



Área: Engenharia de Alimentos

CARACTERIZAÇÃO DE NANOSSENSORES DE CANTILEVER FUNCIONALIZADOS COM ÓXIDO DE GRAFENO UTILIZANDO MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Sandra Cristina Ballen^{1*}, Diego Maroso da Silva¹, Lucelia Hoehne², Juliana Steffens¹, Clarice Steffens¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS

² Departamento de Biotecnologia, Univates, Lajeado, RS, Brasil.

*E-mail: sandra-ballen@live.com

RESUMO – A nanotecnologia tem apresentado grandes avanços com o desenvolvimento de nanossensores de cantileveres que podem ser utilizados para detecção de metais pesados em água. Para a interação entre o cantilever e o analito é necessário a funcionalização da superfície dos mesmos. O óxido de grafeno tem se apresentado como um material de grande interesse nesta área, devido a seu baixo custo e grande área superficial. Entretanto uma etapa muito importante para o desenvolvimento de nanossensores é a caracterização de sua superfície. A técnica de obtenção de imagens topográficas de microscopia de força atômica fornece informações de grande relevância para estudos morfológicos. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar nanossensores de cantilever funcionalizados com óxido de grafeno por meio de obtenção de imagem topográfica de microscopia de força atômica, quanto a morfologia e rugosidade formada. As imagens obtidas demonstraram a formação de picos menores e definidos, sendo possível a realização do cálculo da rugosidade através do desvio médio quadrático, a qual apresentou diferença nos valores obtidos, indicando que houve a formação das camadas automontadas sobre a superfície do silício, assim, pode-se dizer que a funcionalização foi realizada de forma eficiente. Sendo assim, foi possível verificar que o óxido de grafeno possui grande potencialidade para utilização em nanossensores de cantilever e assim, serem utilizados como uma ferramenta para a detecção de metal pesado em águas.

Palavras-chave: metais pesados, águas, microscopia de força atômica, topografia.

1 INTRODUÇÃO

Recentemente a área de nanotecnologia tem apresentado grandes avanços, com o desenvolvimento de nanobiossensores e nanossensores de hastas ultrassensíveis, chamados cantileveres, os quais podem ser aplicados em muitas áreas, como na detecção química: em diferentes tipos de gases (vapor de água, hidrogênio, vapores metálicos, compostos orgânicos voláteis), íons metálicos (metais pesados), substâncias tóxicas; na detecção bioquímica: como no controle de pH (importante nas reações bioquímicas), concentrações de glicose e peróxido de hidrogênio na hibridização específica do DNA, desdobraimento de proteínas e peptídeos, na detecção quantitativa de esporos de fungos, bactérias e vírus; e também é possível detectar alterações em propriedades físicas nos meios circundantes, tais como gás ou líquido, ou de camadas depositadas sobre o próprio braço de suporte (LANG; HEGNER; GERBER, 2010; STEFFENS et al., 2014).

Para a utilização dos cantileveres como sensores de alta especificidade, ou seja, alta sensibilidade a um analito específico é necessária a deposição de uma camada sensora (funcionalização) da superfície. Sua seletividade e sensibilidade depende da deposição uniforme de uma camada funcional em toda a superfície. A resposta deste dispositivo depende da transdução forças de adsorção entre a camada seletiva e o analito a qual pode ser obtida por meio da deposição eficiente de receptores seletivos na superfície (DESIKAN et al., 2007).

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

Dentre estes os derivados do grafeno se destacam por ser um derivado de grafite naturalmente abundante o que o torna de baixo custo e pode ser obtido pelo uso de diferentes técnicas sintéticas, como esfoliação em fase líquida de grafite, deposição de vapor químico, abordagem de automontagem e redução química de óxido de grafite. A atração pela sua utilização em nanossensore de cantilever deve-se às suas performances elétricas e propriedades superiores únicas, tais como boa estabilidade química, grande área de superfície, boa condutividade térmica e condutividade elétrica, alta mobilidade de carga e transmitância óptica (KIM et al., 2011; MAO; PU; CHEN, 2012).



Neste contexto, uma etapa muito importante no desenvolvimento de nanossensores de cantilever é a caracterização da superfície que entrará em contato com o analito de interesse. A microscopia de força atômica (AFM) é uma tecnologia de microscópio que é capaz de caracterizar materiais em escala sub-nanométrica. Ao contrário dos métodos microscópicos convencionais, a sua utilização permite visualizar a amostra contornando a sua superfície controlando as forças entre uma sonda minúscula e pontiaguda ou a ponta e a superfície da amostra (WANG; NIE, 2019). Sendo assim tornou-se uma técnica amplamente utilizada para estudos morfológicos, dimensionais e nanomecânicos de vários tipos de amostras diferentes, gerando imagens tridimensionais de morfologia. Sendo possível por meio dela determinar aspectos estruturais e obter medições precisas das dimensões (por exemplo, comprimento, altura e largura, espessura e rugosidade) (RUGGERI et al., 2019).

Desta forma o presente trabalho tem como objetivo caracterizar nanossensores de cantilever funcionalizados com óxido de grafeno por meio de obtenção de imagem pela técnica de microscopia de força atômica (AFM) quanto a morfologia e rugosidade formada para posterior utilização dos mesmos na detecção de metais pesados em água.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenvolvimento de nanossensor de cantilever

Os cantileveres (ContGD-G) usados para o desenvolvimento dos nanossensores foram adquiridos comercialmente (BudgetSensors), com as seguintes especificações do fabricante: material de silício revestido com 70 nm de ouro em um lado da superfície, frequência de ressonância de 13,0 (± 4) kHz e constante de mola de 0,2 (0,07-0,4) N/m. A baixa constante de mola (0,2 N/m) proporciona maior sensibilidade para as medições no modo estático em meio líquido (CARRASCOA 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 μ m) e o comprimento da ponta (17 μ m). O suporte possui a largura de 1,6 mm e a haste apresenta 450 μ m de comprimento e 50 μ 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).

2.2 Funcionalização da superfície dos cantileveres

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

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

- **Etapa 1:** Limpeza dos cantileveres, os quais foram transferidos individualmente para uma placa de petri, onde foram imersos em álcool isopropílico isopropílico (Vetec, 99,5 %), durante 2 min, para lavagem, assim removendo interferentes da superfície, e então secos, a temperatura de 20 °C, por cerca de 15 min.
- **Etapa 2:** Imersão do cantilever em uma solução de ácido 16-mercaptohexadecanóico (tiol) (Sigma Aldrich, 90 %) 2 mM em meio etanólico, por *overnight* (16 h). Após, foi realizada a lavagem do cantilever com água ultrapura (2 min) e secagem a 20 °C por 15 min.
- **Etapa 3:** Imersão do cantilever em uma mistura de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (Sigma Aldrich, 98 %) 1 mM/ N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma Aldrich, 98 %) 1 mM 4:1 (v/v) durante 10 min. A mistura de EDC/NHS foi realizada no momento de funcionalização. O EDC é usado para acoplar grupos carboxila ou fosfato a grupos aminas primárias e melhorar a ligação química de enzimas ao carbono, materiais poliméricos ou superfície de nanopartículas sem modificação prévia. Uma das principais vantagens do acoplamento EDC é a solubilidade em água, que permite a bioconjugação direta sem dissolução prévia de solvente orgânico. No entanto, o acoplamento deve ser realizado rapidamente para garantir a eficiência do método (MORALES, 2016). O NHS pode ser usado para aumentar a estabilidade deste éster ativo. A seguir, foi realizada a lavagem com água ultrapura (2 min) e secagem a 20 °C por 15 min.
- **Etapa 4:** O óxido de grafeno utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pelo Instituto de Física da USP, São Carlos/SP e pelo Grupo de Nanociências e Nanotecnologia (Nano) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora/MG. O mesmo foi sintetizado utilizando o processo de esfoliação química pelo método de *Hummers* modificado (LIMA et al., 2017) e encontrava-se diluído em água ultrapura na concentração de 0,1 mg/mL. Para a funcionalização o cantilever foi imerso nesta solução de óxido de grafeno durante 10 min. Posteriormente, foi realizada a lavagem do cantilever com água ultrapura (2 min) e secagem a 20 °C por 15 min.



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.

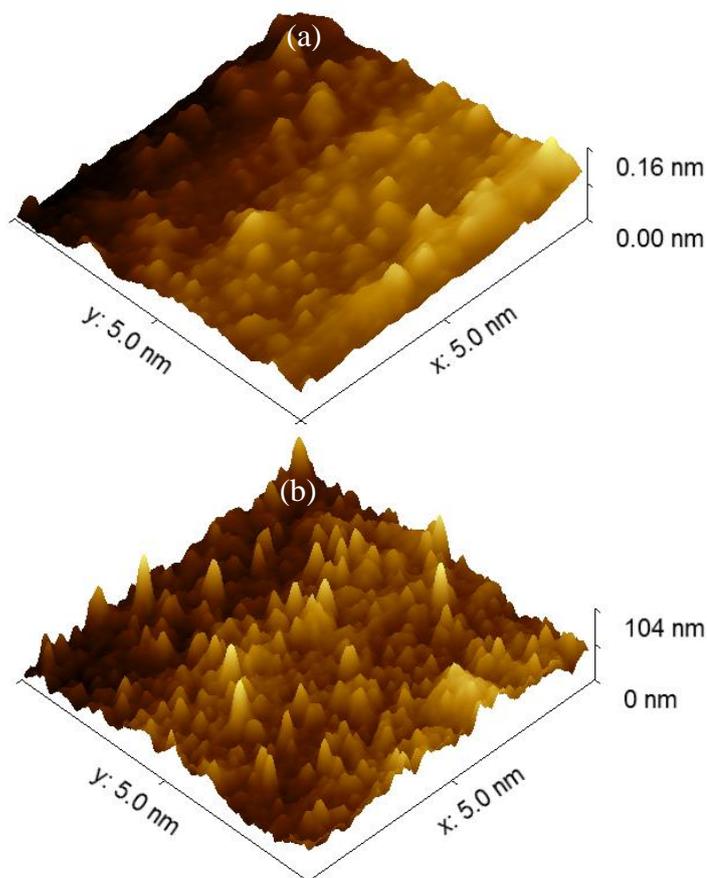
2.3 Microscopia de Força Atômica

A caracterização de topografia e rugosidade da superfície dos nanossensores foi realizada em uma placa 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*. Para tanto foi utilizado a microscopia de força atômica (AFM). As análises foram realizadas em um AFM Nanosurf (C3000 Controller, Suíça), utilizando um cantilever de silício, modelo Tap-150-G (BudgetSensors), de frequência de ressonância de 150 (\pm 75) kHz e constante de mola de 5 (1,5-15) N/m. Todas as imagens foram obtidas em modo dinâmico e a varredura realizada no modo *tapping*. Para as análises de topografia e rugosidade, as imagens foram obtidas em uma área de 25 μ m², com resolução de 512 x 512 pontos e velocidade de varredura de 2 s/linha. A raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) foi calculada usando o software Gwyddion (Versão 2.53), em diferentes locais da imagem. Rms é uma função da média do desvio dos picos e vales presentes no perfil da superfície do material (LEITE et al., 2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta as imagens topográficas, em 3D, obtidas da placa de silício (cantilever) com ouro e após a funcionalização da superfície com óxido de grafeno.

Figura 1. Imagens de AFM, em 3D, da superfície placa de silício recoberto com ouro (a) e funcionalizado com óxido de grafeno (b).



Na Figura 1 pode-se observar diferenças topográficas da superfície da placa de silício recoberto com ouro e após sua funcionalização com óxido de grafeno. Analisando o substrato de silício com ouro (Figura 1a) observa-se uma superfície com aglomerados, decorrentes do processo de deposição do ouro. A adição do óxido de grafeno (Figura 1b)



após a etapa dos agentes reticuladores formou picos menores e mais definidos. A deposição de moléculas sobre uma superfície pode ocorrer tanto nos vales quanto nos picos, que são, respectivamente, regiões abaixo ou acima do plano médio da superfície (RODRIGUES, 2015).

A partir das imagens topográficas foi calculado o desvio médio quadrático da rugosidade (Rms) que está apresentado na Tabela 1. O cálculo da rugosidade leva em conta a diferença entre a dimensão dos componentes da superfície, ou seja os picos e os vales (KLAPETEK; NECAS; ANDERSON, 2016).

Tabela 1. Valores da raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) das superfícies da placa de silício recoberto com ouro (a) e a funcionalizado com óxido de grafeno.

Etapa	Rms (nm)*
Silício + Ouro	22,035 ± (2,128)
Silício + Ouro + Tiol + EDC/NHS + Óxido de grafeno	17,133± (1,965)

*Média (três repetições) ± Desvio Padrão.

A rugosidade apresentada na Tabela 1 para a camada de ouro pode estar relacionada a formação de conglomerados pela deposição de átomos de ouro pela técnica de *Sputtering*, a qual pode haver a deposição de átomos de ouro sob a forma de conglomerados, possivelmente esses conglomerados se depositaram nas regiões de vale, existentes na superfície de silício, preenchendo os espaços vazios (RODRIGUES, 2015).

Na deposição da camada de óxido de grafeno se observou uma redução da rugosidade. Segundo Naghib et al. (2018), a estrutura do óxido de grafeno em forma de folhas aumenta a área de contato, o que proporciona uma melhora significativa da transferência de elétrons entre os mesmos, uma propriedade muito importante para sensores.

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

4 CONCLUSÃO

A caracterização da superfície dos nanossensores de cantilever funcionalizados com óxido de grafeno pela análise de microscopia de força atômica (AFM) confirmaram a funcionalização da camada sensora pela técnica das camadas automontadas (SAM), sendo possível verificar a deposição da mesma. Desta forma a funcionalização com óxido de grafeno demonstrou ser um material com grande potencialidade para utilização em nanossensores de cantilever e assim, serem utilizados futuramente como uma ferramenta para a detecção de metal pesado em águas.

5 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.

6 REFERÊNCIAS

- ARDUINI, F.; CINTI, S.; MAZZARACCHIO, V.; SCOGNAMIGLIO, V.; AMINE, A.; MOSCONE, D. Carbon black as an outstanding and affordable nanomaterial for electrochemical (bio)sensor design. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 112033, jan. 2020.
- 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.
- DESIKAN, R.; ARMEL, S.; MEYER III, H. M.; THUNDAT, T. Effect of chain length on nanomechanics of alkanethiol self-assembly. **Nanotechnology**, v. 18, n. 42, p. 424028, 24 out. 2007.
- 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**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 123, 2009.
- KIM, H.; KOBAYASHI, S.; ABDURRAHIM, M. A.; ZHANG, M. J.; KHUSAINOVA, A.; HILLMYER, M. A.; ABDALA, A. A.; MACOSKO, C. W. Graphene/polyethylene nanocomposites: Effect of polyethylene functionalization and blending methods. **Polymer**, v. 52, n. 8, p. 1837–1846, abr. 2011.
- KLAPETEK, P.; NECAS, D.; ANDERSON, C. **Gwyddion user guide**. Disponível em: <<http://gwyddion.net/download/user-guide/gwyddion-user-guide-en.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2020.
- KURBANOGLU, S.; OZKAN, S. A. Electrochemical carbon based nanosensors: A promising tool in pharmaceutical and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 439–457, jan. 2018.



- LANG, H. P.; HEGNER, M.; GERBER, C. Nanomechanical Cantilever Array Sensors. In: BHUSHAN, B. (Ed.). **Springer Handbook of Nanotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 427–452.
- LEITE, F. L.; PATERNO, L. G.; BORATO, C. E.; HERRMANN, P. S. P.; OLIVEIRA, O. N.; MATTOSO, L. H. C. Study on the adsorption of poly(o-ethoxyaniline) nanostructured films using atomic force microscopy. **Polymer**, v. 46, n. 26, p. 12503–12510, dez. 2005.
- LIMA, A. H.; MENDONÇA, J. P.; DUARTE, M.; STAVALE, F.; LEGNANI, C.; DE CARVALHO, G. S. G.; MACIEL, I. O.; SATO, F.; FRAGNEAUD, B.; QUIRINO, W. G. Reduced graphene oxide prepared at low temperature thermal treatment as transparent conductors for organic electronic applications. **Organic Electronics**, v. 49, p. 165–173, out. 2017.
- MAO, S.; PU, H.; CHEN, J. Graphene oxide and its reduction: modeling and experimental progress. **RSC Advances**, v. 2, n. 7, p. 2643, 2012.
- MARTINAZZO, J.; MUENCHEN, D. K.; BREZOLIN, A. N.; CEZARO, A. M.; RIGO, A. A.; MANZOLI, A.; HOEHNE, L.; LEITE, F. L.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C. Cantilever nanobiosensor using tyrosinase to detect atrazine in liquid medium. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 53, n. 4, p. 229–236, 3 abr. 2018.
- MORALES, J. J. B. **Electrochemical sensors based on electrochemically inert polyme**. Tese de doutorado. Universidade Técnica da Catalunha, p. 74, 2016.
- NAGHIB, S. M.; PARNIAN, E.; KESHVARI, H.; OMIDINIA, E.; ESHGHAN-MALEK1, M. Synthesis, Characterization and Electrochemical Evaluation of Polyvinylalcohol/Graphene Oxide/Silver Nanocomposites for Glucose Biosensing Application. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 13, p. 1013–1026, jan. 2018.
- RODRIGUES, L. F. **Desenvolvimento de Nanobiossensores Utilizando Cantileveres Inteligentes Para Detecção do Herbicida Mesotriona e do Vírus da Tristeza dos Citros**. Dissertação de mestrado. Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade. Universidade Federal de São Carlos, p. 68, 2015.
- RUGGERI, F. S.; ŠNEIDERIS, T.; VENDRUSCOLO, M.; KNOWLES, T. P. J. Atomic force microscopy for single molecule characterisation of protein aggregation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 664, p. 134–148, mar. 2019.
- SAINI, R. K.; BAGRI, L. P.; BAJPAI, A. K. Smart nanosensors for pesticide detection. In: **New Pesticides and Soil Sensors**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 519–559.
- STEFFENS, C.; MANZOLI, A.; LEITE, F. L.; FATIBELLO, O.; HERRMANN, P. S. P. Atomic force microscope microcantilevers used as sensors for monitoring humidity. **Microelectronic Engineering**, v. 113, p. 80–85, jan. 2014.
- TAMAYO, J.; KOSAKA, P. M.; RUZ, J. J.; SAN PAULO, Á.; CALLEJA, M. Biosensors based on nanomechanical systems. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 3, p. 1287–1311, 2013.
- 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.
- WANG, J.; NIE, S. Application of atomic force microscopy in microscopic analysis of polysaccharide. **Trends in Food Science & Technology**, v. 87, p. 35–46, maio 2019.