

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JHENIFER BUENO CORREIA DA ROSA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM IMUNOSENSOR
ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-TOXINA
BOTULÍNICA DO SOROTIPO A

PONTA GROSSA
2026

JHENIFER BUENO CORREIA DA ROSA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM IMUNOSENSOR
ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-TOXINA
BOTULÍNICA DO SOROTIPO A

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas no Programa de Pós Graduação em
Ciências Farmacêuticas pela UNICENTRO/UEPG.

Orientadora: Profª Drª Juliana Inaba

PONTA GROSSA

2026

R788 Rosa, Jhenifer Bueno Correia da
Desenvolvimento e caracterização de um imunossensor eletroquímico para detecção de anticorpos anti-toxina botulínica do sorotipo A / Jhenifer Bueno Correia da Rosa. Ponta Grossa, 2026.
71 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Inaba.

1. Imunossensores. 2. Toxina botulínica - Anticorpos. 3. Aunps-siampy. 4. Eletroquímica. I. Inaba, Juliana. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615.19

JHENIFER BUENO CORREIA DA ROSA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR
ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-TOXINA
BOTULÍNICA DO SOROTIPO A**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e a Universidade do Centro-Oeste (UNICENTRO).

Ponta Grossa, 24 de abril de 2026.



Documento assinado digitalmente

JULIANA INABA

Data: 08/06/2026 14:10:53-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Juliana Inaba – UEPG - `Presidente



Documento assinado digitalmente

PAULO VITOR FARAGO

Data: 16/06/2026 14:33:33-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Paulo Vitor Farago – UEPG – Membro titular interno

Prof. Dr. Dhésmon Lima – MSVU - Membro titular externo

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA – UEPG
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF
Bloco M Sala 93 B - Campus Universitário em Uvaranas - Fone (42) 2102-8937
Av. Carlos Cavalcanti, 4748-CEP: 84030-900- PONTA GROSSA - PR - BRASIL

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida, e por iluminar a minha jornada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Juliana Inaba, pela orientação, por todos os conselhos, pela ajuda e paciência com a qual guiaram o meu aprendizado.

Ao meu esposo Pablo, por ser meu companheiro em todos os momentos, por me apoiar e me incentivar em todas as minhas escolhas.

À minha família, aos meus pais, Rosilene e Rivair, e as minhas irmãs, Joice e Alicia, por me apoiarem e estarem comigo em todos os momentos.

Aos meus amigos, por tornarem essa jornada algo leve.

Aos meus colegas do GEBB e do GDEM, por sua atenção e disposição.

Às professoras Dra. Karen Wohnrath e Dra. Christiana Andrade Pessôa, pelos ensinamentos e pelo apoio.

À banca de defesa, Dr. Paulo Vitor Farago e Dr. Dhesmon Lima pelo interesse e disponibilidade.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuário da UEPG (C-LabMu), pelas análises realizadas.

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e Fundação Araucária.

À Coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (UEPG/UNICENTRO).

Por fim, quero expressar minha profunda gratidão às todos que me ajudaram em meu trabalho. Suas contribuições foram inestimáveis e desempenharam um papel crucial em minha jornada.

RESUMO

A aplicação da toxina botulínica (BoNT/A) no mercado terapêutico e estético movimenta bilhões de dólares anualmente. Como neurotoxina potente, a BoNT/A exerce sua ação nas junções neuromusculares e nos gânglios autonômicos ao inibir a liberação de acetilcolina. Esse bloqueio resulta em uma paralisia flácida temporária, manifestada por fraqueza e atrofia muscular controlada. Desse modo, é amplamente empregada no tratamento de distúrbios associados à transmissão neuromuscular e na medicina estética. Em muitos casos, o tratamento com BoNT/A é crônico, entretanto, a aplicação em doses ou planos incorretos e/ou seu uso repetitivo pode induzir uma resposta imune, com a formação de anticorpos contra a toxina. Para evitar a aplicação terapêutica ineficaz nesses pacientes, a detecção precisa de anticorpos anti-BoNT/A é fundamental. Atualmente, as formas de detecção consistem em bioensaios que utilizam modelos animais, dependem de um maior tempo para análise, possuem alto custo e requerem laboratórios especializados para a sua execução. Uma alternativa eficiente é a utilização de sistemas de detecção eletroquímica baseados em imunossensores. Imunossensores são dispositivos de baixo custo, simples operação e diagnóstico rápido, além de possuírem potencial de miniaturização para uso em sistemas *point-of-care*. Neste sentido, o presente projeto tem como objetivo a construção de um sistema eletroquímico inédito para a detecção e quantificação de anticorpos anti-BoNT/A. Foi desenvolvida uma plataforma composta por um eletrodo de carbono vítreo oxidado (ox-ECV) modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs) estabilizadas por cloreto de 3-n-propil-(2-amino-4-metil)piridínio silsesquioxano (SiAmPy). Esse nanohíbrido foi caracterizado por UV-Vis, MEV, DLS e Potencial ζ . A plataforma ox-ECV/AuNPs-SiAmPy foi caracterizada por técnicas eletroquímicas (Espectroscopia de Impedância Eletroquímica - EIE e Voltametria Cíclica – VC), sendo, subsequentemente, realizada a imobilização da toxina botulínica (BoNT/A) para a confecção do biossensor ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA. Esse biossensor foi capaz de detectar os anticorpos anti-BoNT/A, que alteram a resposta eletroquímica do eletrodo utilizando sonda redox $K_3[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ nas medidas. O sistema foi otimizado através de um planejamento fatorial 2^2 , no qual foram estabelecidas a concentração de 1U da toxina e o tempo de incubação de 30 minutos para a construção do sensor. A curva analítica foi obtida pela técnica de EIE e apresentou uma faixa de detecção de 0,1 a 1,0 ng·mL⁻¹, com um LD = 0,0644 ng·mL⁻¹ e um LQ = 0,1953 ng·mL⁻¹. O dispositivo apresentou precisão satisfatória em termos de repetibilidade e reprodutibilidade, além de seletividade e especificidade na detecção. Adicionalmente, apresentou capacidade de detectar a presença de anticorpos em matriz complexa, como amostras de soro humano e estabilidade do dispositivo por no mínimo 6 dias. O biossensor configura-se como uma ferramenta promissora para a detecção de anticorpos anti-BoNT/A com aplicabilidade na prática clínica.

PALAVRAS-CHAVE: Imunossensor; Anticorpos Anti-BoNT/A; AuNPs-SiAmPy; Eletroquímica.

ABSTRACT

The application of botulinum toxin (BoNT/A) in the therapeutic and aesthetic market generates billions of dollars annually. As a potent neurotoxin, BoNT/A acts at neuromuscular junctions and autonomic ganglia by inhibiting the release of acetylcholine. This blockade results in temporary flaccid paralysis, manifested by controlled muscle weakness and atrophy. Thus, it is widely used in the treatment of disorders associated with neuromuscular transmission and in aesthetic medicine. In many cases, treatment with BoNT/A is chronic; however, administration at incorrect doses or treatment plans and/or repeated use may induce an immune response, leading to the formation of antibodies against the toxin. To avoid ineffective therapeutic application in these patients, the accurate detection of anti-BoNT/A antibodies is essential. Currently, detection methods mainly consist of bioassays that employ animal models, require longer analysis times, involve high costs, and demand specialized laboratories for their execution. An efficient alternative is the use of electrochemical detection systems based on immunosensors. Immunosensors are low-cost devices with simple operation and rapid diagnosis, and they also have potential for miniaturization for use in point-of-care systems. In this context, the present study an electrochemical system was develop to detect and quantify anti-BoNT/A antibodies. A platform was composed by an oxidized glassy carbon electrode (GCE-ox) modified with gold nanoparticles (AuNPs) stabilized by 3-*n*-propyl-(2-amino-4-methyl)pyridinium chloride silsesquioxane (SiAmPy). This nanohybrid was characterized by UV–Vis spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), dynamic light scattering (DLS), and ζ potential analysis. The GCE-ox/AuNPs-SiAmPy platform was characterized by electrochemical techniques (Electrochemical Impedance Spectroscopy – EIS and Cyclic Voltammetry – CV). Subsequently, BoNT/A was immobilized for the construction of the immunosensor GCE-ox/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA. This immunosensor was able to detect anti-BoNT/A antibodies, which alter the electrochemical response of the electrode using the redox probe $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$. The system was optimized through a 2^2 factorial design, establishing a concentration of 1 U of toxin and an incubation time of 30 minutes for sensor construction. The analytical curve, obtained by the EIS technique, showed a detection range from 0.1 to 1.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, with a limit of detection (LOD) of 0.0644 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and a limit of quantification (LOQ) of 0.1953 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. The device demonstrated satisfactory precision in terms of repeatability and reproducibility, as well as selectivity and specificity in detection. Additionally, it showed the ability to detect antibodies in complex matrices, such as human serum samples, and exhibited device stability for at least six days. The immunosensor represents a promising tool for the detection of anti-BoNT/A antibodies with potential applicability in clinical practice.

KEYWORDS: Immunosensor; Anti-BoNT/A Antibodies; AuNPs-SiAmPy; Electrochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura cristalina da neurotoxina botulínica A (BoNT/A).....	17
Figura 2 - Estrutura do complexo de alto peso molecular da BoNT.....	18
Figura 3 - Mecanismo de ação da BoNT no terminal nervoso.....	19
Figura 4 - Esquema representativo de biossensores.....	26
Figura 5 - Estruturas representativas dos silsesquioxanos: aleatórias, escada, e gaiola aberta ou fechada.....	29
Figura 6 - Estrutura do cloreto de 3-n-propil-(2-amino-4-metil)piridínio silsesquioxano (SiAmPy ⁺ Cl ⁻).....	30
Figura 7 - Esquema representativo do desenvolvimento do imunossensor.....	34
Figura 8 - Espectro de absorção UV-Vis (200-800 nm) dos precursores (HAuCl ₄ e SiAmPy ⁺ Cl ⁻) e o nanohíbrido sintetizado (AuNPs-SiAmPy).....	41
Figura 9 - (A) Micrografia MEV-FE das AuNPs-SiAmPy (70 kx). (B) Imagem de FE-STEM em campo claro/escuro evidenciando a distribuição das partículas (escala de 2μ).....	42
Figura 10 - Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos ECV (linha preta) e ox-ECV/AuNPs-SiAmPy (linha vermelha).....	43
Figura 11 - Voltamogramas cíclicos para as etapas de modificação: ECV (preto), ox-ECV (verde), ox-ECV/AuNPs-SiAmPy (vermelho), ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A (rosa) e ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA (azul).....	47
Figura 12 - Diagrama de Nyquist para as etapas de construção do biossensor, evidenciando as variações de R _{ct} em cada nível de funcionalização. ECV, ox-ECV, ox-ECV/AuNPs-SiAmPy, ox-ECV, ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A e ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA.....	48
Figura 13 - Voltamogramas cíclicos para as etapas de modificação: ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA (rosa) e ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA/Anti-BoNT/A (azul).....	49
Figura 14 - Diagrama de Nyquist para as etapas de construção do biossensor, evidenciando as variações da R _{ct} em cada nível de funcionalização. Eletrodos ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA (rosa) e ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA/Anti-BoNT/A (azul).....	50
Figura 15 - Diagrama de Pareto para os efeitos resultantes do planejamento fatorial 2 ² realizado para a otimização da preparação do biossensor.....	51
Figura 16 - Curva Analítica obtida através da relação entre o Log ΔR _{ct} e a concentração de anticorpos anti-BoNT/A.....	53
Figura 17 - Valores médios de concentração de anti-BoNT/A obtidas durante triplicata do ensaio de detecção de anti-BoNT/A em diferentes dias.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis e níveis empregados no planejamento fatorial 2^2 para otimização da plataforma sensora.....	35
Tabela 2 - Parâmetros eletroquímicos obtidos por voltametria cíclica para os eletrodos ECV e ox-ECV/AuNPs-SiAmPy.....	43
Tabela 3 - Valores de área eletroativa calculada para os eletrodos ECV, ox-ECV/AuNPs-SiAmPy.....	45
Tabela 4 - Matriz experimental do planejamento fatorial 2^2 para otimizar a construção do sensor para detecção de anticorpos anti-BoNT/A.....	51
Tabela 5 - Valores obtidos experimentalmente de concentração de anticorpos anti-BoNT/A detectadas em ensaios de sensibilidade e seletividade.....	56
Tabela 6 - Ensaio de Especificidade: Concentração Aparente e Reatividade Cruzada.....	57
Tabela 7 - Avaliação da resposta basal do imunossensor frente a diferentes diluições de soro humano.....	58
Tabela 8 - Parâmetros de recuperação em soro humano.....	59
Tabela 9 - Estudo de seletividade e interferência em matriz de soro (1:100).....	59
Tabela 10 - Valores médios de absorbância e seus respectivos valores de unidades padrões (SU) obtidos no ensaio de ELISA.....	61
Tabela 11 - Parâmetros de estabilidade do imunossensor ao longo de 12 dias de armazenamento.....	63

LISTA DE ABREVIações

anti-BoNT/A	Anticorpos anti-toxina botulínica do sorotipo A
Anti-PPT1	Anticorpos anti-palmitoil-proteína tioesterase 1
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AuNPs-SiAmPy	Nanopartículas de ouro estabilizadas/funcionalizadas com SiAmPy
BoNT/A	Toxina botulínica do sorotipo A
BoNT	Toxina botulínica
BSA	Albumina sérica bovina
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
ECV	Eletrodo de carbono vítreo (<i>glassy carbon electrode</i>)
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Council for Harmonisation
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV-FE	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
MNPs	Nanopartículas metálicas
ox-ECV	Eletrodo de carbono vítreo oxidado
R _{ct}	Resistência à transferência de carga
SiAmPy	Cloreto de 3-n-propil-(2-amino-4-metil)piridínio silsesquioxano
SSQ / SSQs	Silsesquioxano / Silsesquioxanos
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta-visível
VC	Voltametria cíclica
ζ (zeta)	Potencial zeta (ζ)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 TOXINA BOTULÍNICA.....	15
2.1.1 Estrutura espacial das proteínas BoNT	16
2.1.2 Mecanismo de Neuroparalisia causado pela BoNT/A	18
2.1.3 Imunogenicidade da BoNT/A.....	20
2.1.4 Detecção de anticorpos anti-BoNT/A	22
2.2 BIOSSENSORES	23
2.2.1 Biossensor como ferramenta analítica	24
2.2.2 Imunossensores	26
2.2.3 Nanomateriais e Nanohíbridos	27
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	32
4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS COM SiAmPy	33
4.3 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ELETRODOS DE CARBONO VÍTREO (ECV) COM AuNPS-SiAmPy	33
4.4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO IMUNOSSENSOR.....	34
4.5 OTIMIZAÇÃO DA PERFORMANCE DO IMUNOSSENSOR POR ESTUDOS DE PLANEJAMENTO FATORIAL	35
4.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS	36
4.7 AVALIAÇÃO DA REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE	36
4.8 Avaliação da Seletividade e especificidade	36
4.9 DETECÇÃO EM AMOSTRA REAL	37

4.10 VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL POR ELISA	38
4.11 ESTABILIDADE DO IMUNOSENSOR	38
4.12 INSTRUMENTAÇÃO E PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS COM SiAmPy (AuNPS-SiAmPy)	40
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO MODIFICADO OX-ECV/AuNPS-SiAmPy	43
5.2.1 Caracterização Eletroquímica das etapas de Construção do Biossensor	45
5.2.2 Detecção de anticorpos anti-BoNT/A	48
5.2.3 Otimização da performance do imunossensor por estudos de planejamento fatorial	50
5.3 PARÂMETROS ANALÍTICOS	52
5.3.1 Curva Analítica	52
5.3.2 Determinação dos Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)	54
5.4 REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE	54
5.5 EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO (SENSIBILIDADE ANALÍTICA)	55
5.6 ESPECIFICIDADE E REATIVIDADE CRUZADA	56
5.7 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS E ESTUDO DE EFEITO DE MATRIZ	57
5.7.1 Avaliação do Efeito de Matriz e Escolha da Diluição	58
5.7.2 Ensaios de Recuperação por fortificação em Soro Humano	58
5.7.3 Seletividade em Matriz Complexa e Reatividade Cruzada	59
5.8 VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL POR ELISA	60
5.8.1 Comparação: Imunossensor Eletroquímico vs. ELISA	62
5.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE E TEMPO DE ARMAZENAMENTO	62
6 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

A aplicação da toxina botulínica (BoNT) nos mercados terapêutico e estético movimentam bilhões de dólares anualmente. Em 2024, o mercado global de BoNT movimentou USD 8,11 bilhões, enquanto em 2025 os gastos somaram USD 13,2 bilhões (*Botulinum Toxins Market*, 2025). A toxina botulínica é uma potente neurotoxina produzida pelo *Clostridium botulinum*, uma bactéria anaeróbia e Gram-positiva (Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022). Sua ação ocorre nas junções neuromusculares e nos gânglios autonômicos, onde inibe a liberação de acetilcolina - o principal neurotransmissor neuromuscular dessas sinapses (Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022).

Esse bloqueio resulta em uma paralisia flácida temporária, manifestada por fraqueza e atrofia muscular controlada. A duração da paralisia varia significativamente conforme o sorotipo da BoNT, a dosagem, a via de administração e o tipo de terminal nervoso afetado (Pirazzini et al., 2017). Atualmente, a toxina é classificada em oito sorotipos (A, B, C1, C2, D, E, F e G), com base em suas características imunológicas. O sorotipo A (BoNT/A) é o mais potente, sendo que, juntamente com os sorotipos B e E, é responsável pelo botulismo sistêmico em humanos (Wee; Park, 2022).

Na aplicação terapêutica, a BoNT/A é amplamente empregada no tratamento de distúrbios associados à transmissão neuromuscular, como estrabismo, blefaroespamos, espasmo hemifacial, espasticidade e distonia, além de condições como hiperidrose, enxaqueca e incontinência urinária. Na medicina estética, seu uso é crescente para a atenuação de rugas de expressão e na melhora da qualidade de pele (Baranowska et al., 2024; Wee; Park, 2022). Em muitos cenários, o tratamento é crônico, considerando que a fraqueza muscular induzida dura, em média, três meses, a maioria dos pacientes requer reinjeções periódicas desta proteína. Entretanto, a administração em doses incorretas ou o seu uso repetitivo podem induzir resposta imune com formação de anticorpos, especialmente anticorpos neutralizantes. Esses podem reduzir ou anular efeito terapêutico da toxina, levando à falha terapêutica (Lee et al., 2024; Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022).

O alto custo da terapia e a eventual perda de eficácia impactam tanto a expectativa do paciente quanto a credibilidade do profissional. Assim, a detecção

de anticorpos neutralizantes anti-BoNT/A é fundamental para evitar aplicações ineficientes (Wee; Park, 2022). Ensaio imunológico, como ensaio imunoenzimático (ELISA), de fluorescência e ensaio de imunoprecipitação são métodos de triagem sensíveis. Contudo, geralmente não distinguem anticorpos neutralizantes (direcionados a epítopos da neurotoxina central) de anticorpos não neutralizantes (direcionados às proteínas complexantes de estabilização) (Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022). Para a identificação específica de anticorpos neutralizantes, destacam-se bioensaios como o de proteção em camundongos (MPA) e o de hemidiafragma em camundongo (HDA). Estes, porém, exigem o sacrifício de animais, são restritos a centros especializados e possuem execução laboriosa e tecnicamente sensível (Dressler et al., 2014; Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022).

Nesse contexto, os biossensores destacam-se como dispositivos atrativos. Baseando-se na comunicação entre duas partes principais: o componente biológico ativo, que atua como elemento de reconhecimento, e um transdutor, responsável por traduzir a interação com o analito (alvo) em uma resposta mensurável, apresentam alta especificidade de detecção de analitos (Polat et al., 2022). Biossensores eletroquímicos surgem como dispositivos miniaturizáveis e de baixo custo, caracterizando-se por serem sensíveis, seletivos, rápidos e aplicáveis em ambientes com limitada infraestrutura (Pohanka, 2023; Zahrebelnei et al., 2024).

Dentre esses dispositivos, sobressaem os imunossensores, cuja resposta é fundamentada na especificidade da reação imunológica antígeno-anticorpo. Nesse sistema, um antígeno (Ag) ou anticorpo (Ac) é ancorado a uma superfície transdutora e incubado em uma amostra, onde seu respectivo par - o analito de interesse - será capturado pela interação específica. Essa ligação promove alterações nos sinais elétricos na superfície de eletrodo e, consequentemente, variações em parâmetros como potencial, corrente ou impedância são registradas, permitindo a identificação precisa e a quantificação do analito (Kim et al., 2019). Tais dispositivos geralmente demandam poucas etapas de análise, oferecendo uma resposta rápida, aliada a uma excelente sensibilidade e seletividade analítica (Kuntoji et al., 2024; Steinmetz et al., 2019).

Para aprimorar o desempenho analítico em termos de sensibilidade, limite de detecção (LD) e seletividade, diversos sistemas têm empregado nanopartículas metálicas (Lima et al., 2022). Nanopartículas são estruturas que possuem

dimensões em nanoescala, de 10 a 100 nm, e exibem propriedades físico-químicas e catalíticas singulares, além de elevada condutividade elétrica. Tais características decorrem da sua elevada área superficial, densidades de carga superficial e estabilidade (Nasrollahzadeh et al., 2019). A biocompatibilidade também é uma propriedade amplamente procurada nas nanopartículas, conferindo às nanopartículas de ouro (AuNPs) grande destaque na área (Lima et al., 2022).

Os silsesquioxanos (SSQs) são polímeros promissores para a síntese das AuNPs. Tratam-se de híbridos orgânico-inorgânicos que apresentam uma composição geral $R(\text{SiO}_{1,5})_n$, onde R é um grupo orgânico ou um átomo de hidrogênio (Baney et al., 1995). Esses compostos apresentam alta estabilidade química e térmica, biocompatibilidade e diversas funcionalidades químicas, com aplicações que variam desde *nanofillers* para matrizes poliméricas e adsorção de íons metálicos até aplicações biomédicas relevantes, incluindo engenharia de tecidos, liberação de fármacos e sensores e biossensores (Arsalani et al., 2019; Chen et al., 2020; Steinmetz et al., 2019). Na síntese de nanopartículas metálicas, os SSQS atuam como agentes de revestimento eficientes, nos quais a rede polimérica carregada dispersa e estabiliza nanocoloides, evitando a agregação e a coalescência (Lima et al., 2022; Steinmetz et al., 2019; Zahrebelnei et al., 2024).

A descrição do uso de biossensores para a detecção de anticorpos anti-toxina botulínica é ausente. Somente estão descritos estudos para a detecção da toxina botulínica, motivada por demandas de segurança alimentar e defesa biológica, em virtude da doença Botulismo causada pelo *Clostridium botulinum* (Eivazzadeh-Keihan et al., 2018; Pohanka, 2023; Saini et al., 2025; Yadav et al., 2024). No entanto, para a detecção e quantificação de anticorpos anti-BoNT/A em amostras clínicas — etapa crucial para o monitoramento de pacientes que desenvolvem falha terapêutica secundária — ainda não existem biossensores descritos. Essa lacuna tecnológica evidencia a originalidade e a necessidade de novas plataformas analíticas, que sejam especificamente projetadas para identificar a resposta imune do hospedeiro, e não apenas a presença do agente tóxico.

Assim, este trabalho propõe o desenvolvimento e a caracterização de um imunossensor eletroquímico inédito, baseado em eletrodo de carbono vítreo modificado com AuNPs estabilizadas por silsesquioxano para a detecção de anti-BoNT/A. A resposta analítica foi monitorada por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), avaliando-se sensibilidade, seletividade, estabilidade e

desempenho em matriz biológica. Ademais, esta pesquisa propôs um novo método com aplicabilidade na prática clínica para de triagem e monitoramento. O sistema apresenta compatibilidade com detecção do tipo *point-of-care* (PoC) - testes realizados no local de atendimento ao paciente -, caracterizando-se pela análise simplificada e de baixo custo operacional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TOXINA BOTULÍNICA

A toxina botulínica (BoNT) é uma neurotoxina produzida pela bactéria *Clostridium botulinum*, uma bactéria anaeróbia, Gram-positiva e formadora de esporos (Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022). O mecanismo de ação da BoNT ocorre nas junções neuromusculares e gânglios autonômicos, onde a toxina inibe a liberação de acetilcolina, principal neurotransmissor de sinapses colinérgicas nesses locais (Wee; Park, 2022). Esse bloqueio de transmissão química resulta em uma paralisia flácida temporária, fraqueza e atrofia muscular controlada. Adicionalmente, a inibição dos neurônios motores gama, que controlam a contração muscular nos fusos musculares, permite a modulação da hiperatividade reflexa, consolidando a BoNT como um tratamento eficaz para distúrbios de músculos lisos hiperativos e glândulas exócrinas anormalmente ativas (Khan et al., 2022; Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022).

Atualmente, são descritos 8 sorotipos de toxina botulínica, A-G, com propriedades biológicas distintas. Na prática clínica, o sorotipo A (BoNT/A) é o mais utilizado devido a sua maior duração de ação e ao perfil de segurança favorável, apresentando menor incidência de efeitos adversos sistêmicos, seguido pelo sorotipo B (Baranowska et al., 2024; Pirazzini et al., 2017; Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022).

A aplicação clínica da BoNT para o tratamento do estrabismo foi descrita pela primeira vez por Scott, em 1977, expandindo-se para o blefarospasmo no início da década de 1980. Desde então, seu potencial terapêutico tem sido explorado em distúrbios de condução neuromuscular, como estrabismo, espasmo hemifacial; espasticidade e distonia, além de condições autonômicas como hiperidrose, enxaqueca crônica e incontinência urinária. Na medicina estética, observa-se um crescimento contínuo de seu uso para atenuação de rugas de expressão dinâmicas e melhora da qualidade da pele. Verifica-se também um aumento expressivo nas indicações *off-label* da BoNT/A - termo que designa o uso do fármaco para finalidades, doses ou vias de administração não previstas na bula aprovada pelos órgãos reguladores - incluindo o tratamento de bruxismo ou rinite alérgica (Baranowska et al., 2024; Wee; Park, 2022). Seu uso clínico se expandiu

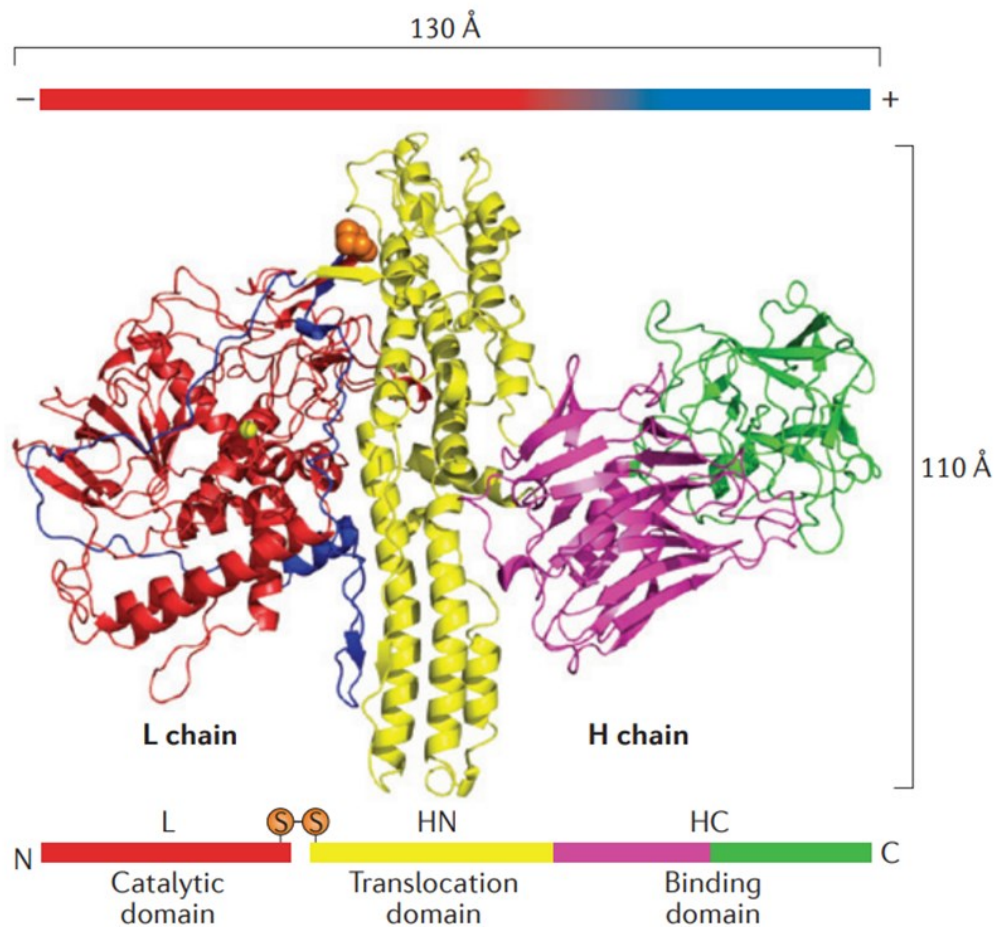
significativamente nas últimas décadas, levando a um número crescente de pacientes submetidos a tratamentos repetidos e de longo prazo (Lee et al., 2024).

Contudo, as patologias que demandam o uso da toxina botulínica frequentemente possuem caráter crônico e, como o efeito do bloqueio neuromuscular perdura por aproximadamente 3 meses, a maioria dos pacientes necessita de aplicações repetitivas. Esse uso prolongado pode desencadear o desenvolvimento de imunogenicidade, caracterizada especialmente pela formação de anticorpos neutralizantes. Tais anticorpos podem reduzir ou anular a eficácia biológica da toxina, resultando em falha terapêutica secundária (Lee et al., 2024; Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022). Embora a formação desses anticorpos seja considerada infrequente em baixas doses, sua ocorrência representa um impacto clínico significativo para pacientes que dependem de tratamento contínuo (Lee et al., 2024).

2.1.1 Estrutura espacial das proteínas BoNT

Apesar da variabilidade na sequência de aminoácidos entre os 8 diferentes sorotipos de BoNT, todos apresentam uma arquitetura molecular semelhante. A toxina organiza-se como um complexo de alto peso molecular, constituído por uma neurotoxina central de 150 kDa e proteínas complexantes acessórias (Figura 1 e 2), que podem elevar a massa total do complexo a até 900 kDa. A unidade funcional de 150 kDa é composta por duas cadeias polipeptídicas unidas por uma ponte dissulfeto: uma cadeia pesada (H_C), de 100 kDa e uma cadeia leve (L_C) de 50 kDa, sendo que essa última se encontra associada ao grupo de proteínas acessórias (Baranowska et al., 2024; Wee; Park, 2022).

Figura 1 - Estrutura cristalina da neurotoxina botulínica A (BoNT/A).

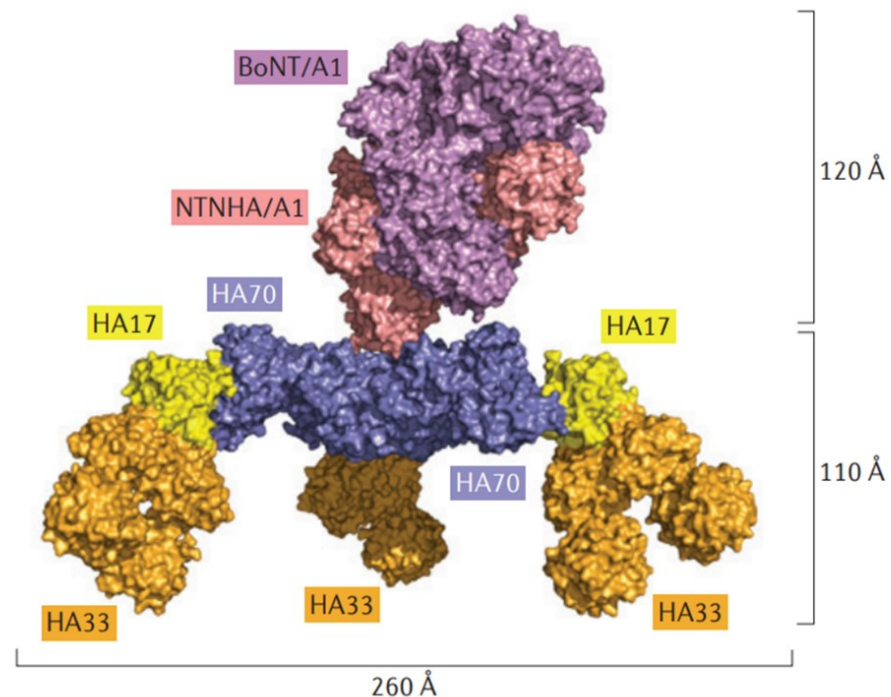


Fonte: Rossetto; Pirazzini; Montecucco, 2014.

As proteínas acessórias são classificadas em hemaglutininas (HA) e proteínas não tóxicas não hemaglutinina (NTNHA). As proteínas HA presentes na BoNT incluem a HA-33 (codificada pelo gene *ha33*), HA-17 (*ha17*) e HA-70 (*ha70*), sendo essa última constituída pelas subunidades HA70a e HA70b. A proteína HA-33 destaca-se como a maior das proteínas complexantes e é a principal responsável pela resposta imunológica contra o complexo proteico (Baranowska et al., 2024; Wee; Park, 2022).

As proteínas HA e NTNHA têm a função de proteger a neurotoxina central em condições de baixo pH (Pirazzini et al., 2017; Wee; Park, 2022). A NTNHA desempenha um papel fundamental na proteção da BoNT da digestão por proteases e pela degradação no estômago, pelo baixo pH. Simultaneamente, as proteínas HA intermediam a ligação e a translocação da BoNT/A através do epitélio intestinal (Carr; Jain; Sublett, 2021; Pirazzini et al., 2017; Wee; Park, 2022).

Figura 2 - Estrutura do complexo de alto peso molecular da BoNT.



Fonte: Rossetto; Pirazzini; Montecucco, 2014.

A cadeia pesada do complexo BoNT possui dois domínios: um domínio de ligação ao receptor e um domínio de translocação. No complexo supramolecular da BoNT/A, a cadeia pesada desempenha dois papéis principais: 1) a ligação aos terminais pré-sinápticos colinérgicos da junção neuromuscular, favorecendo sua internalização na célula, e 2) mediação da translocação da cadeia leve dissociada para o citoplasma da célula (Baranowska et al., 2024; Wee; Park, 2022).

A cadeia leve atua como uma metaloprotease, utilizando um íon de zinco (Zn^{2+}) como cofator para catalisar a clivagem de proteínas específicas do complexo SNARE (*Soluble NSF Attachment Protein Receptor*). Os oito sorotipos da BoNTs clivam diferentes componentes do complexo SNARE, interrompendo a exocitose da acetilcolina (Baranowska et al., 2024; Wee; Park, 2022).

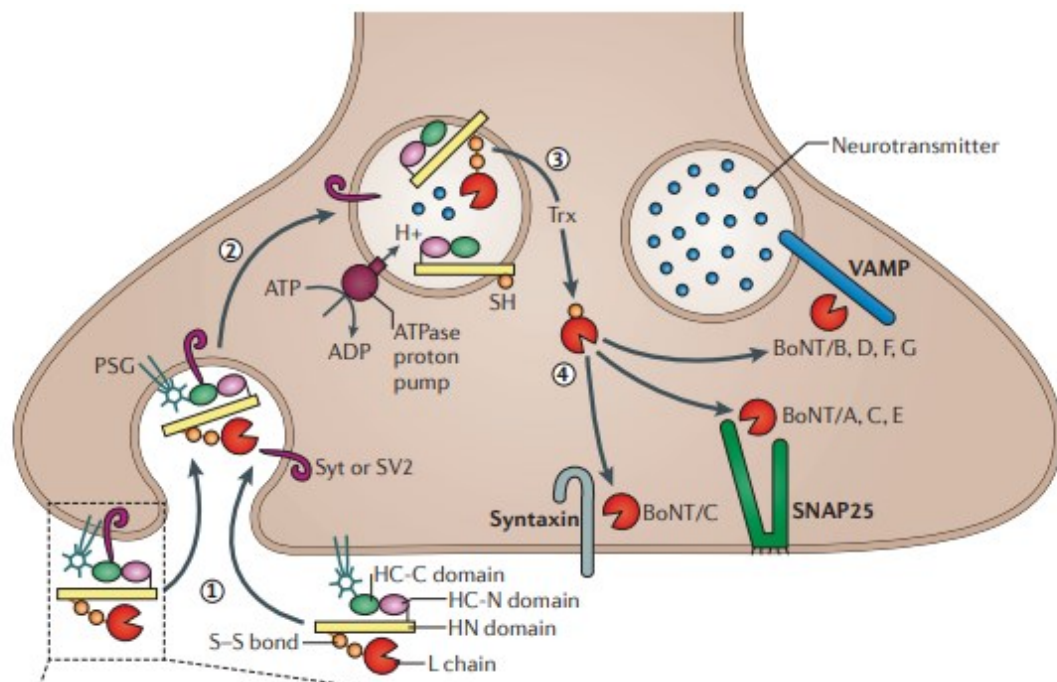
2.1.2 Mecanismo de Neuroparalisia causado pela BoNT/A

A neuroparalisia induzida pelas BoNTs é um processo reversível. A duração da paralisia varia amplamente em função do sorotipo da BoNT, da dose

administrada, da vida de administração e pelo tipo de nervo terminal afetado (Wee; Park, 2022). Em humanos, o sorotipo A (BoNT/A) promove uma paralisia de maior duração. Além disso, o tempo de atividade local da toxina é variável conforme o local de aplicação: os músculos esqueléticos apresentam uma reversibilidade de ação três vezes mais rápida para a BoNT/A do que os terminais nervosos colinérgicos autonômicos (Pirazzini et al., 2017).

A ação da BoNT/A nas células nervosas ocorre por meio de um processo de múltiplas etapas, altamente específico, que culmina na inibição da liberação de neurotransmissores (Figura 3) (Pirazzini et al., 2017). Inicialmente, a toxina liga-se a receptores polisialogangliosídeos específicos na superfície das terminações pré-sinápticas (Figura 3, etapa 1). Essa interação é mediada pelo domínio de ligação da cadeia pesada (HC) da toxina aos gangliosídeos. A BoNT/A associa-se ainda a um segundo receptor proteico localizado na terminação pré-sináptica, a proteína SV2 (proteína 2 da vesícula sináptica) (Pirazzini et al., 2017).

Figura 3 - Mecanismo de ação da BoNT no terminal nervoso.



Fonte: Rossetto; Pirazzini; Montecucco, 2014.

Após o reconhecimento, a BoNT/A é internalizada por endocitose em vesículas sinápticas (etapa 2), as quais são acidificadas via complexo v-ATPase. Esse ambiente ácido promove a protonação da toxina, levando à translocação da

cadeia leve (Lc) através da membrana vesicular para o citosol (etapa 3). A Lc é então liberada do domínio de translocação (H_N) pela ação do sistema tioredoxina redutase/tiorredoxina (TrxR-Trx), que reduz a ponte dissulfeto intercadeias e previne a agregação da protease (etapa 4) (Pirazzini et al., 2017).

No citosol, a cadeia leve atua como uma metaloprotease dependente de zinco (Zn^{2+}), clivando a proteína SNAP-25 e impedindo a formação do complexo SNARE. Consequentemente, a fusão das vesículas contendo neurotransmissores com a membrana pré-sináptica é bloqueada, interrompendo a liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares. A ausência desse mediador químico promove o relaxamento muscular e o bloqueio da secreção de glândulas exócrinas, resultando em paralisia flácida. Esse bloqueio é revertido pelo processo natural de renovação proteica do complexo SNARE (Baranowska et al., 2024; Pirazzini et al., 2017).

2.1.3 Imunogenicidade da BoNT/A

Apesar da eficácia clínica comprovada, alguns pacientes podem apresentar ausência de resposta terapêutica à injeção de toxina botulínica tipo A (BoNT/A). Uma das principais causas para a falha do tratamento — em especial a falha secundária — é a formação de anticorpos contra componentes da toxina após aplicações repetidas. Diversos fatores estão associados a um maior risco de imunogenicidade, destacando-se: uso de doses elevadas e cumulativas, intervalos curtos entre as aplicações, doses de toxina insuficientes, aplicação da toxina em músculos inadequados, tratamentos prolongados ao longo de muitos anos, uso de formulações com maior conteúdo proteico e a administração de reforços (*booster injections*) em intervalos muito próximos (Lee et al., 2024; Rahman; Carruthers, 2024).

Embora a maioria dos pacientes mantenha uma resposta terapêutica sustentada, uma pequena proporção desenvolve anticorpos. O complexo proteico que compõe a BoNT/A pode atuar como antígeno, desencadeando uma resposta imune. Esses anticorpos são classificados em duas categorias principais: neutralizantes e não neutralizantes. Os anticorpos não neutralizantes são direcionados às proteínas complexantes (HAs e NTNHA) — responsáveis por estabilizar e proteger a neurotoxina — e, em geral, não apresentam relevância

clínica direta. Os anticorpos neutralizantes (bloqueadores) são aqueles formados contra epítomos da neurotoxina central e interferem diretamente na eficácia do tratamento. Ao se ligarem à porção ativa da toxina, eles impedem a sua interação com o receptor neuronal celular e a clivagem das proteínas SNARE, bloqueando assim a sua atividade biológica na junção neuromuscular (Carr; Jain; Sublett, 2021; Wee; Park, 2022). A partir de um determinado título, os anticorpos neutralizantes inibem por completo a atividade biológica da toxina botulínica (Rahman; Carruthers, 2024).

A taxa de desenvolvimento desses anticorpos capazes de neutralizar a atividade da toxina varia conforme os estudos e as diferentes formulações comerciais disponíveis (Carr; Jain; Sublett, 2021). Nesse sentido, a carga proteica antigênica — que engloba a quantidade total de neurotoxina e de proteína complexantes — influencia o potencial imunogênico. Formulações com maior carga proteica podem aumentar o risco de sensibilização do sistema imune, embora as evidências sobre essa correlação direta ainda sejam limitadas e heterogêneas (Lee et al., 2024; Wee; Park, 2022).

Clinicamente, a falha do tratamento é classificada em primária e secundária. A falha primária caracteriza-se por uma resposta inferior a 25% logo nos primeiros ciclos, após o aumento na dose ou duas a três tentativas de injeção (Lee et al., 2024; Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022). As causas mais comuns incluem erro diagnóstico, seleção inadequada dos músculos-alvo, técnicas de aplicação incorretas, dose insuficiente ou aplicação em pacientes acima de 60 anos. Raramente, ocorre devido à baixa sensibilidade inata à toxina, condição em que o paciente apresenta uma resistência natural de origem genética ou fisiológica à toxina, mesmo sem exposição prévia (Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022).

A falha secundária ocorre quando o paciente, após uma resposta inicial satisfatória, perde o benefício clínico progressivamente. Além da progressão da doença de base ou do efeito placebo inicial, a imunogenicidade é o principal fator responsável por esse declínio (Wee; Park, 2022). Essa perda de resposta reflete a insatisfação do paciente e indica que o tratamento se tornou parcial ou completamente ineficaz (Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022). A falha secundária associada à presença de anticorpos neutralizantes manifesta-se por meio da redução gradual da magnitude e da duração do efeito clínico. Embora considerada um evento raro, a imunogenicidade deve ser investigada em pacientes

com histórico de uso prolongado ou protocolos de alta carga antigênica (Lee et al., 2024).

2.1.4 Detecção de anticorpos anti-BoNT/A

A detecção precisa de anticorpos neutralizantes (NAbs) é fundamental para identificar a etiologia da falha da terapêutica. Quando o efeito clínico da toxina botulínica declina, suspeita-se de imunogenicidade após a exclusão de outras causas de refratariedade, como erro na técnica de aplicação ou dose insuficiente. Nesses casos, a confirmação diagnóstica exige a realização de ensaios laboratoriais específicos (Wee; Park, 2022).

Os anticorpos contra o complexo proteico da neurotoxina podem ser detectados por meio de imunoenaios, como o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), imunoenaios de fluorescência e ensaios de imunoprecipitação. Nesses métodos, a BoNT/A é imobilizada em uma fase sólida para capturar os anticorpos presentes no soro do paciente. A detecção dessa interação, no entanto, exige um procedimento de múltiplas etapas, incluindo a utilização de anticorpos secundários conjugados a enzimas (como a peroxidase), seguidas da adição de substratos cromogênicos. Embora sejam técnicas altamente sensíveis para a detecção de anticorpos de ligação e amplamente utilizados como testes de triagem — eles apresentam uma limitação clínica significativa: a incapacidade de diferenciar os anticorpos neutralizantes dos não neutralizantes (Dressler et al., 2014; Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022).

Para a identificação específica de NAbs, recorre-se a bioensaios capazes de monitorar funcionalidade da toxina na junção neuromuscular, como ligação, translocação e clivagem. Entre os principais métodos destacam-se:

- **Ensaio de proteção em camundongo (*Mouse Protection Assay* – MPA):** Considerado o padrão-ouro, o MPA consiste na mistura do soro do paciente com uma dose letal de BoNT/A, que é posteriormente injetada no peritônio de camundongos. Se o soro contiver anticorpos neutralizados em títulos suficientes, os animais sobrevivem. Apesar de sua especificidade alcançar 100%, o método possui sensibilidade relativa baixa (inferior a 50%), exige

infraestrutura especializada, possui alto custo e demanda um longo tempo de análise, além de restrições éticas quanto ao uso de animais (Dressler et al., 2014; Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022).

- **Ensaio do hemi-diafragma em camundongo (*Mouse Hemidiaphragm Assay- MHDA*):** Trata-se de um método *ex vivo* que utiliza uma preparação isolada do nervo frênico e do músculo hemidiafragma do camundongo. A toxina é aplicada à preparação e ocorre perda da contração muscular, induzida por estímulo elétrico, e monitorada. O soro com NABs previne ou retarda essa paralisia. O MHDA oferece maior sensibilidade e menor tempo de execução que o MPA, contudo, é tecnicamente complexo e sujeito a resultados falso-positivo, comprometendo a precisão do diagnóstico clínico (Dressler et al., 2014; Rahman; Carruthers, 2024; Wee; Park, 2022).

As limitações inerentes aos métodos convencionais – complexidade técnica, alto custo e o uso de animais – dificultam a comparação direta entre estudos e a rotina clínica. Nesse sentido, torna-se crucial o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos que sejam rápidos, sensíveis, custo-efetivos, livres do uso de animais e baseados em plataformas tecnológicas modernas para a detecção precisa de anticorpos anti-BoNT/A.

2.2 BIOSSENSORES

Sensores representam ferramentas analíticas versáteis para a detecção e quantificação de diversos fenômenos físicos e químicos. Historicamente, esses dispositivos apresentaram uma notável evolução tecnológica, expandindo suas funcionalidades e consolidando sua aplicação em setores estratégicos, como as indústrias automotiva, industrial, médica, agrícola, aeroespacial e de defesa.

No campo das ciências da vida, os sensores de biomoléculas – biossensores - detêm elevada relevância, em virtude de sua capacidade de monitorar processos biológicos, diagnosticar patologias, identificar contaminantes ambientais e auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos (Kuntoji et al., 2024).

2.2.1 Biossensor como ferramenta analítica

Biossensores eletroquímicos são dispositivos analíticos portáteis que permitem a detecção de analitos baseado na interação com biomoléculas imobilizadas em sua superfície, como ácidos nucleicos, enzimas, anticorpos e outras proteínas (Pohanka, 2023). Esses sistemas apresentam baixo custo de produção e de análise além de serem passíveis de miniaturização. Além disso, permitem a detecção de analitos de forma rápida, com elevada sensibilidade e seletividade. Em decorrência dessas propriedades, tais dispositivos apresentam aplicações potenciais em diagnóstico clínico, controle de qualidade industrial e monitoramento ambiental, oferecendo estratégias ágeis e econômicas para a detecção de compostos de interesse (Pohanka, 2023; Zahrebelnei et al., 2024).

Em biossensores, os eventos de ligação entre o analito e as biomoléculas imobilizadas provocam alterações nas características elétricas da interface eletrodo-eletrólito. A quantificação dessas variações — como corrente, tensão ou impedância — permite determinar a concentração do composto de interesse (Kuntoji et al., 2024; Pohanka, 2023).

Entre os diferentes tipos de detecção, os biossensores eletroquímicos apresentam vantagens significativas sobre os sistemas ópticos. Devido a turbidez e interferências cromóforas das amostras biológicas, os sistemas ópticos frequentemente exigem seu pré preparo, o que aumenta o tempo de análise, e encarece o seu preço. Os sensores eletroquímicos são robustos, apresentam baixo consumo de energia e permitem a análise direta em matrizes biológicas complexas, como soro e sangue total, sem a necessidade de etapas rigorosas de clarificação da amostra (Kuntoji et al., 2024).

Biossensores combinam, essencialmente, um transdutor físico-químico e um elemento de biorreconhecimento. Enquanto os transdutores atuam como um sensor físico, o elemento biológico é responsável pela especificidade, iniciando os processos que são convertidos em sinal eletrônico mensurável (Pohanka, 2023). Conforme a sua transdução eletroquímica, os sensores podem ser classificados como:

- **Potenciométricos:** medem a variação no potencial elétrico entre dois eletrodos (trabalho e referência). O sinal é proporcional à

atividade iônica específica do analito, fundamentando-se na Equação de Nernst (Kuntoji et al., 2024).

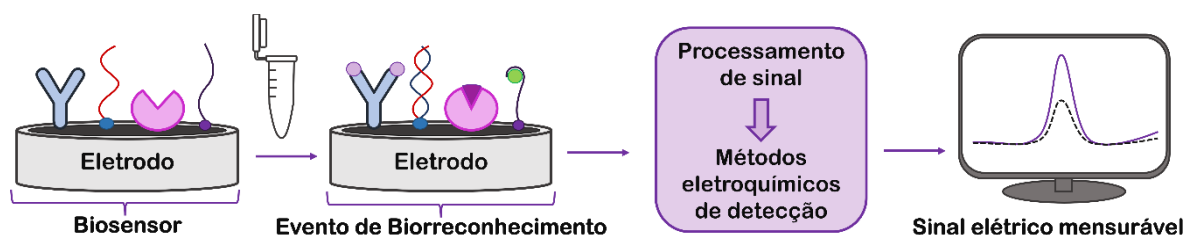
- **Amperométricos:** medem a corrente gerada por uma reação redox (oxidação ou redução) de espécies eletroativas na superfície do eletrodo de trabalho, sob um potencial aplicado constante. A corrente resultante apresenta uma relação linear com a concentração do analito em solução (Kuntoji et al., 2024).
- **Impedimétricos:** detectam alterações nas propriedades elétricas da interface do eletrodo decorrentes de eventos de biorreconhecimento. A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) aplica uma perturbação de corrente alternada (CA) de pequena amplitude e monitora a oposição ao fluxo de carga. Alterações na impedância de transferência de carga (R_{ct}) e na capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}) são registradas quando o analito se liga ao elemento de reconhecimento, permitindo uma detecção altamente sensível e, frequentemente, sem marcadores (Conroy et al., 2009; Kuntoji et al., 2024).

O sensor, representado visualmente pela Figura 4, consiste em:

- **Elemento de Reconhecimento:** inclui biomoléculas como aptâmeros, anticorpos, enzimas, proteínas e polímeros de impressão molecular (MIPS), que atuam como “âncoras” para a identificação de ser alvo relativo. A interação específica entre o par biológico — antígeno-anticorpo, enzima-substrato, complementariedade de DNA — é a base do biorreconhecimento, conferindo seletividade ao sensor (Kuntoji et al., 2024).
- **Transdutor de sinal:** converte o evento de biorreconhecimento em um sinal mensurável, podendo ser ópticos (como fluorescência e absorvância), eletroquímicos (como amperométricos e potenciométricos) e mecânicos (como piezoelétricos) (Kuntoji et al., 2024).

- **Processamento de Sinal de detecção do alvo:** utiliza técnicas como amplificação e filtragem para extrair informações pertinentes e melhorar a relação sinal-ruído (Kuntoji et al., 2024).
- **Mecanismo de Detecção do analito:** refere-se ao processo de ligação da biomolécula ao sensor, gerando mudanças físicas ou químicas proporcionais à concentração do analito (Kuntoji et al., 2024).
- **Calibração e Validação do método:** asseguram a correlação entre a saída do sensor e a concentração real do analito, garantindo confiabilidade sob diversas condições analíticas (Kuntoji et al., 2024).
- **Miniaturização e Integração do Sistema:** tendências que visam otimizar o tempo de resposta e permitir a aplicação em dispositivos de diagnóstico no local de atendimento (Kuntoji et al., 2024).

Figura 4 - Esquema representativo de biossensores.



Fonte: A autora (2026).

2.2.2 Imunossensores

Imunossensores representam uma variante especializada de biossensores na qual a detecção envolve a interação específica antígeno- anticorpo. Idealmente, o dispositivo deve operar em etapa única ou com um número reduzido de passos, exigindo um pré-tratamento mínimo de amostra e baixa complexidade operacional (Pohanka, 2023). Seu papel assemelha-se ao dos testes de ponto de atendimento (*point-of-care*), permitindo detecção em tempo real, como ocorre na imunocromatografia de fluxo lateral (popularmente conhecidos como “testes rápidos”), adotados como alternativa acessível e de baixo custo (Pohanka, 2023).

O desenvolvimento de novos dispositivos analíticos deve considerar certas características, como:

- **Especificidade Restrita e Aplicação Direcionada:** Diferente de dispositivos analíticos universais, os biossensores são projetados para ensaio de um analito específico ou um grupo definido de analitos (Pohanka, 2023).
- **Biorreconhecedor:** A sensibilidade e seletividade do dispositivo são estritamente dependentes da qualidade e do tipo de anticorpo (ou molécula sintética) utilizada (Pohanka, 2023).
- **Integração Digital:** Possuem facilidade de integração com dispositivos móveis, permitindo que o resultado do biomarcador seja enviado instantaneamente para prontuários eletrônicos ou sistemas de monitoramento remoto (Pohanka, 2023).

2.2.3 Nanomateriais e Nanohíbridos

Nanohíbridos são formados pela integração de nanopartículas metálicas (MNPs) com matrizes orgânicas estabilizantes, como os silsesquioxanos (SSQs), oferecendo estrutura sinérgica com propriedades únicas. A síntese das nanopartículas metálicas revestidas com SSQs ocorre em uma única etapa, onde um precursor metálico é reduzido à MNPs de valência zero na presença de um SSQ solúvel e utilizando o borohidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor. As suspensões geradas são estáveis por meses. (Zahrebelnei et al., 2024, Lima et al., 2022; Mossanha et al., 2017). Essa estabilidade se dá por efeitos estéricos (volume poliédrico) e eletrostáticos (repulsão de cargas) (Lima et al., 2022).

A aplicação desses nanohíbridos promove melhoria no desempenho analítico, ao acelerar a transferência eletrônica interfacial e ampliar a área superficial ativa sob a superfície do eletrodo (Kuntoji et al., 2024). A matriz de SSQ fornece sítios de ancoragem funcionais que orientam corretamente os anticorpos, expondo seus sítios ativos (porção Fab) para a captura do analito. Simultaneamente, o núcleo metálico das MNPs atua como um mediador de elétrons, reduzindo a resistência a transferência de carga (R_{ct}) e ampliando o sinal elétrico (Lima et al., 2022). Esse arranjo híbrido melhora a sensibilidade e o limite de detecção (LD) por meio de mecanismo como alta densidade de biorreceptores imobilizados e eficiente transdução de sinal. Adicionalmente, a organização molecular da matriz minimiza adsorções inespecíficas, elevando a seletividade. A

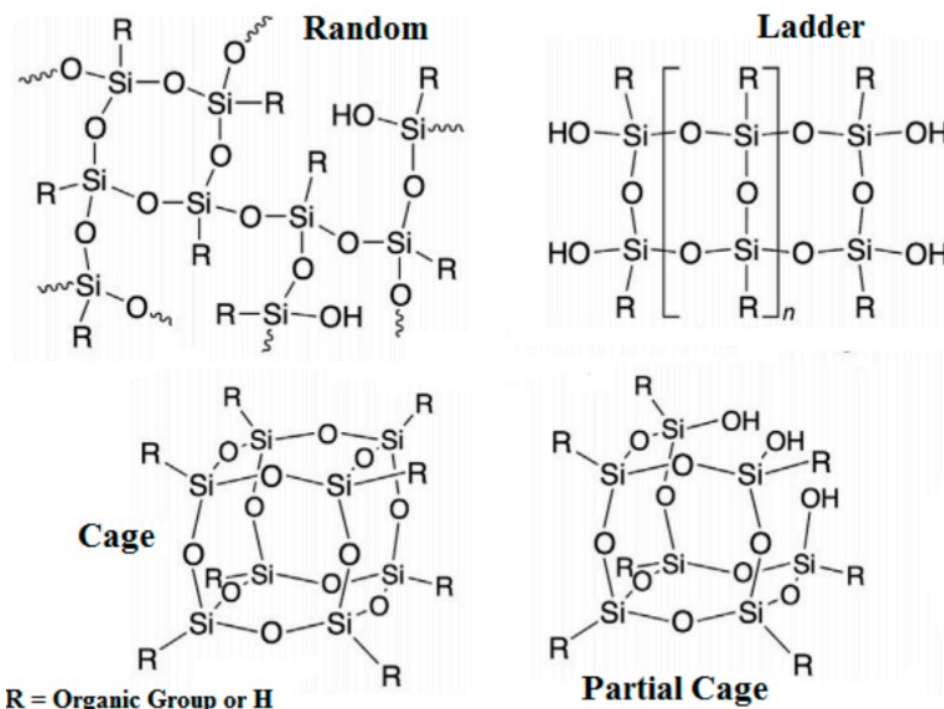
elevada relação sinal-ruído viabiliza a miniaturização de eletrodos impressos (*Screen-Printed Electrodes* – SPE), preservando a performance analítica (Kuntoji et al., 2024; Zahrebelnei et al., 2024).

Os imunossensores baseados em nanohíbridos incorporam curvas de calibrações pré-programadas no seu transdutor ou usam sistemas descartáveis, eliminando a necessidade de padrões de calibração, geralmente utilizados em outros métodos como no ELISA. Seu benefício inclui uma detecção rápida, de baixo custo e sensível para decisões clínicas imediatas (Dykman; Guliy, 2026).

As nanopartículas metálicas incrementam a sensibilidade, permitindo a detecção de biomarcadores em concentrações ultrabaixas (picomolar e femtomolar). As nanopartículas de ouro (AuNPs) destacam-se pela condutividade elevada, alta área superficial e capacidade de ligação com biomoléculas via interações tiol-ouro ou eletrostáticas (Sadique et al., 2022). Essa integração também impulsiona dispositivos sensíveis para patologias como biomarcadores cardíacos (troponina I) (Liu et al., 2020; Zapp et al., 2014), antígenos tumorais (PSA e CEA) (Chikkaveeraiah et al., 2012; Echeverri; Orozco, 2022; Li et al., 2022) e proteínas virais (SARS-COV-2) (Brazaca et al., 2022). Além de sua função como condutoras, também atuam como nanotransdutores, amplificando os sinais e aumentando a densidade de biomoléculas imobilizadas, elevando a sensibilidade. (Dykman; Guliy, 2026; Lima et al., 2022; Putzbach; Ronkainen, 2013)

A eficácia das AuNPs depende da estabilidade e dispersão, onde SSQs emergem como estabilizantes híbridos eficientes, ao lado de polímeros como quitosana, Nafion e dendrímeros (PAMAM) (Zahrebelnei et al., 2024). Com composição geral $\text{RSiO}_{3/2}$, (R= grupo orgânico), os SSQs variam em arranjos moleculares: aleatórios, em escada, ou gaiola aberta ou fechada; os silsesquioxanos oligoméricos poliédricos (POSS), conforme observado na Figura 5 (Lima et al., 2022; Zahrebelnei et al., 2024).

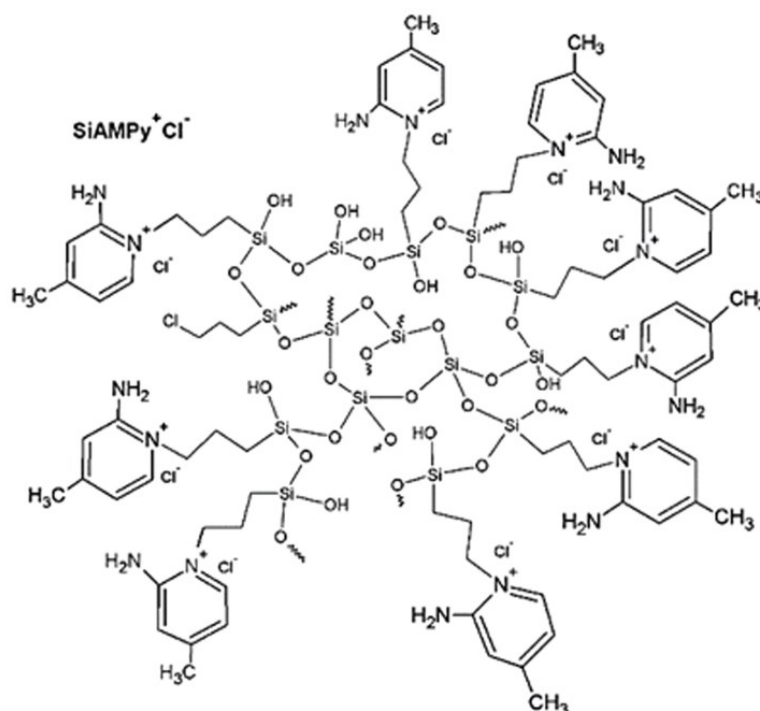
Figura 5 - Estruturas representativas dos silsesquioxanos: aleatórias, escada, e gaiola aberta ou fechada.



Fonte: Kaneko, 2018.

Grupos funcionais variam em comprimento e geometria, adaptando o material para catálise, biomedicina, ciências ambientais e eletroquímica (Zahrebelnei et al., 2024). SSQs solúveis em água revestem MNPs como AgNPs, platina (PtNPs) e paládio (PdNPs), dispersando-as e evitando agregação (Calaça et al., 2017; Crocomo et al., 2019; De Oliveira et al., 2016; Gerent; Spinelli, 2017; Winiarski et al., 2017). Sua biocompatibilidade e química versátil criam sítios ativos, potencializando imunossensores em matrizes reais (Zahrebelnei et al., 2024), incluindo nanocompósitos com cobre (CuNPs) e complexos eletroativos como Azul da Prússia (Maraldi; Do Carmo, 2023; Moradi et al., 2023).

Figura 6 - Estrutura do cloreto de 3-n-propil-(2-amino-4-metil)piridínio silsesquioxano (SiAmPy⁺ Cl⁻).



Fonte: Adaptado do Lima et al., 2022.

Conforme Lima e colaboradores (2022), o SiAmPy⁺ Cl⁻ (Figura 6) estabiliza AuNps via impedimento estérico e repulsão eletrostática, com nitrogênios piridínicos favorecendo interações com os precursores metálicos para partículas menores e homogêneas. Sua carga positiva otimiza ligações com biomoléculas negativamente carregadas, como anticorpos ou fragmentos de DNA, aprimorando a interface do imunossensor (Lima et al., 2022).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um biossensor eletroquímico modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs) estabilizadas por cloreto de 3-n-propil-(2-amino-4-metil)piridínio silsesquioxano (SiAmPy), destinado à detecção quantitativa dos anticorpos anti-toxina botulínica do tipo A (anti-BoNT/A).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de ouro estabilizadas com o derivado de silsesquioxano (AuNPs-SiAmPy), por técnicas de Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Visível (UV-Vis), Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FE);
- Desenvolver e caracterizar um imunossensor de carbono vítreo (ECv) modificado com o nanocompósito AuNPs-SiAmPy e antígeno (BoNT/A), empregando Voltametria Cíclica (VC) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE);
- Otimizar os parâmetros experimentais e as etapas de construção do imunossensor (tempo de incubação e concentração de antígeno) por meio de análise fatorial multivariada;
- Avaliar o desempenho analítico do dispositivo, determinando parâmetros de sensibilidade, especificidade, seletividade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ);
- Validar o método proposto em matrizes biológicas (soro humano);
- Comparar o desempenho do imunossensor construído com o método *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes empregados neste trabalho possuem grau analítico e foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (EUA), salvo menção contrária. Todos os materiais e soluções empregados na construção dos biossensores foram previamente autoclavados, para garantir a esterilidade do processo. A água utilizada em todos os experimentos foi de grau ultrapuro (Milli-Q, resistividade 18,2 MΩ cm).

A toxina botulínica do sorotipo A (BoNT/A) foi obtida em sua formulação comercial (Botulift[®], Bergamo, Brasil). Cada frasco contém uma potência biológica de 100 U, onde uma unidade (U) corresponde a dose letal média (DL₅₀). A composição proteica total por frasco é de aproximadamente 7,4 ng de neurotoxina e 0,5 mg de albumina sérica humana.

Os anticorpos monoclonais de camundongo anti-BoNT/A (IgG_{2A}; Clone #503013) e o anticorpo interferente anti-PPT1 foram adquiridos da R&D Systems[®]. O soro humano comercial utilizado foi proveniente do *kit Dengue IgM Capture ELISA* da Abbott Panbio[®].

O tampão fosfato-salino (PBS) 0,15 mol·L⁻¹ pH 7,4 foi preparado utilizando-se os sais Na₂HPO₄ (1 g·L⁻¹), NaH₂PO₄ (0,34 g·L⁻¹) e NaCl (8,8 g·L⁻¹) (Sigma-Aldrich[®]). Como agentes de ativação e ligação, foram empregados o cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e a N-hidroxissuccinimida (NHS), nas concentrações de 100 mmol·L⁻¹ e 50 mmol·L⁻¹, respectivamente. A solução de H₂SO₄ foi preparada na concentração de 0,5 mol·L⁻¹ e a sonda eletroquímica consistiu em uma solução de 5,0 mmol·L⁻¹ K₄[Fe(CN)]₆/K₃[Fe(CN)]₆, ([Fe(CN)]₆^{4-/3-} (1:1) em suporte eletrolítico.

O cloreto de 3-n-propil-(2-amino-4-metil)piridínio silsesquioxano (SiAmPy⁺Cl⁻) empregado como estabilizante das AuNPs, foi gentilmente cedido por Lima et al (2022) do Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados (GDEM/UEPG), tendo sido sintetizado conforme a metodologia descrita.

4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS COM SiAmPy

A síntese das AuNPs foi baseada no procedimento descrito por Lima et al (2022). As nanopartículas foram obtidas via redução do precursor metálico, o ácido cloroáurico (HAuCl_4 , $2,25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), empregando-se boro-hidreto de sódio (NaBH_4 , $4,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) como agente redutor e SiAmPy ($3,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) como agente estabilizante.

Para a síntese, realizou-se a mistura do precursor metálico e do agente estabilizante, seguida da adição gota a gota do agente redutor sob agitação magnética constante, em banho de gelo, por 3 horas. A suspensão de AuNPs-SiAmPy resultante foi acondicionada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração a 4°C (Lima et al., 2022).

As AuNPs-SiAmPy foram caracterizadas por Espectroscopia de Absorção Molecular na região do UV-Vis (equipamento Varian, modelo Cary 50, feixe simples), operando no modo de absorbância, com cubeta de quartzo, na faixa de 200 a 700 nm. A morfologia e o tamanho das nanopartículas foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FE), utilizando um equipamento Tescan (modelo Mira 3), com as amostras depositadas sob fita de carbono condutiva.

Para avaliar a estabilidade do nanohíbrido foram realizadas medidas de Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*) e potencial ζ (PZ). As análises foram conduzidas à temperatura ambiente em um equipamento Malvern (modelo Nano ZS90), com as amostras dispersas em meio aquoso.

4.3 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ELETRODOS DE CARBONO VÍTREO (ECV) COM AuNPS-SiAmPy

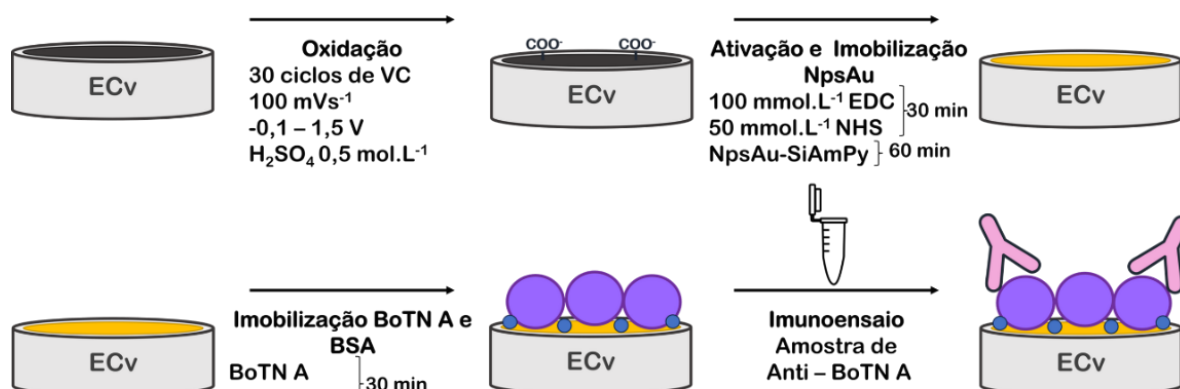
Os ECVs foram polidos em suspensão aquosa de alumina, utilizando-se granulometrias decrescentes ($1,0$, $0,5$ e $0,3 \mu\text{m}$) sobre um pano de polimento específico. Em seguida, os eletrodos foram lavados com água destilada e submetidos à limpeza em banho ultrassônico em álcool isopropílico por três minutos. Posteriormente, foram submetidos à oxidação em meio de H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), aplicando-se 30 ciclos de voltametria cíclica (VC) a uma velocidade de varredura de $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, na faixa de $-0,3$ a $1,5 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), visando a geração de grupos carboxílicos superficiais (denominados ox-ECV).

A superfície do ox-ECV foi ativada durante 30 minutos em uma solução contendo $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de EDC e $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NHS. Após esse período, o eletrodo foi enxaguado com tampão PBS ($0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4) e seco ao ar. Na sequência, o ox-ECV ativado foi incubado por 60 minutos em $20 \mu\text{L}$ da suspensão de AuNPs-SiAmPy e lavado novamente em tampão PBS, promovendo a imobilização covalente das nanopartículas via ligação amida entre os grupos carboxílicos do eletrodo e os grupos amino do silsesquioxano.

4.4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO IMUNOSSENSOR

Após a obtenção da plataforma ox-ECV/AuNPs-SiAmPy, procedeu-se à imobilização do antígeno mediante a incubação de $20 \mu\text{L}$ da solução contendo toxina botulínica (BoNT/A) 1 U ($5 \mu\text{g}$ de albumina + $0,074 \text{ ng}$ de neurotoxina), durante 30 minutos. Esta etapa foi seguida de lavagem exaustiva com tampão PBS e secagem ao ar em condições ambientes. Subsequentemente, para promover o bloqueio dos sítios ativos remanescentes na superfície do eletrodo e mitigar possíveis ligações inespecíficas, os eletrodos foram incubados por 30 minutos em $20 \mu\text{L}$ de uma solução de soro albumina bovino (BSA) a 0,05% (m/v). Após o bloqueio, realizaram-se novas lavagens com tampão PBS (pH 7,4). A Figura 7 apresenta esse procedimento de forma esquemática.

Figura 7 - Esquema representativo do desenvolvimento do imunossensor.



Fonte: A autora (2026).

Para a etapa de biorreconhecimento, a plataforma funcionalizada (ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA) foi incubada em solução contendo $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

de anticorpos anti-BoNT/A por 30 minutos, à temperatura ambiente. Na sequência, procedeu-se à lavagem do dispositivo em tampão PBS para remoção de espécies não ligadas por adsorção física. Todas as etapas de construção e funcionalização da plataforma foram caracterizadas por Voltametria Cíclica (VC) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE).

4.5 OTIMIZAÇÃO DA PERFORMANCE DO IMUNOSENSOR POR ESTUDOS DE PLANEJAMENTO FATORIAL

Para a otimização da performance do biossensor, utilizou-se uma abordagem multivariada, fundamentada em um planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central ($n=3$). As variáveis independentes selecionadas foram a concentração de BoNT/A e o respectivo tempo de incubação na superfície do eletrodo modificado. Os níveis (mínimo, central e máximo) empregados para cada variável estão detalhados na Tabela 1.

Para a execução do planejamento, alíquotas de 20 μL de BoNT/A nas concentrações pré-definidas foram depositados sobre a superfície da plataforma ox-ECV/AuNPs-SiAmPy e mantidos sob incubação pelos intervalos estipulados (Tabela 1). Posteriormente, as etapas de bloqueio e de biorreconhecimento foram realizadas mediante a adição de 20 μL de BSA e, na sequência, do anticorpo anti-BoNT/A na concentração fixa de $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, com tempo de interação de 30 minutos à temperatura ambiente. Os dados obtidos foram processados e analisados através do software Statistica[®] 13.0. A resposta analítica considerada foi a variação da Resistência a Transferência de Carga (ΔR_{ct} normalizado), parâmetro obtido via Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE).

Tabela 1 - Variáveis e níveis empregados no planejamento fatorial 2^2 para otimização da plataforma sensora.

Variável	(-)	(0)	(+)
[BoNT/A] (U)	0,5	0,75	1
Tempo de incubação (min)	30	60	90

Fonte: A autora (2026).

4.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS

Para a construção da curva analítica destinada à detecção de anticorpos anti-BoNT/A, foram realizadas medidas de EIE. A resposta do dispositivo foi expressa por meio da variação relativa da resistência à transferência de carga (ΔR_{ct} normalizado) entre a interface do eletrodo e o eletrólito, comparando-se a resistência da superfície antes e após o evento de biorreconhecimento (formação do imunocomplexo antígeno-anticorpo). A faixa de concentração investigada para o anti-BoNT/A compreendeu o intervalo de $0,1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $1,0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.7 AVALIAÇÃO DA REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Para a avaliação da precisão intraensaio e interensaio do imunossensor, foram conduzidos imunoensaios nas concentrações de $0,1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $1,0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ anticorpos anti-BoNT/A.

A precisão intraensaio (repetibilidade) foi determinada por meio de triplicatas de medidas realizadas em um único dia, sob as mesmas condições experimentais. A precisão interensaio (reprodutibilidade) foi avaliada pela realização de imunoensaios em triplicatas, conduzidos em três dias distintos, utilizando-se novos eletrodos preparados conforme protocolo estabelecido, de acordo com a *Food and Drug Administration - Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* (UNITED STATES, 2018).

4.8 AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE

A seletividade refere-se à capacidade do sensor em detectar o analito de interesse (anti-BoNT/A) na presença de uma matriz isenta de interferentes, permitindo sua quantificação precisa (UNITED STATES, 2018). Para essa avaliação, foram utilizadas amostras da matriz isenta de analito (tampão PBS) e amostras fortificadas com o analito nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8 e $1,0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, preparadas em triplicata. As respostas obtidas (ΔR_{ct}) foram comparadas ao sinal basal do sistema, a fim de avaliar a influência de possíveis ruídos e garantir a estabilidade do sinal analítico frente à constituição da matriz.

A especificidade está associada ao conceito de reatividade cruzada, sendo crucial que o elemento de biorreconhecimento interaja especificamente com o analito alvo (UNITED STATES, 2018). Este parâmetro foi avaliado pela incubação do imunossensor com soluções de anticorpos anti-PPT1 (anticorpo contra a enzima lisossomal palmitoil-proteína tioesterase 1), uma imunoglobulina IgG, mesma classe da anti-BoNT/A. As concentrações testadas foram de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, as quais representam, respectivamente, 1000 e 10000 vezes a concentração máxima dos anticorpos alvo utilizada no estudo ($1,0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). O objetivo desse teste foi confirmar que o sinal gerado decorre exclusivamente da afinidade imunológica entre o antígeno imobilizado e o anti-BoNT/A, sem interferência de outras imunoglobulinas.

4.9 DETECÇÃO EM AMOSTRA REAL

A avaliação do efeito de matriz biológica foi conduzida de acordo com as diretrizes do *International Council for Harmonisation (ICH) M10 – Bioanalytical Method Validation* (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2022) e da *Food and Drug Administration (FDA) - Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* (UNITED STATES, 2018), com a finalidade de investigar possíveis interferências da matriz na quantificação anticorpo anti-BoNT/A.

Como matriz biológica, utilizaram-se amostras de soro humano obtidas do Kit Dengue IgM Capture ELISA (Abbot Panbio®), indicadas como controle negativo. As amostras foram testadas nas diluições 1:100, conforme recomendações do fabricante, e 1:200 em PBS. O efeito foi avaliado por meio de ensaios de seletividade e recuperação por *fortificação*.

Inicialmente, o soro humano foi incubado sem a adição do analito para determinação do sinal basal da matriz. Na sequência, realizaram-se ensaios com amostras fortificadas com $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de anti-BoNT/A em soro humano diluído (1:200).

Para o ensaio de especificidade em amostra real, utilizou-se soro humano contendo anticorpos anti-Dengue (controle positivo do *Kit Panbio*®), diluído conforme instruções do fabricante. O soro foi incubado sem a adição do analito e, posteriormente, em amostras enriquecidas com $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ com anti-BoNT/A.

4.10 VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL POR ELISA

O *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços. Os reagentes auxiliares foram provenientes do *kit* Dengue IgM Capture ELISA (Abbott Panbio®).

Inicialmente, os poços da microplaca foram sensibilizados com 1 U BoNT/A. A placa foi incubada *overnight* (10 a 12 horas) a 4 °C para promover a adsorção passiva do antígeno. Após este período, realizou-se a lavagem dos poços (três ciclos com 300 µL de tampão PBS contendo 0,1% *Tween* 20), seguido pelo bloqueio dos sítios remanescentes com solução de BSA 1% (m/v) por 60 minutos à temperatura ambiente.

As amostras de anti-BoNT/A, em concentrações variando de 0,1 a 12,0 ng·mL⁻¹, além do controle positivo e negativo, foram incubadas por 90 minutos à temperatura ambiente e protegidos de luz, permitindo a ligação específica antígeno-anticorpo.

Após a lavagem para a remoção do material não ligado, adicionaram-se 100 µL do conjugado Proteína A-Peroxidase de Rábano (HRP) em cada poço, com exceção do branco. A proteína A possui alta afinidade pela região Fc dos anticorpos IgG anti-BoNT/A capturados (Kuwahara et al., 2023). A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz.

Após a lavagem final, a reação enzimática foi revelada pela adição de substrato cromogênico TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). O desenvolvimento da coloração, proporcional à quantidade de imunocomplexos formados, foi interrompido com solução de parada ácida. Os valores de absorbância foram medidos a 450 nm utilizando um leitor de microplacas Epoch™ (Biotek®).

4.11 ESTABILIDADE DO IMUNOSENSOR

Para avaliar a estabilidade temporal do imunossensor desenvolvido, os dispositivos foram construídos e armazenados sob condições controladas, em ambiente refrigerado a 4 °C e protegidos da incidência de luz, recobertos em tampão PBS. A estabilidade foi monitorada por meio da resposta analítica frente a uma concentração fixa de 1,0 ng·mL⁻¹ de anti-BoNT/A.

As medidas foram realizadas em intervalos pré-determinados, especificamente nos dias 0, 6, 12 e 30 dias após a construção da plataforma. O parâmetro utilizado para a avaliação foi a variação da resistência a transferência de carga (ΔR_{ct}), permitindo determinar o tempo de vida útil do sensor e a manutenção da integridade da camada de biorreconhecimento sob as condições de armazenamento estipuladas.

4.12 INSTRUMENTAÇÃO E PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato Metrohm Autolab® M204 controlado pelo software Nova® 2.1. As análises foram conduzidas em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, composta por: um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl saturado), um eletrodo auxiliar de fio de platina e, como eletrodo de trabalho, o imunossensor desenvolvido (ECV modificado).

As medidas foram realizadas em meio de tampão PBS ($0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4), contendo uma sonda eletroquímica de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($5,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, proporção 1:1), como mediador redox.

Para as medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), aplicou-se um potencial fixo de circuito aberto, com amplitude de 10 mV (pico a pico), em um intervalo de frequências na faixa de 10 kHz a 100 mHz. Para análises de Voltametria Cíclica (VC), empregou-se uma faixa de potencial de -0,3 V a +0,8 V e uma velocidade de varredura (v) igual a $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

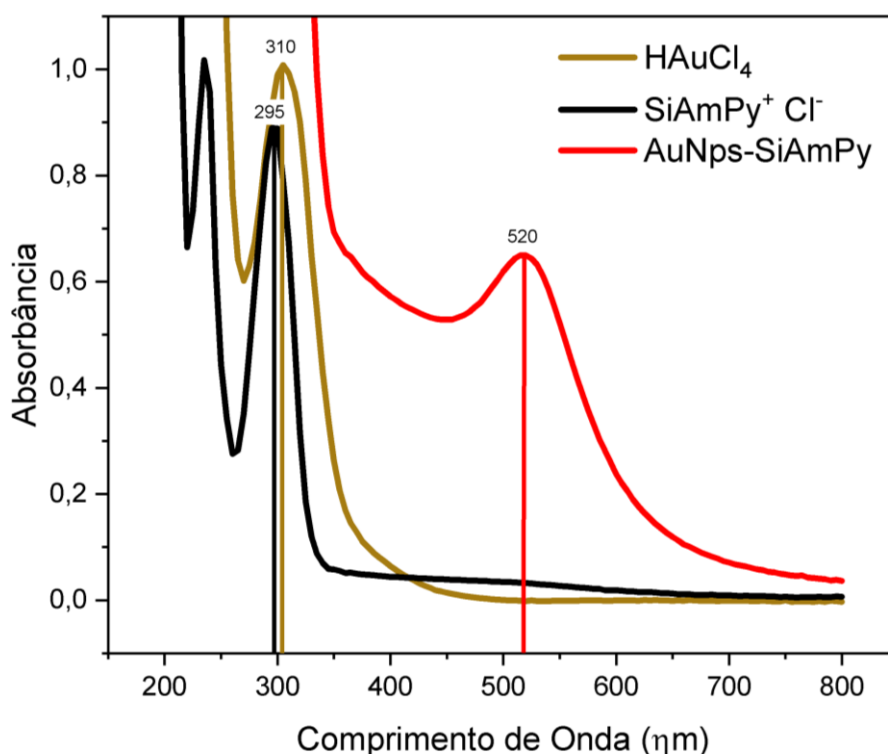
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS COM SiAmPy (AuNPS-SiAmPy)

As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas por meio do precursor metálico HAuCl_4 em presença do agente estabilizante SiAmPy. Inicialmente, a solução precursora apresentava uma coloração amarela pálida, característica dos íons $[\text{AuCl}_4]^-$. Após a adição do agente redutor, observou-se uma transição cromática imediata para vermelho rubi, indicativo macroscópico da redução do $[\text{AuCl}_4]^-$ a Au^0 e a consequente formação de aglomerados nanométricos (Alex; Tiwari, 2015). Nesta etapa, o SiAmPy desempenha um papel duplo: controla a cinética de nucleação e crescimento das partículas e atua como agente de passivação superficial, mantendo as AuNPs em escala nanométrica e prevenindo processos de aglomeração (Lima et al., 2022).

A formação da suspensão coloidal foi confirmada por espectroscopia de absorção na região do UV-vis (Figura 8). Em uma análise qualitativa, o complexo precursor $[\text{AuCl}_4]^-$ apresentou uma banda de absorção em torno de 301 nm, atribuída a transições de transferência de carga ligante-metal (Winiarski et al., 2017). O polieletrólito SiAmPy⁺ exibiu absorções em 295 nm, devido às transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ nos anéis de piridínio, e em 234 nm, atribuídas a transições de transferência de carga intermolecular entre grupos 2-amino-(4-metil)piridínio. O espectro da suspensão exibe uma banda de absorção centrada em 520nm, atribuída à banda de ressonância plasmônica de superfície (SPR) das AuNps (Ferrari, 2023; Lima et al., 2019, 2022). A posição e a largura dessa banda são dependentes do tamanho e da morfologia das partículas; o perfil observado é característico de nanopartículas esféricas de pequenas dimensões e indica uma distribuição de tamanho homogênea (Dykman; Guliy, 2026).

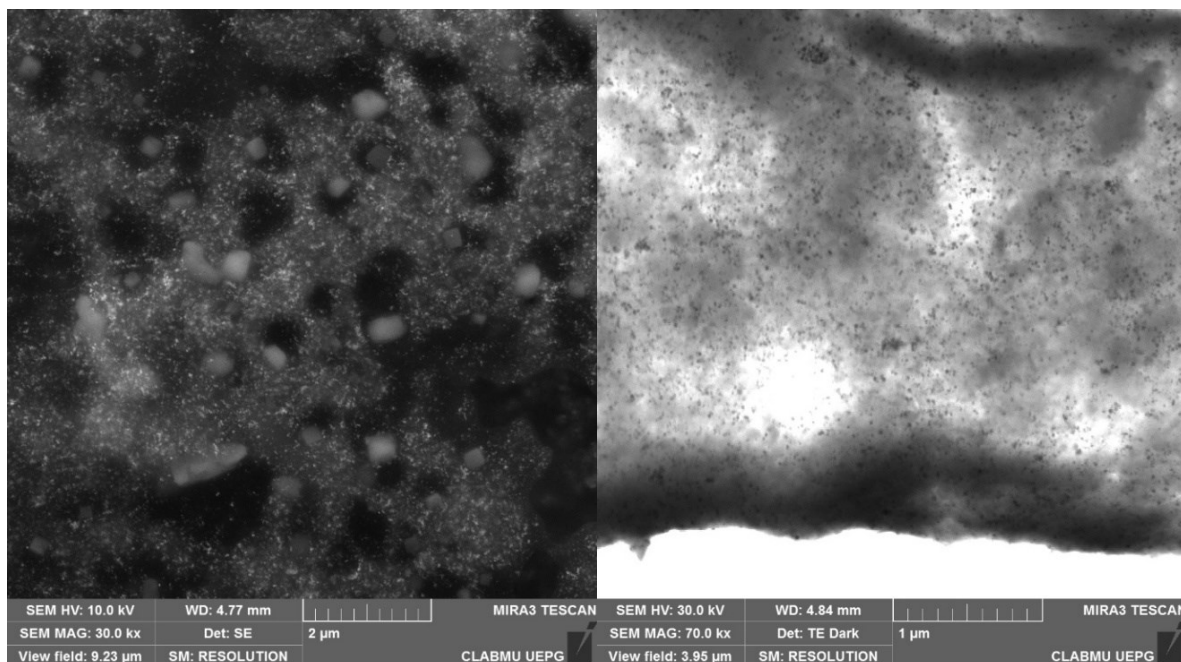
Figura 8 - Espectro de absorção UV-Vis (200-800 nm) dos precursores (HAuCl_4 e $\text{SiAmPy}^+ \text{Cl}^-$) e o nanohíbrido sintetizado (AuNPs-SiAmPy).



Fonte: A autora (2026).

A morfologia e a integridade estrutural das AuNPs-SiAmPy foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FE) (Figura 9). As micrografias revelaram nanopartículas com morfologia predominante esférica e superfície homogênea, sem porosidade aparente. Esses dados corroboram os resultados obtidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS), que indicaram um diâmetro hidrodinâmico médio inicial de $43,8 \pm 0,5 \text{ nm}$. Após um período de 170 dias sob armazenamento, o diâmetro hidrodinâmico médio manteve-se $39,17 \pm 0,5 \text{ nm}$, demonstrando a ausência de agregação significativa ou coalescência. Essa estabilidade prolongada confirma a eficácia do SiAmPy na estabilização da interface ouro-solução.

Figura 9 - (A) Micrografia MEV-FE das AuNPs-SiAmPy (70 kx). (B) Imagem de FE-STEM em campo claro/escuro evidenciando a distribuição das partículas (escala de 2 μ).



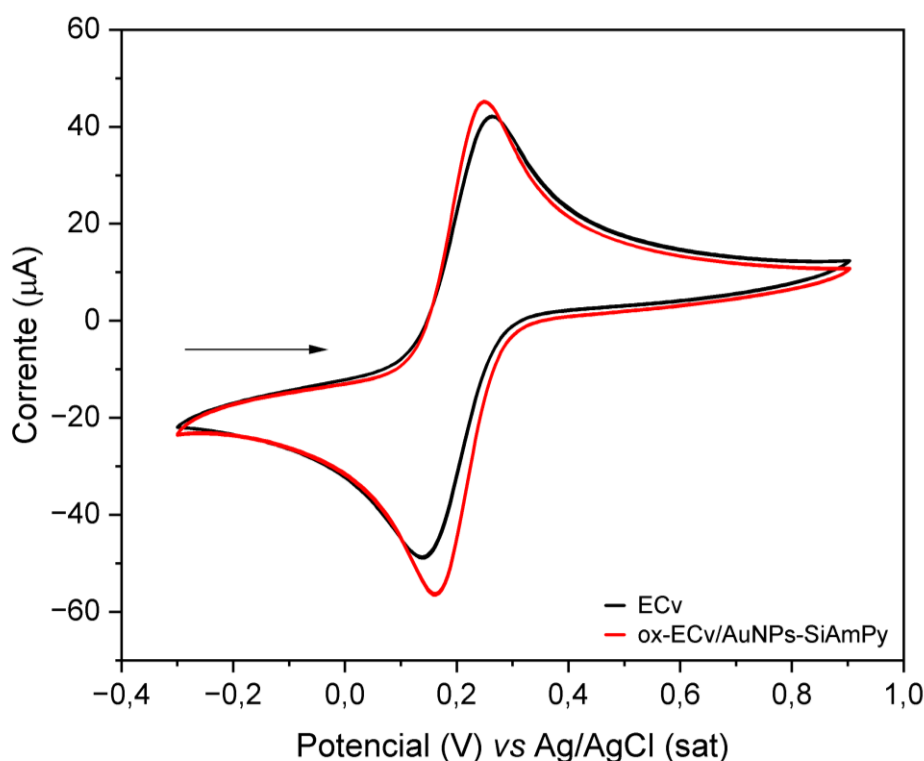
Fonte: A autora (2026).

A análise de Potencial Zeta (ζ) revelou um valor de +36 mV para as AuNPs-SiAmPy recém sintetizadas. Este valor positivo confirma que as nanopartículas foram adequadamente revestidas com as cadeias carregadas positivamente, relativas aos grupos piridínio de SiAmPy. De acordo com a literatura, sistemas coloidais com valores do $|\zeta| > 30\text{mV}$ são considerados fisicamente estáveis, devido à magnitude das forças de repulsão eletrostática. Contudo, no caso das AuNPs-SiAmPy, a estabilidade não é conferida apenas pela barreira eletrostática. A presença das cadeias poliméricas do silsesquioxano promove um efeito sinérgico de estabilização eletroestática: enquanto a carga positiva gera repulsão entre as partículas, o volume das cadeias orgânicas cria um impedimento estérico que impede a aproximação dos núcleos metálicos, mesmo em meios com alta força iônica (Cacua et al., 2019; Lima et al., 2022). Mesmo após 170 dias, o valor de $|\zeta|$ permaneceu em 31,3 mV, corroborando a preservação da estabilidade eletrostática ao longo do tempo.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO MODIFICADO OX-ECV/AuNPS-SiAmPy

As etapas de desenvolvimento e modificação da plataforma eletródica (ox-ECv/AuNPs-SiAmPy) foram caracterizadas por VC, utilizando o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como sonda eletroquímica (Figura 10). A análise dos voltamogramas permite observar variações nas correntes de pico anódico ($I_{p,a}$) e catódico ($I_{p,c}$), bem como nos respectivos potenciais de pico ($E_{p,a}$ e $E_{p,c}$), que refletem as alterações nas propriedades interfaciais do eletrodo de carbono vítreo (ECV), após cada etapa de funcionalização (Tabela 2).

Figura 10 - Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos ECV (linha preta) e ox-ECv/AuNPs-SiAmPy (linha vermelha).



Fonte: A autora (2026).

Tabela 2 - Parâmetros eletroquímicos obtidos por voltametria cíclica para os eletrodos ECV e ox-ECv/AuNPs-SiAmPy.

	$I_{p,a}$ (µA)	$I_{p,c}$ (µA)	$I_{p,a}/I_{p,c}$	$E_{p,a}$ (V)	$E_{p,c}$ (V)	ΔE_p (V)
ECv	42,05	-48,61	-0,87	0,26	0,14	0,13
ox-ECv/AuNPs-SiAmPy	44,83	-55,79	-0,80	0,25	0,16	0,09

Fonte: A autora (2026).

Após a modificação do eletrodo com o nanocompósito AuNPs-SiAmPy, observou-se um incremento expressivo na magnitude das correntes de pico. Simultaneamente, verificou-se uma redução na diferença de potencial (ΔE_p), que decresceu de 0,13 V (ECV) para 0,09 V na plataforma modificada. Essa contração na separação dos picos sugere que o sistema se aproxima de um comportamento mais reversível, indicando uma melhora substancial na cinética de transferência de elétrons na interface eletrodo-solução (Sadique et al., 2022).

Tal fenômeno é atribuído a sinergia entre as propriedades eletrocatalíticas e à alta condutividade das AuNps e do SiAmPy. Juntos, esses materiais expandem a área superficial eletroativa e facilitam a transferência de elétrons para o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, otimizando a resposta do transdutor (Sadique et al., 2022).

Para quantificar esse ganho, a área eletroativa (A) foi determinada por meio da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE). As medidas foram conduzidas na presença de sonda redox $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) em PBS ($0,15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,4). A área eletroativa foi determinada pela relação teórica da impedância na região de difusão linear (baixas frequências). A partir da parte real da impedância (Z') e da frequência angular ($\omega = 2 \pi f$, sendo f a frequência em Hz), construiu-se o gráfico de Warburg (Z' versus $\omega^{-1/2}$), onde o coeficiente de Warburg (σ) é obtido a partir da inclinação da reta, conforme a Equação 1 (Bard; Faulkner; White, 2001):

$$Z' = R_s + R_{ct} + \sigma n \omega^{-\frac{1}{2}} \quad (1)$$

Onde R_s é a resistência da solução, R_{ct} é a resistência a transferência de carga, n é o número de elétrons envolvidos na reação de oxirredução e ω é a frequência angular. Com o valor de σ , a área foi calculada através da reorganização da equação teórica de Warburg (Equação 2):

$$A = \frac{RT}{n^2 F^2 \sigma C \sqrt{2D}} \quad (2)$$

Onde

- R : Constante dos gases ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$);
- T : Temperatura (298,15 K);

- n : número de elétrons envolvidos na reação de oxirredução ($n=1$);
- F : Constante de Faraday (96485 C mol^{-1});
- A : a área eletroativa do eletrodo (cm^2);
- D^* : Coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($7,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$);
- C^* : Concentração da espécie eletroativa ($5,0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}$);

Os valores de área eletroativa para o ECv e ox-ECv/AuNPs-SiAmPy são apresentados na Tabela 3. Os resultados demonstram que a incorporação das AuNPs-SiAmPy promoveu um aumento de 12% na área eletroativa do dispositivo. Esse incremento é reflexo da nano estruturação da superfície, que oferece uma maior densidade de sítios ativos para a transferência de carga, além de evidenciar a eficácia do silsesquioxanos em manter as nanopartículas dispersas e acessíveis ao par redox (Flowers; Strickland, 2010; Lima et al., 2022; Saha et al., 2012).

Tabela 3 - Valores de área eletroativa calculada para os eletrodos ECv, ox-ECv/AuNPs-SiAmPy.

	Área (cm^2)	Desvio Padrão
ECv	0,0534	0,004
ox-ECv/AuNPs-SiAmPy	0,0597	0,005

Fonte: A autora (2026).

5.2.1 Caracterização Eletroquímica das etapas de Construção do Biossensor

As etapas de construção do biossensor (ox-ECv/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA) foram monitoradas pelas técnicas de VC e EIE. Enquanto a VC fornece informações sobre a termodinâmica e cinética dos processos de transferência de elétrons, a EIE é extremamente sensível à alterações da resistência interfacial durante os eventos de modificação superficial.

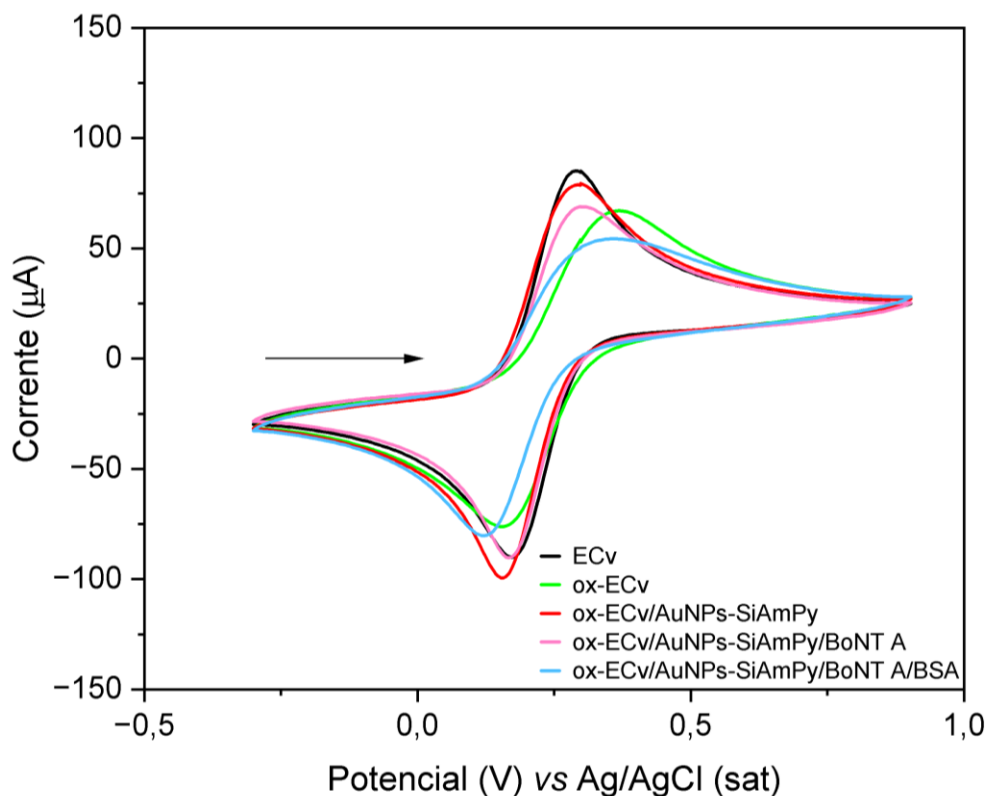
Os voltamogramas cíclicos de cada etapa são apresentados na Figura 11. O ECv polido, inicialmente, não apresentou impedimentos significativos para os processos de transferência eletrônica, exibindo picos redox bem definidos. Após o processo de oxidação (ox-ECv), observa-se uma redução das correntes de pico anódico ($I_{p,a}$) e catódico ($I_{p,c}$), atribuída à formação de grupos carboxilatos (COO^-) na superfície. Como a sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ possui carga negativa, ocorre uma repulsão eletrostática na interface eletrodo-solução, dificultando a aproximação dos íons e, conseqüentemente, a transferência de carga.

A imobilização covalente das AuNPs-SiAmPy foi realizada via ativação dos grupos carboxílicos com a mistura com EDC/NHS. O mecanismo envolve a ativação inicial dos grupos carboxilatos (COO^-) e a formação do intermediário reativo, o o- acilisourea, o qual é estabilizado pela ligação com moléculas de NHS. Esse intermediário sofre um ataque nucleofílico pelos grupos amins presentes no SiAmPy, resultando em ligações amida estáveis (Bartczak; Kanaras, 2011). Como esperado, a incorporação das AuNPs-SiAmPy promoveu um aumento expressivo nas correntes redox, $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$, devido as suas propriedades eletrocatalíticas e ao aumento da área superficial efetiva (Bartczak; Kanaras, 2011; Liu et al., 2015).

A imobilização do bioreceptor BoNT/A e o subsequente bloqueio dos sítios livres remanescentes com BSA resultaram em decréscimos sucessivos as correntes de pico ($I_{p,a}$ e $I_{p,c}$) e um deslocamento do potencial redox (E_p). Esse comportamento é justificado pelo caráter isolante das moléculas proteicas, que criam uma barreira física (impedimento estérico) e dificultam a difusão das onda redox até a superfície eletródica (Sadique et al., 2022). A imobilização da BoNT/A sobre a plataforma sensora é sustentada por um mecanismo sinérgico de interações físico-químicas, destacando-se a atração eletrostática entre os grupos piridínicos do SiAmPy, que conferem carga positiva a interface, e a carga líquida negativa da toxina (Pirazzini et al., 2017).

A imobilização da BSA é um passo importante na construção de um imunossensor, pois sua ligação promove um bloqueio dos sítios de ligação não específicos livres. Essa modificação é estratégica para minimizar o ruído de fundo e aumentar a seletividade da plataforma, garantindo que as variações de sinal observadas nas etapas posteriores sejam decorrentes da interação específica entre o biorreceptor imobilizado (BoNT/A) e o analito (IgG anti-BoNT/A), evitando ligações inespecíficas (Sadique et al., 2022).

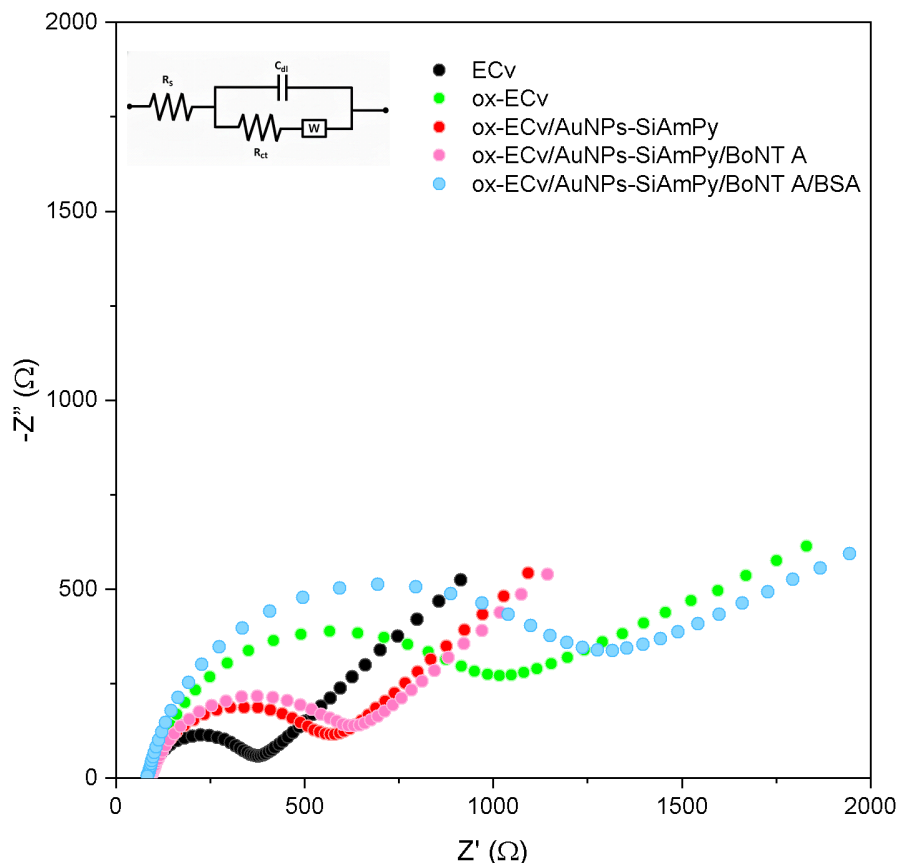
Figura 11 - Voltamogramas cíclicos para as etapas de modificação: ECV (preto), ox-ECV (verde), ox-ECV/AuNPs-SiAmPy (vermelho), ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A (rosa) e ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA (azul).



Fonte: A autora (2026).

Os resultados obtidos por meio de EIE, apresentados como Diagramas de Nyquist (Figura 12) corroboram os achados da VC. O diâmetro do semicírculo em altas frequências representa a Resistência à Transferência de Carga (R_{ct}). Observou-se que a oxidação do eletrodo (ox-ECV) eleva a R_{ct} , devido a repulsão dos grupos carboxilatos (COO^-) em relação a sonda eletroquímica. Por outro lado, a modificação com AuNPs-SiAmPy reduz drasticamente este parâmetro, facilitando o fluxo eletrônico. A imobilização da BoNT/A e da BSA elevou progressivamente a R_{ct} , confirmando a formação de uma camada de macromolécula densa sobre o transdutor.

Figura 12 - Diagrama de Nyquist para as etapas de construção do biossensor, evidenciando as variações de R_{ct} em cada nível de funcionalização. ECV, ox-ECV, ox-ECV/AuNPs-SiAmPy, ox-ECV, ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A e ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/AA/BSA.



Fonte: A autora (2026).

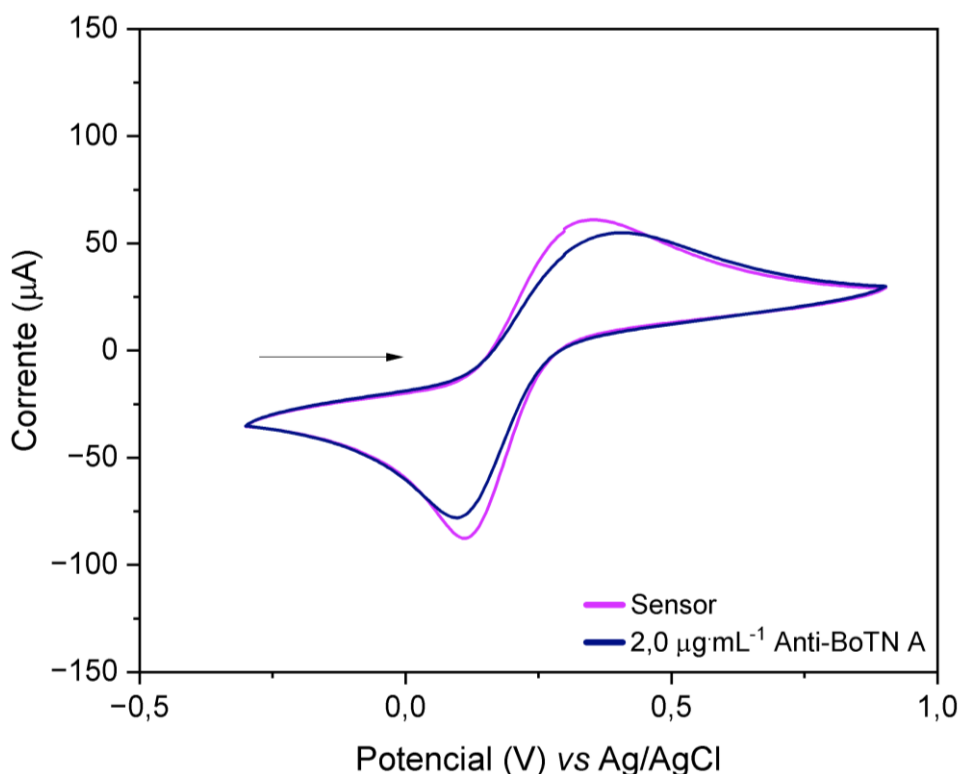
5.2.2 Detecção de anticorpos anti-BoNT/A

Após a caracterização da plataforma de detecção, o imunossensor (ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA) foi exposto ao analito alvo, o anticorpo IgG anti-BoNT/A, na concentração de $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. A formação do imunocomplexo antígeno-anticorpo (BoNT/A/Anti-BoNT/A) foi caracterizada por VC e EIE (Figuras 14 e 15).

Na voltametria cíclica (Figura 13), a interação específica resultou em uma redução de aproximadamente 20 % dos valores de corrente de pico. A corrente $I_{p,a}$ reduziu de $62,14 \mu\text{A}$ para $51,55 \mu\text{A}$, enquanto $I_{p,c}$ de $-86,82 \mu\text{A}$ para $-64,75 \mu\text{A}$. Simultaneamente, o valor de ΔE_p (diferença de potencial) aumentou de $0,22 \text{ V}$ para $0,26 \text{ V}$, indicando que a formação do complexo proteico torna a cinética de transferência de elétrons mais lenta.

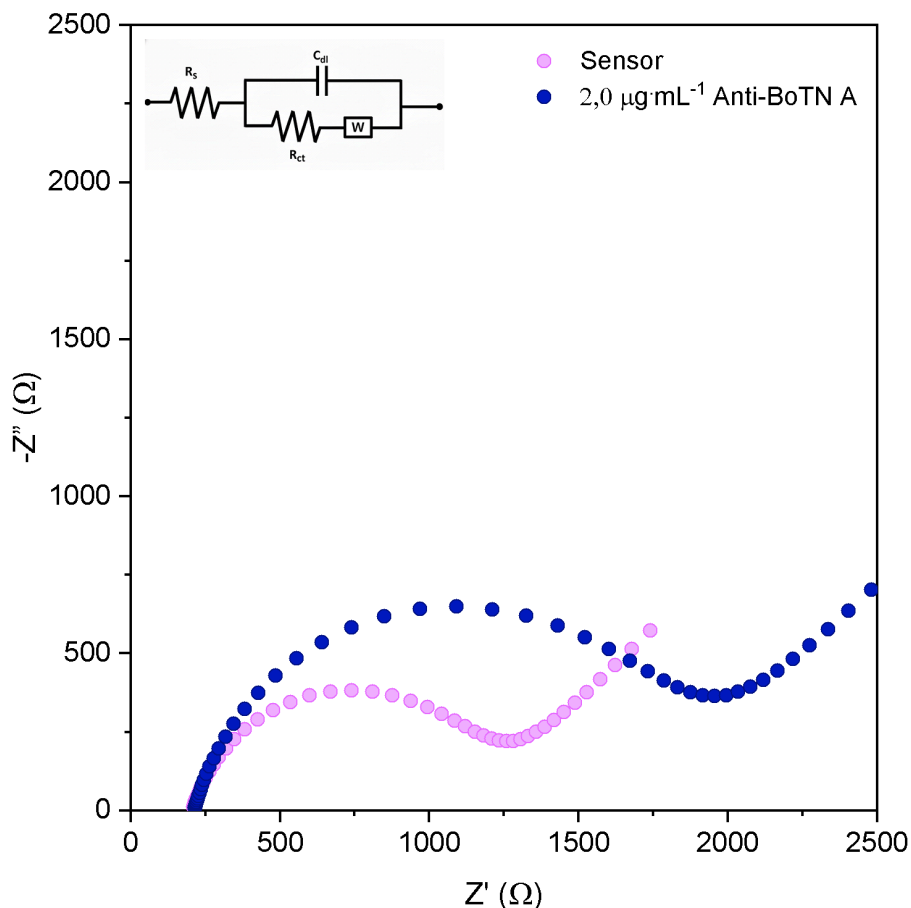
O R_{ct} (Figura 14) mostrou-se ainda mais sensível ao evento de reconhecimento: o valor de R_{ct} variou de 992,46 Ω para 1629,4 Ω após a incubação com anticorpos anti-BoNT/A. Esse incremento de aproximadamente 64% na resistência interfacial prova que a ligação do anticorpo anti-BoNT/A à toxina imobilizada dificulta o acesso da sonda a superfície eletródica, validando o princípio de funcionamento do imunossensor proposto.

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos para as etapas de modificação: ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA (rosa) e ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA/Anti-BoNT/A (azul).



Fonte: A autora (2026).

Figura 14 - Diagrama de Nyquist para as etapas de construção do biossensor, evidenciando as variações da R_{ct} em cada nível de funcionalização. Eletrodos ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA (rosa) e ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA/Anti-BoNT/A (azul).



Fonte: A autora (2026).

5.2.3 Otimização da performance do imunossensor por estudos de planejamento fatorial

A fim de estabelecer as condições ideais de imobilização BoNT/A sobre a plataforma ox-ECV/AuNPs-SiAmPy, aplicou-se um planejamento fatorial experimental 2^2 com triplicata no ponto central ($n=3$). Esta abordagem multivariada permite avaliar não apenas as variáveis, mas também a existência de efeitos de interação entre elas, reduzindo o número de ensaios e o consumo de reagentes (Ferreira et al., 2007). Os fatores selecionados foram a concentração de BoNT/A e o tempo de incubação. A resposta analítica monitorada foi a variação percentual de resistência à transferência de carga ($\% \Delta R_{ct}$), antes e após a incubação do anticorpo anti-BoNT/A ($2,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), conforme detalhado na Tabela 4.

Tabela 4 - Matriz experimental do planejamento fatorial 2^2 para otimizar a construção do sensor para detecção de anticorpos anti-BoNT/A.

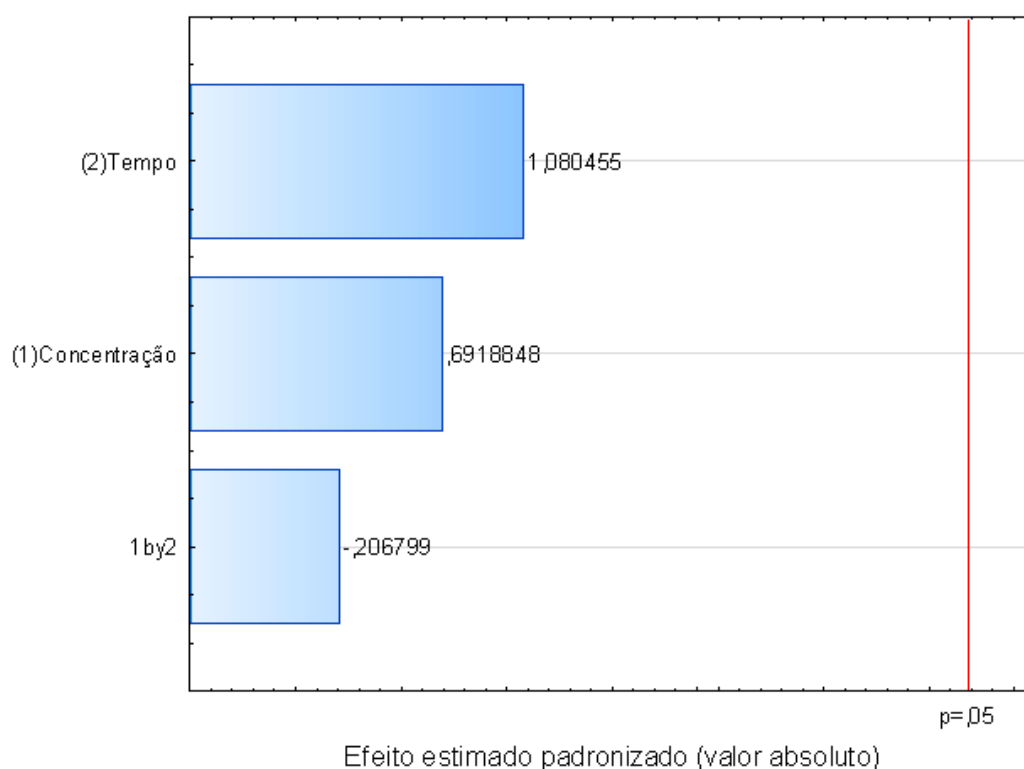
Ensaio	[BoNT/A]	Tempo	$\Delta R_{ct}(\%)$
1	-1	-1	34,56
2	1	-1	46,19
3	-1	1	51,22
4	1	1	57,49
5	0	0	27,76
6	0	0	30,38
7	0	0	33,47

Fonte: A autora (2026).

Nota: Níveis dos fatores: [BoNT/A] (-1=0,5 U; 0=0,75U; +1=1U); Tempo (-1=30 min; 0=60min; +1 = 90min)

O tratamento estatístico dos dados indica que, dentro do domínio experimental estudado, nenhum dos fatores principais (concentração ou tempo de incubação), nem sua interação, apresentaram influência estatisticamente significativa na resposta do sensor ao nível de confiança de 95% ($p > 0,05$). O Diagrama de Pareto (Figura 15) ilustra a magnitude padronizada desses efeitos, onde se observa que nenhum dos termos ultrapassa a linha vertical vermelha (limite de significância), o que sugere que a plataforma apresenta robustez satisfatória frente a pequenas variações nestes parâmetros operacionais.

Figura 15 - Diagrama de Pareto para os efeitos resultantes do planejamento fatorial 2^2 realizado para a otimização da preparação do biossensor.



Fonte: A autora (2026).

Diante da ausência de significância estatística para os fatores estudados, a definição das condições experimentais para as etapas seguintes seguiu critérios de compromisso analítico, visando sensibilidade e eficiência operacional. Para a concentração de BoNT/A, optou-se pelo nível superior (1,0 U) para garantir o recobrimento máximo da superfície eletródica com o antígeno, assegurando que o sensor não se torne o fator limitante em concentrações elevadas de anticorpo. Selecionou-se menor tempo de incubação testado (30 min). Esta escolha é estratégica para o desenvolvimento de um dispositivo de diagnóstico rápido, reduzindo o tempo total de construção do biossensor sem prejuízo à estabilidade da camada de biorreconhecimento.

5.3 PARÂMETROS ANALÍTICOS

5.3.1 Curva Analítica

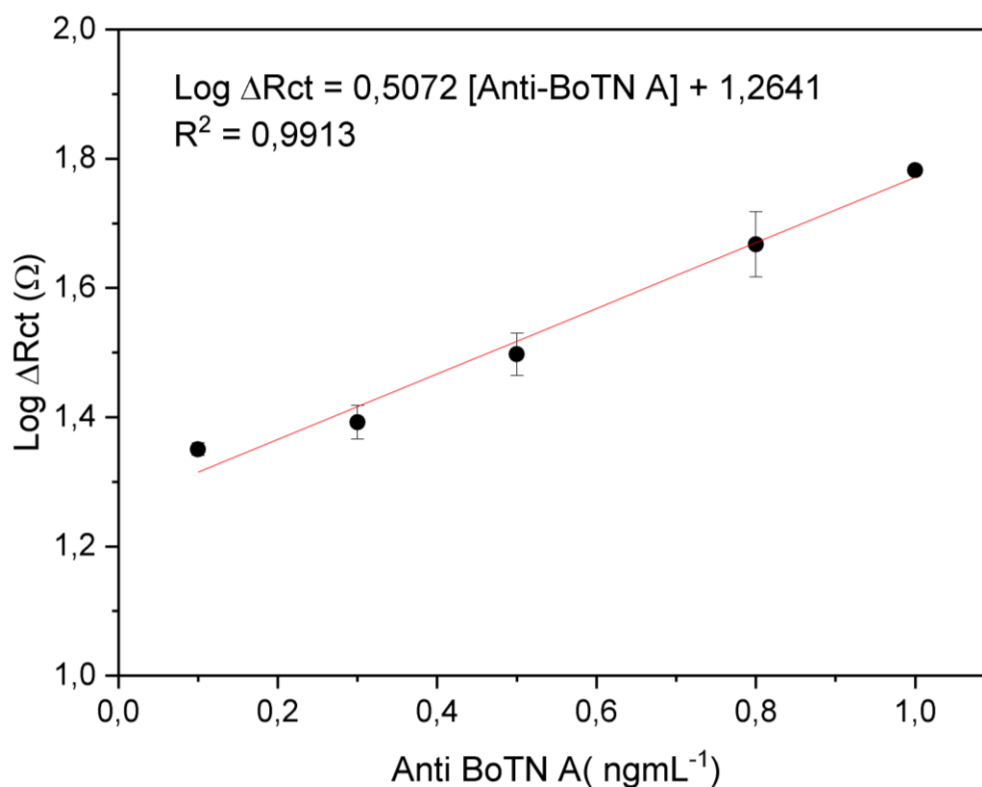
A performance analítica da plataforma ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA foi avaliada pela resposta do logaritmo da impedância ($\text{Log } \Delta R_{ct}$ normalizada) em função do aumento da concentração de IgG anti-BoNT/A. A normalização do sinal foi calculada conforme a Equação 3, onde $R_{ct}(\text{biossensor})$ representa a resistência antes da incubação da amostra e, e $R_{ct}(\text{imunoensaio})$ representa a resistência após a interação com o anticorpo.

$$\Delta R_{ct} (\%) = \frac{R_{ct}(\text{imunoensaio}) - R_{ct}(\text{biossensor})}{R_{ct}(\text{biossensor})} \times 100 \quad (3)$$

Conforme apresentado na Figura 16, a curva analítica média apresentou uma correlação linear entre o logaritmo da variação relativa da resistência ($\text{Log } \Delta R_{ct}$ normalizada) e a concentração de anti-BoNT/A na faixa de 0,1 - 1,0 ng·mL⁻¹. Esse comportamento é frequentemente observado em imunossensores eletroquímicos, onde a saturação progressiva dos sítios de ligação na superfície segue um modelo de adsorção que se reflete na impedância da interface (Bard; Faulkner; White, 2001). A curva analítica resultante pode ser descrita pela equação de regressão linear (Equação 4):

$$\text{Log } \Delta R_{ct} = 0,5072 [\text{Anti} - \text{BoTNA}] + 1,2641 \quad (4)$$

Figura 16 - Curva Analítica obtida através da relação entre o Log ΔR_{ct} e a concentração de anticorpos anti-BoNT/A.



Fonte: A autora (2026).

O coeficiente de determinação (R^2) obtido foi superior a 0,9913, indicando uma linearidade dentro da faixa dinâmica estudada. A análise dos resíduos demonstrou uma distribuição aleatória com variância constante, confirmando que o modelo linear adotado é adequado para a quantificação do analito. Este resultado é promissor, e sugere que a plataforma desenvolvida possui a sensibilidade para a detecção de baixas concentrações de anti-BoNT/A, sugerindo que a plataforma possui potencial para a quantificação dos anticorpos em amostras reais.

5.3.2 Determinação dos Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

A sensibilidade do imunossensor foi quantificada através do cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), utilizando-se as Equações 5 e 6, respectivamente. O procedimento seguiu as diretrizes do guia *International Council for Harmonisation* (ICH) e da *European Medicines Agency* (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2022; Swartz; Krull, 2021).

$$LD = 3,3 \frac{\sigma}{S} \quad (5)$$

$$LQ = 10 \frac{\sigma}{S} \quad (6)$$

Onde o σ refere-se ao desvio padrão da resposta do branco e S é a inclinação (sensibilidade) da curva de calibração obtida.

O limite de detecção (LD), o qual indica a menor concentração de anti-BoNT/A que pode ser distinguida com segurança do ruído de fundo, foi de 0,0644 ng·mL⁻¹. Já o limite de quantificação (LQ), que representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão, resultou 0,1953 ng·mL⁻¹.

5.4 REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE

A precisão do imunossensor foi avaliada em termos de repetibilidade (precisão intraensaio) e reprodutibilidade (precisão interensaio), conforme preconizado pelas diretrizes do *Food and Drug Administration* (UNITED STATES, 2018). O critério de aceitação para validação de métodos bioanalíticos estabelece um Coeficiente de Variação (CV %) inferior a 20% para ambos os ensaios. O cálculo foi realizado de acordo com a Equação 7:

$$CV (\%) = \frac{SD_{medida}}{C_{medida}} \times 100 \quad (7)$$

Onde SD é o desvio padrão da resposta de ΔR_{ct} e C_{medida} é a concentração mensurada.

A repetibilidade foi determinada pela análise de triplicatas nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 ng·mL⁻¹ de anti-BoNT/A, realizadas em um único dia, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de CV% obtidos foram de 9,45%, 7,89% e 5,83%, respectivamente. Observou-se que a precisão aumenta em concentrações mais elevadas, possivelmente devido à maior estabilidade do sinal de impedância quando a superfície está mais densamente ocupada pelo imunocomplexo.

A reprodutibilidade foi avaliada por ensaios conduzidos em três dias distintos, utilizando novos eletrodos modificados. Os valores CV% interensaio foram de 9,42%, 6,46% e 11,80 % para as concentrações 0,1, 0,5 e 1,0 ng·mL⁻¹, respectivamente.

Em ambos os estudos, os valores mantiveram-se significativamente abaixo do critério de aceitação de ≤20%. Esses resultados demonstram que a plataforma ox-ECV/AuNPs-SiAmPy/BoNT/A/BSA apresenta uma precisão satisfatória entre diferentes lotes de sensores e períodos de análise.

5.5 EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO (SENSIBILIDADE ANALÍTICA)

A exatidão do biossensor foi verificada por meio de ensaios de recuperação e cálculo de viés, conforme as Equações 8 e 9, respectivamente. Esses parâmetros permitem avaliar a concordância entre o valor obtido experimentalmente e o valor nominal (teórico) aceito como verdadeiro (UNITED STATES, 2018).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_{\text{medida}}}{C_{\text{nominal}}} \times 100 \quad (8)$$

$$\text{Viés(\%)} = \frac{C_{\text{medida}} - C_{\text{nominal}}}{C_{\text{nominal}}} \times 100 \quad (9)$$

Onde C_{medida} é a concentração obtida experimentalmente; C_{nominal} é a concentração teórica. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores obtidos experimentalmente de concentração de anticorpos anti-BoNT/A detectadas em ensaios de sensibilidade e seletividade

Concentração Teórica (ng·mL ⁻¹)	Concentração Medida (ng·mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Viés (%)
Branco (PBS)	-0,11	< LD	< LD
0,1	0,17 ± 0,02	< LQ	< LQ
0,3	0,25 ± 0,05	84,36	15,64
0,5	0,45 ± 0,07	90,04	9,96
0,8	0,80 ± 0,10	99,43	0,57
1	1,02 ± 0,02	102,22	2,22

Fonte: A autora (2026).

A resposta obtida para o branco (matriz PBS) resultou em uma Concentração aparente de -0,11 ng·mL⁻¹. Este valor situa-se abaixo do limite de detecção (LD = 0,0644 ng·mL⁻¹), o que indica que o ruído de fundo é desprezível. No caso da concentração de 0,1 ng·mL⁻¹, embora o analito tenha sido detectado (0,17 ± 0,02 ng·mL⁻¹), o valor encontra-se abaixo do limite de quantificação (LQ = 0,1953 ng·mL⁻¹), o que impede uma análise estatística fidedigna nesse ponto específico.

Para as concentrações situadas dentro da faixa de quantificação (0,3 a 1,0 ng·mL⁻¹) os valores de recuperação variaram entre 84,36% e 102,22%, enquanto o viés permaneceu abaixo de 15,64%. De acordo com as diretrizes da *FDA* (UNITED STATES, 2018), para bioensaios, aceitam-se recuperações entre 80-120% e viés de até ± 20%. Portanto, os dados confirmam que o biossensor fornece medidas exatas e confiáveis da concentração de anticorpos anti-BoNT/A.

5.6 ESPECIFICIDADE E REATIVIDADE CRUZADA

A especificidade analítica é um parâmetro crítico para assegurar que o sinal gerado é decorrente apenas da interação antígeno-anticorpo de interesse. Para isso, o sensor foi exposto um anticorpo interferente, anti-PPT1, em concentrações massivamente superiores (1 e 10 µg·mL⁻¹, 1000 e 10000 vezes) ao limite superior de detecção do analito. Essa estratégia de "estresse de matriz" é fundamental para simular a elevada carga proteica inespecífico presente em amostras biológicas e é uma abordagem preconizada pelas diretrizes internacionais de validação de

métodos bioanalíticos (ICH M10, 2022). Para o estudo, calculou-se a Reatividade Cruzada (%), por meio da Equação 10.

$$\text{Reatividade – Cruzada (\%)} = \frac{C_{\text{aparente}}}{C_{\text{analito}}} \times 100 \quad (10)$$

Onde C_{aparente} é a concentração medida na presença do interferente e C_{analito} é a concentração nominal do analito do anticorpo Anti-PPT1. O critério de aceitação estabelecido foi de < 5%, baseado em diretrizes internacionais (UNITED STATES, 2018; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2022). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Ensaio de Especificidade: Concentração Aparente e Reatividade Cruzada.

Interferente (anti-PPT1)	anti-PPT1	
	1 µg·mL⁻¹	10 µg·mL⁻¹
C aparente (µg·mL⁻¹)	- 0,16 ± 0,18	0,29 ± 0,16
Reatividade Cruzada (%)	- 0,02	0,00

Fonte: A autora (2026).

Os ensaios relevaram concentrações aparentes extremamente baixas, estatisticamente equivalentes ao branco do sistema. A reatividade cruzada calculada foi praticamente nula (máximo de 0,00%) demonstrando que o sítio de ligação da BoNT/A imobilizada não apresenta afinidade por anticorpos não específicos, mesmo em condições de alta saturação da matriz. Essa especificidade é atribuída tanto à integridade conformacional da toxina imobilizada quanto à eficiência da etapa de bloqueio com BSA, que minimiza adsorções inespecíficas na superfície de ouro/silsesquioxano.

5.7 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS E ESTUDO DE EFEITO DE MATRIZ

A transição de biossensores de meios controlados para matrizes biológicas complexas é um dos maiores desafios na nanobiotecnologia analítica. O soro humano contém uma vasta gama de proteínas, lipídeos e eletrólitos que podem causar interferências inespecíficas ou o “bloqueio” da superfície do transdutor, efeito de matriz (Kuntoji et al., 2024).

5.7.1 Avaliação do Efeito de Matriz e Escolha da Diluição

Para minimizar as interferências inespecíficas, avaliou-se o efeito da diluição do soro humano na resposta do biossensor sem a presença de anticorpos Anti-BoNT/A (Tabela 7).

Tabela 7 - Avaliação da resposta basal do imunossensor frente a diferentes diluições de soro humano.

	Soro 1:100	Soro 1:200
C medida (ng·mL ⁻¹)	0,11 ± 0,48	-0,02 ± 0,09
Interpretação	< LQ	<LD

Fonte: A autora (2026).

A resposta para o soro diluído 1:100 apresentou uma concentração média de 0,11 ng·mL⁻¹, valor situado entre o LD e o LQ. Já a diluição 1:200 resultou em um sinal desprezível (-0,02 ng·mL⁻¹), permanecendo abaixo do Limite de Detecção (0,0644 ng·mL⁻¹). Esse comportamento indica que a diluição de 1:200 é eficaz para mitigar o ruído de fundo e as interações inespecíficas da matriz. Portanto, essa diluição foi selecionada para os ensaios subsequentes de fortificação e recuperação.

5.7.2 Ensaios de Recuperação por fortificação em Soro Humano

A exatidão do método em matriz biológica foi avaliada por ensaios de fortificação, utilizando a concentração de 2,0 ng·mL⁻¹ de anti-BoNT/A em soro humano comercial diluído em razão 1:200. A recuperação por fortificação foi calculada conforme a Equação 11,

$$\text{Recuperação por fortificação (\%)} = \frac{C_{\text{medida}} - C_{\text{matriz}}}{C_{\text{nominal}}} \times 100 \quad (11)$$

Onde C_{medida} corresponde à concentração obtida após a adição do analito ao soro; C_{matriz} corresponde à concentração aparente do soro sem adição do analito (sinal basal) e C_{nominal} corresponde à concentração teórica do analito adicionada. Os parâmetros obtidos estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros de recuperação em soro humano.

Soro 1:200 + anti-BoNT/A 2,0 ng·mL ⁻¹	
C medida (ng·mL⁻¹)	1,91 ± 1,37
RDS (%)	95,45
Viés (%)	-4,55
Recuperação por fortificação (%)	96,50

Fonte: A autora (2026).

Embora os valores médios de recuperação (95,45%) e viés (- 4,55%) estejam em estrita conformidade com os critérios de aceitação da *FDA* (UNITED STATES, 2018), observa-se um elevado desvio padrão ($\pm 1,37$). Esse resultado sugere que, embora o biossensor seja capaz de detectar o analito no soro, a precisão (reprodutibilidade) do sinal é afetada pela complexidade da matriz. Essa variabilidade pode ser atribuída ao fenômeno de adsorção inespecífica de proteínas endógenas do soro sobre a interface sensora. Esse comportamento ressalta a necessidade de novos ensaios para a padronização e aumento da precisão do imunossensor em matrizes biológicas.

5.7.3 Seletividade em Matriz Complexa e Reatividade Cruzada

Para testar a seletividade do imunossensor em um cenário de interferência clínica, utilizou-se soro humano comercial contendo os anticorpos anti-Dengue em uma diluição em razão 1:100, conforme indicado pelo fabricante (Tabela 9).

Tabela 9 - Estudo de seletividade e interferência em matriz de soro (1:100).

Condição da Amostra	C Medida (ng·mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Recuperação por fortificação (%)
Soro + Anti-Dengue	0,56 ± 0,26	-	-
Soro + Anti-Dengue + anti-BoNT/A (2,0 ng·mL ⁻¹)	1,31 ± 0,16	56,54	28,75

Fonte: A autora (2026).

Nesta etapa, observou-se uma interferência significativa, uma vez que a presença isolada de Anti-Dengue no soro 1:100 gerou um sinal equivalente a $0,56 \pm 0,26$ ng·mL⁻¹. Este valor é superior ao limite de quantificação ($0,1953$ ng·mL⁻¹), indicando uma reatividade cruzada na matriz complexa ou adsorção inespecífica elevada nessa diluição.

No ensaio competitivo (contendo o interferente e o analito a $2,0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) a recuperação diminuiu drasticamente para 56,54%, com uma recuperação por fortificação de apenas 28,75%. Estes valores divergem dos critérios de aceitação regulatórios, que preconizam recuperações entre 80-120% (UNITED STATES, 2018).

Essa queda no desempenho analítico em amostras de soro menos diluídas sugere que as imunoglobulinas anti-dengue, ou outras proteínas da matriz, podem estar ocupando fisicamente os sítios ativos ou passivando a superfície das AuNPs-SiAmPy através de interações inespecíficas.

Como conclusão desta etapa, evidencia-se que, embora o imunossensor seja altamente promissor em meios controlados, a aplicação em diagnósticos clínicos reais demandará o aprimoramento das estratégias de bloqueio superficial ou a implementação de etapas de pré-tratamento da amostra para garantir a fidedignidade dos resultados em matrizes complexas.

5.8 VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL POR ELISA

A fim de validar o desempenho do imunossensor desenvolvido, realizou-se um ensaio imunoenzimático (ELISA) convencional para a detecção de anticorpos IgG anti-BoNT/A. Os resultados, apresentados na Tabela 10, demonstraram uma relação entre a concentração de anticorpos anti-BoNT/A e a absorbância medida a 450nm.

Os resultados obtidos foram inicialmente submetidos aos critérios de validação interna para garantir a fidedignidade dos dados. Conforme a Tabela 14, os valores de absorbância do branco do substrato (0,0790) e do controle negativo (0,0755) mantiveram-se dentro dos limites de aceitabilidade ($< 0,100$ e $< 0,200$, respectivamente). O valor de *cut-off* foi estabelecido em 0,1130, servindo como parâmetro para o cálculo das Unidades Padrão (SU, *Standard Units*). A classificação das amostras seguiu o protocolo de interpretação por SU, no qual valores abaixo de 9 foram considerados negativos, entre 9 e 11 como inconclusivos e acima de 11 como positivos.

Tabela 10 - Valores médios de absorbância e seus respectivos valores de unidades padrões (SU) obtidos no ensaio de ELISA.

Amostras	Absorbância (450 nm) $\pm$ SD	Unidades Padrão SU
Cut- Off	0,1130 $\pm$ 0,0085	10 SU
Branco	0,0790 $\pm$ 0,0057	6,9912
Controle negativo (C-)	0,0755 $\pm$ 0,0007	6,6814
Controle positivo (C+)	0,2175 $\pm$ 0,0516	19,2478
Anti- BoTN/A		
0,1 ng·mL⁻¹	0,0733 $\pm$ 0,0035	6,4897
0,3 ng·mL⁻¹	0,1093 $\pm$ 0,0399	9,6755
0,5 ng·mL⁻¹	0,0833 $\pm$ 0,0038	7,3746
0,8 ng·mL⁻¹	0,0973 $\pm$ 0,0156	8,6136
3,0 ng·mL⁻¹	0,0743 $\pm$ 0,0118	6,5782
5,0 ng·mL⁻¹	0,1290 $\pm$ 0,0350	11,4159
8,0 ng·mL⁻¹	0,0950 $\pm$ 0,0173	8,4071
10,0 ng·mL⁻¹	0,1150 $\pm$ 0,0085	10,1770
12,0 ng·mL⁻¹	0,1070 $\pm$ 0,0207	9,4690
DENV-IgG	0,8165 $\pm$ 0,04	16,65
<i>T. cruzi</i>	0,6397 $\pm$ 0,15	13,04

Fonte: A autora (2026).

Dentre as concentrações testadas, observou-se que a maioria das amostras se situou entre resultados negativos ou inconclusivos. A concentração de 5 ng·mL⁻¹ foi a única a apresentar resultado positivo (11,42 SU). No entanto, a análise do perfil de dose-resposta revelou uma ausência de linearidade. Notavelmente, concentrações inferiores (como 0,3 ng·mL⁻¹) apresentaram sinais de absorbância superiores a concentrações dez vezes maiores (3,0 ng·mL⁻¹), sugerindo flutuações experimentais ou interferências na captura do analito.

A vulnerabilidade do ensaio ELISA convencional frente a interferentes biológicos foi evidenciada pelas amostras de soro para Dengue (16,65 SU) e *T. cruzi* (13,04 SU), em que apresentaram sinais na zona positiva. Esse resultado indica reatividade cruzada, evidenciando uma limitação na especificidade do ensaio ELISA convencional a interferentes biológicos.

A presença de múltiplas amostras na zona inconclusiva (0,3; 10,0 e 12,0 ng·mL⁻¹) reforça a necessidade de otimização dos protocolos de bloqueio e lavagem no método enzimático. De acordo com os critérios estabelecidos, resultados persistentes na zona cinzenta devem ser reportados como negativos, o que sugere que o limite de detecção do ELISA convencional encontra-se significativamente

acima daquele obtido pelo imunossensor eletroquímico desenvolvido neste trabalho.

5.8.1 Comparação: Imunossensor Eletroquímico vs. ELISA

Ao comparar o desempenho do imunossensor eletroquímico desenvolvido com o método ELISA, evidenciam-se vantagens significativas da plataforma ox-ECV/AuNPs-SiAmPy:

- **Sensibilidade Analítica:** O imunossensor apresentou um limite de detecção de $0,0644 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, sendo 77,63 vezes mais sensível que o obtido pelo método ELISA ($5,0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$).
- **Especificidade e Seletividade:** Enquanto o ELISA apresentou reatividade cruzada com DENV-IgG e *T. cruzi*, o imunossensor demonstrou reatividade praticamente nula no estudo de especificidade (item 5.6), indicando que a arquitetura nanométrica da plataforma eletroquímica favorece uma interação mais seletiva.
- **Eficiência operacional:** O tempo de incubação da amostra no imunossensor é de apenas 30 minutos, representando uma redução de 75% em relação aos 120 minutos exigidos pelo protocolo de ELISA. Adicionalmente, a detecção eletroquímica dispensa o uso de substratos cromogênicos e múltiplas etapas de lavagem, reduzindo o custo por análise e a complexidade operacional.

Esses resultados confirmam que a estratégia de modificação do eletrodo com nanopartículas de ouro estabilizadas em silsesquioxano não apenas mimetiza a eficiência dos ensaios biológicos tradicionais, mas os supera em parâmetros analíticos fundamentais para o diagnóstico rápido e preciso.

5.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE E TEMPO DE ARMAZENAMENTO

A estabilidade temporal de um imunossensor é um parâmetro crítico que determina sua viabilidade comercial e aplicabilidade na prática. Para avaliar o tempo de vida útil da plataforma desenvolvida, os dispositivos foram armazenados

recobertos em tampão PBS ($0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4) sob refrigeração constante (4°C) e ausência de luz, sendo testados em intervalos de 0, 6, 12 e 30 dias com alíquotas de anticorpo Anti-BoNT/A de $1,0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, conforme presente na Tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros de estabilidade do imunossensor ao longo de 12 dias de armazenamento.

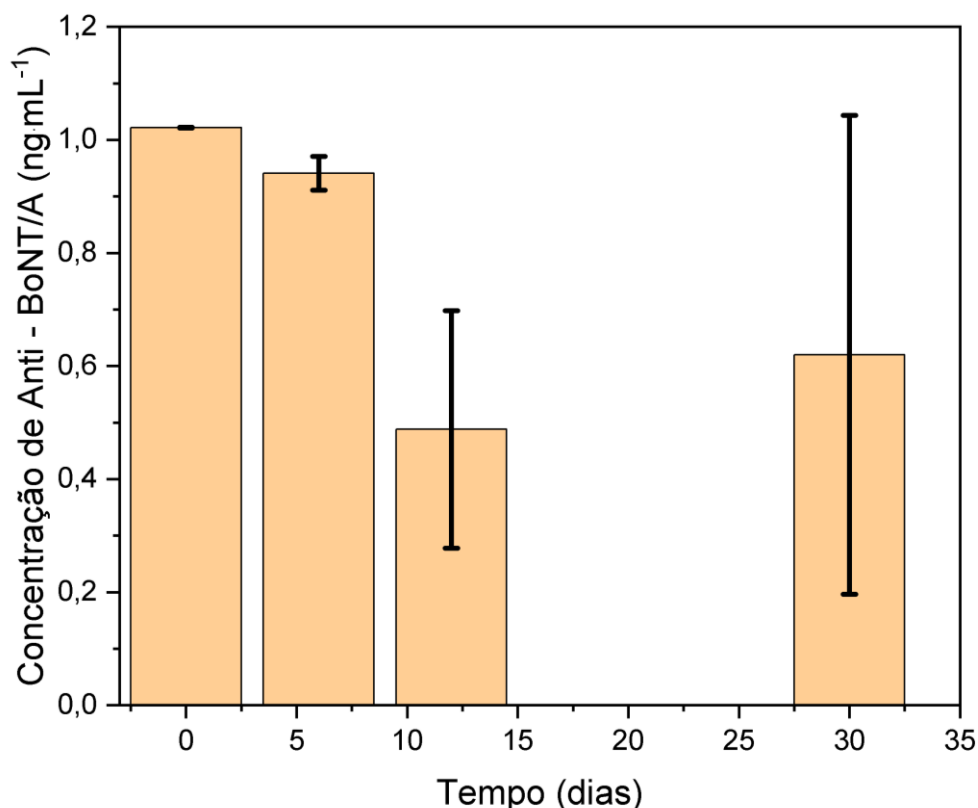
Dia	ΔR_{ct} (%)	Desvio Padrão	Variação em relação ao Dia 0 (%)
0	60,59	0,04	-
6	55,28	1,72	8,77
12	38,50	10,21	36,45
30	41,24	21,43	31,93

Fonte: A autora (2026).

No dia inicial (dia 0), o biossensor apresentou uma resposta de ΔR_{ct} equivalente a $60,59\% \pm 0,04$, correspondente a concentração medida de $1,02 \pm 0,001 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após seis dias de armazenamento, observou-se uma leve redução no sinal analítico, com ΔR_{ct} obtido foi de $55,28\% \pm 1,72$, com uma concentração mensurada de $0,94 \pm 0,02 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Essa variação do sinal analítico de 8,77% em relação ao valor inicial é considerada aceitável, situando-se abaixo do limite de tolerância de 20% estabelecido pelas diretrizes da FDA (UNITED STATES, 2018). Este resultado indica que a arquitetura nanométrica baseada em AuNPs-SiAmPy é capaz de preservar a conformidade e a atividade biológica da toxina botulínica imobilizada por pelo menos uma semana sob refrigeração.

Entretanto, após 12 dias de armazenamento, constatou-se um decréscimo acentuado na capacidade de detecção, com sinal de ΔR_{ct} caindo para $38,50\% \pm 10,21$, com uma concentração aparente de $0,49 \pm 0,21 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Além da perda de sensibilidade (variação de 36,45% em relação ao dia 0 em relação ao ΔR_{ct}), observou-se um aumento no desvio padrão, o que evidencia a perda de reprodutibilidade do sistema. Após 30 dias de armazenamento houve um aumento na variabilidade da resposta do sensor, com o ΔR_{ct} de $41,24 \pm 21,43$ e uma concentração estimada de $0,62 \pm 0,42 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. A Figura 17 apresenta o comportamento citado.

Figura 17 - Valores médios de concentração de anti-BoNT/A obtidas durante triplicata do ensaio de detecção de anti-BoNT/A em diferentes dias.



Fonte: A autora (2026).

A instabilidade observada após o sexto dia pode ser atribuída a um processo de degradação estrutural e alterações físico-químicas na interface eletródica. A desnaturação gradual das biomoléculas (BoNT/A e BSA) resulta na perda de sua conformação nativa e, conseqüentemente, na redução de acessibilidade dos epítomos de reconhecimento (Norde, 1986; Roach; Farrar; Perry, 2005). Além da degradação biológica, alterações na camada de hidratação da interface eletródica desempenham um papel crítico. O armazenamento prolongado em meio aquoso (PBS) pode levar a reorganização das moléculas de água e íons na Dupla Camada Elétrica. Essa flutuação na camada de solvatação altera a permeabilidade da interface com a sonda redox, resultando em variações na cinética de transferência de elétrons (Bard; Faulkner; White, 2001).

Para a armazenagem do biossensor a partir desse período, recomenda-se ponderar mais critérios de armazenamento, como a variação da umidade e maior controle da temperatura. Conseqüentemente, para garantir a confiabilidade dos diagnósticos, recomenda-se que o uso do biossensor ocorra em até 6 dias após as

suas preparações, ou que nos protocolos de preservação, como controle de umidade, ou uso de inibidores de proteases sejam explorados no futuro.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo desenvolveu e validou um imunossensor eletroquímico inédito voltado para a detecção quantitativa dos anticorpos anti-toxina botulínica do sorotipo A (anti-BoTN/A). A pesquisa preenche uma lacuna tecnológica significativa, visto que, até então, a literatura não apresenta descrito biossensores projetados para o monitoramento da resposta imune à BoTN/A

Os principais marcos desta investigação incluem:

- 1) **Plataforma de detecção inovadora:** A utilização do nanohíbrido composto por nanopartículas de ouro estabilizadas por silsesquioxano (AuNPs-SiAmPy) sobre eletrodos de carbono vítreo oxidados foi fundamental para o desempenho do dispositivo. Essa modificação promoveu um aumento na área superficial efetiva e melhorou a cinética de transferência de elétrons, resultando em uma plataforma altamente condutiva e estável para a imobilização do biorreceptor.
- 2) **Alta Especificidade e Seletividade:** Os ensaios de reatividade cruzada confirmaram a especificidade do elemento de biorreconhecimento (BoNT/A imobilizada). Quando incubado com anticorpos não específicos (como anti-PPT1), o imunossensor apresentou respostas estatisticamente equivalentes ao branco do sistema, com uma reatividade cruzada calculada de 0,00%. Isso demonstra que o sítio de ligação não possui afinidade por anticorpos não específicos, garantindo que o sinal registrado seja exclusivo da interação com o anti-BoNT/A
- 3) **Performance Analítica Superior:** O imunossensor operou via Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), apresentando uma faixa linear de detecção de 0,1 a 1,0 ng·mL⁻¹. Os limites de detecção (0,0644 ng·mL⁻¹) e quantificação (0,1953 ng·mL⁻¹) demonstraram uma sensibilidade robusta, adequada para a identificação precoce de anticorpos evitando à falha terapêutica secundária.

- 4) **Viabilidade em Matrizes Complexas:** O dispositivo foi capaz de detectar o analito em amostras de soro humano, com a diluição de 1:200 mostrando-se eficaz para mitigar interferências inespecíficas e ruídos de fundo da matriz biológica
- 5) **Robustez e Estabilidade:** Os ensaios de precisão confirmaram a repetibilidade e reprodutibilidade satisfatórias do método. Além disso, o biossensor manteve sua estabilidade operacional por pelo menos 6 dias quando armazenado adequadamente, o que favorece sua aplicação prática
- 6) **Superioridade frente ao Método Convencional:** Na comparação experimental, o imunossensor demonstrou ser uma alternativa mais sensível e estável que o ensaio ELISA convencional, o qual apresentou vulnerabilidades a interferentes biológicos e menor linearidade nas concentrações testadas

Em suma, o imunossensor proposto configura-se como uma ferramenta diagnóstica promissora, com baixo custo operacional e potencial para miniaturização em sistemas *point-of-care*. Esta tecnologia representa um avanço importante para a prática clínica, permitindo um monitoramento ágil e preciso de pacientes em tratamento crônico com toxina botulínica, garantindo maior segurança e eficácia aos procedimentos terapêuticos e estéticos.

REFERÊNCIAS

- ALEX, Saji; TIWARI, Ashutosh. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications: a review. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 3, p. 1869-1894, 1 mar. 2015.
- ARSALANI, Nasser et al. Synthesis of polyhedral oligomeric silsesquioxane nano-crosslinked poly(ethylene glycol)-based hybrid hydrogels for drug delivery and antibacterial activity. **Polymer International**, v. 68, n. 4, p. 667-674, 30 abr. 2019.
- BANEY, Ronald H. et al. Silsesquioxanes. **Chemical Reviews**, v. 95, n. 5, p. 1409-1430, 1 jul. 1995.
- BARANOWSKA, Alicja et al. Botulinum toxin type A in scar treatment: Review article. **Medical Science**, v. 28, n. 151, p. 1-11, 30 set. 2024.
- BARD, Allen J.; FAULKNER, Larry R.; WHITE, Henry S. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- BARTCZAK, Dorota; KANARAS, Antonios G. Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling. **Langmuir**, v. 27, n. 16, p. 10119-10123, 16 ago. 2011.
- BRAZACA, Laís Canniatti et al. Electrochemical immunosensors using electrodeposited gold nanostructures for detecting the S proteins from SARS-CoV and SARS-CoV-2. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 18, p. 5507-5517, 15 jul. 2022.
- CACUA, Karen et al. Surfactant concentration and pH effects on the zeta potential values of alumina nanofluids to inspect stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 583, p. 123960, dez. 2019.
- CALAÇA, Giselle Nathaly et al. Layer-by-Layer AuNPs-SiPy+/Prussian blue nanoparticles modified electrodes: characterization and electrocatalytic effects. **Electrochimica Acta**, v. 249, p. 104-112, set. 2017.
- CARR, Warner W.; JAIN, Neal; SUBLETT, J. Wesley. Immunogenicity of Botulinum Toxin Formulations: Potential Therapeutic Implications. **Advances in Therapy**, v. 38, n. 10, p. 5046-5064, 1 out. 2021.
- CHEN, Mingjiao et al. Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane-Incorporated Gelatin Hydrogel Promotes Angiogenesis during Vascularized Bone Regeneration. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 20, p. 22410-22425, 20 maio 2020.
- CHIKKAVEERAI AH, Bhaskara V. et al. Electrochemical Immunosenors for Detection of Cancer Protein Biomarkers. **ACS Nano**, v. 6, n. 8, p. 6546-6561, 28 ago. 2012.

CONROY, Paul J. et al. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 10-26, fev. 2009.

CROCOMO, Paola Zimmermann et al. Silver Nanoparticles-Silsesquioxane Nanomaterial Applied to the Determination of 4-Nitrophenol as a Biomarker. **Electroanalysis**, v. 31, n. 12, p. 2319-2329, 25 dez. 2019.

DE OLIVEIRA, Rafaela D. et al. Preparation, characterization and electrochemistry of Layer-by-Layer films of silver nanoparticles and silsesquioxane polymer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 509, p. 638-647, nov. 2016.

DRESSLER, Dirk et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of botulinum toxin-antibodies. **Movement Disorders**, v. 29, n. 10, p. 1322-1324, 1 set. 2014.

DYKMAN, Lev A.; GULIY, Olga I. Gold-based nanohybrid materials in biosensing. **Talanta**, v. 298, p. 128814, fev. 2026.

ECHEVERRI, Danilo; OROZCO, Jahir. Glycan-Based Electrochemical Biosensors: Promising Tools for the Detection of Infectious Diseases and Cancer Biomarkers. **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 8533, 3 dez. 2022.

EIVAZZADEH-KEIHAN, Reza et al. Recent progress in optical and electrochemical biosensors for sensing of Clostridium botulinum neurotoxin. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 103, p. 184-197, jun. 2018.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Committee for Medicinal Products for Human Use. **ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis Step 5**. Amsterdam: EMA, 2022. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-and-study-sample-analysis-scientific-guideline>. Acesso em: 15 jun. 2026.

FERRARI, Enrico. Gold Nanoparticle-Based Plasmonic Biosensors. **Biosensors**, v. 13, n. 3, p. 411, 22 mar. 2023.

FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179-186, ago. 2007.

FLOWERS, Paul A.; STRICKLAND, Jordan C. Easily Constructed Microscale Spectroelectrochemical Cell. **Spectroscopy Letters**, v. 43, n. 7-8, p. 528-533, 25 out. 2010.

GERENT, Giles G.; SPINELLI, Almir. Magnetite-platinum nanoparticles-modified glassy carbon electrode as electrochemical detector for nitrophenol isomers. **Journal of Hazardous Materials**, v. 330, p. 105-115, maio 2017.

GOULARTE, Rayane Bueno et al. Novel analytical sensing strategy using a palladium nanomaterial-based electrode for nimesulide electrochemical reduction. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 920, p. 116622, set. 2022.

KANEKO, Yoshiro. Ionic silsesquioxanes: Preparation, structure control, characterization, and applications. **Polymer**, v. 144, p. 205-224, maio 2018.

KHAN, Mudassar N. et al. ERR2 and ERR3 promote the development of gamma motor neuron functional properties required for proprioceptive movement control. **PLOS Biology**, v. 20, n. 12, p. e3001923, 21 dez. 2022.

KIM, Jayoung et al. Wearable biosensors for healthcare monitoring. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 389-406, 25 abr. 2019.

KUNTOJI, Giddaerappa et al. Macromolecule-Nanoparticle-Based Hybrid Materials for Biosensor Applications. **Biosensors**, v. 14, n. 6, p. 284, 1 jun. 2024.

KUWAHARA, Atsushi et al. Functional integration of protein A binding ability to antibody fragments for convenient and tag-free purification. **Bioengineered**, v. 14, n. 1, p. 2191434, 31 dez. 2023.

LEE, Kar Wai Alvin et al. Immunogenicity of Botulinum Toxin Type A in Different Clinical and Cosmetic Treatment, a Literature Review. **Life**, v. 14, n. 10, p. 1264, 1 out. 2024.

LI, Mantong et al. Recent Progress in Biosensors for Detection of Tumor Biomarkers. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7327, 28 out. 2022.

LIMA, Dhésmon et al. Label-free impedimetric immunosensor based on arginine-functionalized gold nanoparticles for detection of DHEAS, a biomarker of pediatric adrenocortical carcinoma. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 133, p. 86-93, 15 maio 2019.

LIMA, Dhésmon et al. Nanoconjugates based on a novel organic-inorganic hybrid silsesquioxane and gold nanoparticles as hemocompatible nanomaterials for promising biosensing applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 213, p. 112410, 1 maio 2022.

LIU, Guozhen et al. Covalent anchoring of multifunctionized gold nanoparticles on electrodes towards an electrochemical sensor for the detection of cadmium ions. **Analytical Methods**, v. 7, n. 13, p. 5619-5626, 7 jul. 2015.

LIU, Jinlin et al. A microfabricated thickness shear mode electroacoustic resonator for the label-free detection of cardiac troponin in serum. **Talanta**, v. 215, p. 120890, ago. 2020.

MARALDI, Vitor Alexandre; DO CARMO, Devaney Ribeiro. Prussian Blue nanoparticles supported on a hybrid platform of graphene oxide and cubic silsesquioxane applied to Diuron detection. **Materials Research Bulletin**, v. 167, p. 112426, nov. 2023.

MORADI, Nasrin et al. Polyester fabric-based nano copper-polyhedral oligomeric silsesquioxanes sorbent for thin film extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Analytica Chimica Acta**, v. 1270, p. 341461, ago. 2023.

MOSSANHA, Rosana et al. Construction of a biosensor based on SAM of thiolactic acid on gold nanoparticles stabilized by silsesquioxane polyelectrolyte for catechol determination. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 252, p. 747-756, nov. 2017.

NASROLLAHZADEH, Mahmoud et al. Types of Nanostructures. In: NASROLLAHZADEH, Mahmoud et al. **An Introduction to Green Nanotechnology**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 29-80.

NORDE, Willem. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 25, p. 267-340, 1986.

PIRAZZINI, Marco et al. Botulinum neurotoxins: Biology, pharmacology, and toxicology. **Pharmacological Reviews**, v. 69, n. 2, p. 200-235, 1 abr. 2017.

POHANKA, Miroslav. Immunosensors for Assay of Toxic Biological Warfare Agents. **Biosensors**, v. 13, n. 3, p. 341, 1 mar. 2023.

POLAT, Emre Ozan et al. Transducer Technologies for Biosensors and Their Wearable Applications. **Biosensors**, v. 12, n. 6, p. 385, 2 jun. 2022.

PUTZBACH, William; RONKAINEN, Niina. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. **Sensors**, v. 13, n. 4, p. 4811-4840, 11 abr. 2013.

RAHMAN, Eqram; CARRUTHERS, Jean D. A. Immunogenicity of Botulinum Toxin A: Insights. **Dermatologic Surgery**, v. 50, n. 9, p. 811-817, 1 set. 2024.

ROACH, Paul; FARRAR, David; PERRY, Carole C. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 22, p. 8168-8173, 1 jun. 2005.

ROSSETTO, Ornella; PIRAZZINI, Marco; MONTECUCCO, Cesare. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 535-549, 30 ago. 2014.

SADIQUE, Mohd Abubakar et al. Highly Sensitive Electrochemical Immunosensor Platforms for Dual Detection of SARS-CoV-2 Antigen and Antibody based on Gold Nanoparticle Functionalized Graphene Oxide Nanocomposites. **ACS Applied Bio Materials**, v. 5, n. 5, p. 2421-2430, 16 maio 2022.

SAHA, Krishnendu et al. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 5, p. 2739-2779, 9 maio 2012.

SAINI, Arzoo et al. An overview of biosensor advancements for detecting botulinum neurotoxins: Addressing food safety and biowarfare risks. **Analytical Biochemistry**, v. 701, p. 115801, jun. 2025.

STEINMETZ, Marines et al. A sensitive label-free impedimetric DNA biosensor based on silsesquioxane-functionalized gold nanoparticles for Zika Virus detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 141, p. 111439, 15 set. 2019.

SWARTZ, Michael E.; KRULL, Ira S. **Handbook of Analytical Validation**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2021.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics**: contains nonbinding recommendations. Silver Spring: FDA, 2018. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Acesso em: 15 jun. 2026.

WEE, Syeo Young; PARK, Eun Soo. Immunogenicity of botulinum toxin. **Archives of Plastic Surgery**, v. 49, n. 1, p. 5-14, 1 jan. 2022.

WINIARSKI, João Paulo et al. Electrochemical reduction of sulfite based on gold nanoparticles/silsesquioxane-modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 251, p. 522-531, out. 2017.

YADAV, Neelam et al. Development of an ultrasensitive electrochemical aptasensor based on aptamer/rGO/SPGE for the detection of Botulinum neurotoxin A (BoTN/A) in food samples. **Microchemical Journal**, v. 207, p. 111916, dez. 2024.

ZAHREBELNEI, Felipe et al. Silsesquioxanes as Promising Materials for the Development of Electrochemical (Bio)Sensors. **Chemosensors**, v. 12, n. 12, p. 268, 1 dez. 2024.

ZAPP, Eduardo et al. Liquid crystal and gold nanoparticles applied to electrochemical immunosensor for cardiac biomarker. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 59, p. 127-133, set. 2014.