

# EVIDÊNCIAS DE DETECÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA POR ESPECTROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA: UMA FERRAMENTA PROMISSORA PARA SENSORIAMENTO AMBIENTAL

Ariana de Souza Moraes<sup>a</sup>, Bárbara Brito S. Pereira<sup>a</sup>, Alberto Luís D. Moreau<sup>a,b</sup>, Moema Hausen<sup>a</sup>, Pâmela S. Garcia<sup>a</sup>,  
Alessandra L. Da Róz<sup>a</sup>, Fábio L. Leite<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Pesquisa em Nanoneurobiofísica, Universidade Federal de São Carlos em Sorocaba-SP, CEP18052-780, Brasil.

<sup>b</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFSP), Itapetininga - SP, CEP18202-000, Brasil.

\* Autor de correspondência, e-mail: fabioleite@ufscar.br

Recibido: Noviembre 2014. Aprobado: Abril 2015.

Publicado: Mayo 2015.

## RESUMO

A aplicação de agroquímicos em plantações acarreta em danos ao meio ambiente, devido ao seu alto risco biológico (acúmulo e disseminação no bioma). Neste contexto, novos métodos de sensoriamento podem ser destacados como objeto de pesquisa no monitoramento ambiental, e.g., o desenvolvimento de sensores aliado à nanotecnologia podem fornecer ferramentas promissoras, eficientes e seletivas. Neste trabalho, estudou-se parâmetros e metodologias de interação específica entre um anticorpo (anti-atrazina) e um herbicida (atrazina) utilizando a técnica de espectroscopia de força atômica, uma ferramenta da microscopia de força atômica. Tais estudos forneceram resultados preliminares promissores para o desenvolvimento de um nanobiossensor específico para detecção de herbicidas, em especial, a atrazina. Foram comparados substratos funcionalizados com diferentes substâncias (atrazina, imazaquim, metsulfuron-metil e água) para avaliação da interação específica entre atrazina *versus* anti-atrazina (complexo antígeno-anticorpo). Os dados obtidos comprovaram a eficiência do nanodispositivo, sendo que a interação observada entre o herbicida atrazina e seu respectivo anticorpo foi expressiva, comparada com aquelas apresentadas por outros herbicidas.

**Palavras-chave:** Herbicidas, Nanobiossensor, Microscopia de Força Atômica, Funcionalização.

## EVIDENCES OF DETECTION OF ATRAZINE HERBICIDE BY ATOMIC FORCE SPECTROSCOPY: A PROMISSING TOOL FOR ENVIRONMENTAL SENSING

### ABSTRACT

The high increase of agrochemicals application on crops has as consequence a range of environmental disturbances and modifications, due to the biohazard involved on the use of those substances (accumulation and dissemination in bioma). In this context, new detection methods are highlighted as a research subject on environmental monitoring. Therefore, the sensors development combined to nanotechnology is a promising methodology in what concerns effectiveness and selectiveness. This project established specific interaction parameters and methodologies amongst an antibody (anti-atrazine) and the herbicide atrazine, applying atomic force microscopy techniques, which resulted on the development of a specific nanobiosensor to detect herbicides. It was compared substrates functionalized with different substances: atrazine, imazaquim, metsulfuron-methyl and water (control), to evaluate and prove the specific interaction amongst atrazine *versus* antiatrazine (antigen-antibody complex). Since, as compared with other samples, the interaction observed within this specific complex was detected, the obtained data showed the nanodispositive efficiency.

**Keywords:** Herbicides, Nanobiosensor, Atomic Force Microscopy, Functionalization.

## INTRODUÇÃO

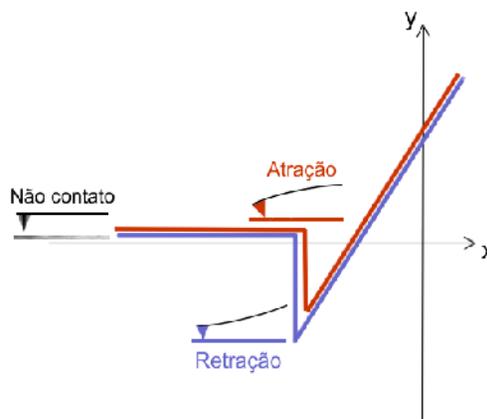
O monitoramento ambiental dos resíduos de agroquímicos utilizados em larga escala é fundamental para avaliar e mensurar seus potenciais danos ao meio ambiente. Os métodos tradicionais utilizados para a detecção de agroquímicos geralmente envolvem técnicas

cromatográficas com ultravioleta [1], detecção por espectrometria de massa [2,3], extração em fase sólida magnética [4] e cromatografias (e.g. gasosa por captura de elétrons), [5,6] Recentemente, técnicas de alta sensibilidade, como a cromatografia líquida de alta

eficiência (HPLC) tem sido uma alternativa interessante para detecções de alta precisão [7,8]. No entanto, métodos de detecção, preparação e análise, especialmente para a identificação de resíduos de pesticidas em amostras ambientais, vêm sendo desenvolvidos para otimizar e minimizar custos, abrangendo inclusive a utilização de sensores com aplicações biológicas, denominados biossensores [9-13]. Assim quando estes exploram a escala nanométrica, são denominados nanobiossensores. Para seu desenvolvimento, pode ser utilizado o Microscópio de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscope*) [14-17], que é um equipamento pontual, seletivo e preciso na identificação e caracterização de moléculas por meio de sondas, geralmente fabricadas em silício [18-20]. A sonda pode ser modificada por intermédio de funcionalização química, para desenvolvimento de nanobiossensores [21-23]. Esta funcionalização pode ser realizada com monocamadas orgânicas, as quais possuem terminações em grupos funcionais bem definidos, e.g., anticorpos [24-27], enzimas [28], herbicidas [29], que viabilizam interações com moléculas-alvo [30-33]. O uso destas sondas funcionalizadas torna o AFM um nanobiossensor com alta sensibilidade, capaz de detectar interações em nível molecular [34,35]. Tais nanodispositivos possibilitam, com precisão nanométrica, a análise de forças entre diferentes grupos moleculares além do mapeamento químico da superfície-alvo [9,36,37]. O AFM possui uma técnica utilizada para mensurar forças de interação que é denominada espectroscopia de força atômica (AFS, do inglês *Atomic Force Spectroscopy*) [38,39]. A AFS gera curvas de força (Figura 1) por intermédio da atração e retração da sonda no eixo Z.

Estudos prévios [20,40], adaptados com diversas metodologias referentes à funcionalização de sondas de AFM [41-43], mostraram grande eficiência na detecção de herbicidas utilizando enzimas [40,44,45]. Entretanto, medidas baseadas no complexo anticorpo-antígeno

[46,47], têm sido pouco exploradas, apesar de haver demonstrado um alto grau de especificidade, o que garante a eficiência das ligações químicas entre o ligante e o anticorpo específico.



**Fig. 1.** O gráfico apresenta uma curva de força típica. A sonda vermelha representa na curva o momento de atração da mesma em relação à amostra, enquanto a sonda azul denota na curva o momento de retração. O pico representado abaixo do eixo x indica o momento de separação da sonda em relação à amostra, e indica a força de adesão entre as mesmas.

Neste trabalho, estudou-se a interação entre o herbicida atrazina e seu anticorpo específico (anti-atrazina) com a finalidade de desenvolver um nanobiossensor. O herbicida atrazina faz parte de um grupo de agrotóxicos amplamente utilizados no setor agrícola e vem sendo alvo de atenção devido ao seu elevado potencial de contaminação do meio ambiente [48], além da baixa reatividade e solubilidade, que permite seu acúmulo em solos e recursos hídricos [48,49]. Desta forma, este estudo fornece resultados preliminares importantes para desenvolvimento de nanodispositivos utilizados no sensoriamento ambiental.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Materiais utilizados*

Anticorpo monoclonal de camundongo anti-atrazina (#LS-C74425, LifeSpan BioSciences, Inc); herbicida atrazina (ChemService); sondas triangulares de nitreto de silício (Bruker Corp.); frações de mica muscovita (LEGEP Mineração Ltda). Câmara de reação que consiste em um

sistema adaptado de vidro temperado semelhante a um dessecador com sílica e duas aberturas para estabelecer o fluxo de entrada e saída de nitrogênio em gás durante a funcionalização das sondas. Todos os reagentes a seguir foram adquiridos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO: imazaquim, metsulfuron-metil, APTES 98% (3-aminopropil-trietoxisilano), glutaraldeído, trietilamina 99%, metanol, solução salina tamponada (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*), glicerol, albumina (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*), EDC (#E1769, N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreídrico) e caseína (CAS).

#### *Funcionalização das sondas de AFM e imobilização do anticorpo*

A funcionalização química das sondas de AFM e a imobilização dos anticorpos foi realizada de acordo com a literatura especializada [19,31,40] e adaptada em cinco etapas conforme descrito a seguir: **(1)** As sondas foram limpas em equipamento de emissão ultra-violeta por 20 minutos (240nm, ProCleaner, BIOFORCE Nanosciences). **(2)** Em seguida foram colocadas em câmara de reação por 30 minutos juntamente com recipientes contendo 40 µL APTES 98% e 40 µL trietilamina 99%. Nesse sistema, com pH balanceado pela trietilamina, as moléculas de APTES se depositaram por evaporação sobre as sondas, formando um filme nanométrico uniforme [19]. **(3)** O anticorpo anti-atrazina foi diluído na proporção 1:1000 em PBS contendo 3% de BSA. **(4)** A solução recém preparada de EDC à 0,02 mmol.L<sup>-1</sup> diluída em PBS foi adicionada à solução de anti-atrazina na proporção 10:1 (EDC:anti-atrazina) por 2h à 4°C. Após este período, as sondas foram lavadas em água deionizada. **(5)** A inibição dos sítios amina em regiões onde provavelmente não houve a interação do anti-atrazina com o APTES ocorreu após a imersão das sondas em solução de CAS à 1% por 1 h à 37°C. A fim de minimizar interferências nas medidas, o uso de CAS no processo final de funcionalização favorece a interação específica entre antígeno-anticorpo a partir do

bloqueio de sítios inespecíficos das terminações amina remanescentes [50]. Após todas estas etapas, as sondas foram lavadas em água deionizada e armazenadas em dessecador.

#### *Funcionalização da mica*

As etapas 1 e 2 da funcionalização da sonda de AFM se repetiram para a mica e foram realizadas conforme as seguintes etapas adicionais: **(A)** Após a etapa 2, foi adicionado, na mica, 200 µL de glutaraldeído à 25% por 10 minutos em câmara de reação. Em seguida, o excesso de glutaraldeído foi removido submetendo a mica a três banhos de água deionizada, e **(B)** imersa por 45 minutos em solução de herbicida diluído em metanol à 0,5 mM e 0,02 mmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Após este período foi lavada três vezes em água deionizada e armazenada em dessecador.

#### *Preparo dos controles*

Os experimentos de controle foram realizados a fim de confirmar a especificidade do nanobiossensor e assegurar possíveis falso-positivos. Foram realizados 5 controles (3 para sondas e 2 para mica) conforme descrito abaixo:

**Sonda.** Três controles foram preparados: i) "Controle NF" (NF, não funcionalizado): sonda submetida apenas à etapa 1 descrita em Funcionalização das Sondas de AFM; ii) "Controle BSA" (sonda submetida apenas a BSA): neste controle foram realizadas as etapas 1 e 2 de Funcionalização de Sondas de AFM, além de adsorção de BSA à 3%; iii) "Controle BSA+CAS" (funcionalizada somente com BSA e CAS): foram realizadas as etapas 1 e 2, além da adsorção de BSA à 3% e CAS à 1%. Estes três controles foram submetidos à interação com atrazina presente na mica funcionalizada, preparada conforme protocolo previamente descrito para funcionalização das micas com herbicidas.

**Mica.** Foram preparados dois controles, imazaquim e metsulfuron-metil, os quais foram submetidos às etapas A

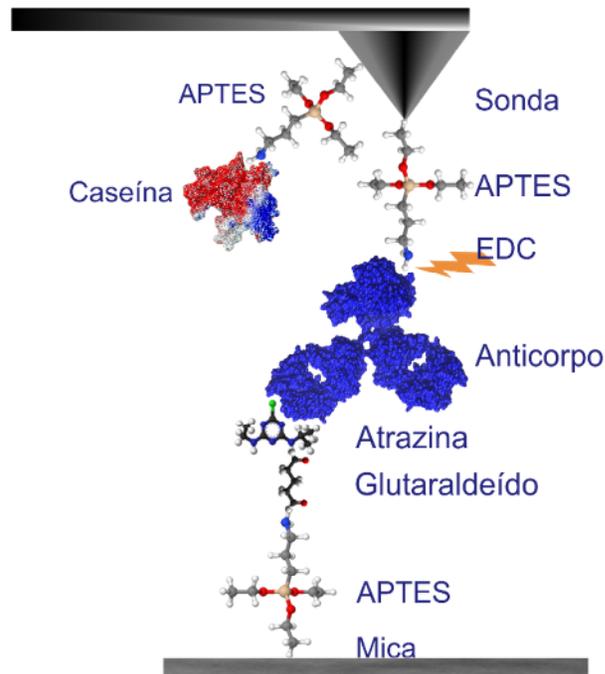
e B conforme descrito no tópico de Funcionalização da Mica.

#### Obtenção das curvas de força em AFM

Para a obtenção das curvas de força foi utilizado um AFM Multimode V, Veeco Instruments® com o pacote PicoForce para AFS. As medidas de força foram realizadas em modo contato, sendo que o software utilizado para análise das curvas e controle do AFM foi o Nanoscope 7.0®. Foram realizadas 50 curvas de força em três pontos da amostra, totalizando 150 curvas para cada experimento (realizado em duplicata). As curvas de força foram obtidas em condições controladas em temperatura de 18°C e umidade relativa (UR) de (20±1) %. Ressalta-se que as forças capilares, nestas condições (UR≤20%), são insignificantes e não interferem nos resultados de adesão, conforme descrito na literatura [51-54]. A calibração da constante de mola (k) da sonda em todas as análises foi realizada conforme reportado por Florin et al (1995) [55]. Dessa forma, os valores de k foram medidos para cada ponta de AFM utilizada, através do software *Nanoscope Analysis*®. A importância de calcular o k ao invés de utilizar o valor fornecido pelo fabricante se deve ao fato de que os valores podem variar muito entre as pontas. Como nanobiossensores exploram escalas atômicas, é empírico calcular com precisão os valores de k para que as medidas de força de adesão do sensor desenvolvido sejam realizadas fielmente quanto a sensibilidade (N/m) e sensibilidade (nm/V).

#### Tratamento dos dados

Os dados de curva de força foram organizados e processados com o auxílio do programa Origin 8.0® para a realização da análise estatística. Dessa forma, histogramas em barras foram construídos e ajustados com uma distribuição de Gauss. Estes gráficos possuem, como variáveis, os valores de força de adesão (no eixo x) e a frequência de eventos de adesão (no eixo y).



**Fig. 2.** Esquema do sistema de funcionalização (sonda e mica) do complexo antígeno (atrazina) e seu respectivo anticorpo. As regiões de interação livres, foram bloqueadas com caseína. O EDC foi utilizado para reticulação dos grupos carboxila do anticorpo aumentando a conjugação direta com as aminas primárias do APTES (representação fora de escala).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 representa os grupos funcionais presentes na sonda e na mica, resultado da funcionalização e imobilização do anticorpo. Métodos tradicionais que envolvem ressonância de plasma de superfície (SPR, do inglês *surface plasmon resonance*) [56], espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*) [20,57,58], microscopia óptica [59], espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS, do inglês, *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) [60,61] e microscopia confocal a laser [24,62,63] são comumente utilizadas para garantir a imobilização de moléculas nas superfícies a serem analisadas. A metodologia recentemente descrita por Garcia et al (2015) [45] segue os mesmos parâmetros de funcionalização do presente trabalho, no entanto as

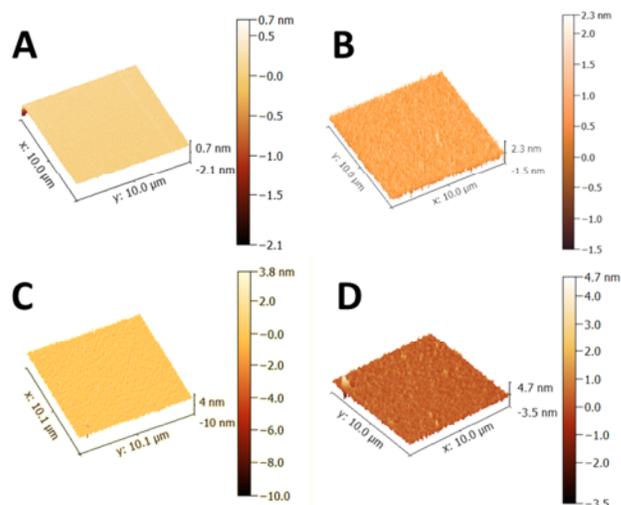
devidas adaptações são necessárias para cada molécula-alvo. No trabalho de Garcia et al (2015) [45], o método de caracterização da sonda confirmou adicionalmente a presença da proteína na sonda funcionalizada a partir de ligação com fluoróforos, sendo possível a visualização das enzimas marcadas e assim confirmando a efetividade de funcionalização do sistema.

A sonda de nitreto de silício sofreu silanização em sua superfície devido à evaporação do APTES. Por sua vez, o grupo carboxila do anticorpo reticulado com EDC interagiu com a amina do APTES. As regiões nas quais não houve interação do anticorpo com o APTES foram bloqueadas. Este procedimento de bloqueio, em processos de funcionalização de pontas de AFM, vem sendo utilizado em experimentos de AFS com a finalidade de evitar o aparecimento de forças não-específicas nas medidas de força [45]. Neste trabalho, o procedimento consistiu em ligar um agente bloqueador (a caseína) nos sítios ativos do APTES, nos quais não houve a ligação do anticorpo (formação de lacunas). Tais lacunas, compostas de terminações amina, caso ficassem livres, poderiam interagir com o anti-atrazina, fornecendo forças interferentes e falso-positivos.

No substrato, a silanização da mica com o APTES proporcionou a ligação do “linker” glutaraldeído à superfície a fim de possibilitar a inserção da atrazina. Dessa forma, garante-se que a interação da antiatrazina na sonda funcionalizada ocorra com a atrazina no substrato durante as medidas de força de adesão realizadas.

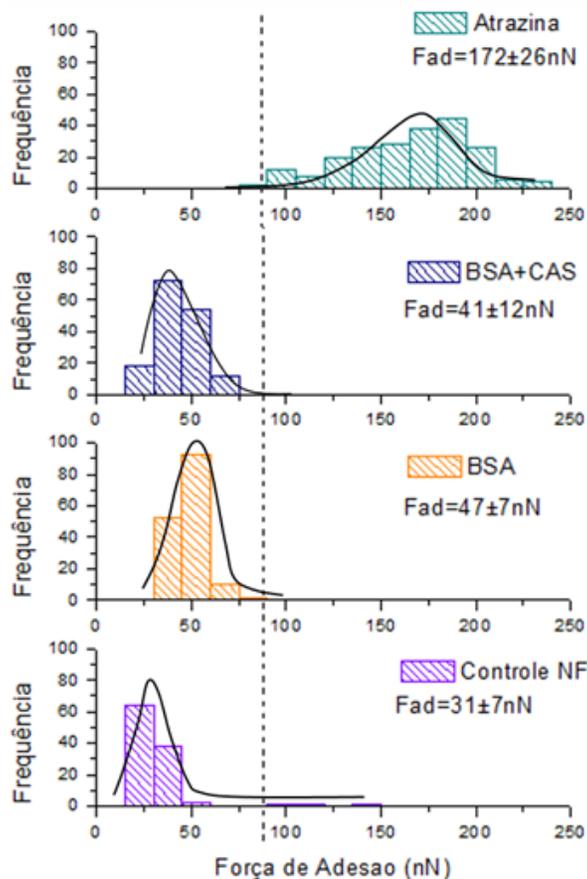
O substrato de mica, devidamente esterilizado (Figura 3A), assim como a sonda, foi funcionalizado com APTES (Figura 3B) para prover grupamentos amina para a interação com o glutaraldeído. A funcionalização com o glutaraldeído (Figura 3C), por sua vez, proporcionará a interação com a atrazina, resultando em uma construção homogênea de camadas automontáveis sobre o substrato, como representado pela Figura 3D, pronto para ser

submetido à interação com a sonda de AFM, também modificada quimicamente.



**Fig. 3.** Imagens de AFM, em modo contato, apresentando a superfície de (A) mica muscovita limpa e as superfícies de micas funcionalizadas (B) com APTES; (C) com APTES e glutaraldeído, e (D) com APTES, glutaraldeído e atrazina. Além da homogeneidade do recobrimento, é possível observar a adição de camadas em cada etapa de funcionalização em virtude do aumento crescente da altura em nm.

A Figura 4 apresenta os histogramas de força de interação entre sondas controle e substrato funcionalizado com atrazina. Devido ao fato de interações não-específicas poderem gerar interferência no sistema [64,65], foram realizadas medidas controle a fim de distinguir interações específicas antígeno-anticorpo das possíveis forças interferentes. Foi verificado que as medidas controle apresentaram valores de força de adesão  $\leq 50$  nN; resultado inferior aos valores de interação específica (nanobiossensor), que apresentaram força de adesão de  $172 \pm 26$  nN. O aumento na força de adesão foi de 319%, 265% e 454% para BSA+CAS, BSA e Controle NF, respectivamente, comprovando a eficácia do nanobiossensor para detectar atrazina, conforme a tabela 1.



**Fig. 4.** Histograma ajustado à uma função gaussiana, associado às 600 curvas (150 para cada amostra) distribuídas em três sondas controle: Controle NF (roxo,  $k = 2,4433 \text{ N/m}$ ); BSA (laranja,  $k = 2,3030 \text{ N/m}$ ); BSA+CAS (azul,  $k = 1,9325 \text{ N/m}$ ) e o nanobiossensor atrazina/antiatrazina (verde,  $k = 2,2362 \text{ n/m}$ ).

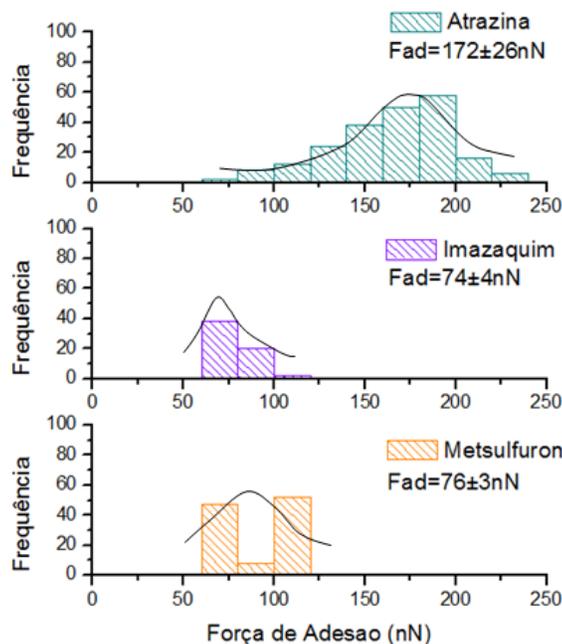
**TABELA I.** VALORES DE FORÇA DE ADESÃO DOS SISTEMAS DE INTERAÇÃO NÃO-ESPECÍFICO E PERCENTUAL NO AUMENTO DA FORÇA DE INTERAÇÃO ESPECÍFICA EM RELAÇÃO AOS CONTROLES

Sistemas de interação não específicos	Força de Adesão (nN)	Aumento da força de interação específica(*) comparado ao controle
Controle-NF x atrazina	31±7	454%
BSA x atrazina	47±7	265%
BSA+CAS x atrazina	41±12	319%
Anti-atrazina x metsulfuron-metil	76±3	126%
Anti-atrazina x imazaquim	74±4	132%

(\*) A força de interação específica foi de  $172 \pm 26 \text{ nN}$ .

A confirmação da eficiência do nanobiossensor foi adicionalmente validada comparando-se as interações obtidas por curva de força com outros herbicidas não-específicos [66-68] (Figura 5), os quais exibiram menor força de interação, se comparado à interação com o herbicida atrazina. O aumento nos desvios da força de adesão do antiatrazina com a atrazina, quando comparados às forças de adesão dos controles ou dos herbicidas não-específicos (imazaquim e metsulfuron-metil), observado nas Figuras 4 e 5 indicam o caráter específico da interação antiatrazina-atrazina, ou seja, em um sistema de interação não-específico, qualquer força é interferente e se enquadra no mesmo intervalo de valor, já em um sistema de interação específica atuam tanto as forças inespecíficas (interferentes) quanto as forças específicas, logo é obtido uma distribuição normal mais larga. A análise da força de adesão específica da atrazina com seu respectivo anticorpo ( $172 \pm 26 \text{ nN}$ ) apresentou uma interação de 132% e 126% mais elevada que a interação entre a antiatrazina e o imazaquim ( $74 \pm 4 \text{ nN}$ ) e metsulfuron-metil ( $76 \pm 3 \text{ nN}$ ), respectivamente. Tal resultado confirma as evidências de que o nanobiossensor desenvolvido com pontas de AFM é uma ferramenta promissora.

Devido à contaminação da atrazina em corpos d'água (maior que  $0,1 \mu\text{g/L}$ , limite estipulado pela União Européia [69]), nos últimos anos, o desenvolvimento de uma tecnologia altamente sensível vem sendo alvo de interesse [56,70]. Este fato ressalta a importância da interação específica para a eficiência da detecção em nanobiossensores de AFM – sobretudo envolvendo sondas funcionalizadas com anticorpos específicos para alguns herbicidas [56,71,72,73].



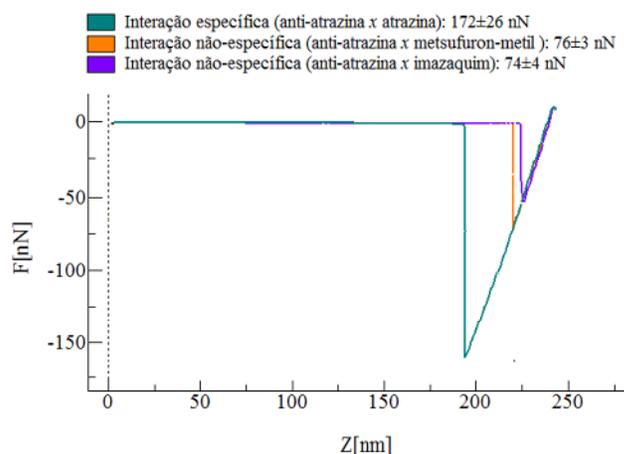
**Fig. 5.** Histograma ajustado à uma função gaussiana, associado às 450 curvas (150 para cada amostra) distribuídas em três substratos funcionalizados com diferentes herbicidas.

Na Figura 6, os mesmos valores de força de adesão apresentados anteriormente apresentam-se comparados como curvas de força, o que torna mais evidente a detecção específica. Nesta imagem fica clara a distinção entre as medidas de interação entre anti-atrazina  $\times$  atrazina, anti-atrazina  $\times$  metsulfuron-metil e anti-atrazina  $\times$  imazaquim.

Deda et al (2013) [44], detectaram traços de contaminação de atrazina na amostra a partir de nanobiossensor, com força de adesão na ordem de piconewtons ( $10^{-12}$  N). Neste trabalho, um aperfeiçoamento da metodologia foi realizado com a inclusão do EDC e da caseína no processo de funcionalização, desta forma os materiais e as biomoléculas aderiram à superfície com mais força. Uma funcionalização química mais consolidada, como a obtida neste trabalho, é de grande importância uma vez que o antiatrazina e os contaminantes se mantêm aderidos e são menos susceptíveis ao desprendimento das superfícies durante as medidas de força. Tal importância pode ser

comprovada nos valores de força de adesão obtidos neste trabalho, atingindo a ordem de nanonewtons ( $10^{-9}$  N).

A interação antígeno-anticorpo possui duas propriedades de particular importância: é altamente específica e possui interações de alta afinidade [74]. Pesquisas recentes enfatizam a relevância de tal estudo, as quais utilizam imunobiossensores baseados em anticorpos [56,75,76] que se destaca pela eficácia, agilidade metodológica, e baixo custo do sistema. Portanto, os resultados apresentados aqui, mostram fortes evidências de que um nanobiossensor de AFM pode ser capaz de detectar atrazina em pequenas quantidades, de forma fina e precisa [24,77].



**Fig. 6.** Curvas de força representando a interação específica entre anti-atrazina  $\times$  atrazina ( $172\pm 26$  nN) e as interações não específicas, entre anti-atrazina  $\times$  metsulfuron-metil ( $76\pm 3$  nN) e anti-atrazina  $\times$  imazaquim ( $74\pm 4$  nN).

## CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram fortes evidências de que a detecção do herbicida atrazina é viável e eficaz empregando-se uma sonda de AFM com anticorpos imobilizados. Os elevados valores das interações específicas entre o nanobiossensor e o herbicida atrazina, confirmam a evidência de detecção da atrazina e a eficácia do sistema em desenvolvimento ( $172\pm 26$  nN). Tal dispositivo apresenta potencial de aplicação para a detecção de outros resíduos de agrotóxicos no meio ambiente.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CNPq, CAPES (PNPD20131501, PNPD02880/09-1) e FAPESP (Proc. 2007/05089-9, 2013/04320-0) pelo apoio e financiamento a esta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- [1] Martínez A., Reyes I., and Reyes N., (2007) "Cytotoxicity of the herbicide glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells," *Biomedica*, 27(4): 594–604.
- [2] de Almeida R. M. & Yonamine M., (2007) "Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of the herbicides paraquat and diquat in plasma and urine samples" *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*, 853(1–2): 260–264
- [3] Tsukioka T. & Murakami T., (1989) "Capillary gas chromatographic-mass spectrometric determination of acid herbicides in soils and sediments" *J. Chromatogr*, 469: 351–359.
- [4] Z. He, D. Liu, R. Li, Z. Zhou, and P. Wang, (2012) "Magnetic solid-phase extraction of sulfonylurea herbicides in environmental water samples by Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@dioctadecyl dimethyl ammonium chloride@silica magnetic particles," *Anal. Chim. Acta*, vol. 747: 29–35.
- [5] Kumazawa T., Sato K., Seno H., Ishii A., and Suzuki O., (1995) "Capillary gas chromatography with four different detectors for dinitroaniline herbicides in human body fluids" *J. Anal. Toxicol.*, 19(2): 95–98.
- [6] Senseman S. A., Lavy T. L., Mattice J. D., Gbur E. E., Skulman B. W., (1997) "Trace Level Pesticide Detections in Arkansas Surface Waters" *Environ. Sci. Technol.*, 31(2):395–401.
- [7] Fenoll J, Hellín P, Martínez CM, et al. (2012) High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying phenylurea herbicides and their main metabolites in amended and unamended soils. *Journal of Chromatography A*, 1257, 81–88.
- [8] Singh R (2013) HPLC method development and validation- an overview. *J Pharm Educ Res*, 4, 26–33.
- [9] Calil S. S. and Silva P. R. Q., "Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade," pp. 1–20, 2011. (obtido de: <http://www.cpgls.ucg.br>).
- [10] Cheng M. S., Lau S. H., Chow V. T., Toh C. S., (2011) "Membrane-based electrochemical nanobiosensor for Escherichia coli detection and analysis of cells viability" *Environ. Sci. Technol.* 45: 6453–6459.
- [11] Liu R., Guan G., Wang S., Zhang Z., (2011) "Core-shell nanostructured molecular imprinting fluorescent chemosensor for selective detection of atrazine herbicide" *Analyst*, 136(1): 184–90.
- [12] Masojídek J., Souček P., Máchová J., Frolík J., KlemK., MalýJ., (2011) "Detection of photosynthetic herbicides: Algal growth inhibition test vs. electrochemical photosystem II biosensor" *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 117–122, 2011.
- [13] Skládal P., Nunes G. S., Yamanaka H., Barceló D. (1997) "Detection Of Carbamate Pesticides In Vegetables Samples Using Cholinesterase-Based Biosensors" *Electroanalysis*, 14:1083-1087.
- [14] Binnig G. & Quate C. F., (1986) "Atomic Force Microscope" *Phys. Rev. Lett.*, 56(9): 930–933.
- [15] Ferreira A. A. P., Yamanaka, H. (2006) "Microscopia de força atômica aplicada em imunossaios". *Química Nova*, 29(1):137-142.
- [16] Costa L. T., Cidade G. A. G., Weissmuller G., Bastos G. G., Moraes M. B., Bisch P. M. (2003) "The Atomic Force Microscopy as a tool for Biomedical and Biotechnological studies" *Artificial Organs*, 27:435-439.
- [17] Costa L. T., Thalhammer S., Heckl W. M. (2004) "Atomic Force Microscopic as a Tool in Nanobiology. Part II: Force Spectroscopy in Genomics & Proteomics". *Cancer Gen. & Proteom.*1:71-76.
- [18] Amarante A. M., Oliveira G. S., Bueno C. C., Cunha R. A., Ierich J. C. M., Freitas L. C. G., Franca E. F., Oliveira O. N., Leite F. L., (2014) "Modeling the coverage of an AFM tip by enzymes and its application in nanobiosensors" *J. Mol. Graph. Model.* 53(C): 100–104.
- [19] da Silva A. C. N., Deda D. K., Da Róz A. L., Prado R. A., Carvalho C. C., Viviani V., Leite F. L., (2013) "Nanobiosensors based on chemically modified AFM probes: a useful tool for metsulfuron-methyl detection" *Sensors (Basel)*, 13(2): 1477–1489.
- [20] da Silva A. C. N., Deda D. K., Bueno C. C., Moraes A. S., Da Róz A. L., Yamaji F. M., Prado R. A., Viviani V., Oliveira O. N., Leite F. L., (2014) "Nanobiosensors Exploiting Specific Interactions Between an Enzyme and Herbicides in Atomic Force Spectroscopy" *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 14(9) : 6678–6684.
- [21] Cecchet F., Duwez A. S., Gabriel S., Jérôme C., Jérôme R., Glinel K., Demoustier-ChampagneS., Jonas A. M., Nysten B., (2007) "Atomic force

- microscopy investigation of the morphology and the biological activity of protein-modified surfaces for bio- and immunosensors” *Anal. Chem.*, 79(17): 6488–95.
- [22] Jauvert E., Dague E., Séverac M., Ressler L., Caminade A. M., Majoral J. P., Trévisiol E., (2012) “Probing single molecule interactions by AFM using bio-functionalized dendritips” *Sensors Actuators B Chem.*, 168: 436–441.
- [23] Leite F. L., Borato C. E., Da Silva W. T. L., Herrmann P. S. P., Oliveira O. N., Mattoso L. H. C., (2007) “Atomic force spectroscopy on poly(o-ethoxyaniline) nanostructured films: sensing nonspecific interactions” *Microsc. Microanal.*, 13 (4):304–312.
- [24] Allen S., Chen X., Davies J., Davies M. C., Dawkes A. C., Edwards J. C., Roberts C. J., Sefton J., Tendler S. J., Williams P. M., (1997) “Detection of antigen-antibody binding events with the atomic force microscope” *Biochemistry*, 36(24): 7457–7463.
- [25] Ierardi V., Ferrera F., Millo E., Damonte G., Filaci G., Valbusa U., (2013) “Bioactive surfaces for antibody-antigen complex detection by Atomic Force Microscopy” *J. Phys. Conf. Ser.*, 439(1): 012001.
- [26] Ferreira A. A. P., Colli W., Alves M. J. M., Oliveira D. R., Costa P. I., Guell A. G., Sans F., Benedetti A. V., Yamanaka H. (2006) “Investigation of the interaction between Tc85-11 protein and antibody anti-T.cruzi by AFM and amperometric measurements”. *Electrochimica Acta*, 51(24):5046-5042.
- [27] Costa L. T., Vilani, C., Peripolli S., Stavale F., Legnani C., Achete C. A. (2012) “Direct immobilization of avidin protein on AFM tip functionalized by acrylic acid vapor at RF plasma”. *JMR. Journal of Molecular Recognition*, 25:256-261.
- [28] Radmacher M., Fritz M., Hansma H. G., Hansma P. K., (1994) “Direct observation of enzyme activity with the atomic force microscope” *Science*, 265(5178): 1577–1579.
- [29] Franca E. F., Leite F. L., Cunha R. A., Oliveira O. N., Freitas L. C. G., (2011) “Designing an enzyme-based nanobiosensor using molecular modeling techniques” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13(19): 8894–889.
- [30] Hugel T. & Seitz M., (2001) “The Study of Molecular Interactions by AFM Force Spectroscopy” *Macromol. Rapid Commun.*, 22(13): 989–1016.
- [31] Moreau A. L. D., (2011) “Microscopia de Força Atômica em Materiais Biológicos: Biossensores e Nanoferramentas,” *Tese, Universidade Estadual de Campinas.*
- [32] Willemsen O. H., Snel M. M., Cambi A., Greve J., De Groot B. G., Figdor C. G., (2000) “Biomolecular interactions measured by atomic force microscopy” *Biophys. J.*, 79(6): 3267–3281.
- [33] Yang Y., Wang H., Erie D. A., (2003) “Quantitative characterization of biomolecular assemblies and interactions using atomic force microscopy” *Methods*, 29(2): 175–87.
- [34] Steffens C., (2012) “Desenvolvimento de Microcantilever Funcionalizado com Polímero Condutor para a Detecção de Compostos Orgânicos Voláteis e Umidade Relativa” *Tese, Universidade Federal de São Carlos.*
- [35] Etchegaray A., Bueno C. C., Teschke O. (2010) “Identificação de microcistina LR ao nível molecular empregando microscopia de força atômica”. *Química Nova*, 33:1843-1848.
- [36] Chiu T. C., Huang C. C., (2009) “Aptamer-functionalized nano-biosensors” *Sensors (Basel)*, 9(12): 10356–88.
- [37] Neves R. B. S., (2011) “Nanotecnologia Aplicada à Indústria de Alimentos: o uso de biossensores,” (Obtido de: [http://portais.ufg.br/up/67/o/semi2011\\_Rodrig\\_o\\_Balduino\\_1c.pdf](http://portais.ufg.br/up/67/o/semi2011_Rodrig_o_Balduino_1c.pdf))
- [38] Teschke, O., Souza E. F., Silva-Stenico M. E., Fiore M. F., Etchegaray A. (2008) “Quorum sensing detected by atomic force microscopy imaging of corrals surrounding multicellular arrangement of bacteria”. *Microscopy Research and Technique*, 71:112-118.
- [39] Dotto, M. E. R., Camargo Jr., S. S. (2007). “Study of force curves on paraffin deposits using atomic force microscopy”. *Energy & Fuels*, 21:1296-1300.
- [40] Bueno C. C., Amarante A. M., Oliveira G. S., Deda D. K., Teschke O., de Faria Franca E., Leite F. L. (2014) “Nanobiosensor for Diclofenac Detection Based on Chemically Modified AFM Probes” *IEEE Sens. J.*, 14(5):1467–1475.
- [41] Frisbie C. D., Rozsnyai L. F., Noy A., Wrighton M. S., Lieber C. M. “Functional group imaging by chemical force microscopy.” *Science* 265(5181):2071–4.
- [42] Noy A., Frisbie C. D., Rozsnyai L. F., Wrighton M. S., Lieber C. M. (1995) “Chemical Force Microscopy: Exploiting Chemically-Modified Tips To Quantify Adhesion, Friction, and Functional Group Distributions in Molecular Assemblies,” *J. Am. Chem. Soc.* 117(30):7943–7951.

- [43] Volcke C., Gandhiraman R. P., Gubala V., Doyle C., Fonder G., Thiry P. A., Cafolla A. A., James B., Williams D. E. (2010) "Plasma functionalization of AFM tips for measurement of chemical interactions.," *J. Colloid Interface Sci.*, 348(2):322–8.
- [44] Deda D. K., Pereira B. B. S., Bueno C. C., da Silva A. N., Ribeiro G. A., Amarante A. M., Franca E. F., Leite F. L. (2013) "The use of functionalized AFM tips as molecular sensors in the detection of pesticides." *Mater. Res.*, 16(3):683–687.
- [45] Garcia, P.S.; Moreau, A.L.D.; Magalhaes Ierich, J.C.; Araujo Vig, A.C.; Higa, A.M.; Oliveira, G.S.; Camargo Abdalla, F.; Hausen, M.; Leite, F.L. (2015) "A Nanobiosensor Based on 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Enzyme for Mesotrione Detection," *Sensors Journal, IEEE*, 15(4):2106-2113.
- [46] Prieto-Simón B., Saint C., Voelcker N. H. (2014) "Electrochemical biosensors featuring oriented antibody immobilization via electrografted and self-assembled hydrazide chemistry." *Anal. Chem.*, 86(3):1422–9.
- [47] Trilling A. K., Beekwilder J., Zuilhof H. (2013) "Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview." *Analyst*, 138(6):1619–27.
- [48] Graymore M., Stagnitti F., Allinson G., (2001) "Impacts of atrazine in aquatic ecosystems.," *Environ. Int.*, 26(7–8): 483–95.
- [49] Zhou Q., Xiao J., Wang W., Liu G., Shi Q., Wang J. "Determination of atrazine and simazine in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes as the adsorbents for preconcentration prior to high performance liquid chromatography with diode array detector." *Talanta*. 68(4):1309–15.
- [50] Dias L. C. F. (2002) "Caracterização imunoquímica dos anticorpos monoclonais que reconhecem proteínas do capsídeo viral do vírus da tristeza dos citrus do complexo Capão Bonito." *Tese, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia.*
- [51] Leite F. L., Bueno C. C., da Róz A. L., Ziemath E. C., Oliveira O. N. (2012) "Theoretical models for surface forces and adhesion and their measurement using atomic force microscopy." *Int. J. Mol. Sci.*, 13(10):12773–856.
- [52] Leite F. L., Herrmann, P. S. P. (2005) "Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: a review," *J. Adhes. Sci. Technol.* 19(3–5):365–405.
- [53] Miranda P., Xu L., Shen Y., Salmeron M. (1998) "Icelike Water Monolayer Adsorbed on Mica at Room Temperature," *Phys. Rev. Lett.*, 81(26):5876–5879.
- [54] Xu L., Lio A., Hu J., Ogletree D. F., Salmeron, M. (1998) "Wetting and Capillary Phenomena of Water on Mica," *J. Phys. Chem. B*, 102(3):540–548.
- [55] Florin E.-L., Rief M., Lehmann H., Ludwig M., Dornmair C., Moy V. T., Gaub H. E (1995) "Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope." *Biosens. Bioelectron.* 10(9–10):895–901.
- [56] Kaur J., Singh K. V., Schmid A. H., Varshney G. C., Suri C. R., Raje M. (2004) "Atomic force spectroscopy-based study of antibody pesticide interactions for characterization of immunosensor surface." *Biosens. Bioelectron.* 20(2):284–93.
- [57] Fiorini M., McKendry R., Cooper M. A., Rayment T., Abell C. (2001) "Chemical force microscopy with active enzymes." *Biophys. J.*, 80(5):2471–6.
- [58] Headrick J. E., Berrie C. L., (2004) "Alternative Method for Fabricating Chemically Functionalized AFM Tips: Silane Modification of HF-Treated Si 3 N 4 Probes." *Langmuir*, 20(10):4124–4131.
- [59] Koçum C., Ulgen S. D., Cubukçu E., Pişkin, E. (2006) "Atomic force microscopy tips (cantilevers) as molecular nucleic acid sensors.," *Ultramicroscopy*, 106(4–5):326–33.
- [60] Gourianova S., Willenbacher N., Kutschera, M. (2005) "Chemical force microscopy study of adhesive properties of polypropylene films: influence of surface polarity and medium." *Langmuir*, 21(12):5429–5438.
- [61] Han T., Williams J. M., Beebe T. P. (1995) "Chemical bonds studied with functionalized atomic force microscopy tips." *Anal. Chim. Acta*, 307(2–3):365–376.
- [62] Janissen R., Oberbarnscheidt L., Oesterhelt F. (2009) "Optimized straight forward procedure for covalent surface immobilization of different biomolecules for single molecule applications." *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 71(2): 200–7.
- [63] Moreau A. L. D., Janissen R., Santos C. A., Peroni L. A., Stach-Machado D. R., de Souza A. A., de Souza A. P., Cotta M. A. (2012) "Highly-sensitive and label-free indium phosphide biosensor for early phytopathogen diagnosis." *Biosens. Bioelectron.*, 36(1):62–8.
- [64] Boks N. P., Busscher H. J., van der Mei H. C., Norde W. (2008) "Bond-strengthening in staphylococcal adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces using atomic force microscopy." *Langmuir*, 24(22):12990.

- [65] Getfert S., Reimann P. (2012) "Hidden multiple bond effects in dynamic force spectroscopy." *Biophys. J.*, 102(5):1184–93.
- [66] Bergkvist M., Cady N. C. (2011) "Chemical functionalization and bioconjugation strategies for atomic force microscope cantilevers." *Methods Mol. Biol.*, 751:381–400.
- [67] Ros R., Schwesinger F., Anselmetti D., Kubon M., Schäfer R., Plückthun A., Tiefenauer L. (1998) "Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(13):7402–5.
- [68] Steffens C., Leite F. L., Bueno C. C., Manzoli A., Herrmann P. S. D. P. (2012) "Atomic force microscopy as a tool applied to nano/biosensors." *Sensors (Basel)*. 12(6):8278–300.
- [69] Commission of European Union (1980) "EEC Directive No. 80/778".
- [70] Pichetsurinthorn P., Vattipalli K., Prasad S. (2012) "Nanoporous impedemetric biosensor for detection of trace atrazine from water samples." *Biosens. Bioelectron.*, 32(1):155–62.
- [71] Alvarez M., Calle A., Tamayo J., Lechuga L. M., Abad, A. Montoya A. (2003) "Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT." *Biosensors and Bioelectronics*, 18(5–6):649–653.
- [72] Bache M., Taboryski R., Schmid S., Aamand J., Jakobsen M. H., (2011) "Investigations on antibody binding to a micro-cantilever coated with a BAM pesticide residue." *Nanoscale Res. Lett.* 6(1):386.
- [73] Raman Suri C., Kaur J., Gandhi S., Shekhawat G. S. "Label-free ultra-sensitive detection of atrazine based on nanomechanics." (2008) *Nanotechnology*, 19(23):235502.
- [74] Harris B. (1999) "Exploiting antibody-based technologies to manage environmental pollution" *Trends Biotechnol.* 17(7):290–296.
- [75] Příbyl J., Hepel M., Haláček J., Skládal P. (2003) "Development of piezoelectric immunosensors for competitive and direct determination of atrazine" *Sensors Actuators B Chem.*, 91(1–3):333–341.
- [76] Raman S. C., Raje M., Varshney G. C. (2002) "Immunosensors for pesticide analysis: antibody production and sensor development." *Crit. Rev. Biotechnol.*, 22(1):15–32.
- [77] Babacan S, Pivarnik P, Letcher S, et al. (2000) Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. *Biosensors & bioelectronics*, 15(11-12):615–21.