

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas
Programa de Pós-graduação em Física

Monique Hilda Costa

PROPOSTA DE MITIGAÇÃO DAS INTERAÇÕES INESPECÍFICAS
EM UM BIOSSENSOR ÓPTICO LABEL FREE:
Aplicação na plataforma BioSearch

Belo Horizonte
2025

Monique Hilda Costa

**PROPOSTA DE MITIGAÇÃO DAS INTERAÇÕES
INESPECÍFICAS EM UM BIOSSENSOR ÓPTICO LABEL
FREE : Aplicação na plataforma BioSearch**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Livia Siman Gomes

Belo Horizonte

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C837p Costa, Monique Hilda.

Proposta de mitigação das interações inespecíficas em um biossensor óptico Label Free: aplicação na plataforma BioSearch / Monique Hilda Costa. – 2025. 80 f. : il.

Orientadora: Lívia Siman Gomes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Física.

Bibliografia: f. 73-76.

1. Biossensores. 2. Nanopartículas. I. Título. II. Gomes, Lívia Siman. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Física.

CDU – 620.3 (043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

A presente dissertação, intitulada "**Proposta de mitigação das interações inespecíficas em um biossensor óptico label free: aplicação na plataforma BioSearch**" de autoria de **MONIQUE HILDA COSTA** submetida à Comissão Examinadora, abaixo-assinada, foi aprovada para obtenção do grau de **MESTRE EM FÍSICA, área de concentração Física Aplicada e Interdisciplinar**, em 22 de agosto de 2025.

Belo Horizonte, 22 de agosto de 2025.

Profa. Lívia Siman Gomes
Orientador do estudante
Departamento de Física/UFMG

Prof. Luiz Orlando Ladeira
Departamento de Física/UFMG

Dra. Anna Carolina Pinheiro Lage
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)



Documento assinado eletronicamente por **Anna Carolina Pinheiro Lage, Usuário Externo**, em 26/08/2025, às 19:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Livia Siman Gomes, Coordenador(a)**, em 29/08/2025, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Orlando Ladeira, Professor do Magistério Superior**, em 29/10/2025, às 15:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4484410** e o código CRC **E77ECCA9**.

Agradecimentos

"A vida é feita de pequenos momentos que se tornam grandes quando compartilhados com as pessoas que amamos". Essa frase resume bem a minha trajetória: de vida, de graduação e agora de mestrado. Na Física, encontrei meu espaço, meu pertencimento. Me reconheci em uma área de pesquisa que me instiga, cercada por pessoas incríveis. Sou imensamente grato pelo apoio da minha orientadora, Lívia Siman Gomes, e por todos do nosso grupo PATI. Compartilhar o dia a dia no laboratório com vocês sempre tornou o caminho mais leve e mais bonito.

Aos meus queridos amigos, nada disso seria possível sem o apoio de vocês. Em especial: Brenda, Ana, Luisa, Henrique, Bianca e Luis — se hoje escrevo essa dedicatória, é porque cada um de vocês fez essa tese existir. Obrigado por me fazerem sentir pertencente e amada. Vocês são afeto e energia essencial. Amo vocês.

Ao meu amor, agradeço por todo carinho, cuidado e apoio. Por me lembrar que sou capaz, e que tenho coragem para voar, sempre com a certeza de que posso voltar para o lar e casulo do seu amor calmo e seguro. Eu te amo, imensamente.

À minha família, especialmente aos meus pais, sou grata por tornarem possível e confortável minha vida em Belo Horizonte, o que me permitiu trilhar essa trajetória acadêmica com mais tranquilidade. À minha irmã, que se fez cada vez mais presente e companheira, meu agradecimento por me lembrar que também encontro colo na família.

Obrigado a todos que contribuíram para o nascimento e a conclusão deste trabalho. Se ele existe, é porque vocês estiveram comigo.

Resumo

Interações inespecíficas representam um dos principais desafios para a aplicação de biossensores *label-free*: dispositivos capazes de detectar interações biomoleculares sem o uso de marcadores secundários. Em amostras biológicas complexas, como o soro humano, essas interações, causadas por ligações não seletivas de biomoléculas (interferentes) à superfície sensora, comprometem a seletividade, aumentam o ruído de fundo e dificultam a interpretação dos sinais. Neste trabalho, é apresentada uma nova abordagem para mitigação dessas interações, utilizando partículas denominadas *Nanocleaners*, que são nanobastões de ouro (AuNbs) com morfologia alongada e ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) acima de 800 nm, fora da faixa de detecção do sistema analítico. A metodologia foi implementada na plataforma óptica BioSearch e validada com biossensores funcionalizados com a proteína N do SARS-CoV-2. O mecanismo de detecção da plataforma é baseado em alterações no espalhamento dinâmico de luz despolarizada (DDLs) dos biossensores em solução, ocasionada pela ligação de biomoléculas aos mesmos. Para quantificar tais alterações, mapea-se o movimento browniano dos biossensores através de flutuações da intensidade da luz espalhada - intensificada pelo fenômeno ótico de LSPR dos AuNbs. No sistema proposto, a variação da intensidade de luz espalhada despolarizada é, majoritariamente, consequente das mudanças na difusividade rotacional das partículas desencadeadas por ligações no biossensor. Essas ligações podem ocorrer de forma inespecífica com interferentes presentes em amostras reais, comprometendo diretamente a acurácia e a sensibilidade do método analítico. Diante desse desafio, propõe-se um protocolo de mitigação das interações inespecíficas que consiste na adição prévia dos *Nanocleaners* à amostra, permitindo o sequestro de interferentes antes da interação com os biossensores, ou seja, limpando a amostra. Foram realizados experimentos com soros negativos e positivos, avaliando a eficácia dos *Nanocleaners* em diferentes concentrações e condições físico-químicas. Os resultados experimentais demonstraram que essa estratégia reduz significativamente a ocorrência de interações inespecíficas, sem prejudicar a detecção específica do analito-alvo. A proposta mostra-se eficaz, simples e compatível com aplicações em matrizes reais, representando um avanço na sensibilidade e acurácia da plataforma óptica *label-free*: a BioSearch.

Palavras-chave: biossensores *label-free*; interações inespecíficas; nanobastões de ouro.

Abstract

Non-specific interactions represent one of the main challenges for the application of *label-free* biosensors: devices capable of detecting biomolecular interactions without the use of secondary markers. In complex biological samples, such as human serum, these interactions, caused by non-selective binding of biomolecules (interferents) to the sensor surface, compromise selectivity, increase background noise, and hinder signal interpretation. In this work, a novel approach is presented for mitigating such interactions using particles referred to as *Nanocleaners*, which are gold nanorods (AuNbs) with elongated morphology and localized surface plasmon resonance (LSPR) above 800 nm, outside the detection range of the analytical system. The methodology was implemented on the optical BioSearch platform and validated using biosensors functionalized with the N protein of SARS-CoV-2. The detection mechanism of the platform is based on changes in the dynamic depolarized light scattering (DDLs) of biosensors in solution, caused by the binding of biomolecules to them. To quantify such changes, the Brownian motion of the biosensors is tracked through fluctuations in scattered light intensity—enhanced by the optical phenomenon of LSPR from AuNbs. In the proposed system, the variation in depolarized scattered light intensity is mainly due to changes in the rotational diffusivity of the particles triggered by binding events at the biosensor surface. These interactions can occur non-specifically with interferents present in real samples, directly compromising the accuracy and sensitivity of the analytical method. To address this challenge, a protocol for mitigating non-specific interactions is proposed, consisting of the prior addition of *Nanocleaners* to the sample, enabling the sequestration of interferents before they interact with the biosensors—essentially cleaning the sample. Experiments were conducted using both negative and positive serum samples to evaluate the efficacy of the *Nanocleaners* under different concentrations and physicochemical conditions. Experimental results demonstrated that this strategy significantly reduces the occurrence of non-specific interactions without impairing the specific detection of the target analyte. The proposed approach is effective, simple, and compatible with real matrix applications, representing an advancement in the sensitivity and accuracy of the *label-free* optical platform: BioSearch.

Keywords: label-free biosensors; nonspecific interactions; gold nanorods.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	10
2	BIOSENSORES LABEL-FREE	12
3	TRANSDUTOR ÓPTICO: NANOPARTÍCULAS DE OURO	15
3.1	Nanobastões de Ouro	15
3.2	Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada - LSPR	16
3.3	Geometria dos Nanobastões de Ouro	18
3.4	Coeficiente De Difusão De Nanobastões	20
4	ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ - DLS	21
5	PLATAFORMA BIOSEARCH	23
5.1	Hardware Óptico e Estrutura	23
5.2	Dados Analíticos	24
6	POTENCIAL ZETA	28
7	BIOSENSORES	31
8	LIGAÇÕES INESPECÍFICAS NOS SENSORES LABEL-FREE	33
8.1	Abordagens utilizadas na mitigação das interações inespecíficas	34
8.2	Proposta de mitigação das interações inespecíficas: Nanocleaners	35
9	OBJETIVOS	36
9.1	Objetivo Geral	36
9.2	Objetivos específicos	36
10	METODOLOGIA	37
10.1	Síntese dos Nanoinsumos	37
10.1.1	Síntese dos Nanobastões de Ouro	37
10.1.2	Síntese dos Nanocleaners	37
10.1.3	Obtenção da proteína N recombinante de COVID-19	37
10.1.4	Síntese dos nanossensores para COVID-19	38
10.2	Caracterização dos Nanoinsumos	39
10.2.1	Caracterização por espectroscopia UV-VIS	39
10.2.2	Medida Potencial Zeta	40
10.2.3	Leitura do Tamanho L na Plataforma BioSearch	41

10.2.4	Leitura volumétrica na plataforma BioSearch	41
10.2.5	Leitura temporal na plataforma BioSearch	41
10.2.6	Definição da concentração dos nanobastões de ouro	41
10.2.7	Definição da concentração dos Nanocleasers	42
10.3	Protocolos	42
10.3.1	Protocolo de Lavagem	42
10.3.2	Protocolo Ajuste de Concentração	43
11	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
11.1	Biossensores, Nanocleasers e Amostras	44
11.2	Ligações inespecíficas	46
11.2.1	Adsorção de interferentes na área cilíndrica dos nanobastões de ouro não funcionalizados (AuNbs)	46
11.2.2	Ocorrência de ligações inespecíficas nos biossensores (Nanobastões de ouro funcionalizados)	52
11.3	Influência do CTAB na eficácia da ação do Nanocleanser	55
11.4	Influência da concentração na eficácia do Nanocleanser	61
11.5	Validação	67
12	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS	77
	ANEXO A – CÓDIGO CURVA TEÓRICA DA VARIAÇÃO DO TAMANHO DO DIÂMETRO D DA ÁREA CILÍN- DRICA DO NANOBASTÃO DE OURO AUNBS EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE τ.	78

1 Introdução

O desenvolvimento de biossensores tem desempenhado um papel essencial na evolução das ferramentas analíticas aplicadas ao diagnóstico biomolecular, ao controle de qualidade e à segurança alimentar (ZANCHETTA et al., 2017). Em particular, biossensores *label-free* têm se destacado por sua capacidade de detectar interações biomoleculares diretamente, sem a necessidade de marcadores secundários, como enzimáticos ou fluorescentes, o que possibilita análises diretas, simplificadas e com maior proximidade das condições fisiológicas reais (ALTUG et al., 2022). Essa abordagem permite o monitoramento em tempo real de processos de ligação e com elevada sensibilidade. (JAVAID et al., 2024).

No entanto, apesar do potencial promissor desses sistemas de detecção, um dos principais desafios enfrentados por biossensores *label-free* em matrizes complexas, como soro humano, é a ocorrência de interações inespecíficas, o que dificulta de forma significativa o processamento de sinais do sistema. Tais interações decorrem da ligação não seletiva de componentes da amostra - denominados interferentes da matrix (como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) aos sensores, o que compromete a especificidade, eleva o sinal de fundo e reduz a confiabilidade das análises (HOMOLA, 2008; DAMBORSKY et al., 2016). No contexto biossensores *label-free* produzidos a partir de AuNbs, esse problema é agravado pela presença residual do surfactante Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB), utilizado na síntese e responsável por conferir carga positiva à superfície cilíndrica dos nanobastões, garantindo sua morfologia e contribuindo para a sua estabilidade coloidal, mas tornando uma região altamente suscetível à adsorção de interferentes negativamente carregados presentes em amostras complexas. Além disso, devido ao método *label-free*, o sinal das interações inespecíficas são frequentes nesses sistemas, uma vez que, embora ocorram de forma transitória e se desfaçam com facilidade, ainda assim geram uma resposta detectável pela plataforma. Isso evidencia a importância de estratégias eficazes para lidar com esses eventos, especialmente em aplicações envolvendo matrizes complexas, a fim de preservar a seletividade e a confiabilidade da análise.

Diversas estratégias têm sido propostas na literatura para mitigar esse fenômeno, incluindo o uso de polímeros *antifouling*, protocolos de bloqueio com proteínas inertes (como a BSA) e ajustes de condições físico-químicas como força iônica e pH da solução (SOLER; LECHUGA, 2022; LIU et al., 2019; VASILESCU et al., 2025). No entanto, a eficácia dessas abordagens é limitada quando aplicadas em amostras reais e complexas como soro humano, especialmente em configurações ópticas sensíveis como a da plataforma BioSearch. Esta plataforma emprega biossensores de AuNbs funcionalizados com bioreceptores específicos e opera por meio da análise da difusividade dos biossensores em solução, captada por medições ópticas baseadas no espalhamento dinâmico da luz dos biossensores

anisotrópicos realizando movimento browniano em solução, sendo altamente sensível a alterações na difusividade rotacional das partículas, parâmetro diretamente afetado por ligações específicas e inespecíficas na superfície dos nanobastões.

Neste trabalho, propõe-se uma nova proposta para mitigação das interações inespecíficas por meio do uso de nanopartículas auxiliares denominadas *Nanocleaners* — AuNbs com morfologia mais alongada e faixa de ressonância deslocada, projetados para sequestrar interferentes presentes na matriz antes do contato com os biossensores. Essa estratégia visa reduzir o ruído de fundo sem comprometer a sensibilidade do sistema, aprimorando a seletividade e a robustez da leitura óptica. A proposta é investigada no contexto de detecção da proteína de nucleocapsídeo (N) do vírus SARS-CoV-2, utilizando amostras clínicas de soro humano e a plataforma BioSearch como ferramenta de análise.

Esta dissertação está estruturada em nove capítulos. Após esta introdução, o Capítulo 2 apresenta os fundamentos dos biossensores *label-free*, com ênfase nos sistemas ópticos. O Capítulo 3 detalha os princípios físicos e estruturais dos biossensores de AuNbs, incluindo os mecanismos de detecção baseados em LSPR. No Capítulo 4, discute-se o impacto das interações inespecíficas nesses sensores e são revisadas abordagens tradicionais de mitigação. O Capítulo 5 descreve a plataforma BioSearch e sua configuração experimental. O Capítulo 6 define os objetivos geral e específicos do trabalho, enquanto o Capítulo 7 apresenta a metodologia empregada, abrangendo síntese, funcionalização, protocolos e caracterizações dos nanoinsumos. O Capítulo 8 reúne os resultados obtidos e sua respectiva análise, e, por fim, o Capítulo 9 traz as conclusões e perspectivas do estudo.

2 Biossensores Label-Free

Os biossensores *label-free* constituem uma classe avançada de dispositivos capazes de detectar interações biomoleculares sem a necessidade de etapas secundárias para a detecção do analito, como o uso de marcadores fluorescente (Fluoresceína e Rodamina)(ALTUG et al., 2022). Esses sistemas baseiam-se na detecção direta de alterações nas propriedades físico-químicas da interface sensor-analito, tais como massa, índice de refração, condutividade elétrica ou ressonância plasmônica, permitindo uma análise em tempo real e com alta sensibilidade (JAVAID et al., 2024). A operação de biossensores *label-free* fundamenta-se na transdução de sinal, na qual a ligação do analito (biomoléculas alvo) a um bioreceptor imobilizado na superfície de um transdutor gera uma resposta mensurável - Figura 1.

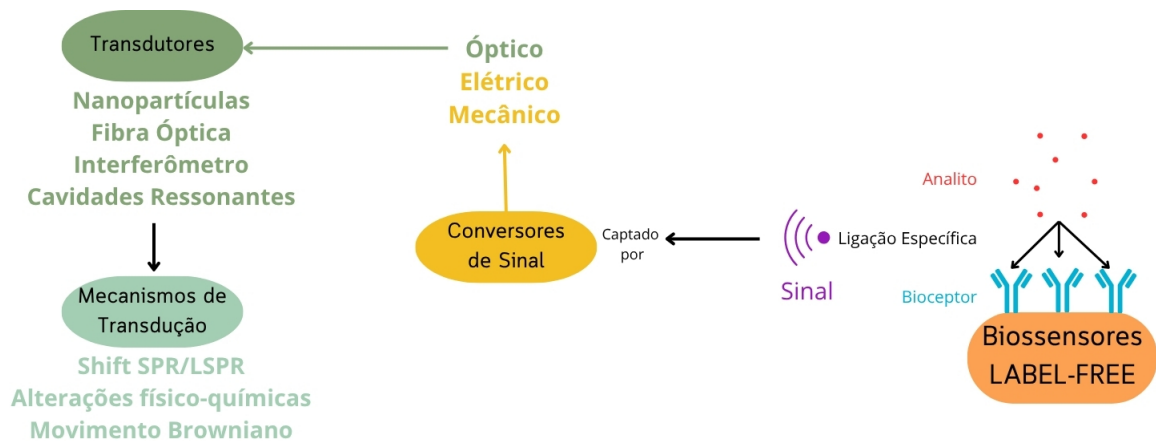


Figura 1 – Representação dos Biossensores *label-free*.

As técnicas *label-dependent* (ELISA e imunofluorescência), utilizam marcadores secundários, geralmente anticorpos conjugados a enzimas, que se ligam ao anticorpo primário para gerar um sinal detectável por meio de uma reação enzimática - Figura 2. Nessa reação, a enzima catalisa a transformação de um substrato específico em um produto colorido ou fluorescente, permitindo a quantificação do analito presente na amostra através da medida dessa mudança de sinal (ENGLISH et al., 2023). Já os sensores *label-free* monitoram diretamente as alterações intrínsecas do sistema, eliminando etapas adicionais de marcação e lavagens complexas, simplificando protocolos e tornando o processo mais ágil e menos invasivo (DAMBORSKY et al., 2016).

Entre os diversos tipos de biossensores *label-free*, os **ópticos** se destacam por sua alta sensibilidade, detecção em tempo real e compatibilidade com a miniaturização de dispositivos. Esses sensores são compostos por transdutores capazes de transmitir um sinal óptico específico oriundo da ocorrência de ligações entre elementos de bioreconhecimento,

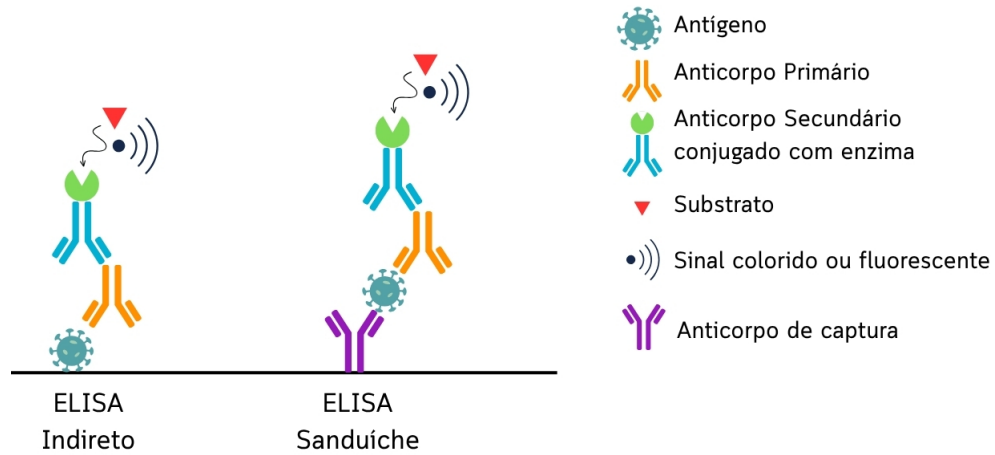
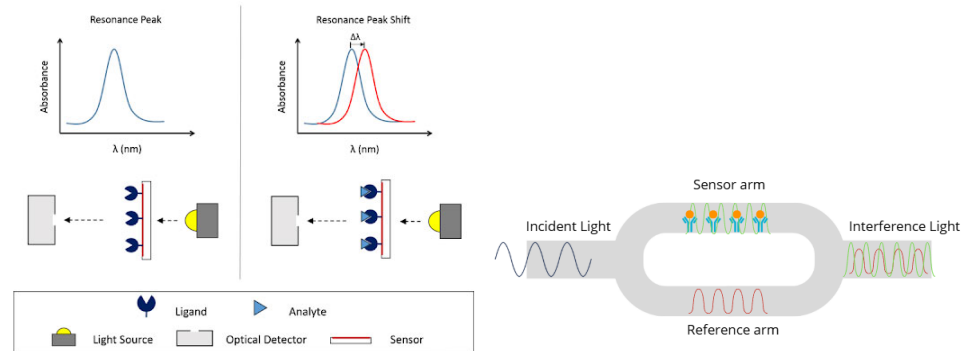


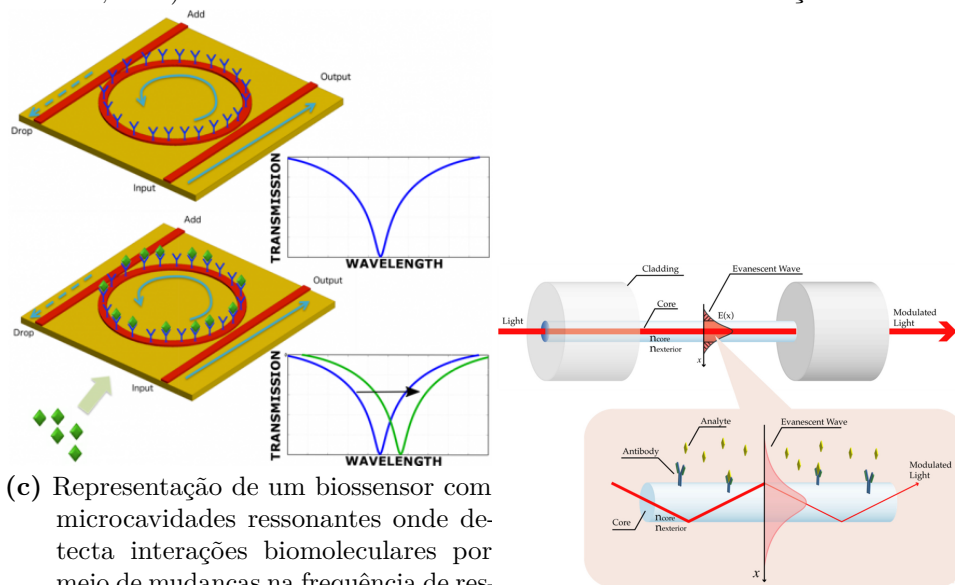
Figura 2 – Representação do esquema de detecção *label-dependent* do ELISA.

como mudança do índice de refração, da absorvância ou da intensidade da luz espalhada, sem a necessidade de marcadores. Dentre as abordagens mais consolidadas, destacam-se os sensores baseados em shift da *surface plasmon resonance* (SPR)/ *localized surface plasmon resonance* (LSPR) - Figura 3.a, interferometria óptica - Figura 3.b, microcavidades ressonantes - Figura 3.c e fibras ópticas - Figura 3.d (DOMINGUES et al., 2023).

Esses sistemas vêm sendo empregados em aplicações emergentes, como detecção digital de nanopartículas virais, quantificação de biomarcadores em tempo real, análises ambientais e segurança alimentar (ZANCHETTA et al., 2017). Essa classe de sensores também tem avançado na detecção de ácidos nucleicos, pequenas moléculas e até moléculas únicas, ampliando as possibilidades de diagnóstico clínico e pesquisa biomolecular com alta especificidade, além de permitir acesso a parâmetros cinéticos de ligação e eliminação das etapas de marcação (SANG et al., 2016; ZANCHETTA et al., 2017).



- (a) Representação de um sensor óptico baseado em shift plasmônico. Nanopartículas metálicas no sensor sofrem uma mudança em seu comprimento de onda ressonante em resposta a uma mudança no índice de refração no meio próximo ao metal devido a ligação específica com o analito. Fonte: (Nico Ya Life, 2023)
- (b) Representação de um Biossensor óptico baseado em interferometria óptica, onde um feixe de luz é dividido em dois braços – um sensível (funcionalizado com bioreceptores) e um de referência. A ligação do analito altera o índice de refração no braço sensível, gerando um deslocamento de fase detectado na recombinação dos feixes.



- (c) Representação de um biossensor com microcavidades ressonantes onde detecta interações biomoleculares por meio de mudanças na frequência de ressonância de uma cavidade óptica (ex. microrressonadores em anel, discos ou esferas). A ligação do analito à superfície funcionalizada altera o índice de refração local, deslocando o comprimento de onda ressonante. Fonte: (Politecnico di Milano. Photonics Lab, 2024)
- (d) Representação de um biossensor baseado em fibra óptica onde a ligação do analito altera localmente o índice de refração (RI), afetando o campo evanescente (EW) e consequentemente as propriedades da luz guiada (intensidade, fase, etc.), permitindo a detecção. Fonte: (SOARES et al., 2021).

Figura 3 – Representação dos esquemas de funcionamentos dos biossensores ópticos label-free.

3 Transdutor óptico: Nanopartículas de ouro

O transdutor óptico utilizado neste trabalho consiste em AuNbs submetidos a um processo de biofuncionalização, no qual moléculas de biorreconhecimento são imobilizadas em suas extremidades esféricas. Essas moléculas são responsáveis por promover a ligação específica de analitos presentes em amostras de soro humano. A detecção é baseada em alterações na difusividade rotacional dos biossensores, as quais são quantificadas por meio de medições de DDLS. Diferentemente de técnicas que monitoram diretamente o deslocamento do pico de ressonância (plasmonic shift), neste trabalho o efeito de LSPR é utilizado para facilitar o mapeamento do movimento browniano das partículas. Isso é possível por meio da análise das flutuações na intensidade da luz despolarizada espalhada, moduladas pelas alterações dinâmicas induzidas pelas interações moleculares na superfície dos biossensores de AuNbs.

3.1 Nanobastões de Ouro

O ouro em escala nanométrica destaca-se por sua elevada versatilidade, atribuída a propriedades físico-químicas e biológicas únicas, como a alta estabilidade, características ópticas e eletrônicas singulares, além de sua biocompatibilidade. Em razão dessas propriedades, as nanopartículas de ouro têm sido amplamente empregadas no desenvolvimento de soluções nanotecnológicas voltadas para as áreas médica e farmacêutica, com aplicações que incluem testes diagnósticos, sistemas de liberação controlada de fármacos e formulação de vacinas (GEORGEIOUS et al., 2024).

A síntese dos AuNbs utilizada nesse trabalho foi pelo método *seedless* - Figura . Ela é iniciada a partir de uma solução aquosa contendo o surfactante CTAB, ácido cloroáurico (HAuCl_4), nitrato de prata (AgNO_3) e uma solução etanólica de resveratrol, todos mantidos à temperatura ambiente. A formação de AuNbs é desencadeada pela rápida adição de uma solução aquosa de borohidreto de sódio (NaBH_4), recém-preparada e mantida a 4°C . Em seguida, a mistura é incubada em banho térmico a 70°C por um período de 4 a 6 horas, com aquecimento gradual para evitar a formação de nanoesferas - Figura 4 . O sucesso da síntese depende de condições estritamente controladas, especialmente das concentrações dos reagentes, uma vez que pequenas variações podem comprometer a formação dos AuNbs. O nitrato de prata (AgNO_3) atua no controle da razão de aspecto dos nanobastões, modulando o comprimento de onda da ressonância longitudinal através da modulação do crescimento longitudinal dos AuNbs - Figura 5. O resveratrol, por sua vez, atua como redutor fraco, e um dos seus papéis é formar micelas de CTAB e resveratrol para fortalecer a adsorção faceta-seletiva com CTAB, facilitando assim o crescimento

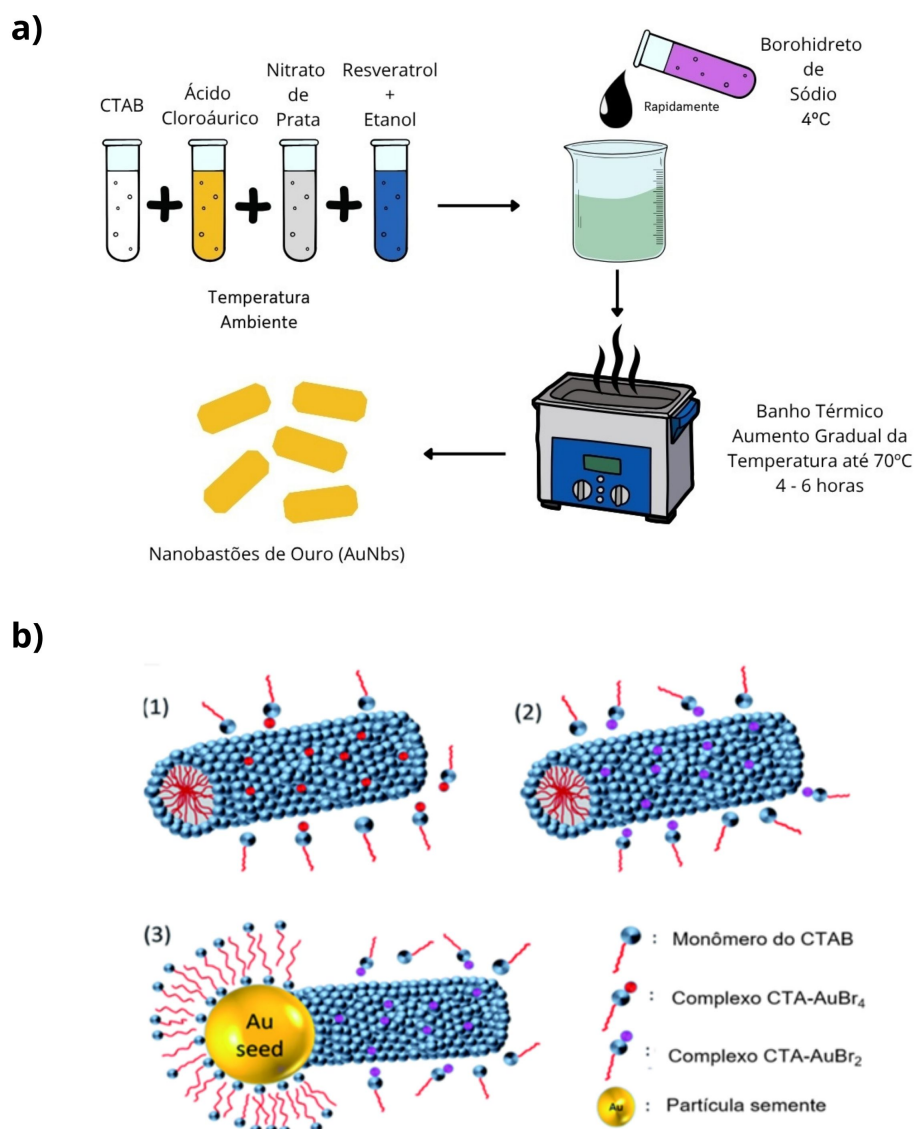


Figura 4 – a) Representação do esquema de síntese dos AuNbs pelo método *seedless*. b) Os monômeros de CTAB se complexam com as espécies iônicas Au³⁺ da solução de crescimento aprisionando-as dentro das micelas formadas (1). Com a adição do redutor brando as espécies complexadas são reduzidas a Au⁺ (2). A adição das sementes promove a redução do Au⁺ a Au⁰ dentro das micelas de CTAB, que direcionam o alongamento da estrutura (3). Fonte: (LAGE, 2020).

longitudinal das partículas. (WANG et al., 2016).

3.2 Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada - LSPR

Na SPR, o campo elétrico da luz incidente pode ser transferido para excitar coletivamente os elétrons da banda de condução de materiais metálicos. Essas oscilações coletivas, denominadas oscilações plasmônicas localizadas, ocorrem de forma coerente em uma frequência ressonante que depende fortemente de parâmetros como a composição, o tamanho, a geometria, o meio dielétrico ao redor e a distância de separação entre

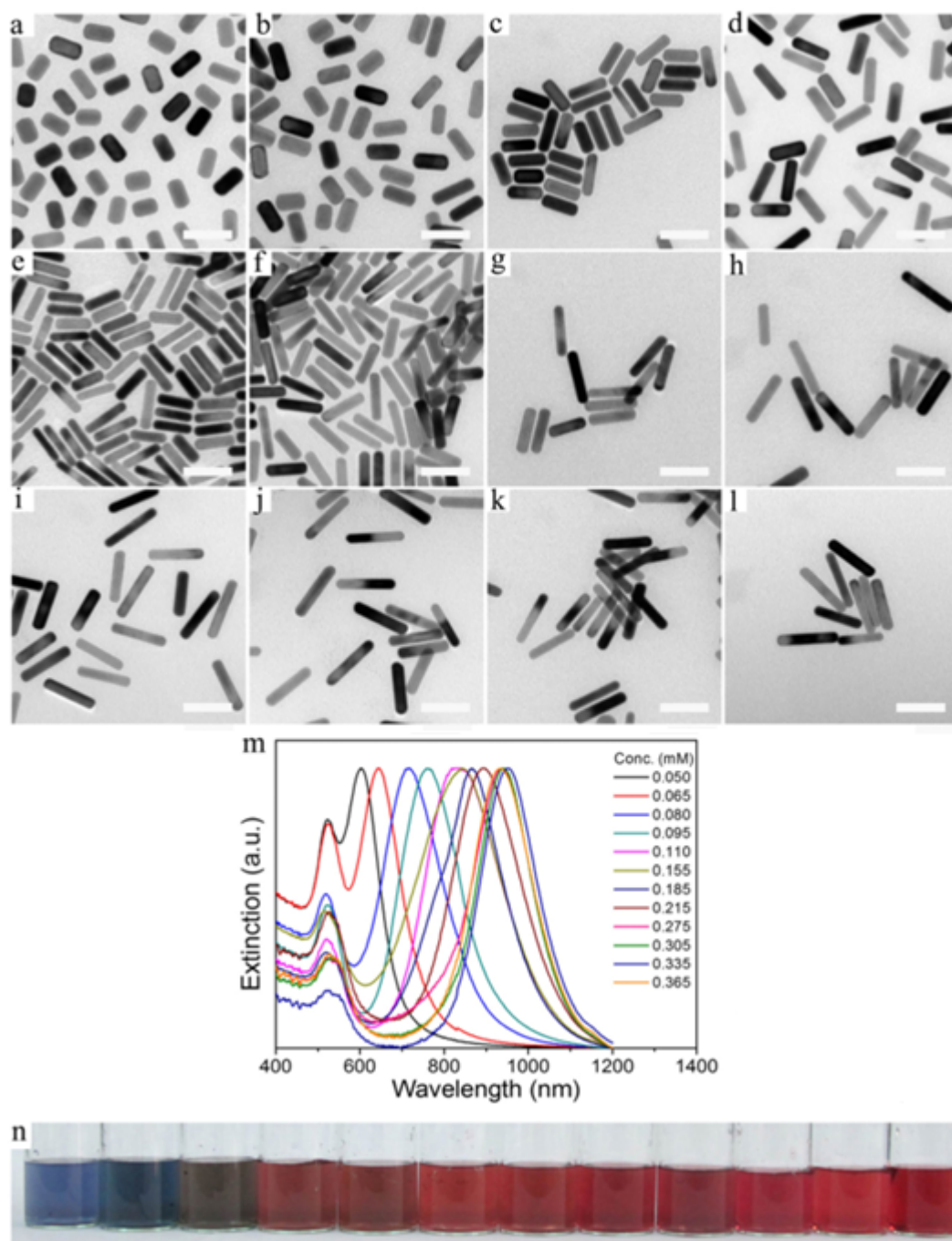


Figura 5 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Trasmissão: (a)–(l) e espectros de extinção UV-Vis (m) dos nanobastões de ouro sintetizados por meio da variação da concentração de AgNO₃ de 0,05 a 0,365 mM. As concentrações de CTAB, HAuCl₄, resveratrol e NaBH₄ foram mantidas constantes em 50, 0,5, 5 e 0,015 mM, respectivamente. Em (a)–(l), a barra de escala corresponde a 50 nm. Em (n), estão mostradas fotografias das soluções de GNRs com diferentes razões de aspecto. Fonte: (WANG et al., 2016)

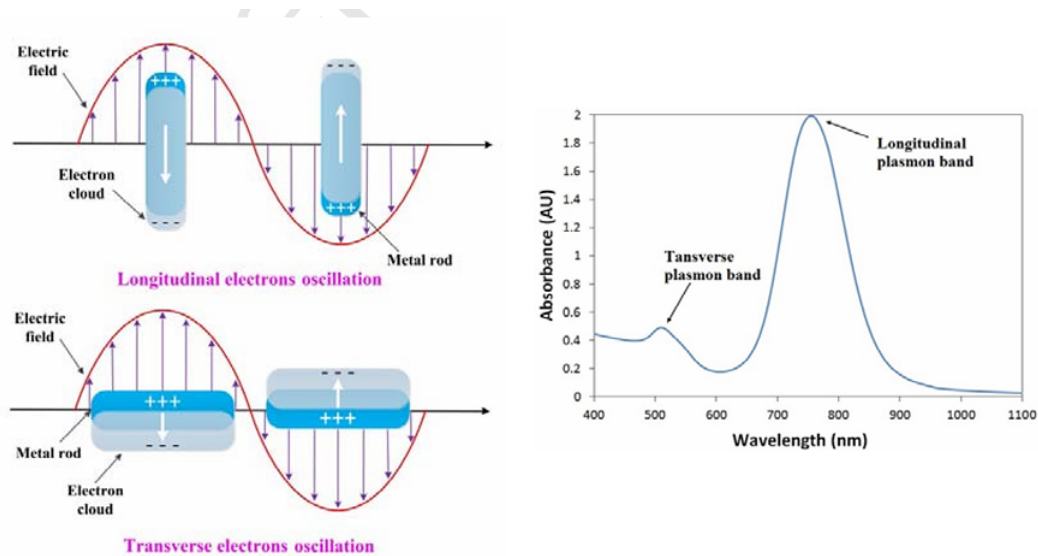


Figura 6 – Ilustração do LSPR de uma nanopartícula e o Espectro de extinção de uma amostra de nanobastões de ouro mostrando as picos de ressonância de um AuNbs. Fonte: (CAO et al., 2014).

nanopartículas (PETRYAYEVA; KRULL, 2011)

Particularmente, os AuNbs apresentam dois picos distintos de LSPR no espectro de extinção (Figura 6). O primeiro, denominado Ressonância Plasmônica Transversal (LSPR-T), apresenta menor intensidade sendo atribuído à oscilação coletiva dos elétrons de superfície ao longo do eixo menor dos nanobastões - eixo d . O segundo, conhecido como Ressonância Plasmônica Longitudinal (LSPR-L), apresenta maior intensidade e está relacionado à oscilação eletrônica ao longo do eixo maior da nanopartícula - eixo L . A posição espectral do pico LSPR-L depende diretamente do tamanho e da razão entre os eixos dos nanobastões. A possibilidade de modulação espectral dos picos LSPR permite o ajuste fino das propriedades ópticas dos nanobastões, viabilizando sua adaptação a diferentes aplicações (WANG et al., 2016).

3.3 Geometria dos Nanobastões de Ouro

Os AuNbs são partículas geometricamente anisotrópicas, o que permite que a oscilação coletiva dos elétrons de condução ocorra em dois eixos distintos: ao longo do eixo curto, denominado eixo transversal d , e ao longo do eixo longo, conhecido como eixo longitudinal L (WANG et al., 2016; CHEN et al., 2013; STONE; JACKSON; WRIGHT, 2011). Neste trabalho, modelamos a geometria do nanobastão como a de um cilindro de comprimento L e diâmetro D , com calotas semiesféricas em ambas as extremidades, conforme ilustrado na Figura 7. Com base nesse modelo, é possível definir as expressões para a área superficial total (A_t), o volume total (V_t) e a razão de aspecto (*aspect ratio*, AR) da partícula conforme descrito a seguir por (BATISTA, 2022):

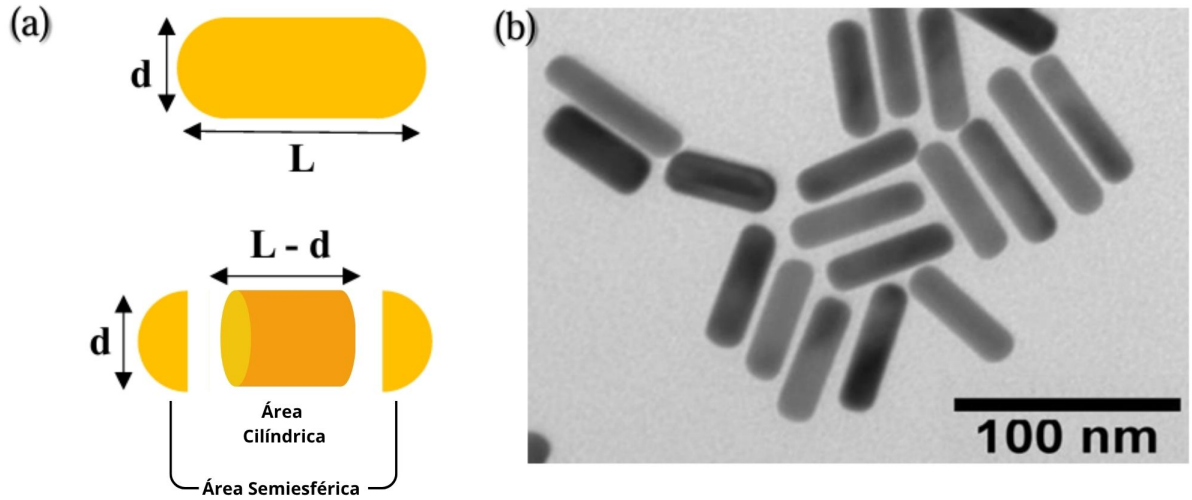


Figura 7 – a) Modelo dos AuNbs. b) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão produzidas no centro de Microscopia da UFMG. . Fonte: (BATISTA, 2022).

$$A_t = \frac{(L - D)\pi D}{2} + \pi D^2 = A_{\text{cilindro}} + 2A_{\text{semiesfera}} \quad (3.1)$$

$$V_t = \frac{\pi D^2}{4} \left[(L - D) + \frac{2D}{3} \right] = V_{\text{cilindro}} + 2V_{\text{semiesfera}} \quad (3.2)$$

$$AR = \frac{L}{D} \quad (3.3)$$

Ao longo deste trabalho, considera-se que a superfície dos AuNbs é composta por duas regiões distintas, conforme ilustrado na Figura 7: a área cilíndrica e as áreas semiesféricas nas extremidades. A região cilíndrica encontra-se recoberta pelo surfactante catiônico CTAB, responsável por conferir carga positiva à superfície e, conseqüentemente, estabilidade coloidal ao sistema, porém também atuando como sítio de adsorção preferencial para moléculas negativamente carregadas presentes em matrizes complexas, o que favorece a ocorrência de ligações inespecíficas. Por outro lado, as extremidades semiesféricas dos nanobastões correspondem às regiões funcionalizadas com o elemento de biorreconhecimento, onde podem ocorrer tanto ligações específicas, mediadas por complementaridade molecular entre analito e bioreceptor, quanto ligações inespecíficas residuais. Essa distinção entre as regiões é fundamental para a interpretação dos resultados experimentais e para a compreensão da origem das variações de estabilidade e sinal óptico observadas ao longo das análises.

3.4 Coeficiente De Difusão De Nanobastões

Partículas coloidais dispersas em um meio líquido viscoso realizam movimento browniano, caracterizado por deslocamentos aleatórios resultantes de colisões com moléculas do solvente (SALINAS, 2005). A intensidade da luz espalhada por essas partículas sofre flutuações temporais, as quais carregam informações sobre o coeficiente de difusão das partículas em suspensão (TSCHARNUTER, 2006). Partículas com geometria anisotrópica apresentam coeficientes de difusão distintos daqueles observados para partículas esféricas em movimento browniano, uma vez que possuem eixos não simétricos. Nesses casos, é necessário considerar tanto o movimento translacional quanto o rotacional das partículas. Segundo (TIRADO; MARTÍNEZ; TORRE, 1984), ao estudar fragmentos rígidos de DNA com razão de aspecto variando entre 2 e 20, foram propostas expressões corrigidas para os coeficientes de difusão translacional (D_{Tr}) e rotacional (D_R) de partículas cilíndricas alongadas:

$$D_{Tr} = \frac{k_B T}{3\pi\eta L} F(AR) \quad (3.4)$$

$$D_{Rot} = \frac{3k_B T}{\pi\eta L^3} G(AR) \quad (3.5)$$

Nas expressões propostas por (TIRADO; MARTÍNEZ; TORRE, 1984), as funções $F(AR)$ e $G(AR)$ representam correções geométricas que dependem da razão de aspecto ($AR = \frac{L}{d}$) do cilindro alongado:

$$F(AR) = \ln\left(\frac{L}{d}\right) + 0.312 + \frac{0.565}{\frac{L}{d}} - \frac{0.1}{\left(\frac{L}{d}\right)^2} \quad (3.6)$$

$$G(AR) = \ln\left(\frac{L}{d}\right) - 0.662 + \frac{0.917}{\frac{L}{d}} - \frac{0.05}{\left(\frac{L}{d}\right)^2} \quad (3.7)$$

Nota-se que o coeficiente de difusão rotacional (D_{Rot}) é mais sensível às variações no comprimento (L) - dependência L^3 , do que o coeficiente de difusão translacional (D_{Tr}) - dependência L , tal característica é explorada na técnica da Plataforma BioSearch.

4 Espalhamento Dinâmico de Luz - DLS

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), também referida como Espectroscopia de Correlação de Fótons, constitui uma abordagem bem estabelecida para o estudo de propriedades físico-químicas de sistemas coloidais, macromoléculas e polímeros em suspensão (TSCHARNUTER, 2006; GLIDDEN; MUSCHOL, 2012; SAKHO et al., 2017). Ainda na década de 1960, Pecora (1985) introduziu o conceito de espalhamento de luz tempo-dependente, demonstrando que a análise da flutuação da intensidade da luz espalhada por suspensões de macromoléculas fornece acesso direto a grandezas relacionadas ao movimento browniano dessas espécies. Especificamente, a partir da distribuição espectral dessas flutuações, é possível extrair os coeficientes de difusão translacional e rotacional, os quais estão intrinsecamente relacionados ao raio hidrodinâmico das partículas em solução (TSCHARNUTER, 2006; SAKHO et al., 2017).

A taxa de flutuação da intensidade da luz espalhada é determinada por meio da análise da função de autocorrelação temporal, o que permite a caracterização do comportamento difusivo das partículas em escala nanométrica. No caso de partículas anisotrópicas, como elipsoides ou cilindros alongados, Glidden e Muschol (2012) demonstraram que a interação com um feixe de luz com polarização vertical (V) pode induzir a rotação do plano de polarização do campo eletromagnético espalhado, resultando em um componente com polarização horizontal (H). A presença desse componente despolarizado no espalhamento fornece uma via experimental para a separação entre os efeitos da difusão translacional (D_{Tr}) e rotacional (D_{Rot}).

Quando a análise é realizada na configuração ótica homódina, isto é, utilizando apenas o sinal espalhado, o método conhecido como Espalhamento Dinâmico de Luz Despolarizado (*Depolarized Dynamic Light Scattering*, DDLS) torna-se particularmente útil. Essa abordagem permite não apenas estimar o raio hidrodinâmico equivalente de partículas, mas também acessar parâmetros morfológicos reais, como o comprimento e o diâmetro de nanobastões metálicos dispersos em solução (GLIDDEN; MUSCHOL, 2012). No presente trabalho, essa capacidade é explorada no contexto da Plataforma Portátil de Biodeteção BioSearch - Figura 8.

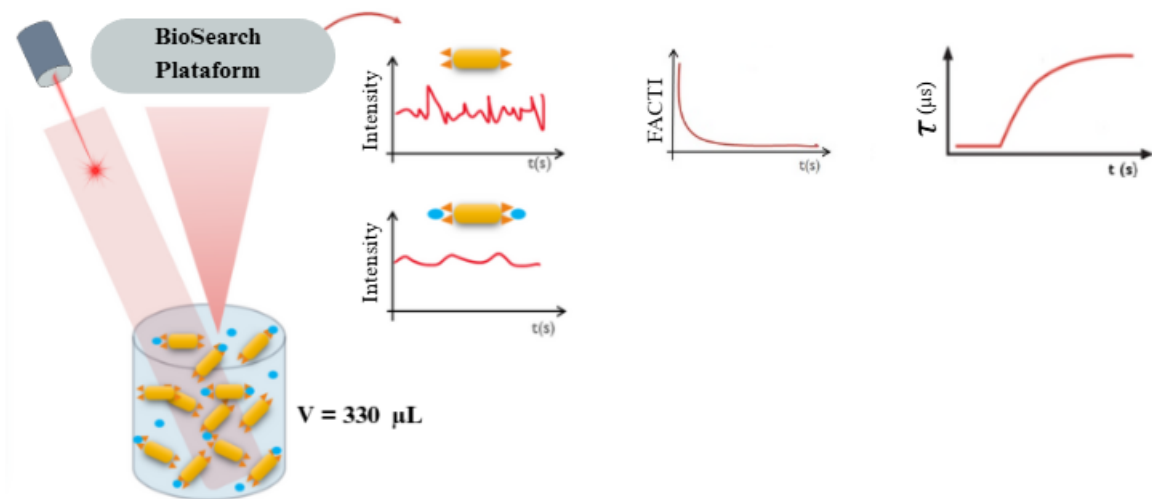


Figura 8 – Esquema das medições do leitor ótico da BioSearch. Uma luz monocromática incide sobre os nanobiossensores e a luz retroespalhada é coletada pela unidade de detecção, que mede as variações temporais intensidade de luz devido à dinâmica dos AuNbs e as funções de autocorrelação temporal da intensidade de luz espalhada (FACTI). A análise das FACTIs gera informações da dinâmica difusiva. Fonte: (JUNQUEIRA, 2020).

5 Plataforma BioSearch

A Plataforma BioSearch, é uma ferramenta de detecção analítica na configuração de retroespalhamento e em modo despolarizado, garantindo que somente partículas anisotrópicas (os AuNbs) sejam analisadas. Nessa abordagem, utiliza-se o princípio do Espalhamento Dinâmico de Luz Despolarizado (DDLS), uma variação da técnica de DLS tradicional, discutido na seção 4. A tecnologia da BioSearch emprega biossensores ópticos de nanobastões de ouro do tipo *label-free* para detectar interações específicas com analitos de interesse, dispensando o uso de marcadores secundários e permitindo medições em tempo real. Os componentes presentes em amostras oriundas de matrizes complexas, como o soro humano, não afetam a polaridade da luz incidente e espalham luz de forma muito reduzida quando comparada aos AuNbs, portanto, não são detectados pela plataforma BioSearch. A anisotropia óptica dos AuNbs, aliada à configuração óptica do sistema de detecção despolarizada, permite que apenas os sinais provenientes dos biossensores sejam captados, garantindo especificidade nas medições mesmo em ambientes altamente complexos. Os biossensores utilizados consistem em nanobastões de ouro funcionalizados com elementos de reconhecimento (receptores) específicos para os analitos-alvo presentes em diferentes matrizes. Quando esses receptores se ligam às moléculas-alvo, ocorrem alterações na difusividade dos biossensores em solução, as quais podem ser detectadas por meio de medições ópticas baseadas no espalhamento dinâmico da luz dos biossensores anisotrópicos.

5.1 Hardware Óptico e Estrutura

O hardware óptico da plataforma BioSearch é baseado na tecnologia do Espectrômetro Portátil de Espalhamento de Luz (EPEL), registrada sob patente número BR1020160097657 (SIMAN; MESQUITA; LADEIRA, 2016) . Essa tecnologia foi desenvolvida no Laboratório de Física de Sistemas Biológicos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelos professores Oscar de Mesquita, Livia Siman e Luiz Orlando Ladeira. A tecnologia EPEL representa uma nova concepção óptica da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), permitindo a simplificação da montagem óptica e apresentando diversas vantagens em relação aos equipamentos tradicionais, tais como: tamanho reduzido, portabilidade, facilidade de manuseio, robustez, tempo de medição reduzido (na ordem de segundos), possibilidade de operação em ambientes iluminados sem necessidade de isolamento óptico, boa tolerância a vibrações e flexibilidade para configuração do sistema mecano-óptico em qualquer orientação espacial (BATISTA, 2022).

O sistema de leitura óptica da Plataforma BioSearch (Figura 9) é constituído por um laser de diodo com comprimento de onda $\lambda = 650$ nm e potência de 40 mW (Laserline),

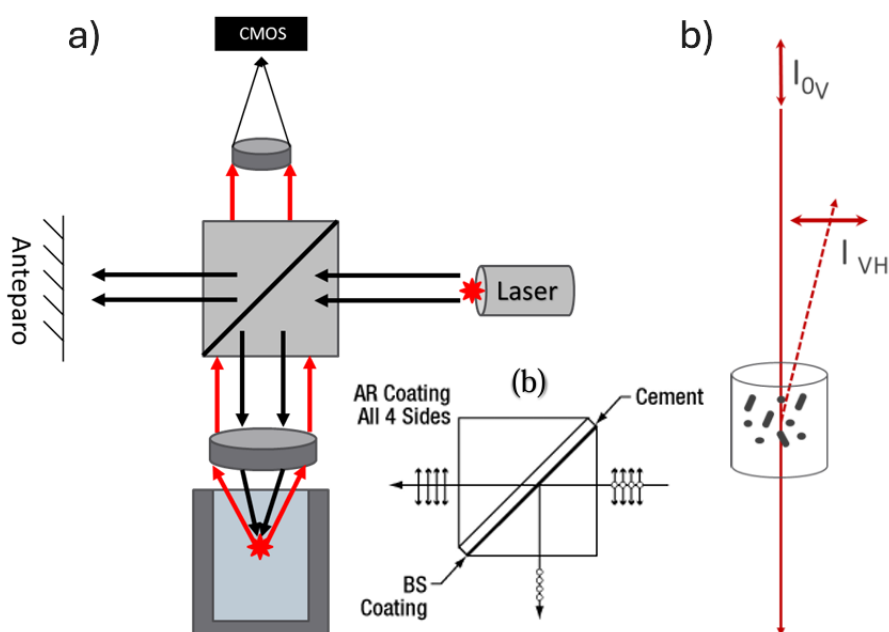


Figura 9 – a) Ilustração esquemática da montagem ótica da plataforma BioSearch uma fonte de luz coerente, um elemento óptico que reflete e transmite os feixes provenientes da fonte de luz e da amostra espalhadora, duas lentes convergentes, um elemento com propriedade de polarização e um conjunto de elementos fotoativos ou pixels. As setas pretas descrevem o caminho ótico dos feixes que não interagem com a amostra e as setas em vermelho descrevem aqueles que interagem e são retroespalhados pelas amostras. b) Ilustração esquemática da interação da luz com os biossensores de nanobastões de ouro produzindo o espalhamento VH. Fonte: (BATISTA, 2022)

um cubo divisor de feixe polarizador modelo CM1-PBS251 (Thorlabs), uma lente objetiva com distância focal de 8 mm (Thorlabs), uma lente adicional de 40 mm (Thorlabs) e uma câmera CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*) fornecida pela empresa Ivision Sistemas de Visão. O cubo divisor de feixe polarizador apresenta um revestimento em sua diagonal que permite a transmissão da componente vertical (V) da polarização da luz e reflete a componente horizontal (H) (Figura 9.b). Dessa forma, o feixe incidente sobre a amostra possui polarização horizontal, enquanto o feixe coletado pela câmera corresponde à polarização vertical. Assim, o sinal analisado é caracterizado como despolarizado.

5.2 Dados Analíticos

Diferentemente de um DLS típico, onde as funções de autocorrelação são analisados por um autocorrelacionador, na plataforma BioSearch, essa função é realizada por uma câmera. Ela armazena a sequência temporal de 64 pixels contidos na região de espalhamento, a uma taxa de captura de 42533 Hz (BATISTA, 2022). Dessa forma, é possível capturar flutuações da intensidade da luz espalhada pelos biossensores em função do tempo e calcular a função de correlação temporal de intensidade de luz espalhada (FACTI):

$$FACTI \propto \frac{\langle I(t)I(t + \Delta t) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \propto e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (5.1)$$

É possível analisar a sua taxa de decaimento (Γ), em MHz, por:

$$\Gamma = \frac{1}{\tau} = \frac{\ln\left(\frac{\Gamma(0)}{\Gamma(t_d)}\right)}{t_d} \cdot 10^{-6} \quad (5.2)$$

Onde t_d é o período entre cada *frame* de captura da câmera, portando $t_d = \frac{1}{42533} = 23,4\mu s$.

O tempo de difusão τ é calculado através de um ajuste linear simples do decaimento Γ utilizando-se os dois primeiros pontos da curva: o primeiro, $\Gamma(0)$ - chamado de C_0 (relacionado com a densidade de partículas espalhadoras na amostra), e o ponto subsequente: $\Gamma(t_d)$. Isso é válido, pois se trata de um sistema de partículas muito pequenas e de baixa razão de aspecto e, portanto, Γ elevado, o que faz a exponencial da intensidade decair rapidamente - Figura 10 (BATISTA, 2022):

$$\tau = \frac{1}{2q^2 D_T + 12D_R} \quad (5.3)$$

Onde $2q^2 D_T = \Gamma_{Tr}$ e $12D_R = \Gamma_{rot}$.

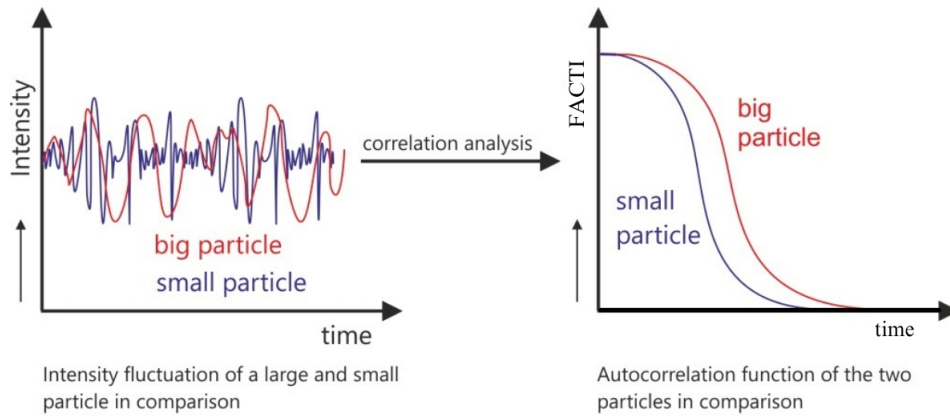


Figura 10 – Técnica DLS e comparação da curva de autocorrelação de intensidade de luz espalhada (FACTI) para pequenas e grandes partículas. Fonte: (3P Instruments GmbH & Co. KG,)

Devido ao modelo de ajuste inicialmente empregado, baseado apenas nos dois pontos da curva, os valores obtidos para a grandeza τ apresentaram elevada dispersão. Com o intuito de aprimorar a qualidade desses resultados, foi posteriormente implementado na plataforma BioSearch um novo algoritmo de ajuste baseado em modelagem por dupla exponencial. Este desenvolvimento foi realizado pelo doutorando Kennedy Batista Gonçalves. Contudo, na época da aquisição dos dados utilizados neste trabalho, essa

atualização ainda não havia sido incorporada ao sistema. Dessa forma, os resultados aqui apresentados ainda refletem as limitações do ajuste linear simples, o que se traduz em uma significativa variabilidade nos valores estimados de τ em medidas temporal.

A Figura 11.a ilustra comparativamente os dois métodos de ajuste. Observa-se que o modelo baseado em dupla exponencial (representado pela curva vermelha) proporciona uma aderência substancialmente superior aos dados experimentais (pontos azuis), quando comparado ao ajuste linear simples, cuja discrepância em relação aos dados brutos é notável. Como consequência direta, na Figura 11.b, é possível observar que a aplicação do modelo simplificado resulta em uma variância significativamente maior nos valores de τ (curva azul), enquanto o modelo de dupla exponencial (curva vermelha) promove uma redução expressiva dessa dispersão.

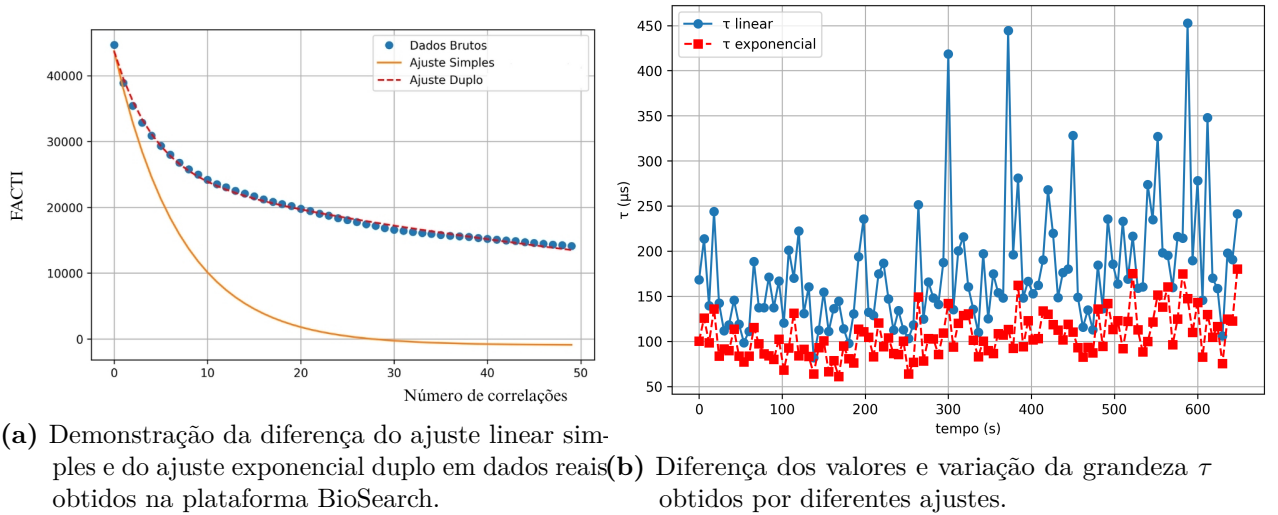


Figura 11 – Esquema da diferença entre ajuste linear simples e ajuste duplo exponencial nos dados da Plataforma BioSearch.

Tabela 1 – Grandezas e funções relacionadas a plataforma BioSearch.

Grandezas	Funções
$\eta = 8,93 \times 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{s}$	
$n_{\text{H}_2\text{O}} = 1,333$	$G(\text{AR} = 2) = 0,477$
$T = 298,15 \text{ K (} 25^\circ\text{C)}$	
$\text{AR} = 2$	
$q = 2,57 \times 10^7 \text{ m}^{-1}$	
$k_B = 1,381 \times 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$	
$\theta = 173 \pm 1^\circ$	$\Gamma_{\text{Rot}} = 39,3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$
$\lambda = 650 \times 10^{-9} \text{ m}$	
$\Gamma_{\text{delay}} = (2,1 \pm 0,5) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$\Gamma_{\text{Tr}} = 2,04 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$

Para os nanobastões utilizados na plataforma BioSearch com $L \approx 40 \text{ nm}$ e $d \approx 20 \text{ nm}$, verifica-se que Γ_{rot} é da ordem de 20 vezes maior que Γ_{Tr} conforme descrito na tabela

1. Isso permite que a taxa de decaimento (Γ) da Função de Autocorrelação Temporal da Intensidade (FACTI) seja aproximada por:

$$\Gamma = \frac{1}{\tau} = 12D_R \quad (5.4)$$

Assim, o tempo de decaimento depende majoritariamente do coeficiente de difusão rotacional (BATISTA, 2022):

$$D_R = \frac{3k_B T}{\pi\eta L^3} G(AR) = \frac{\Gamma_{Rot} - \Gamma_{delay}}{12} \quad (5.5)$$

E portanto:

$$L = \sqrt[3]{\frac{3k_B T}{\pi\eta D_R} \ln\left(\frac{L}{d}\right) - 0.662 + \frac{0.917}{\frac{L}{d}} - \frac{0.05}{\left(\frac{L}{d}\right)^2}} \quad (5.6)$$

Γ_{delay} está relacionando ao tempo necessário para que o sistema responda. A partir das equações 7.4 e 7.5, observa-se que a plataforma BioSearch apresenta maior sensibilidade a interações ocorridas nas regiões semiesféricas dos nanobastões, ou seja, ao longo do eixo L , cuja contribuição para o sinal é proporcional a L^3 . Em contraste, as interações ao longo da região cilíndrica, associadas ao eixo d , apresentam dependência mais fraca, governada pela função geométrica $G(AR)$. Apesar da menor contribuição relativa, essas ligações na área cilíndrica, denominadas de interações inespecíficas, ainda ocorrem e geram um ruído de fundo perceptível no sinal obtido pela plataforma BioSearch.

6 Potencial Zeta

O *potencial zeta* (ζ) é uma grandeza físico-química fundamental para a caracterização de sistemas, refletindo o potencial elétrico na região de cisalhamento da dupla camada elétrica formada ao redor de partículas carregadas em suspensão. Essa grandeza está diretamente relacionada à estabilidade coloidal e às interações eletrostáticas entre partículas e moléculas no meio, sendo de especial importância na análise de nanopartículas funcionalizadas, como os AuNbs utilizados neste trabalho. Quando dispersas em um meio líquido, partículas carregadas interagem com os íons presentes na solução, formando uma *dupla camada elétrica*, composta por:

- **Camada de Stern:** íons fortemente adsorvidos na superfície da partícula;
- **Camada de difusão:** íons fracamente ligados que se distribuem ao redor da superfície.

O potencial zeta corresponde ao potencial elétrico na superfície de cisalhamento, isto é, o limite entre a camada firmemente ligada e o fluido livre - Figura 12. Sua magnitude influencia a força repulsiva entre partículas, sendo um indicador da estabilidade do sistema coloidal.

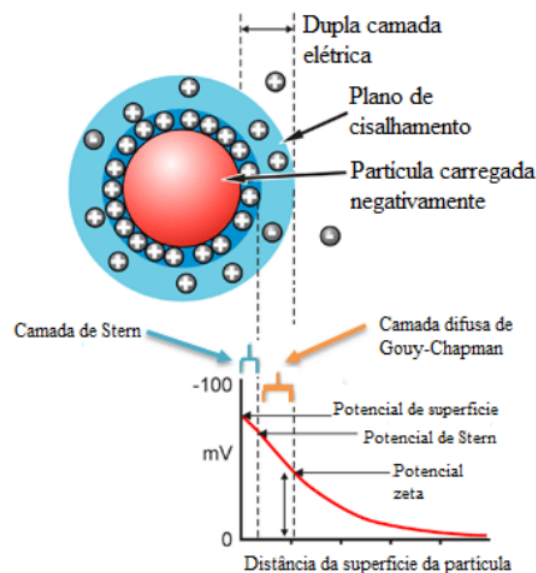


Figura 12 – Diagrama esquemático da dupla camada elétrica na superfície de um colóide: camada Stern e de difusão. Fonte: (KARMAKAR, 2019)

A determinação experimental do potencial zeta é realizada por meio da técnica de eletroforese de partículas combinada à análise de espalhamento de luz. Quando um campo

elétrico externo é aplicado à suspensão coloidal, as partículas carregadas migram com uma velocidade proporcional ao seu carregamento superficial. Essa velocidade é medida indiretamente por técnicas de Laser Doppler Velocimetry (LDV) ou Phase Analysis Light Scattering (PALS), e convertida em mobilidade eletroforética, a partir da qual o potencial zeta é estimado por meio da equação de Henry:

$$\zeta = \frac{3\eta\mu}{2\varepsilon f(\kappa a)} \quad (6.1)$$

onde:

- η é a viscosidade do meio,
- $\mu = \frac{v_{média}}{E}$ representa a mobilidade eletroforética da partícula, isto é, a velocidade com que uma partícula carregada se move em um fluido sob a ação de um campo elétrico unitário (E).
- ε é a permissividade dielétrica do solvente,
- $f(\kappa a)$ é a função de Henry, que depende da espessura da dupla camada elétrica e do raio da partícula.

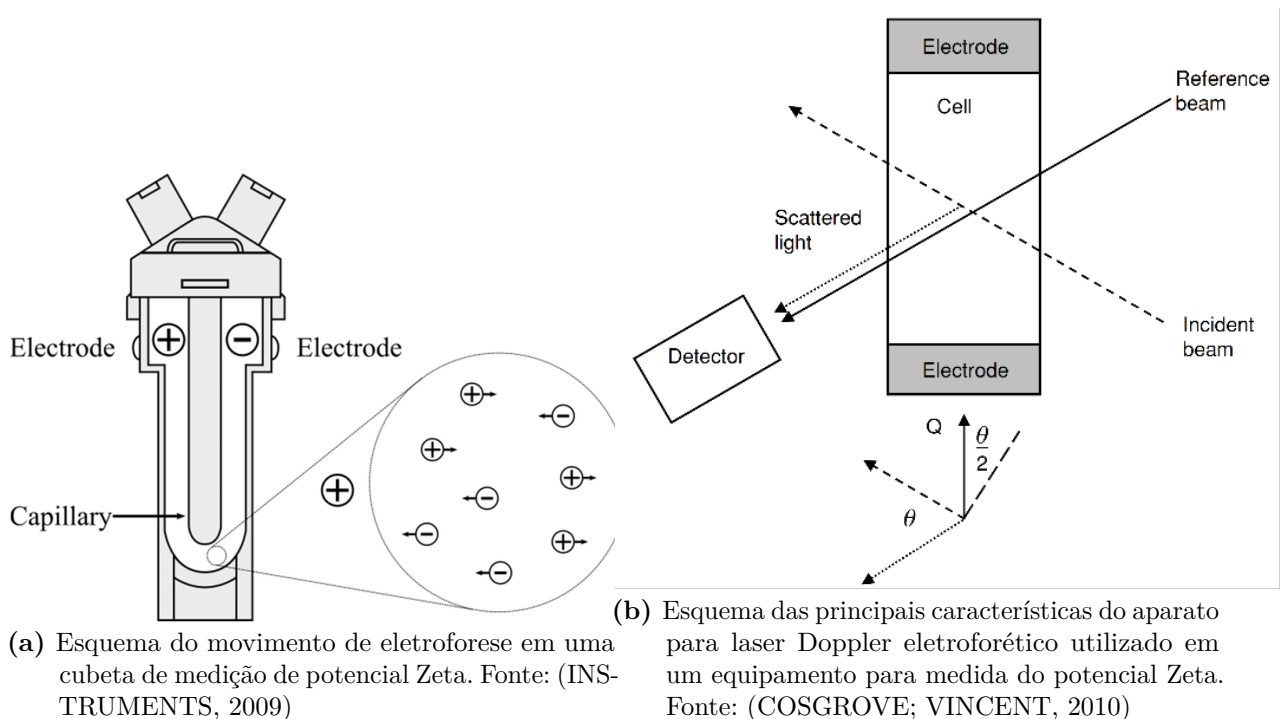


Figura 13 – Esquema medida potencial Zeta

Quando um campo elétrico é aplicado a uma suspensão coloidal de nanopartículas, estas passam a se deslocar lentamente na direção do eletrodo de polaridade oposta à de

sua carga elétrica. Esse deslocamento, ainda que sutil, é caracterizado pelo fenômeno da eletroforese, ou seja, o movimento induzido de partículas carregadas sob a influência de um campo elétrico - Figura 13.a

Para a análise da velocidade dessas partículas, faz-se uso do efeito Doppler. Um feixe laser é direcionado sobre a solução contendo as partículas em movimento. Ao incidir sobre uma partícula em deslocamento, parte da luz é espalhada com um pequeno desvio em sua frequência. A radiação espalhada interfere com a porção não desviada do feixe incidente, formando um padrão de interferência óptica. O sistema de detecção é capaz de registrar esse padrão e, com isso, determinar a frequência do desvio Doppler. Como o desvio está diretamente relacionado à velocidade das partículas, torna-se possível quantificar essa velocidade com precisão, e posteriormente, o potencial Zeta - Figura 13.b.

A determinação do potencial zeta foi empregada neste trabalho como método de avaliação da estabilidade coloidal dos AuNbs. Essa análise é essencial, pois o valor de zeta reflete a magnitude das forças repulsivas eletrostáticas entre partículas, que, quando suficientemente elevadas, evitam a agregação e garantem a dispersão estável das nanopartículas em meio líquido. De acordo com a literatura, sistemas coloidais são considerados estáveis quando o potencial zeta apresenta valores absolutos superiores a 30 mV (positivos ou negativos), assegurando repulsão eletrostática suficiente para impedir a agregação das partículas (BHATTACHARJEE, 2016). Dessa forma, as medidas de potencial zeta realizadas permitiram verificar a eficiência do revestimento superficial promovido pelo surfactante CTAB, bem como monitorar eventuais variações de estabilidade decorrentes das etapas de interação com a matriz biológica.

7 Biossensores

A construção dos biossensores para uso na plataforma BioSearch baseia-se na síntese de AuNbs e na aplicação de procedimentos químicos que permitem a ancoragem de moléculas de biorreconhecimento em suas extremidades. Esses procedimentos, denominados de bioconjugação, estão amplamente descritos na literatura (PEARCE et al., 2007; VERSIANI et al., 2016; JUNQUEIRA, 2020). A bioconjugação ocorre ao utilizar estruturas intermediárias conhecidas como *linkers* ou moléculas adaptadoras, que contêm, em uma de suas extremidades, grupos tiol e carboxila. A extremidade tiol possui alta afinidade por ouro e, quando ativado, o grupo carboxila pode se ligar covalentemente ao elemento de biorreconhecimento. O *linker*, utilizado para produção dos Biossensores foi o ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) - Figura 14, através do método de *crosslinking*, que envolve a ativação das carboxilas do MUA por meio da adição do agente EDAC (cloridato N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e do reagente acoplador NHS (N-hidroxisuccinimida). Essa combinação reage com grupos amina presentes na molécula de biorreconhecimento utilizada: a proteína N do SARS-CoV-2 (JUNQUEIRA, 2020).

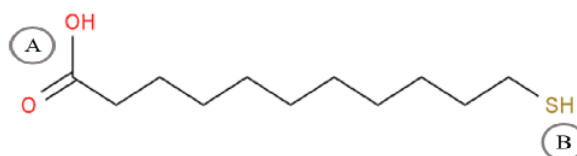


Figura 14 – A fórmula estrutural do MUA, ácido-11-mercaptoundecanóico, destaca suas duas importantes funcionalidades químicas. Na extremidade (A), o grupo carboxila permite interações com moléculas de biorreconhecimento, enquanto na extremidade (B), o grupo tiol confere afinidade com os AuNbs. Essas funcionalidades possibilitam uma ponte entre nanobastões de ouro e elementos de biorreconhecimento, facilitando o processo de bioconjugação para construção de biossensores. (CECCHET et al., 2006).

Essa proteína é um dos principais antígenos virais do SARS-CoV-2, sendo altamente imunogênica e presente em abundância durante a infecção viral. Por essas razões, ela induz uma resposta imune significativa e é amplamente utilizada como alvo em plataformas diagnóstica (HUANG et al., 2024). As regiões laterais do biossensor permanecem recobertas por um surfactante catiônico - CTAB, o qual confere carga positiva à superfície dos AuNbs em solução aquosa - Figura 15.

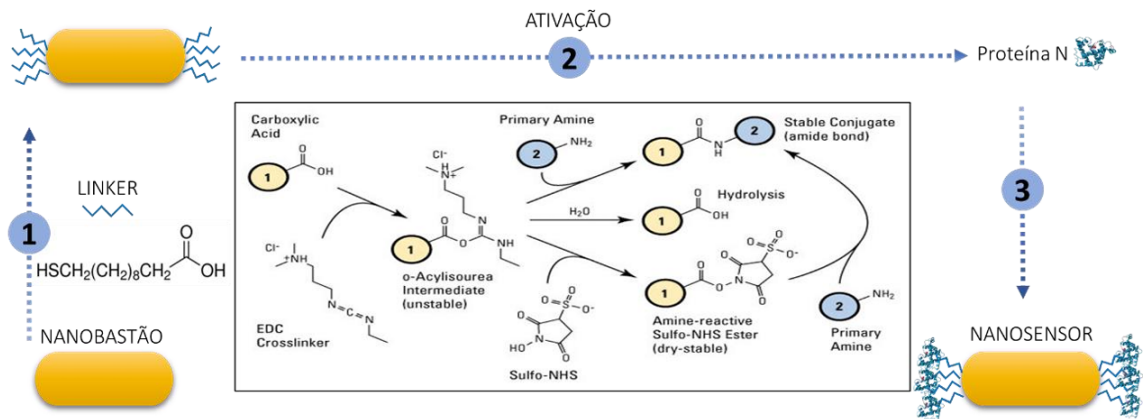


Figura 15 – Ilustração esquemática do processo de biofuncionalização dos nanobastões de ouro (AuNbs) por meio do protocolo de *crosslinker*.

- 1 – Ancoragem do linker MUA (ácido 11-mercaptoundecanoico) à superfície dos AuNbs;
- 2 – Ativação das carboxilas do MUA por reagentes de acoplamento (EDC/NHS);
- 3 – Imobilização covalente da molécula de reconhecimento — neste caso, a proteína N (nucleocapsídeo) do COVID-19.

8 Ligações inespecíficas nos sensores label-free

As ligações inespecíficas ocorrem quando moléculas presentes na amostra (como proteínas, lipídios ou ácidos nucleicos), não específicas aos elementos de bioreconhecimento, adsorvem-se à superfície do sensor. Esse fenômeno é particularmente crítico em biossensores ópticos baseados em SPR, onde a adsorção não específica pode gerar falsos positivos ou sobreposição de sinais, mascarando a resposta específica (HOMOLA, 2008). No caso da BioSearch, a presença de interferentes na matriz das amostras levam à adsorção de moléculas à superfície cilíndrica dos nanobastões, mediada por interações eletrostáticas, e à ligações de baixa afinidade às extremidades dos nanobastões, mediado por interações fracas devido ao momentâneo encaixe espacial dos interferentes e a molécula de bioreconhecimento ((REVERBERI; REVERBERI, 2007). Tais fenômenos acarretam em alterações nos coeficientes de difusão rotacional dos bastões, o que causa ruído no sinal.

Causas das Ligações Inespecíficas

Interações eletrostáticas: Superfícies carregadas positivamente (como aquelas recobertas por CTAB, frequentemente utilizado na síntese de AuNbs) atraem moléculas com carga oposta de maneira não seletiva (HOMOLA, 2008).

Hidrofobicidade: Áreas não funcionalizadas do sensor podem adsorver proteínas plasmáticas (como a albumina) por meio de interações hidrofóbicas do tipo alifáticas, aromáticas, aminoácidos residuais, lipídica e Van der Waals (DAMBORSKY et al., 2016). Na alifática, cadeias apolares tendem a se agrupar no meio aquoso. Anéis aromáticos interagem entre si por empilhamento paralelo ou em ângulo, podendo levar à agregados estáveis de proteínas ou ligantes aromáticos ao longo da superfície do sensor. Aminoácidos residuais carregados (como lisina ou arginina) podem estabelecer ligações não específicas na região de bioreconhecimento. Moléculas anfipáticas como os lipídios tendem a se organizar em micelas e bicamadas próximos a superfície do sensor, podendo gerar ruído na resposta do sensor. Já as forças de Van der Waals, resultantes de flutuações temporárias na distribuição eletrônica das moléculas, promovem interações atrativas de curto alcance entre a superfície do sensor e grupos funcionais apolares das biomoléculas presentes na amostra. Embora essas interações sejam energeticamente fracas de forma individual, seu caráter cumulativo pode gerar adsorções significativas, especialmente em matrizes biológicas complexas (ISRAELACHVILI, 2011)

Proteína funcionalizadora: Mesmo após a imobilização específica da proteína capturadora (como anticorpos ou antígenos), pode ocorrer ligação inespecífica causada por

desnaturação parcial, orientação inadequada da proteína ou adsorção em sítios carregados da superfície funcionalizada. Essas interações proteína-proteína e eletrostáticas residuais, apesar de fracas, aumentam o sinal de fundo e comprometem a seletividade do biossensor, principalmente em amostras complexas como soro e plasma (LICHTENBERG et al., 2019; CONTRERAS-NARANJO; AGUILAR, 2019).

8.1 Abordagens utilizadas na mitigação das interações inespecíficas

A ocorrência de ligações inespecíficas constitui um dos principais obstáculos à aplicação clínica de biossensores *label-free*, comprometendo tanto a sensibilidade quanto a especificidade das análises. Esses fenômenos decorrem de interações físico-químicas entre componentes da matriz biológica e a superfície sensora, gerando ruídos nos sinais que mascaram a detecção do alvo molecular. Neste contexto, pesquisas recentes tem convergido para abordagens multifatoriais que combinam princípios de engenharia de superfícies com otimização de parâmetros experimentais:

- **Modificações de superfície com polímeros antifouling:** Uma das estratégias envolve o uso de revestimentos hidrofílicos, como o polietilenoglicol (PEG) e seus derivados (técnica antifouling). Esses materiais, frequentemente organizados em camadas auto-organizadas (SAMs), formam uma barreira altamente hidratada que inibe a aproximação e adsorção não específica de proteínas, conferindo maior especificidade e estabilidade às superfícies dos sensores (SOLER; LECHUGA, 2022). Contudo, em fluidos biológicos integrais, como soro e plasma, as camadas baseadas em PEG podem apresentar limitações, como degradação oxidativa em aplicações de longo prazo (LIU et al., 2019). Alternativas como polímeros zwitteriônicos (materiais com cargas positivas e negativas balanceadas em sua estrutura, oferecendo alta hidrofiliidade, resistência a adesão indesejada (fouling) e biocompatibilidade) têm sido exploradas para melhorar a resistência as ligações inespecíficas em condições desafiadoras (SOLER; LECHUGA, 2022; LIU et al., 2019).
- **Bloqueio com proteínas inertes:** Protocolos convencionais empregam albumina sérica bovina (BSA) para saturar sítios de adsorção remanescentes após a funcionalização primária. Em sensores *label-free*, práticas de bloqueio utilizam misturas otimizadas: após bloqueio inicial com BSA, realiza-se enxágue com Tween-20 em PBS. Estratégia que demonstrou reduzir substancialmente o ruído de fundo antes da detecção, mantendo a especificidade do sinal (Drexel University, 2016).
- **Otimização de parâmetros físico-químicos (força iônica e pH):** O ajuste das condições físico-químicas da solução, especialmente a força iônica e o pH, tem se mostrado uma estratégia para mitigar interações inespecíficas em biossensores

label-free. A força iônica, geralmente modulada pela concentração de NaCl, influencia o comprimento de Debye, ou seja, o alcance das interações eletrostáticas entre biomoléculas e a superfície sensora. Aumentos na concentração salina reduzem esse comprimento, atenuando a atração de interferentes carregados presentes na matriz biológica e diminuindo a adsorção não específica e o pH ajusta a carga líquida das biomoléculas e da superfície, favorecendo repulsões eletrostáticas que também diminuem a adsorção indesejada.(VASILESCU et al., 2025).

8.2 Proposta de mitigação das interações inespecíficas: Nanocleaners

Diferentemente dos métodos apresentados anteriormente, a proposta de mitigação das interações inespecíficas na plataforma óptica BioSearch baseia-se em uma nova metodologia que utiliza partículas denominadas *Nanocleaners*. Esses são AuNbs com morfologia mais alongada, apresentando comprimento aproximado de $L \approx 60$ nm e diâmetro $d \approx 12$ nm, o que desloca seu pico de ressonância plasmônica para comprimentos de onda superiores a 800 nm, fora da faixa de detecção da plataforma BioSearch.

A estratégia consiste na adição prévia do Nanocleaner à amostra de matriz complexa (como soro humano). Os interferentes presentes na amostra se ligam preferencialmente à região cilíndrica do Nanocleaner por meio de interações eletrostáticas, devido à carga residual positiva conferida pela presença de surfactante CTAB. Após essa etapa de pré-adição, a amostra contendo Nanocleaner e matriz complexa é adicionada à solução contendo os biossensores. Como os interferentes já foram sequestrados pelo Nanocleaner, a ocorrência de ligações inespecíficas no biossensor é reduzida, resultando em menor ruído de fundo durante a leitura óptica, conforme ilustrado na Figura 16.

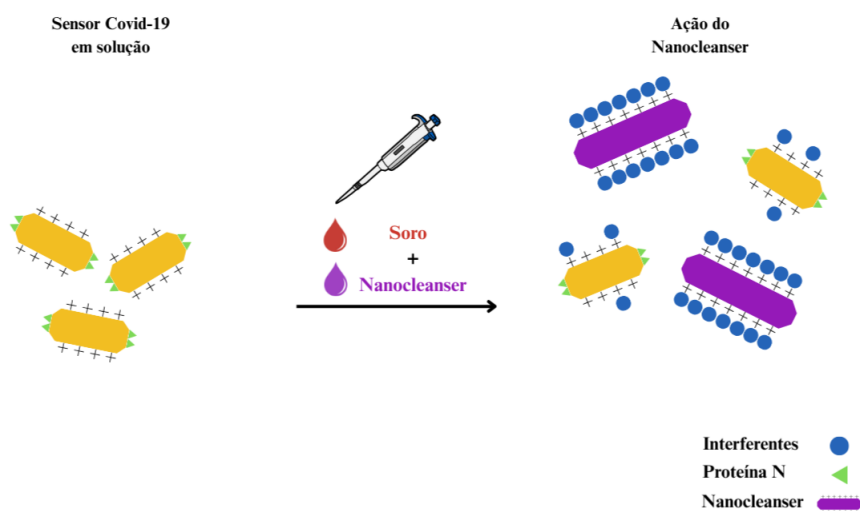


Figura 16 – Representação da ação do Nanocleaner como agente limpador

9 Objetivos

9.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar uma estratégia de mitigação das interações inespecíficas, utilizando nanopartículas auxiliares (Nanocleansers) em biossensores ópticos do tipo label-free, formados por nanobastões de ouro funcionalizados com a proteína N de SARS-CoV-2, com aplicação na plataforma BioSearch para detecção do anticorpo anti-N em amostras reais de soro humano.

9.2 Objetivos específicos

- Avaliar e quantificar o impacto das interações inespecíficas nos nanobastões de ouro (AuNbs).
- Avaliar e quantificar o impacto das interações inespecíficas nos biossensores funcionalizados com proteína N do SARS-CoV-2 (Covid-19).
- Investigar a eficácia da proposta de abordagem baseada no uso de Nanocleansers como agentes mitigadores de interações inespecíficas, bem como identificar e classificar os fatores que influenciam diretamente sua eficiência.
- Definir e implementar protocolos experimentais que assegurem a eficácia dos Nanocleansers, independentemente da amostra de soro utilizada.
- Validar a eficácia da metodologia proposta por meio de experimentos na plataforma BioSearch, comparando o desempenho analítico em amostras de soro humano negativas e positivas para a presença do anticorpo anti SARS, com e sem a presença dos Nanocleansers.

10 Metodologia

10.1 Síntese dos Nanoinsumos

10.1.1 Síntese dos Nanobastões de Ouro

Para a síntese dos nanobastões de ouro (AuNbs) e Nanocleaners empregados neste trabalho, o processo foi aprimorado pelo Graduando Enzo Morrison Figueiredo Costa Jorge. Inicialmente adiciona-se ácido cloroáurico ($HAuCl_4$, Sigma-Aldrich Corporation, EUA) a 0,7 mM, seguido de nitrato de prata ($AgNO_3$, Sigma-Aldrich Corporation, EUA) a 0,1 mM e, por fim, uma solução de resveratrol 5 mM diluída em álcool etílico em uma solução de CTAB (Sigma-Aldrich Corporation, EUA) a 49mM. Nesse estágio, ocorre a redução parcial dos íons Au^{3+} para Au^{+1} , evidenciada pela mudança de coloração da solução. Subsequentemente, foi introduzida uma solução aquosa de borohidreto de sódio ($NaBH_4$, Sigma-Aldrich Corporation, EUA) a 0,07 mM, mantida a 4°C, promovendo a nucleação e a formação das sementes de ouro, as quais evoluem para o crescimento anisotrópico dos nanobastões. Após essa etapa, a solução foi gradualmente aquecida até 70°C em banho térmico, permanecendo a essa temperatura por aproximadamente duas horas para completar o processo de crescimento, resultando em AuNbs de pico de ressonância longitudinal em torno de 650 nm . Ressalta-se que a variação nas concentrações de nitrato de prata e borohidreto permite o controle das dimensões dos nanobastões obtidos.

10.1.2 Síntese dos Nanocleaners

A síntese dos Nanocleaners segue o mesmo protocolo reacional utilizado para a obtenção dos AuNbs descritos anteriormente, diferenciando-se apenas pelas proporções dos reagentes empregados. As alterações realizadas foram as seguintes: CTAB a 49 mM; $HAuCl_4$ a 0,7 mM; $AgNO_3$ a 0,2 mM; resveratrol a 5 mM e $NaBH_4$ a 0,14 mM. Devido às maiores concentrações de nitrato de prata e borohidreto de sódio, os Nanocleaners resultantes apresentam uma morfologia mais alongada, o que desloca o pico de ressonância plasmônica de superfície (SPR) para comprimentos de onda superiores a 800 nm.

10.1.3 Obtenção da proteína N recombinante de COVID-19

A proteína N recombinante do SARS-CoV-2 foi gentilmente fornecida pelo Professor Flávio Guimarães da Fonseca, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Durante a execução do trabalho, foram recebidos diversos lotes

dessa proteína, cada um contendo 400 μL em concentração aproximada de 1mg/mL. Os lotes foram alíquotados em microtubos estéreis (20 μL por alíquota) e armazenados a 70°C para uso posterior. É possível estimar seu raio hidrodinâmico de valor próximo de 5 nm, de acordo com a relação proposta por Erickson (2009):

$$d = \sqrt[3]{3 \times MW}$$

Em que d é o diâmetro hidrodinâmico da molécula, em nanômetros, e MW é a massa molecular de 48kDa para a proteína N.

10.1.4 Síntese dos nanossensores para COVID-19

O protocolo de bioconjugação utilizado neste estudo foi estruturado em três fases sequenciais:

1. Inclusão de um agente funcionalizador (linker) à superfície dos nanobastões de ouro (AuNbs)
2. Ativação química do linker
3. Imobilização covalente da biomolécula de interesse

Inicialmente, foi preparada uma solução aquosa de AuNbs a uma concentração de 200 pM, mantendo-se uma proporção entre CTAB e AuNbs de $3 \cdot 10^7$, parâmetro cuidadosamente controlado para garantir a estabilidade coloidal ao longo de todo o processo. Na etapa de funcionalização, empregou-se o MUA (Sigma-Aldrich), cuja concentração foi calculada com base na seguinte expressão:

$$[MUA] = V_{inicial\ AuNbs} \times [AuNbs]_{inicial} \times n \times A_{calota\ AuNbs}$$

Onde n representa a densidade desejada de 0,5 moléculas de MUA por nm^2 . A estrutura molecular do MUA apresenta, em extremidades opostas, um grupo tiol (-SH) e um grupo carboxílico (-COOH). A elevada afinidade do grupo tiol pelo ouro promove sua ancoragem seletiva nas extremidades dos nanobastões, uma vez que suas superfícies laterais encontram-se protegidas pela camada de CTAB, impedindo a ligação lateral.

Para a ligação do MUA aos AuNbs, adicionaram-se 3,6 μL de uma solução estoque de MUA a 20 mM (obtida pela dissolução de 4,4 mg de MUA em 1 mL de etanol) à solução de nanobastões. A reação foi conduzida a 25°C sob agitação lenta durante 12 horas. Após esse período, a suspensão foi submetida a centrifugação a 12000G por 12 minutos, para remover reagentes em excesso e subprodutos, descartando-se o sobrenadante. Por fim, o pellet obtido foi redisperso no volume original utilizando-se uma solução aquosa de CTAB a 10 mM, restaurando-se a estabilidade coloidal da suspensão funcionalizada.

A etapa subsequente, referente à ativação do grupo carboxílico presente no MUA, denominada ativação por crosslinker, é fundamental para viabilizar a ligação covalente da molécula de reconhecimento aos nanobastões de ouro (AuNbs) mediante a formação de ligações amídicas. Para esse fim, foi adicionado à solução de AuNbs funcionalizados com MUA um volume de EDAC/NHS de uma solução recém-preparada, composta por 125 μL de água deionizada, 41 mg EDAC (Sigma-Aldrich) e 6 mg de NHS (Sigma-Aldrich). O volume necessário dessa solução ativadora foi calculado de acordo com a seguinte relação:

$$Volume_{EDAC/NHS} = [AuNbs] \times V_{inicial} \times A_{calota AuNbs} \times n \times 2.10^4$$

A reação de ativação foi conduzida a 4°C, sob banho ultrassônico e durante 30 minutos, a fim de maximizar a eficiência de ativação dos grupos carboxílicos. Em seguida, a suspensão foi submetida à centrifugação a 7000G por 10 minutos, visando a remoção dos reagentes excedentes e de subprodutos gerados. O precipitado obtido foi redisperso em CTAB 3mM e adicionado as proteínas-N, na proporção de 2:1 em relação à concentração de AuNbs, para efetivar o processo de conjugação bioespecífica. Esta solução foi então mantida a 25°C, em repouso, por um período de 12 horas. Ao término do tempo, a solução foi centrifugada a 7000G por 7 minutos em múltiplos ciclos e os biossensores obtidos - Figura 19 foram redispersos em solução aquosa de CTAB a 1mM.

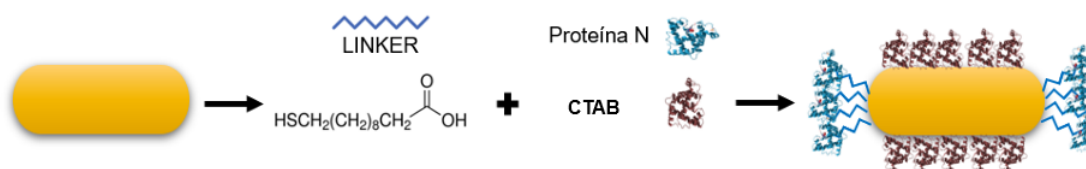


Figura 17 – Esquema ilustrativo do processo de construção do nanosensor. O nanobastão passa pelo protocolo de crosslinker. Fonte: (BATISTA, 2022).

10.2 Caracterização dos Nanoinsumos

10.2.1 Caracterização por espectroscopia UV-VIS

A caracterização óptica dos nanobastões de ouro (AuNRs) e dos sensores desenvolvidos foi realizada por meio de espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis). Quando necessário, as amostras foram previamente diluídas em água deionizada, utilizando-se proporções de 1:10 ou 1:20, de acordo com a concentração inicial de cada preparação.

As amostras diluídas foram dispensadas em poços de uma placa de microtitulação de fundo chato (Corning Life Sciences, EUA) e submetidas à leitura espectroscópica no

equipamento Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, EUA). As medidas de absorvância foram obtidas na faixa de comprimentos de onda de 400 a 900 nm. Os dados espectrais coletados foram exportados no formato CSV e analisados no software KaleidaGraph (Synergy Software®, EUA), permitindo a construção dos espectros de extinção óptica. A partir da análise dos espectros, determinou-se o comprimento de onda máximo de absorção (λ_{MAX}), em nanômetros (nm), associado ao modo de ressonância plasmônica de superfície localizado (LSPR) longitudinal dos nanobastões.

O valor de λ_{MAX} obtido apresenta correlação direta com a razão de aspecto (AR) dos AuNRs, conforme preconizado para sistemas com $1,5 < AR < 9$. A relação entre λ_{MAX} e AR foi determinada a partir da equação proposta por Omi (2012):

$$AR = \left[\frac{\lambda_{MAX} - 467,31}{2,36} \right] \times \frac{1}{52,58} = \frac{L}{d} \quad (10.1)$$

A caracterização óptica por espectroscopia UV-Vis também permite estimar a massa total de ouro presente na solução de nanobastões de ouro (AuNbs). A concentração de ouro, expressa em mol/L, pode ser determinada por meio da absorvância a 400 nm, conforme descrito por Scarabelli et al. (2015), utilizando a seguinte relação:

$$OD_{400\text{ nm}} = \alpha \cdot [Au]$$

Nessa equação, $OD_{400\text{ nm}}$ corresponde à absorvância da solução nessa faixa espectral, $[Au]$ representa a concentração total de ouro e α é o coeficiente angular da reta de calibração, cujo valor é $0,0024 \text{ OD} \cdot \text{M}^{-1}$. Essa relação linear resulta da excitação das transições interbanda do ouro metálico e apresenta alta correlação com a concentração real de ouro na amostra, com coeficiente de Pearson's $R^2 > 0,994$. O modelo foi validado experimentalmente por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (BATISTA, 2022).

10.2.2 Medida Potencial Zeta

As medições de potencial zeta foram realizadas por meio da adição de $650 \mu\text{L}$ da solução a ser analisada, composta por AuNBs na concentração de 50 pM , diluídos em tampão contendo Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) em 10 mM , Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) em $1 \mu\text{M}$ e CTAB em 3 mM , em uma cubeta Omega Cuvette. As leituras foram realizadas no equipamento Anton Paar – Litesizer™ 500. Para cada etapa de adição de $5 \mu\text{L}$ de soro, foram obtidas 50 medições consecutivas de potencial zeta, das quais se calcularam a média e a incerteza correspondente a cada ponto experimental.

10.2.3 Leitura do Tamanho L na Plataforma BioSearch

Nanobastões de ouro recém-sintetizados foram submetidos à análise por DDLS na plataforma BioSearch, com o objetivo de determinar seu tamanho característico L , conforme equação 5.5 discutida. Para tal, os AuNbs foram previamente diluídos em água deionizada na proporção 1:10 e dispensados em poços de uma placa de 96 poços com fundo chato (Corning Life Sciences, EUA). Cada medição corresponde à média de 10 funções de autocorrelação temporal da intensidade (FACTI), adquiridas automaticamente pelo hardware da plataforma.

10.2.4 Leitura volumétrica na plataforma BioSearch

As amostras de nanobastões de ouro ou os sensores previamente diluídos em um meio contendo TRIS (10 mM), EDTA (1 μ M) e CTAB (3 mM), tipicamente a uma concentração de 50 pM, foram dispensadas em volumes de 330 μ L nos poços de uma placa de microtitulação de fundo chato (Corning Life Sciences, EUA). A cada adição incremental de 5 μ L de amostras de soro (negativo ou positivo), foram realizadas dez medidas consecutivas da função de autocorrelação temporal da intensidade de espalhamento, processo conduzido automaticamente pelo equipamento utilizado. Após a aquisição dos dados, a média das dez medidas foi obtida e o tempo total necessário para a obtenção e visualização dos resultados para cada adição de soro foi de aproximadamente 2 minutos.

10.2.5 Leitura temporal na plataforma BioSearch

De forma análoga ao procedimento de medição volumétrica utilizado na plataforma BioSearch: as amostras contendo nanobastões de ouro funcionalizados ou os sensores, previamente diluídos em um meio composto por TRIS (10 mM), EDTA (1 μ M) e CTAB (3 mM), em uma concentração final típica de 50 pM, foram dispensadas em volumes de 330 μ L nos poços de uma placa de microtitulação de fundo chato (Corning Life Sciences, EUA). Em seguida, um volume fixo de 25 μ L de amostra de soro (positiva ou negativa) foi adicionado ao mesmo poço, e a medição temporal foi conduzida continuamente durante um intervalo de 10 minutos. Nesse período, foram adquiridas aproximadamente 40 curvas de autocorrelação da intensidade de espalhamento.

10.2.6 Definição da concentração dos nanobastões de ouro

Utilizando os parâmetros físicos obtidos por espectroscopia UV-Vis: a razão de aspecto (AR) e a concentração de ouro [Au], juntamente com o comprimento L dos nanobastões, determinado por meio das leituras realizadas na plataforma BioSearch e, assumindo a geometria ilustrada na Figura 7, é possível calcular as demais grandezas necessárias para a estimativa da concentração de nanobastões e biossensores.

A dimensão d foi obtida a partir de AR e L , conforme a equação 3.3, enquanto o volume do nanobastão foi determinado utilizando-se as equações 3.2. Com esses parâmetros, a concentração dos nanobastões ($[AuNbs]$) pôde ser calculada por meio da seguinte expressão:

$$[AuNbs] = \frac{[Au] \cdot MM}{\rho_{Au} \cdot V_{AuNBs} \cdot A} \times 10^{-21} \frac{nm^3}{cm^3} \quad (10.2)$$

em que:

- $MM = 196,97g/mol$.
- $\rho_{Au} = 19,27 g/cm^3$ é a densidade do ouro.
- $A = 6,022 \times 10^{23} mol^{-1}$ é o número de Avogadro.
- V_{AuNBs} é o volume do nanobastão de ouro, calculado a partir de sua geometria e a equação 3.2.

10.2.7 Definição da concentração dos Nanocleasers

Como discutido anteriormente, o cálculo da concentração dos AuNbs requer os parâmetros geométricos AR e L . No entanto, para os Nanocleasers, a obtenção experimental do parâmetro L não é viável, uma vez que esses apresentam um pico de ressonância plasmônica longitudinal fora da faixa de detecção da plataforma BioSearch. Dessa forma, foram adotadas estimativas com base na literatura. Segundo (??), nanobastões de ouro com dimensões aproximadas de $L = 60 nm$ e $d = 12 nm$ geram picos de ressonância acima de $800 nm$. Considerando que os Nanocleasers apresentam comportamento espectral semelhante, foram utilizados esses valores como aproximações para L e d no cálculo da concentração. Com base nesses parâmetros e empregando a equação 7.2, foi possível estimar a concentração dos Nanocleasers de forma aproximada.

10.3 Protocolos

10.3.1 Protocolo de Lavagem

O protocolo de lavagem do Nanocleaser consiste em uma série de cinco etapas de centrifugação a $15.000 g$ durante 15 minutos cada. Nas duas primeiras centrifugações, apenas o pellet lateral é coletado e redisperso em solução de CTAB a $1 mM$. Nas três lavagens subsequentes, todo o conteúdo precipitado é recuperado e redisperso na mesma solução de CTAB ($1 mM$). Esse ciclo completo de cinco lavagens visa à remoção eficiente do excesso de CTAB presente na suspensão, condição essencial para garantir a eficácia do Nanocleaser como agente limpador, minimizando interações inespecíficas.

10.3.2 Protocolo Ajuste de Concentração

Como a eficácia do Nanocleanser também está sujeita à sua concentração de atuação, o protocolo de ajuste de concentração visa realizar medidas da variação da grandeza τ com o objetivo de delimitar sua janela de eficácia. Para isso, utiliza-se uma amostra negativa e uma amostra positiva, submetidas a diferentes concentrações do Nanocleanser: 5.000 pM, 10.000 pM, 15.000 pM e 20.000 pM. As leituras foram realizadas de forma temporal na plataforma BioSearch. A partir desses dados, foi possível determinar a faixa de concentração na qual o Nanocleanser apresentou desempenho ideal na supressão de interações inespecíficas, sem comprometer a detecção de interações específicas.

11 Resultados e Discussões

11.1 Biossensores, Nanocleaners e Amostras

Os AuNbs sintetizados, de acordo com a seção X, e utilizados neste trabalho apresentaram o pico de LSPR-L em aproximadamente 658 nm, conforme ilustrado na Figura . A Figura X apresenta o espectro de extinção dos biossensores utilizados neste trabalho, no qual é possível observar um pequeno deslocamento do modo do modo LSPR-T, quando comparado ao AuNbs (Figura X), é atribuído ao processo de funcionalização das extremidades dos AuNbs com a proteína N do SARS-CoV-2.

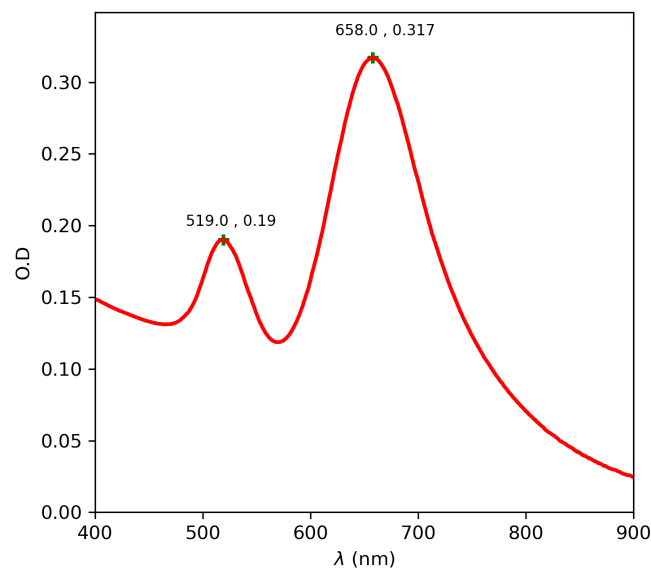


Figura 18 – Espectro UV-VIS dos Nanobastões de ouro utilizados, demonstrando o pico de ressonância transversal (primeiro e menor pico) e o pico de ressonância longitudinal (segundo e maior pico).

Os Nanocleaners foram sintetizados conforme descrito em [referência X]. Devido ao seu formato mais alongado, essas nanoestruturas apresentam o pico de LSPR-L em comprimentos de onda superiores a 800 nm. Todos os Nanocleaners ilustrados na Figura X foram empregados nas análises realizadas neste trabalho.

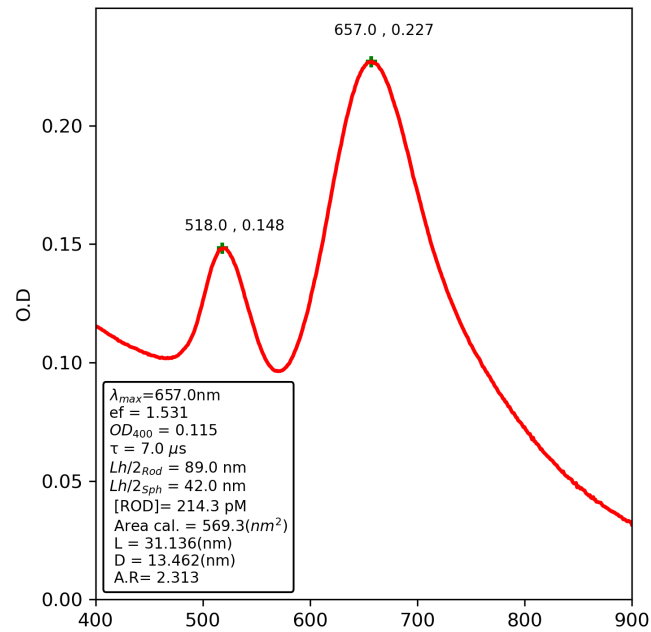


Figura 19 – Espectro UV-VIS dos biossensores utilizados com informações sobre seus parâmetros.

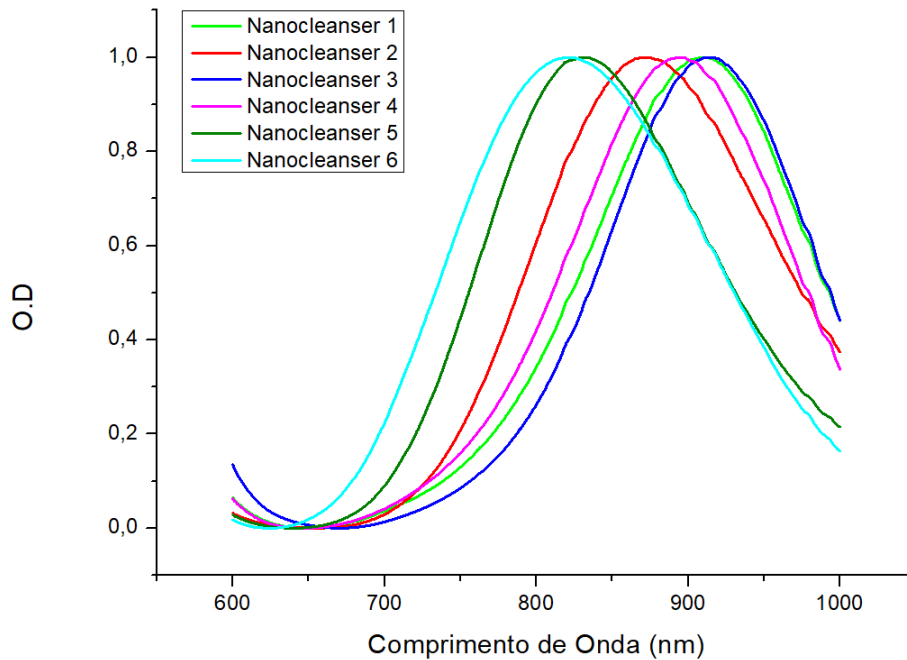


Figura 20 – Espectro UV-VIS dos Nanocleaners utilizados representando o pico de ressonância longitudinal máximo λ_{MAX} .

As amostras utilizadas neste estudo foram gentilmente fornecidas pelo professor Flávio Guimarães da Fonseca do CTVacinas. O quadro a seguir apresenta os resultados dos testes diagnósticos de RT-PCR e ELISA, utilizados como padrão de referência para a análise das mesmas na plataforma BioSearch.

Tabela 2 – Resultados dos testes de PCR e ELISA para as amostras utilizadas.

Soro	Resultado RT-PCR	Resultado ELISA
Soro Negativo 1	Negativo	Negativo alto
Soro Negativo 2	Negativo	Negativo baixo
Soro Negativo 3	Negativo	Negativo baixo
Soro Negativo 4	Negativo	Negativo alto
Soro Negativo 5	Negativo	Negativo baixo
Soro Negativo 6	Negativo	Negativo baixo
Soro Negativo 7	Negativo	Negativo baixo
Soro Negativo 8	Negativo	Negativo alto
Soro Positivo 1	Positivo	Positivo baixo
Soro Positivo 2	Positivo	Positivo alto
Soro Positivo 3	Positivo	Positivo baixo
Soro Positivo 4	Positivo	Positivo baixo
Soro Positivo 5	Positivo	Positivo alto

11.2 Ligações inespecíficas

11.2.1 Adsorção de interferentes na área cilíndrica dos nanobastões de ouro não funcionalizados (AuNbs)

Para investigar exclusivamente o efeito das ligações inespecíficas na área do cilindro foram realizadas medidas utilizando nanobastões de ouro não funcionalizados (AuNbs), de acordo com a síntese descrito em 10.3.1. Os nanobastões foram diluídos para uma concentração final de 50 pM, em uma solução contendo TRIS (10 mM), EDTA (1 μ M e CTAB (3 mM), garantindo um meio adequado para a dispersão e estabilidade das nanopartículas.

As medidas da variação da grandeza τ foram conduzidas seguindo o protocolo de titulação volumétrica descrito em 10.2.4 na Plataforma BioSearch. Para garantir a reprodutibilidade dos resultados, foram realizados experimentos em triplicata e utilizados dois soros negativos distintos (Soro negativo 1 e Soro negativo 2) em diferentes diluições em PBS (1:500, 1:1000 e 1:2000), em pH 7.4, mantendo-se a mesma configuração de solução de nanobastões de ouro para ambos. Todos os dados apresentados neste capítulo estão em função da grandeza $\Delta\tau$, como discutido na seção 5.2, grandeza essa inversamente proporcional à difusividade rotacional dos nanobastões de ouro e relacionada às dimensões dos AuNbs/biossensores. Alterações em $\Delta\tau$ implicam, diretamente, em variações no tamanho dessas estruturas.

De acordo com o capítulo 5.2, a plataforma BioSearch apresenta uma sensibilidade significativamente maior à ligações nas áreas das extremidades semiesféricas do que na área cilíndrica dos AuNbs. No caso dos nanobastões não funcionalizados, observa-se somente

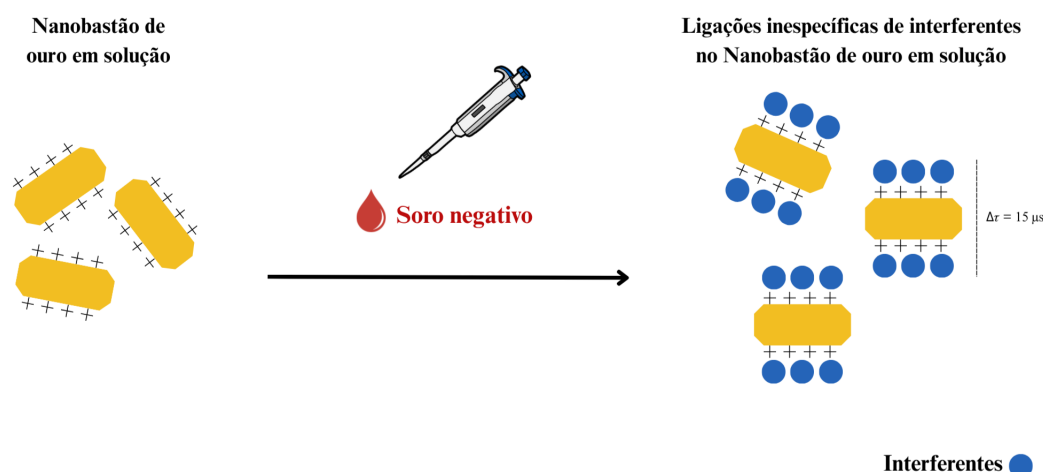


Figura 21 – Representação das ligações inespecíficas em torno da região cilíndrica em um nanobastão de ouro (AuNbs).

a ocorrência da adsorção de biomoléculas ao longo de sua área cilíndrica em razão da carga residual positiva do CTAB adsorvido nessa superfície (em pH 7.4) - Figura 21. A existência de tal carga, embora essencial para a manutenção da estabilidade coloidal das nanopartículas, favorece interações por adsorção, entre AuNbs e interferentes típicos de matrizes biológicas, como proteínas, através ligação eletrostática, já que essas biomoléculas, como a albumina (principal proteína do soro humano) carregam carga líquida negativa em condições de pH fisiológico (MAPIOUR; ABDELRASOUL, 2023).

A Figura 22 apresenta os resultados da análise das interações inespecíficas na região cilíndrica dos nanobastões de ouro (AuNbs), obtidos a partir da adição de duas amostras distintas de soro negativo: Soro Negativo 1 (Figura 22.a) e Soro Negativo 2 (Figura 22.b). Para cada amostra, foram testadas três diluições diferentes: 1:500 (curva em amarelado), 1:1000 (curva em cinza escuro) e 1:2000 (curva em cinza claro). Observa-se que todas as condições convergem para uma mesma faixa de valor de $\Delta\tau$. Esse comportamento indica que, independentemente da amostra negativa utilizada ou da concentração aplicada, a resposta do sistema as interações inespecíficas ao longo da área cilíndrica tende à saturação, estabilizando-se em aproximadamente $\Delta\tau = (15 \pm 1)\mu s$.

Para avaliar o impacto das ligações inespecíficas na área do cilindro em relação à estabilidade dos nanobastões, foi medido o potencial zeta médio das amostras, conforme o protocolo descrito em 10.2.2. Os resultados apresentados na Figura 23 indicam que, além de gerar um sinal característico de ruído em $\Delta\tau = (15 \pm 1)\mu s$, como já discutido, essas interações também afetam a estabilidade do sensor, levando à redução da carga residual da nanopartícula. Isso é evidenciado, na Figura 23, pela queda no valor do potencial zeta dos nanobastões de ouro: inicialmente em torno de (35 ± 3) mV, que, após a adição de $40\mu L$ de Soro Negativo 1, diminui para aproximadamente (10 ± 3) mV.

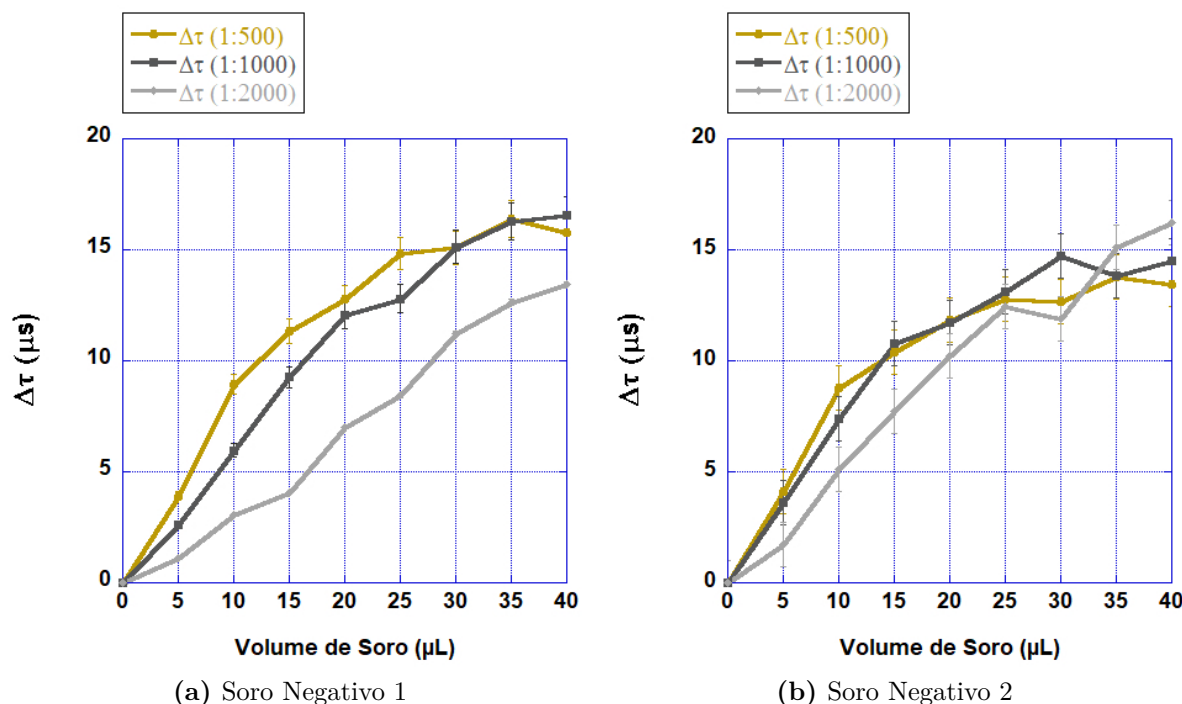


Figura 22 – Variação de τ por adição volumétrica de soro negativo em uma solução de nanobastões de ouro não funcionalizados (AuNbs).

Nanopartículas cuja carga residual positiva apresentam valor abaixo de $+30\text{mV}$ tendem a apresentar menor estabilidade coloidal (PANZADE; THAKKAR; WANJALE, 2016). Esse fenômeno impacta diretamente as medidas realizadas pela plataforma BioSearch, uma vez que nanobastões instáveis tendem a se agregar e precipitar, interrompendo o movimento browniano — base da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz Despolarizada (DDLS) utilizada pela plataforma.

Para verificar a ocorrência de agregação das nanopartículas de ouro em decorrência das ligações inespecíficas na região cilíndrica, foram obtidos, por meio da plataforma BioSearch, dados da grandeza C_0 , simultaneamente às medidas da variação de τ . Conforme (BATISTA, 2022), o parâmetro C_0 avalia a qualidade do espalhamento e está diretamente relacionado à densidade de partículas espalhadoras na amostra. Assim, em casos de agregação, observa-se uma queda acentuada nos valores de C_0 em relação ao valor basal (medido antes da adição do soro), uma vez que a agregação reduz a densidade efetiva de partículas dispersas no meio por se precipitarem.

O resultado apresentado na Figura 24 demonstra que, independentemente da amostra utilizada — Soro Negativo 1 (Figura 24.a) ou Soro Negativo 2 (Figura 24.b), a adição de soro e, conseqüentemente, o aumento das ligações inespecíficas na região cilíndrica promovem uma diminuição na densidade de nanobastões capazes de espalhar luz, indicando a ocorrência de agregação. Além disso, observa-se que esse comportamento independe da concentração, uma vez que todas as curvas (amarelada – 1:500, cinza escuro – 1:1000 e cinza claro – 1:2000) apresentam redução progressiva da grandeza C_0 à medida que

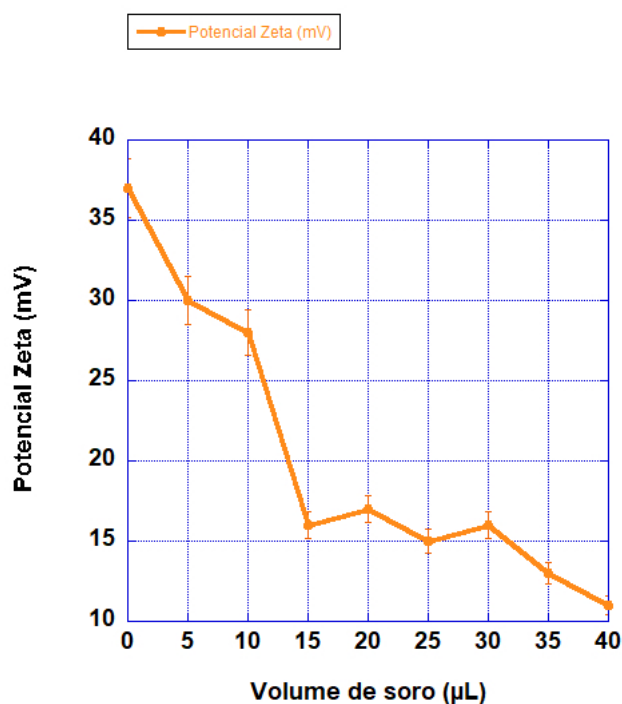


Figura 23 – Potencial Zeta de uma solução de nanobastões de ouro não funcionalizados em função da adição de volumes de Soro Negativo 1.

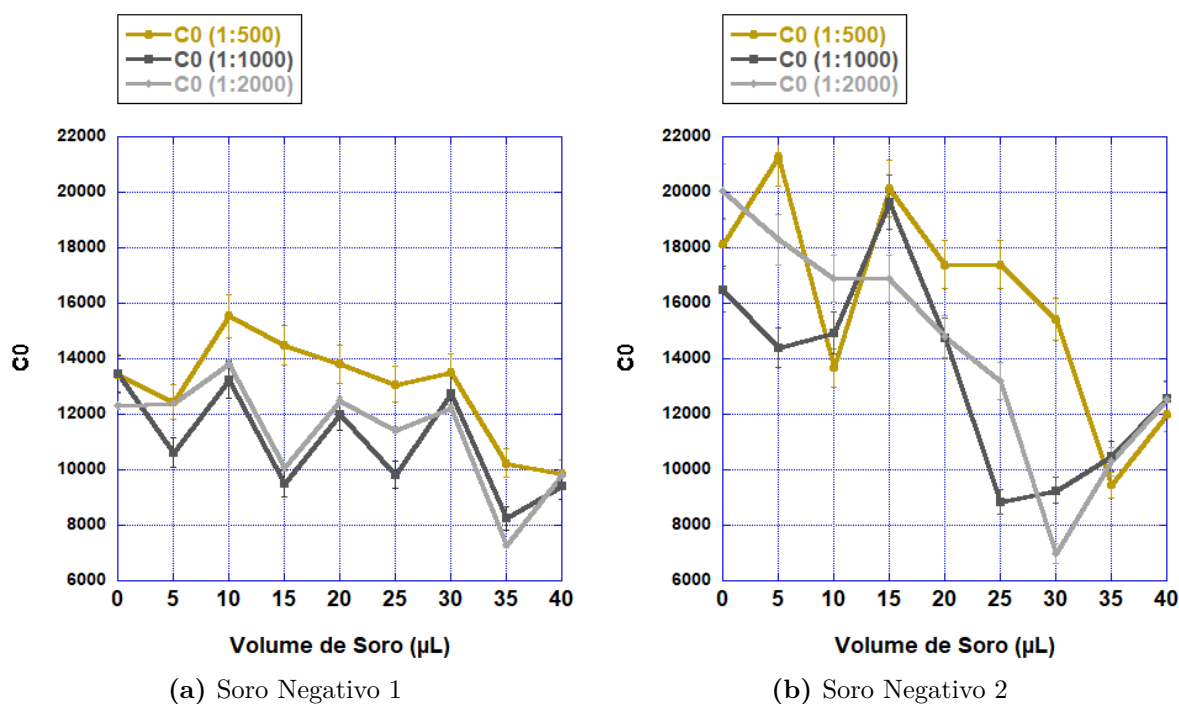


Figura 24 – Valores de C_0 por adição volumétrica de soro negativo em uma solução de nanobastões de ouro não funcionalizados (AuNbs).

se adiciona soro. Independente do soro negativo utilizado, a grandeza C_0 , que representa a densidade efetiva dos AuNbs livres em solução, apresentou uma redução da ordem de 30%, sugerindo a ocorrência de interações inespecíficas ou agregação parcial mesmo na ausência do analito-alvo.

É importante ressaltar que, embora tenha ocorrido agregação, ela não foi total, visto que os valores de C_0 diminuíram, mas não atingiram o limite inferior de sensibilidade operacional do equipamento BioSearch: valor de 1000. A queda dessa grandeza implica que uma fração dos nanobastões presentes na solução sofreu agregação e subsequente precipitação. No entanto, como o valor remanescente de C_0 permaneceu acima do limite de sensibilidade da plataforma, os biossensores restantes permaneceram suficientemente dispersos em solução para viabilizar a detecção óptica. Além disso, a medida do potencial zeta representa uma média da carga residual das partículas, a agregação resultante da diminuição da carga para aproximadamente +10 mV não indica que todas as partículas perderam a estabilidade. Ainda há uma fração de nanobastões com potencial zeta superior a +25 mV, valor suficiente para garantir a estabilidade coloidal local e permitir as medições na plataforma.

Por fim, com base na seção 5.2, é possível plotar a curva teórica da variação do diâmetro d da região cilíndrica dos nanobastões em função da variação da grandeza $\Delta\tau$, considerando um valor observado de $15 \mu s$ - Anexo A. Na Figura 25, observa-se que, partindo de um diâmetro inicial de (17 ± 1) nm e comprimento L fixo em **40nM para o AuNbs** (ponto representado em verde), uma variação de $\Delta\tau$ de $(15 \pm 1) \mu s$ corresponde a um novo valor de d igual a (27 ± 1) nm (ponto em vermelho). Isso representa uma variação dimensional de aproximadamente 10 nm, atribuída ao aumento efetivo do tamanho do nanobastão devido à ocorrência de ligações inespecíficas na região da área cilíndrica. A proposta de categorizar teoricamente o aumento real causado pelos interferentes contribui para aumentar a acurácia do modelo, permitindo que a plataforma BioSearch seja mais precisa na identificação de aumentos em τ associados exclusivamente à interação específica com o analito.

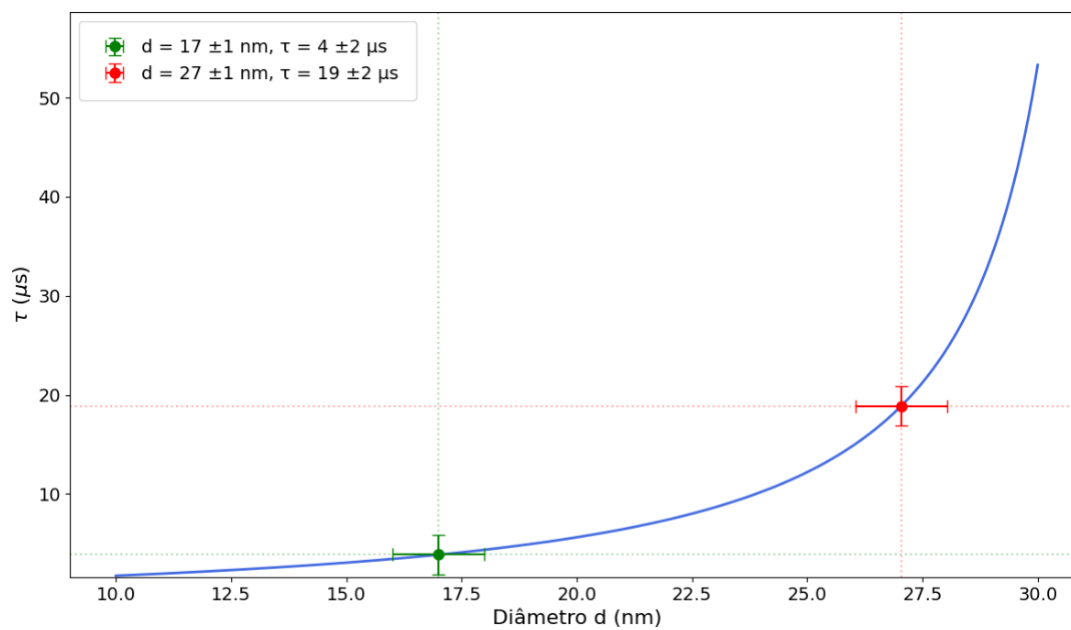


Figura 25 – Curva teórica da variação do tamanho do diâmetro d da área cilíndrica do nanobastão de ouro AuNbs em função da variação de τ .

11.2.2 Ocorrência de ligações inespecíficas nos biossensores (Nanobastões de ouro funcionalizados)

Para investigar a ocorrência das interações inespecíficas nos biossensores foram realizadas novas medidas da variação da grandeza τ utilizando o biossensor desenvolvido para a detecção da COVID-19, funcionalizado com a proteína N, conforme o protocolo descrito em 10.3.4. No contexto de biossensores, para que ocorra uma ligação específica entre antígeno e anticorpo, é necessário que haja múltiplas interações fracas simultâneas, viabilizadas por uma complementaridade espacial adequada entre suas superfícies (REVERBERI; REVERBERI, 2007). Em condições de baixíssima força iônica ($I \leq 0,04$), interferentes presentes no soro humano podem interagir de forma físico-química não direcionada com o antígeno, resultando em reações falso-positivas por agregação inespecífica (REVERBERI; REVERBERI, 2007) na área semiesférica das extremidades (Figura 26), devido a presença da proteína N como antígeno.

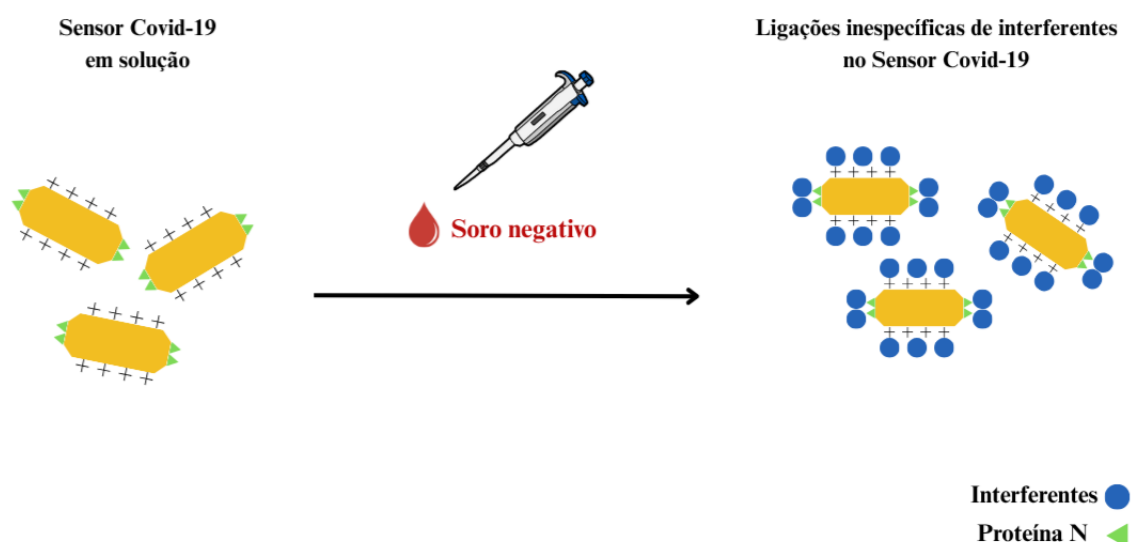


Figura 26 – Representação das ligações inespecíficas da região cilíndrica e semiesférica do biossensor para Covid-19.

Foram tituladas duas amostras de Soro Negativo (Soro Negativo 1 e Soro Negativo 3), seguindo o mesmo protocolo previamente estabelecido de medida volumétrica e diluição em PBS. Os resultados obtidos na Figura 27 demonstraram que, tanto os dados em (a), utilizando o Soro Negativo 1, quanto os dados em (b), utilizando o Soro Negativo 3, apresentam um aumento expressivo da grandeza $\Delta\tau$ em função do aumento de volume de amostra adicionada. Observa-se que os valores ultrapassam $200 \mu s$ para a curva amarelada (diluição de 1:500), $100 \mu s$ para a curva em cinza escuro (diluição de 1:1000) e $50 \mu s$ para a curva em cinza claro (diluição de 1:200). Ou seja, fica evidente que as interações inespecíficas têm um impacto muito mais significativo sobre os biossensores, o que já era

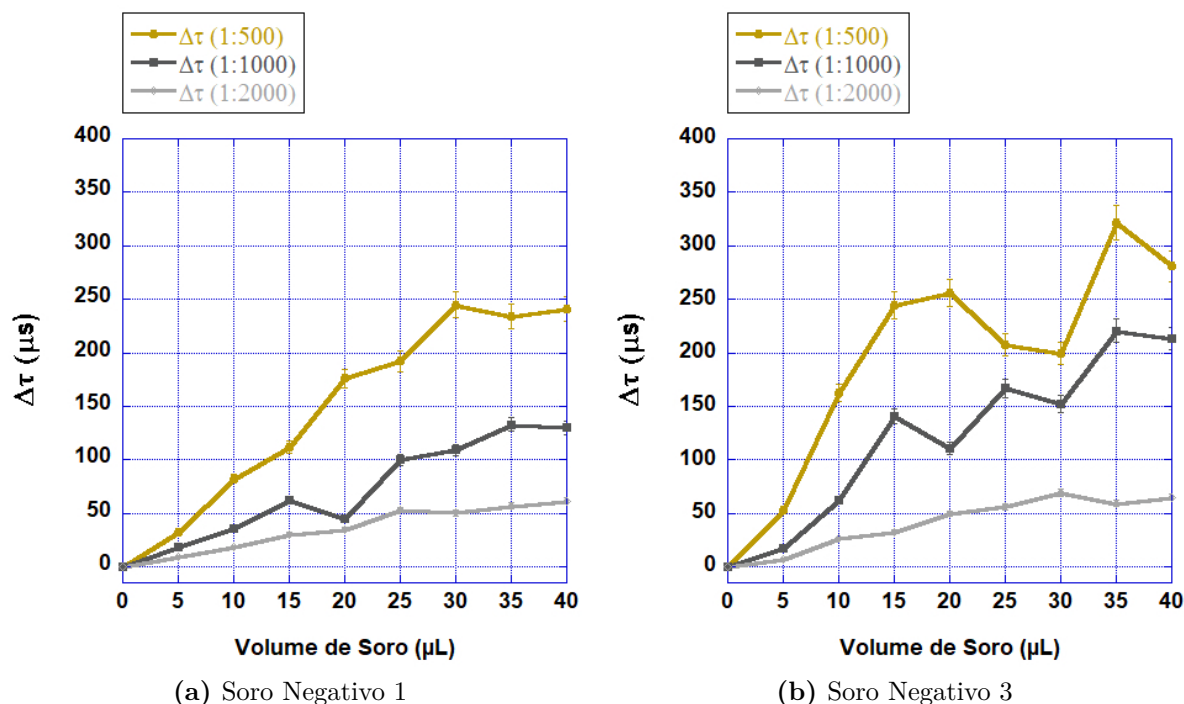


Figura 27 – Variação de τ por adição de soro negativo em um biossensor de COVID-19 em 50pM

esperado, devido à presença das proteínas nas suas extremidades. Diferentemente dos AuNbs não funcionalizados, nos quais as ligações inespecíficas tendem à saturação em $\Delta\tau = 15\mu\text{s}$, os valores observados para o biossensor funcionalizado apresentam tendência de estabilização muito maior.

Esse efeito ocorre ao fato de que, por se tratar agora de um biossensor, ou seja, funcionalizado com um elemento biológico, ocorrem interações entre estruturas biológicas presentes no soro e a proteína N na extremidade semiesférica, mesmo que de forma inespecífica. A plataforma BioSearch é particularmente mais sensível às variações que ocorrem nas extremidades semiesféricas, como discutido no capítulo 5.2, o que explica por que os valores de $\Delta\tau$, na Figura 27, são significativamente maiores do que aqueles causados apenas por interações inespecíficas na região cilíndrica, como observado no caso do nanobastão de ouro, na Figura 22, para as mesmas concentrações de soro. Além disso, a diluição das amostras também se mostrou um fator relevante. Amostras com menor diluição, como a curva em verde (diluição 1:500), apresentam um número maior de interações inespecíficas, uma vez que contêm uma concentração mais elevada de interferentes.

Para avaliar o impacto das ligações inespecíficas na estabilidade do biossensor, foram analisados, além das variações da grandeza τ , obtidas na Figura 27, os valores associados à grandeza C_0 . Na Figura 28.a, observa-se que, independentemente da concentração utilizada, representada pelas curvas em amarelado (1:500), cinza escuro (1:1000) e cinza claro (1:2000), os valores de C_0 sofrem uma queda acentuada, partindo de níveis basais superiores a 12.000

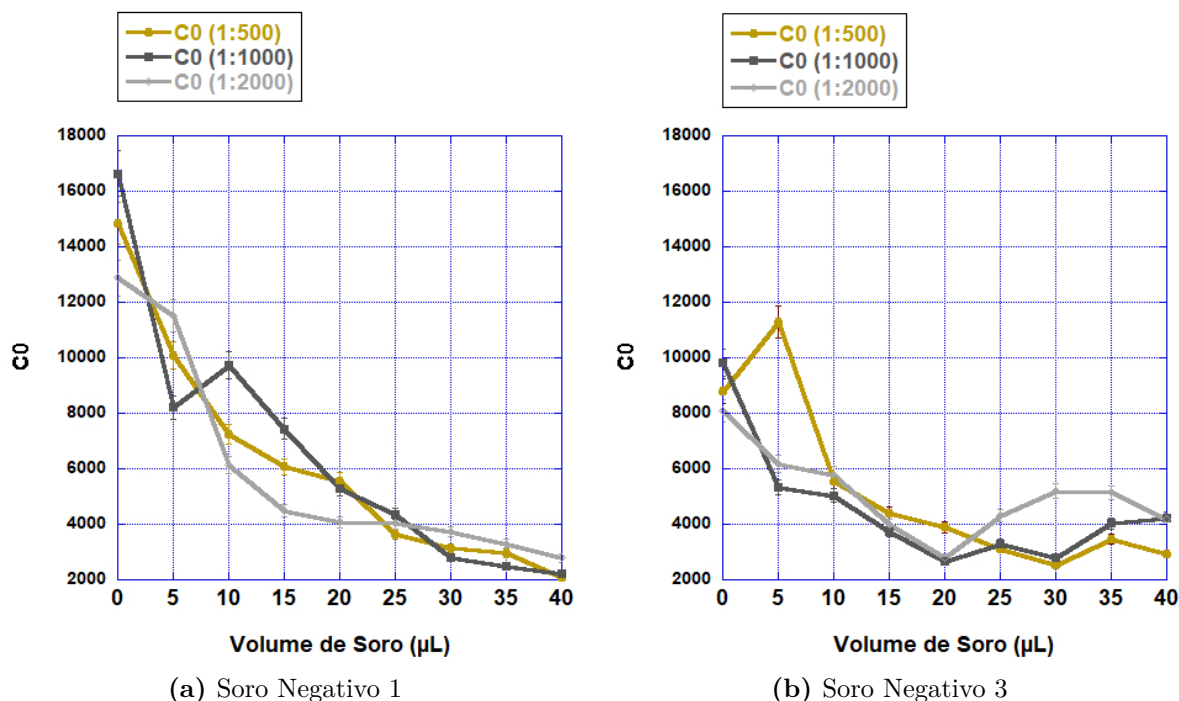


Figura 28 – Valores de C_0 por adição volumétrica de soro negativo em uma solução de biossensores

e atingindo valores próximos a 2.000 após a adição de $40\mu\text{L}$ de Soro Negativo 1. Na Figura 28.b, o comportamento é semelhante: o valor basal de C_0 , inicialmente em torno de 10.000, também é drasticamente reduzido após a adição de $40\mu\text{L}$ de Soro Negativo 3.

Esses resultados indicam que, além das interações inespecíficas na região cilíndrica, responsáveis por variações de até $\Delta\tau = 15\mu\text{s}$, conforme discutido na seção anterior, ocorrem também interações inespecíficas na região semiesférica das extremidades do sensor - Figura 26. Esse conjunto de interações promove uma desestabilização mais intensa do biossensor funcionalizado, uma vez que os valores de C_0 observados são significativamente menores do que aqueles obtidos para os AuNbs não funcionalizados (Figura 22), nos quais apenas a região cilíndrica está envolvida nas interações inespecíficas.

11.3 Influência do CTAB na eficácia da ação do Nanocleanser

Para mitigar as interações inespecíficas no biossensor label-free aplicado à plataforma Biosearch, foi proposto a utilização de uma solução de Nanocleansers, como discutido em 8.2, adicionada previamente às amostras tituladas aos nanobastões/biossensores, sintetizado conforme descrito n

o capítulo 10.3.4. O papel do Nanocleanser é atuar como agente limpador, sendo responsável por interagir previamente com os interferentes presentes nas amostras biológicas. Devido à presença de carga residual em sua superfície, os Nanocleansers são adicionado inicialmente às amostras de soro, de modo que os interferentes sejam adsorvidos às suas laterais. Esse mecanismo diminui significativamente a quantidade de biomoléculas interferentes que interagem posteriormente com os biossensores, promovendo, assim, a supressão das ligações inespecíficas durante a etapa de detecção - Figura 16.

As medidas da grandeza $\Delta\tau$ foram realizadas utilizando o sensor de COVID-19, seguindo o protocolo volumétrico previamente descrito, com adição do Soro Negativo 1 diluído em PBS, nas proporções: 1:500, 1:1000 e 1:2000. Além disso, foram testados dois tipos de Nanocleansers (Nanocleanser 1.a e Nanocleanser 1.b), ambos derivados de uma mesma síntese original. Apesar de terem a mesma origem, esses Nanocleansers passaram por processos de lavagem distintos e portanto, concentrações distintas de CTAB nas suas soluções.

A partir da análise dos dados da Figura 29, observa-se que, independentemente da concentração de Soro Negativo 1 utilizada (20.a - 1:500, 20.b - 1:1000 ou 20.c - 1:2000) ou da concentração aplicada do Nanocleanser (1000pM, 500pM ou 250pM), o Nanocleanser 1.a demonstrou desempenho eficaz na mitigação das interações inespecíficas. Esse comportamento é evidente nos três gráficos (a, b e c), nos quais as curvas representadas em amarelado apresentam valores de $\Delta\tau$ que não excedem $15\mu s$. Tal resultado indica que o Nanocleanser 1.a foi capaz de suprimir eficientemente as interações inespecíficas na região semiesférica da extremidade do sensor, pois a resposta obtida é praticamente idêntica à observada para o nanobastão de ouro não funcionalizado (Figura 22), o que reforça a conclusão de que as interações inespecíficas residuais, pós ação efetiva do Nanocleanser, ocorreram exclusivamente ao longo da área cilíndrica lateral dos nanobastões.

Por outro lado, o Nanocleanser 1.b, apesar de ter sido originado a partir da mesma síntese do Nanocleanser 1.a, apresentou um desempenho insatisfatório. A análise dos dados apresentados na Figura 29 revela que, em todos os três gráficos (a, b e c), os valores de $\Delta\tau$ associados ao Nanocleanser 1.b aumentaram de forma expressiva, ultrapassando $200\mu s$ nas curvas representadas em alaranjado em 20.a e 20.b, e superando $100\mu s$ na curva alaranjada em 20.c. É importante destacar que o menor valor observado nessa última curva se deve ao maior grau de diluição da amostra (1:2000) que reduz a quantidade de

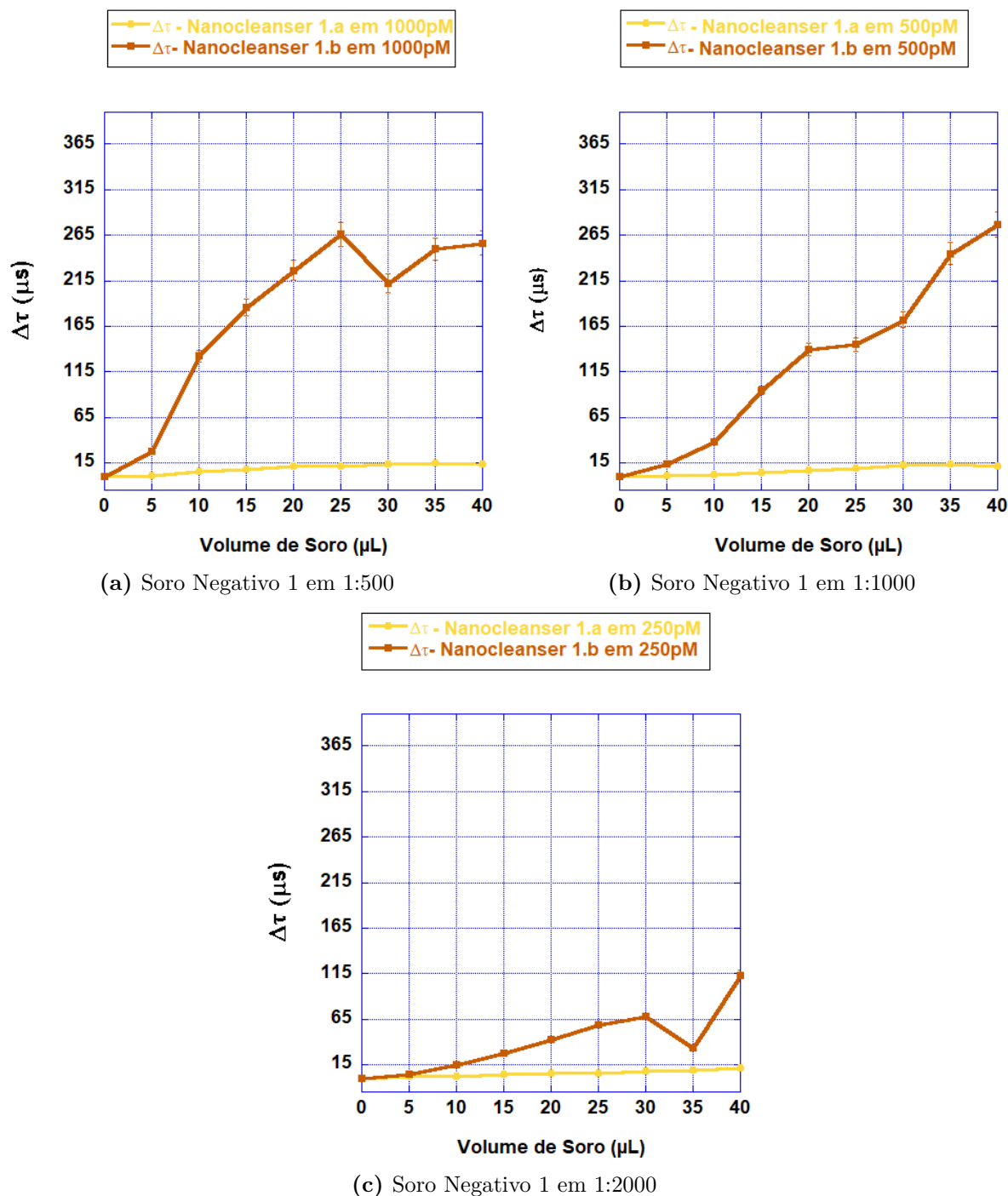


Figura 29 – Variação de τ por adição de Soro Negativo 1 com **Nanocleaner 1** em um biossensor de COVID-19 em 50pM

interferentes presentes e, portanto, a intensidade das interações inespecíficas. De forma geral, os resultados indicam que o Nanocleaner 1.b apresentou baixa eficácia como agente de limpeza, falhando em mitigar adequadamente as interações inespecíficas tanto na região semiesférica da extremidade quanto ao longo da área cilíndrica do sensor. Essa limitação comprometeu substancialmente sua capacidade de reduzir os efeitos indesejados sobre o sinal gerado.

Por fim, todas essas diferenças observadas podem ser atribuídas aos distintos protocolos de lavagem (centrifugar e ressuspender o pellet de nanobastões/biossensores em outra amostra) aplicados ao Nanocleanser 1.a e ao Nanocleanser 1.b. O Nanocleanser 1.a foi lavado cinco vezes e redisperso em água filtrada, enquanto o Nanocleanser 1.b foi lavado somente uma vez e redisperso em água filtrada. Essas quantidades diferentes de lavagem influenciam diretamente a quantidade residual de CTAB presente na solução final. Há uma hipótese que uma maior concentração de CTAB, por formar micelas (MOVCHAN et al., 2012), envolva o Nanocleanser e impeça sua ação na limpeza dos interferentes da amostra - Figura 30. Dessa forma, apesar de terem sido originados da mesma síntese, os Nanocleansers apresentaram eficácias distintas devido às diferenças nas concentrações residuais de CTAB, devido à lavagens diferentes, o que comprometeu a funcionalidade do Nanocleanser 1.b.

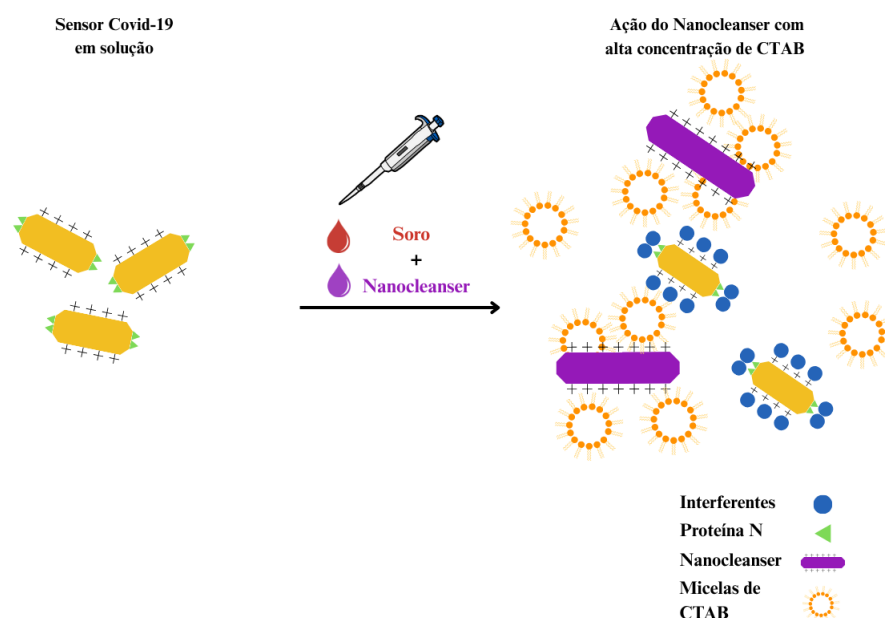
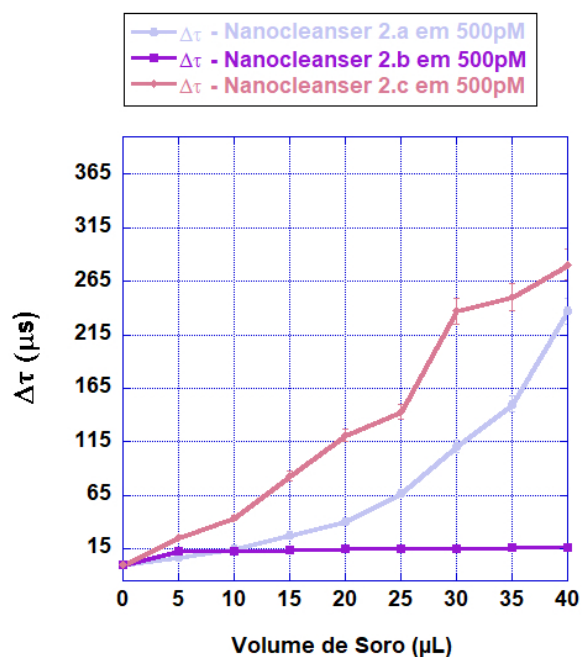


Figura 30 – Representação da ineficiência do Nanocleanser como agente limpador com alta concentração de CTAB

Com o objetivo de validar a influência do CTAB na eficácia do Nanocleanser, ou seja, demonstrar que os diferentes protocolos de lavagem realmente impactam diretamente no seu desempenho como agente limpador, um novo lote de Nanocleanser foi submetido a distintas condições de lavagem, permitindo a comparação de suas eficiências na supressão das interações inespecíficas. Foi adotado o mesmo protocolo de medição volumétrica descrito anteriormente, utilizando o sensor funcionalizado para detecção da COVID-19, na concentração de 50 pM. Para essa análise, o Nanocleanser 2 foi submetido a três diferentes procedimentos de lavagem, resultando em três variantes: Nanocleanser 2.a, 2.b e 2.c, porém todas na mesma concentração de 500pM. Após a síntese, os Nanocleansers apresentam uma concentração residual de CTAB próxima de 25mM. Um maior número de etapas de lavagem resulta em uma redução mais significativa da concentração desse surfactante. O

Nanocleanser 2.a foi submetido a uma única etapa de lavagem e posteriormente redisperso em água filtrada. O Nanocleanser 2.b passou por cinco ciclos consecutivos de lavagem, sendo igualmente redisperso em água filtrada. Já o Nanocleanser 2.c foi lavado duas vezes e, assim como os demais, redisperso no mesmo meio. Foi utilizado o Soro Negativo 1 na concentração de 1:1000, diluído em PBS.

Os resultados obtidos, apresentados na Figura 31, indicam que apenas o Nanocleanser 2.b demonstrou ação eficaz como agente de limpeza, evidenciado pela sua curva em roxo escuro, que apresenta um $\Delta\tau$ estabilizado em aproximadamente $15\ \mu s$. Esse valor é compatível com interações inespecíficas restritas à região cilíndrica lateral do sensor, como discutido previamente na seção 11.1.1. Por outro lado, os Nanocleansers 2.a e 2.c não apresentaram desempenho satisfatório. Suas curvas, em roxo claro e rosa claro, respectivamente, ultrapassaram $200\ \mu s$ de $\Delta\tau$, valor característico de interações inespecíficas abrangendo tanto a superfície cilíndrica quanto a área semiesférica da extremidade do sensor. Esse comportamento sugere a ocorrência de interações entre componentes biológicos residuais presentes na amostra e a molécula de bioreconhecimento: a proteína-N. Dessa forma, os dados reforçam que o protocolo de lavagem e, portanto, a quantidade residual de CTAB presente na solução final, é um parâmetro crítico na determinação da eficácia do Nanocleanser, visto que o Nanocleanser 2.b, submetido ao maior número de etapas de lavagem e, conseqüentemente, com menor concentração residual de CTAB em sua solução, foi o único a apresentar a eficácia desejada na supressão das interações inespecíficas.



(a) Soro Negativo 1 em 1:1000

Figura 31 – Variação de τ por adição de Soro Negativo 1 com Nanocleanser 2.a, 2.b e 2.c em um biossensor de COVID-19 em 50pM.

Para confirmar que a eficácia observada do Nanoblocker 2.b em 500pM não estava

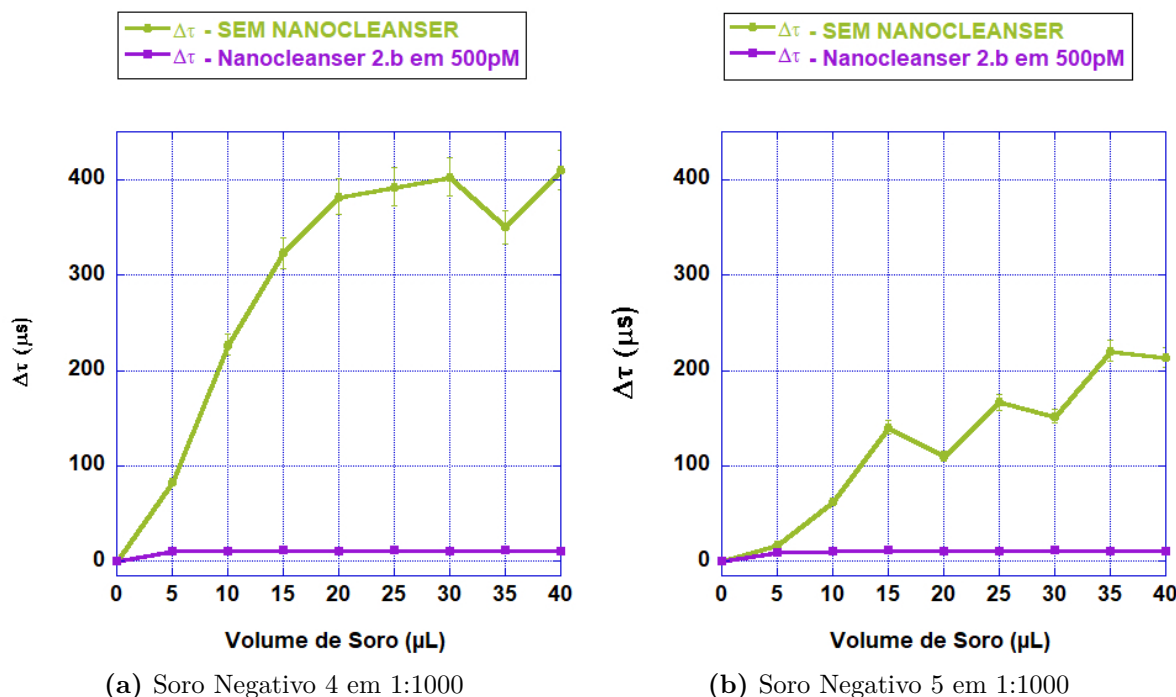


Figura 32 – Variação de τ por adição de Soros negativos(4 e 5) com Nanocleaner 2.b em um biossensor de COVID-19 em 50pM.

condicionada a um tipo específico de amostra negativa, o mesmo foi testado em outras duas amostras distintas de soro negativo (Soro Negativo 4 e Soro Negativo 5), na concentração de 1:1000, diluído em PBS. Os resultados apresentados na Figura 32 demonstram uma excelente capacidade de limpeza do Nanocleaner 2.b, sendo ele capaz de eliminar completamente as interações inespecíficas em amostras negativas distintas, pois tanto as curvas em roxo escuro, nos gráficos a e b, indicam uma saturação do $\Delta\tau$ em até $15\mu\text{s}$. É importante destacar que, por se tratarem de amostras negativas diferentes, é esperado que o nível de interações inespecíficas varie entre elas. No entanto, essa variação deve se manter dentro de um limite aceitável, estimado em no máximo $\Delta\tau = 15\mu\text{s}$, conforme discutido na seção 11.1.1, valor dentro do qual os resultados se mantiveram consistentemente. Já as curvas em vermelho e laranja demonstram as respostas do biossensor funcionalizado para COVID-19 na ausência do Nanocleaner, evidenciando como o ruído gerado pelas ligações inespecíficas pode ultrapassar $400\mu\text{s}$ no gráfico a e $210\mu\text{s}$ no gráfico b.

Após descartar a influência da variabilidade entre as amostras negativas, foi estabelecido um **protocolo de lavagem padronizado**, descrito em 10.4.1. Esse protocolo foi desenvolvido com o objetivo de uniformizar a concentração final de CTAB nas soluções de Nanocleaner, fixando-a em aproximadamente 1 mM, visando eliminar a variação na eficácia do limpeza associada à presença desse surfactante. Tal valor foi escolhido com base em referências da literatura, que indicam essa concentração como adequada para garantir a estabilidade coloidal de nanobastões de ouro e biossensores (AWARI et al., 2018) e para evitar a formação de micelas, visto que tal efeito ocorre em concentrações de CTAB

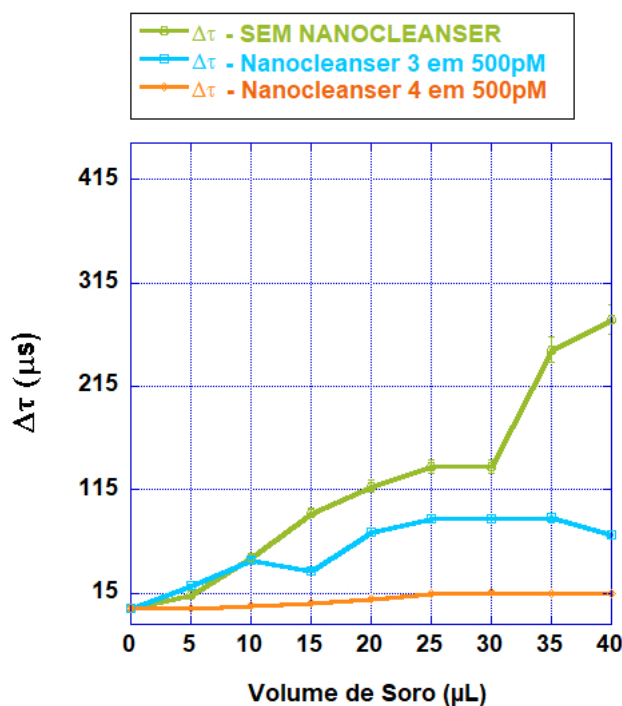


Figura 33 – Variação do τ em diferentes Nanocleaners (Nanocleaners 3 e 4), seguindo o protocolo de lavagem, adicionando Soro Negativo 1 em biossensor de COVID-19 em 50pM.

superiores 1 mM (CHEN et al., 2017).

Os resultados apresentados na Figura 33 foram obtidos a partir de dois Nanocleaners distintos em 500pM (Nanocleanser 3 e Nanocleanser 4), ambos submetidos ao mesmo protocolo padronizado de lavagem (seção 10.4.1) e utilizando o Soro Negativo 1 em 1:1000, diluído em PBS para as medidas. No entanto, observou-se que a eficácia dos Nanocleaners como agentes de limpeza das interações inespecíficas ainda apresenta variações. Enquanto o Nanocleanser 4, curva em laranja, apresentou a eficácia esperada, com saturação do $\Delta\tau$ em 15 μs , o Nanocleanser 3, apesar de ter passado pelo mesmo protocolo de lavagem, teve sua eficácia reduzida, visto que sua curva em azul claro estabilizou-se em torno de $\Delta\tau$ de 90 μs , sugerindo a influência de um fator adicional. Sem a presença de um Nanocleanser, o biossensor registra um $\Delta\tau$ elevado devido às ligações inespecíficas em toda a sua área, ultrapassando os 250 μs , como representado na curva em verde claro. No geral, é possível concluir que, além da padronização da lavagem, outro aspectos da solução do Nanocleanser podem estar influenciando diretamente sua performance: a sua concentração.

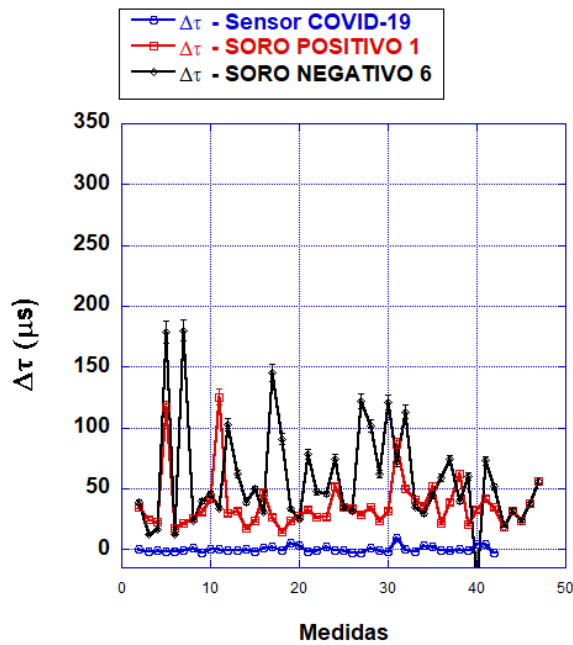
11.4 Influência da concentração na eficácia do Nanocleanser

A determinação da concentração final da solução do Nanocleanser é realizada por aproximação teórica, como discutido em 10.2.7. Como consequência, as concentrações finais efetivas de cada solução de Nanocleanser podem divergir consideravelmente da estimativa inicial, o que compromete a reprodutibilidade e a precisão nos experimentos. Com o objetivo de investigar o impacto da concentração do Nanocleanser na eficácia da limpeza, utilizou-se o Nanocleanser 6, previamente submetido ao protocolo padronizado de lavagem, conforme descrito anteriormente. Foram realizadas variações na sua concentração final, no intervalo de 500 pM a 25.000 pM, diluídos em CTAB 1mM. As medidas, neste caso, seguiram o protocolo de caráter temporal descrito em 10.2.5, utilizando o biossensor funcionalizado para detecção de COVID-19, na concentração de 50 pM e com amostras de soro positiva e negativa (Soro Positivo 1 e Soro Negativo 6), diluídos em PBS na proporção de 1:1000.

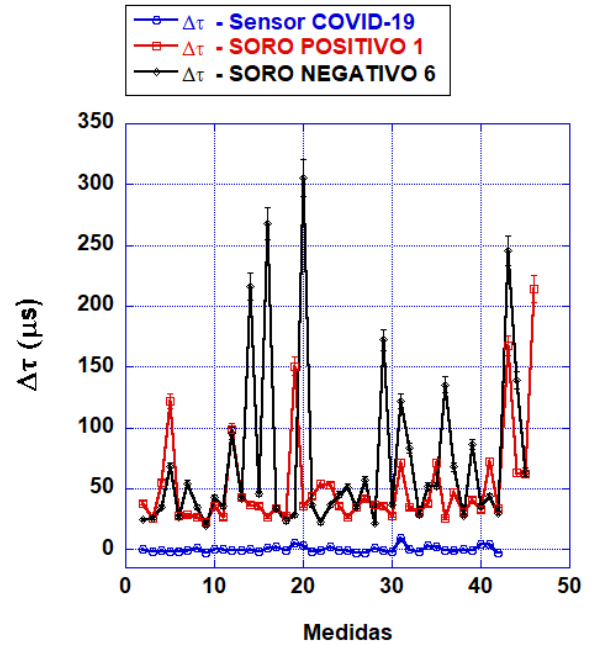
Vale destacar que a adoção do protocolo baseado em medidas temporais, em substituição ao protocolo volumétrico, foi com o intuito de se obter resultados mais precisos e confiáveis. Com a definição de um tempo fixo de aquisição de 10 minutos, foi possível coletar um número significativamente maior de curvas de autocorrelação (em média de 40 funções). Esse aumento na quantidade de dados permite acompanhar, com mais detalhes, a evolução do sistema. Devido ao método de ajuste da curva de τ descrito em 5.2, aplicando a linearização do logaritmo da curva de autocorrelação na plataforma BioSearch, utilizamos apenas os dois primeiros pontos, os dados obtidos da grandeza $\Delta\tau$ apresentam grandes flutuações naturais.

A Figura 34 apresenta os dados obtidos com o objetivo de investigar a influência da **concentração** do Nanocleanser na sua eficácia como agente de limpeza de interações inespecíficas no biossensor. Todos os gráficos apresentados incluem uma curva em azul, que corresponde à resposta do sensor funcionalizado para COVID-19 na concentração de 50 pM, na ausência de soro e de qualquer Nanocleanser. Essa curva de referência foi incluída com o propósito de facilitar a visualização da janela de distinção entre os sinais gerados por interações específicas e inespecíficas, permitindo uma melhor interpretação dos resultados experimentais:

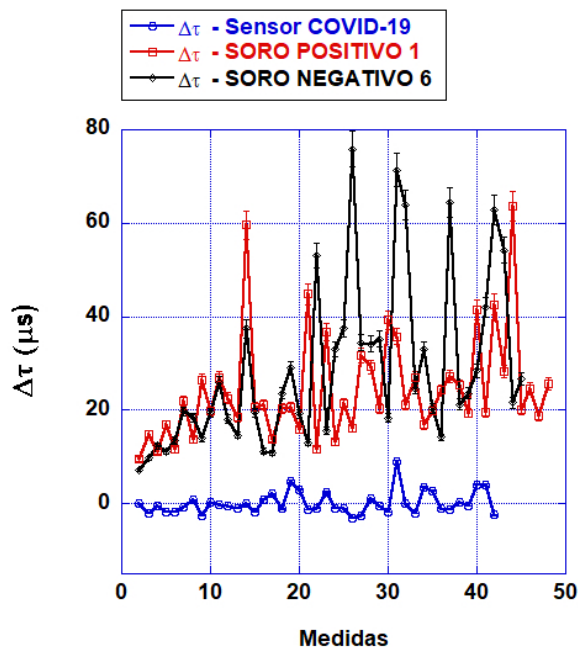
- Em (a) - 500pM de Nanocleanser 5: observa-se que as curvas do soro negativo (preta) e do soro positivo (vermelho) se sobrepõem consideravelmente, tornando inviável distinguir entre os dois tipos de amostra. Isso indica que a concentração de 500 pM do Nanocleanser 5 não foi eficaz em mitigar as interações inespecíficas.
- Em (b) - 1000pM de Nanocleanser 5: a sobreposição das curvas positiva (vermelho) e negativa (preta) persiste, sem permitir a diferenciação entre as amostras, ou seja, a concentração de 1000 pM do Nanocleanser 5 também se mostra ineficaz.



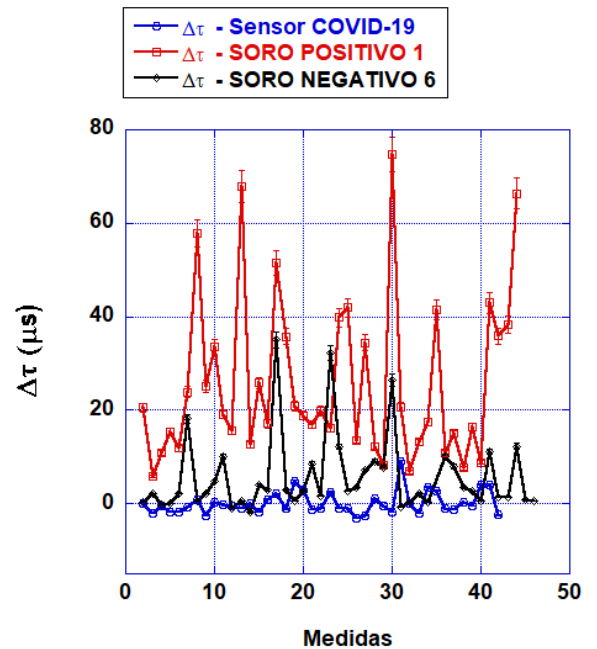
(a) Nanocleanser 5 em 500pM



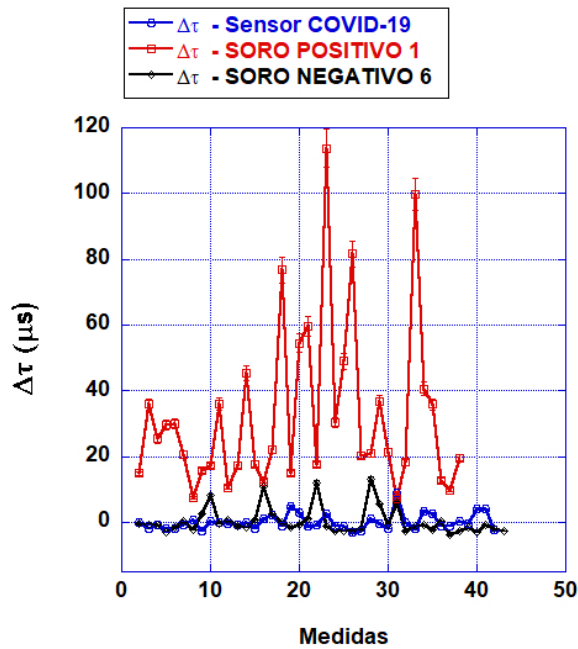
(b) Nanocleanser 5 em 1000pM



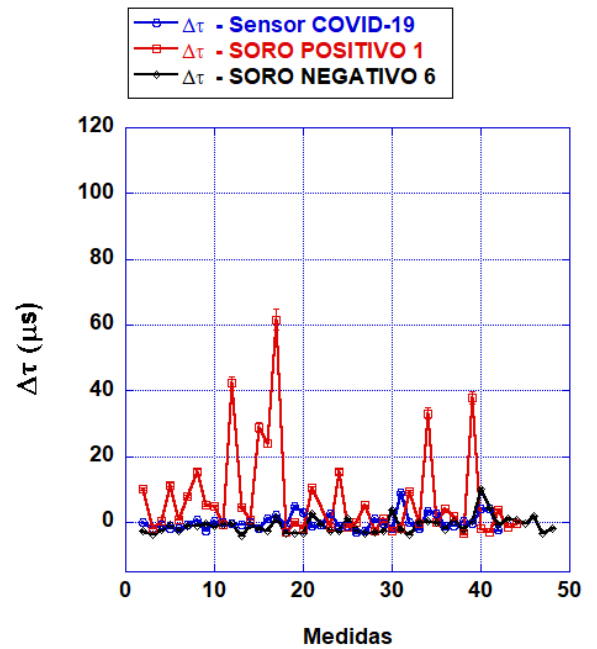
(c) Nanocleanser 5 em 2000pM



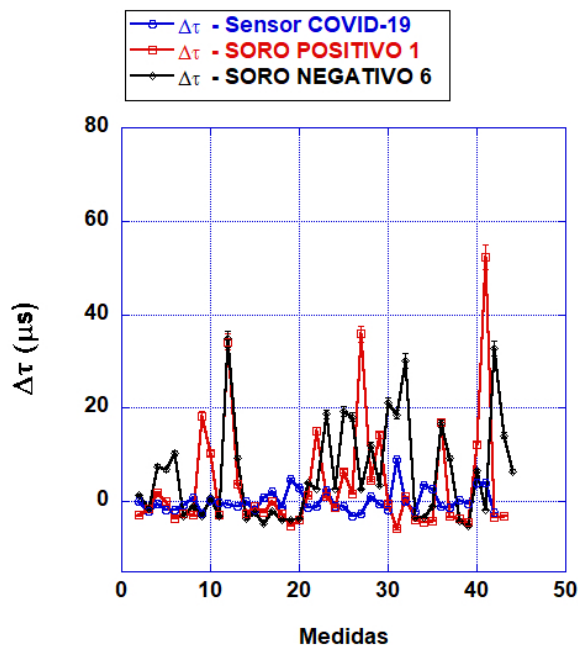
(d) Nanocleanser 5 em 3500pM



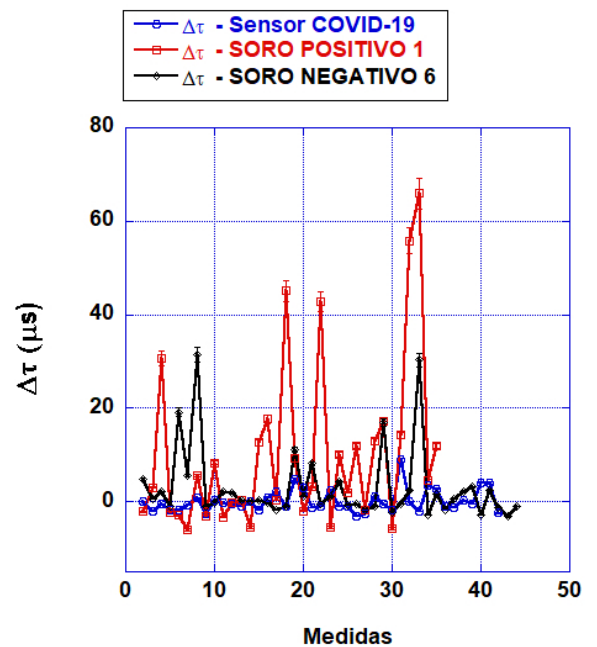
(e) Nanocleanser 5 em 5000pM



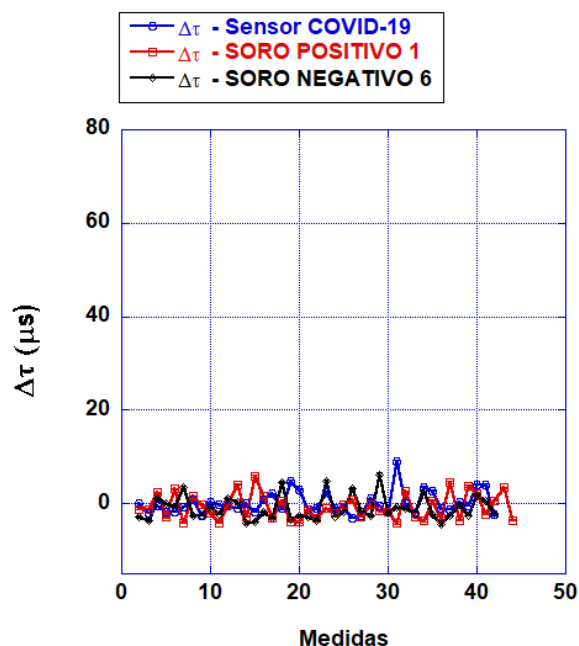
(f) Nanocleanser 5 em 7500pM



(g) Nanocleanser 5 em 10000pM



(h) Nanocleanser 5 em 15000pM



(i) Nanocleanser 5 em 25000pM

Figura 34 – Variação do τ por adição de soro negativo 6 e positivo 1 com Nanocleanser 6 em diferentes concentrações

- Em (c) - 2000pM de Nanocleanser 5: embora ainda não se observe uma clara separação entre as amostras positivas e negativas, os valores da grandeza $\Delta\tau$ diminuem significativamente. A curva negativa (preta) e positiva (vermelho), que anteriormente apresentavam variações acentuadas, diminui para valores em torno de $50\mu s$. Esses resultados sugerem que a concentração de 2000 pM do Nanocleanser 5 começa a apresentar eficácia parcial, reduzindo o número de interações inespecíficas, embora ainda insuficiente para garantir uma janela clara de distinção entre amostras positivas e negativas.
- Em (d) - 3500pM de Nanocleanser 5: A curva negativa (preta) apresenta uma redução ainda mais acentuada, oscilando em torno de $10\mu s$, valor inferior ao da curva positiva (vermelha), que permanece estável em oscilações próximas $30\mu s$. Esses dados indicam que a concentração de 3500 pM do Nanocleanser 5 demonstra maior eficácia na supressão das interações inespecíficas, restando predominantemente o sinal associado às ligações específicas, representado pela curva positiva.
- Em (e) - 5000pM de Nanocleanser 5: Observa-se a supressão completa do sinal da amostra negativa (preta), se igualando ao sinal gerado somente pelo sensor (azul), indicando a ação eficiente do Nanocleanser 5 na concentração de 5000 pM. A curva positiva permanece responsiva às ligações específicas.
- Em (f) - 7500pM, (g) - 10000pM, (h) - 15000pM e (i) - 25000pM: Tanto as curvas negativas (pretas) quanto as positivas (vermelhas) apresentam uma redução expressiva

nos valores de $\Delta\tau$, voltando a se sobrepor e inviabilizando a distinção entre amostras. Como consequência, há uma redução significativa no sinal detectado, que se iguala ao sinal basal gerado apenas pelo biossensor funcionalizado para COVID-19.

Como conclusão dos dados apresentados na Figura 34, observa-se a existência de uma janela de efetividade associada à concentração do Nanocleanser. Para mitigar os efeitos dessa limitação e garantir a eficácia da limpeza de interações inespecíficas, foi estabelecido um **protocolo específico de ajuste de concentração**, conforme descrito em 10.4.2. Esse protocolo prevê a realização de testes preliminares com o objetivo de identificar a concentração ótima de atuação do Nanocleanser, evitando assim, o uso de estimativas para o cálculo da concentração do Nanocleansers, como discutido em 10.2.7.

Para validar a eficácia do Nanocleanser 5 na mitigação de interações inespecíficas em concentrações da ordem de 5000 pM, foram conduzidos experimentos adicionais empregando o método de detecção temporal. Utilizou-se o sensor para COVID-19, submetido a diferentes amostras clínicas, o soro positivo 2 e o soro negativo 7, ambas diluídas na proporção de 1:1000 em solução tampão PBS. Conforme evidenciado nos resultados apresentados na Figura 35, observa-se que na curva da Figura 35.a, correspondente à condição experimental sem a aplicação do Nanocleanser 5, não há distinção significativa entre as respostas obtidas para as amostras positiva (vermelho) e negativa (preta). Ambas apresentaram variações semelhantes, com $\Delta\tau$ superiores a $60\mu s$, indicando a ocorrência de ligações inespecíficas em toda região cilíndrica e semiesférica e, portanto, comprometendo a seletividade do sensor na ausência do agente limpador.

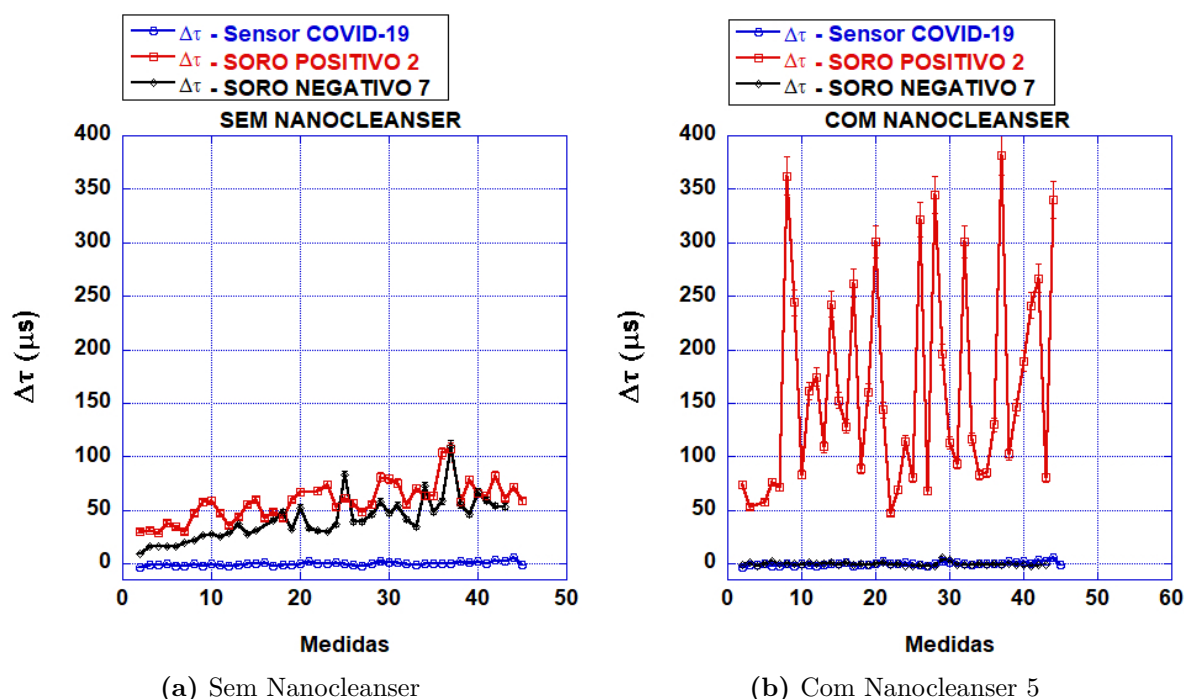


Figura 35 – Variação de τ com e sem Nanocleanser 5 em soro positivo 2 e soro negativo 7 em um biossensor de COVID-19 em 50pM

Já na curva 35.b, correspondente à condição experimental com a aplicação do Nanocleanser 5 na concentração de 5000 pM, observa-se que as ligações inespecíficas são completamente suprimidas no sinal da amostra negativa (curva preta), o qual se torna indistinguível do sinal de referência gerado apenas pelo sensor (curva vermelha). Por outro lado, a curva correspondente à amostra positiva (curva verde) permanece reativa, apresentando um $\Delta\tau$ superior a 250 μs , compatível com a presença de interações específicas entre os biocomponentes do sistema. Em síntese, os resultados demonstram que a faixa de atuação do Nanocleanser 5 em 5000 pM é eficaz na supressão de interações inespecíficas, inclusive em diferentes tipos de amostras clínicas, validando sua eficiência como agente limpador.

11.5 Validação

Em resumo, observou-se que a eficiência de atuação do Nanocleanser como agente limpador de interações inespecíficas está diretamente relacionada concentração de CTAB presente na solução e à sua respectiva faixa de atuação em termos de concentração final. Conforme discutido anteriormente, foram estabelecidos dois protocolos com o objetivo de mitigar essas limitações: um protocolo de lavagem padronizado (seção 10.4.1) e um protocolo específico de ajuste de concentração (seção 10.4.2). Adicionalmente, verificou-se que amostras clínicas negativas podem apresentar uma variação de $\Delta\tau$ de até 15 μs , atribuída à variabilidade das amostras utilizadas. Com base nessas observações, a proposta de mitigação das interações inespecíficas no biossensor da plataforma BioSearch foi estruturada em três etapas: a aplicação dos protocolos de lavagem, ajuste de concentração e a consideração de uma faixa de ruído experimental de até 15 μs para a grandeza $\Delta\tau$ para amostras negativas.

Com o objetivo de validar essa proposta, foram realizadas novas medidas utilizando um outro agente limpador (Nanocleanser 6). Ele foi submetido aos protocolos estabelecidos, e as análises foram conduzidas no modo de detecção temporal, empregando o biossensor para COVID-19 em concentração de 50 pM. Após a aplicação do protocolo de lavagem ao Nanocleanser 6, foi realizado o protocolo específico de ajuste de concentração, conforme apresentado na Figura 36:

- Em a) - 5000 pM de Nanocleanser 6: as curvas correspondentes ao soro positivo (vermelha) e ao soro negativo (preta) se sobrepõem, não sendo possível distinguir entre as amostras. Esse resultado indica que, nesta concentração, o Nanocleanser 6 não foi eficaz na mitigação das interações inespecíficas.
- Em b) - 10000 pM de Nanocleanser 6: ainda é observada a sobreposição dos sinais provenientes das amostras negativas e positivas, impossibilitando a diferenciação entre elas. Assim como no caso anterior, essa concentração não foi suficiente para a supressão das interações inespecíficas.
- Em c) - 15000 pM de Nanocleanser 6: verifica-se a separação entre os sinais gerados pelas amostras negativa (curva preta) e positiva (curva vermelha). Embora o sinal da amostra negativa, atribuído a interações inespecíficas, não tenha sido completamente suprimido, possivelmente devido à maior presença de interferentes na amostra, já é possível distinguir entre as duas condições. Esse resultado sugere que a concentração de 15000 pM representa a faixa de atuação efetiva do Nanocleanser 6 como agente limpador.
- Em d) - 20000 pM de Nanocleanser 6: nesta concentração, observa-se uma desestabilização do sensor, evidenciada pela drástica redução da resposta associada à amostra

positiva (curva verde), com valor de $\Delta\tau$ inferior a $10 \mu s$.

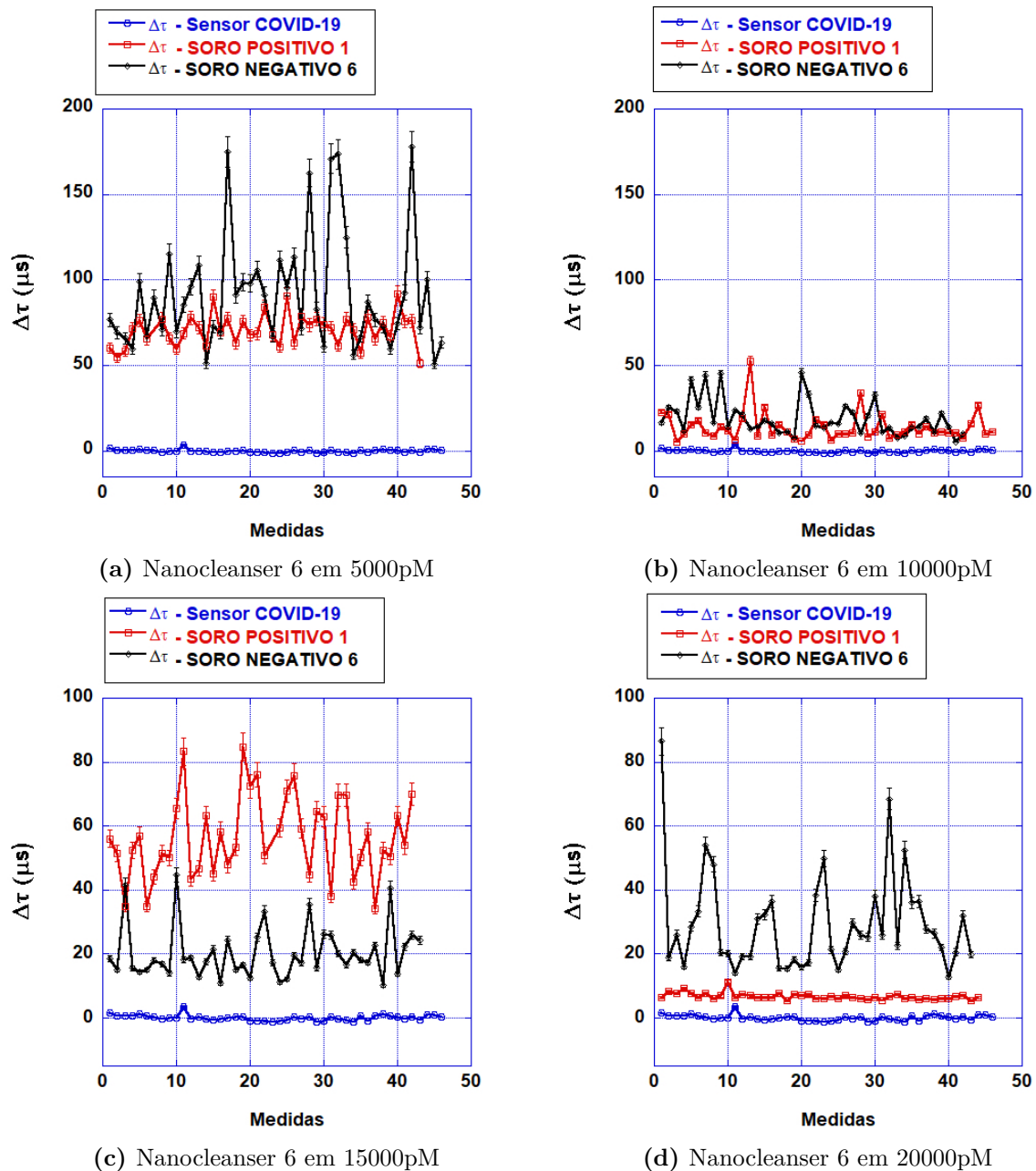


Figura 36 – Variação do τ por adição de soro negativo 6 e positivo 1 com Nanocleanser 6 em diferentes concentrações

Após a definição da faixa de concentração de 15000 pM como ideal para o Nanocleanser 6, foram realizadas medidas no modo de detecção temporal utilizando um sensor para COVID-19 em 50 pM. No total, foram analisadas seis amostras clínicas: três positivas (Soros Positivos 3, 4 e 5) e três negativas (Soros Negativos 6, 7 e 8). Os resultados estão apresentados na Figura 37, organizados conforme faixas de interpretação para leitura:

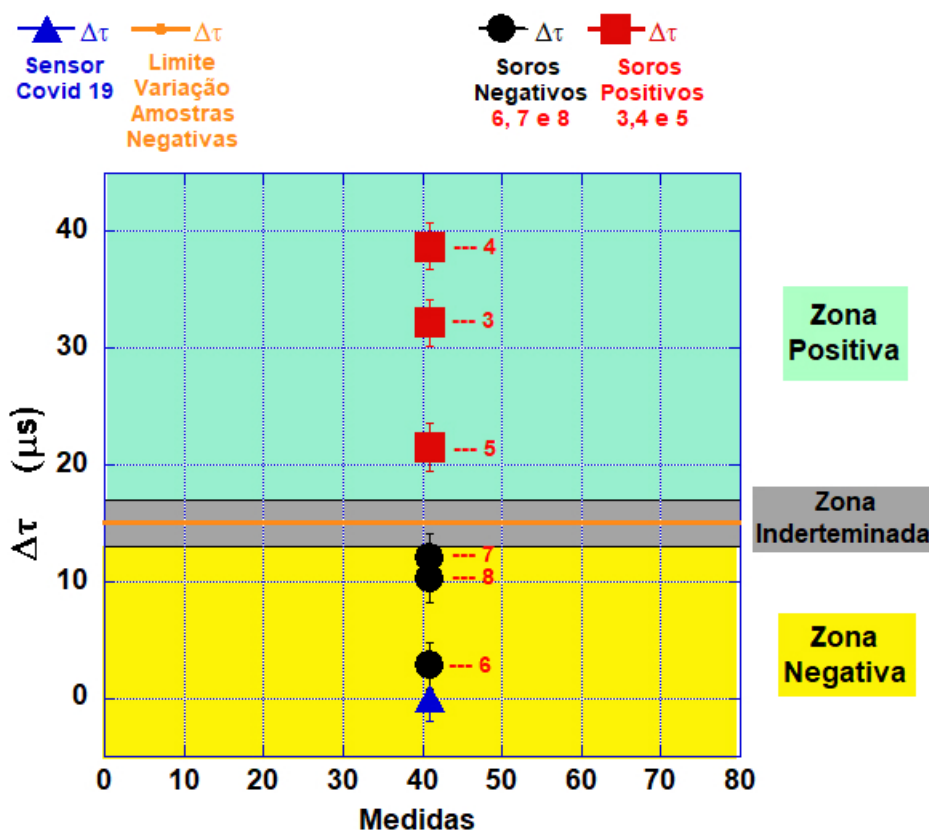


Figura 37 – Média do τ em amostras de soro positivas e negativas no sensor para COVID 19 com Nanoblocker 6 em 15000pM

- Zona negativa: corresponde aos valores médios de τ cuja resposta está dentro da faixa de variação típica associada a ligações inespecíficas, ou seja, o sinal basal do sensor com variação de até $(15 \pm 1) \mu s$, característico de amostras negativas.
- Zona indeterminada: intervalo de transição no qual a sobreposição dos sinais impede a classificação conclusiva da amostra como positiva ou negativa.
- Zona positiva: faixa de resposta que excede consistentemente o limite estabelecido para interações inespecíficas, indicando a presença de ligações específicas entre o analito e a proteína N, característica de amostras positivas.

Vale ressaltar que, com o objetivo de tornar a leitura dos dados mais clara ao utilizar as zonas de resposta, a figura 37 apresenta os valores médios das variações da grandeza $\Delta\tau$, acompanhados de suas respectivas incertezas. Para mitigar essas oscilações e fornecer uma leitura mais representativa do comportamento do sistema, adotou-se o valor médio de $\Delta\tau$ como parâmetro final de validação.

Os resultados demonstraram que, para as três amostras positivas analisadas (pontos em vermelho 3, 4 e 5), o valor médio de $\Delta\tau$ permaneceu dentro da zona positiva esperada (região verde), enquanto as três amostras negativas (pontos em preto 6, 7 e 8) apresentaram

respostas dentro da zona negativa esperada (região amarela). Assim, esses resultados obtidos de um validação da aplicação da proposta composta por três etapas: protocolo de lavagem, controle da faixa de atuação do agente de limpeza e consideração de uma faixa de ruído de até $15 \mu s$ para a grandeza τ , corroboram para a eficácia dos protocolos propostos.

12 Conclusão

O presente trabalho propôs e validou uma nova metodologia para mitigação das interações inespecíficas em biossensores ópticos do tipo label-free, com foco na plataforma BioSearch e na detecção do SARS-CoV-2 (Covid-19). A abordagem desenvolvida baseou-se na utilização de nanopartículas auxiliares denominadas Nanocleaners, com propriedades ópticas e morfológicas específicas com pico de Ressonância Plasmônica de Superfície Longitudinal fora da frequência do laser utilizado para medidas de DDLS na plataforma BioSearch, permitindo sua atuação seletiva sobre os interferentes presentes na amostra sem comprometer a sensibilidade do sistema.

Inicialmente, os experimentos foram realizados com nanobastões de ouro não funcionalizados e permitiram isolar o efeito das interações inespecíficas exclusivamente sobre a superfície cilíndrica da nanopartícula, recoberta por CTAB. Nessas condições, foi possível observar a ocorrência de adsorção de biomoléculas da matriz biológica, mesmo na ausência de bioreceptores. Tal fenômeno produziu um sinal constante de ruído na plataforma BioSearch, caracterizado por uma variação média de no máximo $\Delta\tau = (15 \pm 1) \mu s$. Esse valor de saturação representa um limite basal para o ruído de fundo gerado exclusivamente por ligações inespecíficas à região lateral cilíndrica dos AuNbs, mesmo sob diferentes diluições de soro.

Os resultados relacionados às grandezas C_0 e potencial zeta (ζ) sugerem que, embora ocorra adsorção de interferentes aos AuNbs, essas interações não resultam em colapso total do sistema. Ou seja, o sinal detectado pela plataforma BioSearch, mesmo em condição de interação não específica, gera ruído de fundo mas não inviabiliza a leitura, permitindo a manutenção da funcionalidade analítica da plataforma em contextos complexos.

Adicionalmente, foi demonstrado que os biossensores funcionalizados com proteína N exibem interações inespecíficas relevantes nas extremidades semiesféricas, pela presença da proteína funcionalizadora. Tais interações comprometem a seletividade do sensor ao gerar sinais falsos positivos e aumentar significativamente o ruído de fundo, sobretudo em amostras complexas como o soro humano.

Na etapa seguinte, foi testada a proposta do Nanocleaner como agente limpador dos componentes capazes de interagir de forma não específica com o biossensor (interferentes). Foram utilizados diferentes lotes de Nanocleaners e avaliadas suas performances em condições controladas. Os resultados indicaram que a eficácia desses agentes depende criticamente de dois fatores principais: a concentração final de CTAB residual na solução, regulada via protocolo de lavagem padronizado, e a faixa de concentração eficaz do próprio Nanocleaner utilizado no ensaio, normalizada via protocolo de ajuste da concentração

ideal.

Por fim, após a elaboração e o refinamento de toda a metodologia para garantir a eficácia dos Nanocleansers, a metodologia foi validada com sucesso por meio da análise de amostras clínicas reais. Os resultados demonstraram que a adição dos Nanocleansers foi eficaz em suprimir as interações inespecíficas, reduzindo significativamente o ruído de fundo associado à ligação não específica de interferentes. Essa supressão permitiu estabelecer faixas claras de diferenciação entre as amostras negativas e positivas, mesmo em matrizes complexas. Importante ressaltar que, apesar da atuação seletiva dos Nanocleansers, a plataforma manteve sua sensibilidade para detectar o analito-alvo do SARS-CoV-2, com respostas das amostras positivas superando o limiar basal de $\Delta\tau = (15 \pm 1) \mu s$ associado às interações inespecíficas somente na área cilíndrica.

Assim, conclui-se que a estratégia de mitigação proposta nesta dissertação é eficaz, reprodutível e adaptável a diferentes tipos de amostras clínicas. Os resultados obtidos não apenas validam a funcionalidade dos Nanocleansers como agentes limpadores de interferentes, mas também garante maior sensibilidade e acurácia do uso da plataforma BioSearch, aumentando sua seletividade e confiabilidade em aplicações diagnósticas reais.

Como perspectiva futura, propõe-se a construção de um equipamento dedicado à determinação precisa da concentração de Nanocleansers, utilizando da tecnologia da BioSearch, visando padronizar sua aplicação em diferentes matrizes biológicas. Em paralelo, pretende-se desenvolver uma curva de calibração específica para o surfactante CTAB, utilizado na síntese dos nanobastões de ouro. Essa curva permitirá quantificar com maior exatidão a concentração residual de CTAB em soluções de Nanocleansers prontas para uso, assegurando que a concentração final seja de fato $1mM$, conforme estabelecido nos protocolos. A implementação dessas medidas contribuirá significativamente para o controle de qualidade e a reprodutibilidade dos ensaios realizados na plataforma BioSearch.

Referências

- 3P Instruments GmbH & Co. KG. *Particle size measurement using dynamic light scattering (DLS)*. <<https://www.3p-instruments.com/measurement-methods/dynamic-light-scattering/>>. Acessado em 22 de julho de 2025. Citado na página 25.
- ALTUG, H. et al. Advances and applications of nanophotonic biosensors. **Nature Nanotechnology**, v. 17, n. 1, p. 5–16, Jan 2022. Epub 2022 Jan 17. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 12.
- AWARI, U. A. et al. Stable and reproducible synthesis of gold nanorods for biomedical applications: a comprehensive study. **IET Nanobiotechnology**, v. 12, n. 2, p. 182–190, 2018. Citado na página 59.
- BATISTA, K. G. **Validação e aplicação do uso da tecnologia Espectrômetro Portátil de Espalhamento de Luz em uma plataforma de biodeteção: um novo teste de diagnóstico, baseado em fotônica e nanotecnologia, para deteção de anticorpos contra o novo Corona Vírus**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022. Orientadora: Livia Siman Gomes; Coorientador: Oscar Nassif de Mesquita. Citado 9 vezes nas páginas 18, 19, 23, 24, 25, 27, 39, 40 e 48.
- BHATTACHARJEE, S. Dls and zeta potential – what they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016. Citado na página 30.
- CAO, J. et al. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 195, p. 332–351, 2014. Citado na página 18.
- CECCHET, F. et al. Redox mediation at 11-mercaptoundecanoic acid self-assembled monolayers on gold. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 5, p. 2241–2248, 2006. Citado na página 31.
- CHEN, H. et al. Gold nanorods and their plasmonic properties. **Chem. Soc. Rev.**, The Royal Society of Chemistry, v. 42, p. 2679–2724, 2013. Citado na página 18.
- CHEN, R. et al. Influence of alkyl trimethyl ammonium bromides on hydrothermal formation of α - $\text{caso}_4 \cdot 0.5\text{h}_2\text{o}$ whiskers with high aspect ratios. **Crystals**, v. 7, n. 1, p. 28, 2017. Citado na página 60.
- CONTRERAS-NARANJO, J. E.; AGUILAR, O. Suppressing non-specific binding of proteins onto electrode surfaces in the development of electrochemical immunosensors. **Biosensors**, v. 9, n. 1, p. 15, 2019. Citado na página 34.
- COSGROVE, T.; VINCENT, B. **Colloid Science: Principles, Methods and Applications**. 2. ed. Chichester, UK: John Wiley Sons Ltd, 2010. Citado na página 29.
- DAMBORSKY, P. et al. Optical biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 229, p. 615–633, 2016. Citado 3 vezes nas páginas 10, 12 e 33.

DOMINGUES, M. H. et al. Optical biosensors and their applications for the detection of water pollutants. **Biosensors**, v. 13, n. 3, 2023. ISSN 2079-6374. Citado na página 13.

Drexel University. **Piezoelectric microcantilever sensors for biosensing**. 2016. US9274087B2. Citado na página 34.

ENGLISH, E. et al. An overview of elisa: a review and update on best laboratory practices for quantifying peptides and proteins in biological fluids. **Journal of Immunological Methods**, Elsevier, v. 505, p. 113–120, 2023. Citado na página 12.

GEORGEOS, J. et al. Review of gold nanoparticles: Synthesis, properties, shapes, cellular uptake, targeting, release mechanisms and applications in drug delivery and therapy. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 10, p. 1332, 2024. Citado na página 15.

GLIDDEN, M.; MUSCHOL, M. Characterizing gold nanorods in solution using depolarized dynamic light scattering. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 16, p. 8128–8137, 2012. Citado na página 21.

HOMOLA, J. Surface plasmon resonance sensors for detection of biochemical molecular interactions. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 462–493, 2008. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 33.

HUANG, Y. et al. Molecular characterization of sars-cov-2 nucleocapsid protein. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, p. 1415885, 2024. Citado na página 31.

INSTRUMENTS, M. **Zetasizer Nano User Manual MAN0317**. [S.l.], 2009. Citado na página 29.

ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and Surface Forces**. 3. ed. London: Academic Press, 2011. Citado na página 33.

JAVAID, Z. et al. Reviewing advances in nanophotonic biosensors. **Frontiers in Chemistry**, v. 12, p. 1449161, Sep 2024. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 12.

JUNQUEIRA, C. M. **Da micologia clássica à nanotecnologia: aumento da eficiência para detecção de micoses sistêmicas e aplicação de um novo teste rápido e de baixo custo para diagnóstico de criptococose**. Dissertação (Dissertação de Mestrado) — Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brazil, 2020. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 31.

KARMAKAR, S. Particle size distribution and zeta potential based on dynamic light scattering: Techniques to characterise stability and surface distribution of charged colloids. In: _____. [S.l.: s.n.], 2019. p. 117–159. ISBN 978-93-85046-32-2. Citado na página 28.

LAGE, A. C. P. **Síntese e caracterização de nanobastões de ouro com polifenóis naturais e avaliação da atividade antifúngica, antiparasitária e antitumoral**. Tese (Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)) — Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, MG, 2020. Orientador: Prof. Dr. André Augusto Gomes Faraco. Coorientador: Prof. Dr. Luiz Orlando Ladeira. Citado na página 16.

LICHTENBERG, J. Y. et al. Non-specific adsorption reduction methods in biosensing. **Sensors (Basel)**, v. 19, n. 11, p. 2488, 2019. Citado na página 34.

- LIU, N. et al. Low fouling strategies for electrochemical biosensors targeting disease biomarkers. **Analytical Methods**, v. 11, n. 6, p. 702–711, 2019. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 34.
- MAPIOUR, M.; ABDELRASOUL, A. Critical influences of plasma pH on human protein properties for modeling considerations: Size, charge, conformation, hydrophobicity, and denaturation. **Journal of Composites Science**, v. 7, n. 1, 2023. ISSN 2504-477X. Citado na página 47.
- MOVCHAN, T. G. et al. Dynamic light scattering study of cetyltrimethylammonium bromide aqueous solutions. **Colloid Journal**, v. 74, n. 2, p. 239–247, 2012. Citado na página 57.
- Nico Ya Life. **Shif SPR**. 2023. Acesso em: 30 jun. 2025. Disponível em: <<https://nicoyalife.com/>>. Citado na página 14.
- PANZADE, P.; THAKKAR, S.; WANJALE, S. Green synthesis of gold nanoparticles using colchicum autumnale and its charecterization. **International Journal of Advanced Research**, Int. J. of Adv. Res, p. 596–607, 04 2016. Citado na página 48.
- PEARCE, M. et al. Multifunctional nanorods for biomedical applications. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 12, p. 2335–2352, 2007. Citado na página 31.
- PECORA, R. (Ed.). **Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy**. New York: Springer, 1985. (Springer Advanced Texts in Chemistry). ISBN 9780306417900. Citado na página 21.
- PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 8–24, 2011. ISSN 0003-2670. Citado na página 18.
- Politecnico di Milano. Photonics Lab. **Biossensor Microcavidades ressonantes**. 2024. Acesso em: 30 jun. 2025. Disponível em: <<https://photonics.deib.polimi.it/biosensing/>>. Citado na página 14.
- REVERBERI, R.; REVERBERI, L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. **Blood Transfusion**, v. 5, p. 227–240, 2007. Citado 2 vezes nas páginas 33 e 52.
- SAKHO, E. H. M. et al. Dynamic light scattering (dls). In: **Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization**. [S.l.]: Elsevier, 2017. v. 3, p. 37–49. Citado na página 21.
- SALINAS, S. R. A. Einstein, o atomismo e a teoria do movimento browniano. **Revista USP**, n. 66, p. 38–43, 2005. Citado na página 20.
- SANG, S. et al. Progress of new label-free techniques for biosensors: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 465–481, 2016. Citado na página 13.
- L. Gomes Siman, O. Nacif Mesquita e L. Orlando Ladeira. **Espectrômetro portátil de espalhamento de luz e processo para determinação da função de autocorrelação temporal média**. 2016. BR1020160097657. Privilégio de Inovação. Citado na página 23.
- SOARES, M. S. et al. Immunosensing based on optical fiber technology: Recent advances. **Biosensors**, v. 11, n. 9, 2021. ISSN 2079-6374. Citado na página 14.

- SOLER, M.; LECHUGA, L. M. Biochemistry strategies for label-free optical sensor biofunctionalization: advances towards real applicability. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 18, p. 5071–5085, 2022. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 34.
- STONE, J.; JACKSON, S.; WRIGHT, D. Biological applications of gold nanorods. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 3, n. 1, p. 100–109, Jan-Feb 2011. Citado na página 18.
- TIRADO, M. M.; MARTÍNEZ, C. L.; TORRE, J. G. de la. Comparison of theories for the translational and rotational diffusion coefficients of rod-like macromolecules. application to short dna fragments. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 4, p. 2047–2052, 1984. Citado na página 20.
- TSCHARNUTER, W. Photon correlation spectroscopy in particle sizing. In: MEYERS, R.; FLIPPEN, R. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 21.
- VASILESCU, A. et al. Promising solutions to address the non-specific adsorption in biosensors based on coupled electrochemical-surface plasmon resonance detection. **Chemosensors**, MDPI, v. 13, n. 3, p. 92, 2025. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 35.
- VERSIANI, A. F. et al. Gold nanoparticles and their applications in biomedicine. **Future Virology**, mar. 2016. ISSN 1746-0794. Citado na página 31.
- WANG, W. et al. Seedless synthesis of gold nanorods using resveratrol as a reductant. **Nanotechnology**, v. 27, n. 16, p. 165601, Mar. 2016. Citado 3 vezes nas páginas 16, 17 e 18.
- ZANCHETTA, G. et al. Emerging applications of label-free optical biosensors. **Nanophotonics**, v. 6, n. 4, p. 627–645, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 13.

Anexos

ANEXO A – Código Curva teórica da variação do tamanho do diâmetro d da área cilíndrica do nanobastão de ouro AuNbs em função da variação de τ .

```

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.constants import Boltzmann as kB
from scipy.interpolate import interp1d

# Constants
T = 298          # Temperature in K (25 °C)
ETA_WATER = 0.00089 # Viscosity of water at 25 °C in Pa·s
L = 40e-9       # Length of the nanorod in meters (40 nm)

def calculate_gamma(d_values_m, L, T, eta):
    """Calculates the rotational linewidth Gamma for given diameters."""
    gamma_values = []

    for d in d_values_m:
        sigma = L / d

        term_bracket = np.log(sigma) - 0.662 + (0.917 / sigma) - (0.05 / (sigma**2))

        if term_bracket <= 0:
            gamma_values.append(np.nan)
            continue

        DR = (3 * kB * T) / (np.pi * eta * L**3) * term_bracket
        Gamma = 12 * DR
        gamma_values.append(Gamma)

    return np.array(gamma_values)

```

```

# Main execution
if __name__ == "__main__":
    # Range for d (diameter) in meters starting from 17 nm
    d_values_nm = np.linspace(10, 30, 500)
    d_values_m = d_values_nm * 1e-9

    gamma_values = calculate_gamma(d_values_m, L, T, ETA_WATER)
    gamma_values_mega = gamma_values / 1e6 # Convert to s-1

    # Calculate  $\tau = 1 / (\gamma - (1/4.6))$  [s]
    tau_values = 1 / (gamma_values_mega - (1/4.6))

    # Find values at d = 17 nm
    d_target = 17
    idx_17 = np.abs(d_values_nm - d_target).argmin()
    gamma_at_17 = gamma_values_mega[idx_17]
    tau_at_17 = tau_values[idx_17]
    tau_target = tau_at_17 + 15 # (17) + 15 s

    # Create interpolation function to find d where (d) = _target
    valid_mask = ~np.isnan(tau_values)
    f = interp1d(tau_values[valid_mask], d_values_nm[valid_mask],
                 kind='linear', fill_value='extrapolate')
    d_at_tau_target = f(tau_target)

    # Plotting
    plt.figure(figsize=(12, 7))
    plt.plot(d_values_nm, tau_values, color='royalblue', linewidth=2)

    # Mark the points with error bars (valores inteiros para as incertezas)
    plt.errorbar(d_target, tau_at_17, yerr=2, xerr=1,
                 fmt='o', color='green', markersize=8, capsizes=5,
                 label=f'd = {d_target:.0f} ±1 nm, = {tau_at_17:.0f} ±2 s')
    plt.errorbar(d_at_tau_target, tau_target, yerr=2, xerr=1,
                 fmt='o', color='red', markersize=8, capsizes=5,
                 label=f'd = {d_at_tau_target:.0f} ±1 nm, = {tau_target:.0f} ±2 s')

    # Add reference lines
    plt.axhline(y=tau_at_17, color='green', linestyle=':', alpha=0.3)

```

```
plt.axhline(y=tau_target, color='red', linestyle=':', alpha=0.3)
plt.axvline(x=d_target, color='green', linestyle=':', alpha=0.3)
plt.axvline(x=d_at_tau_target, color='red', linestyle=':', alpha=0.3)

# Labels and title with increased font sizes
plt.title(r'Relaxation Time  $\tau = \frac{1}{\Gamma - (1/4.6)}$  vs. Nanorod Dia
          fontsize=18, pad=20)
plt.xlabel('Diameter d (nm)', fontsize=16)
plt.ylabel(r' $\tau$  ( $\mu$ s)', fontsize=16)

# Set y-axis limits
y_min = max(0, np.nanmin(tau_values)*0.9)
y_max = np.nanmax(tau_values)*1.1
plt.ylim(bottom=y_min, top=y_max)

# Formatting with larger fonts
plt.xticks(fontsize=14)
plt.yticks(fontsize=14)

# Legenda no canto esquerdo com fonte maior
plt.legend(loc='upper left', frameon=True, framealpha=0.8, fontsize=14,
          handletextpad=0.5, borderpad=1)

plt.tight_layout()
plt.show()

# Print results (também com valores inteiros para as incertezas)
print(f"Para d = {d_target} nm:")
print(f" = {gamma_at_17:.6f} s-1")
print(f" = 1/( - (1/4.6)) = {tau_at_17:.0f} ±2 s")
print(f"Diâmetro onde = {tau_target:.0f} ±2 s: d = {d_at_tau_target:.0f} ±1 nm")
```