



---

## APLICAÇÃO DE NANOBIOSENSOR DE CANTILEVER FUNCIONALIZADO COM ÓXIDO DE GRAFENO/UREASE NA DETECÇÃO DE CÁDMIO EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE RIO

SANDRA CRISTINA BALLEEN<sup>1\*</sup>, GREICE MARIA OSTROWSKI<sup>1</sup>, LUCÉLIA HOEHNE<sup>1,2</sup>,  
JULIANA STEFFENS<sup>1</sup>, CLARICE STEFFENS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos

<sup>1,2</sup>Universidade do Vale do Taquari – Univates, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
\*e-mail: sandra-ballen@live.com

**RESUMO** - O cádmio é o metal pesado de maior toxicidade. O avanço das atividades industriais e urbanas aumentaram sua liberação para corpos d'água, comprometendo a qualidade da mesma. Nesse sentido, a área de nanotecnologia vem apresentado grandes avanços, como o desenvolvimento de nanobiossensores, para detecção da presença de íons de cádmio nesses ambientes. Sendo assim, este trabalho tem como avaliar a resposta da deflexão de nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno/urease em relação ao tempo de contato em diferentes concentrações de cádmio diretamente em amostras reais (água de rio). A funcionalização dos mesmos foi realizada empregando a técnica de monocamadas automontadas com óxido de grafeno/urease. As coletas de água foram realizadas no rio Tigre (Erechim/RS) e ocorreram no mesmo ponto de coleta em diferentes dias. A resposta do nanobiossensor se mostrou satisfatória e o efeito da matriz pode ser minimizado com a fortificação com  $Cd^{2+}$  das amostras. Desta forma, os dispositivos desenvolvidos demonstram ter grande potencialidade de aplicação no monitoramento ambiental detectando a presença de cádmio em águas.

**Palavras-chave** – Metal pesado. Cantilever. Funcionalização. Grafeno. Urease.

**ABSTRACT** - Cadmium is the most toxic heavy metal. The advance of industrial and urban activities increased its release into water bodies, compromising its quality. In this sense, the field of nanotechnology has shown great advances, such as the development of nanobiosensors to detect the presence of cadmium ions in these environments. Therefore, this work aims to evaluate the deflection response of a cantilever nanobiosensor functionalized with graphene oxide/urease in relation to the contact time at different concentrations of cadmium directly in real samples (river water). Their functionalization was carried out using the technique of self-assembled monolayers with graphene oxide/urease. Water collections were carried out on the Tigre River (Erechim/RS) and occurred at the same collection point on different days. The response of the nanobiosensor was satisfactory and the effect of the matrix can be minimized by fortifying the samples with  $Cd^{2+}$ . In this way, the devices developed show great potential for application in environmental monitoring by detecting the presence of cadmium in water.

**Keywords** - Heavy metal. Cantilever. Functionalization. Graphene. Urease.

### INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial levou ao aumento das fontes de contaminações de águas

devido a geração de enormes quantidades de resíduos contendo metais pesados (GU *et al.*, 2018; VERMA; DWIVEDI, 2013).

O cádmio é considerado o metal pesado de maior toxicidade (JÄRUP, 2003). Este metal pode ser lançado ao solo, a partir de atividades industriais, sendo então lixiviados para os rios pelo escoamento de águas superficiais provenientes das chuvas, podendo persistir no ambiente aquático, causando também a contaminação das águas subterrâneas, dessa forma causando outros problemas ambientais (RIBEIRO-FILHO *et al.*, 2001; VINODHINI; NARAYANAN, 2008).

Devido a sua alta toxicidade alguns órgãos governamentais estabelecem níveis máximos permitidos em água. Tais como o CONAMA e Ministério da Saúde estabelecem 1-100 ppb e 5 ppb, respectivamente (BRASIL, 2004, 2005, 2011). A nível mundial a OMS (Organização Mundial da Saúde) estabelece um limite máximo de 3 ppb (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Sendo de suma importância a utilização de métodos capazes de identificar e, mais importante ainda, quantificar este metal em água.

A nanotecnologia tem apresentado grandes avanços, na área de quantificação de metais pesados, com o desenvolvimento de sensores na escala nano, tais como sensores de cantileveres. Os mesmos vem apresentando resultados promissores na detecção de substâncias químicas, físicas, toxinas, poluentes e analitos em geral na micro e nanoescala, além de fornecerem recursos sensíveis para medir e mapear a informação química da superfície e quantificar as forças repulsivas e atrativas associadas a materiais inorgânicos e amostras biológicas, por meio de interações químicas entre o cantilever e a amostra (LEITE; HERRMANN, 2005; SMITH, 2003; STEFFENS *et al.*, 2012; MUENCHEN *et al.*, 2016; MARTINAZZO *et al.*, 2018).

Sensores de cantilever baseam-se em hastes finas flexíveis (CARRASCOSA *et al.*, 2006; FERREIRA; YAMANAKA, 2006). Para serem considerados nanossensores devem possuir 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. Esses sensores podem detectar

fatores físicos, químicos, biológicos, e fenômenos quânticos em nanoescala (VELASCO-GARCIA; MOTTRAM, 2003; BUENO *et al.*, 2017).

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

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

O desempenho de enzimas, como a urease, pode ser melhorado utilizando nanomateriais em sua imobilização. A estrutura do óxido de grafeno pode ser um transdutor eficaz, pois permite a transferência direta de elétrons entre enzimas e eletrodos (KUILA *et al.*, 2011).

Sendo assim, este trabalho tem por objetivo avaliar a resposta da deflexão de nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno/urease em relação ao tempo de contato em diferentes concentrações de cádmio diretamente em amostras reais (água de rio).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Desenvolvimento de nanobiossensor de cantilever

Os cantileveres (ContGD-G) usados para o desenvolvimento dos nanobiossensores foram adquiridos comercialmente (BudgetSensors), com as seguintes

especificações do fabricante: material de silício revestido com 70 nm de ouro em um lado da superfície, frequência de ressonância de 13,0 ( $\pm 4$ ) kHz e constante de mola de 0,2 (0,07-0,4) N/m. A baixa constante de mola (0,2 N/m) proporciona maior sensibilidade para as medições no modo estático em meio líquido (CARRASCOSA *et al.*, 2006; FRITZ, 2008).

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

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

#### Funcionalização da superfície dos cantilevers

A funcionalização do cantilever foi realizada por meio da deposição da camada sensora no lado superior, onde se encontra depositado o Au. O procedimento de funcionalização do cantilever foi baseado nos trabalhos de Velanki e Ji (2006) e Martinazzo *et al.* (2018):

- Limpeza dos cantileveres, os quais foram transferidos individualmente para uma placa de petri, onde foram imersos em álcool isopropílico, durante 2 min, para lavagem, assim removendo interferentes da superfície, e então secos, a temperatura de 20 °C, por cerca de 15 min.
- Adição do tiol, imersão do cantilever em uma solução de ácido 16-mercaptohexadecanóico (tiol) 2 mM em meio etanólico, por *overnight* (16 h). Após, foi realizada a lavagem do cantilever com água ultrapura (2 min) e secagem a 20 °C por 15 min.
- EDC/NHS, imersão do cantilever em uma mistura de EDC 1 mM/NHS 1 mM 4:1 (v/v) durante 10 min. A mistura de EDC/NHS foi realizada no momento de funcionalização. O EDC é usado para acoplar grupos carboxila ou

fosfato a grupos amins primárias e melhorar a ligação química de enzimas ao carbono, materiais poliméricos ou superfície de nanopartículas sem modificação prévia. Uma das principais vantagens do acoplamento EDC é a solubilidade em água, que permite a bioconjugação direta sem dissolução prévia de solvente orgânico. No entanto, o acoplamento deve ser realizado rapidamente para garantir a eficiência do método (MORALES, 2016). O NHS pode ser usado para aumentar a estabilidade deste éster ativo. A seguir, foi realizada a lavagem com água ultrapura (2 min) e secagem a 20°C por 15 min.

- Óxido de grafeno/urease, o óxido de grafeno utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pelo Instituto de Física da USP, São Carlos/SP e pelo Grupo de Nanociências e Nanotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG. O mesmo foi sintetizado utilizando o processo de esfoliação química pelo método de Hummers modificado (LIMA *et al.*, 2017) e encontrava-se diluído em água ultrapura na concentração de 0,1 mg/mL. Para a funcionalização o cantilever foi imerso nesta solução de óxido de grafeno durante 10 min. Posteriormente, foi realizada a lavagem do cantilever com água ultrapura (2 min) e secagem a 20 °C por 15 min. Em seguida o cantilever foi imerso em urease comercial (75,26 U/mg) diluída na proporção de 10:1 (m/v) em tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 7,0) de acordo com Rigo *et al.* (2019). Para a funcionalização, o cantilever foi imerso na solução enzimática durante 10 min a 20 °C. Posteriormente, foi realizada a lavagem do cantilever com solução tampão fosfato de sódio (0,2 M pH 7,0) por 2 min, seguido da secagem a 20°C por 15 min em ar ambiente.

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

Os procedimentos de funcionalização foram realizados em uma sala climatizada a 20 °C, pois temperaturas muito altas diminuem a eficiência das ligações dos grupamentos envolvidos. Posteriormente, os dispositivos foram armazenados sob refrigeração (4 °C), a seco sobre uma pequena placa de gel, dentro de placas de petri. Sendo que antes da realização de experimentos, os mesmos permaneciam a

25 °C por 30 min, para estabilizar sua temperatura.

Coleta de amostra: água de rio

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

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

Foram realizadas 4 coletas de água nos dias 23 e 30 de setembro e 7 e 14 de outubro de 2019, contemplando períodos com e sem precipitação pluviométrica.

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

e enxaguados vigorosamente com água destilada e ultrapura.

As amostras foram transportadas ao abrigo da luz solar até o Laboratório de Termodinâmica da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim. Todas as amostras coletadas foram filtradas com papel filtro quantitativo (J Prolab) faixa preta com gramatura de 80 g/m<sup>2</sup> e tamanho de poro de 28 µm, para garantir a remoção de possíveis interferentes físicos da amostra, e armazenadas a temperatura de congelamento (-20 °C).

Detecção de Cd<sup>2+</sup> pelos nanobiossensores e nanossensores de cantilever

A resposta dos nanobiossensores foi avaliada em deflexão para a detecção de Cd<sup>2+</sup> em água de rio. A resposta em deflexão foi obtida em um AFM Nanosurf (C3000 Controller) por meio da realização de uma imagem em meio líquido, e em modo estático. As imagens foram realizadas em modo contato, utilizando o método de feixe óptico, o qual o feixe de laser é focado na extremidade final do cantilever e refletido para um fotodiodo de quatro quadrantes que monitora a deflexão do mesmo.

O dispositivo (cantilever) foi acoplado a um suporte denominado de canticlip, sendo posteriormente inserido junto ao cabeçote (*scanner*) do equipamento. A calibração do laser foi realizada apenas na primeira medida (branco-água ultrapura), onde o mesmo foi posicionado na extremidade final da haste do cantilever e na posição central do fotodetector, verificando sua intensidade, que ficou em torno de 70%. Então, a resposta (deflexão) era obtida por meio da criação de uma imagem, onde o cantilever não realizava uma varredura nos eixos x e y dentro da gota de líquido, com resolução de 450x450 pontos (a imagem era formada por 450 linhas, representando os pontos de resposta) e velocidade de varredura foi de 1 s/linha para obtenção da resposta. Nestes parâmetros, a duração de cada análise era de 15 min.

Sendo assim, uma gota (± 0,5 mL) de cada concentração era injetada, com o auxílio de uma pipeta de pasteur, sobre uma placa de aço inoxidável no AFM, de modo que o nanossensor de cantilever ficasse totalmente



imerso nesta gota para posterior leitura direta das medidas de deflexão. Transcorrido o tempo de 15 min, a gota de líquido era retirada e injetava-se outra gota em ordem crescente de concentração.

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

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

## RESULTADO E DISCUSSÃO

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

O nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno/urease apresenta uma proposta inovadora para imobilizar enzima em óxido de grafeno, assim melhorando suas propriedades de sensoriamento. Desta forma, a Figura 1 apresenta a resposta deste nanobiossensor ao efeito matricial da água do rio nas diferentes coletas e água ultrapura (branco). Enquanto que a Figura 2 apresenta a resposta do nanobiossensor para o efeito da matriz (água do rio) com diferentes concentrações de  $\text{Cd}^{2+}$  (0,01; 0,05; 0,1; 1 e 10 ppb) nos diferentes dias de coleta.

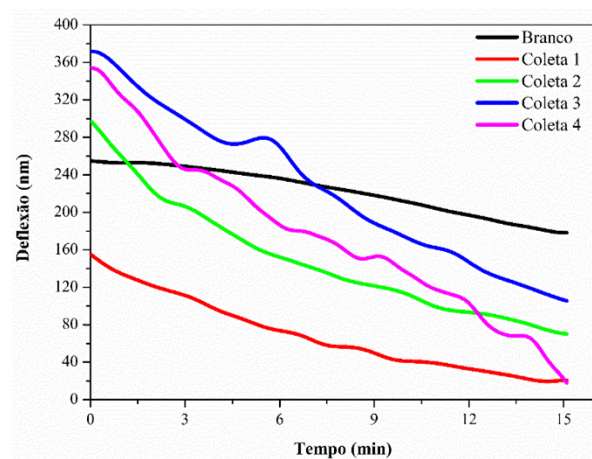


Figura 1: Resposta do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno/urease ao efeito matricial da água do rio nas diferentes coletas e água ultrapura (branco).

Na Figura 1 pode-se perceber que o nanobiossensor funcionalizado com óxido de grafeno/urease sofreu efeito da matriz, pois observa-se que a resposta de deflexão para água do rio sem adição de cádmio se comporta de maneira distinta nas 4 coletas de água.

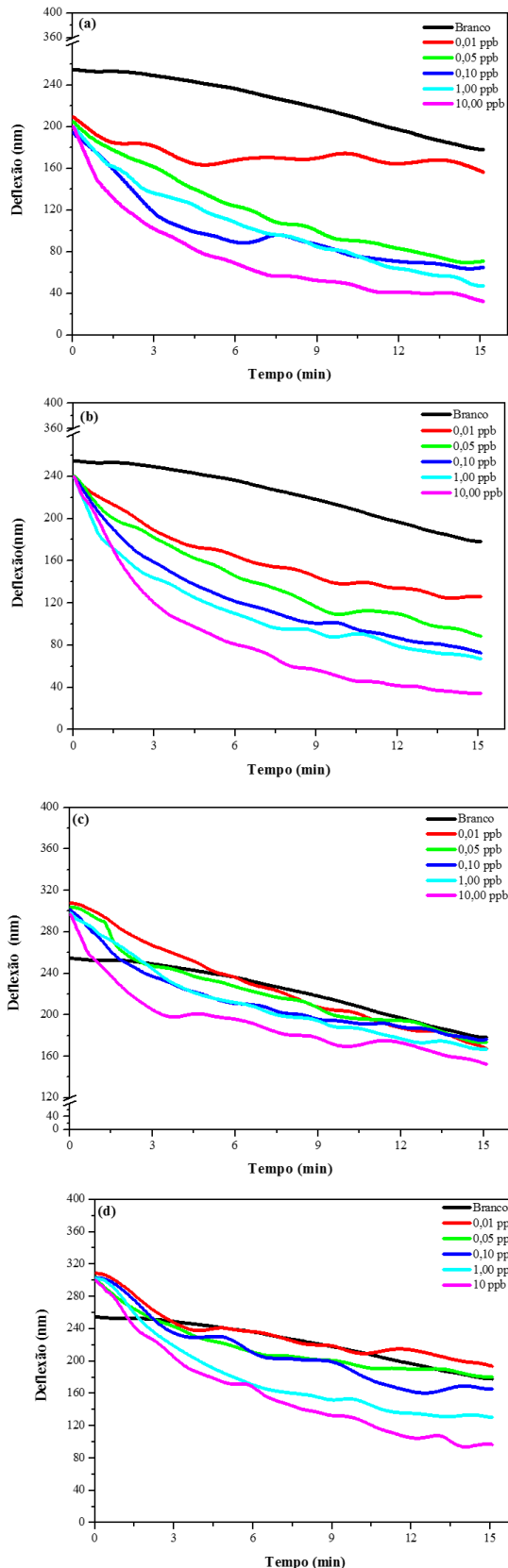


Figura 2: Resposta dos nanobiossensores funcionalizados com óxido de grafeno/urease ao efeito da matriz (água do rio) com diferentes concentrações de Cd<sup>2+</sup> (0,01; 0,05; 0,1; 1 e 10 ppb) nos diferentes dias de coleta: (a) coleta 1, (b) coleta 2, (c) coleta 3 e (d) coleta 4.

O efeito da matriz foi minimizado quando as amostras foram fortificadas com concentrações conhecidas de cádmio (Figura 2), e então o nanobiossensor utilizado foi capaz de detectar estas diferentes concentrações de cádmio.

Esta diferença de comportamento da resposta dos nanobiossensores, pode ser devido ao fato das amostras reais, apresentarem características distintas.

A quantidade de chuvas do período (Figuras 3 a e b) em que as coletas de água no rio Tigre foram realizadas também podem ter influenciado, uma vez em se que obteve coletadas antecedidas por um período com quantidade baixa de chuva (coletas 1 e 2) e outras com maior quantidade de chuva (coletas 3 e 4). Tais dados foram obtidos do site do INMET. As 4 coletas foram realizadas nos dias 23 e 30 de setembro (coletas 1 e 2) e 7 e 14 de outubro de 2019 (coletas 3 e 4).

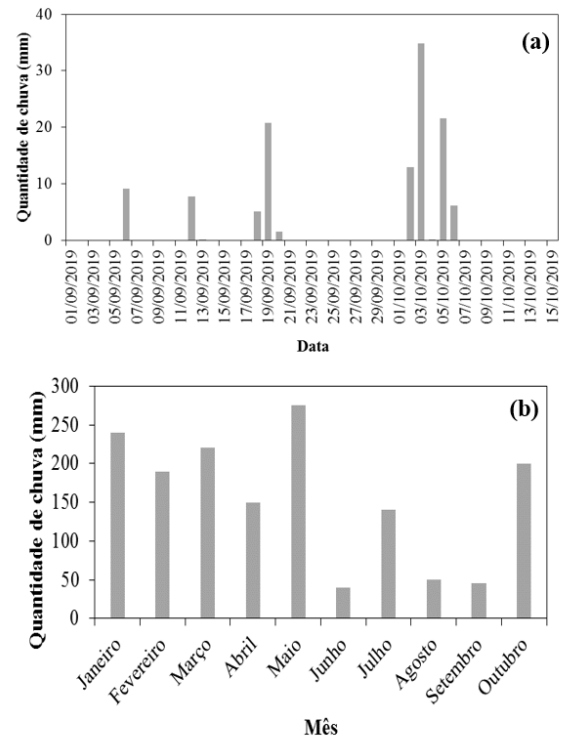


Figura 3: Dados de precipitação pluviométrica entre os dias 01 de setembro a 15 de outubro de 2019 (a) e acumulado de chuva na estação automática de Erechim dos meses de janeiro a outubro de 2019 (b).

Segundo Rigo (2019) o efeito da matriz depende das propriedades físico-químicas do analito de interesse e das características dos

componentes da matriz endógena (compostos desconhecidos e imprevisíveis). Geralmente a análise em amostras reais é difícil, uma vez que as matrizes ambientais são mais complexas e variáveis, tornando o efeito matricial mais pronunciado.

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

## CONCLUSÃO

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

Desta forma, os nanobiossensores e nanossensores desenvolvidos neste trabalho podem ser utilizados como uma ferramenta para a detecção de cádmio em águas, pois apresentaram baixo limite de detecção e análise em tempo real. Podendo, futuramente, atuar na detecção prévia e precisa dos lançamentos deste metal nos cursos d'água, promovendo, desta forma, um melhor controle e monitoramento das suas emissões, consequentemente ajudando a melhorar a qualidade da água refletindo diretamente na saúde dos seres vivos e também do meio ambiente.

## NOMENCLATURA

% - Percentual  
 µg – microgramas  
 µL – microlitros  
 µm - micrometros  
 °C – Graus Celsius  
 AFM – Microscópio de Força Atômica  
 Au - Ouro  
 Cd<sup>2+</sup> - Cádmio  
 CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente  
 EDC - N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida  
 INMET – Instituto Nacional de Meteorologia  
 kHz – quilohertz  
 km - quilômetros  
 L – litro  
 M - molar  
 min – minutos  
 mg – miligrama  
 mm - milímetros  
 mM – milimol  
 mL – mililitro  
 N - Nêwton  
 NHS - N-hidroxisuccinimida)  
 nm – nanômetro  
 OMS – Organização Mundial da Saúde  
 ppb – partes por bilhão  
 Tiol - ácido 16-mercaptohexadecanóico  
 U - Unidade  
 v - volume

## REFERÊNCIAS

- BRANDAO, H. D. M.; GERN, J. C.; VICENTINI, N. M.; PEREIRA; MUNK, M.; ANDRADE, P. V. D. (2011), Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. Revista CFMV, v. 17, n. 53, p. 61–67.
- BRASIL. Portaria nº 518 em 25 de março de 2004, 2004. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria\\_518\\_2004.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria_518_2004.pdf)>
- BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente).
- BRASIL. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Ministério da Saúde. Diário Oficial da União, 2011. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html)>
- BUENO, C. C.; GARCIA, P. S.; STEFFENS, C.; DEDA, D. K.; LEITE, F. DE L. (2017), Nanosensors. In: Nanoscience and its

- Applications. p. 121–153.
- CARRASCOSA, L. G.; MORENO, M.; ÁLVAREZ, M.; LECHUGA, L. M. (2006), Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, n. 3, p. 196–206.
- ELOVERDE. PROJETO REVITALIZAÇÃO DOS RIOS DE ERECHIM. (2020), Disponível em: <[http://www.eloverde.org.br/uploads/artigos/Relatorio\\_Final\\_BAIXA\\_Qualidade\\_03.09.13.pdf](http://www.eloverde.org.br/uploads/artigos/Relatorio_Final_BAIXA_Qualidade_03.09.13.pdf)>. Acesso em: 21 fev. 2020.
- FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. (2006), Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 137–142.
- FRITZ, J. (2008), Cantilever biosensors. *The Analyst*, v. 133, n. 7, p. 855.
- GASPAR, C. (2010), Preparação e caracterização de nanocompósitos de nanopartículas metálicas com proteínas e suas aplicações em biossensores. Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa (dissertação de mestrado).
- GU, Z.; SONG, W.; YANG, Z.; ZHOU, R. (2018), Metal–organic framework as an efficient filter for the removal of heavy metal cations in water. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 20, n. 48, p. 30384–30391.
- GUMPU, M. B.; KRISHNAN, U. M.; RAYAPPAN, J. B. B. (2017), Design and development of amperometric biosensor for the detection of lead and mercury ions in water matrix—a permeability approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 409, n. 17, p. 4257–4266.
- JÄRUP, L. (2003), Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, v. 68, n. 1, p. 167–182.
- LEITE, F. L.; HERRMANN, P. S. P. (2005), Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: a review. *Journal of Adhesion Science and Technology*, v. 19, n. 3–5, p. 365–405.
- LIMA, A. H.; MENDONÇA, J. P.; DUARTE, M.; STAVALE, F.; LEGNANI, C.; DE CARVALHO, G. S. G.; MACIEL, I. O.; SATO, F.; FRAGNEAUD, B.; QUIRINO, W. G. (2017), Reduced graphene oxide prepared at low temperature thermal treatment as transparent conductors for organic electronic applications. *Organic Electronics*, v. 49, p. 165–173.
- 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. (2018), Cantilever nanobiosensor using tyrosinase to detect atrazine in liquid medium. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 53, n. 4, p. 229–236.
- MORALES, J. J. B. (2016), Electrochemical sensors based on electrochemically inert polyme, Universidade Técnica da Catalunha (tese de doutorado).
- MUENCHEN, D. K.; MARTINAZZO, J.; DE CEZARO, A. M.; RIGO, A. A.; BREZOLIN, A. N.; MANZOLI, A.; LEITE, F. DE L.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J. (2016), Pesticide Detection in Soil Using Biosensors and Nanobiosensors. *BIOINTERFACE RESEARCH IN APPLIED CHEMISTRY*.
- RIBEIRO-FILHO, M. R.; SIQUEIRA, J. O.; CURI, N.; SIMÃO, J. B. P. (2001), Fracionamento e biodisponibilidade de metais pesados em solo contaminado, incubado com materiais orgânicos e inorgânicos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 25, n. 2, p. 495–507.
- RIGO, A. (2019), Desenvolvimento de nanobiossensores de cantilever para detecção de metais pesados em água, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI-Erechim (tese de doutorado).
- RIGO, A. A.; CEZARO, A. M. DE; MUENCHEN, D. K.; MARTINAZZO, J.; BREZOLIN, A. N.; HOEHNE, L.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C. (2019), Cantilever nanobiosensor based on the enzyme urease for detection of heavy metals. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 36, n. 04, p. 1429–1437.
- SAINI, R. K.; BAGRI, L. P.; BAJPAI, A. K. (2017), Smart nanosensors for pesticide detection. In: *New Pesticides and Soil Sensors*. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 519–559.
- SMITH, R. M. (2003), Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, v. 1000, n. 1–2, p. 3–27.
- STEFFENS, C.; LEITE, F. L.; BUENO, C. C.; MANZOLI, A.; HERRMANN, P. S. D. P. (2012), Atomic Force Microscopy as a Tool Applied to Nano/Biosensors. *Sensors*, v. 12, n. 6, p. 8278–8300.
- TAMAYO, J.; KOSAKA, P. M.; RUZ, J. J.; SAN PAULO, Á.; CALLEJA, M. (2013), Biosensors based on nanomechanical systems. *Chem. Soc. Rev.*, v. 42, n. 3, p. 1287–1311.



- VELANKI, S.; JI, H.-F. (2006), Detection of feline coronavirus using microcantilever sensors. *Measurement Science and Technology*, v. 17, n. 11, p. 2964–2968.
- VELASCO-GARCIA, M. N.; MOTTRAM, T. (2003), Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. *Biosystems Engineering*, v. 84, n. 1, p. 1–12.
- VERMA, R.; DWIVEDI, P. (2013), Heavy metal water pollution- A case study. *Recent Research in Science and Technology*, v. 5, n. 2076–5061, p. 98–99.
- VINODHINI, R.; NARAYANAN, M. (2008), Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). *International Journal of Environmental Science & Technology*, v. 5, n. 2, p. 179–182.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2017), *Guidelines for drinking water quality 4th edition*.