



DETECÇÃO DE ATRAZINA EM ÁGUA UTILIZANDO NANOBIOSENSORES DE CANTILEVER FUNCIONALIZADOS COM ÓXIDO DE GRAFENO E TIROSINASE

ELIEL P. MACHADO^{1*}, SANDRA C. BALEN¹, DIEGO M. DA SILVA¹, LUCÉLIA HOEHNE², JULIANA STEFFENS¹, CLARICE STEFFENS¹

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

²Universidade do Vale do Taquari – Univates, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
*e-mail: eliel.neko@gmail.com

RESUMO – Cada vez mais micropoluentes, como pesticidas, são lançados nos corpos d'água. A atrazina é considerado o herbicida mais amplamente utilizado no mundo todo e por possuir uma alta toxicidade a sua presença deve ser monitorada em águas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver nanobiossensores de cantilever funcionalizados com óxido de grafeno e enzima tirosinase para detecção de atrazina em água. A funcionalização dos cantileveres foi realizada utilizando a técnica de monocamadas automontadas. As concentrações de atrazina utilizadas foram baseadas na legislação brasileira. O nanobiossensor de cantilever desenvolvido foi capaz de distinguir as diferentes concentrações de atrazina em água ultrapura, obtendo uma alta sensibilidade e baixos limites de detecção e quantificação. Sendo assim, tais resultados demonstram a aplicabilidade destes dispositivos no monitoramento ambiental.

Palavras-chave: Atrazina. Nanobiossensor. Óxido de Grafeno. Tirosinase.

ABSTRACT - More and more micropollutants, such as pesticides, are released into water bodies. Atrazine is considered the most widely used herbicide worldwide and because it has a high toxicity, its presence must be monitored in waters. In this context, the objective of this work is to develop cantilever nanobiosensors functionalized with graphene oxide and tyrosinase enzyme for the detection of atrazine in water. The functionalization of the cantilevers was performed using the self-assembled monolayer technique. The atrazine concentrations used were based on Brazilian legislation. The developed cantilever nanobiosensor was able to distinguish the different concentrations of atrazine in ultrapure water, obtaining high sensitivity and low limits of detection and quantification, properties that are very important in the development of sensors. Therefore, these results demonstrate the applicability of these devices in environmental monitoring.

Keywords - Atrazine. Nanobiosensor. Graphene Oxide. Tyrosinase.

INTRODUÇÃO

Com a alta demanda de alimentos no mundo de hoje, cada vez mais se faz

necessário ampliar a produção de alimentos para satisfazer as necessidades populacionais, conseqüentemente uma demanda maior de fertilizantes e pesticidas são utilizados para



obter uma maior produção com uma menor perda (Urseler *et al.*, 2022).

Dessa forma vários micropoluentes como pesticidas, antibióticos e microcistinas estão sendo deslocados para corpos d'água, sendo detectados normalmente na faixa de ng/L e ug/L, ocorrendo que esses poluentes mesmo em baixas concentrações tem um grande efeito colateral ao meio ambiente e na saúde humana. Dessa maneira os pesticidas, quando ingeridos pelo corpo, são responsáveis por várias doenças resultantes como câncer, retardo do desenvolvimento neural de crianças, debilidade mental, atividade pulmonar diminuída entre outros (Sun *et al.*, 2020).

O herbicida atrazina, utilizado para controlar ervas daninhas que possuem folhas largas, é o pesticida mais utilizado mundialmente, chegando a cerca de 90 mil toneladas por ano. Ao longo do tempo é capaz de se bioacumular, depositando por lixiviação em corpos d'água e em argilas. Assim, tem grande potencial de contaminação à saúde humana e animal, como exemplo, em anfíbios, causando impactos no seu comportamento, desenvolvimento e crescimento (Huang *et al.*, 2022; Urseler *et al.*, 2022). Um estudo na Alemanha, mostrou que mesmo 20 anos após a proibição do herbicida atrazina, ainda era encontrado em águas subterrâneas, mostrando o seu impacto de contaminação (Rostami *et al.*, 2021).

Existem várias técnicas para a detecção de atrazina em água, como a espectrometria de massa acoplada por cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gasosa (Steffens *et al.*, 2022). Com avanço da tecnologia, novas formas de detecção de moléculas têm sido desenvolvidas, como métodos mais rápidos, econômicos e eficazes, os nanobiossensores de cantilever se mostram promissores nesse quesito (Scapin, 2021). Os nanobiossensores são sensores em nano escala de detecção, possuem uma ligação entre um material biológico seletivo e um equipamento eletrônico, o transdutor, este responsável pela obtenção do sinal para leitura. A detecção é obtida pela interação entre a camada biológica

do sensor e a amostra. O sensor de antemão é preparado (funcionalizado), com o agente biológico para detecção, podendo ser esses agentes enzimas, células ou até mesmo anticorpos (Ballen, 2020; Mendes, 2014).

Esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nanobiossensores de cantilever funcionalizados como óxido de grafeno e enzima tirosinase para a detecção de atrazina em água.

MATERIAL E MÉTODOS

Funcionalização 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 (± 4) kHz e constante de mola de 0,2 (0,07-0,4) N/m. A baixa constante de mola (0,2 N/m) proporciona maior sensibilidade para as medições no modo estático em meio líquido (Carrascosa *et al.*, 2006; Fritz, 2008).

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

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).

Primeiramente foi realizada a limpeza dos cantileveres em álcool isopropílico, os quais foram transferidos individualmente para uma placa de petri e imersos em álcool, durante 2 min, para remoção de interferentes da superfície, e então secos, a temperatura de 20 °C, por cerca de 15 min. Em seguida foram



imersos em uma solução de ácido 11-mercaptoundecanóico 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.

A próxima etapa de funcionalização consistiu da imersão do cantilever em uma mistura de EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) 1 mM/NHS (N-hidroxisuccinimida) 1 mM 4:1 (v/v) durante 10 min, seguido de lavagem em água ultrapura (2 min) e secagem a 20°C por 15 min.

Por fim os cantileveres foram imersos durante 10 min em uma mistura de óxido de grafeno (0,1 mg/mL) e enzima comercial tirosinase (0,05 mg/mL diluída em tampão fosfato de sódio a pH 6,5) na proporção de 1:1 v/v. 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). 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.

Após a funcionalização 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.

Deteção de atrazina pelos nanobiossensores de cantilever

A resposta dos nanobiossensores foi avaliada em deflexão para a detecção de atrazina em água. A resposta em deflexão foi obtida em um AFM Nanosurf (C3000 Controller) (Figura 1) onde houve a realização de uma imagem em meio líquido e em modo estático. As imagens foram realizadas em modo contato, utilizando o método de feixe óptico, o qual o feixe de laser é focado na extremidade final do cantilever e refletido para um fotodiodo de quatro quadrantes que monitora a deflexão do mesmo.

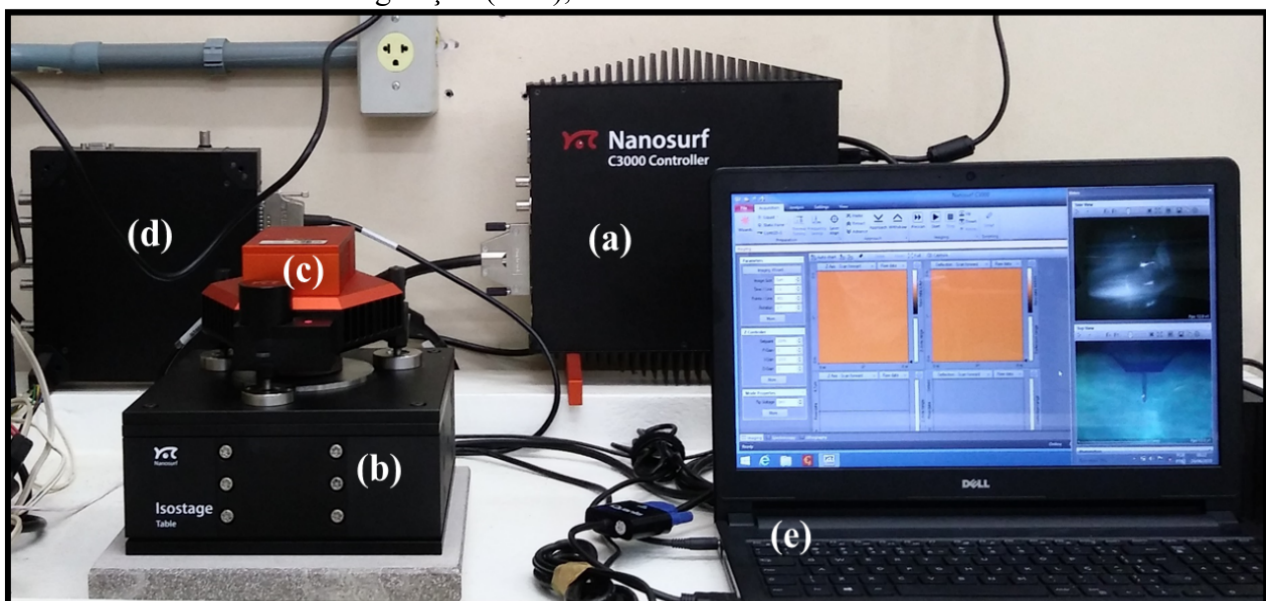




Figura 1: AFM: (a) Controlador C3000, (b) Mesa anti-vibratória, (c) Cabeçote (scanner), (d) Controlador Easyscan e (e) computador.

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 65%. Então, a resposta (deflexão) foi 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 ($\pm 0,5$ mL) de cada concentração era injetada, com o auxílio de uma pipeta de pasteur, sobre uma placa de aço inoxidável no AFM, de modo que o nanobiossensor 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 atrazina em água ultrapura, onde as mesmas foram escolhidas baseando-se no limite máximo permitido na legislação vigente para água de rios e potável (Brasil, 2004, 2005, 2011). Desta forma, foi preparada uma “solução estoque” na concentração de 10000 ppb (10 mg/L) de atrazina, e a partir desta, foram preparadas as concentrações de 0,001,

0,01, 0,1, 1, 10, 50 e 100 ppb ($\mu\text{g/L}$), diluídas em água ultrapura. Todas as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e em temperatura ambiente (25°C).

Caracterização da resposta dos nanobiossensores de cantilever

As repostas de sensibilidade linear, limite de detecção e reversibilidade dos nanobiossensores expostos a diferentes concentrações de atrazina em água foram avaliadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata e estão descritas a seguir:

Sensibilidade linear: demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e é expressa pelo coeficiente angular da curva analítica que foi obtida por meio da curva de calibração da concentração logarítmica de atrazina em água *versus* a deflexão.

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

$$LD = \frac{kS_b}{m} \quad (1)$$

Limite de quantificação (LQ): definido como a quantidade de analito detectável pelos sensores. Para o cálculo utilizou-se a Equação 2, onde a sensibilidade da curva de calibração é o m e o desvio padrão do branco é o S_b .

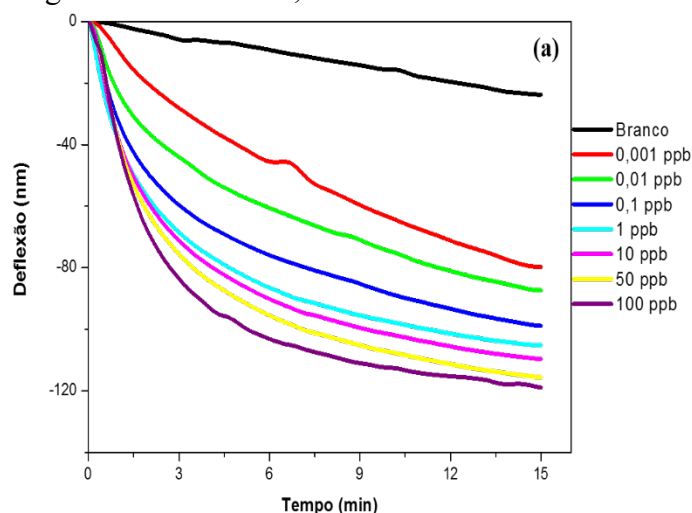
$$LQ = 10 \frac{S_b}{m} \quad (2)$$



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Deteção de atrazina em água

Em se tratando de desenvolvimento de nanobiossensores umas das etapas cruciais do processo ocorre antes mesmo da funcionalização com a escolha do elemento biológico. Neste estudo, a enzima tirosinase



foi a escolhida por haver relatos na literatura que a mesma pode ser inibida na presença do herbicida atrazina, o qual é o analito de interesse.

A Figura 2 apresenta as respostas de deflexão do nanobiossensor funcionalizado com óxido de grafeno e tirosinase quando exposto a diferentes concentrações de atrazina.

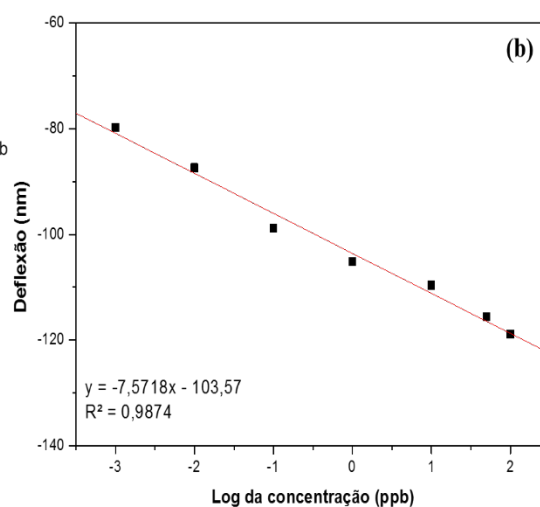


Figura 2: Resposta de deflexão dos nanobiossensores de cantilevers funcionalizados com óxido de grafeno e tirosinase quando expostos ao branco (água ultrapura) e diferentes concentrações de atrazina em água ultrapura (a) e curva de calibração obtida (b).

As medidas de deflexão foram realizadas por um período de 15 min, e no decorrer deste tempo, foi possível verificar que houve diferença na deflexão (nm) dos nanobiossensores entre o branco (água ultrapura) e as soluções de atrazina em água ultrapura, como pode ser observado na Figura 2a. Esta diferença observada é um indicativo de que os dispositivos conseguem detectar a presença do pesticida na água na faixa de ppb.

A deflexão dos cantileveres ocorreu para baixo, com o aumento da concentração da atrazina, o que 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. Quando a adsorção de moléculas ocorre na superfície funcionalizada, pode causar uma flexão, a qual está associada a repulsão ou expansão de moléculas na superfície funcionalizada do cantilever. Quando a flexão ocorre para baixo, é chamada de tensão compressiva (Velanki et al., 2007).

As curvas de calibração foram obtidas pela deflexão, ou seja a resposta dos nanobiossensores versus o logaritmo das concentrações de atrazina utilizada, Figura 2b. Observa-se com relação ao coeficiente de correlação (R^2) um ajuste coerente dos dados para a linha de regressão com valores acima de 0,95 conforme recomendado pelo INMETRO (2003).

Os parâmetros de sensibilidade linear, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) podem ser observados na Tabela 1.



Tabela 1: Valores de sensibilidade linear, limite de detecção (LD) e limite de detecção (LQ) dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com óxido de grafeno e tirosinase.

Parâmetros	Resposta
Sensibilidade (nm/ppb)	7,5718 ± (0,032)
LD (ppb)	0,0119 ± (0,003)
LQ (ppb)	0,0396 ± (0,005)

O nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno e tirosinase a apresentou sensibilidade de 7,5718 nm/ppb, limite de detecção de 0,0119 ppb e limite de quantificação de 0,0396 ppb como demonstrado na Tabela 1.

Segundo a Resolução nº 357 do CONAMA (Conselho Nacional Do Meio Ambiente – CONAMA, 2005) e as Portarias nº 1469, de 29 de dezembro de 2000 e nº 2914, de 12 de dezembro de 2011, ambas do Ministério da Saúde) (Ministério Da Saúde, 2001), a máxima concentração de atrazina permitida em águas doces é de 2 µg/L, ou seja 2 ppb, o nanobiossensor estudado foi capaz de detectar concentrações menores que a legislação, o que significa que poderia que este dispositivo pode ser usado para detecção de atrazina em água.

É importante salientar que em se tratando de sensores busca-se dispositivos com maiores valores de sensibilidade e menores valores de limite de detecção, o que os tornam mais sensíveis e menores concentrações podem ser detectadas e, sendo assim, melhores são suas respostas (Brasil, 2003; Skoog *et al.*, 2005).

CONCLUSÃO

O método de funcionalização dos nanobiossensores demonstrou ser eficiente para detectar as diferentes concentrações de atrazina, por meio da adsorção do analito na superfície funcionalizada do cantilever, o qual

apresentou deflexão (nm) diferente para cada concentração estudada.

Através dos resultados de sensibilidade linear, limite de detecção e de quantificação, foi possível observar que o nanobiossensor de cantilever funcionalizado com óxido de grafeno e tirosinase foi capaz de detectar atrazina abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira.

Diante de tais resultados foi possível observar que o nanobiossensor de cantilever desenvolvido neste estudo detectou o herbicida atrazina em água, o que demonstra sua aplicabilidade no monitoramento ambiental.

NOMENCLATURA

% - Percentual
µg – microgramas
µL - microlitros
AFM – Microscópio de Força Atômica
°C – Graus Celsius
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
EDC - N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia
k – fator de confiança
kHz – kilo hertz
L - litro
LD – Limite de Detecção
LQ – Limite de Quantificação
M – sensibilidade da curva de calibração
min – minutos
mg – miligrama
mm - milímetros
mM – mili mol
mL - mililitro
NHS - N-hidroxisuccinimida)
nm – nanômetro
ppb – partes por bilhão
R – Coeficiente de Pearson
s - segundo
Sb – desvio padrão do branco
v – volume



AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem, primeiramente a Deus, também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil (FAPERG), Financiadora de Estudos e Projeto (FINEP) e a URI- Erechim.

REFERÊNCIAS

- BALLEN, S. C. (2020), Desenvolvimento De Nanobiossensores E Nanossensores De Cantilever Para Detecção De Cádmi Em Água, Programa de PÓs Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (dissertação de mestrado).
- BRASIL, (2003) ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – Re N° 899, De 29 De Maio De 2003 Diário Oficial da União, 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COM_P.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b>
- 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.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA, (2005) Resolução n° 357, Diário Oficial da União.
- FRITZ, J. (2008), Cantilever biosensors, *The Analyst*, v. 133, n. 7, p. 855.
- HUANG, M.; ZHAO, Q.; YIN, J.; CAO, S.; CHEN, H.; DUAN, R. (2022), The toxic effects of chronic atrazine exposure on the intestinal microbiota, metabolism and transcriptome of *Pelophylax nigromaculatus larvae*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 440, p. 129817.
- INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, (2003), Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos.
- 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.
- MENDES, C. C. A. (2014), Estudo Teórico Da Seletividade E Do Solvente Em Um Nanobiossensor De Herbicidas Inibidores Da Acetil-Coenzima A Carboxilase, Curso de Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Uberlândia (dissertação de mestrado).
- MINISTÉRIO DA SAÚDE.(2001), Portaria n° 2914: Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, Brasil.
- ROSTAMI, S.; JAFARI, S.; MOEINI, Z.; JASKULAK, M.; KESHTGAR, L.; BADEENEZHAD, A.; AZHDARPOOR, A.; ROSTAMI, M.; ZORENA, K.; DEGHANI, M. (2021), Current methods and technologies for degradation of atrazine in contaminated soil and water: A review, *Environmental Technology & Innovation*, v. 24, p.



102019.

SCAPIN, E. (2021), Uso De Diferentes Tióis No Desenvolvimento De Nanobiossensores De Cantilever Para Detecção De Atrazina Em Água, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (tese de doutorado).

SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, J.; CROUCH, S. (2005), FUNDAMENTOS DA QUÍMICA ANALÍTICA – Tradução da 8a. edição norte-americana. 8. ed.

STEFFENS, C.; BALLEEN, S. C.; SCAPIN, E.; DA SILVA, D. M.; STEFFENS, J.; JACQUES, R. A. (2022), Advances of nanobiosensors and its application in atrazine detection in water: A review, Sensors and Actuators Reports, v. 4, p. 100096.

SUN, S.; JIANG, T.; LIN, Y.; SONG, J.; ZHENG, Y.; AN, D. (2020), Characteristics of organic pollutants in source water and purification evaluations in drinking water treatment plants. Science of The Total Environment, v. 733, p. 139277.

URSELER, N.; BACHETTI, R.; BIOLÉ, F.; MORGANTE, V.; MORGANTE, C. (2022), Atrazine pollution in groundwater and raw bovine milk: Water quality, bioaccumulation and human risk assessment, Science of The Total Environment, v. 852, p. 158498.

VELANKI, S.; KELLY, S.; THUNDAT, T.; BLAKE, D. A.; JI, H.-F. (2007), Detection of Cd(II) using antibody-modified microcantilever sensors. Ultramicroscopy, v. 107, n. 12, p. 1123–1128.

VELANKI, S.; JI, H.-F. (2006), Detection of feline coronavirus using microcantilever sensors, Measurement Science and Technology, v. 17, n. 11, p. 2964–2968.