



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Lucas Puhl dos Santos

**IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO IMPRESSO EM 3D GALVANIZADO PARA
DETERMINAÇÃO DE TNF- α : UM BIOMARCADOR DE DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Florianópolis

2026

Lucas Puhl dos Santos

**IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO IMPRESSO EM 3D GALVANIZADO PARA
DETERMINAÇÃO DE TNF- α : UM BIOMARCADOR DE DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof.^a Iolanda da Cruz Vieira, Dr.^a

Florianópolis

2026

Santos, Lucas Puhl dos

Imunossensor eletroquímico impresso em 3D galvanizado para determinação de TNF-alfa: um biomarcador de doença inflamatória intestinal /Lucas Puhl dos Santos ; orientadora, Iolanda da Cruz Vieira, 2026.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2026.

Inclui referências.

1. Química. 2. Química Analítica. 3. Imunossensor Eletroquímico. 4. Impressão 3D. 5. Doença Inflamatória Intestinal. I. Vieira, Iolanda da Cruz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Lucas Puhl dos Santos

Imunossensor eletroquímico impresso em 3D galvanizado para determinação de TNF- α : um biomarcador de doença inflamatória intestinal

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 01 de dezembro de 2025 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Maria Luisa Sartorelli, Dr.^a.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Diego Galvan, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Tatiane de Andrade Maranhão, Dr.^a.

Universidade Federal de Santa Catarina

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.^a Adriana Passarella Gerola, Dr.^a

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Química

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.^a Iolanda da Cruz Vieira, Dr.^a

Orientadora

Florianópolis, 2026

*À minha mãe, Luciana, aos meus avós, Armino e
Aparecida e a todos que me mostraram o amor.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo enormemente à minha mãe Luciana, meus avós Armindo e Aparecida, meu pai Claudiomir e meu irmão João Pedro, sem o amor, torcida e apoio recebido de vocês seria impossível ter desenvolvido não só este projeto, mas tudo que realizei até hoje.

Agradeço à professora Iolanda, pela oportunidade de integrar um grupo de pesquisa tão comprometido desde a iniciação científica até aqui.

Agradeço muito também aos pós-doutorandos Edson e João por me ensinarem a fazer ciência de qualidade, por me ensinarem a ser um profissional e não menos importante pela amizade e confiança.

Minha gratidão também aos meus colegas de LaBios: Eduardo, Luan, Guinther, Nathália, Diogo, Gabrielle, Thaynara, Larissa, Sofia, Eloísa e Lucas. Além de tudo que aprendi com vocês, vocês também tornaram essa jornada mais leve.

Minha profunda gratidão aos amigos que a Química me deu durante todo esse tempo: Cinthia, Kaliany, Carol, Voigt e Bia. Vocês foram e continuam sendo família nessa cidade, a caminhada até aqui fez sentido por conta de vocês.

Aos amigos que trago de mais longa data: Paulo Luciano e Kamille, minha eterna gratidão pela torcida e todo amor que me deram durante toda a vida. Estarei sempre torcendo e amando vocês.

Agradeço também, ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME-UFSC) e a Dr^a. Juliana Priscila Dreyer pelas imagens de microscopia. À Central de Análises do Departamento de Engenharia Química da UFSC pelas medidas de ângulo de contato. Ao Laboratório de Plasma, Filmes e Superfícies da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), campus Joinville pelas análises de XPS.

Gratidão aos órgãos de fomento que tornaram a realização do projeto possível: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Processo 408381/2023-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC).

Por fim agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Química, ao Programa de Graduação em Química, e ao Departamento de Química da UFSC pelos anos prestados a fornecer ensino, pesquisa e extensão de maneira pública, gratuita e de qualidade.

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”
(Antoine de Saint-Exupéry, 1943)

RESUMO

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória central na fisiopatologia das doenças inflamatórias intestinais e de outras condições crônicas de inflamação. Sua quantificação em amostras clínicas apresenta grande relevância para o monitoramento da atividade inflamatória e da resposta a terapias baseadas em anticorpos monoclonais anti-TNF- α , como o infliximabe. Nesse contexto, o desenvolvimento de plataformas analíticas sensíveis, seletivas e de baixo custo é essencial para ampliar a acessibilidade a métodos de acompanhamento clínico. Neste trabalho, foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico miniaturizado, impresso em 3D e galvanizado com ouro para a determinação do antígeno TNF- α em soro sanguíneo humano. O dispositivo foi produzido utilizando três tipos de filamentos: Cu/PLA-CB, aplicado na construção do eletrodo de trabalho, PLA-CB para o contra-eletrodo e o eletrodo de pseudo-referência, e o filamento de ABS, empregado como suporte estrutural. Inicialmente, os sensores foram submetidos à ativação eletroquímica em solução de KOH 1,0 mol L⁻¹, sob aplicação de potencial de +1,8 V por 900 s, a fim de expor os sítios condutores de Cu e CB presentes na matriz polimérica. Em seguida, realizou-se a galvanização da superfície do eletrodo de trabalho com solução de H₂AuCl₄ 5,0 mmol L⁻¹ por 5 min, processo espontâneo possibilitado pela diferença de potenciais padrão entre Cu e Au. A deposição de Au viabilizou a formação subsequente de monocamadas auto organizadas (SAMs) a partir do ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA), que serviram como intermediário para a imobilização covalente do anticorpo infliximabe por meio do sistema EDC/NHS. As caracterizações físico-químicas e eletroquímicas, realizadas por SEM, XPS, EIS e voltametria cíclica, confirmaram a deposição uniforme de Au, a redução da resistência à transferência de carga e a eficiência da funcionalização da superfície, assegurando maior estabilidade e seletividade para o reconhecimento biomolecular. Na etapa de otimização experimental, foram avaliados parâmetros das técnicas eletroanalíticas, sendo a voltametria de pulso diferencial (DPV) selecionada como a mais adequada. As condições otimizadas incluíram velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 240 mV, tempo de pulso de 10 ms e incremento de 10 mV, resultando em maior intensidade e reprodutibilidade das respostas de corrente. A curva de calibração obtida para concentrações de TNF- α entre 0,15 e 10 pg mL⁻¹ apresentou correlação linear com coeficiente de correlação de 0,999. O método demonstrou alta sensibilidade (0,95 μ A mL pg⁻¹) e limites de detecção e quantificação de 0,04 e 0,15 pg mL⁻¹, respectivamente. Esses parâmetros permitem quantificar esse biomarcador dentro da faixa considerada normal em indivíduos saudáveis (0,20–8,0 pg mL⁻¹). O imunossensor demonstrou elevada precisão, com valores de RSD de 3,0% em ensaios intradia e 14% em ensaios interdias, ambos inferiores aos limites de Horwitz, além de alta seletividade frente a potenciais interferentes do soro, registrando variações de corrente inferiores a 10%. Nos ensaios de adição e recuperação em matriz de soro sanguíneo humano, as taxas variaram entre 97 e 117%, compatíveis com os critérios de aceitação da literatura para concentrações ultrabaixas, que indicam faixa de 40 a 120% de recuperação. Os resultados obtidos evidenciam o potencial do imunossensor eletroquímico impresso em 3D galvanizado como uma plataforma analítica de baixo custo, reprodutível e altamente sensível, apta para aplicação em análises clínicas voltadas ao monitoramento de TNF- α .

Palavras-chave: Imunossensor eletroquímico; Impressão 3D; Doença Inflamatória Intestinal; Galvanização.

ABSTRACT

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is a pro-inflammatory cytokine that plays a central role in the pathophysiology of inflammatory bowel diseases and other chronic inflammatory conditions. Its quantification in clinical samples is highly relevant for monitoring inflammatory activity and the response to therapies based on anti-TNF- α monoclonal antibodies, such as infliximab. In this context, the development of sensitive, selective, and low-cost analytical platforms is essential to broaden access to clinical monitoring methods. In this work, a miniaturized electrochemical immunosensor, fabricated by 3D printing and gold electroplating, was developed for the determination of the TNF- α antigen in human blood serum. The device was produced using three types of filaments: Cu/PLA-CB, employed in the construction of the working electrode; PLA-CB for the counter electrode and pseudo-reference electrode; and ABS filament, used as the structural support. Initially, the sensors were subjected to electrochemical activation in 1.0 mol L⁻¹ KOH solution under an applied potential of +1.8 V for 900 s, in order to expose the conductive sites of Cu and carbon black (CB) present in the polymeric matrix. Subsequently, the surface of the working electrode was electroplated with a 5.0 mmol L⁻¹ HAuCl₄ solution for 5 min, a spontaneous process enabled by the difference in standard potentials between Cu and Au. The deposition of Au enabled the subsequent formation of self assembled monolayers (SAMs) from 11-mercaptopundecanoic acid (11-MUA), which served as an intermediate for the covalent immobilization of the infliximab antibody via the EDC/NHS coupling system. Physicochemical and electrochemical characterizations performed by SEM, XPS, EIS, and cyclic voltammetry confirmed the uniform deposition of Au, the reduction in charge-transfer resistance, and the efficiency of surface functionalization, ensuring greater stability and selectivity for biomolecular recognition. During the experimental optimization stage, parameters of electroanalytical techniques were evaluated, and differential pulse voltammetry (DPV) was selected as the most suitable method. The optimized conditions included a scan rate of 50 mV s⁻¹, pulse amplitude of 240 mV, pulse time of 10 ms, and step increment of 10 mV, resulting in higher current intensity and improved reproducibility of the responses. The calibration curve obtained for TNF- α concentrations ranging from 0.15 to 10 pg mL⁻¹ exhibited linear correlation with a correlation coefficient of 0.999. The method demonstrated high sensitivity (0.95 μ A mL pg⁻¹) and limits of detection and quantification of 0.04 and 0.15 pg mL⁻¹, respectively. These parameters allow quantification of this biomarker within the range considered normal in healthy individuals (0.20–8.0 pg mL⁻¹). The immunosensor exhibited high precision, with relative standard deviation (RSD) values of 3.0% for intraday assays and 14% for interday assays, both below the Horwitz limits, as well as high selectivity toward potential serum interferences, with current variations below 10%. In spike and-recovery assays performed in human blood serum matrix, recovery rates ranged from 97 to 117%, consistent with literature acceptance criteria for ultralow concentrations, which indicate a recovery range of 40–120%. The results demonstrate the potential of the gold-electroplated, 3D-printed electrochemical immunosensor as a low-cost, reproducible, and highly sensitive analytical platform suitable for clinical analyses aimed at TNF- α monitoring.

Keywords: Electrochemical immunosensor; 3D-printing; Inflammatory Bowel Disease; Galvanic deposition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do IFX.	23
Figura 2. Representação esquemática do método ELISA.....	24
Figura 3. Representação esquemática de um biossensor genérico.	25
Figura 4. Potenciostato <i>Sensit Smart</i> acoplado a aparelho <i>smartphone</i>	27
Figura 5. Processo reacional do par EDC/NHS.....	29
Figura 6. Modelo de sensor com arranjo eletrodico integrado à plataforma polimérica produzido via FFF.....	31
Figura 7. Modelo e medidas do sensor 3D construído através do <i>software</i> Tinkercad (Autodesk, EUA).	36
Figura 8. Representação esquemática do processo de construção do imunossensor.....	38
Figura 9. Voltamogramas cíclicos para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 5,0 mmol L ⁻¹ em solução tampão fosfato 0,01 mol L ⁻¹ (pH 7,4) ($\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$) utilizando sensor impresso em 3D à base de Cu/PLA-CB (a) antes e (b) após passar pelo processo de ativação eletroquímica com KOH 1,0 mol L ⁻¹ , potencial aplicado em +1,8 V durante 900s.	42
Figura 10. Diagramas de Nyquist utilizando $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ para (a) Cu/PLA-CB sem ativação e (b) Cu/PLA-CB ativado eletroquimicamente. <i>Inset:</i> Circuito de Randles proposto para o sistema, onde R_{ct} representa a resistência à transferência de carga, R_s a resistência da solução, CPE é o elemento de fase constante (<i>Constant Phase Element</i> - CPE) e Z_w é a impedância de Warburg.....	43
Figura 11. (A) Voltamogramas cíclicos para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 5,0 mmol L ⁻¹ em solução tampão fosfato 0,01 mol L ⁻¹ (pH 7,4) ($\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$) sobre Cu/PLA-CB galvanizado com Au (Au-Cu/PLA-CB) nas seguintes concentrações de H ₂ AuCl ₄ : (a) 0,0, (b) 2,0, (c) 5,0, (d) 8,0 e (e) 10,0 mmol L ⁻¹ . Gráficos de barra contendo os dados de correntes de pico (B) catódicas e (C) anódicas.....	44
Figura 12. (A) Voltamogramas cíclicos para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 5,0 mmol L ⁻¹ em solução tampão fosfato 0,01 mol L ⁻¹ (pH 7,4) ($\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$) sobre Cu/PLA-CB galvanizado com Au (Au-Cu/PLA-CB) nos tempos: (a) 1, (b) 3, (c) 5, (d) 10 e (e) 15 min. Gráficos de barra contendo os dados de correntes de pico (B) catódicas e (C) anódicas.	45
Figura 13. Diagramas de Nyquist utilizando uma solução de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ sobre Au-Cu/PLA-CB em condições de (A) concentrações de H ₂ AuCl ₄ de: (a) 2,0, (b) 5,0, (c) 8,0 e (d) 10 mmol L ⁻¹ com tempo fixo de 5 min de reação e (B) tempos de reação de (a) 1, (b) 3, (c) 5 e (d) 15 min com concentração de 5,0 mmol L ⁻¹ . Gráficos de barra	

representando os valores de R_{ct} obtidos para (B) diferentes concentrações de HAuCl_4 e (C) diferentes tempos de reação.....	46
Figura 14. Imagens de SEM da superfície de trabalho dos sensores Au-Cu/PLA-CB galvanizados com: (A) 0,0, (B) 2,0, (C) 5,0 e (D) 10,0 mmol L^{-1} de HAuCl_4 durante 5 min.	47
Figura 15. Imagens de SEM da superfície de trabalho dos sensores Au-Cu/PLA-CB galvanizados durante: (A) 1, (B) 3 e (C) 15 min com HAuCl_4 5,0 mmol L^{-1}	48
Figura 16. (A) Espectro Survey e espectros de XPS de alta resolução para (B) C 1s, (C) O 1s, (D) Cu 2p e (E) Au 4f para o WE após galvanização com solução de HAuCl_4 5 mmol L^{-1} durante 5 min.	49
Figura 17. (A) Voltamogramas cíclicos para soluções 5,0 mmol L^{-1} de: (a) $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, (b) A.M, (c) Fc-CHO e (d) $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 7,4). ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$); (B) Gráfico de barras representando as respostas de corrente anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}). ...	50
Figura 18. (A) Voltamogramas para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 0,05 mmol L^{-1} em solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 7,4) utilizando as técnicas de: (a) SWV, (b) LSV e (c) DPV; (B) Gráfico de barras representando as correntes de pico obtidas para cada uma das técnicas avaliadas.	51
Figura 19. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 0,05 mmol L^{-1} em solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 7,4) para v : (a) 30, (b) 40, (c) 50, (d) 60 e (e) 70 mV s^{-1} ; (B) Gráfico de barras representando as intensidades das correntes de pico registradas para cada uma das v	52
Figura 20. (A) Voltamogramas de pulso diferencial realizados em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 0,05 mmol L^{-1} em solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 7,4) nas seguintes E_{pulso} : (a) 10, (b) 30, (c) 50, (d) 80, (e) 110 e (f) 140 mV; (B) Voltamogramas de pulso diferencial realizados em 0,05 mmol L^{-1} $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ em tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 7,4) nas seguintes E_{pulso} : (a) 200, (b) 220, (c) 240, (d) 260 e (e) 280 mV; (C) Gráfico de barras construído a partir da aplicação da função desejabilidade aos dados obtidos de (A) e (B).	53
Figura 21. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 0,05 mmol L^{-1} em solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 7,4) nos seguintes t_{pulso} : (a) 5, (b) 10, (c) 15, (d) 20, (e) 30 e (f) 40 mV s^{-1} ; (B) Gráfico de barras representando as correntes de pico obtidas para cada um dos t_{pulso}	54
Figura 22. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 0,05 mmol L^{-1} em solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 7,4) nos seguintes ΔE : (a) 2, (b) 5, (c) 10, (d) 15 e (e) 20 mV ; (B) Gráfico de barras representando as correntes de pico obtidas para cada um dos ΔE	54

Figura 23. (A) Representação do processo de imobilização do 11-MUA; (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nos seguintes tempos de imobilização de 11-MUA: (a) 0 (Voltamograma controle), (b) 1, (c) 5, (d) 12 e (e) 24 h; (C) Gráfico de barras representando o decréscimo de corrente (ΔI) registrado para cada tempo de imobilização em relação à corrente registrada no voltamograma controle; (D) Gráficos de Nyquist obtidos para cada tempo de imobilização: (a) 0 (controle), (b) 1, (c) 5, (d) 12 e (e) 24 h; (E) Gráfico de barras representando os valores de R_{ct} observados em cada tempo de imobilização. 56

Figura 24. Imagens obtidas com goniômetro para gota de água sobre a superfície do eletrodo (A) Galvanizado e (B) com a SAM imobilizada; (C) Gráfico de barras representando os valores de ângulo de contato obtidos para cada um dos eletrodos de trabalho. 57

Figura 25. (A) Representação do processo de reação com EDC/NHS; (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nos seguintes tempos de reação com EDC/NHS: (a) 0 (Voltamograma controle), (b) 15, (c) 30, (d) 60 e (e) 90 min; (C) Gráfico de barras representando o decréscimo de corrente (ΔI) registrado para cada tempo de reação em relação à corrente registrada no voltamograma controle; (D) Gráficos de Nyquist obtidos para cada tempo de reação: (a) 0 (controle), (b) 15, (c) 30, (d) 60 e (e) 90 min; (E) Gráfico de barras representando os valores de R_{ct} observados em cada tempo de reação. 58

Figura 26. (A) Representação esquemática da imobilização do IFX; (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nos seguintes tempos de imobilização do IFX: (a) 0 (Voltamograma controle), (b) 30, (c) 60, (d) 90 e (e) 120 min; (C) Gráfico de barras representando os valores de ΔI obtidos a partir de (B); (D) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nas seguintes concentrações de IFX: (a) 0 (Voltamograma controle), (b) 0,05, (c) 0,1, (d) 0,5, (e) 1,0 e (f) 1,5 mg mL^{-1} ; (E) Gráfico de barras representando os valores de ΔI obtidos a partir de (D). 60

Figura 27. (A) Gráficos de Nyquist obtidos para: (a) 30, (b) 60, (c) 90 e (d) 120 min. de imobilização de IFX. (B) Gráficos de Nyquist obtidos para: (a) 0,05, (b) 0,1, (c) 0,5, (d) 1,0 e (e) 1,5 mg L^{-1} de IFX. (C) Gráfico de barras representando os valores de R_{ct} observados em cada tempo de imobilização de IFX. (D) Gráfico de barras representando os valores de R_{ct} observados em cada concentração de IFX. 61

Figura 28. (A) Representação esquemática da imobilização da BSA; (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nos seguintes tempos de imobilização da BSA: (a) 0 (Voltamograma controle), (b) 15, (c) 30, (d) 45 e (e) 60 min; (C) Gráfico de barras representando o decréscimo de corrente (ΔI) registrado para cada tempo de reação em relação à corrente registrada no voltamograma controle; (D) Gráficos de Nyquist obtidos para cada tempo de imobilização: (a) 15, (b) 30, (c) 45 e (d) 60 min ; (E) Gráfico de barras representando os valores de R_{ct} observados em cada tempo de imobilização. 62

Figura 29. (A) Representação esquemática da formação do imunocomplexo IFX-TNF- α ; (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nos seguintes tempos de incubação de 5 pg mL^{-1} de TNF- α : (a) 0 (Voltamograma controle), (b) 10, (c) 20, (d) 30 e (e) 50 min; (C) Gráfico de barras representando o decréscimo de corrente (ΔI) registrado para cada tempo de reação em relação à corrente registrada no voltamograma controle; (D) Gráficos de Nyquist obtidos para cada tempo de incubação: (a) 10, (b) 20, (c) 30 e (d) 50 min; (E) Gráfico de barras representando os valores de R_{ct} observados em cada tempo de incubação..... 64

Figura 30. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) para as seguintes concentrações de TNF- α : (a) 0 (controle), (b) 0,15, (c) 1, (d) 2, (e) 5, (f) 8 e (g) 10 pg mL^{-1} ; (B) Curva de calibração para TNF- α ($n = 3$)..... 65

Figura 31. (A) Voltamogramas de pulso diferencial btidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) utilizando 5 pg mL^{-1} de TNF- α para 5 sensores diferentes em um mesmo dia; (B) Gráfico de barras representando os resultados de ΔI obtidos a partir de (A); (C) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) utilizando 5 pg mL^{-1} de TNF- α para medidas realizadas ao longo de 5 dias diferentes; (D) Gráfico de barras representando os resultados de ΔI obtidos a partir de (C). 66

Figura 32. Gráfico de barras representando a correlação $\Delta I/\Delta I_0$ para diferentes interferentes na proporção de 1:1000..... 67

Figura 33. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em soro sanguíneo humano diluído 10 vezes em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) para adições de TNF- α de: (a) Voltamograma Controle, (b) 0,5, (c) 1,0, (d) 2,0, (e) 3,0, (f) 5,0,

(g) 5,5, (h) 6,5, (i) 7,5, (j) 8,0, (k) 8,5, (l) 9,5, (m) 10 pg mL^{-1} ; Gráficos de recuperação para cada um dos 3 níveis (N1 – 0,5 pg mL^{-1} , N2 – 5,0 pg mL^{-1} e N3 – 8,0 pg mL^{-1})...... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do ensaio de adição e recuperação de TNF- α em amostra de soro sanguíneo humano.	69
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 11-MUA** (do inglês, *11-mercaptoundecanoic acid*) – ácido 11-mercaptoundecanóico;
- ABS** (do inglês, *acrylonitrile butadiene styrene*) – acrilonitrila butadieno estireno;
- AM** – azul de metileno;
- AU** – ácido úrico;
- BSA** (do inglês, *Bovine Serum Albumine*) – albumina do soro bovino;
- CB** – Negro de fumo (do inglês, *carbon black*);
- CD** (do inglês, *Crohn's Disease*) – Doença de Crohn;
- CE** (do inglês, *counter electrode*) – contra-eletrodo;
- Cre** – creatinina;
- CV** (do inglês, *cyclic voltammetry*) – voltametria cíclica;
- CBA** (do inglês, *Cytometric Bead Array*) – citometria baseada em microesferas;
- CPE** (do inglês, *Constant Phase Element*) – elemento de fase constante;
- CLIA** (do inglês, *Chemiluminescent Immunoassay*) – imunoenensaio de quimioluminescência;
- DPV** (do inglês, *differential pulse voltammetry*) – voltametria de pulso diferencial;
- E** – potencial;
- EIS** (do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy*) – espectroscopia de impedância eletroquímica;
- EDC/NHS** - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida;
- ELISA** (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) – ensaio de imunoabsorção enzimático;
- Fab** – região variável;
- Fc** – região constante;
- FFF** (do inglês, *Fused Filament Fabrication*) – Fabricação com Filamento Fundido;
- Fc-CHO** – ferrocenocarboxialdeído;
- Gli** – glicose;
- Hb** - hemoglobina
- I** – corrente;
- I_{pa}** – corrente de pico anódica;
- I_{pc}** – corrente de pico catódica;
- IL** – interleucina;
- IBD** (do inglês, *Inflammatory Bowel Disease*) – Doença inflamatória intestinal;
- IFX** – Infliximabe;

IgG – imunoglobulina;

LOD (do inglês, *limit of detection*) – limite de detecção;

LOQ (do inglês, *limit of quantification*) – limite de quantificação;

mAB (do inglês, *monoclonal antibody*) – anticorpo monoclonal;

PLA (do inglês, *polylactic acid*) – ácido polilático;

PoC (do inglês, *Point-of-Care*) – à beira do leito;

p-RE (do inglês, *pseudo-reference electrode*) – eletrodo de pseudo-referência;

R_{CT} (do inglês, *resistance to charge transfer*) – resistência a transferência de carga;

R_s (do inglês, *solution resistance*) – resistência da solução;

RSD (do inglês *relative standard deviation*) – desvio padrão relativo;

SD (do inglês, *standard deviation*) – desvio padrão;

SAM (do inglês, *self-assembled monolayer*) – monocamada auto-organizada;

SEM (do inglês, *scanning electron microscopy*) – microscopia eletrônica de varredura;

SUS – Sistema Único de Saúde;

SWV (do inglês, *square wave voltammetry*) – voltametria de onda quadrada;

SPCE (do inglês, *Screen-Printed Carbon Electrodes*) - eletrodos serigrafados à base de carbono;

TNF- α (do inglês, *tumor necrosis factor alpha*) – fator de necrose tumoral alfa

UC (do inglês, *Ulcerative Colitis*) – colite ulcerativa;

XPS (do inglês *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) – espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X;

Z_w – Impedância de Warburg;

WE (do inglês, *working electrode*) – eletrodo de trabalho

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	20
2.2	TNF- α	21
2.2.1	Infliximabe.....	23
2.3	MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE TNF- α	23
2.4	BIOSSENSORES.....	25
2.4.1	Imunossensores Eletroquímicos	26
2.4.1.1	<i>Imunossensores eletroquímicos impressos em 3D e galvanização</i>	<i>30</i>
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	REAGENTE E SOLUÇÕES	35
4.2	IMPRESSÃO E ATIVAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS SENSORES.....	35
4.3	GALVANIZAÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO	36
4.4	CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR	36
4.4.1	Modificação da superfície do WE com a SAM e EDC/NHS	36
4.4.2	Imobilização do anticorpo (IFX) e da albumina do soro bovino	37
4.4.3	Incubação do antígeno (TNF-α).....	37
4.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SENSORES.....	38
4.6	ANÁLISES ELETROQUÍMICAS.....	39
4.7	PREPARO DA AMOSTRA	39
4.8	CRITÉRIOS DE OTIMIZAÇÃO E TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	
	40	
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1	ATIVAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS SENSORES	41
5.2	GALVANIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO WE.....	43
5.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS SUPERFÍCIES DOS SENSORES	
	GALVANIZADOS	46
5.4	SELEÇÃO DA Sonda REDOX.....	50

5.5	SELEÇÃO E OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA VOLTAMÉTRICA.....	51
5.6	CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR	55
5.6.1	Modificação da superfície do WE com a SAM.....	55
5.6.2	Formação do par EDC/NHS	57
5.6.3	Imobilização do anti-TNF-α, Infliximabe.....	59
5.6.4	Imobilização da albumina do soro bovino (BSA).....	61
5.6.5	Incubação do antígeno, TNF-α	63
5.7	CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O TNF- α	64
5.8	REPETIBILIDADE E SELETIVIDADE	65
5.9	DETERMINAÇÃO DE TNF- α	67
6	CONCLUSÃO	70
7	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (do inglês, *Inflammatory Bowel Diseases* - IBDs), como a Doença de Crohn e a (reto)colite ulcerativa, estão associadas à inflamação crônica do trato gastrointestinal, sendo o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), uma citocina chave envolvida na fisiopatologia dessas condições. Neste sentido, a quantificação de TNF- α em amostras clínicas é fundamental para o monitoramento da atividade inflamatória e da resposta terapêutica. Dentre os tratamentos disponíveis, destaca-se o uso do infliximabe (IFX), um anticorpo monoclonal anti-TNF- α que, além de sua função terapêutica, pode ser empregado para formação de camada de bioreconhecimento em plataformas analíticas.

Métodos tradicionais de quantificação, como o ensaio de imunoabsorção enzimático (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA), embora eficazes, apresentam limitações quanto ao custo, tempo de análise e necessidade de infraestrutura laboratorial. Nesse contexto, surge a busca por alternativas capazes de fornecer resultados rápidos, confiáveis e de menor custo. Imunossensores eletroquímicos vêm ganhando destaque justamente por sua alta sensibilidade, seletividade, potencial para miniaturização e uso em dispositivos de análise à beira do leito (do inglês, *point-of-care*, PoC). Imunossensores *label-free*, baseados na detecção direta da interação antígeno-anticorpo pela supressão da corrente proveniente de uma sonda redox, dependem de superfícies funcionalizadas com estabilidade e reprodutibilidade, comumente obtidas por monocamadas auto-organizadas (do inglês, *Self-Assembled Monolayers* – SAMs) ativadas com EDC/NHS sobre eletrodos de ouro.

Entretanto, o alto custo dos eletrodos metálicos, como o eletrodo de ouro, limita sua aplicabilidade em larga escala. Neste cenário, a impressão 3D por fabricação por filamento fundido (do inglês, *Fused Filament Fabrication* - FFF) surge como uma alternativa promissora para a fabricação de eletrodos de baixo custo e geometrias personalizadas. Filamentos condutores de ácido poli-lático (do inglês, *polylactic acid* – PLA) contendo cobre em sua composição, embora acessíveis, ainda apresentam condutividade superficial limitada, requerendo condicionamento ou modificações adicionais. Neste campo, a deposição de ouro por galvanização, mostra-se uma estratégia promissora para combinar a versatilidade da manufatura aditiva com as propriedades eletroquímicas do ouro, viabilizando o desenvolvimento de imunossensores mais acessíveis, funcionais e adequados ao monitoramento clínico do TNF- α .

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

As IBDs correspondem a um grupo de doenças caracterizadas pela inflamação crônica de tecidos do trato intestinal [1–3]. Essa inflamação recorrente dos tecidos pode levar a outras complicações aos pacientes portadores, como fístulas, fissuras, úlceras e até mesmo quadros que evoluem para tumores [1,2,4,5]. Dentre as IBDs, tem-se a colite ulcerativa (do inglês, *ulcerative colitis* – UC) e a doença de Crohn (do inglês, *Crohn's disease* – CD) [1,2,4,5], sendo o local de inflamação uma das principais diferenças entre a natureza da UC e da CD. Em quadros de UC, a inflamação ocorre mandatoriamente no cólon do paciente, enquanto que em quadros de CD, a inflamação pode ocorrer de maneira mais generalizada, atingindo desde a boca até o ânus [6].

De modo geral, a qualidade de vida dos indivíduos acometidos por IBDs é significativamente comprometida na ausência de diagnóstico e tratamento adequados, devido à ocorrência frequente de sintomas como dores abdominais intensas, diarreia e episódios de vômito [2,3,7]. Além das manifestações gastrointestinais, estudos indicam uma estreita correlação entre esses sintomas e o desenvolvimento ou agravamento de distúrbios psicológicos, como depressão, ansiedade e estresse, nos pacientes portadores dessas enfermidades [8].

Um estudo publicado por Kaplan e Windsor (2020) [9] descreve a rápida evolução dos quadros IBDs ao longo do tempo, passando de casos esporádicos em países do leste europeu para milhões de portadores em um intervalo de aproximadamente 250 anos, a partir do período pós-Primeira Revolução Industrial. Os autores também destacam o aumento global tanto da incidência quanto da prevalência dessas doenças, com crescimento particularmente acentuado e em países em processo de recente industrialização, nos quais houve crescente incorporação de padrões alimentares ocidentalizados [9].

No Brasil, em 2012, a prevalência de casos era de 30 a cada 100.000 habitantes, tendo um salto de 100,1 para cada 100.000 habitantes em 2020, como apontado por um estudo publicado na *The Lancet – Regional Health Americas* em 2022 [10].

As causas que levam ao desenvolvimento dos quadros de IBDs ainda não estão em um consenso científico [1,7,9,11]. Entretanto, alguns fatores aparecem correlacionados ao risco de

desenvolvimento desses quadros, sendo eles, o estilo de alimentação ocidentalizado rico em ultraprocessados, o tabagismo e fatores genéticos [7,9].

Dessa forma, levando em consideração o avanço do número de pessoas acometidas ao redor do mundo, os estudos voltados ao diagnóstico e tratamento dessas doenças ganham atenção especial da comunidade científica. Atualmente, o diagnóstico para IBDs, além da análise sintomática, conta com exames de imagem como ultrassom e necessita também da realização de endoscopias e íleo-colonoscopias acompanhadas de biópsias do tecido afetado [1,7,11]. Tais exames são capazes de fornecer informações úteis para o diagnóstico e sobre o estágio da doença, entretanto, ainda enfrentam problemas com a inconclusividade sobre o diagnóstico [11,12]. Aproximadamente 10 a 15% dos casos de IBDs são inicialmente classificados como indeterminados entre UC e CD, e, dentro desse grupo, cerca de 75% permanecem sem definição diagnóstica mesmo após o acompanhamento clínico [12].

A inconclusividade sobre o subtipo (UC ou CD) de IBD é um fator problemático principalmente na escolha do tratamento mais adequado [2,4,13,14]. Estudos apontam para diferença na resposta para determinados tratamentos em pacientes com diferentes quadros de IBD [2,4,13,14]. Por exemplo, a abordagem cirúrgica da proctocolectomia, muitas vezes indicada como tratamento em caso de UC, pode não ser adequada para quadros de CD, tendo em vista a heterogeneidade da localização e formas da inflamação nos pacientes [2].

Dentre os tratamentos farmacológicos, uma gama de fármacos são aplicados, variando entre aminosalicilatos, imunomoduladores e biológicos [2]. Apesar da variedade de fármacos, grande parte deles atua na inibição ou atenuação de produção de citocinas, como as interleucinas (ILs) e o Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês, *tumor necrosis factor alpha* – TNF- α) [2,4,15].

2.2 TNF- α

As citocinas são um grupo de pequenas proteínas produzidas por um vasto grupo de células, sendo responsáveis pela regulação da resposta imune [16]. Essas proteínas podem ser subdivididas entre as pró e anti-inflamatórias [16]. As pró-inflamatórias, quando liberadas atuam na ativação da resposta imune e as anti-inflamatórias atuam de maneira oposta [16]. Dentre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α emerge como uma das principais chaves de ativação da resposta pró-inflamatória no corpo humano [8,15–17]. Quando o TNF- α encontra-se com seus receptores específicos, uma série de eventos que regulam a resposta pró-inflamatória é desencadeada [17]. Alguns dos eventos regidos por esse encontro são a liberação

de outras citocinas pró-inflamatórias (em especial IL-1, IL-6 e IL-8) e a estimulação de hepatócitos à produção de proteínas que sustentam essa resposta inflamatória de maneira sistemática [17].

Dado o papel relevante do TNF- α na ativação e sustentação da resposta inflamatória no corpo, a sua hiper-regulação (concentração acima dos níveis normais) é observada em diversas doenças de cunho inflamatório crônico [8,16–18]. Estudos apontam níveis de TNF- α no soro sanguíneo de pacientes saudáveis de grupos controle na faixa de 0,2 a 8,0 pg mL⁻¹ [19,20]. Em pacientes expostos a doenças como a artrite reumatoide, psoríase, artrite psoriática e as IBDs (principalmente a UC), esses níveis são frequentemente apresentados acima de 8,0 pg mL⁻¹ [4,19,20].

Em quadros de IBDs, a hiper-regulação de TNF- α é amplamente reportada, tanto no soro sanguíneo, quanto nas mucosas afetadas pela inflamação [1,4,11,15,16]. Alguns estudos apontam inclusive níveis diferenciados dessa citocina para quadros de UC e de CD [4,18,21,22]. Lacruz-Guzmán et al. (2013) [4] observaram níveis maiores de TNF- α sérico em pacientes com UC em relação a pacientes com CD. Nakov (2019) [22], Kourkoulis et al. (2019) [21] e Lopetuso et al. (2020) [18] registraram a correlação direta dos níveis de proteínas como a sTFF3 e a sST2 com os níveis de TNF- α em pacientes também com UC.

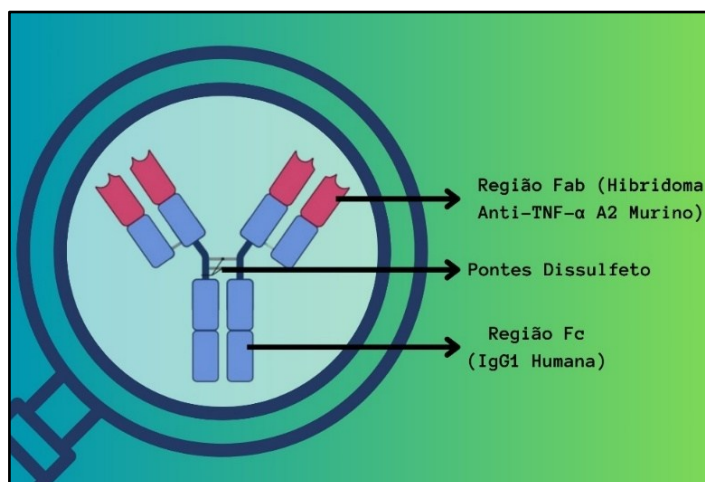
Todavia, o interesse na construção de ferramentas analíticas capazes de determinar essa citocina, especialmente em pacientes com IBD, é de interesse também para controle do avanço de um dos tipos de terapia mais aplicada a pacientes com esses casos clínicos [4,8,15,17,23]. A terapia em questão é a administração de fármacos inibidores do TNF- α [4,8,15,17,23].

Atualmente cinco fármacos com ação anti-TNF- α são recomendados para tratamento de pacientes com quadros de IBD, sendo eles: Infliximabe (IFX), Adalimumabe, Certolizumabe Pegol, Golimumabe e Vedolizumabe [17]. No Brasil, a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC-SUS) em relatório de janeiro de 2017, reforça a recomendação para uso de Certolizumabe Pegol para tratamento de pacientes com quadros de CD [24]. Já o relatório de julho de 2019, reporta a recomendação de uso de IFX, Adalimumabe, Golimumabe e Vedolizumabe para tratamento de quadros de UC de moderada a grave, sendo o IFX, entre os quatro citados, um dos mais proeminentes [25].

2.2.1 Infiximabe

O IFX é um dos fármacos anti-TNF- α mais amplamente explorados como terapia para quadros de IBDs, possuindo como diferencial, entre os outros citados anteriormente, sua rápida capacidade de ação e alta eficácia no tratamento de fístulas geradas em decorrência de IBDs [4,15,17]. Este fármaco é um anticorpo monoclonal (do inglês, *monoclonal antibody* – mAb) [4,17]. Entretanto, o IFX possui uma diferença substancial de outros fármacos baseados em mAbs, uma vez que, trata-se de um mAb quimérico [17,26]. No IFX, a região variável (Fab), responsável pelo reconhecimento do antígeno (nesse caso, o TNF- α), é composta por hibridomas anti-TNF- α A2 de murinos (camundongos). Já a região constante (Fc) é baseada na Fc da imunoglobulina humana do subtipo 1 (IgG1) [17,26]. A Figura 1, representa de maneira esquemática a estrutura do IFX.

Figura 1. Representação esquemática do IFX.



Fonte: O Autor (2025).

O mecanismo de atuação do IFX é baseado em reconhecer e ligar-se seletivamente ao TNF- α criando um complexo antígeno-anticorpo, dessa forma impedindo com que o TNF- α chegue aos seus receptores específicos, cessando assim a resposta pró-inflamatória gerada por essa citocina [17,27].

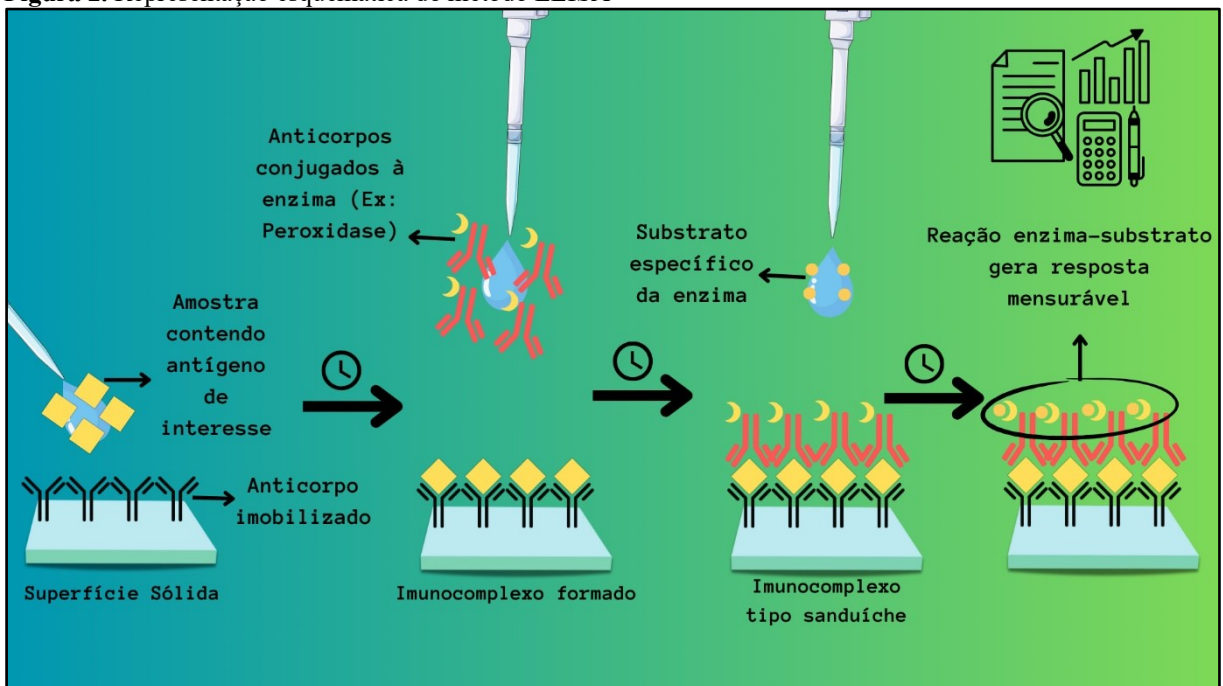
2.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE TNF- α

Tendo em vista o importante papel do TNF- α na regulação de IBDs e outras doenças de cunho inflamatório, bem como o interesse na avaliação do sucesso de terapias anti-TNF- α , diversas metodologias analíticas são aplicadas para a determinação desta citocina [28].

Classicamente, o método mais empregado é o ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) [29,30].

Esse método baseia-se na imobilização de um anticorpo específico sobre uma superfície sólida, a qual é posteriormente exposta à amostra contendo, ou não, o antígeno de interesse [31]. Caso presente, o antígeno liga-se aos sítios de reconhecimento dos anticorpos [31]. Em seguida, adiciona-se uma solução contendo anticorpos secundários conjugados a enzimas, geralmente peroxidases, que se ligam ao imunocomplexo previamente formado [31]. Após uma etapa de lavagem para remoção de espécies não ligadas, adiciona-se um substrato específico da enzima. A reação entre a enzima e o substrato gera um sinal mensurável, como uma mudança de coloração, permitindo a detecção e, por meio da intensidade do sinal gerado, a quantificação do antígeno alvo [31]. A Figura 2 representa o processo de construção e análise do método ELISA.

Figura 2. Representação esquemática do método ELISA



Fonte: O Autor (2025).

O ELISA apresenta vantagens como sensibilidade e especificidade adequadas para a análise de biomarcadores, como o TNF- α , em diferentes matrizes biológicas, tais como sangue, urina e suor [29–32]. Por outro lado, as múltiplas etapas de imobilização, incubação e lavagem tornam a análise mais lenta e suscetível a intercorrências ao longo do processo [29–32]. Além disso, o método requer dois tipos de anticorpos, sendo que um deles deve ser quimicamente marcado, o que aumenta o custo e a complexidade das análises [29–32].

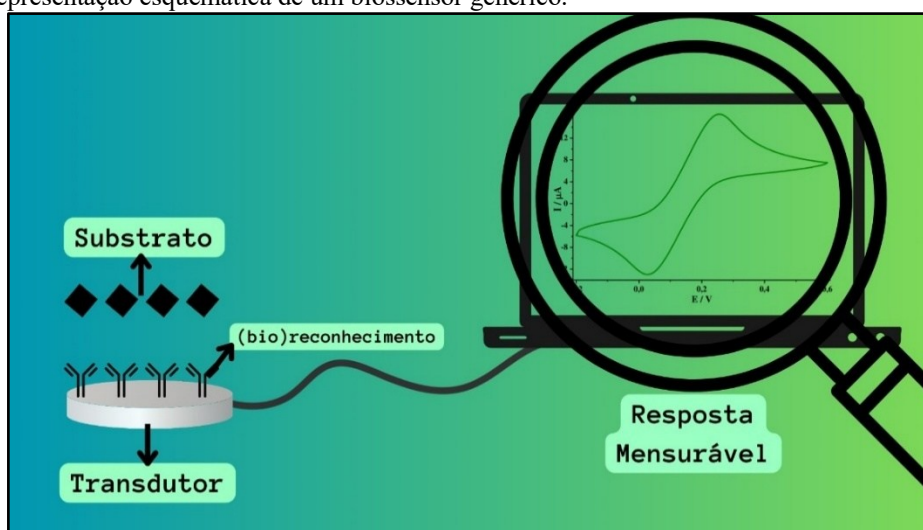
A partir do ELISA, derivam-se outros métodos com características semelhantes, como os ensaios de quimioluminescência (do inglês, *Chemiluminescent Immunoassay* – CLIA), cuja principal diferença está na detecção por emissão de luz [33]. Há ainda uma variante que permite a determinação simultânea do perfil de citocinas, conhecida como citometria que utiliza microesferas (do inglês, *Cytometric Bead Array* – CBA) [34,35]. Esse tipo de ensaio utiliza microesferas funcionalizadas com anticorpos específicos para diferentes citocinas, cada uma marcada com fluoróforos distintos, gerando sinais fluorescentes diferenciados. Apesar da vantagem de permitir a construção de perfil de citocinas, o método exige equipamentos especializados, como o citômetro de fluxo, apresenta elevada complexidade operacional e demanda construção de curvas de calibração individuais para cada analito [34,35].

Tendo em vista a necessidade de minimizar as limitações dos métodos supracitados, os biossensores emergem como plataformas sensíveis e específicas, com potencial para redução de custos e possibilidade de miniaturização, o que viabiliza sua aplicação em PoC [28,36,37].

2.4 BIOSSENSORES

Biossensores, são dispositivos analíticos compostos por uma superfície de (bio)reconhecimento específica para um determinado substrato, sendo essa superfície imobilizada sobre um transdutor que fará a conversão desta interação em uma resposta mensurável [38]. O tipo de resposta a ser registrada é variável a depender da escolha do transdutor, podendo ser aplicados transdutores ópticos, piezoelétricos e eletroquímicos [28,38,39]. A Figura 3 representa de maneira esquemática um biossensor genérico.

Figura 3. Representação esquemática de um biossensor genérico.



Fonte: O Autor (2025).

Além da classificação dada em razão do tipo da resposta gerada pelo transdutor utilizado, há também a classificação dada pelo (bio)reconhecimento selecionado [38,40,41]. No caso dos biossensores enzimáticos, o reconhecimento é composto por enzimas que catalisam reações específicas, como a oxidação de compostos fenólicos, amplamente utilizada em análises ambientais, alimentares e clínicas [38,42]. Outra abordagem envolve o uso de fitas de DNA, RNA ou mRNA, que atuam como sondas capazes de hibridizar com sequências complementares de ácidos nucleicos, possibilitando a detecção seletiva de sequências genéticas específicas, como ocorre nos genossensores [43]. De maneira similar, os aptassensores utilizam aptâmeros, que são sequências sintéticas de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) selecionadas por sua alta afinidade por um alvo específico. Esses elementos são capazes de reconhecer seletivamente diversas classes de analitos, como proteínas, toxinas, metais pesados e fármacos [44]. Já os imunossensores são dispositivos cujo o (bio)reconhecimento é composto por anticorpos, os quais se ligam de forma específica e seletiva a antígenos, sendo amplamente utilizados na detecção de biomarcadores em amostras biológicas [40,41,45].

2.4.1 Imunossensores Eletroquímicos

Observa-se a relevância dos imunossensores em diferentes contextos, desde a rastreabilidade de doenças até o controle de qualidade de alimentos. Esses dispositivos têm sido amplamente empregados em análises laboratoriais de rotina, como na detecção de anticorpos IgG e IgM em pacientes com suspeita de COVID-19, na determinação dos níveis de antígeno prostático específico para o diagnóstico de câncer de próstata, bem como na identificação de alérgenos em alimentos, como o amendoim [46–48].

Transdutores eletroquímicos são uma tecnologia frequentemente adotada para esse tipo de sensor, devido às suas características de sensibilidade adequada, capacidade de resposta seletiva, baixo custo e especialmente sua portabilidade, tendo atualmente dispositivos capazes de operar em *smartphones* como mostra a Figura 4 [41,49,50].

Figura 4. Potenciostato *Sensit Smart* acoplado a aparelho *smartphone*.



Fonte: PalmSens BV. “Sensit Smart.” *PalmSens* (2025).

Os dispositivos eletroquímicos baseados em reconhecimento imunológico operam a partir do monitoramento das respostas geradas pela interação antígeno–anticorpo na superfície do eletrodo. Essas respostas podem se manifestar como variações de corrente elétrica ou como alterações na resistência à transferência de carga, no caso da espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês, *Electrochemical Impedance Spectroscopy* – EIS) [30,51–53]. Embora ambas as abordagens preservem as vantagens das técnicas eletroanalíticas, a detecção por EIS apresenta limitações relacionadas à maior complexidade instrumental, maior demanda operacional e tempos de resposta mais longos [54]. Nesse sentido, os métodos baseados em variação de corrente elétrica configuram alternativas mais atrativas para integração em plataformas de diagnóstico PoC [40,55].

De maneira geral, proteínas como antígenos e anticorpos não apresentam atividade redox na faixa de potencial típica de eletrodos convencionais, como os de carbono vítreo (do inglês, *glassy carbon electrode* - GCE), ouro ou os serigrafados à base de carbono (do inglês, *screen-printed carbon electrode* - SPCE) [56]. Isso ocorre devido à ausência de centros redox acessíveis, à estrutura tridimensional complexa dessas biomoléculas e à sua tendência à desnaturação após a adsorção na superfície do eletrodo [56].

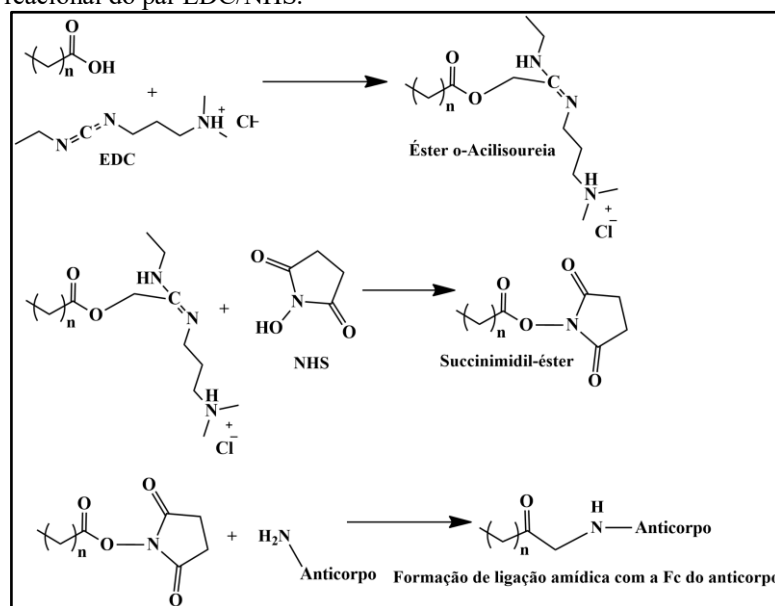
Consequentemente, é necessária a utilização de sondas redox para viabilizar a detecção eletroquímica, como enzimas acopladas a anticorpos, em configurações análogas aos imunoenaios do tipo ELISA (Figura 2) [30]. No entanto, o uso de marcadores adiciona etapas ao protocolo, o que acarreta aumento de custo, maior tempo de análise e a necessidade da formação de um complexo anticorpo–antígeno–anticorpo marcado, refletindo limitações semelhantes às observadas nos métodos clássicos de imunoensaio [57–59].

Conseqüentemente, destacam-se os imunossensores eletroquímicos *label-free*, nos quais não há a necessidade de marcação química de antígenos ou anticorpos, uma vez que a transdução do evento de reconhecimento biomolecular é monitorada por sondas redox, em solução ou imobilizadas na superfície do eletrodo [60,61]. Nesse tipo de imunossensor, a resposta analítica geralmente se manifesta como uma diminuição da corrente da sonda redox, a qual se torna progressivamente atenuada ao longo das etapas de modificação da superfície e, de forma mais pronunciada, quando ocorre a ligação específica entre o antígeno e o anticorpo imobilizado [60,61]. A diminuição da corrente é atribuída ao aumento da barreira à transferência de carga, causado pela formação do complexo antígeno-anticorpo na interface eletrodo de trabalho (do inglês, *working electrode* – WE)/solução, sendo a variação de corrente (ΔI) o parâmetro analítico monitorado [60,61].

Tipicamente, inicia-se com a funcionalização da superfície do WE, etapa essencial para conferir grupos funcionais, como amino ($-NH_2$) ou carboxila ($-COOH$), que permitirão a imobilização controlada do elemento de (bio)reconhecimento [60,62,63]. Essa funcionalização pode ser realizada por diferentes estratégias, como a adsorção de polímeros condutores funcionalizados [64], a formação de monocamadas auto-organizadas (do inglês, *self-assembled monolayers* - SAMs) sobre eletrodos metálicos [32,51,65,66], ou ainda por modificações eletroquímicas diretas, como a eletropolimerização de monômeros contendo grupos reativos [67,68].

Uma vez funcionalizada a superfície, pode-se empregar sistemas de acoplamento químico, como o par 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)/N-hidroxisuccinimida (NHS), que ativa os grupos carboxílicos através da formação de um succinimidil-éster para posterior reação com grupos amina presentes na região Fc dos anticorpos, promovendo a formação de ligações amídicas covalentes e assegurando sua fixação estável sobre a superfície do sensor [32,49,69]. O processo reacional do par EDC/NHS é demonstrado na Figura 5.

Figura 5. Processo reacional do par EDC/NHS.



Fonte: Adaptado de Thermo-Fisher Scientific© (2025).

Dentre as estratégias de funcionalização da superfície do WE e de imobilização de anticorpos em imunossensores eletroquímicos, destaca-se a utilização de SAMs de ácidos tiolados sobre superfícies metálicas, seguida da ativação dos grupos terminais carboxílicos por meio do sistema EDC/NHS [70–72]. Esta abordagem é amplamente descrita na literatura, sendo reconhecida por sua eficiência, reprodutibilidade e compatibilidade com diferentes plataformas de sensoriamento [70–72].

A organização compacta e altamente ordenada de SAMs possibilita a formação de filmes ultrafinos que contribuem para a redução de interações não específicas entre o antígeno e a superfície do eletrodo [70,72–74]. Além de promover uma funcionalização controlada com grupos carboxílicos terminais ($-\text{COOH}$), essa estratégia também se destaca pela elevada estabilidade química decorrente da forte ligação covalente entre os grupos tiol e superfícies metálicas, como ouro, prata, platina e cobre, o que assegura ancoragem robusta e durabilidade do sensor [70,72].

Apesar da afinidade do grupo tiol com outros metais, frequentemente o ouro é utilizado como suporte para esses grupos para plataformas de imunossensoriamento. A literatura atual aponta estudos da aplicação de ouro como suporte para construção de SAMs em imunossensores aplicados à determinação de biomarcadores de periodontite [69], COVID-19 [75], salmonela [76] e o $\text{TNF-}\alpha$ [36]. Frequentemente, a fonte do grupo tiol que possibilitará a formação da SAM é o ácido 11-mercaptoundecanoico (do inglês, *11-mercaptoundecanoic acid* - 11-MUA), sendo aplicado principalmente pelo tamanho da cadeia carbônica que possibilita

maior organização e compactação em detrimento de cadeias menores [74]. Recentemente, o 11-MUA foi aplicado em diversas plataformas de biossensoriamento, tais como na determinação de biomarcador de câncer cervical [49], bifenilas policloradas [32], e creatina quinase [77].

A preferência pelo uso do ouro na formação de SAMs com tióis se deve, principalmente, à elevada energia de ligação Au-S, situada entre 40 e 50 kcal/mol [70,72,74]. Esse valor supera significativamente os observados para metais como prata (30-40 kcal/mol), platina e cobre (20-30 kcal/mol), refletindo o maior caráter covalente da interação Au-S. Como consequência, a ligação entre o grupo tiol e a superfície de ouro é consideravelmente mais estável, favorecendo a formação de filmes organizados, duráveis e reprodutíveis, características essenciais para o desempenho de imunossensores eletroquímicos [70,72,74]. Tal comportamento é coerente em função da teoria ácido-base de Pearson [74,78]. Os grupos tióis são bases de Lewis macias (grande nuvem eletrônica polarizável) [74,78]. O átomo de ouro (Au^0) é classificado como um ácido de Lewis macio e apresenta polarizabilidade mais expressiva em relação aos outros metais em função dos efeitos relativísticos que causam a contração dos orbitais 6s e expansão do orbital 5d [78]. Dessa forma, explicando o grau de covalência e força da ligação Au-S.

Adicionalmente, a elevada estabilidade das SAMs formadas sobre superfícies de ouro está relacionada também à notável resistência desse metal à oxidação. O ouro apresenta um potencial padrão de redução (*vs.* eletrodo padrão de hidrogênio, EPH) de aproximadamente +1,50 V, valor superior ao de outros metais frequentemente utilizados, como platina (+1,18 V), prata (+ 0,80 V) e cobre (+ 0,34 V) [79–81].

2.4.1.1 Imunossensores eletroquímicos impressos em 3D e galvanização

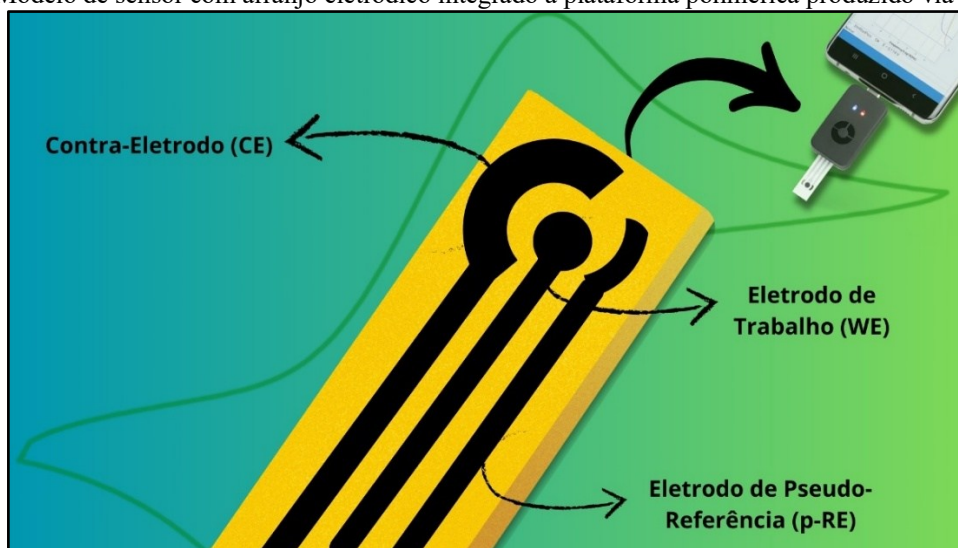
Embora o uso do ouro proporcione a construção de imunossensores eletroquímicos altamente estáveis, robustos e reprodutíveis, sua aplicação em larga escala ainda enfrenta limitações significativas, especialmente em dispositivos voltados à análise PoC. Essas restrições decorrem, principalmente, do elevado custo associado aos eletrodos convencionais de ouro e da sua reduzida flexibilidade em termos de design e integração em plataformas portáteis e de baixo custo [82].

Com o objetivo de viabilizar o desenvolvimento de sensores eletroquímicos de baixo custo e com geometrias adaptadas a dispositivos portáteis voltados à análise PoC, a tecnologia de manufatura aditiva, em especial a impressão 3D por deposição de filamento fundido (do inglês, *Fused Filament Fabrication* - FFF), tem se destacado como uma alternativa promissora

[83,84]. Essa abordagem permite a produção personalizada de eletrodos com geometrias complexas, alta reprodutibilidade e redução significativa de custos quando comparada a métodos convencionais de fabricação, como microfabricação fotolitográfica ou eletrodos metálicos comerciais [83,84]. Além disso, a impressão 3D favorece a descentralização da produção e a rápida prototipagem desses sensores, fatores particularmente relevantes em contextos clínicos emergentes e ambientes com recursos limitados [83,84].

A viabilidade técnica e econômica da impressão 3D por FFF está diretamente associada à utilização de filamentos poliméricos de baixo custo e fácil processamento [55,83–85]. Nesse contexto, polímeros como o acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) são frequentemente empregados na confecção do suporte estrutural do arranjo eletródico, enquanto os eletrodos funcionais são tipicamente fabricados a partir de filamentos à base de ácido polilático (PLA) incorporados com materiais carbonáceos condutores, como grafeno ou negro de fumo (do inglês, *carbon black* - CB), os quais conferem condutividade elétrica ao compósito [55,83–85]. O ABS, por ser um termoplástico, apresenta a vantagem de poder ser reciclado por fusão e remodelagem, contribuindo para abordagens mais sustentáveis [55,83–85]. Já o PLA, é um polímero biodegradável derivado de fontes renováveis, o que o torna atrativo em aplicações que visam reduzir o impacto ambiental dos dispositivos produzidos [55,83–85]. Um design de sensor amplamente utilizado, construído a partir desses polímeros via FFF, está representado na Figura 6.

Figura 6. Modelo de sensor com arranjo eletródico integrado à plataforma polimérica produzido via FFF.



Fonte: O Autor (2025).

Apesar das vantagens econômicas e ambientais associadas aos eletrodos impressos em 3D, esses dispositivos ainda enfrentam limitações relacionadas à sua condutividade eletroquímica [84,85]. Isso ocorre porque, durante o processo de impressão, a matriz polimérica do filamento tende a encapsular os sítios condutores, dificultando a transferência de carga na superfície do eletrodo. Como resultado, torna-se necessário aplicar tratamentos de ativação superficial que promovam a exposição desses sítios condutores. Entre as abordagens mais comuns estão os métodos abrasivos, que removem mecanicamente a camada superficial de polímero, e os tratamentos com solventes capazes de solubilizar seletivamente a matriz polimérica [84–86]. No entanto, ambas as estratégias apresentam baixa seletividade e podem comprometer a integridade da fase condutora, reduzindo a reprodutibilidade e a estabilidade do sensor. Uma alternativa mais controlada e eficaz é o processo de ativação eletroquímica, o qual consiste na exposição do eletrodo a uma solução fortemente alcalina, NaOH ou KOH, sob a aplicação de um potencial positivo suficiente para promover a oxidação parcial do PLA [84–86]. Esse processo degrada seletivamente a matriz polimérica na região superficial, expondo os domínios condutores e restaurando a atividade eletroquímica da superfície do eletrodo [84–86].

Visando ampliar a condutividade de eletrodos impressos em 3D e viabilizar a construção de sensores eletroquímicos cada vez mais sensíveis e compatíveis com plataformas PoC, tem-se investigado a utilização de filamentos compósitos à base de PLA/Cu. Esse tipo de filamento, ainda pouco disseminado comercialmente, representa uma das poucas alternativas disponíveis que combinam uma matriz polimérica com um metal condutor de forma direta. A literatura recente tem se concentrado principalmente em estudos físicos e estruturais voltados à formulação e caracterização desses compósitos, utilizando diferentes abordagens para a incorporação do cobre na matriz polimérica [87,88]. No entanto, as aplicações eletroquímicas desses filamentos ainda são incipientes, carecendo de investigações sistemáticas quanto ao seu desempenho como (bio)sensores [80,89,90].

Apesar da elevada condutividade do cobre, sua baixa estabilidade frente a processos oxidativos, em função do baixo potencial de redução, limita sua aplicação direta em sensores. Para contornar essa limitação, diversos autores têm proposto a galvanização da superfície do eletrodo de cobre com ouro, explorando o potencial dessa técnica tanto em plataformas de biorreconhecimento [79] quanto na eletrocatalise da redução de íons nitrato [80]. A eficácia do processo decorre de sua espontaneidade, resultante da significativa diferença entre os potenciais de redução do ouro e do cobre [79,80,89].

A deposição de ouro confere maior estabilidade à superfície, tornando-a menos suscetível à formação de óxidos de cobre, que comprometem a condutividade e a

reprodutibilidade dos sensores a longo prazo [79,80,89]. Nesse sentido, a galvanização de eletrodos de cobre produzidos por manufatura aditiva (impressão 3D) desponta como uma estratégia promissora, pois combina o baixo custo e a flexibilidade dessa tecnologia com o desempenho eletroquímico superior do ouro.

Além disso, essa modificação superficial viabiliza a aplicação de metodologias consolidadas de funcionalização, como a formação de SAMs, superando limitações inerentes ao uso de eletrodos convencionais de ouro. Assim, a integração entre impressão 3D e galvanização se apresenta como um avanço significativo no desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos acessíveis, estáveis e adaptáveis a dispositivos PoC, configurando-se como uma alternativa viável para futuras aplicações clínicas e diagnósticas, como propõe este trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver imunossensores eletroquímicos impressos em 3D, utilizando filamento de PLA-Cu galvanizado com ouro na região do WE, para monitoramento de TNF- α em amostras de soro sanguíneo humano.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir sensores eletroquímicos impressos em 3D, com a base fabricada a partir de filamento de ABS, os eletrodos de pseudo-referência (do inglês, *pseudo-reference electrode* – p-RE) e contra-eletrodos (do inglês, *counter-electrode* – CE) em PLA-CB, e o WE com Cu/PLA-CB;
- Realizar a ativação eletroquímica da superfície do WE com KOH 1,0 mol L⁻¹, aplicando potencial de +1,8 V durante 900s;
- Galvanizar a superfície do eletrodo de trabalho de Cu/PLA-CB com ouro através do gotejamento de solução de HAuCl₄;
- Otimizar os parâmetros da galvanização (concentração de solução de HAuCl₄ e tempo de contato da solução);
- Caracterizar a superfície do eletrodo galvanizado de maneira físico-química (MEV, XPS, EIS);
- Estudar o comportamento de diferentes sondas redox sobre a superfície galvanizada;
- Construir monocamada auto-organizada através do ácido 11-mercaptoundecanol sobre o WE;
- Imobilizar o anticorpo Infiximabe (IFX) sobre a monocamada auto-organizada através da técnica EDC/NHS;
- Selecionar e otimizar a técnica voltamétrica (LSV, DPV e SWV);
- Otimizar tempo de incubação do antígeno (TNF- α) no imunossensor;
- Determinar parâmetros analíticos como faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação e sensibilidade através da construção da curva de calibração para o TNF- α ;
- Avaliar a estabilidade dos imunossensores através de ensaios de repetibilidade;
- Aplicar o imunossensor na determinação de TNF- α em amostras de soro sanguíneo humano, avaliando a exatidão através de testes de adição e recuperação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTE E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e adquiridos da Sigma-Aldrich/Merck (EUA). As soluções foram preparadas em água ultrapura (18,2 M Ω cm), obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, EUA). Soluções de [Ru(NH₃)₆]Cl₃ 5,0 e 0,50 mmol L⁻¹; K₄[Fe(CN)₆] 5,0 mmol L⁻¹; azul de metileno (A.M.) 5,0 mmol L⁻¹; albumina de soro bovino (BSA) 1,0% (m/v); mistura de EDC 2,0 mmol L⁻¹ e NHS 5,0 mmol L⁻¹; solução estoque do anticorpo monoclonal infliximabe (IFX, M.M \approx 149 kDa) 5,0 mg mL⁻¹; e solução estoque do antígeno TNF- α (\approx 17,4 kDa) 25,0 μ g mL⁻¹ foram preparadas utilizando solução tampão fosfato (Na₂HPO₄/KH₂PO₄) 0,01 mol L⁻¹ (pH 7,4). Solução de ferrocenocarboxialdeído (Fc-CHO) 5,0 mmol L⁻¹ foi preparada em solução tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹, pH 7,4) contendo 10% de etanol absoluto.

O filamento de acrílico-butadieno-estireno (ABS) foi adquirido da Sethi3D (Brasil). O filamento de ácido polilático e *carbon black* (PLA-CB) foi adquirido da ProtoPasta (EUA) e o filamento de ácido polilático e cobre (PLA-Cu) foi adquirido da The Virtual Foundry (EUA).

A ativação dos sensores 3D foi realizada em solução KOH 1,0 mol L⁻¹ preparada em água ultrapura. Para a galvanização do WE foi preparada uma solução estoque de HAuCl₄ 10 mmol L⁻¹ em água ultrapura. Para a construção da SAM sobre a superfície de ouro, utilizou-se solução de 11-MUA 5,0 mmol L⁻¹ preparada em etanol absoluto.

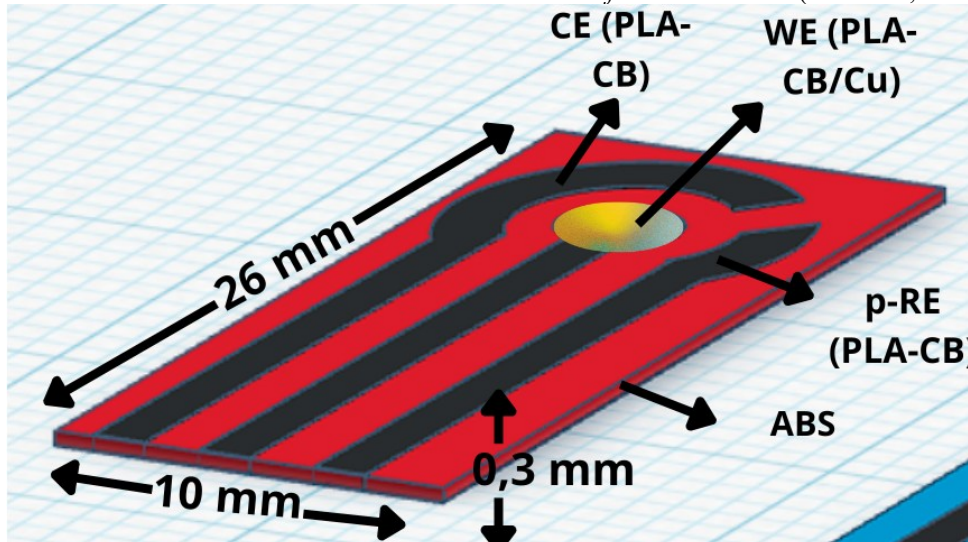
4.2 IMPRESSÃO E ATIVAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS SENSORES

Para a elaboração do design do 3D-Cu/PLA-CB, foi utilizado um *software* livre de modelagem 3D intitulado Tinkercad (Autodesk, EUA) e a impressão foi feita a partir da FFF utilizando uma impressora 3D modelo S3X (Sethi3D, Brasil). O sensor conta com uma base impressa a partir de filamento de ABS com 10 mm de largura, 26 mm de comprimento e 0,3 mm de espessura. O arranjo eletródico é composto de WE, p-RE e CE impressos sobre a base de ABS utilizando o filamento de PLA-CB [91].

O WE possui área geométrica de 0,07 cm² e sobre ele foi depositada uma camada de filamento de PLA-Cu. Os parâmetros de impressão (temperatura de extrusão dos filamentos = 190 °C, número de camadas de filamento de PLA-Cu sobre o WE = 1, padrão de preenchimento = retilíneo e velocidade de extrusão de 60 mm s⁻¹) dos sensores foram otimizados previamente

em trabalho do nosso grupo de pesquisa que está em processo de publicação. O modelo do sensor está representado na Figura 7.

Figura 7. Modelo e medidas do sensor 3D construído através do *software* Tinkercad (Autodesk, EUA).



Fonte: O Autor (2025).

O processo de ativação eletroquímica foi otimizado pelo mesmo trabalho citado anteriormente, sendo assim foram gotejados 80 μL de uma solução KOH 1,0 mol L⁻¹ sobre a superfície dos eletrodos e, através de cronoamperometria, aplicado um potencial fixo de +1,8 V durante 900 s.

4.3 GALVANIZAÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO

Após a ativação eletroquímica do sensor, este foi submetido ao processo de galvanização que consistiu em gotejar 8,0 μL de uma solução aquosa de H₂AuCl₄ 5,0 mmol L⁻¹ sobre a superfície do WE, deixando-as em contato durante 5 min. Após os 5 min, o sensor foi lavado com água deionizada e seco com auxílio de uma estufa (tempo de secagem = 10 min, e temperatura da estufa = 45 °C) [81].

4.4 CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR

4.4.1 Modificação da superfície do WE com SAM e EDC/NHS

Após a galvanização e secagem, o sensor foi imerso em béquer de 5,0 mL contendo 2,0 mL de solução etanólica de 11-MUA 5,0 mmol L⁻¹. Em seguida, foi transferido para uma câmara de incubação previamente preparada com algodão embebido em etanol, garantindo

pressão de vapor constante e minimizando perdas por evaporação. O tempo de incubação foi de 5 h.

Decorrido esse período, o sensor foi retirado, seco à temperatura ambiente por 5 min e lavado com 10 μL de etanol para remoção de moléculas não ligadas de 11-MUA, sendo novamente seco por 5 min. Na sequência, foram adicionados 8,0 μL da solução EDC/NHS (2 nM:5 nM), e o sensor retornou à câmara de incubação por 30 min, desta vez com algodão embebido em água ultrapura, a fim de evitar a evaporação da solução de EDC/NHS e assegurar que as interações se restringissem ao reconhecimento específico entre moléculas de EDC/NHS e substrato (11-MUA).

4.4.2 Imobilização do anticorpo (IFX) e da albumina do soro bovino

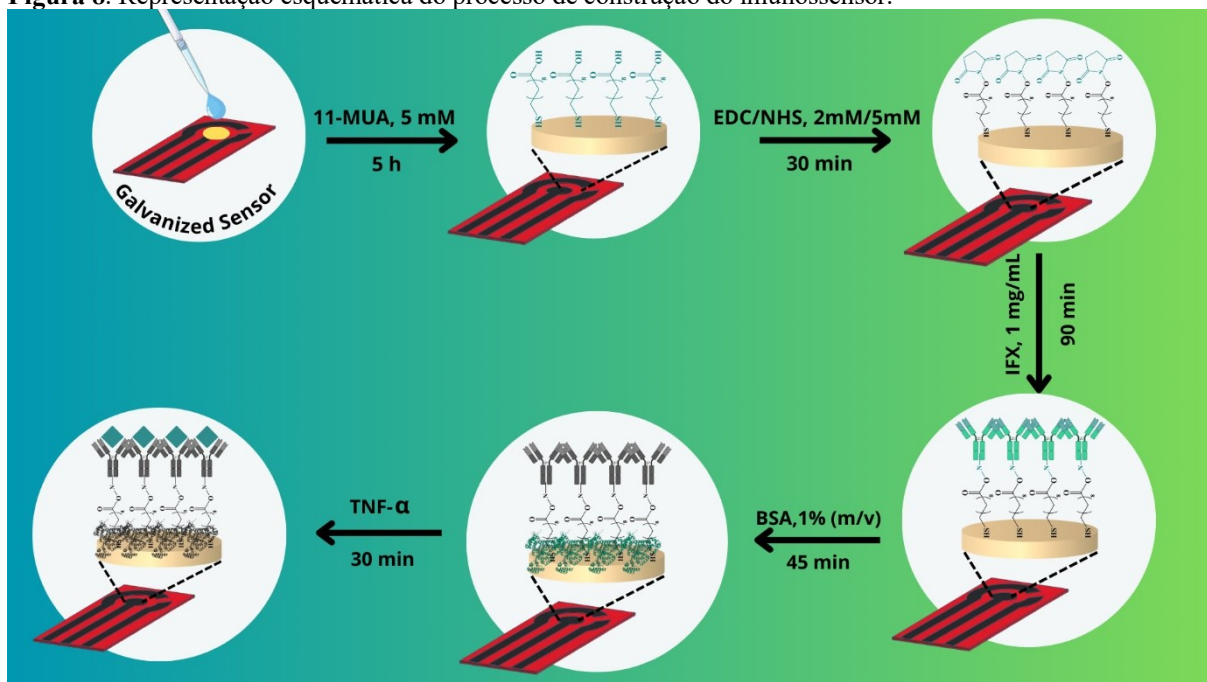
Concluída a etapa de modificação da superfície do WE com EDC/NHS, a solução foi removida com auxílio de uma pisseta vazia. Em seguida, a superfície foi lavada com 10 μL de tampão fosfato (0,01 mol L^{-1} , pH 7,4) para eliminar moléculas não ligadas e os sensores foram secos em dessecador a vácuo por 5 min. Sobre o WE, foi adicionado 8,0 μL de solução de IFX 1,0 mg mL^{-1} , seguida de incubação em câmara umidificada por 90 min.

Após esse período, repetiu-se a remoção do excesso de solução, a lavagem da superfície do WE com solução tampão fosfato (0,01 mol L^{-1} , pH 7,4) e a secagem a vácuo. Para minimizar interações não específicas entre TNF- α e IFX, foram adicionados 8,0 μL de solução de BSA 1% (m/v), com posterior incubação por 45 min na mesma câmara.

4.4.3 Incubação do antígeno (TNF- α)

Concluída a etapa de imobilização de BSA, o sensor foi submetido novamente à remoção do excesso de solução, lavagem e secagem. Com o imunossensor já construído, procedeu-se à otimização do tempo de contato com o antígeno, a fim de favorecer a formação do imunocomplexo antígeno (TNF- α)-anticorpo (IFX). Para isso, 5,0 pg mL^{-1} de TNF- α foram incubados por 30 min em câmara de incubação, à temperatura ambiente. A Figura 8 ilustra esquematicamente as etapas de construção do imunossensor e a imobilização do TNF- α .

Figura 8. Representação esquemática do processo de construção do imunossensor.



Fonte: O Autor (2025).

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SENSORES

As análises da superfície do WE por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (do inglês, *X-ray Photoelectron Spectroscopy* – XPS) foram conduzidas utilizando o espectrômetro ESCA+ (Scienta Omicron, Suécia), equipado com fonte monocromática de raios X Al K α (energia de excitação $h\nu = 1486,6$ eV) e analisador hemisférico de alta resolução (modelo EAC-2000). Para o tratamento dos dados, a correção da linha de base foi realizada por meio da função de Shirley, aplicada antes do processo de ajuste dos espectros. A separação dos sinais característicos (deconvolução) referentes às regiões de ligação C 1s, O 1s, Cu 2p e Au 4f foi efetuada empregando perfis assimétricos com contribuição Gaussiana-Lorentziana, possibilitando a identificação dos diferentes estados químicos presentes nas superfícies avaliadas. Essas análises foram conduzidas pelo Laboratório de Plasma, Filmes e Superfícies da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), *campus* Joinville.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (do inglês, *scanning electron microscopy* - SEM) foram obtidas para a superfície do WE galvanizada utilizando um microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-6390LV (JEOL, Japão), operando com voltagem de aceleração de 25 kV. As análises foram realizadas nas dependências do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME – UFSC).

As medidas para avaliação do ângulo de contato utilizando água sobre a superfície do WE, foram realizadas através de um goniômetro ramé-Hart 250 (ramé-Hart, EUA). O aparelho fica localizado na Central de Análises do departamento de Engenharia Química e Alimentos da UFSC.

4.6 ANÁLISES ELETROQUÍMICAS

As medidas voltamétricas e de EIS foram realizadas utilizando um potenciostato PalmSens4 (Palm Instruments BV, Países Baixos) com módulo de impedância acoplado.

Durante a otimização do processo de galvanização dos sensores foi utilizada como sonda redox uma solução de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 5,0 mmol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ (pH 7,4), sendo a leitura da medida de corrente realizada no sentido catódico de +0,6 a -0,9 V vs. *carbon black* à uma velocidade de 50 mV s⁻¹ por voltametria cíclica (do inglês, *cyclic voltammetry* – CV). Para realização dessas medidas a solução foi previamente purgada com N₂ durante 5 min para remoção do O₂ dissolvido.

Para os estudos de construção do imunossensor e ensaios analíticos, foi utilizada a técnica de voltametria de pulso diferencial (do inglês, *differential pulse voltammetry* - DPV), com os seguintes parâmetros otimizados: velocidade de varredura (v) = 50 mV s⁻¹, amplitude de pulso (E_{pulso}) = 240 mV e incremento de potencial (ΔE) = 10 mV. A faixa de potencial em estudo foi de +0,3 V a -0,7 V.

Os espectros de EIS foram obtidos em condições de potencial de circuito aberto (do inglês, *open circuit potential* - OCP), empregando a sonda redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. As medições foram realizadas com amplitude de perturbação de 5,0 mV, aplicando-se uma faixa de frequência que variou de 0,1 Hz a 50.000 Hz.

4.7 PREPARO DA AMOSTRA

A matriz selecionada para os ensaios foi o soro sanguíneo humano, considerando a relevância do TNF- α como biomarcador nesse meio. Amostras de soro sanguíneo humano sintético foram adquiridas da Sigma-Aldrich/Merck (EUA). A partir delas, preparou-se uma solução estoque por diluição de 1 parte de soro em 9 partes de tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ (pH 7,4) (v/v).

Para avaliação da exatidão do método por ensaio de adição e recuperação, a amostra foi fortificada com solução padrão de TNF- α em três níveis de concentração: 0,5, 5,0 e 8,0 pg mL⁻¹.

4.8 CRITÉRIOS DE OTIMIZAÇÃO E TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

As etapas de otimização relacionadas à galvanização, seleção da sonda, seleção da técnica voltamétrica, tiveram como critérios principais a obtenção de maior intensidade de corrente, aliado ao compromisso com a seletividade, evitando alargamentos de pico significativos.

Desde a construção do imunossensor até sua aplicação analítica, a resposta considerada foi a variação de corrente (ΔI), associada à supressão do sinal causada pela adição de moléculas não eletroativas sobre a superfície do eletrodo de trabalho (WE).

Para definir a amplitude de pulso (E_{pulso}) mais adequada, levando em conta o equilíbrio entre sensibilidade e seletividade, utilizou-se a estratégia de combinação de respostas máximas e mínimas por meio da função desejabilidade de Derringer [92]. Nesse método, a máxima intensidade de corrente com o mínimo alargamento do pico é convertida em valores entre 0 e 1, sendo os mais próximos de 1 considerados os ideais.

A significância dos dados de otimização foi confirmada por meio de análises de variância simples (ANOVA *one-way*) e testes de Tukey, adotando intervalo de confiança de 95% (dados não apresentados).

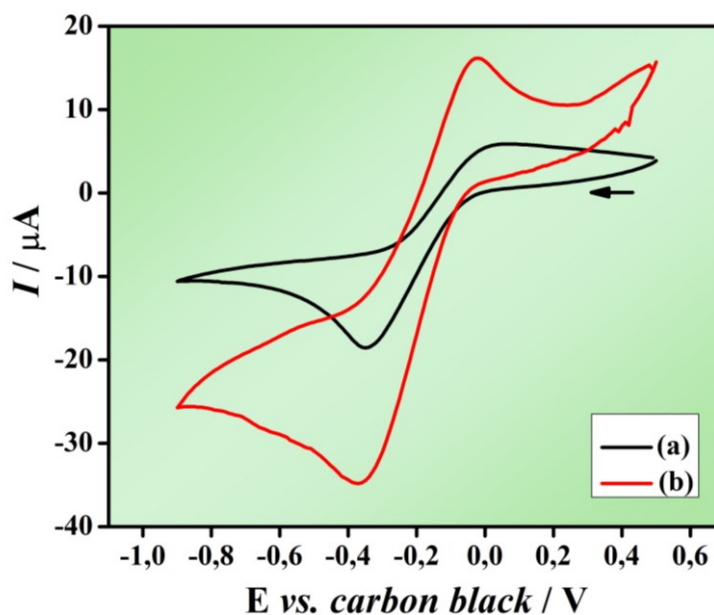
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS SENSORES

O processo de ativação eletroquímica, descrito na Seção 4.2, tem como principal finalidade promover a maior exposição dos sítios condutivos de CB e de Cu metálico, sendo crucial tanto para o aprimoramento da sensibilidade do sensor quanto para viabilizar a etapa subsequente de galvanização.

A Figura 9 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para a sonda redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) usando o sensor (a) antes e (b) após a ativação da superfície do WE em solução de KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Observa-se um aumento de 1,9 vezes na corrente de pico catódica (I_{pc}) e 2,7 vezes na corrente de pico anódica (I_{pa}) antes (a) e após (b) o processo de ativação. Esse aumento nas correntes está associado à degradação da matriz polimérica isolante (PLA), expondo uma maior fração de sítios eletroativos de Cu e CB, o que resulta em uma resposta eletroquímica mais intensa e, portanto, maior sensibilidade [84–86,93]. Nesse estudo foi observado para os sensores Cu/PLA-CB, (a) e (b), valores de separação entre potenciais de picos (ΔE_p) de aproximadamente 0,334 V e uma razão entre $I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$ diferente de 1,0 o que sugere um comportamento quase-reversível da sonda redox [94]. O comportamento da resposta da sonda redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ apresenta reversibilidade sobre eletrodos de trabalho como o GCE, entretanto, a não-uniformidade da distribuição de material condutor em eletrodos impressos via FFF, pode levar à cinéticas de reação mais lentas, o que, por sua vez, causa a observação de um comportamento quase-reversível [84,85,93].

Figura 9. Voltamogramas cíclicos para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) utilizando sensor impresso em 3D à base de Cu/PLA-CB (a) antes e (b) após passar pelo processo de ativação eletroquímica com $\text{KOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$, potencial aplicado em $+1,8 \text{ V}$ durante 900s.

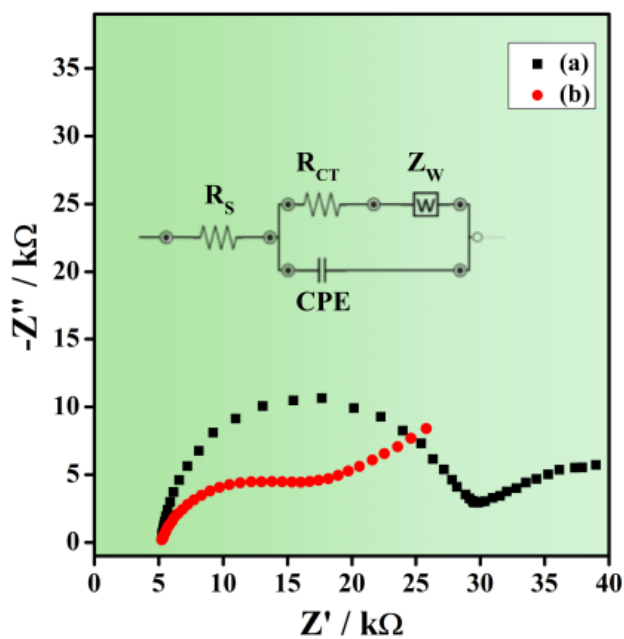


Fonte: O Autor (2025).

A EIS foi utilizada para avaliar a resistência à transferência de carga (R_{ct}) de forma a complementar os resultados dos estudos voltamétricos expressos pela Figura 9. A Figura 10 demonstra os diagramas de Nyquist obtidos para o sensor Cu/PLA-CB, (a) sem ativar e (b) ativado eletroquimicamente com solução de $\text{KOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e potencial aplicado em $+1,8 \text{ V}$ durante 900s.

Os valores de R_{ct} obtidos foram de $23,68 \text{ k}\Omega$ e $8,53 \text{ k}\Omega$ para os sensores (a) e (b), respectivamente, o que representa uma diminuição de aproximadamente 2,8 vezes. Essa redução confirma os resultados voltamétricos apresentados na Figura 9, indicando melhora na condutividade interfacial e confirmando a efetividade do processo de ativação eletroquímica na remoção da camada isolante de PLA.

Figura 10. Diagramas de Nyquist utilizando $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para (a) Cu/PLA-CB sem ativação e (b) Cu/PLA-CB ativado eletroquimicamente. *Inset:* Circuito de Randles proposto para o sistema, onde R_{ct} representa a resistência à transferência de carga, R_s a resistência da solução, CPE é o elemento de fase constante (*Constant Phase Element - CPE*) e Z_w é a impedância de Warburg.



Fonte: O Autor (2025).

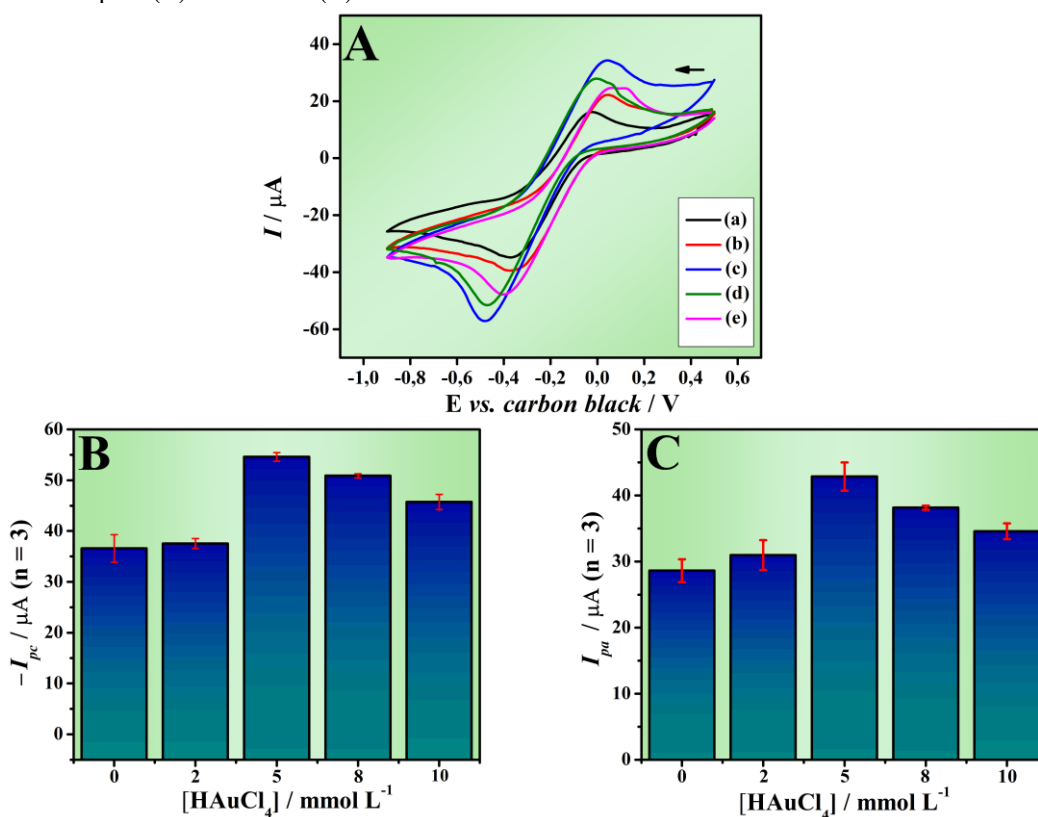
O mecanismo responsável por essa transformação envolve a hidrólise alcalina eletroassistida do PLA, conforme dados reportados na literatura que empregam metodologias similares [85,86,93]. A aplicação de potencial positivo em meio fortemente alcalino favorece a quebra das ligações éster da cadeia polimérica, levando à formação de oligômeros e monômeros, como o ácido lático. Como resultado, a matriz polimérica superficial é degradada, expondo os materiais condutores anteriormente recobertos por essa matriz (Cu e CB). Adicionalmente, a formação de uma superfície rugosa e mais porosa contribui para o aumento da área eletroativa, o que também favorece os processos de transferência de carga nas etapas subsequentes [85,86,93].

5.2 GALVANIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO WE

A reação de galvanização empregada neste trabalho pode ser representada pela seguinte equação global: $3 \text{ Cu}_{(s)} + 2 \text{ AuCl}_4^{-}(\text{aq}) \rightarrow 2 \text{ Au}_{(s)} + 3 \text{ Cu}^{2+}(\text{aq}) + 8 \text{ Cl}^{-}(\text{aq})$. Com o objetivo de otimizar o processo de galvanização da superfície do WE, foi inicialmente avaliado o efeito da concentração da solução de HAuCl_4 ($2,0$ a $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$) durante 5 min. A escolha dessa faixa de concentração e tempo baseou-se em estudos reportados na literatura [81,90].

A Figura 11A mostra os voltamogramas para o estudo da concentração da solução de HAuCl_4 utilizada na galvanização. Os valores de intensidade de corrente catódica (Figura 11B) e anódica (Figura 11C) apresentam um ganho quando se observa o aumento da concentração de HAuCl_4 até $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em seguida há uma redução dessas intensidades em concentrações maiores. Dessa forma, a concentração de HAuCl_4 adotada na sequência dos estudos foi a de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Figura 11. (A) Voltamogramas cíclicos para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) ($\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$) sobre Cu/PLA-CB galvanizado com Au (Au-Cu/PLA-CB) nas seguintes concentrações de HAuCl_4 : (a) 0,0, (b) 2,0, (c) 5,0, (d) 8,0 e (e) $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Gráficos de barra contendo os dados de correntes de pico (B) catódicas e (C) anódicas.

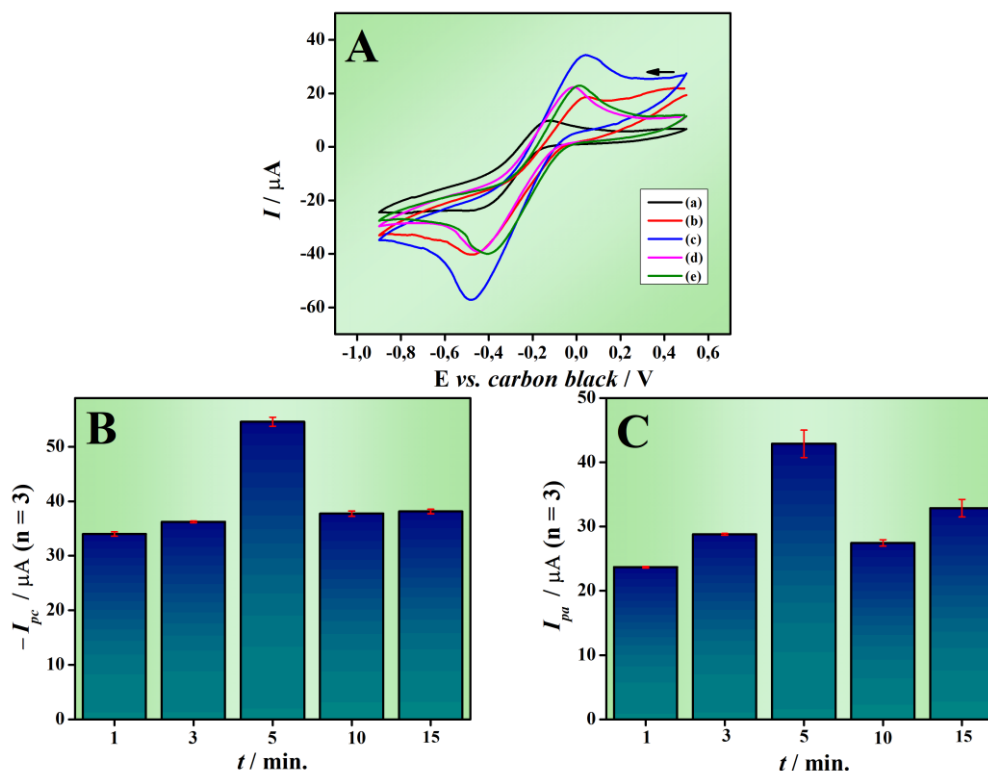


Fonte: O Autor (2025).

A Figura 12A apresenta os voltamogramas obtidos para a sonda redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) para o estudo do tempo de galvanização, variado entre 1 a 15 min, conforme descrito na literatura [81,90]. Os resultados obtidos indicaram um aumento progressivo da intensidade de corrente entre 1 e 5 min, com ganho expressivo em 5 min, seguido de decréscimo para tempos superiores.

As Figuras 12B e 12C evidenciam o comportamento dos valores de I_{pc} e I_{pa} em função do tempo de galvanização, onde a maior intensidade obtida foi com o tempo de 5 min, sendo assim o tempo selecionado para os estudos posteriores.

Figura 12. (A) Voltamogramas cíclicos para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) ($\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$) sobre Cu/PLA-CB galvanizado com Au (Au-Cu/PLA-CB) nos tempos: (a) 1, (b) 3, (c) 5, (d) 10 e (e) 15 min. Gráficos de barra contendo os dados de correntes de pico (B) catódicas e (C) anódicas.

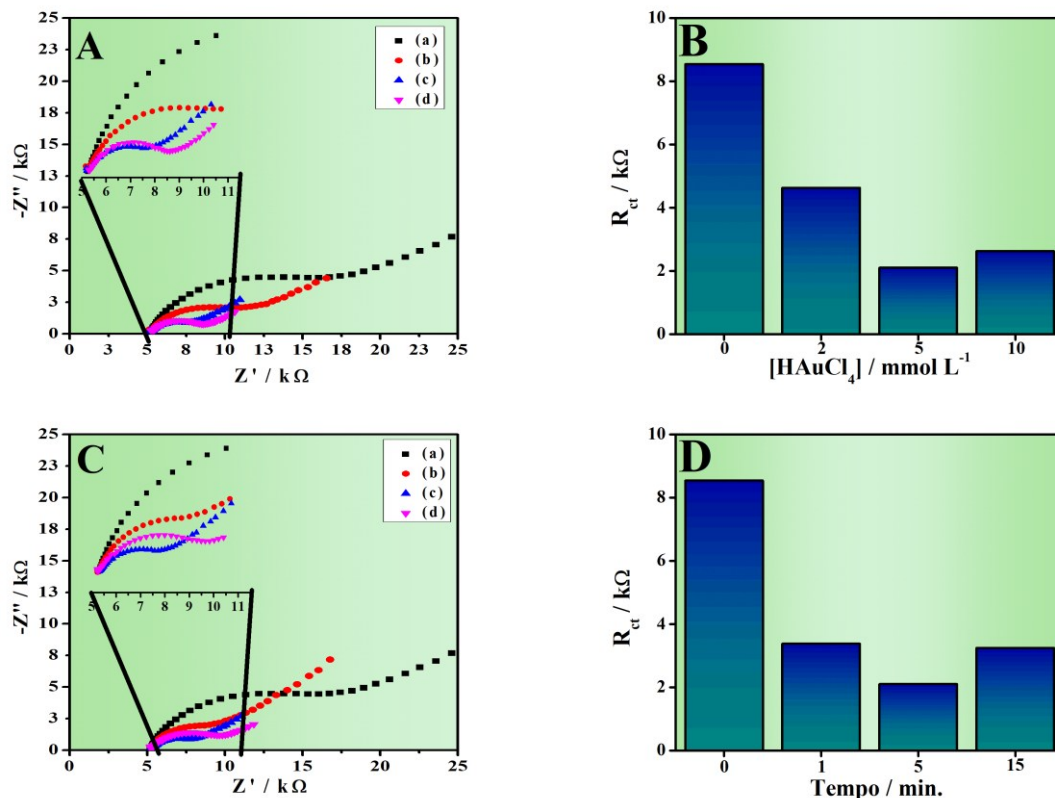


Fonte: O Autor (2025).

As Figuras 13A e 13C mostram os gráficos de Nyquist obtidos para os sensores galvanizados com diferentes concentrações de HAuCl_4 ((a) 2,0, (b) 5,0, (c) 8,0 e (d) 10 mmol) e em diferentes tempos galvanização ((a) 1, (b) 3, (c) 5 e (d) 15 min), respectivamente, utilizando uma solução de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como sonda redox.

Os dados apresentados nas Figuras 13B e 13D mostram que os valores de R_{ct} acompanham o comportamento observado nas análises voltamétricas: redução na faixa de 2,0 a 5,0 mmol L^{-1} , seguida de aumento em concentrações superiores, tendência que também se repete no estudo do tempo de contato. Ao final do processo de galvanização, o sensor otimizado apresentou R_{ct} de aproximadamente 2,10 $\text{k}\Omega$, evidenciando a facilitação da transferência de elétrons entre a sonda redox e a superfície do WE, com desempenho superior em relação ao eletrodo não galvanizado.

Figura 13. Diagramas de Nyquist utilizando uma solução de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sobre Au-Cu/PLA-CB em condições de (A) concentrações de HAuCl_4 de: (a) 2,0, (b) 5,0, (c) 8,0 e (d) 10 mmol L^{-1} com tempo fixo de 5 min de reação e (B) tempos de reação de (a) 1, (b) 3, (c) 5 e (d) 15 min com concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Gráficos de barra representando os valores de R_{ct} obtidos para (B) diferentes concentrações de HAuCl_4 e (C) diferentes tempos de reação.



Fonte: O Autor (2025).

5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS SUPERFÍCIES DOS SENSORES GALVANIZADOS

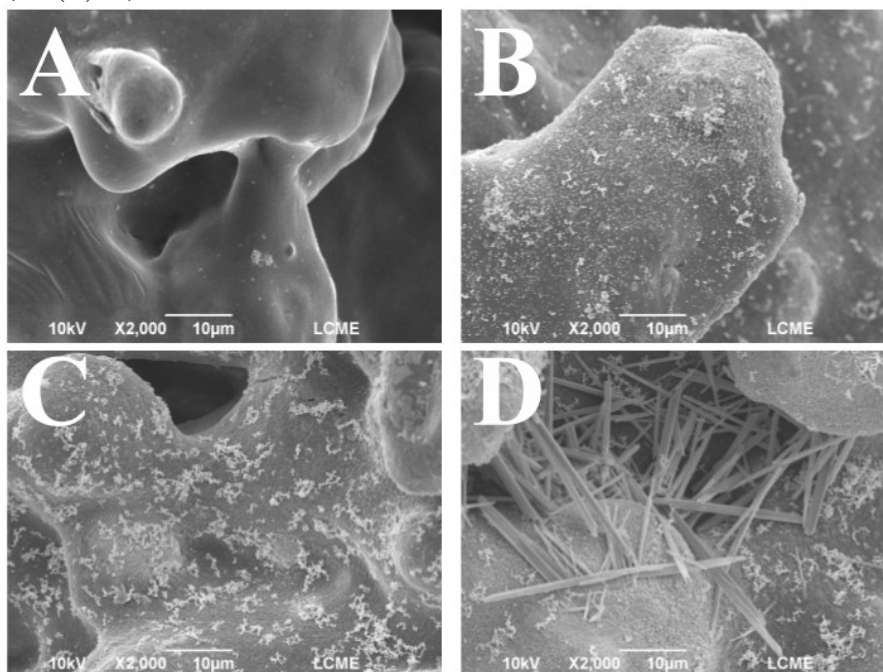
Os sensores Au-Cu/PLA-CB galvanizados em diferentes concentrações de HAuCl_4 e em diferentes tempos, foram caracterizados por SEM para acompanhar as modificações morfológicas na superfície do WE.

Na Figura 14A observa-se a rugosidade resultante da ativação eletroquímica e pequenas protuberâncias associadas às partículas de cobre. Após galvanização com a solução de HAuCl_4 $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 14B), é possível observar partículas de ouro distribuídas de forma irregular, formando pequenos aglomerados. Em $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 14C), essas partículas passam a se organizar em aglomerados maiores e mais uniformes, ampliando a condutividade e a área superficial disponível, favorecendo a adsorção de moléculas e a futura formação da SAM.

Em solução de HAuCl_4 10 mmol L^{-1} (Figura 14D), nota-se crescimento em formato de agulhas, que reduz a área efetiva de contato e a rugosidade da superfície, tornando a adsorção

menos eficiente. Esse comportamento morfológico está de acordo com os resultados eletroquímicos que indicaram diminuição da intensidade de corrente nessa condição.

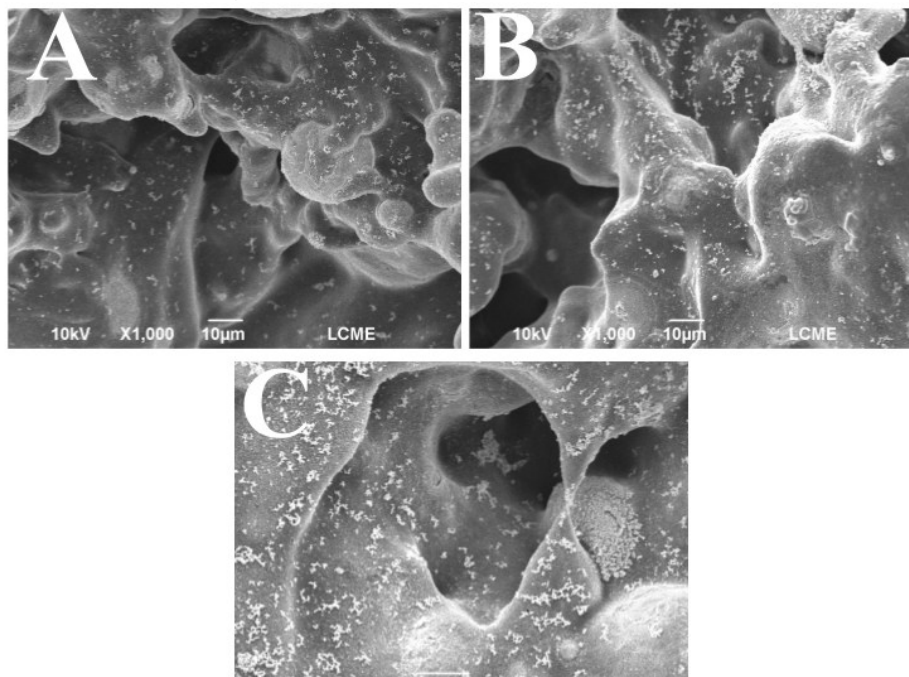
Figura 14. Imagens de SEM da superfície de trabalho dos sensores Au-Cu/PLA-CB galvanizados com: (A) 0,0, (B) 2,0, (C) 5,0 e (D) 10,0 mmol L⁻¹ de HAuCl₄ durante 5 min.



Fonte: O Autor (2025).

A morfologia da superfície também foi avaliada em função do tempo de galvanização (1, 3 e 15 min.), conforme apresentado na Figura 15. Após 1 min de galvanização (Figura 15A), observa-se uma baixa quantidade de partículas depositadas, em comparação com a Figura 14C, que apresenta recobrimento mais evidente. No tempo de 3 min (Figura 15B), nota-se um aumento aparente no número de partículas em relação à Figura 15A, embora sem diferença significativa, o que está em concordância com as respostas de corrente obtidas. Em 15 min (Figura 15C), há um incremento expressivo na deposição de partículas em comparação às Figuras 15A e 15B, resultando em uma cobertura mais uniforme da superfície, porém com formação de mais aglomerados de partículas, o que também leva a queda na área superficial do eletrodo. Vale destacar que o aumento do tempo de galvanização não promove mudanças morfológicas no formato das partículas, ao contrário do observado quando se varia a concentração.

Figura 15. Imagens de SEM da superfície de trabalho dos sensores Au-Cu/PLA-CB galvanizados durante: (A) 1, (B) 3 e (C) 15 min com HAuCl_4 $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

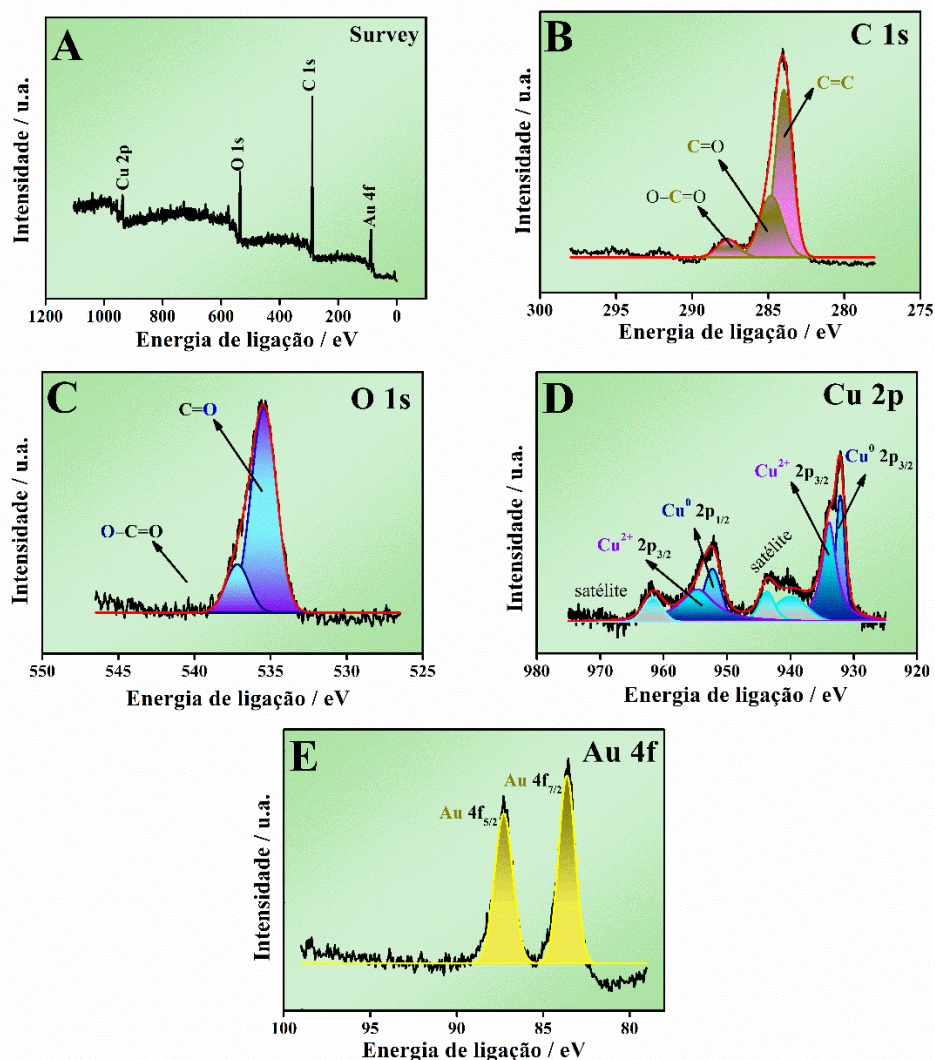


Fonte: O Autor (2025).

Espectro Survey (Figura 16A) e espectros de XPS de alta resolução (Figuras 16B, 16C, 16D e 16E) da superfície do WE após galvanização foram obtidos a fim de se comprovar a natureza química das espécies presentes.

O espectro Survey (Figura 16A) indica a presença de Cu 2p (pico em 932,8 eV), O 1s (534,7 eV), C 1s (289,5 eV) e Au 4f (89,3 eV). A presença e alocamento dos picos observados no espectro Survey corroboram os estudos eletroquímicos (CV e EIS) e de microscopia (SEM) em relação à deposição do Au sobre o WE, bem como se aproximam de resultados reportados na literatura [81,93]. Ao realizar a análise da faixa de energia em alta resolução para o C 1s (Figura 16B), é possível observar o desdobramento de três picos, sendo um em 287,7 eV atribuído à ligações do tipo O–C=O referente a cadeia polimérica e oligomérica do PLA não removido pelo tratamento eletroquímico [84,93]. O pico em 284,9 eV é atribuído à ligação C=O, advinda da estrutura do PLA, seja na forma de ésteres ou dos monômeros (ácido lático) [84,93]. Por fim, há presença de um pico de alta intensidade em 284,0 eV, atribuído à ligações do tipo C=C, características do material carbonáceo exposto após o processo de ativação eletroquímica realizado [84,93].

Figura 16. (A) Espectro Survey e espectros de XPS de alta resolução para (B) C 1s, (C) O 1s, (D) Cu 2p e (E) Au 4f para o WE após galvanização com solução de HAuCl_4 5 mmol L^{-1} durante 5 min.



Fonte: O Autor (2025).

O desdobramento do pico de energia de ligação observado para o O 1s em alta resolução (Figura 16C) apresentou picos de energia em 537,2 eV e 535,48 eV, que corroboram a presença dos grupos funcionais observados em relação ao espectro do C 1s [84,93].

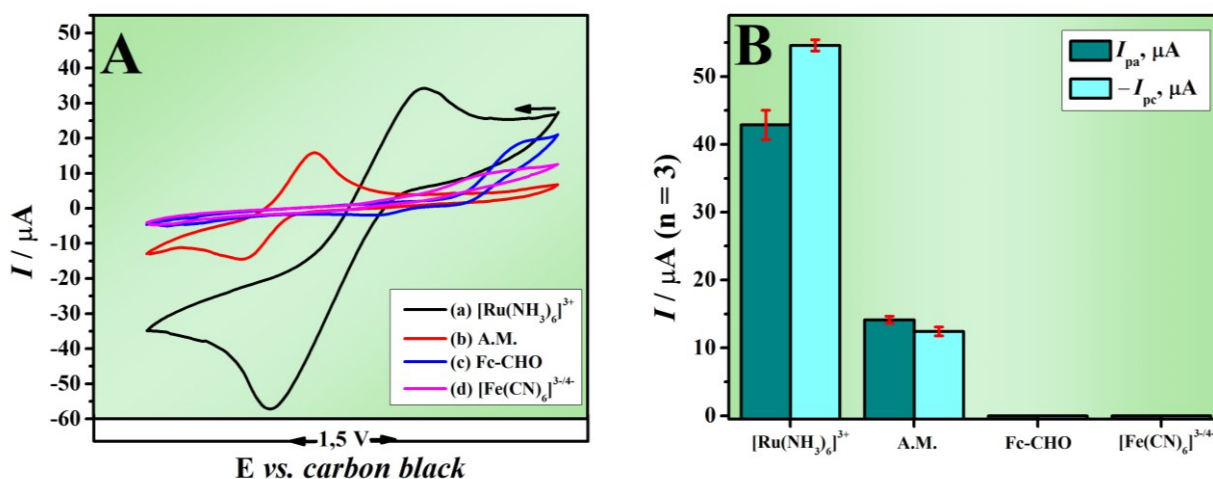
A Figura 16D corresponde ao espectro de alta resolução para o Cu 2p, onde é possível observar múltiplos picos de energia, sendo eles em: 961,8, 954,6, 952,1, 943,6, 939,7, 933,9 e 932,1 eV. O par de picos de energia de 952,1 e 932,1 eV correspondem, respectivamente, aos orbitais $2p_{1/2}$ e $2p_{3/2}$ do cobre metálico remanescente na estrutura do eletrodo galvanizado [80,81,99]. O par 954,6 e 933,9 eV são atribuídos aos orbitais $2p_{1/2}$ e $2p_{3/2}$ do cobre em seu estado de oxidação 2+, gerado pelo processo de galvanização [80,81,99]. Os demais picos, são chamados de picos satélites, característicos da análise de Cu^{2+} via XPS [80,81,99]. Esses picos podem ser gerados por processos conhecidos como *shake-ups* energéticos, onde parte da energia do fotoelétron excitado é revertida para a excitação de um elétron da camada de valência

para a banda de condução [99]. Bem como, podem ser gerados por processos de transferência de carga do ligante para o metal, gerando uma vacância no ligante, observado especialmente em espécies de CuO [99]. Vale ressaltar que estes efeitos têm forte correlação com a configuração semipreenchida (d^9) do Cu^{2+} , uma vez que, ambos levam à um preenchimento total dos orbitais d, minimizando assim a energia destes [99]. Por isso, não foi observado os mesmos efeitos para o Cu^0 que já possui configuração d^{10} .

5.4 SELEÇÃO DA Sonda REDOX

As (bio)moléculas alvo dos imunossensores eletroquímicos não sofrem processos redox na faixa de potencial da maioria dos eletrodos utilizados em eletroanálises ($-2,0$ a $+2,0$ V) [56,94]. Sendo assim, em sistemas *label-free*, há a necessidade de seleção de uma sonda redox para que se faça o monitoramento da resposta eletroquímica. Para isso, foram estudadas quatro sondas redox ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (a), A.M. (b), Fc-CHO (c) e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (d)) na concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ através da técnica de CV (Figura 17).

Figura 17. (A) Voltamogramas cíclicos para soluções $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de: (a) $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, (b) A.M., (c) Fc-CHO e (d) $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4). ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$); (B) Gráfico de barras representando as respostas de corrente anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}).



Fonte: O Autor (2025).

A partir da Figura 17A é possível observar que o sensor apresentou respostas expressivas de corrente para sonda redox de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, seguida de uma queda considerável da resposta (cerca de 3,7 vezes) para a sonda redox de A.M., bem como não houve resposta para Fc-CHO e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, ambas as sondas com centro redox baseado em Fe^{2+} que geram espécies de Fe^{3+} durante o ciclo voltamétrico. Como abordado anteriormente, o ouro é um metal caracterizado como um ácido mole de Pearson devido à alta polarizabilidade proveniente dos

efeitos relativísticos, enquanto o par de íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ são tidos como duros, pela sua menor polarizabilidade, dessa forma diminuindo a efetividade da transição eletrônica em relação à centros metálicos mais compatíveis com a maciez do ouro como o Ru^{3+} [74,78].

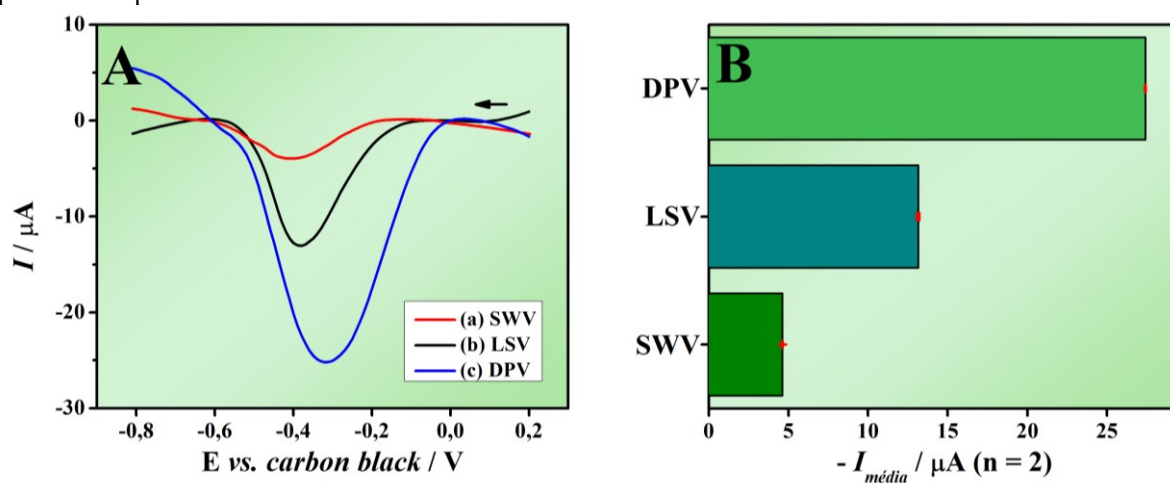
Alternativamente pode-se explicar a não obtenção de resposta para o Fc-CHO, devido à baixa polaridade da sonda quando não modificada com grupos nitro ou tiol que interagem fortemente com o ouro, logo, sem esses grupos, o acoplamento dessa espécie à superfície do eletrodo pode ser limitada [100].

Dessa forma, como a maior resposta de corrente observada foi com a sonda redox de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, esta foi selecionada para estudos posteriores.

5.5 SELEÇÃO E OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA VOLTAMÉTRICA

Foram selecionados três diferentes técnicas voltamétricas: a voltametria de onda quadrada (do inglês, *square wave voltammetry* – SWV) (Figura 18A, voltamograma a), voltametria de varredura linear (do inglês, *linear sweep voltammetry* – LSV) (Figura 18A, voltamograma b), e a voltametria de pulso diferencial (do inglês, *differential pulse voltammetry* – DPV) (Figura 18A, voltamograma c). Para os experimentos utilizou-se a sonda redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Figura 18. (A) Voltamogramas para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) utilizando as técnicas de: (a) SWV, (b) LSV e (c) DPV; (B) Gráfico de barras representando as correntes de pico obtidas para cada uma das técnicas avaliadas.

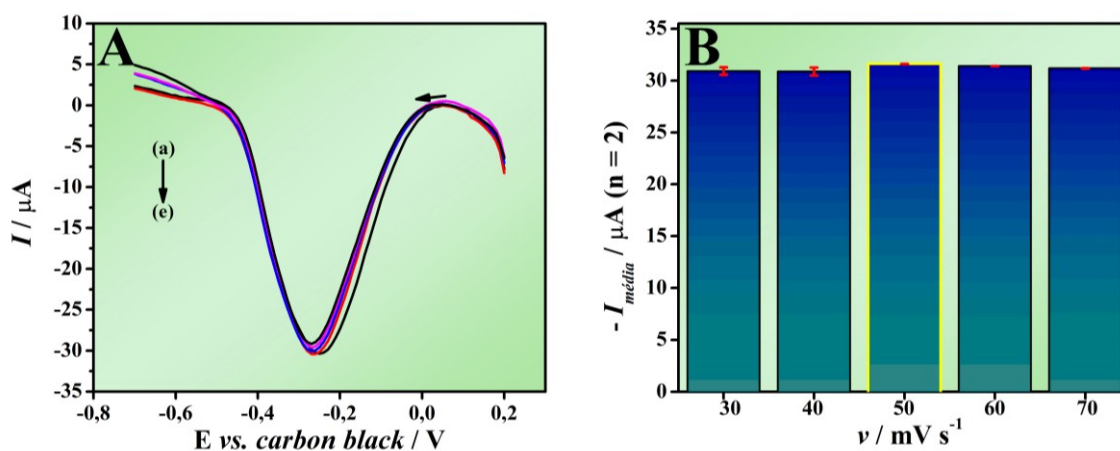


Fonte: O Autor (2025).

O estudo demonstrou uma intensidade de corrente maior para a LSV em relação à SWV (Figura 18B). A SWV é uma técnica com rápida aplicação de potencial, favorecendo reações de cinética rápida [94]. Porém, a não-uniformidade da distribuição dos sítios condutores na matriz polimérica, pode levar a processos redox mais lentos quando comparados à eletrodos convencionais como o GCE [101]. Sendo assim, a aplicação de potencial rápido da SWV pode desfavorecer o registro da corrente. Por outro lado, a DPV registrou a maior corrente, uma vez que, a aplicação de potencial na DPV é mais lenta em relação a SWV, favorecendo reações de cinéticas mais lentas, sendo a técnica selecionada para os demais estudos.

Com a técnica selecionada (DPV), foram otimizados os seguintes parâmetros: velocidade de varredura (v), amplitude de pulso (E_{pulso}), tempo de pulso (t_{pulso}), e incremento de potencial (ΔE). A v foi variada de 30 a 70 mV s^{-1} . Como apontado na Figura 19A e 19B, não houve variação significativa na intensidade de corrente, sendo selecionada, assim, a velocidade intermediária de 50 mV s^{-1} .

Figura 19. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 0,05 mmol L^{-1} em solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 7,4) para v : (a) 30, (b) 40, (c) 50, (d) 60 e (e) 70 mV s^{-1} ; (B) Gráfico de barras representando as intensidades das correntes de pico registradas para cada uma das v .

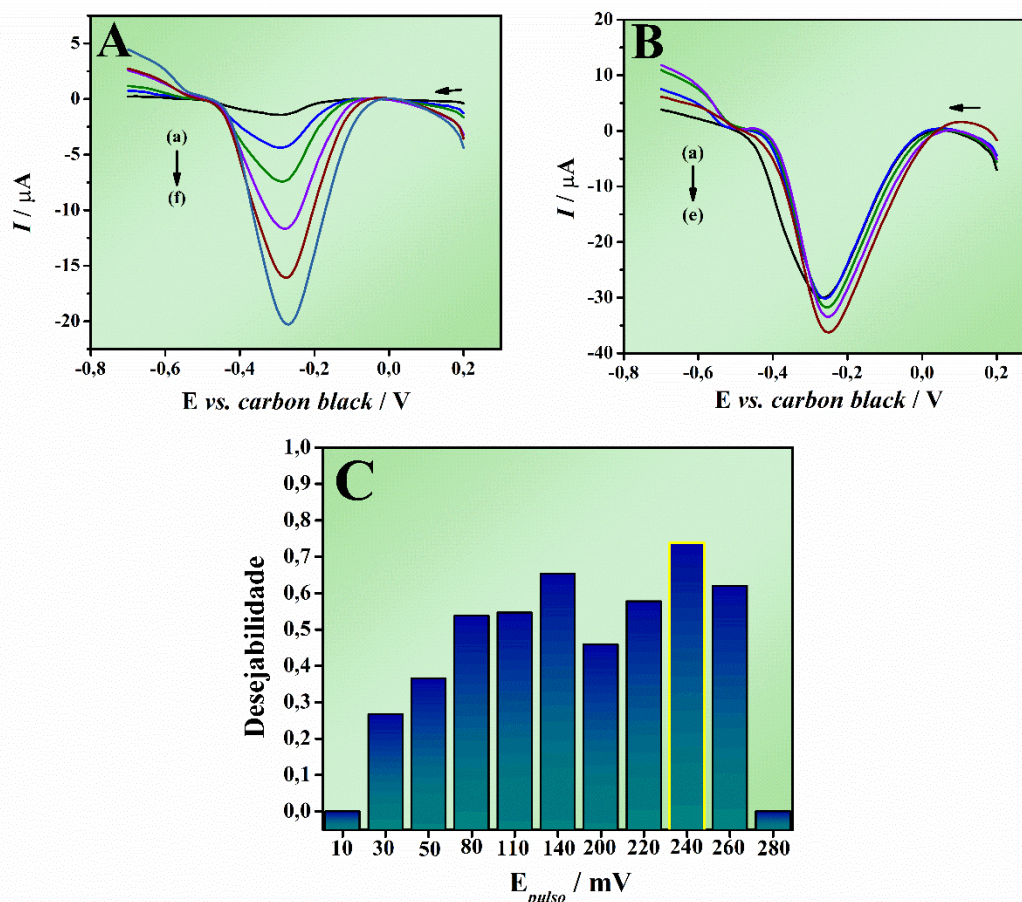


Fonte: O Autor (2025).

A E_{pulso} foi então estudada na faixa de 10 a 280 mV (Figura 20A e 20B). A E_{pulso} constitui um fator determinante na razão sensibilidade/seletividade do método, pois o aumento desse parâmetro tende a elevar a resposta de corrente em função da maior diferença de potencial aplicada. No entanto, a ampliação dessa faixa pode também resultar no registro de correntes associadas a processos não relacionados ao analito de interesse, ocasionando o alargamento do pico [94]. Assim, a função de desejabilidade de Derringer foi empregada para otimizar simultaneamente a maximização da corrente e a minimização do alargamento do pico [92].

Pode-se notar que o ponto de deseabilidade mais próxima à 1, ou seja, mais próxima do comportamento ideal entre intensidade de corrente de pico e alargamento do pico, foi o ponto onde $E_{\text{pulso}} = 240$ mV (Figura 20C), sendo esse parâmetro adotado para as medidas seguintes.

Figura 20. (A) Voltamogramas de pulso diferencial realizados em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nas seguintes E_{pulso} : (a) 10, (b) 30, (c) 50, (d) 80, (e) 110 e (f) 140 mV; (B) Voltamogramas de pulso diferencial realizados em $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nas seguintes E_{pulso} : (a) 200, (b) 220, (c) 240, (d) 260 e (e) 280 mV; (C) Gráfico de barras construído a partir da aplicação da função deseabilidade aos dados obtidos de (A) e (B).

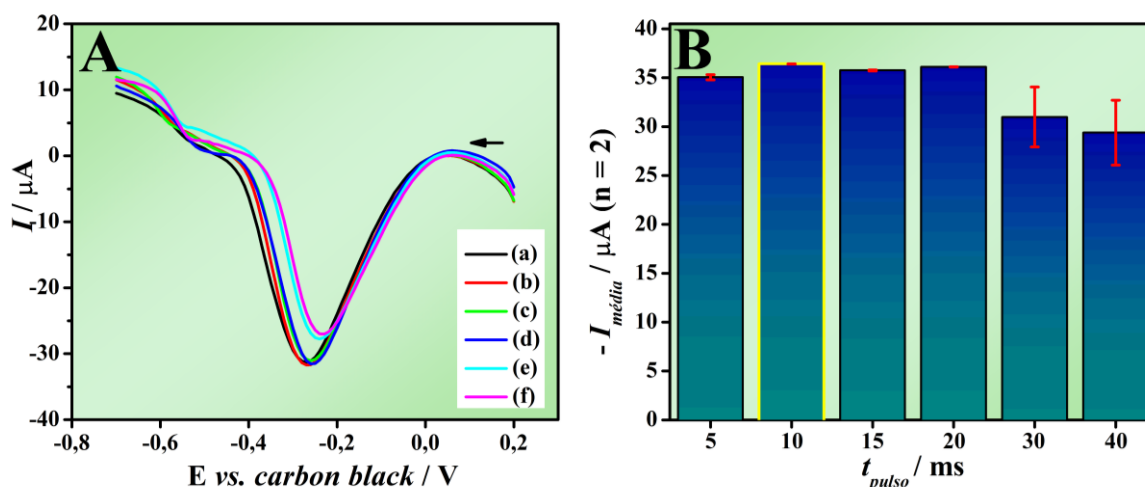


Fonte: O Autor (2025).

O seguinte parâmetro a ser otimizado foi o t_{pulso} , variando-o de 5 a 40 ms (Figura 21A). Observando a Figura 21B, é possível verificar variações muito sutis entre as intensidades de corrente entre 5 e 20 ms, com um decréscimo mais acentuado em 30 e 40 ms, não havendo diferença significativa entre si. Tempos de pulso mais longos, podem gerar decréscimo na corrente faradaica, devido à limitação por difusão, como proposto pela Equação de Cottrell [94].

Dessa forma, o tempo selecionado como ótimo foi o de 10 ms, sendo utilizado para o restante dos estudos.

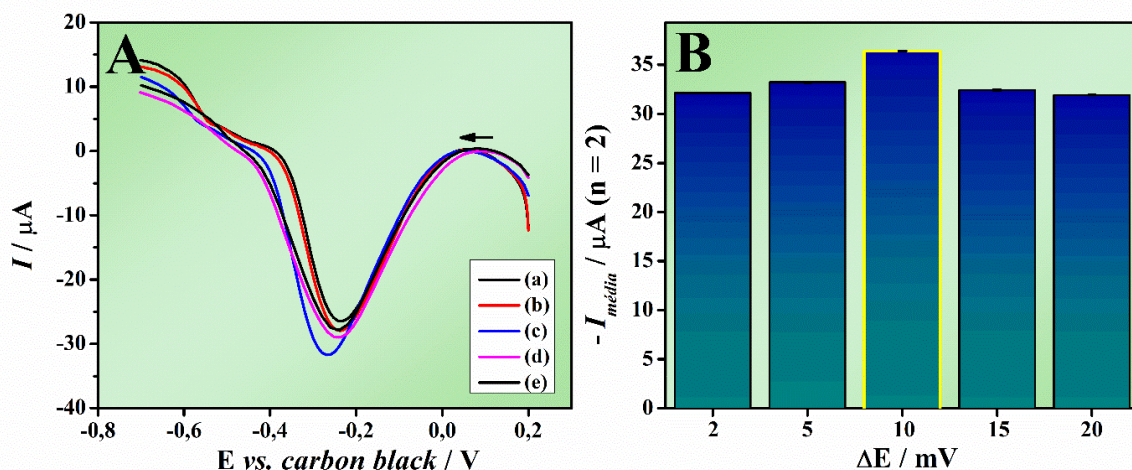
Figura 21. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nos seguintes t_{pulso} : (a) 5, (b) 10, (c) 15, (d) 20, (e) 30 e (f) 40 mV s^{-1} ; (B) Gráfico de barras representando as correntes de pico obtidas para cada um dos t_{pulso} .



Fonte: O Autor (2025).

Por fim, o último parâmetro analisado foi o ΔE , estudado de 2 a 20 mV, onde observou-se um ganho na intensidade da corrente de pico entre 2 e 10 mV, acompanhado de um decréscimo nos valores acima deste, como apresentado na Figura 22A e 22B.

Figura 22. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nos seguintes ΔE : (a) 2, (b) 5, (c) 10, (d) 15 e (e) 20 mV; (B) Gráfico de barras representando as correntes de pico obtidas para cada um dos ΔE .



Fonte: O Autor (2025).

Dessa forma, para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados os seguintes parâmetros otimizados da DPV: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $E_{\text{pulso}} = 240 \text{ mV}$, $t_{\text{pulso}} = 10 \text{ ms}$ e $\Delta E = 10 \text{ mV}$.

5.6 CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR

5.6.1 Modificação da superfície do WE com a SAM

Para a imobilização das moléculas do anticorpo sobre a superfície do WE, necessita-se da construção de uma superfície adequada, dessa forma, inicialmente foi estudada a construção da SAM usando o 11-MUA. O tempo de contato da solução etanólica de 11-MUA $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ [32,69,77] com a superfície do WE foi avaliado em uma faixa de 1 a 24 h. A Figura 23A mostra uma representação esquemática da superfície do WE após o processo de formação da SAM com 11-MUA.

A Figura 23B mostra os voltamogramas obtidos ao imobilizar 11-MUA sobre a superfície do sensor Au-Cu/PLA-CB na faixa de tempo de 0 (controle) a 24 h, utilizando a sonda redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4). O gráfico de barras (Figura 23C) representa a variação de corrente (ΔI) registrado para cada tempo de imobilização em relação à corrente registrada no voltamograma controle.

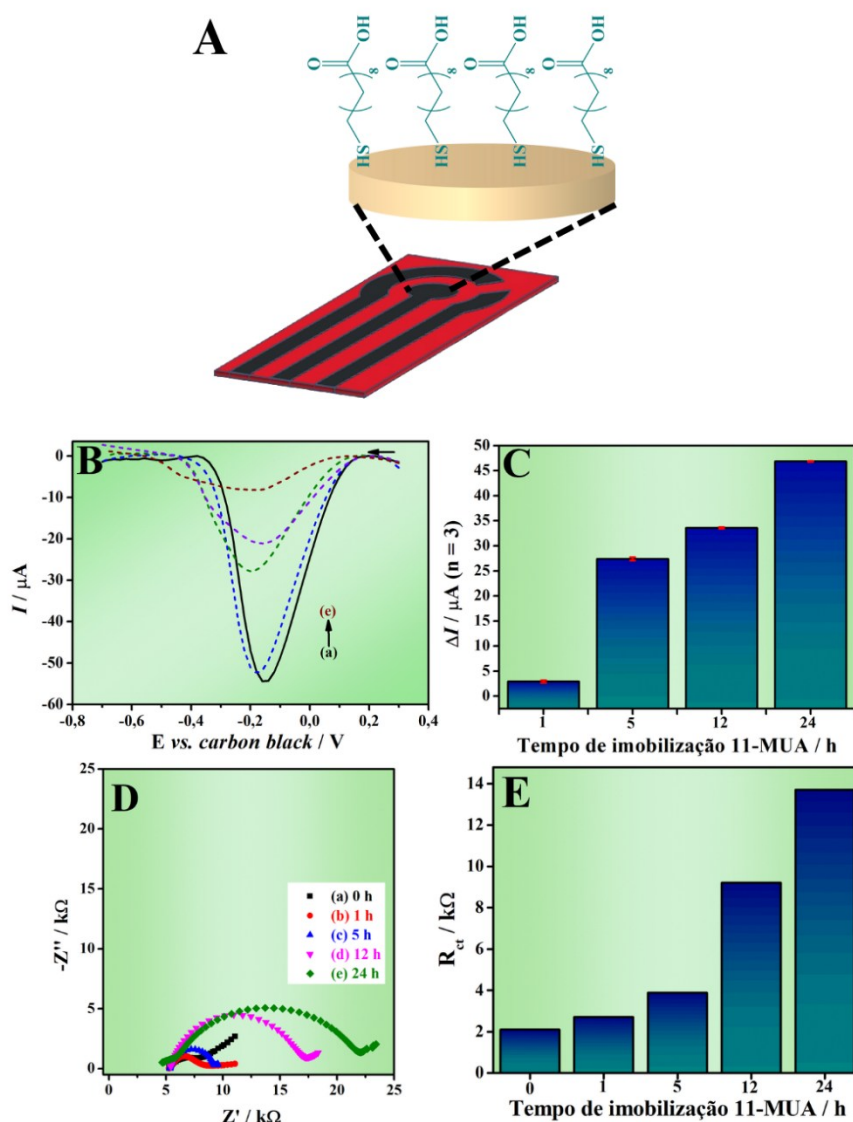
É possível identificar um comportamento de decaimento crescente na intensidade de corrente ao longo do tempo, tendo como voltamograma de controle, ou seja, sem o agente de modificação, a curva (a) da Figura 23B. Isso indica que com o aumento do tempo de contato do 11-MUA com a superfície de Au do WE, mais ligações Au-S se formam, o que torna esses sítios metálicos menos disponíveis, bem como adicionam-se mais cadeias carbônicas longas, pouco condutivas e que dificultam a difusão da sonda redox até a superfície do WE [49,65,102].

Medidas de EIS também foram realizadas para obter informações relacionadas ao valor de R_{ct} da superfície do sensor, para que se complementem os estudos voltamétricos. A Figura 23D mostra os gráficos de Nyquist obtidos utilizando uma sonda redox de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para cada um dos tempos de imobilização do 11-MUA, incluindo o sensor controle. Os valores de R_{ct} obtidos, representados na Figura 23E, demonstram um perfil semelhante aos valores de intensidade de corrente o que indica a congruência entre os dados acerca da deposição de uma espécie não-eletroativa e resistiva, nesse caso, o 11-MUA.

Apesar da indicação de que o tempo favorece a ligação de mais moléculas de 11-MUA à superfície de Au, o tempo selecionado como ótimo foi de 5h. Isso se deve aos seguintes fatores: o perfil voltamétrico observado na Figura 23B (d) e (e), apresenta alargamento e perda de definição do sinal analítico, o que poderia prejudicar a seletividade do método nas etapas subsequentes; tendo em vista que as próximas etapas levam a diminuição da intensidade de

corrente e um decaimento muito abrupto logo na primeira etapa poderia comprometer o registro de corrente.

Figura 23. (A) Representação do processo de imobilização do 11-MUA; (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nos seguintes tempos de imobilização de 11-MUA: (a) 0 (Voltamograma controle), (b) 1, (c) 5, (d) 12 e (e) 24 h; (C) Gráfico de barras representando o decréscimo de corrente (ΔI) registrado para cada tempo de imobilização em relação à corrente registrada no voltamograma controle; (D) Gráficos de Nyquist obtidos para cada tempo de imobilização: (a) 0 (controle), (b) 1, (c) 5, (d) 12 e (e) 24 h; (E) Gráfico de barras representando os valores de R_{ct} observados em cada tempo de imobilização.

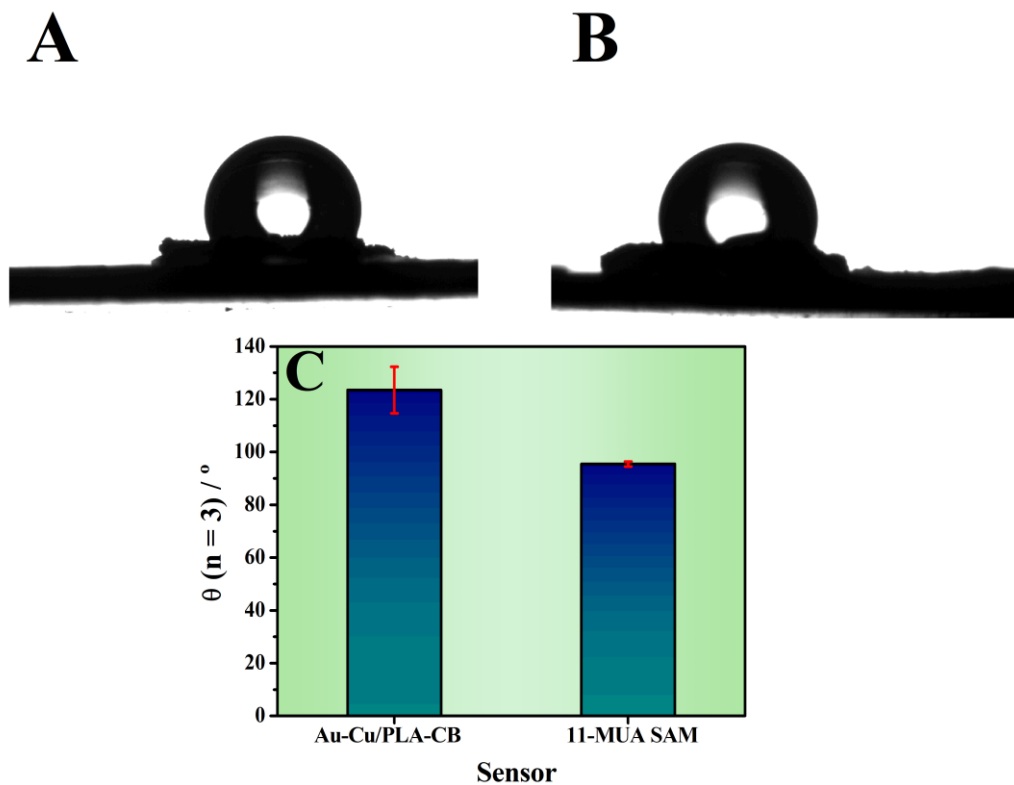


Fonte: O Autor (2025).

Além da caracterização eletroquímica (DPV e EIS), medidas de ângulo de contato foram realizadas para confirmação da imobilização da SAM sobre a superfície do sensor. As Figuras 24A e 24B são imagens de uma gota de água sobre a superfície do sensor Au-Cu/PLA-CB, antes e após o processo de imobilização do 11-MUA, respectivamente. A partir destas

imagens, é possível identificar um achatamento da gota depositada, apontando para um aumento da molhabilidade da superfície com a SAM. A inserção de grupos carboxilados, como os presentes no 11-MUA, tendem a aumentar a molhabilidade da superfície (diminuindo o ângulo de contato, θ) [32,49,72]

Figura 24. Imagens obtidas com goniômetro para gota de água sobre a superfície do eletrodo (A) Galvanizado e (B) com a SAM imobilizada; (C) Gráfico de barras representando os valores de ângulo de contato obtidos para cada um dos eletrodos de trabalho.



Fonte: O Autor (2025).

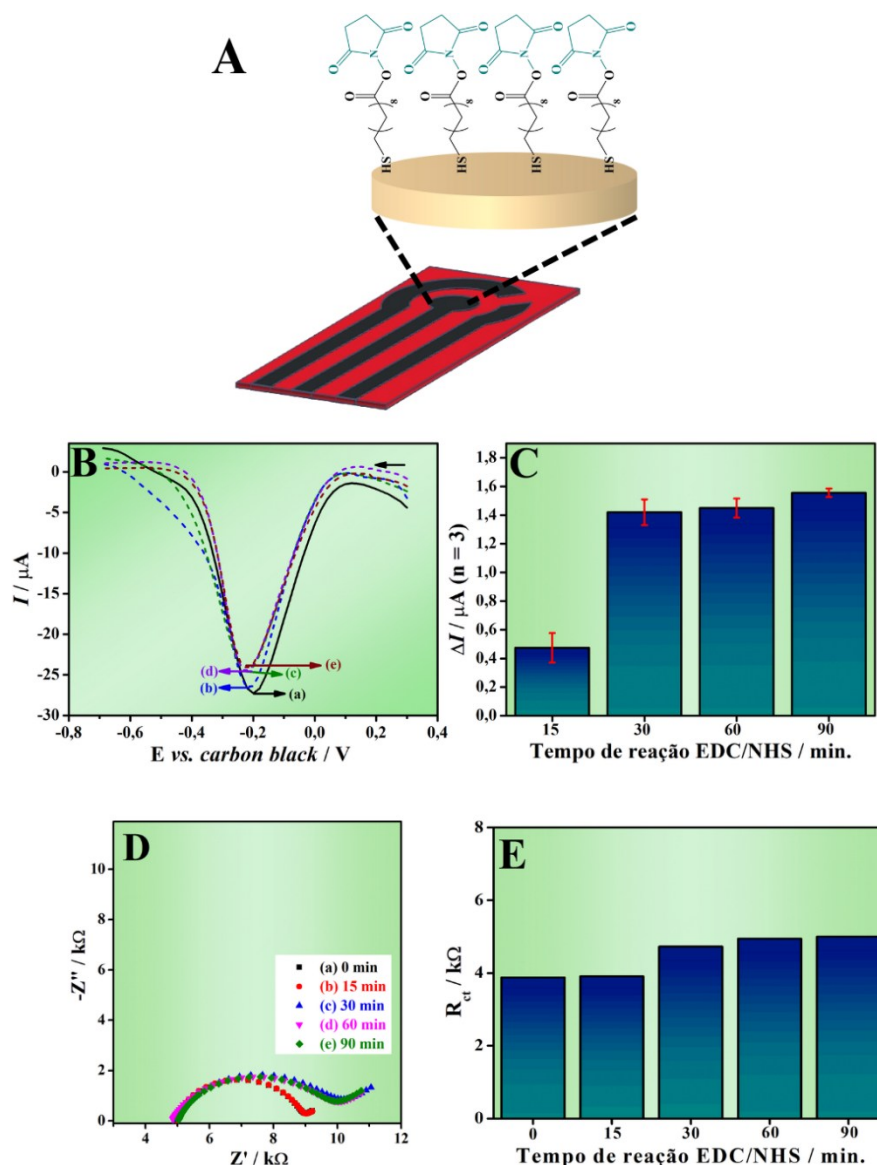
O valor de θ para o eletrodo galvanizado foi de 123,51 ($\pm 8,81$) (Figura 24C) e após a imobilização da SAM, foi de 95,48 ($\pm 0,94$) (Figura 24C), indicando o aumento na molhabilidade da superfície como indicado pela literatura [32,49,72].

5.6.2 Formação do par EDC/NHS

A fim de criar grupos carboxílicos reativos o suficiente para a posterior formação de ligação amida com o anticorpo (IFX), foi otimizado o tempo de contato da solução do par EDC/NHS na proporção de 2nM:5nM com a superfície do eletrodo modificado com a SAM de

11-MUA. A Figura 25A mostra um esquema dos grupos carboxílicos do 11-MUA ativados pelo EDC/NHS a partir do mecanismo descrito na Figura 5.

Figura 25. (A) Representação do processo de reação com EDC/NHS; (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nos seguintes tempos de reação com EDC/NHS: (a) 0 (Voltamograma controle), (b) 15, (c) 30, (d) 60 e (e) 90 min; (C) Gráfico de barras representando o decréscimo de corrente (ΔI) registrado para cada tempo de reação em relação à corrente registrada no voltamograma controle; (D) Gráficos de Nyquist obtidos para cada tempo de reação: (a) 0 (controle), (b) 15, (c) 30, (d) 60 e (e) 90 min; (E) Gráfico de barras representando os valores de R_{ct} observados em cada tempo de reação.



Fonte: O Autor (2025).

As Figuras 25B e 25C demonstram uma variação de corrente (ΔI) consideravelmente menor em relação aos observados para o processo de imobilização do 11-MUA. Comportamento semelhante foi reportado na literatura [32,49,69] e se deve principalmente ao

tamanho consideravelmente menor das moléculas adicionadas e também ao fato de que não se ligam diretamente aos sítios condutivos da superfície do WE.

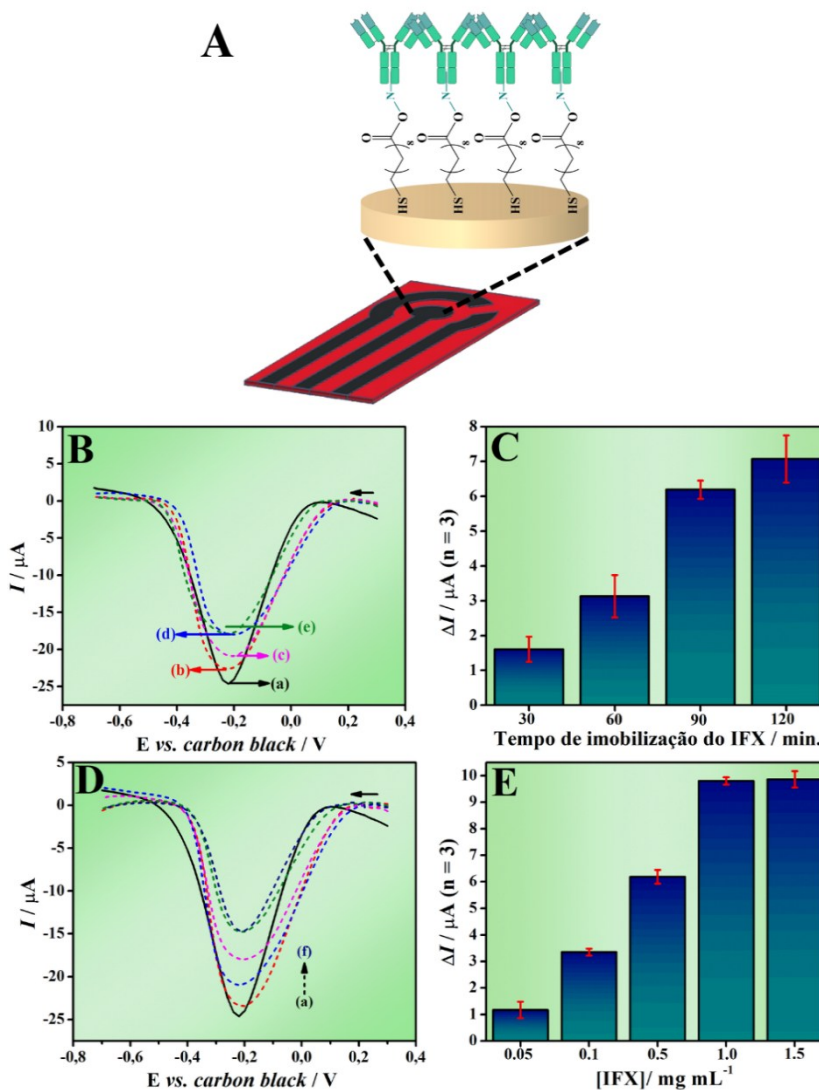
O tempo de 15 min apresentou baixo ΔI sem diferença significativa também de R_{ct} (Figuras 25D curva (b) e 25E), o que indica que este tempo de reação não é o suficiente para que os sítios de 11-MUA reajam com o par EDC/NHS de maneira efetiva. Com 30 min ou mais, percebe-se que não há diferença significativa entre os valores de ΔI e R_{ct} (Figuras 25D curva (c) e 25E), sendo um indicativo de que no tempo de 30 min há saturação da SAM com o EDC/NHS nas condições experimentais avaliadas, sendo então adotado esse tempo como parâmetro otimizado.

5.6.3 Imobilização do anti-TNF- α , Infliximabe

Após a modificação da superfície do WE com 11-MUA e otimização do tempo de reação do par EDC/NHS, a etapa seguinte consistiu na avaliação dos parâmetros de concentração e tempo de imobilização do anticorpo, IFX. Inicialmente, foram analisados tempos de imobilização entre 30 e 120 min, utilizando uma concentração de IFX de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. A Figura 26A mostra uma representação esquemática da formação da ligação amídica a partir da reação entre os grupos amino do anticorpo e os grupos carboxilados da SAM previamente ativada.

Os resultados, apresentados nas Figuras 26B e 26C, demonstram que ΔI (variação de corrente) aumenta de forma progressiva ao longo do intervalo estudado, refletindo maior quantidade de anticorpo imobilizado na superfície. Entretanto, a ausência de diferença significativa das respostas nos tempos de 90 e 120 min sugere que, a partir desse ponto, o processo tende à saturação, indicando que não há ganho expressivo ao prolongar o tempo de reação. Dessa forma, a escolha de 90 min como parâmetro ótimo representa um equilíbrio entre eficiência de imobilização e economia de tempo experimental.

Figura 26. (A) Representação esquemática da imobilização do IFX; (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nos seguintes tempos de imobilização do IFX: (a) 0 (Voltamograma controle), (b) 30, (c) 60, (d) 90 e (e) 120 min; (C) Gráfico de barras representando os valores de ΔI obtidos a partir de (B); (D) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nas seguintes concentrações de IFX: (a) 0 (Voltamograma controle), (b) 0,05, (c) 0,1, (d) 0,5, (e) 1,0 e (f) $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$; (E) Gráfico de barras representando os valores de ΔI obtidos a partir de (D).



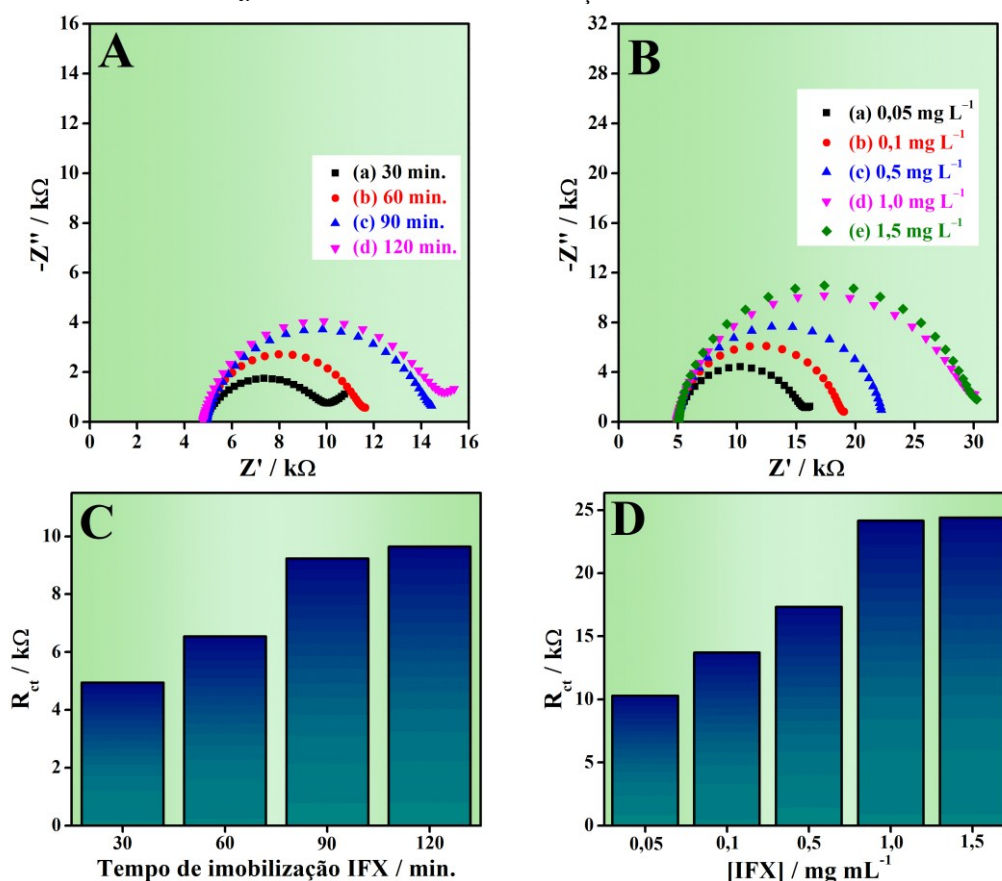
Fonte: O Autor (2025).

Após a otimização do tempo de imobilização, foram avaliadas concentrações de IFX na faixa de $0,05$ e $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Os resultados obtidos foram de acréscimo nos valores de ΔI entre $0,05$ e $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, e manteve-se constante em concentrações superiores como observado na Figura 26D e 26E.

Foram realizadas também medidas de EIS durante a otimização de ambos os parâmetros, onde os gráficos de Nyquist obtidos estão demonstrados nas Figuras 27A e 27B. É

possível notar que o comportamento dos valores de R_{ct} corrobora o padrão observado nas medidas voltamétricas (Figuras 27C e 27D).

Figura 27. (A) Gráficos de Nyquist obtidos para: (a) 30, (b) 60, (c) 90 e (d) 120 min. de imobilização de IFX. (B) Gráficos de Nyquist obtidos para: (a) 0,05, (b) 0,1, (c) 0,5, (d) 1,0 e (e) 1,5 mg L^{-1} de IFX. (C) Gráfico de barras representando os valores de R_{ct} observados em cada tempo de imobilização de IFX. (D) Gráfico de barras representando os valores de R_{ct} observados em cada concentração de IFX.



Fonte: O Autor (2025).

A diminuição da corrente, acompanhada pelo aumento nos valores de R_{ct} , pode ser atribuída à imobilização do IFX, uma molécula de elevado peso molecular ($\approx 149 \text{ kDa}$) e baixa condutividade. Esse recobrimento na superfície do WE atua como uma barreira física, dificultando a difusão da sonda eletroquímica até o eletrodo e, conseqüentemente, reduzindo a resposta obtida. [45,60,103].

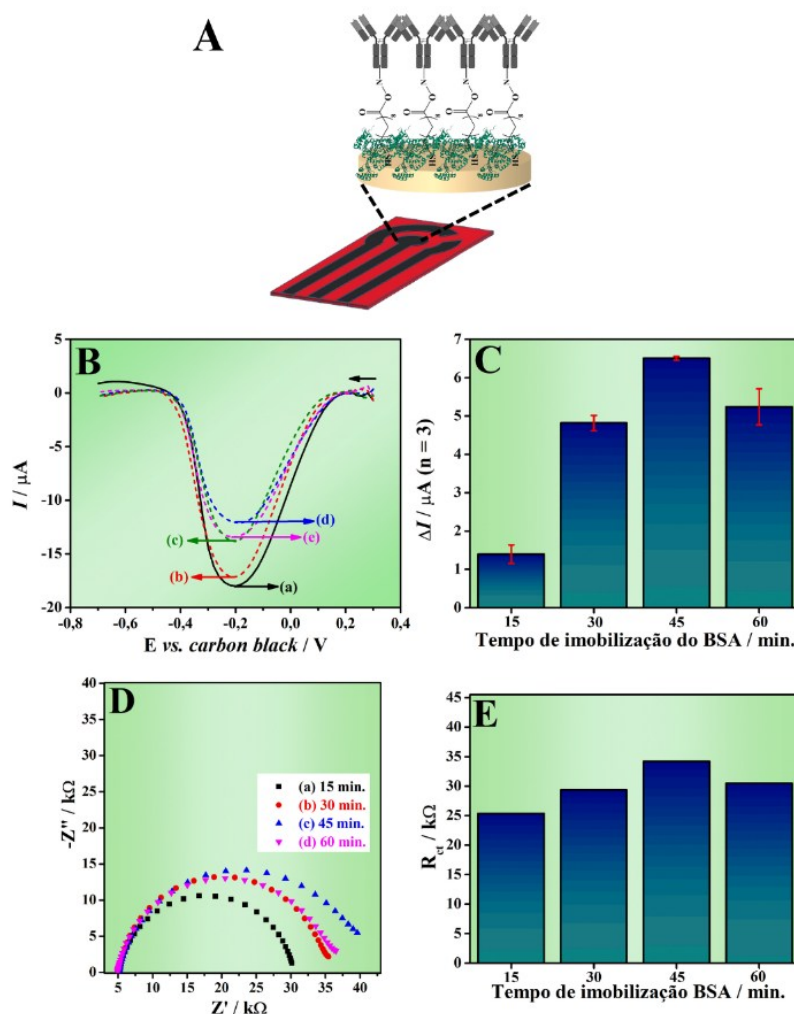
5.6.4 Imobilização da albumina do soro bovino (BSA)

Após a imobilização do IFX, foi realizado o estudo de imobilização da BSA, técnica amplamente utilizada para bloqueio dos sítios não ocupados da superfície do WE (Figura 28A),

evitando assim “falsos-positivos” de interações não específicas do antígeno (TNF- α), ou seja, interações que não correspondem à formação do imunocomplexo com o IFX [51,65,66].

O parâmetro otimizado foi o tempo de contato da solução de BSA em uma concentração de 1% (m/v). A faixa estudada foi de 15 a 60 min, onde os resultados obtidos estão expressos pela Figura 28B e 28C. Nota-se um ganho nos valores de ΔI entre 15 a 45 min, seguido de um decréscimo em 60 min. Essa perda no valor de ΔI , pode ser associado um possível processo de desorção da proteína ao longo do tempo nos parâmetros experimentais adotados, levando à uma desocupação de sítios condutores da superfície do eletrodo [104]. Os resultados obtidos via EIS (Figura 28D e 28E), novamente, corroboram o comportamento voltamétrico observado.

Figura 28. (A) Representação esquemática da imobilização da BSA; (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nos seguintes tempos de imobilização da BSA: (a) 0 (Voltamograma controle), (b) 15, (c) 30, (d) 45 e (e) 60 min; (C) Gráfico de barras representando o decréscimo de corrente (ΔI) registrado para cada tempo de reação em relação à corrente registrada no voltamograma controle; (D) Gráficos de Nyquist obtidos para cada tempo de imobilização: (a) 15, (b) 30, (c) 45 e (d) 60 min ; (E) Gráfico de barras representando os valores de R_{ct} observados em cada tempo de imobilização.



5.6.5 Incubação do antígeno, TNF- α

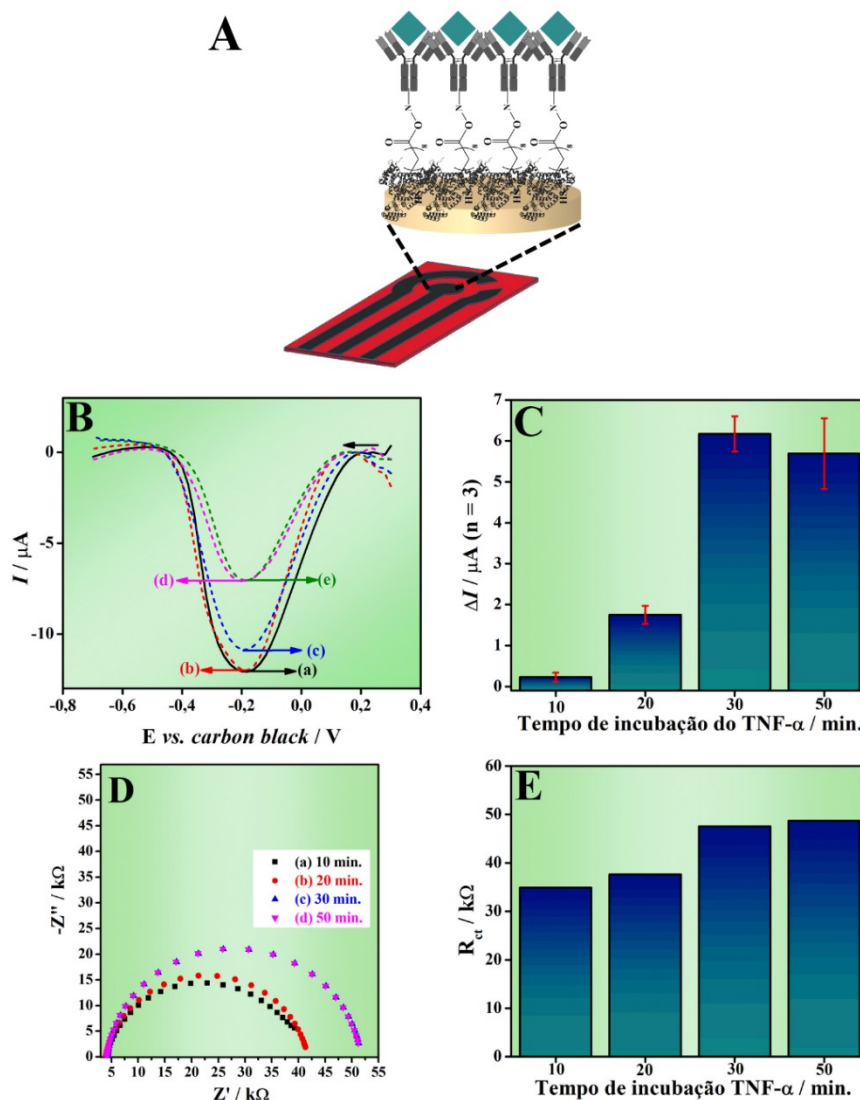
O tempo de incubação é importante para avaliar o tempo de análise necessário para o diagnóstico do TNF- α usando o imunossensor. Assim, a fim de otimizar a formação do imunocomplexo sobre a superfície do WE, 5 pg mL⁻¹ de TNF- α foram incubados por tempos variando de 10 a 50 min. A Figura 29A representa de maneira esquemática a imobilização do TNF- α sobre o anticorpo (IFX). A Figura 29B mostra os voltamogramas obtidos para cada tempo de imobilização, sendo importante frisar que quando não há diferença significativa entre a resposta do voltamograma controle (Figura 29B - (a)) e a resposta de uma medida (Figura 29B - (b)) não é possível detectar TNF- α usando o imunossensor proposto, pois admite-se que o tempo não foi suficiente para a formação do imunocloplexo.

Conforme mostrado na Figura 29C, com o aumento do tempo até 50 min, observa-se um incremento progressivo nos valores de ΔI . Dessa forma, considerando a frequência analítica, o tempo de 30 min foi escolhido como parâmetro ótimo, uma vez que não houve diferença significativa entre as respostas obtidas em 30 e 50 min.

Medidas de EIS também foram realizadas, sendo os gráficos de Nyquist representados na Figura 29D. Os valores de R_{ct} , mostrados na Figura 29E, apresentam comportamento consistente com os dados voltamétricos, corroborando a tendência observada.

De maneira semelhante ao observado para o IFX, a redução da corrente e o aumento da resistência à transferência de carga podem ser atribuídos à imobilização de uma proteína não eletroativa de alto peso molecular sobre a superfície do WE do imunossensor. Essa cobertura atua como uma barreira física, dificultando a aproximação da sonda redox e impactando diretamente a resposta eletroquímica.

Figura 29. (A) Representação esquemática da formação do imunocomplexo IFX-TNF- α ; (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) nos seguintes tempos de incubação de 5 pg mL^{-1} de TNF- α : (a) 0 (Voltamograma controle), (b) 10, (c) 20, (d) 30 e (e) 50 min; (C) Gráfico de barras representando o decréscimo de corrente (ΔI) registrado para cada tempo de reação em relação à corrente registrada no voltamograma controle; (D) Gráficos de Nyquist obtidos para cada tempo de incubação: (a) 10, (b) 20, (c) 30 e (d) 50 min; (E) Gráfico de barras representando os valores de R_{ct} observados em cada tempo de incubação.



Fonte: O Autor (2025).

5.7 CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O TNF- α

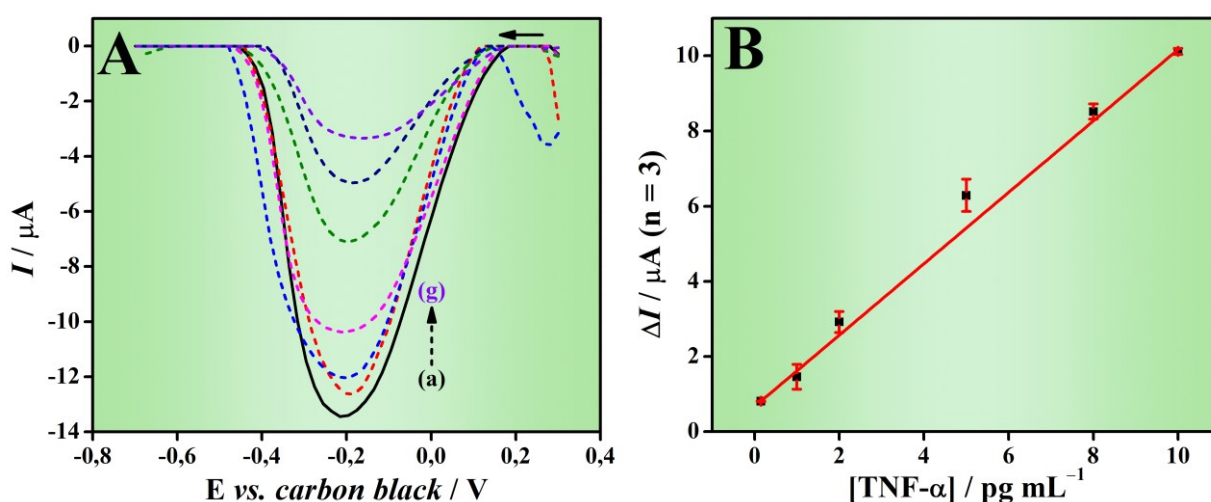
Com os parâmetros de construção do imunossensor otimizados, foi construída uma curva de calibração externa na faixa de $0,15$ a 10 pg mL^{-1} de TNF- α , abrangendo o intervalo de concentrações normalmente encontrado no soro de indivíduos saudáveis ($0,2$ a 8 pg mL^{-1}) [19,20].

A Figura 30A mostra os voltamogramas de uma sonda redox de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), onde observa-se que com o

aumento da concentração de TNF- α (0,15 – 10 pg $^{-1}$), há uma diminuição na intensidade de corrente em relação ao voltamograma controle (Figura 30A, curva a).

A partir dos dados apresentados na Figura 30A foi construída uma curva de calibração para o TNF- α (Figura 30B) e foi obtido a seguinte equação linear: ΔI [μA] = 0,95 ($\pm 1,1 \times 10^{-2}$) [$\mu\text{A mL pg}^{-1}$] + 0,67 ($\pm 1,4 \times 10^{-2}$), que apresentou coeficiente de correlação $r = 0,999$ e uma sensibilidade de 0,95 ($\pm 1,1 \times 10^{-2}$) [$\mu\text{A mL pg}^{-1}$], evidenciando a correlação dos resultados experimentais com o método proposto.

Figura 30. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 0,05 mmol L $^{-1}$ em solução tampão fosfato 0,01 mol L $^{-1}$ (pH 7,4) para as seguintes concentrações de TNF- α : (a) 0 (controle), (b) 0,15, (c) 1, (d) 2, (e) 5, (f) 8 e (g) 10 pg mL $^{-1}$; (B) Curva de calibração para TNF- α (n = 3).



Fonte: O Autor (2025).

Com os dados da equação da reta obtida, pode-se calcular também os valores de limite de detecção (do inglês, *Limit of Detection* – LOD) e limite de quantificação (do inglês, *Limit of Quantification* – LOQ). O LOD foi calculado a partir de $3 \times \text{SD}/S$ e o LOQ com $10 \times \text{SD}/S$, onde SD representa o desvio padrão do intercepto e S representa a inclinação da curva de calibração [105]. Logo, o valor obtido para o LOD foi de 0,04 pg mL $^{-1}$ e 0,15 pg mL $^{-1}$ para o LOQ. Esses valores evidenciam a aplicabilidade do imunossensor proposto na determinação de TNF- α , dada a faixa de concentração de pacientes saudáveis (0,2 a 8 pg mL $^{-1}$).

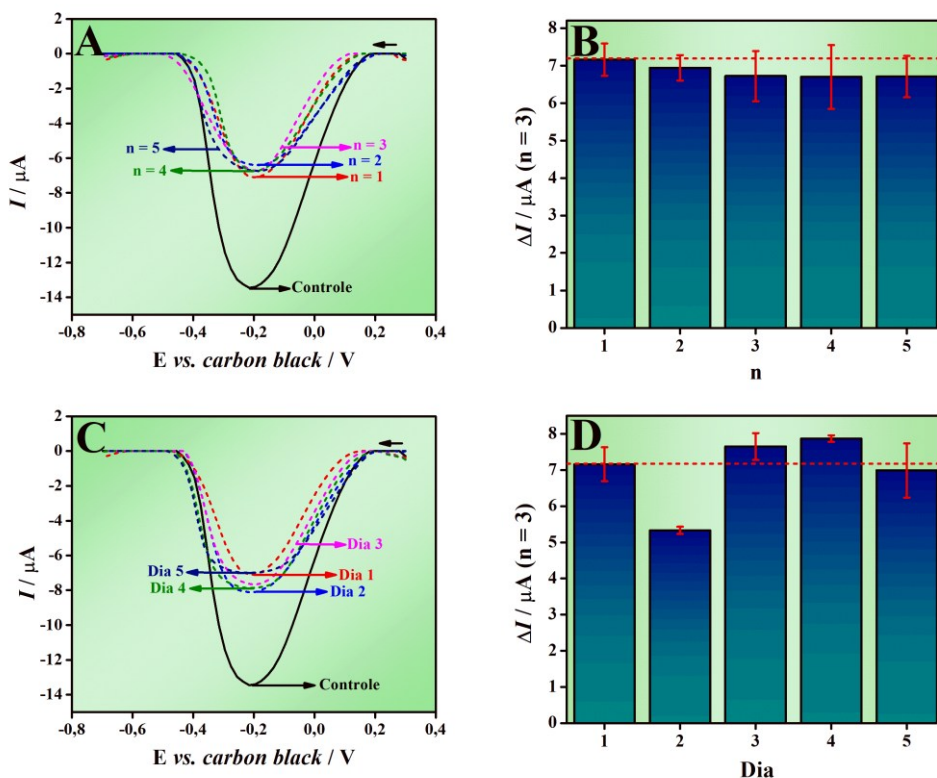
5.8 REPETIBILIDADE E SELETIVIDADE

Para atestar a repetibilidade do método proposto, foram feitos estudos voltamétricos intradia utilizando 5 imunossensores diferentes e realizando medidas em triplicata em um

mesmo dia, e medidas interdia utilizando um imunossensor por dia durante 5 dias realizando medidas em triplicata. As Figura 31A e 31B mostram os voltamogramas e dados de ΔI intradia e as Figuras 31C e 31D os resultados interdia. Os dados foram obtidos com uma sonda redox de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) utilizando 5 pg mL^{-1} de TNF- α .

Os valores de desvio padrão relativo (do inglês, *Relative Standard Deviation* – RSD), foram de 2,96% para as medidas intradia e 14,27% para as medidas interdia. A adequação da repetibilidade de um método pode ser obtida a partir da comparação do RSD com o RSD de Horwitz, onde um método com repetibilidade adequada possui RSD abaixo de $2/3 \times \text{RSD de Horwitz}$ [106]. O valor de RSD de Horwitz para métodos que trabalham com analitos em concentrações mássicas (g/g) abaixo de 10^{-7} é de 22% [106], logo, $2/3 \times \text{RSD de Horwitz}$ é igual a 14,67%, valor este que é acima de ambos os valores encontrados nos estudos conduzidos e apresentados nas Figuras 31B e 31D, indicando assim que o imunossensor proposto apresenta repetibilidade adequada dentro dos padrões de Horwitz.

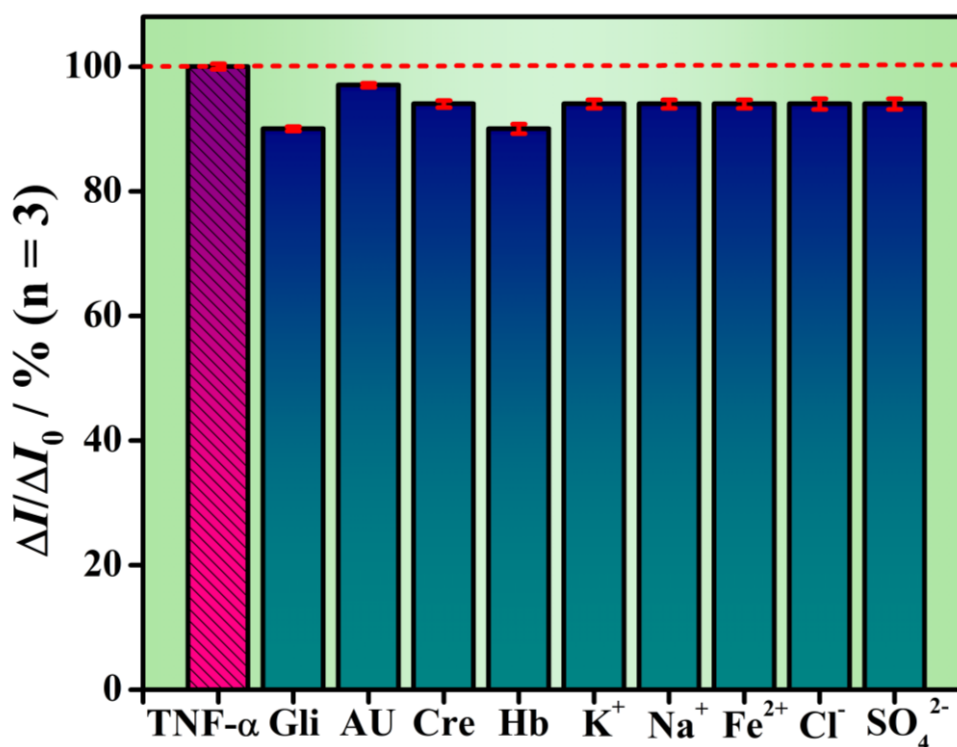
Figura 31. (A) Voltamogramas de pulso diferencial btidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) utilizando 5 pg mL^{-1} de TNF- α para 5 sensores diferentes em um mesmo dia; (B) Gráfico de barras representando os resultados de ΔI obtidos a partir de (A); (C) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) utilizando 5 pg mL^{-1} de TNF- α para medidas realizadas ao longo de 5 dias diferentes; (D) Gráfico de barras representando os resultados de ΔI obtidos a partir de (C).



Fonte: O Autor (2025).

Além da repetibilidade, a seletividade do imunossensor também foi testada. Foram realizados ensaios utilizando $5,0 \text{ pg mL}^{-1}$ de TNF- α acompanhados de 5000 pg mL^{-1} de possíveis interferentes orgânicos como ácido úrico (AU), glicose (Gli), creatinina (Cre) e hemoglobina (Hb) e possíveis interferentes inorgânicos como os cátions K^+ , Na^+ , Fe^{2+} e ânions Cl^- e SO_4^{2-} , que são espécies encontradas frequentemente em matrizes provenientes do sangue humano [107,108]. A Figura 32 mostra os resultados obtidos em função da razão $\Delta I/\Delta I_0$, onde ΔI é a variação de corrente ocasionada na presença do analito+possível interferente e ΔI_0 é a variação somente do analito.

Figura 32. Gráfico de barras representando a correlação $\Delta I/\Delta I_0$ para diferentes interferentes na proporção de 1:1000.



Fonte: O Autor (2025).

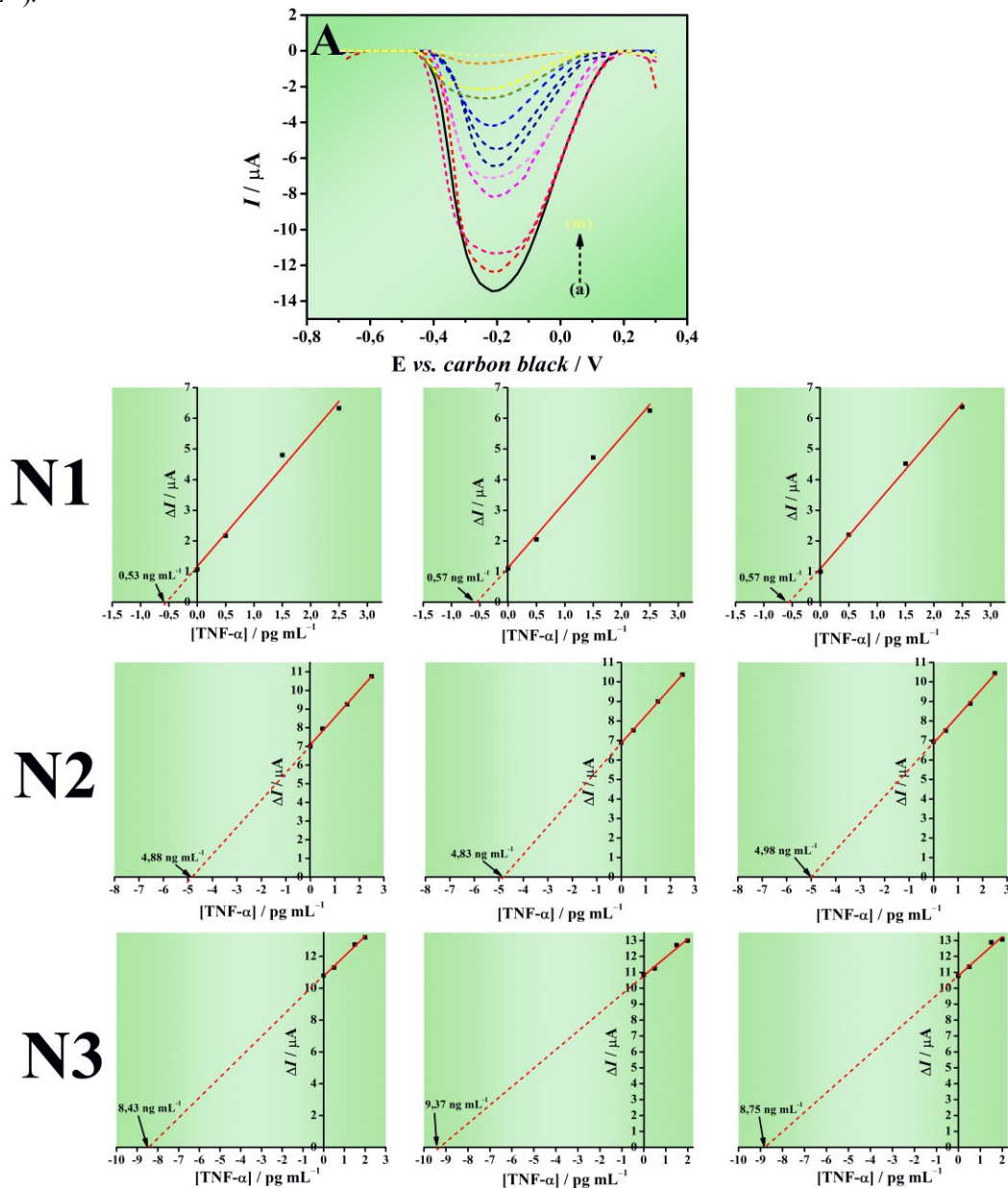
As variações encontradas do valor de ΔI foram entre 3 e 10%, indicando baixa interferência dos compostos avaliados sobre o método proposto.

5.9 DETERMINAÇÃO DE TNF- α

A exatidão do imunossensor proposto foi avaliada por meio de ensaios de adição e recuperação em três níveis de fortificação com TNF- α ($0,5$; $5,0$ e $8,0 \text{ pg mL}^{-1}$), utilizando como matriz soro sanguíneo humano previamente diluído dez vezes em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

(pH 7,4). Os resultados estão apresentados na Figura 33, onde N1, N2 e N3 correspondem às curvas obtidas nos níveis de recuperação de 0,5; 5,0 e 8,0 pg mL^{-1} de TNF- α , respectivamente.

Figura 33. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 0,05 mmol L^{-1} em soro sanguíneo humano diluído 10 vezes em solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 7,4) para adições de TNF- α de: (a) Voltamograma Controle, (b) 0,5, (c) 1,0, (d) 2,0, (e) 3,0, (f) 5,0, (g) 5,5, (h) 6,5, (i) 7,5, (j) 8,0, (k) 8,5, (l) 9,5, (m) 10 pg mL^{-1} ; Gráficos de recuperação para cada um dos 3 níveis (N1 – 0,5 pg mL^{-1} , N2 – 5,0 pg mL^{-1} e N3 – 8,0 pg mL^{-1}).



Fonte: O Autor (2025).

As faixas de recuperação obtidas estão representadas pela Tabela 1. Sendo o valor de recuperação calculado a partir da razão entre o TNF- α adicionado e o TNF- α encontrado, multiplicado por 100 [109].

Tabela 1. Resultados do ensaio de adição e recuperação de TNF- α em amostra de soro sanguíneo humano.

Nível de Adição de TNF-α	Adicionado (pg mL⁻¹)	Encontrado^a (pg mL⁻¹)	Faixa de recuperação (%)
1	0,5	0,56 ($\pm 0,02$)	106-114
2	5,0	4,90 ($\pm 0,08$)	97-100
3	8,0	8,85 ($\pm 0,48$)	105-117

^a Valores encontrados com n = 3.

Fonte: O Autor (2025).

Ao observar as faixas de recuperação expostas na Tabela 1, é possível observar que para os três níveis foi obtido uma faixa de 97-117% de recuperação. Para analitos na ordem de concentração de pg mL⁻¹, as faixas de recuperação adequada são entre 80-120% atestando assim a exatidão do imunossensor desenvolvido dentro da faixa de concentração sérica de pacientes saudáveis, garantindo assim a possibilidade de sua aplicação analítica [109].

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou o potencial da integração entre manufatura aditiva e técnicas clássicas de modificação superficial na construção de plataformas analíticas avançadas. O imunossensor eletroquímico impresso em 3D e galvanizado com ouro desenvolvido neste estudo evidenciou que a combinação entre impressão 3D e galvanização espontânea constitui uma rota eficiente, reproduzível e economicamente viável para a fabricação de dispositivos eletroquímicos. A deposição de ouro sobre a superfície condutiva de compósitos à base de PLA-CB conferiu ao sensor propriedades aprimoradas de condutividade, estabilidade e área ativa, superando limitações inerentes ao uso isolado desses materiais.

A caracterização morfológica e eletroquímica confirmou a formação de superfícies homogêneas e altamente estáveis, adequadas à ancoragem de SAMs e à subsequente imobilização de biomoléculas. A eficiência da rota de galvanização, aliada à simplicidade operacional, reforça sua aplicabilidade em protocolos de funcionalização voltados a sensores e biossensores de baixo custo. O emprego do IFX como elemento de (bio)reconhecimento destacou-se como um aspecto inovador do estudo, explorando a dualidade dessa molécula como fármaco e componente ativo de uma plataforma analítica voltada à detecção do TNF- α .

Os resultados obtidos nas etapas de calibração e validação demonstraram excelente sensibilidade, linearidade e reprodutibilidade dentro da faixa de concentração fisiológica do TNF- α , validando a aplicabilidade do sensor para análises em matrizes biológicas complexas. Além disso, os testes de recuperação em amostras de soro evidenciaram desempenho analítico adequado (97–117%), confirmando a viabilidade prática do sistema proposto.

Portanto, o imunossensor desenvolvido representa uma alternativa promissora para o monitoramento de biomarcadores inflamatórios, especialmente em doenças inflamatórias intestinais, e oferece perspectivas concretas para aplicação em dispositivos portáteis e sistemas PoC.

7 REFERÊNCIAS

- [1] P. Chen, G. Zhou, J. Lin, L. Li, Z. Zeng, M. Chen, S. Zhang, Serum Biomarkers for Inflammatory Bowel Disease, *Front. Med.* 7 (2020) 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00123>.
- [2] Z. Cai, S. Wang, J. Li, Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review, *Front. Med.* 8 (2021) 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.765474>.
- [3] M.E. Kuenzig, S.G. Fung, L. Marderfeld, J.W.Y. Mak, G.G. Kaplan, S.C. Ng, D.C. Wilson, F. Cameron, P. Henderson, P.G. Kotze, J. Bhatti, V. Fang, S. Gerber, E. Guay, S. Kotteduwa Jayawarden, L. Kadota, F. Maldonado D., J.A. Osei, R. Sandarage, A. Stanton, M. Wan, S.K. Jayawarden, F. Maldonado, E. Maltus, S. Bhattacharya, J. Osei, E.I. Benchimol, Twenty-first Century Trends in the Global Epidemiology of Pediatric-Onset Inflammatory Bowel Disease: Systematic Review, *Gastroenterology* 162 (2022) 1147–1159.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.12.282>.
- [4] D. Lacruz-Guzmán, D. Torres-Moreno, F. Pedrero, P. Romero-Cara, I. García-Tercero, J. Trujillo-Santos, P. Conesa-Zamora, Influence of polymorphisms and TNF and IL1 β serum concentration on the infliximab response in Crohn’s disease and ulcerative colitis, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69 (2013) 431–438. <https://doi.org/10.1007/s00228-012-1389-0>.
- [5] J. Popov, V. Caputi, N. Nandeesh, D.A. Rodriguez, N. Pai, Microbiota-immune interactions in ulcerative colitis and colitis associated cancer and emerging microbiota-based therapies, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms222111365>.
- [6] D.C. Baumgart, W.J. Sandborn, Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies, *Lancet* 369 (2007) 1641–1657. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60751-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60751-X).
- [7] A.S. Day, D.A. Lemberg, Identification and diagnosis of Crohn disease and ulcerative colitis in children, *J. Paediatr. Child Health* 56 (2020) 1731–1734. <https://doi.org/10.1111/jpc.14925>.
- [8] T.C. Mules, A. Swaminathan, E. Hirschfeld, G. Borichevsky, C. Frampton, A.S. Day, R.B. Gearry, The impact of disease activity on psychological symptoms and quality of life in patients with inflammatory bowel disease—results from the Stress, Anxiety and Depression with Disease Activity (SADD) Study, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 55 (2022) 201–211. <https://doi.org/10.1111/apt.16616>.
- [9] G.G. Kaplan, J.W. Windsor, The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18 (2020) 56–66. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00360-x>.
- [10] A.B. Quaresma, A.O.M.C. Damiao, C.S.R. Coy, D.O. Magro, A.A.F. Hino, D.A. Valverde, R. Panaccione, S.B. Coward, S.C. Ng, G.G. Kaplan, P.G. Kotze, Temporal trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases in the public healthcare system in Brazil: A large population-based study, *Lancet Reg. Heal. - Am.* 13 (2022)

100298. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100298>.
- [11] A.S. Day, S.T. Leach, D.A. Lemberg, An update on diagnostic and prognostic biomarkers in inflammatory bowel disease, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 17 (2017) 835–843. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1364160>.
- [12] J.P. James, L.B. Riis, M. Malham, E. Høgdall, E. Langholz, B.S. Nielsen, MicroRNA biomarkers in IBD-differential diagnosis and prediction of colitis-associated cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21217893>.
- [13] E. Bretto, D.G. Ribaldone, G.P. Caviglia, G.M. Saracco, E. Bugianesi, S. Frara, Inflammatory Bowel Disease: Emerging Therapies and Future Treatment Strategies, *Biomedicines* 11 (2023) 1–33. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082249>.
- [14] A.E. M'koma, Inflammatory Bowel Disease: Clinical Diagnosis and Surgical Treatment-Overview, *Med.* 58 (2022) 1–13. <https://doi.org/10.3390/medicina58050567>.
- [15] I.V. Obratsov, K.E. Shirokikh, O.I. Obratsova, M.V. Shapina, M.H. Wang, I.L. Khalif, Multiple Cytokine Profiling: A New Model to Predict Response to Tumor Necrosis Factor Antagonists in Ulcerative Colitis Patients, *Inflamm. Bowel Dis.* 25 (2019) 524–531. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy358>.
- [16] S. Kany, J.T. Vollrath, B. Relja, Cytokines in inflammatory disease, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms20236008>.
- [17] G.M. Leone, K. Mangano, M.C. Petralia, F. Nicoletti, P. Fagone, Past, Present and (Foreseeable) Future of Biological Anti-TNF Alpha Therapy, *J. Clin. Med.* 12 (2023). <https://doi.org/10.3390/jcm12041630>.
- [18] L.R. Lopetuso, M. Corbi, F. Scaldaferrì, V. Petito, C. Graziani, F. Castri, M. Neri, A. Gasbarrini, A. Sgambato, A. Papa, Characterization of mucosal cytokine profile in ulcerative colitis patients under conventional and anti-TNF- α treatment, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 32 (2020) 1527–1532. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001933>.
- [19] G. Li, W. Wu, X. Zhang, Y. Huang, Y. Wen, X. Li, R. Gao, Serum levels of tumor necrosis factor alpha in patients with IgA nephropathy are closely associated with disease severity, *BMC Nephrol.* 19 (2018) 326. <https://doi.org/10.1186/s12882-018-1069-0>.
- [20] J.J. Blanco-Pérez, S. Blanco-Dorado, J. Rodríguez-García, M.E. Gonzalez-Bello, Á. Salgado-Barreira, A.C. Caldera-Díaz, A. Pallarés-Sanmartín, A. Fernandez-Villar, F.J. González-Barcala, Serum levels of inflammatory mediators as prognostic biomarker in silica exposed workers, *Sci. Rep.* 11 (2021) 13348. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92587-0>.
- [21] P. Kourkoulis, C. Kapizioni, G. Michalopoulos, N.P. Andreou, I. Papaconstantinou, G. Karamanolis, M. Gazouli, Novel potential biomarkers for the diagnosis and monitoring of patients with ulcerative colitis, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 31 (2019) 1173–1183. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001490>.

- [22] R. Nakov, New markers in ulcerative colitis, *Clin. Chim. Acta* 497 (2019) 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.07.033>.
- [23] R. Battat, P.S. Dulai, N. Vande Casteele, E. Evans, K.D. Hester, E. Webster, A. Jain, J.A. Proudfoot, A. Mairalles, J. Neill, S. Singh, J.T. Chang, J. Rivera-Nieves, W.J. Sandborn, B.S. Boland, Biomarkers Are Associated With Clinical and Endoscopic Outcomes With Vedolizumab Treatment in Ulcerative Colitis, *Inflamm. Bowel Dis.* 25 (2019) 410–420. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy307>.
- [24] Brasil. Ministério da Saúde, Certolizumabe pegol para o tratamento da doença de Crohn moderada a grave, (2017). http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2017/Relatorio_Certolizumabe_DCrohn_final.pdf
<http://fi-admin.bvsalud.org/document/view/b6qfe>.
- [25] Brasil. Ministério da Saúde, Adalimumabe, golimumabe, infliximabe e vedolizumabe para tratamento da colite ulcerativa moderada a grave, (2019). http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2019/Sociedade/ReSoc164_biologicos_colite_ulcerativa.pdf.
- [26] Z. Petric, J. Goncalves, P. Paixao, Under the Umbrella of Clinical Pharmacology: Inflammatory Bowel Disease, Infliximab and Adalimumab, and a Bridge to an Era of Biosimilars, *Pharmaceutics* 14 (2022) 1766. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091766>.
- [27] S. Liang, J. Dai, S. Hou, L. Su, D. Zhang, H. Guo, S. Hu, H. Wang, Z. Rao, Y. Guo, Z. Lou, Structural Basis for Treating Tumor Necrosis Factor α (TNF α)-associated Diseases with the Therapeutic Antibody Infliximab, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 13799–13807. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433961>.
- [28] Y. Lu, Q. Zhou, L. Xu, Non-Invasive Electrochemical Biosensors for TNF- α Cytokines Detection in Body Fluids, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (2021) 1–8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.701045>.
- [29] F.J. Toja-Camba, L. García-Quintanilla, L. Rodríguez-Martínez, J. Tomine, F. Cajade-Pascual, C. Feitosa, I. Zarra-Ferro, M. Barreiro-De-Acosta, J. González-López, C. Mondelo-García, A. Fernández-Ferreiro, Enhancing Therapeutic Drug Monitoring in Inflammatory Bowel Disease: A Comparative Analysis of Rapid Point-of-Care Infliximab, Adalimumab and Anti-Drug Antibodies' Determination against ELISA, *Pharmaceutics* 15 (2023). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112615>.
- [30] S.K. Arya, P. Estrela, Recent advances in enhancement strategies for electrochemical ELISA-based immunoassays for cancer biomarker detection, *Sensors (Switzerland)* 18 (2018). <https://doi.org/10.3390/s18072010>.
- [31] P. Peng, C. Liu, Z. Li, Z. Xue, P. Mao, J. Hu, F. Xu, C. Yao, M. You, Emerging ELISA derived technologies for in vitro diagnostics, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 152 (2022) 116605. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116605>.
- [32] S. Alsefri, T. Balbaied, E. Moore, Electrochemical development of an immunosensor for detection polychlorinated biphenyls (Pcbs) for environmental analysis, *Chemosensors* 9

- (2021). <https://doi.org/10.3390/chemosensors9110307>.
- [33] C.M. Anastasescu, V. Gheorman, E.C. Stoicanescu, F. Popescu, V. Gheorman, I. Udriștoiu, Immunological Biomarkers in Autism Spectrum Disorder: The Role of TNF-Alpha and Dependent Trends in Serum IL-6 and CXCL8, *Life* 14 (2024). <https://doi.org/10.3390/life14091201>.
- [34] B. Zhang, G. Xiao, Y.Q. Mao, Z. Lv, R.-P. Huang, Cytometry Multiplex Bead Antibody Array, in: 2021: pp. 83–92. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1064-0_7.
- [35] B. Jessen, Y. Rodriguez-Sillke, E. Sonnenberg, M. Schumann, A. Kruglov, I. Freise, F. Schmidt, J. Maul, A.A. Kühn, R. Glaubien, D. Lissner, B. Siegmund, Level of Tumor Necrosis Factor Production by Stimulated Blood Mononuclear Cells Can Be Used to Predict Response of Patients With Inflammatory Bowel Diseases to Infliximab, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 19 (2021) 721-731.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.03.066>.
- [36] M.L. Yola, N. Atar, Novel voltammetric tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) immunosensor based on gold nanoparticles involved in thiol-functionalized multi-walled carbon nanotubes and bimetallic Ni/Cu-MOFs, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 2481–2492. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03203-z>.
- [37] N. Dutta, P.B. Lillehoj, P. Estrela, G. Dutta, Electrochemical biosensors for cytokine profiling: Recent advancements and possibilities in the near future, *Biosensors* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/bios111030094>.
- [38] S.I. Kaya, D.N. Unal, A. Cetinkaya, B. Uslu, S.A. Ozkan, Overview of Biosensors, in: *Biosensors*, CRC Press, Boca Raton, 2022: pp. 3–23. <https://doi.org/10.1201/9781003189435-2>.
- [39] E. Sánchez-Tirado, L. Agüí, A. González-Cortés, S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Electrochemical (Bio)Sensing Devices for Human-Microbiome-Related Biomarkers, *Sensors* 23 (2023) 837. <https://doi.org/10.3390/s23020837>.
- [40] A. Popov, B. Brasiunas, K. Blazevic, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, Ultra-sensitive electrochemical immunosensors for clinically important biomarker detection: Prospects, opportunities, and global trends, *Curr. Opin. Electrochem.* 46 (2024) 101524. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2024.101524>.
- [41] J. Kim, M. Park, Recent progress in electrochemical immunosensors, *Biosensors* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/bios11100360>.
- [42] X. Liu, C. Luo, J. Wu, N. He, R. Yu, X. Liu, Construction of a Non-Enzymatic Electrochemical Sensor Based on Metal-Organic-Framework-Derived Manganese Oxide Microspheres for the Detection of Hydrogen Peroxide, *ChemElectroChem* 8 (2021) 4141–4147. <https://doi.org/10.1002/celec.202101031>.
- [43] A. Babaei, A. Pouremamali, N. Rafiee, H. Sohrabi, A. Mokhtarzadeh, M. de la Guardia, Genosensors as an alternative diagnostic sensing approaches for specific detection of virus species: A review of common techniques and outcomes, *TrAC - Trends Anal.*

- Chem. 155 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116686>.
- [44] Z. Zhang, N. Zare, T. Wu, M. Ghalkhani, Y. Wen, N. Zhong, H. Karimi-Maleh, What happens in toxic metal detection using an electrochemical aptasensor? A review, *Inorg. Chem. Commun.* 178 (2025) 114459. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2025.114459>.
- [45] H. Filik, A.A. Avan, Electrochemical immunosensors for the detection of cytokine tumor necrosis factor alpha: A review, *Talanta* 211 (2020) 120758. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120758>.
- [46] I. Sampaio, N.N.K. Takeuti, B. Gusson, T.R. Machado, V. Zucolotto, Capacitive immunosensor for COVID-19 diagnosis, *Microelectron. Eng.* 267–268 (2023) 111912. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2022.111912>.
- [47] M. Freitas, H.P.A. Nouws, C. Delerue-Matos, Voltammetric Immunosensor to Track a Major Peanut Allergen (Ara h 1) in Food Products Employing Quantum Dot Labels, *Biosensors* 11 (2021) 426. <https://doi.org/10.3390/bios11110426>.
- [48] A. Şenocak, A.A. Kızılkurtlu, V. Sanko, S.O. Tümay, Ü. Demirbaş, Electrochemical PSA Detection Performance of an Innovative Immunosensor, *Langmuir* 41 (2025) 20297–20307. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5c02632>.
- [49] A. Barhoum, R. J. Forster, Label-free electrochemical immunosensor for picomolar detection of the cervical cancer biomarker MCM5, *Anal. Chim. Acta* 1225 (2022) 340226. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340226>.
- [50] M. Aydin, E.B. Aydin, M.K. Sezgintürk, Advances in immunosensor technology, in: 2021: pp. 1–62. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2020.08.001>.
- [51] E. Sciurti, M.A. Signore, L. Velardi, R. Di Corato, L. Blasi, A. Campa, M.C. Martucci, P.A. Siciliano, L. Francioso, Label-free electrochemical biosensor for direct detection of Oncostatin M (OSM) inflammatory bowel diseases (IBD) biomarker in human serum, *Talanta* 271 (2024) 125726. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.125726>.
- [52] T.S. e Silva, G.R.O. e Freitas, L.F. Ferreira, D.L. Franco, Development of a label-free impedimetric immunosensor for the detection of respiratory syncytial virus, *J. Solid State Electrochem.* 28 (2024) 4015–4027. <https://doi.org/10.1007/s10008-024-05999-z>.
- [53] V. Sanko, C. Erkmen, F. Kuralay, The role of nanoparticles in non-invasive electrochemical immunosensor technology and recent developments, *Electroanalysis* 36 (2024) e202400004. <https://doi.org/10.1002/elan.202400004>.
- [54] T. Bertok, L. Lorencova, E. Chocholova, E. Jane, A. Vikartovska, P. Kasak, J. Tkac, Electrochemical Impedance Spectroscopy Based Biosensors: Mechanistic Principles, Analytical Examples and Challenges towards Commercialization for Assays of Protein Cancer Biomarkers, *ChemElectroChem* 6 (2019) 989–1003. <https://doi.org/10.1002/celec.201800848>.
- [55] A. Sharma, H. Faber, A. Khosla, T.D. Anthopoulos, 3D printed electrochemical devices for bio-chemical sensing: A review, *Mater. Sci. Eng. R Reports* 156 (2023) 100754.

- <https://doi.org/10.1016/j.mser.2023.100754>.
- [56] Y. Yin, Y. Lü, P. Wu, C. Cai, Direct Electrochemistry of Redox Proteins and Enzymes Promoted by Carbon Nanotubes, *Sensors* 5 (2005) 220–234. <https://doi.org/10.3390/s5040220>.
- [57] D. Mehta, D. Gupta, A. Kafle, S. Kaur, T.C. Nagaiah, Advances and Challenges in Nanomaterial-Based Electrochemical Immunosensors for Small Cell Lung Cancer Biomarker Neuron-Specific Enolase., *ACS Omega* 9 (2024) 33–51. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c06388>.
- [58] E. Janik-Karpinska, M. Ceremuga, M. Niemcewicz, M. Podogrocki, M. Stela, N. Cichon, M. Bijak, Immunosensors-The Future of Pathogen Real-Time Detection., *Sensors (Basel)*. 22 (2022). <https://doi.org/10.3390/s22249757>.
- [59] S. Krishnan, X. He, F. Zhao, Y. Zhang, S. Liu, R. Xing, Dual labeled mesoporous silica nanospheres based electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of carcinoembryonic antigen, *Anal. Chim. Acta* 1133 (2020) 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.080>.
- [60] R. Cancelliere, E. Paialunga, A. Grattagliano, L. Micheli, Label-free electrochemical immunosensors: A practical guide, *TrAC Trends Anal. Chem.* 180 (2024) 117949. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117949>.
- [61] Z. Zhang, Y. Cong, Y. Huang, X. Du, Nanomaterials-Based Electrochemical Immunosensors, *Micromachines* 10 (2019) 397. <https://doi.org/10.3390/mi10060397>.
- [62] F.S. Felix, L. Angnes, Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications, *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 470–478. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.029>.
- [63] K. Theyagarajan, Y.-J. Kim, Recent Developments in the Design and Fabrication of Electrochemical Biosensors Using Functional Materials and Molecules, *Biosensors* 13 (2023) 424. <https://doi.org/10.3390/bios13040424>.
- [64] B. Lakard, Electrochemical Biosensors Based on Conducting Polymers: A Review, *Appl. Sci.* 10 (2020) 6614. <https://doi.org/10.3390/app10186614>.
- [65] S. Dawan, R. Wannapob, P. Kanatharana, W. Limbut, A. Numnuam, S. Samanman, P. Thavarungkul, One-step porous gold fabricated electrode for electrochemical impedance spectroscopy immunosensor detection, *Electrochim. Acta* 111 (2013) 374–383. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.08.012>.
- [66] A. Ahmad, E. Moore, Electrochemical immunosensor modified with self-assembled monolayer of 11-mercaptopundecanoic acid on gold electrodes for detection of benzo[a]pyrene in water, *Analyst* 137 (2012) 5839. <https://doi.org/10.1039/c2an35236b>.
- [67] P. Kanagavalli, S. Eissa, Redox probe-free electrochemical immunosensor utilizing electropolymerized melamine on reduced graphene oxide for the point-of-care diagnosis of gastric cancer, *Talanta* 270 (2024) 125549.

- <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125549>.
- [68] M. Drobysh, A. Ramanavicius, A. Baradoke, Polyaniline-based electrochemical immunosensor for the determination of antibodies against SARS-CoV-2 spike protein, *Sci. Total Environ.* 862 (2023) 160700. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160700>.
- [69] C. Tortolini, V. Gigli, A. Angeloni, F. Tasca, N.T.K. Thanh, R. Antiochia, A disposable immunosensor for the detection of salivary MMP-8 as biomarker of periodontitis, *Bioelectrochemistry* 156 (2024) 108590. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108590>.
- [70] D. Mandler, S. Kraus-Ophir, Self-assembled monolayers (SAMs) for electrochemical sensing, *J. Solid State Electrochem.* 15 (2011) 1535–1558. <https://doi.org/10.1007/s10008-011-1493-6>.
- [71] S. Hadžić, A. Trkulja, I. Alihodžić, Immunosenors: Recent Advances and Applications, in: 2021: pp. 138–151. https://doi.org/10.1007/978-3-030-73909-6_16.
- [72] P.E. Laibinis, M.A. Fox, J.P. Folkers, G.M. Whitesides, Comparisons of Self-Assembled Monolayers on Silver and Gold: Mixed Monolayers Derived from HS(CH₂)₂₁X and HS(CH₂)₁₀Y (X, Y = CH₃, CH₂OH) Have Similar Properties, *Langmuir* 7 (1991) 3167–3173. <https://doi.org/10.1021/la00060a041>.
- [73] M. Hoefling, F. Iori, S. Corni, K.E. Gottschalk, The conformations of amino acids on a gold(111) surface, *ChemPhysChem* 11 (2010) 1763–1767. <https://doi.org/10.1002/cphc.200900990>.
- [74] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1103–1170. <https://doi.org/10.1021/cr0300789>.
- [75] A. Kausaite-Minkstimiene, A. Giniunaite, A. Popov, A. Ramanaviciene, Gold nanoparticle-assisted SPR immunosensor for quantification of SARS-CoV-2 anti-RBD antibodies, *Sensors Actuators B Chem.* 432 (2025) 137465. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2025.137465>.
- [76] M. Zamzami, A. Ahmad, S. Alamoudi, H. Choudhry, S. Hosawi, G. Rabbani, E.-S. Shalaan, B. Arkook, A highly sensitive and specific Gold Electrode-Based electrochemical immunosensor for rapid On-Site detection of Salmonella enterica, *Microchem. J.* 199 (2024) 110190. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110190>.
- [77] B. Demirbakan, A highly sensitive creatine kinase detection in human serum using 11-mercaptoundecanoic acid modified ITO-PET electrodes, *Anal. Biochem.* 700 (2025) 115768. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2025.115768>.
- [78] P. Schwerdtfeger, Relativistic effects in properties of gold, *Heteroat. Chem.* 13 (2002) 578–584. <https://doi.org/10.1002/hc.10093>.
- [79] A.H. Pakiari, Z. Jamshidi, Interaction of amino acids with gold and silver clusters, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 4391–4396. <https://doi.org/10.1021/jp070306t>.

- [80] J. Muñoz, E. Redondo, M. Pumera, Functional metal-based 3D-printed electronics engineering: Tunability and bio-recognition, *Appl. Mater. Today* 28 (2022) 101519. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2022.101519>.
- [81] A. Balkis, J. Crawford, A.P. O'mullane, Galvanic replacement of electrochemically restructured copper electrodes with gold and its electrocatalytic activity for nitrate ion reduction, *Nanomaterials* 8 (2018) 756. <https://doi.org/10.3390/nano8100756>.
- [82] M. Zamani, C.M. Klapperich, A.L. Furst, Recent advances in gold electrode fabrication for low-resource setting biosensing, *Lab Chip* 23 (2023) 1410–1419. <https://doi.org/10.1039/D2LC00552B>.
- [83] T.C. de O. Cândido, D.N. da Silva, M.M.C. Borges, T.G. Barbosa, S.O.D. da Trindade, A.C. Pereira, 3D-Printed Electrochemical Sensors: A Comprehensive Review of Clinical Analysis Applications, *Analytica* 5 (2024) 552–575. <https://doi.org/10.3390/analytica5040037>.
- [84] M.H. Farines, E.C. Martins, L.G. Baumgarten, J.P. Winiarski, E.R. Santana, A. Spinelli, N.A. Debacher, I.C. Vieira, Argon non-thermal plasma jet-activated 3D-printed disposable electrochemical sensor for the determination of methyl dopa, *Electrochim. Acta* 517 (2025) 145722. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2025.145722>.
- [85] P.L. dos Santos, V. Katic, H.C. Loureiro, M.F. dos Santos, D.P. dos Santos, A.L.B. Formiga, J.A. Bonacin, Enhanced performance of 3D printed graphene electrodes after electrochemical pre-treatment: Role of exposed graphene sheets, *Sensors Actuators, B Chem.* 281 (2019) 837–848. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.11.013>.
- [86] A. Koterwa, I. Kaczmarzyk, S. Mania, M. Cieslik, R. Tylingo, T. Ossowski, R. Bogdanowicz, P. Niedziałkowski, J. Ryl, The role of electrolysis and enzymatic hydrolysis treatment in the enhancement of the electrochemical properties of 3D-printed carbon black/poly(lactic acid) structures, *Appl. Surf. Sci.* 574 (2022) 151587. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.151587>.
- [87] N. Dehdari Ebrahimi, Y.S. Ju, Thermal conductivity of sintered copper samples prepared using 3D printing-compatible polymer composite filaments, *Addit. Manuf.* 24 (2018) 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.addma.2018.10.025>.
- [88] E. Vaněčková, M. Bouša, R. Sokolová, P. Moreno-García, P. Broekmann, V. Shestivska, J. Rathouský, M. Gál, T. Sebechlebská, V. Kolivoška, Copper electroplating of 3D printed composite electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 858 (2020) 113763. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113763>.
- [89] E. Redondo, M. Pumera, Fully metallic copper 3D-printed electrodes via sintering for electrocatalytic biosensing, *Appl. Mater. Today* 25 (2021) 101253. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101253>.
- [90] F.A. Kucherov, L. V. Romashov, V.P. Ananikov, Development of 3D+G printing for the design of customizable flow reactors, *Chem. Eng. J.* 430 (2022) 132670. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.132670>.

- [91] E.C. Martins, E.R. Santana, L.G. Baumgarten, J.P. Winiarski, J. de Bona, L.H. da Silveira Lacerda, G.A. Micke, G.M. de Oliveira Barra, I.C. Vieira, A. Spinelli, Disposable 3D-printed electrochemical sensor for in loco simultaneous monitoring of emerging pharmaceutical pollutants in aquatic ecosystems, *J. Environ. Chem. Eng.* (2025) 119230. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.119230>.
- [92] G. Derringer, R. Suich, Simultaneous Optimization of Several Response Variables, *J. Qual. Technol.* 12 (1980) 214–219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>.
- [93] L.G. Lucas, E.C. Martins, P.L. dos Santos, J.P. Winiarski, E.R. Santana, I.C. Vieira, A. Spinelli, 3D-printed carbon black-based electrode for simultaneous determination of ascorbic acid and kojic acid in dermo-cosmetic products, *Talanta Open* (2025) 100532. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2025.100532>.
- [94] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 2001.
- [95] *CRC Handbook of Chemistry and Physics: A Ready-Reference of Chemical and Physical Data*, 85th ed Edited by David R. Lide (National Institute of Standards and Technology). CRC Press LLC: Boca Raton, FL. 2004. 2712, ISBN 0-8493-0485-7., *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 4542–4542. <https://doi.org/10.1021/ja041017a>.
- [96] E. Sočo, J. Kalembkiewicz, Removal of Copper(II) and Zinc(II) Ions From Aqueous Solution by Chemical Treatment of Coal Fly Ash, *Croat. Chem. Acta* 88 (2015) 267–279. <https://doi.org/10.5562/cca2646>.
- [97] P. Pedferri, *Corrosion Science and Engineering*, 1st ed., Springer Nature: Switzerland, 2018.
- [98] D. Majumdar, S. Ghosh, Recent advancements of copper oxide based nanomaterials for supercapacitor applications, *J. Energy Storage* 34 (2021) 101995. <https://doi.org/10.1016/j.est.2020.101995>.
- [99] H. Rupp, U. Weser, X-ray photoelectron spectroscopy of copper(II), copper(I), and mixed valence systems, *Bioinorg. Chem.* 6 (1976) 45–59. [https://doi.org/10.1016/S0006-3061\(00\)80049-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3061(00)80049-6).
- [100] A.L. Eckermann, D.J. Feld, J.A. Shaw, T.J. Meade, Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers, *Coord. Chem. Rev.* 254 (2010) 1769–1802. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.023>.
- [101] W.B. Veloso, T.R.L.C. Paixão, G.N. Meloni, 3D printed electrodes design and voltammetric response, *Electrochim. Acta* 449 (2023) 142166. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.142166>.
- [102] L.R.G. Silva, J.S. Stefano, L.O. Orzari, L.C. Brazaca, E. Carrilho, L.H. Marcolino-Junior, M.F. Bergamini, R.A.A. Munoz, B.C. Janegitz, Electrochemical Biosensor for SARS-CoV-2 cDNA Detection Using AuPs-Modified 3D-Printed Graphene Electrodes, *Biosensors* 12 (2022) 1–20. <https://doi.org/10.3390/bios12080622>.

- [103] H. Ashikaga, O. Ben-Yehuda, K.R. Chien, *Biotechnology and Cardiovascular Medicine: Recombinant Protein Therapy*, in: *Mol. Basis Cardiovasc. Dis.*, Elsevier, 1996: pp. 1–15. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-9428-3.50006-8>.
- [104] T. Verrecchia, P. Huve, D. Bazile, M. Veillard, G. Spenlehauer, P. Couvreur, Adsorption/desorption of human serum albumin at the surface of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a solvent evaporation process, *J. Biomed. Mater. Res.* 27 (1993) 1019–1028. <https://doi.org/10.1002/jbm.820270807>.
- [105] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6th ed., New York: Pearson Education, 2010.
- [106] W. Horwitz, R. Albert, The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision, *J. AOAC Int.* 89 (2006) 1095–1109. <https://doi.org/10.1093/jaoac/89.4.1095>.
- [107] Y. Wei, Z. Wu, Y. Wang, G. Wang, J. Liu, Interaction of sex and diabetes on the association between hemoglobin glycation index, hemoglobin A1c and serum uric acid, *Diabetol. Metab. Syndr.* 14 (2022) 185. <https://doi.org/10.1186/s13098-022-00955-1>.
- [108] S.M.N. Uddin, M.Z. Rahaman, T.J. Thammi, M.R. Islam, M.I.U. Masud, M.G. Uddin, M.S. Islam, Low serum concentration of zinc, selenium, calcium, potassium and high serum concentration of iron, sodium are associated with myocardial infarction, *Aging Heal. Res.* 2 (2022) 100063. <https://doi.org/10.1016/j.ahr.2022.100063>.
- [109] A.G. González, M.Á. Herrador, A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>.