



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

ARIANY SOARES CÔCO

**NANOSENSOR BASEADO EM RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE
SUPERFÍCIE LOCALIZADA PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE
GLIFOSATO EM AMOSTRAS AMBIENTAIS**

VITÓRIA – ES

2021

ARIANY SOARES CÔCO

**NANOSENSOR BASEADO EM RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE
SUPERFÍCIE LOCALIZADA PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE
GLIFOSATO EM AMOSTRAS AMBIENTAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador(a): Prof. Dr. Jairo Pinto de Oliveira

Co-orientador(a): Prof. Dr. Adilson Ribeiro Prado

VITÓRIA – ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

C667n Côco, Ariany Soares, 1993-
Nanosensor baseado em ressonância plasmônica de superfície localizada para detecção rápida de glifosato em amostras ambientais / Ariany Soares Côco. - 2021.
61 f. : il.

Orientador: Jairo Pinto de Oliveira.
Coorientador: Adilson Ribeiro Prado.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Nanopartículas. 2. Herbicidas. 3. Nanotecnologia. I. Oliveira, Jairo Pinto de. II. Prado, Adilson Ribeiro. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Ariany Soares Côco

“Nanosensor baseado em ressonância plasmônica de superfície localizada para detecção rápida de glifosato em amostras ambientais”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovado(a) em 20 de dezembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jairo Pinto de Oliveira – Orientador

Documento assinado digitalmente



ADILSON RIBEIRO PRADO

Data: 27/01/2022 22:04:10-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Adilson Ribeiro Prado – Coorientador

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães – Examinador Interno

Documento assinado digitalmente



PAULO WAGNER PEREIRA ANTUNES

Data: 28/01/2022 08:47:34-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. Paulo Wagner Pereira Antunes – Examinador Externo

**Vitória/ES
2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
JAIRO PINTO DE OLIVEIRA - SIAPE 3831306
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 18/02/2022 às 16:13

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/363580?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
MARCO CESAR CUNEGUNDES GUIMARAES - SIAPE 2622289
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 18/02/2022 às 16:23

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/363618?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir que tudo acontecesse no tempo certo da minha vida e por me proporcionar ânimo para nunca desistir dos desafios.

Aos meus amados pais, Francisco e Lúcia, que foram os maiores incentivadores e que doaram anos de trabalho para que um dia eu tivesse a oportunidade de estudar.

A meu esposo e companheiro de laboratório Gabriel, que se comprometeu em ser meu parceiro de vida e nos estudos, me incentivando e apoiando minhas decisões.

Ao professor Jairo P. de Oliveira pela orientação, por ter me dado a oportunidade de integrar ao grupo de pesquisa, por toda paciência e por compartilhar grandes ensinamentos, um excelente exemplo de profissional.

Ao professor Adilson Ribeiro Prado pela co-orientação, paciência, auxílio com as análises experimentais e ensinamentos compartilhados.

Aos amigos de laboratório por todos os momentos compartilhados de descontração e em especial Clarice, Thaís e Wanderson, que sempre estiveram dispostos a ajudar com os experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia da UFES pela oportunidade de realizar o curso de mestrado e a todos os servidores e professores em especial aos professores Marco Cunegundes Guimarães, Juliana Coitinho e Lucas Rezende, que brilhantemente contribuíram para minha formação.

Aos laboratórios parceiros que colaboraram com a realização deste projeto: LUCCAR (UFES), LABPETRO (UFES), NBT (UFES), Laboratório de Química (IFES-Serra) e Laboratório de Fisiologia Molecular do Exercício Físico (UFES).

A empresa Bioengen Consultoria, Engenharia e Planejamento Ambiental e a FAPES, pelo apoio ao projeto e pela concessão de recursos financeiros para o custeio desta pesquisa.

RESUMO

Os agrotóxicos estão entre os principais produtos químicos mais agressivos ao meio ambiente devido à persistência no solo e em ambientes aquáticos, aos efeitos a longo prazo nos organismos vivos, além da mobilidade entre regiões, em grande maioria destruindo ecossistemas e atingindo áreas adjacentes à produção agrícola. O glifosato [N-(fosfonometil) glicina] é um herbicida não seletivo de amplo espectro e é mundialmente conhecido e comercializado. No entanto, sua aplicação massiva e fora de controle na agricultura tem levado a preocupações ambientais e relacionadas a saúde, visto que nos últimos anos surgiram diversos estudos demonstrando a contaminação na água, solo e alimentos. Portanto, é de grande importância o desenvolvimento de métodos capazes de detecção simples e de baixo custo que possam evidenciar diferentes limites permitidos por órgãos regulamentadores. Neste trabalho, a nanotecnologia foi aplicada para a fabricação de um biossensor baseado em nanopartículas de ouro a partir do fenômeno de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR). As nanopartículas acopladas a um anticorpo anti-glifosato do tipo IgY (AuNp-Ac) foram utilizadas como elemento de reconhecimento de glifosato. O sensor desenvolvido apresentou eficácia na detecção de glifosato com faixa linear de $0,009 \text{ ug.L}^{-1}$ a 10.000 ug.L^{-1} . A resposta do biossensor foi robusta e precisa, apresentando resultados que abrangem a faixa de interesse segundo a ingestão diária aceitável de $0,5 \text{ mg/kg}$, viabilizando uma alternativa promissora para detecção em tempo real de pesticidas.

Palavras-chave: Nanopartículas de ouro, herbicida, nanotecnologia, biossensor, anticorpo.

ABSTRACT

Pesticides are among the main chemical products that are most aggressive to the environment due to their persistence in soil and aquatic environments, their long-term effects on living organisms, in addition to mobility between regions, mostly destroying ecosystems and reaching areas adjacent to agricultural production . Glyphosate [N-(phosphonomethyl) glycine] is a non-selective, broad-spectrum herbicide and is known and marketed worldwide. However, its massive and out-of-control application in agriculture has led to environmental and health-related concerns, as in recent years there have been several studies demonstrating contamination in water, soil and food. Therefore, it is of great importance to develop methods capable of simple and low-cost detection that can show different limits allowed by regulatory bodies. In this work, nanotechnology was applied to the fabrication of a biosensor based on gold nanoparticles from the phenomenon of localized surface plasmon resonance (LSPR). Nanoparticles coupled to an IgY-type anti-glyphosate antibody (AuNp-Ac) were used as a glyphosate recognition element. The developed sensor was successful for detecting glyphosate in a wide linear range from 0,009 $\mu\text{g.L}^{-1}$ to 10.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. The biosensor response was stable and reproducible, with results that cover the range of interest according to the acceptable daily intake of 0.5 mg/kg, providing a promising alternative for real-time detection of pesticides.

Keywords: Gold nanoparticles, herbicide, nanotechnology, biosensor, antibody.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação da fórmula estrutural química do herbicida glifosato. Fonte: PubChem (2021). 19
- Figura 2** – Representação do caminho do chiquimato para a síntese de aminoácidos aromáticos. 19
- Figura 3** – Funcionalização de nanopartículas de ouro. A modificação da superfície das AuNp's confere diferentes funcionalidades. 22
- Figura 4** – Representação ilustrativa do fenômeno de ressonância plasmônica de superfície localizada e o efeito sob as nanopartículas metálicas. Adaptado de Oliveira [66]. 23
- Figura 5** – Esquema apresentando a funcionalização de superfície de AuNp's com cisteamina onde o grupo funcional -SH (tiol) se liga à superfície das AuNp's, formando uma forte ligação entre ouro e enxofre (Au-S), adaptado de TU, et al. 2019. 25
- Figura 6** – Esquema ilustrativo do mecanismo físico-químico de detecção para glifosato através de AuNp's funcionalizadas com cisteamina, adaptado de TU, et al. 2019. 26
- Figura 7** – Representação ilustrativa de imunoglobulina, com duas cadeias leves na porção Fab e as duas cadeias pesadas na porção Fc. 27
- Figura 8** – Esquema apresentando o método de síntese de nanopartículas de ouro com citrato de sódio, mediante o uso de balão com fundo redondo sobreposto a uma manta de aquecimento sob agitação constante a 500 rpm. 31
- Figura 9** – AuNp's caracterizadas por UV/vis. O pico de absorção em 523,13 nm (A); Padrões de DRX do substrato das AuNp's (B); Imagens obtidas através de em escala de 50 e 100 nm (C); Distribuição gaussiana de diâmetro de 500 partículas obtidas por imagens feitas de microscopia eletrônica de transmissão (D). 36
- Figura 10** – Espectroscopia por absorvância UV/vis de AuNp's funcionalizadas com diferentes concentrações de cisteamina (A). Espectroscopia por absorvância UV-Vis das concentrações distintas de cisteamina (B); Curva Padrão da cisteamina (C). ... 39
- Figura 11** – Resultados que indicam a melhor condição experimental da funcionalização de AuNp's com o ligante cisteamina. Na imagem estão as análises de FTIR (A), Espectroscopia Raman (B), DLS (C) e Potencial Zeta (D). 40
- Figura 12** – Espectroscopia UV-Vis das AuNp's submetidas a concentrações distintas de NaCl para avaliação de estabilidade (A). Grau de floculação com base no aumento da área entre 600 e 800 nm em diferentes concentrações de sal (B). 42
- Figura 13** – Espectro de absorção UV-Vis das AuNp's-Cis em faixa de pH de 4 a 10 (A). Grau de floculação com base no aumento da área entre 600 e 800 nm em diferentes concentrações de pH (B). 42

Figura 14 – Espectroscopia UV-Vis da solução sobrenadante de AuNp's conjugadas com BSA (A). Curva padrão da concentração de BSA (B).....	43
Figura 15 – Deslocamento do pico plasmônico das AuNp's na presença de anticorpo anti-glifosato.....	44
Figura 16 – Comparação dos espectros Raman de AuNp's e anticorpo anti-glifosato IgY (A). Espectros de FTIR de AuNp's e anticorpo anti-glifosato (B).	45
Figura 17 – Ensaio de floculação “gold number” das AuNp's conjugadas com anticorpo anti-glifosato.	46
Figura 18 – Espectroscopia UV-Vis de AuNp's conjugadas a anticorpo anti-glifosato em escala de pH 9 (A), pH 8 (B) e pH 7 (C). Grau de floculação das concentrações do conjugado em diferentes ambientes de pH (D, E, F).....	47
Figura 19 – Espectrofotometria UV-Vis da conjugação das AuNp's-Cis com glifosato (A). Gráfico de linearidade de detecção (B). Em altas concentrações do herbicida, o espectro apresenta deslocamento em torno de 650 nm, indicando agregação de AuNp's.....	49
Figura 20 – Espectro Uv-Vis das concentrações de glifosato adicionadas às AuNp's conjugadas a anticorpo anti-glifosato (A). Gráficos de linearidade de detecção (B-C).	50
Figura 21 – Espectroscopia UV-Vis de AuNp's-Ac conjugadas a solução de amostra orgânica de café acrescida de glifosato.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais herbicidas comercializados no Brasil segundo o IBAMA e Ministério da Agricultura (2019).....	17
Tabela 2 – Comparação de diferentes métodos de detecção de glifosato.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac	Anticorpos
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
Anti-Gli	Anticorpo anti-glifosato
Au	Ouro
AuNP's	Nanopartículas de ouro
AuNP's-Ac	Nanopartículas de ouro conjugadas com anticorpo
AuNP's-Cis	Nanopartículas de ouro funcionalizadas com cisteamina
Au-S	Ligação entre ouro e enxofre
BSA	Albumina sérica bovina
CG	Cromatografia em fase gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COOH	Grupo funcional carboxil
DLS	Dynamic Light Scattering
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DRX	Difratometria de raios-x
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPSPS	5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase
Fab	Fração de ligação ao antígeno
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FCC	Face cúbica centrada
Fig.	Figura
FT	Transformada de Fourier
Gli	Glifosato
HAuCl₄	Ácido tetracloroáurico
HCl	Ácido clorídrico
HNO₃	Ácido nítrico
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobulina Y

LSPR	Ressonância plasmônica de Superfície Localizada, do inglês <i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>
M	Molar
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
mg	Miligramas
Min	Minutos
MIP	Polímero com impressão molecular, do inglês <i>molecularly imprinted polymer</i>
ml	Mililitros
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na₃C₆H₅O₇	Citrato trissódico
ng	Nanogramas
-NH₂	Grupo funcional amino
nm	Nanômetros
NP's	Nanopartículas
°C	Grau Celsius
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PO₃H₂	Grupo funcional fosfonil
r² –	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
-SH	Tiol
Tab.	Tabela
UV-Vis	Ultravioleta – Visível
µg	Microgramas
µL	Microlitros
β	Beta
θ	Teta
λ	Lambda
2,4-D	Ácido diclorofenoxiacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 IMPACTOS AMBIENTAIS E A SAÚDE OCASIONADOS POR EXPOSIÇÃO A GLIFOSATO	17
2.2 PROPRIEDADES E MECANISMO DE AÇÃO DO GLIFOSATO	18
2.3 NANOTECNOLOGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGROTÓXICOS	20
2.4 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE LOCALIZADA (LSPR)	23
2.5 FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOMATERIAIS COM COMPOSTOS LIGANTES	24
2.6 CONJUGAÇÃO DE NANOMATERIAIS COM ANTICORPOS	26
2.7 DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ATRAVÉS DE ANTICORPOS ...	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 GERAL	29
3.2 ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAL	30
4.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNP's)	30
4.3 CARACTERIZAÇÃO DE AuNP's	31
4.3.1 Espectroscopia UV-Visível	31
4.3.2 Difração de Raio-X (DRX)	31
4.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	32
4.3.4 Espectroscopia Raman	32
4.3.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	32
4.3.6 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (PZ)	32
4.4 FUNCIONALIZAÇÃO DE AuNP's	33
4.4.1 AuNP's funcionalizadas com Cisteamina (AuNP's-Cis)	33
4.4.2 AuNP's conjugadas com Anticorpo Anti-Glifosato	33
4.5 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE DAS AuNP's-Cis	34
4.6 ENSAIO DE "GOLD NUMBER" DAS AuNP's-Ac	34
4.7 ENSAIOS DE DETECÇÃO DO GLIFOSATO COM LSPR	35

4.7.1. Estratégia de detecção por meio de AuNp's funcionalizadas com cisteamina	35
4.7.2 Estratégia de detecção por meio de AuNp's conjugadas com anticorpo Anti-Glifosato	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	36
5.2 FUNCIONALIZAÇÃO E CONJUGAÇÃO DE AuNP's	37
5.2.1 Funcionalização de AuNp's com Cisteamina	37
5.2.2 Análise de estabilidade das AuNp's-cis	41
5.2.3 Conjugação de AuNp's com Anticorpos	43
5.2.4 Análise de floculação das AuNp's-Ac.....	45
5.3 DETECÇÃO DE GLIFOSATO POR LSPR.....	48
5.3.1 Detecção de glifosato por meio de AuNp's funcionalizadas com cisteamina	48
5.3.2 Detecção de glifosato por meio de AuNp's conjugadas com Anticorpos	49
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

O glifosato é um herbicida de amplo espectro e pós-emergente utilizado para controle de ervas daninhas na agricultura [1] que consiste em um aminoácido glicina e uma fração fosfometil e está presente em formulações comerciais como princípio ativo, a exemplo o *Roundup*®, popular na comunidade agrícola [2].

Atualmente, o uso indiscriminado do herbicida na agricultura fortaleceu a comercialização em ampla escala e apesar de existirem estudos que demonstram os impactos no meio ambiente e na saúde, o glifosato continua a ser amplamente utilizado, visto que alternativas comerciais ecológicas são limitadas [3]. De acordo com Benbrook [4] a participação global no uso do glifosato corresponde a 72%, apenas banido pela União Européia, Áustria e Alemanha. No Brasil, a Anvisa decidiu manter o uso do glifosato, mas com restrições e com o comprometimento dos agricultores para o implemento de tecnologias que reduzam em 50% a dispersão do defensivo para fora da lavoura. No estado do Espírito Santo, grande parte dos herbicidas comercializados possuem o glifosato na formulação, chegando a registrar um número anual de 35,119268 toneladas de glifosato comercializado nos municípios pertencentes a Bacia do Rio Jucu, dentre eles Domingos Martins, Marechal Floriano, Viana, Guarapari e Vila Velha, sendo que a maior parte é comercializada no município de Marechal Floriano com um total de 21,591018 toneladas apenas no ano de 2016 [5].

O monitoramento de glifosato e seus resíduos é essencial para a preservação do meio ambiente e da saúde dos seres humanos. As técnicas atuais demandam altos custos de equipamentos, técnicas laboriosas e longos prazos de análise, como é o exemplo da análise por Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa (CG), além do tradicional teste de ELISA que depende de leitura automatizada dos dados em microplacas e teste imunocromatográfico que possui baixa sensibilidade, dependendo fortemente da concentração da amostra a ser analisada.

Neste sentido, os biossensores baseados em ressonância plasmônica de superfície (SPR) tornaram-se uma ferramenta central para caracterizar e quantificar interações biomoleculares [6] e possuem a capacidade de medir o índice de refração ou absorção

óptica para obtenção do sinal de interação biomolecular [7]. O uso de LSPR tem se mostrado bastante promissor, sendo considerada uma técnica de baixo custo e com manuseio de baixa complexidade. Nos últimos anos, houve um crescente número de publicações envolvendo o desenvolvimento de sensores a partir de LSPR com diferentes estratégias para detecção de pesticidas [9-13]. Existem técnicas que utilizam a adição de mais de um tipo de metal [14],[15] ou a associação com ensaios colorimétricos [16].

Ante o exposto, o presente trabalho consiste no desenvolvimento de um sensor baseado em LSPR para detecção de glifosato em amostras de alimentos. Para esta finalidade, foram desenvolvidas duas técnicas diferentes de detecção. A primeira é fundamentada na funcionalização com o composto químico cisteamina que possui um grupo tiol (-SH) que apresenta afinidade por AuNp's e forma uma forte ligação entre ouro e enxofre (Au-S), expondo o grupo amino (-NH₂) na superfície das AuNp's. A segunda técnica apoia-se na utilização de um anticorpo específico para glifosato conjugado à superfície da nanopartícula de ouro e essa reação imunoquímica é convertida em fenômeno mensurável através de sinal óptico, aumentando a sensibilidade do teste. Ambas as técnicas ocasionaram mudanças no espectro de absorvância devido a alteração na superfície plasmônica do nanomaterial, efetivando a detecção do analito em baixas concentrações.

A estratégias de detecção expostas neste trabalho poderão ser uma alternativa eficiente não só para o herbicida glifosato, mas também para outros tipos de herbicidas e pesticidas a partir da adaptação do sensor com anticorpos específicos para um determinado analito.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPACTOS AMBIENTAIS E A SAÚDE OCASIONADOS POR EXPOSIÇÃO A GLIFOSATO

O glifosato foi introduzido no mercado em 1974 através da empresa Monsanto Company como o principal composto do herbicida *Roundup*® e desde então, corresponde ao primeiro lugar no ranking dos agrotóxicos mais comercializados mundialmente. É comercialmente disponibilizado em diversas formas de sal como isopropilamina, amônio, potássio e triênio. Na tab. 1 em sequência estão listados os cinco principais herbicidas utilizados no Brasil, dentre eles o herbicida glifosato, apresentando o topo da taxa de adesão na agricultura.

Herbicida	Tipo de Cultura
Glifosato	Grãos, algodão, cana-de-açúcar, cereais, frutas, fumo, eucalipto e seringueiras
2,4-D	Grãos, cereais, cana-de-açúcar e eucalipto
Atrazina	Grãos, cana-de-açúcar, abacaxi e seringueiras
Paraquate	Grãos, algodão, cana-de-açúcar, frutas e batata
Diurom	Algodão, grãos, cana-de-açúcar, eucalipto e frutas
S-Metacloro	Algodão, cana-de-açúcar, grãos, mandioca e eucalipto

Tabela 1 – Principais herbicidas comercializados no Brasil segundo o IBAMA e Ministério da Agricultura (2019).

Os herbicidas de amplo espectro à base de glifosato são os mais utilizados mundialmente no controle de ervas daninhas pós-emergentes visto que culturas geneticamente modificadas resistentes ao glifosato foram introduzidas na agricultura, como a soja e o milho. O uso prolongado desse herbicida bem como seus resíduos provenientes de degradação afeta de forma negativa o meio ambiente e a saúde [17-19].

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação [20], o glifosato e seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), são preocupantes quanto a toxicidade, devido ao acúmulo de resíduos tóxicos na cadeia

alimentar, sendo este um motivo de questionamento e que apresenta divergências de opiniões, dado que é um herbicida que afeta diretamente as plantas. Contudo, assim que misturado com diferentes surfactantes, seu uso em excesso contribui para que os resíduos desses surfactantes e produtos de degradação entrem em contato por via respiratória e através da pele, potencializando o risco do desenvolvimento de doenças. Diversos estudos descreveram os prejuízos causados pela exposição direta como doenças neurológicas [21], relacionadas ao câncer [22], doenças relacionadas a distúrbios hormonais [23],[24], alterações endócrinas [25], mudanças genotóxicas [26],[27] e citotóxicas em linhagem de células epiteliais de mucosas [27].

Os impactos referentes a saúde estão relacionados à frequência de exposição, quantidade e duração do glifosato presente nos alimentos e na água. No artigo de Richard et al. [23], foi relatado a influência do *Roundup*[®], composto que contém glifosato incluso na formulação, nos níveis séricos da enzima aromatase, alterando o desenvolvimento de moléculas de estrogênio. Neste caso, conseqüentemente, o glifosato pode ser considerado tóxico para as células da placenta de mulheres grávidas, decorrentes de trabalho agrícola durante o período de gestação levantando questionamentos a respeito dos efeitos estrogênicos sinérgicos.

O uso excessivo e não gerenciado não só causa prejuízo a saúde [28], como também contribui para a contaminação de sistemas aquáticos e do solo por meio dos processos de escoamento, lixiviação e bioacumulação de resíduos [18],[19].

2.2 PROPRIEDADES E MECANISMO DE AÇÃO DO GLIFOSATO

O glifosato (N-[fosfonometil] glicina) é um ácido fosfônico resultante do acoplamento oxidativo do grupo metil do ácido metilfosfônico com o grupo amino presente na glicina. Sua estrutura química pode ser analisada na Fig. 1.

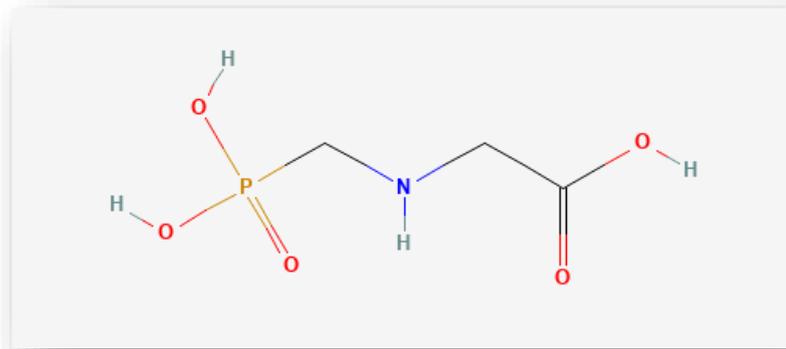


Figura 1 – Representação da fórmula estrutural química do herbicida glifosato. Fonte: PubChem (2021).¹

Os herbicidas à base de glifosato são amplamente utilizados para o controle de ervas daninhas e tem como mecanismo de ação inibir a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) que pertence exclusivamente às plantas, adentrando as plantas por meio das folhas, raízes, tronco e pequenos brotos e está diretamente envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos na via do ácido chiquímico para o metabolismo das plantas, promovendo alterações fisiológicas e consequente morte celular [28]. A Fig. 2 está representado o caminho do chiquimato para realizar a síntese de aminoácidos aromáticos nas plantas.

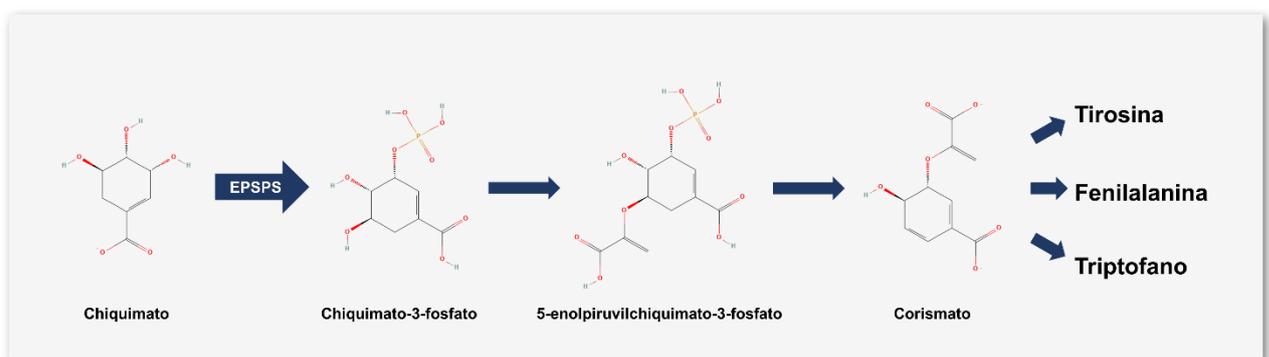


Figura 2 – Representação do caminho do chiquimato para a síntese de aminoácidos aromáticos.

A absorção de glifosato pode ocorrer através do contato direto do herbicida com a pele, devido às circunstâncias de trabalho ou através de exposição indireta que inclui

¹ PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>. Acesso em: 28/08/21.

consumo de água e alimentos contendo resíduos do herbicida [30]. A exposição aos resíduos químicos de glifosato prevalece em áreas agrícolas, fazendas e áreas de processamento, corroborando para que trabalhadores rurais sejam expostos por inalação, contato dérmico e contato ocular direto com o herbicida [31].

Em consequência da constante pulverização deste herbicida, ambientes terrestres e aquáticos são diretamente afetados, desencadeando o desequilíbrio ecológico [32]. Apesar da participação eficaz no controle de ervas daninhas nos campos de cultura, diversos estudos evidenciam a relação do uso indiscriminado do glifosato com efeitos nocivos exclusivos ao alvo [33],[34],[35],[36]. Dentre os percalços estão a persistência do glifosato no meio ambiente, efeitos negativos à vegetação adjacente e interações com os nutrientes da cultura [37].

Estudos envolvendo o glifosato e seus resíduos apresentam associação do herbicida a contaminação ambiental em larga escala e surgimento de efeitos tóxicos a saúde devido a frequente exposição, além de persistir no ambiente por até 180 dias, resultando em uma potente fonte de contaminação para o solo e água subterrânea [32],[38]. No processo de metabolismo, o herbicida é separado em ácido aminometilfosfônico (AMPA) e em dióxido de carbono, reduzindo assim o pH da água [39] e em contato com a água, é convertido em AMPA, alterando as propriedades físico-químicas e conseqüentemente o período de meia vida que varia entre 76 a 240 dias, persistindo no meio ambiente [38].

A efetividade da absorção do glifosato e seus metabólitos pelo solo e por meio da lixiviação dos compostos na água contribuem para o risco de contaminação em grande escala, principalmente em grandes culturas e plantações próximas a rios e lagos, prejudicando fortemente os animais marinhos e a síntese de carotenoides e clorofila nas plantas, além de reduzir o crescimento das plantas e regredir suas funções fotoquímicas [18].

2.3 NANOTECNOLOGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGROTÓXICOS

Os nanomateriais são considerados atraentes para a aplicabilidade em biossensores devido a propriedades elétricas, químicas e físicas que os tornam materiais únicos no tamanho, forma de condutividade, magnetismo, resistência mecânica, absorção e

emissão de luz [40]. A utilização de nanomateriais tem se mostrado uma vantajosa promessa para detecção devido as propriedades de transdução de sinal como mediador do fluxo de corrente ou como meio de reconhecimento para induzir a detecção do analito [41].

A nanotecnologia auxilia a detecção e remediação de agrotóxicos. Os nanomateriais tem sido amplamente utilizado para detecção de pequenas substâncias devido a sensibilidade nos resultados. Os principais tipos de nanomateriais incluem as nanopartículas, nanobastões e nanocompostos, geralmente funcionalizados com material biológico [42].

A construção de sensores baseados em nanotecnologia viabiliza a detecção de baixas concentrações de agrotóxicos. Nanopartículas produzidas a partir de um único precursor de metal e com mais de um tipo de metal são as principais categorias utilizadas e a presença de diferentes propriedades químicas e físicas desses compostos auxiliam na diretriz de detecção de determinado alvo [43].

Entre os nanomateriais mais utilizados para detecção de agentes tóxicos e que possuem função de degradação e remoção estão as nanopartículas de ouro, prata, nanotubos de carbono, entre outros. A modificação química da superfície das nanopartículas tem atraído atenção devido ao evidente interesse dos pesquisadores no controle da dispersão e agregação das nanopartículas, além das melhorias relacionadas a sensibilidade de sensoriamento. A Fig. 3 representa as possíveis ligações de diferentes compostos ao nanomaterial.

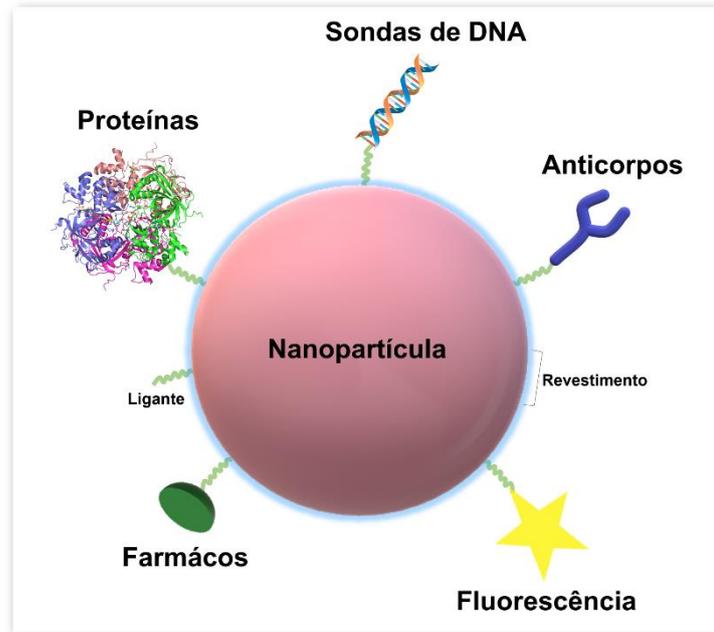


Figura 3 – Funcionalização de nanopartículas de ouro. A modificação da superfície das AuNp's confere diferentes funcionalidades.

As primeiras AuNp's foram sintetizadas a partir do trabalho de Michael Faraday que observou as diferentes propriedades do ouro coloidal [44]. À medida que o ouro passa por reação química de redução para o estado neutro, ele apresenta propriedades ópticas e elétricas ótimas, boa relação de superfície e volume, além de biocompatibilidade com diversos materiais e inúmeras possibilidades de modificação de superfície.

As nanopartículas possuem vasto campo de aplicação referente a detecção de agrotóxicos por meio de diferentes compostos funcionalizados, seja em água, solo ou quando aplicado a frutas e vegetais por meio de técnicas de extração. Elas são atraentes para a construção de sensores devido a diversidade de propriedades física, química e elétrica que permitem moldar de acordo com o objetivo de detecção do analito. As propriedades das AuNp's dependem principalmente da forma, estrutura, revestimento da superfície, carga e estrutura cristalina, quanto menor o tamanho das nanopartículas, maior a área superficial [43],[45]. Os átomos agrupados na superfície da nanopartícula corroboram para o aumento da energia superficial, permitindo o desenvolvimento de adsorção e adesão, capacidade hidrofílica e capilaridade. Portanto, à medida que as AuNp's se tornam menores, a capacidade de conjugação com outros átomos e moléculas se torna maior [46].

2.4 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE LOCALIZADA (LSPR)

As nanopartículas plasmônicas produzidas através de precursores metálicos são comumente aplicadas no desenvolvimento de biosensores devido a facilidade de transdução de sinal óptico e por viabilizar o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície localizada. A LSPR permite que as nanopartículas possam absorver ou espalhar luz intensa em determinados comprimentos de onda, deixando explícito os picos plasmônicos no espectro.

A LSPR é definida como a oscilação coletiva de elétrons de condução de nanopartículas metálicas em resposta ao campo elétrico da luz incidente, conseqüentemente gerando uma absorção de luz eficiente e um campo elétrico aprimorado próximo da nanopartícula, também chamado de aprimoramento de campo próximo [47] além de permitir maior sensibilidade ao índice de refração local ao redor das nanopartículas de ouro e é utilizada para detectar a absorção molecular na superfície de um material [48] e fornecer um meio de melhora significativa na interação da matéria leve [47]. A Fig. 4 representa este processo.

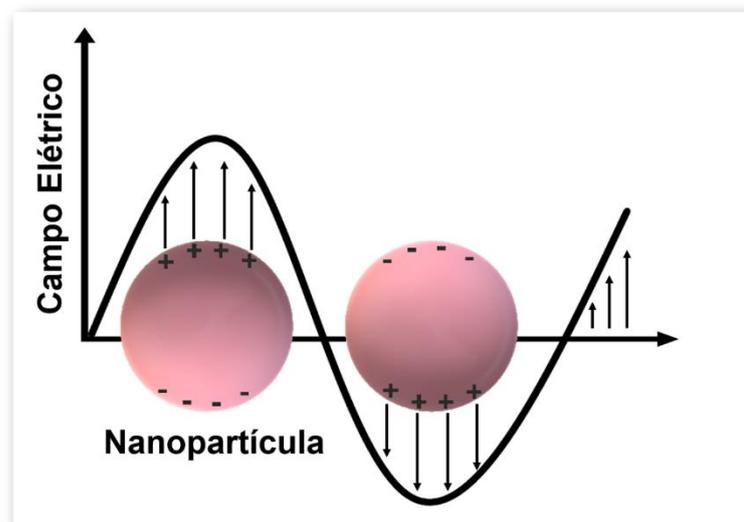


Figura 4 – Representação ilustrativa do fenômeno de ressonância plasmônica de superfície localizada e o efeito sob as nanopartículas metálicas. Adaptado de Oliveira [66].

A partir desse fenômeno é possível projetar um sensor com base em LSPR. A ligação de uma molécula biológica à superfície das nanopartículas metálicas altera o índice de refração local e por sua vez, induz uma alteração no comprimento de onda da

LSPR [49]. O baixo campo eletromagnético produzido na superfície de uma partícula de metal após a incidência de um feixe de luz provoca a excitação dos elétrons em um comprimento de onda específico, resultando na medição das interações moleculares confinadas na superfície do transdutor [50].

Um sensor de LSPR necessita de uma fonte de luz, uma superfície para que haja transdução de sinal como partículas metálicas e ouro, uma biomolécula, um sistema detector e de fluxo. Após a imobilização das biomoléculas na superfície das nanopartículas, a interação induz a mudanças conformacionais no índice de refração e a detecção é concluída a partir das medidas de absorção [49],[50].

As principais vantagens relacionadas aos sensores de ressonância plasmônica incluem sensibilidade, portabilidade, especificidade, e detecção em tempo real [51],[52].

2.5 FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOMATERIAIS COM COMPOSTOS LIGANTES

As AuNp's recebem destaque devido às suas propriedades optoeletrônicas e ajustáveis que são ocasionadas principalmente pela ressonância plasmônica de superfície. Para impedir que aconteça aglomeração entre elas, as AuNp's são estabilizadas por ligantes durante a síntese. Um exemplo de estabilização durante a síntese são as AuNp's estabilizadas por citrato, com as moléculas ligadas à superfície do ouro por meio de pontes de dicarboxilato e monocarboxilato, fornecendo assim repulsão eletrostática entre elas. No entanto, a energia de ligação entre ouro e carboxilato é considerada fraca e a superfície de citrato pode ser rompida por meio de alterações iônicas ou de pH, devolvendo instabilidade para a solução coloidal. Com o intuito de aprimorar a estabilidade dos nanomateriais e permitir que sejam aplicados na construção de sensores, a camada de citrato pode ser substituída por ligantes que possuem o grupo tiol em sua estrutura, permitindo assim que seja formado ligações covalentes entre ouro e enxofre, conferindo funcionalização específica [53].

De modo a exemplificar a ligação estabilizante, o composto químico cisteamina possui grupos tiol e amina que permitem uma forte ligação com o ouro das AuNp's. Devido a estas propriedades, as nanopartículas de ouro funcionalizadas com cisteamina podem ser incorporadas a diferentes estudos de detecção, incluindo ensaios colorimétricos e

eletroquímicos. A Fig. 5 representa esse processo de ligação das AuNp's com o composto cisteamina.

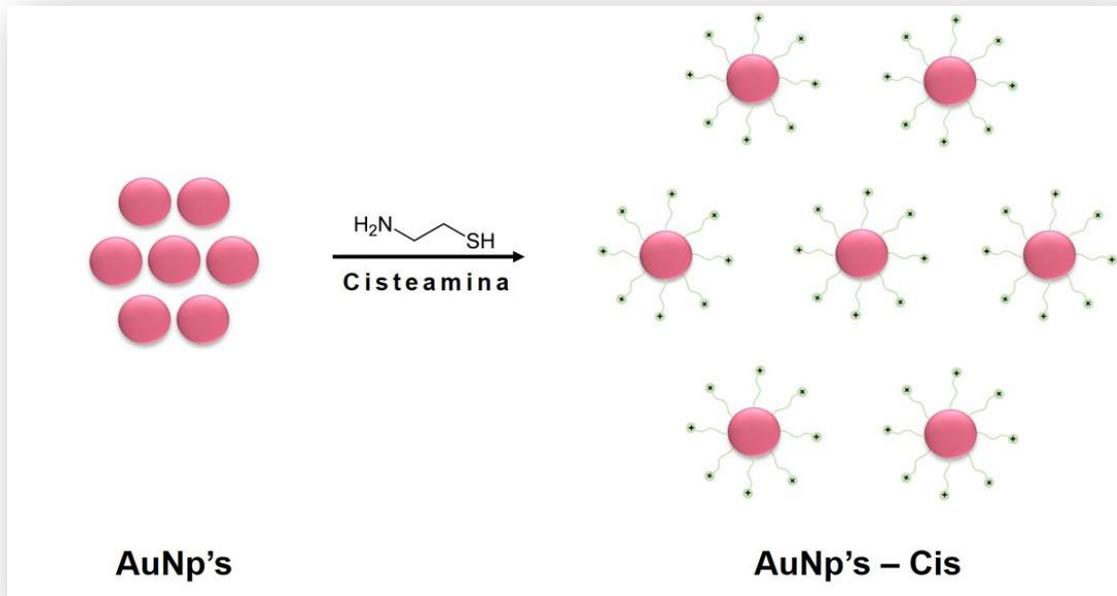


Figura 5 – Esquema apresentando a funcionalização de superfície de AuNp's com cisteamina onde o grupo funcional -SH (tiol) se liga à superfície das AuNp's, formando uma forte ligação entre ouro e enxofre (Au-S), adaptado de TU, et al. 2019.

A mudança na superfície das AuNp's por cisteamina consolida a interação efetiva com o glifosato devido a afinidade das AuNp's com o grupo funcional tiol da cisteamina, ocasionando uma mudança de coloração das partículas de vermelho para roxo. A forte ligação entre ouro e enxofre tem a capacidade de expor os grupos amina na superfície das nanopartículas funcionalizadas como mostrado na Fig. 6. Desse modo, o composto é carregado positivamente, resultando em alta estabilidade contra eventos de agregação.

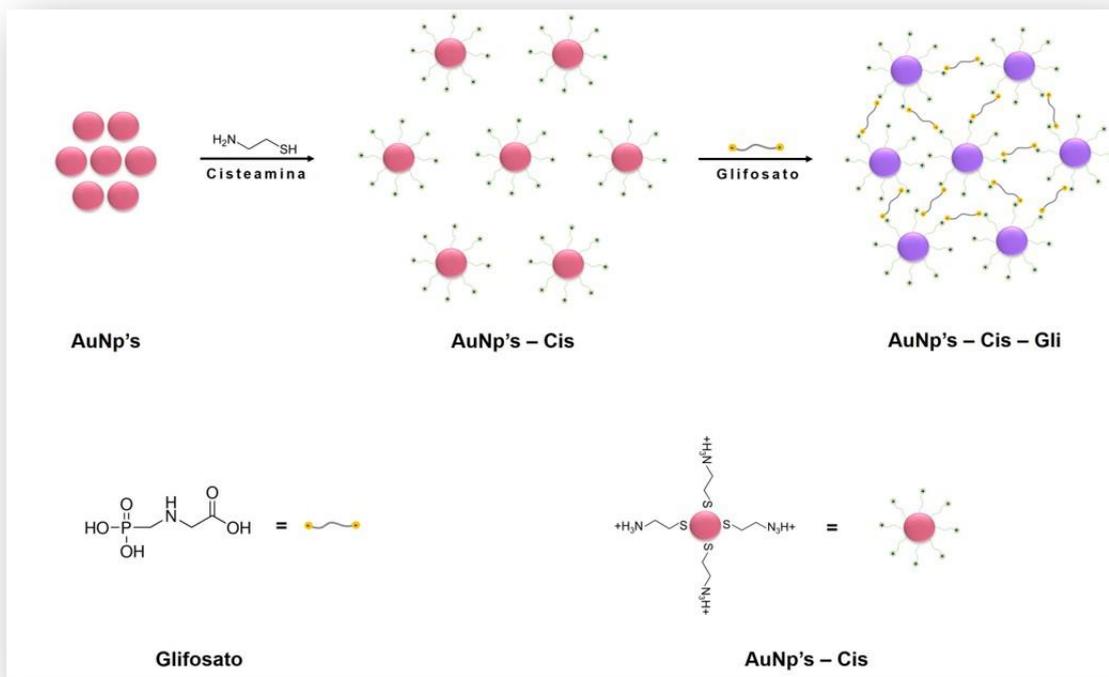


Figura 6 – Esquema ilustrativo do mecanismo físico-químico de detecção para glifosato através de AuNp's funcionalizadas com cisteamina, adaptado de TU, et al. 2019.

2.6 CONJUGAÇÃO DE NANOMATERIAIS COM ANTICORPOS

As imunoglobulinas (Ig) ou anticorpos (Ac) são glicoproteínas produzidas a partir das células brancas do sangue, os linfócitos B e estão presentes nos fluidos extracelulares e plasma. Participam efetivamente do sistema imunológico interagindo com organismos invasores chamados de antígeno de uma forma altamente específica.

A imunoglobulina G (IgG) é considerada a proteína mais abundante no soro humano compreendendo cerca de 10 a 20%, além de muito utilizada para bioconjugação de nanomateriais devido a à sua forma estrutural na qual compreende duas cadeias leves e duas cadeias pesadas ligadas entre si por ligações dissulfeto entre as cadeias, formando uma estrutura em “Y”. Cada cadeia pesada possui uma região de domínio variável N-terminal (VH) e três domínios constantes (CH1, CH2 e CH3) e cada cadeia leve possui um domínio variável N-terminal (VL) e um domínio constante (CL). Para formar a região Fab (Fragmento de ligação ao antígeno), a cadeia leve se associa aos domínios VH e CH1 e dessa forma, as regiões V interagem entre si para formar a região de ligação ao antígeno. A porção do anticorpo formada pela região dobradiça

e os domínios CH2 e CH3 é denominada região de fragmento cristalino ou “Fc” [54]. A Fig. 7 representa as localizações de cada região.

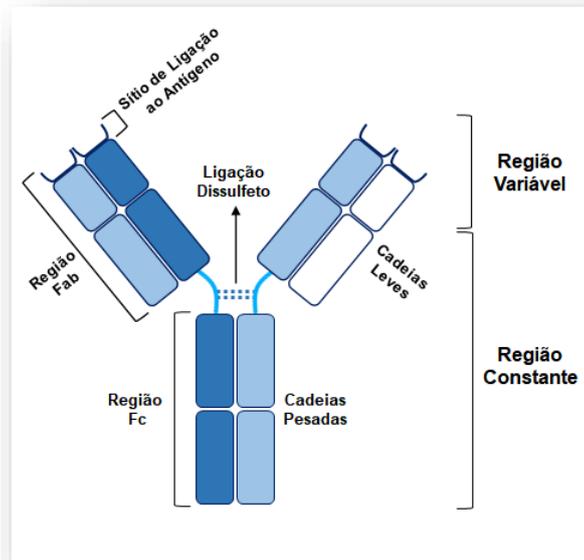


Figura 7 – Representação ilustrativa de imunoglobulina, com duas cadeias leves na porção Fab e as duas cadeias pesadas na porção Fc.

Os anticorpos possuem a capacidade de adotar quatro orientações distintas para conjugação na superfície das nanopartículas. Uma condição estável para a ligação é através do fragmento Fc do anticorpo, permitindo assim que as regiões Fab fiquem livres para receber os antígenos e a região Fc permaneça fixa na superfície metálica.

2.7 DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSORES ATRAVÉS DE ANTICORPOS

A modificação da superfície dos nanomateriais auxiliam no reforço da sensibilidade e especificidade do biossensor, sendo possível realizar a detecção de diversos tipos de agrotóxicos como pesticidas e herbicidas.

O biossensor é um dispositivo que analisa e fornece informações a respeito da composição química do analito através de um componente biológico como enzima, proteína, anticorpo, entre outros. A partir do momento em que o sinal é gerado após o contato do componente biológico com o analito, o transdutor de sinal permite que o analito seja detectado. Biossensores produzidos por meio de nanomateriais são

capazes de oferecer diversas vantagens como rápida e aprimorada resposta, alta sensibilidade e seletividade. Contudo, é importante considerar o material de suporte ligado aos nanomateriais a fim de existir uma forte ligação à matriz, visto que, quando fracamente ligados, os nanomateriais se misturam com o analito e o processo de recuperação de amostra pode ser laborioso [43].

Com base na interação entre antígeno e anticorpo proposto em imunoenaios, os biossensores são produzidos por meio da imobilização de um determinado anticorpo em um agente condutor, que potencializa a detecção de sinal quando ocorre a ligação do anticorpo com o analito.

Os sensores podem ainda ser separados de acordo com os mecanismos de detecção dos elementos que realizam a transdução de sinal, podendo ser divididos em sensores eletroquímicos e ópticos. Um biossensor baseado em imunorreação possui uma unidade que reconhece o analito a ser identificado e outra unidade que realiza a potencialização do sinal transdutor. Com a introdução do anticorpo na instrumentação do teste, os resultados esperados são máxima sensibilidade e especificidade.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolver um nanossensor baseado em LSPR para detecção de glifosato em amostras ambientais.

3.2 ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar a distribuição, estrutura, morfologia e estabilidade de nanopartículas sintetizadas pelo método de redução com citrato de sódio;
- Funcionalizar os elementos de reconhecimento Cisteamina e Anticorpo anti-glifosato na superfície metálica dos nanomateriais;
- Avaliar a estabilidade dos nanobioconjugados em relação a diferentes faixas de pH e concentrações de eletrólitos;
- Avaliar a sensibilidade e os limites de detecção de glifosato com o sistema proposto baseado em LSPR;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica como o Ácido tetracloroáurico, HAuCl_4 (Sigma Aldrich, 520918), Citrato trissódico, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (Sigma Aldrich, S4641), 11-Ácido Mercaptoundecanóico (Sigma Aldrich, 450561), N-hidroxisuccinamida (NHS) (Sigma Aldrich, 130672), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Sigma Aldrich, E6383), proteína sérica bovina (BSA) liofilizada (Sigma Aldrich, 05470), cisteamina (Sigma Aldrich, 30070), ácido clorídrico (HCl) (NEON, 37%), hidróxido de sódio 97% (EMS, 97%), cloreto de sódio (NaCl) Alphatec, 99,5%) e ácido nítrico (HNO_3) (Sigma Aldrich, 84375), chicken glyphosate polyclonal antibody (My Biosource, Cod MBS5306191), glyphosate ELISA kit 96 testes (Thomas Scientific, Cod C859T38-96T), Kit Fitas Glifosato - (Eurofins, Cod 500095) e Glifosato (Sigma Aldrich, 2045054). Os materiais e vidrarias foram devidamente lavados 3 vezes com solução de água régia ($1\text{HNO}_3:3\text{HCl}$) e após esta etapa, os materiais foram submetidos a duas fases de enxágue sendo a primeira em água destilada com 3 repetições e a segunda em água ultrapura com 3 repetições. Todos os ensaios e preparos de soluções foram preparados com água ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q da Millipore 18 Ω .

4.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNp's)

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas a partir de ácido cloroáurico. Foi utilizada uma solução de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 1% para redução. Em um balão volumétrico de fundo redondo foi colocado 15 mL da solução de HAuCl_4 a $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ sob agitação constante em atmosfera inerte com argônio até atingir a temperatura de 100°C. Após atingir a temperatura, foi adicionado 1 mL de citrato de sódio 1% e cronometrado 15 minutos de reação. O coloide foi resfriado em banho de gelo e depois centrifugado a 14.000 rpm durante 20 minutos em centrífuga marca *Eppendorff* modelo 5418. Após esta etapa o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em água ultrapura com 3 repetições para remoção das substâncias que não reagiram (Fig. 8).

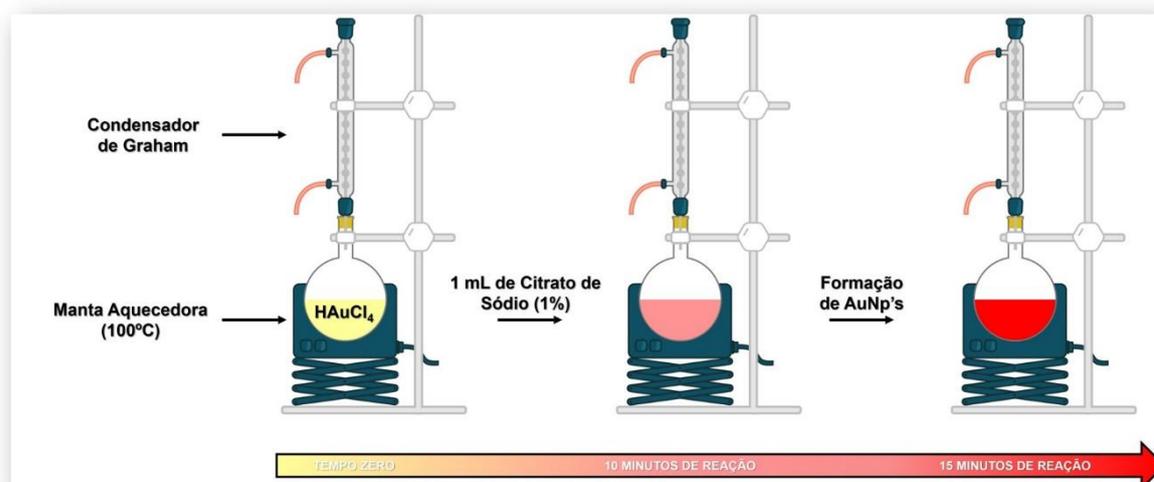


Figura 8 – Esquema apresentando o método de síntese de nanopartículas de ouro com citrato de sódio, mediante o uso de balão com fundo redondo sobrepuesto a uma manta de aquecimento sob agitação constante a 500 rpm.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DE AuNp's

4.3.1 Espectroscopia UV-Visível

Para o alcance de dados da absorbância do material preparado por síntese, foi utilizado o equipamento de espectrofotometria Uv-Vis Ocean Optics USB 2000. A leitura de absorção foi em escala de 200 a 800 nm e a água ultrapura foi utilizada para fazer a leitura em branco. O resultado pôde ser revelado através de gráficos de absorbância por comprimento de onda (nm) obtidos por meio do software GraphPad Prism 9.1.0.

4.3.2 Difração de Raio-X (DRX)

Para a análise de difração de raios-x, o ouro sintetizado foi concentrado por meio de centrifugação a 14.000 rpm durante 20 minutos e colocadas em placa de vidro para secagem durante 12 horas. Após este período, o material foi colocado em lâmina de vidro e foi realizada a varredura na região 2θ , de 30° a 90° , sendo 0.01° por minuto, com uma constante de tempo de 2 segundos utilizando o difratômetro da Phillips PW 1710 (Cu ka radiação). O resultado foi revelado através de gráfico obtido por meio do software GraphPad Prism 9.1.0.

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para análise morfológica das AuNP's foi utilizado Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM-1400, JEOL, USA inc. operado a 120kv. As amostras foram preparadas a partir de uma pequena gota de suspensão coloidal depositada sobre uma grade de cobre. A grade foi previamente preparada com Formvar (Resina termoplástica contendo álcool polivinílico) e posteriormente foi deixada para secar em temperatura ambiente (25°C) durante 24 horas. A distribuição de tamanho das partículas foi realizada utilizando o software Image J em uma análise com 500 nanopartículas.

4.3.4 Espectroscopia Raman

As amostras de AuNP's e AuNP's funcionalizadas com cisteamina foram colocadas em placa de acrílico e analisadas no equipamento portátil de espectroscopia Raman (Metrohm Instant Raman Analyzer - MIRA DS) com faixa espectral de 400 a 2300 cm^{-1} e com comprimento de onda do laser a 785 nm. O resultado foi revelado através de gráfico obtido por meio do software GraphPad Prism 9.1.0.

4.3.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As medidas de Espectroscopia no infravermelho foram realizadas no equipamento Agilent Cary 630 FTIR para determinar os grupamentos químicos. A amostra foi preparada a partir da desidratação de AuNP's como descrito no processo de DRX. O resultado foi revelado através de gráfico obtido por meio do software GraphPad Prism 9.1.0.

4.3.6 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (PZ)

As medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz e Potencial Zeta foram realizadas por meio do equipamento Litesizer 500 utilizando 2 ml de amostra coloidal e os valores finais de DLS foram expressos em μm , posteriormente convertidas em nm e as medidas de PZ foram expressas em mV. Os resultados foram revelados através de gráficos obtidos por meio do software GraphPad Prism 9.1.0.

4.4 FUNCIONALIZAÇÃO DE AuNp's

4.4.1 AuNp's funcionalizadas com Cisteamina (AuNp's-Cis)

Os efeitos da concentração de cisteamina foram avaliados na otimização da funcionalização das AuNp's-Cis. A concentração de cisteamina que não causou mudança de cor distinta e nem mudança espectral relacionada a aglomeração quando funcionalizadas às AuNp's, foi escolhida para mais testes.

As reações foram realizadas em eppendorf de 1,5 mL com 200uL de AuNp's com 200uL de cisteamina em concentrações de 0.01, 0.03, 0.07, 0.1, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 mg.L⁻¹ e em sequência as amostras foram colocadas em temperatura ambiente (25°C) durante 15 minutos. A eficiência da funcionalização foi comprovada por monitoramento de espectrofotometria UV-VIS, Espectroscopia Raman, DLS, PZ e FTIR. Os resultados foram revelados através de gráficos obtidos por meio do software GraphPad Prism 9.1.0.

4.4.2 AuNp's conjugadas com Anticorpo Anti-Glifosato

A albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como amostra controle, prática esta comum em ensaios de acoplamento covalente com biomoléculas. A solução foi preparada livre de anticorpos de ligação a fim de avaliar as interações não covalentes com as nanopartículas de ouro.

A concentração ideal de proteína BSA utilizada para estabilizar o volume de solução de ouro foi confirmada através de ensaio de "gold number" [55], dado este importante para identificação da concentração de anticorpos, posteriormente utilizado para a bioconjugação.

A modificação da superfície das AuNp's foi executada em ambiente de fluxo laminar com anticorpo policlonal anti-glifosato do tipo IgY diluído em PBS a uma concentração de 100 ug/mL. A conjugação de anticorpos na superfície metálica das AuNp's foi realizada por método direto através da atração eletrostática entre o nanomaterial e os anticorpos IgY. As AuNp's foram submetidas a lavagem e ressuspensão em água ultrapura com modificação do pH para 8, visto que os anticorpos do tipo IgY possuem ponto isoelétrico equivalente a 8. Após esta etapa, 6,25 ug/ml do anticorpo anti-

glifosato foram adicionados a 65 μL de AuNp's e mantido sob agitação orbital de 150 rpm à 25°C durante 15 minutos.

A eficiência da conjugação foi confirmada por monitoramento de espectrofotometria UV-VIS, Espectroscopia Raman e FTIR. Os resultados foram revelados através de gráficos obtidos por meio do software GraphPad Prism 9.1.0.

4.5 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE DAS AuNp's-Cis

Para obter resultados relacionados a estabilidade das nanopartículas em condições ótimas, o parâmetro de floculação foi utilizado com o intuito de avaliar o nível de agregação entre as nanopartículas. Em um eppendorf foi colocado uma alíquota de 2 ml de AuNp's funcionalizadas com cisteamina e depois centrifugada a 14.000 rpm durante 20 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso com diferentes soluções de cloreto de sódio (NaCl) e pH. As concentrações de NaCl foram estabelecidas conforme concentrações de 0.009, 0.001, 0.003, 0.007, 0.015, 0.031, 0.065, 0.125, 0.25, 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e as soluções de pH foram de 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, sendo todos os pH's ajustados utilizando HCl e NaOH 0.1 M. Como controle, foi utilizada a solução de AuNp's conjugadas com cisteamina ressuspenso em água ultrapura. A leitura de absorção foi feita em escala de 200 a 800 nm por espectrofotometria Uv-Vis em escala de absorbância de 200 a 800 nm. Os resultados foram revelados através de gráfico obtido por meio do software GraphPad Prism 9.1.0.

4.6 ENSAIO DE "GOLD NUMBER" DAS AuNp's-Ac

A formação do conjugado de nanopartícula e anticorpo depende do estado de pH do meio e exige uma concentração mínima de anticorpos capaz de estabilizar as nanopartículas. O ensaio de "gold number" permite avaliar a estabilidade de um volume pré-estabelecido de uma solução de AuNp's. Para realizar o ensaio, foi adicionado 35 μL de água ultrapura em 18 poços de microplaca de ELISA e as AuNp's foram distribuídas de acordo com diferentes valores de pH, sendo eles pH 7, pH 8 e pH 9. Uma alíquota contendo 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de solução de anticorpos anti-glifosato foi adicionado ao primeiro poço da placa e a partir dessa concentração foi realizada diluição nos cinco poços subsequentes e deixado sob agitação a 150 rpm durante 10

minutos. Uma alíquota de 10 uL de NaCl foi adicionado em cada poço e a mudança de cor foi avaliada por espectrometria UV-Vis e os resultados foram revelados através de gráfico obtido por meio do software GraphPad Prism 9.1.0.

4.7 ENSAIOS DE DETECÇÃO DO GLIFOSATO COM LSPR

4.7.1. Estratégia de detecção por meio de AuNp's funcionalizadas com cisteamina

A interação do glifosato com as AuNp's-Cis foi confirmada através de LSPR, utilizando o equipamento Uv-Vis em escala de absorbância de 400 a 800 nm. A água ultra pura foi utilizada para fazer a leitura em branco. Os resultados foram plotados em gráficos no programa GraphPad Prism 9.1.0 e a detecção foi observada através da comparação dos espectros de absorção das amostras e o deslocamento do pico plasmônico.

4.7.2 Estratégia de detecção por meio de AuNp's conjugadas com anticorpo Anti-Glifosato

A detecção de glifosato por meio de conjugação das AuNp's com o anticorpo foi confirmada por LSPR através dos equipamentos de Uv-Vis e Espectroscopia Raman. Para estabelecer o limite de detecção das amostras em diferentes níveis de concentração, as concentrações analisadas variaram de 0,004 ug.L⁻¹ a 10.000 ug.L⁻¹, compreendendo um vasto intervalo de análise. Os resultados foram plotados em gráficos no programa GraphPad Prism 9.1.0 e os limites de detecção foram observados através da comparação dos espectros de absorção e o deslocamento do pico plasmônico. Para avaliar a presença do herbicida em sistema real, uma amostra orgânica de café devidamente certificada com selo, foi submetida a fase simples de extração e os sedimentos foram diluídos em 100 uL de água ultra pura. Uma alíquota de 0,5 uL do herbicida foi adicionado à 30 uL da amostra orgânica e posteriormente adicionada à 70 uL de solução de AuNp's-Ac. Ainda na detecção, um teste simples para seletividade foi efetuado por espectroscopia UV-Vis e uma alíquota de 0,5 uL do herbicida ácido diclorofenoxiacético foi introduzido à solução de bioconjugado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

Na etapa de síntese, as AuNp's passaram por mecanismo de redução de ouro com citrato por meio do método de Turkevick com modificações [56]. O processo de reação foi consolidado quando o citrato de sódio entrou em contato com o ácido cloroáurico que instantaneamente foi carregado negativamente por íons citrato que permaneceram adsorvidos na superfície das AuNp's, proporcionando estabilidade por repulsão eletrostática. Após essa etapa, as AuNp's foram caracterizadas por UV-vis, DRX, e MET para avaliação morfológica. Os resultados do processo de caracterização estão representados na Figura 9.

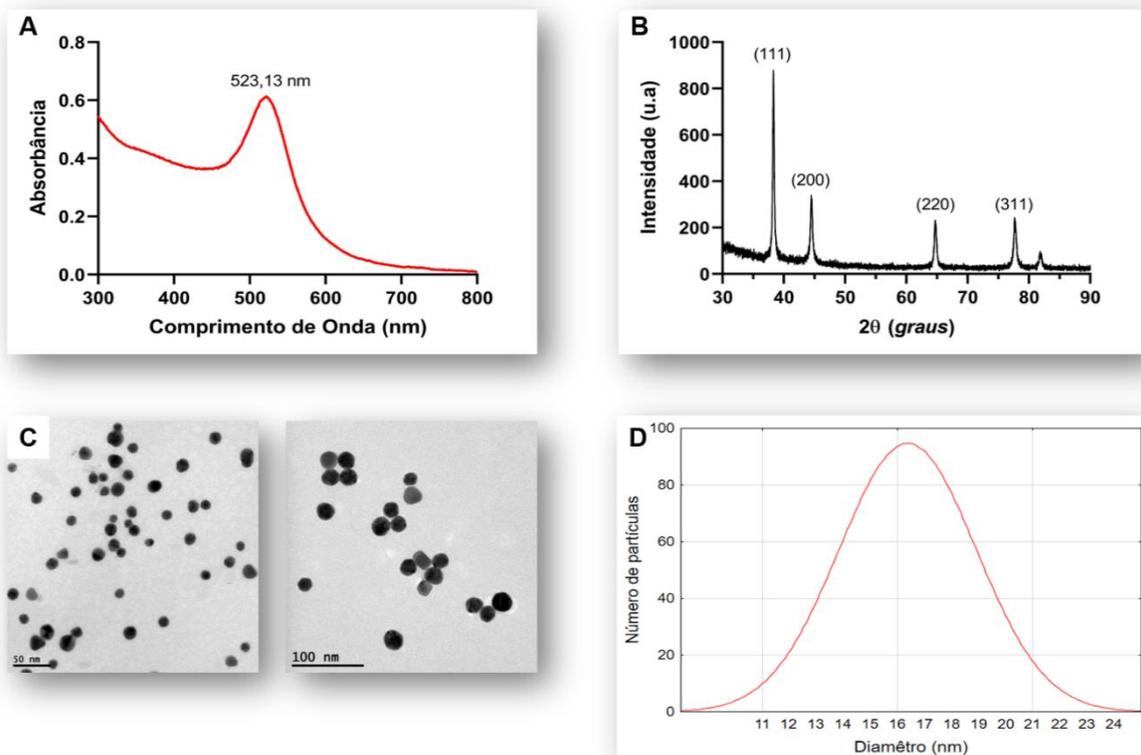


Figura 9 – AuNp's caracterizadas por UV/vis. O pico de absorção em 523,13 nm (A); Padrões de DRX do substrato das AuNp's (B); Imagens obtidas através de em escala de 50 e 100 nm (C); Distribuição gaussiana de diâmetro de 500 partículas obtidas por imagens feitas de microscopia eletrônica de transmissão (D).

As propriedades ópticas das AuNp's foram reveladas por espectroscopia UV-vis com um pico plasmônico de 523,13 nm, apresentando assertividade na banda de absorção, visto que AuNp's sintetizadas sob redução de citrato de sódio apresentaram faixa espectral entre 520-540 nm. A largura estreita de banda a meia altura indica a

existência de monodispersão e uniformidade, devido a formação de núcleos e ao aumento da estabilidade proporcionados por íons citrato [57]. O resultado pode ser identificado na Fig. 9 A.

Na Fig. 9 B estão representados os dados obtidos por DRX, confirmando a natureza cristalina das AuNp's. Foram observados a 2θ graus quatro picos de difração que possuem uma rede FCC (cúbica de face centrada), sendo os valores encontrados de 38.31° , 44.45° , 64.64° e 77.73° , correspondente aos picos (111), (200), (220), e (311) de reflexão do ouro metálico cristalino, respectivamente. O explícito pico de difração (111) sugere que este padrão de face centrada é a orientação predominante de AuNp's devido a intensidade de reflexão do composto metálico.

A análise morfológica indicando a uniformidade, tamanho aproximado e crescimento das partículas foi realizada através de MET e os resultados podem ser identificados na Fig. 9 C. A contagem de AuNp's foi realizada através das imagens obtidas por análise MET com um total de 500 partículas por amostra. A característica esférica pode ser observada na imagem C. Em D, as nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio mostraram-se monodispersas com diâmetro aproximado de 17 nm $CV < 10\%$ de acordo com a contagem das nanopartículas por meio de microscopia eletrônica de transmissão.

5.2 FUNCIONALIZAÇÃO E CONJUGAÇÃO DE AuNp's

Para a obtenção de resultados eficientes quanto ao sensor, os elementos de reconhecimento foram ligados na superfície do nanomaterial de forma que a interação conjugado-analito fosse monitorada por um mecanismo de transdução de sinal, a LSPR [58]. Nos tópicos a seguir estão descritos os resultados da funcionalização das nanopartículas com cisteamina e os resultados da conjugação por adsorção física dos anticorpos na superfície do nanomaterial.

5.2.1 Funcionalização de AuNp's com Cisteamina

Para a funcionalização, ou seja, a modificação da superfície das AuNp's e, portanto, para que as AuNp's sejam aptas a detectar a presença de glifosato, a superfície do metal foi modificada por cisteamina, um composto químico aminotiol com um grupo funcional tiol (-SH) que se ligou facilmente à superfície das AuNp's através de ligações

covalentes entre os átomos de ouro e enxofre [59] expondo o grupo funcional amino (-NH₂) na superfície da nanopartícula. Após a funcionalização, as AuNp's-Cis foram positivamente carregadas, resultando em alta estabilidade contra agregação devido a força de repulsão eletrostática. O resultado da funcionalização pode ser observado na Fig. 10. O deslocamento plasmônico ocasionado pelo fenômeno de LSPR foi constatado devido a perturbação da ressonância dos plasmons de superfície, ocasionando, portanto, mudanças no índice de refração.

Para avaliar a funcionalização das AuNp's com diferentes concentrações do composto químico cisteamina, a adição de vários níveis de concentrações desse ligante foi monitorada por espectrofotometria UV-Vis. Os resultados obtidos podem ser observados na Fig. 10 A. O gráfico de espectroscopia infere que quando a concentração de cisteamina mudou de concentração equivalente a 0.1 para 0.3 mg.L⁻¹, houve notável deslocamento do pico plasmônico para a região de 700nm, havendo uma mudança visível na coloração das nanopartículas. A cor rosa inicial das AuNp's tornou-se mais escura e ligeiramente violeta. Quando a concentração aumentou para 0.6 mg.L⁻¹ e assim em sequência para as concentrações superiores, os espectros demonstraram deslocamento do pico plasmônico na região de 700nm e a coloração visual das nanopartículas foi substituída por coloração em roxo com tendência ao azul, comprovando que houve agregação das nanopartículas.

Os espectros de absorvância de UV-Vis das AuNp's em concentrações crescentes de cisteamina mudaram significativamente, resultando em diminuição da intensidade em 530 nm, ocasionando o aparecimento de um pico em torno de 700 nm. As concentrações acima desses valores revelam agregação de AuNp's uma vez que maiores quantidades de cisteamina ligadas à superfície da nanopartícula diminui a estabilidade e causa mudança de cor visível [60]. Estudos relatam que o grupo tiol presente na cisteamina é considerado o composto responsável pela interação eletrostática e ligação de enxofre entre a cisteamina e as AuNp's e exerce influência sob a agregação, resultando no deslocamento ressonante, alterando a cor de vermelho para roxo [61],[62]. Dessa forma, as AuNp's funcionalizadas com cisteamina com concentração de 0,1 mg.L⁻¹ foram escolhidas para uso ao longo dos experimentos.

A concentração ideal de cisteamina para ser funcionalizada na superfície das AuNp's foi verificada por espectroscopia na região aproximada de 200 nm, conforme descrito na Fig. 10 B. A amostra de cisteamina que indicou um valor de concentração a 2,4 mg.L⁻¹ foi utilizado como parâmetro para os demais testes de detecção, visto que o pico de absorção em torno de 200 nm permitiu a funcionalização sem alterar o pico plasmônico de absorção quando funcionalizado às AuNp's. A linearidade da reação foi descrita em curva padrão, podendo ser observada na Fig. 10 C com resultado de r² equivalente a 0.9962, indicando boa linearidade.

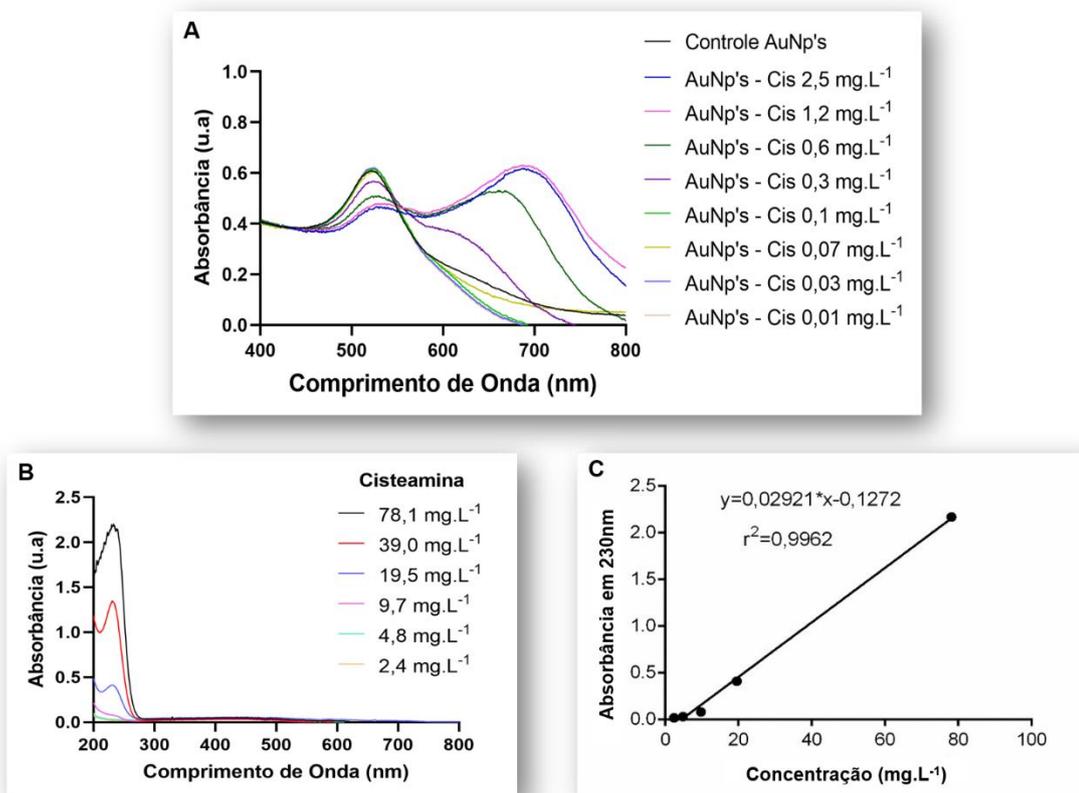


Figura 10 – Espectroscopia por absorvância UV/vis de AuNp's funcionalizadas com diferentes concentrações de cisteamina (A). Espectroscopia por absorvância UV-Vis das concentrações distintas de cisteamina (B); Curva Padrão da cisteamina (C).

Para a confirmação da funcionalização das AuNp's com o ligante, a melhor condição experimental foi caracterizada por FTIR, espectroscopia Raman, potencial Zeta e espalhamento dinâmico de luz e os resultados estão apresentados na Fig. 11.

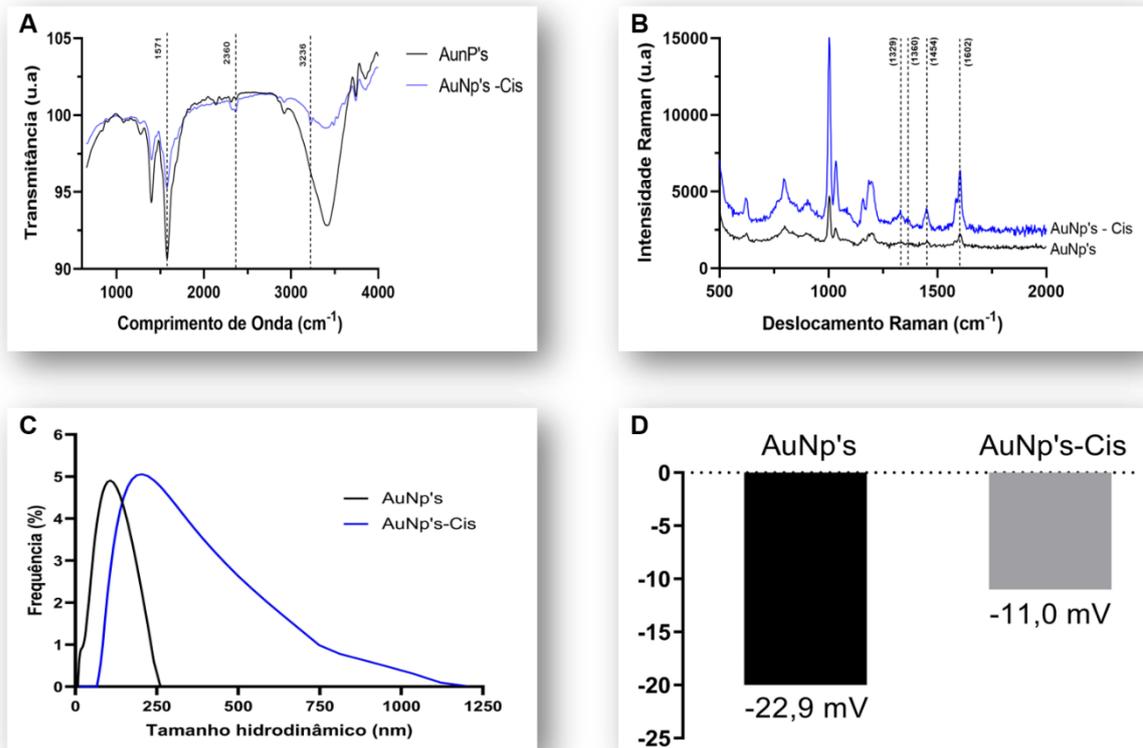


Figura 11 – Resultados que indicam a melhor condição experimental da funcionalização de AuNp's com o ligante cisteamina. Na imagem estão as análises de FTIR (A), Espectroscopia Raman (B), DLS (C) e Potencial Zeta (D).

Os resultados das análises de FTIR estão indicados na Fig. 11 A. O pico de vibração de alongamento do grupo -SH pertencente a cisteamina apareceu por volta de 2360 cm⁻¹. O pico agudo e amplo em 1571 cm⁻¹ pode ser claramente atribuído ao modo de alongamento do grupo -NH₂ na superfície das AuNp's. O pico de absorção em 3236 cm⁻¹ é devido à vibração de alongamento -NH₂ referente a cisteamina. Os picos de absorção entre 3000 e 3400 cm⁻¹ estão relacionados ao alongamento de vibração O-H, devido a presença de água das amostras em estado líquido.

A atividade de ressonância plasmônica depende principalmente da morfologia, com tamanho e forma bem controlados, para atingir resultados satisfatórios na espectroscopia Raman. Para isso, as AuNp's foram analisadas sob condições ideais para obtenção de sinal óptico estável e aprimorado conforme Figura 11 B. Os picos característicos pertencentes a cisteamina apareceram em 1329 e 1454 cm⁻¹, indicando funcionalização apesar do pequeno pico de absorbância, o que pode ser explicado pela falta de cisteamina livre na solução. O comprimento de onda

relacionado à posição do grupo carboxílico 1360 cm^{-1} é referente à vibração de alongamento assimétrico das AuNp's.

Para avaliação da mudança na superfície das AuNp's após a adição do ligante, o tamanho hidrodinâmico do conjugado foi analisado por DLS. A análise por DLS identifica a distribuição do tamanho de pequenas partículas e moléculas em solução. O resultado está representado na Fig. 11 C que mostra a evidência no aumento do valor, da análise em relação aos valores encontrados em análise MET. Isso pode ser explicado devido aos íons carboxilatos que estão perceptíveis apenas na análise DLS e que influenciam nos valores de diâmetro.

O estudo da carga de superfície revela a estabilidade coloidal das partículas e se apresentam agregação. O potencial zeta é o resultado das interações de forças eletrostáticas e de repulsão que estão presentes na superfície das AuNp's e a carga é quantificada em mV [63]. Neste estudo, o valor encontrado do potencial zeta das nanopartículas foi de $-22,9\text{ mV}$ (Fig.11 D). A presença de cisteamina nas AuNp's contribuiu para a diminuição do potencial zeta a $-11,0\text{ mV}$, indicando a ocorrência efetiva de funcionalização, uma vez que a carga da cisteamina é positiva e corroborou com a diminuição da carga do conjugado.

5.2.2 Análise de estabilidade das AuNp's-cis

As AuNp's são utilizadas para aplicações biológicas e para apresentar bom estado de funcionalidade nesse meio, elas precisam apresentar estabilidade em ampla faixa de pH e em ampla faixa de sais. A estabilidade das AuNp's funcionalizadas precisa ser estudada, pois a maior parte dos ensaios de conjugação com biomoléculas requer a mudança pH do meio para atender o ponto isoelétrico (pI) da proteína ou pH de complexação da biomolécula de interesse [66]. Para essa análise, as AuNp's foram submetidas a testes com concentrações distintas de NaCl e pH. O resultado referente a avaliação das AuNp's em concentrações de NaCl estão presentes na Fig. 12. As amostras de AuNp's-Cis apresentaram formação de agregados nas concentrações de 0.031 , 0.065 , 0.125 , 0.25 , 0.5 e 1 M .

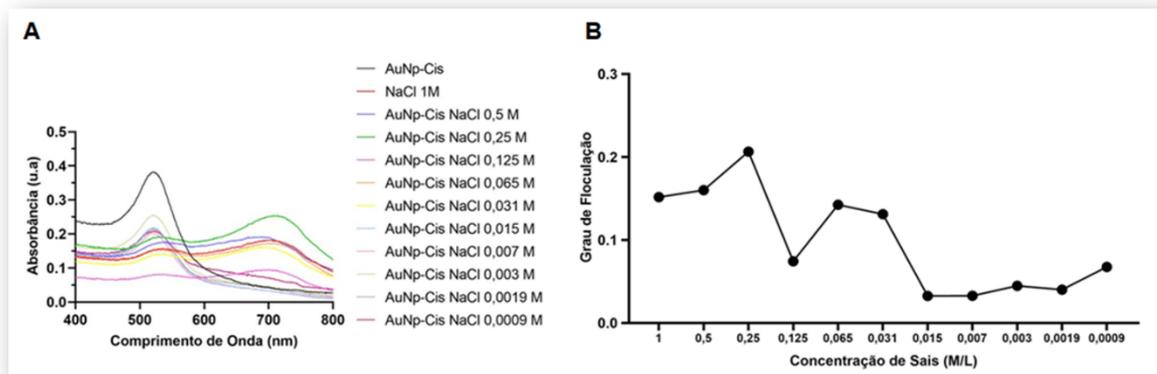


Figura 12 – Espectroscopia UV-Vis das AuNp's submetidas a concentrações distintas de NaCl para avaliação de estabilidade (A). Grau de floculação com base no aumento da área entre 600 e 800 nm em diferentes concentrações de sal (B).

No que se refere à estabilidade das AuNp's funcionalizadas na presença de diferentes valores de pH, as AuNp's-Cis se mantiveram estáveis nas condições de pH de 5 a 10 porém, com pequenas alterações no intervalo de 600 a 800 nm das bandas de absorção (Fig. 13).

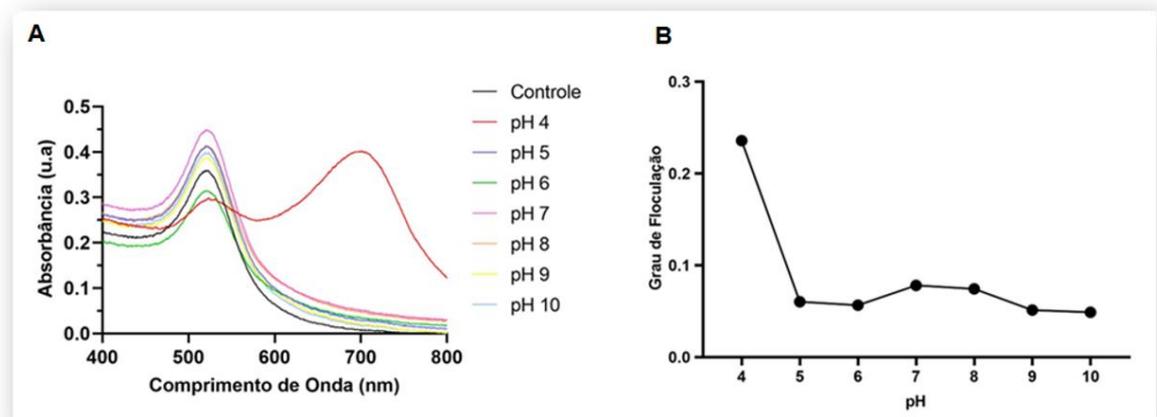


Figura 13 – Espectro de absorção UV-Vis das AuNp's-Cis em faixa de pH de 4 a 10 (A). Grau de floculação com base no aumento da área entre 600 e 800 nm em diferentes concentrações de pH (B).

Em pH 4 as AuNp's apresentaram formação de agregados conforme o pico plasmônico de absorção em torno de 700 nm indicando que as nanopartículas funcionalizadas com cisteamina quando estabelecidas mostraram-se incompatíveis com as outras AuNp's funcionalizadas em diferentes valores de pH. Esse acontecimento pode ser explicado devido aos compostos tiolados da cisteamina,

havendo estudos comprovados de que esse composto se mantém estável apenas em concentrações de pH acima de 4,5 [67].

5.2.3 Conjugação de AuNp's com Anticorpos

O processo químico da conjugação de AuNp's com os anticorpos anti-glifosato foi estabelecido por meio de interação eletrostática entre os compostos, que consiste na dissociação dos grupos iônicos ou na adsorção de íons na solução [64]. Para delinear a construção eficaz do sistema de detecção entre nanopartícula e anticorpo, a concentração mínima referente aos anticorpos para conjugação com as AuNp's foi determinada a partir da dosagem do sobrenadante decorrente da conjugação de AuNp's com proteína BSA, utilizada como amostra modelo. A curva padrão foi estabelecida através de BSA e apresentou um R^2 equivalente a 0,9914, indicando boa linearidade. Os dados gráficos das leituras do sobrenadante realizadas no espectrofotômetro UV-Vis estão apresentados na Fig. 14. A partir destes dados extraídos de BSA, a concentração de $0,25 \text{ g.mL}^{-1}$ foi escolhida para os demais experimentos com anticorpo anti-glifosato.

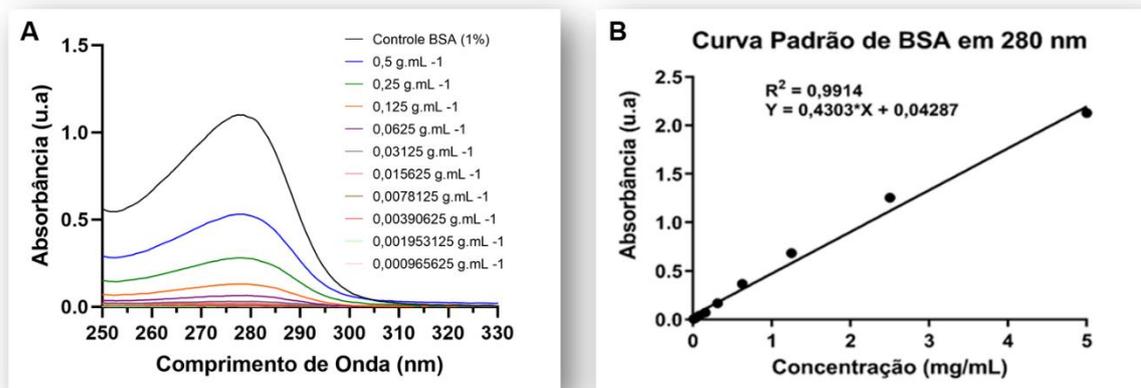


Figura 14 – Espectroscopia UV-Vis da solução sobrenadante de AuNp's conjugadas com BSA (A). Curva padrão da concentração de BSA (B).

Para avaliar a interação entre as AuNp's e os anticorpos anti-glifosato, a espectroscopia UV-Vis foi utilizada para verificar a ressonância plasmônica na presença dos anticorpos. Para isso, as nanopartículas livres de funcionalização foram utilizadas como controle. O espectro pode ser observado na Fig. 15. O deslocamento do pico plasmônico equivalente a 4 nm das AuNp's conjugadas ao anticorpo anti-

glifosato, indicou a confirmação da conjugação. O mecanismo de adsorção física de anticorpos na superfície dos nanomateriais resultou na alteração da ressonância plasmônica, vez que o recobrimento do nanomaterial com um material dielétrico induz a mudanças no índice de refração, na frequência da LSPR e na absorção [65].

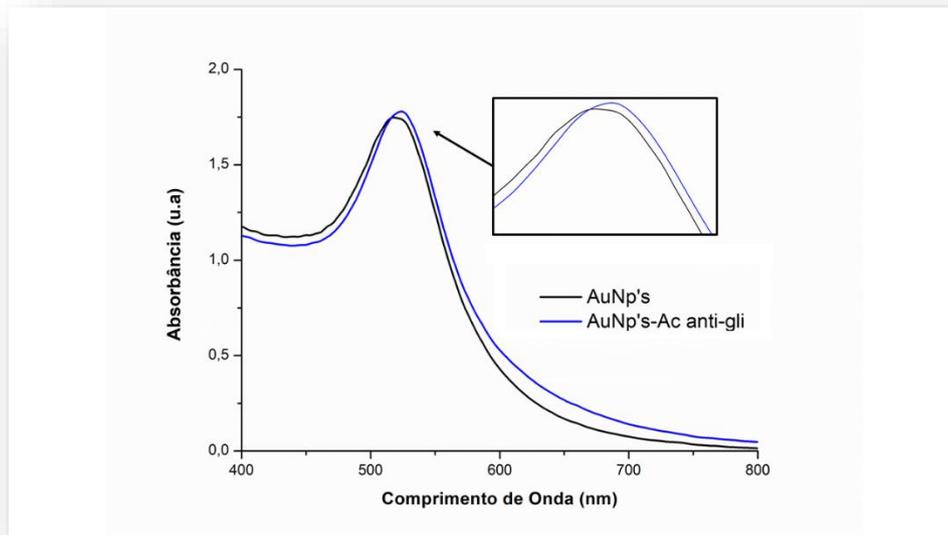


Figura 15 – Deslocamento do pico plasmônico das AuNp's na presença de anticorpo anti-glifosato.

A identificação de compostos conectados ou que estão próximos às nanopartículas foi cumprida por meio de FTIR e espectroscopia Raman. A espectroscopia Raman foi utilizada para identificação dos compostos do conjugado AuNp's-Ac que caracterizam a presença de proteínas do anticorpo. Os resultados da conjugação podem ser observados na Fig. 16 (A). O espectro Raman apresentou resultados assertivos coerentes, revelando por meio dos picos intensificados as estruturas que estão diretamente conectadas às partículas. Os grupos funcionais relacionados a interação das AuNp's com os anticorpos (AuNp's-Ac) foram evidenciados em 1294 e 1557 cm^{-1} , correspondentes as porções fosfonometil e glicina, presentes na estrutura química do glifosato.

As atribuições de identificação na espectroscopia de infravermelho estão relacionadas à presença da nanopartícula conjugada com o anticorpo anti-glifosato, bem como as características químicas que o glifosato possui. A presença de uma forte banda em 991 cm^{-1} no espectro é atribuída a molécula de glifosato, correspondente a fração

fosfonometil, indicando a presença do anticorpo anti-glifosato na ligação com as AuNp's.

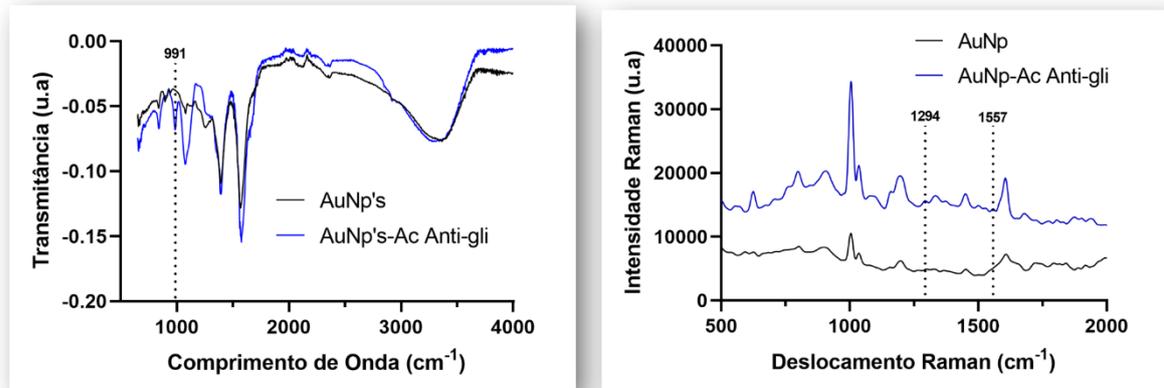


Figura 16 – Comparação dos espectros Raman de AuNp's e anticorpo anti-glifosato IgY (A). Espectros de FTIR de AuNp's e anticorpo anti-glifosato (B).

5.2.4 Análise de floculação das AuNp's-Ac

O ensaio de *Gold Number* [55] foi implementado a fim de avaliar concentração mínima de proteínas capaz de estabilizar as nanopartículas de ouro e avaliar a formação de agregados de nanopartículas quando submetidas a NaCl. As características semelhantes entre anticorpos do tipo IgG e IgY [68] permite ter como base o ponto isoelétrico (pI) do anticorpo do tipo IgG próximo a 8,7 [69], permitindo assim que a interação entre AuNp's e anticorpo pudesse ser analisada em pH7, pH8 e pH9 para estabelecer a melhor carga para adsorção iônica.

Os valores de pH7 e pH8 apresentaram maior eficiência de estabilização das AuNp's-Ac, inibindo a agregação nos quatro primeiros pontos de concentração do anticorpo, enquanto que em pH 9, as nanopartículas conjugadas aos anticorpos apresentaram sinais de agregação a partir da terceira concentração, sendo possível observar na Fig. 17 a mudança de coloração de vermelho para roxo que é indicativo de formação de agregados.

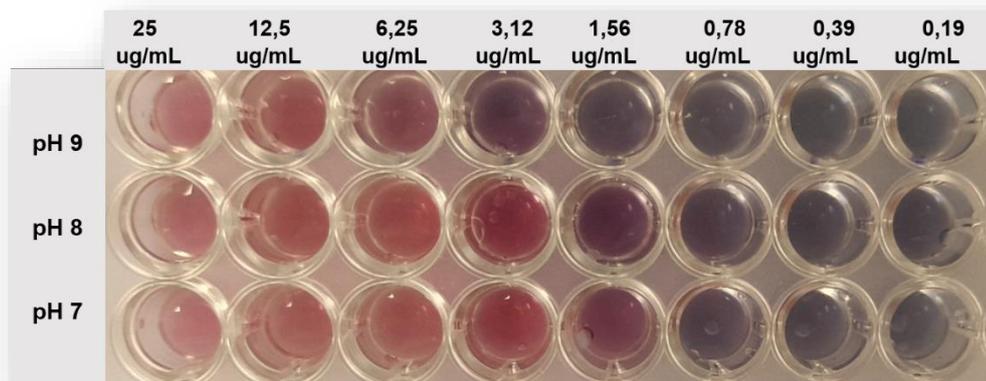


Figura 17 – Ensaio de flocculação “gold number” das AuNp’s conjugadas com anticorpo anti-glifosato.

Portanto, quanto ao fenômeno de atração eletrostática entre as partículas e os anticorpos e consequente adsorção iônica, o estado do conjugado quando em pH 7 e pH 8 apresentou maior estabilidade de conjugação, excluindo o pH 9 visto que a camada superficial das partículas não possibilitou a adsorção iônica do anticorpo na superfície em baixas concentrações.

A mensuração das evidências constatadas na mudança de coloração do conjugado em diferentes valores de pH foi realizada por meio de espectroscopia Uv-Vis (Fig. 18 - A,B e C) e o parâmetro de flocculação foi avaliado em concentrações crescentes do conjugado em diferentes valores de pH (Fig. 18 - D, E e F). A mudança de tonalidade do conjugado de vermelho para roxo é representada na espectroscopia por meio da mudança do pico plasmônico na superfície das partículas, evidenciando a agregação do material na presença dos anticorpos de acordo com as diferentes escalas de pH. A formação de picos plasmônicos próximos a 700 nm indicam a formação de agregados de partículas e evidenciam a instabilidade na presença de NaCl. A baixa concentração de anticorpos na presença dessas partículas, corrobora para que as partículas possam interagir, visto que não encontram anticorpos disponíveis para serem adsorvidos à superfície do metal.

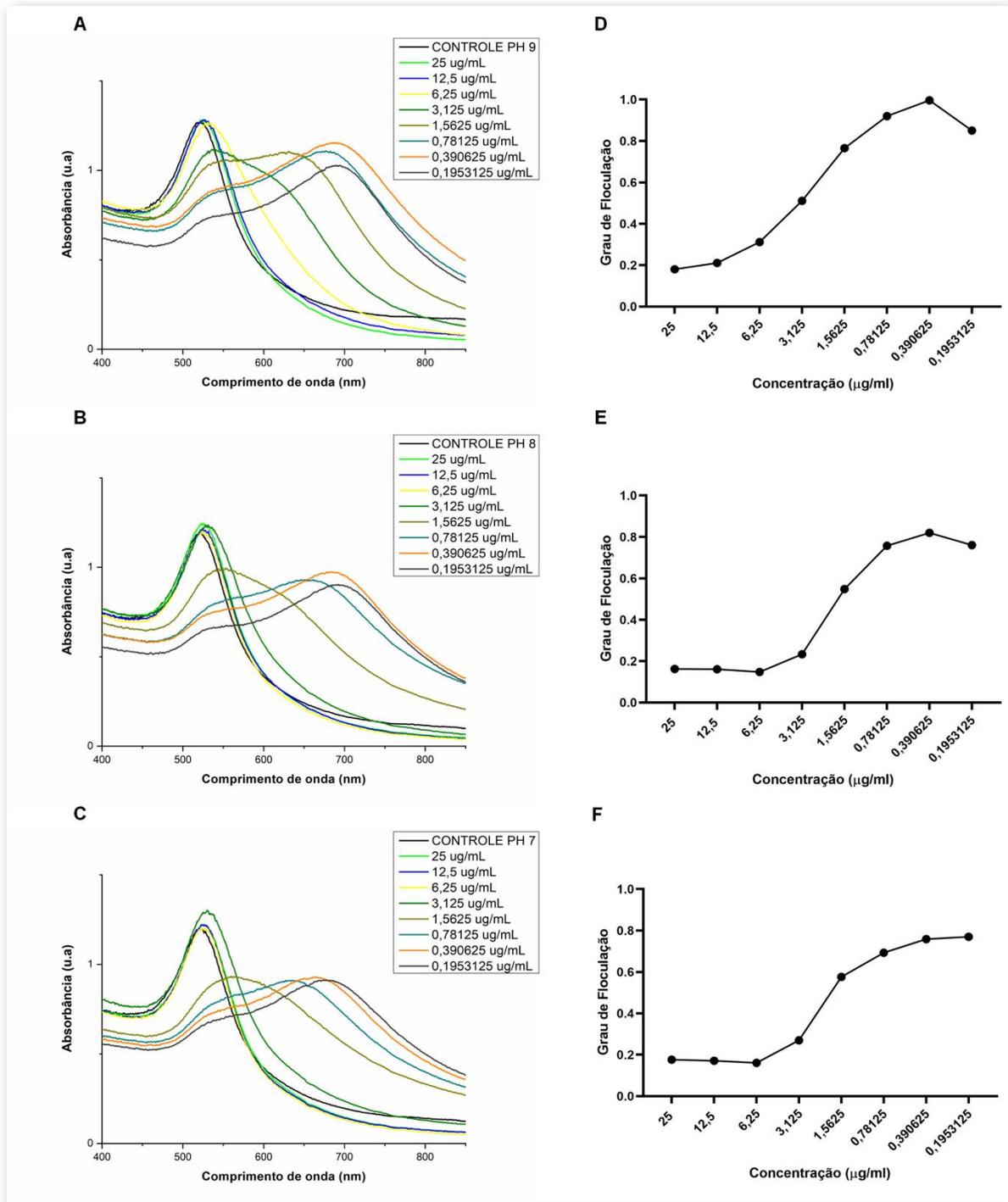


Figura 18 – Espectroscopia UV-Vis de AuNp's conjugadas a anticorpo anti-glifosato em escala de pH 9 (A), pH 8 (B) e pH 7 (C). Grau de floculação das concentrações do conjugado em diferentes ambientes de pH (D, E, F).

5.3 DETECÇÃO DE GLIFOSATO POR LSPR

5.3.1 Detecção de glifosato por meio de AuNp's funcionalizadas com cisteamina

A funcionalização de AuNp's com cisteamina permitiu que os grupos funcionais amino fossem expostos na superfície das nanopartículas devido à forte ligação entre ouro e enxofre pertencente à outra fração da cisteamina, permitindo carga positiva para as Np's funcionalizadas. A ligação do glifosato às AuNp's-Cis ocorreu devido aos grupos funcionais carboxil (-COOH) e fosfonil (-PO₃H₂) do glifosato que interagiram eletrostaticamente com as AuNp's-Cis, estabelecendo uma forte afinidade entre os compostos.

O deslocamento plasmônico confirmando a presença de glifosato pode ser identificado na Fig. 19. O elemento de reconhecimento interagiu com as AuNp's causando um mecanismo de transdução de sinal. Para avaliar a conjugação das AuNp's-Cis com glifosato, foi utilizado espectrofotometria UV-Vis para monitoramento. A resposta de detecção foi diretamente ligada com a mudança dos espectros LSPR quando a amostra estabelecida como controle, como as AuNp's-Cis, foi substituída pela amostra de detecção, as AuNp's-Cis com adição de glifosato. Em altas concentrações do herbicida, o espectro apresentou explícito deslocamento acima de 600 nm, indicando agregação de AuNp's. Devido a esse fato que o excesso de glifosato provoca aglomeração e desvio espectral. Os limites foram definidos de acordo com a equação de regressão apresentada na Fig. 19 (B) de 0,18 mg.L⁻¹ a 3 mg.L⁻¹.

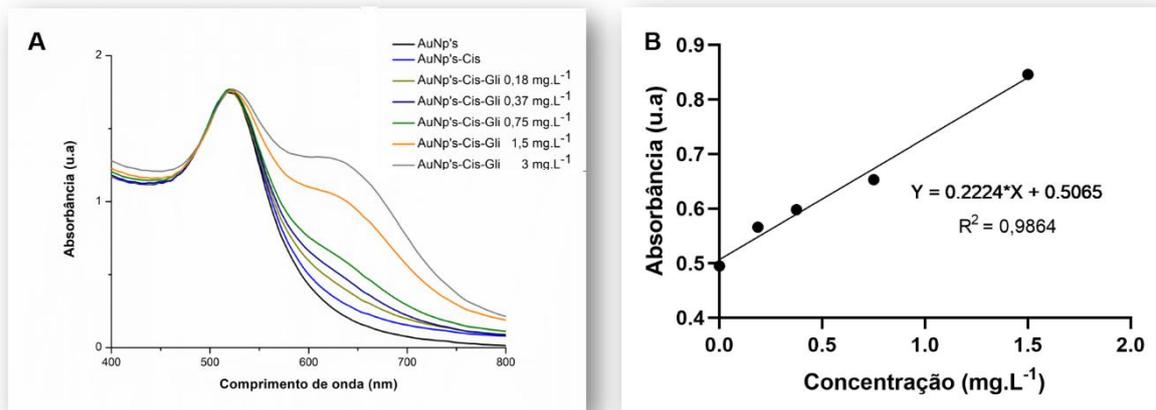


Figura 19 – Espectrofotometria UV-Vis da conjugação das AuNp's-Cis com glifosato (A). Gráfico de linearidade de detecção (B). Em altas concentrações do herbicida, o espectro apresenta deslocamento em torno de 650 nm, indicando agregação de AuNp's

5.3.2 Detecção de glifosato por meio de AuNp's conjugadas com Anticorpos

A interação entre os anticorpos, as AuNp's e o glifosato pode ser atribuída a estratégia de ligação eletrostática e este processo está diretamente relacionado com a mudança na ressonância plasmônica da superfície das nanopartículas. As alterações na superfície das AuNp's por meio de materiais dielétricos induziram a alterações no índice de refração, permitindo a detecção de glifosato por meio da ligação ao anticorpo específico. Para conjugação com os anticorpos, as AuNp's foram estabelecidas em pH 8 conforme o estudo de grau de floculação descrito na seção 5.2.4. As análises para confirmação de detecção de glifosato foram evidenciadas por LSPR e os gráficos de detecção foram atribuídos em função da absorção no comprimento de onda em 600 nm. Para estabelecer o limite de detecção das amostras funcionalizadas com anticorpo, diferentes níveis de concentração de glifosato foram estabelecidos e os resultados podem ser observados de acordo com a espectroscopia Uv-Vis na Figura 20. Os resultados do espectro evidenciaram o deslocamento plasmônico em todas as concentrações de glifosato. As concentrações avaliadas variaram de 0,004 ug.L⁻¹ a 10000 ug.L⁻¹. As alterações observadas no espectro Uv-Vis ocorreram devido a atração da molécula de glifosato com o a região de ligação específica do anticorpo. Observa-se também que à medida que a concentração de glifosato diminui, o pico de deslocamento se torna menor em comparação a concentrações mais altas. Todas as faixas de glifosato apresentaram sucesso no deslocamento, indicando a identificação

do analito por meio dos anticorpos. Além dos desvios plasmônicos identificados, vale ressaltar que não houveram picos proeminentes de agregação de partículas como pode ser observado no espectro com absorção próxima a 700 nm. Os valores de concentração de $0,004 \text{ ug.L}^{-1}$ a 10.000 ug.L^{-1} estão representados no espectro da Fig. 20 (A) e estão de acordo com as equações lineares representadas na Fig. 20 (B-C).

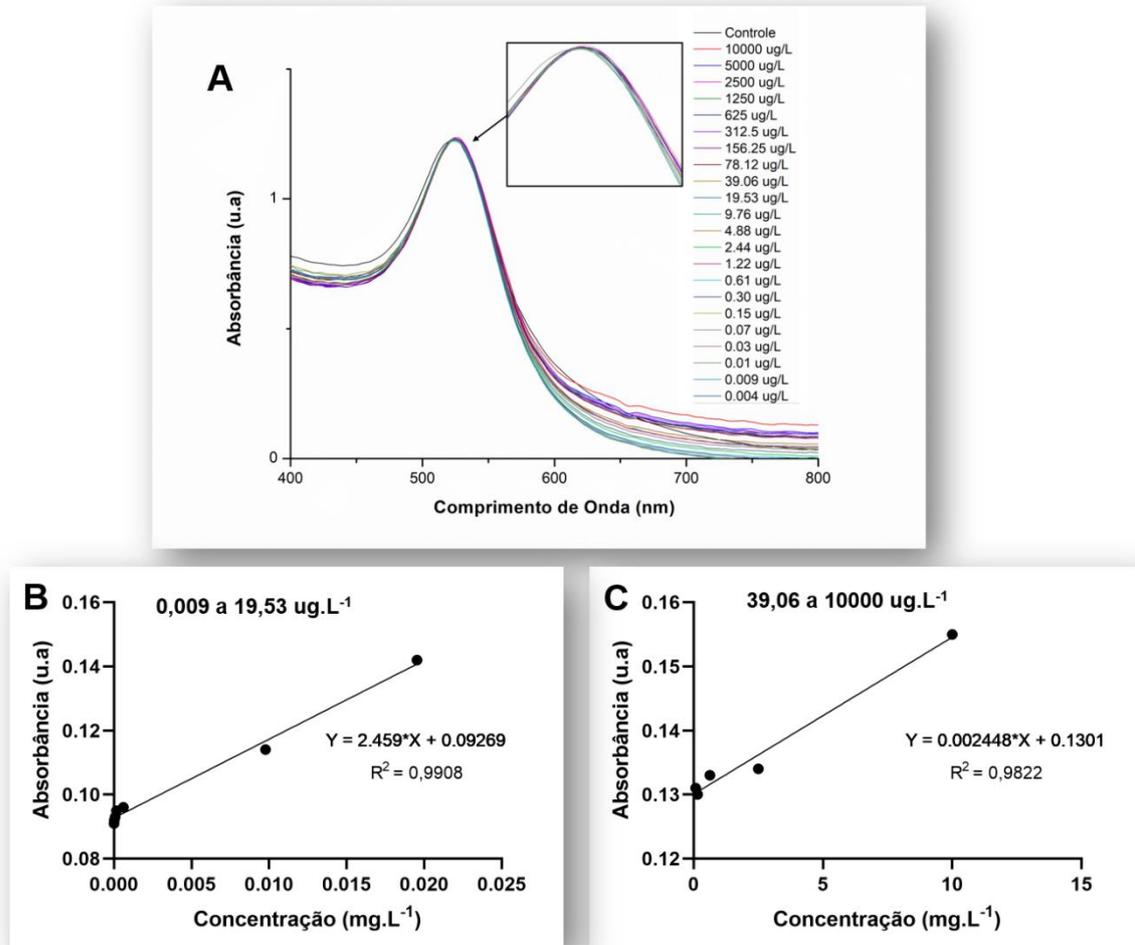


Figura 20 – Espectro Uv-Vis das concentrações de glifosato adicionadas às AuNp's conjugadas a anticorpo anti-glifosato (A). Gráficos de linearidade de detecção (B-C).

A fim de verificar a aplicabilidade do sistema de detecção em amostras reais, uma amostra de café arábica foi avaliada como modelo de estudo. A análise de resíduos requer um extenso processo como extração, limpeza e remoção de interferências. Para isso, várias técnicas elaboradas são consideradas pertinentes para a validação da extração. Neste estudo, não foram adotadas técnicas laboriosas para a extração das amostras, contudo, apresentamos a possibilidade de maiores estudos acerca dos

resíduos de glifosato presentes no café arábica. A identificação desses resíduos nas amostras foi determinada por decorrência do fenômeno de LSPR. A avaliação do comportamento do bioconjugado de AuNp's-Ac na presença de glifosato foi evidenciada pela análise de uma amostra orgânica com adição do herbicida na concentração de 50 ug.Kg^{-1} . Os espectros das análises (Fig. 21) indicaram resultados relevantes, permitindo que o analito fosse identificado a partir da ligação entre o bioconjugado e o herbicida. Para a amostra de café foi detectado um valor de $40,84 \text{ ug.L}^{-1}$. Considerando que os métodos de extração não foram avaliados neste trabalho, os resultados se mostraram promissores para a quantificação de glifosato na amostra avaliada.

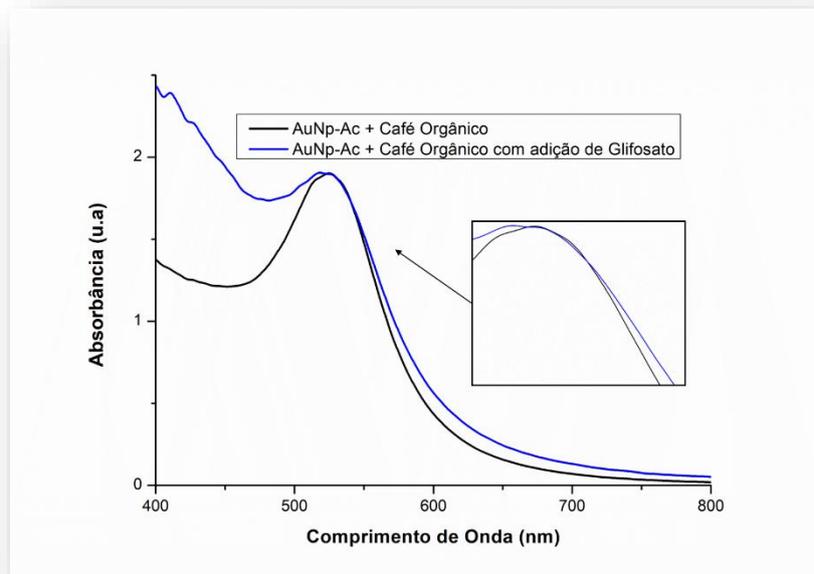


Figura 21 – Espectroscopia UV-Vis de AuNp's-Ac conjugadas a solução de amostra orgânica de café acrescida de glifosato.

Sistemas de detecção de glifosato foram relatados (Tab. 2) para a melhor compreensão do biossensor desenvolvido neste trabalho. De forma efetiva, esses sistemas possibilitaram o avanço quanto aos limites de detecção e permitiram que o tempo de processamento fosse reduzido. Contudo, a nanotecnologia viabilizou a construção de um sensor de baixo custo construído a partir de anticorpos específicos para determinado alvo que resultasse em menor tempo de análise e menor limite de detecção se comparada aos demais métodos.

Método	Material Utilizado	Concentração Detectada	Tempo	Ref.
Colorimétrico	AuNp's e cisteamina	1 ug.L ⁻¹	15 min	[59]
Fluorescência	<i>DNA-templated silver nanoclusters</i>	5 ug.L ⁻¹	6 min	[70]
Quimioluminescência	MIP	0,046 ug.L ⁻¹	10 min	[71]
LSPR	AuNp's e anticorpo	0,009 ug.L ⁻¹	Tempo real	Este estudo

Tabela 2 – Comparação de diferentes métodos de detecção de glifosato.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um método rápido, simples e sensível para detecção de glifosato foi desenvolvido. A detecção de glifosato baseou-se no fenômeno de ressonância plasmônica de superfície localizada, permitindo que o analito fosse monitorado em tempo real. A presença de glifosato foi confirmada por meio da ligação de anticorpos específicos ao herbicida com ampla faixa de linearidade de $0,009 \text{ ug.L}^{-1}$ a 10.000 ug.L^{-1} . A detecção e quantificação em amostras reais foi apresentada indicando que o sistema proposto é promissor para aplicações em escala real, com limites de quantificação que abrange os valores permitidos pela legislação nacional e internacional. O sistema desenvolvido pode ser utilizado como uma alternativa para a detecção rápida no local de coleta ou como ferramenta de monitoramento e triagem para os sistemas tradicionais de detecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Y. Zhu, F. Zhang, C. Tong, and W. Liu, "Determination of glyphosate by ion chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 850, no. 1–2, pp. 297–301, Jul. 1999, doi: 10.1016/S0021-9673(99)00558-0.
- [2] F. E. Belbin *et al.*, "Plant circadian rhythms regulate the effectiveness of a glyphosate-based herbicide," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, p. 3704, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-11709-5.
- [3] H. J. Beckie, K. C. Flower, and M. B. Ashworth, "Farming without Glyphosate?," *Plants*, vol. 9, no. 1, p. 96, Jan. 2020, doi: 10.3390/plants9010096.
- [4] C.M. Benbrook, "Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally," *Environ. Sci. Eur.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–15, 2016, doi: 10.1186/s12302-016-0070-0.
- [5] N. L. Gorza, E. J. A. . Taveira, and E. R. C. Coelho, "Remoção de contaminantes orgânicos em águas de abastecimento público em estação de tratamento de água convencional, associada à pré-oxidação e adsorção em carvão ativado granular.," in *12 Congresso de Águas/16 ENASB/XVI Silubesa.*, 2014.
- [6] R. Liu, Q. Wang, Q. Li, X. Yang, K. Wang, and W. Nie, "Surface plasmon resonance biosensor for sensitive detection of microRNA and cancer cell using multiple signal amplification strategy," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 87, pp. 433–438, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.bios.2016.08.090.
- [7] R. J. Whelan, T. Wohland, L. Neumann, B. Huang, B. K. Kobilka, and R. N. Zare, "Analysis of Biomolecular Interactions Using a Miniaturized Surface Plasmon Resonance Sensor," *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 17, pp. 4570–4576, Sep. 2002, doi: 10.1021/ac025669y.
- [8] Y.-J. He, "Novel and high-performance LSPR biochemical fiber sensor," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 206, pp. 212–219, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.snb.2014.09.061.
- [9] N. M. Dissanayake, J. S. Arachchilage, T. A. Samuels, and S. O. Obare, "Highly sensitive plasmonic metal nanoparticle-based sensors for the detection of organophosphorus pesticides," *Talanta*, vol. 200, pp. 218–227, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2019.03.042.

- [10] J. Tang, W. Chen, and H. Ju, "Rapid detection of pesticide residues using a silver nanoparticles coated glass bead as nonplanar substrate for SERS sensing," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 287, pp. 576–583, May 2019, doi: 10.1016/j.snb.2019.02.084.
- [11] H. Zhang et al., "Blue laser-induced photochemical synthesis of CuAg nanoalloys on h-BN supports with enhanced SERS activity for trace-detection of residual pesticides on tomatoes," *J. Alloys Compd.*, vol. 825, p. 153996, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.jallcom.2020.153996.
- [12] M. M. Hassan et al., "Signal optimized rough silver nanoparticle for rapid SERS sensing of pesticide residues in tea," *Food Chem.*, vol. 338, p. 127796, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127796.
- [13] Y. Lu, Y. Tan, Y. Xiao, Z. Li, E. Sheng, and Z. Dai, "A silver@gold nanoparticle tetrahedron biosensor for multiple pesticides detection based on surface-enhanced Raman scattering," *Talanta*, vol. 234, p. 122585, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.talanta.2021.122585.
- [14] N. M. Dissanayake, J. S. Arachchilage, T. A. Samuels, and S. O. Obare, "Highly sensitive plasmonic metal nanoparticle-based sensors for the detection of organophosphorus pesticides," *Talanta*, vol. 200, pp. 218–227, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2019.03.042.
- [15] T.-J. Lin, K.-T. Huang, and C.-Y. Liu, "Determination of organophosphorous pesticides by a novel biosensor based on localized surface plasmon resonance," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 4, pp. 513–518, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.bios.2006.05.007.
- [16] R. Singh, N. Kumar, R. Mehra, H. Kumar, and V. P. Singh, "Progress and challenges in the detection of residual pesticides using nanotechnology based colorimetric techniques," *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 26, pp. 1–10, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.teac.2020.e00086.
- [17] M. A. Martens, M. S. Bleeke, V. A. Leopold, and D. R. Farmer, "Toxicology and human health risk assessment of polyethoxylated tallow amine surfactant used in glyphosate formulations," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 107, p. 104347, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.yrtph.2019.03.014.

- [18] I. M. Meftaul et al., “Controversies over human health and ecological impacts of glyphosate: Is it to be banned in modern agriculture?,” *Environ. Pollut.*, vol. 263, p. 114372, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.envpol.2020.114372.
- [19] K. Gandhi et al., “Exposure risk and environmental impacts of glyphosate: Highlights on the toxicity of herbicide co-formulants,” *Environ. Challenges*, vol. 4, p. 100149, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.envc.2021.100149.
- [20] Food and Agriculture Organization, “Glyphosate,” FAO, 2016. https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Glyphosate_2016_02_10.pdf.
- [21] R. P. Coullery, M. E. Ferrari, and S. B. Rosso, “Neuronal development and axon growth are altered by glyphosate through a WNT non-canonical signaling pathway,” *Neurotoxicology*, vol. 52, pp. 150–161, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.neuro.2015.12.004.
- [22] D. D. Weisenburger, “A Review and Update with Perspective of Evidence that the Herbicide Glyphosate (Roundup) is a Cause of Non-Hodgkin Lymphoma,” *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, vol. 1, pp. 1–36, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.clml.2021.04.009.
- [23] S. Richard, S. Moslemi, H. Sipahutar, N. Benachour, and G.-E. Seralini, “Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 113, no. 6, pp. 716–720, Jun. 2005, doi: 10.1289/ehp.7728.
- [24] C. Gasnier, C. Dumont, N. Benachour, E. Clair, M.-C. Chagnon, and G.-E. Seralini, “Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines,” *Toxicology*, vol. 262, no. 3, pp. 184–191, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.tox.2009.06.006.
- [25] S. Thongprakaisang, A. Thiantanawat, N. Rangkadilok, T. Suriyo, and J. Satayavivad, “Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 59, pp. 129–136, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.fct.2013.05.057.
- [26] F. Mañas *et al.*, “Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 28, no. 1, pp. 37–41, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.etap.2009.02.001.
- [27] V. J. Koller, M. Fürhacker, A. Nersesyan, M. Mišák, M. Eisenbauer, and S.

Knasmueller, "Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells," *Arch. Toxicol.*, vol. 86, no. 5, pp. 805–813, May 2012, doi: 10.1007/s00204-012-0804-8.

[28] L. P. Agostini et al., "Effects of glyphosate exposure on human health: Insights from epidemiological and in vitro studies," *Sci. Total Environ.*, vol. 705, p. 135808, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135808.

[29] V. C. Aparicio, E. De Gerónimo, D. Marino, J. Primost, P. Carrquiriborde, and J. L. Costa, "Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins," *Chemosphere*, vol. 93, no. 9, pp. 1866–1873, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.041.

[30] A. Sharma et al., "Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 201, p. 110812, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110812.

[31] G. M. Calvert et al., "Acute pesticide poisoning among agricultural workers in the United States, 1998-2005," *Am. J. Ind. Med.*, vol. 51, no. 12, pp. 883–898, Dec. 2008, doi: 10.1002/ajim.20623.

[32] O. K. Borggaard and A. L. Gimsing, "Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review," *Pest Manag. Sci.*, vol. 64, no. 4, pp. 441–456, Apr. 2008, doi: 10.1002/ps.1512.

[33] C. Lesseur et al., "Urinary glyphosate concentration in pregnant women in relation to length of gestation," *Environ. Res.*, vol. 203, p. 111811, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.envres.2021.111811.

[34] R. D. Díaz-Martín, A. Carvajal-Peraza, B. Yáñez-Rivera, and M. Betancourt-Lozano, "Short exposure to glyphosate induces locomotor, craniofacial, and bone disorders in zebrafish (*Danio rerio*) embryos," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 87, p. 103700, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.etap.2021.103700.

[35] R. Mesnage, I. Brandsma, N. Moelijker, G. Zhang, and M. N. Antoniou, "Genotoxicity evaluation of 2,4-D, dicamba and glyphosate alone or in combination with cell reporter assays for DNA damage, oxidative stress and unfolded protein response," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 157, p. 112601, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.fct.2021.112601.

- [36] X. Ren et al., "Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses," *Environ. Pollut.*, vol. 243, pp. 833–841, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2018.09.049.
- [37] J. Xu, S. Smith, G. Smith, W. Wang, and Y. Li, "Glyphosate contamination in grains and foods: An overview," *Food Control*, vol. 106, p. 106710, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106710.
- [38] H. Vereecken, "Mobility and leaching of glyphosate: a review," *Pest Manag. Sci.*, vol. 61, no. 12, pp. 1139–1151, Dec. 2005, doi: 10.1002/ps.1122.
- [39] M. T. Meyer, K. A. Loftin, E. A. Lee, G. H. Hinshaw, J. E. Dietze, and E. A. Scribner, "Product, Degradation Acid, Aminomethylphosphonic Dilution, Isotope Extraction, Online Solid-phase Chromatography, Liquid Spectrometry, Tandem Mass," *U.S. Geol. Surv. Tech. Methods*, vol. 1, no. 1, pp. 1–44, 2009.
- [40] M.-Q. He, Y.-L. Yu, and J.-H. Wang, "Biomolecule-tailored assembly and morphology of gold nanoparticles for LSPR applications," *Nano Today*, vol. 35, p. 101005, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.nantod.2020.101005.
- [41] J. Zhou, T. Yang, J. Chen, C. Wang, H. Zhang, and Y. Shao, "Two-dimensional nanomaterial-based plasmonic sensing applications: Advances and challenges," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 410, p. 213218, May 2020, doi: 10.1016/j.ccr.2020.213218.
- [42] W. Wang et al., "Recent advances in nanomaterials-based electrochemical (bio)sensors for pesticides detection," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 132, p. 116041, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.trac.2020.116041.
- [43] J. N. Anker, W. P. Hall, O. Lyandres, N. C. Shah, J. Zhao, and R. P. Van Duyne, "Biosensing with plasmonic nanosensors," *Nat. Mater.*, vol. 7, no. 6, pp. 442–453, Jun. 2008, doi: 10.1038/nmat2162.
- [44] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, and C. A. Mirkin, "Gold Nanoparticles for Biology and Medicine," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 49, no. 19, pp. 3280–3294, Apr. 2010, doi: 10.1002/anie.200904359.
- [45] SOCIETY, The Royal et al. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. London The Royal Society The Royal Academy of Engineering Report, v. 46, n. July, p. 1–127, 2004. Disponível em:

https://royalsociety.org/~media/royal_society_content/policy/publications/2004/9693.pdf.

[46] BAKIU, Rigters. Nanotechnology Interaction with Environment. Handbook of Environmental Materials Management, p. 2233–2256, 2019.

[47] X. Ma, H. Sun, Y. Wang, X. Wu, and J. Zhang, “Electronic and optical properties of strained noble metals: Implications for applications based on LSPR,” *Nano Energy*, vol. 53, pp. 932–939, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.nanoen.2018.09.042.

[48] A. Agharazy Dormeny, P. Abedini Sohi, and M. Kahrizi, “Design and simulation of a refractive index sensor based on SPR and LSPR using gold nanostructures,” *Results Phys.*, vol. 16, p. 102869, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.rinp.2019.102869.

[49] K. A. Willets and R. P. Van Duyne, “Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 58, no. 1, pp. 267–297, May 2007, doi: 10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607.

[50] S. Schultz, D. R. Smith, J. J. Mock, and D. A. Schultz, “Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 3, pp. 996–1001, Feb. 2000, doi: 10.1073/pnas.97.3.996.

[51] X. Li, L. Jiang, Q. Zhan, J. Qian, and S. He, “Localized surface plasmon resonance (LSPR) of polyelectrolyte-functionalized gold-nanoparticles for bio-sensing,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 332, no. 2–3, pp. 172–179, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.colsurfa.2008.09.009.

[52] M.-Q. He, Y.-L. Yu, and J.-H. Wang, “Biomolecule-tailored assembly and morphology of gold nanoparticles for LSPR applications,” *Nano Today*, vol. 35, p. 101005, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.nantod.2020.101005.

[53] J. L. Wai and S. Y. New, “Cysteamine-coated gold nanoparticles for bimodal colorimetric detection with inverse sensitivity: a proof-of-concept with lysozyme,” *RSC Adv.*, vol. 10, no. 2, pp. 1088–1094, 2020, doi: 10.1039/C9RA07930K.

[54] G. Vidarsson, G. Dekkers, and T. Rispen, “IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions,” *Front. Immunol.*, vol. 5, Oct. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.

- [55] HADDAD, A; SESSO, A; ATTIAS, M; et al. Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2007.
- [56] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, and A. Plech, "Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 32, pp. 15700–15707, Aug. 2006, doi: 10.1021/jp061667w.
- [57] T. K. Sau, A. Pal, N. R. Jana, Z. L. Wang, and T. Pal, "Size controlled synthesis of gold nanoparticles using photochemically prepared seed particles," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 3, no. 4, pp. 257–261, 2001, doi: 10.1023/A:1017567225071.
- [58] P. J. Vikesland and K. R. Wigginton, "Nanomaterial Enabled Biosensors for Pathogen Monitoring - A Review," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, no. 10, pp. 3656–3669, May 2010, doi: 10.1021/es903704z.
- [59] Q. Tu *et al.*, "In situ colorimetric detection of glyphosate on plant tissues using cysteamine-modified gold nanoparticles," *Analyst*, vol. 144, no. 6, pp. 2017–2025, 2019, doi: 10.1039/C8AN02473A.
- [60] J. C. Gukowsky, C. Tan, Z. Han, and L. He, "Cysteamine-Modified Gold Nanoparticles as a Colorimetric Sensor for the Rapid Detection of Gentamicin," *J. Food Sci.*, vol. 83, no. 6, pp. 1631–1638, Jun. 2018, doi: 10.1111/1750-3841.14179.
- [61] M. Zhang, Y.-Q. Liu, and B.-C. Ye, "Colorimetric assay for sulfate using positively-charged gold nanoparticles and its application for real-time monitoring of redox process," *Analyst*, vol. 136, no. 21, p. 4558, 2011, doi: 10.1039/c1an15632b.
- [62] X. Liang *et al.*, "Colorimetric detection of melamine in complex matrices based on cysteamine-modified gold nanoparticles," *Analyst*, vol. 136, no. 1, pp. 179–183, 2011, doi: 10.1039/C0AN00432D.
- [63] R. H. A. Pereira, "Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada (LSPR) em Dispersões Coloidais de Ouro para Detecção de Ocratoxina A Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada (LSPR) em Dispersões Coloidais de Ouro para Detecção de Ocratoxina A," Universidade Federal do Espírito Santo, 2016.
- [64] D. N. Petsev, "Theory of emulsion flocculation," in *Emulsions: Structure Stability and Interactions*, 1st ed., D. N. Petsev, Ed. Elsevier, 2004, pp. 313–350.

- [65] F. Frederix et al., "Biosensing Based on Light Absorption of Nanoscaled Gold and Silver Particles," *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 24, pp. 6894–6900, Dec. 2003, doi: 10.1021/ac0346609.
- [66] J. P. de Oliveira, "Estudo da Síntese de Nanopartículas de Ouro e Bioconjugação com Proteínas para o Desenvolvimento de Nanosensores," Universidade Federal do Espírito Santo, 2016.
- [67] C. Atallah, C. Charcosset, and H. Greige-Gerges, "Challenges for cysteamine stabilization, quantification, and biological effects improvement," *J. Pharm. Anal.*, vol. 10, no. 6, pp. 499–516, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.jpha.2020.03.007
- [68] L. S. Munhoz, G. D. Vargas, G. Fischer, M. de Lima, P. A. Esteves, and S. de O. Hübner, "Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic," *Ciência Rural*, vol. 44, no. 1, pp. 153–160, Jan. 2014, doi: 10.1590/S0103-84782014000100025.
- [69] L. A. Khawli et al., "Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats.," *MAbs*, vol. 2, no. 6, pp. 613–24, Nov. 2010, doi: 10.4161/mabs.2.6.13333.
- [70] Y. Yang et al., "A turn-on fluorescence sensor based on Cu²⁺ modulated DNA-templated silver nanoclusters for glyphosate detection and mechanism investigation.," *Food Chemistry*, vol. 367, no. 1, pp. 01-07, Jul. 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130617>.
- [71] P. Zhao et al., "Determination of glyphosate in foodstuff by one novel chemiluminescence-molecular imprinting sensor.," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 78, no. 5, pp. 1482-1486, Mai. 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.01.037>.
- [72] Y. Zhang et al., "Determination of glyphosate and glufosinate in corn using multi-walled carbon nanotubes followed by ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.," *Journal of Chromatography A*, vol. 1619, Fev. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460939>.