

## DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR EM MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO EM MATRIZES AMBIENTAIS

### *DEVELOPMENT OF BIOSENSOR IN ATOMIC FORCE MICROSCOPE FOR DETERMINATION OF GLYPHOSATE IN ENVIRONMENTAL MATRICES*

Mônica Santana Vianna<sup>1</sup>  
Jhonny Huertas Flores<sup>2</sup>  
Susane Vieira dos Santos<sup>3</sup>  
João Paulo Machado Torres<sup>4</sup>  
Antônio José da Silva Neto<sup>5</sup>

**Resumo:** A preocupação com os níveis de agrotóxicos no meio ambiente têm motivado grupos de pesquisa no mundo inteiro a aperfeiçoar as metodologias para a sua determinação em diferentes amostras. A necessidade de metodologias analíticas mais simples tem impulsionado o desenvolvimento de sensores biológicos desde a década de 1980/90, sendo que a presença dos interferentes tem limitado suas aplicações. Os biossensores em plataforma de Microscópios de Força Atômica (MFA) permitem o controle das condições do meio para a resposta mais adequada à presença do compostos de interesse e medidas de espectroscopia de força e imagem pontuais que permitem a medição de interações moleculares. O objetivo deste trabalho é definir as condições para a imobilização da albumina bovina sérica (BSA) e para a medida de sua interação com a molécula de glifosato. A metodologia consiste na definição das condições para a complexação na presença de interferentes: conformação mais adequada da molécula do sensor e forma química do analito). Os métodos de espectroscopia de fluorescência foram adotados para os estudos de formação de complexos BSA-glifosato. Os espectros de fluorescência da BSA evidenciaram a complexação com o herbicida na razão estequiométrica 1:1 sob condições específicas de pH e força iônica definidas em modelo empírico. A espectroscopia de força realizada com ponteira de nitrato de silício funcionalizada com BSA evidenciaram interações moleculares significativas com o herbicida. Os ensaios baseados na fluorescência intrínseca da BSA foram eficientes para definir as condições de imobilização do sensor e de medida de força da interação BSA-glifosato com vistas à aplicação em amostras com presença de interferentes. As medidas de espectroscopia de força confirmaram as condições experimentais para realizar a validação do biossensor.

**Palavras-chave:** Biossensor, Glifosato, Albumina, Microscopia de Força Atômica.

Doutora, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Pós-Doutorado – Faculdade de Engenharia e Instituto Politécnico, monicaviann@gmail.com.

<sup>2</sup> Doutor, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Politécnico – jhonnyhf@iprj.uerj.br

<sup>3</sup> Graduanda, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, jptorres@biof.ufrj.br

<sup>4</sup> Doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, jptorres@biof.ufrj.br

<sup>5</sup> Doutor, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Politécnico, ajsneto@iprj.uerj.br

**Abstract:** Concern over the levels of pesticides has motivated research groups worldwide to refine the methodologies for their determination in different samples. The need for simplified analytical methodologies has been driving the development of biological sensors since the 1980s and 1990s, and the presence of interferers has limited their applications. The Atomic Force Microscopes (AFM) platform biosensors allow the control of the environment conditions for the most adequate response to the presence of the compounds of interest and measurements of point-and-point force and image spectroscopy that allow the measurement of molecular interactions. The objective of this work is to define the conditions for the immobilization of serum bovine albumin and for the measurement of its interaction with the glyphosate molecule. The methodology consists in the definition of the conditions for the complexation in the presence of interferers: more adequate conformation of the molecule of the sensor and chemical form of the analyte). Fluorescence spectroscopy methods were adopted for the formation studies of BSA-glyphosate complexes. BSA fluorescence spectra evidenced complexing with the herbicide at the 1: 1 stoichiometric ratio under specific conditions of pH and ionic strength defined in an empirical model. Force spectroscopy performed with BSAfunctionalized silicon nitrate tip showed significant molecular interactions with the herbicide. The intrinsic fluorescence-based assays of BSA were efficient to define the conditions of sensor immobilization and strength measurement of the BSA-glyphosate interaction for application in samples with interfering presence. The measurements of force spectroscopy confirmed the experimental conditions to carry out the biosensor validation.

**Keywords:** Biosensor, Glyphosate, Albumin, Atomic Force Microscopy.

## 1 INTRODUÇÃO

A ênfase no estudo dos níveis de agrotóxicos têm motivado grupos de pesquisa no mundo inteiro a aperfeiçoar as metodologias para a sua determinação em diferentes amostras. A necessidade de metodologias analíticas mais simples tem impulsionado o desenvolvimento de sensores biológicos desde a década de 1980/90. Estes biossensores, baseados em moléculas enzimáticas, propõem métodos simplificados e altamente seletivos. Contudo, sabe-se que as enzimas não são sensíveis apenas aos seus substratos e inibidores específicos. Elas podem ser alvo de diferentes compostos que atuam como interferentes, comprometendo o desempenho dos biossensores enzimáticos. A literatura sobre biossensores é extensa e descreve interações entre a sonda biológica e os analitos por diversas técnicas espectroscópicas e eletroquímicas. Em todas elas a presença dos interferentes tem limitado as reais aplicações dos biossensores.

Estudos em diferentes áreas bioquímicas relacionadas à Enzimologia e à Toxicologia têm descrito efeitos não-seletivos de enzimas (inclusive acentuando a preocupação pelo efeito de agrotóxicos em organismos não-

alvo). Dessa forma, as plataformas de biossensores devem passar por um estudo de interferências. As condições experimentais determinam a seletividade ou influência de interferentes em sua função catalítica e evidentemente em seu poder de ligação com tais moléculas enzimáticas. Os biossensores em plataforma de Microscópios de Força Atômica (MFA) permitem o controle das condições do meio para a resposta mais adequada à presença dos compostos de interesse e medidas de espectroscopia de força de diferentes naturezas físico-químicas: força atrativa, força adesiva, interações biológicas e forças não covalentes (Butt et al. 2005; Ito et al. 2010), além de imagens pontuais. Ao mesmo tempo, a caracterização de interações moleculares biosonda-analito são fundamentais para o desenvolvimento de outros biossensores, em outras plataformas de medição. Dessa forma, sinais espectroscópicos ou eletroquímicos podem ser comparados à dinâmica de interações moleculares em MFA e auxiliar na escolha do melhor sensor e avaliação de seu desempenho.

Para o uso da plataforma do MFA como biossensor é necessário funcionalizar quimicamente as ponteiros do cantilever do MFA com uma molécula sensora, desenvolvendo então os chamados nanossensores operando no modo específico chamado de Microscopia de Força Química (MFC) (Frisbie et al. 1994; Noy et al. 1997). Várias metodologias para a funcionalização têm sido descritas na literatura (Fritz, 2008, Volcke et al. 2010). A molécula sensora mais utilizada para a detecção do agrotóxico tem sido a acetolactate sintase (ALS). Esta enzima é empregada para promover a ligação específica e o reconhecimento da molécula de glifosato dentre outros agrotóxicos. Entretanto, os estudos com biossensores não avançaram em seletividade e em aplicações reais onde estão presentes outras substâncias que podem competir pela ligação com o sensor. O uso de enzimas não garante a seletividade pretendida e a aplicação é limitada à amostras simplificadas ou fabricadas em laboratório para eliminar a gama de interferentes de amostras complexas.

Por outro lado, a proposta dos biossensores que utilizam a plataforma de Microscopia de Força Atômica (MFA) também não avançou em resolver essas

limitações. O uso de enzimas de difícil obtenção faz desta técnica um processo caro e não tem fornecido novas opções que visem o uso de outras moléculas de menor custo (proposta tradicional dos biossensores). Para tornar o desenvolvimento de biossensores usando MFA viável e ampliar suas possibilidades analíticas reais, nossa proposta consiste na definição das condições experimentais para a imobilização do sensor biológico para a medida de força com a molécula de glifosato. É importante ressaltar que estas medidas serão feitas na presença de outros compostos. Dessa forma, inclui-se o estudo de ligações competitivas e seus parâmetros termodinâmicos para o desenvolvimento de um biossensor eficiente na aplicação de medições em amostras reais.

A escolha da albumina como sensor permanente para estes testes se justifica em sua fácil obtenção e baixo custo, o que coloca o biossensor proposto em conformidade com a proposta de uso dos sensores biológicos. A albumina de soro bovino (em inglês *Bovine Serum Albumin* - BSA) é uma proteína largamente utilizada em áreas da Bioquímica e Toxicologia com vários estudos sobre seus domínios, sítios de ligação e formas de interação. Isso torna a BSA uma proteína muito versátil e de ampla base de dados para sua manipulação como sensor.

## 1.2. Espectroscopia de Força

Neste modo espectroscópico determina-se a curva de força em função da distância sobre a superfície da amostra. Experimentalmente, mede-se a deflexão  $z_c$  do cantilever como função do movimento  $z_a$  da amostra na direção  $z$ , perpendicular à superfície da amostra, obtendo-se assim um gráfico  $z_c(z_a)$ . A força  $F$  é então obtida multiplicando a deflexão do cantilever pela constante de mola (equação 1):

$$F = k z_c \quad (1)$$

Desprezando deformações elásticas da amostra e da ponteira, em especial no regime de contato, a distância  $s$  de interação entre a ponteira e a amostra, é dada por:

$$s = z_c - z_a \quad (2)$$

Portanto, os gráficos  $z_c(z_a)$  medidos podem ser diretamente traduzidos em curvas força-distância.

## 2 METODOLOGIA

A metodologia deste trabalho se divide em 2 partes: (1) a definição das condições do meio para a BSA e o glifosato, para se obter a melhor conformação e posição que favoreça a sua imobilização e complexação na presença de interferentes; (2) primeiras medidas de espectroscopia de força da interação BSA-glifosato sob as condições anteriormente definidas. Os métodos de espectroscopia de fluorescência foram escolhidos para estes estudos de formação de complexos BSA-glifosato. Os ensaios em fluorescência se basearam na fluorescência intrínseca da molécula de BSA e sua diminuição após a complexação com glifosato. Este evento de espectroscopia molecular relaciona a diminuição de fluorescência de um fluoróforo (albumina) pela formação de complexos com ligantes não fluorescentes (glifosato neste caso).

### 2.1 Conformação Espacial e Estabilidade da Proteína Sensora

A molécula de BSA sofre importantes mudanças conformacionais em resposta a mudanças no pH do meio. As mudanças no pH podem alterar significativamente a força das interações intra e inter-moleculares. Por isso, torna-se necessário identificar as melhores condições para o uso da BSA como molécula sensora para a determinação do glifosato.

Para definir as condições de melhor complexação com o glifosato e estabilidade da conformação da proteína foi realizado um planejamento

experimental composto central com três fatores em dois níveis. Este planejamento  $2^3$  composto central foi realizado para definir as condições de medição de fluorescência da albumina livre (não imobilizada). Os valores de pH e força iônica do tampão fosfato de sódio foram considerados fatores relevantes para esta otimização assim como o tempo de incubação do sistema. Este foi submetido à temperatura ambiente (em torno de 23 °C). Cada parâmetro foi avaliado em níveis que correspondem à faixa dos valores experimentais (Tabela 1). Os ensaios com a albumina bovina sérica (*fração V - Sigma Aldrich*) foram realizados na concentração de  $7,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . A solução de glifosato, de  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  foi obtida de diluições do produto técnico *Roundup® (Monsanto)*.

Tabela 1 - Tabela com os níveis do planejamento  $2^3$  (com pontos centrais e axiais) e os respectivos valores das variáveis reais e codificadas.

Variáveis originais	Variáveis codificadas				
	- 1,68	-1	0	+ 1	+1,68
pH	5,2	6,3	6,9	7,5	7,9
Força iônica ( $\text{mol L}^{-1}$ )	0,02	0,01	0,035	0,05	0,06
Tempo de incubação (min)	10	30	60	90	110

## 2.2. Presença de interferentes

Neste trabalho foi utilizado como interferente o agrotóxico/inseticida imidacloprida (grupo químico: neonicotinóides) na concentração de  $4 \mu\text{g L}^{-1}$ . Este agrotóxico apresenta solubilidade em água da ordem de  $0,6 \text{ g L}^{-1}$ , ionizável se apresentando na forma catiônica na faixa de pH 5,0 a 9,0. Este agrotóxico apresenta interação com a albumina sérica humana (Zhao J. et al 2013).

Utilizou-se o tratamento estatístico de otimização por restrição para sobrepor as superfícies de resposta do complexo BSA-glifosato ao modelo

BSA-Imidacloprido. Aplicando-se a função “desejabilidade” (“desirability”) identifica-se as condições experimentais de melhor sinal fluorescente do complexo BSA-glifosato em comparação ao sinal BSA-imidacloprida. Este é um método de programação não-linear e, no caso do programa *Statistica*, que usa a abordagem de Derringer e Suich, a ferramenta é a função “*desirability*”. Neste tratamento as respostas ( $Y_i$ ) são convertidas em uma outra função individual  $d_i$  que varia em uma faixa de  $0 \leq d_i \leq 1$ . Se a resposta for aquela que se quer,  $d_i = 1$ , e se a resposta estiver fora da região aceitável,  $d_i = 0$ . Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a “desirability” global.

### **2.3. Funcionalização da Ponteira e Imobilização da Albumina bovina sérica**

As ponteiras de nitrato de silício foram submersas em uma solução aquosa de cloridrato de cisteamina ( $20 \text{ nmol L}^{-1}$ ) *overnight* coberta com uma folha de alumínio. O substrato foi lavado com água para remover o excesso de cloridrato de cisteamina. Depois as ponteiras foram submersas em solução aquosa de 1 % de glutaraldeído por 1 hora e lavadas com água antes da imobilização da BSA. A albumina foi imobilizada com trietanolamina e 3-(aminopropiltrióxissilano) APTES. Finalmente, as ponteiras foram submersas em uma solução de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de BSA para uma incubação de uma hora, lavadas e usadas imediatamente.

## **3. RESULTADOS**

As condições experimentais definidas no planejamento foram obtidas por modelo empírico gerado pelo programa *Statistica* a partir da resposta de fluorescência dos complexos BSA-glifosato formado sob as condições do planejamento. A figura 1 mostra as condições de menor sinal de fluorescência da BSA-glifosato ( $\text{pH} = 7,4$ ; força iônica de  $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Estas condições de

menor fluorescência do complexo foram escolhidas como condição na imobilização da proteína e do meio onde serão realizadas as medidas de força. Esta diminuição de fluorescência acentuada indica, com sensibilidade adequada, a formação do complexo BSA-glifosato. A condição de pH=7,4 favorece a ionização da molécula de glifosato, o que pode favorecer a complexação com sítios aniônicos da BSA nesta faixa de pH.

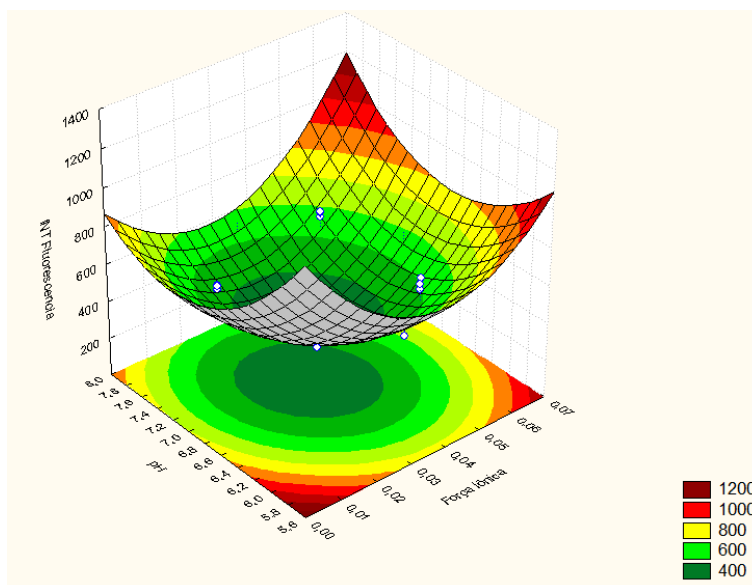


Figura 1 – Superfície de resposta do modelo de regressão para o sinal de fluorescência dos complexos BSA-Gli. Ponto de mínimo: 316,59 unidades arbitrárias de fluorescência (u.a).

Tendo obtido o modelo de regressão para o sinal fluorescência do sistema (BSA-imidacloprido), realizou-se a sobreposição das superfícies de resposta ao complexo BSA-glifosato através da função “*desejabilidade*”. Por este tratamento estatístico se manteve a condição do modelo BSA-Glifosato como condição de maior sensibilidade do sinal de fluorescência para a determinação deste complexo na presença do inseticida imidacloprido na concentração de  $4 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.1. Conformação Espacial e Estabilidade da Proteína Sensora (albumina)

Sob as condições definidas pelo modelo experimental foi obtido o espectro de fluorescência da BSA e a diminuição de fluorescência resultante da

complexação com moléculas de glifosato (figura 2). Estas condições experimentais foram as mais adequadas para a interação entre o sensor (não imobilizado) e o seu analito (glifosato).

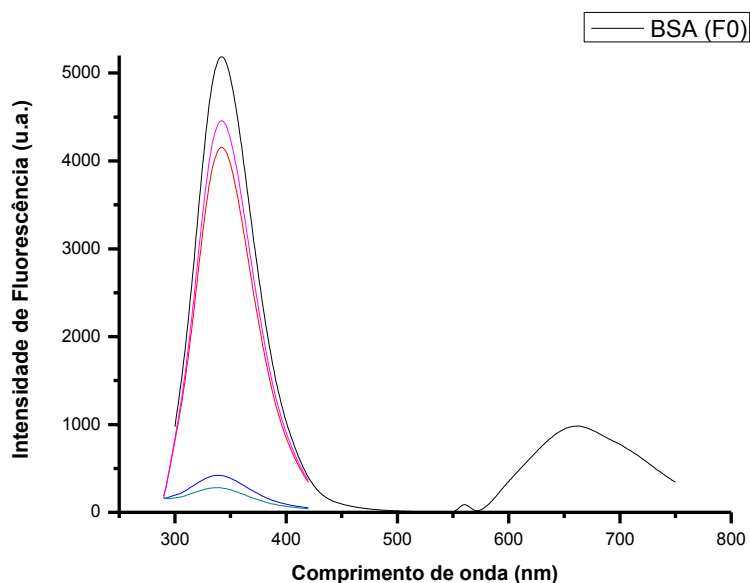


Figura 2: Caracterização espectroscópica da albumina (BSA F0) e sua complexação com diferentes concentrações de glifosato.

A literatura apresenta alguns métodos clássicos que utilizam dados de fluorescência para determinar o número de equivalentes de sítios de ligação por proteína (Xu. et al. 2009). Um dos tratamentos mais utilizados baseia-se em um modelo de duplo log da curva de titulação de BSA pelo supressor que permite calcular, a partir da inclinação, o número de moléculas do supressor que interagem simultaneamente com cada sítio. Por esta abordagem, a relação entre a intensidade de extinção de fluorescência e a concentração do supressor pode ser descrita como indicado a seguir:

$$\text{Log}_{10}\{(F_0-F)/F\} = \text{Log}_{10} K_a + n \text{Log}_{10} [Q] \quad (3)$$

onde  $K_a$  é a constante de ligação ou a constante de associação da interação, e  $n$  é o número de moléculas do supressor que interagem simultaneamente com

cada sítio ligante. Para o complexo BSA-glifosato o modelo de regressão identificou que os complexos proteína-glifosato tem estequiometria do tipo 1:1 levando a:

$$\text{Log}_{10}[\text{F}_0-\text{F}/\text{F}] = 0,78 \text{ Log}_{10}[\text{Q}]+\text{Log}_{10} 5,32 \quad (4)$$

### 3.2 Determinação de Parâmetros Termodinâmicos

O estudo de supressão de fluorescência em diferentes temperaturas permite calcular os parâmetros termodinâmicos envolvidos na ligação dos complexos do glifosato com a BSA. A partir desses parâmetros, além da espontaneidade do processo, é possível inferir a natureza das ligações formadas. Os valores da variação da entalpia ( $\Delta H$ ) e da variação da entropia ( $\Delta S$ ) envolvidos na ligação entre a BSA e cada complexo em estudo foram calculados utilizando a Equação de Van't Hoff (Atkins, 1998):

$$\ln K_a = -(\Delta H/RT) + (\Delta S/R) \quad (5)$$

e a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) foi calculada utilizando:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

sendo  $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  e  $T$  a temperatura em Kelvin.

Os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos foram:  $\Delta H = -20,67 \text{ K J mol}^{-1}$  e  $\Delta S = 5,78 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . Os dados termodinâmicos indicam que a interação do complexo BSA-Glifosato é espontânea e constituída majoritariamente por ligações de hidrogênio, não excluindo a ocorrência de interações hidrofóbicas. Estes dados estão coerentes com os dados obtidos por Yue et al. (2008).

### 3.3 Medidas de Espectroscopia de Força entre BSA-Glifosato

As medidas de espectroscopia de força foram realizadas em meio tamponado com fosfato de sódio (pH= 7,4; força iônica de 0,03 mmol L<sup>-1</sup>), para orientar a conformação da BSA no momento da sua imobilização na ponteira do cantilever. A aproximação da BSA-Glifosato foram realizadas em meio aquoso sob estas mesmas condições de pH. A espectroscopia de força realizada com ponteira de nitrato de silício funcionalizada com BSA evidenciaram interações moleculares significativas com o herbicida. A aproximação da amostra à extremidade do cantilever resulta em sua deflexão significativa na direção da solução de glifosato (zc negativo) devido à força atrativa (sinal negativo) (vide Figura 3). O valor da força atrativa BSA-Gli é maior do que a interação entre a ponteira sem funcionalização e o glifosato ( $F_{at(BSA)} > F_{at}$ ).

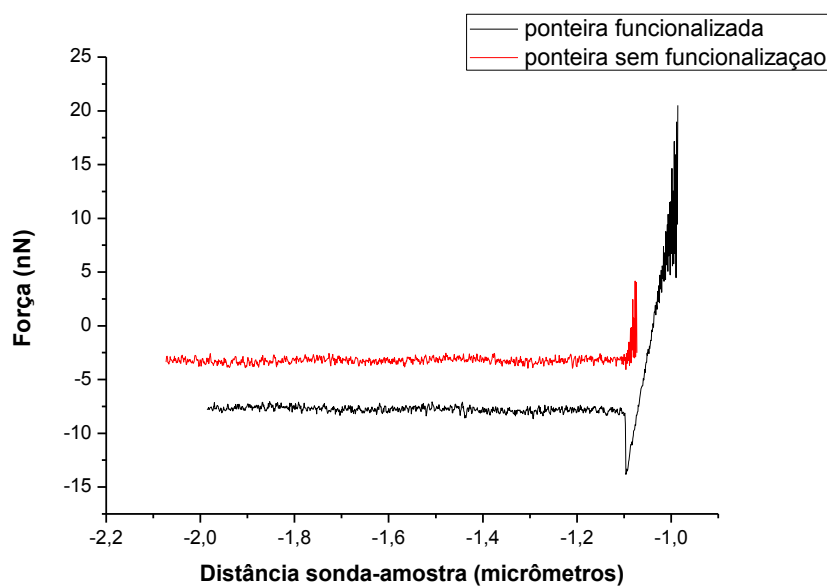


Figura 3 - Curva Força-distância para AFM.

## 4. CONCLUSÃO

Apesar da albumina ser uma proteína transportadora, esta apresenta-se como um sensor adequado às exigências metrológicas consideradas neste

trabalho. Os ensaios baseados na fluorescência intrínseca da BSA foram eficientes para definir as condições de imobilização do sensor e de medida de força da interação BSA-glifosato com vistas à aplicação em amostras com presença de interferentes. As medidas de espectroscopia de força confirmaram as condições experimentais para realizarr a validação do biossensor e seus parâmetros metrológicos de mérito.

Os próximos testes incluem as medidas de força em amostras compostas pelo analito e potenciais interferentes. O objetivo será identificar os domínios moleculares do sensor e os valores de suas respectivas forças de interação. Dessa forma, pretende-se determinar a conformação mais adequada para a interação com o glifosato na presença destes interferentes, que provavelmente estão presentes em amostras complexas.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPERJ-Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, do CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e da CAPES – Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

## **REFERÊNCIAS**

ATKINS, P. W.;Physical Chemistry, 6th ed., Oxford: Oxford, 1998.

BUTT HJ, CAPPELLA B, KAPPL M. Force measurements with the Atomic Force Microscope: technique, interpretation and applications. Surface Science Reports, 59, 1-152, 2005.

FRISBIE CD, ROZSNYAI LF, NOY A, WRIGHTON MS, LIEBER CM., (Functional-group Imaging by Chemical Force Microscopy. Science, 265, 2071-2074, 1994.

FRITZ J. Cantilever biosensors. *Analyst*. 133, 855-863, 2008.

ITO T, GRABOWSKA I, IBRAHIM S. Chemical-force microscopy for materials characterization. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 29, 225-233, 2010.

LIU, X. ET AL. (2010). Effect of Hydrogenation on Ring C of Flavonols on Their Affinity for Bovine Serum Albumin. *Journal of Solution Chemistry*, v. 39, n. 4, p. 533-542.

NOY A, VEZENOV DV, LIEBER CM. Chemical Force Microscopy. *Annual Review of Materials Science*, 27, 381-421, 1997.

VOLCKE C, ET AL. Plasma Functionalization of AFM Tips for Measurement of Chemical Interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 348, 322-328, 2010.

YUE Y. ET AL. In Vitro Study on the Binding of Herbicide Glyphosate to HSA by Optical Spectroscopy and Molecular Modeling. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Volume 90, Issue 1, 30 January 2008, Pages 26-32, 2008.

ZHAO J. ET AL. Studies on the Interaction Between Imidacloprid and Bovine Serum Albumin by Spectrometry – *Advanced Materials Research (Volumes 726-731) (Volumes 726-731) - 199-203 pp.* 2013.

XU, H. ET AL. (). Spectroscopic Studies on the Interaction of Vitamin C with Bovine Serum Albumin. *Journal of Solution Chemistry*, v. 38, n. 1, p. 15-25, 2009.

**Enviado em:** 18 jun. 2018

**Aceito em:** 25 set. 2018

**Editor responsável:** Mateus das Neves Gomes