

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**USO DE DIFERENTES TIÓIS NO DESENVOLVIMENTO DE
NANOBIOSENSORES DE CANTILEVER PARA DETECÇÃO DE ATRAZINA
EM ÁGUA.**

ENELOSE SCAPIN

Tese de Doutorado

Porto Alegre, julho de 2021.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**USO DE DIFERENTES TIÓIS NO DESENVOLVIMENTO DE
NANOBIOSSENSORES DE CANTILEVER PARA DETECÇÃO DE ATRAZINA
EM ÁGUA.**

Enelise Scapin

Tese de doutorado realizada sob a orientação da Prof.^a Dr.^a. Rosângela Assis Jacques, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, julho de 2021.

CIP - Catalogação na Publicação

Scapin, Enelise

Uso de diferentes tióis no desenvolvimento de nanobiossensores de cantilever para detecção de atrazina em água / Enelise Scapin. -- 2021.

95 f.

Orientadora: Rosângela Assis Jacques.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Atrazina . 2. Nanobiossensores. 3. Cantilever. 4. Enzima tirosinase. 5. Funcionalização. I. Jacques, Rosângela Assis, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico todo meu estudo e conquista realizada a família
e em especial minha filha, Helena.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial em primeiro lugar é a Deus, sem ele não teria força, coragem, paciência para guiar meus estudos e minha vida. Agradeço a mãe, rainha e vencedora três vezes admirável de Schoenstatt por toda sua proteção.

Agradeço meus pais por todo apoio e dedicação desde pequena para que pudesse estudar mesmo com tantas dificuldades. Obrigada pai e mãe por todo ensinamento, por mostrar sempre o caminho certo e que o carácter é acima de tudo. Não se conquista nada passando por cima dos outros. Não somos ninguém sem o amor ao próximo. Obrigada a minha irmã Elisandra que apesar da distância manteve-se sempre muito presente nas minhas escolhas me apoiando, me fortalecendo.

Obrigada ao meu maior amor, minha filha Helena. Obrigada por me fortalecer todos os dias, pela companhia, pelo teu amor gigante. Obrigada pela paciência infinita. Te amo infinitamente. Obrigada ao meu companheiro, esposo, por exatamente tudo. Pelo teu amor, tua paciência, teu incentivo, pelas palavras, por estar ao meu lado.

À minha vó Graciosa Stefanello Scapin, pelo amparo, por ser modelo de vida e de amor e ao meu avô Vitorino Scapin (*in memoriam*), pela sua simplicidade, alegria, simpatia força me fez sempre acreditar que podemos superar momentos difíceis. Onde quer que você esteja sei que olhas, protege e torces por mim.

Aos amigos do Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica - LAAO por todo apoio e amizade. À Prof^a. Dra. Elina Bastos Caramão e Cláudia Alcaraz Zini pela atenção e colaboração.

À Prof^a. Dra. Rosângela Jacques por me acolher no laboratório e confiar em mim, pela sua orientação, respeito e pelos seus ensinamentos que levarei para vida toda.

Agradeço ao Allan, colega e amigo pela grande ajuda. Agradeço a todos os colegas e amigos do grupo de pesquisa LAAO que de uma forma ou de outra contribuíram diariamente para o andamento do meu trabalho.

Aos meus amigos, que sempre se fazem presente. Agradecimento especial à professora Clarice pelo acolhimento, dedicação, incentivo e sabedoria. Agradecimento as colegas e amigas Janine Martinazzo e Sandra Ballen pelos conhecimentos, ensinamentos e apoio em tudo que sempre precisei na minha trajetória em Erechim. Aproveito para agradecer à toda equipe do Laboratório de Precisão Analítica, Processos de Separação/

Termodinâmica e de instrumentação Analítica, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das missões – Campus Erechim. À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais pela contribuição à minha formação. Aos professores membros da Banca de Avaliação deste trabalho por aceitarem o convite e suas valiosas contribuições. À CAPES pelo financiamento da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. AGROTÓXICOS E O MEIO AMBIENTE	20
2.1.1. Atrazina	22
2.2. DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS	24
2.2.1. Nanotecnologia: Biossensores e Nanobiossensores	24
2.2.2. Biossensores enzimáticos	25
2.2.3. Enzima Tirosinase	25
2.2.4. Nanobiossensores de Cantileveres	27
2.2.4.1. Funcionalização dos nanobiossensores de cantilevers	28
2.2.4.2. Modo de Operação- Resposta dos biossensores de cantilever	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. MATERIAIS	35
3.2. MÉTODOS	37
3.2.1. Cantileveres	37
3.2.2. Funcionalização dos Cantileveres pela Técnica de Camadas Automontadas (SAM)	38
3.2.3. Medida Atividade Enzimática	40
3.2.4. Medida de Deflexão do Nanobiossensor de Cantilever	41
3.2.5. Avaliação da Resposta do Nanobiossensor de Cantilever na Detecção de Atrazina em Água	41
3.2.6. Caracterização das Respostas dos Nanobiossensores de Cantilever	43
3.2.7. Avaliação do Nanobiossensores de Cantilevers em Amostra Real de Pesticida para Aplicação no Campo	45
3.2.8. Análise de interferentes dos nanobiossensores de cantilvers funcionalizados	46
3.2.9. Caracterização da Superfície dos Nanobiossensores de Cantileveres	47
3.2.9.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)	47
3.2.9.2. Microscopia de força atômica (AFM)	47
3.2.9.3. Espectros de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS)	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49

4.1. FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOBIOSENSORES DE CANTILEVER	49
4.1.1. Imobilização da Enzima Tirosinase.....	49
4.2. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO NANOBIOSENSOR DE CANTILEVER NA DETECÇÃO DE ATRAZINA EM ÁGUA FUNCIONALIZADO COM ENZIMA TIROSINASE COMERCIAL E OS ÁCIDOS 16-AMHD E O 11-AMHD.	50
4.2.1. Sensitividade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação.	53
4.2.2. Resposta de Reversibilidade dos Nanobiossensores de Cantilever	54
4.2.3. Resposta da Estabilidade dos Nanobiossensores de Cantilever	56
4.2.4. Resposta da Avaliação dos Nanobiossensores de Cantilevers em Amostra Real de Pesticida para Aplicação no Campo.	60
4.2.5. Análise de interferentes nos nanobiossensores de cantilevers funcionalizados	63
4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DOS NANOBIOSENSORES DE CANTILEVERS	66
4.3.1. Morfologia	66
4.3.2. Topografia e Rugosidade	69
4.3.3. Espessura	73
4.3.4. Grupos Funcionais- Espectros de Absorção de Reflexão por Infravermelho Modulada por Polarização (PM-IRRAS).....	74
5. CONCLUSÃO	77
6. REFERÊNCIAS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura Química da Atrazina.	22
Figura 2: Estrutura da Enzima Tirosinase com seus dois átomos de Cu (II).	26
Figura 3: Esquema das Reações Catalisadas pela Tirosinase.	26
Figura 4: Representação da Técnica de Monocamadas Automontadas (SAM).....	29
Figura 5: Reação de Reticulação mediada por EDC (a) e EDC/NHS (b).....	30
Figura 6: Modos de Operação de Sensores de Cantilever: Modo Estático e Modo Dinâmico.	31
Figura 7: Localização geográfica da coleta de amostra real de pesticidas.	36
Figura 8: Esquema das etapas do desenvolvimento dos nanobiossensores de cantilevers usados no presente estudo, suas aplicações e caracterizações.....	37
Figura 9: Especificações do Cantilever utilizado.....	38
Figura 10: Solução de atrazina em contato com o cantilever.....	42
Figura 11: Sistema de resfriamento do equipamento de microscopia de força atômica desenvolvido para controle de temperatura e minimização de ruídos.....	43
Figura 12: Preparo da amostra real de pesticida e aplicação em lavoura.....	46
Figura 13: Resposta do nanobiossensor funcionalizado com a enzima tirosinase comercial e o ácido 16-AMHD em função do tempo á diferentes concentrações de solução de atrazina.....	51
Figura 14: Resposta do nanobiossensor funcionalizado com a enzima tirosinase comercial e o ácido 11-MUA em função do tempo á diferentes concentrações de solução de atrazina.....	52
Figura 15: Reversibilidade dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com a enzima tirosinase comercial e o ácido 16-AMHD avaliados em 3 ciclos, usando a água ultrapura (branco) e concentração de solução de atrazina 10 ppb	55
Figura 16: Reversibilidade dos nanobiossensores de cantileveres funcionalizados com a enzima tirosinase comercial e o ácido 11-MUA avaliados em 3 ciclos, usando água ultrapura (branco) e a concentração de solução atrazina 10 ppb	55
Figura 17: Estabilidade do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase comercial e o ácido 16-AMHD.	56
Figura 18: Estabilidade do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase comercial e o ácido 11-MUA.....	57

Figura 19: Estabilidade do nanobiossensor de cantilever funcionalizados com a enzima tirosinase comercial e o ácido 16-AMHD em um intervalo de sete dias.	58
Figura 20: Estabilidade do nanobiossensor de cantilever funcionalizados com a enzima tirosinase comercial e o ácido 11-MUA em um intervalo de sete dias.	58
Figura 21: Perda de sensibilidade (%) dos nanobiossensores de cantileveres funcionalizados com enzima tirosinase e diferentes tióis durante 7 dias de armazenamento.....	59
Figura 22: Resposta da avaliação do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com enzima tirosinase e ácido 16-AMHD para atrazina em amostra real de pesticida para aplicação em campo.....	61
Figura 23: Resposta da avaliação do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com enzima tirosinase e ácido 11-MUA para atrazina em amostra real de pesticida para aplicação em campo.....	61
Figura 24: Resposta da análise de interferentes do nanobiossensor de cantiliver funcionalizado com enzima tirosinase e ácido 16-AMHD.....	64
Figura 25: Resposta da análise de interferentes do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com enzima tirosinase e ácido 11-MUA.....	65
Figura 26: Micrografias das superfícies do cantileveres durante as etapas de construção dos nanobiossensores funcionalizados com enzima tirosinase comercial e os ácidos 16—AMHD e 11-MUA: (a) Silício (sem funcionalização), (b) deposição das camadas de Ouro, (c) placa de silício + ouro + ácido 16—AMHD (tiol 16), (d) placa de silício + ouro + ácido 11-MUA (tiol 11), (e) placa de silício + ouro + ácido 16—AMHD (tiol 16) + EDC/NHS, (f) placa de silício + ouro + ácido 11—AMHD (tiol 16) + EDC/NHS, (g) placa de silício + ouro + ácido 16—AMHD (tiol 16) + EDC/NHS + enzima, (h) placa de silício + ouro + ácido 11—MUA (tiol 11) + EDC/NHS + enzima.	67
Figura 27: Imagens de AFM, em 3D, da superfície do cantilever durante as etapas de funcionalização. (a) Silício (sem funcionalização), (b) deposição das camadas de Ouro, (c) placa de silício + ouro + ácido 16—AMHD (tiol 16), (d) placa de silício + ouro + ácido 16—AMHD (tiol 16) + EDC/NHS, (e) placa de silício + ouro + ácido 11-MUA (tiol 11), (f) placa de silício + ouro + ácido 11—MUA (tiol 11) + EDC/NHS, (g) placa de silício + ouro + ácido 11—MUA (tiol 11) + EDC/NHS + enzima, (h) placa de silício + ouro + ácido 16—AMHD (tiol 16) + EDC/NHS + enzima.....	70

Figura 28: (a) espectro de PM-IRRAS para monocamada de tiol 11-MUA/tirosinase, (b) monocamada de tiol 16-AMHD/ tirosinase..... 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos Agrotóxicos	21
Tabela 2: Propriedades Físicas e Químicas da Atrazina. ³⁷	23
Tabela 3: Valores de atividade enzimática relacionada a enzima tirosinase pura, Enzima tirosinase + ácido 16-AMHD e Enzima tirosinase + ácido 11-MUA.	50
Tabela 4: Sensitividade, Valores de limite de detecção (LD), Coeficiente de Correlação (R^2) e Limite de Quantificação (LQ) dos nanobiossensores de cantileveres funcionalizados com a enzima tirosinase os ácidos 16-AMHD e o 11-MUA.....	53
Tabela 5: A recuperação de nanobiossensores de cantileveres revestidos com tiol 11-MUA e tiol 16-AMHD em amostras reais de água (n = 3).	63
Tabela 6: Valores da raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) das superfícies em cada etapa de construção dos nanobiossensores funcionalizados com os ácidos 11-MUA e 16-AMHD.....	72
Tabela 7: Valores de espessura para nanobiossensores de cantilever funcionalizados com diferentes tióis e enzima tirosinase comercial.	73
Tabela 8: Atribuições de bandas PM-IRRAS para camadas de tiol/tirosinase.	75

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1: Curva de calibração da concentração logarítmica de atrazina *versus* deflexão do nanobiossensor funcionalizado com ácido 11-mercaptoundecanóico a enzima tirosinase comercial 95

Apêndice 2: Curva de calibração da concentração logarítmica de atrazina *versus* deflexão, do nanobiossensor funcionalizado com ácido 16-mercaptohexadecanóico e a enzima tirosinase comercial..... 95

ABREVIATURAS

Ácido 16- AMHD - ácido 16-mercaptohexadecanóico

Ácido 11-MUA-ácido 11-mercaptoundecanóico

AFM- microscopia de força atômica

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CSDE- enzimas atomizadas reticuladas

FAO- Food and Agriculture Organization

GC-cromatografia gasosa

GHS- Sistema Global de Classificação Harmonizado

HPLC-cromatografia líquida de alta eficiência

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LD - Limite de detecção

LQ - Limite de quantificação

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

ONU- Programa da Organização das Nações Unidas

PM-IRRAS- Espectros de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização

SAM - Monocamadas auto-montadas do (*Self-Assembled Monolayers*)

Tiol - Ácido 16-mercaptohexadecanóico e ácido 11-mercaptoundecanóico

RESUMO

A atrazina (2-cloro-4-(etilamino) -6-(isopropilamino)-s-triazina), é um herbicida representada por um anel triazínico substituído com cloro, etilamina e isopropilamina, o que a torna recalcitrante para a degradação biológica no ambiente. Por ser amplamente na agricultura, principalmente no controle de plantas daninhas em lavouras de milho que acaba permanecendo por muito tempo no meio ambiente e torna-se um dos fatores responsáveis pela contaminação do solo, do ar e das águas.

Novos métodos de detecção mais econômicos, com menor tempo de análise e eficazes tem sido estudado para melhorar a detecção deste analitos e minimizar este problema. A área de nanotecnologia vem apresentado grandes avanços, como o desenvolvimento de nanobiossensores de cantilever através de camadas sensoras, para detecção da presença de herbicidas em água. Baseado nestes fatos, este estudo tem como objetivo o desenvolvimento de nanobiossensores de cantileveres funcionalizados com enzima tirosinase comercial e diferentes tióis para detecção de atrazina em água.

A funcionalização dos mesmos foi realizada utilizando a técnica de camadas automontadas (SAM) sobre a superfície de silício contendo ouro, ácido 16-mercaptohexadecanóico (16-AMHD) e ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC)/N-hidroxi-succinimida (NHS) e enzima tirosinase comercial. A avaliação da estabilidade da enzima mostrou a adequação da funcionalização de ambos os nanobiossensores de cantilevers, principalmente quando utilizado o ácido 11-MUA. Por meio da composição química, morfologia, espessura, rugosidade, topografia das superfícies foi possível confirmar a funcionalização dos nanobiossensores de cantilevers funcionalizados pela técnica de SAM, sendo possível verificar que ocorreu a deposição da camada sensora.

Os nanobiossensores de cantileveres foram capazes de detectar diferentes concentrações de atrazina em água, obtendo alta sensibilidade, limites de detecção e de quantificação na ordem de ppb, além de serem 100% reversíveis, porém sua estabilidade foi afetada pelo armazenamento. Ambos nanobiossensores de cantileveres demonstraram boa resposta, mas quando utilizado o ácido (11-MUA) o mesmo se mostrou mais eficiente por possuir maior sensibilidade, menor limite de detecção, maior estabilidade até aproximadamente 20 dias quando comparado com o nanobiossensor usando o ácido 16-

AMHD tanto para água ultrapura quanto para amostra real de pesticida (poço artesiano) analisada. Quando avaliada a seletividade de ambos nanobiossensores pode-se observar que tanto o interferente teflubenzurom quanto o sulfentrazone não causaram influência na resposta do nanobiossensores pois, o seu comportamento foi semelhante ao branco (água ultrapura). Porém o nanobiossensor de cantilever utilizando ácido 11-MUA apresentou maior diferença de deflexão entre branco e a atrazina, demonstrando sua maior eficaz para o pesticida atrazina.

Com os resultados obtidos é possível observar a eficaz do método SAM utilizando um tiol de cadeia alquílica menor (ácido 11-MUA) quando comparado ao ácido 16-AMHD para aplicação nos nanobiossensores de cantilever sendo então, uma boa alternativa aos métodos convencionais de detecção de atrazina em amostras reais. Sendo assim, os dispositivos desenvolvidos demonstram ter grande potencialidade de aplicação para detecção de atrazina em águas.

Palavras-chave: Nanobiossensor de cantilever, ácido 16-mercaptohexadecanóico, tirosinase, ácido 11-mercaptoundecanóico, atrazina.

ABSTRACT

Atrazine (2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine), is a herbicide represented by a triazine ring substituted with chlorine, ethylamine and isopropylamine, which makes it recalcitrant to biological degradation in the environment. Because it is widely used in agriculture, especially to control weeds in corn fields, it ends up remaining for a long time in the environment and becomes one of the factors responsible for the contamination of the soil, air, and water.

New methods of detection that are more economical, less time consuming, and effective have been studied to improve the detection of these analytes and minimize this problem. The nanotechnology area has presented great advances, such as the development of cantilevered nanobiosensors through sensor layers, to detect the presence of herbicides in water. Based on these facts, this study aims to develop cantilever nanobiosensors functionalized with commercial tyrosinase enzyme and different thiols for detection of atrazine in water.

Their functionalization was performed using the self-assembled layer technique (SAM) on silicon surface containing gold, 16-mercaptohexadecanoic acid (16-AMHD) and 11-mercaptoundecanoic acid (11-MUA), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)/N-hydroxy-succinimide (NHS) and commercial tyrosinase enzyme. Evaluation of enzyme stability showed the suitability of functionalization of both cantilever nanobiosensors, especially when 11-MUA acid was used. Through the chemical composition, morphology, thickness, roughness, topography of the surfaces it was possible to confirm the functionalization of the cantilevers nanobiosensors functionalized by the SAM technique, being possible to verify that the deposition of the sensing layer occurred.

The cantilever nanobiosensors were able to detect different concentrations of atrazine in water, obtaining high sensitivity, detection and quantification limits in the order of ppb, besides being 100% reversible, but their stability was affected by storage. Both cantilever biosensors showed good response, but when the acid (11-MUA) was used it was more efficient because it had higher sensitivity, lower detection limit, higher stability up to approximately 20 days when compared to the biosensor using the 16-AMHD acid for both ultrapure water and real sample of pesticide (artesian well) analyzed.

When evaluating the selectivity of both nanobiosensors it can be observed that both teflubenzuron and sulfentrazone interferents did not influence the response of the nanobiosensors because their behavior was similar to the blank (ultrapure water). However, the cantilever nanobiosensor using 11-MUA acid showed a greater difference in deflection between white and atrazine, demonstrating its greater effectiveness for the pesticide atrazine.

With the results obtained it is possible to observe the effectiveness of the SAM method using a smaller alkyl chain thiol (11-MUA acid) when compared to the 16-AMHD acid for application in cantilever nanobiosensors being then, a good alternative to conventional methods for detection of atrazine in real samples. Thus, the developed devices demonstrate a great potential application for atrazine detection in water.

Keywords: Nanobiosensor, 11-mercaptohaxadecanoic acid, Tyrosinase, 11-mercaptopundecanoic acid, Atrazine.

1. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de pesticidas no meio agrícola para o controle de plantas daninhas, são também conhecidos como poluentes persistentes (POP), por permanecerem muito tempo no meio ambiente, contaminando solo, ar e o meio aquático. Muitas vezes por não serem eliminados em tratamentos convencionais de água potável, geram grande preocupação pois, afetam a qualidade das águas superficiais, tornando-a inadequada para o consumo humano, afetando a saúde das pessoas e dos animais.¹

Dentre os (POP) mais utilizados podemos citar a atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina), pertencente a classe dos herbicidas triazínicos, que é muito utilizada na cultura de milho, cana-de-açúcar e sorgo para controle de ervas daninhas. Por não ser adsorvida substancialmente ao solo, pode ser encontrada acima dos níveis toleráveis pelas agências de controle ambiental em águas superficiais e lençóis freáticos.²⁻⁴

A detecção da presença de atrazina em águas pode ser realizada por meio de técnicas convencionais como a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada espectrometria de massa (HPLC-MS).^{5,6}

Além destas técnicas analíticas, sensores e biosensores tem sido desenvolvimentos para o monitoramento ambiental por apresentar uma detecção mais rápida, menores quantidades de amostras, alto limite de detecção para baixas concentrações por meio do uso de camada sensoras biológicas.^{7,8} Com a miniaturização os nanossensores e nanobiosensores apresentam como vantagem a detecção de substâncias na micro e nanoescala.⁹ Os nanobiosensores de cantileveres são assim chamados por serem baseados em uma haste ultra-sensível, originadas da microscopia de força atômica (AFM - do inglês Atomic Force Microscope). Assim, os nanobiosensores de cantileveres são dispositivos ideais para a detecção de contaminantes ambientais como substâncias químicas, toxinas, poluentes e analitos em geral em micro e nanoescala.¹⁰ Através da interação química do cantilever e a amostra de interesse pode-se medir e mapear a informação química da superfície e quantificar as forças repulsivas e atrativas associadas a materiais inorgânicos e amostras biológicas. Para que sua eficiência na detecção seja extremamente sensível, os mesmos precisam ser recobertos com uma camada sensora (célula, antígeno e anticorpo, enzima, proteínas) específica, capaz de identificar e reconhecer as moléculas de interesse. As enzimas são consideradas mais

promissoras devido à rápida resposta, alta estabilidade e biocompatibilidade. Dentre as quais podem se destacar a tirosinase, pois é inibida na presença da atrazina.¹¹

A deposição de camada sensora chamada de funcionalização consiste em ligar quimicamente a superfície do cantilever a uma camada de moléculas, onde os grupos funcionais reajam com o material biológico, assim imobilizando-o na superfície.¹² A técnica de monocamadas automontadas (SAM - do inglês Self-Assembled Monolayers) é caracterizada pela formação espontânea de camadas ordenadas e organizadas sobre uma superfície sólida. Sendo muito utilizada para a funcionalização em cantileveres¹² a automontagem da monocamada se dá por meio de um grupo funcional (enxofre) que se liga a superfície metálica 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.^{13,14} Este processo todo ocorre em duas etapas: a primeira, mais rápida, onde a molécula de tiol se liga na superfície metálica, e a segunda, durando horas, que está relacionada ao processo organizacional da monocamada.^{15,16}

Os tióis são utilizados por possuírem uma forte afinidade com os metais de transição, interagindo fortemente com as superfícies de ouro para formar monocamadas estáveis e automontadas.¹⁷ Os tióis de cadeia alquila longa, $HS - (CH_2)_n - R$ mas, com comprimentos de cadeia $n \geq 10$, tendem a formar uma camada compacta, altamente ordenada, estável¹⁸ e assim aumentando a estabilidade de SAMs.

Após a funcionalização, a resposta dos nanobiossensores de cantileveres é avaliada através da curvatura do cantilever (deflexão) causada pela adsorção da molécula alvo de interesse no cantilever.^{19,20}

Neste contexto este estudo tem como objetivo o desenvolvimento de nanobiossensores de cantileveres funcionalizados com diferentes tióis (ácido 16-AMHDo e ácido 11-MUA) utilizando como elemento de reconhecimento biológico a enzima tirosinase comercial assim como realizar a caracterização da superfície dos nanobiossensores de cantileveres durante cada etapa de funcionalização pela técnica SAM, avaliar a resposta dos dispositivos diante de diferentes concentrações do pesticida atrazina em amostras reais de água, bem como avaliar a seletividade dos nanobiossensores de cantiliveres funcionalizados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. AGROTÓXICOS E O MEIO AMBIENTE

Os agrotóxicos são definidos de acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO), Programa da Organização das Nações Unidas (ONU), como qualquer substância, ou mistura de substâncias, usadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga. Incluindo vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas ou animais, causadoras de danos durante a produção ou interferindo na mesma, no processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e derivados, ou que seja administrada para o controle de insetos, aracnídeos e outras pestes que atacam os corpos de animais de criação.²¹

Amplamente utilizados nas lavouras de arroz, soja, milho, feijão e na produção da maioria dos alimentos que fazem parte do nosso dia a dia, os agrotóxicos se tornaram indispensáveis neste meio por aumentarem o rendimento na produção. Contudo devido a sua permanência no ambiente podem contaminar e poluir o solo, a água e até mesmo o ar. Estudos descrevem um aumento do número de pessoas contaminadas e o alto risco de doenças graves, podendo levar a morte.²² Os pesticidas prejudicam a saúde humana devido a sua alta toxicidade causando reações adversas e afetando principalmente o sistema neural, endócrino e imunológico.^{23,24}

Segundo pesquisa da revista Galileu, os valores apresentados através do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) sobre a comercialização de agrotóxicos no Brasil são assustadores, somente em 2013 foram 495,7 mil toneladas de pesticidas vendidos, em 2017 o número chegou a 539,9 mil toneladas. Pesquisas mais recentes ainda não foram divulgados, mas acredita-se ter aumentado ainda mais pois, o segmento de insumos foi o único do PIB do agronegócio brasileiro a apresentar alta no primeiro bimestre deste ano (2019), mantendo a tendência observada em 2018.²⁵

Os agrotóxicos são classificados por classe, de acordo com a praga a que eles se destinam, a sua estrutura química e modo de ação. Hoje no Brasil a toxicidade destes agrotóxicos está classificada de acordo com o que eles provocam de reações nos seres humanos como, leve irritação nos olhos, na pele, náusea, desconforto abdominal podendo ser extremamente tóxico (classe I), altamente tóxico (classe II), moderadamente tóxico

(classe III) e pouco tóxico (classe IV). Estudos de mortalidade e toxicidade aguda ainda não serão utilizados para determinar a toxicidade dos agrotóxicos.²⁶

Dentre os agrotóxicos, a classe dos pesticidas, são os mais encontrados em meios aquáticos influenciando a qualidade das águas superficiais e subterrâneas, que são uma das principais fontes de águas potáveis.²⁷ Grande maioria dos pesticidas não são adsorvidos ao solo, sendo frequentemente encontrados acima dos níveis toleráveis pelas agências de controle ambiental em águas superficiais e lençóis freáticos.⁴

As variedades de agrotóxicos são classificadas de acordo com três abordagens: no modo de ação; pragas que combatem e; grupo químico a que pertencem **Tabela 1**.²⁸

Tabela 1: Classificação dos Agrotóxicos

Classificação dos agrotóxicos	Definição
1º) Modo de ação	
Sistemático	Entram no sistema vascular da planta
Não sistemático	Não entram no sistema, afetando local de contato
2º) Estrutura Química	
Carbamatos	Chamados de Uretanos, são compostos orgânicos derivados do ácido carbâmico
Piretróides	Composto químico sintético similar às substâncias naturais piretrinas produzidas pelas flores do "gênero" Pyrethrum.
Organofosforados	Composto orgânico degradável contendo ligações carbono-fósforo.
Organoclorados	Composto orgânico contendo ao menos um átomo de cloro ligado covalentemente.
Triazinas	Grupo de compostos orgânicos (C ₃ H ₃ N ₃). Cada um contém um anel benzênico no qual três dos fragmentos C-H tenham sido substituídos por nitrogênio isolobal. Existem três isômeros: 1,2,3-triazina.
3º) pragas que combatem	
Herbicidas	Controle de plantas daninhas
Fungicidas	Controle de fungos
Inseticidas	Controle de insetos

Pertencente a classe dos pesticidas, os herbicidas triazínicos como a atrazina, ametrina e simazina são muito utilizados na agricultura para proteger colheitas de ervas daninhas de folha larga indesejáveis inibindo a fotossíntese e devido a sua alta toxicidade e acúmulo no meio ambiente por muitos anos precisam ser monitorados.^{29,30}

2.1.1. Atrazina

A atrazina (2-cloro-4-(etilamino) -6-(isopropilamino) -s-triazina), é representada por um anel triazínico substituído com cloro, etilamina e isopropilamina (**Figura 1**), o que a torna recalcitrante para a degradação biológica no ambiente. É utilizada principalmente para o controle de plantas daninhas de lavouras de milho, sendo o segundo herbicida de mais utilização no Brasil.^{2,31,32}

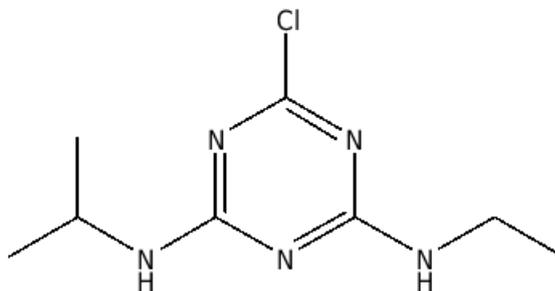


Figura 1: Estrutura Química da Atrazina.^{2,31,32}

A meia vida da atrazina depende muito das características do ambiente, podendo variar de vinte a mais de cem dias, o que a torna um potencial contaminante ambiental.^{33–35} Dentre as variadas propriedades (**Tabela 2**) deste herbicida uma delas é a baixa solubilidade em água (33 mg.L⁻¹), baixa volatilidade, alto potencial de escoamento, hidrólise lenta e baixa pressão de vapor.^{33,36}

Tabela 2: Propriedades Físicas e Químicas da Atrazina.³⁷

Propriedades	Informação
Peso molecular	215,69 g.mol ⁻¹
Densidade	1,187 g/cm ³ a 20 °C
Volatilidade (pressão de vapor)	0,04 mPa a 20 °C
Solubilidade em água	33 mg.L ⁻¹
Ponto de fusão	175-177 °C
Coefficiente de partição octanol-água (log Kow)	2,61

Classificada pela ANVISA como classe III de toxicidade (na qual se enquadram os compostos medianamente tóxicos) a atrazina pode possuir toxicidade crônica sobretudo nos sistemas hormonal e reprodutor.^{38,39} Segundo estudo norte-americano a atrazina é um disruptor endócrino, o que pode causar a feminização dos machos sapos-com-garras-africanos, diminuindo suas glândulas reprodutoras.⁴⁰

Para um maior controle da disseminação deste agrotóxico no meio ambiente e uma melhora na saúde humana no Brasil o ministério da saúde permite um valor máximo para o composto em água potável de 2 µg/L⁴¹ e a Organização Mundial da Saúde (OMS) determina o valor limite de 100 µg/L, correspondente à soma de atrazina e seus metabólitos cloro-s-triazinas.⁴²

Alguns países têm estabelecido o limite da concentração máxima de atrazina na água potável um pouco diferente, como é o caso dos Estados Unidos que permite 3,0 µg/L de atrazina/ água potável.⁴³ A Comunidade Européia estipula que a concentração não possa exceder 0,1 µg/L.⁴⁴ De acordo com a Norma de Qualidade Ambiental da Água Superficial (GB3838-2002) na China, a concentração máxima permitida de atrazina nas águas superficiais é de 3,0 µg/L, e para abastecimento urbano de água a concentração limitada de atrazina é de 2,0 µg/L.⁴⁵

Devido ao alto consumo de resíduos de pesticidas e com os problemas associados à saúde humana e meio ambiente tornou-se importante e necessário buscar novos métodos de detecção de atrazina que sejam eficientes principalmente para baixas concentrações.^{1,5} Além das técnicas analíticas convencionais utilizadas como a cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massa e teste ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), os sensores ganharam importância por

apresentarem , maior sensibilidade e precisão, fácil utilização, possibilidade de portabilidade e miniaturização para a identificação de resíduos de pesticidas em amostras diversas.^{6,46,47}

2.2. DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

2.2.1. Nanotecnologia: Biossensores e Nanobiossensores

Ao medir, manipular, produzir a nível atômico, molecular e supramolecular a produção de materiais, está relacionado á nanotecnologia. Esta tecnologia falamos permite a construção de estruturas e novos materiais a partir dos átomos,^{48,49} sendo o nanômetro (nm) definido como a bilionésima parte de um metro.⁵⁰ Na agricultura a nanotecnologia é muito utilizada para identificação e detecção de resíduos de pesticidas através de dispositivos chamados de nanobiossensores quando estão em escala nanométricas.⁵¹⁻⁵³

Os nanobiossensores são dispositivos que fornecem informações analíticas específicas, usando um elemento de reconhecimento biológico (como ácidos nucléicos, células, enzimas e anticorpos) associado a um sistema de transdução para detectar um analito.^{54,55} O biossensor é composto por três elementos básicos:⁵⁶

- 1) **Elemento de Reconhecimento Biológico:** através do qual o biossensor reconhece seletivamente um ou vários analitos entre um grande número de outras substâncias;
- 2) **Transdutor Físico:** que processa o sinal produzido pela interação entre o elemento de reconhecimento e o analito de interesse;
- 3) **Sistema Eletrônico de Amplificação de Sinal e Gravação de Dados.**

Os nanobiossensores são classificados por quatro critérios básicos de acordo com com Método utilizado para detectar a interação desejada, tipo de interação que se estabelece entre o elemento sensor e o analito, sistema de transdução e a Natureza do composto de reconhecimento (biológico ou não biológico). Podem ser por exemplo eletroquímicos, ópticos, térmicos, físico-químico, acústicos, eletroquímico de acordo com a transdução do sinal.⁵⁷No caso daqueles baseados no elemento biológico podem ser biocatalítico (enzimas, células ou tecidos) ou por bioafinidade (antígenos, anticorpos ou fragmentos de DNA).⁵⁸⁻⁶²

2.2.2. Biossensores enzimáticos

Os biossensores possuem diversas características e uma delas é a seletividade, realizada principalmente pelo componente biológico.^{63,64} O elemento biológico mais usado para a construção destes biossensores são as enzimas, estruturas orgânicas, onde em reação atuam como catalisadores sendo capazes de aumentar a velocidade da reação, diminuindo a energia de ativação e assim, diminuindo o tempo de reação. Quando uma reação utiliza enzima, a mesma se liga ao seu substrato (substância necessária para a formação de produto final) formando assim o complexo enzima-substrato e então, o substrato é consumido para a formação do produto final.^{65,66}

Um biossensor enzimático pode atuar medindo a transformação catalítica do analito alvo pela enzima ou medindo a inibição da enzima devido à presença de um inibidor.⁶⁷ Um inibidor enzimático é uma substância que é capaz de interferir na taxa da catálise enzimática, retardando ou reduzindo o processo, ou a especificidade biológica da reação. Entre os inibidores de enzimas podemos citar os poluentes ambientais, tais como compostos orgânicos, pesticidas e metais, podendo interferir nos processos normais no núcleo da célula e competir com substratos por sítios ativo.^{68,69}

2.2.3. Enzima Tirosinase

As enzimas são estruturas orgânicas, mais precisamente proteínas, que agem como catalisadores de reações em processos biológicos. Um exemplo é a enzima tirosinase, encontrada na natureza desde bactérias até mamíferos, sendo em maior quantidade em cogumelos, nos tecidos de banana, batata, inhame, maçã, pêra, abacate, berinjela, entre outros, sendo a responsável pelo aparecimento da pigmentação escura em vegetais e frutos e também responsável na síntese da melanina.⁷⁰⁻⁷³ Utilizada na determinação de pesticidas, fármacos, envelhecimento de bebidas alcoólicas, determinação de compostos fenólicos.⁷⁴⁻⁷⁷ A tirosinase pode ser inibida por vários poluentes, sendo um deles o herbicida atrazina. Um inibidor enzimático influencia na taxa de reação da catálise enzimática, causando uma diminuição no processo biológico da reação.⁶⁹ Pertencente à família dos polifenóis oxidase, a enzima tirosinase é metaloproteína binuclear conhecida também como creolase e catecolase.⁷⁸ Possui em sua estrutura dois átomos de cobre II,

como sítios ativos, sendo cada um coordenado a três moléculas de histidinas, onde encontram-se duas ligações equatoriais fortes e uma axial fraca (**Figura 2**).⁷⁹

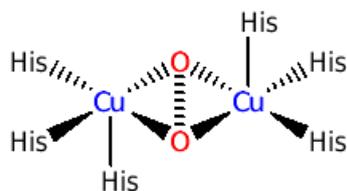


Figura 2: Estrutura da Enzima Tirosinase com seus dois átomos de Cu (II).⁷⁹

A enzima tirosinase em presença de oxigênio catalisa duas reações diferentes (**Figura 3**).⁸⁰

1^a: transformação de o-mono-fenóis em catecóis (atividade cresolase)

2^a: oxidação do catecol para o-quinona (atividade catecolase)

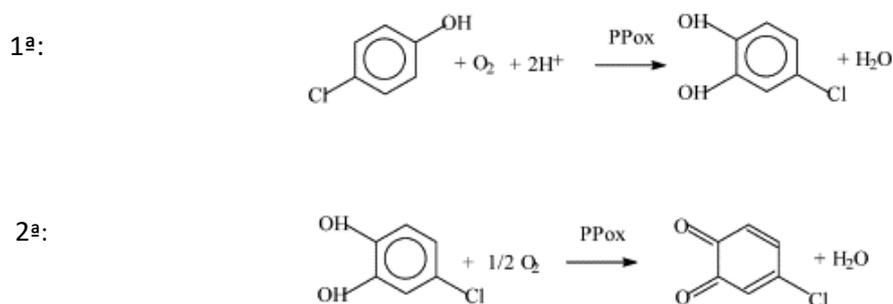


Figura 3: Esquema das Reações Catalisadas pela Tirosinase.⁸⁰

Uma enzima tirosinase é inibida pelo bloqueio de sítios ativos, onde forma o complexo enzima-inibidor bloqueando a transferência eletrônica entre a enzima e o substrato.⁶⁹ O acesso de uma enzima ao analito e a proximidade com o transdutor é dada pela imobilização.⁸¹

Estudos utilizaram a enzima tirosinase no desenvolvimento de seus biossensores para detecção de diversos analitos, como o estudo de Kim et al. (2008) que desenvolveram um biossensor baseado em tirosinase com eletrodo revestido com nanopartículas de ouro caracterizado por medidas de voltametria cíclica para detecção de atrazina. A enzima foi imobilizada no eletrodo sobre uma camada de SAM por ligação covalente com o uso de

EDC/NHS. Os resultados foram obtidos a partir da inibição enzimática decorrente da presença do pesticida em amostras de água, apresentando um limite de detecção de 0,35 pg.mL⁻¹ e com uma faixa de concentração de 0,001 – 0,5 ng.mL⁻¹.⁸²

Martinazzo et al, 2018, desenvolveram um nanobiossensor de cantilever para detecção de atrazina em água utilizando extrato bruto vegetal (banana) da enzima tirosinase. A funcionalização do cantilever foi realizada empregando dois modos diferentes : pela técnica de camadas automontadas (SAM) em superfície de silício contendo ouro, ácido 16-mercaptohexadecanóico (AMHD), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC)/N-hidroxi-succinimida (NHS) e extrato bruto vegetal de tirosinase, obtido de banana nanica (*Musa acuminata*).⁸³

Estes nanobiossensores de cantileveres utilizados são assim demoninados por apresentar uma camada ativa (materiais biologicamente sensíveis, como enzimas) em nanoescala e utilizar agentes biológicos como receptores. Devido à grande versatilidade dos nanobiossensores houve um aumento significativo do seu uso por oferecem respostas em tempo real, reconhecimento específico, alta sensibilidade, miniaturização e sem pré-tratamento de amostras.^{52,53} O grande atrativo desta técnica, em relação aos métodos químicos tradicionais, é que ela permite determinar diretamente a biodisponibilidade das substâncias químicas e seus efeitos biológicos.

2.2.4. Nanobiossensores de Cantileveres

Estudos evidenciam que o uso de pesticidas para combater pragas, fungos, insetos e ervas daninhas muitas vezes são necessários na agricultura, mas o uso desenfreado e acima dos limites permitidos causam uma grande contaminação no solo, água e ar, causando riscos para a saúde.⁸⁴⁻⁸⁷

Com esta grande preocupação a importância de se ter dispositivo de detecção de contaminantes mais preciso, mais rápido, miniaturizado, mais econômico se tornou necessário e novas tecnologias começaram a ser desenvolvidas. A criação de um novo dispositivo de detecção de analitos que ocorre através da funcionalização da haste ou da ponta de um cantilever e este é usado como sensor.^{47,88}

Dentre os sensores, temos os nanossensores definidos como 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. Os nanossensores apresentam uma classe que utiliza agentes biológicos como receptores, os nanobiossensores.⁸⁹ Os nanobiossensores baseados em cantilever possuem baixos limites de detecção, utilizam pequenas quantidades de amostras, apresentam resposta em tempo real, mede interações biomoleculares, a nível molecular, alta sensibilidade não apenas para pesticidas, mas também para metais pesados, compostos voláteis e outros.⁹⁰⁻⁹⁴

O cantilever⁹⁵ normalmente obtido com materiais de silício, possui uma haste flexível, onde uma de suas extremidades é fixa a um suporte.^{94,96-98} Devem possuir sua superfície ou sua ponta recoberta com uma camada sensora (funcionalizados), para atuarem como biossensores, pois não possuem atributos sensitivos na composição de seu material. Esta camada sensora pode ser um elemento biológico, que seja específico a molécula alvo e este recobrimento ocorre pelo processo de funcionalização.⁹⁸

2.2.4.1. Funcionalização dos nanobiossensores de cantilevers

A funcionalização do cantilever para uso como nanobiossensor pode ser realizada com monocamadas orgânicas, onde ocorre uma modificação química da superfície para originar grupos funcionais bem definidos e reativos que se ligam ao elemento de reconhecimento biológico seguido da imobilização.^{5,51,99}

Uma técnica muito utilizada como método de funcionalização, é a técnica de camadas automontadas- SAM (do inglês *Self-Assembled Monolayers*). SAM é constituída por camadas moleculares formadas pela exposição de uma superfície a moléculas com grupos funcionais que possuem afinidade por um determinado substrato usado como suporte, como por exemplo, o ouro. Estas camadas moleculares apresentam alta organização, por meio de quimiossorção de moléculas orgânicas sobre uma superfície sólida.^{13,14,100}

A comparação entrediferentes tióis para formação de SAMs ordenadas é importante pois, cadeia alquílica menor, tem maior rigidez, transmite o stress com maior eficiência. Quanto menor o comprimento, maior é a tensão superficial. Estes mecanismos e princípios irão sustentar a concepção de dispositivos e revestimentos para significativamente baixar o limite de detecção de pequenas moléculas. Assim, a sensibilidade do sensor de cantilever aumenta com a diminuição do comprimento da cadeia do ligante. Estes mecanismos irão sustentar a concepção de dispositivos e

revestimentos para significativamente baixar o limite de detecção de pequenas moléculas.^{17,101}

Através da formação de SAM ocorre uma interação entre moléculas e a superfície, modificando suas propriedades físicas e químicas. Além disso, por ser uma técnica simples, versátil e eficaz para produzir estruturas altamente ordenadas tem se tornado um procedimento de imobilização para fixar material biológico.¹⁰⁰

Estudos apontam a técnica de SAM como promissora e eficaz para o preparado de dispositivos altamente sensores. Galli (2009), descreve que a formação de SAM de tióis sobre a superfície metálica constitui uma técnica bastante interessante de obtenção de uma superfície com alto grau de ordenação controlada quimicamente. Segundo, Lee et al., (1991) os tióis apresentam uma forte afinidade com os metais de transição, provavelmente devido à possibilidade desses compostos formarem múltiplas ligações com a superfície metálica, também são conhecidos por interagirem fortemente com superfícies de ouro para formar monocamadas estáveis e automontadas.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Uma monocamada é constituída por um grupo funcional que se liga a um substrato, uma cadeia de hidrocarbonetos que fornece estabilidade ao conjunto por interações de van der Waals e um outro grupo funcional que é responsável pelo acoplamento da biomolécula a monocamada,^{13,14} como ilustrado na **Figura 4**.¹⁰⁵ Segundo Almeida (2010), a automontagem da monocamada de tiol em ouro é realizada pela interação química entre o ouro e o enxofre (presente no tiol) situado na extremidade da cadeia.¹⁰⁶

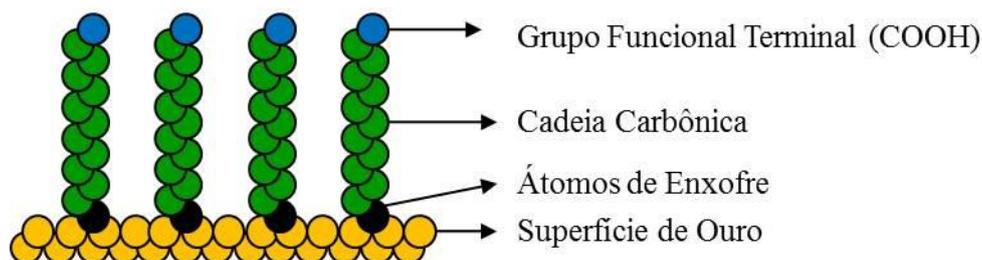


Figura 4: Representação da Técnica de Monocamadas Automontadas (SAM).¹⁰⁵

Para a imobilização da enzima é comum a utilização de agentes de acoplamento, tais como EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) - carbodiimida e NHS - N-hidroxi-succinimida. O EDC possui a função de ativar os grupos carboxílicos e o NHS reage com aminas primárias, sendo que no produto final é formada uma ligação amida (O=C-N-H).¹⁰⁷ Com estes agentes podemos unir enzimas a moléculas de alcanotióis com o grupo

terminal (-COOH), realizando a ligação dos grupamentos (-NH₂) e (-COOH).¹⁰⁸ Pode-se observar (**Figura 5**)¹⁰⁹ melhor esta reação pelo esquema de reticulação mediada por EDC (a) e EDC/NHS (b), onde após a ligação covalente do tiol no ouro, tem um grupo carboxílico que fica disponível para a próxima etapa da técnica de SAM. Este grupo presente no tiol poderá reagir com o EDC, formando o grupo intermediário O-acilisoureia instável e reativo.

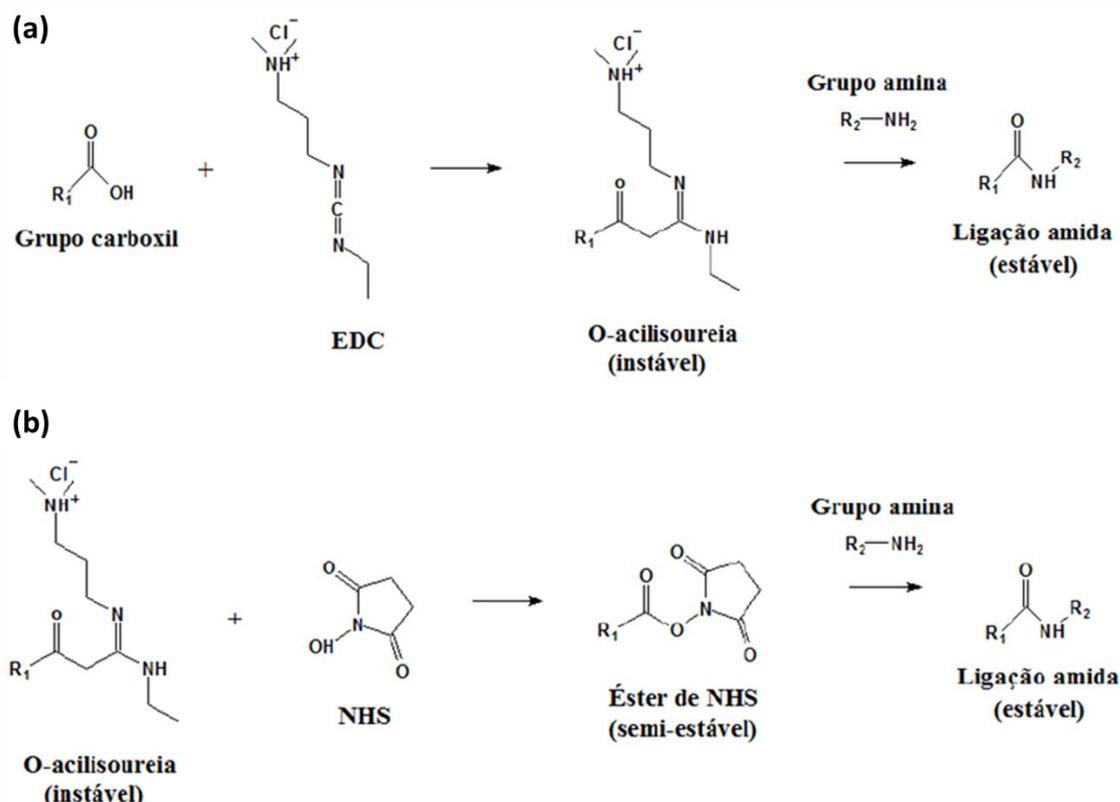


Figura 5: Reação de Reticulação mediada por EDC (a) e EDC/NHS (b).¹⁰⁹

A partir da formação do grupo intermediário formado na reação acima, a reação poderá ocorrer de três etapas:

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

3. Se, o intermediário não reagir imediatamente, irá sofrer hidrólise, e o grupo carboxílico original se restaura.

O caminho da reação (2) é favorecido quando se utiliza EDC e NHS combinados. Posteriormente, aminas primárias do componente a ser imobilizado removem o NHS, liberando-o em solução, e se ligam ao ácido carboxílico original.^{107,109}

2.2.4.2. Modo de Operação- Resposta dos biossensores de cantilever

O funcionamento de um cantilever baseia-se na adsorção de analitos sobre uma superfície sensível que provocará uma mudança na frequência vibracional ou uma deflexão do mesmo.⁹⁸

Assim, dois principais modos de operação e obtenção da resposta dos cantileveres são fornecidos através do equipamento AFM, são (1) o modo estático e o (2) modo dinâmico (**Figura 7**).¹¹⁰

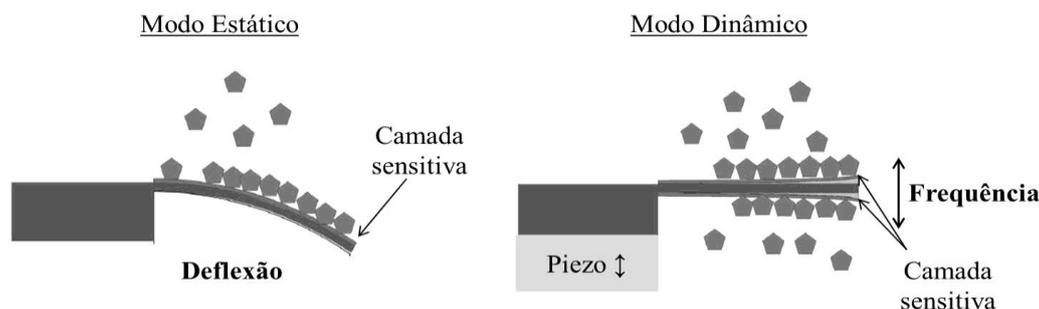


Figura 6: Modos de Operação de Sensores de Cantilever: Modo Estático e Modo Dinâmico.¹¹⁰

Na operação no modo estático (1), somente um lado da superfície do cantilever é funcionalizado, ocorrendo reconhecimento do analito, através de uma alteração na tensão e a deflexão. Neste modo, o cantilever deve possuir uma haste longa e uma constante de mola baixa para se possuir grandes deflexões. No modo dinâmico (2) ocorre a funcionalização em ambos os lados do cantilever, ele depende de alterações de frequência de ressonância causadas por adsorção de massa ou rigidez do cantilever (constante de mola). Quanto mais curta a haste e maior a constante de mola do cantilever, mais fácil de

atingir elevadas frequências de ressonância. Aumentando a massa deste cantilever a frequência de ressonância diminui.^{99,111–113}

Os sensores de cantilever são usados para diferentes amostras no ambiente líquido, ar ou vácuo, sendo que quando está imerso em meio líquido, o efeito do amortecimento dificulta o deslocamento da frequência de ressonância, tornado a resposta de deflexão inalterada justamente pela presença do meio líquido.⁹⁹ Por esta razão, se utiliza o modo estático quando o sensor estiver em meio líquido.¹¹⁴

Em meio líquido o funcionamento exige adaptações de algumas peças para evitar o encharque de componentes elétricos, como a cerâmica piezoelétrica. O porta amostra deve ser grande para acomodar a amostra e a solução em que está imerso. Para recobrir o cantilever costuma-se usar mililitros de solução, para evitar de evaporar e ocasionar mudança na concentração de solventes. O canticlip, suporte do cantilever, evita o contato entre o líquido e o piezo, que conduz o movimento do cantilever.¹¹⁵

A carga de um objeto (da ponta e do cantilever), quando em solução, é rastreada por íons móveis no eletrólito circundante. Os íons com o mesmo sinal de carga são repelidos dos arredores do objeto, os de sinais de cargas opostas, causariam uma atração eletrostática pelo objeto que diminuiria a sua entropia. Sua distribuição espacial é um compromisso entre essas duas tendências opostas. O arranjo resultante da seleção dos íons em torno do objeto é conhecido como a dupla camada elétrica, e sua estrutura tem um impacto maior nas interações entre objetos carregados em solução.^{116,117}

Na operação em meio líquido um feixe de laser é ajustado na extremidade do cantilever. A função do laser é traduzir (informar) a força que atua na ponta em uma deflexão que pode ser posteriormente monitorada por tunelamento de elétrons, capacitância, piezoelétrico, interferometria óptica e deflexão do feixe óptico.¹¹⁸

Para a operação em meio líquido, a maioria dos equipamentos de AFMs usam o método de deflexão do raio laser.¹¹⁵ Quando o cantilever penetra no líquido a intensidade do laser é zerada pois é desviada pela diferença do índice de refração. Assim, é importante realizar o ajuste do laser antes de medir a deflexão, pois caso contrário será lido o ruído.¹¹⁹ Pode-se minimizar este problema usando o canticlip com uma janela transparente de vedação. O feixe de laser que entra é transmitido no líquido sem ter interferência por qualquer onda de superfície, resultando em um ponto de estabilização adequado para detectar a deflexão do cantilever.^{120,121}

Como principal vantagem no uso de nanobiossensores de cantilever está a alta sensibilidade que eles apresentam, por detectar substâncias na escala de nanograma (ng) (10^{-9} g), picograma (pg) (10^{-12} g), femtograma (fg) (10^{-15} g) até zeptograma (zg) (10^{-21} g).¹²⁰

Há poucos estudos ainda sobre o desenvolvimento de nanobiossensores para detecção de atrazina através da técnica de SAM, mas existem outras pesquisas de detecção de atrazina através do desenvolvimento de outros tipos de biossensores. Deda et al. (2013) desenvolveram um nanobiossensor de ponta de AFM, funcionalizando 30 μ L da solução de anticorpo anti-atrazina e glutaraldeído para a detecção de atrazina. Neste trabalho foi comparada a curva de força entre as pontas não funcionalizada e funcionalizada com anticorpo e, a diferença da força de adesão foi de 16 e 44 pN, respectivamente, gerando um aumento de 175% de força de adesão, permitindo a detecção de atrazina em escala molecular.⁹¹

Leite et al. (2015), estudaram a interação entre o herbicida atrazina e seu anticorpo específico (anti-atrazina) com a finalidade de desenvolver um nanobiossensor de AFM. Os resultados mostraram que um nanobiossensor de AFM pode ser capaz de detectar atrazina em pequenas quantidades de forma precisa, pois o valor de interação apresentou força de adesão de 172 ± 26 nN, muito maior quando comparado com outros herbicidas não específicos.¹²¹

Em 2017, Muenchen. K. D, desenvolveu um nanobiossensor de cantilever para a detecção de glifosato em água. A definição da camada sensora, sua forma de imobilização na superfície do cantilever até a etapa de reconhecimento do analito foram realizadas por meio da análise no microscópio de força atômica. O extrato vegetal de peroxidase foi obtido a partir da abobrinha em diferentes condições de extração (pH 6,0 - 7,0 e ausência ou presença de agente protetor). O extrato enzimático obtido a pH 7,0 na ausência de agente protetor apresentou a melhor estabilidade da atividade enzimática, sendo esta condição aplicada como camada sensora. A técnica empregada na funcionalização do cantilever foi a de monocamadas automontadas (SAM), sendo a imobilização da peroxidase realizada por meio da utilização de agentes de reticulação.⁹⁵

Pode-se observar diante de estudos realizados citados acima que a aplicação de nanobiossensores de cantileveres vem sendo usado com bastante êxito para a detecção de vários pesticidas. Alguns apresentados demonstraram a utilização de enzima tirosinase comercial ou extrato bruto vegetal como camada sensora e também o uso do tiol 16-AMHD na funcionalização desses nanobiossensores de cantilevers para detecção de

atrazina em água. Com base nesses estudos foi identificada a necessidade de modificação na funcionalização do nanobiossensor de cantilever como etapa inovadora. Podemos citar como modificação inovadora para este propósito de detecção a modificação e comparação de diferentes moléculas de alcanotóis pela técnica SAM.

Foi desenvolvido um imunossensor de microcantilever para a detecção de Clorimuron-ethyl (CE) utilizando também o ácido 11-MUA. Utilizaram ligantes com 1, 5, 10 e 15 carbonos de comprimento da cadeia alquílica e estes foram comparados pelos seus efeitos na transmissão do stress do corpo para a superfície. A cadeia alquílica mais curta, que tem maior rigidez, transmite o stress com maior eficiência. Quanto menor o comprimento, maior é a tensão superficial. Estes mecanismos e princípios irão sustentar a concepção de dispositivos e revestimentos para significativamente baixar o limite de detecção de pequenas moléculas. Assim, a sensibilidade do sensor de cantilever aumenta com a diminuição do comprimento da cadeia do ligante. Estes mecanismos irão sustentar a concepção de dispositivos e revestimentos para significativamente baixar o limite de detecção de pequenas moléculas.¹⁷

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Os procedimentos experimentais com relação ao nanobiossensores de cantileveres 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 – Campus Erechim.

Todo material utilizado (balões volumétricos, espátulas, béqueres, placas de petri, etc) foi submetido a um procedimento de limpeza com solução de ácido nítrico 3 mol. L⁻¹ (HNO₃) (65%) com posterior lavagem com água destilada (OS10LXE - Gehaka), água deionizada (Permutation) e água milli-Q (Millipore Co. 18,2 MΩ/cm) para assegurar a ausência de quaisquer resíduos orgânicos que pudessem interferir nas análises.

Os reagentes utilizados foram o HNO₃ (Química Moderna, 65%), fosfato de sódio pH 6,5 na concentração de 2 mg.mL⁻¹ (Vetec, 98%), álcool absoluto (Quimex, 99,5 %), álcool isopropílico (Vetec, 95%), catecol 0,05 mol.L⁻¹, ácido 16-mercaptohexadecanóico (AMHD) (tiol) (Sigma Aldrich, 90%), ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) (tiol) (Sigma Aldrich, 90%), N-(3-dimetilaminopropil)-N'etilcarbodiimida (EDC) (Sigma Aldrich, 98%), N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma Aldrich, 98%), tyrosinase from mushroom comercial (Sigma Aldrich) (2687 U/mg) e padrão de Atrazina(Sigma Aldrich) 99% de pureza.

PrimatopSC (Herbicida seletivo de ação sistêmica do grupo químico das triazinas). Composição: 6-chloro-N²-ethyl-N⁴isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (atrazina) 250g.L⁻¹ (25% m/V); 6-chloro-N², N⁴-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (simazina) 250g.L⁻¹ (25% m/V); outros ingredientes 620 g.L⁻¹ (62% m/V), (Syngenta).

Connect (inseticida sistêmico dos grupos químicos dos neonicotinoides (imidacloprido) e piretróides (beta-ciflutrina). Composição: 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)- N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine (IMIDACLOPRIDO) 100g/L (10% m/V; R-alfa-cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl-(1S, 3S)-3-(2, 2-dichlorovinyl)-2, 2-dimethylcyclopropanecarboxylate-and-(S0-alfa-cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl (1R, 3R)-3-(2, 2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarbox (BETA-CIFLUTRINA) 12,5 g/L (1, 25% m/V) outros ingredientes 967,5 g/L (96,75% m/V), (Bayer);

Nomolt 150 (Inseticida regulador de crescimento de insetos, inibidor da síntese de quitina, grupo químico: TEFLUBENZUROM: Benzoiluréias). Composição: 1-(3,5-dichloro-2,4-difluorophenyl) -3-(2,6-difluorobenzoyl) -urea (TEFLUBENZUROM) 150 g/L (15,0% m/v); Outros Ingredientes 953 g/L (95,3% m/v), (BASF).

PONTEIROBR® (Herbicida seletivo, de ação sistêmica, grupo químico: Triazolonas). COMPOSIÇÃO: 2',4'-dichloro-5'-(4-difluoromethyl-4,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-yl) methanesulfonanilide (SULFENTRAZONA) 500,00 g/L (50,00% m/v); Outros Ingredientes 725,00 g/L (72,50% m/v), (Ourofino Agrocência).

A água utilizada para o preparado da amostra real de pesticidas foi obtida de águas superficiais, do poço artesiano localizado na sede da empresa Biotrigo Genética-Passo Fundo-RS, latitude: -28.22450° e longitude: -52.38292 , região contendo lavouras de cultivo de trigo e soja (**Figura 8**).

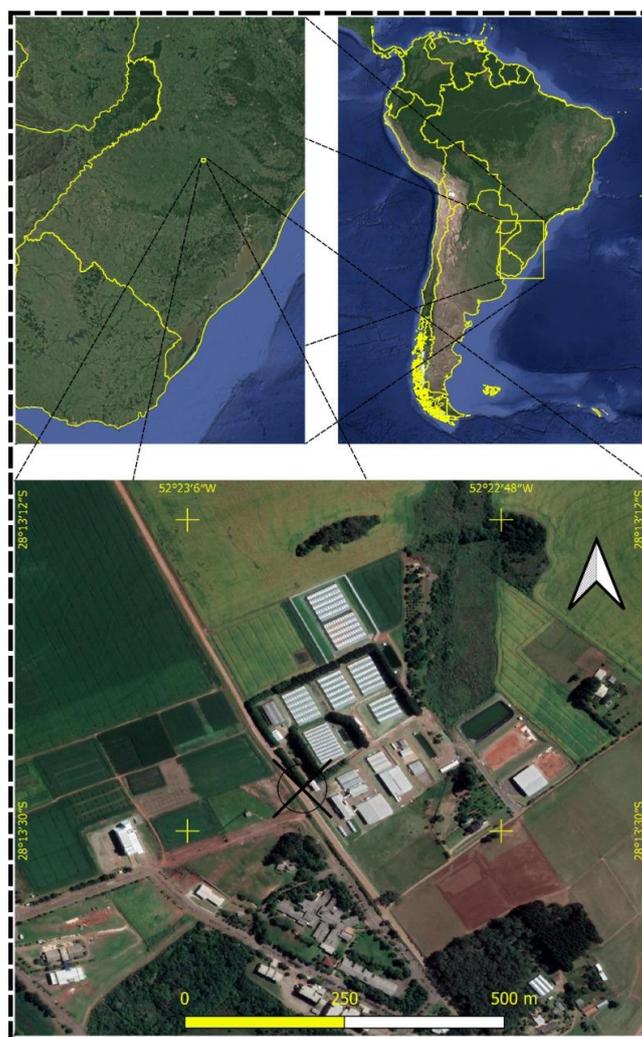


Figura 7: Localização geográfica da coleta de amostra real de pesticidas.¹²²

3.2. MÉTODOS

Através do esquema apresentado na **Figura 9** podemos observar um esquema com as etapas envolvidas neste estudo, desde o desenvolvimento dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com diferentes ácidos (Ácidos 16-AMHD E 11-MUA), a avaliação da resposta do sensor na detecção do herbicida atrazina em água ultrapura e amostra real de pesticida (água de poço artesiano), caracterização das respostas e da superfície dos nanobiossensores de cantileveres.

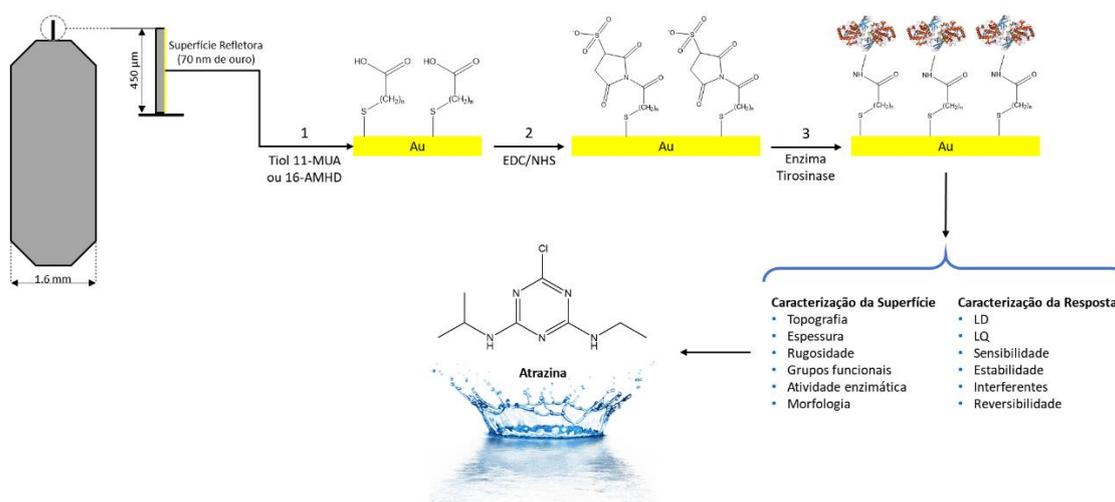


Figura 8: Esquema das etapas do desenvolvimento dos nanobiossensores de cantileveres usados no presente estudo, suas aplicações e caracterizações.

3.2.1. Cantileveres

Os cantileveres (ContGD-G) utilizados para o desenvolvimento dos nanobiossensores, foram obtidos comercialmente da BudgetSensors®, modelo ContGD-G. Um sensor de cantilever deve possuir uma camada refletiva e características para poder se ligar ao material da camada sensível. Baseado nestas informações o ouro foi escolhido como camada refletida por ser um metal inerte e possuir forte interação com o enxofre (suficiente para formar ligações covalentes).¹²³

O material utilizado foi de silício revestido com 70 nm de ouro em somente um dos lados, com frequência de ressonância de 13 kHz e uma baixa constante de mola 0,2 (0,07-0,4) N/m, o que resulta em maior sensibilidade para medições no modo estático em meio líquido, que traduz também a rigidez da haste, ou seja, representa uma medida de dureza, e quanto mais flexível for a mola, mais facilmente consegue sentir alterações de massa, resultando em maior sensibilidade do sensor que será desenvolvido.¹²⁴

É possível observar na **Figura 10** as seguintes dimensões na vista lateral: comprimento de 3,4 mm e a espessura do suporte de 0,3 mm, com espessura de haste de 2 μm e 17 μm de comprimento de ponta. Na vista superior o suporte possui a largura de 1,6 mm e a haste apresenta 450 μm de comprimento e 50 μm de largura.

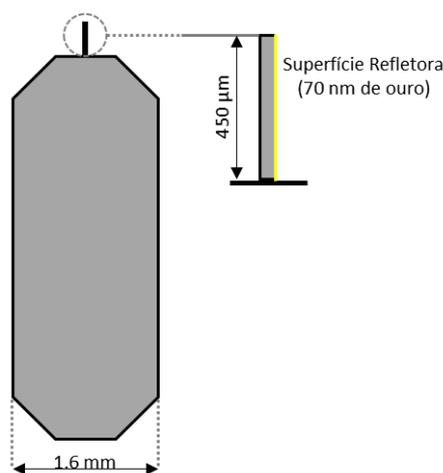


Figura 9: Especificações do Cantilever utilizado.⁹⁵

Os cantilevers, são recobertos com AU e foram escolhidos por sua alta afinidade com o grupo tiol (-SH) e por esta razão, essa camada parte das etapas de funcionalização. A camada de ouro está presente apenas no lado superior do cantilever, então a funcionalização é realizada apenas neste lado e consequentemente, o mesmo pode ser operado no modo estático.⁹⁹

3.2.2. Funcionalização dos Cantilevers pela Técnica de Camadas Automontadas (SAM)

A funcionalização do cantilever foi realizada em seu modo ativo, que consiste na deposição da camada sensora no lado superior, onde se encontra depositado o ouro. A

técnica de SAM foi escolhida por permitir interações entre moléculas e superfícies, modificando suas propriedades físicas e químicas, aumentando a sensibilidade pelo analito, além de apresentarem estabilidade razoável por um período longo de tempo.^{100,125}

A imobilização da enzima na superfície do cantilever foi realizada por meio da técnica de SAM, usando agentes reticuladores (EDC/NHS) para ligação covalente com moléculas de alcanotiois.

O procedimento de funcionalização do cantilever foi realizado consistindo das seguintes etapas:¹¹

Etapas da Funcionalização dos nanobiossensores de cantilever por SAM utilizando EDC 1mM/ NHS 1mM (4:1 v/v) e ácido 16-mercaptohexadecanóico (AMHD) e Funcionalização dos nanobiossensores de cantilever por SAM utilizando EDC 1mM/ NHS 1mM (4:1 v/v) e ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA):

- **Etapa 1: limpeza**

O cantilever foi transferido individualmente para uma placa de petri e imerso em aproximadamente 1,5 mL álcool isopropílico por 2 minutos para lavagem, a fim de eliminar quaisquer interferentes presentes. Após, é retirado para a secagem por durante 15 minutos, a uma temperatura de aproximadamente 20°C.

- **Etapa 2: Deposição do tiol**

Após a secagem o cantilever é colocado em imersão em uma solução de 16-AMHD (2 mM) em meio etanólico (aproximadamente 2 mL), em contato overnight (16 h) em uma placa de petri. Em seguida, foi realizada a lavagem do cantilever com água ultrapura por 2 min e secagem a 20°C por 15 min. O mesmo procedimento repete-se para o cantilever em contato com o ácido 11-MUA.

- **Etapa 3: EDC / NHS**

Nesta etapa foi realizada a imersão do cantilever na mistura EDC/NHS por 10 minutos. A seguir foi realizada uma lavagem com água ultrapura por 2 min e secagem por 15 min.

- **Etapa 4: imobilização da enzima**

A imobilização foi realizada por meio da imersão do cantilever na enzima comercial tirosinase (2687 U/mg) diluída em tampão de fosfato de sódio a pH 6,5 na concentração de $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ durante 10 minutos. Posteriormente foi realizada a lavagem do cantilever com a solução de tampão de fosfato de sódio a pH 6,5 (2 min) e secagem a 20°C por 15 minutos.

Posteriormente, os nanobiossensores de cantilvers foram armazenados sob refrigeração (4°C) a seco em um suporte denominado, canticlip. Todas as lavagens realizadas após cada etapa de funcionalização tinham como função remover as moléculas que ficaram adsorvidas na superfície. Todos os procedimentos foram realizados em uma sala climatizada a 20°C e antes da realização de cada experimento, os mesmos ficaram a 25°C por 30 min, para estabilizar a temperatura.

A quantidade de enzima que foi imobilizada na superfície dos cantilvers foi determinada através da medida da atividade enzimática antes e após a imobilização para ambos as soluções contendo tanto o ácido 11-MUA quanto o ácido 16-AMHD.

3.2.3. Medida Atividade Enzimática

A atividade enzimática da enzima tirosinase foi determinada por meio da técnica de espectrofotometria no UV/Vis (Biosystems), de acordo com Perone et al. (2005).⁷² A absorbância das soluções foi medida em comprimento de onda igual a 410 nm, imediatamente após a mistura dos reagentes em uma cubeta de quartzo (2,8 mL de solução de catecol $0,05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em tampão de fosfato de sódio $0,2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 0,1 mL da solução de enzima tirosinase a 20°C e 0,1 mL de tampão de fosfato de sódio $0,2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Todas as medidas foram realizadas em um intervalo de 20 até atingir o tempo necessário para a enzima deixar de reagir em presença de catecol. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

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

$$\text{Atividade enzimática (U/mg)} = (\Delta A \times 1000 \times D / (\Delta t \times V)) \quad \text{Equação 1.}$$

onde: ΔA : variação de absorvância final e inicial Δt : variação do tempo reacional (final e inicial), em min; D: diluição da solução enzimática; V: volume da solução enzimática utilizada no ensaio, em mL e solução enzimática de tirosinase que é igual a 2 mg. mL⁻¹).

3.2.4. Medida de Deflexão do Nanobiossensor de Cantilever

A resposta dos nanobiossensores, foi avaliada em meio líquido, no modo estático, por meio da realização de uma imagem utilizando um AFM da Nanosurf (C3000 Controller). O feixe de laser é focado na extremidade final do cantilever e refletido para um fotodiodo de quatro quadrantes que monitora a deflexão, onde o alcance do fotodetector é de 0 a 12 Volts, sendo que a distância percorrida pela haste é proporcional ao sinal de voltagem do AFM.¹⁰⁸

O nanobiossensor de cantilever, previamente funcionalizado e acoplado ao canticlip (suporte onde fica o cantilever), foi inserido junto ao cabeçote (scanner) do equipamento, onde o laser foi posicionado na extremidade final da haste do cantilever e na posição central do fotodetector, verificando sua intensidade, sendo ambos calibrados apenas na primeira medida com água ultrapura. Então, a resposta era monitorada por meio da criação de uma imagem, realizada nos seguintes parâmetros: resolução de 600 x 600 pontos (a imagem foi formada por 600 linhas, representando os pontos de resposta) e a velocidade de varredura de 1s/linha para a obtenção da resposta.

As imagens obtidas foram convertidas em um gráfico de Deflexão X Tempo de contato (min), por meio do software Gwyddion (Versão 2.57) e os dados da imagem foram exportados para o software Excel (Versão 2010) para obtenção dos gráficos.

A voltagem lida foi proveniente do sinal do fotodetector do equipamento. Todos os dados foram obtidos em triplicata.

3.2.5. Avaliação da Resposta do Nanobiossensor de Cantilever na Detecção de Atrazina em Água

Para as análises do herbicida atrazina utilizou-se um padrão de atrazina de 99% de pureza da Sigma Aldrich. Foi preparada uma “solução estoque” na concentração de 10 mg. L⁻¹, onde foi diluído 0,005g de atrazina em 500 mL de água ultrapura.

A partir desta, as soluções de trabalho foram de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 50, e 100 µg/L utilizando-se água ultrapura, que foram preparadas de acordo com o limite máximo permitido pelo ministério da saúde do Brasil para atrazina em água potável (2 ppb).

Para a realização das análises foi inserido (0,5 mL) de cada solução injetada sobre uma placa de aço inoxidável no AFM, de modo que o nanobiossensor de cantilever ficasse imerso na solução (**Figura 12**). Cada análise foi de 15 min. Transcorrido este tempo, a gota era retirada e injetada outra gota em ordem crescente de concentração das soluções de atrazina em água ultrapura.



Figura 10: Solução de atrazina em contato com o cantilever.

As análises foram realizadas em temperatura constante de 25,5 °C ± 0,5 através de um sistema de resfriamento tendo por base uma pastilha Peltier com dimensões de 50 x 53 mm. Este elemento, quando ligado a uma fonte de corrente contínua (CC) teve uma de suas faces resfriadas e a outra aquecida.

A fim de, minimizar ruídos, vibrações mecânicas e interferências nas respostas, usou-se uma caixa de fibra de média densidade (MDF) sobre a parte do equipamento que ficava o cantilever em contato com a amostra e a mesa-vibratória (**Figura 13**).⁹⁹



Figura 11: Sistema de resfriamento do equipamento de microscopia de força atômica desenvolvido para controle de temperatura e minimização de ruídos.

O local onde o equipamento se encontra é uma característica bem importante sobre o funcionamento do AFM, pois ele é muito sensível e deve permanecer sobre uma superfície que evite vibrações para não prejudicar a interação da ponta-amostra. Fatores como, sensibilidade de medição, o ruído e a resolução não dependem apenas das propriedades do cantilever, pois estes parâmetros são fortemente influenciados pelo desempenho do sistema de instrumentação e das condições do ambiente externo.^{99,126}

A face resfriada e seu dissipador ficaram na parte interna da caixa enquanto a face aquecida e seu dissipador ficaram na parte externa. O dispositivo foi montado na parte superior da caixa em uma abertura realizada para sua fixação. Em cada dissipador de calor foi colocado um microventilador, ambos alimentados pela mesma fonte de energia que aciona a pastilha Peltier. A tensão a que o sistema ficou submetido era em torno de 5,5 V, que garantiu o resfriamento e impulsionou os microventiladores com baixa velocidade, para não haver ruído que pudesse interferir nos experimentos.

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

3.2.6. Caracterização das Respostas dos Nanobiossensores de Cantilever

Foram avaliadas as características como sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, reversibilidade e estabilidade dos nanobiossensores de cantileveres

funcionalizados com enzima tirosinase comercial e para ambos os tióis citados. Estas características foram avaliadas através destes nanobiossensores em contato com diferentes concentrações de padrão de atrazina. Os dispositivos tiveram suas deflexões observadas, produzindo uma curva de calibração da concentração logarítmica do padrão de atrazina *versus* deflexão. As características avaliadas foram obtidas da seguinte maneira:

Limite de detecção (LD): o cálculo foi baseado de acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que define limite de detecção sendo a menor concentração que pode ser distinguida a nível de confiança.^{127,128} O limite de detecção foi definido com a concentração analítica que gera resposta com um fator de confiança k superior ao desvio padrão do branco (S_b) (**Equação 2**), sendo realizado a partir da curva de calibração.

$$LD = \frac{kS_b}{m} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde: S_b é o desvio padrão do branco, m é sensibilidade da calibração, k : 3, correspondendo ao nível de confiança de 99,6%.

O limite de quantificação (LQ): é definido como a quantidade de analito detectável pelos sensores.

$$LQ = 10 \frac{S_b}{m} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde: (m) é a sensibilidade da curva de calibração e o desvio padrão do branco (S_b).

Sensitividade: é a variação da resposta em função da concentração do analito e é expressa pelo coeficiente angular da curva analítica.¹²⁹ A sensibilidade linear é a razão entre a inclinação da curva de calibração e o desvio padrão do sinal analítico a uma certa concentração do analito.¹²⁸

Reversibilidade (η): é a resposta do sensor de retornar ou não a sua condição inicial depois de interrompido o contato com o analito em questão.¹³⁰ Os nanobiossensores foram expostos a uma concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ da solução de padrão de atrazina (concentração que apresentou maior resposta) e a água ultrapura (branco) em triplicata, com temperatura monitorada ($25 \text{ }^\circ\text{C}$).¹³¹ A partir destes dados foi calculada a reversibilidade (**Equação 4**).

$$\eta(\%) = \frac{D-D_f}{D-D_0} \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde: D_0 é a deflexão inicial do nanobiossensor; D é valor de deflexão após exposição aos metais pesados e D_f é a deflexão final do nanobiossensor.

Durabilidade (estabilidade): foi avaliada nos nanobiossensores funcionalizados com a enzima tirosinase comercial e diferentes ácidos 16-AMHD e 11-MUA, do 1º ao 30º dia de armazenamento, num intervalo de 10 dias e após analisar os resultados foi avaliada novamente em um intervalo menor de sete dias a fim de verificar por quanto tempo os nanobiossensores funcionalizados continuavam respondendo. O experimento foi realizado usando a solução de atrazina 0,1 ppb (usada esta concentração por ser um valor intermediário, (visto que todas as concentrações apresentaram deflexão aproximadas). Após cada análise os nanobiossensores foram imersos em água ultrapura por 30 s para lavagem e posterior armazenamento em temperatura de refrigeração ($\pm 4^\circ\text{C}$).

3.2.7. Avaliação do Nanobiossensores de Cantilevers em Amostra Real de Pesticida para Aplicação no Campo.

A amostra real de pesticida (PrimatopSC Herbicida (atrazina+simazina), Connect inseticida, Nomolt 150 Inseticida (teflubenzurom) + água do poço artesiano) foi coletada diretamente na hora da aplicação na lavoura de experimentação em soja pertencente a Biotrigo Genética, sendo descartado o primeiro jato de amostra que saiu através do bico do pulverizador a fim de evitar qualquer resíduo de outro pesticida (**Figura 14**).



Figura 12: Preparo da amostra real de pesticida e aplicação em lavoura.

A amostra foi armazenada em vidro âmbar e congelada até o momento da avaliação da resposta pelos nanobiossensores funcionalizados. A amostra foi levada congelada e mantida neste estado até o Laboratório de Termodinâmica da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

A amostra coletada foi homogeneizada, e após foram preparadas soluções (soluções com concentrações de atrazina + simazina em água ultrapura: 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 50, e 100 ppb) para a avaliação da resposta dos nanobiossensores de cantilever em amostra real de pesticida.

As amostras foram avaliadas por ordem crescente de concentração e a resposta dos nanobiossensores de cantileveres (deflexão) foi avaliada em modo estático no AFM, conforme descrito no item 3.2.4 no presente estudo. Para a realização da avaliação da resposta dos nanobiossensores de cantilever foi colocada uma gota (0,5 mL) de cada solução injetada sobre uma placa de aço inoxidável no AFM, de modo que o nanobiossensor de cantilever ficasse imerso nesta gota para depois fazer a leitura direta das medidas de deflexão, por um período de 15 minutos. As análises foram realizadas a uma temperatura de 25,5 °C ($\pm 0,2$).

3.2.8. Análise de interferentes dos nanobiossensores de cantilvers funcionalizados

Foram realizadas as análises de interferências para os nanobiossensores funcionalizados na presença de compostos interferentes como, PrimatopSC Herbicida

(atrazina+simazina), Connect inseticida, Nomolt 150 Inseticida (teflubenzurom), PONTEIROBR® Herbicida (sulfentrazono). A resposta dos dispositivos funcionalizados aos compostos interferentes individuais foi avaliada na concentração de 0,1 µg/mL conforme procedimento descrito no item 3.2.4 com o propósito de avaliar sua seletividade ao composto atrazina.

3.2.9. Caracterização da Superfície dos Nanobiossensores de Cantileveres

3.2.9.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização da superfície dos nanobiossensores foi realizada em cada etapa da funcionalização do cantilever utilizando os ácidos 16-AMHD 11- AMHD, sendo que ambos utilizaram enzima tirosinase comercial. 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*.

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 10 kV.

3.2.9.2. Microscopia de força atômica (AFM)

A Microscopia de força atômica (AFM) foi usada a fim de avaliar a topografia, rugosidade e espessura. Nesta análise, a ponta de um cantilever realizou uma varredura na superfície da amostra para avaliar sua topografia. Em consequência é gerado um mapa topográfico da superfície que permite calcular os valores de rugosidade superficial bem como avaliar a mudança na altura da superfície. A rugosidade e a espessura da camada depositada são dadas pela presença de irregularidades na superfície podendo assim também calcular sua espessura.^{132,133}

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 estático e a varredura realizada no modo tapping (modo contato

intermitente). Para as análises de topografia e rugosidade, as imagens foram obtidas em uma área de $25 \mu\text{m}^2$, com resolução de 512×512 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.¹²¹ As amostras foram recobertas com uma camada de 20 nm de ouro usando um metalizador (Quorum, SC 7620).

Para a medida de espessura, utilizou-se uma agulha para fazer um risco sobre as placas funcionalizadas com os diferentes tióis e a enzima tirosinase. A imagem topográfica (área de $25 \mu\text{m}^2$, com resolução de 512×512 pontos e velocidade de varredura de 2 s/linha) foi obtida entre a região da superfície que continha a camada sensora depositada e a que teve a camada removida pela agulha, mas permanecendo com a camada de ouro. A espessura foi calculada utilizando o software Gwyddion (Versão 2.45), por meio da diferença de altura entre as duas regiões, em vários pontos da imagem analisada.

3.2.9.3. Espectros de absorção de reflexão por infravermelho modulada por polarização (PM-IRRAS)

A formação de camadas de Tiol-11-MUA/Tirosinase e Tiol-16-AMHD/Tirosinase e o estudo dos mecanismos de adsorção, foram realizados pelas medidas de (PM –IRRAS),¹³⁴ com um ângulo de incidência de 81° e uma resolução espectral de 8cm^{-1} . Foi avaliada a etapa de deposição dos diferentes e após com a deposição da enzima. Para avaliar a composição química pela técnica foi utilizado um espectrofotômetro comercial KSV, modelo PMI 550 (Instrumentos KSV, Finlândia). Esta análise foi realizada no Instituto de Física, da Universidade de São Paulo – USP, Campus São Carlos – SP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOBIOSENSORES DE CANTILEVER

4.1.1. Imobilização da Enzima Tirosinase

Um das etapas mais importantes no desenvolvimento de um nanobiossensor ocorre antes de toda a funcionalização com a escolha do elemento biológico. No presente estudo, a enzima tirosinase foi a escolhida por ser inibida pelo herbicida atrazina, analito de interesse.⁷³ Baseado nas características dessa molécula e no dispositivo onde foi imobilizada, foi realizada a sua funcionalização, onde primeiramente ocorreu a modificação química, da superfície de ouro, pela adição dos ácidos 16-AMHD e 11-MUA. Estes ácidos são alcanotióis de cadeia longa, proporcionando camadas mais ordenadas, estáveis e posterior maior sensibilidade do dispositivo. O grupo tiol (-SH), localizado em uma de suas extremidades, adsorve na superfície do ouro através da formação de uma ligação tiolato enquanto o grupo carboxila presente na outra extremidade fica disponível.¹³⁵ Para imobilizar a enzima tirosinase sobre a superfície do cantilever de forma covalente, os grupos carboxila dos ácidos 16-AMHD e o 11-MUA foram acoplados aos grupos da amina primária presente na estrutura da enzima através dos agentes reticulantes EDC e NHS.

O grupo carboxílico presente nos ácidos 16-AMHD e 11-MUA reagem com o EDC, formando o intermediário instável O-acilisourea. Em solução aquosa, o intermediário instável é suscetível à hidrólise, o que resultaria na regeneração do grupo carboxílico. A fim de evitar esta regeneração aumenta-se a eficiência da ligação com a adição do NHS, que reage com o composto intermediário formando um novo intermediário um pouco mais estável. Este novo intermediário formado, reage com a amina primária, presente na enzima, o que faz com que a amina se ligue ao ácido carboxílico original, por meio de uma ligação amida.^{107,136} O produto da reação utilizando o NHS é idêntico ao obtido na reação utilizando somente EDC, porém aquela é altamente eficiente e com maior rendimento na conjugação.¹⁰⁸

Utilizar enzimas no desenvolvimento de biossensores apresenta muitas vantagens como, resposta rápida, maior sensibilidade, detecção de baixas concentrações do analito, altamente específicas, possibilitando que os biossensores sejam utilizados mesmo na

presença de outras substâncias na amostra.^{137,138} Foi possível observar através da medida da atividade enzimática (**Tabela 3**) antes e após a imobilização com diferentes tióis que ocorreu uma boa imobilização, sendo que quando utilizado o ácido 11-MUA a atividade é menor em relação as comparadas, o que demonstra possuir maior quantidade de enzima na superfície do cantilever, resultando em melhor imobilização.

Tabela 3: Valores de atividade enzimática relacionada a enzima tirosinase pura, Enzima tirosinase + ácido 16-AMHD e Enzima tirosinase + ácido 11-MUA.

Soluções	Atividade enzimática (U/mg)
Enzima tirosinase	4391
Enzima tirosinase + ácido 16-AMHD	3796
Enzima tirosinase + ácido 11-MUA	3155

4.2. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO NANOBIOSENSOR DE CANTILEVER NA DETECÇÃO DE ATRAZINA EM ÁGUA FUNCIONALIZADO COM ENZIMA TIROSINASE COMERCIAL E OS ÁCIDOS 16-AMHD E O 11-AMHD.

A detecção de atrazina para os nanobiossensores funcionalizados com enzima tirosinase e os ácidos 16-AMHD e o 11-MUA, foram avaliadas nas concentrações de soluções de padrão de atrazina: 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 50, e 100 ppb e água ultrapura (branco) (**Figuras 15 e 16**).

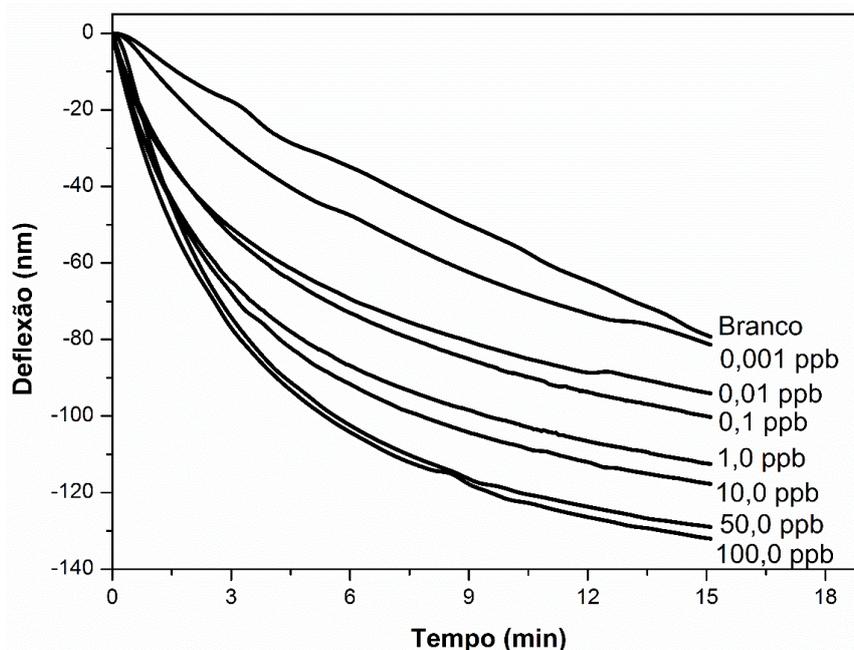


Figura 13: Resposta do nanobiossensor funcionalizado com a enzima tirosinase comercial e o ácido 16-AMHD em função do tempo á diferentes concentrações de solução de atrazina.

As medidas de deflexão foram realizadas em 15 min e no decorrer deste tempo, foi possível verificar através da **Figura 15** que houve diferença na deflexão do nanobiossensor entre o branco e as demais concentrações de atrazina em água ultrapura. Pode-se observar que a menor concentração (0,001 ppb) apresentou resposta, o que indica que o nanobiossensor consegue detectar a presença do herbicida atrazina na água.

A diferença de deflexão entre a maior concentração (100 ppb) e a menor (0,001 ppb) ficou aproximadamente de 57 nm. Esta diferença pode estar relacionada com a adsorção da atrazina em diferentes concentrações na superfície funcionalizada dos cantileveres. A resposta do nanobiossensor ao longo do tempo foi decorrente da adsorção do analito na 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.

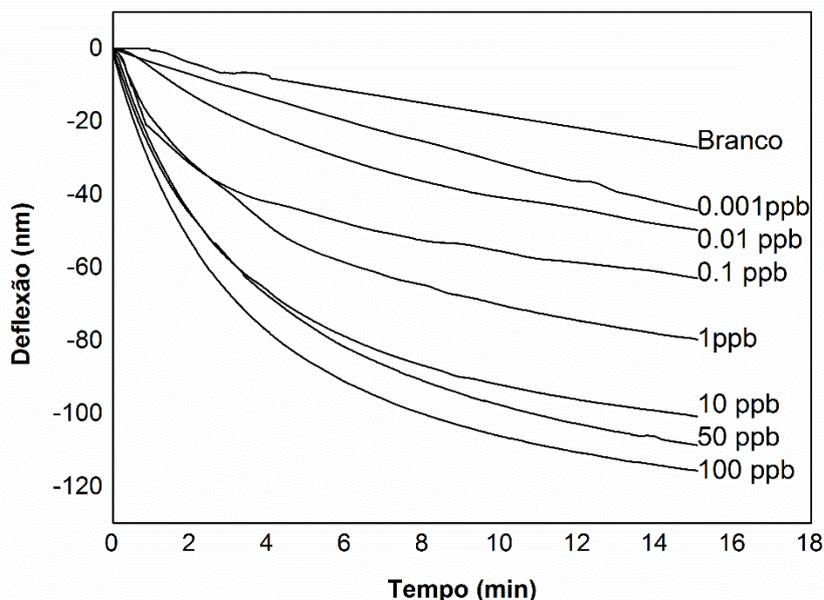


Figura 14: Resposta do nanobiossensor funcionalizado com a enzima tirosinase comercial e o ácido 11-MUA em função do tempo á diferentes concentrações de solução de atrazina.

Para o nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase comercial e o ácido 11-MUA, foi possível verificar que houve diferença na deflexão do nanobiossensor entre o branco e as demais concentrações de atrazina em água ultrapura. Pode-se também observar através da **Figura 16** que a menor concentração (0,001 ppb) apresentou deflexão, o que indica que o nanobiossensor consegue detectar a presença do herbicida atrazina na água.

Segundo a Resolução n° 357 do CONAMA¹³⁹ e as Portarias n° 1469, de 29 de dezembro de 2000 e n° 2914, de 12 de dezembro de 2011, ambas do Ministério da Saúde),⁴¹ a máxima concentração de atrazina permitida em águas doces é de 2 µg/L e, conforme as **Figuras 15 e 16**, é possível observar que o nanobiossensor de cantilever foi capaz de identificar concentrações maiores e menores que a permitida nas legislações.

Nas **Figuras 15 e 16** verifica-se em ambos os nanobiossensores de cantileveres funcionalizados que quanto maior a interação do herbicida (maior concentração) com o nanobiossensor de cantilever, maior a deflexão observada. O mesmo resultado foi observado no estudo de Guang-Ping et al. (2017),¹⁴⁰ que utilizaram sensores de cantileveres na detecção de Hg²⁺ em solução aquosa e verificaram que com o aumento da concentração (1ng.mL⁻¹ a 200 ng.mL⁻¹) ocorre um aumento da inclinação da curva de

deflexão. No estudo de Martinazzo.(2017),¹⁰⁵ utilizou nanobiossensor de cantilever funcionalizado com extrato bruto de enzima tirosinase, também foi possível observar uma tendência no aumento da tensão de compressão de superfície (tensão negativa) com o aumento da concentração de atrazina, este fenômeno ocorre pela interação da enzima tirosinase imobilizada no cantilever com o herbicida.

Através dos resultados obtidos na **Figura 16** pode-se calcular a diferença de deflexão entre a maior concentração (100 ppb) e a menor (0,001 ppb) que foi aproximadamente de 74 nm. Esta diferença pode estar relacionada com a adsorção da atrazina na superfície funcionalizada dos cantileveres. A resposta do nanobiossensor ao longo do tempo foi decorrente da adsorção do analito na superfície funcionalizada, onde ocorreu uma curvatura do cantilever (deflexão) que foi causada por uma tensão de compressão, resultante de uma repulsão ou expansão de moléculas.

O nanobiossensor funcionalizado com a enzima tirosinase comercial e o ácido 11-MUA apresentou maior diferença de deflexão do que o nanobiossensor de cantilever utilizando enzima tirosinase e ácido 16-AMHD.

4.2.1. Sensitividade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação.

A **Tabela 4** apresenta valores de limite de detecção (LD), sensibilidade e coeficiente de correlação (R^2) e limite de quantificação (LQ), obtidos através da curva de calibração de diferentes concentrações de atrazina, para os nanobiossensores de cantileveres funcionalizados com a enzima tirosinase e os ácidos 16-AMHD e o 11-MUA.

Tabela 4: Sensitividade, Valores de limite de detecção (LD), Coeficiente de Correlação (R^2) e Limite de Quantificação (LQ) dos nanobiossensores de cantileveres funcionalizados com a enzima tirosinase os ácidos 16-AMHD e o 11-MUA.

Ácido (tiol)	Sensitividade (nm/ ppb)	LD (ppb)	Coeficiente de Correlação (R^2)	LQ (ppb)
16-AMHD	9,79 ± (0,031)	0,043	0,99	0,14
11-MUA	15,05± (0,013)	0,038	0,98	0,12

As curvas de calibração mostraram uma boa linearidade avaliada pelo fator de determinação (R^2), no intervalo das concentrações estudadas. Um valor de R^2 elevado (perto de 1,0) foi encontrado para ambos nanobiossensores de cantileveres (Anexo A)¹⁴¹.

Levando em consideração o limite máximo permitido do herbicida atrazina em água potável e dos resultados obtidos, observa-se que os nanobiossensores de cantileveres conseguem detectar a presença do herbicida bem abaixo da concentração máxima permitida pela legislação de 2 ppb.⁴¹ Então, desta forma, pode-se afirmar que os limites de detecção encontrados neste trabalho foram aceitáveis quando comparados ao limite máximo permitido do herbicida atrazina em água potável.

Em relação a sensibilidade dos nanobiossensores de cantileveres, foi obtida por meio do coeficiente angular da concentração versus deflexão. O nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase utilizando ácido 16-AMHD foi o que apresentou menor sensibilidade (9,79 ppb), quando comparado ao nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase utilizando ácido 11-MUA. Também apresentou maior limite de detecção (0,15 ppb) e menor limite de quantificação (0,12 ppb) sendo possível então, observar que, o nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase utilizando ácido 11-MUA desenvolvido neste estudo apresenta maior capacidade de detecção do herbicida atrazina em água.

4.2.2. Resposta de Reversibilidade dos Nanobiossensores de Cantilever

A reversibilidade é a capacidade dos nanobiossensores de retornar ou não a sua condição inicial mesmo depois de finalizada a interação entre a superfície do funcionalizada do cantilever e a solução de atrazina, durante várias medições (3 ciclos).

A resposta da reversibilidade foi avaliada utilizando água ultrapura (branco) e a solução de atrazina 10 ppb em água ultrapura para os nanobiossensores de cantileveres funcionalizados utilizando enzima tirosinase e os ácidos 16-AMHD e 11-MUA em sua funcionalização (**Figura 17 e 18**).

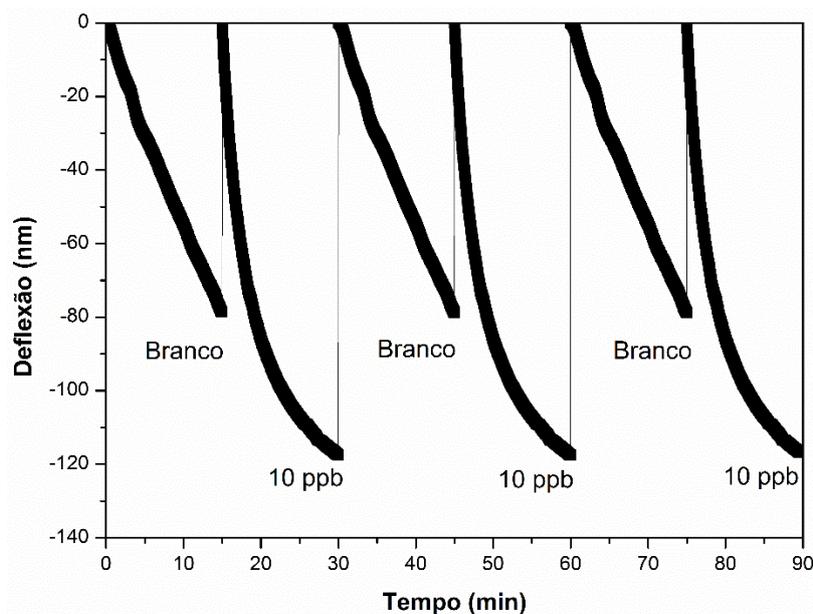


Figura 15: Reversibilidade dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com a enzima tirosinase comercial e o ácido 16-AMHD avaliados em 3 ciclos, usando a água ultrapura (branco) e concentração de solução de atrazina 10 ppb .

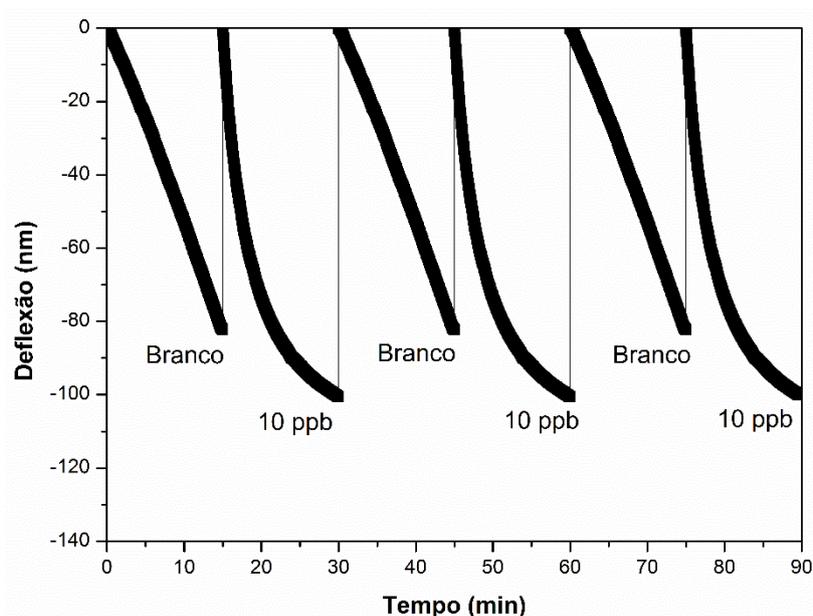


Figura 16: Reversibilidade dos nanobiossensores de cantileveres funcionalizados com a enzima tirosinase comercial e o ácido 11-MUA avaliados em 3 ciclos, usando água ultrapura (branco) e a concentração de solução atrazina 10 ppb .

Os valores de reversibilidade obtidos (**Equação 4**) foram de aproximadamente 100 % para os nanobiossensores estudados, durante 3 ciclos alternando a exposição da

solução de 10 ppb do padrão de atrazina e água ultrapura. Assim, baseado neste estudo foi possível observar (**Figura 17 e 18**) que os nanobiossensores funcionalizados com enzima tirosinase utilizando tanto o ácido 16-AMHD quanto o ácido 11-MUA foram capazes de retornar à condição inicial após o contato com o analito.

4.2.3. Resposta da Estabilidade dos Nanobiossensores de Cantilever

A estabilidade foi estudada no período de 30 dias (**Figuras 19 e 20**) com a finalidade de verificar quanto tempo os nanobiossensores de cantileveres permaneceriam respondendo ao analito estudado.

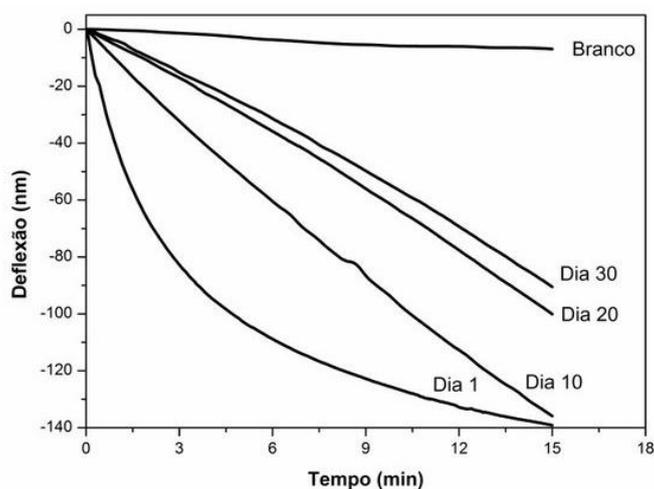


Figura 17: Estabilidade do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase comercial e o ácido 16-AMHD.

Analisando a **Figura 19** foi possível observar que no nanobiossensor de cantilever funcionalizados com a enzima tirosinase comercial usando o ácido 16-AMHD apresentou resposta no primeiro dia de estudo até praticamente o 10º dia, diminuindo sua estabilidade no decorrer dos dias seguintes até o 30º. Rigo et al. (2019)¹⁴³ também avaliou a resposta de um nanobiossensor de cantilever funcionalizado pela técnica SAM, utilizando o ácido 16-AMHD e enzima urease durante 30 dias de armazenamento e verificaram uma diminuição da sensibilidade no decorrer dos dias.

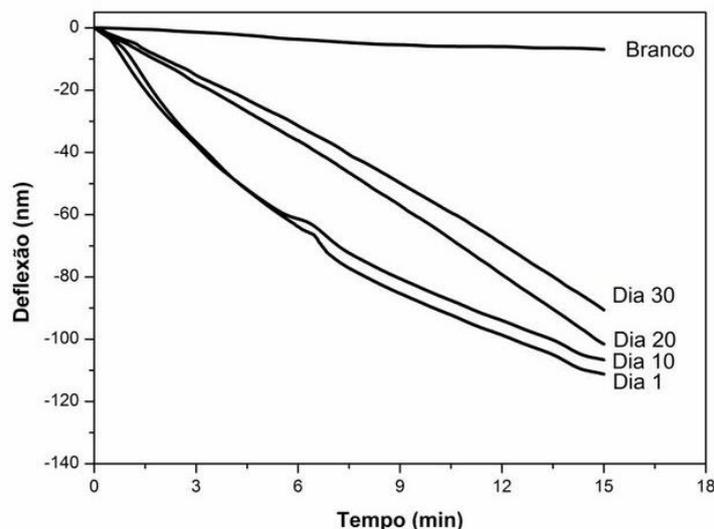


Figura 18: Estabilidade do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase comercial e o ácido 11-MUA.

Analisando a **Figura 20** foi possível observar que no nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase comercial usando o ácido 11-MUA apresentou respostas de deflexão do 1º dia até o 10º dia de estudo, diminuindo sua estabilidade após este período seguintes até o 30º. Comparando o nanobiossensor utilizando o ácido 11-MUA em sua funcionalização com o anterior ele foi mais eficaz, pois respondeu por mais tempo e o ideal é que um nanobiossensor seja utilizado por um período maior.

Com base nos resultados acima de estabilidade para ambos nanobiossensores que avaliamos novamente a estabilidade em um período de sete dias, realizando a leitura com intervalo entre cada dia afim de verificar melhor em até qual dia os nanobiossensores de cantileveres ainda estariam respondendo visto, que somente o nanobiossensor de cantilever utilizando o ácido 11-MUA havia apresentado resposta no 10º dia.

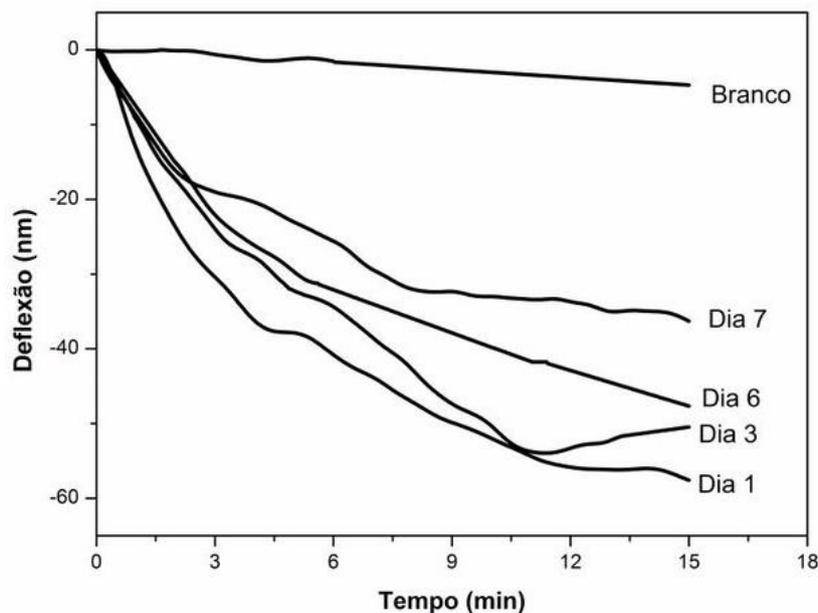


Figura 19: Estabilidade do nanobiossensor de cantilever funcionalizados com a enzima tirosinase comercial e o ácido 16-AMHD em um intervalo de sete dias.

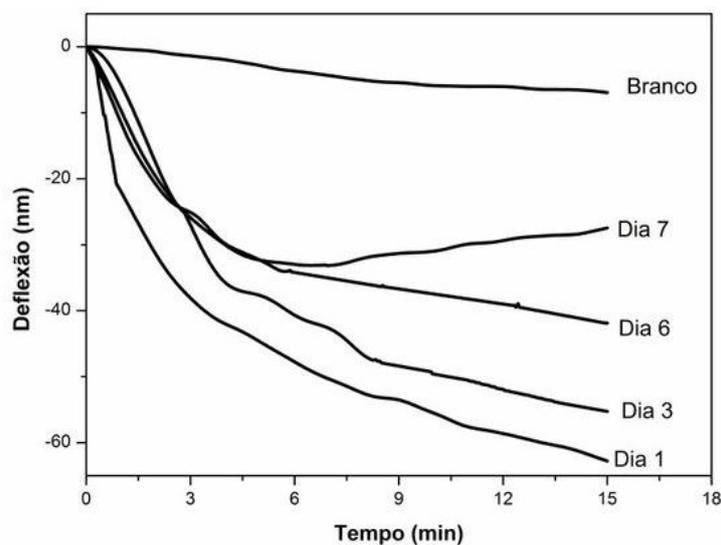


Figura 20: Estabilidade do nanobiossensor de cantilever funcionalizados com a enzima tirosinase comercial e o ácido 11-MUA em um intervalo de sete dias.

Foi possível verificar através das (**Figuras 21 e 22**) que ambos nanobiossensores funcionalizados com diferentes ácidos reagiram até o sétimo dia. Porém, quando utilizado o ácido 11-MUA em funcionalização o nanobiossensor de cantilever apresentou uma maior resposta (deflexão) no primeiro dia de avaliação.

A **Figura 23** apresenta o percentual de perda de sensibilidade dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com enzima tirosinase e diferentes tióis em 7 dias de armazenamento calculado em relação a sensibilidade do primeiro dia de análise.

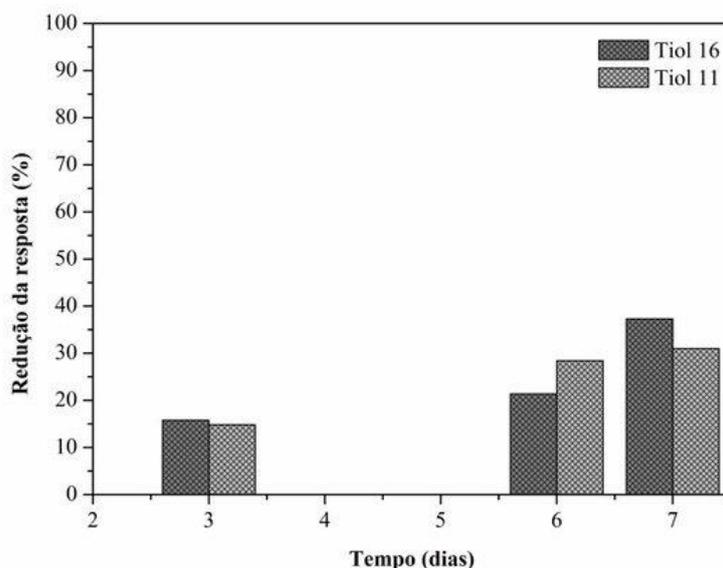


Figura 21: Perda de sensibilidade (%) dos nanobiossensores de cantileveres funcionalizados com enzima tirosinase e diferentes tióis durante 7 dias de armazenamento.

Pela **Figura 23** é possível verificar que a maior perda de sensibilidade ao sétimo dia de armazenamento foi para o nanobiossensor de cantilever utilizando ácido/tiol 16-AMHD (38 %), e a menor foi para o nanobiossensor funcionalizado com o ácido/tiol 11MUA (30 %). Foi possível observar que no terceiro dia de armazenamento ambos nanobiossensores de cantileveres perderam aproximadamente 15 % de resposta, enquanto no sexto dia o nanobiossensor utilizando o ácido 11-MUA perdeu maior estabilidade (29%) quando comparado ao nanobiossensor com a utilização do ácido 11-MUA (22%). Porém, do sexto até o sétimo dia o nanobiossensor na presença do ácido 11-MUA se manteve praticamente constante, sem perda de estabilidade enquanto o nanobiossensor com o ácido 16-AMHD perdeu mais um pouco de sua estabilidade. Então, é possível evidenciar pelos dados realizados de estabilidade que o nanobiossensor de cantilever utilizando o ácido 11-MUA responde com maior eficaz e estabilidade no sétimo dia de análise.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram uma boa imobilização (funcionalização) da enzima tirosinase frente aos tióis utilizados pois, ambos nanobiossensores apresentaram respostas satisfatórias quando comparados a literatura. Porém, a perda de estabilidade ocorre devido a algumas mudanças climáticas, tempo de estocagem que podem levar a desnaturação da enzima na superfície do suporte diminuindo sua vida útil, afetando a resposta dos nanobiossensores.¹⁴⁴

4.2.4. Resposta da Avaliação dos Nanobiossensores de Cantileveres em Amostra Real de Pesticida para Aplicação no Campo.

As aplicações práticas dos nanobiossensores cantileveres requerem que funcionem bem em condições reais. A água do poço artesiano avaliado continha pesticida atrazina-simazina, para aplicação no campo, pelo que foi diluída com água ultrapura, nas mesmas condições da curva de calibração. 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 de cantilever entre o branco e as diferentes concentrações de atrazina em água ultrapura (branco).

A resposta dos nanobiossensores cantilever foi avaliada em diferentes concentrações (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 ppb) de atrazina. As **figuras 24 e 25** mostram uma diminuição gradual dos valores de deflexão dos nanobiossensores de cantilever com o aumento da concentração de atrazina.

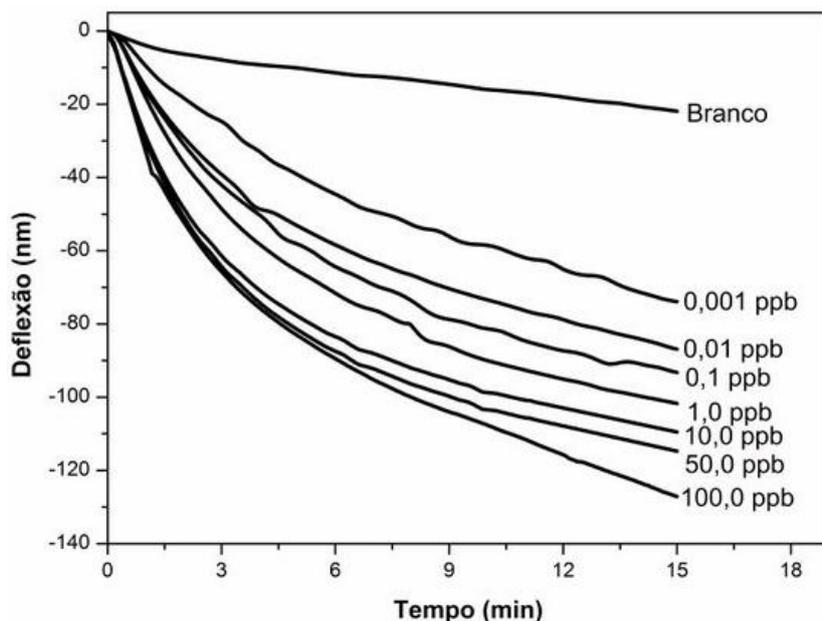


Figura 22: Resposta da avaliação do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com enzima tirosinase e ácido 16-AMHD para atrazina em amostra real de pesticida para aplicação em campo.

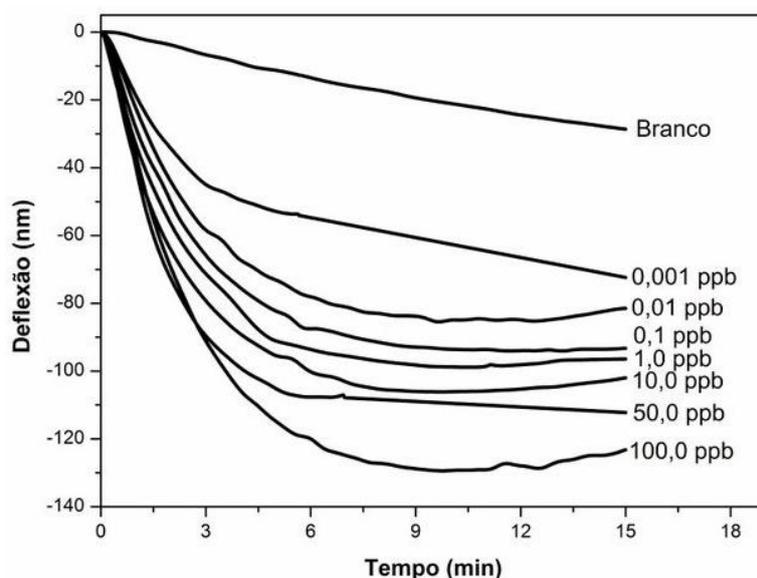


Figura 23: Resposta da avaliação do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com enzima tirosinase e ácido 11-MUA para atrazina em amostra real de pesticida para aplicação em campo.

Avaliando as **Figuras 24** e **25** observa-se diferença de deflexão entre a água ultrapura (branco) e as diferentes concentrações, isto indica que os dispositivos

conseguem detectar a presença da amostra de atrazina em amostra real de água de pesticida, mostrando a eficaz funcionalização pelo método SAM utilizando diferentes tióis e enzima tirosinase. Quando comparado a resposta entre os nanobiossensores com diferentes tióis é possível observar que o nanobiossensor utilizando o ácido 11-MUA com a enzima tirosinase o mesmo apresentou resposta na menor concentração avaliada enquanto o nanobiossensor utilizando o ácido 16-AMHD parece não ter mais deflexão (resposta) para a atrazina em amostra real de água para pesticidas. O que pode ser justificado pela diferença do comprimento da cadeia alquílica, que quanto menor cadeia alquílica, maior rigidez, transmite o stress com maior eficiência, maior deflexão do nanobiossensor. Então, quanto menor o comprimento, maior é a tensão superficial. Assim, a sensibilidade nanobiossensor de cantilver aumenta com a diminuição do comprimento da cadeia do ligante.¹⁷

O mesmo pode-se observar através da curva padrão nas **Figuras 15 e 16** que ambos os cantileveres funcionalizados apresentaram resposta para menor concentração avaliada do padrão atrazina diluído em água ultrapura e que quanto maior a interação do herbicida (maior concentração) com o nanobiossensor de cantilver, maior a deflexão observada, essa diferença de deflexão com as diferentes concentrações de atrazina é decorrente da interação da enzima tirosinase imobilizada no cantilver com o herbicida. As respostas de recuperação obtidas pelos nanobiossensores cantilevers mostraram percentagens de 100-109% (**Tabela 5**), sugerindo a determinação precisa e fiável da atrazina em amostras reais. Estes resultados confirmam que não há atrazina na água subterrânea (água de poços artesianos). Assim, os resultados obtidos com os nanobiossensores coincidem com as adições comerciais de atrazina feitas nas amostras reais (em pulverizador para aplicação no campo). Ambos os valores de desvio padrão relativo (RDS) foram satisfatórios, são inferiores a 1,76 (n=3).

Tabela 5: A recuperação de nanobiosensores de cantileveres revestidos com tiol 11-MUA e tiol 16-AMHD em amostras reais de água (n = 3).

Concentração adicionada de atrazina em amostra real (ppb)	Tiol 11			Tiol 16		
	Concentração de atrazina determinada por nanobiosensor (ppb)	Recuperação (%)	RDS (%)	Concentração de atrazina determinada por nanobiosensor (ppb)	Recuperação (%)	RDS (%)
0.01	0.001	104	0.451	0.001	106	1.766
0.01	0.016	106	0.792	0.011	108	0.654
0.1	0.102	102	0.894	0.109	109	0.583
1	1.067	107	0.846	1.019	109	0.177
10	10.071	107	1.003	10.015	102	1.580
50	49.928	100	1.106	50.083	101	0.487
100	100.728	101	1.568	100.099	102	2.116

O que pode ser justificado pela diferença da cadeia pois, quanto menor cadeia alquílica, que tem maior rigidez, transmite o stress com maior eficiência, maior deflexão. Então, quanto menor o comprimento, maior é a tensão superficial. Assim, a sensibilidade do sensor de cantilever aumenta com a diminuição do comprimento da cadeia do ligante.¹⁷

Desta forma, esta descoberta sugere que os nanobiosensores de cantileveres devem ser capazes de detectar a contaminação por pesticidas na água natural sem comprometer os limites de detecção devido à interferência da matriz ambiental.

4.2.5. Análise de interferentes nos nanobiosensores de cantilvers funcionalizados

A seletividade dos nanobiosensores de cantileveres funcionalizados foi avaliada com a finalidade de verificar a capacidade dos dispositivos funcionalizados em determinar com precisão a atrazina na presença de outros componentes na amostra de água real. Foram adicionadas diferentes interferentes, tais como teflubenzuron,

atrazina+simazina e sulfentrazone em água ultrapura na concentração de 0,1 ppb , juntamente com uma amostra de água ultrapura (branco), como pode ser observado nas **Figuras 26 e 27**.

Nas **Figuras 26 e 27** foi possível observar que, o teflubenzurom e o sulfentrazone não causaram influência na resposta do nanobiossensor pois, o seu comportamento foi semelhante ao branco (água ultrapura). Observamos também que quando utilizamos o nanobiossensor de cantilever utilizando ácido 11-MUA e enzima tirosinase o mesmo apresentou maior resposta de deflexão a atrazina quando comparado com o nanobiossensor utilizando o ácido 16-AMHD e enzima tirosinase. Com os resultados obtidos é possível verificar a eficiência do método SAM utilizando um tiol de cadeia alquílica menor (ácido 11-MUA) quando comparado ao ácido 16-AMHD para aplicação nos nanobiossensores de cantilever sendo, uma boa alternativa aos métodos convencionais de detecção de atrazina em amostras reais.

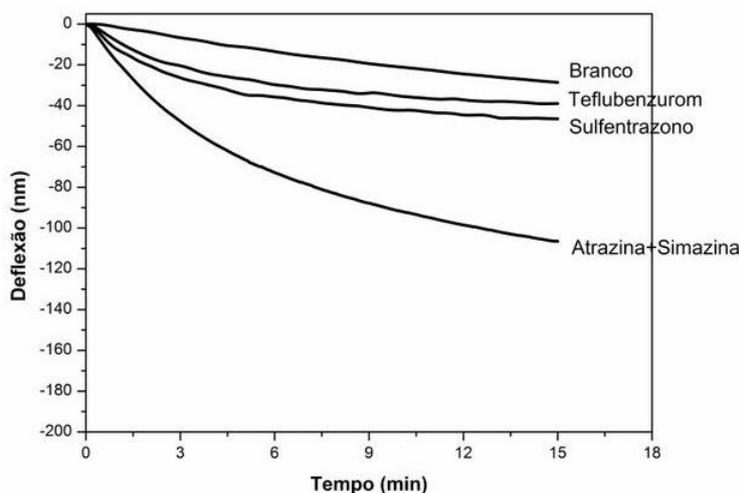


Figura 24: Resposta da análise de interferentes do nanobiossensor de cantilver funcionalizado com enzima tirosinase e ácido 16-AMHD.

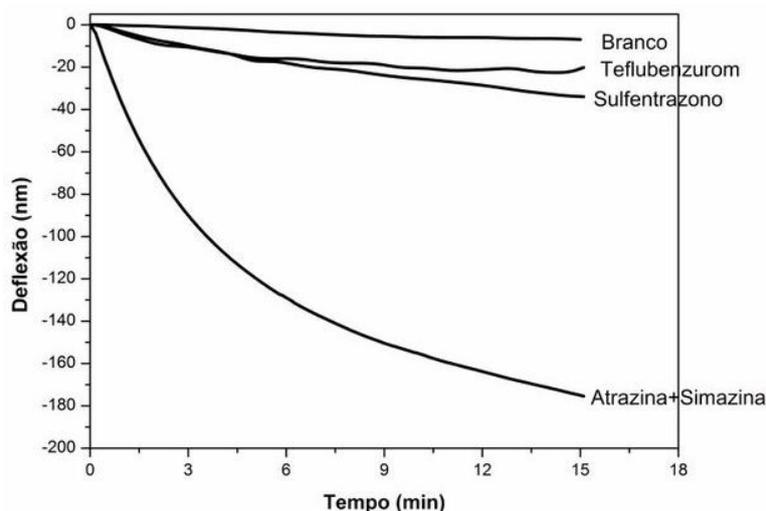


Figura 25: Resposta da análise de interferentes do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com enzima tirosinase e ácido 11-MUA.

A selectividade foi avaliada pela razão R ($\Delta D_n / \Delta D_0$) da alteração de deflexão ΔD_n ($D_n - D_{\text{atrazina}}$) induzida pelas substâncias interferentes no sistema de dois componentes versus a alteração de deflexão ΔD_0 ($D_{\text{atrazina}} - D_0$) para 0,1 ppb, onde D_0 e D_{atrazina} se referem à deflexão antes e depois da resposta em 0,1 ppb atrazina, D_n é a deflexão do sistema de dois componentes incluindo 0,1 ppb atrazina (padrão obtido da curva de calibração), atrazina + simazina, e teflubenzurão e sulfentrazone. A diferença de deflexão entre o branco e a deflexão de atrazina + simazina para o nanobiossensor funcionalizado com o ácido 16-AMHD foi de 80 nm. Enquanto a diferença de deflexão entre o branco e o pesticida teflubenzuron para o mesmo nanobiossensor foi de 11 nm, o que demonstra a selectividade e a afinidade do nanobiossensor em detectar presença de atrazina.

A diferença de deflexão entre o branco e a concentração atrazina + simazina para o nanobiossensor funcionalizado com o ácido 11-MUA foi de 131 nm. Enquanto a diferença de deflexão entre o branco e o pesticida teflubenzuron para o mesmo nanobiossensor foi de 23 nm, o que demonstra a seletividade e a afinidade do nanobiossensor em detectar presença de atrazina.

Porém, se compararmos os valores de deflexão entre nanobiossensores funcionalizados observa-se que quando utilizado ácido 11-MUA teve maior deflexão em relação a atrazina + simazina do que o nanobiossensor utilizando o ácido 16-MUA, o motivo pode

ser explicado pelo fato da enzima tirosinase se ligar às moléculas de atrazina com maior afinidade e especificidade de ligação.

Os resultados experimentais mostraram que as sensibilidades dos nanobiossensores de cantileveres funcionalizados pela técnica SAM variaram de perfil para o mesmo analito alvo. Isso pode ser explicado pela diferença entre os alcanotióis utilizados que apesar de possuírem mesmo grupo terminal de ácido carboxílico, tem diferentes comprimentos de cadeias alquílicas (11C e 16 C). Sabendo-se que a cadeia alquílica é flexível e a que a sensibilidade aumenta com a diminuição do comprimento da cadeia do ligante é justificável o nanobiossensor utilizando o ácido 11-MUA apresentar melhor sensibilidade em relação ao analito alvo atrazina.

Nanobiossensores de cantileveres que utilizam para imobilização de enzimas cadeias alquílica mais curta, produzem maior rigidez, transmitindo stress mais eficiente. Assim, um nanobiossensor com uma cadeia alquílica mais curta entre a superfície e a enzima tem maior sensibilidade devido a uma transmissão eficaz do stress.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DOS NANOBIOSENSORES DE CANTILEVERS

4.3.1. Morfologia

A microscopia eletrônica de varredura (SEM) é amplamente utilizado devido ao seu alto poder de resolução e grande profundidade de foco. A **Figura 28** apresenta as micrografias em alta resolução, da superfície durante as etapas de deposição das camadas sensoras dos nanobiossensores funcionalizados com enzima tirosinase comercial usando tanto o ácido 16-AMHD quanto o ácido 11-MUA.

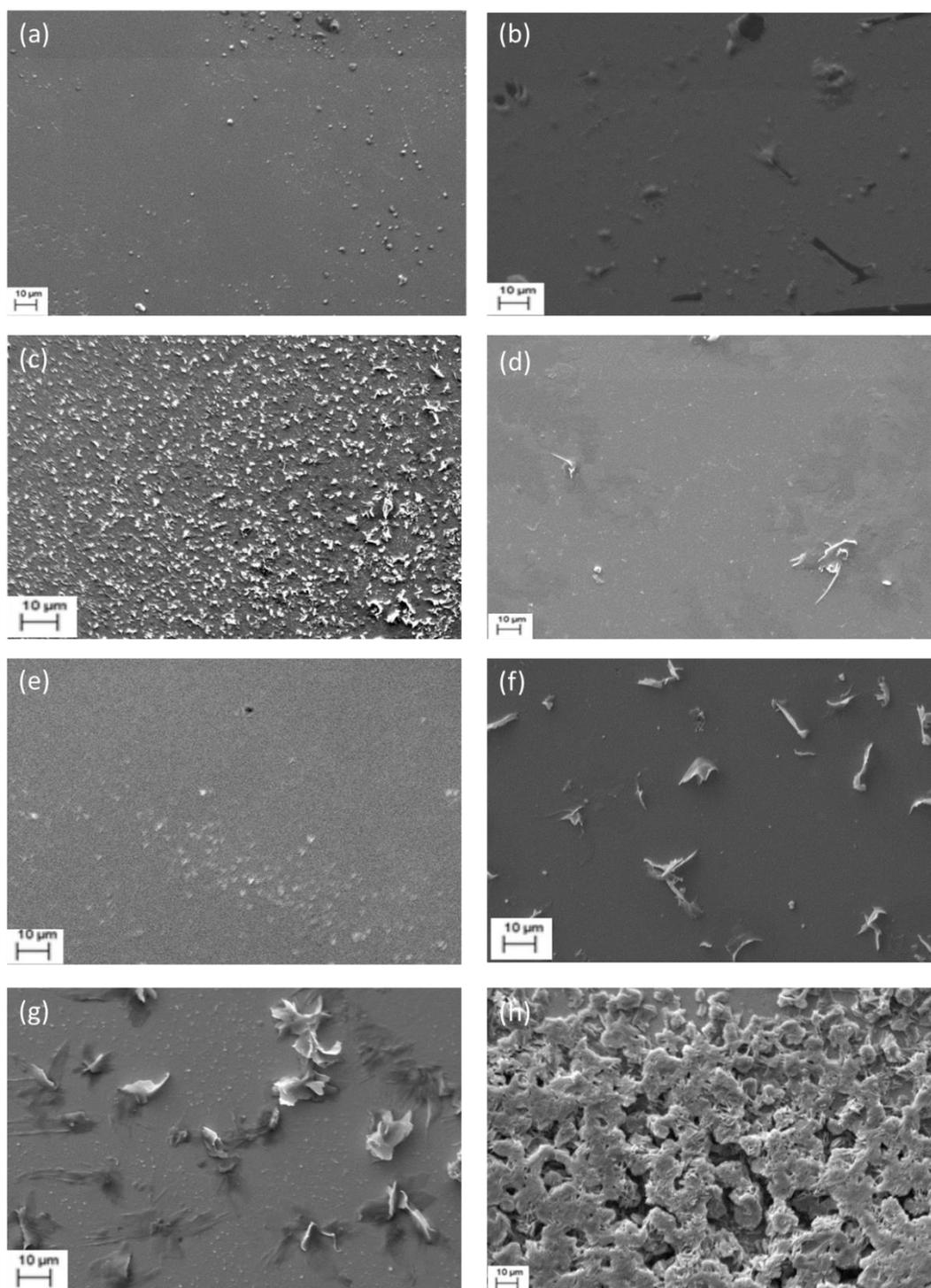


Figura 26: Micrografias das superfícies do cantileveres durante as etapas de construção dos nanobiossensores funcionalizados com enzima tirosinase comercial e os ácidos 16—AMHD e 11-MUA: (a) Silício (sem funcionalização), (b) deposição das camadas de Ouro, (c) placa de silício + ouro + ácido 16—AMHD (tiol 16), (d) placa de silício + ouro + ácido 11-MUA (tiol 11), (e) placa de silício + ouro + ácido 16—AMHD (tiol 16) + EDC/NHS, (f) placa de silício + ouro + ácido 11—AMHD (tiol 16) + EDC/NHS, (g)

placa de silício + ouro + ácido 16—AMHD (tiol 16) + EDC/NHS + enzima, (h) placa de silício + ouro + ácido 11—MUA (tiol 11) + EDC/NHS + enzima.

As micrografias da **Figura 28 (a e b)** correspondem a superfície do silício (sem funcionalização) e a deposição da camada de ouro, respectivamente, que pode ser observado uma superfície lisa em ambos e uma boa deposição da camada de ouro.

A partir da deposição do tiol 16-AMHD **Figura 28 (c)** e do EDC/NHS **Figura 28 (e)**, observa-se que a superfície está recoberta, mas com uma presença de aglomerados, uma superfície rugosa, com a presença de pequenas partículas. Essa mudança é atribuída aos grupos do conjugado de tiol com a camada de ouro (sobre a superfície do cantilever) por ligação covalente. Os grupos amina (NH_3) alteraram a superfície com uma camada superficial bem distribuída.¹⁴³ Porém na última camada de funcionalização, incorporando a enzima tirosinase **Figura 28 (g)**, apresenta uma formação de aglomerados de maior tamanho e mais dispersos, mesmo assim observa-se que a placa ficou bem recoberta, com uma boa funcionalização.

Na **Figura 28 (d)** com a deposição do tiol 11-MUA é possível observar um bom recobrimento da superfície, o que demonstra uma boa ligação, mas diferentemente do observado na **Figura 28 (c)** com a deposição do tiol 16-AMHD, apresenta uma superfície recoberta mais uniforme, mais homogênea, quase sem partículas ou aglomerados. Na **Figura 28 (f)** com a presença do EDC/NHS, podemos observar que a superfície permanece muito bem recoberta, o que indica uma boa eficácia da funcionalização, da técnica SAM. Para finalizar o desenvolvimento do nanobiossensor de cantilever utilizando tiol 11-MUA na **Figura 28 (h)** temos a deposição da enzima tirosinase comercial sendo possível observar uma grande diferença do que quando usada como última etapa no nanobiossensor de cantilever usando tiol 16-AMHD. Nesta figura é possível visualizar claramente deposição superficial mais uniforme, quase totalmente preenchida, formando assim uma camada homogênea, o que é muito importante, devido a adsorção de moléculas na superfície.

As monocamadas automontadas de cadeias longas de alcanotiol ($n \geq 10$ carbonos) em contato com o ouro são estáveis ao ar, água e solventes orgânicos à temperatura ambiente. O uso do ácido 11-MUA no desenvolvimento do nanobiossensor de cantilver, demonstrou ao longo do estudo resultados relevantes quando comparado ao uso do ácido

16-AMHD, o que demonstra ser eficaz o uso deste tiol na funcionalização de nanobiossensores de cantileveres através da técnica SAMs.

4.3.2. Topografia e Rugosidade

A **Figura 29** apresenta as imagens topográficas, em 3D, obtidas nas diferentes etapas de funcionalização da superfície dos cantileveres para a obtenção dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com enzima tirosinase e os ácidos 16-mercaptohexadecanóico e 11-mercaptoundecanóico.

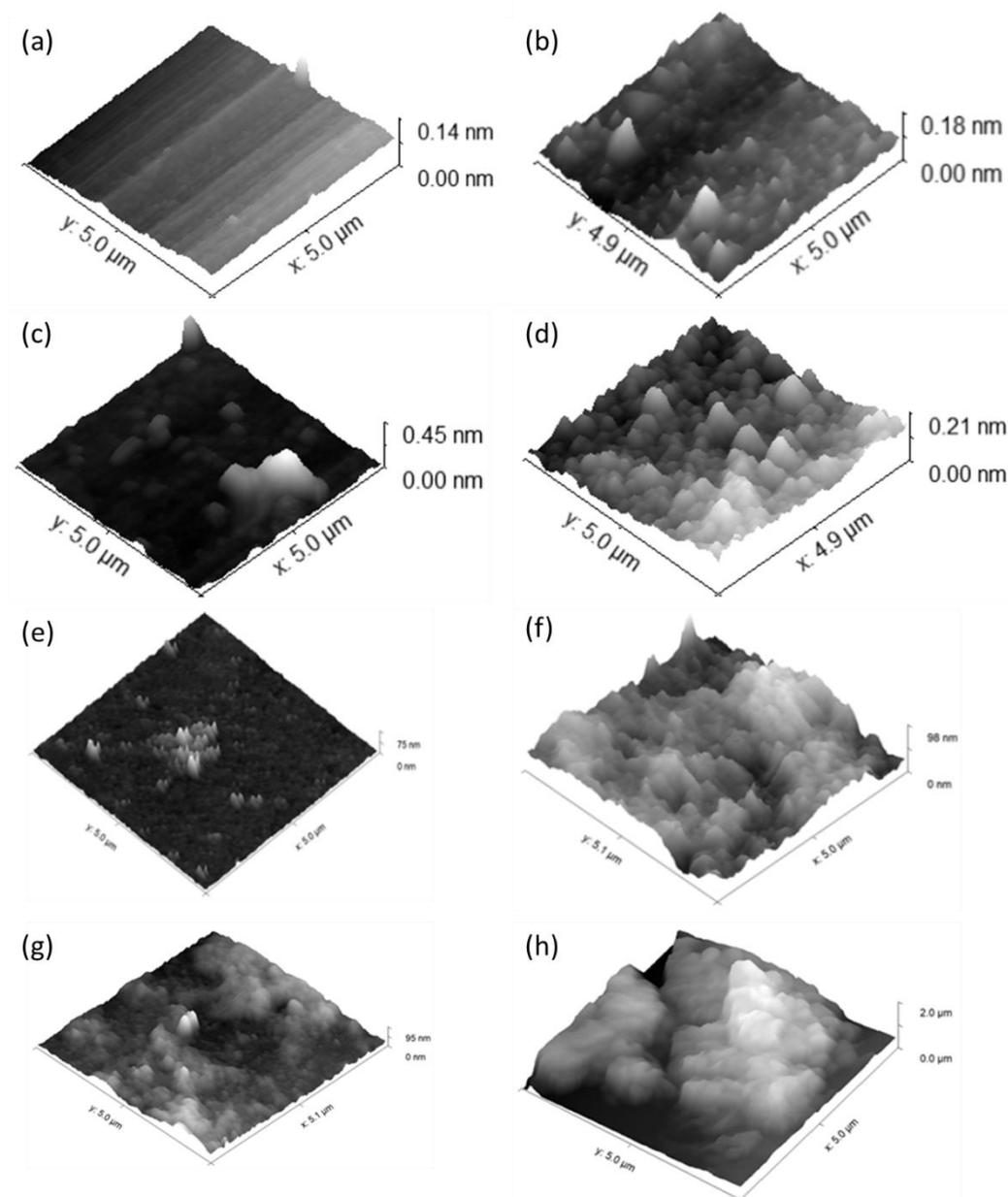


Figura 27: Imagens de AFM, em 3D, da superfície do cantilever durante as etapas de funcionalização. (a) Silício (sem funcionalização), (b) deposição das camadas de Ouro, (c) placa de silício + ouro + ácido 16—AMHD (tiol 16), (d) placa de silício + ouro + ácido 16—AMHD (tiol 16) + EDC/NHS, (e) placa de silício + ouro + ácido 11-MUA (tiol 11), (f) placa de silício + ouro + ácido 11—MUA (tiol 11) + EDC/NHS, (g) placa de silício + ouro + ácido 11—MUA (tiol 11) + EDC/NHS + enzima, (h) placa de silício + ouro + ácido 16—AMHD (tiol 16) + EDC/NHS + enzima.

Na **Figura 29** pode-se observar diferenças topográficas em cada etapa de funcionalização da superfície dos dois nanobiossensores de cantileveres (um com o uso

de tiol 11-MUA e outro com o uso do tiol 16-AMHD juntamente com a enzima tirosinase comercial). Analisando a **Figura 29 (a)** contendo apenas silício, verifica-se uma superfície homogênea, característica do próprio material, na **Figura 29 (b)** pode-se observar que com a deposição do ouro obtivemos uma superfície com aglomerados, provenientes do próprio processo de deposição do ouro. Nas imagens representadas em **Figura 29 (c)** e em **Figura 29 (d)**, verifica-se o aparecimento de agrupamentos irregulares, sendo mais abundante na camada funcionalizada com a presença de EDC/NHS junto ao tiol 16-AMHD. Uma morfologia semelhante é possível observar também, nas imagens fornecidas pelas **Figuras 29 (e) e (f)**, onde a adição de agentes reticulantes junto ao tiol 11-MUA geram a presença de agrupamentos, porém não tão irregulares e picos mais baixos do que os observados na **Figura 29 (d)** com a presença do tiol 16-AMHD. Com a adição da enzima tirosinase comercial é possível observar na **Figura 29 (g) e Figura 29 (h)**, que apresentam uma morfologia mais homogênea em relação a picos e vales, porém esta homogeneidade é mais evidente quando utilizada a enzima tirosinase na presença do tiol 11-MUA (**Figura 29 (g)**). 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.⁴

Foi calculado a partir das imagens topográficas 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 nanobiossensores utilizando diferentes tióis (**Tabela 6**). O cálculo da rugosidade leva em conta a diferença entre a dimensão destes componentes da superfície.¹⁴⁵

Tabela 6: Valores da raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) das superfícies em cada etapa de construção dos nanobiossensores funcionalizados com os ácidos 11-MUA e 16-AMHD.

Etapa	Rms (nm)	
	16	11
Sílicio	19,26 ± (0,48)	
Sílicio+Ouro	22,01 ± (1,31)	
	Tiol	
	16	11
Sílicio+Ouro+Tiol	50,89 ^a ± (2,94)	37,18 ^b ± (0,40)
Sílicio+Ouro+Tiol+EDC/NHS	43,89 ^b ± (3,24)	65,55 ^a ± (4,75)
Sílicio+Ouro+Tiol+EDC/NHS+Tirosinase	61,94 ^a ± (1,84)	75,91 ^b ± (1,82)

*Dados apresentados como média (três repetições) ± Desvio Padrão. Letras iguais na linha indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (teste de T-Student).

Com a deposição da camada de ouro ocorreu um pequeno aumento de rugosidade em relação a superfície de silício, o que pode estar relacionada a formação de conglomerados ocorrido pela deposição de átomos de ouro através da técnica de *Sputtering*. Possivelmente esses conglomerados se depositaram nas regiões de vale, existentes na superfície de silício, preenchendo os espaços vazios.¹⁴⁶

Com a adição da camada de tióis em ambos nanobiossensores de cantileveres, foi possível observar que houve um aumento da rugosidade e este aumento pode ser devido aos tióis possuírem alta afinidade pelo ouro, tendo uma grande probabilidade de se depositarem nas regiões de picos, as quais estão mais expostas. Também, notamos que este aumento de rugosidade foi maior na utilização do tiol 16-AMHD do que quando utilizado o tiol 11-MUA, talvez este fato se explica pelo tiol 16-AMHD ser uma molécula de cadeia longa, o que influencia para o aumento da rugosidade.¹⁴³

Um aumento de rugosidade também pode ser observado quando foi adicionado a mistura dos agentes reticuladores de EDC/NHS ao tiol 11-MUA, o que pode estar relacionado a acomodação das moléculas, em função da inserção de novos grupos funcionais que ficam expostos na superfície.¹⁴⁷ Porém ocorreu uma diminuição da rugosidade quando adicionado estes agentes junto ao tiol 16-AMHD.

Na última etapa de funcionalização onde ocorre a deposição da enzima tirosinase, resultou uma redução da rugosidade quando utilizado junto ao tiol 16-AMHD, o que pode ser devido ao preenchimento dos espaços vazios e, assim, formando uma camada mais

homogênea. Não ocorreu o mesmo quando adicionamos enzima a camada funcionalizada utilizando o tiol 11-MUA, que apresentou um aumento muito significativo na rugosidade. Aumentando a rugosidade da superfície gera um aumento na área de contato da enzima, o que proporciona uma melhora significativa da transferência de elétrons entre os mesmos, uma propriedade muito importante para biossensores. Alonso et al. (2016)¹⁴⁸ também observaram a redução dos valores de rugosidade (Rms), quando depositaram enzima glicose oxidase (GOX) em uma superfície de platina pela técnica de SAM.

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, neste estudo a funcionalização foi realizada de forma eficiente.

4.3.3. Espessura

A **Tabela 7** apresenta os valores de espessura para nanobiossensores de cantilever funcionalizados com diferentes tióis e enzima tirosinase comercial.

Tabela 7: Valores de espessura para nanobiossensores de cantilever funcionalizados com diferentes tióis e enzima tirosinase comercial.

Camada	Espessura (nm)
TIOL 16-AMHD+ENZIMA	76±2
TIOL 11-MUA +ENZIMA	58±1,7

A medida da espessura entre a camada sensora e a superfície não funcionalizada (contendo somente silício), apresentou um valor médio de 76±2 nm quando utilizamos tiol 16-AMHD na funcionalização e de 58±1,7 nm quando utilizamos tiol 11-MUA na funcionalização (**Tabela 7**). A diminuição da rugosidade mostra a formação de uma camada de preenchimento, a onde foi capaz de preencher os espaços vazios, formando uma superfície mais homogênea e que a diferença nos valores de rugosidade da superfície mostra que ocorreu a deposição de camadas sobre a superfície do silício, indicando que a funcionalização pela técnica SAM foi eficiente.

Com os valores obtidos é possível verificar que ambas camadas sensoras desenvolvidas encontram-se em escala nanométrica, ou seja, de até 100 nm¹⁴⁹ favorecendo a construção de dispositivos de sensoriamento pela grande área superficial, o que aumenta a sensibilidade. Alonso et al. (2016)¹⁴⁸ também observaram a redução dos valores de rugosidade (Rms), realizando a deposição de uma outra enzima sobre uma superfície de platina, também realizada pela mesma técnica SAM.

4.3.4. Grupos Funcionais- Espectros de Absorção de Reflexão por Infravermelho Modulada por Polarização (PM-IRRAS)

A adsorção das camadas foi monitorada utilizando a técnica PM-IRRAS, através das bandas características de grupos funcionais pertencentes a cada material com o intuito de verificar a interação e comprovar a adsorção dos materiais na superfície da camada.

Foram utilizados no processo de funcionalização pela técnica SAM agentes reticulantes que auxiliaram para a imobilização da enzima tirosinase comercial sobre a superfície do ácido 16-AMHD e do ácido 11-MUA em ambos nanobiossensores desenvolvidos. Os agentes reticulantes EDC/NHS atuaram favorecendo a reação dos grupos carboxílicos dos ácidos 16-AMHD e do 11-MUA com os grupos amina da enzima, formando ligações amida estáveis.

As **figuras 30 (a) e 30 (b)** indicam, respectivamente, espectros PM-IRRAS para as monocamadas formadas por Tiol 11-MUA/Tirosinase e Tiol 16-AMHD/Tirosinase na região entre 1200 e 1720 cm⁻¹.¹⁵⁰⁻¹⁵³ Esta região, é característica onde são encontrados tióis e enzima tirosinase, as quais são atribuídas na **Tabela 8**.

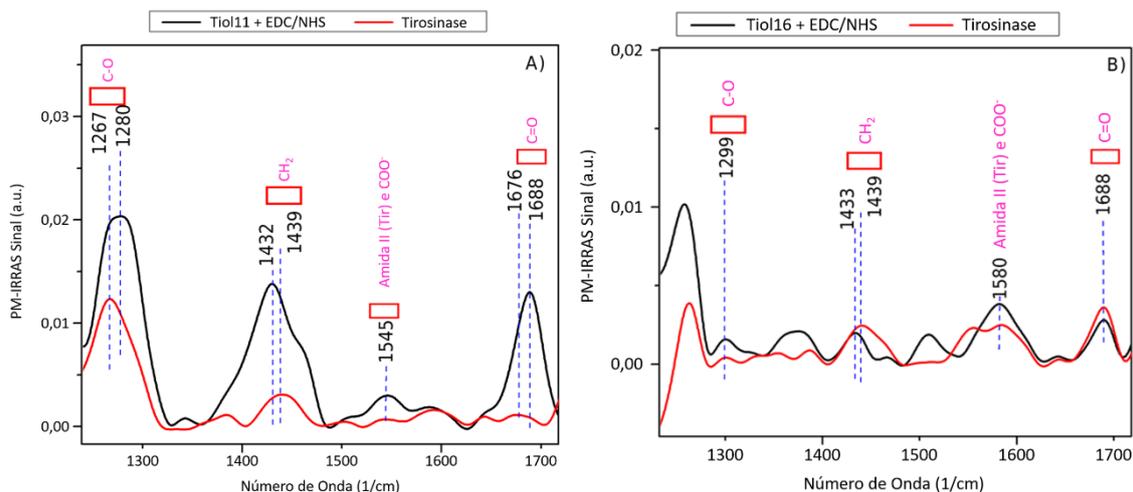


Figura 28: (a) espectro de PM-IRRAS para monocamada de tiol 11-MUA/tirosinase, (b) monocamada de tiol 16-AMHD/ tirosinase.

Tabela 8: Atribuições de bandas PM-IRRAS para camadas de tiol/tirosinase.

Número de ondas (cm ⁻¹)	Grupo funcional
1267/1280/1299	C-O de ácido carboxílico
1432/1433/1439	C-H e CH ₂
1545/1580	N-H/C-N (tirosinase) e COO ⁻ (tiol)
1676/1688	C=O (tirosinase/tiol)

Observa-se a presença de uma banda em 1688 cm⁻¹, a qual é atribuída ao grupo carbonila (C=O) da ligação amida I e uma banda em 1545-1580 cm⁻¹, pertencente ao estiramento C-N da amida, denominada de amida II. Bandas evidenciadas para ambos nanobiossensores funcionalizados.

No estudo de Martinazzo, J. (2017), sobre o desenvolvimento de nanobiossensores de cantilever para detecção de atrazina em água foram observadas duas bandas, uma a 1658 cm⁻¹ atribuída ao grupo carbonila da ligação amida (amida I) e outra em 1547 cm⁻¹ atribuída ao estiramento C-N da amida (amida II). Estes resultados indicam a eficiência da funcionalização do cantilever, indicando que a enzima foi imobilizada na superfície contendo 16-AMHD.¹⁰⁵

Bandas semelhantes foram encontradas para enzima peroxidase no trabalho de Schmidt et al. (2008), onde foram observadas bandas em 1663 cm⁻¹ e 1554 cm⁻¹, correspondente a amida I e amida II respectivamente.¹⁵⁴ Em Alonso et al. (2016), também foram encontradas bandas próximas desta região no desenvolvimento de um biossensor

utilizando a técnica de SAM para imobilizar enzimas oxidases, onde o PM-IRRAS resultou na banda de 1653 cm^{-1} para amida I e 1558 cm^{-1} para amida II.¹⁴⁸

Também é possível observar nos espectros acima a banda em 1260 cm^{-1} correspondente a interação dos modos de deformação O-H e alongamento C-O do grupo fenol.¹⁵⁵ A funcionalização das monocamadas de tiol com tirosinase altera a energia de oscilação dos dipolos C-H do grupo CH_2 (para ambos os filmes), C-O do carbonila (Tiol 11-MUA) e C = O do ácido carboxílico presente no tiol e na tirosinase (para os filmes de Tiol 11-MUA), indicando a ocorrência de ligações covalentes entre as monocamadas e a tirosinase. No caso da banda em $1545/1580\text{ cm}^{-1}$, em ambas as camadas sensoras não há alteração da energia de oscilação dos dipolos COO^- , C-N e N-H, indicando que estes dipolos só podem sofrer alterações na sua orientação molecular com biorecognição. Tais alterações na orientação molecular dos dipolos podem ocorrer nos dipolos C-O e C=O para a película de Tiol 11-MUA, indicadas pela diminuição da área da banda, o que não era esperado devido ao aumento da quantidade de dipolos presentes com adsorção de tirosinase. De fato, observa-se que a alteração da monocamada na construção do filme indica que a orientação molecular está diretamente ligada à arquitetura molecular, o que pode levar a alterações na sensibilidade e seletividade do material para a detecção.

Esta mudança na sensibilidade do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com o ácido 11-MUA e enzima tirosinase observada pelo PM-IRRAS pode estar diretamente associada ao fato deste nanobiossensor ter apresentando maior sensibilidade ($15,05\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$) e menor limite de detecção ($0,038\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$) quando comparado ao nanobiossensor de cantilever funcionalizado na presença de ácido 16-AMHD e enzima tirosinase.

Como as bandas das etapas de deposição do 16-AMHD, do 11-MUA e do EDC/NHS não aparecem nos espectros PM-IRRAS, quando adicionado a enzima tirosinase, o que demonstra que a mesma foi imobilizada no substrato, demonstrando a eficiência da funcionalização para ambos nanobiossensores funcionalizados.

5. CONCLUSÃO

Através das caracterizações das superfícies por SEM, AFM e PM-IRRAS, foi avaliada a morfologia, espessura, topografia e rugosidade dos nanobiossensores de cantileveres funcionalizados com diferentes tióis e enzima tirosinase, onde foi possível observar a diferença e eficaz funcionalização pela técnica SAM em cada etapa realizada, bem como a diferença entre os tióis. Pode-se observar também através da avaliação de estabilidade que ambos nanobiossensores responderam até o sétimo dia, porém o nanobiossensor na presença do ácido 11-MUA respondeu com maior deflexão no primeiro dia e ao atingir o sétimo dia manteve maior estabilidade comparado ao nanobiossensor utilizando o ácido 16-AMHD.

Foram obtidos limites de detecção que variaram de 0,043 ppb para o nanobiossensor utilizando ácido 16-AMHD e 0,038 ppb para o nanobiossensor utilizando o ácido 11-MUA. Quanto ao limite de detecção, quanto menores os seus valores, menores as concentrações mínimas que o sensor consegue detectar.

Em relação a sensibilidade dos nanobiossensores de cantileveres o nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase utilizando ácido 16-AMHD foi o que apresentou menor sensibilidade (9,79 ppb) quando comparado ao nanobiossensor de cantilever funcionalizado com a enzima tirosinase utilizando ácido 11-MUA que apresentou maior sensibilidade (15,05 ppb). Através da literatura sabemos que quanto maiores os valores de sensibilidade, mais sensíveis são os sensores, e quanto menores os valores de LD mais adequados são para a detecção de analitos em interesse.

Ambos, apresentaram deflexão (resposta) para todas as diferentes concentrações de atrazina em água, porém quando utilizado o nanobiossensor de cantilever utilizando ácido 11-MUA e enzima tirosinase o mesmo apresentou maior resposta de deflexão quando comparado com o nanobiossensor utilizando o ácido 16-AMHD e enzima tirosinase.

Diante dos resultados obtidos foi possível observar que, a técnica de SAM para diferentes cadeias alquílicas de tióis e enzima tirosinase foi eficiente, apresentando diferentes deflexões (nm) para cada concentração de atrazina em água avaliada. Porém, o nanobiossensor de cantilever na presença do ácido 11-MUA (menor cadeia) demonstrou maior sensibilidade, menor de detecção, maior deflexão, conseqüentemente maior capacidade de detecção da atrazina em água.

6. REFERÊNCIAS

- (1) WWAP – United Nations World Water Assessment Programme. *The United Nations World Water Development Report 2015: Water for a Sustainable World*; Paris, 2015.
- (2) Rodríguez-González, N.; González-Castro, M. J.; E. Beceiro-González, E.; MuniateguI-Lorenzo, S.; Prada-Rodríguez, D. Determination of Triazine Herbicides in Seaweeds: Development of a Sample Preparation Method Based on Matrix Solid Phase Dispersion and Solid Phase Extraction Clean-Up. *Talanta* **2014**, *121*, 194–198.
- (3) Abate, G.; Masini, J. C. Adsorption of Atrazine, Hydroxyatrazine, Deethylatrazine, and Deisopropylatrazine onto Poly (Hydroxy Iron) Cations Intercalated Vermiculite and Montmorillonite. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *5* (53), 1612–1619.
- (4) Rodrigues, L. F. Desenvolvimento de Nanobiossensores Utilizando Cantileveres Inteligentes Para Detecção Do Herbicida Mesotriona e Do Vírus Da Tristeza Dos Citros, Universidade Federal de São Carlos, 2015.
- (5) Leite, F. L.; Moraes, A. S.; Pereira, B. B. S.; Moreau, A. L. D.; Hausen, M.; Garcia, P. S.; Roz, A. L. Evidências de Detecção Do Herbicida Atrazina Por Espectroscopia de Força Atômica: Uma Ferramenta Promissora Para Sensoriamento Ambiental. *Acta Microsc.* **2015**, *24* (1), 53–63.
- (6) Liu, X.; Yang, Y.; Mao, L.; Li, Z.; Zhou, C.; Liu, X.; Zheng, S.; Hu, Y. SPR Quantitative Analysis of Direct Detection of Atrazine Traces on Au-Nanoparticles: Nanoparticles Size Effect. *Sensors Actuators B Chem.* **2015**, *218*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.04.099>.
- (7) Cezaro, A. M.; Rigo, A. A.; Martinazzo, J.; Muenchen, D. K.; Brezolin, A. N.; Manzoli, A.; Correa, D. S.; Steffens, J.; Steffens, C. Development of Cantilever Nanoimmunosensors Applied to the Detection of β -Estradiol and Estrone in Water. *IEEE Sens. J.* **2020**, *20* (21), 12620–12627. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2020.3000582>.
- (8) Rigo, A. A.; de Cezaro, A. M.; Martinazzo, J.; Ballen, S.; Hoehne, L.; Steffens, J.;

- Steffens, C. Detection of Lead in River Water Samples Applying Cantilever Nanobiosensor. *Water, Air, Soil Pollut.* **2020**, *231* (4), 186. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04562-6>.
- (9) 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* **2012**, *12* (6), 8278–8300. <https://doi.org/10.3390/s120608278>.
- (10) Ballen, S. C.; Steffens, J.; Steffens, C. Stability Characteristics of Cantilever Nanobiosensors with Simple and Complex Molecules for Determination of Cadmium. *Sensors Actuators A Phys.* **2021**, *324*, 112686. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2021.112686>.
- (11) Martinazzo, J.; Brezolin, A. N.; Steffens, C.; Steffens, J. Detection of Pesticides Using Cantilever Nanobiosensors. In *21st Century Nanoscience – A Handbook*; CRC Press: Boca Raton, Florida: CRC Press, [2020], 2020; pp 17-1-17–10. <https://doi.org/10.1201/9780429351587-17>.
- (12) Awasthi, A. P.; Grady, M. E.; Kim, I. H.; Sottos, N. R.; Geubelle, P. H. Nanoscale Mechanical Tailoring of Interfaces Using Self-Assembled Monolayers. *Mech. Mater.* **2016**, *98*, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.mechmat.2016.04.003>.
- (13) Arya, S. K.; Solanki, P. R.; Datta, M.; Malhotra, B. D. Recent Advances in Self-Assembled Monolayers Based Biomolecular Electronic Devices. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (9), 2810–2817. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.02.008>.
- (14) 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* **2012**, *520* (22), 6719–6723. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2012.07.054>.
- (15) Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (4), 1533–1554. <https://doi.org/10.1021/cr9502357>.
- (16) 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. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (4), 1103–1170. <https://doi.org/10.1021/cr0300789>.

- (17) Wu, S.; Nan, T.; Xue, C.; Cheng, T.; Liu, H.; Wang, B.; Zhang, Q.; Wu, X. Mechanism and Enhancement of the Surface Stress Caused by a Small-Molecule Antigen and Antibody Binding. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *48*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.03.086>.
- (18) Butt, H.-J.; Cappella, B.; Kappl, M. Force Measurements with the Atomic Force Microscope: Technique, Interpretation and Applications. *Surf. Sci. Rep.* **2005**, *59* (1–6), 1–152. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2005.08.003>.
- (19) 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. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *676* (1–2), 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.07.042>.
- (20) VLADKOVA, R.; IVANOVA, P.; KRASTEVA, V.; MISRA, A. N.; APOSTOLOVA, E. Assessment of Chlorophyll Fluorescence and Photosynthetic Oxygen Evolution Parameters in Development of Biosensors for Detection of q(b) Binding Herbicides. *Comptes Rendus L Acad. Bulg. Des Sci.* **2009**, *62*, 355–360.
- (21) Peres, F.; Moreira, J. C. *É Veneno Ou é Remédio? Agrotóxicos, Saúde e Ambiente*; Rio de Janeiro, 2003.
- (22) R7. Agrotóxicos e Pesticidas.
- (23) R.W., B.; Thomas, C. M.; Scheepers, P. T.; Zielhuis, G. A.; Roeleveld, N. Pesticide Exposure: The Hormonal Function of the Female Reproductive System Disrupted? *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2006**, *4* (30). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-30>.
- (24) Vogel, A.; Jocque, H.; Sirot, L. K.; Fiumera, A. C. Effects of Atrazine Exposure on Male Reproductive Performance in *Drosophila Melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **2015**, *72*, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.11.002>.
- (25) Grigori, P. Afinal, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxico do mundo? <https://revistagalileu.globo.com/Ciencia/Meio-Ambiente/noticia/2019/06/afinal-o-brasil-e-o-maior-consumidor-de-agrotoxico-do-mundo.html> (accessed Nov 5, 2019).
- (26) Milz, T. Anvisa aprova mudança na classificação de agrotóxicos.

- (27) Díaz, E. D. de A.; Velasco, M. C. V.; Pérez, F. R.; Ramírez, C. A.; López, L. L. I. Utilización de Adsorbentes Basados En Quitosano y Alginato Sódico Para La Eliminación de Iones Metálicos: Cu²⁺, Pb²⁺, Cr³⁺ y Co³⁺. *Rev. Iberoam. Polímeros* **2007**, 8 (1), 20–37.
- (28) Zacharia, J. T. Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides. In *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*; InTech: Croácia, 2011; pp 1–19.
- (29) Ying, G. G.; Kookana, R. S.; Mallavarpu, M. Release Behavior of Triazine Residues in Stabilised Contaminated Soils. *Environ. Pollut.* **2005**, 134 (1), 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.07.016>.
- (30) Oliveira JR, R. S. Mecanismo de Ação de Herbicidas. In *Biologia e Manejo de Planta Daninhas*; Omnipax: Curitiba, PR, 2011.
- (31) Aquino, J. M.; Miwa, D. W.; Rodrigo, M. A.; Motheo, A. J. Treatment of Actual Effluents Produced in the Manufacturing of Atrazine by a Photo-Electrolytic Process. *Chemosphere* **2017**, 172, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.154>.
- (32) Marchi, G. Determinação de atrazina em solos e água em áreas de cultivo de milho irrigado do Distrito Federal.
- (33) Eisler, R. *Atrazine Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review*; Laurel, MD, 1989.
- (34) Consolin Filho, N. Desenvolvimento de Novos Materiais Para a Detecção de Pesticidas, Universidade de São Paulo, 2002.
- (35) LOURENCETTI, C.; SPADOTTO, C. A.; SILVA, M. S.; RIBEIRO, M. L. *Avaliação Do Potencial de Contaminação de Águas Subterrâneas Por Pesticidas: Comparação Entre Métodos de Previsão de Lixiviação*; Curitiba, 2005.
- (36) Vasconcelos, F. C. W. Transporte de Atrazine Influenciado Por Calagem e Adubação Fosfatada Em Ambientes de Latossolos Da Bacia Do Rio Das Mortes (MG), Universidade Federal de Lavras, 2007.
- (37) Royal Society of Chemistry. *Agrochemicals Handbook*, 2nd ed.; Royal Society of

- Chemistry: Nottingham, 1987.
- (38) Ministério do Meio Ambiente. Agrotóxicos.
- (39) Solomon, K. R.; Carr, J. A.; Du Preez, L. H.; Giesy, J. P.; Kendall, R. J.; Smith, E. E.; Van Der Kraak, G. J. Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review. *Crit. Rev. Toxicol.* **2008**, *38* (9), 721–772. <https://doi.org/10.1080/10408440802116496>.
- (40) Exame. Agrotóxicos proibidos na europa são campeões de vendas no brasil <https://exame.abril.com.br/brasil/agrotoxicos-proibidos-na-europa-sao-campeoes-de-vendas-no-brasil> (accessed Nov 8, 2019).
- (41) Ministério da Saúde. *Portaria Nº 2914: Dispõe Sobre Os Procedimentos de Controle e de Vigilância Da Qualidade Da Água Para Consumo Humano e Seu Padrão de Potabilidade*; Brasil, 2001.
- (42) WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking water quality.
- (43) Aggelopoulos, C. A.; Tataraki, D.; Rassias, G. Degradation of Atrazine in Soil by Dielectric Barrier Discharge Plasma – Potential Singlet Oxygen Mediation. *Chem. Eng. J.* **2018**, *347*, 682–694. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.111>.
- (44) Hou, X.; Huang, X.; Ai, Z.; Zhao, J.; Zhang, L. Ascorbic Acid Induced Atrazine Degradation. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *327*, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.12.048>.
- (45) He, H.; Liu, Y.; You, S.; Liu, J.; Xiao, H.; Tu, Z. A Review on Recent Treatment Technology for Herbicide Atrazine in Contaminated Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16* (24), 5129. <https://doi.org/10.3390/ijerph16245129>.
- (46) Kuklenyik, Z.; Panuwet, P.; Jayatilaka, N. K.; Pirkle, J. L.; Calafat, A. M. Two-Dimensional High Performance Liquid Chromatography Separation and Tandem Mass Spectrometry Detection of Atrazine and Its Metabolic and Hydrolysis Products in Urine. *J. Chromatogr. B* **2012**, *901*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.028>.
- (47) Sang, S.; Zhang, W.; Zhao, Y. Review on the Design Art of Biosensors. In *State*

- of the Art in Biosensors - General Aspects*; InTech: Croácia, 2013; pp 89–110.
- (48) Carniel, B. F. Avaliação de Impactos Ambientais e Sociais Do Uso Da Nanotecnologia Na Agricultura: Uma Proposta Metodológica, Universidade Federal de São Carlos, 2013.
- (49) Canaltech. O que é nanotecnologia <https://canaltech.com.br/ciencia/o-que-e-nanotecnologia/>.
- (50) UFRGS. Nanotecnologia <http://www.ufrgs.br/alimentus/disciplinas/tecnologia-de-alimentos-especiais/nanotecnologia/>.
- (51) Bueno, C. C. Desenvolvimento de Um Nanobiossensor Para o Monitoramento Da Qualidade Ambiental No Setor Agrícola, Universidade Federal de São Carlos, 2013.
- (52) Gupta, V. K.; Yola, M. L.; Eren, T.; Atar, N. Selective QCM Sensor Based on Atrazine Imprinted Polymer: Its Application to Wastewater Sample. *Sensors Actuators B Chem.* **2015**, *218*, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.05.009>.
- (53) da Silva, A.; Deda, D.; da Róz, A.; Prado, R.; Carvalho, C.; Viviani, V.; Leite, F. Nanobiosensors Based on Chemically Modified AFM Probes: A Useful Tool for Methyl Parathion Detection. *Sensors* **2013**, *13* (2), 1477–1489. <https://doi.org/10.3390/s130201477>.
- (54) Colomer-Farrarons, J.; Miribel-Català, P. L.; Rodríguez-Villarreal, A. I.; Samitier, J. Portable Bio-Devices: Design of Electrochemical Instruments from Miniaturized to Implantable Devices. In *New Perspectives in Biosensors Technology and Applications*; InTech: Rijeka, 2011; pp 373–400.
- (55) Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry). *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16* (1–2), 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4).

- (56) Korotkaya, E.-. Biosensors: Design, Classification, and Applications in the Food Industry. *Foods Raw Mater.* **2014**, 2 (2), 161–171. <https://doi.org/10.12737/5476>.
- (57) Ahmed, A.; Rushworth, J. V.; Hirst, N. A.; Millner, P. A. Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, 27 (3), 631–646. <https://doi.org/10.1128/CMR.00120-13>.
- (58) Lei, Y.; Chen, W.; Mulchandani, A. Microbial Biosensors. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 568 (1–2), 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.065>.
- (59) Park, B.-W.; Yoon, D.-Y.; Kim, D.-S. Recent Progress in Bio-Sensing Techniques with Encapsulated Enzymes. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 26 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.04.033>.
- (60) Hirst, E. R.; Yuan, Y. J.; Xu, W. L.; Bronlund, J. E. Bond-Rupture Immunosensors—A Review. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 23 (12), 1759–1768. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.02.002>.
- (61) Palchetti, I.; Mascini, M. Nucleic Acid Biosensors for Environmental Pollution Monitoring. *Analyst* **2008**, 133 (7), 846. <https://doi.org/10.1039/b802920m>.
- (62) TELES, F.; FONSECA, L. Trends in DNA Biosensors. *Talanta* **2008**, 77 (2), 606–623. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.024>.
- (63) Du, P.; Zhou, B.; Cai, C. Development of an Amperometric Biosensor for Glucose Based on Electrocatalytic Reduction of Hydrogen Peroxide at the Single-Walled Carbon Nanotube/Nile Blue A Nanocomposite Modified Electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, 614 (1–2), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2007.11.036>.
- (64) Alfaya, A. A. S.; Kubota, L. T. A Utilização de Materiais Obtidos Pelo Processo de Sol-Gel Na Construção de Biossensores. *Quim. Nova* **2002**, 25 (5), 835–841. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500020>.
- (65) Lehninger, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*, 2nd ed.; Sarvier: São Paulo, 1995.
- (66) Foschin, M. Eletrossíntese e Caracterização de Filmes de Polipirrol-2-Ácido Carboxílico Para Uso Em Biossensores Amperométricos Construídos Em Eletrodos Miniaturizados, Universidade de São Paulo, 2009.

- (67) Farré, M.; Kantiani, L.; Pérez, S.; Barceló, D.; Barceló, D. Sensors and Biosensors in Support of EU Directives. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2009**, *28* (2), 170–185. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.018>.
- (68) Karunakaran, C.; Madasamy, T.; Sethy, N. K. Enzymatic Biosensors. In *Biosensors and Bioelectronics*; Karunakaran, C., Bhargava, K., Benjamin, R., Eds.; Elsevier, 2015; pp 133–204.
- (69) Marques, P. R. B. de O.; Yamanaka, H. Biossensores Baseados No Processo de Inibição Enzimática. *Quim. Nova* **2008**, *31* (7), 1791–1799. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700034>.
- (70) Vidal, J. C.; Esteban, S.; Gil, J.; Castillo, J. R. A Comparative Study of Immobilization Methods of a Tyrosinase Enzyme on Electrodes and Their Application to the Detection of Dichlorvos Organophosphorus Insecticide. *Talanta* **2006**, *68* (3), 791–799. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.038>.
- (71) da Cruz Vieira, I.; Fatibello-Filho, O. Flow Injection Spectrophotometric Determination of Total Phenols Using a Crude Extract of Sweet Potato Root (*Ipomoea Batatas* (L.) Lam.) as Enzymatic Source Presented at the VII International Conference on Flow Analysis, Held in Piracicaba, SP, Brazil, Aug. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *366* (1–3), 111–118. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00724-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00724-1).
- (72) Perone, C. A. S.; Queiroz, A. S.; Dalosso, V. M.; Moreira, M. E. M. Determinação Espectrofotométrica e Amperométrica de Compostos Fenólicos Em Urina Humana, Usando Extrato Parcialmente Purificado de Banana Nanica (*Musa Acuminata*) / Spectrophotometric and Amperometric Determination of Compounds Phenolics in Human Urine, *Ut. Rev. do Inst. Ciências da Saúde* **2005**, *23* (4), 253–259.
- (73) MATUSCHEK, E. The Effect of Fruit Extracts with Polyphenol Oxidase (PPO) Activity on the in Vitro Accessibility of Iron in High-Tannin Sorghum. *Food Chem.* **2005**, *90* (4), 765–771. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.002>.
- (74) Tanimoto de Albuquerque, Y. D.; Ferreira, L. F. Amperometric Biosensing of Carbamate and Organophosphate Pesticides Utilizing Screen-Printed Tyrosinase-

- Modified Electrodes. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 596 (2), 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.013>.
- (75) Apetrei, I. M.; Rodriguez-Mendez, M. L.; Apetrei, C.; de Saja, J. A. Enzyme Sensor Based on Carbon Nanotubes/Cobalt(II) Phthalocyanine and Tyrosinase Used in Pharmaceutical Analysis. *Sensors Actuators B Chem.* **2013**, 177, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.10.131>.
- (76) Ghasemi-Varnamkhasti, M.; Rodríguez-Méndez, M. L.; Mohtasebi, S. S.; Apetrei, C.; Lozano, J.; Ahmadi, H.; Razavi, S. H.; Antonio de Saja, J. Monitoring the Aging of Beers Using a Bioelectronic Tongue. *Food Control* **2012**, 25 (1), 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.020>.
- (77) Sys, M.; Pekec, B.; Kalcher, K.; Vytras, K. Biossensor Eletroquímico Baseado Na Enzima Tirosinase Para a Determinação de Fenol Em Efluentes. *Int. J. Electrochem.* **2013**, 8. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150086>.
- (78) Fenoll, L. G.; Rodríguez-López, J. N.; García-Sevilla, F.; García-Ruiz, P. A.; Varón, R.; García-Cánovas, F.; Tudela, J. Analysis and Interpretation of the Action Mechanism of Mushroom Tyrosinase on Monophenols and Diphenols Generating Highly Unstable O-Quinones. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2001**, 1548 (1), 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00207-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00207-2).
- (79) Ferreira, L. F. Biossensor Amperométrico à Base de Tirosinase Aplicado Na Determinação de Compostos Orgânicos Em Amostras Ambientais, Universidade Federal de Uberlândia, 2005.
- (80) Anh, T. M.; Dzyadevych, S. V.; Van, M. C.; Renault, N. J.; Duc, C. N.; Chovelon, J.-M. Conductometric Tyrosinase Biosensor for the Detection of Diuron, Atrazine and Its Main Metabolites. *Talanta* **2004**, 63 (2), 365–370. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2003.11.008>.
- (81) Lagarde, F.; Jaffrezic-Renault, N. New Trends in Biosensors for Water Monitoring. In *Environmental Biosensors*; Somerset, V., Ed.; InTech: Croatia, 2011; pp 1–31.
- (82) Kim, G.-Y.; Shim, J.; Kang, M.-S.; Moon, S.-H. Optimized Coverage of Gold Nanoparticles at Tyrosinase Electrode for Measurement of a Pesticide in Various

- Water Samples. *J. Hazard. Mater.* **2008**, 156 (1–3), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.007>.
- (83) 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. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* **2018**, 53 (4), 229–236. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1421833>.
- (84) Sekhon, B. Nanotechnology in Agri-Food Production: An Overview. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2014**, 31. <https://doi.org/10.2147/NSA.S39406>.
- (85) Borsoi, A.; Santos, P. R. R.; Taffarel, L. E.; Júnior, A. C. G. Agrotóxicos: Histórico, Atualidades e Meio Ambiente. *Acta Iguazu* **2014**, 3 (1), 86–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v3i1.9650>.
- (86) Karasali, H.; Marousopoulou, A.; Machera, K. Pesticide Residue Concentration in Soil Following Conventional and Low-Input Crop Management in a Mediterranean Agro-Ecosystem, in Central Greece. *Sci. Total Environ.* **2016**, 541, 130–142. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.016>.
- (87) Xia, X.-R.; Leidy, B. Simplified Liquid-Solid Extraction Technique for the Analyses of Pesticide Residues in Soil Samples. *Environ. Monit. Assess.* **2002**, 73, 179–190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1013017804165>.
- (88) Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56 (9), 930–933. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>.
- (89) Ballen, S. C.; Steffens, J.; Steffens, C. Stability Characteristics of Cantilever Nanobiosensors with Simple and Complex Molecules for Determination of Cadmium. *Sensors Actuators, A Phys.* **2021**, 324, 112686. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2021.112686>.
- (90) Touhami, A. Biosensors and Nanobiosensors: Design and Applications. In *Nanomedicine*; Seifalian, A., MEL, A. de., Kalaskar, D. M., Eds.; Manchester, 2014; pp 374–403.
- (91) Deda, D. K.; Pereira, B. B. S.; Bueno, C. C.; Silva, A. N. da; Ribeiro, G. A.;

- Amarante, A. M.; Franca, E. F.; Leite, F. L. The Use of Functionalized AFM Tips as Molecular Sensors in the Detection of Pesticides. *Mater. Res.* **2013**, *16* (3), 683–687. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392013005000043>.
- (92) Chen, X.; Chen, W.; Mulchandani, A.; Mohideen, U. Application of Displacement Principle for Detecting Heavy Metal Ions and EDTA Using Microcantilevers. *Sensors Actuators B Chem.* **2012**, *161* (1), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.10.020>.
- (93) Bridle, H.; Wang, W.; Gavriilidou, D.; Amalou, F.; Hand, D. P.; Shu, W. Static Mode Microfluidic Cantilevers for Detection of Waterborne Pathogens. *Sensors Actuators A Phys.* **2016**, *247*, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2016.05.011>.
- (94) Carrascosa, L. G.; Moreno, M.; Álvarez, M.; Lechuga, L. M. Nanomechanical Biosensors: A New Sensing Tool. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2006**, *25* (3), 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.09.006>.
- (95) Muenchen, K. D. Desenvolvimento de Nanobiossensores de Cantilever Utilizando Peroxidase de Fonte Vegetal Para Detecção de Glifosato Em Água, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, 2015.
- (96) T. Thundat, P. I. Oden, and R. J. W. MICROCANTILEVER SENSORS. *Microscale Thermophys. Eng.* **1997**, *1* (3), 185–199. <https://doi.org/10.1080/108939597200214>.
- (97) Raiteri, R.; Grattarola, M.; Berger, R. Micromechanics Senses Biomolecules. *Mater. Today* **2002**, *5* (1), 22–29. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(02\)05139-8](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(02)05139-8).
- (98) Lang, H. P.; Hegner, M.; Gerber, C. Nanomechanical Cantilever Array Sensors. In *Handbook of Nanotechnology*; Bhushan., B., Ed.; Springer: Berlin, 2010; pp 427–452.
- (99) Tamayo, J.; Kosaka, P. M.; Ruz, J. J.; San Paulo, Á.; Calleja, M. Biosensors Based on Nanomechanical Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (3), 1287–1311. <https://doi.org/10.1039/C2CS35293A>.
- (100) Moccelini, S. K. Sensores Modificados Com Monocamadas Autoorganizadas de

- Tióis Para Determinação de Dopamina, Tiodicarbe e Catequina, Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.
- (101) Yan, J.; Wang, T.; Wu, G.; Dai, W.; Guan, N.; Li, L.; Gong, J. Tungsten Oxide Single Crystal Nanosheets for Enhanced Multichannel Solar Light Harvesting. *Adv. Mater.* **2015**, 27 (9), 1580–1586. <https://doi.org/10.1002/adma.201404792>.
- (102) Galli, A. Desenvolvimento e Caracterização de Um Biossensor Bienzimático Imobilizado Sobre Monocamadas Auto-Organizadas Para Determinação de Açúcares Em Alimentos, Universidade de São Paulo, 2009.
- (103) Lee, T. R.; Laibinis, P. E.; Folkers, J. P.; Whitesides, G. M. Heterogeneous Catalysis on Platinum and Self-Assembled Monolayers on Metal and Metal Oxide Surfaces. *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63 (6), 821–828. <https://doi.org/10.1351/pac199163060821>.
- (104) Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G. Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111 (1), 321–335. <https://doi.org/10.1021/ja00183a049>.
- (105) Martinazzo, J. Desenvolvimento de Nanobiossensores de Cantilever Para Detecção de Atrazina Em Água, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2017.
- (106) Almeida, I. B. B. Funcionalização de Superfícies de Ouro via Formação de Ditiocarbamatos, Universidade de Lisboa, 2010.
- (107) Brazaca, L. C. Desenvolvimento de Um Sistema Para o Diagnóstico Precoce Do Diabetes Mellitus Tipo 2, Universidade de São Paulo, 2015.
- (108) Hermanson, G. T. Zero-Length Crosslinkers. In *Bioconjugate Techniques*; HERMANSON, G. T., Ed.; Tóquio, 2013; pp 259–273.
- (109) Pepino, R. O. Desenvolvimento de Géis e Esponjas de Quitosana e Blendas Quitosana/Gelatina Em Ácido Adípico, Universidade de São Paulo, 2016.
- (110) Hegner, M.; Arntz, Y. Advanced Biosensing Using Micromechanical Cantilever Arrays. In *Methods in Molecular Biology*; 2004; pp 39–50.

- <https://doi.org/10.1385/1-59259-647-9:39>.
- (111) Wang, J. Nanomaterial-Based Amplified Transduction of Biomolecular Interactions. *Small* **2005**, *1* (11), 1036–1043. <https://doi.org/10.1002/sml.200500214>.
- (112) Sang, S.; Zhao, Y.; Zhang, W.; Li, P.; Hu, J.; Li, G. Surface Stress-Based Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *51*, 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.07.033>.
- (113) Manzoli, A.; Steffens, C.; Paschoalin, R. T.; Oliveira, J. E. de; Mattoso, L. H. C.; Junior, P. S. de P. H. Funcionalização Da Superfície de Microcantilevers Utilizados Em Microscopia de Força Atômica Com Biomoléculas. *Circ. Técnica* **2010**, *53*, 1–6.
- (114) Chaudhary, M.; Gupta, A. Microcantilever-Based Sensors. *Def. Sci. J.* **2009**, *59* (6), 634–641. <https://doi.org/10.14429/dsj.59.1569>.
- (115) Baró, A. M.; Reifengerger, R. G. *Atomic Force Microscopy in Liquid – Biologic Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2012.
- (116) Arntz, Y.; Seelig, J. D.; Lang, H. P.; Zhang, J.; Hunziker, P.; Ramseyer, J. P.; Meyer, E.; Hegner, M.; Gerber, C. Label-Free Protein Assay Based on a Nanomechanical Cantilever Array. *Nanotechnology* **2003**, *14* (1), 86–90. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/14/1/319>.
- (117) Cubillas, P.; Anderson, M. W. Atomic Force Microscopy. In *Multi Length-Scale Characterisation*; Walton, R. I., Ed.; John Wiley & Sons Ltda.: Walton Chichester, 2014; pp 121–193.
- (118) Fritz, J. Cantilever Biosensors. *Analyst* **2008**, *133* (7), 855. <https://doi.org/10.1039/b718174d>.
- (119) Lavrik, N. V.; Sepaniak, M. J.; Datskos, P. G. Cantilever Transducers as a Platform for Chemical and Biological Sensors. *Rev. Sci. Instrum.* **2004**, *75* (7), 2229–2253. <https://doi.org/10.1063/1.1763252>.
- (120) Gruber, K.; Horlacher, T.; Castelli, R.; Mader, A.; Seeberger, P. H.; Hermann, B. A. Cantilever Array Sensors Detect Specific Carbohydrate–Protein Interactions

- with Picomolar Sensitivity. *ACS Nano* **2011**, 5 (5), 3670–3678. <https://doi.org/10.1021/nn103626q>.
- (121) 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 (Guildf)*. **2005**, 46 (26), 12503–12510. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.07.108>.
- (122) QGIS Development Team. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation 2009.
- (123) Han, Y.; Uosaki, K. Effects of Concentration and Temperature on the Formation Process of Decanethiol Self-Assembled Monolayer on Au(111) Followed by Electrochemical Reductive Desorption. *Electrochim. Acta* **2008**, 53 (21), 6196–6201. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.04.016>.
- (124) Thundat, T.; Majumdar, A. Microcantilevers for Physical, Chemical, and Biological Sensing. In *Sensors and Sensing in Biology and Engineering*; Springer Vienna: Vienna, 2003; pp 337–355. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6025-1_24.
- (125) Chaki, N. K.; Vijayamohanan, K. Self-Assembled Monolayers as a Tunable Platform for Biosensor Applications. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17 (1–2), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00277-9](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00277-9).
- (126) Bausells, J. Piezoresistive Cantilevers for Nanomechanical Sensing. *Microelectron. Eng.* **2015**, 145, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2015.02.010>.
- (127) ANVISA -Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução No 899. 2003.
- (128) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*, 8th ed.; Cengage Learning: São Paulo, 2005.
- (129) Paschoal, J. A. R.; Rath, S.; Airoidi, F. P. da S.; Reyes, F. G. R. Validação de Métodos Cromatográficos Para a Determinação de Resíduos de Medicamentos Veterinários Em Alimentos. *Quim. Nova* **2008**, 31 (5), 1190–1198. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500048>.
- (130) Janata, J. *Principles of Chemical Sensors*; Springer: Boston, 2009.

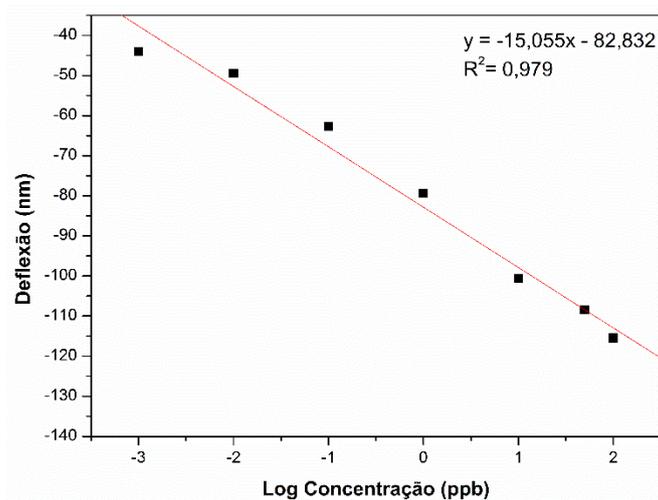
- (131) Steffens, C.; Manzoli, A.; Francheschi, E.; Corazza, M. L.; Corazza, F. C.; Oliveira, J. V.; Herrmann, P. S. P. Low-Cost Sensors Developed on Paper by Line Patterning with Graphite and Polyaniline Coating with Supercritical CO₂. *Synth. Met.* **2009**, *159* (21–22), 2329–2332. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2009.08.045>.
- (132) Goddard, J. M.; Hotchkiss, J. H. Polymer Surface Modification for the Attachment of Bioactive Compounds. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32* (7), 698–725. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002>.
- (133) Guo, S.; Zhu, X.; Loh, X. J. Controlling Cell Adhesion Using Layer-by-Layer Approaches for Biomedical Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *70*, 1163–1175. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.074>.
- (134) Blaudez, D.; Turlet, J.-M.; Dufourcq, J.; Bard, D.; Buffeteau, T.; Desbat, B. Investigations at the Air/Water Interface Using Polarization Modulation IR Spectroscopy. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1996**, *92* (4), 525. <https://doi.org/10.1039/ft9969200525>.
- (135) Gooding, J. J.; Hibbert, D. B. The Application of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers to Enzyme Electrodes. *TrAC Trends Anal. Chem.* **1999**, *18* (8), 525–533. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00133-8).
- (136) Janegitz, B. C.; Pauliukaite, R.; Ghica, M. E.; Brett, C. M. A.; Fatibello-Filho, O. Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase at Glassy Carbon Electrode Modified with Functionalized Carbon Nanotubes within a Dihexadecylphosphate Film. *Sensors Actuators B Chem.* **2011**, *158* (1), 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.06.048>.
- (137) Fernandes, E. G. R. *Biossensores Nanoestruturados Para Monitoração de Glicose*, Universidade Federal de Itajubá, 2005.
- (138) Rumayor, V. G.; Iglesias, E. G.; Galán, O. R.; Cabezas, L. G. *Aplicaciones de Biosensores En La Industria Agroalimentaria*; Elecé Industria Gráfica: Madri, 2005.
- (139) Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução N° 357. Diário Oficial da União 2005.

- (140) ZHANG, G.-P.; LI, C.; MA, W.; WU, S.-Q.; ZHANG, Q.-C. A Cantilever Array Sensor Platform Guided by Optical Fibers and Its Sensing Application. *Chinese J. Anal. Chem.* **2017**, *45* (1), 42–47. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(16\)60986-6](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(16)60986-6).
- (141) INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, N. e Q. I. Orientações Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008. 2003.
- (142) 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 J. Chem. Eng.* **2019**, *36* (04), 1429–1437.
- (143) 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. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* **2020**, *55* (3), 239–249. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1685318>.
- (144) Soozanipour, A.; Taheri-kafrani, A. Enzyme Immobilization on Functionalized Graphene Oxide Nanosheets: Efficient and Robust Biocatalysts. In *Methods in Enzymology*; 2018; pp 371–403.
- (145) Klapetek, P.; Necas, D.; Anderson, C. Gwyddion User Guide. 2020.
- (146) Rodrigues, L. F. Desenvolvimento de Nanobiossensores Utilizando Cantileveres Inteligentes Para Detecção Do Herbicida Mesotriona e Do Vírus Da Tristeza Dos Citros. Universidade Federal de São Carlos 2015.
- (147) 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. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2018**, *186* (4), 1061–1073. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2799-y>.
- (148) 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. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *383*, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.05.006>.

- (149) Rai, M.; Gade, A.; Gaikwad, S.; Marcato, P. D.; Durán, N. Biomedical Applications of Nanobiosensors: The State-of-the-Art. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000100004>.
- (150) Soares, A. C.; Soares, J. C.; Shimizu, F. M.; Melendez, M. E.; Carvalho, A. L.; Oliveira, O. N. Controlled Film Architectures to Detect a Biomarker for Pancreatic Cancer Using Impedance Spectroscopy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (46), 25930–25937. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b08666>.
- (151) Soares, J. C.; Shimizu, F. M.; Soares, A. C.; Caseli, L.; Ferreira, J.; Oliveira, O. N. Supramolecular Control in Nanostructured Film Architectures for Detecting Breast Cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (22), 11833–11841. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b03761>.
- (152) Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3rd ed.; Academic Press: Boston, 1990.
- (153) Więckowski, A.; Korzeniewski, C.; Braunschweig, B. *No Title*; Wiley: New Jersey, 2013.
- (154) Schmidt, T. F.; Caseli, L.; Viitala, T.; Oliveira, O. N. Enhanced Activity of Horseradish Peroxidase in Langmuir–Blodgett Films of Phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2008**, *1778* (10), 2291–2297. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.05.012>.
- (155) Camilo, D. E. Filmes Nanoestruturados Para Detecção Do Antígeno Prostático Específico Utilizando Nanopartículas de Ouro, Universidade Federal de São Carlos, 2019.

APÊNDICES

Apêndice 1: Curva de calibração da concentração logarítmica de atrazina *versus* deflexão do nanobiossensor funcionalizado com ácido 11-mercaptoundecanóico a enzima tirosinase comercial



Apêndice 2: Curva de calibração da concentração logarítmica de atrazina versus deflexão, do nanobiossensor funcionalizado com ácido 16-mercaptohexadecanóico e a enzima tirosinase comercial

