



Área: Engenharia de Alimentos

DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSSENSOR DE CANTILEVER ENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE CÁDMIO EM ÁGUA

Sandra Cristina Ballen^{1*}, Diego Maroso da Silva¹, Lucas Henrique do Nascimento¹, 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 – O desenvolvimento das atividades industriais aumentou de resíduos contendo metais pesados. O cádmio, um dos metais com maior toxicidade, pode ser lançado ao solo e então lixiviado para os rios pelo escoamento de águas superficiais provenientes das chuvas, causando diversos problemas ambientais. Neste contexto cresce a demanda por métodos alternativos aos utilizados tradicionalmente. Os nanobiossensores de cantilever ganharam grande destaque devido a se apresentarem com uma análise quantitativa rápida e com melhor sensibilidade. Dessa forma o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um nanobiossensor de cantilever funcionalizados com enzima comercial urease para detecção de cádmio em água. Os resultados obtidos pela medida de atividade da enzima antes e após a funcionalização do nanobiossensor demonstrou que ocorreu a funcionalização da superfície do cantilever. Pela exposição do mesmo a uma concentração de cádmio de 10 ppb foi possível verificar a deflexão do dispositivo, demonstrando sua capacidade em detectar o metal pesado presente na água. Assim, promovendo, um melhor controle e monitoramento de emissões de metal pesado em águas, refletindo diretamente na saúde dos seres vivos e também do meio ambiente.

Palavras-chave: Cantilever, Urease, Detecção, Cádmio.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de água por metais pesados tornou-se um problema de importância global com preocupação crescente devido a implicações na saúde humana. O desenvolvimento industrial levou ao aumento das fontes de contaminações devido a geração de enormes quantidades de resíduos contendo metais pesados (VERMA; DWIVEDI, 2013; GU et al., 2018). 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) (VOLESKY, 2001).

O cádmio é um dos metais com maior toxicidade, está presente em produtos de policloreto de vinil (PVC), pigmentos de cor, várias ligas metálicas e, agora mais comumente, em baterias recarregáveis de níquel-cádmio, podendo ser lançado ao solo, sendo então lixiviados para os rios pelo escoamento de águas superficiais provenientes das chuvas, persistindo no ambiente aquático, causando também a contaminação das águas subterrâneas, dessa forma causando outros problemas ambientais (RIBEIRO-FILHO et al., 2001; VINODHINI; NARAYANAN, 2008).

Atualmente existem diversas legislações que determinam limites permitidos de cádmio, tanto no âmbito nacional como internacional. No Brasil a Portaria 2914 do Ministério da Saúde dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, a Resolução do CONAMA N° 357, de 17 de março de 2005 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências, dentre outras legislações presentes no meio e a Portaria N° 518 de 25 de março de 2004 que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências (BRASIL, 2004, 2005, 2011). Enquanto que a nível mundial a Organização Mundial de Saúde e a Agência de Proteção Ambiental dos EUA também configuraram limites de concentração permitido de cádmio na água potável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017; EPA, 2018).

Uma variedade de instrumentos e métodos associados tem sido usado para detecção de cádmio em amostras de água, cada uma com seu próprio custo associado, eficiência e sensibilidade de detecção para o analito alvo. No entanto, esses métodos analíticos possuem preparação complicada de amostras, instrumentos sofisticados e alto custo (HAO; YAN, 2015). Para superar as limitações desses métodos e melhorar os limites de detecção os nanobiossensores podem ser empregados trazendo uma análise quantitativa rápida e com melhor sensibilidade.

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; GASPARI, 2010).



O princípio de funcionamento de um biossensor está fundamentado na utilização de um sistema que contém dois componentes: o biorreceptor, que é o elemento de reconhecimento que permite ocorrer a reação bioquímica ou a ligação específica com o alvo (amostra e analito); e o transdutor, que recebe o sinal produzido entre o biorreceptor e a amostra, e o quantifica, gerando o resultado em sinal (GASPAR, 2010).

Elementos enzimáticos possuem alta sensibilidade e seletividade (SAINI; BAGRI; BAJPAI, 2017). Diversas enzimas são utilizadas para biossensoriamento ambiental. Dentre estas, a urease 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).

A urease pode ser inibida na presença de metais pesados, como o cádmio. O mecanismo de inibição da enzima baseia-se nas interações entre os íons de metais pesados e os grupos tiol/ metiltiol da cisteína/metionina apresentados no centro ativo da enzima (OGOŃCZYK et al., 2005). Na prática, essa inibição é importante, pois pode ser explorada para a construção de sistemas de detecção baseados na sua inibição para determinação *in situ* e em tempo real dos níveis de traços destes íons, por exemplo, em monitoramento de água (KRAJEWSKA, 2009).

Dessa forma este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um nanobiossensor de cantilever funcionalizados com enzima comercial urease para detecção de cádmio em água.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolvimento do nanobiossensor de cantilever e funcionalização

Para o desenvolvimento do nanobiossensor funcionalizado com enzima urease foram utilizados cantileveres (ContGD-G) adquiridos comercialmente (BudgetSensors), com as seguintes especificações: material de silício revestido com 70 nm de ouro em apenas um dos lados da superfície, frequência de ressonância de 13,0 (± 4) kHz, constante de mola de 0,2 (0,07-0,4) N/m, 450 μm de comprimento ($\pm 10 \mu\text{m}$), 50 μm de largura ($\pm 5 \mu\text{m}$) e 2 μm de espessura ($\pm 1 \mu\text{m}$).

A funcionalização do cantilever foi realizada por meio da deposição da camada sensora no lado superior, o qual continha o ouro depositado. A técnica de camadas automontadas (SAM) foi empregada com a adição de agentes reticuladores (EDC/NHS) para ligação covalente com moléculas de alcanotóis. O procedimento de funcionalização do cantilever foi baseado no trabalho de Velanki e Ji (2006), com modificações, consistindo na limpeza dos cantileveres, os quais serão imersos em álcool isopropílico (Vetec, 99,5 %), durante 2 min, para lavagem, assim removendo interferentes da superfície, e então secos, a 20 °C, por cerca de 15 min. Imersão do cantilever em uma solução de ácido 16-mercaptohexadecanóico (tiol) (Sigma Aldrich, 90 %) 2 mM em meio etanólico, por *overnight* (16 h). Após, realizada a lavagem do cantilever com água ultrapura (Millipore Co. 18,2 M Ω /cm), (2 min) e secagem em temperatura ambiente por 15 min o cantilever foi imerso em uma mistura de 1 mM de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (Sigma Aldrich, 98 %) e 1 mM de N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma Aldrich, 98%) na proporção de 4:1 (v/v) durante 10 min. Em seguida realizou-se a lavagem com água ultrapura (2 min) e secagem em temperatura ambiente por 15 min. Por fim realizou-se a imersão do cantilever em enzima comercial (urease de *Canavalia ensiformis* (Sigma Aldrich), - 75,26 U/mg) diluída em tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 7,0) na proporção de 10:1 (m/v) de acordo com Rigo et al. (2019) durante 10 min. O nanobiossensor foi armazenado sob refrigeração (4 °C), a seco.

Medida de atividade da urease depositada no nanobiossensor

A solução de enzima que sobrou da funcionalização foi misturada com 15 mL da solução de ureia (Neon, 99%) em um elermeyer, deixando agir por 5 min, após foi adicionado 3 gotas de indicador alaranjado de metila. A solução foi titulada com HCl (Synth, 37%) 0,1 M sob agitação até o ponto de viragem de laranja para rosa (SOARES, 2011). O mesmo procedimento foi realizado com a solução de enzima sem contato com cantilever. Para o branco não foi deixado o tempo de reação e então titulado.

Resposta de deflexão do nanobiossensor

A funcionalização do nanobiossensor, foi avaliada pela medida de deflexão do cantilever em AFM da marca Nanosurf (C3000 Controller), por meio da realização de uma imagem em meio líquido, e em modo estático onde é utilizado o método de feixe óptico, onde o laser é refletido da superfície do cantilever e atinge uma posição sensível do fotodetector, sendo que a distância percorrida é proporcional à deflexão da haste de acordo com Martinazzo et al. (2018).

Para resposta do sensor ao cádmio em água ultrapura, foi escolhida a concentração de 10 ppb 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, preparada a de 10 ppb ($\mu\text{g/L}$), diluída em água ultrapura. As soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e em temperatura ambiente (25°C).

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 ($\pm 0,5$ mL) de líquido 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. Este processo foi realizado primeiramente para o branco (água ultrapura) e em seguida para a concentração de 10 ppb de Cd^{2+} .

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

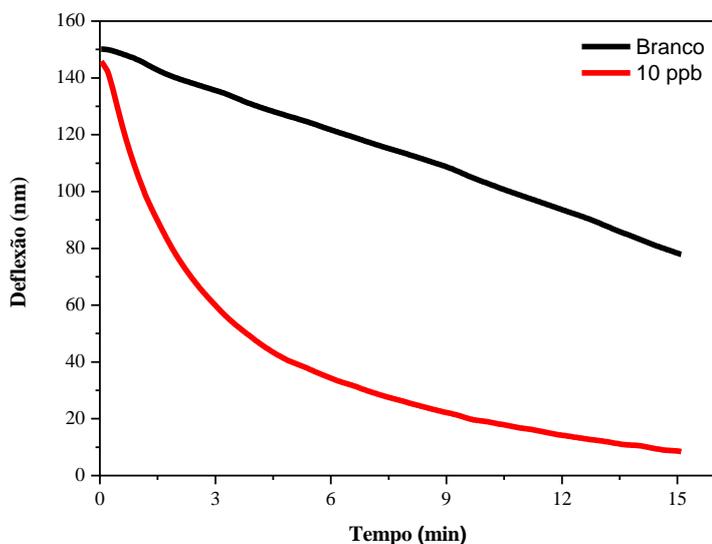
Medida da atividade enzimática da urease depositada no nanobiossensor

A partir da medida de atividade enzimática obteve-se valores de 92 U/mL para a enzima livre e 170 U/mL após a exposição ao cantilever, o que confirma a funcionalização da superfície do mesmo.

Avaliação das resposta do nanobiossensor

A Figura 1 apresenta as respostas de deflexão dos nanobiossensores de cantilever funcionalizados com urease na presença de água ultrapura (branco) e Cd^{2+} .

Figura 1. Resposta do nanobiossensor funcionalizados com urease em função do tempo na concentração de 10 ppb de Cd^{2+} e água ultrapura (branco).



As medidas de deflexão (Figura 1) foram realizadas durante 15 min, e no decorrer deste tempo, foi possível verificar que houve diferença na deflexão (nm) dos nanobiossensores entre o branco (água ultrapura) e o Cd^{2+} diluído na concentração de 10 ppb em água ultrapura, isto indica que os dispositivos conseguem detectar a presença do metal na água.

Pode-se observar também que a resposta de deflexão dos cantiliveres ocorreu para baixo. 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).

A urease se apresenta como um receptor biocatalítico, o qual possui o poder de reconhecer íons de metais pesados, pelo mecanismo de inibição da enzima, baseando-se nas interações destes íons e seus grupos químicos apresentados no centro ativo da enzima (OGOŃCZYK et al., 2005). As alterações na enzima urease ocorrem em seu sítio catalítico de níquel pois os íons Cd^{2+} induzem a inibição, reagindo com os grupos sulfidríla da urease. As porções sulfidríla são partes integrantes do sítio ativo e estão envolvidos na manutenção da atividade da enzima. Assim, a inibição induzida pelo Cd^{2+} causa uma alteração conformacional da enzima (MAY MAY; RUSSELL, 2003).



Além disso no tempo de 15 minutos a deflexão dos nanobiosensores se manteve estável na detecção do metal pesado. Este tempo é necessário para a interação dos grupamentos funcionais com o Cd^{2+} . Estes resultados corroboram com o encontrado por Wen et al. (2013) usando um sensor de transistor de efeito de campo com filme de grafeno e nanopartículas de ouro para imobilização covalente de moléculas de enzimas de DNA tioladas, o qual foi utilizado para detecção de chumbo e que em 20 min de incubação, ou seja, contato do sensor como metal, houve estabilização do sinal obtido.

4 CONCLUSÃO

O método de funcionalização do nanobiossensor se revelou satisfatório, onde foi possível detectar a concentração de 10 ppb de cádmio, por meio da adsorção do mesmo na superfície funcionalizada do cantilever, o qual apresentou deflexão (nm) diferente do branco (água ultrapura).

Desta forma, o nanobiossensor desenvolvido neste trabalho podem ser utilizados como uma ferramenta para a detecção de cádmio em águas. 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.

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

- BRANDAO, H. D. M.; GERN, J. C.; VICENTINI, N. M.; PEREIRA; MUNK, M.; PATRÍCIA VILHENA DIAS DE ANDRADE. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. **Revista CFMV**, v. 17, n. 53, p. 61–67, 2011.
- BRASIL. **Portaria n° 518 em 25 de março de 2004**, 2004. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/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://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>
- EPA. **2018 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories**. United States Environmental Protection Agency, n. March, p. 2–6, 2018.
- GASPAR, C. **Preparação e caracterização de nanocompósitos de nanopartículas metálicas com proteínas e suas aplicações em biossensores**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, 2010.
- GU, Z.; SONG, W.; YANG, Z.; ZHOU, R. 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, 2018.
- GUMPU, M. B.; KRISHNAN, U. M.; RAYAPPAN, J. B. B. 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, 20 jul. 2017.
- HAO, J.-N.; YAN, B. A water-stable lanthanide-functionalized MOF as a highly selective and sensitive fluorescent probe for Cd^{2+} . **Chemical Communications**, v. 51, n. 36, p. 7737–7740, 2015.
- KRAJEWSKA, B. Ureasas I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1–3, p. 9–21, jul. 2009.
- 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.
- MAY MAY, L.; RUSSELL, D. A. Novel determination of cadmium ions using an enzyme self-assembled monolayer with surface plasmon resonance. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1–2, p. 119–125, dez. 2003.
- OGOŃCZYK, D.; TYMECKI, Ł.; WYŻKIEWICZ, I.; KONCKI, R.; GŁĄB, S. Screen-printed disposable urease-based biosensors for inhibitive detection of heavy metal ions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 106, n. 1, p. 450–454, abr. 2005.
- 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.; MANZOLI, A.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C. Heavy metals detection in river water with cantilever nanobiosensor. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, p. 1–11, 4 nov. 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.

SOARES, J. C. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol**. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade de São Paulo, 2011.

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

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.

VERMA, R.; DWIVEDI, P. Heavy metal water pollution- A case study. **Recent Research in Science and Technology**, v. 5, n. 2076–5061, p. 98–99, 2013.

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.

WEN, Y.; LI, F. Y.; DONG, X.; ZHANG, J.; XIONG, Q.; CHEN, P. The Electrical Detection of Lead Ions Using Gold-Nanoparticle- and DNAzyme-Functionalized Graphene Device. **Advanced Healthcare Materials**, v. 2, n. 2, p. 271–274, fev. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking water quality 4th edition**. 2017.