

RESSALVA

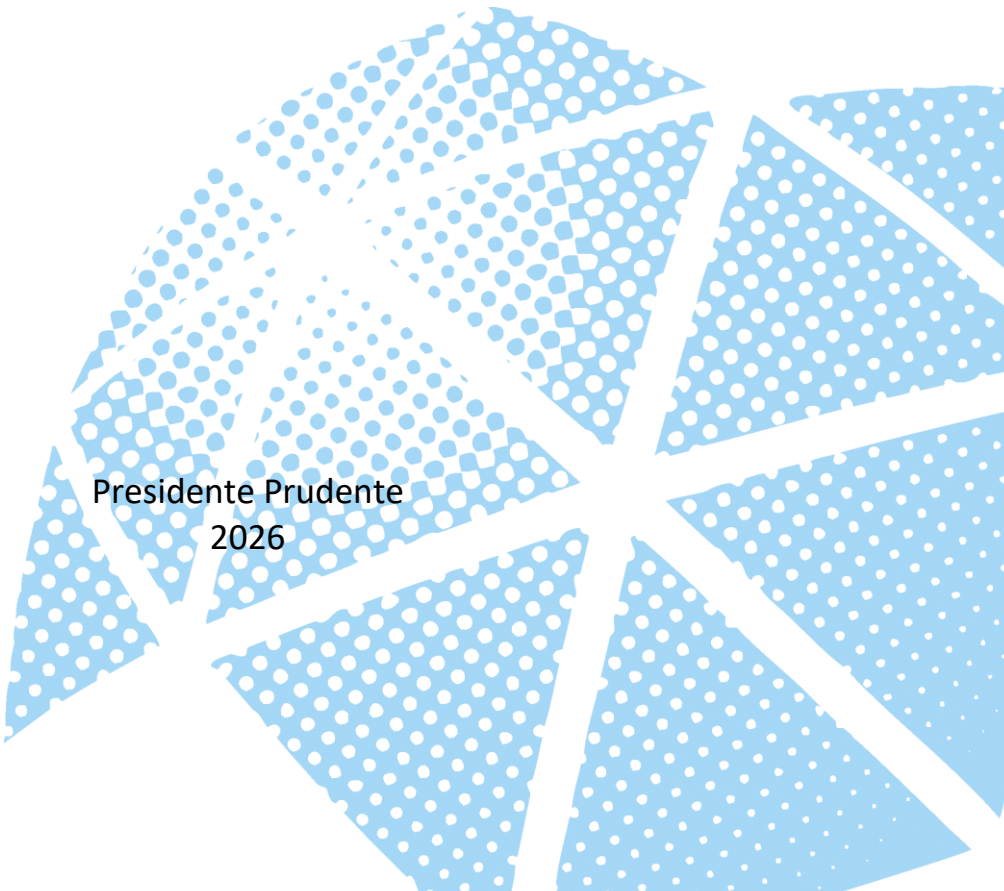
Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/08/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Ciências e Tecnologia - Campus de Presidente Prudente

GABRIEL MASIERO DA SILVA

**IMMUNOSENSOR BASED ON GOLD NANOPARTICLES ENCAPSULATED IN AZO-
POLYMER AND REDUCED GRAPHENE OXIDE FOR THE DETECTION OF THE PRO-
INFLAMMATORY MOLECULE INTERLEUKIN-6 (IL-6)**

Presidente Prudente
2026



GABRIEL MASIERO DA SILVA

IMMUNOSENSOR BASED ON GOLD NANOPARTICLES ENCAPSULATED IN AZO-POLYMER AND REDUCED GRAPHENE OXIDE FOR THE DETECTION OF THE PRO-INFLAMMATORY MOLECULE INTERLEUKIN-6 (IL-6)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Química

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira (UNESP)

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Santos de Lira (UNESP)

Presidente Prudente
2026

S586i

Silva, Gabriel Masiero da

Immunosensor based on gold nanoparticles encapsulated in azo-polymer and reduced graphene oxide for the detection of the pro-inflammatory molecule interleukin-6 (IL-6) / Gabriel Masiero da Silva. -- Presidente Prudente, 2026
71 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente

Orientador: Marcos Fernando de Souza Teixeira

Coorientador: Fábio Santos de Lira

1. Biossensores. 2. Espectroscopia de impedância. 3. Eletroquímica. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL

O presente trabalho propõe uma abordagem inovadora no campo de biossensores eletroquímicos por meio do desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico voltado para a determinação da citocina pró-inflamatória interleucina-6 (IL-6). A IL-6 é amplamente reconhecida como um biomarcador envolvido na modulação de processos inflamatórios agudos e crônicos e, em contextos oncológicos, pode favorecer a progressão tumoral em diferentes tipos de câncer, incluindo mama, pulmão, colorretal e próstata.

Nesse contexto, o imunossensor desenvolvido apresenta alinhamento com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, especialmente o ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), ao possibilitar a detecção antecipada da interleucina-6 (IL-6), favorecendo estratégias de diagnóstico e monitoramento de doenças crônicas não transmissíveis, em consonância com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS). Além disso, o sensor demonstra potencial aplicação em sistemas miniaturizados, permitindo análises descentralizadas, próximas ao paciente e fora de ambientes laboratoriais altamente especializados, o que é particularmente relevante em regiões com acesso limitado à infraestrutura de saúde. Essa característica contribui para a ampliação do acesso a ferramentas diagnósticas, alinhando-se também ao ODS 10 (Redução das Desigualdades) e ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura).

Do ponto de vista econômico, a detecção convencional da IL-6 é majoritariamente realizada por ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA, que demandam equipamentos específicos, múltiplas etapas, maior tempo de análise e custos elevados por ensaio. Nesse sentido, o imunossensor impedimétrico proposto surge como uma alternativa promissora, com potencial para redução de custos operacionais, simplificação de procedimentos analíticos e otimização nos tempos de análise. Esses aspectos estão em consonância com o ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis), ao favorecer o uso racional de reagentes e a otimização de recursos laboratoriais. Assim, este trabalho apresenta impacto potencial não apenas científico e tecnológico, mas também social, ao contribuir para o desenvolvimento de soluções sustentáveis e acessíveis voltadas à saúde.

POTENTIAL IMPACT

The present work proposes an innovative approach in the field of electrochemical biosensors through the development of an impedimetric immunosensor aimed at the determination of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6). IL-6 is widely recognized as a biomarker involved in the modulation of acute and chronic inflammatory processes and, in oncological contexts, may promote tumor progression in different types of cancer, including breast, lung, colorectal, and prostate cancers.

In this context, the developed immunosensor is aligned with the Sustainable Development Goals (SDGs), particularly SDG 3 (Good Health and Well-Being), by enabling the early detection of interleukin-6 (IL-6), thereby supporting diagnostic and monitoring strategies for chronic non-communicable diseases, in accordance with the guidelines of the World Health Organization (WHO). In addition, the sensor shows potential applicability in miniaturized analytical systems, allowing decentralized analyses close to the patient and outside highly specialized laboratory environments, which is particularly relevant in regions with limited access to healthcare infrastructure. This feature contributes to expanding access to diagnostic tools, aligning with SDG 10 (Reduced Inequalities) and SDG 9 (Industry, Innovation and Infrastructure).

From an economic perspective, conventional IL-6 detection is predominantly performed using immunoenzymatic assays, such as ELISA, which require specific equipment, multiple procedural steps, longer analysis times, and high per-assay costs. In this sense, the proposed impedimetric immunosensor emerges as a promising alternative, with potential for reducing operational costs, simplifying analytical procedures, and optimizing analysis time. These aspects are consistent with SDG 12 (Responsible Consumption and Production), as they favor the rational use of reagents and the optimization of laboratory resources. Thus, this work presents potential impact not only at the scientific and technological levels, but also at the social level, by contributing to the development of sustainable and accessible solutions for healthcare.

GABRIEL MASIERO DA SILVA

**IMMUNOSENSOR BASED ON GOLD NANOPARTICLES ENCAPSULATED IN AZO-POLYMER
AND REDUCED GRAPHENE OXIDE FOR THE DETECTION OF THE PRO-INFLAMMATORY
MOLECULE INTERLEUKIN-6 (IL-6)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica

Data da defesa: 26/02/2026

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira
UNESP - Faculdade de Ciências e Tecnologia - Campus de Presidente Prudente

Profa. Dra. Silvania Lanfredi
UNESP - Faculdade de Ciências e Tecnologia - Campus de Presidente Prudente

Prof. Dr. Elen Julciléia Romão Sartori
UEL - Câmpus de Londrina

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos ao meu orientador e grande amigo Marcos Fernando de Souza Teixeira, que me acolheu no grupo de pesquisa, acreditou em meu potencial desde o início e contribuiu de forma imprescindível para a execução deste trabalho, além de ter sido fundamental para o meu crescimento profissional.

Aos meus pais, Edivaldo e Elizabeth, agradeço pelo incentivo constante ao longo da minha trajetória acadêmica, pelo apoio emocional, financeiro e por nunca medirem esforços para que eu pudesse seguir o caminho dos estudos. Nada disso seria possível sem vocês. Aos meus irmãos, Daniel e Samuel, pelos momentos compartilhados ao longo dessa caminhada e pela presença constante, tanto nas conquistas quanto nos desafios.

Ao professor Fábio, que atuou como coorientador deste trabalho, deixo meu agradecimento pelas valiosas contribuições, discussões e suporte técnico, sem os quais a realização desta pesquisa não teria sido possível.

Aos meus colegas de laboratório, Heitor, Miqueias, Pedro, João, Arthur, Fábio, Willian, Manoela e Bianca, agradeço pelo convívio diário, pelas trocas de conhecimento e pelo apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Destaco, de forma especial, o Vinícios, que me acompanha desde a graduação e esteve presente em todas as etapas dessa trajetória.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para a conclusão desta etapa tão importante da minha formação. Esta dissertação não representa apenas um esforço individual, mas o resultado da colaboração, do apoio e do incentivo de todos que estiveram comigo ao longo desse caminho. Meu mais profundo agradecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória amplamente associada a processos inflamatórios agudos e crônicos e que, em contextos oncológicos, pode contribuir para a formação e progressão tumoral, tornando seu monitoramento altamente relevante para aplicações biomédicas. Neste contexto, a presente dissertação descreve os resultados obtidos a partir da análise eletroquímica e morfológica da plataforma ternária poli(azo-BBY)-AuNP/OGr, visando sua aplicação no monitoramento da concentração de interleucina-6 (IL-6). A plataforma foi construída por meio da técnica de eletropolimerização em etapa única sobre substrato de óxido de estanho dopado com flúor (FTO), permitindo a obtenção de nanopartículas de ouro revestidas pelo azo-polímero em conjunto com óxido de grafeno reduzido. O mecanismo de detecção do imunossensor baseia-se no uso de oxigênio molecular dissolvido como sonda redox, cuja resposta eletroquímica é mediada pelo agrupamento azo ($-N=N-$) presente no polímero Bismarck Brown Y. As análises por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) revelaram uma redução superior a 90% na resistência de transferência de carga do material modificado (poli(azo-BBY)-AuNP/OGr) em comparação ao polímero puro poli(azo-BBY), evidenciando o efeito sinérgico das nanopartículas de ouro e do óxido de grafeno reduzido na melhoria das propriedades eletroquímicas do sistema. A morfologia dos filmes foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), revelando nanoestruturas de ouro revestidas pelo polímero condutor, bem como a incorporação do óxido de grafeno reduzido, evidenciada pela presença de estruturas contínuas que se sobrepõem às camadas previamente formadas, resultando em um recobrimento do tipo véu sobre a matriz polimérica. A imobilização dos anticorpos na superfície da plataforma ternária foi realizada por ligação cruzada utilizando glutaraldeído a 1%, permitindo a construção do imunossensor. O dispositivo desenvolvido apresentou limite de detecção de $2,51 \text{ pg mL}^{-1}$ e faixa linear de $5\text{--}30 \text{ pg mL}^{-1}$ sob oxigênio atmosférico, demonstrando elevado potencial para quantificação de citocinas em aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Imunossensor impedimétrico; Impedância eletroquímica; Interleucina-6. Inflamação; Sensor eletroquímico.

ABSTRACT

Interleukin-6 (IL-6) is a pro-inflammatory cytokine widely associated with acute and chronic inflammatory processes and, in oncological contexts, may contribute to tumor development and progression. Consequently, monitoring IL-6 levels is highly relevant for biomedical applications. In this context, this dissertation reports the electrochemical and morphological investigation of a ternary poly(azo-BBY)-AuNP/rGO sensing platform for monitoring interleukin-6 concentration. The platform was fabricated through a single-step electropolymerization process on a fluorine-doped tin oxide (FTO) substrate, enabling the formation of gold nanoparticles encapsulated by the azo-polymer in combination with reduced graphene oxide. The immunosensor detection mechanism relies on dissolved molecular oxygen as an intrinsic redox probe, whose electrochemical response is mediated by the azo group ($-N=N-$) present in the Bismarck Brown Y polymer. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) revealed a reduction greater than 90% in the charge transfer resistance of the modified material (poly(azo-BBY)-AuNP/rGO) compared with the pristine poly(azo-BBY), highlighting the synergistic contribution of gold nanoparticles and reduced graphene oxide to the enhancement of the system's electrochemical properties. Scanning electron microscopy (SEM) revealed gold nanostructures coated by the conducting polymer and the successful incorporation of reduced graphene oxide, forming continuous structures that overlap the previously deposited layers and generate a veil-like coating over the polymeric matrix. Antibodies were immobilized onto the surface of the ternary platform through glutaraldehyde-mediated crosslinking (1%), enabling the construction of the immunosensor. The resulting device exhibited a detection limit of 2.51 pg mL^{-1} and a linear range of $5\text{--}30 \text{ pg mL}^{-1}$ under atmospheric oxygen conditions, demonstrating strong potential for cytokine quantification in biomedical applications.

Keywords: Impedimetric immunosensor; Electrochemical impedance; Interleukin-6; Inflammation; Immunosensor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

Figura 1: Representação esquemática do início do processo inflamatório.	15
Figura 2: Representação esquemática das vias metabólicas ativadas após a formação de ácido araquidônico.....	16
Figura 3: Representação esquemática dos tipos de imunoensaio que podem ser realizados: imunoensaio direto (A), imunoensaio indireto (B), imunoensaio tipo "sanduíche" (C) e imunoensaio competitivo (D).....	20
Figura 4: Representação esquemática do mecanismo de funcionamento de sensores impedimétricos aplicados ao imunossensoriamento.....	23
Figura 5: Representação do Monômero de Bismarck Brown Y.	25
Figura 6: Ilustração do comportamento redox do azopolímero.	25
Figura 7: Estrutura molecular do óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido.	27
Figura 8: Representação esquemática da estrutura de camadas alternadas entre o polímero condutor e o óxido de grafeno reduzido.	28
Figura 9: Representação esquemática do aumento da área eletroativa da plataforma sensorial.	30

Artigo Científico

Figure 1: (A) Cyclic voltammograms recorded during the single step electrosynthesis of the poly(azo-BBY)-AuNP/rGO nanocomposite on the FTO substrate showing the progressive film growth over 20 cycles within a potential window of -0.5 to 1.2 V vs SCE at a scan rate of 10 mV s ⁻¹ . (B) Schematic illustration of the interfacial formation mechanism depicting the anodic polymerization of the monomer and the subsequent cathodic processes involving the nucleation of gold nanoparticles at distinct energetic sites and the simultaneous deposition of the reduced graphene oxide layer. (1) polymerization of the BBY monomer (E _a); (2) electrochemical reduction, deposition, and stabilization of gold nanoparticles (E _{C1} and E _{C2}); (3) electrochemical reduction of graphene oxide	38
Figure 2: Scanning electron microscopy SEM images illustrating the morphological evolution of the sensing platform. Micrographs of the pristine poly(azo-BBY) film at magnifications of 10,000x (A) 50,000x (B) and 100,000x (C). Images of the poly(azo-BBY)-AuNP binary system at	

magnifications of 10,000x (D) 50,000x (E) and 100,000x (F). Micrographs of the ternary poly(azo-BBY)-AuNP/rGO nanocomposite at magnifications of 10,000x (G) 50,000x (H) and 100,000x (I) highlighting the integrated texture and the presence of translucent rGO sheets. Scale bars represent 1 μm for images at 10,000x magnification and 100 nm for images at 50,000x and 100,000x magnifications..... 39

Figure 3: Electrochemical characterization of the sensing platforms under controlled atmospheres in PBS at 25 °C. **(A)** Cyclic voltammograms recorded at 25 mV s⁻¹ comparing the electrocatalytic response toward oxygen reduction for (1) poly(azo-BBY), (2) poly(azo-BBY)-AuNP, and (3) poly(azo-BBY)-AuNP/rGO. **(B)** Nyquist plots obtained at an applied potential of -0.35 V vs pseudo-Ag/AgCl under O₂ saturation for the three platforms displaying the experimental data and the respective mathematical fits. **(C)** Bode phase angle spectra representing the phase shift as a function of the logarithm of frequency for each interface to illustrate the relaxation behavior and capacitive changes. **(D)** Comparative Nyquist plots for the ternary poly(azo-BBY)-AuNP/rGO platform under N₂ and O₂..... 41

Figure 4: Impedimetric characterization of the IL-6 immunosensor. **(A)** Nyquist spectra recorded at an applied potential of -0.35 V (vs. pseudo-Ag/AgCl) in 0.10 mol L⁻¹ PBS under naturally aerated conditions for each surface modification step. **(B)** Real Impedance versus Real Capacitance spectra of the poly(azo-BBY)-AuNP/rGO platform before and after successive functionalization with the immunosensor components 47

Figure 5: Impedimetric evaluation of the interleukin-6 recognition process. **(A)** Nyquist plots obtained during the standard addition of IL-6 in 0.05 mol L⁻¹ PBS at an applied potential of -0.35 V vs pseudo-Ag/AgCl. **(B)** Absolute impedance magnitude |Z| spectra as a function of frequency for the different analyte concentrations 49

Figure 6: Performance assessment and selectivity of the IL-6 immunosensor. **(A)** Analytical response as a function of interleukin-6 concentration highlighting the sigmoidal behavior fitted by the 4PL model. **(B)** Relative response percentage for 20pg mL⁻¹ of various interfering substances including TNF α , IL-10, IL-1RA, BSH, and Hm compared to the primary IL-6 signal where error bars represent the standard deviation of triplicate measurements recorded in 0.05 mol L⁻¹ PBS at an applied potential of -0.35 V vs pseudo-Ag/AgCl 50

Figure 7: Validation of the analytical precision and stability. **(A)** Reproducibility study using six independently fabricated immunosensors (labeled 1 to 6) exposed to 20 pg mL⁻¹ of IL-6. **(B)**

Operational stability assessment of a single immunosensor maintained in the same analyte solution over seven days. The red dash-dotted lines represent the boundaries of the 95% confidence interval (97.2% – 115.1%) calculated from the first four days. Data points from Day 1 to Day 4 fall within this stability region, while Day 5 onward shows a significant deviation due to surface passivation effects. Error bars represent the standard deviation of triplicate measurements (n = 3) 54

Material Suplementar

Figure S1: Cyclic voltammograms recorded during the electropolymerization of the pristine BBY monomer (10 mmol L^{-1}) on the FTO substrate in 0.1 mol L^{-1} HCl. The potential was scanned between -0.3 and $+1.2 \text{ V}$ (vs. SCE) at a scan rate of 10 mV s^{-1} for 20 cycles..... 58

Figure S2: Structural and compositional analysis of the poly(azo-BBY)-AuNP/rGO sensing platform. (A) Particle size distribution histogram for the gold nanoparticles within the ternary system, displaying an average diameter of $67.4 \pm 1.0 \text{ nm}$. (B) Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) spectrum highlighting the characteristic elemental signals of the nanocomposite components and the underlying substrate..... 58

Figure S3: Linearized Freundlich isotherm for the IL-6 immunosensor obtained by plotting the natural logarithm of the relative impedance change against the natural logarithm of IL-6 concentration. The plot reveals two distinct linear regimes with slopes (θ) of 0.75 and 0.19 , respectively, reflecting the distribution of binding sites with different energy levels..... 59

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO GERAL	13
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 MECANISMOS INICIAIS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	15
2.2 BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS	17
2.3 IMUNOENSAIOS	18
2.4 IMUNOSENSORES ELETROQUÍMICOS	21
2.5 POLÍMEROS CONDUTORES	23
2.6 BISMARCK BROWN Y	24
2.7 NANOCOMPÓSITOS BASEADOS EM GRAFENO-POLÍMEROS	26
2.8 NANOCOMPÓSITOS BASEADOS EM AUNP-POLÍMEROS	29
3.0 ARTIGO CIENTÍFICO: IMMUNOSENSOR BASED ON GOLD NANOPARTICLES ENCAPSULATED IN AZO-POLYMER AND REDUCED GRAPHENE OXIDE FOR THE DETECTION OF THE PRO-INFLAMMATORY MOLECULE INTERLEUKIN-6 (IL-6)	32
4.0 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65
DADOS CURRICULARES	68

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

A quantificação rápida de biomarcadores tem se tornado cada vez mais relevante em diversas áreas da ciência, uma vez que possibilita o monitoramento e o estudo eficiente de diferentes processos fisiopatológicos e, em contextos clínicos, pode favorecer a tomada de decisões em tempo hábil. Métodos capazes de fornecer respostas analíticas em curtos intervalos de tempo são especialmente importantes em sistemas biológicos dinâmicos, nos quais pequenas variações de concentração podem refletir alterações significativas no estado do organismo. Nesse contexto, a interleucina-6 (IL-6) destaca-se como um biomarcador de grande interesse devido ao seu papel central na resposta inflamatória e à sua participação em diferentes processos patológicos. Em contextos oncológicos, níveis elevados de IL-6 estão associados à inflamação crônica do microambiente tumoral, favorecendo a progressão de diversos tipos de câncer, o que reforça a relevância de sua quantificação para o acompanhamento e a compreensão desses fenômenos.

Atualmente, a quantificação de IL-6 é predominantemente realizada por ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA, amplamente empregados em laboratórios clínicos devido à sua elevada sensibilidade e especificidade. Apesar de sua consolidação, esses métodos apresentam limitações relacionadas ao custo, à necessidade de múltiplas etapas experimentais, ao tempo de análise e à dependência de infraestrutura laboratorial especializada, o que restringe sua aplicação em contextos que demandam análises rápidas, descentralizadas ou em tempo real.

Diante dessas limitações, os imunossensores eletroquímicos emergem como alternativas promissoras para a quantificação de biomarcadores inflamatórios. Em particular, os imunossensores impedimétricos combinam a seletividade da interação antígeno-anticorpo com a sensibilidade da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, permitindo o monitoramento direto de eventos biomoleculares na superfície do sensor, sem a necessidade de marcadores ou etapas adicionais de amplificação de sinal. Além disso, esses dispositivos apresentam potencial para miniaturização, baixo consumo de amostra e aplicação em sistemas portáteis.

Nesse contexto, os polímeros condutores têm se destacado por sua eficiência na construção de interfaces sensoriais adequadas à transdução eletroquímica. Entre eles, os azopolímeros apresentam propriedades particularmente atrativas, como atividade redox

intrínseca, elevada estabilidade química e a presença de grupos funcionais que favorecem a imobilização de biomoléculas. Além disso, a aplicação de técnicas eletroquímicas, como a voltametria cíclica, durante o processo de eletropolimerização possibilita a obtenção de filmes homogêneos, permitindo o controle da espessura e da morfologia do material, parâmetros diretamente associados ao desempenho do sensor.

Adicionalmente, a incorporação de materiais em plataformas sensoriais tem sido amplamente explorada visando a obtenção de efeitos sinérgicos. A integração de nanopartículas de ouro a polímeros condutores pode aumentar significativamente a área eletroativa e facilitar a transferência de carga, enquanto a incorporação do óxido de grafeno contribui para a melhoria da condutividade elétrica do sistema, além de potencializar a sensibilidade analítica do sensor. Dessa forma, o desenvolvimento de nanocompósitos baseados em azo-polímeros, nanopartículas de ouro e óxido de grafeno representa uma abordagem promissora para a construção de imunossensores impedimétricos altamente sensíveis e aplicáveis à quantificação da interleucina-6.

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico baseado no nanocompósito ternário poli(azo-BBY)-AuNP/OGr, utilizando o oxigênio dissolvido no meio reacional como sonda redox intrínseca para a determinação de IL-6. Diferentemente das abordagens convencionais, que envolvem múltiplas etapas de síntese e integração dos componentes, propõe-se a construção da interface sensora por meio de um único protocolo de eletropolimerização. Nesse processo, a formação do filme polimérico, a nucleação das nanopartículas de ouro e a incorporação do óxido de grafeno reduzido ocorrem de forma integrada durante a varredura voltamétrica, sem a necessidade de etapas adicionais de montagem ou pós-tratamento. Espera-se que essa estratégia de etapa única reduza o tempo de fabricação e favoreça uma integração interfacial mais eficiente, possibilitando a obtenção de uma plataforma sensora adequada para aplicações em imunossensoriamento eletroquímico.

4.0 CONCLUSÃO

A presente dissertação de mestrado descreveu o desenvolvimento de uma plataforma imunossensora baseada no filme nanocompósito ternário poli(azo-BBY)-AuNP/OG_r, obtido por meio de um processo de eletropolimerização em etapa única. Essa estratégia representa um avanço relevante em relação à maioria das abordagens previamente reportadas na literatura científica, nas quais materiais à base de grafeno e nanopartículas metálicas são incorporados por etapas sequenciais e processos de fabricação mais complexos. A incorporação em etapa única das nanopartículas de ouro e do óxido de grafeno reduzido à matriz polimérica resultou em uma arquitetura condutora altamente integrada, promovendo melhorias significativas nas propriedades eletroquímicas da plataforma sensorial.

A formação do nanocompósito ternário poli(azo-BBY)-AuNP/OG_r foi confirmada pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), evidenciando a integração efetiva dos componentes na matriz polimérica. As imagens revelaram a presença de AuNP's distribuídas e revestidas pelo azo-polímero, cuja incorporação contribuiu diretamente para o aumento da área eletroativa, intensificando a resposta eletroquímica gerada. Adicionalmente, observou-se estruturas translúcidas semelhantes a um véu, sendo associadas ao óxido de grafeno reduzido. Essa configuração estrutural favoreceu uma comunicação eletrônica mais eficiente entre as interfaces internas do nanocompósito reduzindo em mais de 90% os valores de R_{ct} , resultando em uma plataforma sensorial altamente condutora com elevada densidade de sítios ativos para imobilização de anticorpos e, conseqüentemente, melhor desempenho no reconhecimento biomolecular.

Um dos aspectos centrais do sensor proposto foi a utilização do oxigênio dissolvido no meio de análise como sonda redox intrínseca, na qual a transdução do sinal foi governada por um mecanismo do tipo “*gate effect*”, associado ao impedimento estérico promovido pela formação do imunocomplexo na interface do sensor. A abordagem utilizada eliminou a necessidade de mediadores redox externos como o $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, simplificando o sistema analítico e reduzindo etapas experimentais.

Ao comparar o imunossensor desenvolvido com o método padrão ouro (ELISA), observa-se uma simplificação significativa do protocolo analítico, uma vez que a plataforma proposta opera com um único anticorpo imobilizado diretamente na interface eletroquímica,

eliminando etapas adicionais de detecção e amplificação enzimática. Ademais, a configuração eletroquímica possibilita miniaturização do sistema, redução no consumo de reagentes e potencial integração em dispositivos portáteis para análises rápidas e descentralizadas.

A validação frente ao ELISA revelou um erro relativo de 3,15 %. A análise estatística pelo teste t de Student resultou em t calculado inferior ao valor crítico esperado ($t_{\text{calc}}=0,62 < t_{\text{tab}} = 2,78$), indicando ausência de diferença estatisticamente significativa entre as metodologias. Logo, a plataforma poli(azo-BBY)-AuNP/OGr demonstrou desempenho quantitativo equivalente ao ELISA, configurando-se como uma alternativa robusta e eficiente para o monitoramento de IL-6 em matrizes biológicas complexas. Os ensaios de seletividade confirmaram a especificidade da interface de reconhecimento, ao mesmo tempo em que evidenciaram a interação competitiva entre IL-6 e o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), destacando um fenômeno biológico relevante que pode influenciar a dinâmica de reconhecimento em matrizes complexas.

Concluindo, o imunossensor desenvolvido apresentou excelente desempenho analítico, fornecendo um limite de detecção de $2,51 \text{ pg mL}^{-1}$ e uma faixa linear entre 5 a 30 pg mL^{-1} , demonstrando alta sensibilidade, estabilidade adequada ao longo de quatro dias e resposta reprodutível. Ademais, a arquitetura proposta não se limita à determinação de IL-6, podendo ser adaptada para outros analitos por meio da substituição do elemento de biorreconhecimento, o que evidencia a versatilidade e o potencial da plataforma poli(azo-BBY)-AuNP/OGr para aplicações em imunossensoriamento eletroquímico e bioanálises.

REFERÊNCIAS

- AHMED, Shakeel *et al.* Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 141–153, 1 ago. 2016.
- ARNOLD, Natalie *et al.* Inflammation and Cardiovascular Disease: The Future. **European Cardiology**, v. 16, p. e20, fev. 2021.
- ASHARANI, P. V. *et al.* Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 43–54, mar. 2011.
- CANCELLIERE, Rocco *et al.* Cost-effective and disposable label-free voltammetric immunosensor for sensitive detection of interleukin-6. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 213, p. 114467, 1 out. 2022.
- CHEN, Huinan *et al.* The Applications of Electrochemical Immunosensors in the Detection of Disease Biomarkers: A Review. **Molecules**, v. 28, n. 8, p. 3605, 20 abr. 2023.
- DUAN, Lihua; RAO, Xiaoquan; SIGDEL, Keshav Raj. Regulation of Inflammation in Autoimmune Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p. 7403796, 28 fev. 2019.
- EIRÓ, Noemí; VIZOSO, Francisco J. Inflammation and cancer. **World Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 4, n. 3, p. 62–72, 27 mar. 2012.
- FARJADIAN, Fatemeh *et al.* Recent Developments in Graphene and Graphene Oxide: Properties, Synthesis, and Modifications: A Review. **ChemistrySelect**, v. 5, n. 33, p. 10200–10219, 2020.
- GIBALOVA, Anna *et al.* Multi-responsive Electropolymer Surface Coatings Based on Azo Molecular Switches and Carbazoles: Light, pH, and Electrochemical Control of Z→E Isomerization in Thin Films. **Chemistry – A European Journal**, v. 29, n. 63, p. e202302215, 2023.
- GOUVEIA, Guilherme *et al.* Continuous Biosensing to Monitor Acute Systemic Inflammation, a Diagnostic Need for Therapeutic Guidance. **ACS Sensors**, v. 10, n. 1, p. 4–14, 24 jan. 2025.
- GREBENCIUCOVA, Elena; VANHAERENTS, Stephen. Interleukin 6: at the interface of human health and disease. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 28 set. 2023.
- HANNA, Violette Said; HAFEZ, Ebtisam Abdel Aziz. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 11, p. 23–32, maio 2018.
- HAYRAPETYAN, Hovhannes *et al.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2612, p. 1–17, 2023.
- IELO, Ileana *et al.* Synthesis, Chemical–Physical Characterization, and Biomedical Applications of Functional Gold Nanoparticles: A Review. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5823, jan. 2021.

- JOUDEH, Nadeem; LINKE, Dirk. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, p. 262, 7 jun. 2022.
- LAZANAS, Alexandros Ch.; PRODROMIDIS, Mamas I. Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial. **ACS Measurement Science Au**, v. 3, n. 3, p. 162–193, 21 jun. 2023.
- LE, Thanh-Hai; KIM, Yukyung; YOON, Hyeonseok. Electrical and Electrochemical Properties of Conducting Polymers. **Polymers**, v. 9, n. 4, p. 150, abr. 2017.
- LEI, Hongtao *et al.* Application of Antibody and Immunoassay for Food Safety. **Foods**, v. 11, n. 6, p. 826, jan. 2022.
- LIU, Guozhen *et al.* Point-of-care detection of cytokines in cytokine storm management and beyond: Significance and challenges. **VIEW**, v. 2, n. 4, p. 20210003, ago. 2021.
- MARQUES, Rafael Elias *et al.* Exploring the Homeostatic and Sensory Roles of the Immune System. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 125, 31 mar. 2016.
- OLEAN-OLIVEIRA, André *et al.* Nanocomposite Materials Based on Electrochemically Synthesized Graphene Polymers: Molecular Architecture Strategies for Sensor Applications. **Chemosensors**, v. 9, n. 6, p. 149, jun. 2021.
- OLEAN-OLIVEIRA, André; MONTEIRO SERAPHIM, Patricia; TEIXEIRA, Marcos F. S. Methylated DNA impedimetric immunosensor based on azo-polymer-AuNPs dots and 5-methylcytosine antibody using dissolved oxygen as a redox probe. **Electrochemistry Communications**, v. 136, p. 107242, 1 mar. 2022.
- POLICE PATIL, Avinash V. *et al.* Recent Advances in Electrochemical Immunosensors with Nanomaterial Assistance for Signal Amplification. **Biosensors**, v. 13, n. 1, p. 125, 11 jan. 2023.
- RAMIREZ, Carlos A. *et al.* Recent advances in graphene oxide-based electrochemical sensors. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 102, n. 11, p. 667–681, nov. 2024.
- RANDVIIR, Edward P.; BANKS, Craig E. A review of electrochemical impedance spectroscopy for bioanalytical sensors. **Analytical Methods**, v. 14, n. 45, p. 4602–4624, 24 nov. 2022.
- REAÑO, Resmond L.; ESCOBAR, Erwin C. A review of antibody, aptamer, and nanomaterials synergistic systems for an amplified electrochemical signal. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, p. 1361469, 13 mar. 2024.
- REN, Haoliang. Graphene and Its Derivatives for Electrochemical Sensing. **Sensors**, v. 25, n. 7, p. 1993, jan. 2025.
- RUIZ-RODRÍGUEZ, Juan Carlos *et al.* Critical Hypercytokinemia in Sepsis and Septic Shock: Identifying Interleukin-6 Thresholds Beyond Which Mortality Risk Exceeded Survival Probability. **Journal of Clinical Medicine**, v. 15, n. 3, p. 1057, 28 jan. 2026.

SAID, Elias *et al.* Defining IL-6 levels in healthy individuals: A meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 93, 22 nov. 2020.

SANG, Yun Beom *et al.* High Serum Levels of IL-6 Predict Poor Responses in Patients Treated with Pembrolizumab plus Axitinib for Advanced Renal Cell Carcinoma. **Cancers**, v. 14, n. 23, 2 dez. 2022.

SHENDE, Pravin; AUGUSTINE, Steffi; PRABHAKAR, Bala. A review on graphene nanoribbons for advanced biomedical applications. **Carbon Letters**, v. 30, n. 5, p. 465–475, 1 out. 2020.

SIBUYI, Nicole Remaliah Samantha *et al.* Multifunctional Gold Nanoparticles for Improved Diagnostic and Therapeutic Applications: A Review. **Nanoscale Research Letters**, v. 16, p. 174, 5 dez. 2021.

TANAKA, Toshio; NARAZAKI, Masashi; KISHIMOTO, Tadamitsu. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, p. a016295, out. 2014.

TEIXEIRA, M. F. S.; BARSAN, M. M.; BRETT, C. M. A. Molecular engineering of a π -conjugated polymer film of the azo dye Bismarck Brown Y. **RSC Advances**, v. 6, n. 103, p. 101318–101322, 24 out. 2016.

VAZHAYIL, Ashalatha *et al.* A comprehensive review on the recent developments in transition metal-based electrocatalysts for oxygen evolution reaction. **Applied Surface Science Advances**, v. 6, p. 100184, 1 dez. 2021.

ZAMIRI, Golnoush; HASEEB, A. S. M. A. Recent Trends and Developments in Graphene/Conducting Polymer Nanocomposites Chemiresistive Sensors. **Materials**, v. 13, n. 15, p. 3311, jan. 2020.

ZEB, Shah *et al.* Relationship Between Serum Interleukin-6 Levels, Systemic Immune-Inflammation Index, and Other Biomarkers Across Different Rheumatoid Arthritis Severity Levels. **Cureus**, 24 out. 2024.

ZHANG, Yiran *et al.* Arachidonic acid metabolism in health and disease. **MedComm**, v. 4, n. 5, p. e363, 2023.

ZHAO, Qian *et al.* Recent improvements in enzyme-linked immunosorbent assays based on nanomaterials. **Talanta**, v. 223, p. 121722, 1 fev. 2021.

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
	GABRIEL MASIERO DA SILVA 25/09/2000
Nacionalidade	Brasileiro
Nome em citações bibliográficas:	G.M. Silva SILVA, Gabriel M.
Currículo Lattes	https://lattes.cnpq.br/9167046600919394
ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5235-7613
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
2018/2023	Graduado em Licenciatura em Química pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Brasil.
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	
SILVA, G. M.; TREVIZAN, H. F.; OLIVEIRA, Y. A.; LANFREDI, S.; TEIXEIRA, M. F. S. Light-driven, low-overpotential water oxidation on an alternating-layer architecture of palladium-salen/reduced graphene oxide p-n heterojunction. <i>Electrochimica Acta</i> , v. 548, 147922, 2026. DOI: https://doi.org/10.1016/j.electacta.2025.147922	
PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS	
Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), 2025, (Águas de Lindóia). IMMUNOSENSOR BASED ON GOLD NANOPARTICLE ENCAPSULATED IN AZO-POLYMER AND REDUCED GRAPHENE OXIDE FOR DETECTION OF THE PRO-INFLAMMATORY MOLECULE INTERLEUKIN-6 (IL-6). (Congresso).	
Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), 2022, (Bento Gonçalves). STUDY OF PHOTOELECTROCATALYTICAL BEHAVIOR OF PALLADIUM-SALEN/GRAPHENE NANOSTRUCTURES APPLYING IN WATER OXIDATION. (Congresso).	