



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

LÉONY SOARES DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS GENOSENSORES
NANOESTRUTURADOS COM POLÍMEROS CONDUTORES
E *QUANTUM DOTS* PARA DETECÇÃO DE ONCOGENES DE
INTERESSE NA LEUCEMIA INFANTIL**

Recife
2022

LÉONY SOARES DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS GENOSENSORES
NANOESTRUTURADOS COM POLÍMEROS CONDUTORES E *QUANTUM DOTS*
PARA DETECÇÃO DE ONCOGENES DE INTERESSE NA LEUCEMIA INFANTIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, como trabalho de conclusão de pós-graduação para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Orientador: Prof^a. Dra. Maria Danielly de Oliveira.

Coorientador: Prof^o César Augusto Souza de Andrade.

Recife
2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Oliveira, Léony Soares de.

Desenvolvimento de protótipos genossensores nanoestruturados com polímeros condutores e *quantum dots* para detecção de oncogenes de interesse na leucemia infantil. / Léony Soares de Oliveira. – 2022.

153 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Maria Danielly de Oliveira.

Coorientador: César Augusto Souza de Andrade.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Genossensor - leucemia. 2. Eletroquímica - polipirrol . 3. Pontos quânticos de grafeno.
Oliveira, MARIA DAnielly de. (orient.). II. Andrade, César Augusto Souza de. (coorient.).
III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-013

LÉONY SOARES DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS GENOSENSORES
NANOESTRUTURADOS COM POLÍMEROS CONDUTORES E *QUANTUM DOTS*
PARA DETECÇÃO DE ONCOGENES DE INTERESSE NA LEUCEMIA INFANTIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, como trabalho de conclusão de pós-graduação para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Aprovada em: 26 / 09 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira (Orientadora).

UFPE/ Departamento de Bioquímica

Prof. Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade (Examinador Interno).

UFPE/ Departamento de Bioquímica

Prof^a. Dr^a. Norma Lucena Cavalcanti Licinio (Examinador Externo).

FIOCRUZ- Instituto Aggeu

Dedico a todos que em meio a grandes objetivos pensaram em desistir mas persistiram. Também aos primeiros entusiastas e apoiadores dos meus sonhos, minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço e engrandeço a Deus por tanto cuidado, direcionamento e amor em cada detalhe. Nos momentos mais difíceis Ele me sustentou e me deu forças para continuar, sem Ele nada disso seria possível. Vejo Ele em tudo a minha volta e em cada realização. Por seu infinito cuidado, graça e amor à Ele seja toda honra, glória e louvor para sempre amém.

Aos meus pais José Leandro e Mercia Soares por serem os primeiros apoiadores dos meus sonhos. Agradeço por toda fé, paciência, dedicação, incentivo e ensinamentos sem precedentes depositados em mim. Obrigada por me alegrarem e serem os primeiros a acreditar que tudo é possível. Também a minha irmã, companheira e melhor amiga da vida Leonara Soares que sempre me motivou, inspirou e ajudou. Sou eternamente grata a Deus por me proporcionar uma família tão maravilhosa e única.

Agradeço à minha orientadora a Prof^a. Dr^a. Maria Danielly pela confiança, compreensão, ensinamentos e direcionamento. Sou imensamente grata por tanto esforço, dedicação e participação desde do início da minha jornada acadêmica. Sendo um farol de inspiração como pesquisadora e mulher na ciência.

Ao meu coorientador Prof. Dr. César Andrade pela confiança e colaboração na participação de projetos de pesquisas no laboratório Biodispositivos Nanoestruturados. Sou grata por todas considerações e conselhos que me ajudaram a aprimorar os trabalhos de pesquisa desenvolvidos.

À Prof^a. Dr^a. Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva do Laboratório de Imunogenética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz pela confiança e colaboração no desenvolvimento desta pesquisa. Por todas as conversas e explicações que serviram para o nivelamento e aprimoramento da pesquisa desenvolvida.

À Prof^a. Dr^a. Karen Yasmin que teve grande participação na minha jornada acadêmica por tantos conselhos e conversas com grande entusiasmo e paciência na docência. Sendo hoje uma inspiração profissional, pessoal e grande amiga.

A todos componentes do laboratório Biodispositivos Nanoestruturados, por cada momento de troca de conhecimento no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação Terapêutica (PPGIT-UFPE) e Departamento de Bioquímica/UFPE pela estrutura, funcionamento e aos seus funcionários pelo

atendimento necessário.

Por fim agradeço as instituições de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

“ Grandes coisas fez o SENHOR por nós, e, por isso, estamos alegres.”
(Salmos 126.3)

RESUMO

As leucemias são neoplasias hematológicas que constituem um grupo heterogêneo de doenças que afetam os progenitores hematopoiéticos. A determinação da alteração genética associada a leucemia é de extrema importância para o prognóstico dos pacientes. Neste contexto, a população infanto-juvenil merece considerável atenção pois nessa faixa etária a leucemia é o tipo de câncer mais recorrente e com elevada taxa de mortalidade. Para investigação desses oncomarcadores são utilizadas técnicas da biologia molecular como FISH, RT-PCR e sua variante RTq-PCR. Essas técnicas são eficientes no rastreio, no entanto, ainda apresentam protocolos extensos, complexos e de alto custo. Diante disso, os genossensores se destacam por serem biodispositivos que realizam quantificação de variantes genéticas de forma confiável, rápida e de baixo custo. Em adição, materiais como polímeros condutores e nanomateriais semicondutores são utilizados na estruturação de biossensores eletroquímicos garantindo o melhoramento de sua performance bioanalítica. Assim, dentre os polímeros condutores o polipirrol (PPy) e a polianilina (PANI) são amplamente utilizados na construção de sensores por proporcionar um filme com elevação das propriedades eletrocatalíticas da superfície além de fornecerem grupos funcionais para imobilização de biomoléculas e nanomateriais. Os pontos quânticos de grafeno (GQDs) são nanomateriais semicondutores que fornecem grupos funcionais que permitem automontagem de biomoléculas com elevada bioafinidade sobre a superfície de sensores. Diante disso, o presente estudo traz o desenvolvimento de protótipos genossensores nanoestruturados com polímeros condutores e pontos quânticos de grafeno para detecção de oncogenes de interesse na leucemia infantil. Duas categorias de nanodispositivos foram desenvolvidos um em formato de eletrodo de trabalho e outro contendo os três eletrodos de ouro sendo um eletrodo de trabalho, um referência e um auxiliar. Ambos dispositivos foram confeccionados em superfície de ITO flexível por meio de uma impressora de corte automatizado. PPy, PANI e GQDs foram utilizados para a nanoestruturação e imobilização de sequências de fita simples de DNA (ssDNA) sobre a superfície dos biossensores desenvolvidos. Os nanodispositivos desenvolvidos foram voltados a detecção das translocações 1;19, 4;11, 12;21, 15;17 e 17;19. Todas as etapas de construção e ensaios de bioatividade dos dispositivos bioanalíticos foram caracterizadas por voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (DPV), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e microscopia de força atômica (AFM). Com a construção da plataforma sensora se constatou alterações morfológicas e no pico máximo de altura das imagens de AFM para cada camada. Ao avaliar a performance analítica dos genossensores frente a amostras plasmídeais e de pacientes com leucemia, alterações eletroquímicas características de biorreconhecimento foram detectadas com diminuição das correntes de picos voltamétricos e elevação da resistência a transferência de carga (R_{ct}) do sistema. Por meio da extração dos valores de $\Delta I\%$ dos ensaios de VC foi avaliada a linearidade de resposta de cada sistema genossensor em tira flexível para cada translocação resultando em um R^2 de 0,97 para a t(1;19), 0,99 para t(4;11), 0,98 para t(15;17)APLB, 0,99 para t(15;17)M7 e 0,98 para t(17;19). Na avaliação de especificidade dos biossensores de DNA não foram detectadas alterações de biorreconhecimento. Desta forma, os nanodispositivos desenvolvidos apresentam sensibilidade analítica por meio do LOD 0,214 pM para ssDNA t(15;17)APLB e 0,677pM para ssDNA t(15;17)M7 com tempo de detecção de apenas 15 minutos. Diante disso, os genossensores produzidos

possuem características promissoras para o diagnóstico de oncogenes de interesse na leucemia infantil.

Palavras-chave: Genossensor; leucemia; eletroquímica; polipirrol; pontos quânticos de grafeno.

ABSTRACT

Leukemias are hematologic malignancies that constitute a heterogeneous group of diseases that affect hematopoietic progenitors. Determining the genetic alteration associated with leukemia is extremely important for the prognosis of patients. In this context, the juvenile population deserves considerable attention because in this age group, leukemia is the recurrent type of cancer with a high mortality rate. Molecular biology techniques such as FISH, RT-PCR and its variant RTq-PCR are used to investigate these oncomarkers. These techniques are efficient in screening, however, they still have extensive, complex and costly protocols. In view of this, genosensors stand out for being biodevices that perform quantification of genetic variants reliably, quickly and at low cost. In addition, materials such as conductive polymers and semiconductor nanomaterials are used in the structuring of electrochemical biosensors, ensuring the improvement of their bioanalytical performance. Thus, among the conductive polymers, polypyrrole (PPy) and polyaniline (PANI) are widely used in the construction of sensors for providing a film that allows elevation of the electrocatalytic properties of the surface. In addition, these polymers provide functional groups for the immobilization of biomolecules and nanomaterials. Graphene quantum dots (GQDs) are semiconductor nanomaterials that provide functional groups that allow self-assembly of biomolecules with high bioaffinity on the surface of sensors. In this view, the present study brings the development of nanostructured genosensor prototypes with conductive polymers and quantum dots for the detection of oncogenes of interest in childhood leukemia. Two categories of nanodevices were developed one in working electrode format and the other with three gold electrodes a working, reference and auxiliary electrode. Both devices were made on a flexible ITO surface using an automated cutting printer. PPy, PANI and GQDs formed the nanostructuring for immobilization of single-stranded DNA sequences (ssDNA) on the surface of the developed biosensors. The developed nanodevices were aimed at detecting translocations 1;19, 4;11; 12;21, 15;17 and 17;19. All stages of construction and bioactivity tests of the bioanalytical devices were characterized by cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and atomic force microscopy (AFM). With the construction of the sensor platform, there were morphological changes and changes in the maximum peak height of the AFM images for each layer. When evaluating the analytical performance of two categories of genosensors against plasmid samples and from patients with leukemia were detected electrochemical alterations characteristic of biorecognition with a decrease in currents of voltammetric peaks and an increase in the resistance to charge transfer (R_{CT}) of the system. By extracting the $\Delta I\%$ values from the CV assays, the response linearity of each flexible strip genosensor system was evaluated for each translocation, resulting in an R^2 of 0.97 for t(1;19), 0.99 for t(4;11), 0.98 for t(15;17)APLB, 0.99 for t(15;17)M7 and 0.98 for t(17;19). In the specificity evaluation of the DNA biosensors, there were no biorecognition changes. Thus, the developed nanodevices present analytical sensitivity through LOD 0.214 pM for ssDNA t(15;17)APLB and 0.677pM for ssDNA t(15;17)M7 with a detection time of only 15 minutes. Therefore, the produced genosensors have promising characteristics for the diagnosis of oncogenes of interest in childhood leukemia.

Keywords: Genosensor; leukemia; electrochemistry; polypyrrole; graphene quantum dots.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hematoscopia com observação de alterações hematológicas em pacientes diagnosticados com (a) leucemia linfóide aguda, (b) leucemia mieloide aguda, (c) leucemia linfóide crônica e (d) leucemia mieloide crônica.....	27
Figura 2. Detecção por FISH da t(12;21) presente na LLA onde a sonda verde corresponde ao gene ETV6 (cromossomo 21) e a sonda vermelha corresponde a presença do gene RUNX1 (cromossomo 12).....	29
Figura 3. Ensaio RTq-PCR aplicado a detecção da doença residual mínima em paciente LLA-B.....	30
Figura 4. Representação esquemática dos componentes de um biossensor.....	32
Figura 5. Processo de hibridização <i>label-free</i>	38
Figura 6. Detecção da hibridização por meio de agentes eletroativos.....	38
Figura 7. Processo de dopagem e desdopagem do polímero condutor polipirrol e seus estados: (a) neutro (b) polaron e (c) bipolaron.....	42
Figura 8. Estrutura de alguns polímeros condutores comumente utilizados em biossensores.....	43
Figura 9. Estados de oxidação da polianilina em formas dopadas e desdopada	45
Figura 10. Processo de síntese <i>top-down</i> dos pontos quânticos de grafeno a partir de nanopartícula de grafite.....	48
Figura 11. Processo de síntese <i>bottom-up</i> dos pontos quânticos de grafeno a partir de eletropolimerização da orto-fenilenodiamina.....	48
Figura 12. Modelo de célula eletroquímica e protótipo com conjunto de eletrodo trabalho (WE), eletrodo de referência (RE) e contra eletrodo (CE) e sistema de captação e processamento de sinal.....	50
Figura 13. Voltamograma cíclico resultante, correntes de pico anódicas e catódicas I_{pa} e I_{pc} respectivamente no potencial anódico (E_{pa}) e potencial catódico (E_{pc})	51
Figura 14. Diagrama de Nyquist onde Z' - componente real e $-Z''$ - componente imaginária.....	54
Figura 15. Circuito elétrico de Randles e elementos do circuito: resistência da solução (RS), resistência à transferência de carga (RCT), frequência angular (ω) e	

capacitância da dupla camada elétrica (Cdl).....	55
Figura 16. Esquema dos componentes básicos do microscópio de força atômica.....	57
Figura 17. Sonda cantilever e modo de operação de contato (a), não contato (b) e contato intermitente (c).....	58
Figura 18. Processo de confecção dos substratos utilizados para construção dos genossensores.....	63
Figura 19. Descrição das etapas de montagem do genossensor flexível e protótipo genossensível.....	65
Figura 20. Formas de obtenção do sinal eletroquímico do genossensor em tira (a) e do protótipo genossensor (b).....	66
Figura 21. Voltamogramas cíclicos referentes a polimerização eletroquímica do PPy.....	68
Figura 22. Voltamogramas cíclicos referentes a polimerização eletroquímica do PANI.....	69
Figura 23. Estudo de variação de potencial de eletropolimerização do filme de PANI, (a) -0,4V – 1,5V, (b) -0,2 – 1,0V e (c) -0,8 – 1,0V.....	70
Figura 24. Estudo voltamétrico comparativo entre o PPy e PANI (a) e respectivas correntes de pico (b).....	71
Figura 25. Caracterização eletroquímica das etapas de construção e teste de detecção do genossensor em tira (a) ITO-PANI-GQD-EDC/NHS-ssDNA t(15;17) e (b) ITO-PPy-GQD-EDC/NHS-ssDNA t(15;17)	73
Figura 26. Caracterização topográfica das etapas de montagem e ensaios de biorreconhecimento do genossensor M7: (a) PPy, (b) PPy-GQD, (c) PPy-GQD-ssDNA t(15;17)-BSA, (d) Genossensor t(15;17) – amostra plasmideal, (e) Genossensor t(15;17) – amostra clínica e (f) Genossensor t(15;17) – controle negativo.....	74
Figura 27. Voltamogramas cíclicos das etapas de construção dos Genossensores em tira t(1;19) (a), t(4;11) (b), t(15;17)M7 (c), t(15;17)APLB (d) e t(17;19) (e).....	76
Figura 28. Espectros de Impedância das etapas de construção dos Genossensores em tira t(1;19) (a), t(4;11) (b), t(15;17)M7 (c), t(15;17)APLB (d) e t(17;19) (e).....	77

Figura 29. Caracterização voltamétrica dos ensaios de biodetecção dos genossensores em tira t(1;19) (a), t(4;11) (b), t(17;19) (c), t(15;17)M7 (d) e t(15;17)APLB (e) frente as amostras plasmideais.....	79
Figura 30. Caracterização voltamétrica dos ensaios de biodetecção dos genossensores em tira t(1;19) (a), t(4;11) (b), t(17;19) (c), t(15;17)M7 (d) e t(15;17)APLB (e) frente as amostras plasmideais.....	80
Figura 31. Caracterização eletroquímica do biorreconhecimento dos genossensores em tira t(15;17)M7(a) e APLB (b) frente a amostras de cDNA de pacientes.....	81
Figura 32. Voltamogramas cíclicos dos testes de especificidade dos genossensores M7 (a) e APLB (b).....	82
Figura 33. Caracterização por voltametria cíclica (a), espectroscopia de impedância eletroquímica (b), voltametria de pulso diferencial (c) do substrato protótipo.....	84
Figura 34. Caracterização voltamétrica da eletropolimerização do PPY no protótipo metalizado (a) e sistema de captação de sinal do protótipo (b).....	85
Figura 35. Caracterização eletroquímica por DVP (a) e EIE (b) do estudo de imobilização da ssDNA (10 – 50 pM).....	86
Figura 36. Caracterização DPV (a) e Ipa (b) das etapas de montagem do protótipo genossensível.....	87
Figura 37. Caracterização dos padrões de DPV (a) e respectivas Ipas (b) dos protótipos genossensível para cada translocação.....	87
Figura 38. Caracterização dos padrões de RCT dos protótipos genossensível para cada translocação.....	88
Figura 39. Caracterização por DPV dos ensaios de biorreconhecimento com amostras plasmideais (1 – 100 pg.µL-1) para t(1;19) (a), t(4;11) (b), t(12;21) (c) e t(17;19) (d).....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Correntes de pico anódicas (I_{pa}) das camadas automontadas genossensores flexíveis específicos para cada translocação estudada.....	78
Tabela 2. Resistência a transferência de carga (R_{CT}) dos ensaios de EIE para os protótipos genossensíveis específicos para cada translocação estudada.....	78
Tabela 3. Comparação entre genossensores eletroquímicos desenvolvidos para detecção do oncogene PLM-RAR α	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica (do inglês <i>atomic force microscopy</i>)
ANAE	Alfa-naftil acetato esterase
Au	Ouro
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
CAE	cloroacetato esterase
CD	Grupamento de diferenciação (do inglês <i>cluster of differentiation</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial (do inglês <i>differential pulse voltammetry</i>)
DRM	Doença residual mínima
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (do inglês <i>fluorescence in situ hybridization</i>)
GQDs	Pontos Quânticos de Grafeno (do inglês <i>graphene quantum dots</i>)
HCV	Vírus da hepatite C (do inglês <i>Hepatitis C virus</i>)
HIV1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (do inglês <i>immunodeficiency virus</i>)
HPV	Papilomavírus humano (do inglês <i>Human Papillomavirus</i>)
ICP	Polímeros intrinsecamente condutores (do inglês <i>intrinsic conductive polymers</i>)
ITO	Óxido de índio dopado com estanho (do inglês <i>indium tin oxide</i>)
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda de células B
MO	Medula Óssea
MPO	Mieloperoxidase
NHS	N-hidroxissuccinimida
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
RTq-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)

OMS	Organização Mundial de Saúde
PANI	Polianilina (do inglês <i>Polyaniline</i>)
PAS	Ácido periódico de Schiff ou reação do ácido para-amino salicílico
PPy	Polipirrol (do inglês <i>Polypyrrole</i>)
PSA	Antígeno prostático específico
QDs	Pontos Quânticos (do inglês <i>quantum dots</i>)
SBB	do inglês <i>sudan black B</i>
ssDNA	DNA de cadeia simples (do inglês <i>single-stranded DNA</i>)
SP	Sangue periférico
UFC	Unidade formadora de colônia
VC	Voltametria cíclica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	LEUCEMIAS	25
2.2	DIAGNÓSTICO POR EXAMES LABORATÓRIAS	26
2.2.1	Exames complementares	27
2.3	BIOSSENSORES	31
2.3.1	Classificação dos biossensores	33
2.3.2	Genossensores: biossensores eletroquímicos de DNA	37
2.4	NANOTECNOLOGIA E MATERIAS APLICADOS A BIOSSENSORES	40
2.4.1	Polímeros condutores	31
2.4.1.1	Filme de polipirrol	43
2.4.1.2	Filme de polianilina	44
2.4.2	Pontos Quânticos	46
2.4.2.1	Pontos quânticos de grafeno	47
2.5	TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	49
2.5.1	Voltametria cíclica	50
2.5.2	Espectroscopia de impedância eletroquímica	52
2.6	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	56
3	JUSTIFICATIVA	59
4	OBJETIVOS	60
4.1	OBJETIVO GERAL	60
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
5	MATERIAIS E MÉTODOS	62
5.1	MATERIAIS	62
5.2	ESTRATÉGIAS DE ELABORAÇÃO DOS SUBSTRATOS DE CONSTRUÇÃO DOS GENOSSENSORES	62
5.3	NANOARQUITETURAÇÃO DOS GENOSSENSORES	64

5.3.1	Estudo dos parâmetros de eletropolimerização dos polímeros condutores.....	64
5.3.2	Automontagem e imobilização da ssDNA para as translocações de interesse	64
5.4	TESTES DE BIORRECONHECIMENTO	65
5.5	TESTES DE ESPECIFICIDADE	65
5.6	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA.....	65
5.7	CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	66
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
6.1	GENOSENSOR EM TIRA FLEXÍVEL.....	68
6.1.1	Estudos dos parâmetros de eletropolimerização dos polímeros condutores.....	68
6.1.2	Determinação da melhor nanoestruturação dos genossensores em tira..	71
6.1.3	Caracterização topográfica das etapas de montagem dos genossensores em tira	73
6.1.4	Caracterização eletroquímica das etapas de montagem dos genossensores em tira	75
6.1.5	Ensaio de biodetecção com amostras plasmídeais	78
6.1.6	Biorreconhecimento frente a amostras clínicas de pacientes	81
6.1.7	Testes de especificidade	81
6.2	PROTÓTIPO GENOSENSOR FLEXÍVEL	84
6.2.1	Definição das técnicas eletroquímicas de análise do substrato protótipo genossensor	84
6.2.2	Parâmetros de eletropolimerização dos polímeros condutores	85
6.2.3	Estudo da imobilização da sonda de DNA	85
6.2.4	Caracterização eletroquímica das etapas de montagem do protótipo genossensor	86
6.2.5	Caracterização do biorreconhecimento do protótipo genossensor	88
7	CONCLUSÕES	90
8	REFERÊNCIAS	91

9	APÊNDICES	104
9.1	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO E MATERIAL SUPLEMENTAR.....	105
9.2	APÊNDICE B – ARTIGO EM CORREÇÃO.....	121
10	ANEXOS.....	122
10.1	ANEXO A – DIRETRIZES DA REVISTA <i>BIOELECTROCHEMICAL</i>	123
10.2	ANEXO B – DIRETRIZES DA REVISTA <i>TALANTA</i>	139

1 INTRODUÇÃO

As leucemias são neoplasias hematológicas que constituem um grupo heterogêneo de doenças clonais que atingem os progenitores hematopoiéticos. As células neoplásicas assumem função anormal afetando a resposta imune e suprimindo o equilíbrio da hematopoiese. A superpopulação neoplásica pode ainda gerar extravazamento celular para tecidos adjacentes como fígado, baço, linfonodos e sistema nervoso central ocasionando hepatoesplenomegalia, hemorragias e danos neurológicos (TASIAN et al., 2015; LIN et al., 2021). A população infantojuvenil merece considerável atenção no rastreo destas neoplasias pois, nessa faixa etária, a leucemia é o tipo de cancer mais recorrente e com elevada taxa de mortalidade (GLOBOCAN, 2020). Além disso os casos de recaída e persistência da doença residual mínima (DRM) são fatores de impacto na morbidade deste grupo (TASIAN et al., 2015).

As mutações genéticas, em maior parte cromossômicas, são responsáveis pelo desenvolvimento da leucemia e a determinação da alteração associada a este quadro é de extrema importância no prognóstico dos pacientes. Por meio dessa detecção é possível realizar a estratificação de risco e a escolha da conduta terapêutica. As principais mutações cromossômicas encontradas nas leucemias são alterações numéricas e estruturais que podem ser deleções, inversões e translocações. Os oncogenes resultantes das mutações assim como os produtos de sua expressão são utilizadas como marcadores diagnósticos (LIN et al., 2021). Para investigação desses oncomarcadores são utilizadas técnicas da biologia molecular como FISH (Hibridização fluorescente *in situ*) com observação de cariótipo, RT-PCR (Reação em cadeia da DNA-polimerase via transcriptase reversa) e seu variante RTq-PCR (Reação em cadeia da DNA-polimerase via transcriptase reversa quantitativo). Essas técnicas são eficientes no rastreo, entretanto ainda apresentam protocolos extensos, complexos e de alto custo. Além disso, para realização desses ensaios são necessários ambientes laboratoriais altamente controlados e profissionais especializados dificultando assim a rotina diagnóstica ou o atendimento em unidades de saúde sem infraestrutura (DAVIS et al., 2014; LIQUORI et al., 2020; PINCEZ et al., 2021). Neste cenário, pesquisas com desenvolvimento de novos dispositivos de diagnóstico genético são extremamente relevantes.

Diante disso, os genossensores se destacam por serem biodispositivos que realizam quantificação de variantes genéticas de forma confiável, rápida e de baixo custo. Quando esses biodispositivos genossensíveis são associados a técnicas eletroquímicas de transdução são agregadas características essenciais como detecção reversível da hibridização além da possibilidade de desenvolvimento de sistemas miniaturizados de avaliação multiplex. Entretanto, a implantação de biossensores DNA-sensíveis na rotina laboratorial ainda é um desafio importante (RASOULI et al., 2018; JEŃDRZAK et al., 2022). Isso porque a portabilidade e miniaturização dos biodispositivos desenvolvidos sobre substratos convencionais, como eletrodos de ouro e carbono, ainda são fatores que precisam ser desenvolvidos. Um material interessante para isso é o ITO flexível (do inglês *indium tin oxide*) que é um PET revestido com o óxido de índio estanho (ITO) (BOUDEN et al., 2016). Este substrato apresenta propriedades eletroquímicas significativas podendo ser empregado na confecção de eletrodos em tiras flexíveis. Além disso, esta superfície proporciona a inovação trazendo *designs* variados além da associação com filmes poliméricos e nanomateriais (AVELINO et al., 2021).

Com os avanços nas técnicas de desenvolvimento de materiais e nanomateriais, a adição de polímeros condutores e nanopartículas na estruturação de biossensores possibilitou o melhoramento de propriedades bioanalíticas desses dispositivos. Polímeros condutores como o polipirrol (PPy) e polianilina (PANI) possibilitam elevação da atividade eletrocatalítica de plataformas eletroquímicas. (LI; GONG, 2020; KHODER; KORRI-YO USSOUFI, 2020). O PPy e a PANI, quando aplicado a estruturação de biodispositivos, fornecem uma matriz capaz elevar a sensibilidade desses dispositivos em baixas concentrações do analito (KHODER; KORRI-YO USSOUFI, 2020; KAZEMI et al., 2021). Além disso apresentam síntese por via eletroquímica que permite o controle da polimerização do filme possibilitando a estimativa da espessura do filme e do estado de oxidação do polímero. Em adição, ambos polímeros disponibilizam grupos funcionais importantes para a imobilização de biomoléculas com elevada biocompatibilidade (SILVA et al., 2016; KHODER; KORRI-YO USSOUFI, 2020).

Os pontos quânticos de grafenos (GQD) são nanomateriais semicondutores que são utilizados na elaboração de camadas automontadas

em biossensores viabilizando a detecção de processos físicos ou químicos relacionados ao bioreconhecimento. Outras características importantes são a elevação da área superficial e fornecimento de grupos químicos para ancoragem de biomoléculas, estabilidade e não toxicidade no ambiente. Como características eletroquímicas os GQD contribuem na transferência de carga e reação redox de técnicas eletroquímicas (BACON et al., 2014; POTHIPOR et al., 2021).

Dentre as técnicas analíticas empregadas nos biossensores os métodos eletroquímicos apresentam atrativa compatibilidade com produção em massa e tecnologias de microfabricação. Além disso, a detecção eletroquímica que resulta em sinais eletrônicos direto possibilitando uma detecção simplificada com informações detalhadas com baixo custo (KREJCOVA et al., 2017; MAHMOODI et al., 2019). Quando aplicadas em genossensores as técnicas eletroquímicas possibilitam a avaliação do processo de hibridação com rápido tempo de resposta gerando rapidez no diagnóstico genético. Técnicas eletroanalíticas como a voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (DPV) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) são amplamente utilizadas na avaliação da construção e performance de biodispositivos pois apresentam a medição de sinais eletroquímicos e análise de modificações de superfície de biossensores permitindo estudos qualitativos e quantitativos (MAHMOODI et al., 2020; RASOULI et al., 2018). A formação de camadas automontadas também pode ser avaliada pela microscopia de força atômica (AFM) que permite a investigação de características morfológicas e mecânicas da superfície gerando imagens de três dimensões em escala nanométrica ou subnanométrica (KRIEG et al., 2019; MARINELLO et al., 2019).

Deste modo, a presente dissertação traz o desenvolvimento de duas categorias de genossensores eletroquímicos em substratos flexíveis de ITO: 1) em forma de tira genossensora e 2) protótipo composto por um conjunto de eletrodos de ouro. Os biossensores DNA sensíveis foram voltados para a detecção de oncogenes quiméricos associados a leucemia infantil. Para a nanoestruturação desses substratos foram utilizadas duas configurações iniciais: 1) filme de PPy-GQD e 2) filme de PANI-GQD. Todas etapas de desenvolvimento dos genossensores foram caracterizados por voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (DPV), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e microscopia de força atômica (AFM). Como resultados

foram estimados as correntes de pico nos ensaios de VC e DPV, resistência a transferência de carga (R_{CT}) nos ensaios de EIE, onde foram avaliados sensibilidade e especificidade analítica dos biossensores com representação de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LQ).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEUCEMIAS

As leucemias são neoplasias hematológicas heterogêneas caracterizadas pela proliferação de células imaturas na medula óssea, sangue e outros órgãos como fígados, baço e linfonodos. As células neoplásicas acabam suprimindo a hematopoiese resultando em comprometimento da resposta imune e hematológica. Essas disfunções se iniciam nas células tronco hematopoiéticas e são desencadeados por mutações genéticas. (TASIAN et al., 2013).

As leucemias são inicialmente classificadas de acordo com sua evolução em aguda, com progressão rápida e crônica com progressão lenta. No quadro agudo ocorre a perda de função hematopoiética de forma rápida onde as células neoplásicas são encontradas no sangue periférico extremamente imaturas. Essas células indiferenciadas são classificadas como blastos. Na leucemia crônica ocorre um desvio escalonado onde algumas células chegam em estágio de maturação sendo possível visualizar todas as fases de maturação celular no mesmo paciente (TASIAN et al., 2013; HUANG et al., 2020).

Outra classificação da leucemia é feita de acordo com a linhagem celular envolvida no processo neoplásico em linfóide ou mielóide. A leucemia linfóide ocorre por meio de alterações genéticas no precursor comum linfóide e a leucemia mielóide por mutações no precursor comum mielóide. Os fatores genéticos, imunológicos e ambientais são apontados como possíveis causadores, entretanto, a determinação da alteração genética associada a leucemia é de extrema importância prognóstica. Por meio dessa determinação é possível realizar a estratificação de risco do paciente e a escolha da conduta terapêutica (FIGUEROA et al., 2013; BROWN et al., 2020; LIN et al., 2021).

As principais mutações genéticas presentes na leucemia são alterações cromossômicas numéricas e estruturais que podem ser deleções, inversões e translocações. As alterações numéricas são comuns em quadros somáticos sempre associados como fator de risco no desenvolvimento a neoplasia hematológica como na Síndrome de Down e quadros de leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil por exemplo. Dentre os tipos de mutações a translocação é uma das principais alterações estruturais e envolve a formação de oncogenes

quiméricos (FIGUEROA et al., 2013; BROWN et al., 2020; LIN et al., 2021). Neste cenário, o rastreio da leucemia na população infanto-juvenil merece considerável atenção pois esta neoplasia apresenta a maior incidência e elevada mortalidade entre os cânceres que atingem esta faixa etária (GLOBOCAN, 2020).

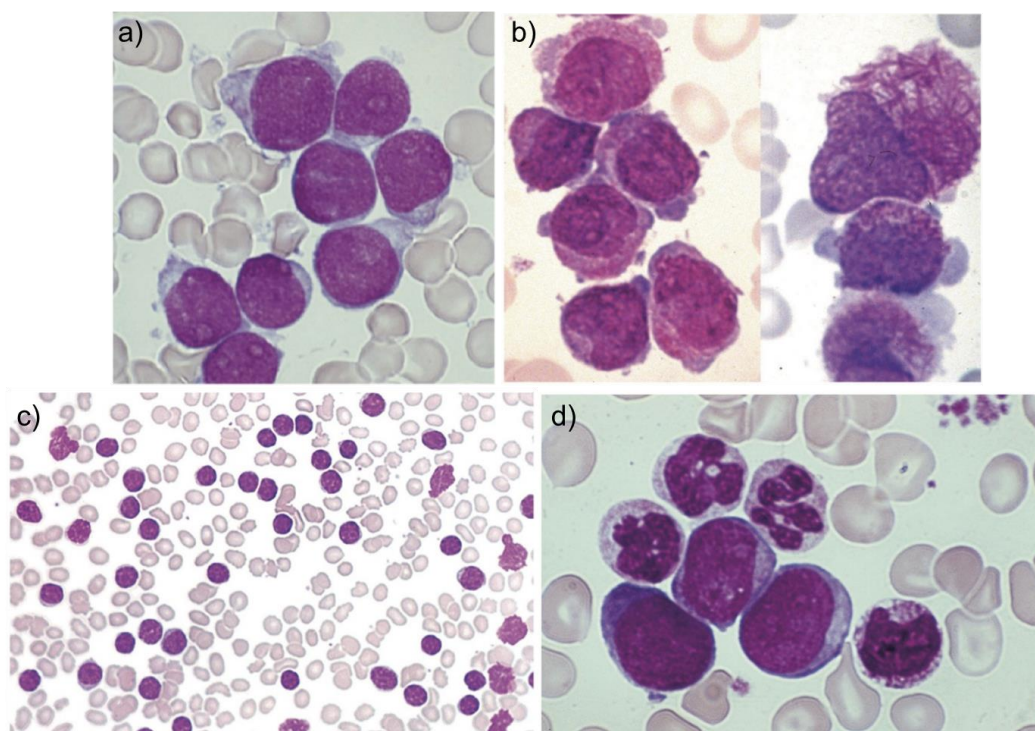
Casos de relapsos ocorrem em aproximadamente 15% - 20% das crianças com leucemia e é um fator importante na morbidade desta população. A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o câncer infantil mais comum, representando aproximadamente 25% dos diagnósticos de câncer. Pelo menos metade dos pacientes infanto-juvenis com LLA de células B (LLA-B) apresentam translocações cromossômicas somáticas. Dentre as translocações encontradas nestes pacientes as mais recorrentes são a t(12;21) (p13;q22), t(1;19) (q23;p13.3) e t(9;22) (q34;q11.2). Outra translocação menos recorrente na população pediátrica é a t(17;19) (q22;p13.3) entretanto requer um diagnóstico de atenção pois é associada a um péssimo prognóstico na LLA-B. A t(15;17) (q24;q21) está presente em aproximadamente 90% dos casos de leucemia promielocítica aguda e requer cautela pois está associada a eventos hemorrágicos e alta mortalidade (TASIAN et al., 2015; ZHAO et al., 2019).

2.2 DIAGNÓSTICO POR EXAMES LABORATORIAIS

Com base nas manifestações clínicas ligadas a hipótese diagnóstica de leucemia os exames laboratoriais iniciais realizados são o hemograma, onde é possível observar diferentes níveis de alterações nas células sanguíneas e os exames bioquímicos, onde pode se visualizar disfunções metabólicas e de coagulação. Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde) o achado $\geq 20\%$ de blastos no SP é caracterizado como um quadro de leucemia. Além disso na contagem relativa das células do sangue periférico (SP) o percentual de células imaturas é um fator relevante para a classificação da velocidade de progressão da leucemia. Na leucemia aguda além da visualização de blastos no SP também podem ser encontradas alterações na série plaquetária e série vermelha, como presença de reticulócitos, alterações de cor, forma e presença de inclusões citoplasmáticas. Nos casos da leucemia crônica os achados hematológicos podem ser mais discretos com menor percentual de células imaturas, entretanto,

se destacando a presença de todas fases de maturação da linhagem afetada caracterizando um desvio celular escalonado (Figura 1) (HOFFBRAND; MOSS, 2013). Para confirmação do diagnóstico também necessário a realização do mielograma para a visualização e marcação das células em amostras originária de medula óssea (MO) (BROWN et al., 2020).

Figura 1. Hematoscopia com observação de alterações hematológicas em pacientes diagnosticados com (a) leucemia linfóide aguda, (b) leucemia mieloide aguda, (c) leucemia linfóide crônica e (d) leucemia mieloide crônica.



Fonte: HOFFBRAND; MOSS, 2013.

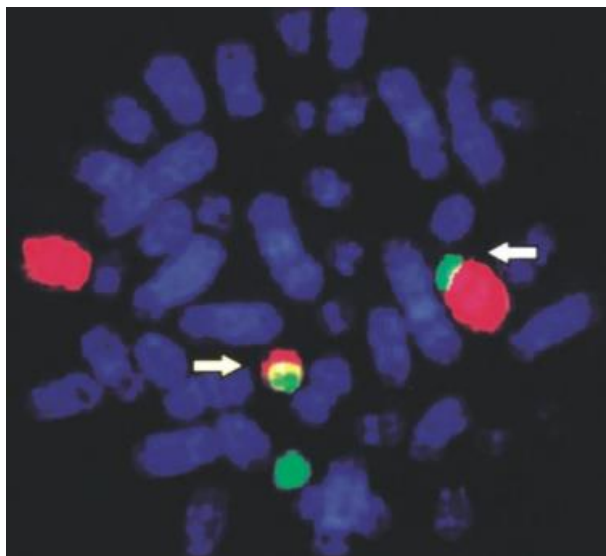
2.2.1 Exames Complementares

Após os exames iniciais com confirmação do quadro leucêmico é necessário que ocorra uma melhor classificação do tipo de leucemia do paciente. Para isso são feitos exames complementares de citoquímica, imunofenotipagem e testes genéticos como PCR (Reação em cadeia da DNA-polimerase) e FISH. A citoquímica consiste na marcação intracelular por meio de colorações específicas possibilitando a classificação da linhagem celular envolvida permitindo ainda a subdivisão em alguns casos (TOHAMI et al., 2012;

HOFFBRAND; MOSS, 2013). As principais colorações utilizadas são fosfatase alcalina, mieloperoxidase (MPO), *sudan black B* (SBB), naftol AS-D, cloroacetato esterase (CAE), alfa-naftil acetato esterase (ANAE), reação do ácido para-amino salicílico ou ácido periódico de Schiff (PAS) e a fosfatase ácida (TOHAMI et al., 2012). A imunofenotipagem se baseia na utilização de anticorpos monoclonais direcionados a antígenos de superfície e intracelulares específicos chamados de *cluster* de diferenciação ou grupos de diferenciação (CD). Os anticorpos monoclonais são associados a fluorocromos específicos e as células marcadas são avaliadas por citometria de fluxo. Desta forma, é possível distinguir a linhagem celular e os diferentes estágios de maturação (PETERS; ANSARI, 2011).

No diagnóstico genético a principal técnica utilizada para a visualização das mutações cromossômica é o FISH. Essa técnica se baseia na utilização de sondas associadas a marcadores fluorescentes que são direcionadas a regiões gênicas de interesse. Isso permite a visualização de microdeleções e rearranjos cromossômicos mesmo em amostras fixadas (Figura 2). Os ensaios de PCR (reação em cadeia da DNA polimerase) utilizam *primers*, também chamadas de sequências iniciadoras, que são direcionadas ao alvo e na presença da DNA polimerase realiza a amplificação do DNA. Isso ocorre por meio da variação de ciclos de desnaturação, anelamento e amplificação no termociclador. Entretanto para visualização do resultado final do PCR convencional é necessário realizar a separação do material amplificado por meio de eletroforese em gel de agarose (WANG et al., 2001; DAVIS et al., 2014).

Figura 2. Detecção por FISH da t(12;21) presente na LLA onde a sonda verde corresponde ao gene ETV6 (cromossomo 21) e a sonda vermelha corresponde a presença do gene RUNX1 (cromossomo 12).

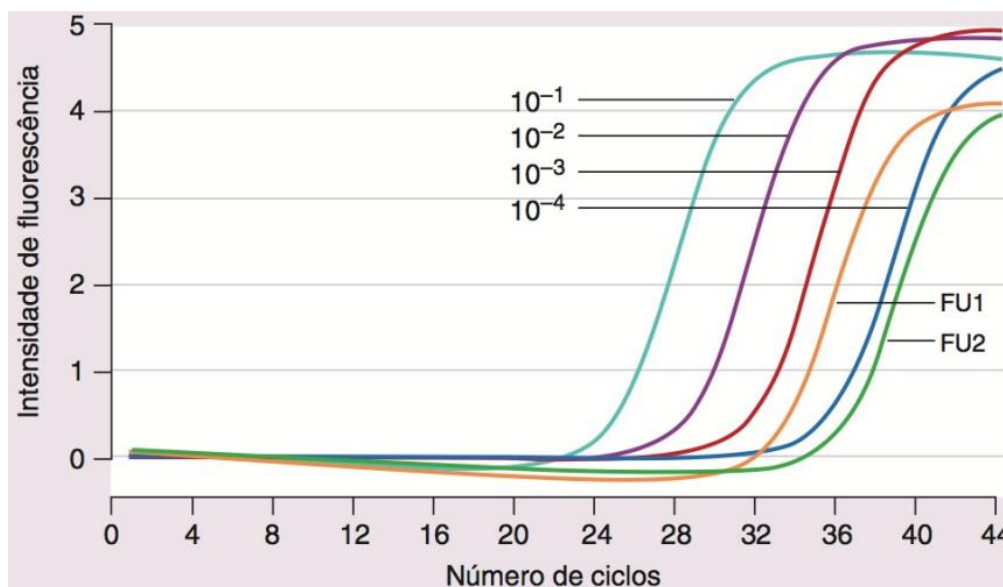


Fonte: HOFFBRAND; MOSS, 2013.

Com objetivo de quantificar o fragmento amplificado e eliminar a eletroforese utilizada no PCR convencional foi desenvolvido o PCR em tempo real que consiste na utilização de *primers* que apresentam uma molécula fluorescente em uma de suas extremidades e um *quencher* na outra extremidade, sendo complementar a região interna ao fragmento de DNA alvo. No decorrer do processo de amplificação, a DNA polimerase remove os resíduos de nucleotídeos da sonda, e na ausência do *quencher*, a molécula fluorescente é liberada no meio emitindo fluorescência proporcional a quantidade de alvo produzido. Desta forma é possível determinar o número de cópias do fragmento alvo na amostra e assim acompanhar a resposta ao tratamento do paciente com leucemia (WANG et al., 2001; DAVIS et al., 2014).

As variações do PCR como RT-PCR e RT-qPCR tem sido mais utilizadas no diagnóstico pois possibilitam a avaliação da expressão dos oncogenes alvos. Isso é possível pois ambas variações utilizam a transcriptase reversa para conversão de RNA em cDNA. Além disso com a soma das técnicas a última etapa do PCR convencional é dispensada e a quantificação dos oncomarcadores é realiza simultaneamente (Figura 3) (LIQUORI et al., 2020; PINCEZ et al., 2021).

Figura 3. Ensaio RTq-PCR aplicado a detecção da doença residual mínima em paciente LLA-B.



Fonte: HOFFBRAND; MOSS, 2013.

Sabe-se que o tempo entre o diagnóstico e o início do tratamento é um fator primordial que impacta diretamente a taxa de remissão completa e sobrevida dos pacientes com leucemia. Este fator repercute ainda mais na taxa de sobrevida de jovens diagnosticados com leucemia mieloide aguda (AML) sendo este caso indicativo para início de terapia imediata (SEKERES et al., 2009). Os testes de diagnóstico atuais principalmente citogenéticos, como FISH e cariotipagem, apresentam dificuldades de tempo de execução ou mesmo interferentes no processo. Por exemplo, o exame citogenético requer um protocolo que dura de 24 à 48 horas para visualização da placa metafásica possibilitando a identificação de mutações cromossômicas sendo este um fator que influencia na demora de resposta. Na técnica de FISH pode ocorrer sobreposição das bandas dos cromossomos dificultando a visualização das mutações (RAMCHANDREN et al., 2018). Além dos fatores de execução da técnica desses métodos de diagnóstico, ainda existem dificuldades estruturais de cada região. Em muitos casos, para a realização dos testes de cariotipagem é necessário o envio das amostras para laboratórios especializados e esse fator logístico pode exceder o tempo recomendado de diagnóstico ultrapassando a margem de 5 à 7 dias (MACK et al., 2019).

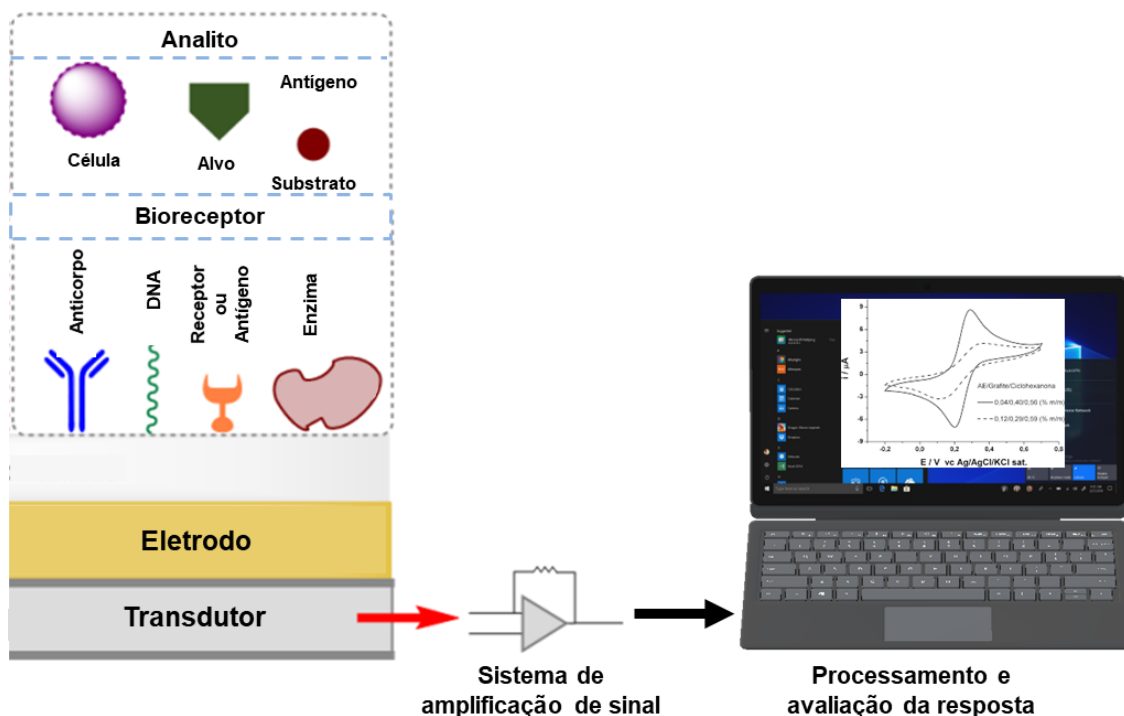
Apesar dos avanços e investimentos na técnica de RT-PCR ocasionados

pela demanda requerida na pandemia do SARS-CoV-2, os termocicladores e kits mais rápidos utilizados demoravam cerca de 1,5 horas para execução de um teste (BUSTIN, NOLAN et al., 2020). Além disso nesses ensaios pode ocorrer seletividade variável sendo preciso a utilização de amostras com elevado grau de pureza (PINCEZ et al., 2021). Desta forma, apesar dessas técnicas de análise genética serem eficientes ainda apresentam limitações significativas no diagnóstico rápido com detecção dos oncogenes de interesse. Algumas limitações claras são os protocolos extensos, demorados, necessidade de reagentes, equipamentos e profissionais especializados (RAMCHANDREN et al., 2018; MACK et al., 2019; BUSTIN, NOLAN et al., 2020).

2.3 BIOSSENSORES

Os biossensores podem ser definidos como dispositivos bioeletrônicos baseados em processos bioquímicos de reconhecimento que geram sinais analíticos quantitativos ou semi-quantitativos. Três principais elementos compõem esses biodispositivos: o bioreceptor, o transdutor e amplificador do sinal e processador de sinal (Figura 4) (MEHROTRA et al., 2016; ROSARIO; MUTHARASAN, 2014; DAMIATI; SCHUSTER, 2020). O bioreceptor é o componente responsável pelo processo de reconhecimento, sendo uma biomolécula capaz de interagir e reconhecer o analito de forma específica e seletiva. Este processo de bioreconhecimento pode ocorrer através de interações moleculares ou reações catalíticas. (ROSARIO; MUTHARASAN, 2014; RASOULI et al., 2018). O transdutor tem o papel de converter a energia produzida pela interação molecular de bioreconhecimento em um sinal mensurável. O sinal produzido e detectado pode ser de natureza óptica, eletroquímica, piezoelétrica, colorimétrica, térmica ou magnética. O amplificador e processador de sinal é responsável pela transferência da resposta do transdutor para um circuito gerando o sinal elétrico que pode ser interpretado através de gráficos e grandezas numéricas (RASOULI et al., 2018; ENSAFI, 2019).

Figura 4. Representação esquemática dos componentes de um biossensor.



Fonte: Adaptada de DAMIATI; SCHUSTER, 2020.

O interesse por esses biodispositivos tem se expandido por sua ampla aplicabilidade em diversas áreas tanto no diagnóstico clínico quanto no monitoramento ambiental e industrial. No diagnóstico clínico os biossensores vêm sendo utilizados no monitoramento de distintas doenças, como, doenças infecciosas, genéticas, crônico-degenerativas e cardiovasculares (MEHROTRA et al., 2016; ROSARIO; MUTHARASAN, 2014).

Essa atratividade ocorre, pois, essas ferramentas analíticas apresentam elevada sensibilidade, seletividade, especificidade, baixo custo e fácil instrumentação. Além disso, também possuem a possibilidade de portabilidade, miniaturização, automação, fácil produção, com baixo limite de detecção, acurácia, precisão, linearidade, rápido tempo de resposta, reprodutibilidade, robustez, simplicidade e estabilidade (MAHMOODI et al., 2019; MADURAVEERAN et al., 2018). Essas qualidades são de grande valor no diagnóstico de rotina permitindo que esses biodispositivos possam ser utilizados no monitoramento de várias patologias fornecendo informações clínicas válidas em tempo real com fácil interpretação (WINDMILLER et al., 2013; ROSARIO;

MUTHARASAN, 2014; MEHROTRA et al., 2016).

2.3.1 Classificação dos Biossensores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a interação bioquímica do receptor com a analito ou de acordo com os componentes utilizados em sua configuração. Desta forma a subdivisão realizada de acordo com a interação de detecção classifica os biossensores em catalíticos ou de bioafinidade. A diferenciação conforme os componentes do biodispositivo ocorre de acordo com o elemento transdutor ou o bioreceptor utilizado (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015; MEHROTRA et al., 2016). Desta forma, se apresenta a classificação dos biossensores segundo a interação de biorreconhecimento:

a) Biossensores catalíticos: são aqueles onde ocorrem uma reação catalítica própria entre bioreceptor e o analito alvo podendo gerar um subproduto. Essa reação está diretamente ligada a mensuração do sinal resposta. Tendo como exemplo o glicosímetro baseado em glicose-oxidase que está relacionado a uma produção de um subproduto secundário a biointeração (CHEN et al., 2013).

b) Biodispositivos de bioafinidade: o princípio de mensuração está relacionado com as modificações mecânicas e conformacionais geradas pela interação bioreceptor-analito. Essas modificações resultam em alterações de grandezas e parâmetros avaliados como resposta. A relação de bioafinidade permite informações em tempo real com a utilização de anticorpos, receptores celulares ou ácidos nucleicos como bioreceptores (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010; VIDAL et al., 2013; AVELINO, 2017).

Diversas biomoléculas podem ser utilizadas como bioreceptor por exemplo enzimas, anticorpos, antígenos, sequências simples de DNA, RNA, aptâmeros e também elementos como vírus, bactérias e células (ROSARIO; MUTHARASAN, 2014; MEHROTRA et al., 2016; RASOULI et al., 2018). Desta forma, se apresenta a classificação dos biossensores quanto ao bioreceptor utilizado:

a) Biossensor enzimático: uma enzima é imobilizada como elemento biológico e a biodetecção é observada pelo consumo ou formação de

substâncias resultantes da interação enzima com substrato (TURNER, 2000; ERDEN; KILIÇ, 2013). O glicosímetro é um biossensor enzimático que utiliza a glicose oxidase como bioreceptor, sendo o biossensor mais conhecido (CHEN et al., 2013). Também existem biossensores enzimáticos para a detecção de ácido úrico com elevada sensibilidade e seletividade (ERDEN; KILIÇ, 2013).

b) Imunossensor: se baseia na imobilização de um anticorpo ou antígeno com o papel de bioreconhecimento. Sua detecção é fundamentada na formação do complexo antígeno-anticorpo que gera um sinal mensurável. Alguns estudos indicam a aplicabilidade clínica desses biossensores principalmente pela capacidade de desligamento do complexo anticorpo-antígeno permitindo assim a reutilização desses biodispositivos. (LUPPA; SOKOLL; CHAN, 2001; MEHROTRA et al., 2016). Existem imunossensores desenvolvidos voltados a doenças sazonais como dengue (SANGILI et al., 2022) ou para marcadores de metastáticos (AYDIN; AYDIN; SEZGINTÜRK, 2019).

c) Genossensor: utiliza moléculas de ácidos nucleicos como elemento de bioreconhecimento. Geralmente se utiliza uma sequência simples de DNA (ssDNA) complementar ao alvo que é detectado através da hibridização (MEHROTRA et al., 2016; RASOULI et al., 2018; CHEN et al., 2016). Esse tipo de biossensor é utilizado na investigação marcadores genéticos patológicos, como as talassemias (GHOLIVAND; AKBARI, 2019), infecções bacterianas com a detecção de genoma bacteriano (ARORA et al., 2007) e investigação viral como identificação de HPV (AVELINO et al., 2021).

d) Aptassensor: são utilizadas sequências de ácidos nucleicos, DNA ou RNA, sinteticamente elaborados voltados para a detecção de alvos. Essas moléculas são chamadas de aptâmeros e são desenvolvidas para assumir uma conformação sítio específico que possibilita a ligação ao alvo (LUPPA; SOKOLL; CHAN, 2001; AVELINO, 2017). Desta forma, essas biomoléculas adquirem uma elevada especificidade podendo ser aplicadas na detecção de vários biomarcadores como trombina e imunoglobulina E. Também sendo aplicado no diagnóstico de HIV1, HCV, infecções bacterianas (HONG et al., 2012) e na detecção de pesticidas (LIU et al., 2019).

e) Biossensor microbiológico: microrganismos como bactérias ou leveduras são imobilizados com objetivo de biodetecção. (SU et al., 2011; D'SOUZA et al., 2001; LEI et al., 2006). Essa categoria de biodispositivo tem sido

aplicado na mensuração do consumo de oxigênio e metais pesados no ambiente, assim como pesticidas ou produtos farmacêuticos (D'SOUZA et al., 2001).

f) Biossensor celular: muitas vezes biossensores microbiológicos também são classificados como celulares isso porque são biossensores que possuem qualquer tipo de célula imobilizada como bioreceptor (CERMINATI; CHECA, 2015; HU et al., 2017). Esses biossensores podem ser utilizados no diagnóstico de diversas viroses (CHENG et al., 2015).

Os biodispositivos também são classificados de acordo com o tipo de transdução empregada:

a) Transdução óptica: avalia a biodetecção por meio de processos ópticos como fluorescência, luminescência ou índices de refração (COOPER, 2002; FAN et al., 2008; MEHROTRA et al., 2016). Uma técnica promissora que pode ser utilizada é a ressonância plasmônica de superfície (SPR) que avalia a modificação do índice de refração da superfície de acordo com a imobilização de biomoléculas e o próprio processo de bioreconhecimento (COOPER, 2002; LIAO et al., 2019; YANG et al., 2020). Esses biossensores estão entre os mais estudados principalmente por apresentarem uma análise de eventos complexos de ligação através de sistemas multiplexados com elevada sensibilidade (YOO; LEE, 2016; LIAO et al., 2019).

b) Transdução piezoelétrica: baseia sua mensuração em mudanças na frequência de ressonância ocasionado por mudanças na massa de cristais anisotrópicos utilizados como transdutor (MEHROTRA et al., 2016; POHANKA, 2019; BAYRAMOGLU et al., 2019). A técnica mais escolhida na construção desses biossensores é a microbalança de quartzo onde o cristal de quartzo possui as propriedades piezoelétricas. O princípio de detecção destes dispositivos é fundamentado na mudança de frequência linearmente e proporcionalmente a alterações na massa adicionada no cristal (LIU et al., 2017; POHANKA, 2019; BAYRAMOGLU et al., 2019; YANG et al., 2020).

c) Transdução calorimétrica: realiza a mensuração de energia térmica utilizando a calorimetria. A calorimetria é utilizada em diversas técnicas, mas nos biossensores é muito eficaz na análise de reações bioquímicas. Com objetivo de tornar a técnica específica se revestiu o calorímetro com moléculas que possui um caráter de biointeração específica como enzimas e anticorpos. Quando o analito é exposto ao bioreceptor imobilizado, a reação bioquímica se inicia e a

quantidade total de calor e cinética gerados é proporcional à concentração do analito e às constantes de velocidade da reação (BARI; REIS; NESTOROVA, 2019). Além disso, os sensores calorimétricos, demonstram grandes vantagens quando associados a outra técnica de sensoriamento, como a óptica, e quando aplicados na miniaturização de sensores (BARI; REIS; NESTOROVA, 2019; WANG et al, 2019).

d) Transdução eletroquímica: identifica mudanças físico-químicas na superfície sensora. O transdutor eletroquímico responde e converte o evento de bioreconhecimento em uma resposta elétrica que pode ser amplificada, armazenada e exibida (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010; AYDIN; AYDIN; SEZGINTÜRK, 2019). Esses biodispositivos podem ainda ser subclassificados de acordo com o tipo de mensuração eletroquímica em: potenciométrico, amperométrico, condutimétrico e impedimétrico.

- Os biossensores potenciométricos determinam da diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência.
- Os biossensores amperométricos mensuram a corrente resultante da reação de oxidação ou redução eletroquímica de uma espécie eletroativa. Sendo a corrente resultante correlacionada à concentração das espécies eletroativas ou a sua taxa de produção ou consumo na camada biocatalítica (superfície do biossensor).
- Os biodispositivos condutimétricos mensuram alterações na condutividade elétrica da amostra, à medida que a composição da solução e do meio muda com a reação química. (THÉVENOT et al., 2001; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010; TANG et al., 2011; AYDIN; AYDIN; SEZGINTÜRK, 2019; GHOLIVAND; AKBARI, 2019).
- Os biossensores impedimétricos apresentam mensuração da impedância gerada no sistema a partir da aplicação de um potencial senoidal no eletrodo de trabalho com sobreposição de faixas de frequência variantes, resultando em uma corrente elétrica alternada (THÉVENOT et al., 2001; BERTOK et al., 2019).

A transdução eletroquímica aplicada a estruturação de biodispositivos tem como objetivo projetar uma técnica de detecção sensível, seletiva e específica como métodos alternativos para vários exames de diagnóstico atuais. Assim esses biodispositivos representam uma das principais classes de biossensores

estudados e produzidos com objetivo de diagnóstico clínico pela possibilidade de miniaturização de sistemas multiplex (GHOLIVAND; AKBARI, 2019; MAHMOODI et al., 2019; YANG et al., 2020).

2.3.2 Genossensores: Biossensores Eletroquímicos de DNA

Os biossensores de DNA, comumente chamados de genossensores, realizam avaliação de alvos moleculares genéticos baseados na hibridação específica entre sequências de oligonucleotídeos. Essa categoria de biodispositivos tem se destacado principalmente por gerar ferramentas altamente específicas e capazes de discriminar sequências de DNA com substituições de apenas um nucleotídeo. Além disso, também possuem uma alta produtividade, quantificação confiável de variantes genéticas e biomarcadores de DNA a um baixo custo e com elevada sensibilidade (CHEN et al., 2016; XU et al., 2017; HUANG et al., 2018; LU et al., 2020). Essas ferramentas baseadas em DNA são capazes de projetar uma estrutura interfacial com melhor imitação da biointerface natural com uma elevada ordem de organização e biocompatibilidade (XU et al., 2017; HUANG et al., 2018; YE et al., 2018).

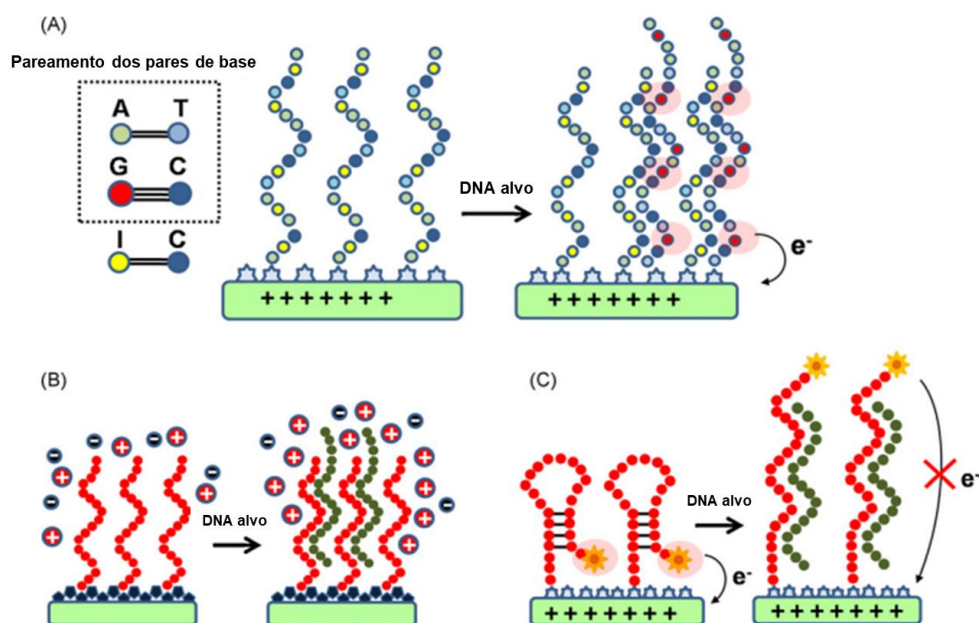
O processo de bioreconhecimento dos genossensores é baseado no anelamento entre pares de bases nitrogenadas da amostra genômica e da sequência imobilizada na plataforma sensora. Apesar do biorreconhecimento dos biossensores ocorrer por simples hibridização é possível subdividir o processo de detecção eletroquímica do anelamento em dois grupos onde um utiliza reagentes secundários para amplificação do sinal e o outro não utiliza sendo denominado *label-free*:

a) Na categoria *label-free* é possível realizar a detecção da hibridização por três principais formas que são amplamente utilizadas: baseadas na oxidação da base nitrogenada guanina (Figura 5a), baseada na propriedade polianiónica do DNA que gera alterações eletroquímicas na superfície (Figura 5b) e modificação da ssDNA com um marcador eletroativo que muda o comportamento de acordo com a alteração conformacional na hibridização (Figura 5c).

b) Na categoria de detecção que utiliza reagente secundário como indicador da reação de oxidorredução pode se utilizar um agente eletroativo na

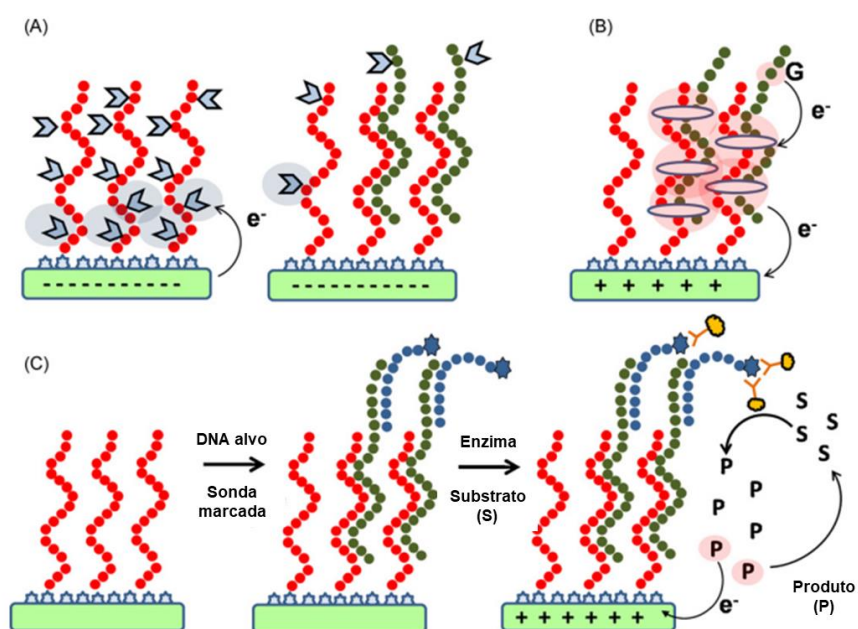
sequência de fita simples biorreceptora (Figura 6a), indicador eletroativo com afinidade para a fita dupla de DNA (Figura 6b) ou ainda uma sonda de captura acoplada a uma reação enzimática sanduíche (Figura 6c) (TOSAR; BRANAS; LAÍZ et al., 2010).

Figura 5. Processo de hibridização *label-free*.



Fonte: TOSAR; BRANAS; LAÍZ, 2010.

Figura 6. Detecção da hibridização por meio de agentes eletroativos.



Fonte: TOSAR; BRANAS; LAÍZ, 2010.

O procedimento de imobilização da ssDNA é de extrema importância para o direcionamento correto do bioreceptor na superfície refletindo na confiabilidade do sensor. A condição de estabilidade, reatividade, acessibilidade do analito alvo e orientação ideal do bioreceptor são parâmetros que devem ser mantidos no processo de imobilização do bioreceptor (RONKAINEN et al., 2010; MEHROTRA et al., 2016). A ssDNA pode ser imobilizada através de duas técnicas: adsorção física ou adsorção química com utilização do complexo estreptavidina-biotina ou por utilização de um agente ligante:

a) A imobilização por adsorção física é baseada principalmente na atração eletrostática entre a superfície do transdutor que assume carga positiva e a carga negativa dos grupos fosfato das moléculas de DNA. Esse método não requer reagentes ou modificações na sequência imobilizada, porém pode ocorrer a degradação da molécula biológica além da adsorção ser irregular na superfície gerando em baixa eficiência de hibridação e lixiviação da plataforma.

b) A imobilização por adsorção química com a utilização do complexo estreptavidina-biotina é baseada na bioafinidade das moléculas que resultam em um complexo com elevada afinidade. Esse complexo é pouco afetado por valores extremos de pH, temperaturas, solventes orgânicos e agentes desnaturantes. Para imobilização através desse complexo é necessário que ocorra previamente a modificação da sonda de DNA e da superfície de imobilização. A ssDNA sofre o processo de biotinação adquirindo a biotina em uma de suas extremidades, sendo a biotina responsável pela interação com a superfície do sensor modificada anteriormente com a estreptavidina ou avidina.

c) A utilização de agentes ligantes ou também chamados de reticulantes para adsorção química do bioreceptor de DNA é baseada na formação de ligação covalente entre a ssDNA e a superfície da plataforma. Para isso a ssDNA é quimicamente modificada com um grupo químico que formará a ligação com a molécula reticulante escolhida. Essa estratégia pode beneficiar a flexibilidade estrutural das sondas de DNA permitindo alterações conformacionais que resultam no aumento da hibridação (PIDORI; MERKOCI; ALEGRET, 2000; TELES; FONSECA, 2008; WANG et al., 2011; FARIA; ZUCOLOTTI, 2019). Esses agentes reticulantes podem ser por exemplo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-

hidroxissuccinimida (NHS) ou glutaraldeído (WANG et al., 2011; MCKENNA et al., 2016).

Outros processos como introdução de polímeros, materiais em escala nanométrica foram adicionados na configuração dos biossensores e podem colaborar na manutenção da estabilidade do bioreceptor de DNA. Esses materiais podem apresentar características de biocompatibilidade atrativas e elevação de área superficial das camadas de montagem no biossensor permitindo uma imobilização mais orgânica do elemento de bioreconhecimento. Desta forma a aplicação desses materiais trazem características inovadoras colaborando na robustez, sensibilidade e especificidade dos biodispositivos (MADURAIVEERAN; SASIDHARAN; GANESAN, 2018; GHOLIVAND; AKBARI, 2019).

2.4 NANOTECNOLOGIA E MATERIAIS APLICADOS A BIOSSENSORES

Os avanços nas metodologias de síntese de materiais em nanoescala permitiram aplicações relevantes nas áreas biológicas e biomédicas. Assim, os nanomateriais têm sido cada vez mais introduzidos na elaboração de plataformas sensoras nanoestruturadas. Isso porque adicionam a esses biodispositivos características físico-químicas únicas e bem controladas. Nanomateriais, tais como nanopartículas, nanotubos, nanofibras e nanocompósitos são amplamente utilizados introduzindo características-chaves aos biossensores. A variedade dessas estruturas possibilita diversas alternativas de modificações interfaciais que proporcionam a ampliação do sinal analítico, aumento de sensibilidade, seletividade, estabilidade e reprodutibilidade dos biossensores (FRÍAS et al., 2015; FARKA et al., 2017; MADURAIVEERAN; SASIDHARAN; GANESAN, 2018; GHOLIVAND; AKBARI, 2019).

Materiais como os polímeros também são utilizados na elaboração de plataformas sensoras. Esse material tem capacidade de fornecer uma matriz ideal para a formação de camadas automontadas com imobilização de biomoléculas ou nanomateriais com elevada biocompatibilidade e estabilidade. Um exemplo de excelente aplicabilidade é a utilização de polímeros condutores (PC) em biossensores de transdução eletroquímica. Esses PCs agregam qualidades físico-químicas significativas como elevado trânsito de elétrons que

proporciona uma maior sensibilidade de detecção final do sensor (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; VELASCO; ROMO; DURAN, 2019).

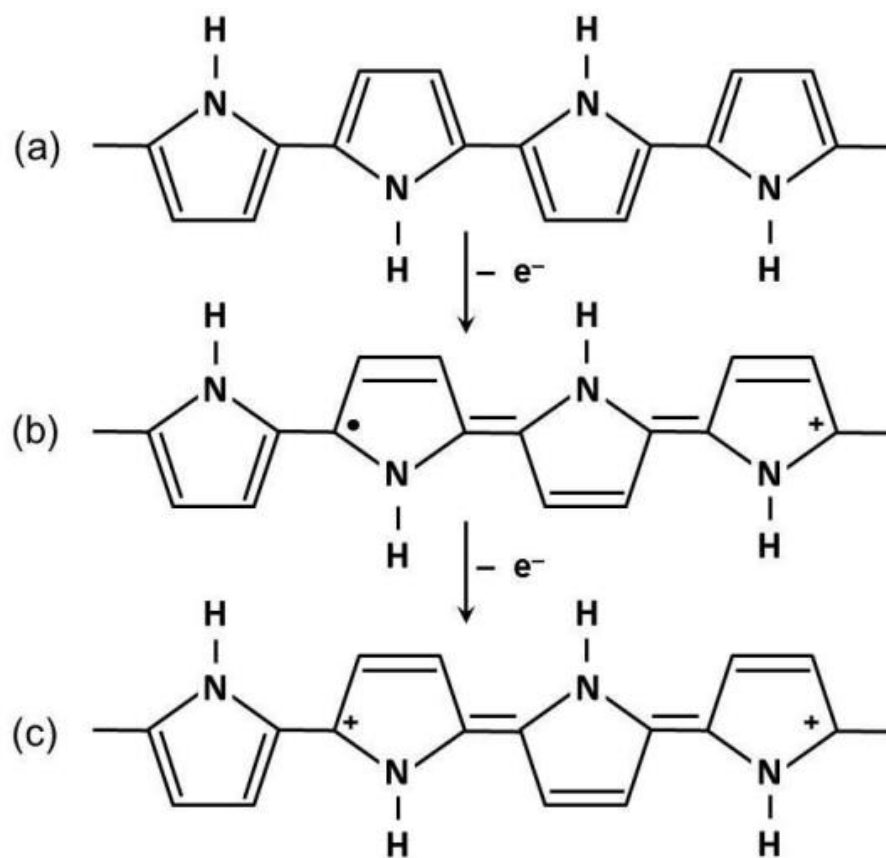
2.4.1 Polímeros Condutores

Os polímeros condutores podem também ser chamados de polímeros conjugados dopados ou ainda polímeros intrinsecamente condutores (ICP). Devido aos elevados valores de condutividade alguns polímeros podem até ser chamados de metais sintéticos (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; CHEN; CHATTERJEE, 2013). O poliacetileno foi primeiro polimerizado em 1974 por Shirakawa et al, e logo após descrito em 1977 com condutividade comparada a metais (CHIANG et al., 1977; CHIEN, 2012). A utilização desses polímeros tem sido objeto de diversas pesquisas devido ao vasto potencial em aplicações tecnológicas.

O aumento de condutividade do material utilizado quando polimerizado está relacionado a dopagem sofrida pelo polímero, sendo a dopagem um processo baseado em uma reação redox. Essa propriedade elétrica ocorre por conta da organização estrutural do polímero em um sistema de cadeias conjugadas, ou seja, com alternância de ligações simples e duplas. A condução elétrica acontece porque os elétrons de caráter π são facilmente removidos ou adicionados às cadeias formando o íon polimérico via reação de oxidação-redução, processo de dopagem (Figura 7).

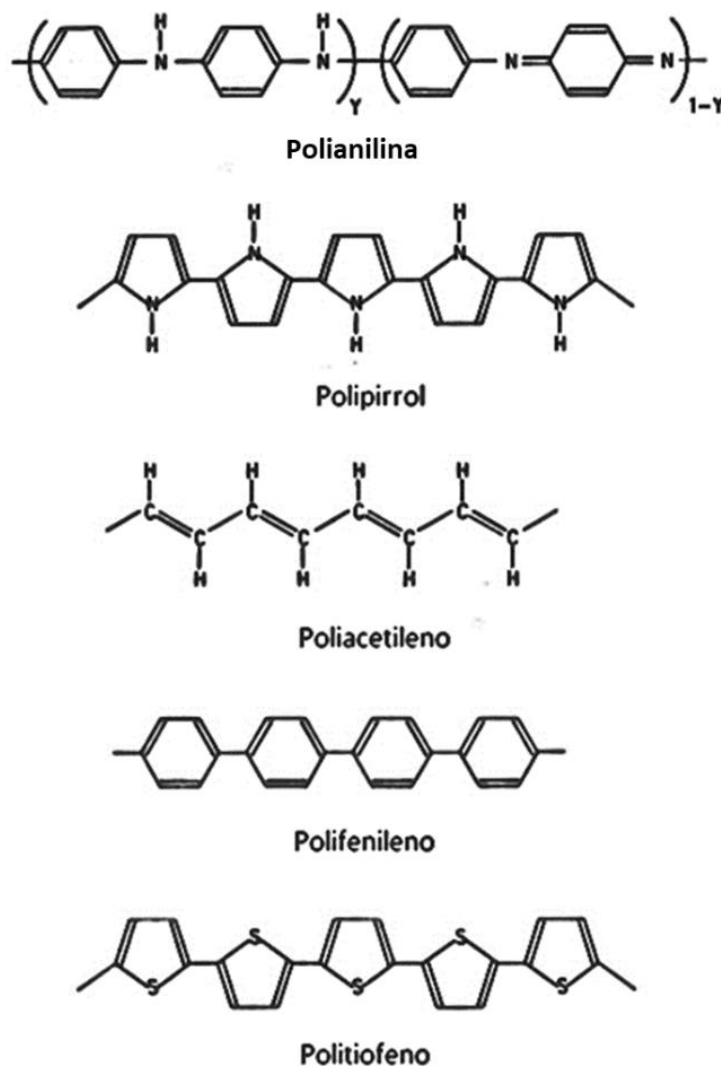
As mudanças elétricas no processo de transição eletrônica não afetam a estrutura de ligações que mantém o polímero. Por conta disso, os ICPs possuem propriedades importantes tais como baixo potencial de ionização, elevada afinidade eletrônica e propriedade mecânica diferenciadas. Devido a esses atributos os polímeros conjugados aumentaram as possibilidades de modificação da superfície dos eletrodos convencionais, fornecendo alternativas novas e interessantes. Alguns dos polímeros mais utilizados em biossensores são a polianilina, politiofeno e o polipirrol (Figura 8) (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; SALVATIERRA, 2010; SILVA et al., 2016).

Figura 7. Processo de dopagem e desdopagem do polímero condutor polipirrol e seus estados : (a) neutro (b) polaron e (c) bipolaron.



FONTE: Adaptada de LIMA et al., 2018.

Figura 8. Estrutura de alguns polímeros condutores comumente utilizados em biossensores.



Fonte: Adaptada de GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002.

2.4.1.1 Filme de polipirrol

Dentre os polímeros condutores, o polipirrol (PPy) tem sido muito utilizado na produção de biossensores principalmente pela capacidade de minimizar o problema de sensibilidade em baixas concentrações do analito e aumentar a estabilidade do sistema (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; VELASCO; ROMO; DURAN, 2019). O PPy tem condutividade entre 10^{-4} e 10^{-2} Scm^{-1} e propriedades redox ativo, em temperatura ambiente, troca iônica, forte absorção de gases, proteínas, DNA, atividade catalítica e proteção contra corrosão. Porém essas habilidades são determinadas pela forma de síntese do polímero.

(RAMANAVIČIUS; RAMANAVIČIENĖ; MALINAUSKAS, 2006; VELASCO; ROMO; DURAN, 2019).

O filme de PPy pode ser sintetizado através da polimerização química, eletroquímica ou por fotoindução, porém para aplicação em biodispositivos a polimerização eletroquímica é mais proveitosa. Isso se deve porque a eletropolimerização do PPy gera um filme uniforme além de permitir o controle de espessura. Outra vantagem oferecida pelo PPy é que sua síntese por via eletroquímica permite a deposição direta do polímero na superfície do eletrodo (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; VELASCO; ROMO; DURAN, 2019; KHODER; KORRI-YOUSSOUFI, 2020). Em outra perspectiva, o PPy é um excelente material para a formação de nanocompósitos e imobilização de biomoléculas (VELASCO; ROMO; DURAN, 2019).

Loguercio e colaboradores (2021) utilizaram as propriedades eletrocatalíticas do PPy somadas a nanopartículas de ouro (AuNPs) em um nanocompósito para estruturação de um biossensor enzimático. Neste trabalho a propriedade catiônica do PPy possibilitou uma excelente imobilização enzimática por meio de interação eletrostática resultando em uma alta densidade de enzimas ativas imobilizadas. Por meio desta configuração o biossensor enzimático foi direcionado a detecção do pesticida carbaril com limite de detecção (LOD) de $0,033 \text{ ng.mL}^{-1}$ (LOGUERCIO et., 2021). Um dispositivo *point-of-care* foi desenvolvido por meio de impressão molecular utilizando o PPy para detecção α -amilase como marcador de estresse. O PPy foi escolhido como polímero de impressão devido a sua elevada biocompatibilidade e fácil eletropolimerização. Desta forma por um passo simples de utilização do PPy foi possível sintetizar um bioreceptor artificial com elevada especificidade para o alvo proporcionando um LOD de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$ (REBELO et al., 2021).

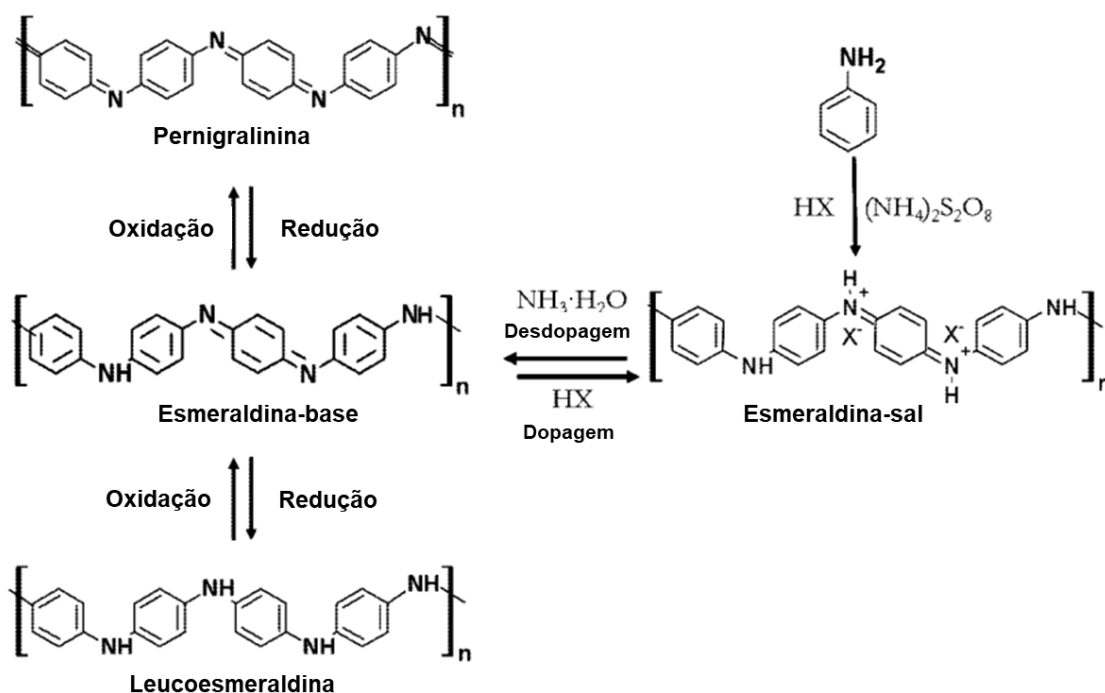
2.4.1.2 Filme de polianilina

A polianilina (PANI) é um típico polímero condutor que apresenta inúmeras vantagens, como condutividade elevada e ajustável, comportamento eletroquímico reversível e com síntese de baixo custo. Assim como o filme de PPy, o filme de PANI também pode ser obtido por meio de síntese química, fotoindução e polimerização eletroquímica. Entretanto, as propriedades

estruturais, morfológicas, químicas e elétricas da PANI são fortemente dependentes de seu estado de dopagem ou desdopagem (LI; HUANG; KANER, 2009; KAZEMI et al., 2021).

A condutividade da polianilina aumenta reversivelmente à dopagem, desta forma o estado de base não dopada se encontra a forma pouco condutora e no estado de sal completamente dopado se encontra a forma condutora. Deste modo, a condutividade da PANI pode ser ajustada quimicamente ou eletroquimicamente pela alteração do estado de oxidação (Figura 9) (LI; HUANG; KANER, 2009; LI; GONG, 2020). A esmeraldina é o estado em que a PANI apresenta condutividade elétrica quando dopada em meio ácido, sendo a dopagem controlada pelo pH da solução dopante. Diante dessas características a PANI possui uma aplicabilidade extremamente versátil sendo utilizada em biossensores, supercapacitores, diodos emissores de luz, transistores de efeito de campo, células fotovoltaicas, células de biocombustível, proteção contra corrosão, membranas, dispositivos de células solares e baterias recarregáveis (YILMAZ et al., 2020; KAZEMI et al., 2021).

Figura 9. Estados de oxidação da polianilina em formas dopadas e desdopada.



Fonte: (LI; HUANG; KANER, 2009).

Ranbajar e colaboradores (2019) elaborou um dispositivo para detecção *Escherichia coli* utilizando uma configuração simples com eletropolimerização do filme de PANI. Devido as propriedades de elétricas e ópticas dos diferentes estados de oxidação da PANI foi possível realizar a avaliação do biossensor por meio da técnica eletroquímica de voltametria de pulso diferencial e também por alteração de cor. Por meio de uma simples análise óptica o dispositivo poin-of-care apresentou um LOD de 10^1 UFC.mL⁻¹ (RANBAJAR e al., 2019). Soni e colaboradores (2019) sintetizou uma nanoestrutura híbrida de PANI e MoS² (dissulfeto de molibdênio) que apresentou uma elevada performance eletrocatalítica e biocompatibilidade. Os nanocompositos PANI-MoS² foram utilizados para nanoestruturação de um genossensor para detecção da leucemia mielóide crônica apresentando LOD de 3×10^{-18} M (SONI et al., 2019).

2.4.2 Pontos Quânticos

Os pontos quânticos (QD do inglês *quantum dots*) são definidos como materiais semicondutores em tamanho nanométrico sendo nanopartículas ou nanocristais que apresentam confinamento quântico nas três dimensões espaciais. O confinamento quântico ocorre quando a partícula apresenta seu diâmetro menor que o raio de excitação de Bohr, e assim a movimentação dos elétrons fica restrita a regiões mínimas. Esse processo ocorre no momento da transição de elétrons (e) onde no processo de excitação um e salta da banda de valência para a banda de condução deixando um buraco. Ao retornar para a banda de valência ocorre a emissão de energia por fotoluminescência. Após esse processo o par elétron-buraco tendem a continuar atraídos fazendo com que essa distância seja chamada de raio de excitação de Bohr (BERA et al., 2010; GÜÇLÜ et al., 2014).

Devido a esse fator, o tamanho do QD tem relação inversa com o grau de confinamento e esta propriedade permite controlar o *band gap* e comprimento de onda de emissão. Desta forma, os pontos quânticos são nanomateriais extremamente versáteis em aplicações sendo utilizados em biomarcação, bioimagem, entrega de drogas e fotocatalise (BERA et al., 2010; GÜÇLÜ et al., 2014). Além disso, a natureza de semicondutor dos pontos quânticos proporcionam uma boa transferência de elétrons sendo atrativos quando

aplicados em biossensores de transdução eletroquímica. Em adição, também contribuem na elevação da área superficial e fornecimento de grupos químicos para ancoragem de biomoléculas com elevada biocompatibilidade. Devido essas propriedades físico-químicas atrativas os QDs vem sendo introduzidos na nanoestruturação de biodispositivos sensores contribuindo na transferência de carga e reação redox em técnicas eletroquímicas (GARCÍA-MENDIOLA et al., 2018; FARIDBOD; SANATI et al., 2019; POTHIPOR et al., 2021).

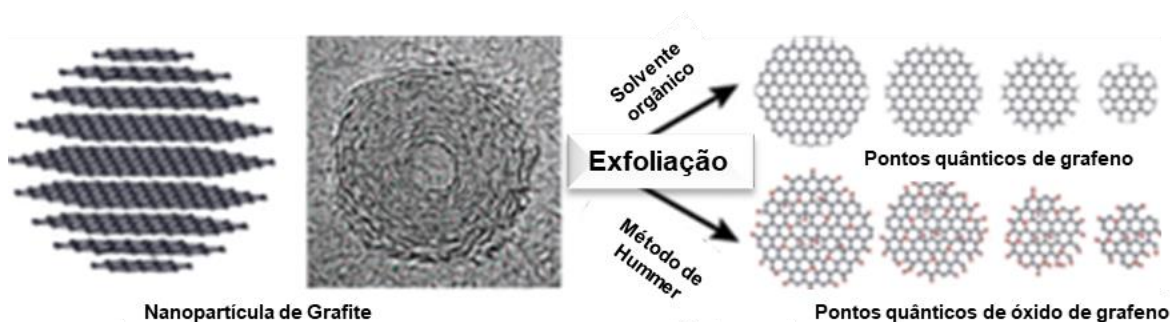
2.4.2.1 Pontos quânticos de grafeno

Os pontos quânticos de grafeno (GQDs do inglês *graphene quantum dots*) são pequenos fragmentos folhas de grafeno com propriedades de semicondutor. Os GQDs normalmente têm dimensões na faixa de tamanho abaixo de 20nm de diâmetro, entretanto, o confinamento quântico pode ser observado em qualquer fragmento. Características importantes deste material nanométrico é que são originários do carbono, sendo de matéria prima abundante, além da não toxicidade e elevada solubilidade em vários solventes. As bordas dos GQDs podem ser modificadas com grupos funcionais carboxil, carbonil e hidroxil possibilitando assim imobilização de biomoléculas e formação de camadas automontadas, elevando a aplicabilidade deste nanomaterial (BACON et al., 2014).

Os pontos quânticos de grafeno podem ser sintetizados principalmente por dois métodos: *top-down* e *bottom-up*. Na síntese *top-down* é realizada a exfoliação de materiais no seu volume natural a base de grafeno, como o grafite, com várias etapas. Além disso, são utilizados ácidos concentrados, agentes fortes ou altas temperaturas. Outros materiais utilizados para esta síntese são o grafeno, fibras de carbono, nanotubos de carbono, óxido de grafeno. A exfoliação realiza uma decomposição no material gerando fragmentos de diversos tamanhos (Figura 10). A principal desvantagem deste métodos de síntese é a falta de precisão do tamanho dos GQDs gerados (LIU et al., 2013; BACON et al., 2014). O método *bottom-up* se baseia na utilização de compostos aromáticos policíclicos ou moléculas com estruturas aromáticas que por meio de reações químicas ou montagem de pequenos blocos são formados os pontos quânticos. Esta técnica utiliza principalmente fulerenos e apesar de ser mais complexa

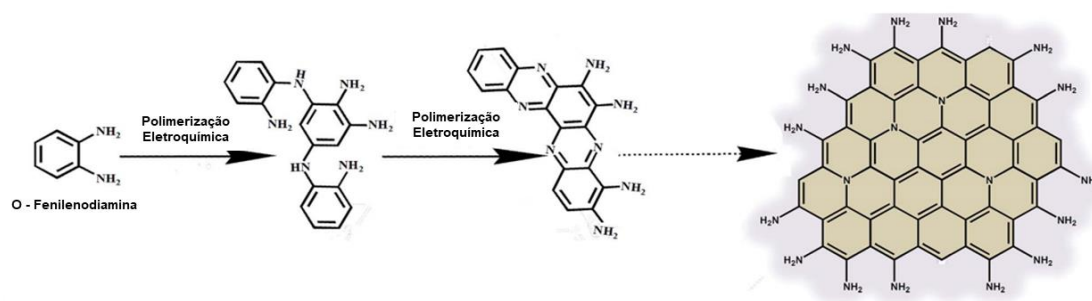
permite o controle do tamanho final e modificações funcionais das bordas dos GQDs (Figura 11) (BACON et al., 2014; GÜÇLÜ et al., 2014; TIAN et al., 2016).

Figura 10. Processo de síntese *top-down* dos pontos quânticos de grafeno a partir de nanopartícula de grafite.



Fonte: Adaptada de LIU et al., 2013.

Figura 11. Processo de síntese *bottom-up* de pontos quânticos de grafeno aminados a partir de eletropolimerização da orto-fenilenodiamina.



Fonte: Adaptada de TIAN et al., 2016.

Yang e colaboradores (2011) desenvolveram um imunossensor eletroquímico nanoestruturado com GQD para a detecção de PSA (antígeno prostático específico). O GQD adicionou propriedades eletroquímicas como boa transferência de elétrons, além de fornecer grupos funcionais para imobilização do anticorpo bioreceptor (YANG; JAVADI; GONG, 2011). Pothipor e colaboradores (2021) trouxe um sistema de análise multiplex de microRNAs utilizando AuNPs, GQD e óxido de grafeno. A união desses nanomateriais colaborou para a performance bioanalítica do sensor assim como para a imobilização da sequência de oligonucleotídeos resultando em um LOD em femtomolar de 0,04 fM, 0,33 fM e 0,28 fM (POTHIPOR et al., 2021).

2.5 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

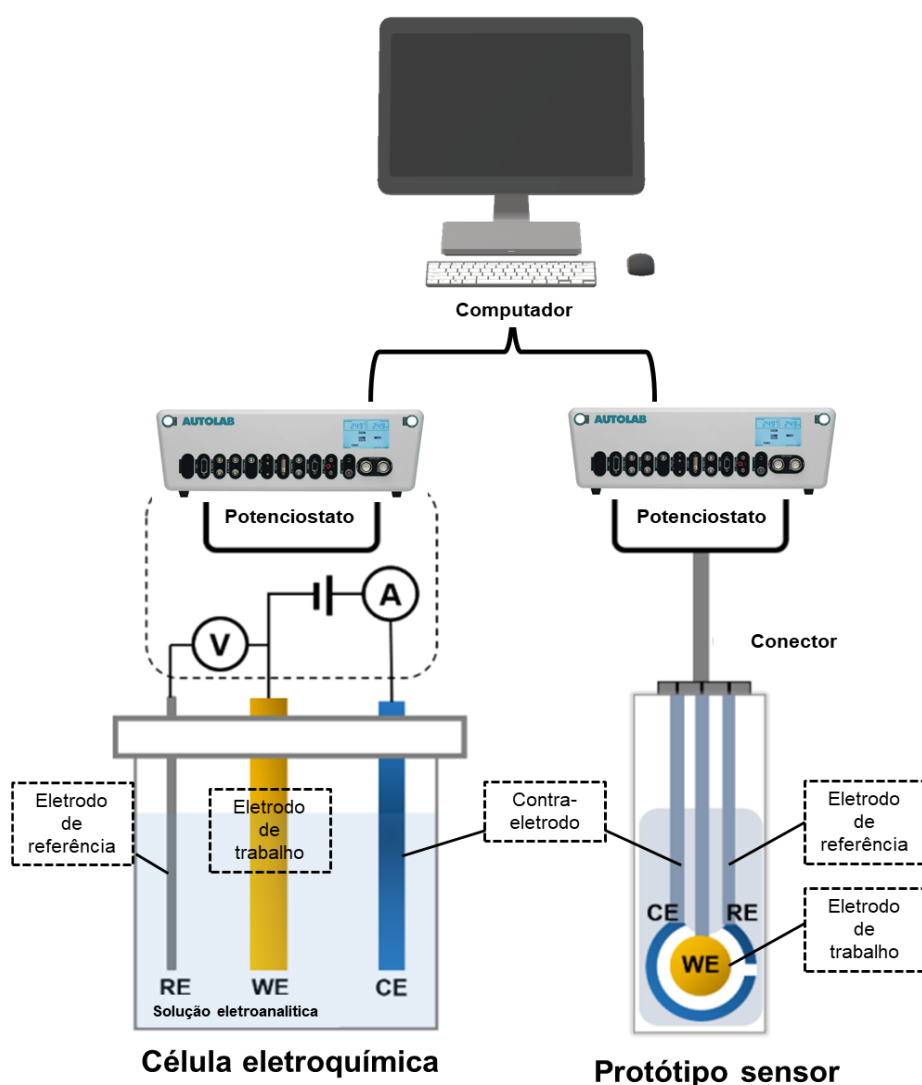
As técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica (VC) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) são as mais utilizadas e difundidas na construção de biossensores eletroquímicos, pois são capazes de examinar as propriedades interfaciais da superfície do eletrodo. Em adição, comparada à maioria das técnicas analíticas, os métodos eletroquímicos são compatíveis com produção em massa e tecnologias de microfabricação. Além disso, outros métodos de detecção envolvem ferramentas caras de transdução de sinal em comparação com a detecção eletroquímica que resulta em sinais eletrônicos direto (KREJCOVA et al., 2017; MAHMOODI et al., 2019; RASOULI et al., 2018).

O sistema eletroquímico é baseado em um jogo de eletrodos composto por eletrodo de trabalho, referência e contra-eletrodo imersos em uma solução eletrolítica, que possui as sondas redox, dentro de uma célula eletroquímica. Esses componentes são conectados ao equipamento eletroquímico, geralmente um potenciostato/galvanostato, que repassa os dados das medidas realizadas para um computador permitindo a análise através de gráficos ou extração de componentes (Figura 12). O papel da sonda redox é fornecer e receber os elétrons nas reações de oxidação e redução na mensuração eletroquímica. O eletrodo de referência é responsável por fornecer um potencial proporcional que garante estabilidade da mensuração eletroquímica. O contra-eletrodo, também chamado de auxiliar, é responsável pela fonte da corrente elétrica aplicada sobre o eletrodo de trabalho. O eletrodo de trabalho atua como detector da reação redox e em sua superfície é construído a camada automontada onde o bioreceptor é imobilizado (DAMIATI; SCHUSTER, 2020).

Na construção de genossensores são necessárias técnicas que possibilitem a avaliação da hibridação, rápido tempo de resposta, além de facilidade de montagem de sistemas multiplex, gerando um impacto significativo no diagnóstico. As VC e EIE, apresentam essa atratividade por possuírem vantagens significativas na utilização de ácidos nucleicos considerando sua capacidade na medição de sinais eletroquímicos com potencial de redução específico (PIVIDORI; MERKOCI; ALEGRET, 2000; RONKAINEN et al., 2010; LU et al., 2019). Dessa forma, nos sensores eletroquímicos de DNA a hibridação

rápida e reversível da ssDNA (sequência simples de DNA) e do ácido nucleico alvo permite a regeneração do genossensor detectada por métodos eletroquímicos de forma simples, mantendo a sua estabilidade (KREJCOVA et al., 2017; MAHMOODI et al., 2020; RASOULI et al., 2018).

Figura 12. Modelo de célula eletroquímica e protótipo com conjunto de eletrodo trabalho (WE), eletrodo de referência (RE) e contra eletrodo (CE) e sistema de captação e processamento de sinal.



Fonte: Adaptada de DAMIATI; SCHUSTER, 2020.

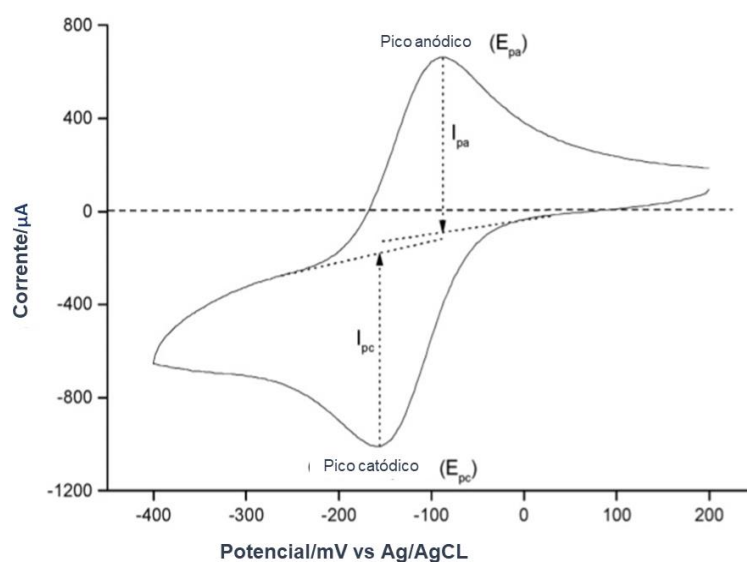
2.5.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é baseada na aplicação uma diferença de potencial sobre o eletrodo de trabalho e referência e se mede a corrente elétrica gerada

entre o eletrodo de trabalho e contra-eletrodo. A corrente elétrica gerada é resultado da eletrólise das espécies eletroativas por meio da reação de oxidação e redução eletroquímica entre a superfície do eletrodo de trabalho e a solução eletroanalítica. O potencial de varredura utilizado varia linearmente em relação ao tempo com uma forma de onda triangular sendo a taxa de varredura uma das variáveis mais importantes na voltametria, pois controla a escala de tempo do experimento. Assim, o voltamograma é uma exibição de corrente (eixo vertical) versus o potencial (eixo horizontal) que também pode ser utilizado como eixo do tempo (Figura 13) (HEINZE, 1984; LOJOU; BIANCO, 2006; RONKAINEN et al., 2010; AVELINO, 2017; KREJCOVA et al., 2017).

Através da resposta voltamétrica é possível fornecer uma interpretação quantitativa de todas as variantes importantes de processos eletroquímicos. Além disso, métodos numéricos modernos e simples facilitam o cálculo das curvas voltamétricas em processos eletroquímicos complexos permitindo a avaliação da magnitude das correntes de pico (I_{pa} - anódicas e I_{pc} - catódicas) e dos respectivos potenciais de pico (HEINZE, 1984; LOJOU; BIANCO, 2006; RONKAINEN et al., 2010; AVELINO, 2017; KREJCOVA et al., 2017).

Figura 13. Voltamograma cíclico resultante, correntes de pico anódicas e catódicas I_{pa} e I_{pc} respectivamente no potencial anódico (E_{pa}) e potencial catódico (E_{pc}).



Fonte: Adaptada de LOJOU; BIANCO, 2006.

Outros parâmetros que podem ser avaliados são o potencial redox, transferência de elétrons e diferentes reações químicas. A transferência de elétrons ocorre na troca de carga entre a superfície do eletrodo de trabalho e as espécies eletroativas da solução eletrolítica, acontecendo nas duas direções da equação de oxidação-redução. Essa transferência é baseada em um mecanismo simples de reação de oxidação e redução dependente do potencial aplicado no eletrodo (HEINZE, 1984; AVELINO, 2017). Abaixo, a equação 1 que corresponde a reação de transferência heterogênea de carga de uma espécie eletroativa (A) ao eletrodo (B) ou vice-versa, sendo A oxidado ou reduzido a B.



Nos experimentos de bioconhecimento as correntes de pico (I_{pc}) são utilizadas para o cálculo do ΔI , que reflete aumento das concentrações das amostras analisadas. O $\Delta I\%$ pode ser calculado utilizando qualquer uma das correntes de pico anódicas ou catódicas. Se leva em consideração o pico da corrente antes e depois do processo de bioconhecimento (Figura 14) (AVELINO et al., 2020). Abaixo se tem a equação 2 utilizada para cálculo do $\Delta I\%$ em ensaios de bioconhecimento. Onde I_a corresponde a corrente depois e I_b antes do bioconhecimento:

$$\Delta I(\%) = \frac{(I_b - I_a)}{(I_b)} \times 100 \quad [2]$$

2.5.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A EIE é uma técnica eletroanalítica bem estabelecida no estudo de modificação de superfícies pois investiga eventos interfaciais com grande estabilidade e perturbações mínimas do sistema (MACDONALD, 1991; FARIA; ZUCOLOTTI, 2019). No ponto de vista teórico a impedância do sistema é obtida por meios diretamente elétricos fornecendo informações de grande valor de forma simplificada sendo assim uma das medidas mais importantes na EIE. A impedância de um sistema é geralmente baseada na aplicação de uma perturbação elétrica em forma de um potencial de pequena amplitude sobre o jogo de eletrodos e detectando a resposta. Esse potencial é aplicado de forma contínua e a resposta elétrica gerada em forma de corrente tem comportamento

senoidal (MACDONALD, 1991; LISDAT; SCHÄFER, 2008; CHANG; PARK, 2010; GASPARYAN et al., 2020). A resposta impedimétrica é obtida em diferentes frequências formando o espectro de impedância que permite a caracterização de superfícies, camadas ou membranas, bem como estudos de biointeração e processos de troca e difusão de íons (CHANG; PARK, 2010; ZUCOLOTTI, 2019; GASPARYAN et al., 2020). Sendo a impedância definida através da equação 3:

$$Z(j\omega) = \frac{V(j\omega)}{I(j\omega)} \quad [3]$$

Onde, Z corresponde a impedância, V é a voltagem, I é a corrente, j corresponde a componente imaginária e ω a frequência. Essas grandezas são consideradas em função do tempo.

É necessário entender que a impedância é composta por componentes resistivos, de indutância e capacitância refletindo um circuito elétrico. A EIE permite a análise de parâmetros como processos de relaxação polar, iônica e dielétrica do sistema eletrolítico e o eletrodo, e na região de dupla camada elétrica. Outros parâmetros-chave de um sistema eletroquímico também podem ser medidos como densidades de corrente, resistência a transferência de carga, capacitâncias de dupla camada (LISDAT; SCHÄFER, 2008; RANDVIIR; BANKS, 2013; GASPARYAN et al., 2020).

A EIE permite a manipulação de números complexos para deduzir valores reais para a impedância sendo dividida de componente real e imaginária (RANDVIIR; BANKS, 2013). Duas equações fundamentais descrevem as impedâncias reais e imaginárias (equações 4 e 5):

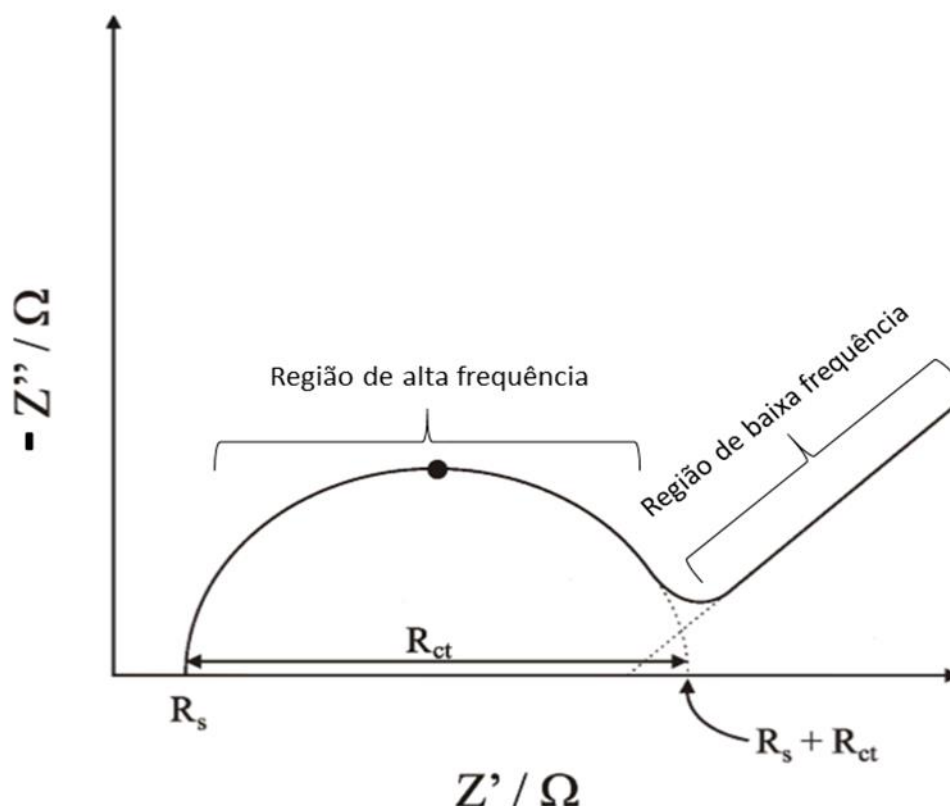
$$Z' = \frac{R_s + R_{ct}}{1 + \omega^2 R_{ct}^2 C_{dl}^2} \quad [4]$$

$$Z'' = \frac{R_{ct}^2 C_{dl} \omega}{1 + \omega^2 R_{ct}^2 C_{dl}^2} \quad [5]$$

Sendo, Z' - componente real, Z'' - componente imaginária, R_s - resistência da solução, R_{ct} - resistência à transferência de carga, ω - frequência angular e C_{dl} - capacitância da dupla camada elétrica. Os dados estudados

podem ser apresentados de várias maneiras, por exemplo, utilizando os componentes de impedância reais e imaginários plotados um contra o outro nos gráficos de Nyquist (Figura 14).

Figura 14. Diagrama de Nyquist onde Z' - componente real e $-Z''$ - componente imaginária.

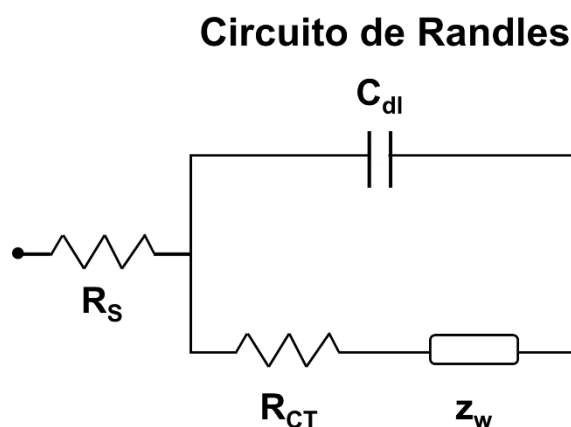


Fonte: Adaptada de RANDVIIR; BANKS, 2013.

Através da combinação dos múltiplos parâmetros impedimétricos como resistência da solução (R_s), resistência à transferência de carga (R_{ct}), frequência angular (ω) e capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}) é possível fazer a simulação dos resultados possibilitando a quantificação desses elementos. Isso ocorre de acordo com a complexidade do sistema proposto onde circuitos elétricos que correspondam ao sistema de camadas desenvolvido são utilizados para uma simulação teórica. Esta simulação teórica é utilizada tanto para obtenção quantitativa dos elementos impedimétricos quanto para comparação dos resultados experimentais aos teóricos permitindo a investigação dos parâmetros com veracidade. O circuito de Randles é um formato simples e amplamente utilizado no desenvolvimento de biossensores e

representa a união dos elementos básicos como R_s , R_{CT} , ω e C_{dl} (Figura 15) (RANDVIIR; BANKS, 2013; BERTOK et al., 2019).

Figura 15. Circuito elétrico de Randles e elementos do circuito: resistência da solução (R_s), resistência à transferência de carga (R_{CT}), frequência angular (ω) e capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}).



Fonte: Adaptada de RANDVIIR; BANKS, 2013.

Dentre os dados que podem ser obtidos através do circuito de Randles, como circuito equivalente, a resistência à transferência de carga (R_{ct}) é muito utilizada em ensaios de bioseletividade e sensibilidade. Isso ocorre, pois, uma relação linear pode ser estabelecida entre o R_{ct} e a concentração do analito sendo assim uma estratégia simples e eficaz (AVELINO et al., 2014; 2020; XU et al., 2020). O R_{ct} é representado pela equação 6:

$$R_{ct} = \frac{RT}{F^2 k^0 C} \quad (6)$$

Onde, R - constante molar do gás, T - temperatura, F - constante de Faraday, C - concentração das espécies eletroativas e k^0 - constante heterogênea da taxa de transferência de elétrons.

Por meio da avaliação gráfica e das grandezas quantitativas obtidas pelas técnicas eletroquímicas é possível acompanhar os principais processos de construção e modificação de superfície de biossensores. Por meio disso é possível avaliar as propriedades interfaciais tanto de nanomateriais quanto de biomoléculas (RONKAINEN et al., 2010; LU et al., 2019)

2.6 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

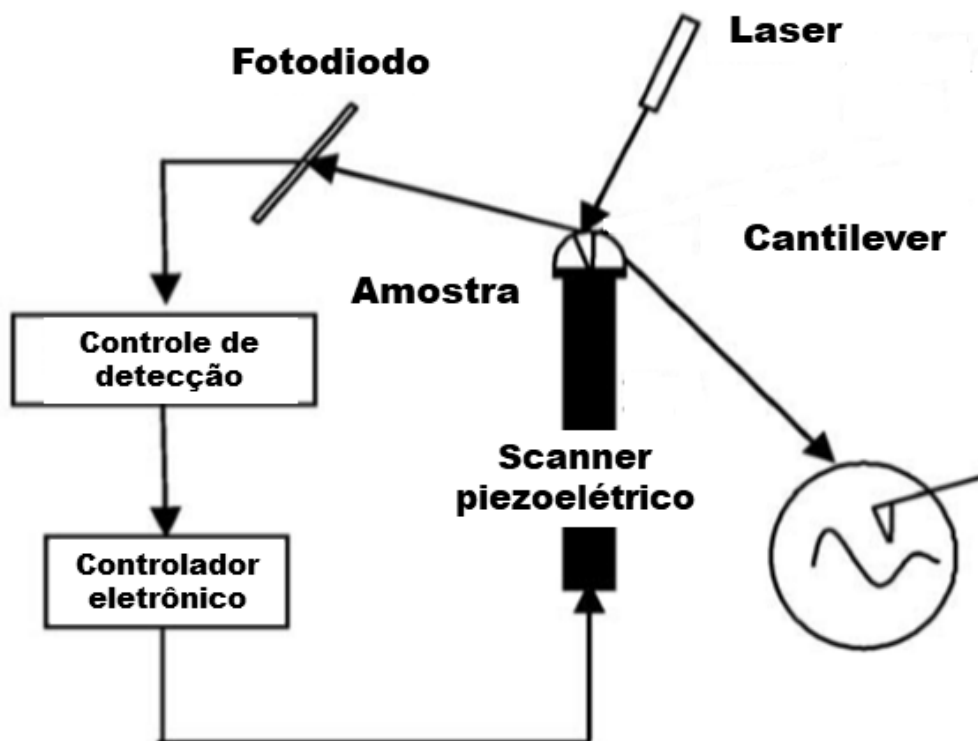
A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica que fornece imagens nas 3 dimensões gerada por uma varredura topográfica de superfícies em escala nanométrica ou subnanométrica. A AFM tem sido utilizada como uma importante ferramenta que possibilita obter a caracterização morfológica e mecânica da superfície, analisar forças intermoleculares com uma resolução atômica sem a necessidade de preparações anteriores das amostras. Essas características possibilitam sua aplicabilidade em diversos tipos de materiais como eletrônicos, semicondutores, polímeros, sistemas biológicos e biomateriais (JALILI; LAXMINARAYANA, 2004; KRIEG et al., 2019; MARINELLO et al., 2019). Além disso, essa técnica microscópica pode ser utilizada para complementar estudos de sistemas biológicos permitindo a observação direta de proteínas únicas nas membranas celulares ou ainda interações entre moléculas de DNA, sem a necessidade de fixação ou marcação química (HANSMA; PIETRASANTA, 1998; HANSMA, 2001). Assim, sua utilização é considerada mais vantajosa do que outras microscopias em estudos de superfície. (JALILI; LAXMINARAYANA, 2004; KRIEG et al., 2019; MARINELLO et al., 2019).

O microscópio de força atômica é constituído por uma sonda cantilever, um laser, fotodiodo e um scanner piezoelétrico (Figura 16) (JALILI; LAXMINARAYANA, 2004; ALSTEENS et al., 2017). O princípio de funcionamento do AFM é baseado na interação da ponta de varredura com a amostra analisada onde a interação dos átomos entre a sonda e a superfície são observadas. De acordo com as ações de atração e repulsão resultantes da varredura da superfície, o raio laser é desviado do cantilever gerando diferenças de intensidade de luz que são detectadas pelo fotodiodo e interpretadas como dados. O movimento da sonda é de forma a contornar a superfície da amostra para cima e para baixo sendo mantido uma força ou altura constante. Essa modulação da força de interação sonda/amostra permite investigar vários aspectos físico-químicos e propriedades da superfície (JALILI; LAXMINARAYANA, 2004; ALSTEENS et al., 2017; MARINELLO et al., 2019).

O AFM possui 3 formas de operação: modo contato, não contato e de contato intermitente (Figura 17). Cada modo possui uma forma diferente de

construção de imagem topográfica relacionada ao tipo de interação da ponta da sonda com a amostra avaliada.

Figura 16. Esquema dos componentes básicos do microscópio de força atômica.

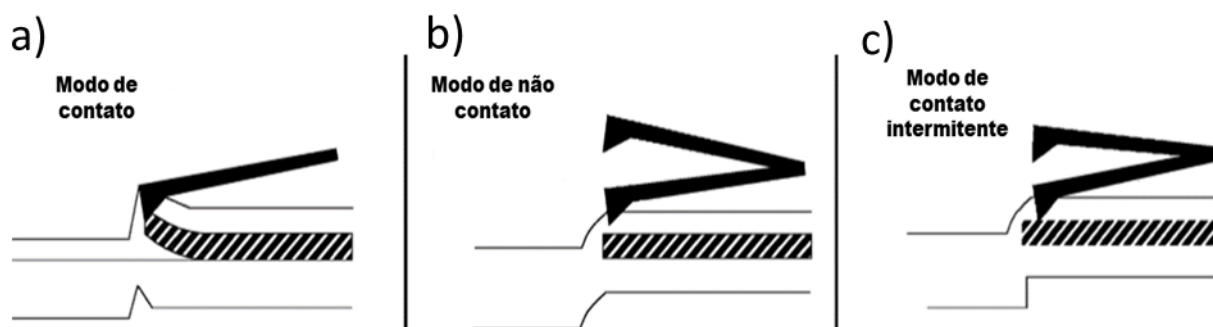


Fonte: Adaptada de JALILI; LAXMINARAYANA, 2004.

A forma de interação é alterada com a modificação da constante elástica e frequência de vibração da ponta da sonda. No modo contato as interações são analisadas quando a ponta da sonda mantém o contato com a amostra sobre uma força ou altura constantes e com uma maior constante elástica para suportar o deslocamento vertical da ponta conforme as forças de repulsão, principalmente por interações eletrostáticas são geradas (Figura 17.a). No modo não contato a ponta é mantida a uma distância da amostra, a varredura ocorre de forma leve sobre a superfície onde a interação de atração, por forças de Van der Waals principalmente, gera oscilação da frequência natural do cantilever possibilitando a extração dos dados. Outras interações também são dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio (Figura 17.b). No modo de contato intermitente a sonda varia entre momentos de contato e não contato variando a frequência e constante elástica permitindo uma análise ampla da superfície (Figura 17.c) (GIESSIBL, 2003;

JALILI; LAXMINARAYANA, 2004; KRIEG et al., 2019.

Figura 17. Sonda cantilever e modo de operação de contato (a), não contato (b) e contato intermitente (c).



Fonte: Adaptada de JALILI; LAXMINARAYANA, 2004.

Diante disso, o AFM é uma ferramenta auxiliar no estudo das superfícies nanoestruturadas em camadas permitindo a análise das forças intermoleculares fornecendo dados importantes no estudo de superfícies modificadas. Além disso fornece imagens que permite avaliar e acompanhar as alterações de rugosidade e altura durante o processo de construção do biossensor (HIRATA; YABUKI; MIZUTANI, 2004). Dessa forma, as imagens de AFM têm sido utilizadas na construção de biodispositivos para detecção de genoma viral (AVELINO et al., 2022), diagnóstico de arboviroses como dengue, zika, chikungunya e febre amarela (SIMÃO et al., 2020), análise de bactérias contaminantes em amostras de água (RENGARAJ et al., 2018) e ainda biossensores enzimáticos (ARIKAN et al., 2022).

3 JUSTIFICATIVA

A leucemia linfóide aguda é a neoplasia hematológica mais recorrente na população pediátrica representando aproximadamente 25% de todos os cânceres diagnosticados. Em 2020 foi estimada cerca de 57.377 casos de LLA infantil entre 0 e 14 anos (WHO, 2020). A leucemia mieloide aguda ocupa segundo lugar de incidência dentre os tipos de leucemia na população infantil entretanto apresenta menores taxas de sobrevida (GLOBOCAN, 2020). O diagnóstico imediato do câncer é de extrema importância no prognóstico impactando significativamente a sobrevida infantil. Por meio da detecção precoce dos oncogenes ligados a quadros de leucemia infantil é possível realizar a estratificação de risco dos pacientes e direcionar a terapêutica de forma eficiente. Entretanto, os métodos convencionais de diagnóstico genético possuem limitações que interpoem a detecção ágil de oncomarcadores. Diante disso, para solucionar essa problemática é necessário o desenvolvimento de novas técnicas que detectem alvos moleculares em tempo real a um baixo custo. Portanto, é de grande valia o desenvolvimento de protótipos genossensores eletroquímicos baseado em polímero condutor e *quantum dots* de grafeno para detecção de oncogenes quiméricos associados à leucemia. Em adição, o trabalho desenvolvido desenvolveu novas ferramentas miniaturizadas e flexíveis capazes de identificar os genes de fusão de interesse na leucemia infantil de forma rápida, sensível, seletiva, com baixo custo e elevada performance bioanalítica. Portanto, os genossensores desenvolvidos apresentam grande relevância no auxílio do diagnóstico da leucemia infantil através de ferramentas genéticas acessíveis à rede pública. Além disso, possui caráter multidisciplinar, associando diversas áreas de conhecimento como a nanotecnologia, biotecnologia e a físico-química interfacial, viabilizando um acréscimo diversificado de conhecimento.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver de um genossensor miniaturizado e flexível baseado em filmes de polímero condutor e *quantum dots* para detecção de oncogenes quiméricos associados à leucemia

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver sistema sensor nanoestruturado aplicável ao diagnóstico com rápida detecção para monitoramento de translocações gênicas associadas a quadros clínicos de leucemia;
- Produzir eletrodos miniaturizados baseados em tiras flexíveis de ITO através de equipamento de corte automatizado;
- Elaborar plataformas de interfaceamento inovadoras compostas por filmes dos polímeros condutores polipirrol e polianilina e *quantum dots* de grafeno, com a finalidade de aperfeiçoar a capacidade de transdução e a performance bioanalítica do sistema sensor;
- Imobilizar fisicamente e quimicamente sondas oligonucleotídicas sobre a área eletroativa de transdutores miniaturizados flexíveis para o biorreconhecimento de oncogenes alvo;
- Avaliar as propriedades interfaciais da superfície eletródica modificada com os filmes poliméricos e os GQD, através do uso de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (DPV);
- Validar o uso das plataformas flexíveis nanotecnológicas para detecção de genes de fusão das translocações cromossômicas 9;22; 15;17; 1;19; 4;11; 17;19 e 12;21.
- Promover ensaios de bioatividade em amostras de plasmídeo e amostras clínicas de pacientes diagnosticados com leucemia e realizar o monitoramento da doença residual mínima durante o tratamento terapêutico para as translocações abordadas;

- Realizar o diagnóstico diferencial frente a genes humanos constitutivos e genomas de microrganismos, tais como vírus da hepatite C (HCV), papilomavírus humano (HPV), *Candida albicans*;
- Avaliar a sensibilidade, seletividade, especificidade e reprodutibilidade do biossensor eletroquímico miniaturizado e calcular o limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LQ).
- Realizar análise estrutural topográfica dos genossensores elaborados por meio da microscopia de força atômica (AFM);

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

Ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), e ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram adquiridos da VETEC (Brasil). As folhas de ITO flexível (PET revestido com óxido de estanho de índio), o ácido clorídrico (HCl), pirrol (98%), anelina (99.5%), *quantum dots* de grafeno (GQD), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-Hidroxisuccinimida (NHS), Tris base e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foram obtidos na Sigma Aldrich Co. (St Louis, USA). Todos os produtos químicos e solventes utilizados são de grau analítico. A água ultrapura usada na preparação das soluções foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q Plus (Billerica, EUA).

Os materiais utilizados nos estudos de bioatividade, como as ssDNA modificadas com grupo amino e não modificadas, plasmídeos e amostras clínicas de cDNA de pacientes diagnosticados com leucemia das translocações t(1;19), t(4;11), t(12;21), t(15;17) e t(17;19), foram gentilmente fornecidos pela Prof^a. Dr^a. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva, do Laboratório de Imunogenética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz (Recife, Brasil). As diluições de todas as amostras biológicas e sondas foram preparadas em solução tampão Tris-EDTA 10mM (pH 8,0) em água livre de nuclease, obtida da Thermo Fisher, e mantidas congeladas.

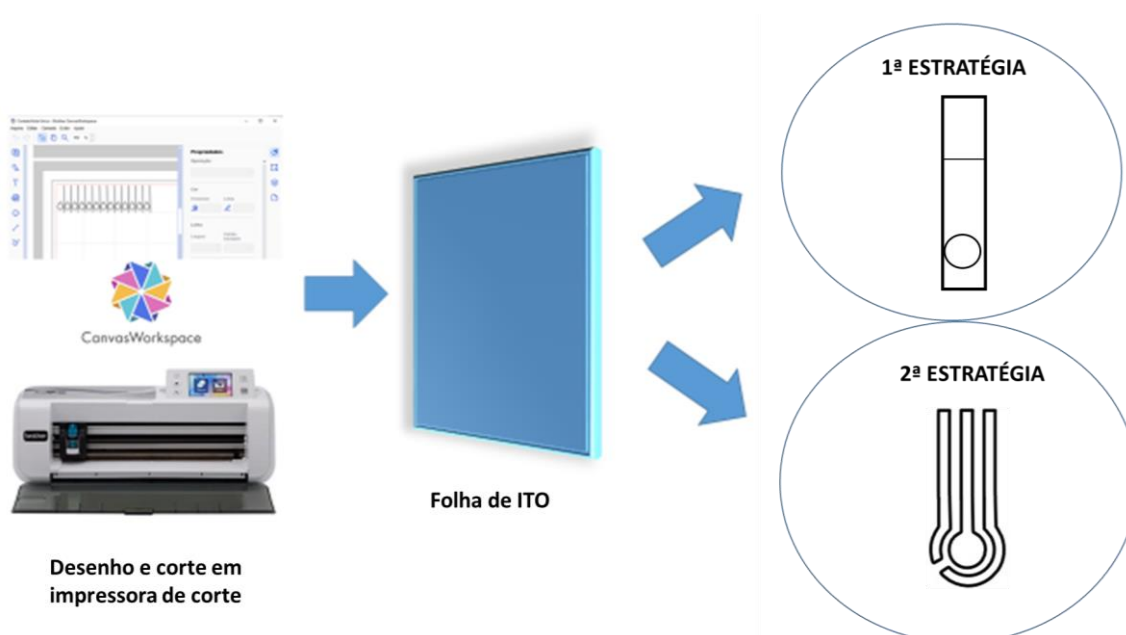
5.2 ESTRATÉGIAS DE ELABORAÇÃO DOS SUBSTRATOS DE CONSTRUÇÃO DOS GENOSSENSORES

Foram confeccionados sobre a superfície do ITO flexível dois tipos de substratos utilizados para elaboração dos genossensores. Os desenhos foram produzidos no *Software Brother Canvas Workspace* Versão 2.6.1 em formato de eletrodo único de tira flexível com 2.18 cm de altura e 5.8 mm de largura e outro com grupo de três eletrodos, sendo um eletrodo de referência, um auxiliar e um de trabalho. Por fim o corte dos eletrodos foi realizado com a impressora de corte automatizado *Brother ScanNCut* CM300 em uma folha de ITO. O

formato de eletrodo único foi utilizado como eletrodo de trabalho em célula eletroquímica convencional onde foi construído os Genossensores Flexíveis (Figura 18).

O substrato flexível com o conjunto de três eletrodos seguiu para o processo de metalização com ouro por 150 segundos com taxa esperada de 0,1 nm/s gerando espessura de 15 nm no equipamento Leica EM ACE 200 no tipo difuso. Após esta etapa, foi retirado o adesivo isolante do ITO da região adjacente ao desenho e a camada de ouro sobre o ITO. A principal diferença entre os dois substratos produzidos é que o primeiro é utilizado como eletrodo de trabalho e o segundo comporta na mesma superfície o conjunto de três eletrodos que compõem uma célula eletroquímica revestido de ouro. Outra distinção realizada foi a imobilização covalente da ssDNA bioreceptora por meio da modificação química em sua extremidade com adição de grupo amina (-NH). Além disso, os protótipos genossensíveis foram voltados apenas para diagnóstico da linhagem linfoblástica da leucemia infantil com as translocações 1;19, 4;11, 12;21 e 17;19 e os Genossensores Flexíveis abordaram LMC e LLA.

Figura 18. Processo de confecção dos substratos utilizados para construção dos genossensores.



Fonte: Próprio autor.

5.3 NANOARQUITETURAÇÃO DOS GENOSENSORES

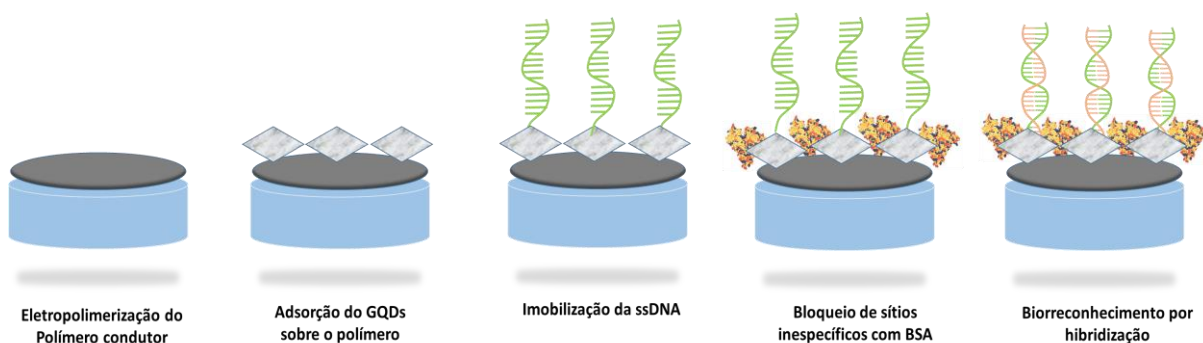
5.3.1 Estudos dos parâmetros de eletropolimerização dos polímeros condutores

Foram realizados estudos dos parâmetros de síntese eletroquímica dos polímeros condutores polianilina (PANI) e polipirrol (PPy). Foram utilizados 10 ciclos de eletropolimerização por meio da VC para definir o número ideal de ciclos de polimerização para a formação dos filmes. Para a formação do PPy sobre as superfícies foi utilizada uma solução de ácido clorídrico 0,5 M contendo o monômero pirrol com concentração de 30 mM. Foram aplicados seis ciclos de eletropolimerização com faixa de potencial de -0,2 - +0,7 V e velocidade de varredura de 100 mV.s⁻¹. Para a formação do filme de PANI foi utilizada uma solução de ácido sulfúrico 0,5 M e 0,25M de anilina. Seis ciclos de eletropolimerização na faixa de potencial de -0,8 - +1,0 V e velocidade de varredura 100mV.s⁻¹ foram aplicados. Em adição para a obtenção do PANI também foram realizados estudos com diferentes faixas de potencial para cada estado de oxidação do polímero.

5.3.2 Automontagem e imobilização da ssdna para translocações de interesse

Após a obtenção do filme polimérico nos dois tipos de substratos desenvolvidos, foi gotejado 4μL do GQD sobre a superfície por 5 minutos. Em seguida, para a ativação dos grupos carboxílicos dos GQD foi utilizada uma solução de EDC/NHS (1:1) com 0,4M de EDC e 0,1M de NHS por 30 minutos. Com a superfície seca 4μL da ssDNA foi adicionada para cada translocação alvo por 20 minutos, 1nM para o substrato flexível e 10pM para o protótipo metalizado. Por fim se utilizou o BSA (1% e pH 7,4) por 30 segundos para o bloqueio de possíveis sítios inespecíficos (Figura 19). Cada etapa de modificação foi caracterizada por meio da VC e EIE para o substrato flexível e DPV e EIE para o protótipo metalizado.

Figura 19. Descrição das etapas de montagem do genossensor flexível e protótipo genossensível.



Fonte: Próprio autor.

5.4 TESTES DE BIORRECONHECIMENTO

Nos testes de biodeteção foram utilizadas amostras de plasmídeo para cada translocação avaliada, t(1;19), t(4;11), t(12;21), t(15;17) e t(17;19). Também foram utilizadas amostras de cDNA pacientes para cada translocação. As amostras foram diluídas em TE (10mM e pH 8,0) e mantidas congeladas. Para a execução dos testes de biorreconhecimento se aqueceu uma alíquota da amostra em banho a -97°C por 1 minuto para a desnaturação do DNA com abertura da fita dupla do DNA e adicionado 4 μL sobre a superfície do genossensor. Após 15 minutos de hibridização os genossensores foram exaguados com água deionizada e caracterizados eletroquimicamente.

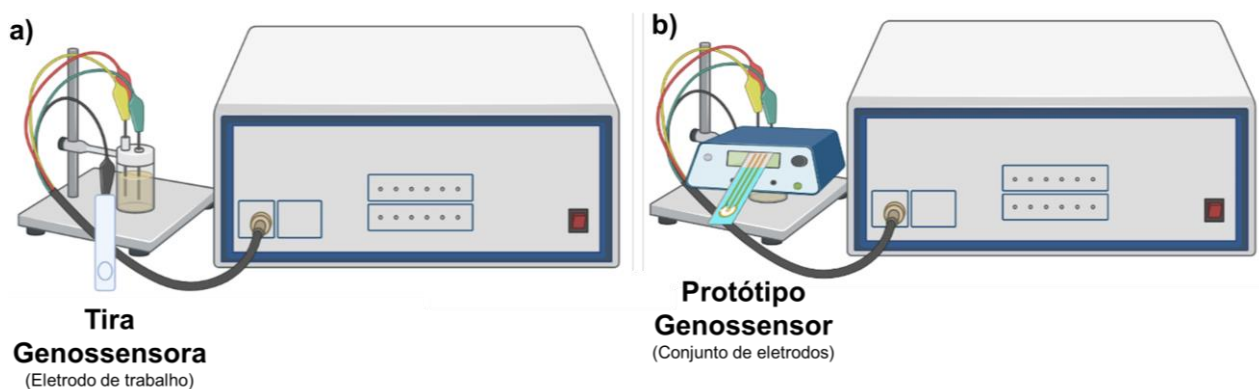
5.5 TESTE DE ESPECIFICIDADE

Nos testes de especificidade foi utilizada uma solução controle negativo composto por genoma de *Candida albicans*, HPV 33 e vírus da hepatite C (HCV) (1:1:1) cada genoma na concentração de 100 pg. μL^{-1} . Foram utilizados 4 μL do MIX sobre a superfície dos genossensores, e para isso a amostra negativa foi aquecida em -97°C por 1 minuto para propiciar a desnaturação do DNA. Após 15 minutos de hibridização, em temperatura ambiente, os genossensores foram exaguados com água deionizada e caracterizados eletroquimicamente.

5.6 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

Os experimentos de VC, DPV e EIE foram realizados após cada etapa de montagem e ensaios de biorreconhecimento dos biodispositivos genossensíveis na presença de uma solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$) (1:1 em pH 7,0) como indicador redox. Em adição, nos testes com a tira genossensora flexível foi utilizada uma célula eletroquímica composta por três eletrodos acoplados a um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 128N. O substrato flexível foi utilizado como eletrodo de trabalho, o eletrodo de Ag/AgCl saturado com KCl a 3M como eletrodo de referência e o eletrodo de platina como contra-referência. Para o protótipo genossensível composto por eletrodos de ouro o eletrodo central foi utilizado como eletrodo de trabalho e os eletrodos adjacentes como referência e auxiliar. O sinal eletroquímico foi obtido recobrimdo os eletrodos com 20 μ L da solução eletroanalítica. Desta forma os eletrodos foram acoplados ao Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 128N por meio de uma caixa contato, desenvolvida em parceria com a empresa Salvus Tecnologia LTDA, que permite a ligação entre o protótipo genossensor e o Autolab PGSTAT 128N. Todas avaliações eletroquímicas foram feitas em triplicatas para o acompanhamento da reprodutibilidade do sistema. Na figura 20 é descrito a forma de obtenção de sinal de ambos genossensores.

Figura 20. Formas de obtenção do sinal eletroquímico do genossensor em tira (a) e do protótipo genossensor (b).



Fonte: Próprio autor

5.7 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

O estudo topográfico das etapas iniciais de montagem da plataforma sensora foram realizados através de um microscópio de força atômica SPM-9500 (Shimadzu, Japão). As imagens em três dimensões da AFM foram adquiridas por meio de um cantilever de silício com revestimento de alumínio sendo a frequência de ressonância 75 kHz em uma força constante de 3 N m^{-1} (Multi 75AL, NCHR). A obtenção das medidas topográficas foi realizada, com a configuração do microscópio, no modo de não contato em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). A resolução lateral foi definida em 512×512 pixels em uma área de varredura de $5 \times 5 \text{ }\mu\text{m}$. Por fim, as imagens foram processadas e analisadas utilizando o Software Gwyddion.

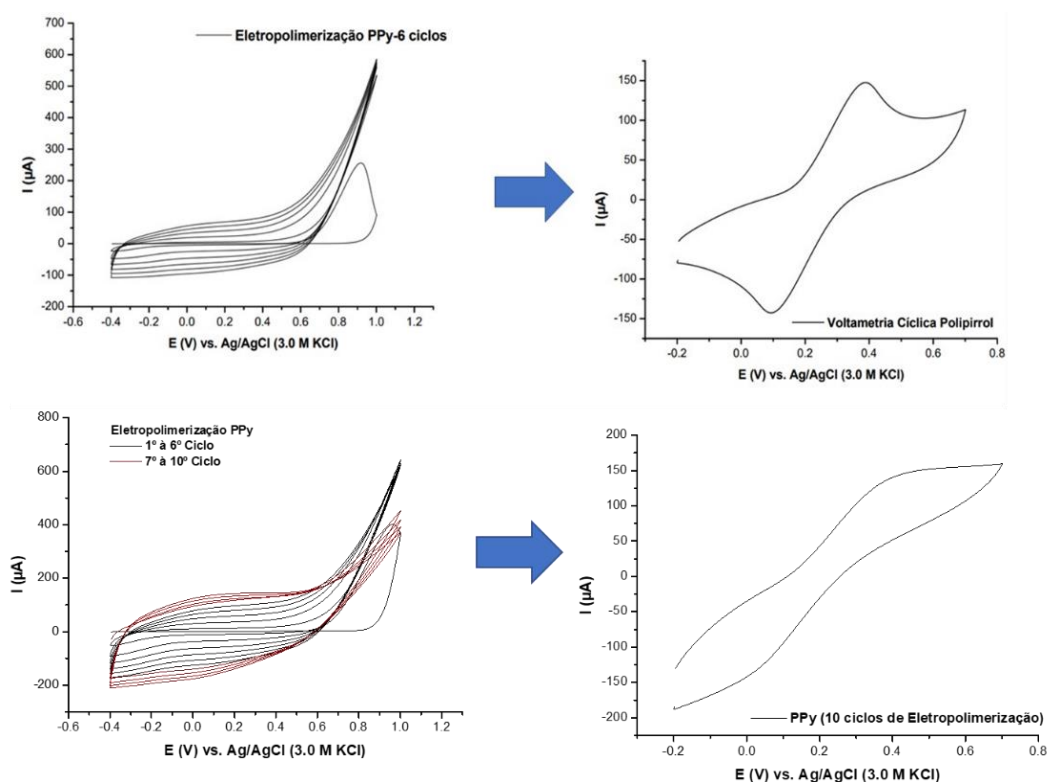
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 GENOSENSOR EM TIRA FLEXÍVEL

6.1.1 ESTUDOS DOS PARÂMETROS DE ELETROPOLIMERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS CONDUTORES

Para um melhor direcionamento da estruturação do nanossistema biossensível a princípio foram estudadas duas estratégias de modificação e construção na superfície de ITO (óxido de índio e estanho). Para isso foram realizados estudos dos parâmetros de síntese eletroquímica dos polímeros condutores polianilina e polipirrol. Foram utilizados 10 ciclos de eletropolimerização por meio da VC para definir o número ideal de ciclos de polimerização para a formação dos filmes (Figura 21 e 22). Na avaliação do filme de PPy o 6º ciclo foi estabelecido como ideal por apresentar os maiores valores de correntes de pico e formação de uma camada polimérica visível (Figura 21).

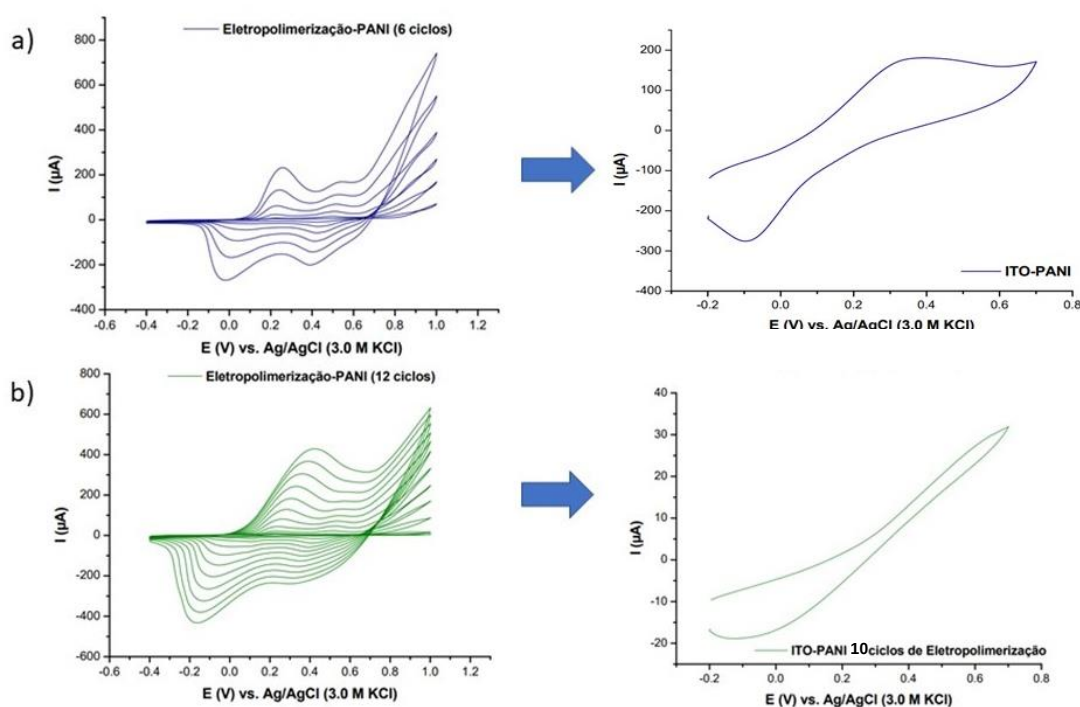
Figura 21. Voltamogramas cíclicos referentes a polimerização eletroquímica do PPy.



Fonte: Próprio autor.

No estudo com a PANI se observou que a partir do 7º ciclo de eletropolimerização o estado de oxidação do filme era alterado modificando assim sua resposta eletroquímica. Além disso, a resposta da voltametria cíclica (VC) perdeu sua característica de reversibilidade não apresentando correntes de pico aparentes (Figura 22b). Portanto, o 6º ciclo foi estabelecido como ideal (Figura 22a).

Figura 22. Voltamogramas cíclicos referentes a polimerização eletroquímica do PANI.

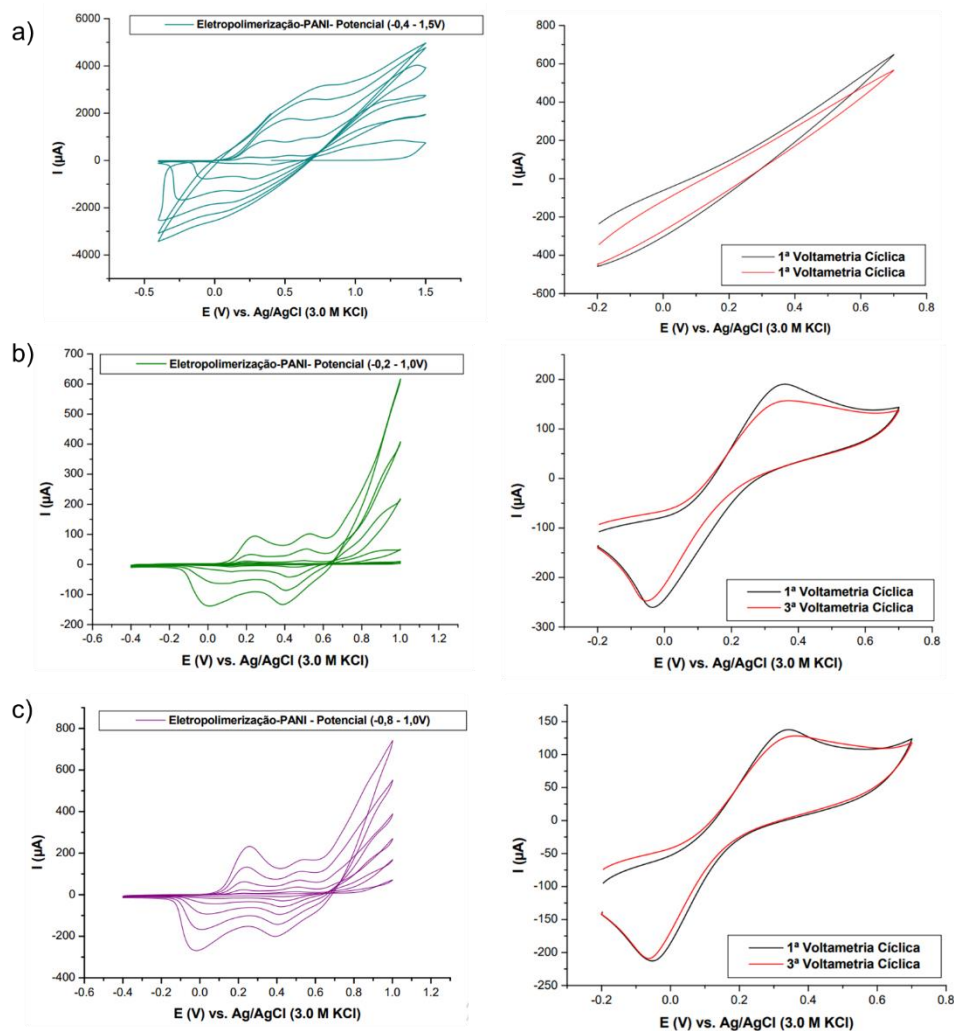


Fonte: Próprio autor.

Como característica intrínseca do material, a PANI pode ser sintetizada em diferentes estados oxidativos que resultam em respostas eletroquímicas distintas (YILMAZ et al., 2020). Diante disso, foi realizado um estudo com três faixas de variação do potencial de síntese, tanto para estimar o estado de oxidação ou redução, quanto para definir o estado com a melhor resposta eletroquímica (Figura 23). Foi observado que no potencial de -0,4V – 1,5V ocorreu a formação de um filme com boa espessura e visível com coloração verde escuro. Entretanto, as formas de base da PANI não apresentam elevada transferência de elétrons, por esse motivo a resposta voltamétrica não

apresentou amplos picos de correntes (Figura 23a) (LI; GONG, 2020). No potencial de -0,2 – 1,0V ocorreu a formação do filme de PANI com uma leve coloração verde claro com evidenciação de picos na VC demonstrando perfil condutor (Figura 23b).

Figura 23. Estudo de variação de potencial de eletropolimerização do filme de PANI, (a) -0,4V – 1,5V, (b) -0,2 – 1,0V e (c) -0,8 – 1,0V.



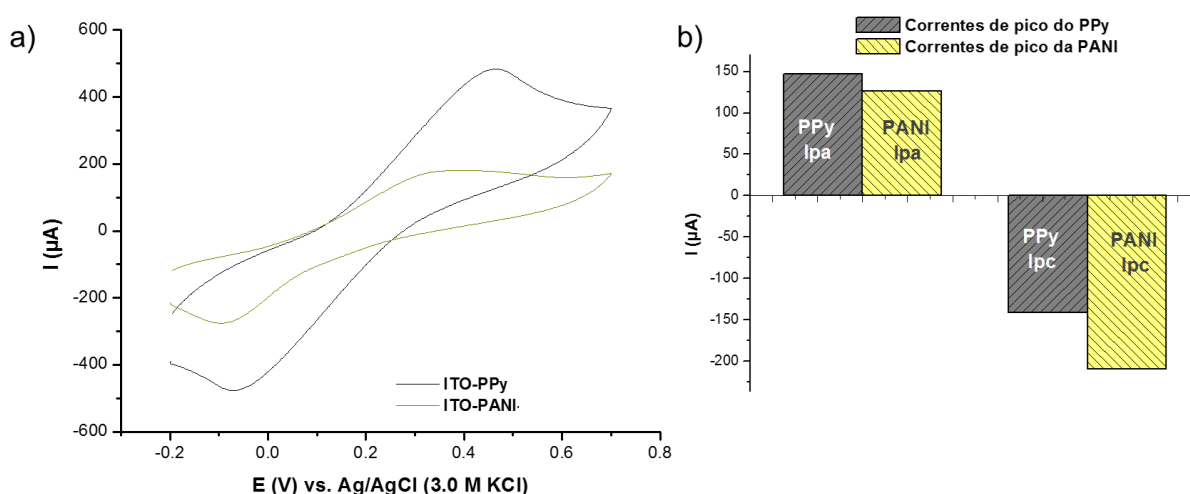
Fonte: Próprio autor.

O PANI exibiu cor amarela no potencial de -0,8 – 1,0V que também demonstrou perfil de condutividade (Figura 23c). A estabilidade dos filmes obtidos também foi avaliada executando três leituras voltamétricas sequenciais e se observou o deslocamento dos picos de VC. Concluiu-se que para eletropolimerização a faixa de potencial de -0,8 – 1,0V ocorreu menor variação entre leituras, portanto, melhor estabilidade da PANI. Além disso, nesta variação

de potencial o PANI formado apresentou amplos picos de correntes sendo assim estabelecida como parâmetro ideal de construção (Figura 23c).

Após as avaliações de padronização de eletropolimerização dos polímeros condutores, as respostas amperométricas por VC também foram comparadas (Figura 24). O PPy apresentou maiores valores de correntes de pico e melhor estabilidade em relação a PANI (Figura 24b). Isso pode estar relacionado a forma de síntese dos filmes e o número de ciclos de eletropolimerização sobre o substrato de ITO. Entretanto, ainda foi válido o estudo das demais etapas construção do protótipo genossensível para que assim seja possível entender como ocorre a interação de cada polímero frente aos nanomateriais utilizados e qual, por fim, é realmente mais vantajoso.

Figura 24. Estudo voltamétrico comparativo entre o PPy e PANI (a) e respectivas correntes de pico (b).



Fonte: Próprio autor.

6.1.2 DETERMINAÇÃO DA MELHOR NANOESTRUTURAÇÃO DOS GENOSENSORES EM TIRA

Com a definição dos melhores parâmetros de polimerização eletroquímica dos polímeros PANI e PPy sobre os eletrodos em tira flexível, posteriormente foi realizada a construção de camadas automontadas. Como segunda etapa de modificação foram utilizados *quantum dots* de grafeno com ativação dos grupos carboxílicos. O incremento da plataforma com o uso de

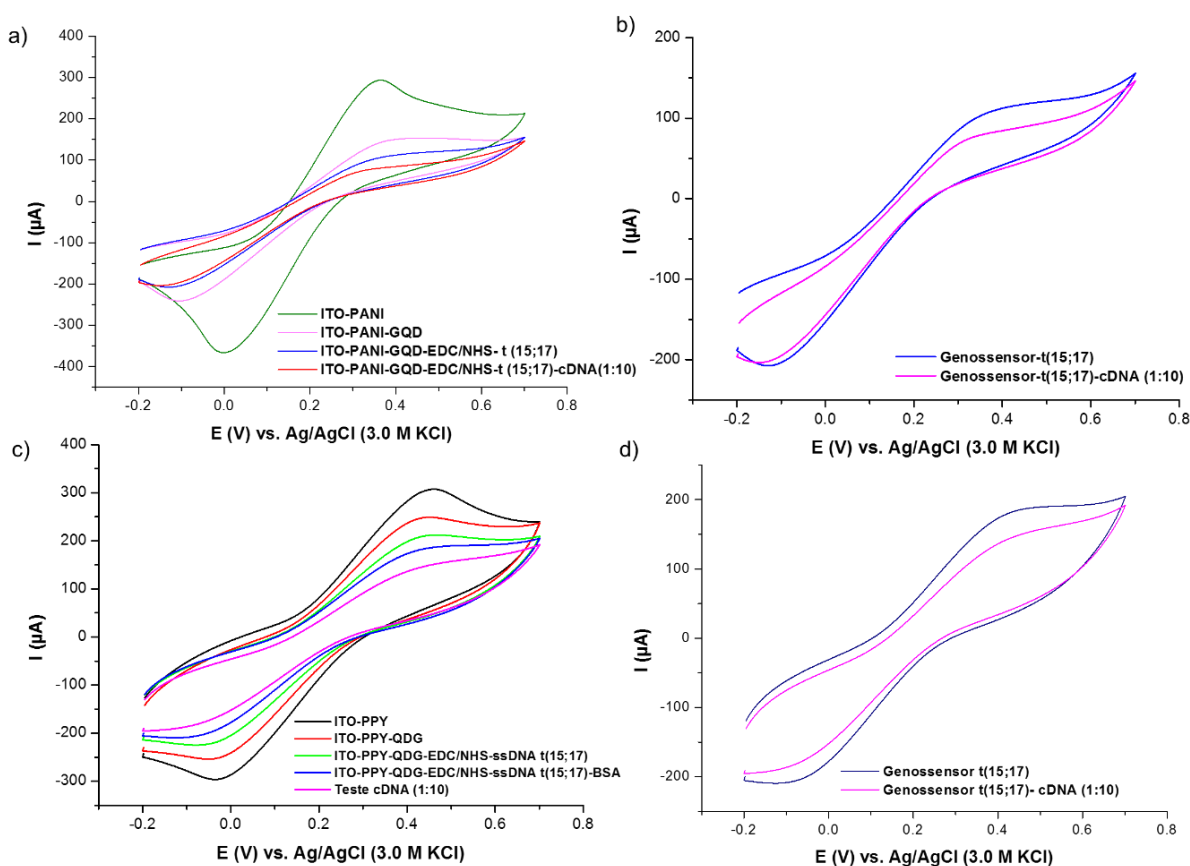
GQD é importante, pois traz um aspecto de inovação para os genossensores desenvolvidos. Em ambas formulações das plataformas foram utilizadas a ssDNA específica para translocação alvo de estudo.

A Figura 25 traz a caracterização por VC onde se observam as modificações dos picos das correntes anódicas (I_{pa}) e catódicas (I_{pc}) de acordo com a automontagem formada. Ambos os polímeros responderam como esperado com formação de VC com picos amplos (Figura 25), entretanto, na etapa dois, onde se utiliza GQD, ocorreu a queda da resposta amperométrica, processo que pode ser relacionado aos grupos funcionais COOH presentes no GQD (SUN et al., 2022). Esse grupo químico assume carga negativa e pode repelir o par negativo da sonda redox (ferrocianeto $[Fe(CN)_6]^{4-}$ e ferricianeto $[Fe(CN)_6]^{3-}$) presente na solução eletroanalítica, resultando na diminuição do sinal voltamétrico (JAISWAL et al., 2018). Por fim, para a imobilização da ssDNA foi necessário a ativação dos grupos carboxílicos dos GQD por meio do EDC/NHS. Dessa forma, a sequência de DNA, específica para a t(15;17)APLB, foi imobilizada na superfície nanoarquiteturada por interações não covalentes (Figura 25).

Em adição, foram realizados testes iniciais de biodetecção com cDNA de pacientes. Assim se avaliou a responsividade dos genossensores ao oncomarcador além da comparação das respostas das duas estratégias nanoestruturadas. É possível perceber que ocorreu a diminuição da resposta voltamétrica em ambas as plataformas (Figura 25). Essa modificação é gerada pela hibridização específica entre a sequência alvo e a ssDNA do genossensor. Isso ocorre, pois, o DNA de dupla hélice formado no bioreconhecimento aumenta o número de cargas negativas na superfície do genossensor diminuindo assim o trânsito de elétrons entre a superfície do genossensor e a solução eletroanalítica (AVELINO et al., 2021). Apesar de ambos genossensores apresentarem eficiência de biodetecção, quando comparadas as respostas é possível perceber que a plataforma PPy-GQD-EDC/NHS-ssDNA-t(15;17) apresentou maior amplitude de resposta voltamétrica. Devido a isso a formulação com PPy possibilita uma melhor distinção de resposta em estudos de detecção e quantificação. Além disso o PPy apresentou melhor estabilidade quando comparado a PANI. Dessa forma, a plataforma baseada em PPy-GQD-ssDNA

foi escolhida como principal estratégia para o desenvolvimento dos genossensores nanoestruturados.

Figura 25. Caracterização eletroquímica das etapas de construção e teste de detecção do genossensor em tira (a) ITO-PANI-GQD-EDC/NHS-ssDNA t(15;17) e (b) ITO-PPy-GQD-EDC/NHS-ssDNA t(15;17).



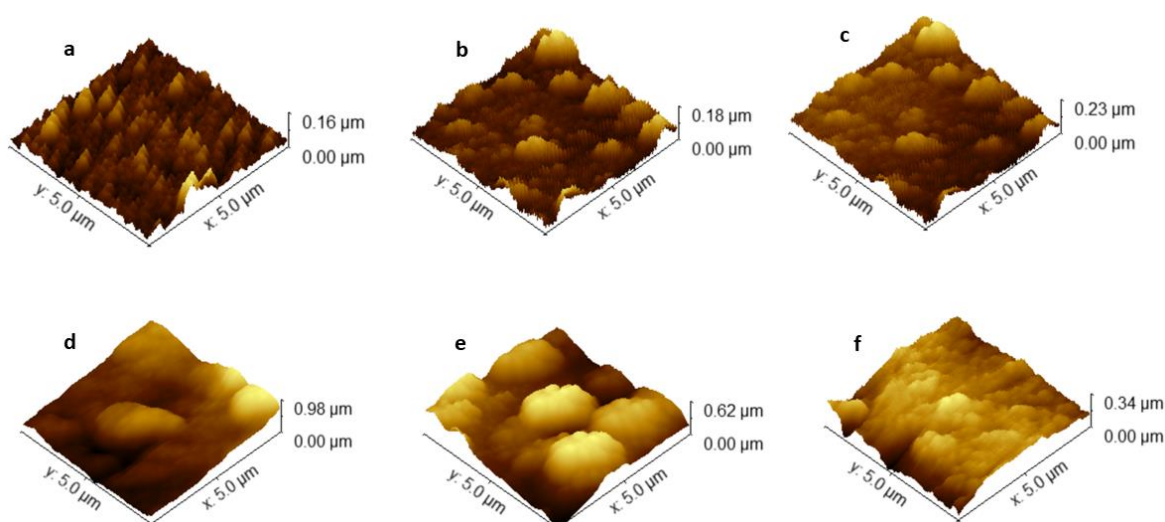
Fonte: Próprio autor.

6.1.3 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DAS ETAPAS DE MONTAGEM DOS GENOSENSORES EM TIRA

Sendo a microscopia de força atômica uma técnica analítica direta e visual para examinar as características topográficas e transversais de materiais como poliméricos e a base de grafeno, foram analisadas as modificações no substrato flexível. Desta forma, foram obtidas as imagens 3D de cada etapa de modificação (Figura 26). Na figura 26a é possível perceber a topografia granular

correspondente ao filme de PPy característico da síntese eletroquímica (AVELINO et al., 2021) com uma altura de $0,16\ \mu\text{m}$. Com a associação do filme de PPy com GQDs foi revelada uma altura de pico em torno de 20nm na imagem de AFM. Em adição, foi observada uma heterogeneidade da superfície (Figura 26b). Esta discreta elevação pode ocorrer devido a aglomeração dos GQDs em superfícies secas (KEPIC et al., 2014) além da faixa de tamanho de diâmetro dos *quantum dots* ser próximo a 20 nm (BACON; BRADLEY; NANN, 2014). Com a imobilização da ssDNA t(15;17) e bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA ocorreu a elevação do pico topográfico da superfície para $0,23\mu\text{m}$ confirmando a imobilização da sequência do bioreceptor (Figura 26c). Ao expor o genossensor a amostras positivas para a sequência PML-RAR α (Figura 26d e 26e) ocorreu a formação de sítios de hibridização com formação da dupla hélice de DNA demonstrado pela elevação dos picos máximos na superfície (MANZANO et al., 2018).

Figura 26. Caracterização topográfica das etapas de montagem e ensaios de biorreconhecimento do genossensor M7: (a) PPy, (b) PPy-GQD, (c) PPy-GQD-ssDNA t(15;17)-BSA, (d) Genossensor t(15;17) – amostra plasmideal, (e) Genossensor t(15;17) – amostra clínica e (f) Genossensor t(15;17) – controle negativo.



Fonte: Próprio autor.

A amostra plasmideal apresentou pico de $0,98\ \mu\text{m}$ e a amostra clínica $0,62\ \mu\text{m}$ (Figura 26d e 26e). Com a avaliação da amostra de cDNA negativo ocorreu

uma elevação de 0.11 μm em relação ao pico correspondente ao genossensor (0.23 μm) (Figura 26f). Isso pode ocorrer por interações não específicas já que na amostra positiva de paciente ocorreu uma elevação significativa.

6.1.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DAS ETAPAS DE MONTAGEM DOS GENOSENSORES EM TIRA

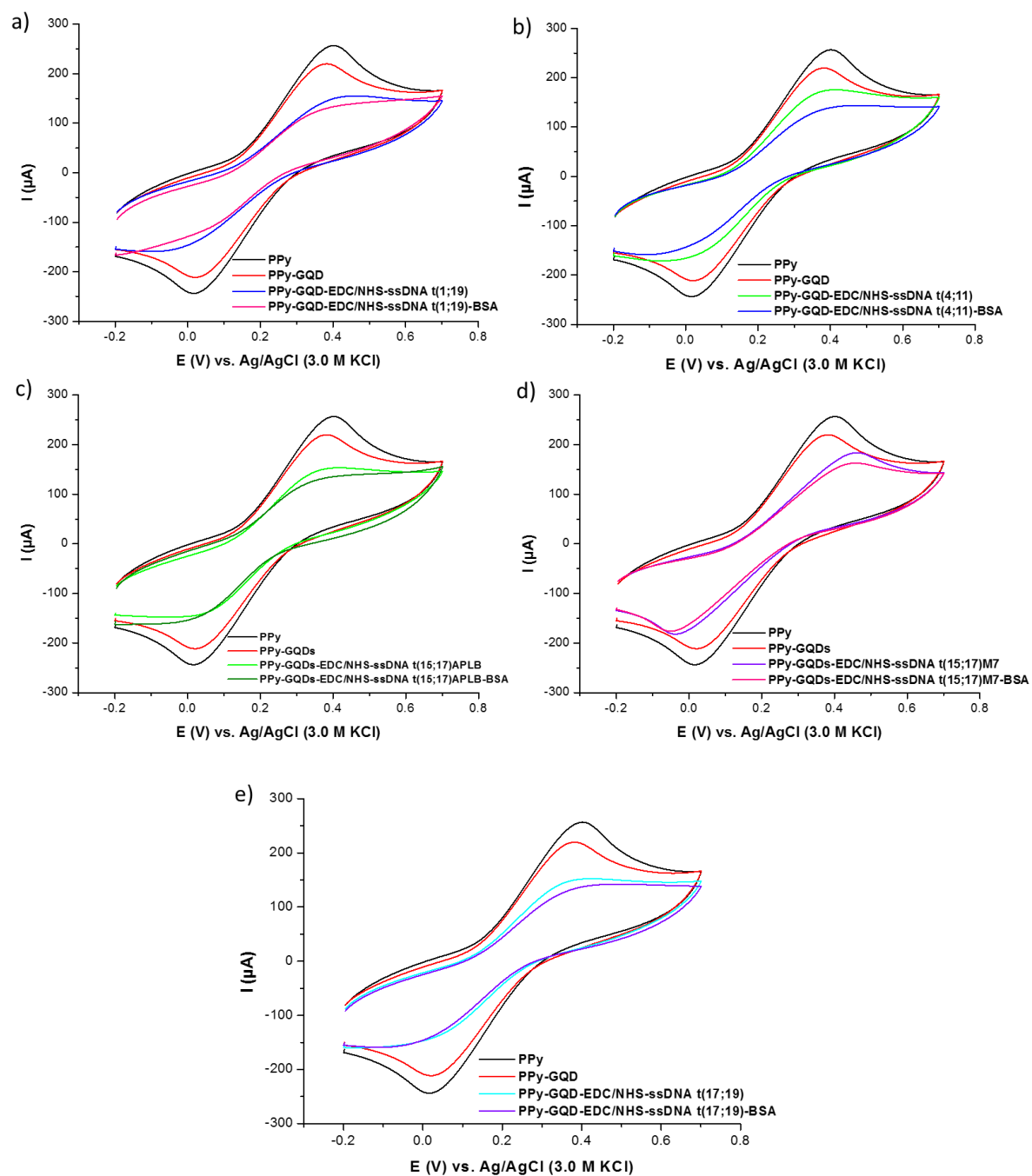
Cada etapa de construção dos genossensores flexíveis foram caracterizadas pela VC e pela EIE. Foram obtidos os voltamogramas para todos os genossensores sendo voltados para diagnóstico da linhagem linfoblástica com as translocações 1;19, 4;11, 17;19 e para a linhagem mieloblástica t(15;17)M7 e APLB (Figura 27). Foi possível observar a modificação na disposição dos picos de corrente voltamétricos de acordo com a modificação da superfície até a construção final dos genossensores. Os espectros de impedância também foram obtidos para cada translocação e na Figura 26 se observou o aumento do diâmetro dos semicírculos com a automontagem das plataformas. O filme de PPy sobre a superfície apresentou I_{pa} de $165 \pm 1,56 \mu\text{A}$ e R_{CT} de $256 \pm 1,00 \Omega$ (Tabela 1 e 2).

Na segunda etapa com a adsorção dos GQD apesar do grafeno ser um nanomaterial extremamente condutor ocorreu queda de nos picos voltamétricos apresentando diminuição de 27 μA no I_{pa} ($138 \pm 1,47 \mu\text{A}$) e elevação da resposta impedimétrica com aumento de 218 Ω do R_{CT} ($474 \pm 11,53 \Omega$) (Figura 27 e 28) (Tabela 1 e 2). Desta forma, o mesmo comportamento nos testes iniciais se manteve devido a interação dos grupos COOH do *quantum dots* e o par negativo da solução eletroanalítica. Com a imobilização da ssDNA das diferentes translocações, como esperado, também ocorreu a diminuição da amplitude dos picos na VC e aumento do diâmetro do semicírculo da EIE.

Como última etapa se constatou uma discreta queda na resposta voltamétrica característica da utilização do BSA que responsável pelo bloqueio de possíveis sítios inespecíficos. Em proporcionalidade inversa a VC a EIE apresentaram elevação de resposta. Este comportamento eletroquímico se deve pela natureza biológica do BSA que é um peptídeo de alto peso molecular (66kDa) atuando na diminuição da passagem de elétrons entre a interface genossensor/solução. Desta forma, os padrões eletroquímicos de VC e EIE

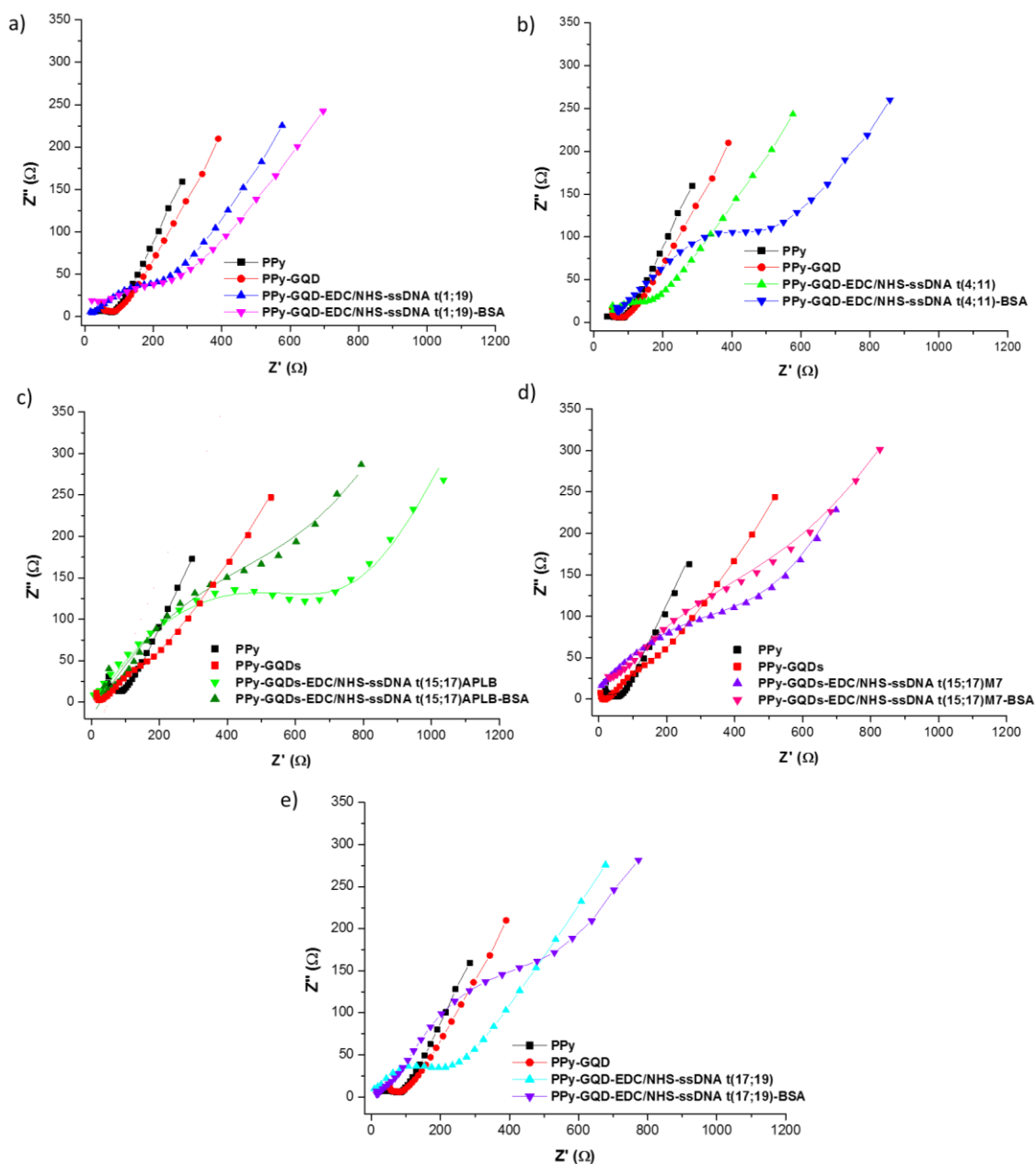
foram estabelecidos para cada genossensor. Foram obtidos os valores quantitativos das correntes de pico anódicas (Tabela 1) e resistência a transferência de carga (Tabela 2) para cada genossensor flexível desenvolvido.

Figura 27. Voltamogramas cíclicos das etapas de construção dos Genossensores em tira t(1;19) (a), t(4;11) (b), t(15;17)M7 (c), t(15;17)APLB (d) e t(17;19) (e).



Fonte: Próprio autor.

Figura 28. Espectros de Impedância das etapas de construção dos Genossensores em tira t(1;19) (a), t(4;11) (b), t(15;17)M7 (c), t(15;17)APLB (d) e t(17;19) (e).



Fonte: Próprio autor.

Tabela 1. Correntes de pico anódicas (I_{pa}) das camadas automontadas genossensores flexíveis específicos para cada translocação estudada.

Plataforma	I_{pa} (μA)
ITO-PPy	$165 \pm 1,56$
ITO-PPy-GQD	$138 \pm 1,47$
Translocação	-
Genossensor t(1;19)	$60,8 \pm 2,66$
Genossensor t(4;11)	$69,8 \pm 1,43$
Genossensor t(15;17) APLB	$54,5 \pm 3,87$
Genossensor t(15;17) M7	$86,4 \pm 1,01$
Genossensor t(17;19)	$70 \pm 0,095$

Fonte: Próprio autor.

Tabela 2. Resistência a transferência de carga (R_{CT}) dos ensaios de EIE para os protótipos genossensíveis específicos para cada translocação estudada.

Plataforma	R_{CT} (Ω)
ITO-PPy	$256 \pm 1,00$
ITO-PPy-GQD	$474 \pm 11,53$
Translocação	-
Genossensor t(1;19)	$899 \pm 28,29$
Genossensor t(4;11)	$657 \pm 10,5$
Genossensor t(15;17) APLB	$976 \pm 18,61$
Genossensor t(15;17) M7	$847 \pm 9,53$
Genossensor t(17;19)	$880 \pm 37,4$

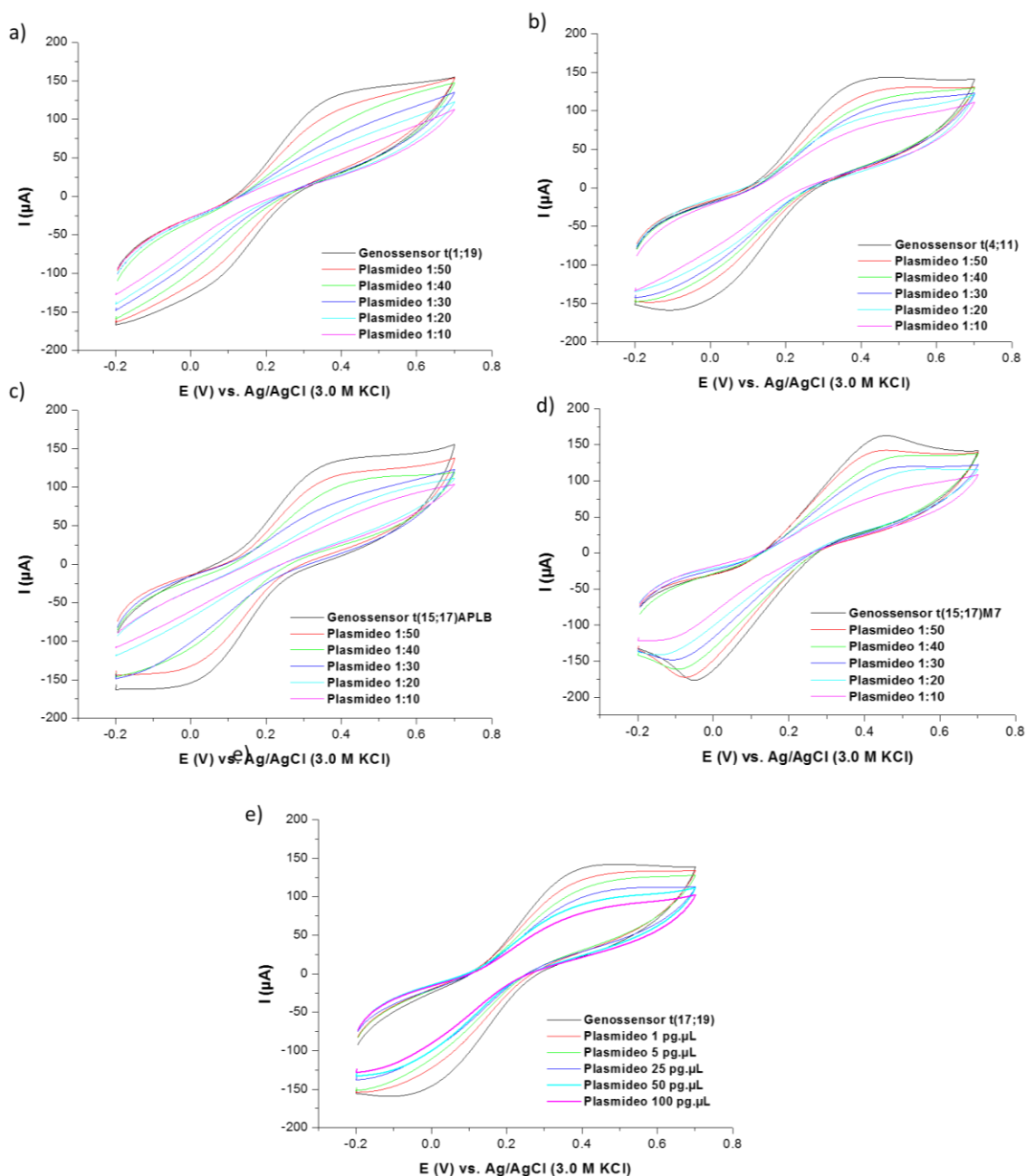
Fonte: Próprio autor.

6.1.5 ENSAIOS DE BIODETECÇÃO COM AMOSTRAS PLASMIDEAIS

Após o estabelecimento do padrão de construção de cada genossensor seguiu-se para avaliação da biodeteção com amostras de plasmídeos recombinantes contendo a sequência específica para cada translocação. Se observou o decaimento das correntes de pico anódica e catódica de acordo com a elevação da concentração da amostra (Figura 29). Isso ocorre porque no processo de hibridização a sequência bioreceptora e a sequência alvo formam um complexo de dupla-hélice de DNA dificultando o transporte de elétrons. Esse

processo é refletido na VC no decaimento das correntes de pico (SRISOMWAT et al., 2020).

Figura 29. Caracterização voltamétrica dos ensaios de biodeteção dos genossensores em tira t(1;19) (a), t(4;11) (b), t(17;19) (c), t(15;17)M7 (d) e t(15;17)APLB (e) frente as amostras plasmídeais.

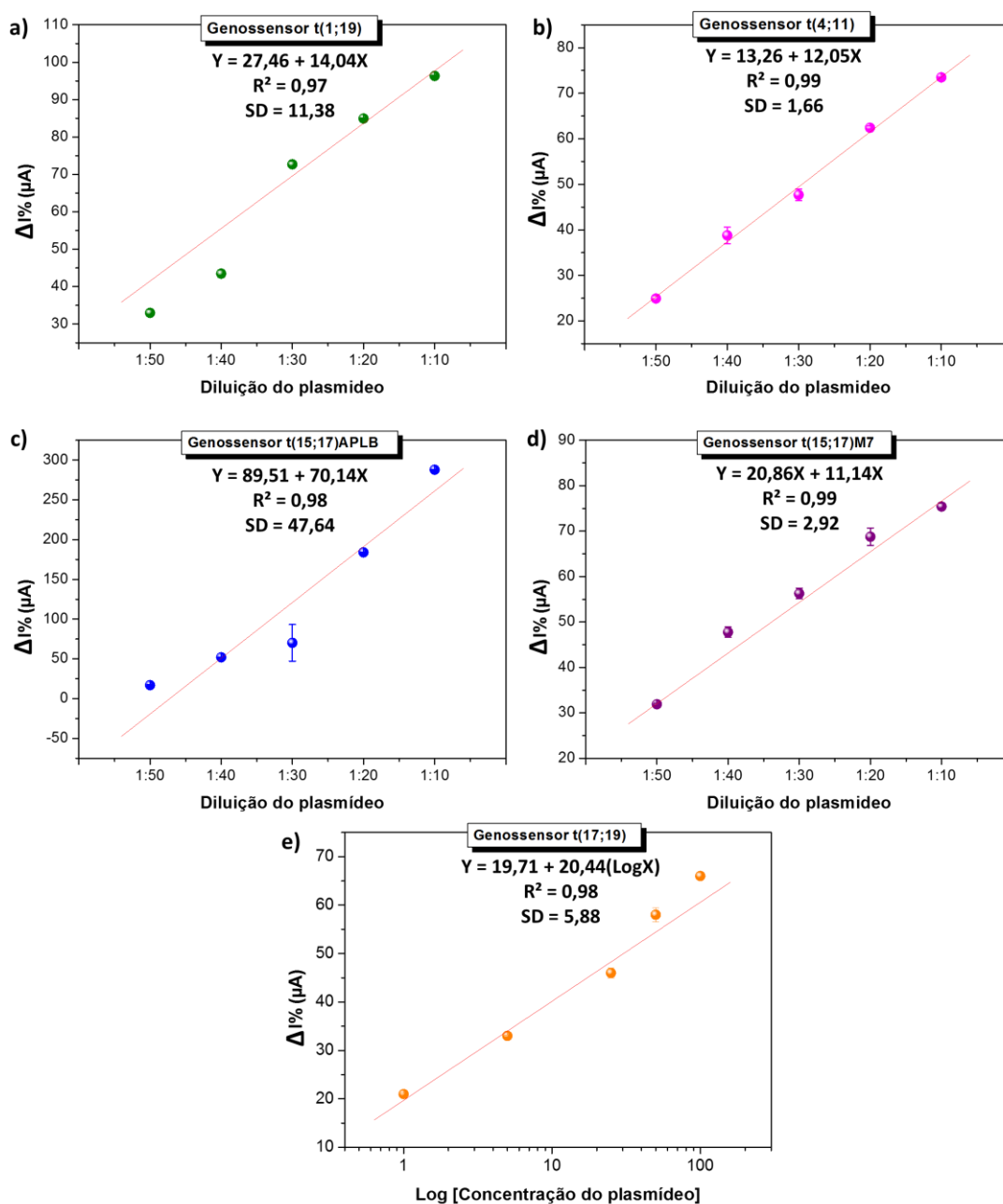


Fonte: Próprio autor.

Por meio desses estudos foi avaliada a linearidade de resposta de cada genossensor utilizando os dados de $\Delta I\%$ em relação a diluição da amostra

plasmideal. Os genossensores apresentaram uma excelente linearidade com R^2 de 0,97 para a t(1;19), 0,99 para t(4;11), 0,98 para t(15;17)APLB, 0,99 para t(15;17)M7 e 0,98 para t(17;19) (Figura 30). Isso demonstra a qualidade da linearidade dos ensaios de bioreconhecimento em relação a resposta obtida.

Figura 30. Caracterização voltamétrica dos ensaios de biodeteção dos genossensores em tira t(1;19) (a), t(4;11) (b), t(17;19) (c), t(15;17)M7 (d) e t(15;17)APLB (e) frente as amostras plasmideais.

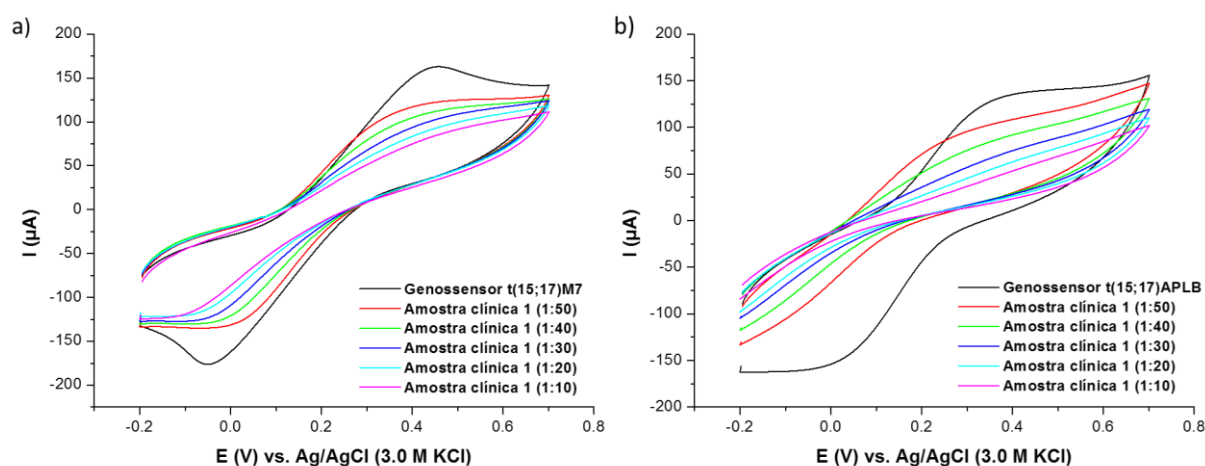


Fonte: Próprio autor.

6.1.6 BIORRECONHECIMENTO FRENTE A AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES

A figura 31 traz o ensaio de biodetecção avaliado pela VC proporcionando uma avaliação do processo de biorreconhecimento. O comportamento eletroquímico ligado a hibridização de sequências complementares se manteve com a exposição dos genossensores às amostras de cDNA de pacientes previamente diagnosticados. Demonstrando assim características de biorreconhecimento pela diminuição das Ipcs (Figura 31). Esse comportamento eletroquímico confirma a formação da dupla hélice de DNA por meio do anelamento receptor-alvo. Isso é característico do biorreconhecimento em genossensores eletroquímicos pois o complexo de hibridização repele $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ do par redox diminuindo a transferência de elétrons na interface genossensor / solução (SRISOMWAT et al., 2020). Ainda são necessários ensaios de biorreconhecimento com amostras de pacientes para as translocações 1;19, 4;11 e 17;19.

Figura 31. Caracterização eletroquímica do biorreconhecimento dos genossensores em tira t(15;17)M7(a) e APLB (b) frente a amostras de cDNA de pacientes.

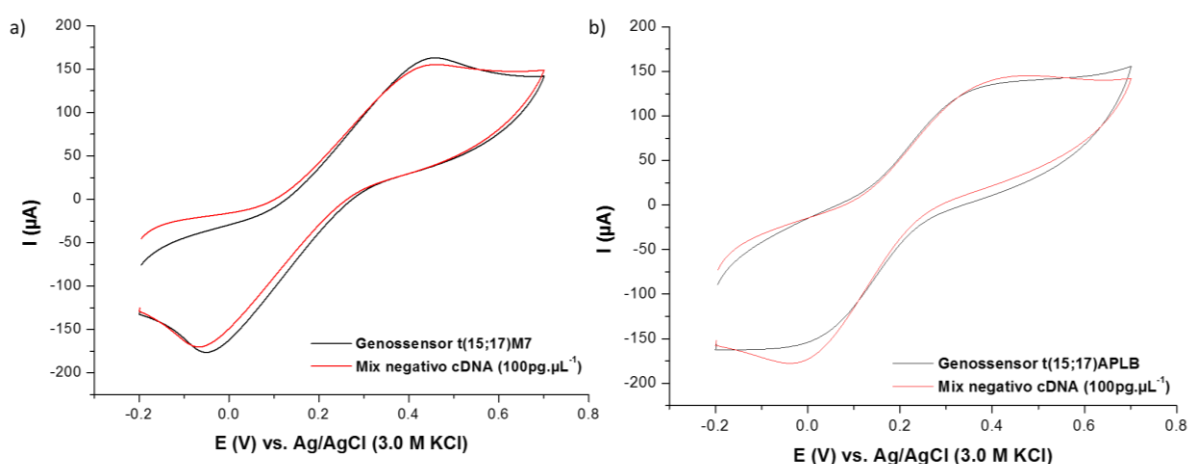


Fonte: Próprio autor.

6.1.7 TESTE DE ESPECIFICIDADE

Com a comprovação do biorreconhecimento dos genossensores desenvolvidos frente as amostras plasmídeais e de pacientes positivos seguiu-se para a análise da especificidade desses dispositivos. Para isso se utilizou um controle negativo formado por genoma de *Candida albicans*, Vírus da hepatite C e Papilomavírus Humano. A especificidade dos genossensores M7 e APLB foi constatada pois não ocorreram alterações eletroquímicas significativas características de biorreconhecimento (Figura 32).

Figura 32. Voltamogramas cíclicos dos testes de especificidade dos genossensores M7 (a) e APLB (b).



Fonte: Próprio autor.

Em comparação com biossensores desenvolvidos anteriormente para detecção da t(15;17) as tiras genossensoras elaboradas no presente trabalho demonstraram inovação de substrato de construção e nanoestruturação inédita (Tabela 3). Além disso estes genossensores apresentaram uma elevada performance bioanalítica com detecção do oncogene alvo em 15 minutos com limite de detecção (LOD) 0,214 pM para ssDNA t(15;17)APLB e 0,677pM para ssDNA t(15;17)M7. Os respectivos limites de quantificação (LQ) foram de 0,648 pM e 2,05 pM.

Tabela 3. Comparação entre genossensores eletroquímicos desenvolvidos para detecção do oncogene PLM-RAR α .

Plataforma	Método de Transdução	Labelfree	Tempo de Hibridização	LOD	Faixa Linear	Amostra	Referência
GCE-Poly-CCAfilme- ácidos nucleicos bloqueados -Anti-carboxifluoresceína -Harpina	VC	Não / Reação enzimática	60 min	83 fM	-	cDNA	Lin et al., 2011
GCE-aldeído-agarose hidrogel	VC, DPV, EIE	Não / MB	30 min	4 pM	4.0 – 0.12 pM	cDNA	Liu et al., 2011
GE- Mercaptohexanol - Sanduíche de ácidos nucleicos bloqueados	VC, EIE	Não / Reação enzimática	85 min	74 fM	0.1 – 10 pM	Sequência sintética	Wang et al., 2011
GE-Nanoporos de ouro- ssDNA-Mercaptohexanol	VC, DPV	Não / MB	30 min	6.7 pM	60 – 220 pM	cDNA	Zhong et al., 2011
GCE- Filme em monocamada de eriocromo cianina R	VC, DPV	Não / MB	30 min	0.982 pM	5.0 – 200 pM	Sequência sintética	Whang et al., 2012
Sanduíche de ácidos nucleicos bloqueados	VC, Cronoamperometria	Sim	60 min	79 fM	-	cDNA	Lei et al., 2013
GE- Junção Y de DNA com dupla sonda	VC, Cronoamperometria	Não / Reação enzimática	105 min	47 fM	-	cDNA	Wang et al., 2015
ITO-PPy-QDG-ssDNA t(15;17)M7-BSA	VC, EIE	Sim	15 min	0.214 pM 0.677 pM	1.0 - 100 pM	cDNA, Plasmideo	Este trabalho
ITO-PPy-QDG-ssDNA t(15;17)APLB-BSA							

GCE: Eletrodo de carbon vítreo
GE: Eletrodo de ouro
MB: Azul de metileno
Poli-CCA: Poli ácido calcon carboxílico

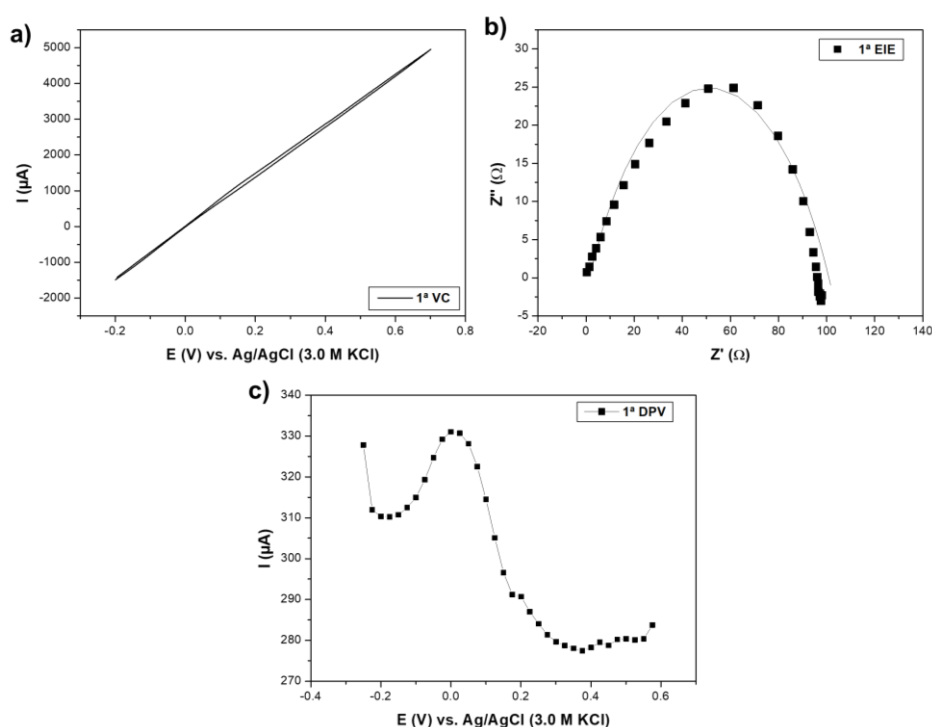
Fonte: Próprio autor.

6.2 PROTÓTIPO GENOSENSOR FLEXÍVEL

6.2.1 Definição das técnicas eletroquímicas de análise do substrato protótipo genossensor

O protótipo metalizado foi caracterizado por técnicas eletroquímicas de VC, voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrática (SWV) e EIE, na presença de 10mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ (1:1, v/v) em PBS (10 mM, pH 7.4) como solução eletroanalítica. Na Figura 33 é possível visualizar a resposta da VC que os picos de correntes e a área gráfica do voltamograma estão extremamente fechados (Figura 33a). No diagrama de Niquist (Figura 33b) ocorreu a formação de um semicírculo característico e evidente. No estudo por DVP foi possível a visualização de pico característico (Figura 33c) dessa forma as técnicas de DVP e EIE foram escolhidas como forma de análise eletroquímica preferencial deste substrato.

Figura 33. Caracterização por voltametria cíclica (a), espectroscopia de impedância eletroquímica (b), voltametria de pulso diferencial (c) do substrato protótipo.

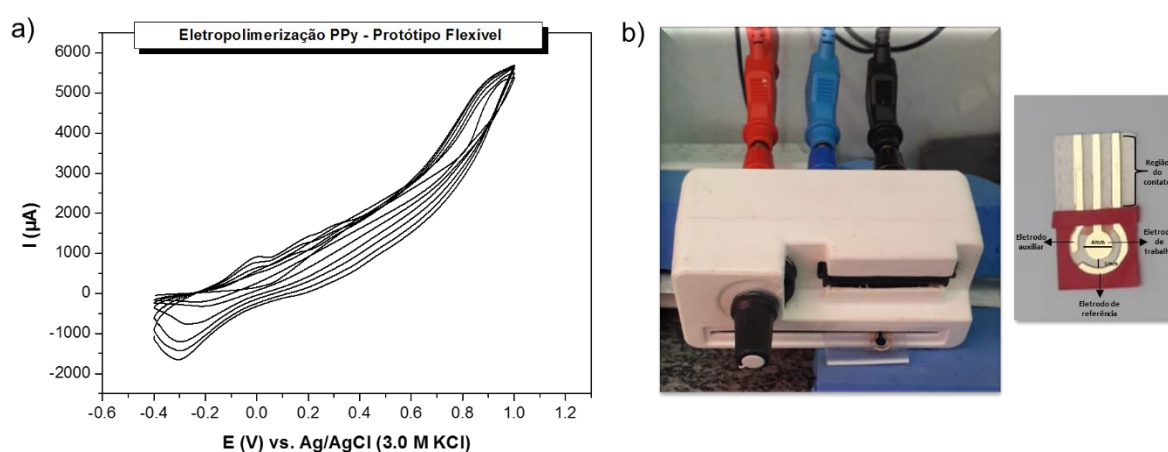


Fonte: Próprio autor.

6.2.2 PARÂMETROS DE ELETROPOLIMERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS CONDUTORES

Inicialmente se fez a tentativa de eletropolimerização da PANI sobre a superfície do protótipo metalizado, entretanto com a exposição do substrato metalizado a solução em ácido sulfúrico ocorreu a degradação do revestimento de ouro. Desta forma seguiu-se para tentativa de eletropolimerização do PPy, apesar da solução ser feita em ácido clorídrico não ocorreu degradação do revestimento de ouro e ocorreu a formação do filme corretamente. Diante disso, os mesmos padrões definidos anteriormente no substrato flexível foram utilizados para a eletropolimerização do PPy sobre o substrato metalizado escolhendo o 6º ciclo como ideal para formação do filme. Assim se obteve o perfil voltamétrico do processo de eletropolimerização e formação do polímero sobre a superfície (Figura 34a). A caracterização do protótipo metalizado foi realizada por meio de uma caixa contato ligada ao Potenciostato / Galvanostato utilizando o eletrodo central como eletrodo de trabalho e os eletrodos adjacentes como referência e auxiliar (Figura 34b).

Figura 34. Caracterização voltamétrica da eletropolimerização do PPy no protótipo metalizado (a) e sistema de captação de sinal do protótipo com protótipo genossensor(b).

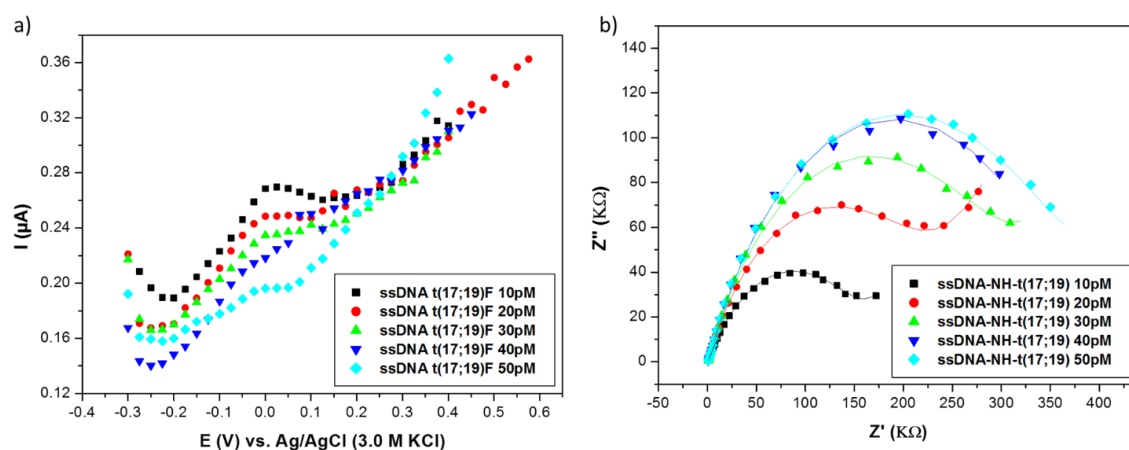


Fonte: Próprio autor.

6.2.3 ESTUDO DE IMOBILIZAÇÃO DA SONDA DE DNA

Cada etapa de montagem dos genossensores metalizados foram caracterizadas pela DVP e pela EIE sendo utilizadas a mesma nanoestruturação dos substratos flexíveis com PPy e GQD. Assim foi realizado o estudo da melhor concentração de imobilização covalente da ssDNA nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 pM. Se constatou que com o aumento das concentrações da ssDNA ocorreu a diminuição do sinal amperométrico e elevação do sinal impedimétrico reflexo do aumento da imobilização (Figura 35). Se observou que a concentração de 10 pM já foi suficiente para uma boa imobilização da ssDNA sem perca da amplitude da resposta final do genossensor sendo, portanto escolhida como ideal para a modificação.

Figura 35. Caracterização eletroquímica por DVP (a) e EIE (b) do estudo de imobilização da ssDNA (10 – 50 pM).



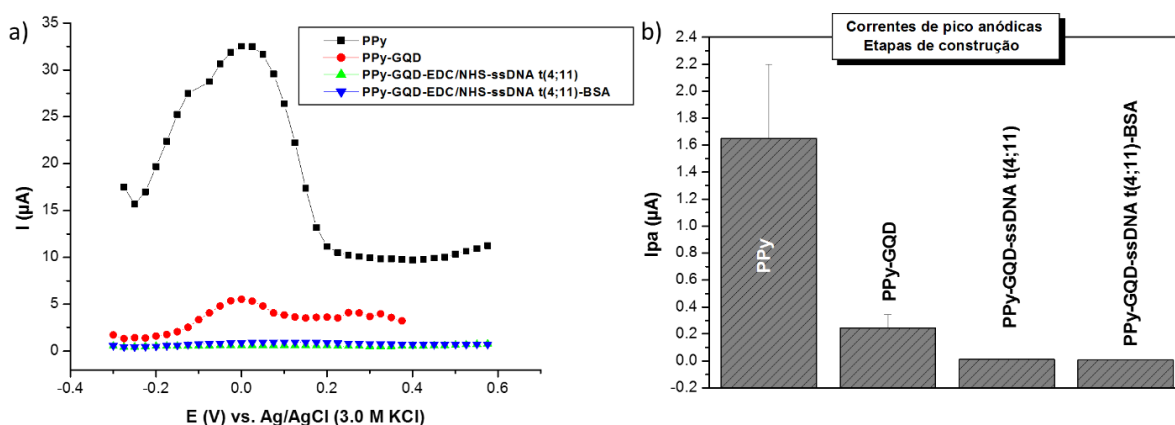
Fonte: Próprio autor.

6.2.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DAS ETAPAS DE MONTAGEM DO PROTÓTIPO GENOSENSOR

Os voltamogramas por DPV demonstraram modificação nas correntes de pico avaliadas de acordo com a nanoestruturação da plataforma. É possível perceber que o PPy apresentou maior valor de corrente justamente por ser um polímero intrinsecamente condutor. E assim como os resultados anteriores do substrato flexível ocorreu a diminuição da I_{pa} com a imobilização dos GQD-COOH e imobilização da ssDNA-NH (Figura 36). Deste modo a construção de

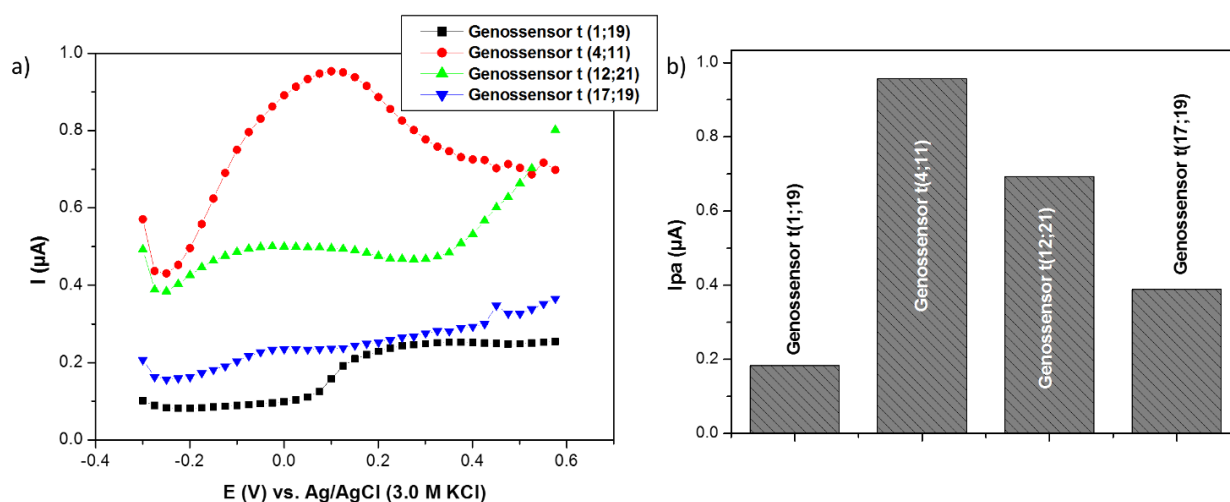
cada Genossensor foi avaliada por DPV estabelecendo padrões de DPV com cálculo das I_{pa} de construção do protótipo genossensível para cada translocação estudada (Figura 37). Por meio dos ensaios de EIE o R_{CT} de cada genossensor foi calculado (Figura 38) sendo perceptível a relação inversa entre correntes de pico e a resistência a transferência de carga da superfície, ou seja, quanto maior a corrente menor o R_{CT} .

Figura 36. Caracterização DPV (a) e I_{pa} (b) das etapas de montagem do protótipo genossensível.



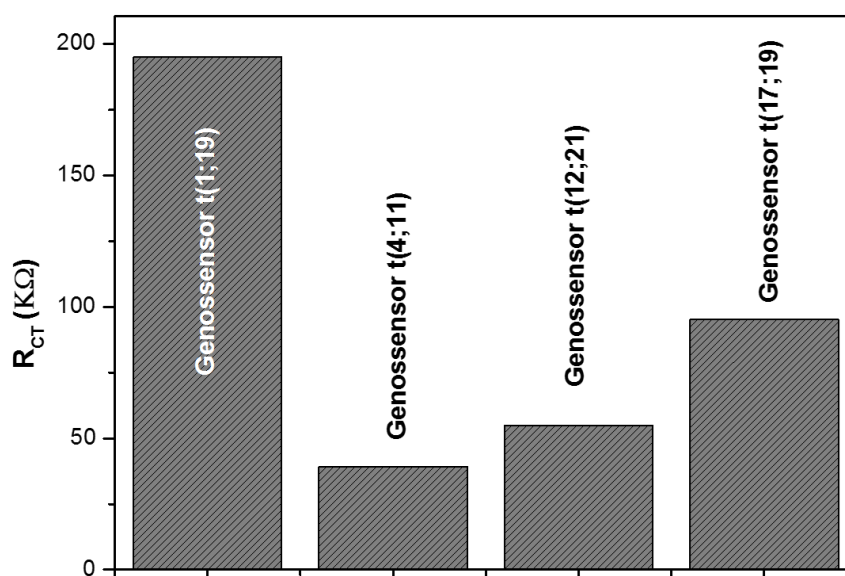
Fonte: Próprio autor.

Figura 37. Caracterização dos padrões de DPV (a) e respectivas I_{pa} (b) dos protótipos genossensível para cada translocação.



Fonte: Próprio autor.

Figura 38. Caracterização dos padrões de R_{CT} dos protótipos genossensível para cada translocação.



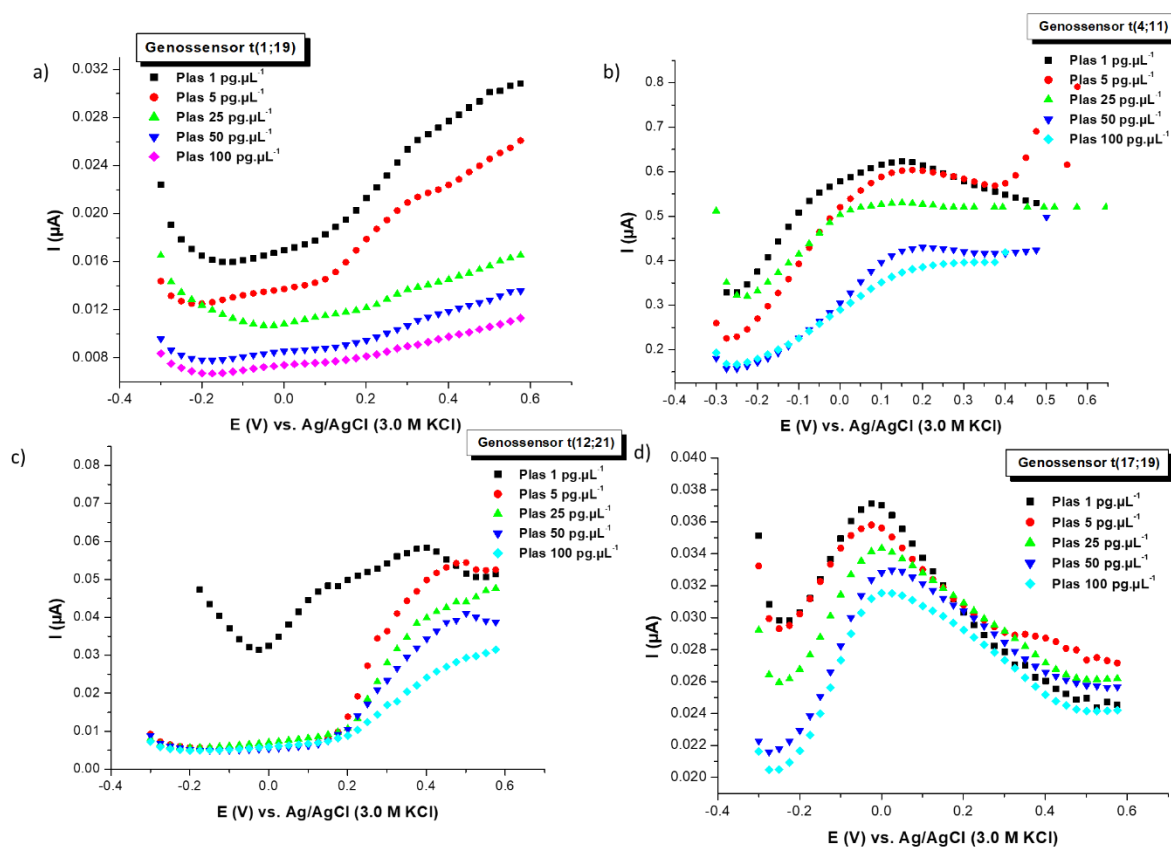
Fonte: Próprio autor.

6.2.5 CARACTERIZAÇÃO DO BIORRECONHECIMENTO DO PROTÓTIPO GENOSENSOR

Após a construção dos protótipos genossensores para cada translocação se realizou ensaios de biorreconhecimento com amostras plasmídeais. Através das análises de DPV foi possível acompanhar o decaimento dos picos de correntes de acordo com o aumento da concentração da amostra comprovando a hibridização bioreceptor-alvo (Figura 39). É possível perceber que houveram perfis de respostas distintas para cada genossensor construído e isso pode estar ligado a constituição de cada ssDNA. Diante disso ao se avaliar o conteúdo de guanina-citosina (G-C) das sondas utilizadas foi observado que as ssDNA para identificação da t(1;19) e t(17;19) apresentaram conteúdo de G-C de 66,7% e 65,5% enquanto as sondas da t(4;11) e t(12;21) apresentaram 57,7% e 45% respectivamente. As ssDNA que apresentaram acima de 65% de G-C obtiveram eletroquimicamente menores picos anódicos nos ensaios de biodeteção caracterizados por DPV. Isso pode ocorrer porque a guanina apresenta picos específicos de oxidação detectados pela técnica de

DPV (SHEN; WANG, 2009) e quando ocorre o anelamento com a base complementar forma a ligação tripla com citosina gerando o declínio do sinal da corrente de oxidação de forma acentuada.

Figura 39. Caracterização por DPV dos ensaios de biorreconhecimento com amostras plasmídeais ($1 - 100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) para t(1;19) (a), t(4;11) (b), t(12;21) (c) e t(17;19) (d).



Fonte: Próprio autor

7 CONCLUSÕES

O substrato de ITO flexível possibilitou a formação de eletrodos com configurações distintas e inovadoras apresentando propriedades eletroquímicas significativas. A nanoestruturação PPy-GQDs padrão que foi adotada na confecção dos sistemas proporcionou uma boa matriz de imobilização das ssDNA de forma covalente e não covalente. Além disso a configuração dos genossensores utilizando o PPy-GQD garantiu a inovação de construção ainda não descrita em literatura no campo de genossensores eletroquímicos para detecção de leucemia infantil. O PPy e o GQD proporcionaram a elevação das propriedades eletrocatalíticas dos eletrodos. Por fim, os nanodispositivos genossensíveis desenvolvidos apresentam capacidade de reconhecer amostras positivas de plasmídeos para as translocações t(15;17); t(1;19); t(4;11); t(17;19) e t(12;21) alvo do estudo. Em adição os biodispositivos também foram capazes de detectar amostras positivas de pacientes e distinguir amostras negativas. Os Genossensores t(15;17)APLB e t(15;17)M7 desenvolvidos em eletrodo de tira flexível apresentaram o limite de detecção (LOD) de 0,214 pM e 0,677pM, respectivamente. Além disso foi possível caracterizar todas etapas de construção e biorreconhecimento do genossensor em tira e protótipo genossensor por meio das técnicas eletroquímicas de VC, EIE e DPV e caracterização topográfica pela AFM. Desta forma os nanodispositivos desenvolvidos apresentaram elevada performance bioanalítica com detecção dos oncogenes alvo em apenas 15 minutos sendo uma possível nova ferramenta que poderá ser utilizada no diagnóstico genético da leucemia infantil.

8 REFERÊNCIAS

ALSTEENS, David et al. Atomic force microscopy-based characterization and design of biointerfaces. **Nature Reviews Materials**, v. 2, n. 5, p. 1-16, 2017.

ARIKAN, Kubilay et al. Glucose nano biosensor with non-enzymatic excellent sensitivity prepared with nickel–cobalt nanocomposites on f-MWCNT. **Chemosphere**, v. 291, p. 132720, 2022.

ARORA, Kavita et al. E scherichia coli Genosensor Based on Polyaniline. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 16, p. 6152-6158, 2007.

AVELINO, Karen YPS et al. Smart applications of bionanosensors for BCR/ABL fusion gene detection in leukemia. **Journal of King Saud University-Science**, v. 29, n. 4, p. 413-423, 2017.

AVELINO, Karen YPS et al. Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens. **Talanta**, v. 226, p. 122118, 2021.

AVELINO, Karen YPS et al. Electrochemical dna biosensor for chronic myelocytic leukemia based on hybrid nanostructure. **Bioelectrochemistry**, p. 108176, 2022.

AYDIN, Muhammet; AYDIN, Elif Burcu; SEZGINTÜRK, Mustafa Kemal. Electrochemical immunosensor for CDH22 biomarker based on benzaldehyde substituted poly (phosphazene) modified disposable ITO electrode: A new fabrication strategy for biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 230-239, 2019.

BACON, Mitchell; BRADLEY, Siobhan J.; NANN, Thomas. Graphene quantum dots. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 31, n. 4, p. 415-428, 2014.

BARI, Saif Mohammad Ishraq; REIS, Louis G.; NESTOROVA, Gergana G. Calorimetric sandwich-type immunosensor for quantification of TNF- α . **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 82-87, 2019.

BAYRAMOGLU, Gulay et al. Design of an aptamer-based magnetic adsorbent and biosensor systems for selective and sensitive separation and detection of thrombin. **Talanta**, v. 191, p. 59-66, 2019.

BERA, Debasis et al. Quantum dots and their multimodal applications: a review. **Materials**, v. 3, n. 4, p. 2260-2345, 2010.

BERTOK, Tomas et al. Electrochemical impedance spectroscopy based biosensors: mechanistic principles, analytical examples and challenges towards commercialization for assays of protein cancer biomarkers. **ChemElectroChem**, v. 6, n. 4, p. 989-1003, 2019.

BOUDEN, Sarra et al. Multifunctional indium tin oxide electrode generated by unusual surface modification. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016.

BROWN, Patrick et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia, version 2.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 18, n. 1, p. 81-112, 2020.

BUSTIN, Stephen A.; NOLAN, Tania. RT-qPCR testing of SARS-CoV-2: a primer. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 8, p. 3004, 2020

CERMINATI, Sebastián; SONCINI, Fernando Carlos; CHECA, Susana Karina. A sensitive whole-cell biosensor for the simultaneous detection of a broad-spectrum of toxic heavy metal ions. **Chemical Communications**, v. 51, n. 27, p. 5917-5920, 2015.

CHANG, Byoung-Yong; PARK, Su-Moon. Electrochemical impedance spectroscopy. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 207-229, 2010.

CHEN, Chao et al. Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. **Rsc Advances**, v. 3, n. 14, p. 4473-4491, 2013.

CHEN, Guanying et al. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy. **Chemical reviews**, v. 116, n. 5, p. 2826-2885, 2016.

CHENG, Ming Soon et al. Impedimetric cell-based biosensor for real-time monitoring of cytopathic effects induced by dengue viruses. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 70, p. 74-80, 2015.

CHIANG, Chwan K. et al. Electrical conductivity in doped polyacetylene. **Physical review letters**, v. 39, n. 17, p. 1098, 1977.

CHIEN, James CW. **Polyacetylene: chemistry, physics, and material science**. Elsevier, 2012.

COOPER, Matthew A. Optical biosensors in drug discovery. **Nature reviews Drug discovery**, v. 1, n. 7, p. 515-528, 2002.

D'SOUZA, S. F. Microbial biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 6, p. 337-353, 2001.

DAMIATI, Samar; SCHUSTER, Bernhard. Electrochemical biosensors based on S-layer proteins. **Sensors**, v. 20, n. 6, p. 1721, 2020.

DAVIS, Amanda; VIERA, Anthony J.; MEAD, Monica D. Leukemia: an overview for primary care. **American family physician**, v. 89, n. 9, p. 731-738, 2014.

DEMCHENKO, Alexander P.; DEKALIUK, Mariia O. Novel fluorescent carbonic nanomaterials for sensing and imaging. **Methods and applications in fluorescence**, v. 1, n. 4, p. 042001, 2013.

ENSAFI, Ali A. An introduction to sensors and biosensors. In: **Electrochemical Biosensors**. Elsevier, 2019. p. 1-10.

ERDEN, Pinar Esra; KILIÇ, Esma. A review of enzymatic uric acid biosensors based on amperometric detection. **Talanta**, v. 107, p. 312-323, 2013.

FAN, Xudong et al. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. **analytica chimica acta**, v. 620, n. 1-2, p. 8-26, 2008.

FARIA, Henrique Antonio Mendonça; ZUCOLOTTI, Valtencir. Label-free electrochemical DNA biosensor for zika virus identification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 131, p. 149-155, 2019.

FARIDBOD, Farnoush; SANATI, Afsaneh L. Graphene quantum dots in electrochemical sensors/biosensors. **Current Analytical Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 103-123, 2019.

FARKA, Zdeněk et al. Nanoparticle-based immunochemical biosensors and assays: recent advances and challenges. **Chemical reviews**, v. 117, n. 15, p. 9973-10042, 2017.

FIGUEROA, Maria E. et al. Integrated genetic and epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 7, p. 3099-3111, 2013.

FRÍAS, Isaac AM et al. Trends in biosensors for HPV: identification and diagnosis. **Journal of Sensors**, v. 2015, 2015.

GARCÍA-MENDIOLA, Tania et al. Carbon nanodots based biosensors for gene mutation detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 256, p. 226-233, 2018.

GASPARYAN, L. F. et al. EIS Biosensor for Detection of Low Concentration DNA Molecules. **Journal of Contemporary Physics (Armenian Academy of Sciences)**, v. 55, n. 1, p. 101-109, 2020.

GERARD, Manju; CHAUBEY, Asha; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 345-359, 2002.

GIESSIBL, Franz J. Advances in atomic force microscopy. **Reviews of modern physics**, v. 75, n. 3, p. 949, 2003.

GHOLIVAND, Mohammad-Bagher; AKBARI, Arezoo. A sensitive electrochemical genosensor for highly specific detection of thalassemia gene. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 129, p. 182-188, 2019.

GLOBOCAN. Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, worldwide, both sexes, ages 0-19 (excl. NMSC). Cancer Today, IARC, 2022.

GÜÇLÜ, Alev Devrim et al. **Graphene quantum dots**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.

HANSMA, Helen G.; PIETRASANTA, Lía. Atomic force microscopy and other scanning probe microscopies. **Current opinion in chemical biology**, v. 2, n. 5, p. 579-584, 1998.

HANSMA, Helen G. Surface biology of DNA by atomic force microscopy. **Annual review of physical chemistry**, v. 52, n. 1, p. 71-92, 2001.

HEINZE, Jürgen. Cyclic voltammetry—"electrochemical spectroscopy". New analytical methods (25). **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 23, n. 11, p. 831-847, 1984.

HIRATA, Yoshiki; YABUKI, Soichi; MIZUTANI, Fumio. Application of integrated SECM ultra-micro-electrode and AFM force probe to biosensor surfaces. **Bioelectrochemistry**, v. 63, n. 1-2, p. 217-224, 2004.

HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul Austin. Fundamentos em hematologia. In: **Fundamentos em Hematologia**. 2013. p. 454-454.

HONG, Ping; LI, Wenli; LI, Jinming. Applications of aptasensors in clinical diagnostics. **Sensors**, v. 12, n. 2, p. 1181-1193, 2012.

HUANG, Rongrong; HE, Nongyue; LI, Zhiyang. Recent progresses in DNA nanostructure-based biosensors for detection of tumor markers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 109, p. 27-34, 2018.

HUANG, Dapeng et al. Bottom-up synthesis and structural design strategy for graphene quantum dots with tunable emission to the near infrared region. **Carbon**, v. 142, p. 673-684, 2019.

HUANG, Fang-Liang et al. Pathogenesis of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: Molecular pathways and disease treatments. **Oncology letters**, v. 20, n. 1, p. 448-454, 2020.

HU, Liang et al. A novel label-free bioengineered cell-based biosensor for salicin detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 238, p. 1151-1158, 2017.

JAISWAL, Nandita et al. Electrochemical genosensor based on carboxylated graphene for detection of water-borne pathogen. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 275, p. 312-321, 2018.

JALILI, Nader; LAXMINARAYANA, Karthik. A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. **Mechatronics**, v. 14, n. 8, p. 907-945, 2004.

JĘDRZAK, Artur et al. Portable glucose biosensor based on polynorepinephrine@ magnetite nanomaterial integrated with a smartphone analyzer for point-of-care application. **Bioelectrochemistry**, p. 108071, 2022.

KARUNAKARAN, Chandran; RAJKUMAR, Raju; BHARGAVA, Kalpana. Introduction to biosensors. In: **Biosensors and bioelectronics**. Elsevier, 2015. p. 1-68.

KAZEMI, Fatemeh et al. Biosensing applications of polyaniline (PANI)-based nanocomposites: a review. **Polymer Reviews**, v. 61, n. 3, p. 553-597, 2021.

KEPIĆ, Dejan P. et al. Preparation of PEDOT: PSS thin films doped with graphene and graphene quantum dots. **Synthetic metals**, v. 198, p. 150-154, 2014.

KHODER, Rabih; KORRI-YO USSOUFI, Hafsa. E-DNA biosensors of M. tuberculosis based on nanostructured polypyrrole. **Materials Science and Engineering: C**, v. 108, p. 110371, 2020

KRIEG, Michael et al. Atomic force microscopy-based mechanobiology. **Nature Reviews Physics**, v. 1, n. 1, p. 41-57, 2019.

KREJCOVA, Ludmila et al. Current trends in electrochemical sensing and biosensing of DNA methylation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 97, p. 384-399, 2017.

LEI, Yu; CHEN, Wilfred; MULCHANDANI, Ashok. Microbial biosensors. **Analytica chimica acta**, v. 568, n. 1-2, p. 200-210, 2006.

LEI, Yun et al. Sequence-specific electrochemical detection of double-strand PCR amplicons of PML/RAR α fusion gene in acute promyelocytic leukemia. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 1, p. 423-428, 2013.

LIAO, Zerong et al. Microfluidic chip coupled with optical biosensors for simultaneous detection of multiple analytes: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 697-706, 2019.

LI, Dan; HUANG, Jiaying; KANER, Richard B. Polyaniline nanofibers: a unique polymer nanostructure for versatile applications. **Accounts of chemical research**, v. 42, n. 1, p. 135-145, 2009.

LI, Zhihua; GONG, Liangjun. Research progress on applications of polyaniline (PANI) for electrochemical energy storage and conversion. **Materials**, v. 13, n. 3, p. 548, 2020.

LIMA, Pedro Henrique Correia et al. Polímeros Condutores com Propriedades Eletrocrômicas: Uma Revisão. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 13, n. 1, 2018.

LIN, Xiaojing et al. Integration of genomic and transcriptomic markers improves the prognosis prediction of acute promyelocytic leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 13, p. 3683-3694, 2021.

LIN, Liqing et al. Enzyme-amplified electrochemical biosensor for detection of PML–RAR α fusion gene based on hairpin LNA probe. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, n. 1, p. 277-283, 2011.

LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1555, 2008.

LIQUORI, Alessandro et al. Acute promyelocytic leukemia: A constellation of molecular events around a single PML-RARA fusion gene. **Cancers**, v. 12, n. 3, p. 624, 2020.

LIU, Ailin et al. Electrochemical DNA biosensor based on aldehyde-agarose hydrogel modified glassy carbon electrode for detection of PML/RAR α fusion gene. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 160, n. 1, p. 1458-1463, 2011.

LIU, Fei et al. Facile synthetic method for pristine graphene quantum dots and graphene oxide quantum dots: origin of blue and green luminescence. **Advanced materials**, v. 25, n. 27, p. 3657-3662, 2013.

LIU, Chuanjun et al. Molecularly imprinted sol-gel-based QCM sensor arrays for the detection and recognition of volatile aldehydes. **Sensors**, v. 17, n. 2, p. 382, 2017.

LIU, Mei et al. Aptasensors for pesticide detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 130, p. 174-184, 2019.

LOGUERCIO, Lara F. et al. Efficient acetylcholinesterase immobilization for improved electrochemical performance in polypyrrole nanocomposite-based biosensors for carbaryl pesticide. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 339, p. 129875, 2021.

LOJOU, E.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. **Journal of Electroceramics**, v. 16, n. 1, p. 79-91, 2006.

LUPPA, Peter B.; SOKOLL, Lori J.; CHAN, Daniel W. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. **Clinica chimica acta**, v. 314, n. 1-2, p. 1-26, 2001.

LU, Xiaohui et al. Detection of mutant genes with different types of biosensor methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 115860, 2020.

MACDONALD, Digby D. Review of mechanistic analysis by electrochemical impedance spectroscopy. In: **Electrochemical and Optical Techniques for the Study and Monitoring of Metallic Corrosion**. Springer, Dordrecht, 1991. p. 31-68.

MACK, Elisabeth KM et al. Comprehensive genetic diagnosis of acute myeloid leukemia by next-generation sequencing. **Haematologica**, v. 104, n. 2, p. 277, 2019.

MADURAIVEERAN, Govindhan; SASIDHARAN, Manickam; GANESAN, Vellaichamy. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 103, p. 113-129, 2018.

MAHMOODI, Pegah et al. Early-stage cervical cancer diagnosis based on an ultra-sensitive electrochemical DNA nanobiosensor for HPV-18 detection in real samples. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2020.

MANZANO, Marisa et al. Rapid and label-free electrochemical DNA biosensor for detecting hepatitis A virus. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, p. 89-95, 2018.

MARINELLO, Francesco et al. Atomic Force microscopy techniques to investigate activated food packaging materials. **Trends in Food Science & Technology**, v. 87, p. 84-93, 2019.

MEHROTRA, Parikha. Biosensors and their applications—A review. **Journal of oral biology and craniofacial research**, v. 6, n. 2, p. 153-159, 2016.

PETERS, John M.; ANSARI, M. Qasim. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 135, n. 1, p. 44-54, 2011.

PINCEZ, Thomas et al. Intensive monitoring of minimal residual disease and chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia in children. **Bone Marrow Transplantation**, v. 56, n. 12, p. 2981-2989, 2021.

PIVIDORI, M. I.; MERKOCI, A.; ALEGRET, S. Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 5-6, p. 291-303, 2000.

POHANKA, Miroslav. Piezoelectric Immunosensor for the Determination of C-Reactive Protein. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 14, p. 8470-8478, 2019.

POTHIPOR, Chammari et al. An electrochemical biosensor for simultaneous detection of breast cancer clinically related microRNAs based on a gold nanoparticles/graphene quantum dots/graphene oxide film. **Analyst**, v. 146, n. 12, p. 4000-4009, 2021.

RAMANAVIČIUS, A.; RAMANAVIČIENĖ, A.; MALINAUSKAS, A. Electrochemical sensors based on conducting polymer—polypyrrole. **Electrochimica acta**, v. 51, n. 27, p. 6025-6037, 2006.

RAMCHANDREN, Radhakrishnan et al. Molecular diagnosis of hematopoietic neoplasms: 2018 update. **Clinics in laboratory medicine**, v. 38, n. 2, p. 293-310, 2018.

RANDVIIR, Edward P.; BANKS, Craig E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 1098-1115, 2013.

RANJBAR, Saba et al. Smart chip for visual detection of bacteria using the electrochromic properties of polyaniline. **Analytical chemistry**, v. 91, n. 23, p. 14960-14966, 2019.

RASOULI, Elisa et al. Advancements in electrochemical DNA sensor for detection of human papilloma virus-A review. **Analytical biochemistry**, v. 556, p. 136-144, 2018.

REBELO, Tânia SCR et al. A disposable saliva electrochemical MIP-based biosensor for detection of the stress biomarker α -amylase in point-of-care applications. **Electrochem**, v. 2, n. 3, p. 427-438, 2021.

RENGARAJ, Saravanan et al. Impedimetric paper-based biosensor for the detection of bacterial contamination in water. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 265, p. 50-58, 2018.

RONKAINEN, Niina J.; HALSALL, H. Brian; HEINEMAN, William R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.

ROSARIO, Ruben; MUTHARASAN, Raj. Nucleic acid electrochemical and electromechanical biosensors: a review of techniques and developments. **Reviews in analytical chemistry**, v. 33, n. 4, p. 213-230, 2014.

SALVATIERRA, Rodrigo Villegas. Nanocompósitos de polianilina e nanotubos de carbono obtidos por polimerização interfacial. **Química, Universidade Federal do Paraná/UFPR: Curitiba**, 2010.

SANGILI, Arumugam et al. Label-free electrochemical immunosensor based on l-cysteine-functionalized AuNP on reduced graphene oxide for the detection of dengue virus E-protein in dengue blood serum. **Composites Part B: Engineering**, v. 238, p. 109876, 2022.

SANTOS, Giselle S. et al. Impedimetric nanostructured genosensor for detection of schistosomiasis in cerebrospinal fluid and serum samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 137, p. 163-169, 2017.

SANTOS, Giselle S. et al. Label-free nanostructured biosensor for *Schistosoma mansoni* detection in complex biological fluids. **Talanta**, v. 204, p. 395-401, 2019.

SEKERES, Mikkael A. et al. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 113, n. 1, p. 28-36, 2009.

SIMÃO, Estefani P. et al. Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. **Talanta**, v. 208, p. 120338, 2020.

SILVA, Adriano de Souza et al. Estudo estrutural e morfológico de nanocompósitos formados por polipirrol e óxidos metálicos. 2016.

SHEN, Qin; WANG, Xuemei. Simultaneous determination of adenine, guanine and thymine based on β -cyclodextrin/MWNTs modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 632, n. 1-2, p. 149-153, 2009.

SONI, Amrita et al. Highly efficient Polyaniline-MoS₂ hybrid nanostructures based biosensor for cancer biomarker detection. **Analytica chimica acta**, v. 1055, p. 26-35, 2019.

SRISOMWAT, Chawin et al. Pop-up paper electrochemical device for label-free hepatitis B virus DNA detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 316, p. 128077, 2020.

SU, Liang et al. Microbial biosensors: a review. **Biosensors and bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 1788-1799, 2011.

SUN, Yanan et al. Recent development of carbon quantum dots: biological toxicity, antibacterial properties and application in foods. **Food Reviews International**, v. 38, n. 7, p. 1513-1532, 2022.

TASIAN, Sarah K.; LOH, Mignon L.; HUNGER, Stephen P. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Integrating genomics into therapy. **Cancer**, v. 121, n. 20, p. 3577-3590, 2015.

TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Trends in DNA biosensors. **Talanta**, v. 77, n. 2, p. 606-623, 2008.

TIAN, Linfan et al. Green, simple and large scale synthesis of N-doped graphene quantum dots with uniform edge groups by electrochemical bottom-up synthesis. **RSC advances**, v. 6, n. 86, p. 82648-82653, 2016.

TOHAMI, Tali; NAGLER, Arnon; AMARIGLIO, Ninette. Laboratory tools for diagnosis and monitoring response in patients with chronic myeloid leukemia. **Isr Med Assoc J**, v. 14, n. 8, p. 501-507, 2012.

TOSAR, J. P.; BRANAS, G.; LAÍZ, J. Electrochemical DNA hybridization sensors applied to real and complex biological samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1205-1217, 2010.

TURNER, Anthony PF. Biosensors--sense and sensitivity. **Science**, v. 290, n. 5495, p. 1315-1317, 2000.

VIDAL, Juan C. et al. Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 49, p. 146-158, 2013.

VELASCO, AX Velasco; ROMO, JJ Rosero; DURAN, HA Estupiñan. Modified graphite biosensor with polypyrrole (PPY) and MWCNT-NH₂. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2019. p. 012003.

WANG, Y. Lynn et al. Chronic myelogenous leukemia: laboratory diagnosis and monitoring. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 32, n. 2, p. 97-111, 2001.

WANG, Qingxiang et al. Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan–mutiwallled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 156, n. 2, p. 599-605, 2011.

WANG, Kun et al. Design of a sandwich-mode amperometric biosensor for detection of PML/RAR α fusion gene using locked nucleic acids on gold electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 6, p. 2870-2876, 2011.

WANG, Liman et al. Electrochemical biosensor for detection of PML/RAR α fusion gene based on eriochrome cyanine R film modified glassy carbon electrode. **Electrochimica acta**, v. 69, p. 56-59, 2012.

WANG, Kun et al. Dual-probe electrochemical DNA biosensor based on the “Y” junction structure and restriction endonuclease assisted cyclic enzymatic amplification for detection of double-strand DNA of PML/RAR α related fusion gene. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 71, p. 463-469, 2015.

WANG, Zhuqing et al. Enzyme immobilization in completely packaged freestanding SU-8 microfluidic channel by electro click chemistry for compact thermal biosensor. **Process biochemistry**, v. 79, p. 57-64, 2019.

World Health Organization. (2020). WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330745>. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

WINDMILLER, Joshua Ray; WANG, Joseph. Wearable electrochemical sensors and biosensors: a review. **Electroanalysis**, v. 25, n. 1, p. 29-46, 2013.

XU, Shicai et al. Real-time reliable determination of binding kinetics of DNA hybridization using a multi-channel graphene biosensor. **Nature communications**, v. 8, p. 14902, 2017.

YANG, Minghui; JAVADI, Alireza; GONG, Shaoqin. Sensitive electrochemical immunosensor for the detection of cancer biomarker using quantum dot functionalized graphene sheets as labels. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 155, n. 1, p. 357-360, 2011.

YANG, Dongli et al. Effect of HPV infection on the occurrence and development of laryngeal cancer: a review. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 19, p. 4455, 2019.

YANG, Fang et al. Transduction process-based classification of biosensors. **Nanobiosensors: From Design to Applications**, p. 23-44, 2020.

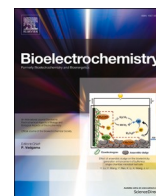
YE, Dekai; ZUO, Xiaolei; FAN, Chunhai. DNA nanotechnology-enabled interfacial engineering for biosensor development. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 11, p. 171-195, 2018.

YILMAZ, Pelin et al. Spectrally selective PANI/ITO nanocomposite electrodes for energy-efficient dual band electrochromic windows. **ACS Applied Energy Materials**, v. 3, n. 4, p. 3779-3788, 2020.

YOO, Seung Min; LEE, Sang Yup. Optical biosensors for the detection of pathogenic microorganisms. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 7-25, 2016.

ZHAO, Jie et al. The genetics and clinical characteristics of children morphologically diagnosed as acute promyelocytic leukemia. **Leukemia**, v. 33, n. 6, p. 1387-1399, 2019.

9. APÊNDICES



Electrochemical DNA biosensor for chronic myelocytic leukemia based on hybrid nanostructure

Karen Y.P.S. Avelino^{a,b}, Léony S. Oliveira^{a,b}, Maryana R. Santos^b, Norma Lucena-Silva^{c,d}, César A.S. Andrade^{a,b}, Maria D.L. Oliveira^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^c Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 50670-420 Recife, PE, Brazil

^d Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Oncologia Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), 50070-550 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Biosensor
Hybrid nanocomposite
BCR/ABL fusion gene
Polypyrrole
Zinc oxide
Electrochemistry

ABSTRACT

The present research refers to elaborating a new label-free electrochemical biosensor used to detect the BCR/ABL fusion gene. We used a hybrid nanocomposite composed of chitosan and zinc oxide nanoparticles (Chit-ZnONP) immobilized on a polypyrrole (PPy) film. DNA segments were covalently immobilized, allowing biomolecular recognition. Atomic force microscopy (AFM), cyclic voltammetry (CV), and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used to evaluate the assembly stages of the biosensor. The biosensor's analytical performance was investigated using recombinant plasmids containing the target oncogene and clinical samples from patients with chronic myeloid leukemia (CML). A limit of detection (LOD) of 1.34 fM, limit of quantification (LOQ) of 4.08 fM, and sensitivity of 34.03 $\mu\text{A fM}^{-1} \text{cm}^2$ were calculated for the BCR/ABL fusion oncogene. The sensing system exhibited high specificity, selectivity, and reproducibility with a standard deviation (SD) of 4.21%. Additionally, a linear response range was observed between 138.80 aM to 13.88 pM with a regression coefficient of 0.96. Also, the biosensor shows easy operationalization and fast analytical response, contributing to the early cancer diagnosis. The proposed nanostructured device is an alternative for the genetic identification BCR/ABL fusion gene.

1. Introduction

Genetic disorders cause Leukemias in hematopoietic precursor cells. Leukemic diseases form a heterogeneous group of neoplasms that constitute one of the most prevalent types of hematologic cancer worldwide. The BCR/ABL fusion gene, which characterizes the Philadelphia chromosome, is predominant in CML patients, constituting an essential genetic biomarker for oncogenesis. The formation of this hybrid oncogene results from the rearrangement between the ABL sequence of chromosome 9 and the breakpoint cluster region (BCR) of chromosome 22 [1,2]. In this perspective, efficient molecular diagnosis with rapid identification of the BCR/ABL fusion gene is essential for patients with suspected leukemia, allowing an early diagnosis, better stratification of the disease according to risk, and prescription of specific therapies [3].

The presumptive methods for identifying CML-related genetic

abnormalities are based on cytogenetic studies, fluorescent in situ hybridization (FISH), and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Although these techniques are effective for the diagnosis, there are still limiting factors, protocols lasting 24 to 48 h for metaphase analysis in cytogenetic assessments, overlapping of chromosome bands in FISH and variable selectivity in RTq-PCR assays. Moreover, there is a need for qualified professionals, robust equipment, and, frequently, simultaneous use of different techniques for the accurate confirmation of the Philadelphia chromosome, generating counterpoints that increase the cost and diagnostic response time [4].

The bioanalysis procedure is based on molecular hybridization between complementary oligonucleotide fragments anchored on transducer surfaces [5]. Thus, DNA biosensors provide selective and specific detection of target genes quickly and inexpensively. Electrochemical biosensors become even more advantageous due to enhanced output performance, high sensitivity, and the possibility of label-free response

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

E-mail address: maria.doliveira@ufpe.br (M.D.L. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108176>

Received 21 February 2022; Received in revised form 3 June 2022; Accepted 4 June 2022

Available online 8 June 2022

1567-5394/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

analysis. However, the influence of experimental factors needs to be investigated for bioanalytical success, such as biomolecules concentration, hybridization time, temperature, pH, and presence of salts. Some of these factors, such as pH and temperature, can directly affect the stability and conformation of DNA probes. Specifically, sugar residues and phosphate groups of nucleic acids can be altered by ionic strength, causing loss of oligonucleotide integrity [6].

Nanostructures and functional materials have been associated with the development of electrochemical interfacing platforms [7]. PPy is a organic polymer with highlighted conductivity. The molecular structure of PPy enables an easy doping process, substantially increasing the material's conductivity through the formation and movement of polarons and bipolaron. Another advantage of applying PPy in electrochemical biosensors is its direct synthesis by electropolymerization on the electrode surface, allowing an experimental control of the polymeric film thickness. The association of conductive polymer and nanostructure metal oxides has received significant attention [8].

Zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) are semiconductor material that exhibits outstanding properties such as physical and chemical stabilities, high electron mobility, and high surface area for molecules immobilization [9,10]. ZnONPs associated with Pd and Pt [11], gold [12], chitosan (Chit) [13], polyaniline, and carbon nanotubes have been used to manufacture diagnostic devices [14]. Chit is a high molecular weight polysaccharide obtained from chitin that has been used to synthesize multilayer structures and hybrid nanocomposites [15]. Chit provides a highly favorable microenvironment for immobilizing biomolecules without loss of biological activity [16].

The development of new sensors utilizing nanomaterials for real-time bioanalysis is essential for the molecular detection of genetic biomarkers. In this perspective, Shamsipur et al. [17] created a DNA biosensor based on graphene nanosheets stabilized by hemoglobin@gold nanoclusters for the electrochemical detection of short DNA species. The BCR/ABL fusion gene was identified in a concentration range of 0.1 fM to 10 pM with a LOD of 0.037 fM, using methylene blue as a signaling probe. 3D corals based on polyaniline nanostructures were developed to capture the BCR/ABL fusion gene, through the use of DNA probes. The gene was quantified with high sensitivity (LOD of 7 aM) in clinical samples [18]. Electrostatically immobilized oligonucleotides on zinc oxide nanorods were obtained for impedimetric determination of BCR/ABL fusion gene [19]. The sensing tool displayed a dynamic range from 1.0 pM to 1.0 nM with a LOD of 0.275 pM. Due to the high prevalence of CML among hematologic malignancies, alternative methods for molecular screening of the BCR/ABL chimeric oncogene should be considered.

The present study reports an electrochemical DNA biosensor as an innovative tool for analyzing and detecting the CML genetic biomarker. The sensing system based on Chit-ZnONP hybrid nanostructures and PPy polymer enabled the BCR/ABL fusion gene identification with high analytical quality, sensitivity, selectivity, and reproducibility. The recognition of the molecular hybridization in clinical samples configured the biosensor as an alternative for medical diagnosis for patients with malignant hematologic disorders. In addition to the early diagnosis of leukemia, the electrochemical test can contribute in an innovative way to the screening of minimal residual disease and evaluation of the therapeutic effectiveness.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Pyrrole (98%), ZnONPs (<50 nm) (97%), Chit (75–85%), hydrochloric acid (HCl) (37%), glacial acetic acid ($C_2H_4O_2$) ($\geq 99.7\%$), glutaraldehyde (25%), bovine serum albumin (BSA) ($\geq 98\%$), potassium ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$) ($\geq 99.0\%$), potassium ferrocyanide ($K_4[Fe(CN)_6]$) (98.5–102.0%), sodium phosphate monobasic and dibasic ($\geq 99.0\%$), 0.05 μm alumina paste ($\alpha-Al_2O_3$) were obtained from Sigma

Aldrich Co. (St Louis, USA). Trizol was acquired from Invitrogen Co. Ltd. (Carlsbad, CA, USA). The ultrapure water resulting from a Milli-Q Plus purification system (Billerica, USA) was used to prepare analytical grade solutions.

2.2. Oligonucleotide probes and real samples

Conventional PCR and agarose gel electrophoresis in the presence ethidium bromide evaluated the clinical and plasmid samples. The recombinant plasmid containing the BCR/ABL fusion gene was amplified using the ALL and CML primers: ALL (9;22) 5'-AGATACTCAGCGGCATTG-3' and CML (9;22) 5'-AGCTTCTCCCTGACATCCGTG-3' primers [20]. Subsequently, chimeric DNA sequences were cloned into the pTA vector. Thus, the analytical results of the biosensor were validated against a standard diagnostic method.

Patients with a leukemia diagnosis were submitted to iliac bone aspiration. The clinical samples were collected with patients' informed consent from the Pediatric Oncology Service biorepository at the Integral Medicine Institute Prof. Fernando Figueira. Bone marrow samples from unselected patients were subjected to genetic analysis after total RNA extraction in 5×10^6 cells using Trizol reagent. Reverse transcription to obtain cDNA specimens was processed using an oligonucleotide primer. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Aggeu Magalhães Institute (FIOCRUZ Pernambuco) with the Certificate of Presentation for Ethical Appreciation (CAAE) no. 13296913.3.0000.5190.

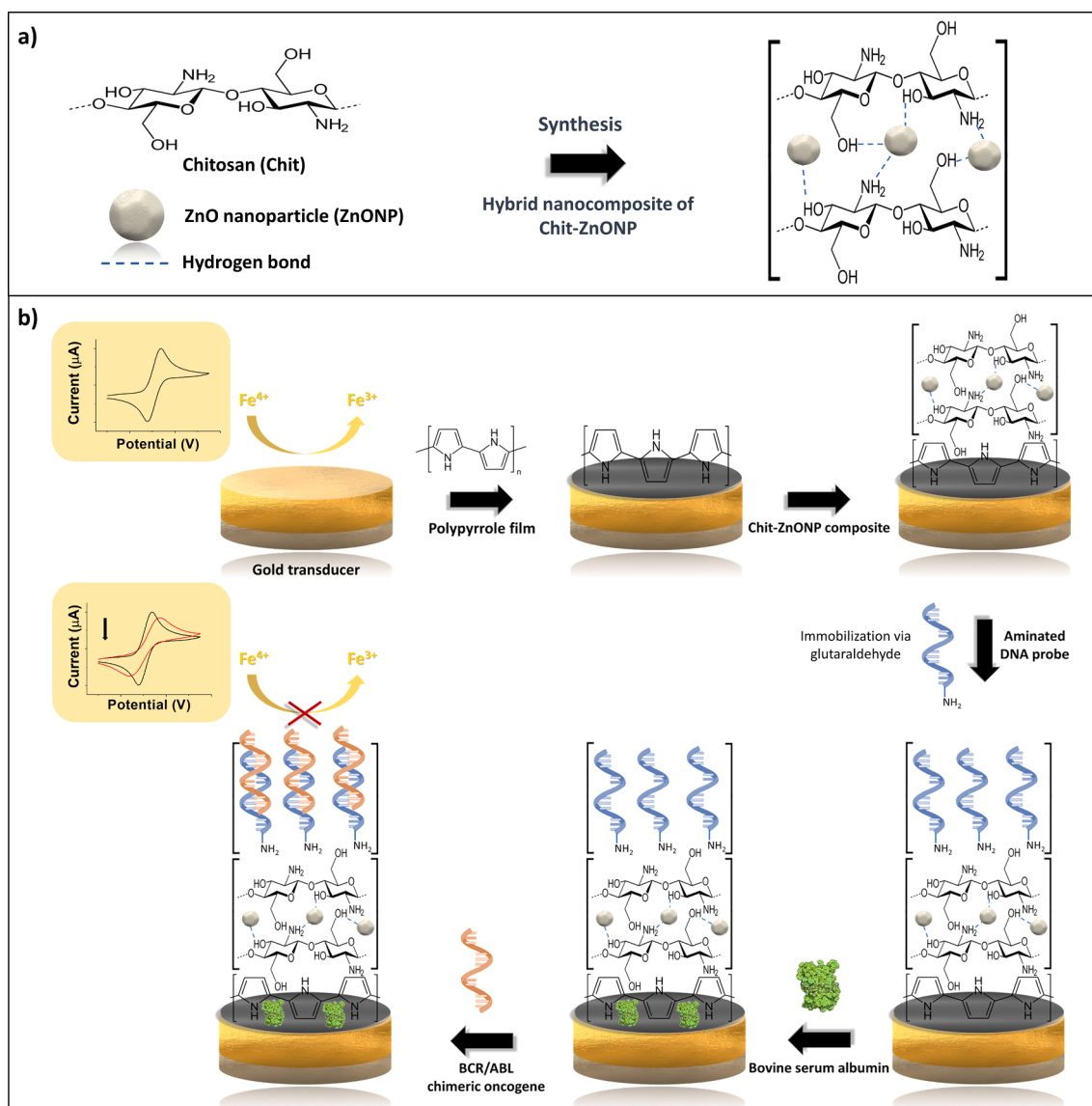
2.3. Synthesis of the Chit-ZnONP nanocomposite and construction of the nanostructured biosensor

The methodology adapted for the synthesis of the Chit-ZnONP nanocomposite was based on Xin et al, 2010 [21] and Rovina and Siddiquee, 2016 [22]. Chit and ZnONPs solutions were prepared at a 1 mg/mL concentration in a 1% acetic acid. Subsequently, the final mixture (volumetric ratio of 1:1) was stirred by magnetic conduction for 30 min at room temperature, then ultrasonication for approximately 1 h.

Preliminarily, the bare gold electrode was moderately polished with an alumina suspension (Al_2O_3) with a particle size of 0.05 μm . Afterward, it was rinsed with ultrapure water, submitted to an ultrasound bath for 10 min to remove residual particles, and dried in air. The first stage of the sensing platform corresponds to the electrochemical polymerization of PPy using 20 mL of 0.5 M HCl solution containing 30 mM pyrrole monomer. Six voltammetric cycles were performed in a potential range of -0.4 at $+1.0$ V at a scan rate of 100 mV s^{-1} . The second stage refers to the adsorption of the Chit-ZnONP hybrid nanocomposite on the polymeric film. In this second stage, 2 μL of the colloidal solution was added for 30 min to obtain a self-assembled nanostructured layer. The third stage consists of the biofunctionalization of the PPy/Chit-ZnONP interface platform with DNA probes to identify the BCR/ABL fusion oncogene. The immobilization of oligonucleotide sequences was performed by dropping 0.5% glutaraldehyde ($v = 2$ μL) with an incubation time of 15 min. Subsequently, 2 μL of a 25 pmol/ μL DNA solution were added for biomolecular conjugation. Glutaraldehyde is a functional crosslinking agent to bind amino groups of the Chit and functionalized DNA. Finally, the fourth stage comprises blocking the sensor layer's nonspecific sites with BSA protein. In this step, 2 μL of 1% BSA solution (pH 7.4) were incorporated over the electrode surface to obtain the PPy/Chit-ZnONP/Probe/BSA system (Scheme 1).

2.4. Studies of genetic detection

The sensitivity and specificity of the electrochemical biosensor were assessed through hybridization studies with recombinant plasmids containing the BCR/ABL chimeric oncogene in variable concentrations (13.88 pM to 138.80 aM). In addition, clinical specimens (cDNA samples) from patients with Philadelphia chromosome (Ph)-positive chronic



Scheme 1. Representation of the Chit-ZnONP hybrid nanocomposite (a) and its use in a nanostructured biosensor based on polypyrrole (PPy), Chit-ZnONP, DNA probe, and bovine serum albumin (BSA) for the detection of the BCR/ABL chimeric oncogene.

myelogenous leukemia were also used for the genetic screening. The biosensor was exposed to 2 μL of the sample for 15 min to the biorecognition process. The temperature of 94 $^{\circ}\text{C}$ was used to cause the denaturation of the genetic material before the biorecognition assay. Dilutions of all biological samples were prepared with phosphate buffer saline solution (PBS, 10 mM, pH 7.4) and kept frozen.

2.5. Electrochemical measurements

An Autolab PGSTAT 128 N in potentiostatic mode (MetrohmAutolab Inc., Netherlands) controlled by NOVA 1.11 software was employed in the electroanalytical measurements. An electrochemical cell was used in conventional configuration with three electrodes immersed in support electrolyte of PBS (10 mM, pH 7.4) containing 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1, v/v). A modified gold electrode ($\phi = 2$ mm) was used as a working electrode. Ag/AgCl saturated with 3 M KCl and platinum wire were used as reference and counter electrodes. Cyclic voltammograms for interfacial characterization were obtained from the application of potentials between -0.2 and $+0.7$ V with a sweep rate of 50 mV s^{-1} . Cole-Cole diagrams were recorded in a frequency range of 100 mHz to 100 kHz using a potential of 10 mV and integration time of 0.125 s.

The electrochemical analysis was obtained at least three independent repetitions of the experiment at room temperature and inside a Faraday cage.

2.6. Microscopy measurements

The morphological characterization of the biosensor construction and its interactions with the BCR/ABL oncogene was performed using an atomic force microscope (SPM-9500; Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). AFM cantilevers with aluminum-coated silicon probe (Nano-world, Japan; resonant frequency = 300 kHz; force constant = 42 N. m^{-1}) were used noncontact mode at room temperature. The topographic micrographs (512 points per line) were collected in a scan area of 5×5 μm . Finally, the 3D images were processed and analyzed using the Gwyddion software.

3. Results and discussion

3.1. Microscopic characterization

AFM was employed to monitor biosensor surface morphologies and

investigate biomolecular activities against clinical samples with a positive diagnosis for the BCR/ABL chimeric oncogene. The PPy electrochemical synthesis resulted in a nodular polymeric matrix with an average thickness of 125 nm (Fig. 1a). PPy globular nodules are expected in electropolymerized thin films, contributing to electrolyte permeation and higher electric conductivity [23]. These structures are dependent on the oxidation–reduction states of the polymer, pyrrole concentration, properties of the doping ions, polymer film thickness, and experimental conditions of electrochemical polymerization [24]. Metal oxide nanoparticles were homogeneously deposited on the PPy polymer, where the PPy/ZnONP film has a maximum height of 201 nm (Fig. 1b). For comparison of the topographic profile, when ZnONPs are in the form of a hybrid nanocomposite with the Chit biopolymer, an increase in surface heterogeneity can be verified (Fig. 1c). Topographic peaks of up to 218 nm were evidenced after the self-assembly of the Chit-ZnONP nanocomposite on the polymeric substrate. The height difference of the PPy and PPy/Chit-ZnONP films suggests that the hybrid nanomaterial has an approximate diameter of 93 nm.

The chemical anchorage of the DNA probe on the PPy/Chit-ZnONP nanoplatform was mediated through glutaraldehyde. Sequentially, incorporating BSA globular proteins enabled the blocking of non-functional sites on the transducer. The AFM 3D image (Fig. 1d) showed that the PPy/Chit-ZnONP/Probe/BSA biosensing system is characterized by well-defined peaks and valleys with a maximum height of 0.24 μm . The flattening structural feature in Fig. 1e indicates the biomolecular hybridization process after exposure of the biosensor to positive CML sample. When the biosensor was exposed to the BCR/ABL oncogene during the biorecognition assay, there was an increase of 0.11 μm in the surface roughness measurements with a maximum height of 0.35 μm . Distinctively, Fig. 1f shows a granular topology with a maximum peak of 0.21 μm for the sensor platform during selectivity tests with a negative sample of CML.

3.2. Electrochemical characterization of the genetic sensing platform

3.2.1. Impedimetric characterization

The physical–chemical analysis of the DNA biosensor preparation stages is shown in Fig. 2. Nyquist plots were adopted to display the EIS data. The Randles circuit model was employed to fit and interpret the experimental spectra accurately (inset of Fig. 2a). This equivalent circuit is composed of a constant phase element (CPE) related to the charge

concentration on the electric double layer; resistance to charge transfer (R_{CT}) associated with electron flow between the electrode and electrolytes in solution; the resistance of the electrolyte solution (R_S); and Warburg impedance (Z_W). The impedimetric parameters were summarized in the [supplementary material](#) (Table S1).

The impedimetric investigation for bare gold electrode (Fig. 2a and Fig. S1) showed an almost linear response characterized by a low R_{CT} value ($R_{CT} = 0.15 \pm 0.001 \text{ k}\Omega$). The decrease of electrochemical resistance from $0.15 \pm 0.001 \text{ k}\Omega$ (for gold electrode) to 0.01 ± 0.0001 (for PPy-modified gold electrode) confirmed the presence of the polymeric film on the metallic surface. These results suggest that the PPy polymer can improve the charge-transfer efficiency of bioanalytical devices, thus favoring the chemical stability, sensitivity, and selectivity of sensing tools [25].

Reduced charge transfer in the electric double layer was observed ($R_{CT} = 2.02 \pm 0.07 \text{ k}\Omega$) after electrochemical modification with the Chit-ZnONP nanocomposite. The conjugation of the Chit-ZnONP hybrid material on the PPy polymer favors the increase in the surface area, provides chemical groups ($-\text{NH}_2$ and $-\text{OH}$) for the covalent immobilization of oligonucleotides, and offers a hydrophilic and biocompatible microenvironment, necessary for the maintenance of the molecular conformation of immobilized biomolecules.

The biofunctionalization of the PPy/Chit-ZnONP nanostructured platform with oligonucleotide probes caused a reduction in the impedimetric signal ($R_{CT} = 10.86 \pm 0.15 \text{ k}\Omega$). This phenomenon is related to the reduced accessibility of redox probe in the sensor system due to the electrostatic repulsion between the phosphate groups of the DNA probes and the negative charges of the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ions. Consequently, the partial impediment of the oxidation–reduction reactions in the regions adjacent to the electrode surface is favored [41]. Additionally, BSA caused an increase in resistance ($R_{CT} = 12.56 \pm 0.45 \text{ k}\Omega$).

3.2.2. Voltammetric characterization

Cyclic voltammograms are graphical representations of a current (I) measured as a function of a linearly swept potential (E) in the form of a triangular wave. Valuable parameters can be obtained from electroanalytical analysis, such as anodic peak current (I_{pa}), cathodic peak current (I_{pc}), anodic peak potential (E_{pa}), and cathodic peak potential (E_{pc}). These variables provide information about charge transfer kinetics, reversibility of electrochemical reactions, redox potentials of

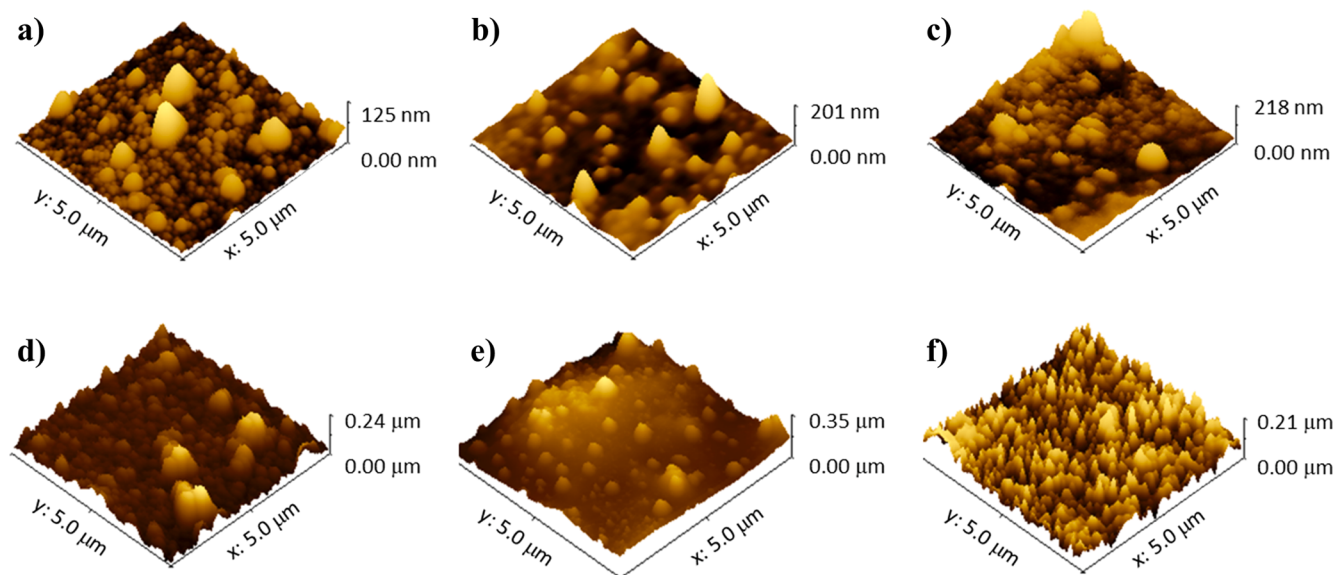


Fig. 1. Atomic force microscopy (AFM) images for PPy (a); PPy/ZnONP (b); PPy/Chit-ZnONP (c); PPy/Chit-ZnONP/Probe/BSA (d); Biosensor/CML positive sample (e); and Biosensor/CML negative sample (f).

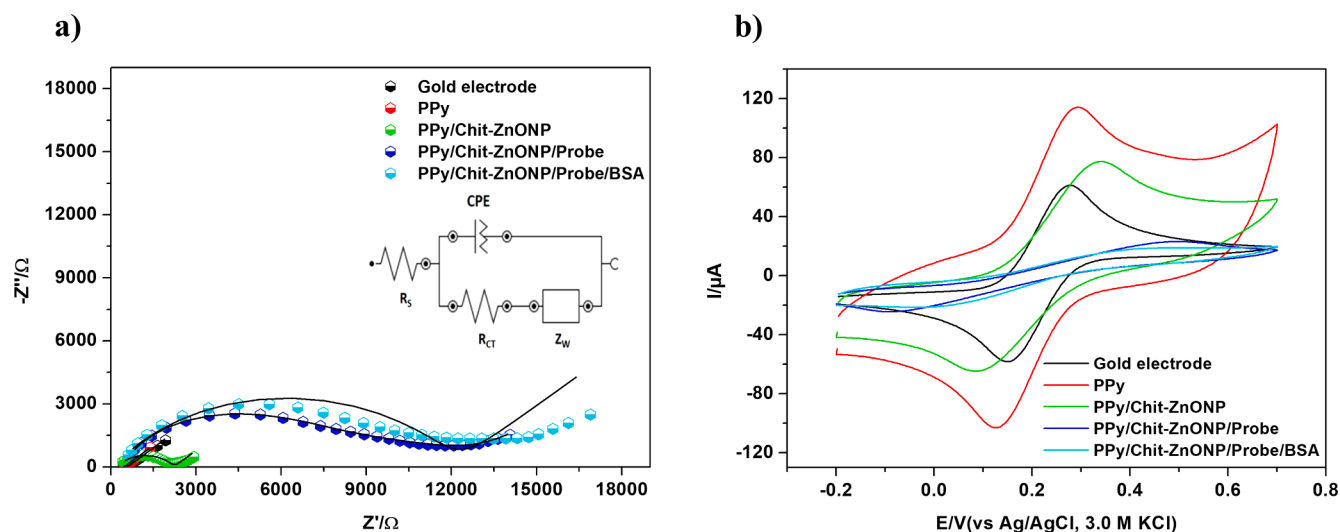


Fig. 2. Impedance spectra (a) and cyclic voltammograms (b) for each assembly step of the nanostructured biosensor based on PPy/Chit-ZnONP/Probe/BSA. Inset: Equivalent circuit used to adjust impedance measurements (a). Three consecutive analyzes were conducted in each methodological procedure, where the experimental values are displayed as the mean values $\pm$ standard deviation.

electroactive substances, biomolecular interactions, and surface modification processes [26].

Voltammetric measurements were recorded in 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ solution (Fig. 2b). As expected, the voltammetric responses agree with the impedimetric measurements discussed earlier. The oxidation and reduction of electrolytic components on the bare gold electrode were characterized by a diffusion-limited transport kinetic with I_{pa} of $61.14 \pm 0.35 \mu\text{A}$. Diffusion limited for bare gold electrode was assumed considering the fact that redox active species with high electron transfer rate, such as the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ electrolyte, has an electron transfer rate controlled by the flow in which redox-active species are brought to the electrode surface (i.e. diffusion limited) [27]. Additionally, the voltammogram exhibits well-defined oxidative and reductive processes.

The electropolymerization of the pyrrole monomer caused an increase in the voltammetric signal. Additionally, the oxidation current became higher ($I_{pa} = 141.06 \pm 0.04 \mu\text{A}$) due to polypyrrole-mediated electron transfer. A decrease in anodic and cathodic currents ($I_{pa} = 77.27 \pm 0.20 \mu\text{A}$ and $I_{pc} = -64.98 \pm 0.18 \mu\text{A}$) was obtained after molecular structuring of the Chit-ZnONP nanocomposite on the PPy conductive matrix, indicating dielectric properties of the material. A

lower voltammetric response ($I_{pa} = 22.769 \pm 0.255 \mu\text{A}$) was observed after the chemical immobilization of DNA probes on the Chit-ZnONP composite. As expected, the use of BSA molecules to block nonspecific sites of the biosensor caused a reduction in voltammetric currents ($I_{pa} = 18.432 \pm 0.057 \mu\text{A}$). Additionally, voltammetric and impedimetric characterizations for each isolated component that the biosensitive nanostructured platform was presented in Fig. S2. Therefore, it was possible to ensure the proper construction of the biological sensor on a transducer substrate through these electrochemical characterizations.

3.3. Evaluation of experimental conditions

3.3.1. Electrochemical polymerization of PPy

Fig. 3 shows the voltammetric measurements recorded during the potentiodynamic polymerization of pyrrole. Electropolymerization involves the application of a potential variation, resulting in the oxidation of the monomer unit. The electrochemical polymerization reaction proceeds with the coupling of monomer cations and oligomer cations until the PPy film is formed [28].

The electrochemical behavior of the electrode surface was

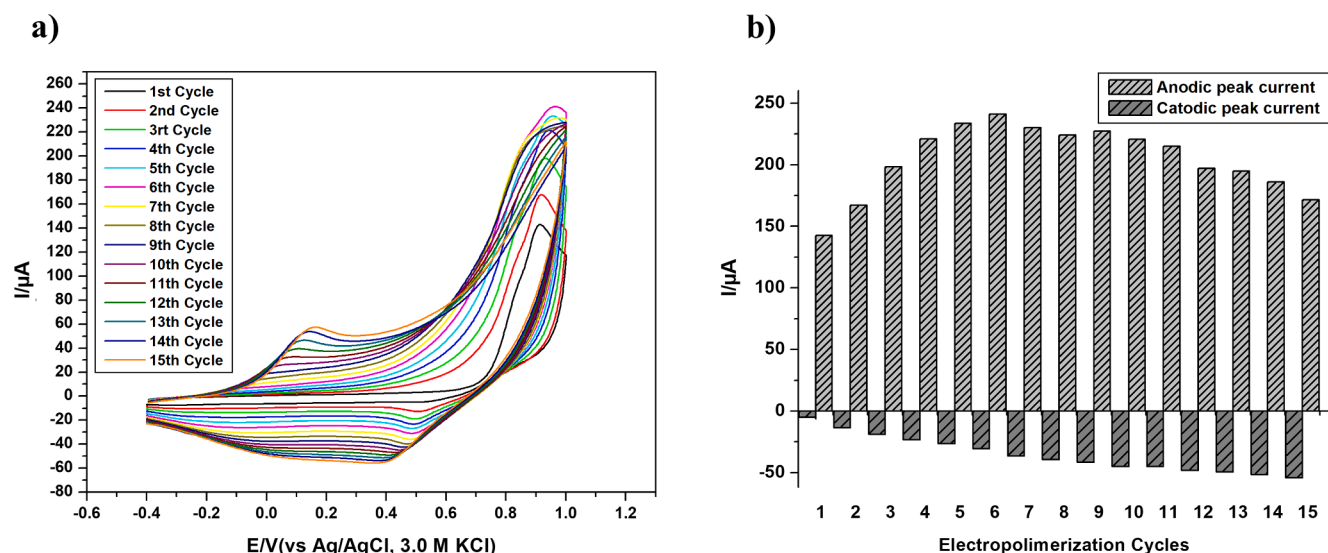


Fig. 3. Cyclic voltammograms (a) and peak currents (b) were recorded during the potentiodynamic polymerization of pyrrole.

investigated during 15 cycles of polymerization, where a reduction in the anodic current was observed after the 6th scanning cycle. This result is consistent with previous studies [29,30]. It is related to an increase in the conducting polymer layer resistance, lower electrical double layer capacitance, and decreased pyrrole monomers consumed during the synthesis [31]. Therefore, six electropolymerization cycles were ideal for obtaining a reproducible polymeric coating with maximum conductivity response and controllable thickness.

3.3.2. Immobilization study of the Chit-ZnONP nanocomposite

The self-assembled layer of Chit-ZnONP hybrid composite formed on a gold electrode previously modified with PPy was investigated under different adsorption times (1, 10, 20, 30, and 40 min). The increase in adsorption time resulted in voltammetric curves with anodic peak potential shifted to more positive potentials. This fact is due to the oxidation of zinc oxide species on the electrode surface [32] (Fig. 4a). According to Fig. 4b, the diameter of the impedance spectrum increased with the adsorption time. These responses indicate that the incubation period influences the amount of nanomaterial deposited on the transducer. Thus, it results in a change of the resistance signal. However, from the R_{CT} analysis (Fig. S3), it was verified that the time of 30 min causes electroodic saturation with moderate blocking of the redox reactions in the electrical double layer. Thus, the time of 30 min presented ideal adsorption kinetics for the molecular ordering of the Chit-ZnONP nanocomposite on the polymeric film.

3.4. Analytical performance with plasmid DNA

The detection study of the BCR/ABL chimeric oncogene involves monitoring variations in the electrochemical currents. The analytical behavior of the nanostructured device was evaluated through the hybridization of recombinant plasmids. As evidenced in Fig. 5a, after exposing the PPy/Chit-ZnONP/Probe/BSA system to synthetic DNA samples, a reduction in the voltammetric signal was observed with a decrease in the height of the anodic and cathodic peaks. The electrochemical event indicates hybridization between two oligonucleotide strands, which causes greater electrostatic repulsion between the $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ions and the negatively charged phosphate groups of the gene molecules. Due to the formation of a barrier to electron transport, the current values are reduced with the more significant number of cDNA conjugates at the transducer interface [17].

Fig. 5b shows the anodic peak currents for the DNA biosensor after its

exposure to different concentrations of the BCR/ABL chimeric sequence. The biodetection assay indicated that the proposed biosensor has an excellent linear response to BCR/ABL chimeric oncogene in the concentration range of 138.80 aM to 13.88 pM with a SD of 3.49 (Fig. 5b). The linear regression equation was expressed as $y = 12.07 - 1.06 \cdot \ln(x)$ with a coefficient of determination (R^2) of 0.96 ($n = 6$). Where x corresponds to the target DNA concentration and y refers to the I_{pa} value. It is noteworthy that the linearization of the x axis was performed on a logarithmic scale of the concentration. A LOD of 1.34 fM, LOQ of 4.08 fM, and sensitivity of $34.03 \mu A fM^{-1} cm^2$ were estimated. These analytical variables were measured using the respective equations, $3.3SD/slope$, $10SD/slope$, and $SD/(area \text{ of the electrode})$, where SD is the standard deviation of the blank sample (zero concentration) in triplicate and slope is the angular coefficient of the linearity study. The reproducibility for the bioanalysis system was 4.21%, obtained from the SD value for three independent biosensing tools produced with the same methodological process.

In addition, the percentage variation of the anodic peak current (ΔI), described as:

$$\Delta I(\%) = \frac{I_b - I_a}{I_b} \times 100 \quad (1)$$

was shown in Fig. S4. Where I_b and I_a correspond to the peak current before and after the oncogenic capture. A gradual increase in the ΔI (%) values can be seen in correlation with the concentration of the studied plasmids. The gene detection caused the linear variation of ΔI (%) from $33.62 \pm 2.42\%$ to $132.123 \pm 3.84\%$, reflecting the molecular capture ability of the proposed system (Table S2).

3.5. Electrochemical investigation in clinical samples

Biodetection assays with real biological samples were performed to verify the clinical relevance of the nanostructured biosensor. Reduced voltammetric signals were reported in Fig. 6a after exposure of the sensing system to different cDNA samples from patients diagnosed with CML. Positive samples for BCR/ABL fusion gene caused significant current variations with ΔI values between $9.78 \pm 3.62\%$ and $561.44 \pm 3.50\%$ (Fig. 6b). Differences in the magnitude of the electrochemical responses can be attributed to the target oncogene expression and, consequently, to the staging of the hematologic malignancy [33]. These results indicate the feasibility of the sensor utilizing nanomaterials for gene screening in cDNA clinical specimens.

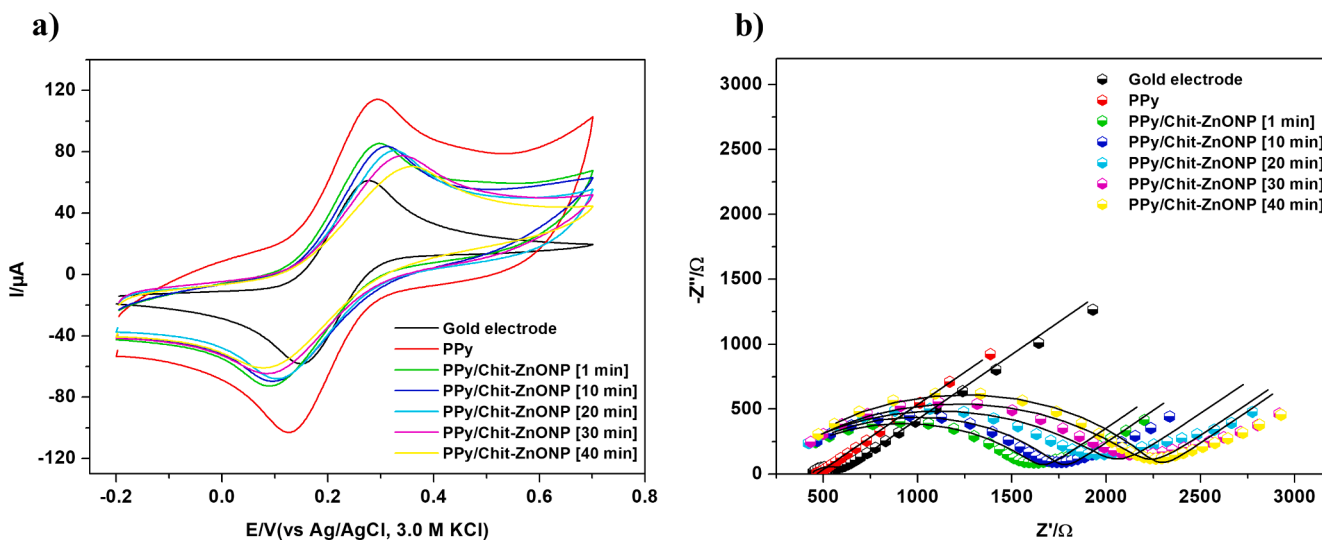


Fig. 4. Voltammetric plots (a) and impedance spectra (b) for the self-assembled layer of Chit-ZnONP hybrid composite formed under different adsorption times (1, 10, 20, 30, and 40 min). Three consecutive analyzes were conducted in each methodological procedure, where the experimental values are displayed as the mean values $\pm$ their standard deviation.

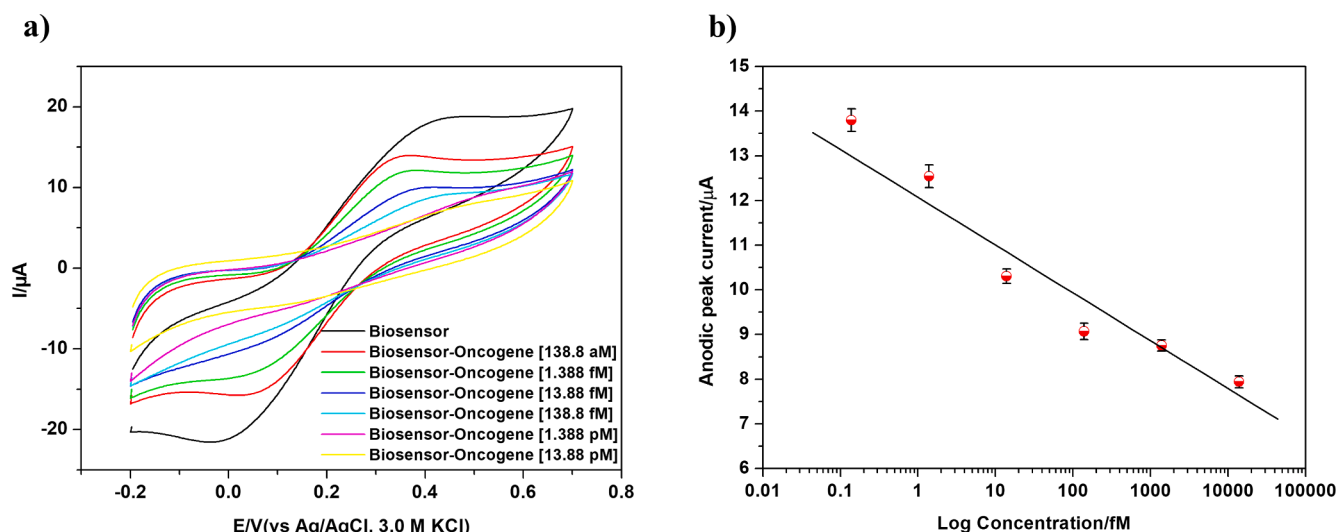


Fig. 5. Cyclic voltammograms (a) for the DNA biosensor exposed to variables concentrations of the BCR/ABL fusion gene in recombinant plasmids. Calibration plot of the bioanalytical platform with linear regression equation expressed as $y = 12.07 - 1.06 \ln(x)$, $R^2 = 0.96$, and $SD = 3.49$ (b). Three consecutive analyzes were conducted in each methodological procedure, where the experimental values are displayed as the mean values $\pm$ their standard deviation.

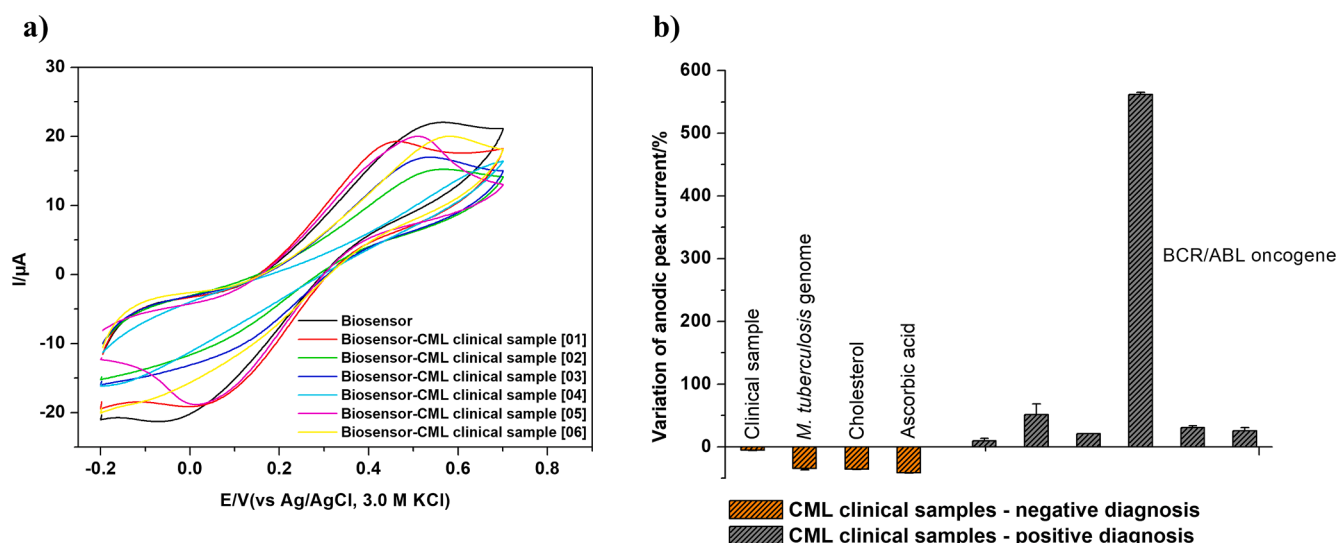


Fig. 6. Voltammetric records (a) of the DNA biosensor exposed to clinical samples from patients diagnosed with CML. The histogram shows ΔI values for the biosensor after assays with leukemia-negative samples and human cDNA samples containing biological interferers, such as *M. tuberculosis* genome (5 mM), and ascorbic acid (0.05 mM).

Specificity analysis was conducted using leukemia-negative samples. The interference studies were performed using human cDNA samples contained biological interferers: *Mycobacterium tuberculosis* genome, cholesterol (5 mM), and ascorbic acid (0.05 mM) [34]. The distinct electrochemical profiles show an excellent specificity and selectivity of the biosensor (Fig. 6b). Thus, the biosensor can be used for clinical trials with complex samples.

Conventional techniques for identifying genetic disorders in human blood have disadvantages such as late diagnosis, limited sensitivity, and complex protocols. In contrast, the nanostructured biosensor developed in this study provides a fast analytical response within 15 min with a single hybridization step. Furthermore, the biodetection process occurs isothermally, at room temperature, without the need for temperature cycling, as in qRT-PCR experiments. In this perspective, a new tool developed for identification the BCR/ABL chimeric oncogene is relevant for the health promotion of patients with leukemia and the monitoring of minimal residual disease.

An analytical comparison with previous works is shown in Table 1. The biodevices presented in the Table 1 are based on the association of different nanomaterials, such as polyaniline nanostructures [18], ZnONPs [35], graphene sheets [36] and gold nanoparticles [17]. Electrochemical modification methodologies were used to build biosensors on flexible or rigid transducers. It is observed that the use of conductive polymers such as polyaniline can increase the sensitivity of sensing tools, leading to limits of detection on the order of attomolar [18]. In this perspective, the incorporation of the Chit-ZnONP nanocomposite in a conductive matrix of PPy enabled the development of an innovative and biosensitive nanostructured platform, until then not described in electrochemical genosensors.

Distinctively from other studies, the developed bioanalysis system requires only small volumes of biological samples (only two microliters) for rapid and quantitative detection of the BCR/ABL fusion gene. The biodevice presented notable analytical performance parameters: comparable detection and quantification limits, high selectivity, and

Table 1

Analytical comparison between the biosensor presented in this work and the other DNA sensing systems reported in the literature for the electrochemical identification of the BCR/ABL fusion gene.

Sensor platform	Electroanalytical technique	Limit of detection	Limit of quantification	Detection range	Response time	Electrochemical marker	Reference
ITO coated glass substrate / polyaniline nanotubes / biotinylated DNA probe	CV and EIS	0.1 fM	–	0.1 fM to 1 μ M	20 min	–	[37]
ITO coated glass substrate / polyaniline-MoS ₂ hybrid nanostructures / biotinylated DNA probe	CV and EIS	3 aM	–	10 aM to 1 μ M	15 min	–	[38]
ITO coated glass substrate / amino-functionalized silica coated zinc oxide nanoparticles / aminated DNA probe	EIS	0.1 fM	–	0.1 fM to 1 μ M	–	–	[35]
Glassy carbon electrode / graphene sheets / polyaniline / gold nanoparticles / thiolated DNA probe	CV, EIS and DVP	1.05 pM	–	10 pM to 20 nM	~ 90 min	Biotinylated hairpin molecules and streptavidin-labelled alkaline phosphatase	[36]
ITO electrode / 3D coral like polyaniline nanostructures / biotinylated DNA probe	CV and EIS	7 aM	–	10 aM to 1 μ M	15 min	–	[18]
Glassy carbon electrode / gold nanoparticles / hemoglobin-capped gold nanoclusters stabilized graphene nanosheets / aminated DNA probe	CV, EIS and DVP	0.03 fM	–	aM to 10 pM	30 min	Methylene blue	[17]
Gold electrode / PPy / Chit-ZnONP / aminated DNA probe / BSA	CV and EIS	1.34 fM	4.08 fM	138.80 aM to 13.88 pM	15 min	–	This work

CV – cyclic voltammetry; DPV – differential pulse voltammetry; EIS – electrochemical impedance spectroscopy; ITO – indium tin oxide.

specificity. It is important to note that most electrochemistry-based assays require the analytical signal amplification using, for example, methylene blue, biotinylated hairpin molecules, and streptavidin-labelled alkaline phosphatase [17,36]. In this report, our DNA biosensor is label-free to reduce the demand for chemicals, response time, and methodological process costs.

4. Conclusions

The proposed biosensor is a promising tool for the molecular detection of the BCR/ABL chimeric oncogene. An innovative nanostructured platform based on PPy electropolymerized film and Chit-ZnONP nanocomposite was successfully obtained. The electroodic modification enabled amplification of the surface area, electron transfer efficiency, and biocompatible microenvironment. The biosensor is effective for leukemia investigation with high analytical performance, sensitivity, specificity, and selectivity. Small volumes of synthetic oligonucleotides and real biological samples were used in bioactivity assays. Thus, the biosensor can be applied for clinical trials. In addition, label-free electrochemical responses were measured at a 15-minute interval with limits of detection and quantification in the femtomolar order. Therefore, a new sensing assay was designed for diagnostic applications of hematologic malignancies, enabling the identification of early-stage cancer.

CRediT authorship contribution statement

Karen Y.P.S. Avelino: Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Léony S. Oliveira:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Maryana R. Santos:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Norma Lucena-Silva:** Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition. **César A.S. Andrade:** Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition. **Maria D. L. Oliveira:** Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The researchers are grateful for the assistance provided by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development/CNPq (grant numbers 314894/2018-7 and 314756/2018-3); Brazilian Health Ministry Project DECIT-FINEP-CNPq (grant numbers 1299/2013 and 401700/2015-1); Pernambuco State Foundation for Research Support, FACEPE-PPSUS-APQ (grant number 0040-4.00/13); and PRO-PESQ/UFPE. Léony S. Oliveira and Sevy R.D.E. Oliveira would like to thank CAPES and CNPq for their respective scholarships.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108176>.

References

- [1] M. Baccarani, F. Castagnetti, G. Gugliotta, G. Rosti, A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML, *Ann. Hematol.* 94 (2015) 141–147.
- [2] F. Loscocco, G. Visani, S. Galimberti, A. Curti, A. Isidori, BCR-ABL independent mechanisms of resistance in chronic myeloid leukemia, *Front. Oncol.* 9 (2019) 939.
- [3] M.W. Deininger, N.P. Shah, J.K. Altman, E. Berman, R. Bhatia, B. Bhatnagar, D. J. DeAngelo, J. Gotlib, G. Hobbs, L. Maness, Chronic myeloid leukemia, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology, *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 18 (2020) 1385–1415.
- [4] R. Ramchandren, T. Jazaerly, M.H. Bluth, A.M. Gabali, Molecular diagnosis of hematopoietic neoplasms: 2018 update, *Clinics in Laboratory Medicine*, 38 (2018) 293–310.
- [5] X. Lu, M. Cui, Q. Yi, Detection of mutant genes with different types of biosensor methods, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 126 (2020), 115860.
- [6] A. Sabahi, R. Salhandish, A. Ghaffarinejad, E. Omidinia, Electrochemical nanosensor for highly sensitive detection of miR-21 biomarker based on SWCNT-grafted dendritic Au nanostructure for early detection of prostate cancer, *Talanta* 209 (2020), 120595.

- [7] M.-B. Gholivand, A. Akbari, A sensitive electrochemical genosensor for highly specific detection of thalassemia gene, *Biosens. Bioelectron.* 129 (2019) 182–188.
- [8] Z. Ait-Touchente, H.E.E.Y. Sakhraoui, N. Fourati, C. Zerrouki, N. Maouche, N. Yaakoubi, R. Touzani, M.M. Chehimi, High performance zinc oxide nanorod-doped ion imprinted polypyrrole for the selective electroensing of mercury II ions, *Appl. Sci.* 10 (2020) 7010.
- [9] S. Chawla, C.S. Pundir, An amperometric hemoglobin A1c biosensor based on immobilization of fructosyl amino acid oxidase onto zinc oxide nanoparticles-polypyrrole film, *Anal. Biochem.* 430 (2012) 156–162.
- [10] N.P. Shetti, S.D. Bukkitgar, K.R. Reddy, C.V. Reddy, T.M. Aminabhavi, ZnO-based nanostructured electrodes for electrochemical sensors and biosensors in biomedical applications, *Biosens. Bioelectron.* 141 (2019), 111417.
- [11] C. Singhal, C.S. Pundir, J. Narang, A genosensor for detection of consensus DNA sequence of Dengue virus using ZnO/Pt-Pd nanocomposites, *Biosens. Bioelectron.* 97 (2017) 75–82.
- [12] Z. Hatami, E. Ragheb, F. Jalali, M.A. Tabrizi, M. Shamsipur, Zinc oxide-gold nanocomposite as a proper platform for label-free DNA biosensor, *Bioelectrochemistry* 133 (2020) 107458, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107458>.
- [13] H. Pyman, H. Roshanfekar, S. Ansari, DNA-based electrochemical biosensor using chitosan-carbon nanotubes composite film for biodetection of Pirazon, *Eurasian. Chem. Commun.* 2 (2020) 213–225.
- [14] S. Mohajeri, A. Dolati, K. Yazdanbakhsh, Synthesis and characterization of a novel non-enzymatic glucose biosensor based on polyaniline/zinc oxide/multi-walled carbon nanotube ternary nanocomposite, *J. Electrochem. Sci. Eng.* 9 (3) (2019) 207–222.
- [15] S.K. Shukla, A.K. Mishra, O.A. Arotiba, B.B. Mamba, Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review, *Int. J. Biol. Macromol.* 59 (2013) 46–58.
- [16] N. Antony, S. Mohanty, S.K. Nayak, Electrochemical inspection of polypyrrole/chitosan/zinc oxide hybrid composites, *J. Appl. Polym. Sci.* 137 (2020) 49561.
- [17] M. Shamsipur, L. Samandari, L. Farzin, F. Molaabasi, M.H. Mousazadeh, Dual-modal label-free genosensor based on hemoglobin@ gold nanocluster stabilized graphene nanosheets for the electrochemical detection of BCR/ABL fusion gene, *Talanta* 217 (2020), 121093.
- [18] A. Soni, C.M. Pandey, S. Solanki, G. Sumana, Synthesis of 3D-coral like polyaniline nanostructures using reactive oxide templates and their high performance for ultrasensitive detection of blood cancer, *Sens. Actuators, B* 281 (2019) 634–642.
- [19] J. Xia, J. Qing, J. Liu, A sensitive electrochemical impedance DNA biosensor based on ZnO nanorod electrodes for BCR/ABL fusion gene detection, *Int. J. Electrochem. Sci.* 14 (2019) 4271–4279.
- [20] R. Hoteit, R. Mahfouz, Proposed algorithm for the best detection of different bcr-abl gene fusion transcripts in molecular diagnostics laboratories: experience of a major referral center, *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 15 (4) (2011) 227–229.
- [21] L.-H. Li, J.-C. Deng, H.-R. Deng, Z.-L. Liu, L. Xin, Synthesis and characterization of chitosan/ZnO nanoparticle composite membranes, *Carbohydr. Res.* 345 (2010) 994–998.
- [22] K. Rovina, S. Siddiquee, Electrochemical sensor based rapid determination of melamine using ionic liquid/zinc oxide nanoparticles/chitosan/gold electrode, *Food Control* 59 (2016) 801–808.
- [23] J. Liu, D. Xuan, Z. Lu, Z. Wang, Q. Liu, S. Li, D. Wang, Y. Ye, D. Wang, Z. Zheng, A novel perspective on interfacial interactions between polypyrrole and carbon materials for improving performance of supercapacitors, *Appl. Surf. Sci.* 573 (2022), 151626.
- [24] S. Carquigny, O. Segut, B. Lakard, F. Lallemand, P. Fievet, Effect of electrolyte solvent on the morphology of polypyrrole films: application to the use of polypyrrole in pH sensors, *Synth. Met.* 158 (2008) 453–461.
- [25] F.G. Zamani, H. Moulahoum, M. Ak, D.O. Demirkol, S. Timur, Current trends in the development of conducting polymers-based biosensors, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 118 (2019) 264–276.
- [26] M.J. Jara-Palacios, M.L. Escudero-Gilete, J.M. Hernández-Hierro, F.J. Heredia, D. Hernanz, Cyclic voltammetry to evaluate the antioxidant potential in winemaking by-products, *Talanta* 165 (2017) 211–215.
- [27] Y. Xing, S. O'Shea, S. Li, Electron transfer kinetics across a dodecanethiol monolayer self assembled on gold, *J. Electroanal. Chem.* 542 (2003) 7–11.
- [28] A.A. Hermas, S.S. Al-Juaid, S.A. Al-Thabaiti, A.H. Qusti, M. Abdel Salam, In situ electropolymerization of conducting polypyrrole/carbon nanotubes composites on stainless steel: Role of carbon nanotubes types, *Prog. Org. Coat.* 75 (4) (2012) 404–410.
- [29] K.Y. Avelino, L.S. Oliveira, N. Lucena-Silva, C.A. Andrade, M.D. Oliveira, Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens, *Talanta* 226 (2021), 122118.
- [30] K.Y. Avelino, G.S. Dos Santos, I.A. Frías, A.G. Silva-Junior, M.C. Pereira, M.G. Pitta, B.C. de Araújo, A. Errachid, M.D. Oliveira, C.A. Andrade, Nanostructured sensor platform based on organic polymer conjugated to metallic nanoparticle for the impedimetric detection of SARS-CoV-2 at various stages of viral infection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 206 (2021), 114392.
- [31] M. Mahmoudian, W. Basirun, Y. Alias, A.K. Zak, Electrochemical characteristics of coated steel with poly (N-methyl pyrrole) synthesized in presence of ZnO nanoparticles, *Thin Solid Films* 520 (2011) 258–265.
- [32] R. Renuka, L. Srinivasan, S. Ramamurthy, A. Veluchamy, N. Venkatakrishnan, Cyclic voltammetric study of zinc and zinc oxide electrodes in 5.3 M KOH, *J. Appl. Electrochem.* 31 (2001) 655–661.
- [33] K.Y.P. dos Santos Avelino, I.A.M. Frías, N. Lucena-Silva, C.A.S. de Andrade, M.D. L. de Oliveira, Impedimetric gene assay for BCR/ABL transcripts in plasmids of patients with chronic myeloid leukemia, *Microchim. Acta* 185 (2018) 415.
- [34] M.K. Patel, M.A. Ali, S. Srivastava, V.V. Agrawal, S. Ansari, B.D. Malhotra, Magnesium oxide grafted carbon nanotubes based impedimetric genosensor for biomedical application, *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013) 406–413.
- [35] C.M. Pandey, S. Dewan, S. Chawla, B.K. Yadav, G. Sumana, B.D. Malhotra, Controlled deposition of functionalized silica coated zinc oxide nano-assemblies at the air/water interface for blood cancer detection, *Anal. Chim. Acta* 937 (2016) 29–38.
- [36] X. Chen, L. Wang, S. Sheng, T. Wang, J. Yang, G. Xie, W. Feng, Coupling a universal DNA circuit with graphene sheets/polyaniline/AuNPs nanocomposites for the detection of BCR/ABL fusion gene, *Anal. Chim. Acta* 889 (2015) 90–97.
- [37] A. Soni, C.M. Pandey, S. Solanki, R. Kotnala, G. Sumana, Electrochemical genosensor based on template assisted synthesized polyaniline nanotubes for chronic myelogenous leukemia detection, *Talanta* 187 (2018) 379–389.
- [38] A. Soni, C.M. Pandey, M.K. Pandey, G. Sumana, Highly efficient Polyaniline-MoS₂ hybrid nanostructures based biosensor for cancer biomarker detection, *Anal. Chim. Acta* 1055 (2019) 26–35.

Electronic Supporting Material

**ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSOR FOR CHRONIC MYELOCYTIC
LEUKEMIA BASED ON HYBRID NANOSTRUCTURE**

Karen Y.P.S. Avelino^{a,b}, Léony S. Oliveira^{a,b}, Maryana R. Santos^b, Norma Lucena-Silva^{c,d}, César A.S. Andrade^{a,b}, Maria D.L. Oliveira^{a,b*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^bLaboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^cInstituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 50670-420 Recife, PE, Brazil.

^dLaboratório de Biologia Molecular, Departamento de Oncologia Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), 50070-550 Recife, PE, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed.

Maria D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: maria.dloliveira@ufpe.br

Figure S1. R_{CT} values for the biosensor constituents. Three consecutive analyzes were conducted in each methodological procedure, where the experimental values are displayed as the mean values $\pm$ standard deviation.

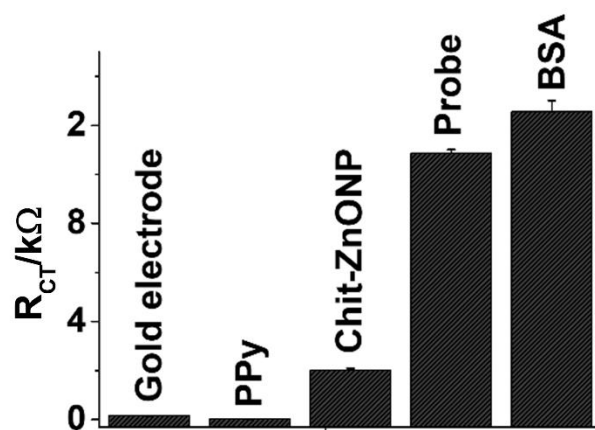


Figure S2. Voltammetric (a) and impedimetric (b) characterization for each isolated component that constitutes the biosensitive nanostructured platform.

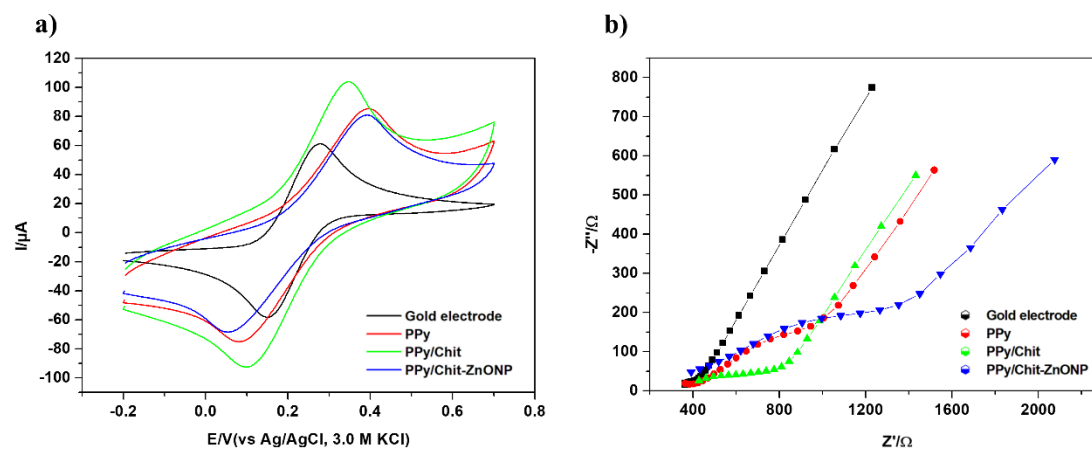


Figure S3. R_{CT} values for different incubation times of the Chit-ZnONP nanomaterial.

Three consecutive analyzes were conducted in each methodological procedure, where the experimental values are displayed as the mean values $\pm$ their standard deviation.

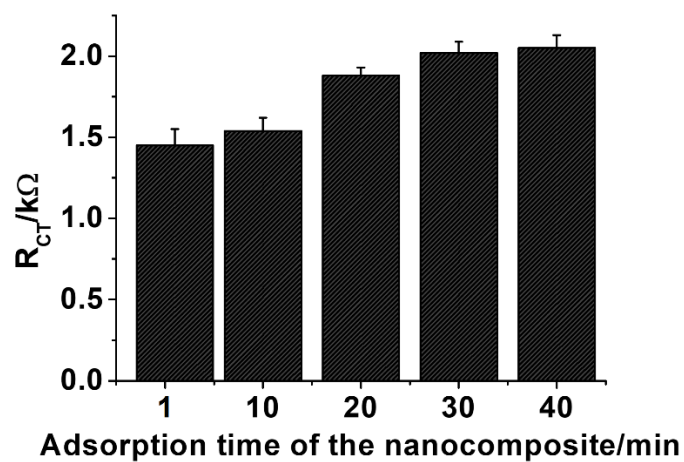


Figure S4. ΔI (%) values for the DNA biosensor after exposure to different concentrations of the target sequence. Three consecutive analyzes were conducted in each methodological procedure, where the experimental values are displayed as the mean values $\pm$ their standard deviation.

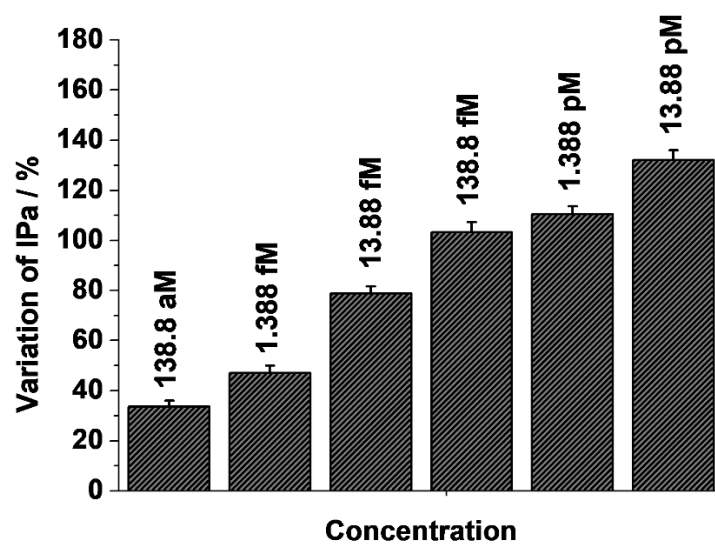


Table S1. Values of the equivalent circuit elements obtained from the fitting of the impedance results. Three consecutive analyzes were conducted in each methodological procedure, where the experimental values are displayed as the mean values $\pm$ their standard deviation.

Electrode modification	CPE (μF)	n	R_{CT} ($k\Omega$)
Gold electrode	7.380 ± 0.222	0.728 ± 0.003	0.151 ± 0.001
PPy	69.300 ± 0.283	0.735 ± 0.007	0.018 ± 0.0001
PPy/Chit-ZnONP	0.632 ± 0.001	0.624 ± 0.020	2.020 ± 0.070
PPy/Chit-ZnONP/Probe	0.448 ± 0.025	0.577 ± 0.004	10.867 ± 0.153
PPy/Chit-ZnONP/Probe/BSA	0.235 ± 0.018	0.637 ± 0.005	12.567 ± 0.451

Table S2. Amperometric anodic shift for the construction steps of the biosensor after its exposure to plasmid samples containing the BCR/ABL fusion gene. Three consecutive analyzes were conducted in each methodological procedure, where the experimental values are displayed as the mean values $\pm$ their standard deviation.

Electrode modification	Analyte concentration	I _{PA} before hybridization (μ A)	I _{PA} after hybridization (μ A)	ΔI (%)
Gold electrode	-	61.142 $\pm$ 0.356	-	-
PPy	-	141.060 $\pm$ 0.045	-	-
PPy/Chit-ZnONP	-	77.271 $\pm$ 0.200	-	-
PPy/Chit-ZnONP/Probe	-	22.769 $\pm$ 0.255	-	-
PPy/Chit-ZnONP/Probe/BSA	-	18.432 $\pm$ 0.057	-	-
Biosensor	-	18.432 $\pm$ 0.057	-	-
Biosensor/Oncogene	138.800 aM	-	13.797 $\pm$ 0.250	33.623 $\pm$ 2.420
Biosensor/Oncogene	1.388 fM	-	12.545 $\pm$ 0.252	46.959 $\pm$ 2.980
Biosensor/Oncogene	13.880 fM	-	10.306 $\pm$ 0.160	78.876 $\pm$ 2.803
Biosensor/Oncogene	138.800 fM	-	9.072 $\pm$ 0.181	103.213 $\pm$ 4.118
Biosensor/Oncogene	1.388 pM	-	8.756 $\pm$ 0.127	110.524 $\pm$ 3.062
Biosensor/Oncogene	13.880 pM	-	7.942 $\pm$ 0.132	132.123 $\pm$ 3.847

**FLEXIBLE GENOSENSORS TO DETECT PML/RAR α FUSION GENE BASED
ON POLYPYRROLE AND GRAPHENE QUANTUM DOTS: A STUDY OF
ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA IN CHILDREN**

Léony S. Oliveira^{a,b}, Karen Y.P.S. Avelino^{a,b}, Sevy R.D.E. Oliveira^b, Norma Lucena-Silva^{c,d}, César A.S. Andrade^{a,b}, Maria D.L. Oliveira^{a,b*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^bLaboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^cInstituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 50670-420 Recife, PE, Brazil.

^dLaboratório de Biologia Molecular, Departamento de Oncologia Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), 50070-550 Recife, PE, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed.

Maria D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: maria.dloliveira@ufpe.br

10. ANEXOS

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.3



ISSN: 1567-5394

DESCRIPTION

Bioelectrochemistry is an international journal devoted to **electrochemical** principles in biology and biological aspects of **electrochemistry**. It publishes experimental and theoretical papers dealing with the electrochemical aspects of:

- Electrified interfaces (electric double layers, adsorption, electron transfer, protein electrochemistry, basic principles of biosensors, biosensor interfaces and bio-nanosensor design and construction).
- Electric and magnetic field effects (field-dependent processes, field interactions with molecules, intramolecular field effects, sensory systems for electric and magnetic fields, molecular and cellular mechanisms)
- Bioenergetics and signal transduction (energy conversion, photosynthetic and visual membranes)
- Biomembranes and model membranes (thermodynamics and mechanics, membrane transport, electroporation, fusion and insertion)
- Electrochemical applications in medicine and biotechnology (drug delivery and gene transfer to cells and tissues, iontophoresis, skin electroporation, injury and repair).
- Organization and use of arrays in-vitro and in-vivo, including as part of feedback control.
- Electrochemical interrogation of biofilms as generated by microorganisms and tissue reaction associated with medical implants.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Life Scientists and Electrochemists

IMPACT FACTOR

2021: 5.760 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2022

PubMed/Medline
 BIOSIS Citation Index
 Biosciences Information Services
 Chemical Abstracts
 Elsevier BIOBASE
 Current Contents
 Electroanalytical Abstracts
 Engineering Index
 Embase
 Science Citation Index Expanded
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor in Chief

P. Vadgama, University of London, London, United Kingdom

Editor

S. Cosnier, Department of Molecular Chemistry, Grenoble Cedex 9, France

C. Kranz, Ulm University, Institute of Analytical and Bioanalytical Chemistry, Ulm, Germany

Advisory Board

A. Amine, Casablanca, Morocco

S. Arbault, Talence, France

D.W.M. Arrigan, Perth, Western Australia, Australia

P.N. Bartlett, Southampton, United Kingdom

A. Bergel, Toulouse, France

R. Bilewicz, Warsaw, Poland

M.A. De la Rosa, Sevilla, Spain

G. A. Evtugyn, Kazan, Russian Federation

R.A. Gilbert, Tampa, Florida, United States of America

G. O. Gorton, Lund, Sweden

R. Guidelli, Florence, Italy

E.A.H. Hall, Cambridge, United Kingdom

R. Heller, Norfolk, Virginia, United States of America

T. Hianik, Bratislava, Slovakia

N. Hu, Beijing, China

B.L. Ibey, Wright Patterson AFB, Ohio, United States of America

E. Iwuoha, Bellville, South Africa

E. Katz, Potsdam, New York, United States of America

A. Kuhn, Pessac, France

W. Kutner, Warszawa, Poland

F. Lisdar, Wildau, Germany

G. Marrazza, Florence, Italy

D. Miklavcic, Ljubljana, Slovenia

L.M. Mir, Villejuif, France

E. Neumann, Bielefeld, Germany

A.M. Oliveira Brett, Coimbra, Portugal

A. G. Pakhomov, Norfolk, Virginia, United States of America

T. Ruzgas, Malmö, Sweden

J. Teissié, Toulouse, France

J. Ulstrup, Kongens Lyngby, Denmark

D.E. Williams, Auckland, New Zealand

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Bioelectrochemistry is an international journal devoted to electrochemical principles in biology and biological aspects of electrochemistry. It publishes experimental and theoretical papers dealing with the electrochemical aspects of:

- Electrified interfaces (electric double layers, adsorption, electron transfer, basic principles of biosensors)
- Electric and magnetic field effects (field-dependent processes, field interactions with molecules, intramolecular field effects, sensory systems for electric and magnetic fields, molecular and cellular mechanisms)
- Bioenergetics and signal transduction (energy conversion, photosynthetic and visual membranes)
- Biomembranes and model membranes (thermodynamics and mechanics, membrane transport, electroporation, fusion and insertion)
- Electrochemical applications in medicine and biotechnology (drug delivery and gene transfer to cells and tissues, iontophoresis, skin electroporation, injury and repair).

Types of paper

Should authors be requested by the Editor to revise the text, the revised version should be submitted within 12 weeks. After this period, the article will be regarded as a new submission.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

- The text of the submission should be *single-line spaced*. One free single line space above and below an equation (which is numbered on the right hand side) is also requested.
- All the pages should be numbered.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Research Council's [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of competing interest

Corresponding authors, on behalf of all the authors of a submission, must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. All authors, including those *without* competing interests to declare, should provide the relevant information to the corresponding author (which, where relevant, may specify they have nothing to declare). Corresponding authors should then use [this tool](#) to create a shared statement and upload to the submission system at the Attach Files step. **Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.**

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by [Crossref Similarity Check](#) and other originality or duplicate checking software.

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Preprint posting on SSRN

In support of [Open Science](#), this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server [SSRN](#) once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to [SSRN](#), please consult the [SSRN Terms of Use](#) and [FAQs](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Contributors

Each author is required to declare their individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated [Scientific Managing Editor](#), a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality

figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

REVISED SUBMISSIONS

Give page numbers to each page.

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class [elsarticle.cls](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography.

Our [LaTeX site](#) has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Vitae

Submit a short (maximum 100 words) biography of each author, along with a passport-type photograph accompanying the other figures. Please provide the biography in an editable format (e.g. Word), not in PDF format.

Line spacing

The text of the submission should be *single-line spaced*.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

131

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not consist of more than 200 words and should, together with the format of the title page, fit on one page. Therefore the Introduction should start on the second page.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

The (molar) concentration of substance xy should be given as $[xy]$ and $\log [xy]/M$ with $M=\text{mol/L}$ ($=\text{mol/dm}^3$) or $C(i)/(\text{mol/cm}^3)$ of substance i .

The "electrode potential", preferentially denoted as E/V (vs. ref. pot.), should be given explicit versus the specified reference potential.

Coordinate labelling

For coordinate labelling, in the context of numbers, the symbols X for physical quantities should be given as X/unit . For data correlations, legend must include "which physical quantity X/unit (ordinate) is presented as a function of which one X/unit (abscissa)".

Because of number scaling, on coordinates, the argument of a logarithm of a physical quantity must be with unit, e.g., I/nA as $\log I/nA$ for current I ; for current density $j/(\mu A/\text{cm}^2)$ use $\log j/(\mu A/\text{cm}^2)$.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figures

Each figure should be numbered and each should be displayed on a separate sheet.

The list of figure captions, each caption beginning with a brief title, should start on a separate page. The position of a figure should be indicated in the text, as "Here Fig. x". Do not incorporate figures in the text.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Each table should be numbered and each should be displayed on a separate sheet. Supply a brief table title and table text defining the symbols used. The position of a table should be indicated in the text, "Here Table x". Do not incorporate tables in the text.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, Crossref and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*, Zenodo, March 25, 2020. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Each reference should contain the article title and the list of the numbered references should start on a separate sheet.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal requires and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple *MethodsX* articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. *MethodsX*, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their *MethodsX* article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to *MethodsX* where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in *MethodsX*. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use the [methods template](#) or [protocol template](#) to prepare your *MethodsX* article.

Data statement

To foster transparency, we require you to state the availability of your data in your submission if your data is unavailable to access or unsuitable to post. This may also be a requirement of your funding body or institution. You will have the opportunity to provide a data statement during the submission process. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

137

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

AUTHOR INFORMATION PACK
TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.5



ISSN: 0039-9140

DESCRIPTION

Talanta provides a forum for the publication of original research papers, short communications, and critical reviews in all branches of pure and applied **analytical chemistry**. Papers are evaluated based on established guidelines, including the fundamental nature of the study, scientific novelty, substantial improvement or advantage over existing technology or methods, and demonstrated analytical applicability. Original research papers on fundamental studies, and on novel sensor and instrumentation developments, are encouraged. Novel or improved applications in areas such as clinical and biological chemistry, environmental analysis, geochemistry, materials science and engineering, and analytical platforms for omics development are welcome.

Analytical performance of methods should be determined, including interference and matrix effects, and methods should be validated by comparison with a standard method, or analysis of a certified reference material. Simple spiking recoveries may not be sufficient. The developed method should especially comprise information on selectivity, sensitivity, detection limits, accuracy, and reliability. However, *applying official validation or robustness studies to a routine method or technique does not necessarily constitute novelty*. Proper statistical treatment of the data should be provided. Relevant literature should be cited, including related publications by the authors, and authors should discuss how their proposed methodology compares with previously reported methods.

Talanta is the companion title to the open access journal [Talanta Open](#).

The name *Talanta* derives from the Greek word *ταλαντα*, used by Homer to mean a *pair of scales*. Such a balance was used for measuring talents or gold coins. See [Talanta, 35\(5\)\(1988\)I-V](#) for details. The symbol for the journal is a Greek balance taken from one of the Hope Vases.

talantaimage.jpg

AUDIENCE

Analytical Chemists.

IMPACT FACTOR

2021: 6.556 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2022

Curr Cont ASCA/Phy Chem & Earth Sci
Science Citation Index
Web of Science
Chemical Abstracts
BIOSIS Citation Index
Analytical Abstracts
EIC/Intelligence
Elsevier BIOBASE
Research Alert
Aqualine Abstracts
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor in Chief

Jean-Michel Kauffmann, University of Brussels - ULB, Bruxelles, Belgium

Associate Editors

Jose Luis Burguera, University of the Andes, Mérida, Venezuela

Andres D. Campiglia, University of Central Florida, Department of Chemistry, Orlando, Florida, United States of America

Qun Fang, Zhejiang University Department of Chemistry, Hangzhou, China

Microfluidics; Lab on a Chip; Capillary electrophoresis; Single cell analysis; High-throughput screening

Maria Dolores Luque de Castro, University of Cordoba, Cordoba, Spain

Ian McKelvie, University of Melbourne School of Chemistry, Parkville, Australia

Agata Michalska, University of Warsaw, Warsaw, Poland

Joaquim A. Nóbrega, Federal University of Sao Carlos, Sao Carlos, Brazil

Microwave-assisted sample preparation, Spectrochemical analysis, AAS, ICP-OES, ICP-MS

Vincent T. Remcho, Oregon State University, Corvallis, Oregon, United States of America

lab-on-a-chip technology - fabrication and implementation of analytical instruments in the microchip format, nanomaterial-enabled sensors, nanostructure and surface chemistry to enable droplet microfluidics, molecular recognition technologies - high selectivity sorbents for separations and sensing, development of miniaturized, automated assays for clinical chemistry applications, development of microscale reactors for nanomaterial synthesis, using semiconductor nanoparticles as components of assay systems

Kin-ichi Tsunoda, Kobe University, Kobe, Japan

My main fields are inorganic trace analysis. Thus, techniques are atomic spectrometry such as AAS, ICP techniques, and UV-visible spectrometry including spectrophotometry and fluorometry. Waveguide spectrometry (UV-VIS) is another technique of mine. I can cover a FIA technique. Although I am not a chromatographer, I can understand IC as well as typical HPLC techniques. Application of ESI-MS to inorganic trace analysis is also a technique of mine. My application is mainly for environmental problems. Recently, I am working on the environmental radioactivity issue connecting with Fukushima Daiichi Nuclear Disaster.

Manel del Valle, Autonomous University of Barcelona Chemistry Department, Bellaterra, Spain

Areas, 1.020, Automation 1.030, Chemometrics 1.040, Computers / computational analytical methods 1.050, Instrumentation 1.060, Neural networks 4.010, Chemically modified electrodes 4.030, Ion-selective electrodes 4.060, Voltammetry/ampereometry 8.010, Flow injection analysis 16.010, Biosensors 16.020, Chemical sensors 20.010, Bioanalysis 20.020, Environmental analysis Keywords, Analytical Chemistry aptasensors Artificial Neural Networks biosensors Electrochemical Impedance Spectroscopy Electronic tongues FIA systems Genosensors Instrumentation Nanobiotechnology Sensor arrays SIA systems, ,

Jianhua Wang, Northeastern University, Shenyang, China

flow analysis, spectral analysis, sample pretreatment, microfluidic analysis system

Assistant Editors

Ming-Li Chen, Northeastern University, Shenyang, China

Xiao-Tong Shi, Zhejiang University Library, Hangzhou, China

Emeritus Board Member

James D. Winefordner, University of Florida, Gainesville, Florida, United States of America

Chairman Editorial Advisory Board

Gary Christian, University of Washington, Seattle, Washington, United States of America

140

Editorial Advisory Board

Ruth Andrew, The University of Edinburgh The Queen's Medical Research Institute, Edinburgh, United Kingdom
Steroid, Metabolism, Mass Spectrometry, Imaging, Chromatography

Resat Apak, Istanbul University-Cerrahpasa Department of Chemistry, İstanbul, Turkey
Analytical Chemistry (specifically antioxidants and explosives analysis)

Hugo Miguel Baptista Carreira dos Santos, NOVA University of Lisbon Faculty of Science and Technology, Caparica, Portugal
Proteomics, Mass Spectrometry, Sensors

Andrey V. Bulatov, Saint Petersburg University Institute of Chemistry, Sankt Peterburg, Russian Federation
Supramolecular solvents, deep eutectic solvents, Microextraction and membrane methods, Flow analysis

Rodjana Burakham, Khon Kaen University Department of Chemistry, Khon Kaen, Thailand
Analytical chemistry, Chromatography, Sample preparation, Flow analysis, Applications in residue analysis

Susana Campuzano Ruiz, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain
Electroanalysis, Affinity-based electrochemical bioplatfroms, Multiplexed and/or multi-omics determinations, Clinical, Food safety

Antonio Canals, University of Alicante, Alicante, Spain
Sample preparation, Chromatography, Atomic spectrometry, Electroanalysis, (micro)extraction

Doo Soo Chung, Seoul National University Department of Chemistry, Seoul, South Korea
Analytical chemistry

Salvatore Daniele, Ca' Foscari University of Venice, Venezia, Italy
Electroanalysis with micro and nanoelectrodes and their arrays, development and application of scanning electrochemical microscopy (SECM), development and applications of sensors in environmental, food, pharmaceutical and biological matrices, new nanomaterials for the enzyme-free detection of biological molecules, miniaturized electrochemical devices for detection of analytes in gaseous atmospheres

Eric Deconinck, Sciensano, Brussels, Belgium
Chromatography, (near) infrared spectroscopy, LC/GC-MS, Chemometrics, (illegal) medicines, illicit drugs

Ludovic Duponchel, University of Lille, Lille, France
Chemometrics / Spectroscopy

Anastasios Economou, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece
electrochemical sensors chemiluminescence LC-MS automated methods of analysis (flow-injection and sequential-injection analysis)

Manuel Hernandez-Cordoba, University of Murcia, Murcia, Spain
Gas chromatography (GC) GC/MS Liquid chromatography (LC) LC/MS Solid phase microextraction (SPME) Solvent extraction Atomic absorption spectroscopy Flame atomic absorption spectroscopy Electrothermal atomic absorption spectroscopy ICP Environmental analysis Pharmaceutical analysis Soil/sediments/plant analysis Speciation Keywords Analysis of pharmaceuticals DLLME Environmental samples Food analysis Fungicides Heavy metals Liquid microextraction Miniaturized extraction systems Pesticides Speciation Vitamins

John Kalivas, Idaho State University Department of Chemistry, Pocatello, Idaho, United States of America
Chemometrics with emphasis on multivariate calibration in both methodology development and application

Spas Kolev, University of Melbourne School of Chemistry, Parkville, Australia
Flow analysis, Microfluidic paper-based analytical devices, Passive sampling, Membrane separation

X. Chris Le, University of Alberta Department of Laboratory Medicine and Pathology, Edmonton, Alberta, Canada
Analytical techniques and assays for molecules of environmental and biological significance, Arsenic speciation, Exposure, Metabolism and health effects, DNA damage and protein biomarkers, Environmental health, Water and food safety

Hian Kee Lee, National University of Singapore Department of Chemistry, Singapore, Singapore
Miniaturized sample preparation, Separation science, Environmental analysis

Jin-Ming Lin, Tsinghua University Department of Chemistry, Beijing, China
Microfluidic chip mass spectrometry combined with cell drug metabolism

Baohong Liu, Fudan University Department of Chemistry, Shanghai, China
Optical/electrochemical biosensing, Microfluidic analysis, Single molecule imaging, Single cell measurement

Frank M. Matysik, University of Regensburg Institute of Analytical Chemistry, Regensburg, Germany

Instrumental analytical chemistry, Electroanalysis, Mass spectrometry, Hyphenated systems, Capillary electrophoresis

Maria Minunni, University of Florence Department of Chemistry 'Ugo Schiff', Florence, Italy
Chemical Sensors, surface plasmon resonance, Analytical Techniques, Aptamers, PCR, Analytical Chemistry, Lab on a Chip

Alejandro C. Olivieri, National University of Rosario, Rosario, Argentina
Multivariate analysis, Multiway analysis, Experimental Design, Classification, Calibration.

Sibel A. Ozkan, Ankara University Department of Analytical Chemistry, Ankara, Turkey
Electroanalysis, Biosensors, Biomarkers, Nanosensors, MIP sensors, chiral sensors

Valérie Pichon, Sorbonne University, Paris, France & ESPCI Paris, PSL University, , France
Sample preparation, Selective extraction, Solid-phase extraction, Immunoaffinity, Aptamers, Imprinted polymers, LC/MS

Feliciano Priego-Capote, University of Cordoba Department of Analytical Chemistry, Cordoba, Spain
Metabolomics, mass spectrometry, sample preparation, automation, clinical analysis, agrofood analysis

Marcela Segundo, University of Porto Faculty of Pharmacy, Porto, Portugal
Automation, Miniaturization, Sample treatment

Mojtaba Shamsipur, Razi University, Kermanshah, Iran

Kelly Smalling, US Geological Survey New Jersey Water Science Center, Lawrenceville, New Jersey, United States of America

Petr Solich, Charles University Department of Analytical Chemistry, Hradec Králové, Czechia
Pharmaceutical analysis, Environmental analysis, Bioanalytical analysis Separation methods (LC, UHPLC), Flow methods (SIA, FIA, SIC) – development and applications Monolithic columns Drugs, Pharmaceuticals

Robert E. Synovec, University of Washington Department of Chemistry, Seattle, Washington, United States of America

Comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry, Chemometric data analysis, High-speed gas chromatography, Applications in fuels, Metabolomics, Foods, Environmental, and Forensics

Beata Walczak, University of Silesia, Katowice, Poland
all aspects of data analysis, chemometrics

Joseph Wang, University of California San Diego Department of Nanoengineering, San Diego, California, United States of America

Biosensors, diabetes management, wearable sensors, microrobots

Xinghua Xia, Nanjing University, Nanjing, China
electrochemical measurements and imaging, in situ infrared spectroelectrochemistry and nano infrared spectroelectrochemical imaging, electrochemical energy conversion and storage, micro-/ nano-fluidic devices

Xiu-Ping Yan, Jiangnan University School of Food Science and Technology, Wuxi, China
Food safety, Environmental and biological analysis

Chaoyong Yang, Xiamen University College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen, China
aptamer, bioluminescence sensor, microfluidic and bioanalysis

Ping Yu, Institute of Chemistry Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
Electroanalysis, In vivo analysis, Ion transport, Nanopore, Biosensor

Yong-Liang Yu, Northeastern University, Shenyang, China
Atomic Spectroscopy, Sample pretreatment

Xinrong Zhang, Tsinghua University Department of Chemistry, Beijing, China
Luminescence analysis, Mass spectrometry

INTRODUCTION

Talanta provides a forum for the publication of original research papers, short communications, and critical reviews in all branches of pure and applied **analytical chemistry**

TYPES OF PAPERS:

Full Papers

Papers are evaluated based on established guidelines, including the fundamental nature of the study, scientific novelty, substantial improvement or advantage over existing technology or methods, and demonstrated analytical applicability. Original research papers on fundamental studies, and on novel sensor and instrumentation developments, are encouraged. Novel or improved applications in areas such as clinical and biological chemistry, environmental analysis, geochemistry, materials science and engineering, and analytical platforms for omics development are welcome.

Short Communications

Short communications comprise more abbreviated studies that demonstrate new concepts and applicability.

Review Articles

Reviews including authoritative and comprehensive review articles, dedicated to a particularly important topic or field of analysis, are published regularly. In addition, shorter, concise reviews or viewpoints focusing on the current status and future prospects of a field or topic particularly relevant to the development of a new analytical methodology or to a better understanding of its fundamental underlying principles are welcome. Tutorial reviews, illustrating in depth fundamental concepts in atomic spectroscopy and analytical atomic spectroscopy, are also published.

CRITERIA:

Analytical performance of methods should be determined, including interference and matrix effects, and methods should be **validated** by comparison with a standard method, or analysis of a certified reference material. Simple spiking recoveries may not be sufficient. The developed method should especially comprise information on selectivity, sensitivity, detection limits, accuracy, and reliability. *However, applying official validation or robustness studies to a routine method or technique does not necessarily constitute novelty.* Proper statistical treatment of the data should be provided. Relevant literature should be cited, including related publications by the authors, and authors should discuss how their proposed methodology compares with previously reported methods.

ESTABLISHED METHODS:

Since classical spectrophotometric measurements and applications (including derivative spectrophotometry), fluorimetry, solvent extraction, titrimetry, chemometrics, etc. are well established and are considered routine analytical methods, studies in such areas should demonstrate a unique and substantial advantage over presently known systems. Standard chemometrics for optimization is not novel, but solving a problem or analyzing data may be appropriate. New reagents or systems should demonstrate clear advantage, and their presentation should be comprehensive rather than generating a series of similar papers for several analytes or similar reagents. Modifications of reagents should demonstrate significant improvements. Obvious application of known chemistries or methods to established instrumental techniques are discouraged.

The development of new sensors or methods for common analytes for which many methods exist should demonstrate clear analytical advantage, for example, dopamine, ascorbic acid, uric acid, glucose, H₂O₂, copper, etc. Nanoparticle based sensors with enhanced sensitivity are now common, and should solve challenging analytical problems. Application of established analytical approaches to specific samples or relatively simple matrices having no major interferences, such as pharmaceutical preparations, are discouraged unless considerable improvements over other methods in the literature are demonstrated, and may be more appropriate for a more focused journal such as a pharmaceutical journal.

DATA:

143

Papers dealing with analytical data such as stability constants, pKa values, etc. should be submitted to more specific journals, unless novel analytical methodology is demonstrated, or important analytical data are provided which could be useful in the development of analytical procedures.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Declaration of competing interest

Corresponding authors, on behalf of all the authors of a submission, must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. All authors, including those *without* competing interests to declare, should provide the relevant information to the corresponding author (which, where relevant, may specify they have nothing to declare). Corresponding authors should then use [this tool](#) to create a shared statement and upload to the submission system at the Attach Files step. **Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.**

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by [Crossref Similarity Check](#) and other originality or duplicate checking software.

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Preprint posting on SSRN

In support of [Open Science](#), this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server [SSRN](#) once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to [SSRN](#), please consult the [SSRN Terms of Use](#) and [FAQs](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated [Scientific Managing Editor](#), a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Please note that a Novelty Statement is required for submission. This statement should provide information in one or two sentences as to what is new and novel in the manuscript in relation to prior related work, including the authors' own.

Please submit your article via <https://www.elsevier.com/locate/talanta>

Referees

Refereeing of Papers

All papers submitted are refereed by experts who advise the Editors-in-Chief on the matter of acceptance in accordance with the high standards required and on the understanding that the subject matter has not been previously published and that the authors accept full responsibility for the factual accuracy of the data presented and have obtained any necessary authority to publish. Referees will be encouraged to present critical and unbiased reports which are designed to assist the author in presenting material in the clearest and most unequivocal way possible. Authors should appreciate that the comments of referees are presented in a constructive spirit, and that agreement between the views of author and referee must result in a higher standard of publication.

When submitting their paper authors are requested to provide names and addresses (including e-mail addresses) of three competent but independent referees, although the choice of referees used will be made by the Editor.

All papers accepted are subject to editorial amendment if necessary.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. Page numbering is mandatory for all submitted manuscripts.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC nomenclature for spectroscopy and analytical chemistry for further information (available online at <http://www.iupac.org/>). Analytical Terminology is found in the Orange book. IUPAC recommended quantities, units and symbols are found in the Green book.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.

- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Figures and tables should be embedded in text. Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table. All Figures should be accompanied by a caption, e.g.: Fig. 1: Analysis of [...]. (A) Detailed analysis of [...].

Tables

Tables should be placed next to the relevant text in the article. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the

journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, Crossref and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web Reference

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references should be included in the reference list under a different heading if desired.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Reference formatting

Our policy now requires listing of the title of a cited article. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*, Zenodo, March 25, 2020. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to

supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal requires and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple *MethodsX* articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. *MethodsX*, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their *MethodsX* article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to *MethodsX* where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in *MethodsX*. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use the [methods template](#) or [protocol template](#) to prepare your *MethodsX* article.

To foster transparency, we require you to state the availability of your data in your submission if your data is unavailable to access or unsuitable to post. This may also be a requirement of your funding body or institution. You will have the opportunity to provide a data statement during the submission process. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#)..

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).