

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ARTHUR FELIX POEIRAS

DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS PLASMÔNICAS À BASE DE
NANOBASTÕES DE OURO BIOCONJUGADOS COM PEPTÍDEOS

PATOS DE MINAS - MG
MARÇO DE 2026

ARTHUR FELIX POEIRAS

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS PLASMÔNICAS À BASE DE
NANOBASTÕES DE OURO BIOCONJUGADOS COM PEPTÍDEOS**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Claudilene Ribeiro Chaves

Coorientador: Me. Kennedy Batista Gonçalves

PATOS DE MINAS - MG

MARÇO DE 2026

ARTHUR FELIX POEIRAS

**Desenvolvimento de plataformas plasmônicas à base de nanobastões de ouro
bioconjugados com peptídeos**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca Examinadora:

Dra. Claudilene Ribeiro Chaves - IBTEC/UFU Presidente

Dr. Diego Leoni Franco - IQ/UFU - Membro

Dra. Caroline Magalhães Junqueira. CTNano/UFMG - Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas, MG, 13 de março de 2026.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sua providência e por ter me guiado em todos os momentos desta jornada.

A concretização deste Trabalho de Conclusão de Curso é o resultado de um esforço que transcende o âmbito puramente acadêmico, sendo sustentado pela colaboração, confiança e apoio incondicional de diversas pessoas e instituições.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e ao curso de Biotecnologia, pela formação sólida e pela oportunidade de desenvolvimento científico que pavimentaram o caminho para esta pesquisa.

À minha orientadora, Profa. Dra. Claudilene Ribeiro Chaves, a quem dedico a mais profunda gratidão. Sua orientação não se limitou à correção técnica e à condução do projeto, mas se estendeu a um apoio estratégico e pessoal fundamental. Em um momento crucial da minha formação, quando as portas para a área de interesse futuro (edição gênica em células-tronco) pareciam fechadas por limitações de infraestrutura ou por obstáculos alheios à ciência, a senhora demonstrou uma visão e um empenho excepcionais. Seu esforço em viabilizar uma pesquisa de Iniciação Científica que servisse como ferramenta para o meu futuro, estabelecendo uma parceria interinstitucional para aplicar a nanotecnologia à área médica, foi um ato de confiança e dedicação que jamais esquecerei. Sua crença no meu potencial e a busca incansável por soluções foram o motor deste trabalho.

À Profa. Dra. Thaíse Gonçalves de Araújo, pela disponibilização do peptídeo utilizado neste trabalho e pela contribuição fundamental para a viabilização da pesquisa.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em especial ao Laboratório SMS no CTNano, por cederem a infraestrutura de ponta e o espaço necessário para a execução da etapa experimental. A acolhida calorosa e o tratamento dispensado por toda a equipe fizeram com que eu me sentisse parte do grupo, transformando o período de pesquisa em uma experiência de aprendizado e camaradagem. Agradeço imensamente a Livia Siman Gomes, Caroline Magalhães Junqueira, Tatiane Santos e Kennedy Batista Gonçalves pelo auxílio técnico, pelos ensinamentos valiosos e pelas contribuições que enriqueceram a pesquisa.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, por um apoio que transcende a compreensão e que não pode ser traduzido em palavras. O suporte incondicional, mesmo à distância, e os sacrifícios feitos para que eu pudesse concluir esta etapa da minha vida foram a base emocional que me permitiu persistir.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero muito obrigado.

RESUMO

Plataformas plasmônicas baseadas em nanobastões de ouro apresentam elevado potencial para aplicações biomédicas, porém sua tradução para sistemas biológicos ainda é limitada por desafios relacionados à estabilidade coloidal e à biocompatibilidade, especialmente associados ao uso de surfactantes durante a síntese. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e otimizar um vetor em escala nanométrica, estabelecendo um protocolo reprodutível que abrange desde a etapa de purificação até a bioconjugação. Para isso, foram comparados dois protocolos de lavagem, sendo selecionada a lavagem em etapas por preservar de forma mais eficiente o comportamento óptico e proporcionar maior estabilidade eletrostática e melhor adequação hidrodinâmica do material de partida. A confirmação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada nos nanobastões de ouro purificados, previamente à etapa de funcionalização. Em seguida, investigou-se a funcionalização superficial com ácido 11-mercaptopundecanóico em diferentes razões molares (1:1, 5:1 e 10:1 moléculas/nm²), monitorando-se alterações espectrais, hidrodinâmicas e eletrocinéticas. A bioconjugação covalente de um peptídeo (B7) com potencial terapêutico em contexto oncológico foi realizada por meio da ativação de grupos carboxila, sendo acompanhada principalmente pelo aumento do volume hidrodinâmico, utilizando como evidência indireta a ligação superficial. A integração dos resultados de estabilidade eletrostática, desempenho hidrodinâmico e consistência operacional indicou que a condição 5:1 representa o melhor compromisso experimental, mantendo estabilidade adequada e desempenho consistente na bioconjugação, enquanto a condição 10:1 apresentou menor margem de segurança eletrostática. Conclui-se que o sistema otimizado constitui uma plataforma estável e reprodutível, com potencial para avançar para validações funcionais em meios biológicos e aplicações futuras em diagnóstico e terapia.

Palavras-chave: Nanobastões de Ouro. Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada. Bioconjugação Peptídica. Nanovetores. Estabilidade Coloidal.

ABSTRACT

Plasmonic platforms based on gold nanorods exhibit significant potential for biomedical applications, but their translation into biological systems remains limited by challenges related to colloidal instability and biocompatibility, particularly those associated with the use of surfactants during synthesis. This study aimed to develop and optimize a nanoscale vector by establishing a reproducible protocol encompassing steps from purification to bioconjugation. Two washing protocols were compared, and stepwise washing was selected for its superior preservation of the optical properties, enhanced electrostatic stability, and improved hydrodynamic suitability of the starting material. Morphological confirmation by transmission electron microscopy was performed on the purified gold nanorods, prior to the functionalization step. Subsequently, surface functionalization with 11-mercaptopundecanoic acid was investigated at different molar ratios (1:1, 5:1, and 10:1 molecules/nm²), with spectral, hydrodynamic, and electrokinetic changes systematically monitored. Covalent bioconjugation of a peptide (B7) with therapeutic potential in an oncological context was carried out via activation of carboxyl groups and was primarily monitored through the increase in hydrodynamic volume, used as indirect evidence of surface binding. The integrated analysis of electrostatic stability, hydrodynamic performance, and operational consistency indicated that the 5:1 condition represents the optimal experimental compromise, maintaining adequate stability and consistent bioconjugation performance, whereas the 10:1 condition exhibited a narrower electrostatic safety margin. In conclusion, the optimized system constitutes a stable and reproducible platform with potential to advance toward functional validation in biological media and future applications in diagnostics and therapy.

Keywords: Gold Nanorods. Localized Surface Plasmon Resonance. Peptide Bioconjugation. Nanovectors. Colloidal Stability.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AgNO₃: Nitrato de Prata
AR: Razão de Aspecto (*Aspect Ratio*)
Au(0): Ouro metálico
Au(III): Íon ouro trivalente
AuCl₃: Cloreto de Ouro (III)
AuNPs: Nanopartículas de Ouro (*Gold Nanoparticles*)
AuNRs: Nanobastões de Ouro (*Gold Nanorods*)
CMC: Concentração Micelar Crítica
COOH: Grupo Carboxila
CPPs: Peptídeos Penetrantes de Células (*Cell-Penetrating Peptides*)
CTAB: Brometo de Cetiltrimetilamônio
CTNano: Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno
D-DLS: *Depolarized Dynamic Light Scattering*
DI: Água Deionizada (*Deionized Water*)
DLS: Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*)
DP: Desvio Padrão
EDAC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPEL: Espectrômetro Portátil de Espalhamento de Luz
FTIR: Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)
HAuCl₄: Ácido Tetracloroáurico
IBTEC: Instituto de Biotecnologia
IQ/UFU: Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
LSPR: Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada
MATLAB: *Matrix Laboratory*
MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico
MM: Massa Molar (*Molar Mass*)
MUA: Ácido 11-Mercaptoundecanóico
NaBH₄: Borohidreto de Sódio
NHS: N-Hidroxisuccinimida
NIR: Infravermelho Próximo (*Near-Infrared*)
NPs: Nanopartículas (*Nanoparticles*)
NRs: Nanobastões (*Nanorods*)
OD₄₀₀: Densidade Óptica em 400 nm (*Optical Density at 400 nm*)
ODS: Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
PBS: Solução Tampão Fosfato-Salina (*Phosphate-Buffered Saline*)
SAM: Monocamada Auto-organizada (*Self-Assembled Monolayer*)
SEI: Sistema Eletrônico de Informações
SMS: Segurança, Meio Ambiente e Saúde
SPR: Ressonância de Plasmon de Superfície (*Surface Plasmon Resonance*)
TCC: Trabalho de Conclusão de Curso
TEM: Microscopia Eletrônica de Transmissão (*Transmission Electron Microscopy*)
Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
UFU: Universidade Federal de Uberlândia
UV-Vis: Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-Visível

XPS: Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*)

Símbolos

$\Delta\tau$: Variação do tempo de relaxação rotacional

L: Comprimento (Length)

d: Diâmetro

λ_{LSPR} : Comprimento de onda de Ressonância Plasmônica Longitudinal

λ_{max} : Comprimento de onda máximo

n: Tamanho amostral

τ : Tempo de relaxação rotacional (tau)

ζ : Potencial Zeta (zeta)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da banda de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) em nanopartículas plasmônicas esféricas (A) e em forma de bastão (B)...	16
Figura 2 - Espectros de absorção UV-Vis-NIR representativos de AuNRs com os picos de LSPR em 650 nm, 760 nm, 840 nm, 900 nm, 1000 nm, 1036 nm, 1060 nm e 1100 nm (esquerda para a direita) (a). Relação entre os picos de LSPR longitudinal e as AR calculadas (por imagens de TEM). A linha reta representa o ajuste linear dos pontos de dados (b). Imagens de TEM representativas de AuNRs com os picos de LSPR longitudinal em (c) 650 nm, (d) 760 nm, (e) 920 nm e (f) 1000 nm. Barras de escala: 100 nm (c-f).....	17
Figura 3 - Estrutura química do ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), composto contendo grupo tiol e grupo carboxílico.....	20
Figura 4 - Esquema ilustrativo de AuNRs funcionalizados, destacando aplicações em (i) terapia fototérmica no infravermelho próximo (NIR), (ii) liberação controlada de fármacos, (iii) entrega de ácidos nucleicos (DNA/RNA), (iv) conjugação com proteínas, peptídeos e anticorpos, (v) direcionamento por ligantes específicos, (vi) marcadores para imagens, (vii) sondas ópticas e (viii) remoção de microrganismos e toxinas.....	22
Figura 5 - Representação esquemática de nanovetor plasmônico composto por nanobastão de ouro (AuNR) funcionalizado com ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) e bioconjugado com peptídeo via química EDAC/NHS.....	24
Figura 6 - Espectro de absorção UV-Vis dos AuNRs: banda transversal (525 nm) e banda longitudinal (645 nm) e caracterização físico-química das amostras recém-sintetizadas.....	32
Figura 7 - Espectros de absorção UV-Vis das dispersões coloidais de nanobastões de ouro (AuNRs) em diferentes condições de CTAB e procedimentos de lavagem. (A) Espectros completos na faixa de 400–1000 nm. (B) Ampliação da região do pico de ressonância plasmônica longitudinal (λ LSPR), entre 550–700 nm. O material bruto corresponde à dispersão em 50 mM de CTAB, enquanto as amostras submetidas à lavagem direta e à lavagem em etapas (Ensaio 1 e 2) referem-se às dispersões em 6 mM de CTAB.....	36
Figura 8 - Micrografia TEM dos AuNRs após lavagem em etapas (condição final: 6 mM CTAB). Barra de escala = 100 nm.....	39
Figura 9 - Micrografia TEM em maior ampliação dos AuNRs após lavagem em etapas (6 mM CTAB), destacando partículas individuais. Barra de escala = 50 nm.....	40
Figura 10 - Sobreposição dos espectros de absorção UV-Vis normalizados (banda longitudinal) dos AuNRs em 6 mM de CTAB após funcionalização com MUA (Ensaio 2). As variações na posição de λ LSPR são pequenas e, em grande parte, compatíveis com a incerteza instrumental; observa-se modulação do perfil espectral e um deslocamento discreto (~3 nm) na condição MUA 10:1 em relação ao controle, compatível com alteração do microambiente superficial.....	45
Figura 11 - Comparação dos espectros de absorção UV-Vis normalizados mostrando a presença de um ombro (shoulder) em maiores comprimentos de onda no controle (6 mM CTAB), compatível com acoplamento plasmônico por aproximação lateral (side-by-side). Após funcionalização com MUA (ex.: 10:1), observa-se redução do ombro e recuperação de um perfil mais estreito, sugerindo melhora da dispersão coloidal.....	47
Figura 12 - Monitoramento hidrodinâmico da bioconjugação do peptídeo na condição (5:1). Comparação do Tempo de Relaxação Rotacional (τ) entre o Controle (AuNR-MUA ativado) e	

o Nanovetor, evidenciando o incremento significativo do volume hidrodinâmico ($\Delta\tau \approx 1,91 \mu s$) compatível à bioconjugação da biomolécula na superfície. As barras de erro representam o desvio padrão (n=10)..... 52

Figura 13 - Avaliação da estabilidade eletrostática final dos nanovetores (ensaio 2). Valores de potencial zeta (ζ) para as diferentes razões; a linha tracejada indica o limiar empírico de estabilidade ($\approx +30 \text{ mV}$). Observa-se que 10:1 situa-se em região limítrofe, enquanto 5:1 permanece em faixa estável e consistente..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos dos AuNRs após diferentes processos de lavagem (concentração final de 6 mM de CTAB).....	33
Tabela 2 – Parâmetros morfométricos por TEM e estimativas por método óptico/coloidal em AuNRs (lavagem em etapas; 6 mM CTAB).....	41
Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos dos AuNRs após funcionalização com MUA em diferentes razões molares (MUA:Área de Calota).....	43
Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos e variação do tempo de relaxação rotacional ($\Delta\tau$) após a bioconjugação (ensaio 1).....	51
Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos e variação do tempo de relaxação rotacional ($\Delta\tau$) após a ensaio de reprodutibilidade de bioconjugação (ensaio 2).....	53
Tabela 6 - Potencial zeta dos nanovetores finais (ensaio 2) e avaliação da estabilidade coloidal.....	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Nanobastões de ouro e Propriedades Plasmônicas.....	15
1.2 Síntese, funcionalização superficial e estabilidade coloidal.....	18
1.3. Bioconjugação de Nanobastões de Ouro.....	21
1.3.1. Peptídeos como ligantes biomoleculares.....	23
1.4. Caracterização de bioconjugados.....	24
1.5. Hipótese e Relevância.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Materiais.....	28
3.2 Síntese e Purificação dos Nanobastões de Ouro (AuNRs).....	29
3.3 Funcionalização dos AuNRs com Ácido 11-Mercaptoundecanóico (MUA).....	29
3.4 Bioconjugação dos AuNRs-MUA aos Peptídeos.....	30
3.5 Caracterização Físico-Química e estrutural.....	30
3.5.1 Espectroscopia de absorção no UV-Vis.....	30
3.5.2 Espectrômetro Portátil de Espalhamento de Luz (EPEL).....	31
3.5.3 Potencial Zeta (ζ).....	31
3.5.4 Cálculo da Concentração Molar.....	31
3.5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM):.....	31
3.6 Análise de Dados.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Caracterização dos AuNRs pós-Síntese.....	32
4.2 Processo de purificação dos AuNRs.....	33
4.2.1 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	38
4.3 Funcionalização dos AuNRs com ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA).....	42
4.3.1 Análise espectral e organização da monocamada de MUA.....	43
4.3.2 Análise Eletrostática e contribuição do τ	47
4.4 Bioconjugação AuNRs-Peptídeos e Avaliação da Estabilidade Operacional.....	50
4.4.1 Avaliação da Eficiência de Bioconjugação (ensaio 1).....	50
4.4.2 Avaliação da Reprodutibilidade da bioconjugação (ensaio 2).....	53
4.5 Análise Eletrostática Final e Seleção do Nanovetor Otimizado.....	55
4.5.1 Impacto da Bioconjugação na Estabilidade Eletrostática.....	55
4.5.2 Seleção da Condição Padrão do Nanovetor.....	57
4.4.3 Limitações e implicações para a validação do nanovetor.....	57
5 CONCLUSÃO.....	59

REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICES.....	69
APÊNDICE A: INVESTIGAÇÃO DE ARTEFATOS TÉRMICOS NA CONDIÇÃO 1:169	
APÊNDICE B: PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO DE POTENCIAL ZETA DO NANOVETOR OTIMIZADO.....	69

1. INTRODUÇÃO

As plataformas plasmônicas à base de nanomateriais têm atraído crescente interesse devido à sua capacidade de converter estímulos ópticos em sinais detectáveis ou respostas funcionais. Por meio da Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (*Localized Surface Plasmon Resonance* - LSPR), essas plataformas permitem o monitoramento de interações biomoleculares, bem como o desenvolvimento de sistemas para diagnóstico, liberação controlada e terapias fototérmicas (Esporrín-ubierto et al., 2025).

Nesse contexto, a nanobiotecnologia tem emergido como uma área interdisciplinar de vanguarda, promovendo uma revolução silenciosa em setores que vão da medicina à eletrônica. Ao manipular a matéria em escala nanométrica (1 e 100 nanômetros), cientistas têm desenvolvido materiais com propriedades físico-químicas singulares, antes inatingíveis em macroescala (Malik; Muhammad; Waheed, 2023). Dentre esses, os nanomateriais plasmônicos, como as nanopartículas de ouro (AuNPs), destacam-se por sua capacidade de interagir com a luz de maneira singular, em razão do fenômeno da LSPR (Willeits; Van Duyne, 2007). Essa propriedade não apenas confere cores vibrantes a dispersões coloidais, mas também amplia significativamente um leque de aplicações em diagnóstico, terapia e sensoriamento (Hammami et al., 2021).

No entanto, a translação dessas promessas da bancada para o mercado enfrenta um obstáculo crítico: a estabilidade e a biocompatibilidade. Muitas rotas de síntese, especialmente para geometrias anisotrópicas como os AuNRs, dependem do uso de surfactantes citotóxicos, como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), que é fundamental para direcionar o crescimento dos nanobastões (NRs). Entretanto sua presença residual compromete a aplicação biológica e a estabilidade a longo prazo das partículas (Del Caño et al., 2020). Além disso, a remoção incompleta do CTAB ou a perda da estabilidade durante as etapas de purificação (lavagem) podem levar a resultados irreprodutíveis, formação de agregados indesejados e artefatos experimentais, representando um gargalo significativo para o desenvolvimento de nanovetores robustos e seguros.

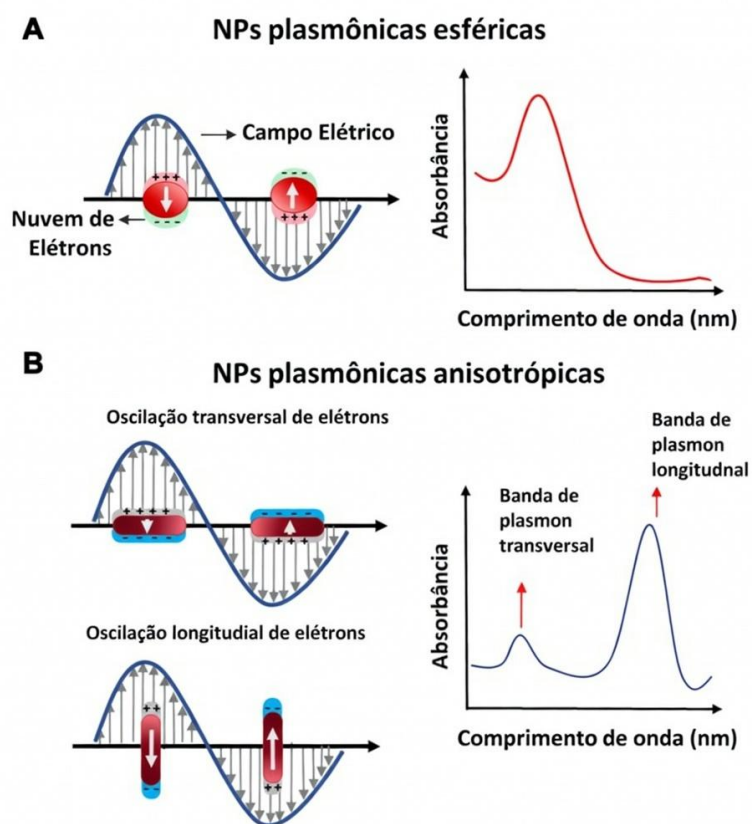
Este trabalho delimita seu foco na investigação de estratégias para resolução desse problema, concentrando-se na otimização da superfície de AuNRs para a bioconjugação de peptídeos. A pesquisa aborda a necessidade de desenvolver e padronizar protocolos de purificação e funcionalização que não apenas promovam a remoção eficiente do CTAB, mas que também preparem adequadamente a superfície dos NRs para a ligação covalente de biomoléculas, garantindo a estabilidade coloidal e funcional do sistema final. A justificativa

para esta investigação reside na lacuna técnica existente na literatura quanto à padronização desses processos, uma vez que a ausência de um entendimento sistemático sobre como as etapas de lavagem, a densidade de ligantes e as condições de funcionalização influenciam a estabilidade e a reatividade dos AuNRs limita o desenvolvimento de plataformas nanotecnológicas confiáveis. Esse cenário compromete aplicações que exigem alta precisão, como a entrega direcionada de fármacos e o desenvolvimento de biossensores com elevada sensibilidade e reprodutibilidade.

1.1. Nanobastões de ouro e Propriedades Plasmônicas

Os nanomateriais metálicos consistem em estruturas com dimensões nanométricas que apresentam propriedades físicas, químicas e ópticas distintas daquelas observadas em seus materiais macroscópicos, principalmente em função dos efeitos de tamanho e de superfície. Entre eles, os nanomateriais de ouro destacam-se pela elevada estabilidade química, biocompatibilidade e propriedades ópticas singulares. Uma das propriedades ópticas mais relevantes desses materiais é o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR), que ocorre quando os elétrons livres presentes na superfície do metal oscilam coletivamente em resposta à interação com a radiação eletromagnética incidente. Quando a frequência da luz coincide com a frequência natural dessas oscilações eletrônicas, observa-se uma intensa absorção e/ou espalhamento da luz, resultando em bandas espectrais características no espectro de absorção (Figura 1). A posição e a intensidade da LSPR dependem de fatores como o tamanho, a forma, a composição do nanomaterial e o meio circundante, conferindo aos nanomateriais de ouro elevada versatilidade para diversas aplicações (Utter; Fendler, 2004).

Figura 1 - Representação esquemática da banda de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) em nanopartículas plasmônicas esféricas (A) e em forma de bastão (B).



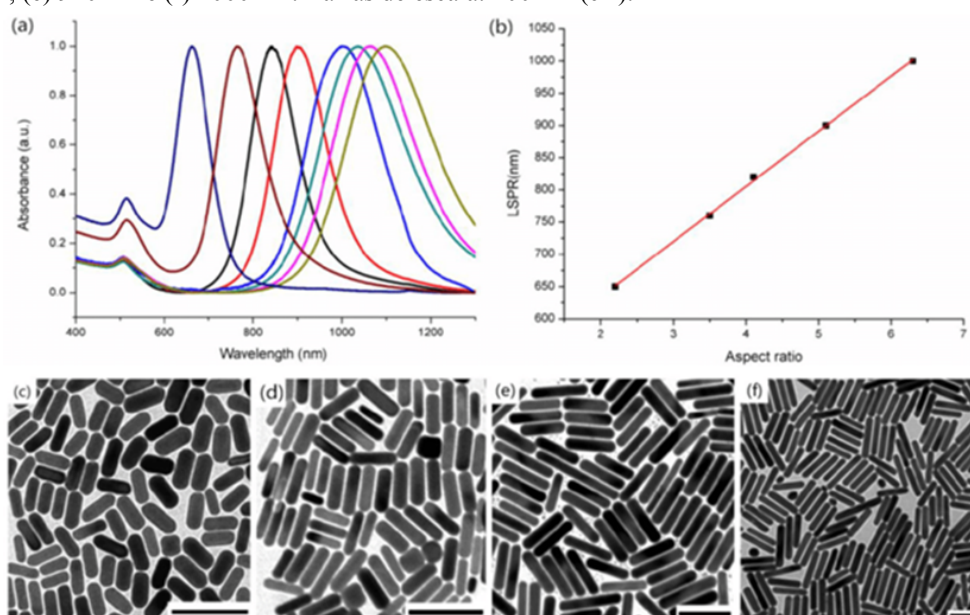
Fonte: Adaptada de Alba-Molina; Giner-Casares; Cano (2019).

As NPs esféricas de ouro representam uma das morfologias mais estudadas e bem estabelecidas. Sua geometria isotrópica favorece sínteses reprodutíveis e com alto grau de monodispersidade, além de apresentarem uma única banda de LSPR, geralmente situada na região do visível. Por sua vez, os AuNRs são NPs anisotrópicas caracterizadas por uma geometria alongada, na qual o comprimento é significativamente maior que o diâmetro. Essa morfologia diferenciada confere aos AuNRs propriedades físico-químicas distintas em relação às NPs esféricas, especialmente no que se refere ao comportamento óptico (Link; El-Sayed, 1999).

Diferentemente das NPs esféricas, que possuem um único pico de LSPR (Figura 1a), os AuNRs exibem dois modos plasmônicos distintos: um pico transversal, localizado na região da luz visível (~520 nm), e um pico longitudinal, que é altamente sintonizável (Figura 1b) (Zheng et al., 2021). A posição deste pico longitudinal é diretamente dependente da razão de aspecto (*Aspect Ratio* - AR), definida como a razão entre o comprimento e o diâmetro dos NRs (Figura 2). Ao controlar a AR durante a síntese, é possível ajustar a absorção de luz dos

AuNRs para a região do infravermelho próximo (NIR, 650-900 nm), conhecida como a "janela óptica biológica", na qual a penetração de luz nos tecidos é máxima e a autofluorescência é mínima. Essa capacidade de sintonização torna os AuNRs especialmente atrativos para aplicações biomédicas avançadas, como a terapia fototérmica de tumores e a bioimagem de alta profundidade (Roach et al., 2022).

Figura 2 - Espectros de absorção UV-Vis-NIR representativos de AuNRs com os picos de LSPR em 650 nm, 760 nm, 840 nm, 900 nm, 1000 nm, 1036 nm, 1060 nm e 1100 nm (esquerda para a direita) (a). Relação entre os picos de LSPR longitudinal e as AR calculadas (por imagens de TEM). A linha reta representa o ajuste linear dos pontos de dados (b). Imagens de TEM representativas de AuNRs com os picos de LSPR longitudinal em (c) 650 nm, (d) 760 nm, (e) 920 nm e (f) 1000 nm. Barras de escala: 100 nm (c-f).



Fonte: Wang et al. (2015).

A síntese de AuNRs é notória por gerar subprodutos esféricos (esferóides) que coexistem com os nanobastões (Scarabelli et al., 2015). Embora a fração esférica seja geralmente minoritária, sua presença é crítica, pois essas NPs possuem um pico de LSPR distinto e não sintonizável, que pode mascarar o sinal óptico característico dos NRs e competir pelos sítios de ligação durante os processos de funcionalização superficial (Pellas et al., 2020). O processo de purificação, portanto, não se restringe apenas à redução e/ou remoção do CTAB, mas também a uma tentativa de separação eficiente desses esféroídes, podendo levar a uma maior homogeneidade morfológica e, consequentemente a uma maior pureza hidrodinâmica da amostra. Dessa forma, a remoção majoritária dessas espécies é fundamental para que o nanovetor final apresente a sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade necessárias para aplicações biomédicas (Kaymaz et al., 2023).

Nesse contexto, além do acompanhamento espectroscópico da LSPR, a Dispersão de Luz Dinâmica Despolarizada (D-DLS) tem se destacado como uma ferramenta robusta para a caracterização hidrodinâmica de NPs anisotrópicas em solução, como os AuNRs (Xue et al., 2024). Diferentemente do DLS convencional, cujo sinal é dominado pelo movimento translacional e pode ser pouco sensível à anisotropia e à presença de populações morfológicas distintas, o D-DLS explora a componente despolarizada da luz espalhada para acessar também o movimento rotacional das partículas. Com isso, torna-se possível desacoplar as contribuições translacionais e rotacionais, permitindo obter como parâmetro-chave o tempo de relaxação rotacional (τ), diretamente relacionado ao volume hidrodinâmico e à AR efetiva das NPs (Feller et al., 2021). Na prática, essa abordagem adiciona uma camada de sensibilidade para detectar alterações de forma e heterogeneidades coloidais, por exemplo, diferenças entre nanobastões e frações esféricas, complementando a leitura óptica fornecida pela LSPR.

Embora as técnicas espectroscópicas e hidrodinâmicas sejam essenciais para o monitoramento das propriedades ópticas e coloidais em solução, a Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) permanece como o padrão-ouro para a confirmação morfológica e a avaliação da integridade estrutural dos NRs (He; Yu; Wang, 2020). A TEM permite a visualização direta da forma, do tamanho e da AR das NPs, sendo um complemento indispensável para validar os dados obtidos por LSPR e D-DLS (Damani et al., 2024).

1.2 Síntese, funcionalização superficial e estabilidade coloidal

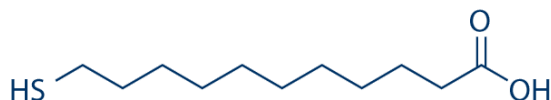
Os métodos de síntese de AuNPs baseiam-se, de modo geral, na redução de sais de ouro na presença de agentes estabilizantes, sendo o controle do tamanho e da morfologia frequentemente determinado pela proporção entre os reagentes e pelas condições reacionais. Em 2003, pesquisadores adaptaram e consolidaram o método de crescimento de AuNRs mediado por sementes (Nikoobacht; El-Sayed, 2003). Nesse método, sementes nanométricas de Au(0), previamente sintetizadas, são adicionadas a uma solução de crescimento contendo íons Au (III), brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), nitrato de prata (AgNO_3) e um agente redutor fraco, geralmente o ácido L-ascórbico. O CTAB atua simultaneamente como surfactante e agente direcionador de crescimento, formando micelas que promovem a adsorção seletiva em determinadas fases cristalinas do ouro, favorecendo o crescimento anisotrópico ao longo do eixo longitudinal (Roach et al., 2018).

Como variação derivada dessa abordagem, foram desenvolvidas rotas *seedless* (sem semente), nas quais a etapa separada de preparação de sementes é suprimida e a nucleação de

Au(0) ocorre *in situ* na própria solução de crescimento. Essa nucleação é tipicamente iniciada pela adição de pequena quantidade de um redutor forte, como o borohidreto de sódio (NaBH_4), gerando núcleos metálicos na mistura reacional, seguido de um redutor mais brando, como o resveratrol ou ácido ascórbico, contribuindo para a redução progressiva do precursor de ouro e para o controle cinético do crescimento, mantendo-se o papel do CTAB como estabilizante micelar e a contribuição de Ag^+ para o controle da anisotropia e do aspecto dos NRs. Nesses protocolos, ajustes finos nas concentrações de CTAB, AgNO_3 e dos agentes redutores modulam a densidade de nucleação e, consequentemente, o rendimento e a distribuição morfológica dos AuNRs (Lage et al., 2021). Após a síntese, o CTAB tende a permanecer adsorvido na superfície dos AuNRs, conferindo estabilidade coloidal e, em geral, carga superficial positiva. Contudo, essa camada pode limitar etapas posteriores de funcionalização e aplicações biológicas, o que torna necessária sua substituição por ligantes mais biocompatíveis (Casas et al., 2013).

A etapa subsequente à síntese é a funcionalização superficial, crucial para transformar os AuNRs em plataformas quimicamente estáveis e biologicamente ativas. A funcionalização de NPs consiste na modificação controlada de sua superfície por meio da introdução de grupos químicos ou ligantes, com o objetivo de ajustar as propriedades físico-químicas e criar sítios reativos. O processo mais comum envolve a adição de ligantes que possuem um grupo tiol ($-\text{SH}$) em uma extremidade, capaz de formar ligações fortes com a superfície do ouro, e um grupo funcional reativo (como uma carboxila, $-\text{COOH}$) na extremidade oposta. Essa ligação ocorre preferencialmente nas pontas dos AuNRs, uma vez que o CTAB apresenta adsorção seletiva nas faces laterais, orientada pelos planos cristalinos, deixando as extremidades livres para a ancoragem de novos ligantes. Nesse contexto, destaca-se o uso do ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) (Figura 3), cuja extremidade ($-\text{COOH}$) confere carga negativa, aumenta a estabilidade coloidal dos AuNRs e possibilita reações subsequentes de bioconjugação (Junqueira, 2024).

Figura 3 - Estrutura química do ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), composto contendo grupo tiol e grupo carboxílico.



Fonte: Selleck Chemicals (2026).

A densidade de empacotamento dos ligantes tiolados na superfície do ouro é um fator determinante tanto na estabilidade coloidal quanto na reatividade química do nanovetor (Colangelo et al., 2017). Para o MUA, a organização da monocamada auto-montada (*self-assembled monolayer* - *SAM*) pode ser caracterizada por duas fases principais: a fase deitada (*lying-down*), que ocorre em baixas concentrações de ligante e resulta em uma camada menos organizada e mais hidratada, e a fase em pé (*standing-up*), que se estabelece em altas densidades de MUA (Toh et al., 2013). A transição para a fase *standing-up* é crucial, pois o empacotamento denso das cadeias alquílicas resulta em uma camada orgânica mais espessa e ordenada, o que eleva o índice de refração local na interface dos NRs, este aumento é espectroscopicamente detectável, manifestando-se como um deslocamento batocrômico (*redshift*) no pico longitudinal da LSPR, servindo como uma assinatura indireta da funcionalização bem-sucedida e da estabilidade coloidal aprimorada (Marques et al., 2018).

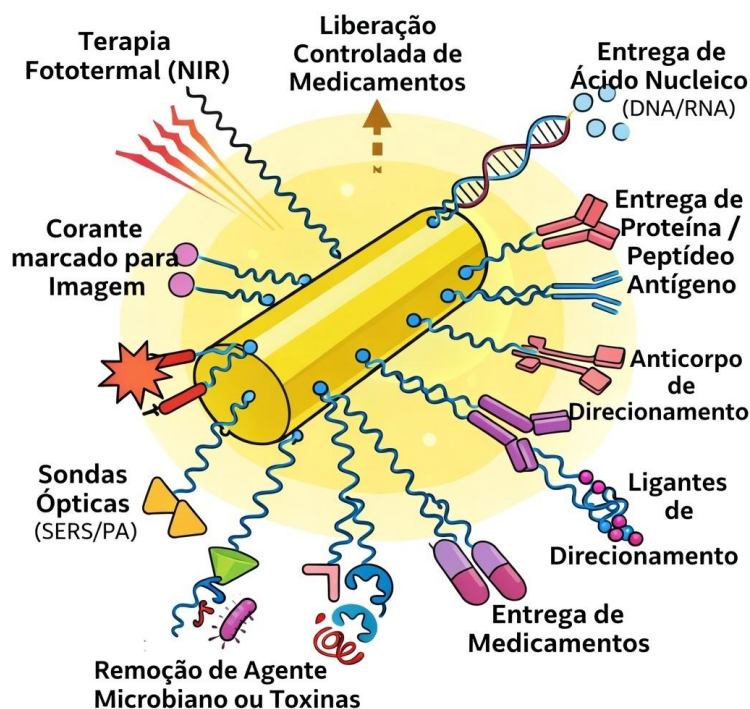
A estabilidade morfológica dos AuNRs em solução é constantemente desafiada pela tendência à agregação, que pode ocorrer em diferentes arranjos. Um desafio particular é a agregação lateral (*side-to-side assembly*), na qual os NRs se alinham paralelamente uns aos outros (Sekizawa et al., 2020). Este tipo de agregação é frequentemente induzido por forças de Van der Waals ou pela redução da repulsão eletrostática, sendo espectroscopicamente caracterizado por um deslocamento hipsocrômico (*blueshift*) do pico LSPR longitudinal, frequentemente acompanhado pela formação de um ombro (*shoulder*) no espectro (Roach et al., 2022). A camada de MUA deve, portanto, atuar como uma barreira física e eletrostática eficaz, prevenindo o contato lateral e garantindo a individualidade hidrodinâmica das partículas, um pré-requisito essencial para a precisão e a confiabilidade em aplicações de sensoriamento (Miranda et al, 2021).

1.3. Bioconjugação de Nanobastões de Ouro

Diversas aplicações biomédicas e biotecnológicas requerem uma etapa de bioconjugação, na qual biomoléculas são ligadas de forma controlada à superfície de nanomateriais previamente funcionalizados, conferindo-lhes funções biológicas específicas. Esse processo é essencial para a conversão de NPs em nanovetores bioativos, pois define a interface do nanomaterial com o ambiente biológico, influenciando propriedades como reconhecimento molecular, interação célula–nanomaterial e desempenho do sistema em meios complexos (Conde et al., 2014).

A bioconjugação pode ocorrer por interações físicas ou, preferencialmente, por ligações químicas covalentes mediadas por grupos funcionais disponíveis na superfície das NPs, como carboxilas, aminas e tióis. Em geral, abordagens não covalentes são operacionalmente simples, porém mais suscetíveis a rearranjos e dessorção do ligante em condições fisiológicas, em contrapartida as estratégias covalentes tendem a oferecer maior confiabilidade e estabilidade do conjugado, o que favorece aplicações que exigem maior confiabilidade. Uma vez que a superfície dos AuNRs esteja devidamente funcionalizada, esses nanomateriais podem ser covalentemente ligados a uma variedade de biomoléculas, como peptídeos, anticorpos ou ácidos nucleicos, transformando-os em nanovetores (Figura 4) (Conde et al., 2014).

Figura 4 - Esquema ilustrativo de AuNRs funcionalizados, destacando aplicações em (i) terapia fototérmica no infravermelho próximo (NIR), (ii) liberação controlada de fármacos, (iii) entrega de ácidos nucleicos (DNA/RNA), (iv) conjugação com proteínas, peptídeos e anticorpos, (v) direcionamento por ligantes específicos, (vi) marcadores para imagens, (vii) sondas ópticas e (viii) remoção de microrganismos e toxinas.



Fonte: O autor (2026).

Entre as estratégias de bioconjugação covalente mais empregadas, destaca-se a química de ativação via EDAC/NHS (N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida / N-Hidroxisuccinimida) amplamente utilizada para promover a ligação entre grupos carboxila e amina. O EDAC atua como um agente ativador de grupos (-COOH), formando um intermediário instável do tipo O-acil-isourea. A adição de NHS converte esse intermediário em um éster de NHS mais estável, aumentando a eficiência da reação. Esse éster reativo pode então reagir com grupos amina primários (-NH₂) presentes em biomoléculas, resultando na formação de ligações amida estáveis (Nakajima; Ikada, 1995).

A química de ativação via EDAC/NHS é uma rota eficiente para formar uma ligação amida estável entre o grupo carboxila do MUA e um grupo amina primária de uma biomolécula (peptídeo), pois por se tratar de um acoplamento do tipo *zero-length*, essa estratégia permite a imobilização do ligante sem a introdução de espaçadores adicionais, desde que as condições reacionais (como pH e razão molar dos reagentes) sejam controladas para maximizar o rendimento e minimizar efeitos indesejados sobre a estabilidade coloidal do sistema (D'onofrio et al., 2022).

1.3.1. Peptídeos como ligantes biomoleculares

Peptídeos são biomoléculas constituídas por cadeias curtas de aminoácidos e apresentam grande interesse em biotecnologia e nanomedicina por combinarem alta seletividade de interação, potencial de biocompatibilidade e, principalmente, facilidade de síntese e modificação química, permitindo ajustes racionais de propriedades como carga, hidrofobicidade e afinidade por alvos moleculares. Em comparação a proteínas maiores, peptídeos tendem a oferecer maior controle estrutural por desenho de sequência, além de facilitar a padronização e a reprodutibilidade do ligante em plataformas nanoestruturadas (Fosgerau; Hoffmann, 2015; Vlieghe et al., 2010).

Na funcionalização de NPs inorgânicas, peptídeos podem atuar como ligantes capazes de incorporar funções de bioreconhecimento (por exemplo, pela afinidade por receptores) e/ou funções bioativas dependentes da sequência, sendo frequentemente discutidos como componentes versáteis para aplicações biomédicas, incluindo contextos relacionados a câncer. Ainda assim, a atribuição de uma função biológica específica a um peptídeo depende diretamente de validação experimental em condições biológicas apropriadas, uma vez que atividade, seletividade e estabilidade podem variar substancialmente conforme o meio e o alvo (Fosgerau; Hoffmann, 2015; Li et al., 2021).

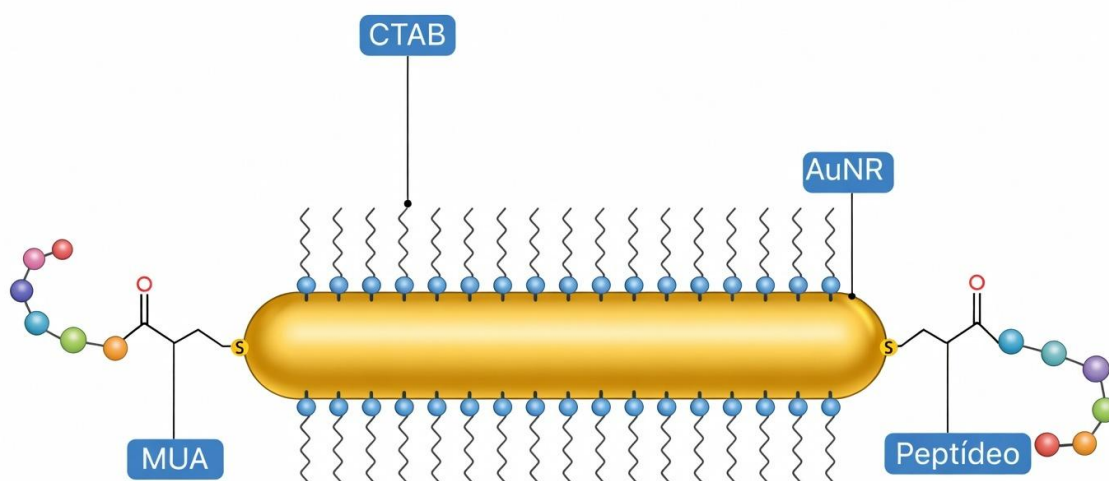
Do ponto de vista químico, peptídeos são particularmente compatíveis com rotas de bioconjugação covalente por apresentarem grupos funcionais reativos em sua estrutura, especialmente aminas primárias (N-terminal e, quando presentes, cadeias laterais como a de lisina). Isso os torna adequados para estratégias de acoplamento do tipo carboxila-amina, como a ativação por carbodiimida/NHS, formando ligações amida estáveis com superfícies previamente funcionalizadas contendo grupos carboxila. Um aspecto relevante é que, quando há múltiplas aminas disponíveis, o acoplamento pode ocorrer em mais de um sítio, gerando heterogeneidade de orientação e de densidade do ligante, por isso, o desenho do peptídeo e o controle das condições reacionais são fatores que impactam a reprodutibilidade do bioconjugado (Vlieghe et al., 2010).

Por fim, a conjugação de peptídeos a AuNRs é amplamente reportada como uma estratégia eficaz para introduzir funções biomoleculares específicas na superfície e, ao mesmo tempo, preservar e explorar as propriedades plasmônicas características dos AuNRs em aplicações biomédicas e bioanalíticas, o que sustenta a viabilidade dessa arquitetura nanoestruturada (Oyelere et al., 2007). Adicionalmente, classes particulares de peptídeos, como os *cell-penetrating peptides* (CPPs), são frequentemente descritas como ferramentas

para favorecer o transporte e a internalização celular de diferentes cargas moleculares (por exemplo, fármacos, ácidos nucleicos ou sondas); entretanto, o desempenho, a seletividade e os efeitos fora do alvo podem variar conforme a sequência do peptídeo, a densidade de conjugação e o ambiente biológico, tornando essencial interpretar esses sistemas à luz do contexto experimental e do desenho do nanovetor (Guidotti; Brambilla; Rossi, 2017).

A arquitetura de um nanovetor, composta por AuNR-MUA-Peptídeo, está representada esquematicamente na Figura 5

Figura 5 - Representação esquemática de nanovetor plasmônico composto por nanobastão de ouro (AuNR) funcionalizado com ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) e bioconjugado com peptídeo via química EDAC/NHS.



Fonte: O autor

1.4. Caracterização de bioconjugados

O sucesso das bioconjugações é frequentemente monitorado por técnicas que medem o aumento do volume hidrodinâmico da partícula, como por espectroscopia de espalhamento de luz (*Polarized Light Extinction Spectroscopy* - EPEL), que afere o tempo de relaxação rotacional (τ), baseado na técnica de espalhamento dinâmico de luz despolarizada (*Depolarized Dynamic Light Scattering*, D-DLS) (Gonçalves, 2022). O parâmetro τ é particularmente sensível a modificações nas extremidades dos AuNRs, pois a difusão rotacional depende fortemente do comprimento efetivo da partícula, tornando-o mais adequado que parâmetros translacionais para detectar pequenas alterações superficiais decorrentes da ligação de biomoléculas (Feller et al., 2021).

Para os AuNRs, o aumento do τ após a bioconjugação constitui uma indicação da imobilização da biomolécula (como um peptídeo) na superfície, pois o volume adicional da biomolécula resulta em rotações mais lentas dos NRs em solução, validando o uso da técnica para monitorar a eficiência da ligação (Johansson; Käll; Šípová-Jungová, 2025).

Contudo, a própria química de ativação pode ser um fator de desestabilização, uma vez que neutraliza temporariamente as cargas de superfície, promovendo a agregação das partículas. Dessa forma, a resistência do nanovetor frente a essa instabilidade operacional é, sem dúvidas, um indicador direto da qualidade do protocolo de funcionalização empregado.

Portanto, a estabilidade coloidal do nanovetor é um parâmetro de qualidade fundamental, e o potencial zeta (ζ) é o parâmetro eletrocinético mais utilizado para sua avaliação (Németh et al., 2022). O ζ mede o potencial elétrico na camada de cisalhamento da partícula, refletindo a magnitude da repulsão eletrostática entre as NPs. Embora o valor ideal possa variar em função do meio dispersante, é comum empregar, como regra prática, que sistemas com potencial zeta em módulo superior a 30 mV ($|\zeta| > 30$ mV, isto é, $\zeta > +30$ mV ou $\zeta < -30$ mV) tendem a apresentar maior resistência à agregação por estabilização eletrostática (Dikovskaya et al., 2024). Ressalta-se, contudo, que o ζ não constitui um critério absoluto de estabilidade, pois sua estimativa depende de modelos eletrocinéticos e das condições experimentais (Pochapski et al., 2021), e que parâmetros hidrodinâmicos (τ) constituem, em geral, evidências indiretas de modificação superficial. Assim, quando se deseja uma confirmação química mais direta da presença e/ou do modo de ligação de ligantes na superfície de partículas, recomenda-se o uso de técnicas espectroscópicas sensíveis à composição e às ligações químicas na interface, como a espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), preferencialmente de forma complementar (Mourdikoudis; Pallares; Thanh, 2018). Adicionalmente, estratégias de quantificação do ligante baseadas em marcações fluorescentes podem ser empregadas para estimar a densidade e quantidade de biomoléculas conjugadas, desde que se considerem limitações experimentais como possíveis efeitos de supressão de fluorescência em proximidade de superfícies metálicas (Tan et al., 2015).

1.5. Hipótese e Relevância

Diante do exposto, a hipótese central deste trabalho é que a otimização do protocolo de purificação por meio de lavagens sequenciais em etapas sucessivas, associada a seleção de uma razão molar intermediária de Ácido 11-Mercaptoundecanóico (MUA) para a

funcionalização e bioconjugação de AuNRs com peptídeo é determinante para a obtenção de um nanovetor AuNRs-MUA-Peptídeo quimicamente estável e biologicamente funcional. Adicionalmente, pressupõe-se que a eficiência dos processos de purificação e bioconjugação possa ser avaliada por meio da estabilidade coloidal dos AuNRs, mensurada por medidas de potencial zeta, bem como por análises da variação do tempo de relaxação rotacional das nanoestruturas. Dessa forma refletindo alterações na dinâmica e no ambiente superficial após a conjugação, tendo como critérios de desempenho a obtenção de alta estabilidade eletrostática ($\zeta > +30$ mV) e a máxima eficiência de bioconjugação (maior variação no tempo de relaxação rotacional, $\Delta\tau$), mitigando as limitações associadas a razões molares extremas de MUA.

Este estudo contribui diretamente para o avanço da nanobiotecnologia ao propor um protocolo otimizado e experimentalmente validado para a produção de nanovetores plasmônicos estáveis, reprodutíveis e funcionalmente eficientes. A elucidação dos parâmetros críticos que governam a estabilidade coloidal e a eficiência de bioconjugação é fundamental para viabilizar a aplicação dessas plataformas em futuras terapias e diagnósticos. Nesse sentido, o presente trabalho alinha-se com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 da ONU, especificamente o ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), ao contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e de diagnóstico, e o ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura), ao fomentar a inovação e estabelecer uma base de conhecimento sólida para a futura industrialização de tecnologias baseadas em nanomateriais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e otimizar um nanovetor plasmônico à base de nanobastões de ouro (AuNRs) bioconjugados com peptídeos, estabelecendo um protocolo reprodutível e estável em solução, visando à obtenção de uma plataforma adequada para futuras etapas de validação biológica, com ênfase na preservação do perfil óptico, na manutenção da estabilidade coloidal e na consistência operacional do sistema.

2.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar os protocolos de purificação de AuNRs sintetizados pelo método *seedless* mediado por resveratrol, comparando a lavagem direta e a lavagem em etapas (25 mM e 6 mM de CTAB), para obtenção de dispersões coloidais estáveis, utilizando espectroscopias de absorção no UV-Vis, técnicas de D-DLS (τ) e medidas de potencial zeta (ζ);
- b) Caracterizar a morfologia e as dimensões dos AuNRs purificados por meio de TEM, correlacionando os dados morfológicos com os parâmetros espectroscópicos (λ_{LSPR} e Razão de Aspecto);
- c) Avaliar o impacto da funcionalização da superfície dos AuNRs com MUA, monitorando as alterações físico-químicas (absorção UV-Vis, τ e ζ) em diferentes razões molares (1:1, 5:1 e 10:1), a fim de identificar e estabelecer condições de modificações interfaciais reprodutíveis, mantendo a estabilidade coloidal dos AuNRs;
- d) Realizar a bioconjugação covalente do peptídeo na superfície dos AuNRs-MUA, utilizando a química de ativação EDAC/NHS, e avaliar a variação do tempo de relaxação rotacional ($\Delta\tau$), através da espectroscopia de absorção no UV-Vis para verificação do perfil óptico nas nanoestruturas;
- e) Selecionar a condição padrão do nanovetor (AuNRs-MUA-Peptídeo), integrando os resultados de estabilidade coloidal (ζ), desempenho hidrodinâmico ($\Delta\tau$) e margem de segurança operacional, visando sua aplicação em etapas subsequentes de validação biológica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho caracteriza-se como uma pesquisa experimental realizada em parceria entre o CTNano/UFMG e o Laboratório de Nanociência e Nanobiotecnologia (IBTEC/UFU – Campus Patos de Minas).

3.1 Materiais

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico, quando aplicável. Para a síntese, lavagem e funcionalização, foram empregados: brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, Sigma-Aldrich, >99%, MM = 364,45 g/mol), cloreto de ouro (III) (AuCl_3 , Sigma-Aldrich, >99,9%, MM = 393,83 g/mol; utilizado para preparo de solução de HAuCl_4 em água ultrapura), nitrato de prata (AgNO_3 , Sigma-Aldrich, >99%, MM = 169,87 g/mol), borohidreto de sódio (NaBH_4 , Sigma-Aldrich, 98%, MM = 37,83 g/mol), resveratrol (reagente comercial submetido a procedimento de purificação interno do laboratório), ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA, Sigma-Aldrich, 95%, MM = 218,36 g/mol), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDAC, Sigma-Aldrich, >99%, MM = 191,70 g/mol) e N-hidroxisuccinimida (NHS, Sigma-Aldrich, 98%, MM = 115,09 g/mol). O tampão PBS utilizado foi da Sigma-Aldrich.

O peptídeo utilizado para a bioconjugação foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Thaise Araújo Gonçalves (IBTEC/UFU - Campus Patos de Minas) em solução tampão PBS, com concentração de 3,2 mM, massa molar de 3211,64 g/mol. O peptídeo apresenta potencial terapêutico em contexto oncológico, sendo investigado como agente com atividade antitumoral. Devido a restrições de patente, a sequência não será divulgada, ademais, ele foi utilizado em sua forma nativa, e sua natureza eletrostática não foi considerada um parâmetro crítico para a bioconjugação, uma vez que a ligação foi realizada via química covalente EDAC/NHS, que é independente da sua carga. O tamanho hidrodinâmico do peptídeo foi estimado em aproximadamente 3,56 nm², utilizando a aproximação para proteínas globulares, conforme as equações 1 e 2 (Erickson, 2009):

$$L = \sqrt[3]{3 \times MW_{(kDa)}} \quad (1)$$

$$A = \pi \times (L \div 2)^2 \quad (2)$$

3.2 Síntese e Purificação dos Nanobastões de Ouro (AuNRs)

Os AuNRs foram sintetizados no Laboratório SMS (CTNano/UFGM), utilizando a metodologia *seedless* (sem semente) mediada por resveratrol. No processo de síntese o nitrato de prata foi utilizado como agente direcionador de crescimento e o CTAB como agente estabilizante, seguindo protocolo descrito por Junqueira (2024). Neste trabalho, as atividades experimentais concentraram-se nas etapas de purificação e no processo de bioconjugação utilizando MUA e o peptídeo.

O processo de purificação foi realizado por meio de ciclos sucessivos de centrifugação, com o objetivo de remover o excesso de reagentes e subprodutos, bem como ajustar a concentração de CTAB do meio. As amostras foram centrifugadas a 15.000 G por 15 minutos, com posterior ressuspensão do *pellet* (material sedimentado) em soluções de CTAB conforme as condições experimentais:

- A. Lavagem em etapas (25 mM para 6 mM CTAB): três ciclos em CTAB 25 mM, seguidos de três ciclos em CTAB 6 mM.
- B. Lavagem direta: três ciclos realizados diretamente em CTAB 6 mM.

Para cada ensaio de lavagem, o material bruto foi previamente diluído em solução de CTAB 50 mM antes do início dos ciclos de centrifugação, com fatores de diluição distintos entre eles. Essa estratégia visou à padronização da concentração dos AuNRs na faixa de aproximadamente 200 pM para as etapas subsequentes de funcionalização com MUA.

Após as lavagens, as amostras foram submetidas a caracterização pelas espectroscopias de absorção no UV-Vis e espalhamento de luz (D-DLS).

3.3 Funcionalização dos AuNRs com Ácido 11-Mercaptoundecanóico (MUA)

A funcionalização da superfície dos AuNRs foi realizada para promover a ancoragem de MUA nas extremidades, introduzindo grupos carboxila reativos para a posterior bioconjugação. Foram investigadas diferentes razões molares de ligante (1:1, 5:1 e 10:1 moléculas/nm²), visando otimizar a densidade de cobertura superficial. O protocolo experimental foi ajustado com base nas diretrizes descritas por Junqueira (2024), com adaptações voltadas à otimização da organização e da estabilidade da camada funcional na superfície dos AuNRs. O MUA foi preparado a partir de solução estoque de 5 mM em etanol e as suspensões foram incubadas sob agitação orbital (100 rpm) à 27 °C, durante a noite

(*overnight*). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 G por 12 minutos, com remoção do sobrenadante e ressuspensão para o volume inicial.

3.4 Bioconjugação dos AuNRs-MUA aos Peptídeos

A ligação covalente do peptídeo à superfície dos AuNRs funcionalizados com MUA foi realizada por meio da química de ativação de grupos carboxila, EDAC e NHS, seguindo protocolo descrito por (Junqueira, 2024).

As soluções de EDAC e NHS foram preparadas imediatamente antes da adição, em tampão MES (ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico) pH 5,5, à suspensão de AuNR-MUA, seguida de incubação por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, as amostras foram purificadas por centrifugação e ressuspensas em tampão (CTAB 3 mM, Tris 10 mM e EDTA 1 µM), utilizado para manutenção da estabilidade coloidal do nanovetor durante e após a bioconjugação. Após a etapa de ativação, as amostras foram organizadas em duas condições experimentais: (A) Controle: AuNR-MUA, sem adição do peptídeo; (B) Nanoconjugado: AuNR-MUA ativado com adição do peptídeo B7 ($PM = 3211,64 \text{ g mol}^{-1}$).

A quantidade de peptídeo adicionada foi calculada com base na área superficial dos AuNRs e no tamanho hidrodinâmico estimado do peptídeo ($\sim 3,56 \text{ nm}^2$).

3.5 Caracterização Físico-Química e estrutural

A caracterização dos AuNRs, dos AuNRs-MUA e dos nanoconjugados (AuNRs-MUA-Peptídeo) foi realizada pelas técnicas descritas a seguir.

3.5.1 Espectroscopia de absorção no UV-Vis

Os espectros de absorção no UV-Vis foram obtidos em espectrofotômetro Varioskan Lux (Thermo Fisher Scientific), utilizando microplaca transparente de 96 poços, na faixa de 400 a 1000 nm, com passo de 1 nm. As leituras foram realizadas para cada condição (AuNR, AuNR-MUA e AuNR-MUA-Peptídeo), sendo utilizado como o branco o respectivo meio dispersante de cada amostra. Os espectros foram utilizados para determinar o comprimento de onda de ressonância plasmônica longitudinal (λ_{LSPR}) e a razão de aspecto (AR) das amostras. Os dados foram processados e analisados pelo software Kaleidagraph (Synergy Software).

3.5.2 Espectrômetro Portátil de Espalhamento de Luz (EPEL)

As medidas do τ foram obtidas por espectroscopia de espalhamento de luz (EPEL – D-DLS). O valor de τ foi utilizado como indicador do comprimento efetivo dos NRs, sendo sensível a alterações na camada de superfície (troca de ligantes) e/ou agregação. Para cada amostra, foram realizadas 10 leituras por poço.

3.5.3 Potencial Zeta (ζ)

A carga superficial e a estabilidade coloidal dos NRs foram avaliadas por meio de medidas de carga líquida residual (Potencial Zeta). As leituras foram realizadas em triplicata, utilizando o equipamento de analisador de tamanho de partículas da Anton Paar, em cubeta apropriada.

3.5.4 Cálculo da Concentração Molar

A concentração molar dos AuNRs foi determinada por cálculos que correlacionam os parâmetros espectroscópicos (Absorbância em 400 nm e λ_{LSPR}) e hidrodinâmicos (τ) para estimar o coeficiente de extinção molar e, conseqüentemente, a concentração da amostra.

3.5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM):

A caracterização estrutural, incluindo a morfologia e as dimensões reais (comprimento e diâmetro) dos AuNRs foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (Tecnai G20) no Centro de Microscopia da UFMG. As imagens obtidas foram posteriormente analisadas utilizando o software MATLAB.

3.6 Análise de Dados

A determinação da estabilidade coloidal e da bioconjugação baseou-se na variação dos parâmetros físico-químicos (λ_{LSPR} , τ e ζ) entre as amostras controle (sem peptídeos) e as amostras funcionalizadas com os peptídeos (nanoconjugados/nanovetores). Para essa análise foram consideradas as médias e desvios-padrão das leituras adotadas em cada ensaio, além das análises morfométricas extraídas por TEM.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos AuNRs pós-Síntese

A amostra de AuNRs foi inicialmente caracterizada logo após a síntese. Os parâmetros físico-químicos basais foram determinados por espectroscopia de absorção UV-Vis e por espectroscopia de espalhamento de luz (EPEL), ensaio baseado na técnica de *Depolarized Dynamic Light Scattering* (D-DLS) (Gonçalves, 2022).

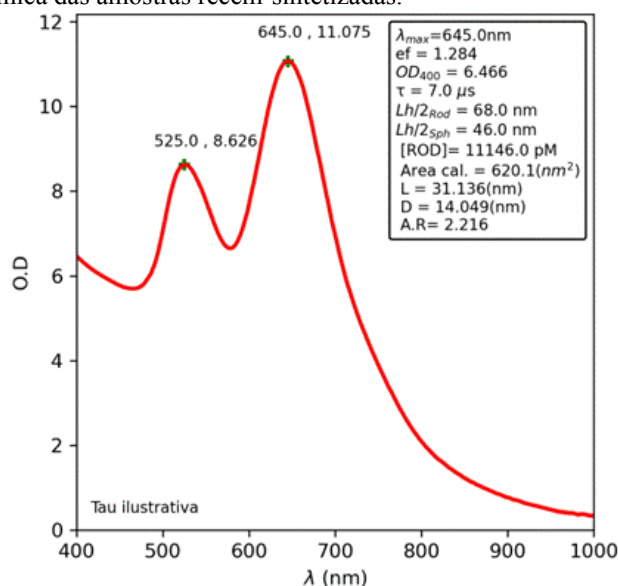
Os resultados iniciais das dispersões coloidais recém-sintetizadas são apresentados a seguir:

- a) Comprimento de Onda de Ressonância Plasmônica Longitudinal (λ_{LSPR}): 645 nm
- b) Tempo de Relaxação Rotacional (τ): 7,0 μs
- c) Razão de Aspecto: 2,216
- d) Concentração Molar dos AuNRs ([AuNRs]): 11146 pM

Os parâmetros descritos estão representados na Figura 6.

A concentração molar foi calculada utilizando um método semiempírico desenvolvido pelo Laboratório SMS (CTNano) que correlaciona a Densidade Óptica em 400 nm (OD_{400}), o λ_{max} (λ_{LSPR}), o tau (τ) e o fator de diluição para estimar o coeficiente de extinção molar dos NRs (Gonçalves, 2022).

Figura 6 - Espectro de absorção UV-Vis dos AuNRs: banda transversal (525 nm) e banda longitudinal (645 nm) e caracterização físico-química das amostras recém-sintetizadas.



Fonte: Dados fornecidos pelo Laboratório SMS (CTNano/UFMG (2024).

A pureza e a estabilidade coloidal dos AuNRs são fatores críticos que influenciam diretamente a eficiência das etapas subsequentes de funcionalização e, consequentemente, a sensibilidade dos nanovetores (El-Sayed, 2004; Zheng et al., 2021). O surfactante CTAB, essencial para o crescimento anisotrópico durante a síntese, deve ser removido ou ter sua concentração reduzida para níveis próximos à Concentração Micelar Crítica (CMC) (aproximadamente 0,9 mM) para permitir a troca de ligantes e a bioconjugação (Wei et al., 2021). No entanto, a remoção abrupta do CTAB pode comprometer a morfologia e a estabilidade dos AuNRs.

4.2 Processo de purificação dos AuNRs

Com o objetivo de estabelecer um protocolo de remoção do excesso de CTAB que preservasse o perfil óptico característico dos AuNRs e maximizasse a estabilidade coloidal na condição de trabalho, foram comparadas duas abordagens: a lavagem direta com ajuste da concentração para 6 mM de CTAB e a lavagem em etapas, partindo de 25 mM, até atingir para 6 mM de CTAB.

A Tabela 1 sumariza os resultados comparativos entre a lavagem direta e a lavagem em etapas, ambas visando a concentração final de 6 mM de CTAB, que é a condição necessária para as etapas de funcionalização. A comparação baseia-se nos parâmetros físico-químicos dos AuNRs, utilizados como indicadores de estabilidade coloidal e integridade morfológica.

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos dos AuNRs após diferentes processos de lavagem (concentração final de 6 mM de CTAB).

Parâmetro	Pós-Síntese (Bruto)	Lavagem Direta (6mM)	Lavagem em etapas – Ensaio 1	Lavagem em etapas – Ensaio 2
λ_{LSPR} (nm)	645	634	641,5	642
Razão de Aspecto	2,216	2,13	2,19	2,19
τ (μs)	$\sim 7,0$	$7,52 \pm 0,71$	$12,05 \pm 0,25$	$13,09 \pm 1,66$

Potencial Zeta (ζ) (mV)	N/A	$+34,7 \pm 1,2$	$+52,1 \pm 2,4$	$+51,6 \pm 0,5$
Concentração [AuNRs]	11146 pM	136 pM	230 pM	593 pM
Conclusão	Mistura bruta	Estável, porém com maior deslocamento espectral e menor ζ	Maior preservação do perfil óptico e maior estabilidade coloidal	Maior preservação do perfil óptico e maior estabilidade coloidal

Fonte: O autor (2025).

A diferença entre a concentração do material bruto (11146 pM) e as concentrações obtidas após lavagem (136–593 pM) é consequência direta da diluição prévia do material bruto realizada antes de cada ensaio, e não de perdas significativas durante o processo de purificação. As variações entre ensaios refletem os diferentes fatores de diluição adotados, com o ensaio 2 partindo de uma diluição menor para que todos permitam a padronização na faixa de trabalho desejada para a funcionalização.

Ademais, as concentrações molares estimadas para os AuNRs ao longo das diferentes etapas experimentais devem ser interpretadas principalmente como um parâmetro operacional de controle do sistema, e não como um critério primário de interpretação físico-química. Esses valores foram utilizados para padronizar as suspensões na faixa de trabalho necessária para as etapas de funcionalização e bioconjugação, e também como um indicador indireto e secundário da integridade coloidal da suspensão. Em sistemas coloidais desse tipo, processos de agregação irreversível ou perdas significativas de material durante etapas de purificação tendem a resultar em reduções expressivas da concentração estimada, uma vez que parte do material deixa de permanecer dispersa na fase coloidal.

No presente trabalho, as variações observadas entre amostras refletem principalmente diferenças nos fatores de diluição aplicados e/ou perdas esperadas durante o preparo e execução experimental e não indicam alterações estruturais relevantes nos AuNRs. Dessa forma, a concentração foi utilizada principalmente como parâmetro auxiliar de monitoramento experimental e consistência das suspensões, sendo discutida especificamente nos casos em que contribuiu para a interpretação dos resultados. Nos demais pontos do texto, sua apresentação nas tabelas tem caráter informativo e de controle experimental, enquanto a análise das modificações interfaciais e do comportamento dos nanovetores foi baseada predominantemente nos parâmetros espectrais, hidrodinâmicos e eletrocinéticos do sistema.

O protocolo de lavagem em etapas demonstrou ser superior na preservação da estabilidade coloidal e na manutenção do perfil óptico da amostra bruta (recém sintetizada). Em relação ao pico longitudinal (λ_{LSPR}), a lavagem direta resultou em deslocamento para 634 nm, enquanto a lavagem em etapas manteve valores mais próximos do material bruto (641,5-642 nm). Considerando que a determinação de λ_{LSPR} foi realizada em leitor de microplacas (passo espectral de 1 nm) e que o equipamento possui uma incerteza instrumental associada à determinação do comprimento de onda de ± 2 nm (manual do equipamento Thermo Fisher Scientific), a diferença observada entre protocolos ($\approx 7\text{--}8$ nm entre 634 e ~ 642 nm) é consistente com um efeito real do processo de lavagem sobre o comportamento óptico do sistema, e não apenas variação de medida.

Para contextualizar a magnitude desse deslocamento em termos de razão de aspecto (AR), quando esta é estimada a partir de λ_{LSPR} , pode-se utilizar a relação empírica reportada na literatura $\lambda_{\text{max}} = 95 \cdot \text{AR} + 420$ (Link; Mohamed; El-Sayed, 1999; Foti et al., 2024). Assim, $\text{AR} = (\lambda_{\text{max}} - 420)/95$ e, por propagação de incerteza de primeira ordem, $\Delta \text{AR} \approx \Delta \lambda / 95$. Dessa forma, adotando $\Delta \lambda$ com base na especificação do instrumento, obtém-se uma estimativa de incerteza mínima para AR derivada espectralmente: $\Delta \lambda = \pm 2$ nm e $\Delta \text{AR} \approx 2/95 = 0,021 \approx \pm 0,02$.

Aplicando essa ordem de grandeza de incerteza aos valores obtidos (Tabela 1), nota-se que a diferença entre o material bruto ($\text{AR} = 2,216$) e a lavagem em etapas ($\text{AR} = 2,19$) é pequena ($\Delta \text{AR} = 0,026$) e, portanto, compatível com a incerteza mínima associada à determinação de λ_{LSPR} . Em contraste, a diferença entre a lavagem direta ($\text{AR} = 2,13$) e a lavagem em etapas ($\text{AR} = 2,19$) é maior ($\Delta \text{AR} = 0,06$), sugerindo efeito mais consistente do protocolo de lavagem sobre os parâmetros espectrais e coloidais associados à AR.

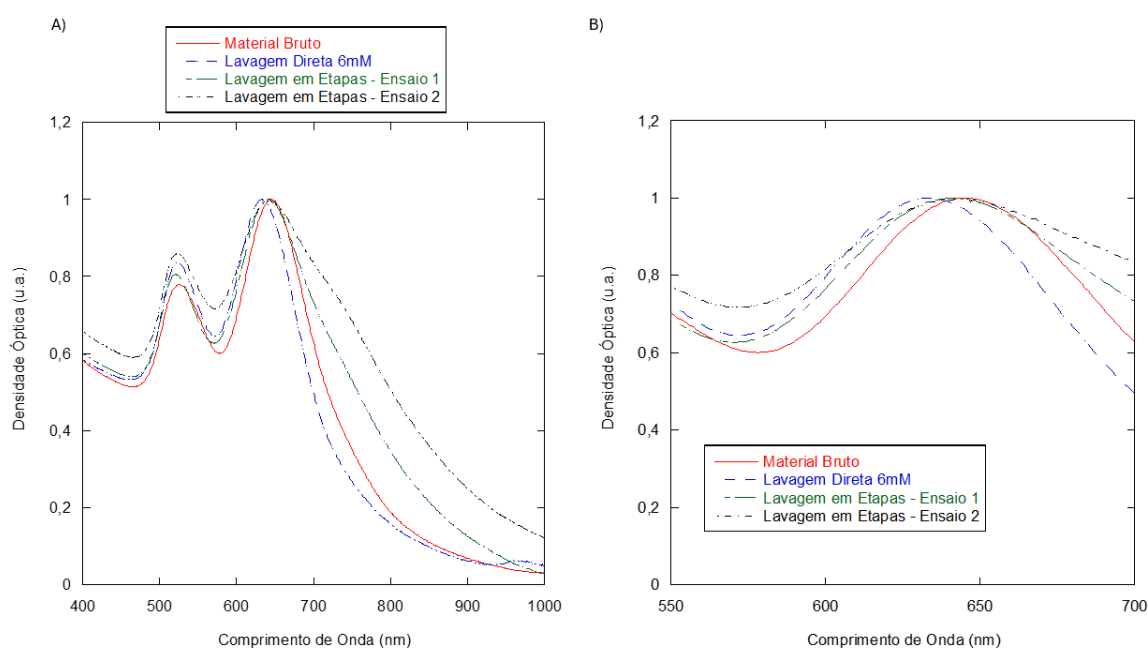
Essa abordagem foi utilizada como uma aproximação conservadora da propagação da incerteza associada à determinação de λ_{LSPR} sobre uma AR derivada espectralmente. Como métodos internos do CTNano também utilizam λ_{LSPR} como variável de entrada, a influência do erro instrumental em λ permanece relevante, ainda que a relação exata entre λ e AR dependa do modelo empregado.

A análise do Potencial Zeta (ζ) reforça a superioridade da rota em etapas, pois enquanto a amostra da lavagem direta apresentou $\zeta = +34,7$ mV, as amostras da lavagem em etapas apresentaram valores de $+52,1$ mV e $+51,6$ mV, respectivamente. Esta diferença de ~ 18 mV na carga superficial é compatível com uma camada de CTAB mais preservada e efetiva, garantindo maior repulsão coulombiana e, consequentemente, maior estabilidade coloidal (Nikoobakht; El-Sayed, 2001).

Ademais, observou-se um aumento expressivo do τ na lavagem em etapas, que passou de $\sim 7,0 \mu\text{s}$ para $12,05 \pm 0,25 \mu\text{s}$ (primeiro ensaio) e $13,09 \pm 1,66 \mu\text{s}$ (segundo ensaio), em comparação com a lavagem direta, que apresentou um τ de $\sim 7,5 \pm 0,71 \mu\text{s}$. Como τ é um parâmetro estimado pelo EPEL e depende da qualidade do sinal na faixa espectral de operação do equipamento, diferenças no perfil óptico entre as amostras (por exemplo, deslocamentos do λ_{LSPR} e alterações na intensidade e na forma do espectro) podem influenciar a confiabilidade do ajuste e, consequentemente, a incerteza associada a τ . Ainda assim, o aumento observado para o protocolo em etapas foi consistente entre os ensaios 1 e 2, sugerindo um efeito reprodutível do processo de lavagem sobre o comportamento rotacional e hidrodinâmico do sistema.

A Figura 7 mostra a sobreposição dos espectros de absorção no UV-Vis, evidenciando diferenças no perfil óptico final entre os protocolos, enquanto a amostra obtida por lavagem direta apresenta um pico longitudinal visualmente mais estreito e menor cauda na região de maiores comprimentos de onda, sugerindo uma distribuição óptica mais concentrada em torno da amostra total, a lavagem em etapas apresentou uma cauda maior e um pico mais alargado.

Figura 7 - Espectros de absorção UV-Vis das dispersões coloidais de nanobastões de ouro (AuNRs) em diferentes condições de CTAB e procedimentos de lavagem. (A) Espectros completos na faixa de 400–1000 nm. (B) Ampliação da região do pico de ressonância plasmônica longitudinal (λ_{LSPR}), entre 550–700 nm. O material bruto corresponde à dispersão em 50 mM de CTAB, enquanto as amostras submetidas à lavagem direta e à lavagem em etapas (Ensaio 1 e 2) referem-se às dispersões em 6 mM de CTAB.



Fonte: O autor (2025).

Em AuNRs, a forma e largura do pico longitudinal e a presença de caudas estão associadas à distribuição de razões de aspecto e à heterogeneidade populacional, além disso, alterações de linha de base e alargamentos podem acompanhar interações interpartículas ou incipiente agregação, que são frequentemente monitoradas por espectroscopia de absorção no UV-Vis (Eustis; El-Sayed, 2006).

Nesse contexto, o alargamento observado na lavagem em etapas pode ser atribuído, ao menos em parte, ao maior número de ciclos de centrifugação empregados de acordo com o protocolo utilizado (6 ciclos, contra 3 na lavagem direta). A precipitação forçada durante a centrifugação promove a aproximação lateral das partículas, favorecendo a formação de aglomerados transitórios que, mesmo após ressuspensão, podem persistir e contribuir para o alargamento espectral e o surgimento de caudas em maiores comprimentos de onda (Eustis; El-Sayed, 2006).

Contudo, essa aparente homogeneidade da lavagem direta ocorre junto a um deslocamento do λ_{LSPR} para valores menores (Tabela 1), o que é consistente com a mudança do microambiente dielétrico e superfície e/ou a seleção de fração ou de subpopulações durante as etapas de centrifugação e lavagem. Esses processos podem alterar a distribuição populacional recuperada, devido a perdas seletivas durante a formação de precipitados e ressuspensão, bem como as mudanças no microambiente coloidal, como a concentração de micelas livres e organização superficial do CTAB, o que pode refletir no perfil espectral final (Schweizerhof et al., 2018). Além disso, a própria precipitação forçada durante a centrifugação pode induzir a aproximação lateral das partículas, resultando na formação de aglomerados transitórios e, embora esses aglomerados possam ser parcialmente desfeitos na ressuspensão, sua persistência, ainda que parcial, pode contribuir para as alterações espectrais observadas entre os protocolos.

Portanto, embora a lavagem direta produza um espectro final visualmente mais uniforme, ela também promove maior afastamento do perfil óptico do material pós-síntese e menor estabilidade coloidal (ζ), o que contraria o objetivo desta etapa: obter uma suspensão em 6 mM de CTAB simultaneamente estável e o mais próxima possível do material bruto para prosseguir às etapas subsequentes.

Em conjunto, os resultados indicam que a lavagem em etapas manteve λ_{LSPR} mais próximo do material bruto e apresentou maior ζ , sugerindo melhor estabilidade coloidal na condição final de 6 mM de CTAB. Além disso, a proximidade entre os dois ensaios otimizados indica boa reprodutibilidade do protocolo. Assim, o protocolo em etapas foi

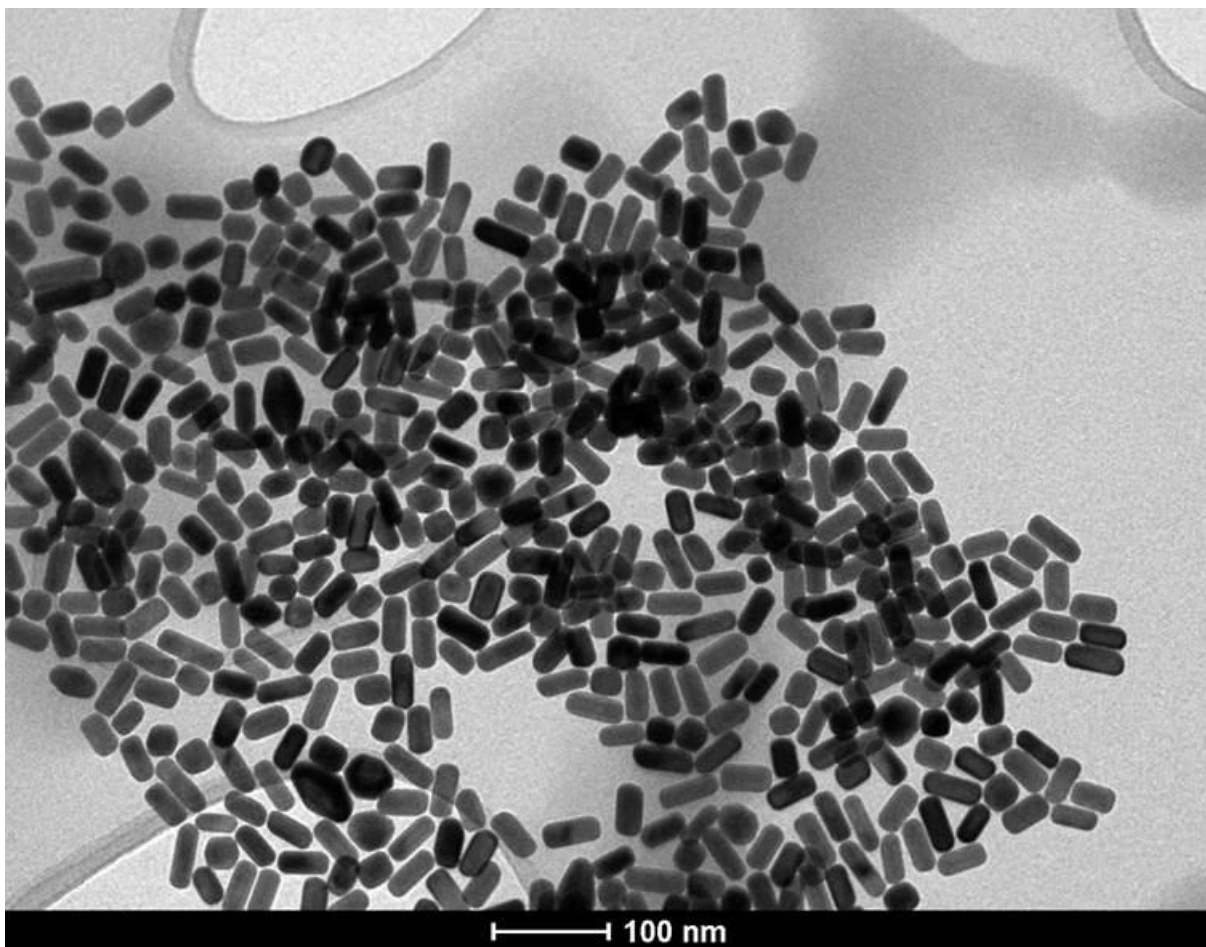
selecionado como material de partida para as etapas subsequentes e para a caracterização morfológica por TEM.

4.2.1 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão

A caracterização morfológica dos AuNRs selecionados após a lavagem em etapas foi realizada por TEM, com o objetivo de confirmar a forma anisotrópica e determinar as dimensões geométricas (comprimento e diâmetro) da população. A TEM é uma das técnicas mais empregadas para avaliação de morfologia e dimensões em AuNRs, especialmente quando se busca validar estimativas derivadas de parâmetros ópticos e coloidais (ZHENG, 2021).

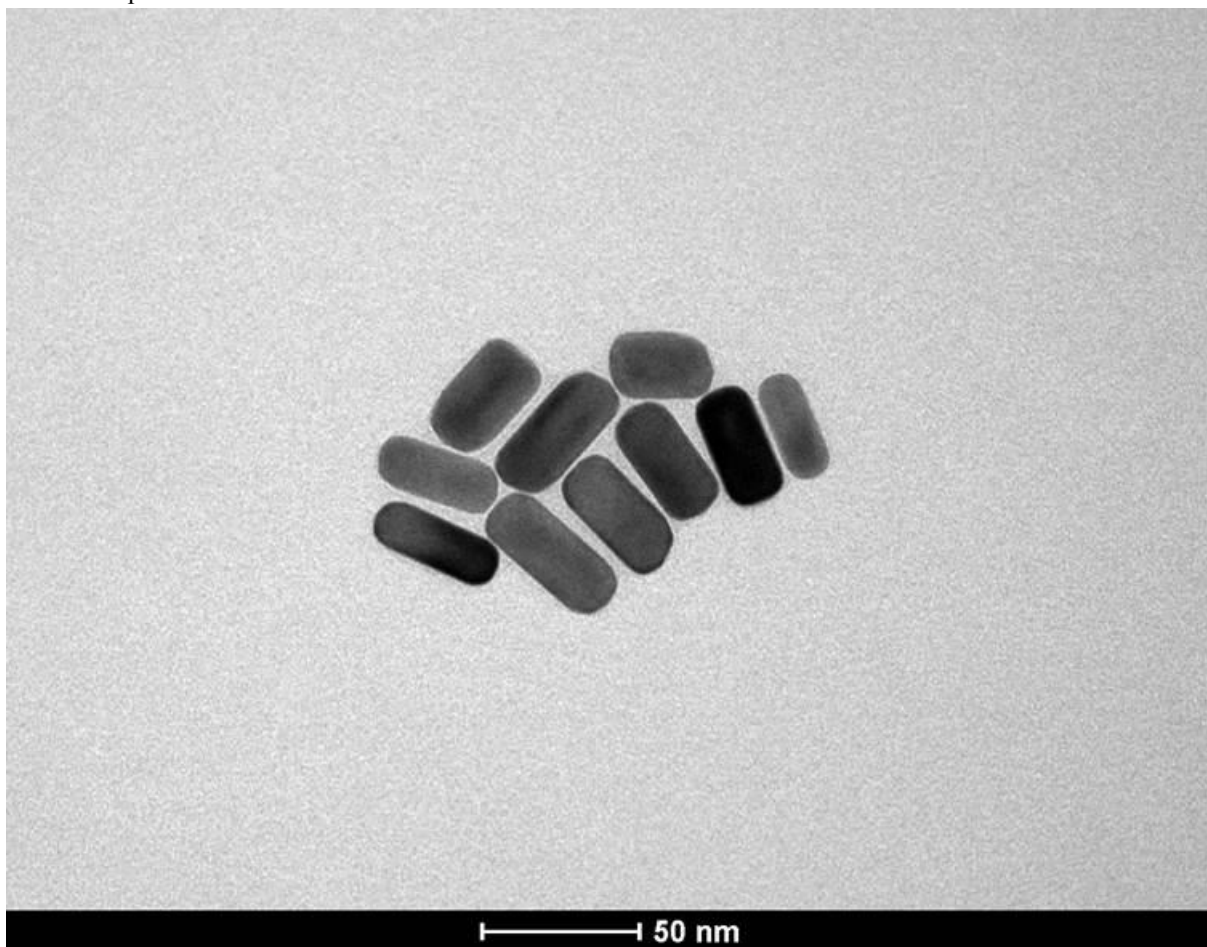
As Figuras 8 e 9 apresentam micrografias representativas dos AuNRs após lavagem em etapas (condição final em 6 mM de CTAB). A Figura 8 mostra um campo mais amplo, útil para visualizar a população e sua representatividade, enquanto a Figura 9 apresenta maior ampliação, favorecendo a observação de partículas individuais e a visualização de extremidades e contornos, importantes para as medidas morfométricas.

Figura 8 - Micrografia TEM dos AuNRs após lavagem em etapas (condição final: 6 mM CTAB). Barra de escala = 100 nm.



Fonte: O autor (2026).

Figura 9 - Micrografia TEM em maior ampliação dos AuNRs após lavagem em etapas (6 mM CTAB), destacando partículas individuais. Barra de escala = 50 nm.



Fonte: O autor (2026).

A análise quantitativa foi conduzida a partir de cinco micrografias TEM, totalizando $n = 125$ AuNRs medidos. As imagens foram analisadas em um software implementado em MATLAB, no qual a calibração dimensional foi realizada por correlação entre a barra de escala e o número de pixels correspondente. Em seguida, o algoritmo executou a detecção e segmentação das partículas e converteu as medidas para unidades métricas.

Antes da análise automática, as micrografias passaram por pré-processamento manual, a fim de melhorar a separação de partículas adjacentes. Para as medidas morfométricas, foram incluídos apenas AuNRs com contorno completo e extremidades visíveis, evitando sobreposição significativa. Em regiões com partículas próximas ou parcialmente sobrepostas, apenas a partícula com contorno mais claramente discernível foi considerada, enquanto os casos cuja individualização não foi possível com segurança foram excluídos. Ainda assim, reconhece-se que a segmentação em campos densos pode introduzir incertezas residuais nas medidas, motivo pelo qual os resultados são apresentados como média e desvio-padrão, juntamente com o tamanho amostral.

Com base nas medidas individuais, obteve-se comprimento médio de $49,87 \pm 8,91$ nm e diâmetro médio de $20,84 \pm 4,81$ nm, resultando em razão de aspecto média (AR) de $2,49 \pm 0,67$. Esses valores indicam uma população predominantemente anisotrópica e evidenciam dispersão dimensional moderada, particularmente em AR, o que é esperado em amostras de AuNRs sintetizadas por rotas de crescimento anisotrópico.

Para a mesma amostra, o método interno baseado em parâmetros ópticos e coloidais forneceu $AR = 2,19$, $L = 46,9$ nm e $d = 21,4$ nm, conforme apresentado na Tabela 2. Observa-se boa concordância de ordem de grandeza entre os métodos para comprimento e diâmetro, com diferenças pequenas frente às dispersões do TEM. A AR média obtida por TEM foi superior à estimativa coloidal, o que pode ocorrer por diferenças intrínsecas entre medidas geométricas em condição seca (TEM) e estimativas dependentes do comportamento em solução. Outros fatores que influenciam são a heterogeneidade populacional refletida no desvio-padrão de AR e as diferenças matemáticas entre a média de razões (média de L/d partícula a partícula) e a razão entre médias ($\bar{L} / \bar{d}$), que não são necessariamente equivalentes.

Tabela 2 – Parâmetros morfométricos por TEM e estimativas por método óptico/coloidal em AuNRs (lavagem em etapas; 6 mM CTAB).

Parâmetro	TEM (média $\pm$ DP)	Estimativa óptico/coloidal (GONÇALVES, 2022)
Comprimento, L (nm)	$49,87 \pm 8,91$	46,9
Diâmetro, d (nm)	$20,84 \pm 4,81$	21,4
Razão de aspecto, AR	$2,49 \pm 0,67$	2,19

Fonte: O autor (2025).

Nas micrografias analisadas (5 micrografias; $n = 125$), não foram observados grandes aglomerados compactos ou estruturas agregadas; além disso, nota-se a manutenção da morfologia original (bastão). Observa-se, no entanto, a presença de regiões localmente densas, que podem ser atribuídas tanto ao processo de deposição e secagem na grade, quanto à formação de aglomerados transitórios induzidos pelas etapas de centrifugação, conforme discutido anteriormente. Dessa forma, as eventuais diferenças observadas por espectroscopia de absorção no UV-Vis são mais compatíveis com heterogeneidade populacional e/ou interações interpartículas decorrentes do processamento, sem evidência de agregação irreversível.

Em resumo, a TEM corroborou diretamente a morfologia majoritariamente alongada da amostra selecionada e forneceu medidas geométricas compatíveis com as estimativas derivadas de parâmetros ópticos e coloidais, sustentando o uso da condição obtida por lavagem em etapas como material de partida para posterior funcionalização e bioconjugação.

A otimização do protocolo de lavagem é fundamental para o sucesso das etapas seguintes de funcionalização, pois define simultaneamente o perfil óptico final e a estabilidade coloidal das NPs. No presente estudo, o protocolo de lavagem em etapas mostrou-se superior à lavagem direta, ao manter o λ_{LSPR} mais próximo ao do material bruto, apresentar maiores valores de potencial zeta, indicando maior estabilidade eletrostática e demonstrar concordância entre os dois ensaios otimizados, o que reforça a reprodutibilidade do procedimento.

O aumento do τ para a faixa de $\sim 12\text{--}13\ \mu\text{s}$ e do ζ para $\sim +52\ \text{mV}$ são os principais indicativos de um comportamento hidrodinâmico bem definido e uma condição coloidal mais estável. Em nanovetores caracterizados por D-DLS, um τ elevado em relação ao material bruto e bem definido é desejável, uma vez que a técnica EPEL é comparativa e o sinal de detecção molecular é baseado na variação desse parâmetro rotacional ($\Delta\tau$) após a ligação do analito. Dessa forma, a funcionalização e bioconjugação devem promover uma variação de τ ($\Delta\tau$) compatível com o tamanho da biomolécula conjugada e detectável pela técnica, sendo que variações excessivas podem indicar agregação irreversível ou formação de clusters (Gonçalves, 2022).

Desta forma, os NRs lavados pelo protocolo de lavagem em etapas (com $\lambda_{\text{LSPR}} \approx 642\ \text{nm}$, $\tau \approx 12\text{--}13\ \mu\text{s}$ e $\zeta \approx +52\ \text{mV}$) foram selecionados para os ensaios de funcionalização e bioconjugação com peptídeos.

4.3 Funcionalização dos AuNRs com ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA)

A etapa de funcionalização é crucial para a aplicação dos AuNRs como nanovetores, pois promove a conjugação de um ligante que permite a bioconjugação subsequente. O MUA foi escolhido devido à sua terminação tiol, que forma uma ligação covalente estável com o ouro, e ao seu grupo carboxila terminal, que pode ser ativado para a ligação do peptídeo (Junqueira, 2024).

A avaliação do efeito do MUA na superfície dos AuNRs foi realizada por meio da análise de três razões molares de MUA por área de calota (1:1, 5:1 e 10:1). As alterações físico-químicas resultantes foram monitoradas por espectroscopia de absorção UV-Vis,

potencial zeta (ζ) e tempo de relaxação rotacional (τ). Para interpretação, as comparações foram realizadas sempre em relação ao respectivo controle em 6 mM CTAB, medido no mesmo conjunto experimental, uma vez que ζ e τ dependem do meio e das condições instrumentais, podendo ser afetados por diluições e por diferenças no ajuste entre equipamentos distintos.

4.3.1 Análise espectral e organização da monocamada de MUA

A Tabela 3 sumariza os parâmetros obtidos após a funcionalização com MUA nas razões 1:1, 5:1 e 10:1, incluindo os valores de λ_{LSPR} e AR para ensaios de reprodutibilidade, juntamente com os parâmetros coloidais (τ e ζ).

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos dos AuNRs após funcionalização com MUA em diferentes razões molares (MUA:Área de Calota).

Amostra	Ensaio	λ_{LSPR} (nm)	Razão de Aspecto	τ (μ s)	ζ (mV)	Concentração [AuNRs]	Interpretação do Fenômeno
Controle (6mM CTAB)	1	641,0	2,18	$8,93 \pm 0,18$	$+52,1 \pm 2,4$	204 pM	Referência (CTAB; ζ alto)
MUA 1:1	1	639,5	2,17	$10,07 \pm 0,49$	$+24,3 \pm 6,8$	205 pM	Efeito de diluição (ζ ↓)
MUA 5:1	1	639,5	2,18	$11,54 \pm 2,88$	$+23,5 \pm 7,9$	197 pM	Efeito de diluição (ζ ↓)
MUA 10:1	1	641,5	2,19	$9,96 \pm 0,40$	$+38,6 \pm 0,3$	228 pM	Modificação superficial (ζ ↓)
Controle (6mM CTAB)	2	641,0	2,18	$13,03 \pm 1,51$	$+51,6 \pm 0,5$	196 pM	Referência ; shoulder (<i>side-by-side</i>)
MUA 1:1	2	641,0	2,18	$12,90 \pm 0,69$	$+56,1 \pm 2,1$	160 pM	Reorganização/CTAB predominante
MUA 5:1	2	640,5	2,18	$11,86 \pm 1,17$	$+38,1 \pm 0,6$	186 pM	Modificação superficial (ζ ↓)

MUA 10:1	2	644,0	2,21	12,92 ± 0,66	+37,4 ± 0,7	165 pM	Maior modificaçã o ($\zeta \downarrow$; $\Delta\lambda \uparrow$)
----------	---	-------	------	-----------------	----------------	--------	---

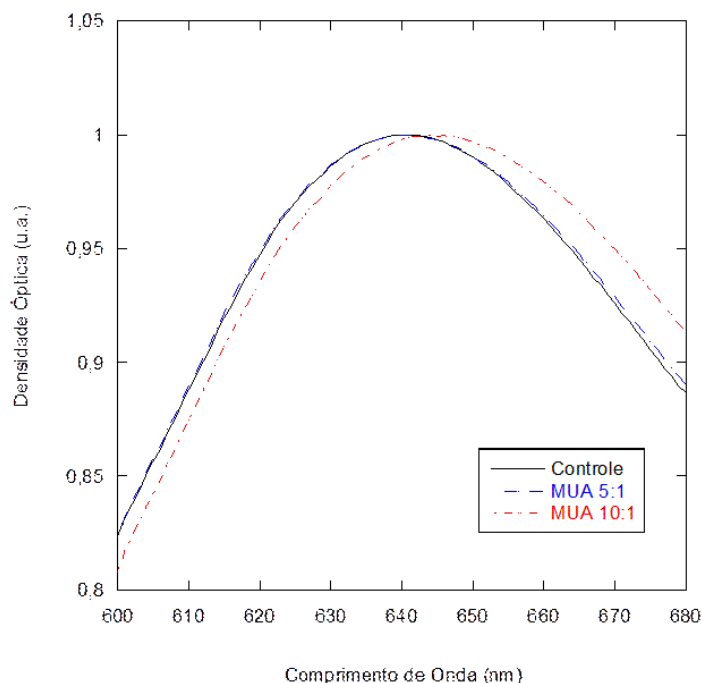
Fonte: O autor (2025).

A espectroscopia de absorção UV-Vis foi empregada para acompanhar alterações no comportamento óptico dos AuNRs após a adição de MUA. Foram considerados três elementos complementares: posição do pico plasmônico longitudinal (λ_{LSPR}), a razão de aspecto (AR) e as mudanças na forma do espectro (alargamento, cauda e presença de ombro ou *shoulder*). Em AuNRs, o modo longitudinal é particularmente sensível a mudanças no microambiente próximo à superfície, como por exemplo, variações do índice de refração local, e a efeitos coletivos quando há aproximação interpartículas (Zheng et al, 2021; Willets; Van Duyne, 2007).

De modo geral, as amostras funcionalizadas apresentaram variações pequenas de λ_{LSPR} em relação ao controle em 6 mM de CTAB. Considerando a incerteza instrumental de leitura do comprimento de onda (± 2 nm), as diferenças observadas nas condições 1:1 e 5:1, em ambos os ensaios, devem ser interpretadas como não conclusivas quando a análise se apoia apenas neste parâmetro, pois deslocamentos dessa ordem podem refletir flutuações de medida e não necessariamente uma alteração real do sistema.

No teste de reprodutibilidade (ensaio 2), a condição 10:1 apresentou λ_{LSPR} maior que o controle ($\Delta\lambda \approx +3$ nm). Esse deslocamento é discretamente superior à incerteza mínima, o que o torna compatível com um efeito real pequeno, ainda assim, por ser uma variação de baixa magnitude, o resultado deve ser apresentado como um indicativo cauteloso de alteração do microambiente superficial e rearranjo interfacial, e não como prova isolada de um estado específico de organização molecular na superfície (Zheng et al., 2021). O detalhe da banda longitudinal e a comparação entre as curvas do controle e das condições com MUA podem ser apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Sobreposição dos espectros de absorção UV-Vis normalizados (banda longitudinal) dos AuNRs em 6 mM de CTAB após funcionalização com MUA (Ensaio 2). As variações na posição de λ_{LSPR} são pequenas e, em grande parte, compatíveis com a incerteza instrumental; observa-se modulação do perfil espectral e um deslocamento discreto (~ 3 nm) na condição MUA 10:1 em relação ao controle, compatível com alteração do microambiente superficial.



Fonte: O autor (2025).

Os valores estimados de AR permaneceram praticamente constantes ($\approx 2,17\text{--}2,21$) entre controle (AuNRs) e amostras funcionalizadas (AuNRs-MUA). Esse comportamento é coerente com o cenário observado para λ_{LSPR} , já que quando o deslocamento do pico é pequeno e frequentemente compatível com a incerteza, espera-se que a AR estimada por abordagem óptica também varie pouco. Do ponto de vista físico, essa estabilidade é compatível com a preservação do núcleo anisotrópico metálico, uma vez que a funcionalização altera predominantemente a interface e o entorno dielétrico das extremidades, e não a geometria do bastão já formado (Zheng et al, 2021).

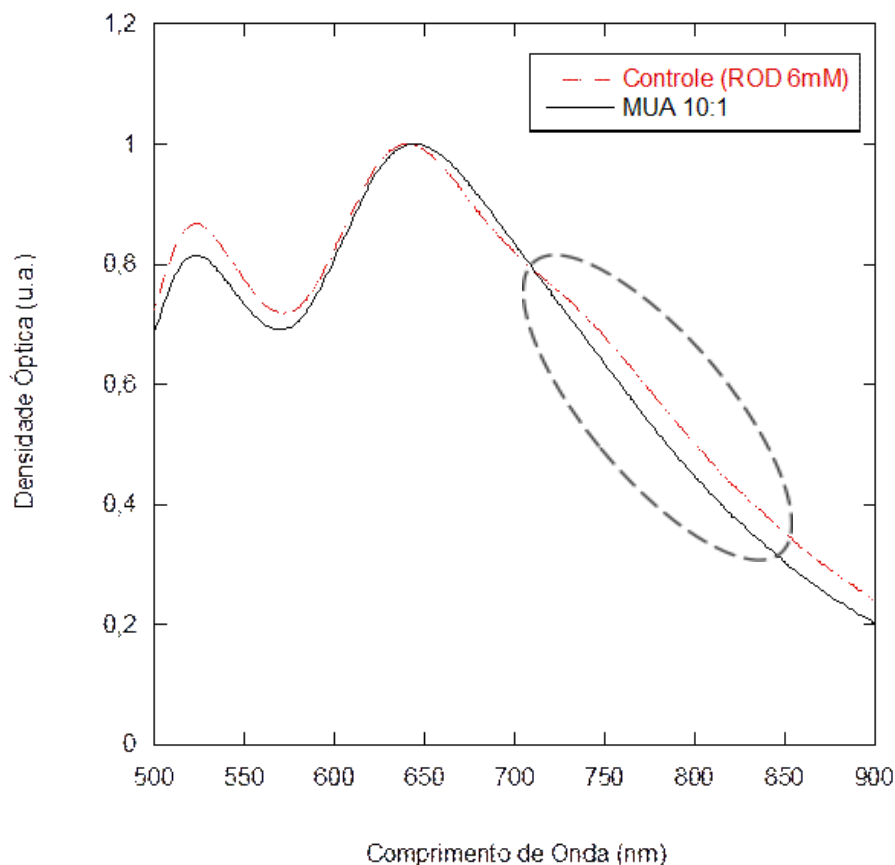
Assim, dentro do conjunto de dados obtido, AR e λ_{LSPR} sugerem que o procedimento de funcionalização não provocou alteração relevante do núcleo dos AuNRs e que, quando há diferença em λ_{LSPR} , ela é pequena e mais compatível com efeito superficial e microambiental do que com mudança morfológica do material.

Embora a posição do λ_{LSPR} nem sempre permita separar claramente as condições (especialmente quando $\Delta\lambda$ está dentro do erro), a forma do espectro fornece um sinal qualitativo mais informativo. Observa-se um ombro (*shoulder*) em maiores comprimentos de

onda no controle em 6 mM de CTAB, compatível com acoplamento plasmônico por aproximação interpartículas, frequentemente associado a arranjos transitórios como aproximação lateral (*side-by-side*) e alterações no estado coloidal. Esse tipo de modulação espectral pode aparecer mesmo sem agregação irreversível e tende a refletir mudanças na distância média e na orientação relativa entre partículas (Willels; Van Duyne, 2007), sendo consistente com os efeitos de aproximação lateral induzida pelas etapas de centrifugação, conforme discutido anteriormente.

A Figura 11 mostra a evidência espectroscópica de interações interpartículas reversíveis e sua redução após adição de MUA. Com o aumento da concentração de MUA, observou-se uma redução da cauda em maiores comprimentos de onda, sugerindo diminuição dessas interações interpartículas e melhora da dispersão coloidal. Esse comportamento é compatível com um cenário em que a introdução do ligante altera a interface das NPs com meio e reduz a propensão a estados de aproximação lateral, diminuindo o acoplamento observado no espectro (Willels; Van Duyne, 2007; Zheng et al., 2021).

Figura 11 - Comparação dos espectros de absorção UV-Vis normalizados mostrando a presença de um ombro (*shoulder*) em maiores comprimentos de onda no controle (6 mM CTAB), compatível com acoplamento plasmônico por aproximação lateral (*side-by-side*). Após funcionalização com MUA (ex.: 10:1), observa-se redução do ombro e recuperação de um perfil mais estreito, sugerindo melhora da dispersão coloidal.



Fonte: O autor (2025).

Em suma, as variações de λ_{LSPR} e AR foram discretas e, em grande parte, compatíveis com a incerteza instrumental, enquanto a da cauda em maiores comprimentos de onda com aumento da concentração de MUA configurou-se como um sinal espectral mais informativo para discutir mudanças no estado coloidal. (Willems; Van Duyne, 2007; Zheng et al., 2021).

4.3.2 Análise Eletrostática e contribuição do τ

O potencial zeta (ζ) foi adotado como o indicador mais direto para discutir alterações após a adição de MUA, pois representa o potencial na região do plano de deslizamento (*slipping plane*) e é calculado a partir da mobilidade eletroforética das partículas, sendo sensível ao estado coloidal e ao meio de dispersão. Assim, ζ não deve ser interpretado como uma propriedade absoluta das NPs, pois depende de parâmetros do meio (por exemplo,

condutividade e força iônica, viscosidade e constante dielétrica), além do modelo utilizado na conversão de mobilidade para ζ (Clogston; Vermilya, 2020; Malvern Instruments Limited, 2015). Como ζ depende do meio de dispersão, as comparações foram feitas prioritariamente entre amostras medidas no mesmo meio (6 mM CTAB). As medidas realizadas após diluição em água ultrapura foram tratadas como não diretamente comparáveis ao controle.

Em ambos os ensaios, o controle em 6 mM CTAB apresentou valores elevados de ζ (+52,1 mV no ensaio 1; +51,6 mV no ensaio 2), consistentes com uma interface CTAB dominante e estabilidade eletrostática alta na condição de trabalho. Essa tendência é compatível com o seu papel como estabilizante em AuNRs e com a manutenção intencional dele no meio para preservar a estabilidade coloidal durante etapas de funcionalização (Wei et al., 2021; Zheng et al., 2021).

No ensaio 1, a condição MUA 10:1 apresentou $\zeta = +38,6$ mV, representando uma redução clara em relação ao controle (+52,1 mV). Como essa condição não foi interpretada sob interferência de diluição em água ultrapura (ponto crítico para comparabilidade), o resultado é compatível com uma modificação interfacial após adição de MUA, mantendo o ζ positivo e, portanto, uma estabilidade eletrostática preservada. Esse comportamento é mais bem descrito como ligação e a intercalação de MUA, pois o sistema permanece em meio contendo CTAB, o que favorece a permanência de contribuição catiônica mesmo após introdução do ligante (Zheng et al, 2021; Junqueira, 2024).

Ainda no ensaio 1, as condições MUA 1:1 e MUA 5:1 apresentaram ζ na faixa $\sim +23$ – 25 mV, porém as medidas foram realizadas após diluição em água deionizada e, uma vez que o ζ medido pode variar substancialmente com o meio (alterações na dupla camada elétrica e nos parâmetros eletrocinéticos do meio), esses valores não são diretamente comparáveis ao controle em 6 mM CTAB e não devem ser usados para inferir quantitativamente uma maior ou menor cobertura de MUA nessas duas condições (Clogston; Vermilya, 2020; Malvern Instruments Limited, 2015). Nesse sentido, o resultado é interpretado como evidência de que a diluição altera a leitura e a estabilidade aparente, reforçando a necessidade de padronizar o meio para comparação.

No ensaio 2, observou-se um padrão mais limpo e reprodutível, onde o MUA 5:1 e MUA 10:1 apresentaram $\zeta = +38,1$ mV e +37,4 mV, respectivamente, valores esses, que são muito próximos entre si e próximos ao obtido para 10:1 no ensaio 1 (+38,6 mV). Essa convergência entre ensaios constitui o achado mais robusto desta seção, pois sugere que, a partir de 5:1–10:1, o sistema atinge um regime reprodutível de modificação interfacial,

compatível com ligação e a intercalação de MUA em meio contendo CTAB, sem forte interferência na estabilidade coloidal (Zheng et al, 2021; Junqueira, 2024).

A condição MUA 1:1 no ensaio 2 apresentou $\zeta = +56,1$ mV, ligeiramente acima do controle. Esse resultado é divergente da expectativa de redução de ζ em razão da introdução de grupos carboxila e, portanto, deve ser descrito como não conclusivo quanto a funcionalização com MUA nessa razão, pois em baixa concentração desse ligante, o sistema tende a permanecer CTAB-predominante. Assim, o valor observado pode refletir variabilidade experimental e/ou diferenças de organização interfacial que não necessariamente correspondem a uma maior cobertura efetiva de MUA (Clogston; Vermilya, 2020; Zheng et al, 2021).

Além disso, o fato de ζ permanecer positivo, mesmo quando reduzido ($\sim +37$ – 39 mV) é coerente com a hipótese de ligação e/ou formação de camada mista de CTAB e MUA, especialmente porque o procedimento foi conduzido mantendo CTAB no meio para preservar estabilidade coloidal. Ou seja, em termos práticos, essa condição atende ao objetivo do nanovetor, que é reduzir a contribuição catiônica efetiva da interface e introduzir grupos funcionais ($-\text{COOH}$) sem comprometer a dispersão necessária para as próximas etapas (Wei et al, 2021; Zheng et al, 2021; Junqueira, 2024).

Quanto ao tempo de relaxação rotacional (τ), este foi interpretado como evidência complementar, pois pode ser afetado pela heterogeneidade do sistema, por aproximações interpartículas reversíveis e variações experimentais (incluindo ruído e pequenas diferenças de concentração efetiva entre amostras). No ensaio 1, τ aumentou nas três condições com MUA em relação ao controle ($8,93$ μs), com destaque para MUA 5:1 ($11,54$ μs) e MUA 1:1 ($10,07$ μs), enquanto MUA 10:1 ficou em $9,96$ μs . Uma interpretação plausível para o fato de 10:1 não apresentar o maior valor é que o τ pode ser afetado por diferenças na concentração efetiva da suspensão (conforme apresentado na Tabela 3) e por espalhamento múltiplo em amostras mais concentradas, o que reduz a qualidade do ajuste e pode deslocar o valor estimado. Por esse motivo, o parâmetro foi utilizado como indicador complementar e não como evidência primária de ligação.

No ensaio 2, τ foi mais homogêneo entre controle e funcionalizados ($\approx 11,9$ – $13,0$ μs), compatível com um conjunto experimental mais uniforme e com a hipótese de que parte da variabilidade de τ esteja associada a estados transitórios de interação interpartículas observáveis pela espectroscopia de absorção UV-Vis (seção 4.2.1). Ainda assim, nesta etapa, ζ permaneceu o parâmetro mais consistente para sustentar modificação interfacial, enquanto τ foi mantido como apoio interpretativo do comportamento hidrodinâmico, dado o fato do

MUA ser uma molécula pequena, cuja adição às extremidades dos AuNRs promove variações discretas no comprimento efetivo da partícula, resultando em alterações de τ próximas ao limite de sensibilidade da técnica. Nesse contexto, a conjugação de biomoléculas maiores é necessária para promover $\Delta\tau$ mais expressivas e detectáveis de forma robusta.

De modo geral, os dados de ζ sustentam de forma mais robusta uma modificação interfacial reproduzível nas razões 5:1–10:1 ($\zeta \sim +37\text{--}39$ mV), enquanto os resultados obtidos sob mudança do meio (diluição em água DI) foram tratados como não comparáveis quantitativamente ao controle em 6 mM CTAB. Por fim, ressalta-se que ζ é um indicador eletrocinético indireto, pois apoia a discussão sobre a alteração de interface e estabilidade, mas não permite a identificação química do ligante; consequentemente, a confirmação direta demandaria técnicas específicas (ex.: FTIR, XPS) (Clogston; Vermilya, 2020; Malvern Instruments Limited, 2015), não empregadas nesta etapa por não integrarem os critérios operacionais do protocolo adotado como referência.

4.4 Bioconjugação AuNRs-Peptídeos e Avaliação da Estabilidade Operacional

A bioconjugação do AuNRs aos peptídeos foi realizada via química EDAC/NHS (JUNQUEIRA, 2024), sendo o desempenho monitorado principalmente pela variação do tempo de relaxação rotacional ($\Delta\tau$), parâmetro sensível a alterações no arrasto hidrodinâmico associado ao nanovetor (AuNRs-Pep). Como suporte interpretativo, também foram analisados o perfil espectral por espectroscopia de absorção UV-Vis e a razão de aspecto (AR) estimada a partir de λ_{LSPR} .

Nesta seção, as comparações são realizadas prioritariamente entre pares controle versus nanovetor obtidos no mesmo conjunto experimental e no mesmo meio dispersante, uma vez que parâmetros espectrais e coloidais dependem do meio de dispersão.

4.4.1 Avaliação da Eficiência de Bioconjugação (ensaio 1)

A Tabela 4 apresenta os resultados do primeiro ensaio de bioconjugação 1 para as três razões (1:1; 5:1; 10:1), comparando cada nanovetor ao seu respectivo controle, submetido às mesmas etapas experimentais, diferindo apenas pela adição do peptídeo. Considerando a incerteza instrumental associada à determinação de comprimento de onda (± 2 nm), variações pequenas de λ_{LSPR} foram consideradas na interpretação.

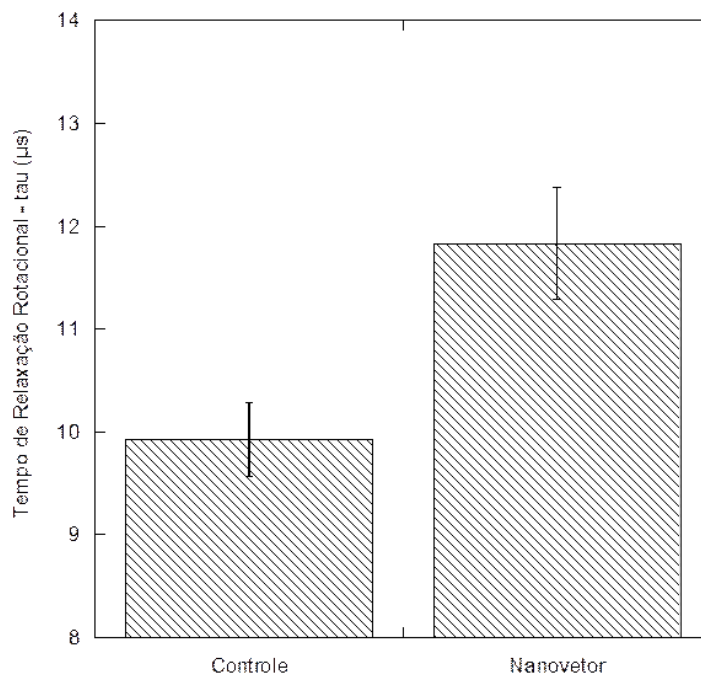
Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos e variação do tempo de relaxação rotacional ($\Delta\tau$) após a bioconjugação (ensaio 1).

Amostra	λ_{LSPR} (nm)	AR	τ (μs)	$\Delta\tau$ (μs)	Concentração [AuNRs]	Interpretação
Controle 10:1	648,0	2,24	$12,19 \pm 0,71$	-	252 pM	Referência do par 10:1
Nanovetor 10:1	648,0	2,24	$12,52 \pm 0,67$	+0,33	233 pM	$\Delta\tau$ não discriminante
Controle 5:1	643,5	2,20	$9,92 \pm 0,36$	-	165 pM	Referência do par 5:1
Nanovetor 5:1	643,5	2,20	$11,83 \pm 0,54$	+1,91	126 pM	$\Delta\tau$ significativo
Controle 1:1	641,5	2,19	$9,51 \pm 0,53$	-	221 pM	Referência do par 1:1
Nanovetor 1:1	627,5	2,08	$10,24 \pm 0,29$	+0,73	101 pM	Interferência espectral

Fonte: O autor (2025).

A condição 5:1 apresentou o maior incremento em τ ($\Delta\tau = +1,91 \mu\text{s}$), indicando a alteração hidrodinâmica mais pronunciada entre as condições avaliadas (Figura 12). Esse aumento de τ é consistente com maior arrasto rotacional efetivo do nanovetor em relação ao controle, compatível com a incorporação do ligante biológico na interface após a ativação EDAC/NHS (Junqueira, 2024). Além disso, a magnitude do incremento observado ocorreu sem deslocamento detectável de λ_{LSPR} (Tabela 4), o que reforça a interpretação de modificação interfacial acompanhada de preservação do perfil óptico global.

Figura 12 - Monitoramento hidrodinâmico da bioconjugação do peptídeo na condição (5:1). Comparação do Tempo de Relaxação Rotacional (τ) entre o Controle (AuNR-MUA ativado) e o Nanovetor, evidenciando o incremento significativo do volume hidrodinâmico ($\Delta\tau \approx 1,91 \mu\text{s}$) compatível à bioconjugação da biomolécula na superfície. As barras de erro representam o desvio padrão ($n=10$).



Fonte: O autor (2025).

Na condição 10:1, o nanovetor apresentou τ ligeiramente maior que o controle ($\Delta\tau = +0,33 \mu\text{s}$), porém com sobreposição dos desvios padrão (Tabela 4), indicando que, neste ensaio, a diferença não se distinguiu de forma robusta. Do ponto de vista espectral, controle e nanovetor 10:1 exibiram λ_{LSPR} idêntico e AR constante, compatível com ausência de mudança detectável no espectro de absorção UV-Vis após a adição do peptídeo. Dessa forma, o conjunto de dados sugere que a condição 10:1, neste ensaio, apresentou baixa sensibilidade operacional para detectar incremento hidrodinâmico por τ , não sendo possível concluir de forma robusta sobre ganho de arrasto nesta razão específica apenas com base em $\Delta\tau$.

Por fim, o sensor 1:1 apresentou um deslocamento anômalo de λ_{LSPR} para 627,5 nm acompanhado de deformidade do espectro (Tabela 4), um comportamento incompatível com a variação esperada devido à incerteza instrumental e indicativo de interferência durante a leitura. Com isso, a hipótese levantada foi a da cristalização do CTAB, o que pode impactar simultaneamente o espectro de absorção UV-Vis e a confiabilidade do ajuste de τ , tornando a condição operacionalmente pouco confiável (Wei et al, 2021). A evidência experimental que sustenta essa interpretação é apresentada no Apêndice A, onde a amostra recupera o perfil

espectral característico após o condicionamento em banho térmico. Observa-se também uma redução aparente da concentração estimada nesta condição, o que pode estar associado ao mesmo artefato de cristalização do CTAB durante o preparo experimental. Esse fenômeno pode promover retenção transitória de material ou dispersão não homogênea da suspensão durante a leitura, resultando em variações temporárias na concentração estimada sem necessariamente indicar perda permanente de nanovetores.

4.4.2 Avaliação da Reprodutibilidade da bioconjugação (ensaio 2)

A Tabela 5 apresenta os resultados da reprodutibilidade da bioconjugação (ensaio 2) para as razões 1:1; 5:1 e 10:1, comparando cada nanovetor ao respectivo controle submetido às mesmas etapas experimentais, diferindo apenas pela adição do peptídeo. Assim como discutido no ensaio 1 (Tabela 4), variações pequenas de λ_{LSPR} foram interpretadas considerando a incerteza instrumental (± 2 nm).

Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos e variação do tempo de relaxação rotacional ($\Delta\tau$) após a ensaio de reprodutibilidade de bioconjugação (ensaio 2).

Amostra	λ_{LSPR} (nm)	Razão de Aspecto	τ (μs)	$\Delta\tau$ (μs)	Concentração [AuNRs]	Interpretação
Controle 10:1	645,0	2,22	$14,08 \pm 0,78$	-	173 pM	Referência do sensor 10:1
Nanovetor 10:1	645,0	2,22	$15,22 \pm 1,86$	+1,14	145 pM	$\Delta\tau$ indicativo
Controle 5:1	639,0	2,17	$12,23 \pm 0,47$	-	183 pM	Referência do sensor 5:1
Nanovetor 5:1	637,0	2,15	$12,29 \pm 0,39$	+0,06	164 pM	$\Delta\tau$ não discriminante
Controle 1:1	639,0	2,17	$11,77 \pm 0,42$	-	198 pM	Referência do sensor 1:1
Nanovetor 1:1	637,5	2,16	$12,18 \pm 0,62$	+0,41	154 pM	$\Delta\tau$ não conclusivo

Fonte: O autor (2025).

No ensaio de bioconjugação 2, as diferenças de λ_{LSPR} entre controle e nanovetor permaneceram pequenas em todas as razões (0 a 2 nm em módulo), portanto compatíveis com o limite instrumental de leitura. Do mesmo modo, os valores de AR variaram apenas discretamente (Tabela 5). Dessa forma, assim como observado anteriormente, o espectro de

absorção UV-Vis e o AR não separaram de forma robusta as condições após adição do peptídeo neste ensaio, e a interpretação se apoia principalmente na $\Delta\tau$ como parâmetro operacional (Gonçalves, 2022).

A condição 10:1 apresentou o maior incremento em τ ($\Delta\tau = +1,14 \mu\text{s}$), constituindo o sinal hidrodinâmico mais pronunciado do ensaio 2. Entretanto, observa-se uma maior dispersão experimental em τ , de modo que o resultado deve ser descrito como indicativo de alteração hidrodinâmica, porém com variabilidade aumentada nesta repetição. Ainda assim, quando comparada às demais razões, a condição 10:1 foi a que exibiu maior afastamento do controle em termos de τ , sugerindo que, neste ensaio, essa razão foi a mais propensa a produzir um efeito mensurável no comportamento rotacional após a etapa de bioconjugação.

Nas condições 5:1 e 1:1, os valores de τ do nanovetor foram muito próximos aos de seus respectivos controles ($\Delta\tau = +0,06 \mu\text{s}$ e $+0,41 \mu\text{s}$, respectivamente), com sobreposição dos desvios padrão (Tabela 5). Portanto, para essas razões, os dados indicam baixa separabilidade por τ no ensaio 2, não sendo possível concluir de forma robusta sobre ganho hidrodinâmico apenas com base em $\Delta\tau$.

Um aspecto relevante para a discussão da reprodutibilidade é que, novamente, a razão 10:1 apresentou valores absolutos de τ e valores de AR e λ_{LSPR} superiores aos das razões 5:1 e 1:1 já no controle (Tabela 5), sugerindo que essa condição pode operar em um regime óptico e hidrodinâmico distinto mesmo antes da adição do peptídeo. Uma hipótese operacional compatível com esse padrão é que a maior densidade de ativação e modificação na razão 10:1 favorece estados diferenciados de organização e empacotamento de ligantes, bem como alterações no microambiente próximo à superfície, influenciando o comportamento coloidal e a leitura de τ . Contudo, é importante ressaltar que essa hipótese de reorganização interfacial não foi confirmada quimicamente neste trabalho, uma vez que não foram empregadas técnicas específicas de caracterização de superfície (ex.: FTIR/XPS).

Além disso, quando presentes, interações interpartículas reversíveis do tipo *side-by-side*, evidenciadas anteriormente na etapa de funcionalização com MUA (Seção 4.2.1), podem aumentar o ruído e variabilidade experimental na linha de base do espectro de absorção UV-Vis do controle, reduzindo a sensibilidade do ensaio para detectar incrementos discretos em τ (Busch et al, 2019). Assim, a diferença de comportamento entre os ensaios reforça que a leitura por $\Delta\tau$ é sensível não apenas à adição do peptídeo, mas também à estabilidade operacional do sistema durante a etapa de ativação.

Em conjunto, os experimentos de repetição indicam que a separabilidade por τ pode depender tanto da razão avaliada quanto do estado coloidal do controle em cada ensaio.

Enquanto o ensaio 1 apresentou maior resposta na condição 5:1, no ensaio 2 o sinal mais pronunciado ocorreu em 10:1, porém acompanhado de maior dispersão experimental. Dessa forma, os resultados sugerem que as razões testadas podem apresentar janelas operacionais distintas quanto à estabilidade durante ativação e bioconjugação, reforçando a necessidade de controle rigoroso do processo para garantir reprodutibilidade do parâmetro hidrodinâmico.

4.5 Análise Eletrostática Final e Seleção do Nanovetor Otimizado

O potencial zeta (ζ) é um parâmetro eletrocinético amplamente utilizado como indicador indireto de estabilidade coloidal, por refletir o potencial elétrico na região do plano de deslizamento e, consequentemente, a intensidade de repulsão eletrostática entre partículas em suspensão. Como referência empírica, valores de $|\zeta|$ próximos ou acima de ~ 30 mV são frequentemente associados à maior estabilidade coloidal, ainda que esse critério dependa do meio e das condições de medida (Németh et al, 2022).

Nesta seção, o ζ foi empregado com foco operacional, isto é, para verificar se o nanovetor final permanece em uma faixa compatível com estabilidade e manipulação em solução. Com isso, ressalta-se que ζ não constitui prova direta de bioconjugação, pois não identifica quimicamente o ligante e é fortemente dependente do meio. Além disso, a carga líquida efetiva do peptídeo limita inferências mecanísticas sobre a direção e a magnitude esperadas de variações de ζ após a etapa de conjugação. Dessa forma, o ζ é interpretado, nesta seção, como um critério de estabilidade eletrostática final, complementando os parâmetros hidrodinâmicos ($\Delta\tau$) e ópticos discutidos nas Seções 4.2 e 4.3.

4.5.1 Impacto da Bioconjugação na Estabilidade Eletrostática

A Tabela 6 apresenta os valores de ζ obtidos para os nanovetores finais do ensaio 2 nas três razões avaliadas (1:1; 5:1; 10:1). Todas as leituras tiveram sua classificação de estabilidade realizada com base no limiar empírico de $|\zeta| \approx 30$ mV (Németh et al, 2022).

Tabela 6 - Potencial zeta dos nanovetores finais (ensaio 2) e avaliação da estabilidade coloidal.

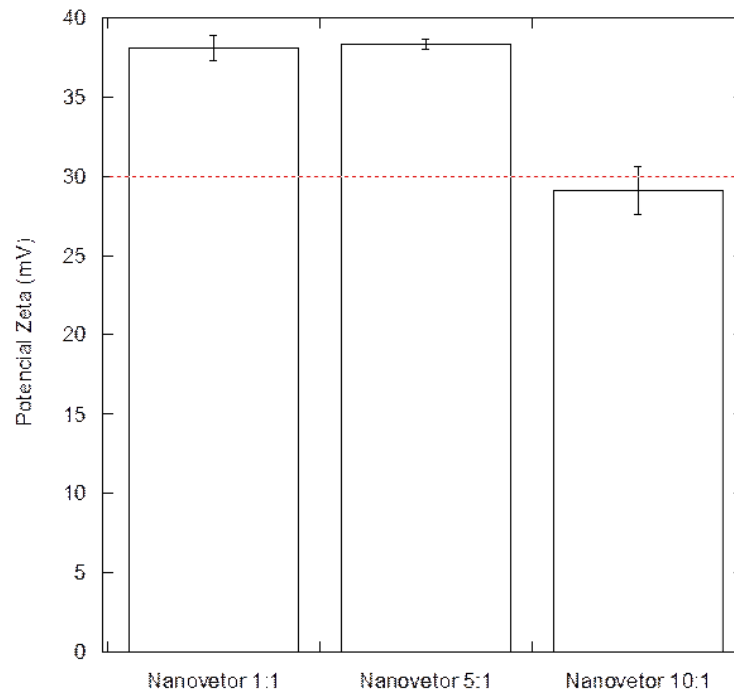
Amostra	ζ Médio (mV)	Status de Estabilidade	Interpretação
Nanovetor 1:1	$+38,1 \pm 0,8$	Estável	Acima do limiar
Nanovetor 5:1	$+38,3 \pm 0,3$	Estável	Maior consistência (DP menor)

Nanovetor 10:1	$+29,1 \pm 1,5$	Limítrofe	Próximo ao limiar
----------------	-----------------	-----------	-------------------

Fonte: O autor (2025).

Os nanovetores 1:1 e 5:1 apresentaram ζ em faixa estável e acima do limiar empírico. Em particular, o nanovetor 5:1 manteve ζ próximo de +38 mV e apresentou perfil de distribuição monomodal (Apêndice B), o que sustenta a confiabilidade nessa condição. Por outro lado, o nanovetor 10:1 apresentou $\zeta = +29,1$ mV, valor limítrofe em relação ao critério empírico de estabilidade, sugerindo menor margem eletrostática e maior sensibilidade a variações do meio em etapas subsequentes. Esses resultados estão representados graficamente na Figura 13

Figura 13 - Avaliação da estabilidade eletrostática final dos nanovetores (ensaio 2). Valores de potencial zeta (ζ) para as diferentes razões; a linha tracejada indica o limiar empírico de estabilidade ($\approx +30$ mV). Observa-se que 10:1 situa-se em região limítrofe, enquanto 5:1 permanece em faixa estável e consistente.



Fonte: O autor (2026).

Por fim, registra-se que os valores de ζ obtidos no ensaio 1 não foram utilizados como base para a decisão final devido à suspeita de artefato instrumental associado ao sistema de medição (integridade da cubeta), motivo pelo qual a discussão de ζ foi ancorada no ensaio 2, após a substituição do componente.

4.5.2 Seleção da Condição Padrão do Nanovetor

A seleção da condição padrão foi realizada integrando-se os resultados de estabilidade eletrostática (ζ) com o desempenho hidrodinâmico ($\Delta\tau$) e a consistência operacional observada nas etapas anteriores.

- 1) Condição 1:1 - embora o ζ final esteja em faixa estável, essa razão foi considerada menos adequada como protocolo padrão devido à fragilidade operacional evidenciada na Seção 4.3.1, na qual a condição apresentou interferência espectral e comportamento menos confiável nas leituras.
- 2) Condição 10:1 – apresentou, em uma das repetições, incremento mais pronunciado de τ após bioconjugação (Seção 4.3.2); entretanto o ζ final situou-se em regime limítrofe (Tabela 6), indicando menor margem de estabilidade eletrostática e potencial maior susceptibilidade à instabilidade em condições subsequentes.
- 3) Condição 5:1 – foi selecionada como compromisso ideal (*trade-off*), por reunir estabilidade eletrostática robusta, com ζ em faixa estável e perfil monomodal (Apêndice B), além de melhor desempenho operacional na etapa de bioconjugação (maior $\Delta\tau$ no ensaio 1; Seção 4.3.1). Essa condição apresentou maior margem operacional, favorecendo manipulação e reprodutibilidade do nanovetor em solução.

Portanto, o nanovetor funcionalizado na razão MUA 5:1 (AuNR–MUA–Peptídeo) foi definido como condição padrão inicial para prosseguir à etapa seguinte de validação funcional, que consiste em ensaios celulares para avaliar o desempenho do nanovetor em ambiente biológico. Caso a resposta funcional seja insuficiente, poderá ser avaliado o ajuste da razão molar, iniciando-se em 5:1 e avançando, se necessário, até 10:1 como limite superior testado, considerando o caráter limítrofe de ζ nessa condição.

4.4.3 Limitações e implicações para a validação do nanovetor

Apesar de ζ e $\Delta\tau$ serem parâmetros úteis para avaliar a estabilidade e o desempenho operacional do nanovetor, algumas limitações devem ser explicitadas para a interpretação adequada dos resultados. Primeiramente, o ζ é dependente do meio e não constitui prova direta de bioconjugação, pois não identifica quimicamente o ligante na superfície. Além disso, a carga líquida efetiva do peptídeo não pôde ser estabelecida, o que limita inferências

mecanísticas sobre variações de ζ após a conjugação. Dessa forma, a confirmação química direta da funcionalização exigiria técnicas específicas de caracterização da superfície (como, FTIR e/ou XPS).

Adicionalmente, o parâmetro hidrodinâmico ($\Delta\tau$) é sensível ao estado coloidal do controle em cada ensaio, de modo que interações interpartículas reversíveis e variações no nível de referência do controle podem aumentar a dispersão experimental e reduzir a separabilidade entre controle e nanovetor. Assim, a seleção do protocolo foi realizada com base em um critério integrado e operacional (estabilidade eletrostática, confiabilidade do parâmetro e viabilidade de manuseio), e a validação definitiva do desempenho do nanovetor deve ser conduzida em ensaios celulares, que representam a etapa crítica para confirmar sua aplicabilidade em ambiente biológico.

Os resultados indicaram que a lavagem em etapas foi a estratégia mais adequada para preservar a estabilidade coloidal dos AuNRs no meio contendo CTAB, refletida por comportamento óptico consistente e maior margem eletrostática. A funcionalização com MUA promoveu alterações interfaciais compatíveis com ligação e intercalação do estabilizante, e a etapa de bioconjugação evidenciou que a resposta hidrodinâmica ($\Delta\tau$) é sensível ao estado coloidal do controle e pode variar entre ensaios, devendo ser interpretada como uma métrica operacional. Assim, no escopo desta etapa, a condição 5:1 foi selecionada como padrão inicial para orientar as validações subsequentes, reconhecendo-se que a realização de caracterizações químicas diretas da superfície constitui etapa essencial para confirmação do protocolo experimental.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou a otimização de um protocolo reprodutível para obtenção de um nanovetor plasmônico à base de AuNRs bioconjugados com peptídeos, com estabilidade coloidal controlada e desempenho hidrodinâmico mensurável. A estratégia adotada integrou parâmetros ópticos, eletrocinéticos e rotacionais com critérios operacionais de otimização, permitindo a definição de uma condição padrão estável para validações biológicas subsequentes.

A otimização do protocolo de purificação foi determinante para o desempenho das etapas subsequentes. A lavagem em etapas mostrou-se superior à lavagem direta ao preservar o perfil óptico do material de partida ($\lambda_{\text{LSPR}} \approx 641,5\text{--}642\text{ nm}$) e ao proporcionar maior estabilidade eletrostática ($\zeta \approx +52\text{ mV}$), associada a um regime hidrodinâmico mais adequado ($\tau \approx 12\text{--}13\text{ }\mu\text{s}$), com reprodutibilidade consistente entre os ensaios.

Na etapa de funcionalização com MUA, os resultados indicaram que o procedimento não promoveu alteração relevante do núcleo plasmônico, evidenciadas por variações discretas de λ_{LSPR} e da AR. O sinal mais informativo foi a melhoria do comportamento coloidal, observada pela redução de interações interpartículas no espectro de absorção UV-Vis (redução do *shoulder*) e pelo estabelecimento de um regime reprodutível de modificação interfacial nas razões 5:1–10:1, especialmente no ensaio 2, com ζ na faixa de $\sim +37\text{--}39\text{ mV}$, mantendo caráter positivo em meio contendo CTAB.

A bioconjugação do peptídeo via EDAC/NHS foi monitorada principalmente por meio da variação do tempo de relaxação rotacional $\Delta\tau$. No ensaio 1, a condição 5:1 apresentou o maior incremento hidrodinâmico significativo ($\Delta\tau = +1,91\text{ }\mu\text{s}$), compatível com o aumento de arrasto rotacional após conjugação, sem deslocamento detectável de λ_{LSPR} . Já no ensaio 2, o maior $\Delta\tau$ foi observado na razão 10:1 ($\Delta\tau = +1,14\text{ }\mu\text{s}$), porém com maior dispersão experimental, sugerindo maior sensibilidade a variações operacionais nessa repetição. Adicionalmente, a condição 1:1 foi considerada menos adequada como protocolo padrão, em razão da fragilidade operacional observada, associada a interferência espectral compatível com cristalização de CTAB, o que comprometeu a confiabilidade das leituras nessa razão.

Para a decisão final, a seleção do nanovetor foi fundamentada na integração entre estabilidade eletrostática final (ζ), desempenho hidrodinâmico ($\Delta\tau$) e consistência operacional. No ensaio 2, o nanovetor 5:1 apresentou $\zeta = +38,3 \pm 0,3\text{ mV}$, dentro da faixa considerada estável, além de perfil monomodal, indicando comportamento coloidal

consistente. Em contraste, a condição 10:1 apresentou $\zeta = +29,1 \pm 1,5$ mV, valor limítrofe em relação ao critério empírico de estabilidade ($\approx |30$ mV|), sugerindo menor margem de segurança para manipulação em etapas subsequentes. Dessa forma, a condição 5:1 foi definida como o compromisso ideal (*trade-off*), por combinar estabilidade eletrostática robusta e desempenho favorável na etapa de bioconjugação (maior $\Delta\tau$ no ensaio 1), além de maior previsibilidade operacional. Recomenda-se, portanto, sua adoção como condição padrão inicial para validações funcionais. Caso a resposta biológica seja insuficiente, o escalonamento poderá ser considerado até a razão 10:1, o caráter limítrofe de ζ nessa condição.

Por fim, ressalta-se que os parâmetros eletrocinéticos e hidrodinâmicos utilizados (ζ e $\Delta\tau$) constituem indicadores indiretos interfaciais. Nesse contexto, o ζ foi utilizado como critério operacional de estabilidade coloidal, e não como evidência química direta da conjugação. Além disso, a ausência de informações sobre a carga líquida efetiva do peptídeo nas condições experimentais impôs limitações às inferências mecanísticas, especialmente quanto a direção esperada das variações de ζ , após a bioconjugação. Assim, o protocolo otimizado estabelecido neste trabalho representa um avanço metodológico consistente para o desenvolvimento de plataformas plasmônicas aplicadas à nanobiotecnologia ao estruturar um modelo decisório baseado na integração de métricas físico-químicas complementares e na análise crítica da reprodutibilidade entre ensaios. Tal abordagem fortalece a base translacional da tecnologia, contribuindo para soluções alinhadas ao ODS 9: Indústria, Inovação e Infraestrutura ao fomentar o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados robustos, e ao ODS e ao ODS 3: Saúde e Bem-Estar, diante do potencial de aplicação futura em estratégias diagnósticas e terapêuticas.

Perspectivas Futuras

- a) Validação Biológica: realização de ensaios *in vitro* em cultura celular para avaliar o desempenho do nanovetor 5:1 em condições biologicamente relevantes. Esses estudos devem contemplar análise de citotoxicidade, eficiência de internalização e avaliação da resposta funcional associado ao peptídeo conjugado.
- b) Confirmação química direta de superfície: a aplicação de técnicas de caracterização superficial, como FTIR e XPS é recomendada para confirmar de forma direta a formação de ligações químicas esperadas. Essas análises permitirão consolidar o protocolo sob uma perspectiva estrutural e mecanística.

- c) Estudos de estabilidade e aplicabilidade: investigações adicionais devem contemplar a estabilidade coloidal do nanovetor em meios com relevância fisiológica, considerando variações de força iônica, pH e presença de biomoléculas (proteínas séricas). Adicionalmente, estudos da cinética de interação e/ou liberação do peptídeo podem contribuir para compreender o comportamento do nanovetor em condições que simulem o ambiente biológico real, ampliando seu potencial de aplicação.

REFERÊNCIAS

- ALBA-MOLINA, D.; GINER-CASARES, J. J.; CANO, M. Bioconjugated plasmonic nanoparticles for enhanced skin penetration. **Topics in Current Chemistry (Cham)**, v. 378, n. 1, art. 8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0273-0>. Acesso em: 11 fev. 2026.
- BUSCH, R. T. *et al.* Optimization and Structural Stability of Gold Nanoparticle–Antibody Bioconjugates. **ACS Omega**, Washington, v. 4, n. 24, p. 20658–20667, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02276>. Acesso em: 28 nov. 2025.
- CASAS, J. *et al.* Replacement of cetyltrimethylammonium bromide bilayer on gold nanorod by alkanethiol crosslinker for enhanced plasmon resonance sensitivity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 49, p. 525–530, 2013. DOI: 10.1016/j.bios.2013.05.057. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3744215/>. Acesso em: 11 fev. 2026.
- CLOGSTON, J. D.; VERMILYA, A. NCL Method PCC-2: Measuring Zeta Potential of Nanoparticles. Version 1.2. In: National Cancer Institute's Nanotechnology Characterization Laboratory Assay Cascade Protocols. **Bethesda (MD): National Cancer Institute (US)**, 2005. Publicado em: abril 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK604914/>. Acesso em: 28 nov. 2025.
- COLANGELO, E. *et al.* Characterizing Self-Assembled Monolayers on Gold Nanorods: A Critical Review. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 1-12, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00587>. Acesso em: 28 nov. 2025.
- CONDE, J. *et al.* Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, art. 48, 2014. DOI: 10.3389/fchem.2014.00048.
- DAMANI, M. *et al.* Advances in Gold Nanoparticles: Synthesis, Functionalization Strategies, and Theranostic Applications in Cancer. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 41, n. 6, p. 1-56, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2024046712>. Acesso em: 28 nov. 2025.
- DEL CAÑO, R. *et al.* Effective replacement of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) by mercaptoalkanoic acids on gold nanorod (AuNR) surfaces in aqueous solutions. **Nanoscale**, Cambridge, v. 12, n. 2, p. 988–999, 2020. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/nr/c9nr09137h>. Acesso em: 28 nov. 2025.

DIKOVSKAYA, A. O. *et al.* The concentration limit of stability for individual gold nanorods in aqueous solutions during water evaporation. **Chemical Physics**, v. 586, p. 112399, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2024.112399>. Acesso em: 28 nov. 2025.

D'ONOFRIO, A. *et al.* Bioorthogonal chemistry approach for the theranostics of GRPR expressing cancers. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2569, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122569>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/12/2569>. Acesso em: 28 nov. 2025.

EL-SAYED, M. A. Small Is Different: Shape-, Size-, and Composition-Dependent Properties of Some Colloidal Semiconductor Nanocrystals. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 37, n. 5, p. 326–333, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/ar020204f>. Acesso em: 28 nov. 2025.

ERICKSON, H. P. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. **Biological Procedures Online**, v. 11, n. 32, 2009. DOI: 10.1007/s12575-009-9008-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x>. Acesso em: 24 fev. 2026.

ESPORRÍN-UBIETO, D. *et al.* Engineered plasmonic and fluorescent nanomaterials for biosensing, motion, imaging, and therapeutic applications. **Advanced Materials**, v. 37, n. 49, e2502171, 2025. DOI: 10.1002/adma.202502171. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40658895/>. Acesso em: 10 fev. 2026.

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Determination of the aspect ratio statistical distribution of gold nanorods in solution from a theoretical fit of the observed inhomogeneously broadened longitudinal plasmon resonance absorption spectrum. **Journal of Applied Physics**, v. 100, n. 4, art. 044324, 2006. DOI: 10.1063/1.2244520. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.2244520>. Acesso em: 28 nov. 2025.

FELLER, D. *et al.* Translational and rotational diffusion coefficients of gold nanorods functionalized with a high molecular weight, thermoresponsive ligand: a depolarized dynamic light scattering study. **Soft Matter**, v. 17, n. 10, p. 2873-2882, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1039/d1sm00077b>. Acesso em: 28 nov. 2025.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>. Acesso em: 11 fev. 2026.

FOTI, A. *et al.* A simple approach for CTAB-free and biofunctionalized gold nanorods to construct photothermal active nanomedicine for potential in vivo applications in cancer cells and scar treatment. **Frontiers in Materials**, v. 11, 2024. Artigo 1381176. DOI:

10.3389/fmats.2024.1381176. Disponível em:
<https://www.frontiersin.org/journals/materials/articles/10.3389/fmats.2024.1381176/full>.
 Acesso em: 28 nov. 2025.

GONÇALVES, K. B. **Validação e aplicação do uso da tecnologia Espectrômetro Portátil de Espalhamento de Luz em testes sorológica**: um novo teste de diagnóstico, baseado em fotônica e nanotecnologia, para detecção de anticorpos. 2022. Dissertação (Mestrado em Física) – Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2022. Disponível em:
https://lilith.fisica.ufmg.br/posgrad/Dissertacoes_Mestrado/decada2020/kennedy-goncalves/.
 Acesso em: 28 nov. 2025.

GUIDOTTI, G.; BRAMBILLA, L.; ROSSI, D. Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 4, p. 406–424, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.01.003>. Acesso em: 11 fev. 2026.

HAMMAMI, I. *et al.* Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. **Journal of King Saud University - Science**, Riyadh, v. 33, n. 7, p. 101560, 2021. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101560>. Acesso em: 28 nov. 2025.

HE, M. Q.; YU, Y. L.; WANG, J. H. Biomolecule-tailored assembly and morphology of gold nanoparticles for LSPR applications. **Nano Today**, v. 35, p. 101005, 2020. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.101005>. Acesso em: 28 nov. 2025.

JOHANSSON, P.; KÄLL, M.; ŠÍPOVÁ-JUNGOVÁ, H. Depolarized Forward Light Scattering for Subnanometer Precision in Biomolecular Layer Analysis on Gold Nanorods. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 16, n. 5, 2025. DOI:
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.4c02956>. Acesso em: 11 fev. 2026.

JUNQUEIRA, C. M. **Desenvolvimento e padronização de uma plataforma fotônica nanoestruturada para um teste do tipo POC (point of care) para a detecção de anticorpos**: aplicação no diagnóstico da COVID-19. 2024. Tese (Doutorado em Ciências) – Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2024.

KAYMAZ, S. V. *et al.* Nanomaterial surface modification toolkit: Principles, components, recipes, and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 322, 103035, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.103035>. Acesso em: 28 nov. 2025.

LAGE, A. C. P. *et al.* Synthesis and characterization of gold nanorods using the natural products resveratrol, gallic acid, and a purified fraction of *Stryphnodendron obovatum* by seedless method. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 16, 100473, 2021. DOI: 10.1016/j.enmm.2021.100473. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2215153221000489>. Acesso em: 11 fev. 2026.

LI, X. *et al.* The peptide functionalized inorganic nanoparticles for cancer-related bioanalytical and biomedical applications. **Molecules**, v. 26, n. 11, art. 3228, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26113228>. Acesso em: 11 fev. 2026.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 40, p. 8410-8426, 1999. DOI: 10.1021/jp9917648. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp9917648>. Acesso em: 10 fev. 2026.

LINK, S.; MOHAMED, M. B.; EL-SAYED, M. A. Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 16, p. 3073–3077, 1999. DOI: 10.1021/jp990183f. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp990183f>. Acesso em: 10 fev. 2026.

MALIK, S.; MUHAMMAD, K.; WAHEED, Y. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. **Molecules**, Basel, v. 28, n. 2, p. 661, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/2/661>. Acesso em: 28 nov. 2025.

MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. Zeta potential – An introduction in 30 minutes. **Technical Note**. 2015. Disponível em: <https://www.research.colostate.edu/wp-content/uploads/2018/11/ZetaPotential-Introduction-in-30min-Malvern.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2025.

MARQUES, F. C. *et al.* Characterization of 11-mercaptopundecanoic and 3-mercaptopropionic acids adsorbed on silver by surface-enhanced Raman scattering. **Vibrational Spectroscopy**, v. 98, p. 139-144, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.07.015>. Acesso em: 28 nov. 2025.

MIRANDA, B. *et al.* Recent Advances in the Fabrication and Functionalization of Flexible Optical Biosensors: Toward Smart Life-Sciences Applications. **Biosensors**, v. 11, n. 4, p. 107, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/bios11040107>. Acesso em: 28 nov. 2025.

MOURDIKOU DIS, S.; PALLARES, R. M.; THANH, N. T. K. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. **Nanoscale**, v. 10, p. 12871–12934, 2018. DOI: 10.1039/C8NR02278J. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/nr/c8nr02278j>. Acesso em: 11 fev. 2026.

NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. **Bioconjugate Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 123–130, 1995. DOI: 10.1021/bc00031a015.

NÉMETH, Z. *et al.* Quality by Design-Driven Zeta Potential Optimisation Study of Liposomes with Charge Imparting Membrane Additives. **Pharmaceutics**, Basel, v. 14, n. 9, p. 1798, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/9/1798>. Acesso em: 28 nov. 2025.

NIKOBAKHT, B.; EL-SAYED, M. A. Evidence for bilayer assembly of cationic surfactants on the surface of gold nanorods. **Langmuir**, v. 17, n. 20, p. 6368–6374, 2001. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la010530o>. Acesso em: 28 nov. 2025.

NIKOBAKHT, B.; EL-SAYED, M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 10, p. 1957–1962, 2003. DOI: 10.1021/cm020732l. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cm020732l>. Acesso em: 11 fev. 2026.

OYELERE, A. *et al.* Peptide-conjugated gold nanorods for nuclear targeting. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1490–1497, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bc070132i>. Acesso em: 11 fev. 2026.

PELLAS, V. *et al.* Gold Nanorods for LSPR Biosensing: Synthesis, Coating by Silica, and Bioanalytical Applications. **Biosensors**, v. 10, n. 10, p. 146, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/bios10100146>. Acesso em: 28 nov. 2025.

POCHAPSKI, D. J. *et al.* Zeta Potential and Colloidal Stability Predictions for Inorganic Nanoparticle Dispersions: Effects of Experimental Conditions and Electrokinetic Models on the Interpretation of Results. **Langmuir**, v. 37, n. 45, p. 13379–13389, 2021. DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c02056. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.langmuir.1c02056>. Acesso em: 11 fev. 2026.

ROACH, L. *et al.* Controlling the Optical Properties of Gold Nanorods in One-Pot Syntheses. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 126, n. 6, p. 3235–3243, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c10447>. Acesso em: 28 nov. 2025.

ROACH, L. *et al.* Morphological control of seedlessly-synthesised gold nanorods using binary surfactants. **Nanotechnology**, v. 29, n. 13, 135601, 2018. DOI: 10.1088/1361-6528/aaa99d. Disponível em: <https://eprints.whiterose.ac.uk/id/eprint/126646/1/Morphological%20Control%20of%20Seedlessly%20Synthesised%20Gold%20Nanorods%20using%20Binary%20Surfactants.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2026.

SCARABELLI, L. *et al.* A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 6, n. 21, p. 4270–4279, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.5b02123>. Acesso em: 28 nov. 2025.

SCHWEIZERHOF, S. *et al.* Diffusion of gold nanorods functionalized with thermoresponsive polymer brushes. **Langmuir**, v. 34, n. 27, p. 8031–8041, 2018. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b01289. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7434011/>. Acesso em: 28 nov. 2025.

SEKIZAWA, Y. *et al.* Reversible changes in the orientation of gold nanorod arrays on polymer brushes. **Nanoscale Advances**, v. 2, n. 9, p. 3798–3803, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1039/d0na00315h>. Acesso em: 28 nov. 2025.

SELLECK CHEMICALS. 11-Mercaptoundecanoic acid. Houston: Selleck Chemicals. Disponível em: <https://www.selleckchem.com/products/11-mercaptoundecanoic-acid.html>. Acesso em: 14 mar. 2026.

TAN, G. *et al.* Conjugation of Polymer-Coated Gold Nanoparticles with Antibodies-Synthesis and Characterization. **Nanomaterials**, v. 5, n. 3, p. 1297–1316, 2015. DOI: 10.3390/nano5031297. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/5/3/1297>. Acesso em: 11 fev. 2026.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Varioskan LUX Multimode Microplate Reader: Technical Manual. Rev. 2.3. **Singapore: Thermo Fisher Scientific**, 2023. Disponível em: <https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LCD/manuals/Varioskan-LUX-Technical-Manual.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2026.

TOH, Y. R. *et al.* Induced pH-dependent shift by local surface plasmon resonance of 11-mercaptoundecanoic acid modified gold nanorods. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 103, p. 1–8, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-103>. Acesso em: 28 nov. 2025.

TORSKAL. Understanding the Stability of Gold Nanoparticles: Key Concepts and Metrics. 2025. Disponível em: <https://www.torskal.com/understanding-the-stability-of-gold-nanoparticles-key-concepts-and-metrics/>. Acesso em: 28 nov. 2025.

UTTER, E.; FENDLER, J. H. Exploitation of localized surface plasmon resonance. **Advanced Materials**, v. 16, n. 19, p. 1685–1706, 2004. DOI: 10.1002/adma.200400271. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.200400271>. Acesso em: 10 fev. 2026.

VLIEGHE, P. *et al.* Synthetic therapeutic peptides: science and market. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 1–2, p. 40–56, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.10.009>. Acesso em: 11 fev. 2026.

WANG, S. *et al.* Three-photon luminescence of gold nanorods and its applications for high contrast tissue and deep in vivo brain imaging. **Theranostics**, v. 5, n. 3, p. 251–266, 2015. DOI: 10.7150/thno.10396. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4279189/>. Acesso em: 10 fev. 2026.

WEI, M. Z. *et al.* Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods at Low Cetyltrimethylammonium Bromide Concentration. **ACS Omega**, Washington, v. 6, n. 14, p. 9535–9543, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8028147/>. Acesso em: 28 nov. 2025.

WILLETS, K. A.; VAN DUYNE, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, Palo Alto, v. 58, n. 1, p. 267–297, 2007. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607>. Acesso em: 28 nov. 2025.

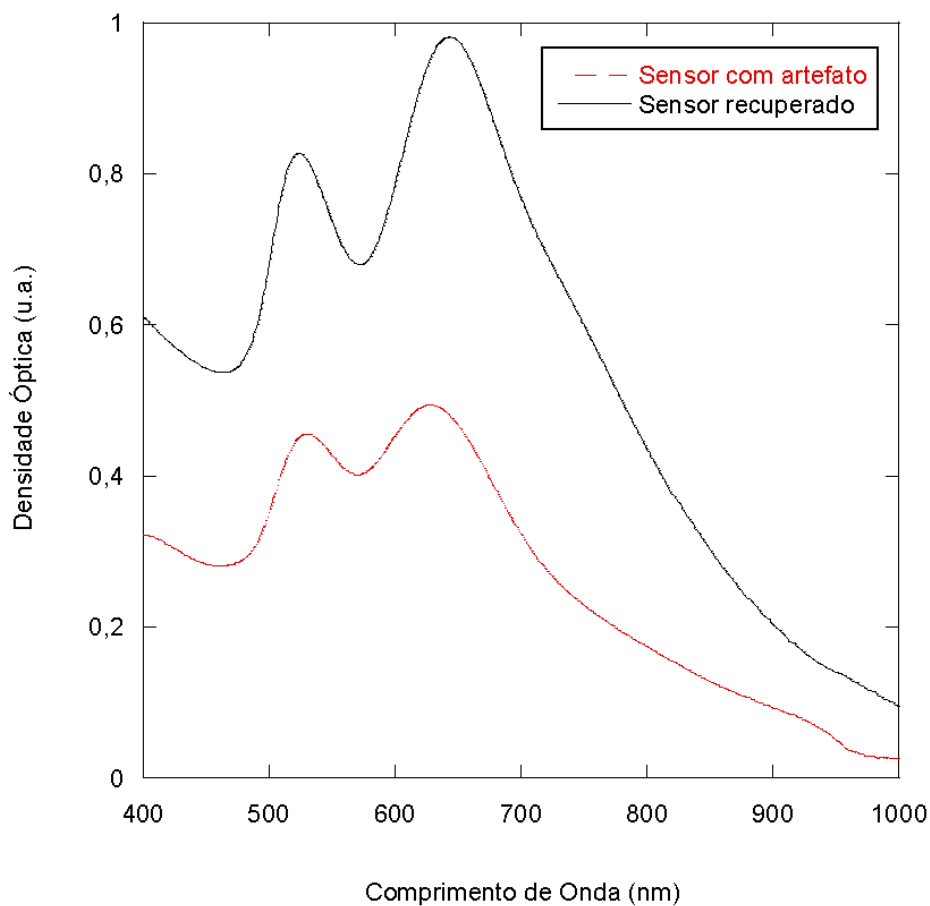
XUE, B. *et al.* The coupling of rotational and translational dynamics for rapid diffusion of nanorods in macromolecular networks. **Nature Communications**, v. 15, p. 6502, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50859-z>. Acesso em: 28 nov. 2025.

ZHENG, J. *et al.* Gold Nanorods: The Most Versatile Plasmonic Nanoparticles. **Chemical Reviews**, Washington, v. 121, n. 21, p. 13342–13414, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00422>. Acesso em: 28 nov. 2025.

APÊNDICES

APÊNDICE A: INVESTIGAÇÃO DE ARTEFATOS TÉRMICOS NA CONDIÇÃO 1:1

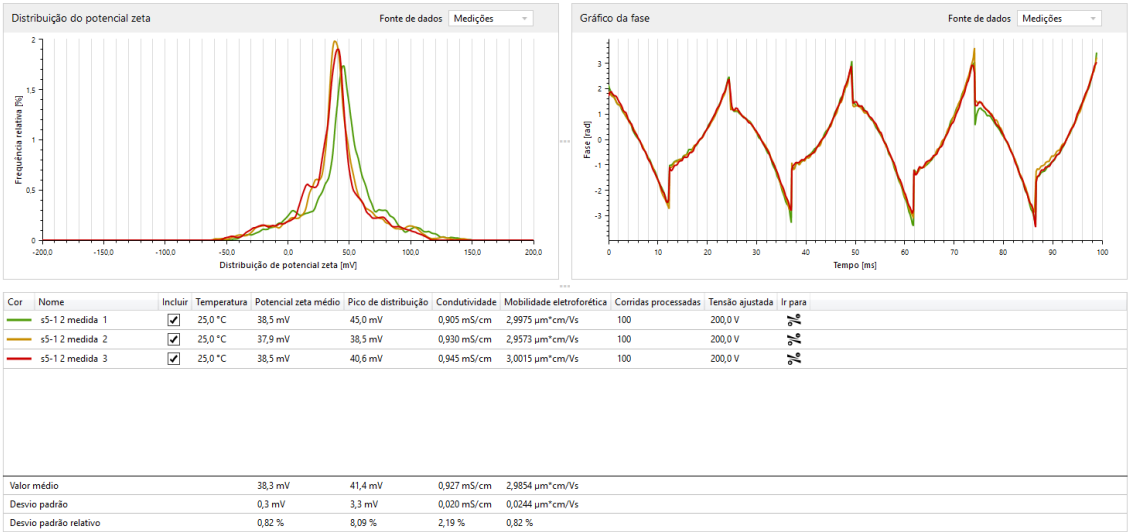
Figura A1 - Estudo de estabilidade temporal da condição 1:1 frente a variações térmicas. Comparação entre o espectro de extinção obtido sob refrigeração a 4°C (linha tracejada vermelha), evidenciando o artefato de leitura causado pela cristalização do surfactante (queda de intensidade e deslocamento anômalo para 627 nm), e o espectro da mesma amostra após equilíbrio térmico em temperatura ambiente (linha sólida preta), demonstrando a recuperação da banda LSPR característica em 641 nm e a integridade dos nanobastões.



Fonte: O autor (2025).

APÊNDICE B: PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO DE POTENCIAL ZETA DO NANOVETOR OTIMIZADO

Figura B1 - Relatório de análise de potencial zeta obtido para o nanovetor funcionalizado na razão 5:1 (AuNR-MUA-Peptídeo, ensaio 2). O gráfico à esquerda exibe um perfil de distribuição monomodal estreito, com pico médio em +38,3 mV, confirmando a estabilidade da condição selecionada e a ausência de agregados secundários. A tabela inferior detalha a consistência entre as triplicatas técnicas realizadas.



Fonte: O autor (2025).