalizado com a enzima fosfatase alcalina foi de 0,323 ( $\pm 0,06$ )  $\mu\text{g/L}$  e 0,284 ( $\pm 0,07$ ) V/ppb, respectivamente. O nanobiossensor funcionalizado com a enzima urease apresentou valores de limite de detecção de 0,286 ( $\pm 0,06$ )  $\mu\text{g/L}$  e sensibilidade de 0,321 ( $\pm 0,04$ ) V/ppb. Estes valores foram obtidos por meio das curvas de calibração apresentadas nos Apêndices 6.1a e 6.2a, para as

enzimas fosfatase alcalina e urease, respectivamente. Ambos os limites de detecção apresentam valores bem abaixo das concentrações máximas definidas pela legislação (Tabela 2.2). Além disto, trabalhos encontrados na literatura, utilizando biossensores na detecção deste metal, detectaram limites de detecção na gama de mg/L (TSAI et al., 2003; OGONCZYK et al., 2005; BEREZHETSKYY et al., 2008), valores acima do encontrado deste trabalho.

#### 4.3.3 Resposta dos nanobiossensores em amostras reais

##### 4.3.3.1 Efeito da matriz

As Figuras 4.2 e 4.3 apresentam o efeito matricial das amostras 1 e 2 (Tabela 4.1), respectivamente, para os nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina (a) e urease (b), onde foram adicionados diferentes quantidades de água de rio em uma solução de 10 µg/L de PbCl<sub>2</sub> II, na proporção de 1:1, 1:5 e 1:10 (v:v) (10 µg/L de PbCl<sub>2</sub> II:água de rio).

A solução de 10 µg/L de PbCl<sub>2</sub> II, foi utilizada para a realização desta análise, por ser a concentração que apresentou menor diferença de sinal entre os nanobiossensores (fosfatase alcalina e urease), ficando em torno de 0,13 V (Figura 4.1).

Na amostra de água de efluente urbano (amostra 1) da proporção de 1:1 (Figura 4.2), verifica-se uma pequena diferença de voltagem em relação a solução de 10 µg/L de PbCl<sub>2</sub> II, cerca de 0,15 e 0,05 V, para ambos os nanobiossensores funcionalizados com a enzima fosfatase alcalina (Figura 4.2a) e urease (Figura 4.2b), respectivamente. Sendo que essa diferença aumenta com o aumento da proporção de água de rio, até se aproximar ao sinal da amostra de água de rio referente a amostra 1 (sem adição da solução padrão de PbCl<sub>2</sub> II). Este comportamento é similar ao apurado por Jan Pribyl et al. (2005), o qual avaliaram o efeito da matriz em um sensor baseado em colinesterase para detecção de diisopropilfluorofosfato (DFP) em água de rio. Os autores constataram que a amostra contendo 5% de água de rio na solução de trabalho, teve os efeitos matriciais minimizados em comparação com as amostras contendo maiores porcentagens (10%, 25% e 50%).





nanobiossensor sem a diluição. Desta forma, o desempenho do mesmo foi pouco afetado pelos efeitos da matriz, necessitando uma preparação mínima da amostra, eliminando etapas laboriosas de preparação da amostra tão comumente utilizadas nos métodos de detecção convencionais.

#### 4.3.3.2 Determinação do chumbo em amostras reais de água

Por meio da realização da análise de GF AAS, não foi verificada a presença do chumbo nos diferentes pontos de amostragem (Tabela 4.1), o qual o limite de detecção do equipamento é de 2 µg/L.

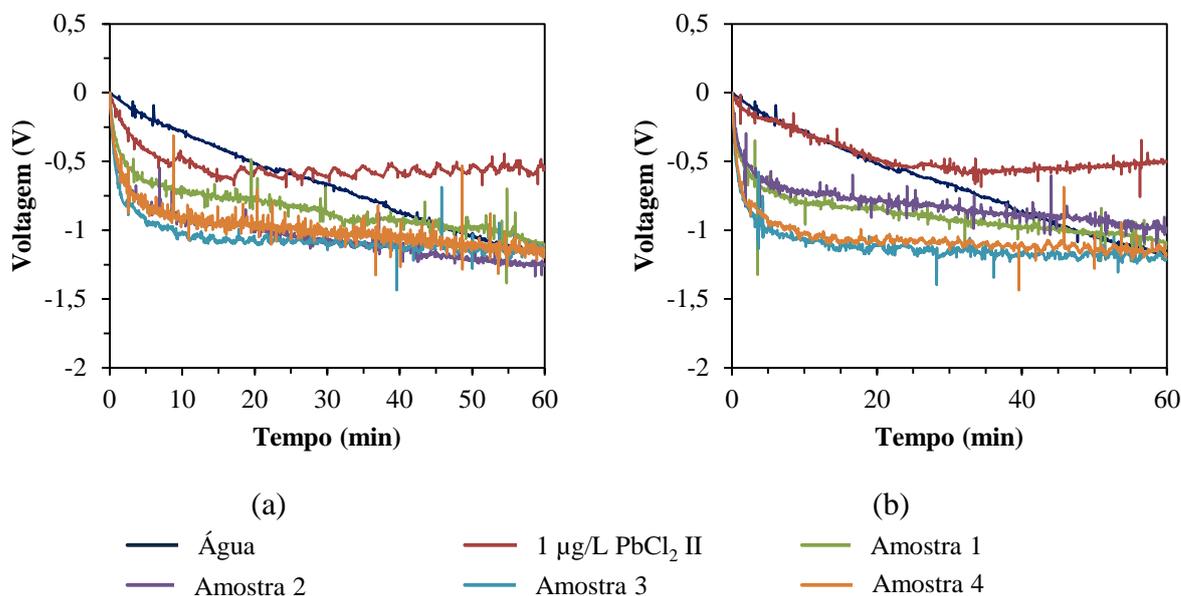
A determinação elementar por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) é uma técnica destinada à determinação de traços e ultratraços de elementos, porém os procedimentos de pré-tratamento das amostras, exigida por essa técnica, apresentam limitações que dependem, particularmente, do tipo de amostra, dos analitos e de suas concentrações. Erros sistemáticos devido à contaminação ou perdas por volatilização, nesta etapa, estão entre os mais frequentes, podendo afetar diretamente a exatidão e precisão dos resultados analíticos (NOMURA; SILVA; OLIVEIRA, 2008).

O nanobiossensor de cantilever não possui este tipo de limitação, pois o preparo da amostra é mínimo, além disto, os nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease apresentaram limites de detecção para o chumbo de 0,323 µg/L e 0,286 µg/L, respectivamente, bem abaixo do técnica de GF AAS.

As respostas de voltagem dos nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina (Figura 4.4a) e urease (Figura 4.4b), para as amostras de água 1, 2, 3 e 4, além da concentração de 1 µg/L de PbCl<sub>2</sub> II e água ultrapura, a fim de comparação, estão apresentadas na Figura 4.4.

Desta forma, é possível verificar que o sinal de voltagem final para as amostras reais de água ficaram próximos ao valor obtido com a água ultrapura. Comparando o limite de detecção da técnica de GF AAS (2 µg/L) com a resposta de detecção de Pb (Figura 4.4) na concentração de 1 µg/L PbCl<sub>2</sub> II por ambos nanobiossensores, todas as amostras reais de água apresentam sinal abaixo deste valor, indicando que os nanobiossensores de cantilever foram eficientes na correta investigação de chumbo em meio líquido.

Figura 4.4 – Resposta dos nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina (a) e urease (b) em função do tempo, com a injeção das 4 diferentes amostras, diluídas na proporção 1:1 (v:v) (água ultrapura:amostra de água), a concentração de 1 µg/L de PbCl<sub>2</sub> II e água ultrapura



Fonte: O autor

Importante ressaltar que o limite máximo permitido de chumbo para água potável, segundo a Portaria nº 2914 (BRASIL, 2011) e a WHO (World Health Organization) (WHO, 2011) é de 10 µg/L, e para a Resolução nº 357 (BRASIL, 2005), a qual estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes, é de no máximo 33 µg/L. Desta forma, o limite de detecção encontrado, utilizando nanobiossensores de cantilever, se revela muito abaixo dos limites prescritos pela legislação.

#### 4.4 Considerações parciais

As amostras reais de águas, coletadas em diferentes pontos do município de Erechim, apresentaram valores de turbidez, condutividade e pH dentro da legislação vigente para águas de rios e potável.

A performance dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com as enzimas comerciais fosfatase alcalina e urease, na detecção de PbCl<sub>2</sub> II, mostrou-se eficiente, pois foi possível observar que os mesmos conseguiram discriminar as diferentes concentrações, apresentando uma sensibilidade de 0,284 V/ppb e 0,321 V/ppb e limite de detecção de

0,323 µg/L e 0,286 µg/L, para os nanobiossensores funcionalizados com as enzimas fosfatase alcaline e urease, respectivamente.

Em relação a aplicação dos nanobiossensores em amostra real, os efeitos matriciais foram superados com a filtração e a diluição da água de rio na proporção 1:1 em uma solução padrão. Quanto a investigação da presença de chumbo nas diferentes amostras de água coletadas, os nanobiossensores se revelaram eficazes na correta identificação quando comparados a utilização de um método convencional de detecção do metal. Desta forma, é possível afirmar que os nanobiossensores desenvolvidos podem ser aplicados com sucesso para análise de amostras reais de água.

Portanto, a aplicação dos nanobiossensores de cantilever em amostras reais é de suma importância na conservação dos recursos naturais e bem-estar humano, tendo como característica mais importante a de proporcionar a detecção de moléculas alvo em tempo real e em concentrações baixas, facilitando um melhor monitoramento e controle das áreas contaminadas.

#### 4.5 Referências bibliográficas

- ADDO, M.; AFFUM, H.; BOTWE, B. O.; GBADAGO, J. K.; ACQUAH, S.; SENU, J. K.; MUMUNI, I. I. Assessment of water quality and heavy metal levels in water and bottom sediment samples from Mokwé Lagoon, Accra, Ghana. **Research Journal of Environmental and Earth Sciences**, v. 4, p. 119–130, 2012.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20 ed. Washington: 1998.
- AZHAR, S. C.; ARIS, A. Z.; KAMILYUSOFF, M.; RAMLI, M. F.; JUAHIR, H. Classification of River Water Quality Using Multivariate Analysis. **Procedia Environmental Sciences**, v. 30, p. 79-84, 2015.
- BANNON, D. I.; CHISOLM, J. J. Anodic stripping voltammetry compared with graphite furnace atomic absorption spectrophotometry for blood lead analysis. **Clinical Chemistry**, v. 47, p. 1703-1704, 2001.
- BENSON, N. U.; ADEDAPO, A. E.; FRED-AHMADU, O. H.; WILLIAMS, A. B.; UDOSEN, E. D.; AYEJUYO, O. O.; OLAJIRE, A. A. New ecological risk indices for evaluating heavy metals contamination in aquatic sediment: A case study of the Gulf of Guinea. **Regional Studies in Marine Science**, v.18, p. 44-56, 2018.
- BEREZHETSKYY, A. L.; SOSOVSKA, O. F.; DURRIEU, C.; CHOVELON, J.-M.; DZYADEVYCH, S.V.; TRAN-MINH, C. Alkaline phosphatase conductometric biosensor for heavy-metal ions determination. **IRBM**, v. 29, n. 2–3, p. 136-140, 2008.
- BRASIL. **Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011**. Ministério da Saúde. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html)> Acesso em: 25 de agosto de 2015.

- BRASIL. **Resolução n° 357, de 17 de março de 2005**. CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> Acesso em: 25 de agosto de 2015.
- CASTILLO, J.; GÁSPÁR, S.; LETH, S.; NICULESCU, M.; MORTARI, A.; BONTIDEAN, I. Biosensors for life quality: design, development and applications. **Sensors Actuators B Chemical**, v. 102, p. 179–194, 2004.
- CHEN, X. CHEN, X.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A.; MOHIDEEN, U. Application of displacement principle for detecting heavy metal ions and EDTA using microcantilevers. **Sensors and Actuators B**, v. 161, p. 203-208, 2012.
- CORBISIER, P.; VAN DER LELIE, D.; BORREMANS, B.; PROVOOST, A.; LORENZO, V.; BROWN, N. L. Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 387, 235–244, 1999.
- DESHOMMES, E.; ANDREWS, R. C.; GAGNON, G.; MCCLUSKEY, T.; MCILWAIN, B.; DORÉ, E.; NOUR, S.; PREVOST, M. Evaluation of exposure to lead from drinking water in large buildings. **Water Research**, v. 99, p. 46-55, 2016.
- DEVREESE, J. T. Importance of Nanosensors: Feynman's Vision and the Birth of Nanotechnology. **Materials Research Society Symposium Proceedings**, v. 952, p. 718-725, 2007.
- EFFENDI, H. River Water Quality Preliminary Rapid Assessment Using Pollution Index. **Procedia Environmental Sciences**, v. 33, p. 562-567, 2016.
- HANSEN, K.M.; THUNDAT, T. Microcantilever biosensors. **Methods**, v. 37, p. 57-64, 2005.
- HE, Q.; MILLER, E. W.; WONG, A. P.; CHANG, C. J. A selective fluorescent sensor for detecting lead in living cells. **Journal of American Chemical Society**, v. 128, p. 9316–9317, 2006.
- JAN PRIBYL, H. J.; MAKOWER, A.; SKLADAL, P.; SCHELLER, F. W. Sensitive detection of organophosphates in river water by means of a piezoelectric biosensor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 1904-1911, 2005.
- KARNATI, C.; DU, H.; JI, H. F.; XU, X.; LVOV, Y.; MULCHANDANI, A.; MULCHANDANI, P.; CHEN, W. Organophosphorus hydrolase multilayer modified microcantilevers for organophosphorus detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2636-2642, 2007.
- KURBANOGLU, S.; OZKAN, S. A.; MERKOÇI, A. Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 886-898, 2017.
- LANG, H.; HEGNER, M.; GERBER, C. Nanomechanical Cantilever Array Sensors. In: BHUSHAN, B. (Ed.). **Springer Handbook of Nanotechnology: Springer Berlin Heidelberg**. cap. 15, p.427-452, 2010.
- LUZARDO, F. H. M.; VELASCO, F. G.; CORREIA, I. K. S.; SILVA, P. M. S.; SALAY, L. C. Removal of lead ions from water using a resin of mimosa tannin and carbon nanotubes. **Environmental Technology & Innovation**, v. 7, p. 219-228, 2017.

- MALEKI, N.; KASHANIAN, S.; MALEKI, E.; NAZARI, M. A novel enzyme based biosensor for catechol detection in water samples using artificial neural network. **Biochemical Engineering Journal**, v. 128, p. 1-11, 2017.
- MARTINAZZO, J.; MUENCHEN, D. K.; BREZOLIN, A. N.; CEZARO, A. M.; RIGO, A. 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, v. 53, p. 229-236, 2018.
- NOMURA, C. S.; SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: Uma Revisão. **Química Nova**, v. 31, p. 104-113, 2008.
- OGOŃCZYK, D.; TYMECKI, L.; WYŻKIEWICZ, I.; KONCKI, R.; GLAB, S. Screen-printed disposable urease-based biosensors for inhibitive detection of heavy metal ions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, n. 106, p. 450-454, 2005.
- PREFEITURA MUNICIPAL DE ERECHIM. **Plano Ambiental Municipal**. Prefeitura Municipal de Erechim RS: Secretaria Municipal de Meio Ambiente, 2011. Disponível em: <[https://www.pmerechim.rs.gov.br/uploads/files/Plano\\_Ambiental\\_Municipal\\_Erechim\\_Dez\\_2011.pdf](https://www.pmerechim.rs.gov.br/uploads/files/Plano_Ambiental_Municipal_Erechim_Dez_2011.pdf)> Acesso em: 25 de fevereiro de 2019.
- RAITERI, R.; GRATAROLA, M.; BUTT, H. J.; SKLÁDAL, P. Micromechanical cantilever-based biosensors. **Sensors and Actuators B**, v. 4010, p. 1-12, 2001.
- RAMPAZZO, S. E. **Proposta conceitual de zoneamento ambiental**. Tese de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais – UFScar. São Carlos, 2003.
- SHRESTHA, S.; KAZAMA, F. Assessment of surface water quality using multivariate statistical techniques: A case study of the Fuji river basin, Japan. **Environmental Modelling & Software**, v. 22, p. 464-475, 2007.
- SILVA, V. P. A.; PAZ, M. S. O.; CAVALCANTE, R. M.; Nascimento, R. F. Strategy for Correction of Matrix Effect on the Determination of Pesticides in Water Bodies Using SPME-GC-FID. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 6, p. 1081-1090, 2017.
- SMITH, R. Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography**, v. 1000, p. 3-27, 2003.
- TOUHAMI, A. Biosensors and Nanobiosensors: Design and Applications. In: SEIFALIAN, A.; MEL, A. de.; KALASKAR, D.M. (Eds.). **Nanomedicine**. Manchester: One Central Press, cap. 15, p. 374-403, 2014.
- TSAI, H. C.; DOONG, R. A.; CHIANG, H. C.; CHEN, K. T. Sol-gel derived urease-based optical biosensor for the rapid determination of heavy metals. **Analytica Chimica Acta**, v. 481, p. 75-84, 2003.
- ULLAH, N.; MANSHA, M.; KHAN, I.; QURASHI, A. Nanomaterial-based optical chemical sensors for the detection of heavy metals in water: Recent advances and challenges. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 1-32, 2018.
- UZUNLAR, E.; UZUNLAR, E.; BEYKAL, B.; EHRLICH, K.; SANLI, D.; JONÁS, A.; ALACA, E.; KIRAZ, A.; UREY, H.; ERKEY, C. Frequency response of microcantilevers immersed in gaseous, liquid, and supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 81, p. 254-264, 2013.

- VAN DE STEENE, J. C.; LAMBERT, W. E. Comparison of Matrix Effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS Analysis of Nine Basic Pharmaceuticals in Surface Waters. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 19,p. 713-718, 2008.
- VASHIST, S. A. Review of Microcantilevers for Sensing Applications. **Journal of Nanotechnology Online**, v. 3, p. 1-15, 2007.
- VELANKI, S.; JI, H. F. Detection of feline coronavirus using microcantilever sensors. **Measurement Science and Technology**, v. 17, p. 2964-2968, 2006.
- VERMA, R.; GUPTA, B. D. Detection of heavy metal ions in contaminated water by surface plasmon resonance based optical fibre sensor using conducting polymer and chitosan. **Food Chemical**, v.166, p. 568-575, 2015.
- WHO (World Health Organization). Guidelines for drinking-water quality. Background document for preparation of WHO. Geneva, 2011.

## CAPÍTULO V

### 5 CONCLUSÕES

De maneira geral, pode-se concluir que o uso de nanobiossensores de cantilever funcionalizados com as enzimas fosfatase alcalina e urease mostram-se como ferramentas promissoras na detecção de metais pesados em águas.

O método de funcionalização dos nanobiossensores se revelou adequado, sendo possível detectar as diferentes concentrações dos metais analisados, por meio da adsorção do metal na superfície funcionalizada do cantilever, o qual emitiu um sinal de voltagem diferente para cada concentração.

Por meio da análise de PCA, foi possível discriminar os diferentes metais pesados e as diferentes concentrações. Além disto, foram obtidos limites de detecção que variaram de 0,286  $\mu\text{g/L}$  à 0,868  $\mu\text{g/L}$  e uma alta sensibilidade que chegou a 0,321 V/ppb. Os cantileveres de silício e revestido de ouro não apresentaram efetividade em suas respostas, por não conseguirem distinguir as diferentes concentrações dos metais pesados, confirmando ainda mais a bem-sucedida funcionalização dos nanobiossensores. Além disso, os mesmos não apresentaram perdas de sinal durante as sucessivas medições na análise de reversibilidade, porém a durabilidade dos nanobiossensores foram comprometidas após 30 dias de estocagem, ocorrendo um aumento do limite de detecção e uma diminuição na sensibilidade.

A caracterização da superfície pelas análises de PM-IRRAS, AFM e MEV confirmaram a funcionalização da camada sensora pela técnica das monocamadas automontadas (SAM), sendo possível verificar a deposição da mesma, bem como sua espessura que foi de 80,48 nm.

Quanto a aplicação dos nanobiossensores em amostras reais de água, foi possível superar os efeitos da matriz com a simples filtração e posterior diluição das amostras na solução de trabalho. E também foi verificado a correta investigação de chumbo em amostras reais de água, empregando o nanobiossensor de cantilever funcionalizado com as enzimas fosfatase alcalina e urease.

Desta forma, os nanobiossensores desenvolvidos podem ser utilizados como uma ferramenta para a detecção de metais em águas, apresentando baixo limite de detecção e análise em tempo real. Podendo, futuramente, atuar na detecção prévia e precisa dos lançamentos dos metais pesados nos cursos d'água, o que promoverá um melhor controle e monitoramento das suas emissões. Para posteriormente poderem ser aplicados à campo e assim refletir diretamente na saúde dos seres vivos e também do meio ambiente.

## 5.1 Trabalhos futuros

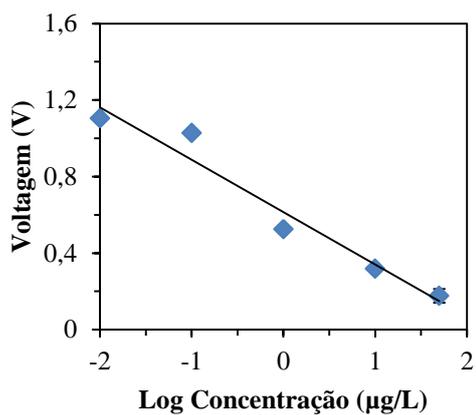
A seguir são apresentadas sugestões de trabalhos futuros relacionadas a área de nanobiossensores de cantilever como ponto central a aplicação em metais pesados.

1. Desenvolvimento de diferentes métodos de funcionalização do cantilever, utilizando uma mistura de 2 tióis de cadeia grande e pequena, o qual pode acarretar em uma ligação mais estável entre a enzima.
2. Avaliar a resposta do nanobiossensor de cantilever com o uso de diferentes enzimas comerciais, o qual devem reagir seletivamente com os metais pesados.
3. Avaliar o comportamento do uso de extrato bruto vegetal, ao invés de enzima comercial, diminuindo os custos da construção do sensor.
4. Analisar possíveis interferentes na resposta do nanobiossensor de cantilever, como pesticidas, matéria orgânica, temperatura, pH, etc.
5. Avaliar a detecção de outros metais pesados em águas.

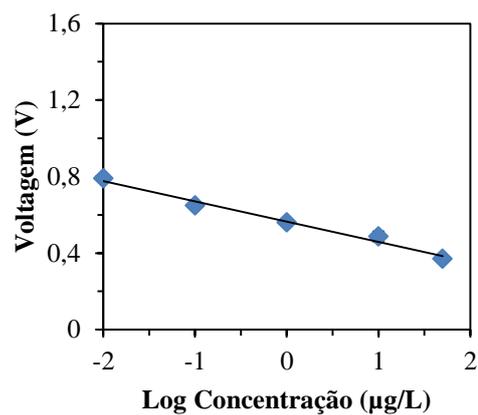
## CAPÍTULO VI

### 6 APÊNDICES

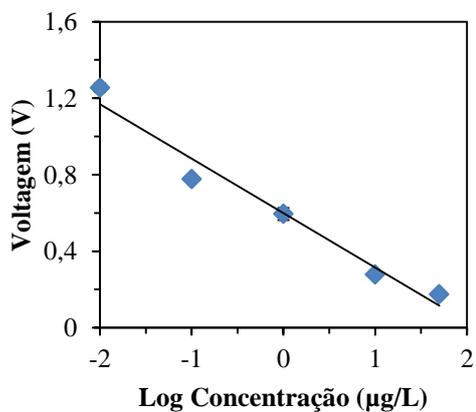
Apêndice 6.1 – Curvas de calibração da concentração logarítmica *versus* voltagem, para os metais pesados  $\text{PbCl}_2$  II (a),  $\text{NiCl}_2$  II (b),  $\text{CdCl}_2$  (c),  $\text{ZnCl}_2$  (d),  $\text{CoCl}_2$  II (e),  $\text{AlCl}_3$  (f), do nanobiossensor funcionalizado com a enzima fosfatase alcalina



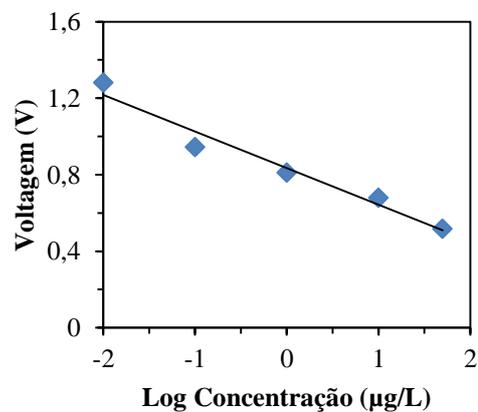
(a)



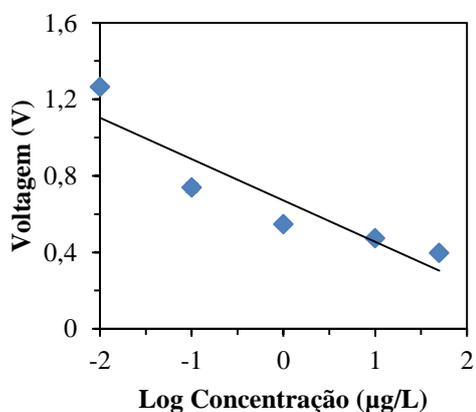
(b)



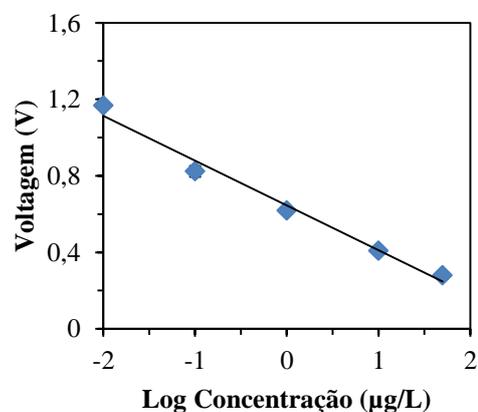
(c)



(d)

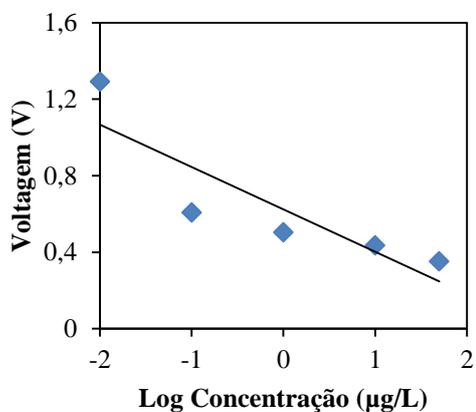


(e)

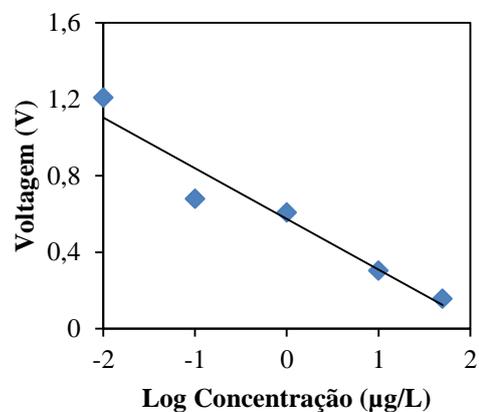


(f)

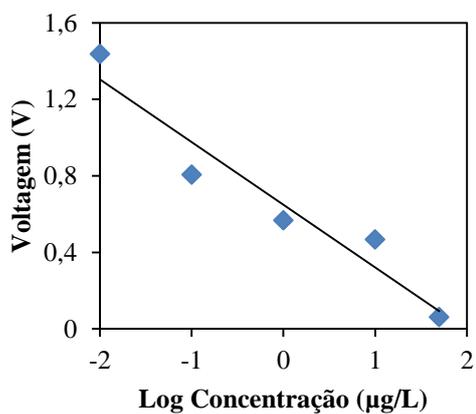
Apêndice 6.2 – Curvas de calibração da concentração logarítmica *versus* voltagem, para os metais pesados  $\text{PbCl}_2$  II (a),  $\text{NiCl}_2$  II (b),  $\text{CdCl}_2$  (c),  $\text{ZnCl}_2$  (d),  $\text{CoCl}_2$  II (e),  $\text{AlCl}_3$  (f), do nanobiossensor funcionalizado com a enzima urease



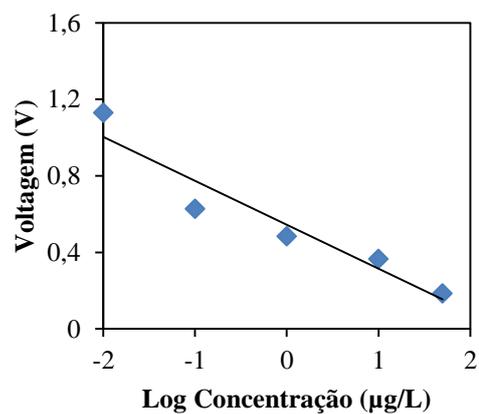
(a)



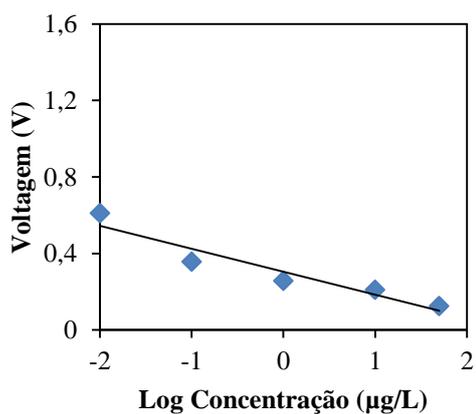
(b)



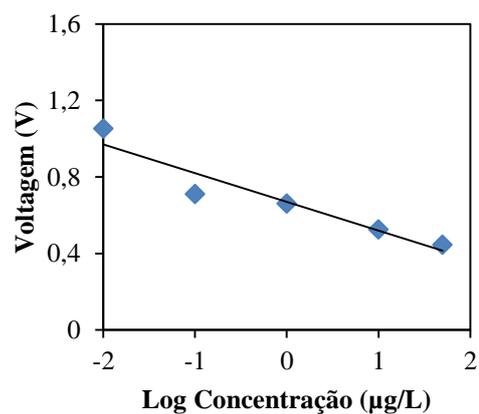
(c)



(d)



(e)



(f)

Fonte: O autor