

**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**

SANDRA CRISTINA BALLEEN

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSSENSORES E NANOSSENSORES DE
CANTILEVER PARA DETECÇÃO DE CÁDMIO EM ÁGUA**

ERECHIM - RS

2020

SANDRA CRISTINA BALLEEN

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSSENSORES E NANOSSENSORES DE
CANTILEVER PARA DETECÇÃO DE CÁDMIO EM ÁGUA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI – Erechim como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre, Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Orientadoras: Dr^a Clarice Steffens

Dr^a Juliana Steffens

ERECHIM – RS

2020

SANDRA CRISTINA BALLEEN

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSSENSORES E NANOSSENSORES DE
CANTILEVER PARA DETECÇÃO DE CÁDMIO EM ÁGUA**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos da URI – Erechim como requisito
parcial à obtenção do Grau de Mestre,
Departamento de Engenharia de Alimentos da
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai
e das Missões – URI Erechim.**

Erechim, 09 de março de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Clarice Steffens (orientadora)

URI – Erechim

Prof^a. Dr^a. Juliana Steffens (orientadora)

URI – Erechim

Prof^a. Dr^a. Geciane Toniazzo

URI - Erechim

Dr. Flávio Makoto Shimizu

Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), Centro Nacional de Pesquisa em
Energia e Materiais (CNPEM)

B191d Ballen, Sandra Cristina

Desenvolvimento de nanobiossensores e nanossensores de cantilever para detecção de cádmio em água /Sandra Cristina Ballen. - 2020.
89 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2020.

“Orientação: Dra Clarice Steffens, Dra Juliana Seffens.”

1. Sensor de cantilever 2. Óxido de grafeno 3. Urease 4. Metal pesado
I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço Deus, pelo dom da vida.

Agradeço ao meu companheiro Willian pela compreensão e apoio nesta etapa. A minha família meus pais Jair e Áurea e irmãos Marcos e Leila, por formaram os fundamentos do meu caráter e me apontaram os caminhos da vida. Que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões. Obrigado por serem a minha referência e minha base pra tudo e por estarem sempre presentes na minha vida. Ao bebê que está a caminho por suportar toda minha ansiedade e nervosismo desses últimos dias.

Em especial as minhas professoras orientadoras Clarice e Juliana Steffens pela orientação maravilhosa que prestaram, com muita paciência e sempre dispostas a esclarecer dúvidas que surgiram pelo caminho, além do incentivo nos momentos difíceis.

A Janine Martinazzo e Aline Rigo pelos conhecimentos e ensinamentos repassados sobre a operação do AFM. A Alexandra Manzoli por todo o apoio, conselhos e ajuda ofertada, me faltam palavras para agradecer. A Ilizandra Fernandes e Rosicler Colet por toda ajuda e suporte oferecidos. A Rafaela Takehara pela doação de placas de silício e pela ajuda em algumas análises.

Não poderia deixar de esquecer das minhas amigas Adriana, Karine e Keli que sem dúvida ficaram para sempre em minha memória. Estendo este agradecimento ao pessoal da salinha de estudos pelo simples fato de terem entrado em minha vida, sem dúvida são e serão sempre especiais para mim.

Aos professores, colegas de laboratório, o pessoal da Central de Materiais, a Embrapa instrumentação São Carlos-SP, a Capes pelo auxílio financeiro, ao Finep, CNPq, Fapergs e a Uri como instituição pela estrutura fornecida enfim, a todos que colaboraram diretamente ou indiretamente com o aperfeiçoamento deste trabalho.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

O cádmio é o metal pesado de maior toxicidade. O avanço das atividades industriais e urbanas aumentaram sua liberação para corpos d'água, comprometendo a qualidade da mesma. Nesse sentido, a área de nanotecnologia vem apresentando grandes avanços, como o desenvolvimento de nanobiossensores e nanossensores, para detecção da presença de íons de cádmio nesses ambientes. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com urease e grafeno para detecção de cádmio (Cd^{2+}), em amostras de água. A funcionalização dos mesmos foi realizada empregando a técnica de monocamadas automontadas (SAM) sobre a superfície de silício contendo ouro, ácido 16-mercaptohexadecanóico (tiol), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC)/N-hidroxi-succinimida (NHS), enzima urease, óxido de grafeno e óxido de grafeno/urease. A superfície dos cantileveres foi caracterizada em cada etapa da funcionalização por espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS), microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (SEM) as quais confirmaram a funcionalização do mesmo. Os dispositivos foram capazes de detectar diferentes concentrações de cádmio em água, obtendo alta sensibilidade e baixos limites de detecção de quantificação na gama de ppb, além de serem 100% reversíveis, porém sua estabilidade foi afetada pelo armazenamento. O nanobiossensor de óxido de grafeno/urease se mostrou ser mais eficiente com relação a maior sensibilidade e menor limite de detecção, sendo assim, foi aplicado para verificar o efeito da matriz (água do rio). As coletas de água foram realizadas no rio Tigre (Erechim/RS) e ocorreram no mesmo ponto de coleta em diferentes dias. A resposta do nanobiossensor se mostrou satisfatória e o efeito da matriz pode ser minimizado com a fortificação com Cd^{2+} das amostras. Desta forma, os dispositivos desenvolvidos demonstram ter grande potencialidade de aplicação no monitoramento ambiental detectando a presença de cádmio em águas.

Palavras-chave: Sensor de Cantilever. Óxido de grafeno. Urease. Metal Pesado.

ABSTRACT

Cadmium is the most toxic heavy metal. The advancement of industrial and urban activities increased their release to water bodies compromising its quality. In this sense, nanotechnology has shown great advances, such as the development of nanobiosensors and nanosensors, to detect cadmium ions in these environments. This work aims at developing cantilever nanobiosensors and nanosensors functionalized with urease and graphene for cadmium (Cd^{2+}) detection in water samples. Functionalization was performed using the self-assembled monolayer (SAM) technique on the silicon surface containing gold, 16-mercaptohexadecanoic acid (thiol), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)/N-hydroxy-succinimide (NHS), urease enzyme, graphene oxide, and graphene oxide/urease. The surface of the cantilevers was characterized in each functionalization stage by polarized modulated infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS), atomic force microscopy (AFM), and scanning electron microscopy (SEM), which confirmed functionalization. The devices could detect different concentrations of cadmium in water, obtaining high sensitivity and low detection limits high quantification in the ppb range, as well as being 100% reversible, despite their stability being affected by storage. Graphene oxide/urease nanobiosensor proved to be more efficient with respect to higher sensitivity and lower detection limit, so it was applied to verify the matrix effect (river water). Water sample collection was carried out on the Tigre River (Erechim/RS) using the same collection point on different days. The nanobiosensor response was satisfactory and the effect of the matrix could be minimized by fortifying the samples with Cd^{2+} . In this way, the devices developed offer great potential for their application in environmental monitoring by detecting cadmium in water.

Keywords: Cantilever Sensor. Graphene oxide. Urease. Heavy Metal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de sensores de cantilever exposto a um analito.	22
Figura 2. Representação esquemática do suporte, cantilever e ponta.	22
Figura 3. Esquema da interação da superfície funcionalizada com o analito e monitoramento da deflexão do cantilever.	23
Figura 4. Representação da formação da SAM.	26
Figura 5. Sítio ativo (a) e molécula da urease (b).....	27
Figura 6. Representação esquemática de imobilização de enzimas sobre óxido de grafeno.	28
Figura 7. AFM: (a) Controlador C3000, (b) Controlador da mesa anti-vibratória, (c) Mesa anti-vibratória, (d) Cabeçote, (e) Controlador Easyscan e (f) computador.....	35
Figura 8. Suporte para acoplamento do cantilever (canticlip).....	36
Figura 9. Imersão do cantilever na solução Cd^{2+} para obtenção da medida de deflexão: (a) Vista frontal do cabeçote; (b) Imersão do cantilever em meio líquido.	37
Figura 10. Espectro PM-IRRAS das etapas de funcionalização do cantilever nas faixas de número de onda (a) 2800 a 2940 cm^{-1} e (b) 1520 a 1760 cm^{-1}	42
Figura 11. Imagens de AFM, em 3D, da superfície do cantilever durante as etapas de funcionalização. Silício – cantilever não funcionalizado (a), deposição das camadas de ouro (b), tiol (c), EDC/NHS (d), urease (e), óxido de grafeno (f), e óxido de grafeno/urease (g).	45
Figura 12. Micrografias de superfície do cantilever durante as etapas de construção dos nanobiossensores e nanossensores. (a) Silício (sem funcionalização), deposição das camadas de (b) Ouro, (c) tiol, (d) EDC/NHS, (e) Óxido de grafeno, (f) Urease e (g) Óxido de grafeno/urease.	48
Figura 13. Resposta dos nanobiossensores e nanossensores funcionalizados com (a) urease, (b) óxido de grafeno, e (c) óxido de grafeno/urease em função do tempo nas diferentes concentrações de Cd^{2+} e água ultrapura (branco).	50
Figura 14. Representação esquemática da funcionalização e funcionamento do cantilever.	52
Figura 15. Reversibilidade dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com (a) urease, (b) óxido de grafeno, e (c) óxido de grafeno/urease durante 6 ciclos, alternado a exposição a solução de Cd^{2+} (0,1 ppb) e em água ultrapura (branco).....	58

Figura 16. Valores de sensibilidade linear dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com urease, óxido de grafeno, e óxido de grafeno/urease durante 30 dias de estocagem.	60
Figura 17. Limite de detecção dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com urease, óxido de grafeno, e óxido de grafeno/urease durante 30 dias de estocagem.....	61
Figura 18. Dados de precipitação pluviométrica entre os dias 01 de setembro a 15 de outubro de 2019.	64
Figura 19. Acumulado de chuva na estação automática de Erechim dos meses de janeiro a outubro de 2019.	65
Figura 20. Resposta do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno/urease ao efeito matricial da água do rio nas diferentes coletas e água ultrapura (branco).....	68
Figura 21. Resposta dos nanobiossensores funcionalizados com óxido de grafeno/urease ao efeito da matriz (água do rio) com diferentes concentrações de Cd^{2+} (0,01; 0,05; 0,1; 1 e 10 ppb) nos diferentes dias de coleta: (a) coleta 1, (b) coleta 2, (c) coleta 3 e (d) coleta 4.	69
Figura 22. Resposta dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com óxido de grafeno/urease para a concentração de 10 ppb de Na^+ , Mg^{2+} e K^+ diluídos em água ultrapura.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limite permitido de cádmio em água segundo diversas legislações.	20
Tabela 2. Métodos tradicionais de detecção de cádmio e limites de detecção.	21
Tabela 3. Valores da raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) das superfícies em cada etapa de construção dos nanossensores e nanobiossensores funcionalizados com urease, óxido de grafeno, e óxido de grafeno/urease.....	46
Tabela 4. Valores de sensibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com urease, óxido de grafeno, e óxido de grafeno/urease.....	53
Tabela 5. Padrões de qualidade ambiental para cádmio.	55
Tabela 6. Sensores utilizados para detecção de cádmio em água.....	57
Tabela 7. Perda de sensibilidade (%) dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com urease, óxido de grafeno, e óxido de grafeno/urease durante 30 dias de armazenamento.	62
Tabela 8. Turbidez, condutividade elétrica e pH das amostras de água coletadas.	65
Tabela 9. Concentração de minerais na água coletada no rio Tigre.	67

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Curva de calibração da concentração logarítmica do Cd^{2+} <i>versus</i> deflexão, do nanobiossensor funcionalizado com a enzima urease.....	85
Apêndice 2. Curva de calibração da concentração logarítmica do Cd^{2+} <i>versus</i> deflexão, do nanobiossensor funcionalizado com a enzima óxido de grafeno.....	85
Apêndice 3. Curva de calibração da concentração logarítmica do Cd^{2+} <i>versus</i> deflexão, do nanobiossensor funcionalizado com a enzima óxido de grafeno/urease.....	86
Apêndice 4. Resposta do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com urease durante 30 dias de armazenamento em relação a diferentes concentrações de Cd^{2+} em água ultrapura: (a) branco (água ultrapura), (b) 0,01, (c) 0,05, (d) 0,1, (e) 1 e (f) 10 ppb.....	87
Apêndice 5. Resposta do nanossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno durante 30 dias de armazenamento em relação a diferentes concentrações de Cd^{2+} em água ultrapura: (a) branco (água ultrapura), (b) 0,01, (c) 0,05, (d) 0,1, (e) 1 e (f) 10 ppb.....	88
Apêndice 6. Resposta do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno/urease durante 30 dias de armazenamento em relação a diferentes concentrações de Cd^{2+} em água ultrapura: (a) branco (água ultrapura), (b) 0,01, (c) 0,05, (d) 0,1, (e) 1 e (f) 10 ppb.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

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

EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*)

EQS-AA - Padrão de Qualidade Ambiental - Média Anual (*Environmental Quality Standard - Annual Average*)

EQS MPC - Padrão de Qualidade Ambiental – Concentração Máxima Permitida (*Environmental Quality Standard – Maximal Permissible Concentration*)

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*)

HR-CS AAS - Espectrômetro de Absorção Atômica, (*High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometer*)

ICP-AES - Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*)

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

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LD - Limite de detecção

LQ - Limite de quantificação

NHS - N-hidroxisuccinimida

GO - Óxido de grafeno

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

PVC - Policloreto de vinil

SAM - Monocamadas automontadas do (*Self-Assembled Monolayers*)

SEM - Microscopia eletrônica de varredura (*Scanning Electron Microscopy*).

Tiol - Ácido 16-mercaptohexadecanóico

SPR – Ressonância plasmônica de superfície (*Surface Plasmon Resonance*)

UR - Urease

WHO - Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.2 Objetivos	17
1.2.1 Objetivo geral	17
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Contaminação de água por cádmio	19
2.2 Métodos de detecção.....	20
2.2.2 Sensores de cantilever.....	21
2.2.2.1 Funcionalização dos nanossensores de cantilever	24
2.3 Aplicação de sensores na detecção de cádmio em água.....	28
2.4 Considerações sobre o estado da arte	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Material.....	31
3.2 Métodos.....	31
3.2.1 Desenvolvimento de nanobiossensor e nanossensor de cantilever	31
3.2.2 Funcionalização da superfície dos cantilevers	32
3.2.3 Caracterização da camada sensora dos cantilevers	34
3.2.4 Detecção de Cd^{2+} pelos nanobiossensores e nanossensores de cantilever	35
3.2.5 Caracterização da resposta dos nanobiossensores e nanossensores	37
3.2.7 Aplicação dos nanobiossensores em amostras de água de rio	39
3.2.7.1 Coleta de amostra	39
3.2.7.2 Análise físico-química das águas	40
3.2.7.4 Análise do efeito matricial da água de rio nos nanossensores e nanobiossensores de cantilever.....	41
3.2.7.5 Análise de seletividade	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Caracterização das camadas sensoras dos nanossensores e nanobiossensores	42
4.1.1 Composição química e orientação das moléculas	42
4.1.2 Topografia e rugosidade.....	44
4.1.3 Morfologia.....	48
4.2 Avaliação das respostas dos nanobiossensores e nanossensores.....	49
4.2.1 Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação.....	53
4.2.2 Reversibilidade.....	58

4.3 Análise dos parâmetros físico-química da água.....	64
4.3.2 Análise do efeito matricial da água de rio na resposta dos nanobiossensores de cantilever e interferentes	67
5 CONCLUSÃO.....	73
5.1 Sugestões de trabalhos futuros	74
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados constituem o tipo de contaminação mais grave de águas superficiais, sendo liberados para o meio ambiente pelos processos naturais, atividades industriais, especialmente das áreas de galvanoplastia, fundição de metal e química, além de águas residuais domésticas e agrícolas não tratadas adequadamente. Os metais pesados são conhecidos por sua meia vida prolongada, não biodegradabilidade e seu potencial de acumulação em diferentes partes do organismo humano (WAHEED; MANSHA; ULLAH, 2018). Dentre estes, destaca-se especialmente o cádmio (Cd^{2+}) por sua alta toxicidade, causando danos à saúde, podendo causar danos nos rins, além de câncer (LIU et al., 2017). Portanto, um rastreamento rápido, sensível e preciso em amostras de água, é altamente desejável.

Os métodos convencionais para detecção de metais pesados incluem espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS - do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS - do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*), espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES – do inglês *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS – do inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry*) (HALKARE et al., 2019; LIU et al., 2019). Apesar de serem altamente sensíveis, esses métodos apresentam algumas desvantagens como a necessidade de instrumentos sofisticados, operadores habilidosos, preparação de amostras e tempo de resposta longo (QUANG; KIM, 2010). Desta forma, para contornar tais problemas faz-se necessário o desenvolvimento de um método viável e rápido para a detecção de íons metálicos.

Neste sentido a área de nanotecnologia tem apresentado grandes avanços, com o desenvolvimento de nanobiossensores e nanossensores, sendo que podem ser baseados em hastes ultra-sensíveis, chamados cantileveres. Os mesmos apresentam resultados promissores na detecção de substâncias químicas, físicas, 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 (LEITE; HERRMANN, 2005; SMITH, 2003; STEFFENS et al., 2012; MUENCHEN et al., 2016; MARTINAZZO et al., 2018).

Entretanto, os nanossensores devem ser submetidos a um processo de funcionalização, ou seja, serem recobertos por uma camada sensível, a qual deve ser específica e capaz de reconhecer as moléculas de interesse. A adsorção dessas moléculas na superfície funcionalizada do cantilever resulta na curvatura do mesmo (deflexão) (VLADKOVA et al., 2009; SHARMA et al., 2010). 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 de camadas ordenadas e organizadas sobre uma superfície sólida, por meio de interação entre os grupos químicos (AWASTHI et al., 2016).

Os nanomateriais utilizados na funcionalização dos cantileveres que ganharam atenção considerável devido a sua alta sensibilidade e baixos limites de detecção, são as nanopartículas, nanotubos de carbono e o grafeno (LIU et al., 2017). Dentre estes o grafeno se destaca por possuir alta capacidade de aprisionar e imobilizar nanopartículas em sua superfície e imobilizar, tornando-se de grande relevância no desenvolvimento de nanobiossensores. Essa propriedade tem sido utilizada para amplificar sinais e melhorar a sensibilidade de sensores de íons metálicos (ZHANG et al., 2018).

Os nanobiossensores fazem uso de receptores biológicos tais como: proteínas, anticorpos, enzimas e células inteiras (CUI et al., 2018). Entre estes, as enzimas são consideradas mais promissoras devido à rápida resposta, alta estabilidade e biocompatibilidade (BISWAS et al., 2017). Dentre as quais podem se destacar a urease, pois é inibida na presença de metais pesados. Sendo esta característica de grande importância na construção de sistemas de biossensores para determinação *in situ* e em tempo real em nível de traço destes íons, por exemplo, em monitoramento de água (KRAJEWSKA, 2009).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com enzima comercial (urease) e óxido de grafeno para detecção de íons de cádmio (Cd^{2+}), em amostras de água.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver e aplicar um biossensor nanoestruturado baseado em cantilever funcionalizado com a enzima urease e óxido de grafeno para a detecção de íons de cádmio em água.

1.2.2 Objetivos específicos

- Estudar as melhores condições para o processo de funcionalização da superfície dos cantilevers utilizando a técnica de monocamadas automontadas (SAMs) com enzima comercial urease, óxido de grafeno e com a mistura de óxido de grafeno/urease.
- Caracterizar a camada sensora dos nanossensores de cantilever quanto a composição química e orientação das moléculas por meio da técnica de espectroscopia de absorção de reflexão por polarização (PM-IRRAS - do inglês *Polarization-Modulated Infrared Reflection Absorption Spectroscopy*), topografia e rugosidade por microscopia de força atômica (AFM - do inglês *Atomic Force Microscope*) e morfologia por microscopia eletrônica de varredura (SEM – do inglês *Scanning Electron Microscopy*).
- Avaliar a resposta da deflexão dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados em relação ao tempo de contato em diferentes concentrações de cádmio (Cd^{2+}) solubilizado em água ultrapura.
- Verificar a resposta dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever quanto à sensibilidade linear, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), reversibilidade e estabilidade.
- Avaliar o efeito matricial da água de rio no nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno/urease.
- Avaliar a resposta da deflexão do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno/urease em relação ao tempo de contato em diferentes concentrações de cádmio diretamente na água do rio.
- Avaliar a seletividade dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com óxido de grafeno/urease em relação à adição de interferentes em água (Na^+ , K^+ e Mg^{2+}).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminação de água por cádmio

A contaminação da água por metais pesados tornou-se um problema de importância global com preocupação crescente devido a implicações na saúde humana. Esta contaminação pode ser de fontes naturais, bem como antropogênicas. As fontes naturais são infiltração de água nas rochas, atividade vulcânica, incêndios florestais, etc. O desenvolvimento industrial levou ao aumento das fontes de contaminações devido a geração de enormes quantidades de resíduos contendo metais pesados (VERMA; DWIVEDI, 2013; GU et al., 2018).

De maneira geral, os íons de metais que mais representam risco ambiental são: cádmio (Cd), chumbo (Pb), mercúrio (Hg), cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), níquel (Ni), zinco (Zn) e alumínio (Al). Os três primeiros são os mais prejudiciais tanto ao homem quanto ao meio ambiente, sendo que o cádmio é o que apresenta maior toxicidade, 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).

O cádmio, um dos metais com maior toxicidade, ocorre naturalmente em minérios juntamente com zinco, chumbo e cobre e seus compostos são usados como estabilizantes em produtos de policloreto de vinil (PVC), pigmentos de cor, várias ligas metálicas e, agora mais comumente, em baterias recarregáveis de níquel-cádmio. O cádmio metálico tem sido usado principalmente como agente anticorrosivo (cadmiação). Produtos contendo cádmio raramente são reciclados (JÄRUP, 2003).

Este metal pode ser lançado ao solo, a partir destas atividades, sendo então lixiviados para os rios pelo escoamento de águas superficiais provenientes das chuvas, podendo persistir no ambiente aquático, causando também a contaminação das águas subterrâneas, dessa forma causando outros problemas ambientais (RIBEIRO-FILHO et al., 2001; VINODHINI; NARAYANAN, 2008).

O cádmio se acumula facilmente nas plantas e pode ser passado adiante na cadeia alimentar (PRIYADARSHINI; PRADHAN, 2017). A sua ingestão causa uma ampla gama de doenças, como insuficiência renal, afeta os pulmões, câncer de próstata e pode desregular o metabolismo do cálcio (JIANG et al., 2008).

No Brasil a Portaria 2914 do Ministério da Saúde 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 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 (BRASIL, 2004, 2005, 2011). Enquanto que a nível mundial a Organização Mundial de Saúde (WHO do inglês *World Health Organization*) e a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA inglês *United States Environmental Protection Agency*) também configuraram limites de concentração permitido de cádmio na água potável de (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017; EPA, 2018). Os limites estabelecidos por tais legislações estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Limite permitido de cádmio em água segundo diversas legislações.

Legislações	Limite (ppb)
Portaria 2914 do Ministério da Saúde	5
Resolução do CONAMA N° 357: (Classe 1-2 e Classe 3)	1 e 100
Portaria N° 518	5
Organização Mundial de Saúde (WHO do inglês <i>World Health Organization</i>)	3
Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>)	5

Fonte: O autor.

2.2 Métodos de detecção

2.2.1 Métodos convencionais

Tendo em vista os limites permitidos de cádmio presente na água e seus elevados riscos relacionados a saúde humana, a detecção qualitativa e quantitativa do mesmo pode ser considerada uma aspiração de importância primordial.

Uma variedade de instrumentos e métodos associados tem sido usado para detecção de Cd^{2+} em amostras de água, cada uma com seu próprio custo associado, eficiência e sensibilidade de detecção para o analito alvo (Tabela 2). Os métodos mais utilizados são espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS - do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS - do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*), espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES – do inglês *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS – do inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry*) (SINCLAIR et al., 2015).

Tabela 2. Métodos tradicionais de detecção de cádmio e limites de detecção.

Método	Limite de Detecção (ppb)
Espectrometria de absorção atômica com chama	1,0
Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite	0,01
Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente	0,1 a 1,0
Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado	0,001 a 0,01

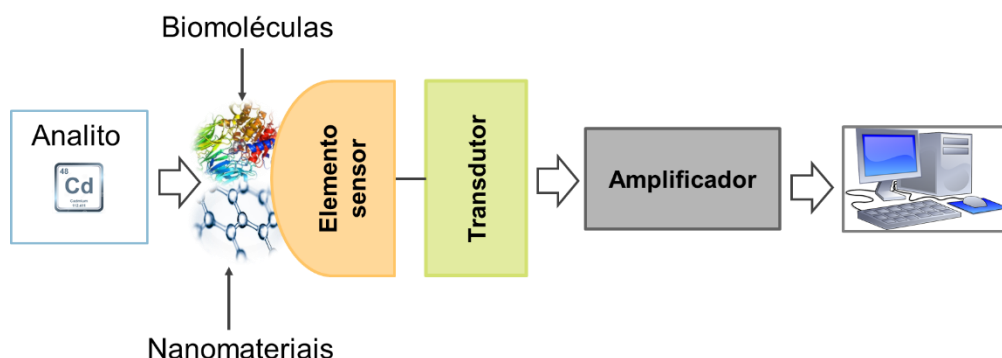
No entanto, esses métodos analíticos possuem preparação complicada de amostras, instrumentos sofisticados e alto custo (HAO; YAN, 2015). Para superar as limitações desses métodos e melhorar os limites de detecção os nanossensores podem ser empregados trazendo uma análise quantitativa rápida e com melhor sensibilidade.

2.2.2 Sensores de cantilever

Nanossensores podem ser definidos como qualquer material sensível usado para transmitir informações químicas, físicas ou biológicas sobre nanomateriais e moléculas de eventos de reconhecimento, com propriedades espaciais de 1 a 100 nm. Eles também podem ser definidos como dispositivos moleculares para análises que incorporam um elemento de reconhecimento associado a um sistema de transdução que permite o processamento do sinal produzido pela interação entre o sensor elemento e o analito,

como demonstrado na Figura 1. Portanto, esses sensores podem detectar fatores físicos, químicos, biológicos, e fenômenos quânticos em nanoescala (VELASCO-GARCIA; MOTTRAM, 2003; BUENO et al., 2017).

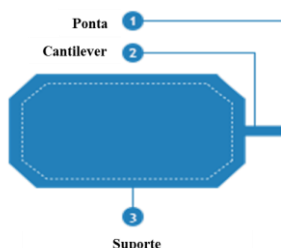
Figura 1. Representação esquemática de sensores de cantilever exposto a um analito.



Fonte: O autor.

O cantilever utilizado em AFM consiste de uma haste fina e flexível e em sua parte inferior contém uma agulha piramidal, como mostrado na Figura 2, cujo raio do vértice final da ponta apresenta uma dimensão de alguns nanômetros. Os cantileveres podem ser constituídos de uma ou mais hastes de silício ou de nitreto de silício que apresentam em média um comprimento entre 100 a 500 μm , espessura entre 0,5 a 5 μm e a ponta tem que terminar em um conjunto de átomos, para alcançar resolução atômica. Podem ter formato “V” (triangular) ou “T” (retangular). Além disto, a fabricação dos cantileveres consiste 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. Representação esquemática do suporte, cantilever e ponta.

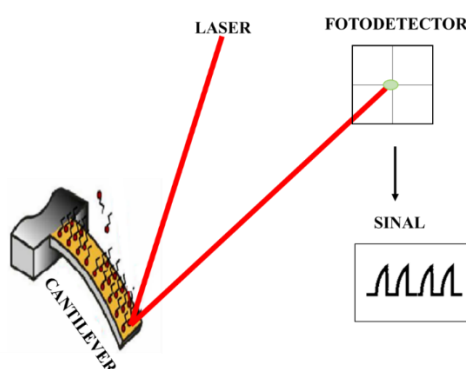


Fonte: NanoAndMore USA. Disponível em: <<https://www.nanoandmore.com/afm-probes-guide>>

Nanossensores 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) até zeptograma (zg) (10^{-21} g), quando comparados com outros sensores, além de serem dispositivos versáteis e compactos (SWIERCZEWSKA et al., 2012; MUENCHEN et al., 2016).

Para a utilização de nanossensores de cantileveres o AFM fornece dois modos típicos de operação, baseados na interação de força envolvida, ou seja, modo estático e modo dinâmico (WANG; NIE, 2019). 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. O cantilever comporta-se como um oscilador harmônico, ou seja, como um sistema oscilador massa-mola ideal (TAMAYO et al., 2013). O modo estático usa a mudança da deflexão física do cantilever. No modo de deflexão, a diferença entre a superfície funcionalizada apenas um lado do microcantilever (lado ativo) e a superfície que não está funcionalizada (lado passivo) provoca uma mudança na tensão superficial, causando a deflexão do cantilever (BUENO et al., 2017). Nesta técnica, um diodo de laser é focado na extremidade do cantilever livre e o feixe de laser refletido é monitorado usando um fotodetector sensível à posição como é demonstrado na Figura 3.

Figura 3. Esquema da interação da superfície funcionalizada com o analito e monitoramento da deflexão do cantilever.



Fonte: Adaptado de SANG; ZHANG; ZHAO, 2013.

Quando expostas a moléculas alvo, ligações específicas de receptor-alvo no cantilever causam variação nos estados de energia da superfície (tensão superficial) do

cantilever que são anulados por uma deflexão do cantilever. Dependendo do tipo de espécie-alvo, o cantilever se dobra na direção para cima ou para baixo (LI; LEE, 2012). A adsorção molecular em um lado de um cantilever resulta em flexão do cantilever devido à indução de forças de adsorção. A flexão ascendente é devida à geração de tensão compressiva, ou seja, diminuição da energia superficial, enquanto a flexão descendente é atribuída à tensão elástica, ou seja, aumento da energia superficial (MATHEW; RAVI SANKAR, 2018).

Dentre os nanossensores pode-se destacar uma classe muito importante que utiliza agentes biológicos como receptores. Os nanobiossensores são dispositivos que convertem reações bioquímicas oriundas de eventos biológicos incorporadas aos elementos de reconhecimento como ácidos nucleicos, células, enzimas e anticorpos, produzindo sinais elétricos, térmicos ou ópticos, os quais associados a um sistema de transdução que convertem o sinal entre os elementos de reconhecimento e o analito em um efeito detectável e mensurável (BRANDAO et al., 2011; GASPAR, 2010).

O princípio de funcionamento de um biossensor está fundamentado na utilização de um sistema que contém dois componentes: o biorreceptor, que é o elemento de reconhecimento que permite ocorrer a reação bioquímica ou a ligação específica com o alvo (amostra e analito); e o transdutor, que recebe o sinal produzido entre o biorreceptor e a amostra, e o quantifica, gerando o resultado em sinal (GASPAR, 2010).

2.2.2.1 Funcionalização dos nanossensores de cantilever

Para a utilização dos cantileveres como sensores de alta especificidade, ou seja, alta sensibilidade a um analito específico é necessária a deposição de uma camada sensora (funcionalização) da superfície.

A seletividade e sensibilidade de um sensor de cantilever depende da deposição uniforme de uma camada funcional em toda a superfície. A resposta do dispositivo depende da transdução forças de adsorção entre a camada seletiva e o analito a qual pode ser obtida por meio da deposição eficiente de receptores seletivos na superfície (DESIKAN et al., 2007).

Diversos procedimentos têm sido empregados na construção de biossensores enzimáticos como: adsorção, encapsulação, ligação covalente e ligação covalente cruzada (crosslinking) (MARQUES; YAMANAKA, 2008).

Dentre estas técnicas, as monocamadas automontadas - SAM (do inglês *Self-Assembled Monolayers*) são camadas construídas na superfície de um elemento sensível

(SANG; ZHANG; ZHAO, 2013), a qual 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).

A automontagem da monocamada ocorre por meio de um grupo funcional (enxofre) 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 (ácidos carboxílicos) que é responsável pelo acoplamento da molécula a monocamada (ARYA et al., 2009; ADAMKIEWICZ et al., 2012).

O enxofre se liga ao ouro e então há a formação de tiolato (Au-SR), um processo em equilíbrio químico no qual ocorre a desprotonação da molécula de tiol e posterior eliminação de H_2 da superfície do metal (KARPOVICH; BLANCHARD, 1994). O processo de formação das camadas na superfície acontece em duas etapas: a primeira, que é mais rápida, na qual a molécula de tiol se liga na superfície metálica, e a segunda, que pode durar horas, que corresponde ao processo organizacional da monocamada (ULMAN, 1996; LOVE et al., 2005).

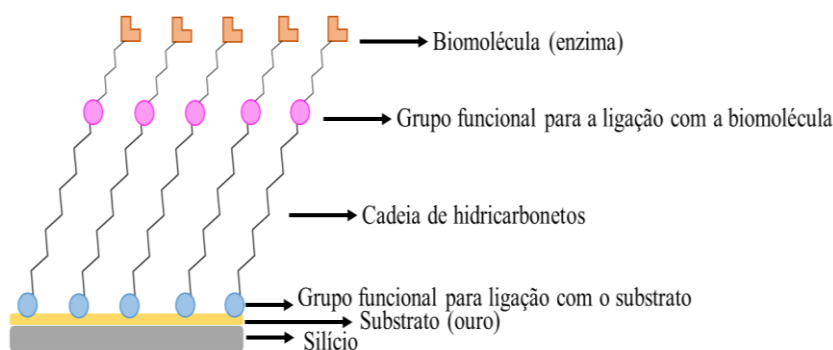
As moléculas de tiol se ligam desorganizadamente sobre a superfície de ouro e que, com o tempo, devido às interações intermoleculares entre as espécies adsorvidas adjacentes, ocorre o processo de organização da monocamada. Esse processo envolve a desocupação de espaços que, devido a ligação das moléculas de tiol de forma desorganizada sobre o ouro, estavam indisponíveis para adsorção (SANTOS; RIBEIRO; BUENO, 2014).

Para muitas aplicações de tióis com uma cadeia alquila longa, $\text{HS} - (\text{CH}_2)_n - \text{R}$, são utilizados. Para comprimentos de cadeia $n \geq 10$, os hidrocarbonetos tendem a formar uma camada compacta, altamente ordenada e estável (BUTT; CAPPELLA; KAPPL, 2005).

Outra etapa importante da funcionalização da superfície do cantilever é adição de agentes de acoplamento de comprimento zero para unir quimicamente nanomateriais e moléculas biológicas à moléculas de alcanotióis com grupo terminal – COOH , os quais realizam, com maior eficiência, a ligação dos grupamentos $-\text{NH}_2$ e $-\text{COOH}$, 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 a amins 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). A formação das camadas automontadas (SAM) está demonstrada na Figura 4.

Figura 4. Representação da formação da SAM.



Fonte: Adaptado de Rigo (2019).

2.2.2.2 Elementos utilizados como camadas sensoras

Vários nanomateriais têm sido desenvolvido e aplicado como camadas sensoras. Os nanomateriais à base de carbono como os fulerenos, nanotubo, nanofibras, nanofios e derivados de grafeno têm sido considerados como materiais promissores devido a sua relação custo-eficácia e sua grande área de superficial (SAINI; BAGRI; BAJPAI, 2017; KURBANOGU; OZKAN, 2018; ARDUINI et al., 2020).

O grafeno possui um átomo de espessura, com uma distância carbono-carbono de 0,142 nm. Pode ser derivado de grafite naturalmente abundante o que o torna de baixo custo, é obtido pelo uso de diferentes técnicas sintéticas, como esfoliação em fase líquida de grafite, deposição de vapor químico, abordagem de automontagem e redução química de óxido de grafite. A atração pela sua utilização deve-se às suas performances elétricas e propriedades superiores únicas, tais como boa estabilidade química, grande área de superfície (2630 m²/g), boa condutividade térmica (5000 W/mK) e condutividade elétrica (106 S/cm), alta mobilidade de carga (200000 cm²/Vs) e transmitância óptica (~97,7%) (KIM et al., 2011; MAO; PU; CHEN, 2012).

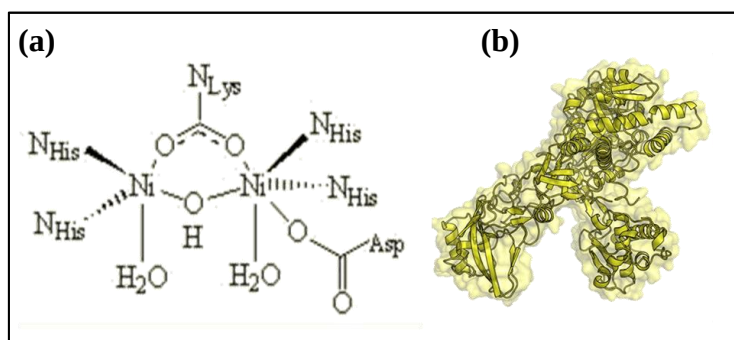
O óxido de grafeno pode ser sintetizado em grandes quantidades por oxidação de pós de grafite usando oxidantes fortes como H₂SO₄, HNO₃, KMnO₄, KClO₃, NaClO₂ com folhas individuais obtidas por esfoliação suave subsequente (KIM et al., 2011). Os métodos mais usados para sintetizar óxido de grafeno a partir de grafite, são o de Hummer

e Offeman (HUMMERS; OFFEMAN, 1958), Staudenmaier (LOMEDA et al., 2008) e Brodie (JEONG et al., 2008).

Além dos nanomateriais, elementos de reconhecimento biomolecular também podem ser utilizados como camadas sensoras. Elementos enzimáticos possuem alta sensibilidade e seletividade (SAINI; BAGRI; BAJPAI, 2017). Diversas enzimas são utilizadas para biossensoriamento ambiental. Dentre estas, a urease (EC 3.5.1.5) produzida por bactérias, fungos e plantas, se apresenta como um elemento de detecção enzimática mais empregada na detecção de vários metais pesados, como o cádmio presente em amostras de água (GUMPU; KRISHNAN; RAYAPPAN, 2017)

A urease é membro da superfamília de amido-hidrolases e fosfotriesterases, que exibem metais cataliticamente ativos em seus sítios ativos. Com algumas exceções, a urease carrega dois íons de Ni^{2+} em seu sítio ativo (KAPPAUN et al., 2018), como demonstrado na Figura 5.

Figura 5. Sítio ativo (a) e molécula da urease (b).



Fonte: Adaptado de KAPPAUN et al. (2018).

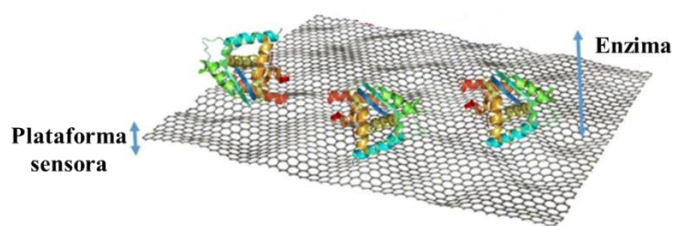
A urease pode ser inibida na presença de metais pesados, como o cádmio. O mecanismo de inibição da enzima baseia-se nas interações entre os íons de metais pesados e os grupos tiol/ metiltiol da cisteína/metionina apresentados no centro ativo da enzima (OGOŃCZYK et al., 2005). Na prática, essa inibição é importante, pois pode ser explorada para a construção de sistemas de detecção baseados na sua inibição para determinação *in situ* e em tempo real dos níveis de traços destes íons, por exemplo, em monitoramento de água (KRAJEWSKA, 2009).

O desempenho de enzimas, como a urease, pode ser melhorado utilizando nanomateriais em sua imobilização. A estrutura do óxido de grafeno pode ser um transdutor eficaz, pois permite a transferência direta de elétrons entre enzimas e eletrodos

(KUILA et al., 2011). Também a urease se destaca por apresentar características apreciáveis como biodegradabilidade, estabilidade térmica, e principalmente grande área de superficial e volume de poros (ADEEL et al., 2018).

Uma representação de imobilização enzimática utilizando óxido de grafeno está demonstrada na Figura 6.

Figura 6. Representação esquemática de imobilização de enzimas sobre óxido de grafeno.



Fonte: Adaptado de PEÑA-BAHAMONDE et al. (2018).

Até o momento a técnica mais comum utilizada para imobilização de enzima em derivados de grafeno, como o óxido de grafeno é a ligação inespecífica da enzima por adsorção, pois essa técnica de imobilização é livre de produtos químicos e direta (PEÑA-BAHAMONDE et al., 2018). Normalmente, o procedimento consiste na simples deposição da enzima sobre o óxido de grafeno (KARIMI et al., 2015).

O óxido de grafeno também possui muitos grupos de ácidos carboxílicos em sua superfície que podem interagir fortemente por interações eletrostáticas com as moléculas da enzima, levando a conjugados muito estáveis (BOLIBOK et al., 2017). Dessa forma, o óxido de grafeno demonstra ser um material bastante promissor na área de imobilização enzimática e aplicação em nanobiossensores utilizados na detecção de metais pesados em água.

2.3 Aplicação de sensores na detecção de cádmio em água

Os nanobiossensores e nanossensores de cantileveres podem ser aplicados em muitas 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

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).

Em relação a detecção de cádmio utilizando nanobiossensores podem ser citados alguns trabalhos bem distintos encontrados na literatura. Como Rigo et al. (2019a), no qual desenvolveram um nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima urease pela técnica de SAM altamente eficiente na discriminação de metais pesados, dentre eles o cádmio. O nanobiossensor apresentou alta sensibilidade, boa estabilidade e limite de detecção na faixa de ppb durante 30 dias de armazenamento. Em outro estudo Rigo et al. (2019b) utilizaram o mesmo sensor para detectar a presença de chumbo em amostras reais de água de rio, e constataram que o dispositivo empregado pode ser aplicado em amostras reais, pois o mesmo não sofreu efeito matricial.

Liu et al. (2018) fabricaram um sensor eletroquímico descartável à base de grafeno que exibiu excelentes propriedades para detecção de metais pesados, alcançado um limite de detecção para cádmio de 0,5 ppb. Então, o sistema foi implementado com sucesso para analisar metais pesados em amostras de água de rio.

Velanki et al. (2007) estudaram a viabilidade de detectar íons Cd (II) usando sensores de cantilever modificados com anticorpo. Os autores utilizaram métodos diferentes para funcionalizar a superfície, um dos lados do cantilever foi 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. Quando a amostra do complexo Cd (II)-EDTA foi injetado na célula fluida onde o cantilever era mantido, o mesmo se dobrou com o reconhecimento do complexo Cd (II) pelo anticorpo na superfície do cantilever. Um experimento de controle mostrou que o complexo que não continha Cd (II) não causou nenhuma flexão do cantilever. O limite de detecção do sensor foi de aproximadamente 10^{-9} M.

2.4 Considerações sobre o estado da arte

A literatura apresenta inúmeros estudos demonstrando que a área de nanobiotecnologia, incluindo os nanobiossensores, está em crescente desenvolvimento, e desta forma, que tem contribuído e trazendo grandes avanços nas mais distintas áreas,

como na medicina, fármacos, agricultura, alimentos e embalagens, além da ambiental. Neste contexto, certamente a nanotecnologia irá oferecer a perspectiva de diversas inovações que permitam melhorar a qualidade de vida e auxiliar na preservação do meio ambiente.

Por outro lado, a crescente expansão das atividades antropográficas vem gerando um alto comprometimento da qualidade das águas superficiais, devido a despejo de efluentes domésticos e industriais, além de carga urbana e agrícola não tratados de maneira correta. Um dos maiores problemas no âmbito mundial é o despejo de água contaminada por metais pesados em corpos d'água, sendo que o cádmio merece especial atenção por ser o metal de maior toxicidade e risco a saúde. Devido a este fato e das rigorosas legislações que regem seus padrões de emissão, seu monitoramento se faz extremamente necessário.

A utilização de grafeno para imobilização enzimática em nanobiossensores ainda é pouco estudada, uma vez que o mesmo possui ótimas características para tal feito. Sendo assim, o desenvolvimento de nanobiossensores e nanossensores para detecção de cádmio em águas pode ser aplicado na detecção precoce e precisa da presença do mesmo em corpos hídricos, desta forma, possibilitando o desenvolvimento de estratégias mais efetivas de controle e monitoramento, refletindo diretamente na saúde dos seres vivos e também do meio ambiente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 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 HNO₃ (ácido nítrico) 3 M (65 %) com posterior lavagem com água destilada (OS10LXE - Gehaka), água deionizada (Permutation) e água ultrapura (Millipore Co. 18,2 MΩ/cm), para assegurar a ausência de quaisquer resíduos orgânicos que pudessem interferir nas análises.

Os reagentes utilizados neste trabalho foram: Ácido Nítrico (Química Moderna, 65 %), fosfato de sódio monobásico monohidratado (Synth, 98 %), fosfato de sódio dibásico anidro (Vetec, 98 %), álcool absoluto (Neon, 99,8 %), álcool isopropílico (Vetec, 99,5 %), ácido 16-mercaptohexadecanóico (tiol) (Sigma Aldrich, 90 %), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (Sigma Aldrich, 98 %), N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma Aldrich, 98%), urease de *Canavalia ensiformis* (75,26 U/mg) (Sigma Aldrich), padrão de Cádmio (Cd²⁺) (Alamar Tecno Científica, 99 %), solução-padrão estoque de sódio (Na⁺) (Specsol, 99 %) , potássio (K⁺) (Specsol, 99 %) e magnésio (Mg²⁺) (Specsol, 99 %) e gás combustível/Ar Sintético-gás oxidante (White Martins).

3.2 Métodos

3.2.1 Desenvolvimento de nanobiossensor e nanossensor de cantilever

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

sensibilidade para as medições no modo estático em meio líquido (CARRASCOSA et al., 2006; FRITZ, 2008).

O cantilever apresenta comprimento e a espessura do suporte de 3,4 e 0,3 mm, respectivamente, bem como a espessura da haste (2 μm) e o comprimento da ponta (17 μm). O suporte possui a largura de 1,6 mm e a haste apresenta 450 μm de comprimento e 50 μm de largura.

Os cantileveres com recobrimento de ouro (Au) foram escolhidos pela alta afinidade deste metal com o grupo tiol (-SH). Como a camada de Au está presente em apenas um dos lados do cantilever, ou seja, do lado superior, a funcionalização ocorre unicamente neste lado e, assim, o mesmo pode ser operado no modo estático (TAMAYO et al., 2013).

3.2.2 Funcionalização da superfície dos cantilevers

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 baseado no trabalho de Velanki e Ji (2006) e Martinazzo et al. (2018) consistindo das seguintes etapas para a obtenção de três diferentes dispositivos (nanobiosensor de cantilever de urease, nanosensor de cantilever de óxido de grafeno, e nanobiosensor de cantilever de óxido de grafeno/urease):

- **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 (tiol) 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 de EDC/NHS foi realizada no momento de funcionalização. O

EDC é usado para acoplar grupos carboxila ou fosfato a grupos aminas primárias e melhorar a ligação química de enzimas ao carbono, materiais poliméricos ou superfície de nanopartículas sem modificação prévia. Uma das principais vantagens do acoplamento EDC é a solubilidade em água, que permite a bioconjugação direta sem dissolução prévia de solvente orgânico. No entanto, o acoplamento deve ser realizado rapidamente para garantir a eficiência do método (MORALES, 2016). O NHS pode ser usado para aumentar a estabilidade deste éster ativo. 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 a urease, óxido de grafeno e óxido de grafeno/urease:

- a) Nanobiossensor de urease: A urease comercial (75,26 U/mg) foi diluída na proporção de 10:1 (m/v) em tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 7,0) de acordo com Rigo et al. (2019a). Para a funcionalização, o cantilever foi imerso na solução enzimática durante 10 min a 20 °C. de. Posteriormente, foi realizada a lavagem do cantilever com solução tampão fosfato de sódio (0,2 M pH 7,0) por 2 min, seguido da secagem a 20°C por 15 min em ar ambiente.
- b) Nanossensor de óxido de grafeno: O óxido de grafeno utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pelo Instituto de Física da USP, São Carlos/SP e pelo Grupo de Nanociências e Nanotecnologia (Nano) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora/MG. O mesmo foi sintetizado utilizando o processo de esfoliação química pelo método de Hummers modificado (LIMA et al., 2017) e encontrava-se diluído em água ultrapura na concentração de 0,1 mg/mL. Para a funcionalização o cantilever foi imerso nesta solução de óxido de grafeno durante 10 min. Posteriormente, foi realizada a lavagem do cantilever com água ultrapura (2 min) e secagem a 20 °C por 15 min.
- c) Nanobiossensor de óxido de grafeno/urease: A funcionalização deste nanobiossensor foi realizada por meio da imersão do cantilever em solução óxido de grafeno e após secagem, seguida pela imersão em solução enzimática, nas mesmas condições de tempo utilizadas anteriormente, lavagem e secagem, de acordo com Yang et al. (2019) com modificado. As soluções foram preparadas nas mesmas condições que os nanobiossensor de urease e nanossensor de óxido de grafeno.

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

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 dispositivos foram armazenados sob refrigeração (4 °C), a seco sobre uma pequena placa de gel, 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.

3.2.3 Caracterização da camada sensora dos cantileveres

A caracterização da superfície dos nanossensores e nanobiosensores foi realizada em cada etapa da funcionalização do cantilever. A superfície utilizada foi de silício (1 cm²), ou seja, um material similar ao do cantilever, onde foi depositada uma camada de 20 nm de ouro por meio da técnica *Sputtering*. As caracterizações dos grupamentos funcionais, topografia, rugosidade e morfologia funcionalizadas em cada etapa estão descritas a seguir: Os grupamentos funcionais foram analisados por meio de espectros de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS) obtidos por em um espectrofotômetro KSV (modelo PMI 550, KSV Instruments), com resolução espectral de 8 cm⁻¹ e ângulo incidente de 81°. Tal análise foi realizada no Instituto de Física, da Universidade de São Paulo – USP, Campus São Carlos – SP.

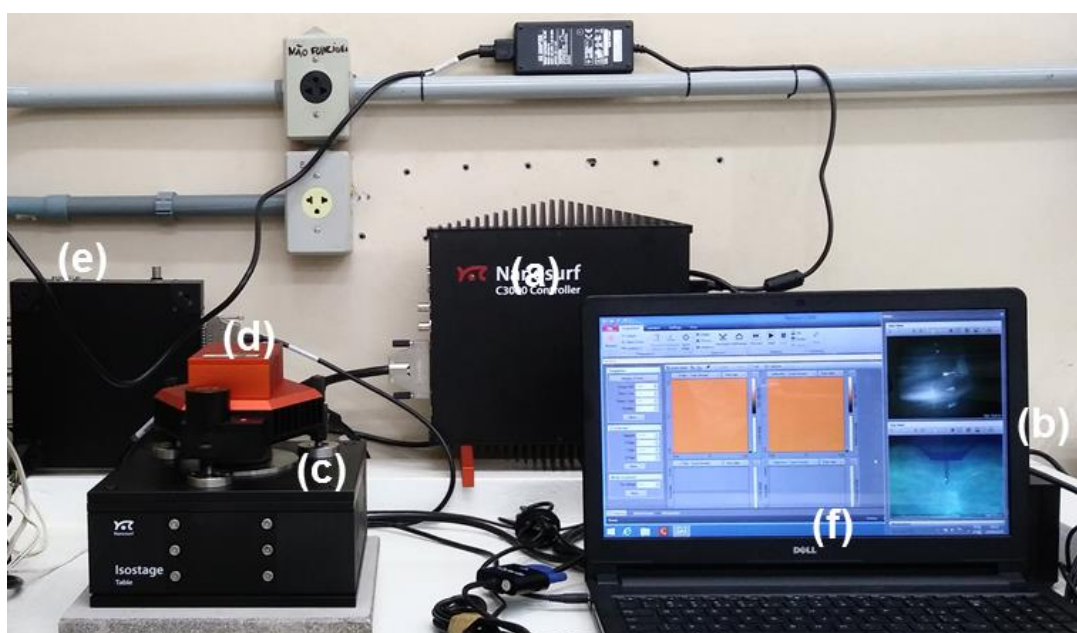
A topografia e a rugosidade das superfícies foram obtidas pela microscopia de força atômica (AFM). As análises foram realizadas em um AFM Nanosurf (C3000 Controller, Suíça), utilizando um cantilever de silício, modelo Tap-150-G (BudgetSensors), de frequência de ressonância de 150 (±75) kHz e constante 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 µm², com resolução de 512 x 512 pontos e velocidade de varredura de 2 s/linha. A raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) foi calculada usando o software Gwyddion (Versão 2.53), 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).

A morfologia das superfícies foi avaliada por meio da microscopia eletrônica de varredura (SEM). Um microscópio eletrônico de varredura (Zeis, EVO LS25). As amostras foram recobertas com uma camada de 20 nm de ouro usando um metalizador (Quorum, SC 7620). As micrografias foram obtidas na tensão de 30 kV.

3.2.4 Detecção de Cd^{2+} pelos nanobiossensores e nanossensores de cantilever

A resposta dos nanobiossensores e nanossensores foi avaliada em deflexão para a detecção de Cd^{2+} em água. A resposta em deflexão foi obtida em um AFM Nanosurf (C3000 Controller) (Figura 7) por meio da realização de uma imagem em meio líquido, e em modo estático. 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 deflexão do mesmo.

Figura 7. AFM: (a) Controlador C3000, (b) Controlador da mesa anti-vibratória, (c) Mesa anti-vibratória, (d) Cabeçote, (e) Controlador Easyscan e (f) computador.

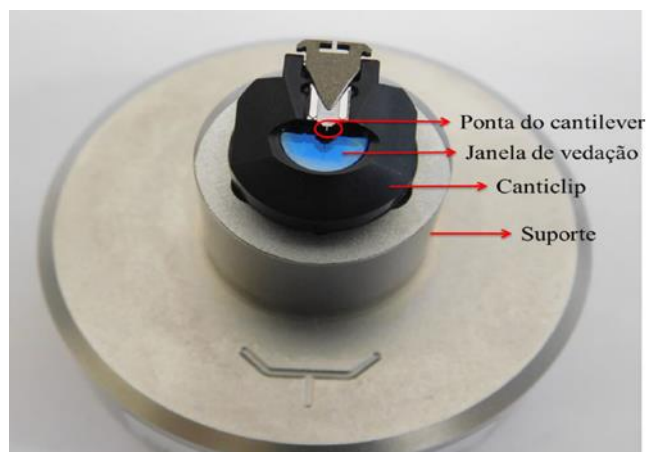


Fonte: O autor.

O dispositivo (cantilever) foi acoplado a um suporte denominado de canticlip (Figura 8), sendo posteriormente inserido junto ao cabeçote (*scanner*) do equipamento. A calibração do laser foi realizada apenas na primeira medida (branco-água ultrapura), onde o mesmo foi posicionado na extremidade final da haste do cantilever e na posição central do fotodetector, verificando sua intensidade, que ficou em torno de 70%. Então, a resposta (deflexão) era obtida por meio da criação de uma imagem, onde o cantilever não realizava uma varredura nos eixos x e y dentro da gota de líquido, com resolução de 450x450 pontos (a imagem era formada por 450 linhas, representando os pontos de

resposta) e velocidade de varredura foi de 1 s/linha para obtenção da resposta. Nestes parâmetros, a duração de cada análise era de 15 min.

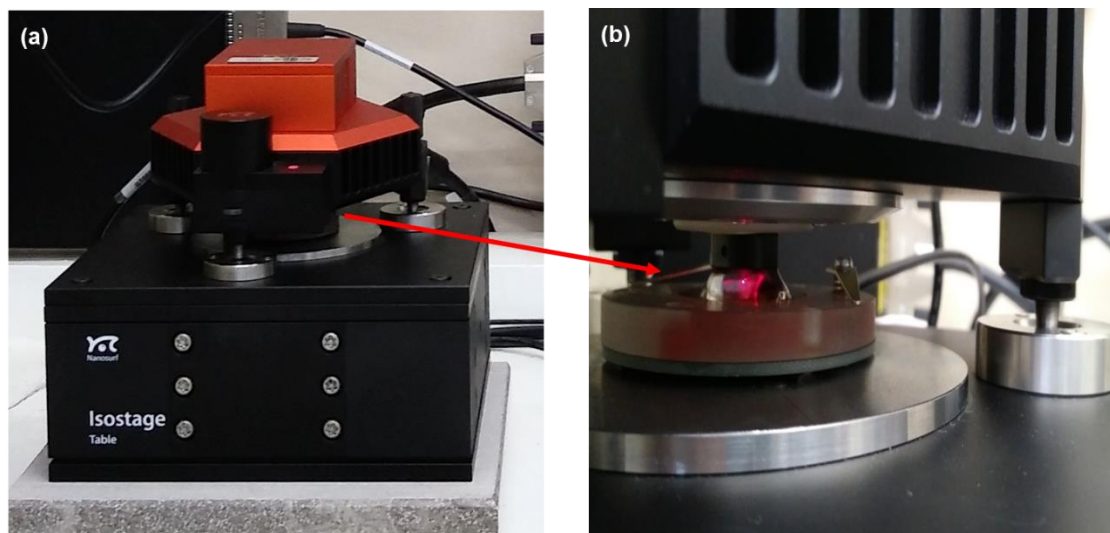
Figura 8. Suporte para acoplamento do cantilever (canticlip).



Fonte: O autor.

Sendo assim, uma gota ($\pm 0,5$ 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 nanossensor de cantilever ficasse totalmente imerso nesta gota para posterior leitura direta das medidas de deflexão, como demonstrado na Figura 9. Transcorrido o tempo de 15 min, a gota de líquido era retirada e injetava-se outra gota em ordem crescente de concentração.

Figura 9. Imersão do cantilever na solução Cd^{2+} para obtenção da medida de deflexão: (a) Vista frontal do cabeçote; (b) Imersão do cantilever em meio líquido.



Fonte: O autor.

As imagens obtidas foram convertidas em um gráfico de deflexão (nm) versus tempo de contato (min), por meio do software Gwyddion (Versão 2.53). Todos os dados foram tomados em triplicata.

O meio líquido utilizado nas análises foi preparado com diferentes concentrações de Cd^{2+} em água ultrapura, onde as mesmas foram escolhidas baseando-se no limite máximo permitido na legislação vigente para água de rios e potável (BRASIL, 2004, 2005, 2011). Desta forma, foi preparada uma “solução estoque” na concentração de 10000 ppb (10 mg/L) de Cd^{2+} , e a partir desta, foram preparadas as concentrações de 0,01, 0,05, 0,1, 1, e 10 ppb ($\mu\text{g/L}$), diluídas em água ultrapura. Todas as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e em temperatura ambiente (25°C).

3.2.5 Caracterização da resposta dos nanobiossensores e nanossensores

As repostas de sensibilidade linear, limite de detecção, reversibilidade e estabilidade dos nanobiossensores e nanossensores expostos a diferentes concentrações de Cd^{2+} em água foram avaliadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata e estão descritas a seguir:

A sensibilidade linear demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e é expressa pelo coeficiente angular da curva analítica que foi

obtida por meio da curva de calibração da concentração logarítmica do Cd^{2+} versus a deflexão.

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração que pode ser distinguida com um certo nível de confiança. O LD foi calculado de acordo com a Equação 1 (BRASIL, 2003; SKOOG et al. 2005). Para o cálculo utilizou-se a sensibilidade da curva de calibração (m), um fator de confiança $k=3$ (correspondendo ao nível de confiança de 99,6 %) e desvio padrão do branco (S_b).

$$LD = \frac{kS_b}{m} \quad \text{Equação 1}$$

O limite de quantificação (LQ): é definido como a quantidade de Cd^{2+} detectável pelos sensores. Para o cálculo utilizou-se a sensibilidade da curva de calibração (m), um fator e o desvio padrão do branco (S_b).

$$LQ = 10 \frac{S_b}{m} \quad \text{Equação 2}$$

A reversibilidade (η) demonstra a capacidade 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 imersos em uma concentração de $1 \mu\text{g/L}$ de Cd^{2+} , por 15 min, em seguida em água ultrapura (branco), por mais 15 min, sendo monitorada a deflexão, onde estas etapas foram repetidas por 6 ciclos. A partir destes dados foi calculada a reversibilidade por meio da Equação 3 (STEFFENS et al., 2009).

$$\eta(\%) = \frac{D - D_f}{D - D_o} \quad \text{Equação 3}$$

Onde: D_o é a deflexão inicial dos sensores; D é valor de deflexão após exposição ao Cd^{2+} e D_f é a deflexão final dos sensores.

A estabilidade foi realizada com o intuito de verificar por quanto tempo os nanobiossensores e nanossensores permaneceriam respondendo ao analito estudado. Para isso a cada 3 dias, durante 30 dias, foi avaliada a resposta dos nanobiossensores e nanossensores às diferentes concentrações de Cd^{2+} 0,01, 0,05, 0,1, 1 e 10 ppb ($\mu\text{g/L}$). A partir dos resultados de deflexão foram calculados a sensibilidade linear e limite de

detecção. Após cada análise os mesmos eram imersos em água ultrapura por 30 s para lavagem e então armazenados em temperatura de refrigeração ($\pm 4^\circ\text{C}$).

3.2.7 Aplicação dos nanobiossensores em amostras de água de rio

3.2.7.1 Coleta de amostra

As amostras de água foram coletadas no rio Tigre o qual atravessa a cidade de Erechim, localizada na região norte do estado do Rio Grande do Sul. As coordenadas do local de coleta foram as seguintes: latitude -27.6616559 e longitude -52.2357112. Este ponto localiza-se próximo ao distrito industrial do município de Erechim o qual é constituído por indústrias do setor metal mecânica e que ao lançarem seus rejeitos podem contaminar a água do rio. A escolha deste local se deu devido ao acesso fácil e pela água nesse ponto não apresentar correnteza.

O Rio Tigre possui uma extensão de 118 km no município. A disponibilidade hídrica indica que sua vazão média é de $0,804\text{ m}^3/\text{s}$. A bacia do Tigre abrange quase à totalidade da área urbana de Erechim (cerca de 90 %), englobando os seguintes bairros: Koller, Espírito Santo, Boa Vista, Aeroporto, Cerâmica, Fátima, Presidente Castelo Branco, Bela Vista, Linho, Parque Livia, Atlântico, José Bonifácio, Centro, Industrial, Cristo Rei, Progresso, São Cristóvão, Frinape. Seu curso apresenta-se canalizado e retificado em partes do seu trecho principal assim como dos seus pequenos contribuintes. Além disso, estão impactados pelas atividades urbanas recebendo efluentes sem tratamento e também resíduos sólidos. Devido ao lançamento de esgoto da cidade de Erechim o Rio Tigre tem alto teor de nutrientes, resíduos totais e coliformes, sendo que o teor de fósforo e de coliformes são superiores aqueles admitidos para Classe 3, no rio ocorre também índices baixos de saturação de oxigênio (ELOVERDE, 2011).

Foram realizadas 4 coletas de água nos dias 23 e 30 de setembro e 7 e 14 de outubro de 2019, contemplando períodos com e sem precipitação pluviométrica. Os dados pluviométricos referentes ao período de coleta da água foram obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

A coleta das amostras 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 de 500 mL, previamente descontaminados com ácido nítrico (3 M, Química Moderna – 65%) e enxaguados vigorosamente com água destilada e ultrapura.

As amostras foram 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 quantitativo (J Prolab) faixa preta com gramatura de 80 g/m² e tamanho de poro de 28 µm, para garantir a remoção de possíveis interferentes físicos da amostra, e armazenadas a temperatura de congelamento (-20 °C).

3.2.7.2 Análise físico-química das águas

Os parâmetros físico-químicos de turbidez, pH e condutividade elétrica foram analisados nas amostras de água coletadas. As análises foram realizadas por leitura direta, ou seja, as amostras não passaram por nenhum pré-tratamento. Estas análises foram realizadas de acordo com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Métodos Padrão para o Exame de Água e Efluentes) (APHA, 1998). Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados submetidos a análise de variância (ANOVA teste de Tukey, a nível de 95% de confiança) utilizando o software *Statistic 7.0*.

- Turbidez: foi realizada com auxílio de um turbidímetro (Poli Control, Modelo AP – 2000).
- pH: foi obtido por meio de um pHgâmetro (Digimed, Modelo DM – 22).
- Condutividade elétrica: a condutividade elétrica foi analisada por meio de um condutivímetro (Meter, Modelo 8306).

Para a determinação de minerais e metais foi utilizada a metodologia recomendada por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Métodos Padrão para o Exame de Água e Efluentes) (APHA, 1998). Os minerais investigados foram potássio, magnésio, sódio e também se investigou a presença de íons de cádmio (Cd²⁺). Para tanto, 150 mL de amostra (diferentes amostras de água coletada no rio) foram digeridas em 10 mL de HNO₃ concentrado (ácido nítrico) (Química Moderna – 65%) em chapa de aquecimento (Fisatom, modelo 752A) até o volume final de 50 mL. As amostras foram analisadas em um Espectrômetro de Absorção Atômica, HR-CS AAS (do inglês - *High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometer*) equipado com corretor de *background* (modelo contrAA 700, Analytikjena). A técnica utilizada foi de chama, e análise dos espectros por absorção. O tratamento dos dados foi realizado pelo Software *Aspect CS*. O tipo de chama utilizado foi de acetileno (gás combustível/Ar Sintético -gás oxidante) com fluxo de 40-120 L/h.

Para a realização da curva-padrão dos minerais, preparou-se as soluções-padrão a partir da solução-padrão estoque, levando em consideração a sensibilidade do equipamento e a faixa linear de trabalho para cada elemento. A leitura das absorbâncias das soluções-padrão foi realizada, onde o branco foi zerado e obteve-se a curva-padrão para cada elemento a ser determinado usando regressão linear. Em seguida, realizou-se as leituras das amostras em triplicata.

3.2.7.4 Análise do efeito matricial da água de rio nos nanossensores e nanobiossensores de cantilever

Para a realização da análise de detecção de Cd^{2+} utilizou-se apenas os nanobiossensores de cantilever funcionalizados com grafeno/urease.

Uma “solução de estoque” na concentração de 10000 ppb (10 mg/L) de Cd^{2+} foi preparada, e a partir desta, foram obtidas diferentes concentrações 0,01, 0,05, 0,1, 1 e 10 ppb ($\mu\text{g/L}$), para cada amostra de água coletada. Para a análise de Cd^{2+} utilizou-se em torno de 0,5 mL de água ultrapura (branco), água do rio sem adição de Cd^{2+} , e de cada concentração de solução de Cd^{2+} em água de rio, em ordem crescente, foram injetadas com o auxílio de uma pipeta de pasteur, sobre uma placa de aço inoxidável. A leitura de deflexão dos sensores foi realizada da mesma maneira conforme descrito no item 3.2.4. Após leitura de todas as amostras, os dispositivos foram imersos em água ultrapura por 30 s, sendo esse processo repetido por duas vezes. Esse procedimento foi realizado para eliminar possíveis resíduos.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.7.5 Análise de seletividade

A análise de interferentes foi realizada utilizando minerais que estão presentes em águas de rios. Os interferentes utilizados foram o potássio, magnésio e sódio. Para tanto foram preparadas as “soluções de estoque” com padrões destes minerais em água ultrapura na concentração de 10000 ppb (10 mg/L) e após diluindo para a concentração de 10 ppb em água ultrapura. Para avaliar a resposta de deflexão do nanobiossensor de óxido de grafeno/urease aos interferentes foi realizado o mesmo procedimento conforme descrito no item 3.2.4. Este nanobiossensor foi escolhido por ter sido utilizado na análise do efeito matricial da água do rio.

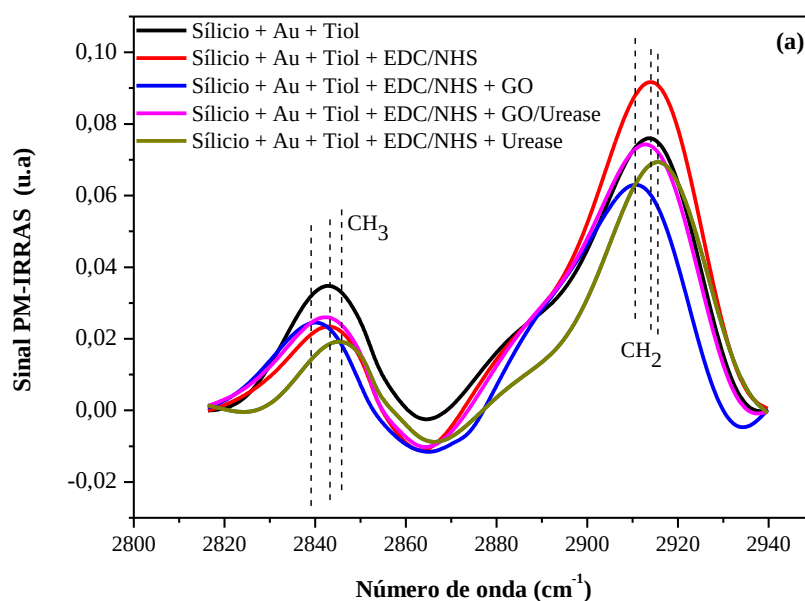
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das camadas sensoras dos nanossensores e nanobiossensores

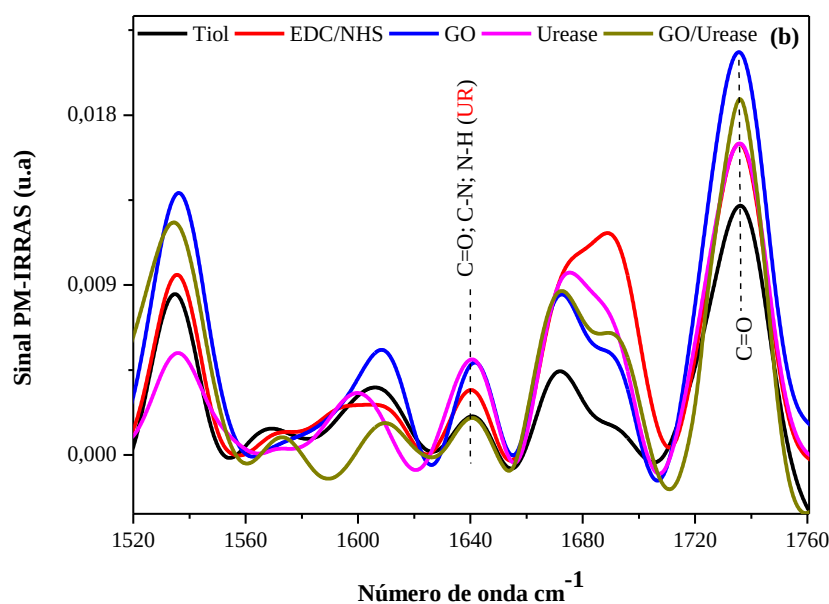
4.1.1 Composição química e orientação das moléculas

A técnica de espectroscopia PM-IRRAS fornece informações sobre estruturas anisotrópicas; portanto, o momento de transição da vibração deve ser ordenado para o aparecimento de sua banda relacionada nos espectros (ROSSINI; MOLINA; CASELI, 2019). Dessa forma a Figura 10 apresenta os espectros de PM-IRRAS das etapas de funcionalização dos cantilevers.

Figura 10. Espectro PM-IRRAS das etapas de funcionalização do cantilever nas faixas de número de onda (a) 2800 a 2940 cm^{-1} e (b) 1520 a 1760 cm^{-1} .



Continuação



É possível observar pela Figura 10a que o sistema que adsorve ao filme é responsável pela mudança na orientação molecular de cada banda, a partir da diminuição da área e da intensidade das bandas nas regiões de 2840 e 2920. Na primeira etapa da funcionalização com o tiol, como o mesmo apresenta uma molécula pequena em sua terminação (2 carbonos e terminação com ácido carboxílico), verifica-se duas bandas características o estiramento simétrico (CH_3) em 2843 cm^{-1} e estiramento assimétrico (CH_2) em 2912 cm^{-1} (Figura 8a). Essas bandas também são observadas com a deposição do EDC-NHS, contudo em maior intensidade em 2912 cm^{-1} , esse aumento pode ter ocorrido devido a organização molecular, uma vez que são moléculas de tamanho maior. No filme a deposição do GO verifica-se um deslocamento na banda para 2839 cm^{-1} , manteve-se estável no mesmo comprimento (2843 cm^{-1}) com a deposição de óxido de grafeno e enzima, já para a deposição da enzima ocorreu um deslocamento para 2846 cm^{-1} . Esse comportamento é observado na região de 2920 cm^{-1} para as mesmas funcionalizações. Isso pode ter ocorrido devido ao mecanismo que governa a adsorção na região de CH_2 e CH_3 , é composto pela mudança na orientação molecular dos grupos CH_2 e CH_3 , alterando a energia de oscilação destes grupos após à adsorção do óxido de grafeno/urease.

A banda 1640 cm^{-1} (Figura 10b), correspondente ao grupamento amida I da cadeia da urease, a qual é atribuída ao grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$) da ligação amida. Já a banda em 1540 cm^{-1} corresponde ao grupo amida II, pertencente ao estiramento $\text{C}-\text{N}$ da amida.

Nas regiões de amida I e II, o mecanismo de adsorção de óxido de grafeno, urease e óxido de grafeno/urease altera a área de banda dos dipolos C=O em 1740 cm^{-1} e C=O, C-N e N-H na região de 1640 cm^{-1} , sem modificar a orientação molecular, mostrando que óxido de grafeno, urease e óxido de grafeno/urease adsorvem ao filme fino, aumentando a quantidade de sítios ativos presentes para interação dos filmes com os analitos de interesse (Figura 8b). O aumento do sinal em 1740 cm^{-1} óxido de grafeno e óxido de grafeno/urease se deu devido a adição do óxido grafeno, em relação as demais, o que pode ser atribuído a ligação *stretching* C=O. Além disso, a alta intensidade dessa banda indica que a orientação do grupo carbonila está no plano do filme.

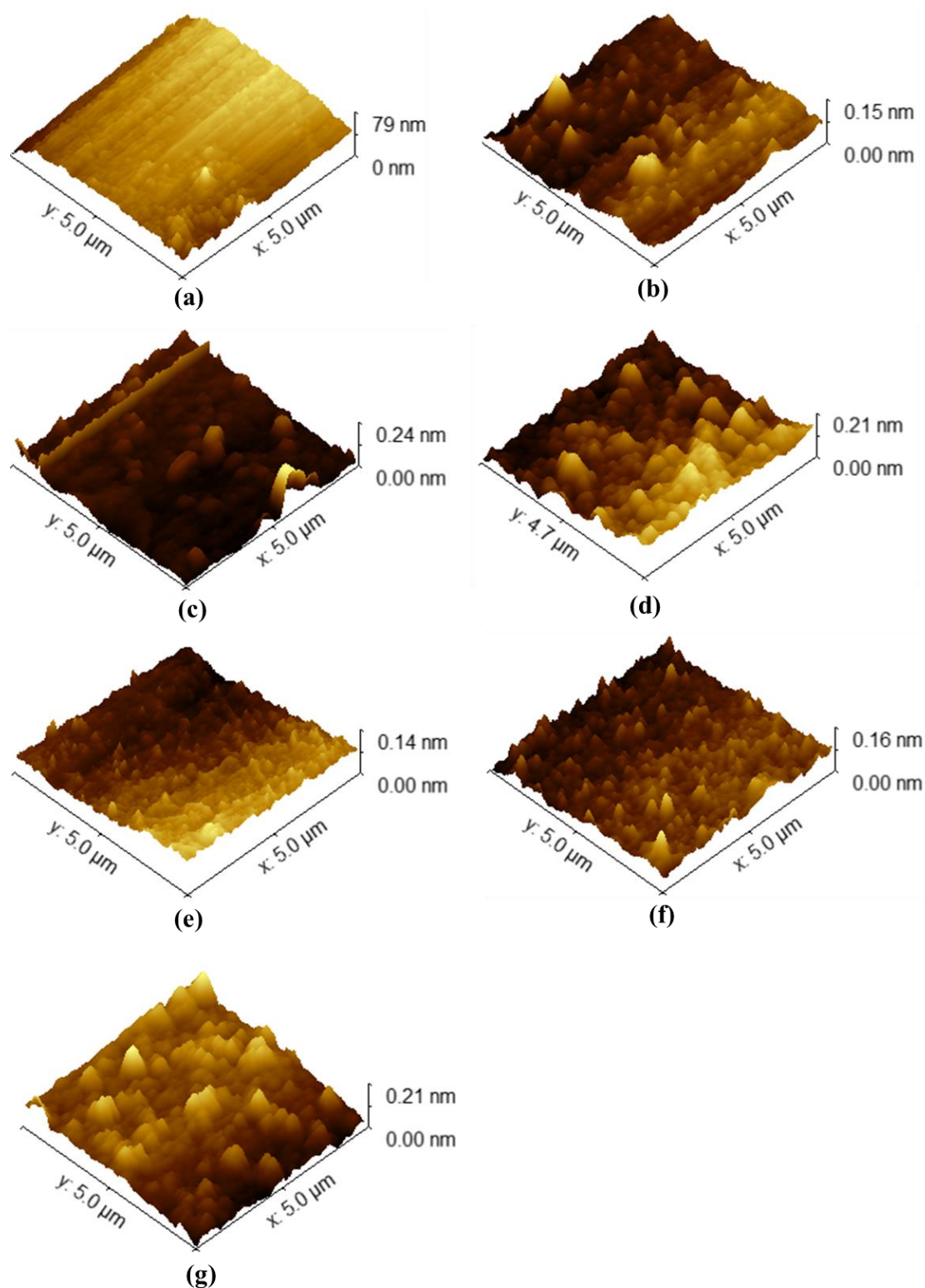
Na banda de 1675 cm^{-1} é atribuído aos modos de vibração amida I, a qual é maior com a enzima, que também é associado ao C=O *stretches*. Um ombro é observado em 1690 cm^{-1} que está associado ao grupo carboxílico presente nos grupos EDC e NHS. Também está associado ao *stretching* C=O visto nas funcionalizações com óxido de grafeno e óxido de grafeno/urease e, não sendo observado para a funcionalização com a enzima.

Kreider et al. (2014) observaram bandas relacionadas a amida I em 1659 cm^{-1} e a amida II em 1548 cm^{-1} , indicando desta forma a presença da enzima peroxidase. Schmidt et al. (2008), em seu trabalho relatam a presença da enzima investigada nas bandas de 1663 cm^{-1} e 1554 cm^{-1} , as quais os autores atribuíram a amida I e amida II, respectivamente. Alonso et al. (2016), para caracterizar a superfície de diferentes métodos de acoplamento enzimático utilizaram a técnica de PM-IRRAS, sendo que os mesmos obtiveram bandas de 1653 cm^{-1} para a amida I e 1558 cm^{-1} para a amida II, quando estudaram enzimas oxidases.

4.1.2 Topografia e rugosidade

A Figura 11 apresenta as imagens topográficas, em 3D, obtidas nas diferentes etapas de funcionalização da superfície dos cantilevers para a obtenção do nanobiosensor de cantilever de urease, nanosensor de cantilever de óxido de grafeno, e nanobiosensor de cantilever de óxido de grafeno/urease.

Figura 11. Imagens de AFM, em 3D, da superfície do cantilever durante as etapas de funcionalização. Silício – cantilever não funcionalizado (a), deposição das camadas de ouro (b), tiol (c), EDC/NHS (d), urease (e), óxido de grafeno (f), e óxido de grafeno/urease (g).



Fonte: O autor.

Na Figura 11 pode-se observar diferenças topográficas em cada etapa de funcionalização da superfície. Analisando o substrato de silício (Figura 11a), verifica-se uma superfície homogênea, isto pode ser atribuído a característica do próprio material, enquanto que a camada contendo ouro (Figura 11b) apresenta uma superfície com aglomerados, decorrentes do processo de deposição do ouro. Na superfície funcionalizada com o tiol (Figura 11c) e os agentes reticuladores EDC/NHS (Figura 11d), verifica-se o aparecimento de agrupamentos irregulares, sendo mais abundante na camada funcionalizada com EDC/NHS. Com a adição da urease (Figura 11e), observa-se que a morfologia mais homogênea em relação a picos e vales. A deposição de moléculas sobre uma superfície pode ocorrer tanto nos vales quanto nos picos, que são, respectivamente, regiões abaixo ou acima do plano médio da superfície (RODRIGUES, 2015).

A adição do óxido de grafeno (Figura 11f) após a etapa dos agentes reticuladores formou picos menores e mais definidos em relação a funcionalização com urease (Figura 11e). A superfície com adição de óxido de grafeno e enzima urease (Figura 11g) apresentou uma morfologia com contornos maiores.

A partir das imagens topográficas foi calculado o desvio médio quadrático da rugosidade (Rms) da superfície do cantilever não funcionalizado (silício) e após em cada etapa da funcionalização para a construção dos nanossensores e nanobiossensores (Tabela 3). O cálculo da rugosidade leva em conta a diferença entre a dimensão destes componentes da superfície (KLAPETEK; NECAS; ANDERSON, 2016).

Tabela 3. Valores da raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) das superfícies em cada etapa de construção dos nanossensores e nanobiossensores funcionalizados com urease, óxido de grafeno, e óxido de grafeno/urease.

Etapa	Rms (nm)*
Silício	18,405 ± (0,106)
Silício + Ouro	22,035 ± (2,128)
Silício + Ouro + Tiol	52,453 ± (0,873)
Silício + Ouro + Tiol + EDC/NHS	59,035 ± (1,987)
Silício + Ouro + Tiol + EDC/NHS + Urease	27,730± (0,691)
Silício + Ouro + Tiol + EDC/NHS + Óxido de grafeno	17,133± (1,965)
Silício + Ouro + Tiol + EDC/NHS + Óxido de grafeno/Urease	49,580 ± (4,582)

*Média (três repetições) ± Desvio Padrão.

Fonte: O autor.

A deposição da camada de ouro acarretou em um pequeno aumento de rugosidade em relação a superfície de silício, o que pode estar relacionada a formação de conglomerados pela deposição de átomos de ouro pela técnica de *Sputtering*, a qual pode haver a deposição de átomos de ouro sob a forma de conglomerados, possivelmente esses conglomerados se depositaram nas regiões de vale, existentes na superfície de silício, preenchendo os espaços vazios (RODRIGUES, 2015). Já com a adição da camada de tiol houve um considerável aumento da rugosidade, isso pode ser devido ao tiol 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 (RIGO et al., 2019b). Um pequeno aumento de rugosidade também pode ser observado quando foi adicionado a mistura dos agentes reticuladores de EDC/NHS, o que pode estar relacionado a acomodação das moléculas, em função da inserção de novos grupos funcionais que ficam expostos na superfície (MUENCHEN et al., 2018).

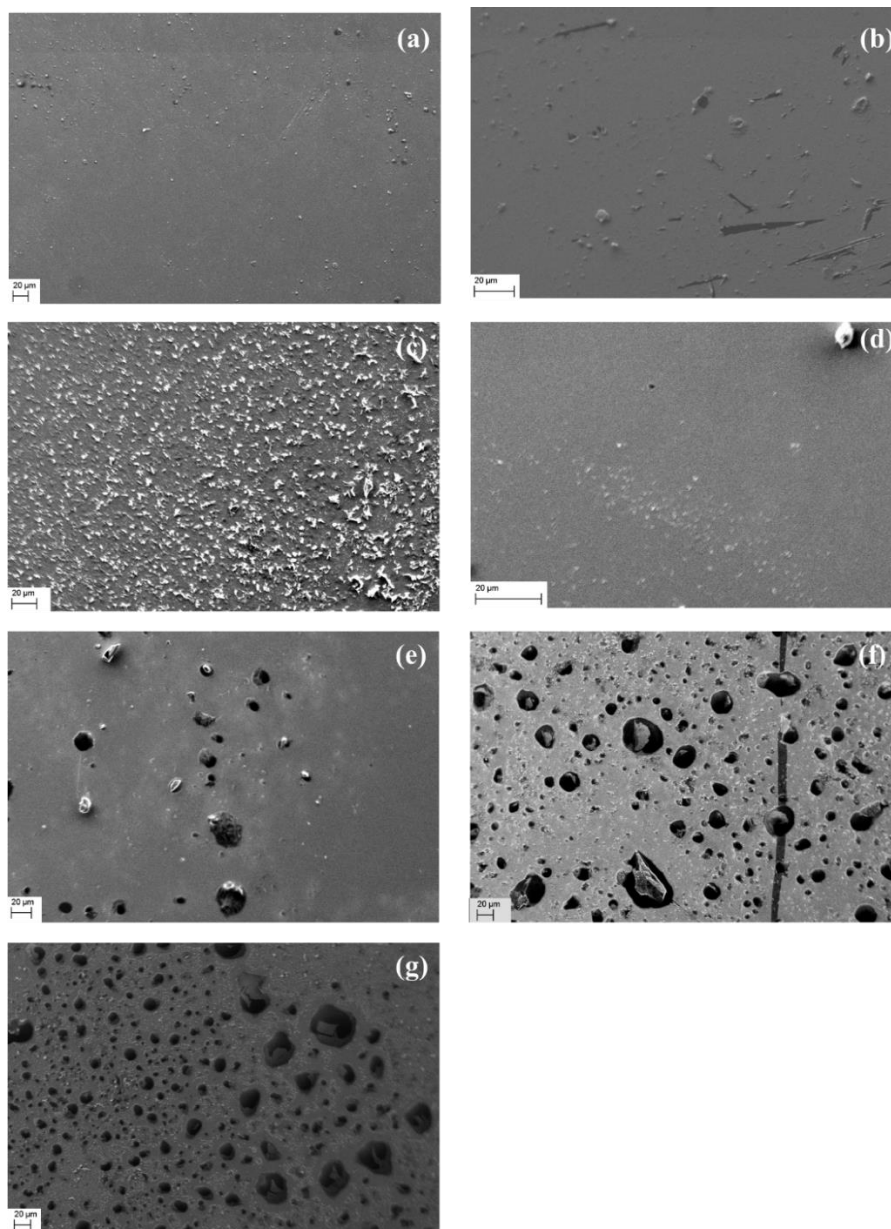
Na última camada com a deposição da enzima urease ocorreu uma redução da rugosidade, o que pode ser devido ao preenchimento dos espaços vazios e, assim, formando uma camada mais homogênea. Alonso et al. (2016) também observaram em seu trabalho a redução dos valores de rugosidade (Rms), quando depositaram enzima glicose oxidase (GOX) em uma superfície de platina pela técnica de SAM. Na deposição da camada de óxido de grafeno também se observa uma redução da rugosidade. Enquanto que a camada de óxido de grafeno/urease apresentou um aumento de rugosidade, possivelmente devido ao volume resultante da utilização das duas moléculas juntas e pela adsorção da enzima no óxido de grafeno. Segundo Naghib et al. (2018), a estrutura do óxido de grafeno em forma de folhas aumenta a rugosidade da superfície e então aumenta a área de contato da enzima, o que proporciona uma melhora significativa da transferência de elétrons entre os mesmos, uma propriedade muito importante para biossensores.

A diferença nos valores obtidos de rugosidade da superfície em cada etapa de funcionalização é um indicativo da formação das camadas automontadas sobre a superfície do silício, dessa forma podendo-se dizer que a funcionalização foi realizada de forma eficiente.

4.1.3 Morfologia

A microscopia eletrônica de varredura (SEM) é amplamente utilizado devido ao seu alto poder de resolução e grande profundidade de foco. A Figura 12 apresenta as micrografias em alta resolução, da superfície durante as etapas de deposição das camadas sensoras dos nanossensores e nanobiossensores.

Figura 12. Micrografias de superfície do cantilever durante as etapas de construção dos nanobiossensores e nanossensores. (a) Silício (sem funcionalização), deposição das camadas de (b) Ouro, (c) tiol, (d) EDC/NHS, (e) Óxido de grafeno, (f) Urease e (g) Óxido de grafeno/urease.



Fonte: O autor.

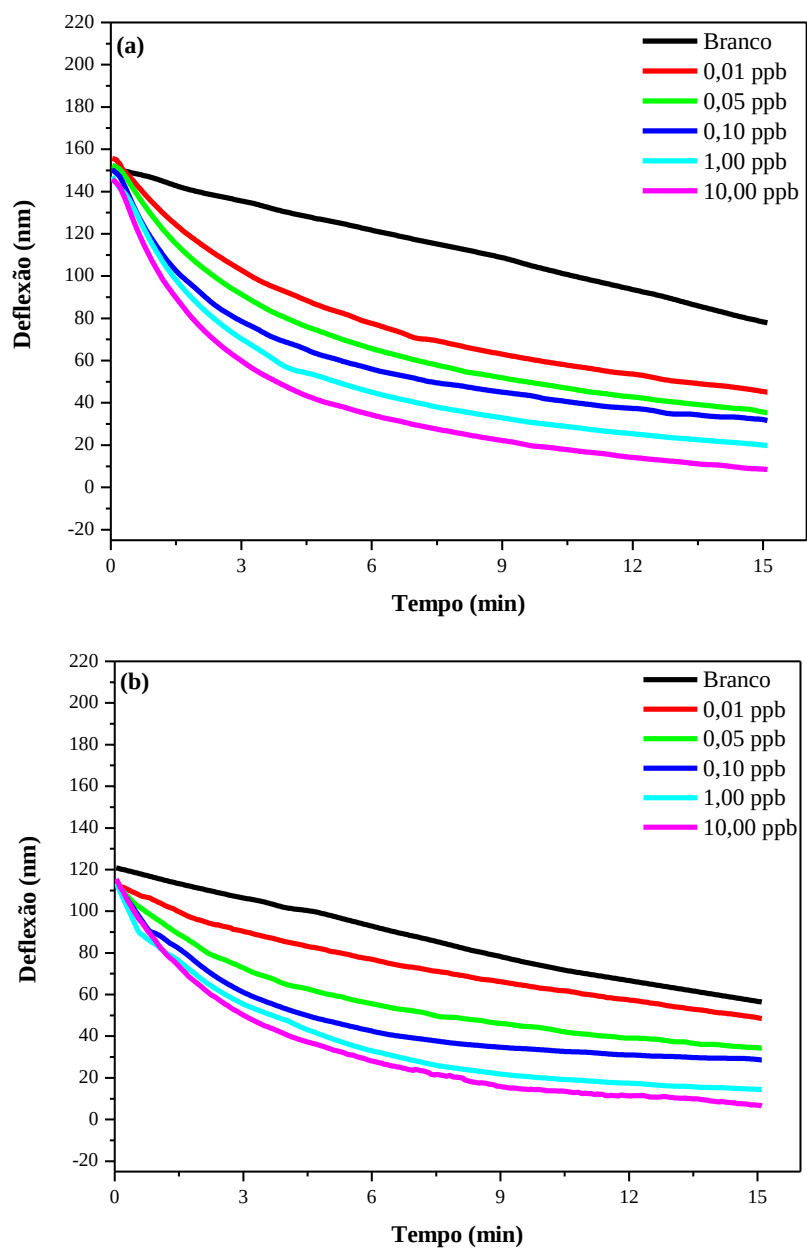
As micrografias da Figura 12 (a e b) correspondem a superfície do silício (sem funcionalização) e a deposição da camada de ouro, respectivamente, onde pode ser observado uma superfície lisa em ambos. A partir da deposição do tiol (Figura 12c) e do EDC/NHS (Figura 12d), observa-se a presença de partículas. Porém na última camada de funcionalização, incorporando o óxido de grafeno (Figura 12e), ou urease (Figura 12f), ou óxido de grafeno/urease (Figura 12g), apresenta uma formação de aglomerados e de maior tamanho.

Rigo et al. (2019a) obtiveram imagens de micrografias da superfície do cantilever funcionalizado pela técnica de SAM, com a deposição do tiol e dos agentes reticuladores EDC/NHS na superfície, foi observada uma formação de aglomerados dispersos. Essa mudança foi atribuída aos grupos do conjugado de tiol com a camada de ouro (sobre a superfície do cantilever) por ligação covalente. Os grupos amina ($-\text{NH}_3^+$) alteraram a superfície com uma camada superficial bem distribuída e, com a enzima urease, foi observada uma deposição superficial mais uniforme. Formando assim uma camada homogênea em apenas um lado do sensor, o que é muito importante, devido ao controle da adsorção de moléculas na superfície.

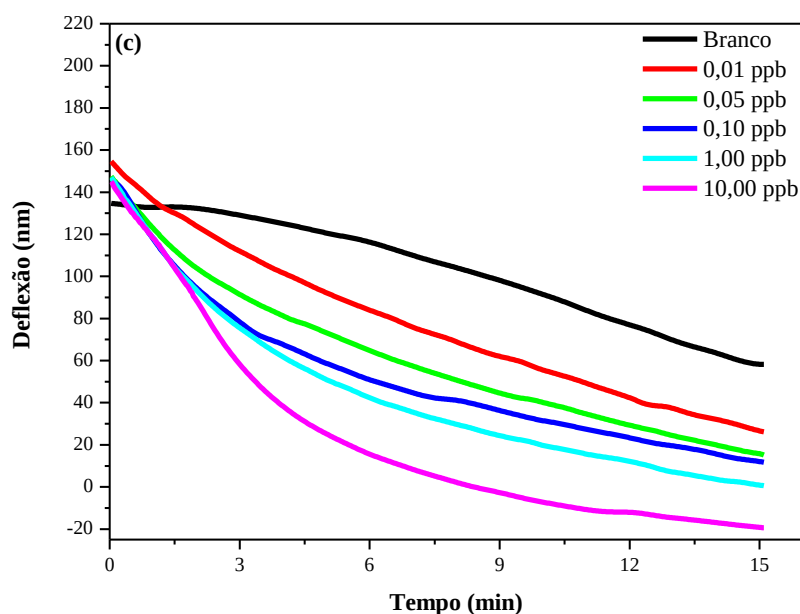
4.2 Avaliação das respostas dos nanobiossensores e nanossensores

A Figura 13 apresenta as respostas de deflexão dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com urease, óxido de grafeno, e óxido de grafeno/urease na presença de água ultrapura (branco) e nas diferentes concentrações de Cd^{2+} .

Figura 13. Resposta dos nanobiossensores e nanossensores funcionalizados com (a) urease, (b) óxido de grafeno, e (c) óxido de grafeno/urease em função do tempo nas diferentes concentrações de Cd^{2+} e água ultrapura (branco).



Continuação



Fonte: O autor.

As medidas de deflexão foram realizadas durante 15 min, e no decorrer deste tempo, foi possível verificar que houve diferença na deflexão (nm) dos nanobiossensores e nanossensores entre o branco e as concentrações de Cd^{2+} em água ultrapura. Verifica-se também que os mesmos apresentaram resposta na menor concentração estudada (0,01 ppb). Como foi observado uma diferença de deflexão entre a água ultrapura e as diferentes concentrações, isto indica que os dispositivos conseguem detectar a presença do metal na água.

Observa-se também, que a diferença de deflexão (nm) entre a maior concentração (10 ppb) e a menor (0,01 ppb) ficou em torno de 36 nm para os nanobiossensores funcionalizados com urease, 42 nm para os nanossensores de óxido de grafeno e 46 nm para o de óxido de grafeno/urease. O que pode estar relacionado com a adsorção do cádmio na superfície funcionalizada dos cantileveres. O que corrobora com resultados apresentados por Karnati et al. (2007), onde a resposta de nanobiossensor, ao longo do tempo, foi decorrente na adsorção de analitos no lado da superfície funcionalizada, onde ocorreu uma curvatura do cantilever, a qual foi causada por uma tensão de compressão, resultante de uma repulsão ou expansão de moléculas.

Pode-se observar também que a resposta de deflexão dos cantiliveres ocorreu para baixo, com o aumento da concentração do metal. Quando a adsorção de moléculas ocorre na superfície funcionalizada, pode causar uma flexão, a qual está associada a repulsão ou

difundem, o que altera o acoplamento eletrônico original entre o complexo da enzima e o óxido de grafeno (WEN et al., 2013). Essa interação ocorre na superfície do cantilever funcionalizado com a enzima e acaba gerando uma deflexão do mesmo. Dessa forma quanto maior a quantidade de íons de Cd^{2+} na amostra maior a flexão do cantilever.

Além disso no tempo de 15 minutos a deflexão dos nanossensores e nanobiosensores se manteve estável na detecção do metal pesado. Este tempo é necessário para a interação dos grupamentos funcionais com o Cd^{2+} . Estes resultados corroboram com o encontrado por Wen et al. (2013) usando um sensor de transistor de efeito de campo com filme de grafeno e nanopartículas de ouro para imobilização covalente de moléculas de enzimas de DNA tioladas, o qual foi utilizado para detecção de chumbo e que em 20 min de incubação, ou seja, contato do sensor como metal, houve estabilização do sinal obtido.

4.2.1 Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação

A Tabela 4 apresenta os valores de sensibilidade e limite de detecção (LD), obtidos por meio da curva de calibração (Apêndices 1, 2 e 3) para os nanossensores e nanobiosensores.

Tabela 4. Valores de sensibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) dos nanobiosensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com urease, óxido de grafeno, e óxido de grafeno/urease.

Nanossensores/ Nanobiosensores	Sensibilidade (nm/ppb)	LD (ppb)	LQ (ppb)	R ²
Urease	12,18967 ^c ± (0,07795)	0,03776 ^a ± (0,00024)	0,12586 ^a ± (0,00080)	0,99
Óxido de grafeno	13,88033 ^b ± (0,06601)	0,02795 ^b ± (0,00013)	0,09317 ^b ± (0,00044)	0,96
Óxido de grafeno/urease	14,74667 ^a ± (0,08601)	0,01831 ^c ± (0,00011)	0,06103 ^c ± (0,00035)	0,98

Dados apresentados como média (três repetições) ± Desvio Padrão. Letras iguais na coluna indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey).

Fonte: O autor.

Com relação ao coeficiente de correlação (R^2), foi possível obter um ajuste satisfatório dos dados para a linha de regressão com valores acima de 0,95 conforme recomendado pelo INMETRO (2003).

A sensibilidade dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever foi obtida utilizando o coeficiente angular da concentração *versus* a deflexão. O nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno/urease foi o que apresentou maior sensibilidade (14,74667 nm/ppb) e consequentemente menor limite de detecção (0,01831 ppb) e de quantificação (0,06103 ppb) (Cd^{2+}), diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais sensores. Enquanto que a menor sensibilidade foi apresentada pelo nanobiossensor funcionalizado com a enzima urease (12,18967 nm/ppb), maior limite de detecção (0,03776 ppb) e maior limite de quantificação (0,12856 ppb).

Levando em consideração os limites máximos permitidos pela legislação brasileira para Cd^{2+} em água (BRASIL, 2004, 2005, 2011), pela Organização Mundial de Saúde (WHO), pelas Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011; EPA, 2018) e pela Diretiva 2008/105/CE do Parlamento e Conselho Europeu de 16 de dezembro de 2008, relativa às normas de qualidade ambiental no domínio da política da água e limites máximo autorizado bem como os valores médios anuais de concentração de cádmio em águas superficiais (PUJOL et al., 2014), os quais estão demonstrados na Tabela 5, pode-se observar que os nanobiossensores e nanossensores desenvolvidos neste trabalho são capazes de detectar satisfatoriamente a presença de Cd^{2+} em água, bem abaixo das concentrações máximas definidas por estas legislações.

Tabela 5. Padrões de qualidade ambiental para cádmio.

Legislação/Órgão	Águas superficiais internas (ppb)***	Outras águas superficiais (ppb)
EQS-AA* Diretiva Europeia	0,08 (classe 1)	
	0,08 (classe 2)	
	0,09 (classe 3)	0,2
	0,15 (classe 4)	
	0,25 (classe 5)	
EQS MPC** Diretiva Europeia	0,45 (classe 1)	0,45 (classe 1)
	0,45 (classe 2)	0,45 (classe 2)
	0,6 (classe 3)	0,6 (classe 3)
	0,9 (classe 4)	0,9 (classe 4)
	1,5 (classe 5)	1,5 (classe 5)
EPA	3,00	-
WHO	5,00	-
Portaria N° 2914 Ministério da Saúde (Brasil)	5,00	-
Resolução N° 357 CONAMA (Brasil)	1,00 (classes 1-2)	-
Portaria N° 518 Ministério da Saúde (Brasil)	5,00	-

* Padrão de Qualidade Ambiental - Média Anual (EQS-AA – do inglês *Environmental Quality Standard - Annual Average*)

** Padrão de Qualidade Ambiental – Concentração Máxima Permitida (EQS MPC – do inglês *Environmental Quality Standard – Maximal Permissible Concentration*)

*** Águas superficiais incluindo rios e lagos

Fonte: O autor.

Sendo assim, pode-se dizer que os LD encontrados neste trabalho foram satisfatórios, quando comparados com outros trabalhos na literatura como por exemplo Rigo (2019) que elaborou um nanobiossensor de cantilever funcionalizado pela técnica de SAM com enzima urease e determinou um LD de 0,413 ppb de Cd^{2+} em água ultrapura. May May e Russell (2003) estudaram um biossensor de ressonância plasmônica de superfície (SPR - do inglês *Surface Plasmon Resonance*) com urease em substrato de vidro revestido a ouro e obtiveram um limite de detecção de 10 mg/L (10000 ppb). Rodriguez, Bolbot e Tothill, (2004) utilizaram enzimas urease e desidrogenase glutâmica em um biossensor amperométrico e obtiveram um limite de detecção para Cd^{2+} de 0,29 mg/L (290 ppb). Xing et al. (2014) desenvolveram um imunossensor colorimétrico sensível e específico para a detecção de cádmio em amostras aquosas com adição nanopartículas de prata e obtiveram um limite de detecção de Cd^{2+} de 5 ppb.

Quanto aos métodos convencionais de detecção de cádmio, Yabe e Oliveira (1998) utilizando o espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP AES), obtiveram limite de detecção de 3,3 ppb. Ramalho, Amaral Sobrinho e Velloso (2000) empregaram em seu trabalho a técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e obtiveram limite de detecção de 2,2 ppb. Isso demonstra que os nanossensores e nanobiossensores de cantilever desenvolvidos, obtiveram LD muito menores os métodos tradicionais para análise de metais pesados.

É importante destacar que maiores valores de sensibilidade e menores valores de limite de detecção, tornam os sensores mais sensíveis e menores concentrações podem ser detectadas e, sendo assim, melhores são suas respostas. Assim, em se tratando de sensores procura-se sempre dispositivos com maiores valores de sensibilidade e menores limites de detecção (BRASIL, 2003; IUPAC, 2014; SKOOG et al., 2005). A deposição da enzima sobre o óxido de grafeno melhorou a performance em relação ao nanobiossensor com a enzima e ao nanossensor de apenas óxido grafeno, como pode ser observado pelo aumento da sensibilidade e diminuição do limite de detecção. Dessa forma percebe-se o enorme potencial de aplicação que essa técnica apresenta para detecção de quantidades mínimas deste metal estudado.

A Tabela 6 apresenta um comparativo de tipos de sensores utilizados para detecção de cádmio em água.

Tabela 6. Sensores utilizados para detecção de cádmio em água.

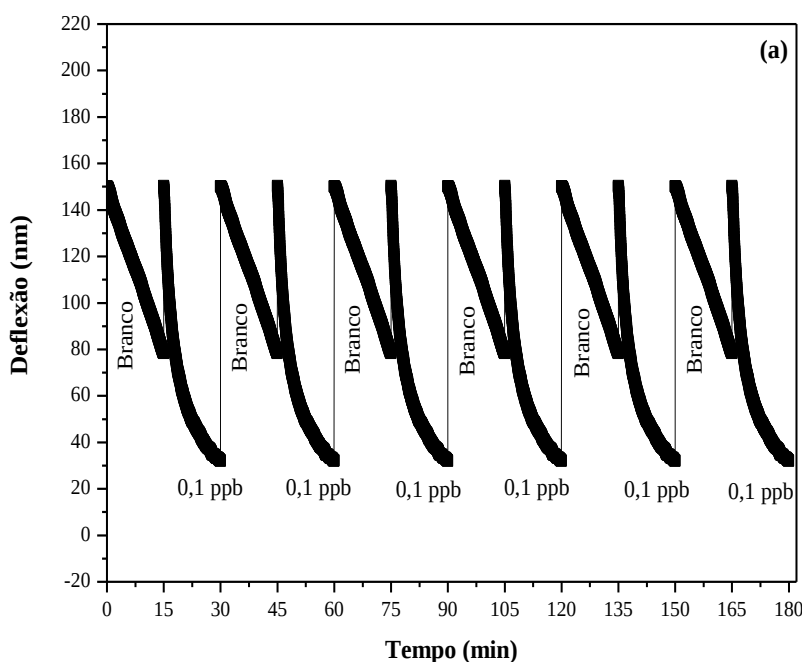
Sensores	Camada sensora	Limite de detecção	Referência
Nanosensor de cantilever	Óxido de grafeno/urease	0,01831 ppb	Presente estudo
Microsensor eletroquímico	Óxido de grafeno reduzido	1,00 ppb	Xuan, Hossain e Park (2016)
Eletroquímico	Filme de óxido de grafeno reduzido modificado com bismuto	0,5 ppb	Ping et al. (2014)
Eletroquímico	SnO ₂ e óxido de grafeno reduzido	0,1015 nM	Wei et al. (2012)
Biossensor amperométrico	Eletrodo de platina com óxido de grafeno e acetilcolinaesterase	0,02–0,7 µM	Gumpu et al. (2018)

Fonte: o autor.

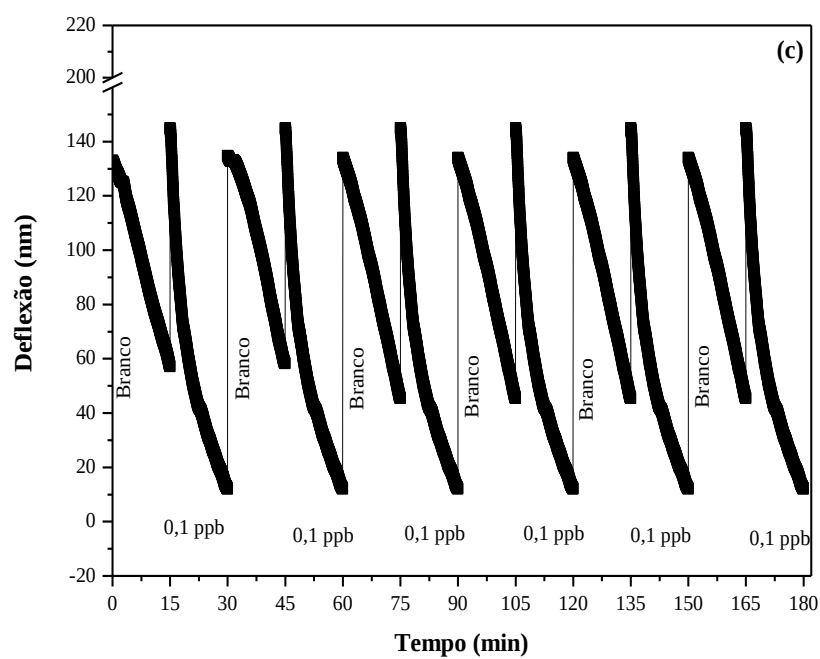
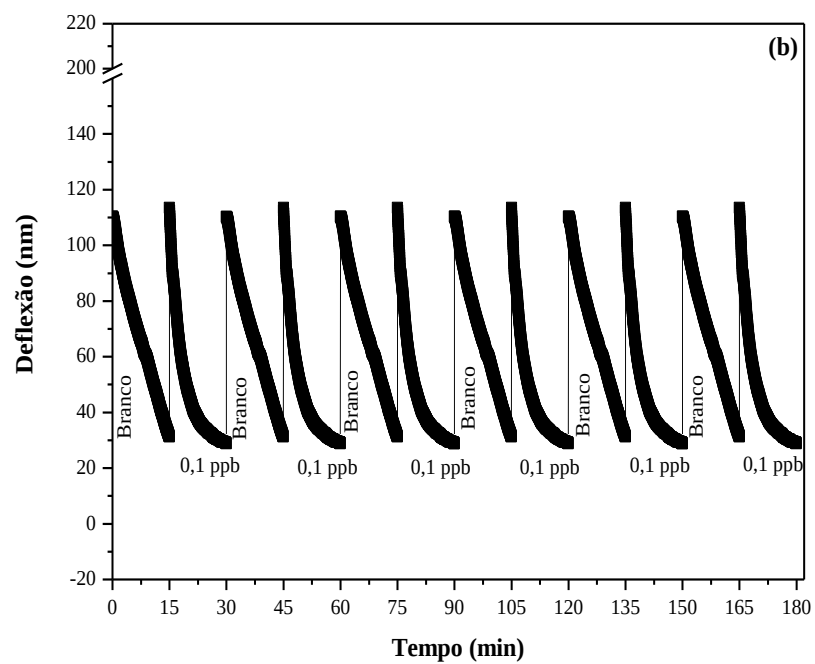
4.2.2 Reversibilidade

A reversibilidade (η) pode ser considerada como a capacidade dos nanossensores ou nanobiossensores de retornar ou não à sua condição inicial depois de ser submetido a interação com o analito, durante várias medições. A resposta de reversibilidade foi estudada utilizando uma concentração de Cd^{2+} de 0,1 ppb em água ultrapura. Desta forma, os valores de reversibilidade foram de 100 % (± 10) para todos os sensores estudados, durante os 6 ciclos alternando a exposição de Cd^{2+} e água ultrapura. Desse modo, demonstrou capacidade de detectar e retornar à sua condição inicial, como pode ser observado na Figura 15.

Figura 15. Reversibilidade dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com (a) urease, (b) óxido de grafeno, e (c) óxido de grafeno/urease durante 6 ciclos, alternado a exposição a solução de Cd^{2+} (0,1 ppb) e em água ultrapura (branco).



Continuação

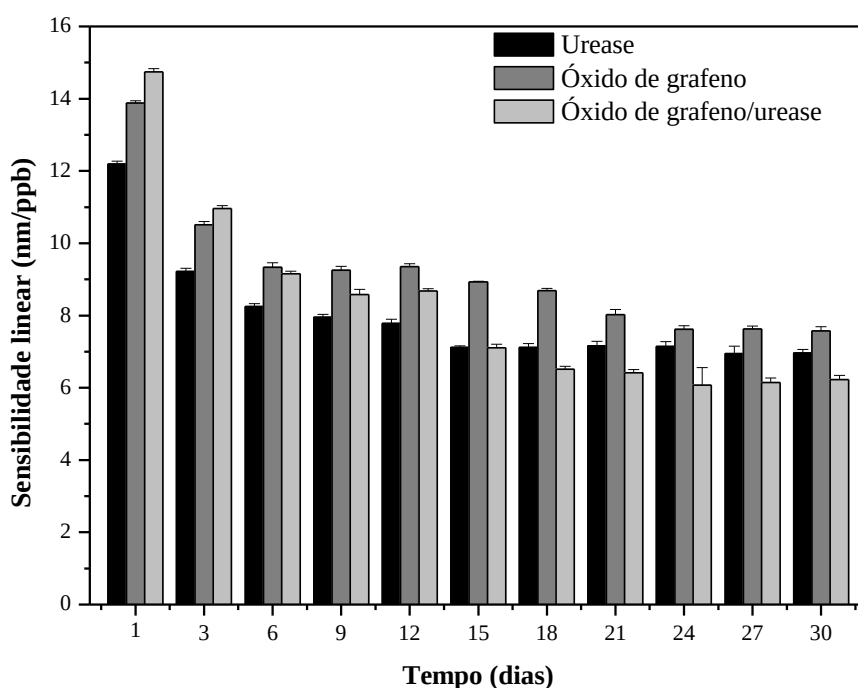


Fonte: O autor.

4.2.3 Estabilidade

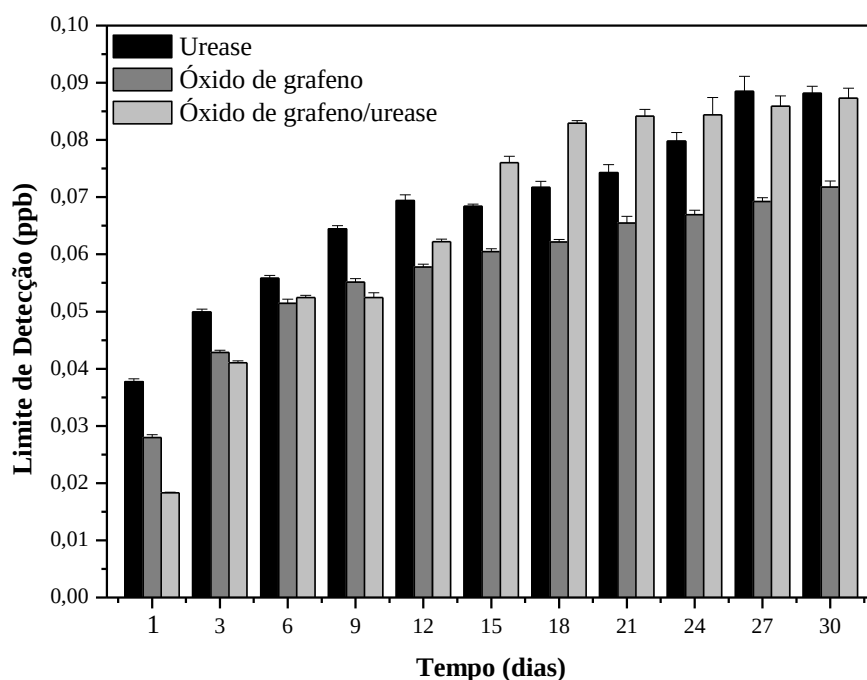
A estabilidade da resposta de um sensor é de extrema importância, uma vez que, dependendo da situação, o ideal é que o sensor possa ser utilizado por mais tempo e que mantenha as suas características quanto a sua sensibilidade e seu limite de detecção. As respostas de deflexão diminuíram durante os dias de armazenamento para todos os dispositivos (Apêndices 4, 5 e 6). As Figura 16 e 17 apresentam os valores de sensibilidade e LD para os nanobiossensores e nanossensores estudados, respectivamente, durante 30 dias de estocagem.

Figura 16. Valores de sensibilidade linear dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com urease, óxido de grafeno, e óxido de grafeno/urease durante 30 dias de estocagem.



Fonte: O autor.

Figura 17. Limite de detecção dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com urease, óxido de grafeno, e óxido de grafeno/urease durante 30 dias de estocagem.



Fonte: O autor.

Analisando a Figura 16 observa-se que a sensibilidade diminui durante os 30 dias de armazenamento tanto para nanossensor de óxido de grafeno quanto para os nanobiossensores de urease e o de grafeno/urease. Por outro lado, o valor do LD aumentou durante este período estudado (Figura 17).

A Tabela 5 apresenta o percentual de perda de sensibilidade dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com urease, óxido de grafeno e óxido de grafeno/urease durante 30 dias de armazenamento calculado em relação a sensibilidade do primeiro dia de análise.

Tabela 7. Perda de sensibilidade (%) dos nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com urease, óxido de grafeno, e óxido de grafeno/urease durante 30 dias de armazenamento.

Dias	Perda de Sensibilidade (%)		
	Urease	Óxido de grafeno	Óxido de grafeno/urease
1	-	-	-
3	24,39	24,30	25,68
6	32,33	32,78	37,93
9	34,75	33,33	41,81
12	36,15	32,65	41,14
15	41,61	35,66	51,84
18	41,65	37,39	55,83
21	41,28	42,21	56,48
24	41,39	45,09	58,83
27	43,03	45,04	58,31
30	42,86	45,46	57,81

Fonte: O autor.

Pela Tabela 7 é possível verificar que a maior perda de sensibilidade ao final dos 30 dias de armazenamento foi para o nanobiossensor de óxido de grafeno/urease (57,81 %), e a menor foi para o nanobiossensor funcionalizado com urease (42,86%). A abordagem de adsorção física da enzima no óxido de grafeno é considerada o método mais eficaz de imobilização de enzimas em derivados de grafeno, pelo fato de que a ausência de reagentes funcionais adicionais e processo complicado muitas vezes preserva alterações conformacionais das enzimas. Embora as interações intermoleculares sejam fracas, mudanças ambientais podem levar a lixiviação da enzima da superfície do suporte dessa forma diminuindo sua vida útil (SOOZANIPOUR; TAHERI-KAFRANI, 2018). Este fato pode explicar a maior perda de sensibilidade ocorrida no nanobiossensor de óxido de grafeno/urease. Rigo et al. (2019) avaliaram a resposta de um nanobiossensor de cantilever funcionalizado pela técnica SAM com enzima urease durante 30 dias de armazenamento e verificaram uma diminuição de 44,8 % da sensibilidade e um aumento do limite de detecção.

Alguns estudos na literatura relatam a utilização de óxido de grafeno como uma plataforma de imobilização enzimática e sua estabilidade. Song et al. (2011) estudaram a estabilidade ao armazenamento de um biossensor de nanopartícula de ouro contendo a enzima tirosinase imobilizada em óxido de grafeno, na detecção de 10 μ M de catecol em solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) e observaram que o biossensor utilizado reteve 89 % de sua resposta original após 20 dias e depois diminuiu gradualmente para cerca de 54 % após 2 meses de armazenamento. Os autores ainda atribuem este resultado ao filme obtido poderia fornecer um microambiente biocompatível para proteger a capacidade específica da enzima tirosinase de maneira eficaz.

Liu et al. (2010) produziram um eletrodo enzimático usando ligação covalente entre grupos de ácidos carboxílicos do óxido de grafeno e as aminas da enzima glicose oxidase. O mesmo após ter sido armazenado durante 30 dias em solução tampão (pH 7,4) a 4 °C teve uma diminuição de 20 % da sensibilidade, que foi atribuída ao declínio da atividade enzimática.

Artigues, Abellà e Colominas (2017) desenvolveram um biossensor amperométrico baseado na imobilização da enzima glicose oxidase usando um hidrogel de quitosana em matrizes de nanotubos de dióxido de titânio altamente ordenados para análise de glicose em sucos, o qual reteve 85% de sua sensibilidade inicial após 30 dias da medição. Os autores atribuíram esse fato à excelente capacidade de retenção e boa biocompatibilidade da matriz de imobilização utilizada.

Branzoi e Branzoi (2014) obtiveram um filme de nanocompósito de nanotubos de carbono por copolimerização eletroquímica e imobilizaram a enzima urease em um eletrodo modificado do filme nanocompósito/substrato de platina, preparando um biossensor amperométrico para a detecção de ureia. A estabilidade ao armazenamento alcançada foi de 54% de sua atividade original retida após 3 semanas. Levando em consideração esses resultados, pode-se dizer que a presença de dos nanotubos de carbono melhorou a imobilização da enzima, a condutividade do filme e a transferência de carga entre a enzima e o substrato.

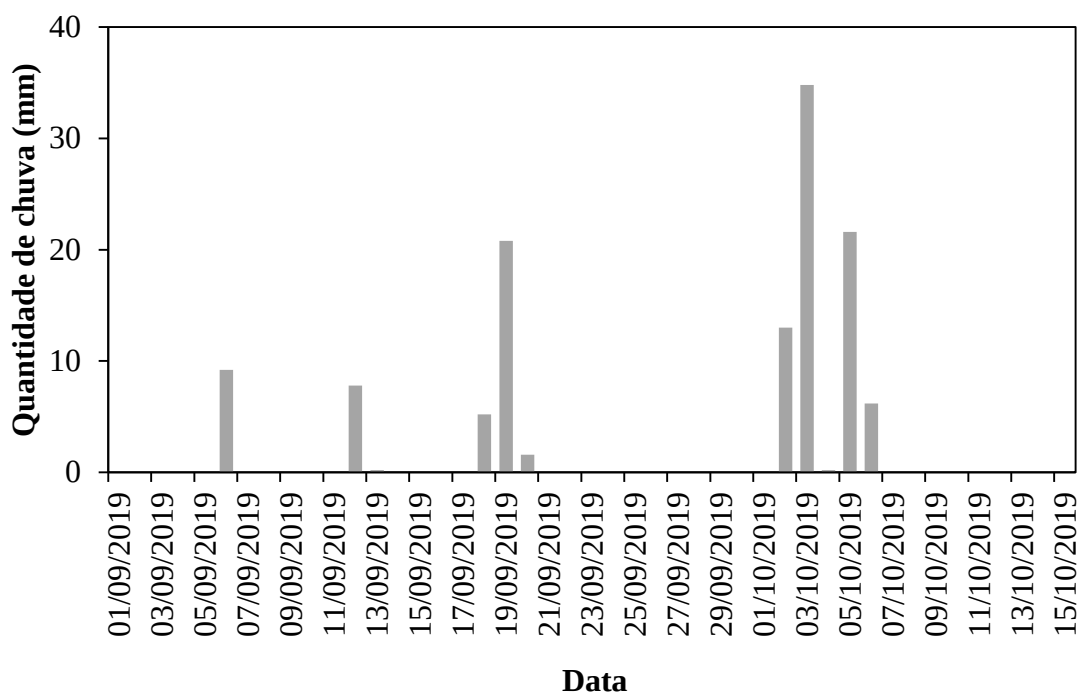
Com base nestes estudos e nos resultados obtidos é possível afirmar que o tempo de estocagem afeta a resposta dos nanobiossensores, ocorrendo uma diminuição da qualidade da resposta do mesmo por meio do decremento da atividade da enzima. Porém, mesmo observando essas diferenças em relação ao LD e a sensibilidade, os resultados mostram que mesmo após 30 dias, os mesmos conseguem detectar pequenas quantidades

de Cd^{2+} , na ordem de ppb, características excelentes quando comparado com outros métodos de detecção.

4.3 Análise dos parâmetros físico-química da água

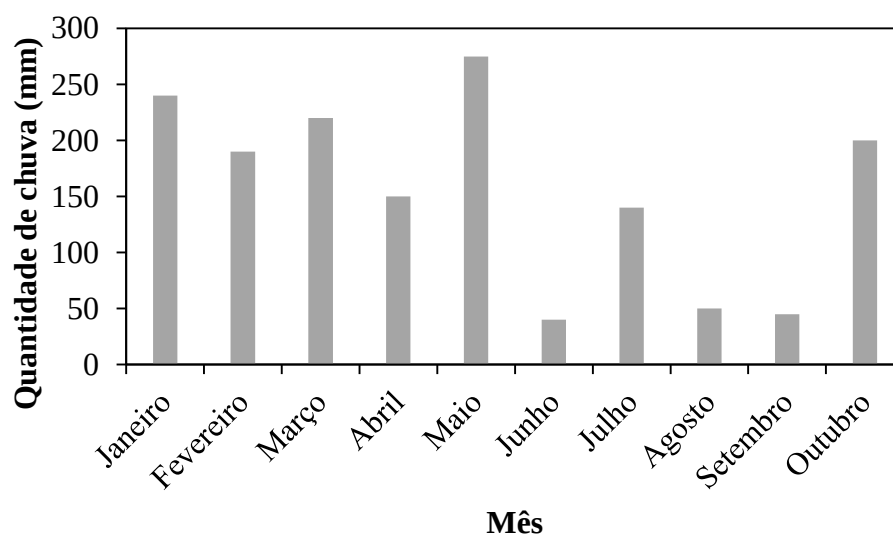
As Figuras 18 e 19 apresentam os dados de precipitação pluviométrica entre os dias de coleta da água do rio Tigre e o acumulado de chuva na estação automática de Erechim, respectivamente. Tais dados foram obtidos do site do INMET. As 4 coletas foram realizadas nos dias 23 e 30 de setembro (coletas 1 e 2) e 7 e 14 de outubro de 2019 (coletas 3 e 4).

Figura 18. Dados de precipitação pluviométrica entre os dias 01 de setembro a 15 de outubro de 2019.



Fonte: INMET (2019).

Figura 19. Acumulado de chuva na estação automática de Erechim dos meses de janeiro a outubro de 2019.



Fonte: INMET (2019).

É possível observar pelas Figuras 18 e 19 que houve dois períodos distintos de quantidade de chuva. As coletas 1 e 2 foram realizadas em um período de pouca chuva aproximadamente 50 mm durante os 20 anteriores a essas coletas. Enquanto que para as coletas 3 e 4 a precipitação anterior foi de aproximadamente 80 mm em apenas 7 dias.

A Tabela 8 apresenta os resultados de turbidez, condutividade elétrica e pH das amostras de água coletadas do rio.

Tabela 8. Turbidez, condutividade elétrica e pH das amostras de água coletadas.

Coleta	Turbidez (NTU)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH
1	$3,03^b \pm (0,48)$	$310,67^a \pm (1,15)$	$7,28^a \pm (0,05)$
2	$3,55^b \pm (0,05)$	$291,67^b \pm (1,15)$	$7,38^a \pm (0,10)$
3	$4,43^a \pm (0,13)$	$121,47^d \pm (0,06)$	$7,35^a \pm (0,12)$
4	$4,94^a \pm (0,03)$	$133,67^c \pm (1,27)$	$7,48^a \pm (0,02)$

*Média (três repetições) $\pm$ Desvio Padrão. Letras iguais na coluna indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey).

Fonte: O autor

O pH não apresentou diferença significativa a nível de 5% entre as amostras de água. 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. 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 coletas 1 e 2 apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação as coletas 3 e 4. Isto pode ser explicado pela precipitação pluviométrica ocorrida durante os dias coletados (Figura 18). 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).

Verifica-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre todas as coletadas de água analisadas para a condutividade. Sendo a amostra 1 a que possui o maior valor (310,67 $\mu\text{S}/\text{cm}$) e a amostra 3 o menor (121,47 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Desta forma, quanto maior for a quantidade de íons dissolvidos, maior será a condutividade elétrica da água, neste caso também pode se relacionar com a precipitação pluviométrica do período, uma maior concentração de íons dissolvidos no período em que não houve chuva, conseqüentemente menor volume de água no rio, conforme houve aumento do volume de água no rio também houve a diminuição de íons na água pela diluição dos mesmos. 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 Tabela 9 apresenta os resultados da análise de minerais e metal das amostras de água coletada do rio.

Tabela 9. Concentração de minerais na água coletada no rio Tigre.

Coleta	Na ⁺ (mg/L)	K ⁺ (mg/L)	Mg ²⁺ (mg/L)	Cd ²⁺ (mg/L)
1	41,80 ^a ± (2,10)	4,41 ^a ± (0,07)	8,91 ^a ± (0,11)	Nd
2	38,63 ^a ± (0,64)	4,20 ^a ± (0,51)	8,94 ^a ± (1,56)	Nd
3	33,26 ^b ± (0,94)	3,41 ^a ± (0,49)	9,38 ^a ± (0,16)	Nd
4	26,19 ^c ± (1,47)	3,36 ^a ± (0,43)	8,10 ^a ± (1,01)	Nd
LD (mg/L)	0,0463	0,082	0,0366	0,1089
LQ (mg/L)	0,0554	0,117	0,0471	0,1152

*Média (três repetições) ± Desvio Padrão. Letras iguais na coluna indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey).

**Nd: não detectável, abaixo do LD.

Fonte: O autor

A concentração de sódio diminuiu do primeiro dia de coleta em relação ao quarto dia de coleta e foi o mineral que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes coletas. Enquanto que o potássio e o magnésio não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as coletas de água.

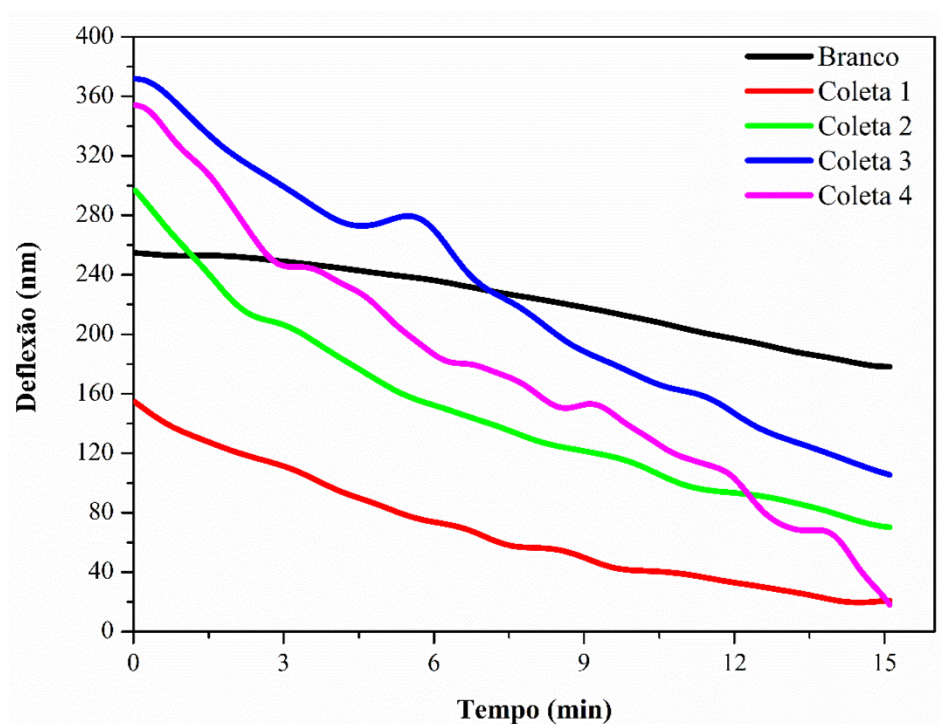
Por meio da realização da análise de espectrometria de absorção atômica, não foi verificada a presença de cádmio nos diferentes dias de coleta o qual o limite de detecção do equipamento é de 0,1089 mg/L (108,9 ppb). O nanobiossensor de cantilever utilizado neste estudo apresentou um limite de detecção de 0,01831 ppb bem abaixo da técnica da espectrometria de absorção atômica.

4.3.2 Análise do efeito matricial da água de rio na resposta dos nanobiossensores de cantilever e interferentes

O nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno/urease foi escolhido para este estudo por ter apresentado características como maior sensibilidade e menor limite de detecção, frente aos demais estudados, as quais são de fundamental importância, em se tratando deste tipo de dispositivo, além de ser uma proposta inovadora para imobilizar enzima em óxido de grafeno, assim melhorando suas propriedades de sensoriamento. Desta forma, a Figura 20 apresenta a resposta deste nanobiossensor ao efeito matricial da água do rio nas diferentes coletas e água ultrapura (branco). Enquanto

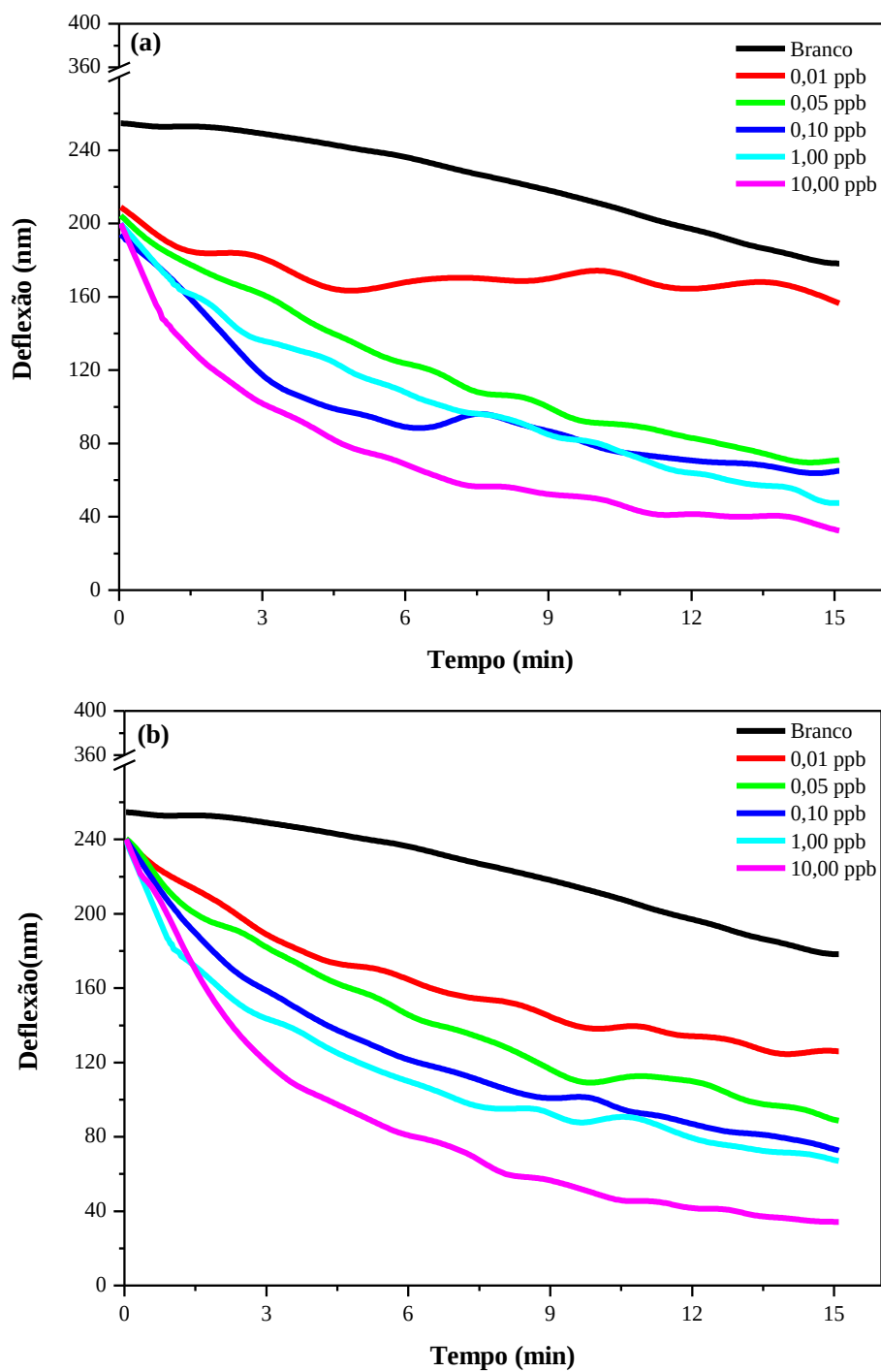
que a Figura 21 apresenta a resposta do nanobiossensor para o efeito da matriz (água do rio) com diferentes concentrações de Cd^{2+} (0,01; 0,05; 0,1; 1 e 10 ppb) nos diferentes dias de coleta.

Figura 20. Resposta do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno/urease ao efeito matricial da água do rio nas diferentes coletas e água ultrapura (branco).

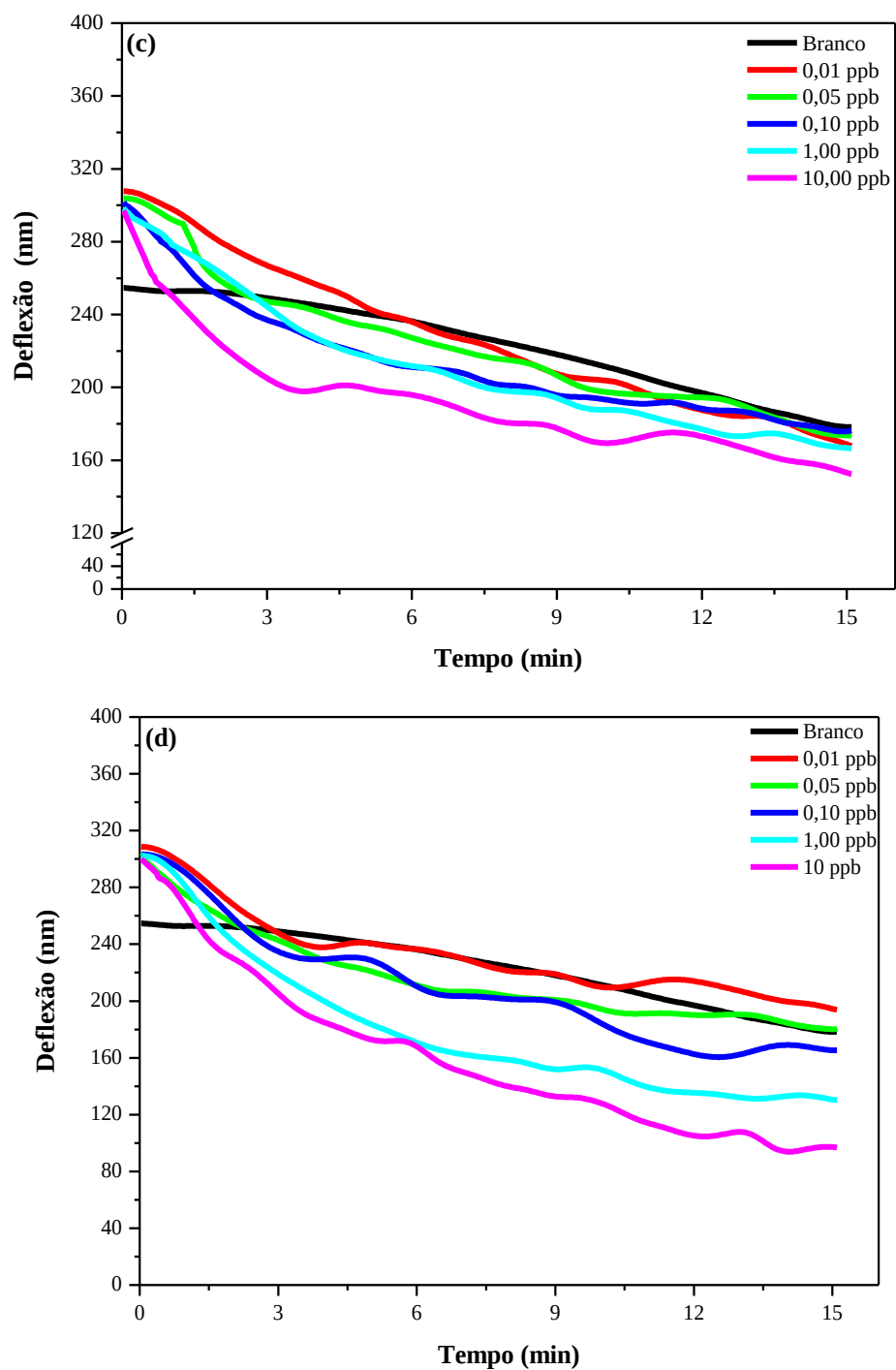


Fonte: o autor.

Figura 21. Resposta dos nanobiossensores funcionalizados com óxido de grafeno/urease ao efeito da matriz (água do rio) com diferentes concentrações de Cd^{2+} (0,01; 0,05; 0,1; 1 e 10 ppb) nos diferentes dias de coleta: (a) coleta 1, (b) coleta 2, (c) coleta 3 e (d) coleta 4.



Continuação



Fonte: O autor.

Na Figura 20 pode-se perceber que o nanobiossensor funcionalizado com óxido de grafeno/urease sofreu efeito da matriz, pois observa-se que a resposta de deflexão para água do rio sem adição de cádmio se comporta de maneira distinta nas 4 coletas de água.

Entretanto este efeito foi minimizado quando as amostras foram fortificadas com concentrações conhecidas de cádmio (Figura 21), e então o nanobiossensor utilizado foi capaz de detectar estas diferentes concentrações de cádmio.

Esta diferença de comportamento da resposta dos nanobiossensores, pode ser devido ao fato das amostras reais, apresentarem características distintas conforme observado na Tabela 8. As amostras apresentaram diferença significativa a turbidez e condutividade, sendo que as coletas 1 e 2 apresentaram menor quantidade de partículas em suspensão (3,03 e 3,55 NTU) e as coletas 3 e 4 as maiores (4,43 e 4,94 NTU) e quanto aos íons dissolvidos a coleta 1 apresentou maior condutividade (310,67 $\mu\text{S}/\text{cm}$), enquanto a coleta 3 apresentou a menor (121,47 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Os resultados de pH não apresentaram diferença significativa, então é provável que não interferiram nos resultados do nanobiossensor.

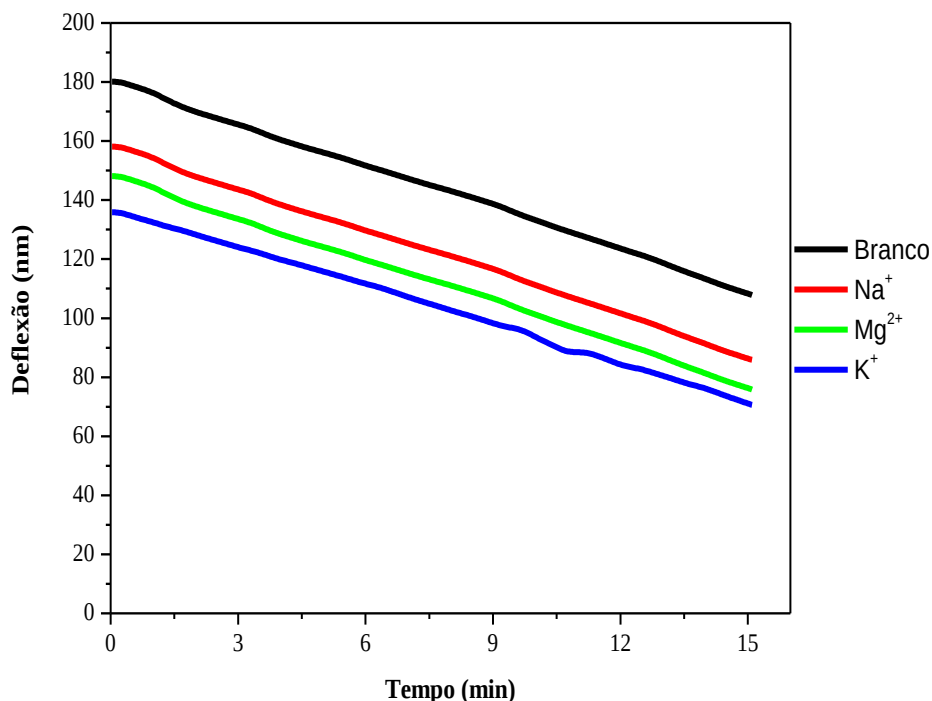
A quantidade de chuvas do período (Figuras 18 e 19) em que as coletas de água no rio Tigre foram realizadas também podem ter influenciado, uma vez em se que obteve coletadas antecedidas por um período com quantidade baixa de chuva (coletas 1 e 2) e outras com maior quantidade de chuva (coletas 3 e 4).

Segundo Rigo (2019) o efeito da matriz depende das propriedades físico-químicas do analito de interesse e das características dos componentes da matriz endógena (compostos desconhecidos e imprevisíveis). Geralmente a análise em amostras reais é difícil, uma vez que as matrizes ambientais são mais complexas e variáveis, tornando o efeito matricial mais pronunciado.

No entanto este problema relacionado à análise de amostras reais foi vencido pela fortificação com cádmio das amostras de água coletadas no rio. Utilizando esta fortificação, o efeito da matriz acabou se tornando menos significativo quando comparado com a resposta do nanobiossensor sem a fortificação. Sendo assim, seu desempenho não foi muito afetado pelos efeitos da matriz, dessa forma, necessitando pouca preparação da amostra, podendo ser eliminado etapas laboratoriais de preparação, as quais são comumente utilizadas nos métodos convencionais de detecção.

A seletividade do nanobiossensor de cantilever foi avaliada para verificar a capacidade do dispositivo em determinar com precisão o Cd^{2+} na presença de outros componentes na matriz da amostra de água (água do rio coletada). Para isso foram adicionadas com diferentes interferentes, tais como o Na^+ , Mg^{2+} e K^+ em água ultrapura na concentração de 10 ppb, juntamente com uma amostra de água ultrapura (branco) conforme demonstrado na Figura 22.

Figura 22. Resposta dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com óxido de grafeno/urease para a concentração de 10 ppb de Na^+ , Mg^{2+} e K^+ diluídos em água ultrapura.



Fonte: o autor.

A seletividade do nanobiossensor foi realizada a fim de verificar se o mesmo apresentaria resposta para os minerais (Na^+ , Mg^{2+} e K^+), uma vez que estão presentes nas amostras de água que foram coletadas (Tabela 9). Pode-se notar que os mesmos não causaram efeito na resposta do nanobiossensor uma vez que seu comportamento foi similar ao do branco (água ultrapura) como está demonstrado na Figura 22.

Com os resultados obtidos neste trabalho é possível visualizar a potencialidade e a promissora aplicação dos nanobiossensores de cantilever como uma alternativa aos métodos convencionais de detecção de metais pesados, uma vez que não requer nenhuma preparação preliminar da amostra.

5 CONCLUSÃO

De maneira geral, pode-se concluir que o uso de nanobiossensores e nanossensores de cantilever funcionalizados com urease, óxido de grafeno, e óxido de grafeno/urease se mostraram como ferramentas promissoras para detecção de cádmio em águas.

A caracterização da superfície pelas análises de PM-IRRAS, AFM e SEM confirmaram a funcionalização da camada sensora pela técnica das camadas automontadas (SAM), sendo possível verificar a deposição da mesma.

O método de funcionalização dos nanobiossensores e nanossensores se revelou satisfatório, onde foi possível detectar as diferentes concentrações de cádmio, por meio da adsorção do mesmo na superfície funcionalizada do cantilever, o qual apresentou deflexão (nm) diferente para cada concentração estudada.

Além disto, foram obtidos limites de detecção variaram de 0,01831 ppb (nanobiossensor de óxido de grafeno/urease) à 0,03776 ppb (nanobiossensor de urease) e uma alta sensibilidade que chegou a 14,74667 nm/ppb para o nanobiossensor de óxido de grafeno/urease. Os mesmos não apresentaram perdas de sinal durante as sucessivas medições na análise de reversibilidade. Durante o estudo de estabilidade houve diminuição da sensibilidade e aumento do limite de detecção durante os 30 dias de armazenamento, verificou-se uma perda de sensibilidade em relação ao primeiro dia de análise de 57,81 % para o nanobiossensor de óxido de grafeno/urease e de 42,86 % para o naobiossensor de urease.

Quanto a aplicação dos nanobiossensores de óxido de grafeno/urease em amostras reais de água, foi possível superar os efeitos da matriz com a simples filtração e posterior fortificação das amostras coletadas nos diferentes dias. Onde o nanobiossensor apresentou diferentes deflexões em relação a água ultrapura, a água do rio e as concentrações analisadas. Verificou-se também que os minerais presentes na água do rio não interferiram na resposta do nanobiossesnor, uma vez que apresentaram uma reposta semelhante ao branco (água ultrapura).

Desta forma, os nanobiossensores e nanossensores desenvolvidos neste trabalho podem ser utilizados como uma ferramenta para a detecção de cádmio em águas, pois apresentaram baixo limite de detecção e análise em tempo real. Podendo, futuramente, atuar na detecção prévia e precisa dos lançamentos deste metal nos cursos d'água, promovendo, desta forma, um melhor controle e monitoramento das suas emissões,

consequentemente ajudando a melhorar a qualidade da água refletindo diretamente na saúde dos seres vivos e também do meio ambiente.

5.1 Sugestões de 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 imobilizar a enzima no óxido de grafeno, o qual pode acarretar em uma ligação mais estável entre a enzima e o mesmo.
2. Avaliar a resposta do nanobiossensor de cantilever com o uso de diferentes enzimas.
4. Analisar outros 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.

REFERÊNCIAS

- ADAMKIEWICZ, M.; O'HARA, T.; O'HAGAN, 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, n. 22, p. 6719–6723, set. 2012.
- ADEEL, M.; BILAL, M.; RASHEED, T.; SHARMA, A.; IQBAL, H. M. N. **Graphene and graphene oxide: Functionalization and nano-bio-catalytic system for enzyme immobilization and biotechnological perspective.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 120, p. 1430–1440, dez. 2018.
- ALONSO, J. M.; BIELEN, A. A. M.; OLTHUIS, 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, out. 2016.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 20. ed. WASHINGTON: 1998.
- ARDUINI, F.; CINTI, S.; MAZZARACCHIO, V.; SCOGNAMIGLIO, V.; AMINE, A.; MOSCONE, D. **Carbon black as an outstanding and affordable nanomaterial for electrochemical (bio)sensor design.** Biosensors and Bioelectronics, p. 112033, jan. 2020.
- ARTIGUES, M.; ABELLÀ, J.; COLOMINAS, S. **Analytical Parameters of an Amperometric Glucose Biosensor for Fast Analysis in Food Samples.** Sensors, v. 17, n. 11, p. 2620, 14 nov. 2017.
- 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, n. 9, p. 2810–2817, maio 2009.
- AWASTHI, A. P.; GRADY, M. E.; KIM, I. H.; SOTTOS, N. R.; GEUBELLE, P. H. **Nanoscale mechanical tailoring of interfaces using self-assembled monolayers.** Mechanics of Materials, v. 98, p. 71–80, jul. 2016.
- AZHAR, S. C.; ARIS, A. Z.; YUSOFF, M. K.; RAMLI, M. F.; JUAHIR, H. **Classification of River Water Quality Using Multivariate Analysis.** Procedia Environmental Sciences, v. 30, p. 79–84, 2015.
- BISWAS, P.; KARN, A. K.; BALASUBRAMANIAN, P.; KALE, P. G. **Biosensor for detection of dissolved chromium in potable water: A review.** Biosensors and Bioelectronics, v. 94, p. 589–604, ago. 2017.
- BOLIBOK, P.; WIŚNIEWSKI, M.; ROSZEK, K.; TERZYK, A. P. **Controlling enzymatic activity by immobilization on graphene oxide.** Science of Nature, v. 104, n. 3–4, 1 abr. 2017.
- BRANDAO, H. D. M.; GERN, J. C.; VICENTINI, N. M.; PEREIRA; MUNK, M.; PATRÍCIA VILHENA DIAS DE ANDRADE. **Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária.** Revista CFMV, v. 17, n. 53, p. 61–67, 2011.

- BRANZOI, F.; BRANZOI, V. **Enzymatic Electrode Obtained by Immobilizing of Urease into a Nanocomposite Film Based on Conducting Polymers and Different Additives**. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, v. 63, n. 11, p. 549–556, 24 jul. 2014.
- BRASIL. **ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – Re Nº 899, De 29 De Maio De 2003** Diário Oficial da União, 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b>
- BRASIL. **Portaria nº 518 em 25 de março de 2004**, 2004. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria_518_2004.pdf>
- BRASIL. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente)**., 2005.
- BRASIL. **Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Ministério da Saúde**. Diário Oficial da União, 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>
- BUENO, C. C.; GARCIA, P. S.; STEFFENS, C.; DEDA, D. K.; LEITE, F. DE L. Nanosensors. In: Nanoscience and its Applications. p. 121–153, 2017.
- BUTT, H.-J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. **Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications**. Surface Science Reports, v. 59, n. 1–6, p. 1–152, out. 2005.
- 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, mar. 2006.
- CUI, Z.; LUAN, X.; JIANG, H.; LI, Q.; XU, G.; SUN, C.; ZHENG, L.; SONG, Y.; DAVISON, P. A.; HUANG, W. E. **Application of a bacterial whole cell biosensor for the rapid detection of cytotoxicity in heavy metal contaminated seawater**. Chemosphere, v. 200, p. 322–329, jun. 2018.
- DESIKAN, R.; ARMEL, S.; MEYER III, H. M.; THUNDAT, T. **Effect of chain length on nanomechanics of alkanethiol self-assembly**. Nanotechnology, v. 18, n. 42, p. 424028, 24 out. 2007.
- DU, N.; CHEN, M.; LIU, Z.; SHENG, L.; XU, H.; CHEN, S. **Kinetics and mechanism of jack bean urease inhibition by Hg²⁺**. Chemistry Central Journal, v. 6, n. 1, p. 154, 10 dez. 2012.
- EFFENDI, H. **River Water Quality Preliminary Rapid Assessment Using Pollution Index**. Procedia Environmental Sciences, v. 33, p. 562–567, 2016.
- ELOVERDE. **Projeto Revitalização dos Rios de Erechim**. Disponível em: <http://www.eloverde.org.br/uploads/artigos/Relatorio_Final_BAIXA_Qualidade_03.09.13.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2020.
- EPA. **2018 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories**. United States Environmental Protection Agency, n. March, p. 2–6, 2018.

- FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. **Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios**. Química Nova, v. 29, n. 1, p. 137–142, fev. 2006.
- FRITZ, J. **Cantilever biosensors**. The Analyst, v. 133, n. 7, p. 855, 2008.
- GALLI, A. **Desenvolvimento e caracterização de um biossensor bienzimático imobilizado sobre monocamadas auto-organizadas para determinação de açúcares em alimentos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- GASPAR, C. **Preparação e caracterização de nanocompósitos de nanopartículas metálicas com proteínas e suas aplicações em biossensores**. [s.l.] Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, 2010.
- GU, Z.; SONG, W.; YANG, Z.; ZHOU, R. **Metal–organic framework as an efficient filter for the removal of heavy metal cations in water**. Physical Chemistry Chemical Physics, v. 20, n. 48, p. 30384–30391, 2018.
- GUMPU, M. B.; VEERAPANDIAN, M.; KRISHNAN, U. M.; RAYAPPAN, J. B. B. **Amperometric determination of As(III) and Cd(II) using a platinum electrode modified with acetylcholinesterase, ruthenium(II)-tris(bipyridine) and graphene oxide**. Microchimica Acta, v. 185, n. 6, p. 297, 12 jun. 2018.
- GUMPU, M. B.; KRISHNAN, U. M.; RAYAPPAN, J. B. B. **Design and development of amperometric biosensor for the detection of lead and mercury ions in water matrix—a permeability approach**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 409, n. 17, p. 4257–4266, 20 jul. 2017.
- HALKARE, P.; PUNJABI, N.; WANGCHUK, J.; NAIR, A.; KONDABAGIL, K.; MUKHERJI, S. **Bacteria functionalized gold nanoparticle matrix based fiber-optic sensor for monitoring heavy metal pollution in water**. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 281, p. 643–651, fev. 2019.
- HAO, J.-N.; YAN, B. **A water-stable lanthanide-functionalized MOF as a highly selective and sensitive fluorescent probe for Cd²⁺**. Chemical Communications, v. 51, n. 36, p. 7737–7740, 2015.
- HERMANSON, G. **Zero-Length Crosslinkers**. In: HERMANSON, G. (Ed.). . Bioconjugate Techniques. 3. ed. Tóquio: Academic Press, 2013. p. 259–273.
- HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. **Preparation of Graphitic Oxide**. Journal of the American Chemical Society, v. 80, n. 6, p. 1339–1339, mar. 1958.
- INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, N. E. Q. I. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, 2003.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). **Chuva acumulada na estação automática: Erechim (RS)**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_iframe.php?codEst=A828&mesAno=2019>. Acesso em: 4 nov. 2019.
- IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**. 2014.
- JANATA, J. **Principles of Chemical Sensors**. Boston, MA: Springer US, 2009.

- JÄRUP, L. **Hazards of heavy metal contamination**. British Medical Bulletin, v. 68, n. 1, p. 167–182, 1 dez. 2003.
- JEONG, H.-K.; LEE, Y. P.; LAHAYE, R. J. W. E.; PARK, M.-H.; AN, K. H.; KIM, I. J.; YANG, C.-W.; PARK, C. Y.; RUOFF, R. S.; LEE, Y. H. **Evidence of Graphitic AB Stacking Order of Graphite Oxides**. Journal of the American Chemical Society, v. 130, n. 4, p. 1362–1366, jan. 2008.
- JIANG, G.; XU, L.; SONG, S.; ZHU, C.; WU, Q.; ZHANG, L.; WU, L. **Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells**. Toxicology, v. 244, n. 1, p. 49–55, fev. 2008.
- KAPPAUN, K.; PIOVESAN, A. R.; CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. **Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review**. Journal of Advanced Research, v. 13, p. 3–17, set. 2018.
- KARIMI, A.; OTHMAN, A.; UZUNOGLU, A.; STANCIU, L.; ANDREESCU, S. **Graphene based enzymatic bioelectrodes and biofuel cells** Nanoscale Royal Society of Chemistry, , 28 abr. 2015.
- 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, n. 11, p. 2636–2642, 15 maio 2007.
- KARPOVICH, D. S.; BLANCHARD, G. J. **Direct Measurement of the Adsorption Kinetics of Alkanethiolate Self-Assembled Monolayers on a Microcrystalline Gold Surface**. Langmuir, v. 10, n. 9, p. 3315–3322, set. 1994.
- KIM, H.; KOBAYASHI, S.; ABDURRAHIM, M. A.; ZHANG, M. J.; KHUSAINOVA, A.; HILLMYER, M. A.; ABDALA, A. A.; MACOSKO, C. W. **Graphene/polyethylene nanocomposites: Effect of polyethylene functionalization and blending methods**. Polymer, v. 52, n. 8, p. 1837–1846, abr. 2011.
- KLAPETEK, P.; NECAS, D.; ANDERSON, C. **Gwyddion user guide**. Disponível em: <<http://gwyddion.net/download/user-guide/gwyddion-user-guide-en.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2020.
- KRAJEWSKA, B. **Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 59, n. 1–3, p. 9–21, jul. 2009.
- 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, abr. 2014.
- KUILA, T.; BOSE, S.; KHANRA, P.; MISHRA, A. K.; KIM, N. H.; LEE, J. H. **Recent advances in graphene-based biosensors**. Biosensors and Bioelectronics, v. 26, n. 12, p. 4637–4648, ago. 2011.
- KURBANOGU, S.; OZKAN, S. A. **Electrochemical carbon based nanosensors: A promising tool in pharmaceutical and biomedical analysis**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 147, p. 439–457, jan. 2018.
- LANG, H. P.; HEGNER, M.; GERBER, C. **Nanomechanical Cantilever Array**

- Sensors.** In: BHUSHAN, B. (Ed.). . Springer Handbook of Nanotechnology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 427–452.
- LEITE, F. L.; PATERNO, L. G.; BORATO, C. E.; HERRMANN, 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, dez. 2005.
- LEITE, F. L.; HERRMANN, P. S. P. **Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: a review.** Journal of Adhesion Science and Technology, v. 19, n. 3–5, p. 365–405, jan. 2005.
- LI, X.; LEE, D.-W. **Integrated microcantilevers for high-resolution sensing and probing.** Measurement Science and Technology, v. 23, n. 2, p. 022001, 1 fev. 2012.
- LIMA, A. H.; MENDONÇA, J. P.; DUARTE, M.; STAVALE, F.; LEGNANI, C.; DE CARVALHO, G. S. G.; MACIEL, I. O.; SATO, F.; FRAGNEAUD, B.; QUIRINO, W. G. **Reduced graphene oxide prepared at low temperature thermal treatment as transparent conductors for organic electronic applications.** Organic Electronics, v. 49, p. 165–173, out. 2017.
- LIU, S.; WU, T.; LI, F.; ZHANG, Q.; DONG, X.; NIU, L. **Disposable graphene sensor with an internal reference electrode for stripping analysis of heavy metals.** Analytical Methods, v. 10, n. 17, p. 1986–1992, 2018.
- LIU, X.; YAO, Y.; YING, Y.; PING, J. **Recent advances in nanomaterial-enabled screen-printed electrochemical sensors for heavy metal detection.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, mar. 2019.
- LIU, Y.; YU, D.; ZENG, C.; MIAO, Z.; DAI, L. **Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors.** Langmuir, v. 26, n. 9, p. 6158–6160, 4 maio 2010.
- LIU, Y.; DENG, Y.; DONG, H.; LIU, K.; HE, N. **Progress on sensors based on nanomaterials for rapid detection of heavy metal ions.** Science China Chemistry, v. 60, n. 3, p. 329–337, 27 mar. 2017.
- LOMEDA, J. R.; DOYLE, C. D.; KOSYNKIN, D. V.; HWANG, W.-F.; TOUR, J. M. **Diazonium Functionalization of Surfactant-Wrapped Chemically Converted Graphene Sheets.** Journal of the American Chemical Society, v. 130, n. 48, p. 16201–16206, 3 dez. 2008.
- LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; NUZZO, R. G.; WHITESIDES, G. M. **Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology.** Chemical Reviews, v. 105, n. 4, p. 1103–1170, abr. 2005.
- MANDLER, D.; KRAUS-OPHIR, S. **Self-assembled monolayers (SAMs) for electrochemical sensing.** Journal of Solid State Electrochemistry, v. 15, n. 7–8, p. 1535–1558, 12 jul. 2011.
- MAO, S.; PU, H.; CHEN, J. **Graphene oxide and its reduction: modeling and experimental progress.** RSC Advances, v. 2, n. 7, p. 2643, 2012.
- 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, n. 4, p. 229–236, 3 abr. 2018.
- MATHEW, R.; RAVI SANKAR, A. **A Review on Surface Stress-Based Miniaturized Piezoresistive SU-8 Polymeric Cantilever Sensors.** Nano-Micro Letters, v. 10, n. 2, p. 35, 2 abr. 2018.
- MAY MAY, L.; RUSSELL, D. A. **Novel determination of cadmium ions using an enzyme self-assembled monolayer with surface plasmon resonance.** Analytica Chimica Acta, v. 500, n. 1–2, p. 119–125, dez. 2003.
- MORALES, J. J. B. **Electrochemical sensors based on electrochemically inert polyme.** [s.l.] Universidade Técnica da Catalunha, 2016.
- MUENCHEN, D. K.; MARTINAZZO, J.; DE CEZARO, A. M.; RIGO, A. A.; BREZOLIN, A. N.; MANZOLI, A.; LEITE, F. DE L.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J. **Pesticide Detection in Soil Using Biosensors and Nanobiosensors.** BIOINTERFACE RESEARCH IN APPLIED CHEMISTRY, 2016.
- MUENCHEN, D. K.; MARTINAZZO, J.; BREZOLIN, A. N.; DE CEZARO, A. M.; RIGO, A. A.; MEZARROBA, M. N.; MANZOLI, A.; DE LIMA LEITE, F.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C. **Cantilever Functionalization Using Peroxidase Extract of Low Cost for Glyphosate Detection.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 186, n. 4, p. 1061–1073, 4 dez. 2018.
- NAGHIB, S. M.; PARNIAN, E.; KESHVARI, H.; OMIDINIA, E.; ESHGHAN-MALEK1, M. **Synthesis, Characterization and Electrochemical Evaluation of Polyvinylalcohol/Graphene Oxide/Silver Nanocomposites for Glucose Biosensing Application.** International Journal of Electrochemical Science, v. 13, p. 1013–1026, jan. 2018.
- OGOŃCZYK, D.; TYMECKI, Ł.; WYŻKIEWICZ, I.; KONCKI, R.; GŁĄB, S. **Screen-printed disposable urease-based biosensors for inhibitive detection of heavy metal ions.** Sensors and Actuators B: Chemical, v. 106, n. 1, p. 450–454, abr. 2005.
- PEÑA-BAHAMONDE, J.; NGUYEN, H. N.; FANOURAKIS, S. K.; RODRIGUES, D. F. **Recent advances in graphene-based biosensor technology with applications in life sciences.** Journal of Nanobiotechnology, v. 16, n. 1, p. 75, 22 dez. 2018.
- PING, J.; WANG, Y.; WU, J.; YING, Y. **Development of an electrochemically reduced graphene oxide modified disposable bismuth film electrode and its application for stripping analysis of heavy metals in milk.** Food Chemistry, v. 151, p. 65–71, maio 2014.
- PRIYADARSHINI, E.; PRADHAN, N. **Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric detection of toxic metal ions: A review.** Sensors and Actuators B: Chemical, v. 238, p. 888–902, jan. 2017.
- PUJOL, L.; EVRARD, D.; GROENEN-SERRANO, K.; FREYSSINIER, M.; RUFFIEN-CIZSAK, A.; GROS, P. **Electrochemical sensors and devices for heavy metals assay in water: the French groups' contribution.** Frontiers in Chemistry, v. 2, 30 abr. 2014.

- QUANG, D. T.; KIM, J. S. **Fluoro- and Chromogenic Chemodosimeters for Heavy Metal Ion Detection in Solution and Biospecimens**. Chemical Reviews, v. 110, n. 10, p. 6280–6301, 13 out. 2010.
- RAMALHO, J. F. G. P.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B. DO; 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, jul. 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 de Ciência do Solo, v. 25, n. 2, p. 495–507, jun. 2001.
- RIGO, A. **DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSORES DE CANTILEVER PARA DETECÇÃO DE METAIS PESADOS EM ÁGUA**. [s.l.] URI-Erechim, 2019.
- RIGO, A. A.; CEZARO, A. M. DE; MUENCHEN, D. K.; MARTINAZZO, J.; BREZOLIN, A. N.; HOEHNE, L.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C. **Cantilever nanobiosensor based on the enzyme urease for detection of heavy metals**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 36, n. 04, p. 1429–1437, 2019a.
- RIGO, A. A.; CEZARO, A. M. DE; MUENCHEN, D. K.; MARTINAZZO, J.; MANZOLI, A.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C. **Heavy metals detection in river water with cantilever nanobiosensor**. Journal of Environmental Science and Health, Part B, p. 1–11, 4 nov. 2019b.
- RODRIGUES, L. F. **Desenvolvimento de Nanobiossensores Utilizando Cantileveres Inteligentes Para Detecção do Herbicida Mesotriona e do Vírus da Tristeza dos Citros**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2015.
- RODRIGUEZ, B. B.; BOLBOT, J. A.; TOTHILL, I. E. **Development of urease and glutamic dehydrogenase amperometric assay for heavy metals screening in polluted samples**. Biosensors and Bioelectronics, v. 19, n. 10, p. 1157–1167, maio 2004.
- ROSSINI, C. V. T.; MOLINA, C.; CASELI, L. **Immobilization of urease in Langmuir-Blodgett films of di-ureasil hybrid compounds**. Thin Solid Films, v. 670, p. 17–23, jan. 2019.
- SAINI, R. K.; BAGRI, L. P.; BAJPAI, A. K. Smart nanosensors for pesticide detection. In: New Pesticides and Soil Sensors. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 519–559.
- SANG, S.; ZHANG, W.; ZHAO, Y. Review on the Design Art of Biosensors. In: State of the Art in Biosensors - General Aspects. [s.l.] InTech, 2013.
- SANTOS, A. DOS; RIBEIRO, W. C.; BUENO, P. R. **ESTUDO IN SITU DA FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE OURO PARA IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNA**. Eclética Química, v. 39, p. 244–256, 2014.
- 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 (BBA) - Biomembranes, v. 1778, n. 10, p. 2291–2297, out. 2008.

- 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, n. 1–2, p. 87–92, ago. 2010.
- 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, n. 4, p. 464–475, abr. 2007.
- SINCLAIR, J. A.; SCHEIN, A.; WAINWRIGHT, M. E.; PRENCIPE, H. J.; MACDONALD, D. D.; HAINES, M. L.; MEAYS, C. **Ambient Water Quality Guidelines for Cadmium,** 2015.
- SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, J.; CROUCH, S. **Fundamentos da Química Analítica** – Tradução da 8ª. edição norte-americana. 8. ed. 2005.
- SMITH, R. M. **Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques.** *Journal of Chromatography A*, v. 1000, n. 1–2, p. 3–27, jun. 2003.
- SONG, W.; LI, D.-W.; LI, Y.-T.; LI, Y.; LONG, Y.-T. **Disposable biosensor based on graphene oxide conjugated with tyrosinase assembled gold nanoparticles.** *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, n. 7, p. 3181–3186, mar. 2011.
- SOOZANIPOUR, A.; TAHERI-KAFRANI, A. Enzyme Immobilization on Functionalized Graphene Oxide Nanosheets: Efficient and Robust Biocatalysts. In: *Methods in Enzymology*. p. 371–403, 2018.
- 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 CO₂.** *Synthetic Metals*, v. 159, n. 21–22, p. 2329–2332, nov. 2009.
- STEFFENS, C.; LEITE, F. L.; BUENO, C. C.; MANZOLI, A.; HERRMANN, P. S. D. **P. Atomic Force Microscopy as a Tool Applied to Nano/Biosensors.** *Sensors*, v. 12, n. 6, p. 8278–8300, 14 jun. 2012.
- 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, jan. 2014.
- SWIERCZEWSKA, M.; LIU, G.; LEE, S.; CHEN, X. **High-sensitivity nanosensors for biomarker detection.** *Chem. Soc. Rev.*, v. 41, n. 7, p. 2641–2655, 2012.
- TAMAYO, J.; KOSAKA, P. M.; RUZ, J. J.; SAN PAULO, Á.; CALLEJA, M. **Biosensors based on nanomechanical systems.** *Chem. Soc. Rev.*, v. 42, n. 3, p. 1287–1311, 2013.
- ULMAN, A. **Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers.** *Chemical Reviews*, v. 96, n. 4, p. 1533–1554, jan. 1996.
- VELANKI, S.; KELLY, S.; THUNDAT, T.; BLAKE, D. A.; JI, H.-F. **Detection of Cd(II) using antibody-modified microcantilever sensors.** *Ultramicroscopy*, v. 107, n. 12, p. 1123–1128, nov. 2007.

- VELANKI, S.; JI, H.-F. **Detection of feline coronavirus using microcantilever sensors.** Measurement Science and Technology, v. 17, n. 11, p. 2964–2968, 1 nov. 2006.
- VELASCO-GARCIA, M. N.; MOTTRAM, T. **Biosensor Technology addressing Agricultural Problems.** Biosystems Engineering, v. 84, n. 1, p. 1–12, jan. 2003.
- VERMA, R.; DWIVEDI, P. **Heavy metal water pollution- A case study.** Recent Research in Science and Technology, v. 5, n. 2076–5061, p. 98–99, 2013.
- VINODHINI, R.; NARAYANAN, M. **Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp).** International Journal of Environmental Science & Technology, v. 5, n. 2, p. 179–182, 10 mar. 2008.
- 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 herbicides.** Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, v. 62, n. 3, p. 355–360, 2009.
- VOLESKY, B. **Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century.** Hydrometallurgy, v. 59, n. 2–3, p. 203–216, fev. 2001.
- WAHEED, A.; MANSHA, M.; ULLAH, N. **Nanomaterials-based electrochemical detection of heavy metals in water: Current status, challenges and future direction.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 105, p. 37–51, ago. 2018.
- WANG, J.; NIE, S. **Application of atomic force microscopy in microscopic analysis of polysaccharide.** Trends in Food Science & Technology, v. 87, p. 35–46, maio 2019.
- WEI, Y.; GAO, C.; MENG, F.-L.; LI, H.-H.; WANG, L.; LIU, J.-H.; HUANG, X.-J. **SnO₂/Reduced Graphene Oxide Nanocomposite for the Simultaneous Electrochemical Detection of Cadmium(II), Lead(II), Copper(II), and Mercury(II): An Interesting Favorable Mutual Interference.** The Journal of Physical Chemistry C, v. 116, n. 1, p. 1034–1041, 12 jan. 2012.
- WEN, Y.; LI, F. Y.; DONG, X.; ZHANG, J.; XIONG, Q.; CHEN, P. **The Electrical Detection of Lead Ions Using Gold-Nanoparticle- and DNAzyme-Functionalized Graphene Device.** Advanced Healthcare Materials, v. 2, n. 2, p. 271–274, fev. 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality.** 4. ed. 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking water quality 4th edition.** 2017.
- XING, C.; KUANG, H.; HAO, C.; LIU, L.; WANG, L.; XU, C. **A silver enhanced and sensitive strip sensor for Cadmium detection.** Food and Agricultural Immunology, v. 25, n. 2, p. 287–300, 3 abr. 2014.
- XUAN, X.; HOSSAIN, M. F.; PARK, J. Y. **A Fully Integrated and Miniaturized Heavy-metal-detection Sensor Based on Micro-patterned Reduced Graphene Oxide.** Scientific Reports, v. 6, n. 1, p. 33125, 12 dez. 2016.
- YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. DE. **Metais pesados em águas superficiais como**

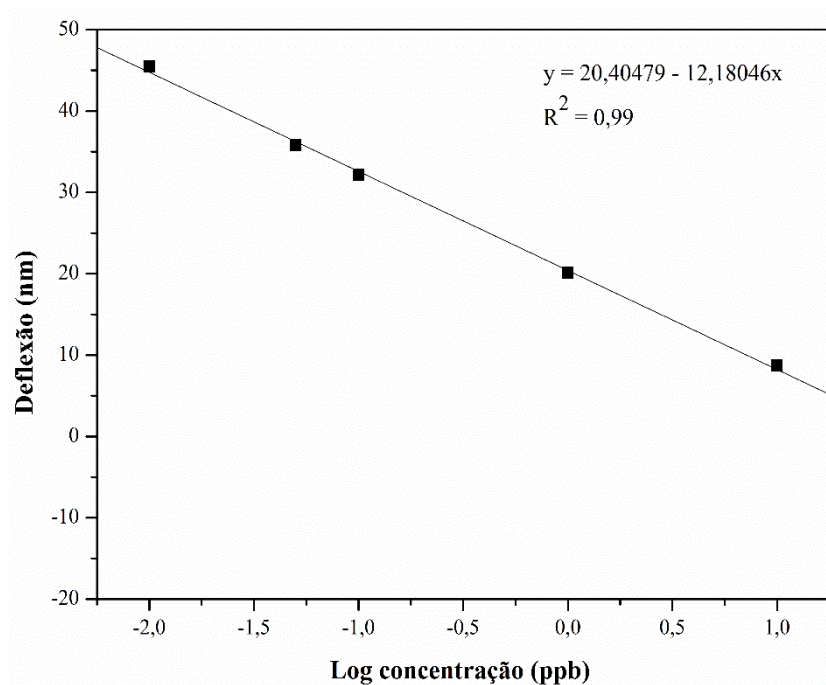
estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. Química Nova, v. 21, n. 5, p. 551–556, 1998.

YANG, L.; LIU, X.; ZHOU, N.; TIAN, Y. **Characteristics of refold acid urease immobilized covalently by graphene oxide-chitosan composite beads.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 127, n. 1, p. 16–22, jan. 2019.

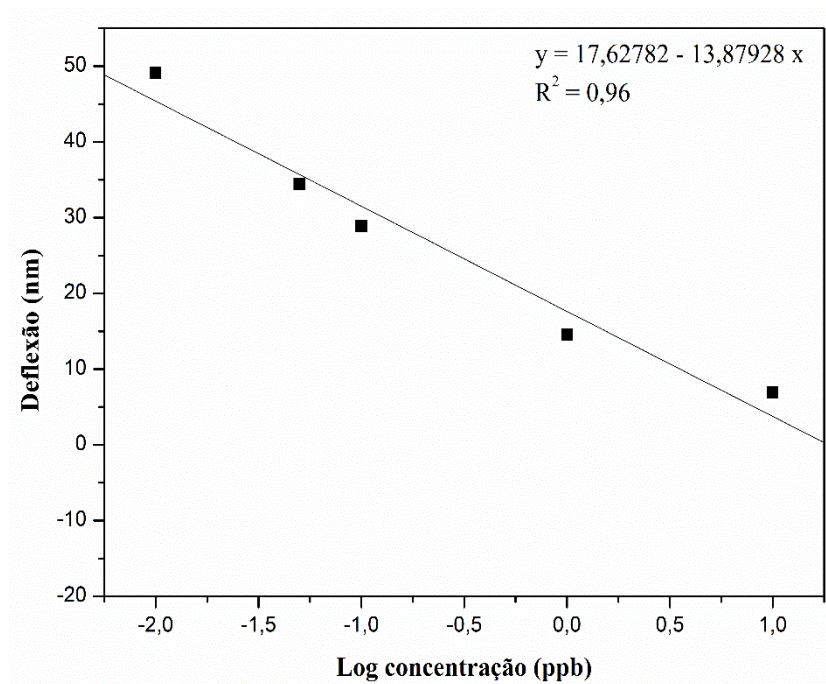
ZHANG, L.; PENG, D.; LIANG, R.-P.; QIU, J.-D. **Graphene-based optical nanosensors for detection of heavy metal ions.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 102, p. 280–289, maio 2018.

APÊNDICES

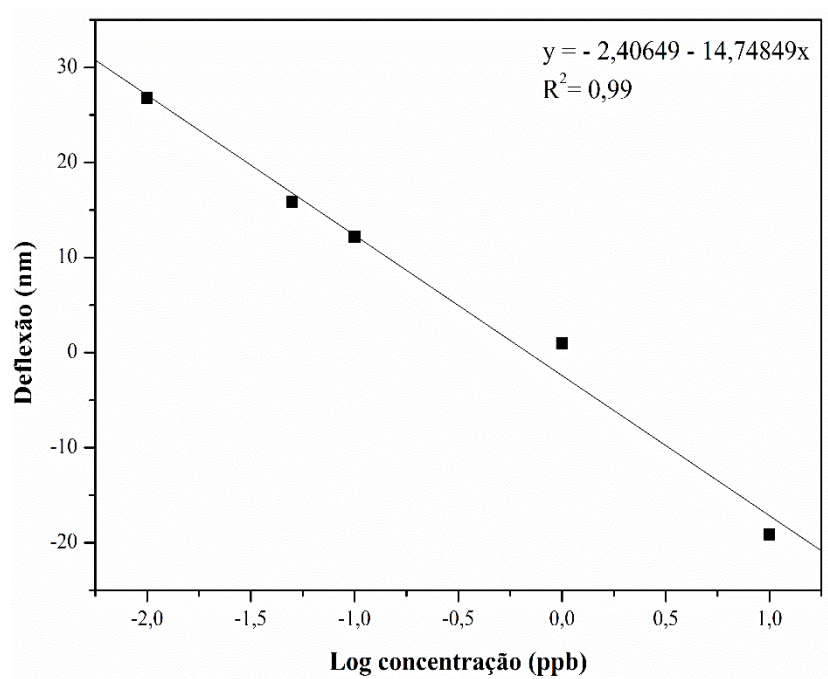
Apêndice 1. Curva de calibração da concentração logarítmica do Cd^{2+} *versus* deflexão, do nanobiossensor funcionalizado com a enzima urease.



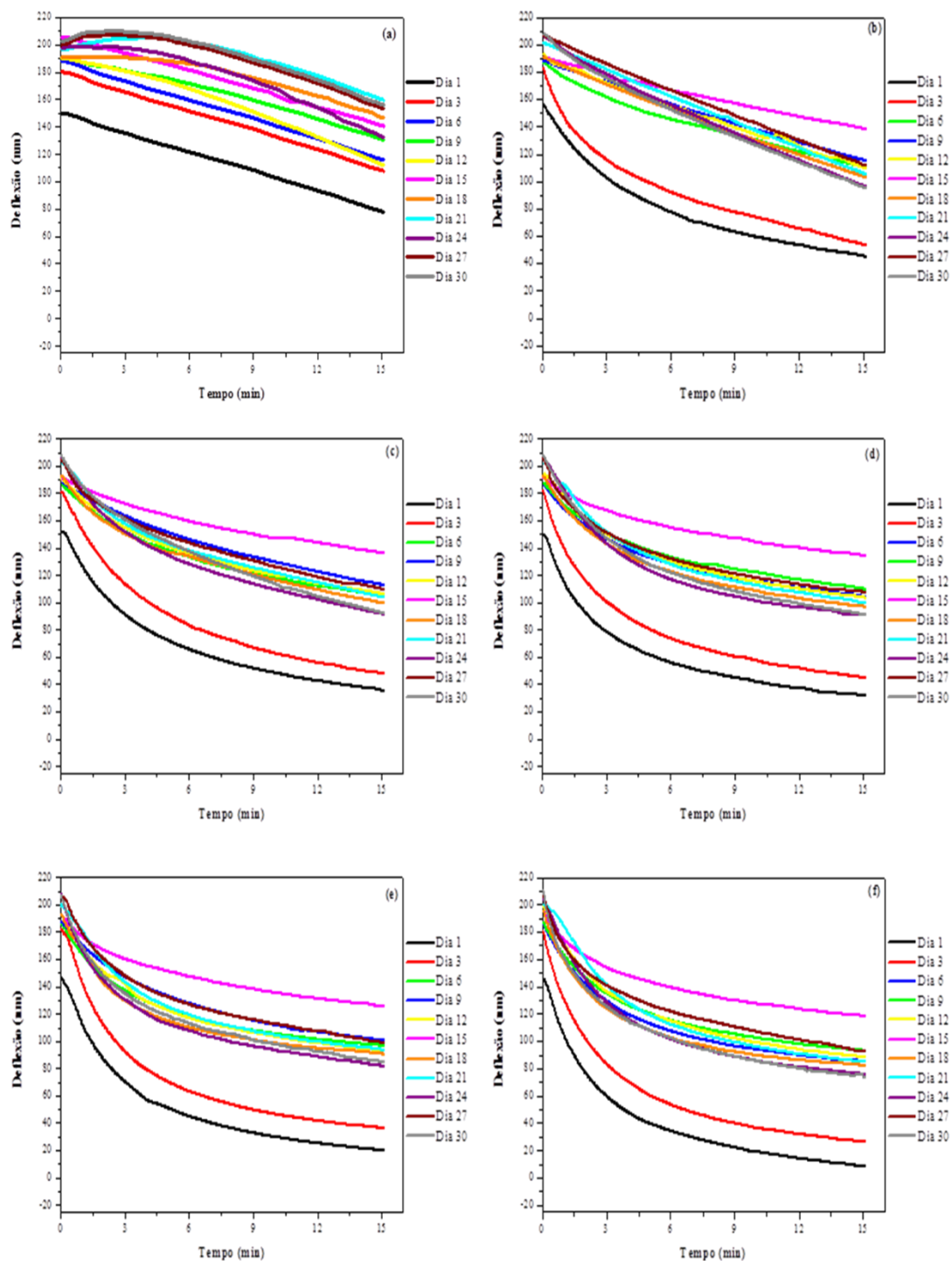
Apêndice 2. Curva de calibração da concentração logarítmica do Cd^{2+} *versus* deflexão, do nanobiossensor funcionalizado com a enzima óxido de grafeno.



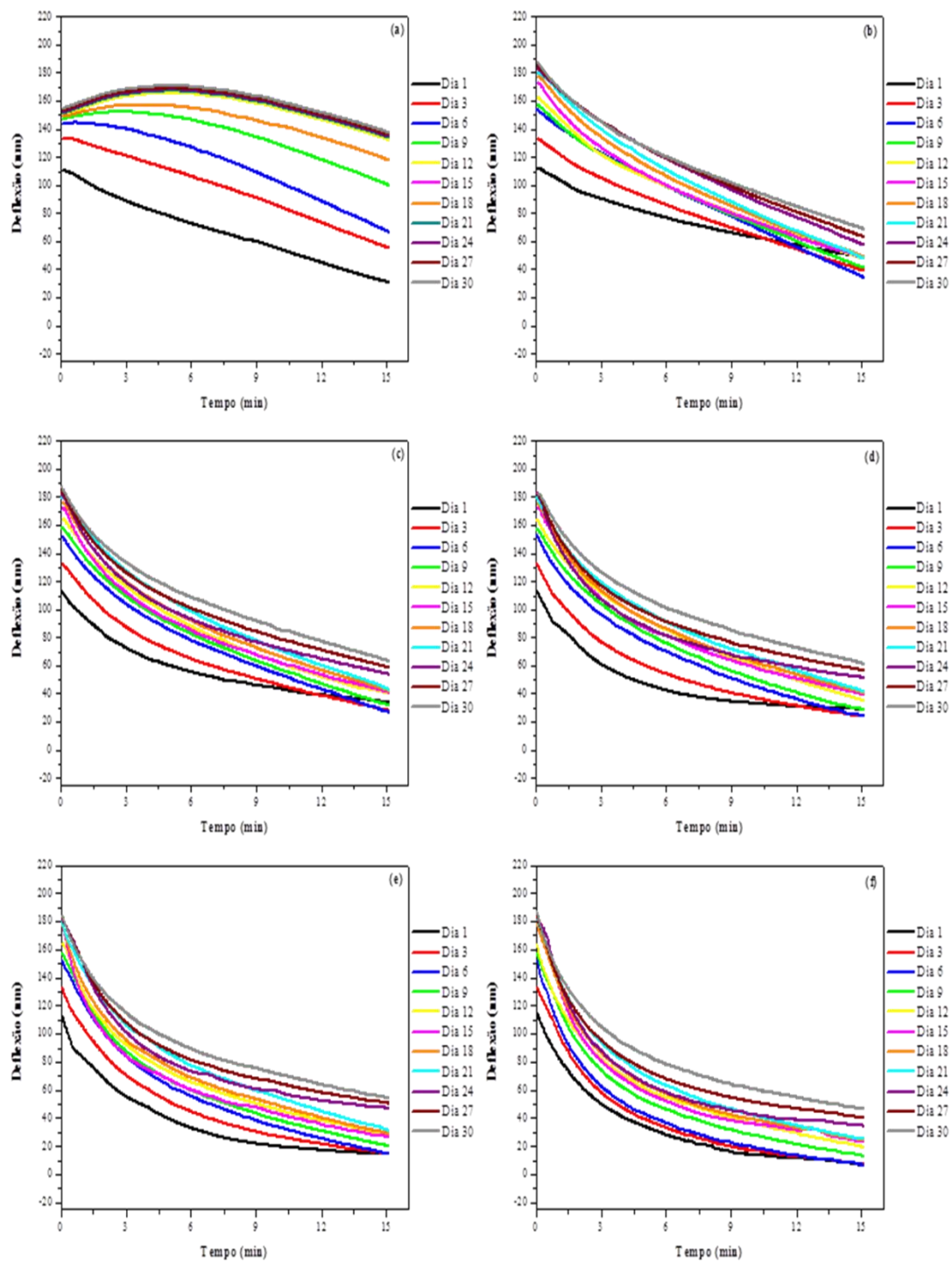
Apêndice 3. Curva de calibração da concentração logarítmica do Cd^{2+} *versus* deflexão, do nanobiossensor funcionalizado com a enzima óxido de grafeno/urease.



Apêndice 4. Resposta do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com urease durante 30 dias de armazenamento em relação a diferentes concentrações de Cd^{2+} em água ultrapura: (a) branco (água ultrapura), (b) 0,01, (c) 0,05, (d) 0,1, (e) 1 e (f) 10 ppb.



Apêndice 5. Resposta do nanossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno durante 30 dias de armazenamento em relação a diferentes concentrações de Cd^{2+} em água ultrapura: (a) branco (água ultrapura), (b) 0,01, (c) 0,05, (d) 0,1, (e) 1 e (f) 10 ppb.



Apêndice 6. Resposta do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno/urease durante 30 dias de armazenamento em relação a diferentes concentrações de Cd^{2+} em água ultrapura: (a) branco (água ultrapura), (b) 0,01, (c) 0,05, (d) 0,1, (e) 1 e (f) 10 ppb.

