

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE NANOBIOSENSOR ENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE CÁDMIO EM ÁGUA

S. C. BALLE¹, D. M. da SILVA², R. V. UTTEICH³, J. STEFFENS⁴, C. STEFFENS⁵

^{1,2,3,4,5} Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias

RESUMO – A nanotecnologia avança no desenvolvimento de técnicas para a detecção de metais pesados em água. Neste contexto os nanobiossensores enzimáticos se destacam por apresentarem alta sensibilidade frente a estes analitos. Dentre os metais pesados, o cádmio requer uma atenção especial, visto que é o metal de maior toxicidade e, então sua detecção em corpos d’água é de suma importância. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a estabilidade de nanobiossensores de cantilever funcionalizados com enzima comercial urease quando submetidos a diferentes concentrações de cádmio em água ultrapura, durante 30 dias de armazenamento. Os resultados obtidos demonstraram que a estabilidade destes dispositivos foi afetada durante o tempo de estocagem, tendo diminuição de resposta e de sensibilidade e por consequência aumento do limite de detecção. Apesar disto ainda demonstraram versatilidade na utilização, pois foram capazes de detectar o analito em escala de ppb. Sendo assim, possuem grande potencialidade de aplicação no monitoramento ambiental.

Palavras-chave: Nanotecnologia, Estabilidade, Cantilever, Metal Pesado.

ABSTRACT – Nanotechnology advances in the development of techniques for detecting heavy metals in water. In this context, enzymatic nanobiosensors stand out for their high sensitivity to these analytes. Among the heavy metals, cadmium requires special attention, as it is the most toxic metal and, therefore, its detection in water bodies is of paramount importance. Thus, the present work aims to evaluate the stability of cantilever nanobiosensors functionalized with commercial enzyme urease when subjected to different concentrations of cadmium in ultrapure water, during 30 days of storage. The results obtained showed that the stability of these devices was affected during the storage time, with a decrease in response and sensitivity and, consequently, an increase in the detection limit. Despite this, they still demonstrated versatility in use, as they were able to detect the analyte on a ppb scale. Therefore, they have great potential for application in environmental monitoring.

Keywords: Nanotechnology, Stability, Cantilever, Heavy Metal.

1. INTRODUÇÃO

A área da nanotecnologia tem apresentado grandes avanços, com o desenvolvimento de nanobiossensores, para a substituição dos métodos convencionais de detecção de metais pesados. Apesar de serem altamente sensíveis, esses métodos apresentam algumas desvantagens como a necessidade de instrumentos sofisticados, operadores habilitados, preparação de amostras e tempo de resposta longo (QUANG; KIM, 2010). Desta forma, para contornar tais problemas faz-se necessário o desenvolvimento de um método viável e rápido para a detecção de íons metálicos, tais como os nanobiossensores de cantilever.

Os nanobiossensores de cantilever são baseados em hastes ultra-sensíveis. Os mesmos apresentam resultados promissores na detecção de substâncias químicas, físicas, toxinas, poluentes e analitos em geral na micro e nanoescala (LEITE; HERRMANN, 2005; SMITH, 2003; STEFFENS et al., 2012; MUENCHEN et al., 2016; MARTINAZZO et al., 2018). Entretanto os cantilevers para serem utilizados como nanobiossensores precisam passar por uma etapa de funcionalização de sua superfície, para que seja possível a interação do mesmo com o analito a ser analisado. Como camada sensora podem ser utilizados receptores biológicos tais como: proteínas, anticorpos, enzimas e células inteiras (CUI et al., 2018). Entre estes, as enzimas são consideradas mais promissoras devido à rápida resposta, alta estabilidade e biocompatibilidade (BISWAS et al., 2017). Dentre as quais podem se destacar a urease, pois é inibida na presença de metais pesados. Sendo esta característica de grande importância na construção de sistemas de biossensores para determinação *in situ* e em tempo real em nível de traço destes íons, por exemplo, em monitoramento de água (KRAJEWSKA, 2009).

De maneira geral, os íons de metais que mais representam risco ambiental são: cádmio (Cd), chumbo (Pb), mercúrio (Hg), cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), níquel (Ni), zinco (Zn) e alumínio (Al). Os três primeiros são os mais prejudiciais tanto ao homem quanto ao meio ambiente, sendo que o cádmio é o que apresenta maior toxicidade (VOLESKY, 2001). Este metal ao ser lançado ao solo pode ser lixiviado 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).

Desta forma o presente trabalho tem por objetivo avaliar a estabilidade ao armazenamento por um período de 30 dias de um nanobiossensor de cantilever funcionalizado com enzima urease para a detecção de cádmio em água.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Desenvolvimento do nanobiossensor de cantilever

Os cantileveres (ContGD-G) usados para o desenvolvimento dos nanobiossensores foram adquiridos comercialmente (BudgetSensors), com as seguintes especificações do fabricante: material de silício revestido com 70 nm de ouro em um lado da superfície, frequência de ressonância de 13,0 (± 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).

2.2. Funcionalização da superfície dos cantilevers

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

O procedimento de funcionalização do cantilever foi baseado no trabalho de Velanki e Ji (2006) e Martinazzo et al. (2018) consistindo das seguintes etapas:

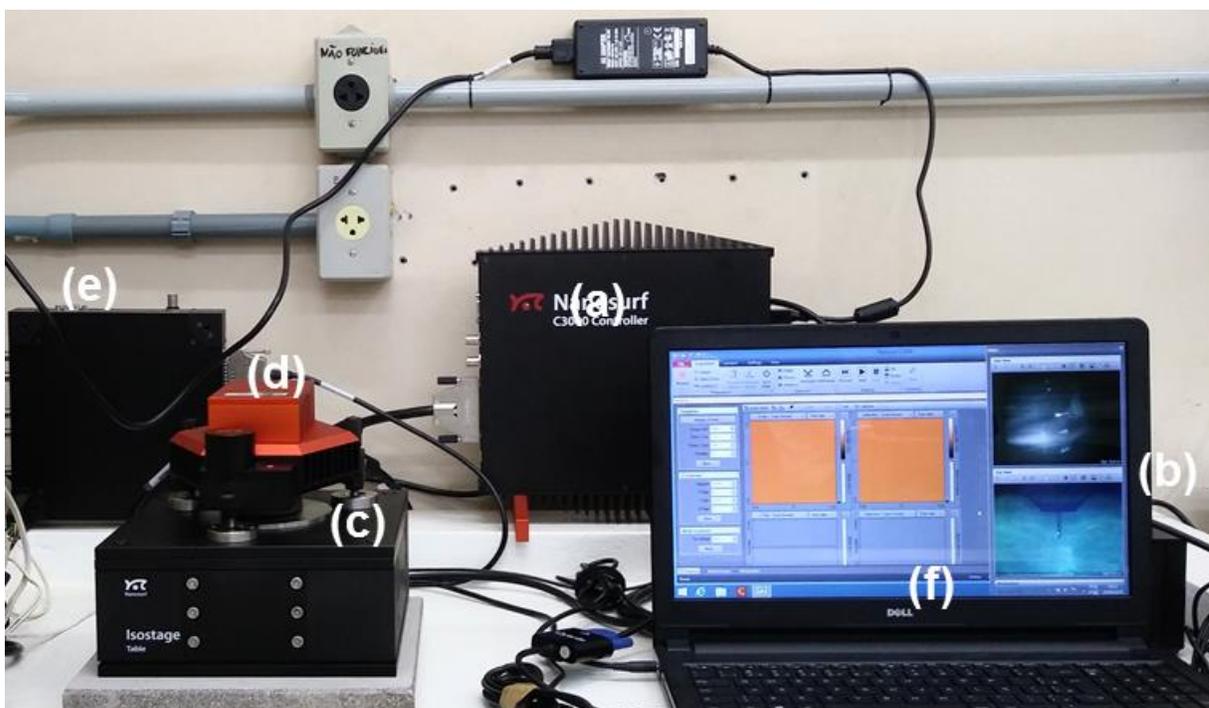
- Limpeza dos cantilevers, os quais foram transferidos individualmente para uma placa de petri, onde foram imersos em álcool isopropílico, durante 2 min, para lavagem, assim removendo interferentes da superfície, e então secos, a temperatura de 20 °C, por cerca de 15 min.
- Imersão do cantilever em uma 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.
- Imersão do cantilever em uma mistura de EDC 1 mM/NHS 1 mM 4:1 (v/v) durante 10 min. A mistura de EDC/NHS foi realizada no momento de funcionalização. O EDC é usado para acoplar grupos carboxila ou fosfato a grupos aminas primárias e melhorar a ligação química de enzimas ao carbono, materiais poliméricos ou superfície de nanopartículas sem modificação prévia. Uma das principais vantagens do acoplamento EDC é a solubilidade em água, que permite a bioconjugação direta sem dissolução prévia de solvente orgânico. No entanto, o acoplamento deve ser realizado rapidamente para garantir a eficiência do método (MORALES, 2016). O NHS pode ser usado para aumentar a estabilidade deste éster ativo. A seguir, foi realizada a lavagem com água ultrapura (2 min) e secagem a 20°C por 15 min.
- Imersão do cantilever 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. (2019a). 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.

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

2.3. Detecção de cádmio pelos nanobiossensores

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

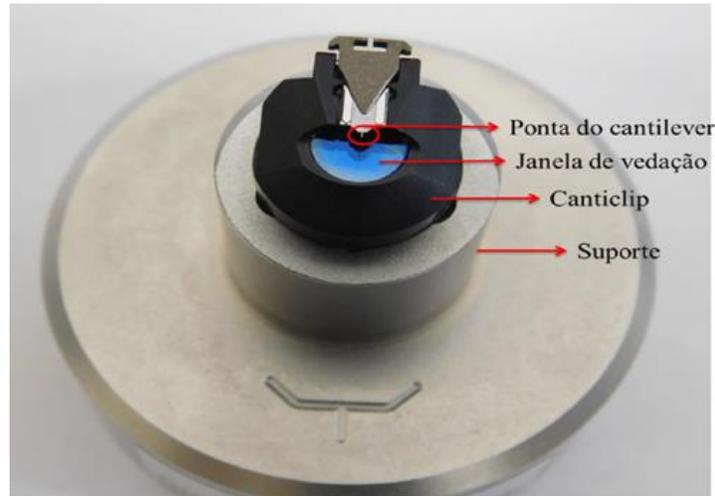
Figura 1 - AFM: (a) Controlador C3000, (b) Controlador da mesa anti-vibratória, (c) Mesa anti-vibratória, (d) Cabeçote, (e) Controlador Easyscan e (f) computador.



Fonte: O autor.

O dispositivo (cantilever) foi acoplado a um suporte denominado de canticlip (Figura 2), sendo posteriormente inserido junto ao cabeçote (*scanner*) do equipamento. A calibração do laser foi realizada apenas na primeira medida (branco-água ultrapura), onde o mesmo foi posicionado na extremidade final da haste do cantilever e na posição central do fotodetector, verificando sua intensidade, que ficou em torno de 70%. Então, a resposta (deflexão) era obtida por meio da criação de uma imagem, onde o cantilever não realizava uma varredura nos eixos x e y dentro da gota de líquido, com resolução de 450x450 pontos (a imagem era formada por 450 linhas, representando os pontos de resposta) e velocidade de varredura foi de 1 s/linha para obtenção da resposta. Nestes parâmetros, a duração de cada análise era de 15 min.

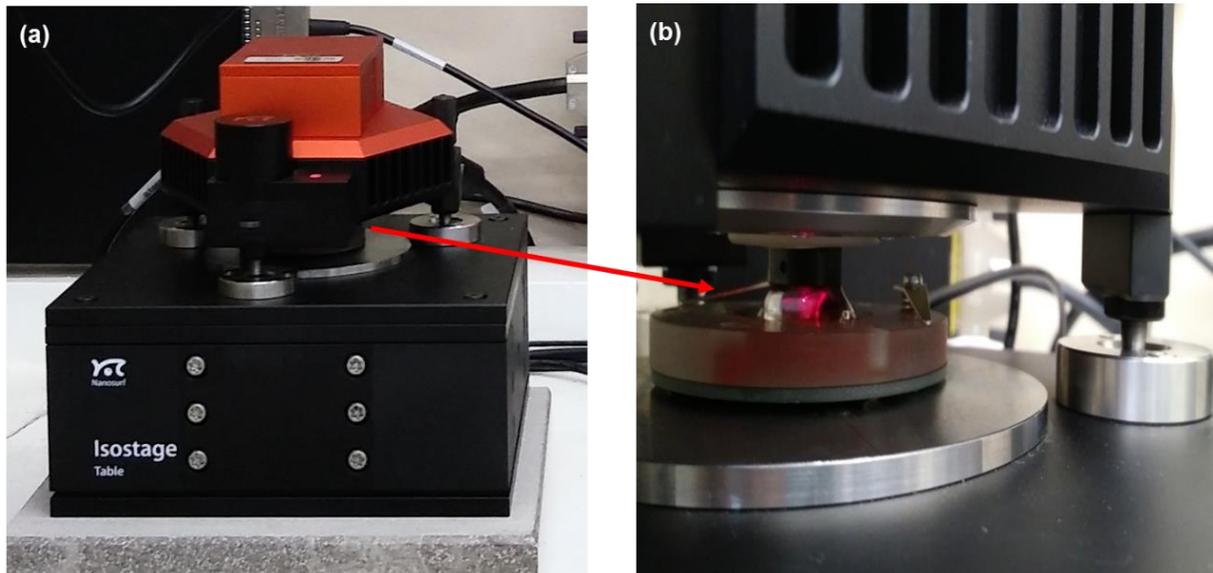
Figura 2 - Suporte para acoplamento do cantilever (canticlip).



Fonte: O autor.

Sendo assim, uma gota ($\pm 0,5$ mL) de cada concentração era injetada, com o auxílio de uma pipeta de pasteur, sobre uma placa de aço inoxidável no AFM, de modo que o nanobiossensor de cantilever ficasse totalmente imerso nesta gota para posterior leitura direta das medidas de deflexão, como demonstrado na Figura 3. Transcorrido o tempo de 15 min, a gota de líquido era retirada e injetava-se outra gota em ordem crescente de concentração.

Figura 3 - Imersão do cantilever na solução Cd^{2+} para obtenção da medida de deflexão: (a) Vista frontal do cabeçote; (b) Imersão do cantilever em meio líquido.



Fonte: O autor.

As imagens obtidas foram convertidas em um gráfico de deflexão (nm) versus tempo de contato

(min), por meio do software Gwyddion (Versão 2.53). Todos os dados foram tomados em triplicata.

O meio líquido utilizado nas análises foi preparado com diferentes concentrações de cádmio 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 cádmio, e a partir desta, foram preparadas as concentrações de 0,01, 0,05, 0,1, 1, e 10 ppb ($\mu\text{g/L}$), diluídas em água ultrapura. Todas as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e em temperatura ambiente (25°C).

2.4. Avaliação de estabilidade dos nanobiossensores

A estabilidade foi realizada com o intuito de verificar por quanto tempo os nanobiossensores permaneceriam respondendo ao analito estudado. Para isso a cada 3 dias, durante 30 dias, foi avaliada a resposta dos nanobiossensores às diferentes concentrações de cádmio 0,01, 0,05, 0,1, 1 e 10 ppb ($\mu\text{g/L}$). A partir dos resultados de deflexão foram calculados a sensibilidade linear e limite de detecção. Após cada análise os mesmos eram imersos em água ultrapura por 30 s para lavagem e então armazenados em temperatura de refrigeração ($\pm 4^\circ\text{C}$).

A sensibilidade linear demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e é expressa pelo coeficiente angular da curva analítica que foi obtida por meio da curva de calibração da concentração logarítmica do cádmio versus a deflexão.

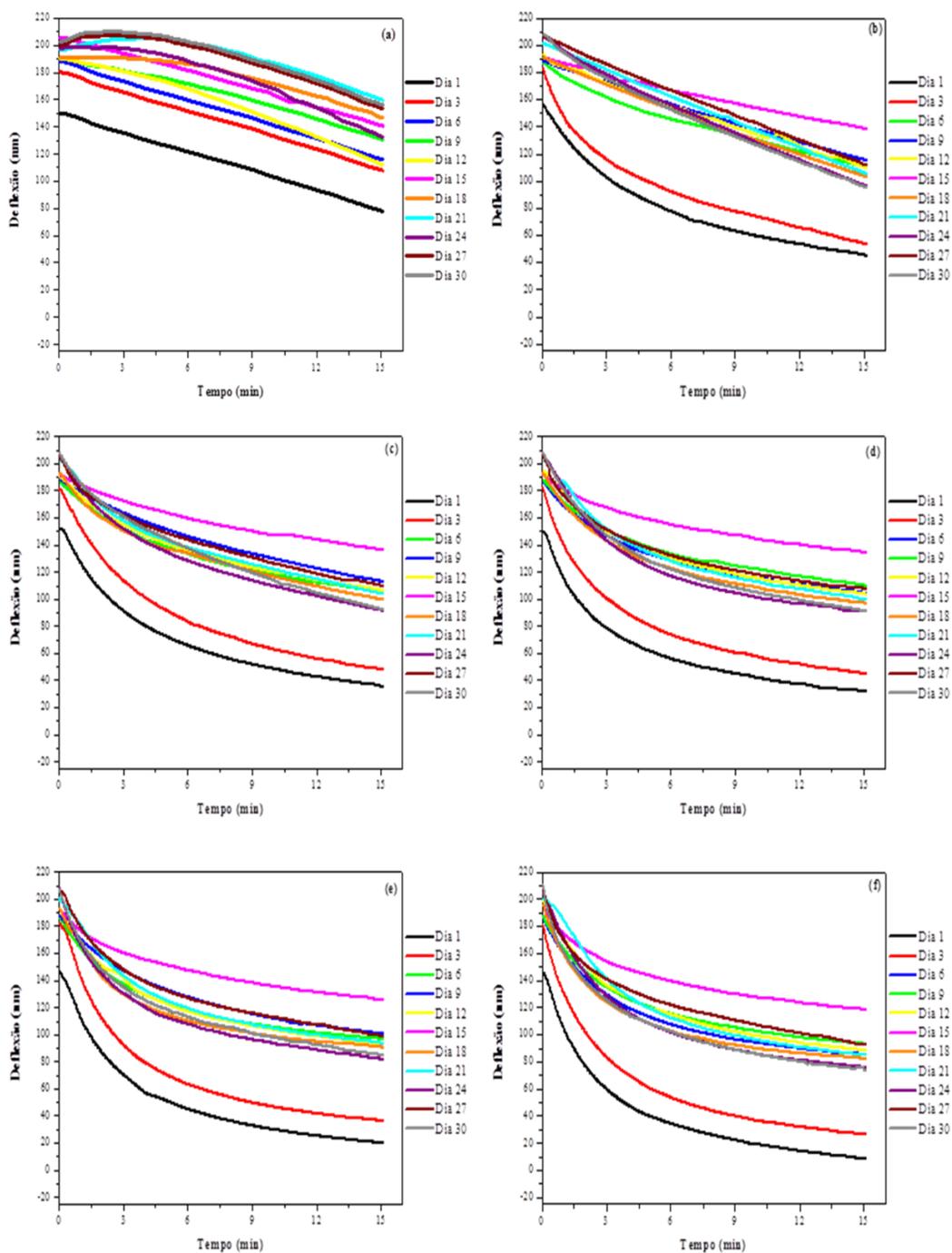
O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração que pode ser distinguida com um certo nível de confiança. O LD foi calculado de acordo com a Equação 1 (BRASIL, 2003; SKOOG et al. 2005). Para o cálculo utilizou-se a sensibilidade da curva de calibração (m), um fator de confiança $k=3$ (correspondendo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

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estabilidade da resposta de um sensor é de extrema importância, uma vez que, dependendo da situação, o ideal é que o sensor possa ser utilizado por mais tempo e que mantenha as suas características quanto a sua sensibilidade e seu limite de detecção. As repostas de deflexão estão demonstradas na Figura 4.

Figura 4 - Resposta do nanobiossensor de cantilever funcionalizado com urease durante 30 dias de armazenamento em relação a diferentes concentrações de cádmio em água ultrapura: (a) branco (água ultrapura), (b) 0,01, (c) 0,05, (d) 0,1, (e) 1 e (f) 10 ppb.

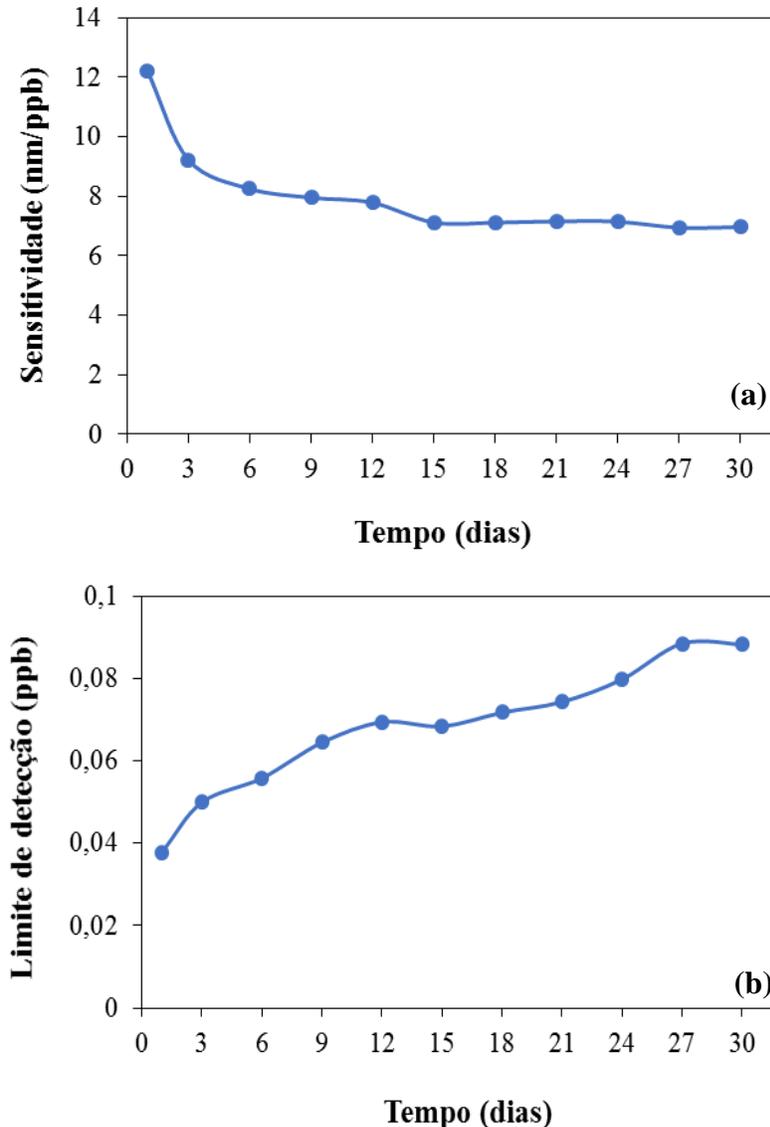


Fonte: O autor.

O nanobiossensor enzimático teve redução de sua resposta de deflexão durante os 30 dias de armazenamento de armazenamento como pode ser observado na Figura 4.

As Figura 5 apresentam os valores de sensibilidade e LD para os nanobiossensores estudados durante 30 dias de estocagem.

Figura 5 - Sensibilidade linear (a) e limite de detecção dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com urease durante 30 dias de estocagem.



Fonte: O autor.

Analisando a Figura 5 observa-se que a sensibilidade diminui durante os 30 dias de armazenamento, conseqüentemente os valores de LD aumentaram. Estimou-se ao fim dos 30 dias uma perda de sensibilidade de 42,86 %, enquanto que o LD mais que dobrou em relação ao primeiro dia.

A diminuição da resposta dos nanobiossensores está relacionada as interações intermoleculares fracas, mudanças ambientais, as quais podem levar a lixiviação da enzima da superfície funcionalizada do cantilever dessa forma diminuindo sua vida útil (SOOZANIPOUR; TAHERI-KAFRANI, 2018). Rigo et al. (2019) avaliaram a resposta de um nanobiossensor de cantilever funcionalizado pela técnica SAM com enzima urease durante 30 dias de armazenamento e verificaram uma diminuição de 44,8 % da sensibilidade e um aumento do limite de detecção.

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

Com base nestes resultados obtidos é possível dizer que o tempo de estocagem afeta a resposta dos nanobiossensores, ocorrendo uma diminuição da qualidade da resposta do mesmo por meio do decremento da atividade da enzima. Porém, mesmo observando essas diferenças em relação ao LD e a sensibilidade, os resultados mostram que mesmo após 30 dias, os mesmos conseguem detectar pequenas quantidades de Cd^{2+} , na ordem de ppb, características excelentes quando comparado com outros métodos de detecção.

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o uso de nanobiossensores de cantilever funcionalizados com enzima urease se mostrou uma ferramenta promissora para detecção de cádmio em águas.

Durante a avaliação da estabilidade houve diminuição da resposta de deflexão dos nanobiossensores de cantilever e desta forma, conseqüente diminuição da sensibilidade e aumento do limite de detecção durante os 30 dias de armazenamento. Entretanto ainda sendo capaz de detectar o analito estudado da escala de ppb, sendo assim, esta técnica se destaca como uma inovação para a detecção prévia e precisa dos lançamentos de cádmio nos cursos d'água promovendo controle e monitoramento das suas emissões, conseqüentemente ajudando a melhorar a qualidade da água, o que reflete diretamente na saúde dos seres vivos e também do meio ambiente.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - Código Financeiro 001 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul -FAPERGS, Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e URI Erechim.

5. REFERÊNCIAS

BISWAS, P.; KARN, A. K.; BALASUBRAMANIAN, P.; KALE, P. G. **Biosensor for detection of dissolved chromium in potable water: A review**. Biosensors and Bioelectronics, v. 94, p. 589–604, ago. 2017.

BRASIL. 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_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b>

BRASIL. Portaria n° 518 em 25 de março de 2004, 2004. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria_518_2004.pdf>

BRASIL. Resolução n° 357, de 17 de março de 2005. CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), 2005.

BRASIL. Portaria n° 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>

CARRASCOSA, L. G.; MORENO, M.; ÁLVAREZ, M.; LECHUGA, L. M. **Nanomechanical biosensors: a new sensing tool**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 25, n. 3, p. 196–206, mar. 2006.

CUI, Z.; LUAN, X.; JIANG, H.; LI, Q.; XU, G.; SUN, C.; ZHENG, L.; SONG, Y.; DAVISON, P. A.; HUANG, W. E. **Application of a bacterial whole cell biosensor for the rapid detection of cytotoxicity in heavy metal contaminated seawater**. Chemosphere, v. 200, p. 322–329, jun. 2018.

FRITZ, J. **Cantilever biosensors**. The Analyst, v. 133, n. 7, p. 855, 2008.

GALLI, A. **Desenvolvimento e caracterização de um biossensor bienzimático imobilizado sobre monocamadas auto-organizadas para determinação de açúcares em alimentos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

KRAJEWSKA, B. **Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 59, n. 1–3, p. 9–21, jul. 2009.

LEITE, F. L.; HERRMANN, P. S. P. **Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: a review**. Journal of Adhesion Science and Technology, v. 19, n. 3–5, p. 365–405, jan. 2005.

LIU, Y.; YU, D.; ZENG, C.; MIAO, Z.; DAI, L. **Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors**. Langmuir, v. 26, n. 9, p. 6158–6160, 4 maio 2010.

MARTINAZZO, J.; MUENCHEN, D. K.; BREZOLIN, A. N.; CEZARO, A. M.; RIGO, A. A.; MANZOLI, A.; HOEHNE, L.; LEITE, F. L.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C. **Cantilever nanobiosensor using tyrosinase to detect atrazine in liquid medium**. Journal of Environmental Science and Health, Part B, v. 53, n. 4, p. 229–236, 3 abr. 2018.

MORALES, J. J. B. **Electrochemical sensors based on electrochemically inert polyme**. [s.l.] Universidade Técnica da Catalunha, 2016.

MUENCHEN, D. K.; MARTINAZZO, J.; DE CEZARO, A. M.; RIGO, A. A.; BREZOLIN, A. N.; MANZOLI, A.; LEITE, F. DE L.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J. **Pesticide Detection in Soil Using Biosensors and Nanobiosensors**. BIOINTERFACE RESEARCH IN APPLIED CHEMISTRY, 2016.

QUANG, D. T.; KIM, J. S. **Fluoro- and Chromogenic Chemodosimeters for Heavy Metal Ion Detection in Solution and Biospecimens**. Chemical Reviews, v. 110, n. 10, p. 6280–6301, 13 out. 2010.

RIBEIRO-FILHO, M. R.; SIQUEIRA, J. O.; CURI, N.; SIMÃO, J. B. P. **Fracionamento e biodisponibilidade de metais pesados em solo contaminado, incubado com materiais orgânicos e**

inorgânicos. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 25, n. 2, p. 495–507, jun. 2001.

RIGO, A. A.; CEZARO, A. M. DE; MUENCHEN, D. K.; MARTINAZZO, J.; BREZOLIN, A. N.; HOEHNE, L.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C. **CANTILEVER NANOBIOSENSOR BASED ON THE ENZYME UREASE FOR DETECTION OF HEAVY METALS**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 36, n. 04, p. 1429–1437, 2019.

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

SMITH, R. M. **Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques**. Journal of Chromatography A, v. 1000, n. 1–2, p. 3–27, jun. 2003.

SOOZANIPOUR, A.; TAHERI-KAFRANI, A. **Enzyme Immobilization on Functionalized Graphene Oxide Nanosheets: Efficient and Robust Biocatalysts**. Methods in Enzymology, v. 609, p. 371–403, 2018.

STEFFENS, C.; LEITE, F. L.; BUENO, C. C.; MANZOLI, A.; HERRMANN, P. S. D. P. **Atomic Force Microscopy as a Tool Applied to Nano/Biosensors**. Sensors, v. 12, n. 6, p. 8278–8300, 14 jun. 2012.

VELANKI, S.; JI, H.-F. **Detection of feline coronavirus using microcantilever sensors**. Measurement Science and Technology, v. 17, n. 11, p. 2964–2968, 1 nov. 2006.

VINODHINI, R.; NARAYANAN, M. **Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp)**. International Journal of Environmental Science & Technology, v. 5, n. 2, p. 179–182, 10 mar. 2008.

VOLESKY, B. **Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century**. Hydrometallurgy, v. 59, n. 2–3, p. 203–216, fev. 2001.