



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

SAULO HENRIQUE SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO À BASE DE
POLIPIRROL E NANOCOMPÓSITO $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ PARA DETECÇÃO DO ONCOGENE
TCF3-PBX1 NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL**

Recife
2025

SAULO HENRIQUE SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO À BASE DE
POLIPIRROL E NANOCOMPÓSITO $\text{TiO}_2\text{@Pt}$ PARA DETECÇÃO DO ONCOGENE
TCF3-PBX1 NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Orientador: Dr César Augusto Souza de Andrade

Coorientadora: Dr^a Maria Danielly Lima de Oliveira

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Saulo Henrique.

Desenvolvimento de biossensor eletroquímico à base de polipirrol e nanocompósito TiO₂@Pt para detecção do oncogene TCF3-PBX1 na leucemia linfoblástica aguda infantil / Saulo Henrique Silva. - Recife, 2025.

84f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2025.

Orientação: Cesar Augusto Souza de Andrade.

Coorientação: Maria Danielly Lima de Oliveira.

Inclui referências.

1. Biossensor; 2. Leucemia; 3. Eletroquímica; 4. Dióxido de Titânio; 5. Polipirrol. I. Andrade, Cesar Augusto Souza de. II. Oliveira, Maria Danielly Lima de. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

SAULO HENRIQUE SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO À BASE DE
POLIPIRROL E NANOCOMPÓSITO $\text{TiO}_2\text{@Pt}$ PARA DETECÇÃO DO ONCOGENE
TCF3-PBX1 NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta (1ª Titular – Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Maurília Palmeira da Costa (2ª Titular – Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr. Michelle Melgarejo da Rosa (1ª Suplente – Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Raiza Pereira Santos de Lucena (2ª Suplente – Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

À minha esposa, Karen Avelino, pelo apoio e companheirismo ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. César Andrade, por sua paciência e conselhos valiosos ao longo deste percurso.

Às professoras Dr^a Danielly Oliveira e Dr^a Norma Lucena, agradeço pela parceria, orientações e colaboração.

À equipe do Bionano, expresso minha gratidão pelo suporte técnico e pelas discussões produtivas que tanto contribuíram para a evolução desta pesquisa.

À minha família, expresso meu mais profundo agradecimento. Aos meus pais, por todo amor, apoio e ensinamentos que me moldaram e me trouxeram até aqui. Aos meus irmãos e demais familiares, por sempre acreditarem no meu potencial e oferecerem palavras de encorajamento nos momentos mais difíceis.

Aos amigos que estiveram presentes, mesmo à distância, minha gratidão por cada palavra de incentivo.

Agradeço também à Universidade Federal de Pernambuco, cujo financiamento tornou viável a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a Deus pela força, resiliência e discernimento para enfrentar cada etapa deste processo, contando sempre com a intercessão e amparo de Nossa Senhora das Graças.

RESUMO

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é a forma mais frequente de câncer infantil. A anomalia cromossômica conhecida como translocação (1;19)(q23;p13) ocorre em 3% a 12% dos casos de LLA. O presente estudo tem como objetivo principal a concepção de um nanodispositivo inovador, sem a necessidade de marcadores de sinal, visando o diagnóstico ultrasensível do oncogene quimérico TCF3-PBX1. O biossensor foi desenvolvido com uma plataforma nanoestruturada composta por polipirrol (PPy) e um compósito híbrido formado por nanopartículas de dióxido de titânio e nanosferas de platina (TiO₂@Pt). Para possibilitar a detecção bioespecífica, oligonucleotídeos de cadeia simples foram quimicamente imobilizados no transdutor nanoestruturado. A caracterização das diferentes etapas de construção do dispositivo biotecnológico foi realizada utilizando técnicas como voltametria cíclica (VC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis) e microscopia de força atômica (AFM). A avaliação das propriedades analíticas do dispositivo de detecção foi feita com plasmídeos recombinantes que contêm a sequência oncogênica TCF3-PBX1 e amostras clínicas de pacientes pediátricos com LLA de células B. Após a exposição do sistema de monitoramento molecular ao alvo genético, foram observadas variações significativas na corrente de oxidação voltamétrica e na resistência à transferência de carga. A análise dos dados revelou alta reprodutibilidade, com um desvio padrão relativo de 3,66%, um intervalo de resposta linear que varia de 3,58 aM a 357,67 fM, um limite de detecção de 0,41 aM e um limite de quantificação de 1,24 aM. Assim, pela primeira vez, foi descrita uma tecnologia de baixo custo para triagem eletroquímica multiparamétrica do oncogene quimérico TCF3-PBX1, o que pode ajudar a melhorar a qualidade de vida dos pacientes com leucemia.

Palavras-chave: Biossensor; Dióxido de Titânio; Espectroscopia de Impedância Eletroquímica; Leucemia; Polipirrol; Voltametria Cíclica.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common form of childhood cancer. The primary chromosomal abnormality known as the translocation (1;19)(q23;p13) occurs in 3% to 12% of ALL cases. The present study aims to develop an innovative nanodevice, label-free, for the ultrasensitive diagnosis of the TCF3-PBX1 chimeric oncogene. The biosensor was developed using a nanoengineered platform composed of polypyrrole (PPy) and a hybrid composite of titanium dioxide nanoparticles and platinum nanospheres (TiO₂@Pt). To enable biospecific detection, single-stranded oligonucleotides were chemically immobilized on the nanoengineered transducer. Characterization of the different stages of constructing the biotechnological device was carried out using techniques such as cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), and atomic force microscopy (AFM). The analytical properties of the detection device were evaluated using recombinant plasmids containing the TCF3-PBX1 oncogenic sequence and clinical samples from pediatric patients with B-cell ALL. After exposing the molecular monitoring system to the genetic target, significant variations were observed in the voltammetric oxidation current and in the charge transfer resistance. Data analysis revealed high reproducibility, with a relative standard deviation of 3.66%, a linear response range from 3.58 aM to 357.67 fM, a detection limit of 0.41 aM, and a quantification limit of 1.24 aM. Thus, for the first time, a low-cost technology for multiparametric electrochemical screening of the TCF3-PBX1 chimeric oncogene was described, which could help improve the quality of life for leukemia patients.

Keywords: Biosensor; Titanium Dioxide; Electrochemical Impedance Spectroscopy; Leukemia; Polypyrrole; Cyclic Voltammetry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição dos pontos de quebra nos genes TCF3 e PBX1, ilustrando as regiões de translocação cromossômica que resultam no oncogene quimérico TCF3-PBX1.....	19
Figura 2 –	Representação esquemática de um biossensor.....	25
Figura 3 –	Estrutura molecular do DNA e as interações bioespecíficas entre suas bases nitrogenadas.....	30
Figura 4 –	Estratégias de imobilização de DNA em superfícies sólidas. a) adsorção física, b) adsorção covalente e c) adsorção por biointeração.....	32
Figura 5 –	Representação do nanocompósito híbrido TiO ₂ @Pt.....	35
Figura 6 –	Ilustração esquemática de uma célula eletroquímica de compartimento único contendo três eletrodos: eletrodo de referência, eletrodo de trabalho e contra eletrodo.....	37
Figura 7 –	Gráfico de onda triangular demonstrado a forma em que o potencial é aplicado na técnica de VC (a) e o voltamograma cíclico resultante (b).....	37
Figura 8 –	Representação do diagrama de Nyquist.....	40
Figura 9 –	Distribuição de íons na interface eletrodo/solução.....	41
Figura 10 –	Esquema ilustrativo do mecanismo de funcionamento de um microscópio de força atômica.....	43
Figura 11 –	Efeito da distância entre a sonda e a amostra sobre o regime de forças do sistema.....	44
Figura 12 –	Modos de operação de um microscópio de força atômica: modo de contato (a), modo de não contato (b) e modo de contato intermitente (c).....	45
Figura 13 –	Esquema da plataforma biossensora baseada em eletrodo de ouro funcionalizado com PPy-TiO ₂ @Pt para detecção do oncogene quimérico TCF3-PBX1.....	50
Figura 14 –	Análise da evolução topográfica do biossensor PPy-TiO ₂ @Pt durante a funcionalização e detecção do oncogene TCF3-PBX1,	

	com base em parâmetros de rugosidade e altura máxima das superfícies.....	52
Figura 15 –	Espectro UV-Vis comparativo de nanopartículas de TiO_2 , nanoesferas de Pt e o nanocompósito híbrido $\text{TiO}_2@\text{Pt}$	54
Figura 16 –	Análise eletroquímica do biossensor PPy- $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ nas etapas de funcionalização: voltametria cíclica (a) e espectroscopia de impedância eletroquímica (b).....	54
Figura 17 –	Voltamogramas cíclicos da polimerização eletroquímica do pirrol em 15 ciclos: formação e estabilização do filme condutor de polipirrol (PPy).....	59
Figura 18 –	Avaliação eletroquímica dos tempos de adsorção do nanocompósito $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ e de imobilização de oligonucleotídeos sobre a superfície do biossensor PPy- $\text{TiO}_2@\text{Pt}$	60
Figura 19 –	Avaliação do desempenho analítico do biossensor PPy- $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ na detecção do oncogene quimérico TCF3-PBX1: respostas voltamétricas (a) e espectros de impedância eletroquímica com curva de calibração (b).....	61
Figura 20 –	Respostas voltamétricas (a) e espectros de impedância eletroquímica (b) do biossensor PPy- $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ na detecção de cDNA clínico com o oncogene TCF3-PBX1 em diferentes concentrações.....	66
Figura 21 –	Curva logarítmica de saturação do grau de recobrimento superficial do biossensor em função da concentração de DNA-alvo.....	68
Figura 22 –	Especificidade do biossensor PPy- $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ na detecção da translocação cromossômica t(1;19).....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Comparação das Técnicas de Detecção do Oncogene Quimérico TCF3-PBX1.....	23
Tabela 2 –	Sequências de oligonucleotídeos de primers e sondas utilizadas nos ensaios de biologia molecular.....	48
Tabela 3 –	Correntes de pico anódica e catódica obtidas durante as etapas de construção do biossensor de DNA após exposição às amostras analíticas. Três análises consecutivas foram realizadas para cada procedimento metodológico, e os valores experimentais são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....	55
Tabela 4 –	Valores dos elementos do circuito equivalente obtidos por meio do ajuste dos resultados de impedância para cada etapa da montagem do biodispositivo. Três análises consecutivas foram realizadas para cada procedimento metodológico, e os valores experimentais são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....	56
Tabela 5 –	Análise comparativa do biossensor desenvolvido neste estudo em relação a outras tecnologias de detecção biológica documentadas na literatura para a investigação eletroquímica de biomarcadores genéticos da leucemia.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
Ag	Prata
aM	Attomolar
APTES	3-Aminopropiltrietoxissilano
Au	Ouro
BSA	Albumina de Soro Bovino
CuO	Óxido de cobre
VC	Voltametria Cíclica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIS	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
Epa	Potencial de Pico de Oxidação
Epc	Potencial de Pico de Redução
Fe ₂ O ₃	Óxido de ferro
FISH	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>
fM	Fentomolar
HCl	Ácido Clorídrico
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Ferricianeto de Potássio
K ₄ [Fe(CN) ₆]	Ferrocianeto de Potássio
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
MnO ₂	Dióxido de manganês
MPTMS	3-Mercaptopropiltrimetoxissilano
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
Pd	Paládio
Pt	Platina
PtNs	Nanoesferas de Platina
PPy	Polipirrol
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
R _{CT}	Resistência à Transferência de Carga
RNA	Ácido ribonucleico
RS	Resistência da Solução
Sn	Estanho

ssDNA	DNA de Fita Simples
TCF3	Fator de Transcrição 3
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TiO ₂	Dióxido de Titânio
TiO ₂ @Pt	Nanopartículas de dióxido de titânio e nanosferas de platina
UV-Vis	Espectroscopia Ultravioleta-Visível
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
XRD	Difração de Raios X
Zn	Zinco
ZnO	Óxido de zinco
ZW	Impedância de Warburg

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1	Leucemia e o oncogene quimérico TCF3-PBX1.....	19
2.1.1	Métodos convencionais de diagnóstico.....	19
2.2	Desenvolvimento de biossensores e avanços da nanotecnologia..	24
2.2.1	Classificação dos biossensores com base no elemento sensor.....	26
2.2.2	Classificação dos biossensores com base no elemento de transdução.....	27
2.2.3	Biossensores eletroquímicos de DNA.....	29
2.2.4	Métodos de imobilização de DNA.....	30
2.3	Plataformas nanoestruturadas.....	32
2.3.1	Polipirrol.....	33
2.3.2	Óxido de Titânio (TiO₂)	34
2.3.3	Nanoesferas de Platina (PtNs).....	34
2.3.4	Nanocompósito híbrido de nanopartículas de óxido de titânio e nanoesferas de platina.....	35
2.4	Técnicas eletroanalíticas.....	36
2.4.1	Voltametria cíclica.....	36
2.4.2	Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	38
2.5	Microscopia de força atômica.....	42
3	OBJETIVO.....	45
3.1	Geral.....	45
3.2	Específicos.....	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1	Reagentes.....	46
4.2	Sondas oligonucleotídicas e amostras clínicas.....	47
4.3	Síntese do nanocompósito de TiO ₂ @Pt.....	48
4.4	Concepção da plataforma biossensora.....	49
4.5	Estudos de detecção genética.....	50
4.6	Medições eletroquímicas.....	50

4.7	Análises de AFM e UV-Vis.....	51
5	RESULTADOS.....	52
5.1	Análise topográfica.....	52
5.2	Caracterização espectral por UV-Vis.....	53
5.3	Perfil eletroquímico da plataforma biossensora.....	54
5.4	Otimização das variáveis experimentais.....	58
5.4.1	Eletrodeposição de filmes de polipirrol.....	58
5.4.2	Estudo da conjugação química do nanocompósito TiO₂@Pt...	59
5.4.3	Estudo da conjugação química das sequências de oligonucleotídeos.....	60
5.5	Desempenho analítico da plataforma sensora.....	61
5.6	Triagem eletroquímica em amostras clínicas.....	66
5.7	Estudo de interferentes biológicos.....	68
6	DISCUSSÃO.....	70
7	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

LLA é um câncer maligno do sangue e da medula óssea que afeta as células progenitoras linfoides. É o câncer mais prevalente em crianças, constituindo aproximadamente um terço de todos os casos de câncer infantil. A incidência de LLA varia globalmente em função de fatores genéticos, ambientais e socioeconômicos, com taxas mais altas sendo relatadas em países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, a incidência anual de LLA é de aproximadamente 3,8 casos por 100.000 crianças com menos de 15 anos de idade (Nathan et al., 2020). Uma das alterações genéticas mais prevalentes na LLA de células B é o oncogene quimérico TCF3-PBX1, resultante da translocação cromossômica t(1;19)(q23;p13) (Zhang et al., 2022). Esse rearranjo cromossômico resulta da fusão do TCF3 (fator de transcrição 3), localizado em 19p13, com o PBX1 (homeobox 1 da leucemia de células pré-B), localizado em 1q23. Como resultado, há a expressão da oncoproteína TCF3-PBX1, capaz de modificar processos celulares e interromper a diferenciação celular (Organista-Nava et al., 2016). Nota-se que esse genótipo tem sido historicamente associado a um prognóstico ruim e a um risco aumentado de recidiva no sistema nervoso central. No entanto, tratamentos contemporâneos orientados para o risco têm melhorado o seu prognóstico (Chiaretti et al., 2013; Zhang et al., 2022).

Os métodos de análise genética possibilitam a identificação do oncogene de fusão TCF3-PBX1. Embora a análise de bandas cromossômicas (cariótipo) seja comum na prática clínica, ela apresenta sensibilidade limitada e exige protocolos demorados e trabalhosos. O cariótipo requer acesso a células neoplásicas recém-isoladas para cultivo de curto prazo a fim de obter cromossomos em metáfase (Barbosa et al., 2018; Skotheim et al., 2009). Sua eficácia pode ser consideravelmente limitada pela resolução cromossômica reduzida na leucemia, anomalias crípticas e pela baixa proliferação de células neoplásicas durante o cultivo (Rack et al., 2022). A introdução da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) na prática laboratorial de rotina, juntamente com a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), supera algumas dessas limitações (Burmeister et al., 2023; Eldfors et al., 2017). A técnica FISH é usada para identificar anomalias citogenéticas numéricas e visualizar a localização precisa do oncogene no cromossomo, atingindo uma sensibilidade de até 10^{-2} . O qPCR, um método altamente preciso, é o padrão-ouro para o diagnóstico de translocações genéticas, com uma sensibilidade que varia de

10^{-4} a 10^{-5} . Ele requer conhecimento prévio do gene de fusão complementar, e sua sensibilidade pode ser influenciada pela qualidade da amostra clínica, potencialmente levando a falsos positivos. O processamento analítico exige profissionais qualificados e equipamentos robustos (Short et al., 2019). O sequenciamento de nova geração (NGS), um termo que se refere às tecnologias contemporâneas de sequenciamento de ácidos nucleicos para DNA ou RNA, tem avançado significativamente na pesquisa de translocações em leucemias com alta sensibilidade ($\sim 10^{-6}$), desempenho e precisão. Os desafios incluem a seleção da plataforma de sequenciamento para o painel de NGS, a realização de estudos de validação, o gerenciamento da alta complexidade dos procedimentos e resultados, a utilização de ferramentas bioinformáticas para análise e a garantia de armazenamento de dados a longo prazo (Kumar; Cowley; Davis, 2024).

Os biossensores eletroquímicos, considerados uma tecnologia avançada para análise genômica, surgem como alternativas promissoras para o rastreamento molecular da LLA, destacando-se pelo potencial de aumentar a sensibilidade e a precisão nos processos de detecção bioanalítica. Esses dispositivos integram elementos de reconhecimento biológico, como enzimas, segmentos de oligonucleotídeos, células ou anticorpos, em transdutores, possibilitando a conversão eficiente da resposta bioquímica em um sinal mensurável (Shahdeo; Gandhi, 2022). Materiais baseados em nanotecnologia, como nanotubos, nanopartículas, nanoesferas, nanocubos, nanofibras e nanocompósitos, têm sido utilizados para preservar a bioatividade das moléculas de bioreconhecimento após a ancoragem em superfícies transdutoras. Essa abordagem visa não apenas aumentar a reprodutibilidade do sinal analítico, mas também promover a escalabilidade da fabricação e garantir a estabilidade a longo prazo (Fritea et al., 2021).

A aplicação de nanocompósitos híbridos em biossensores eletroquímicos tem atraído atenção substancial, atribuída ao seu desempenho aprimorado e aplicações versáteis. Notadamente, nanocompósitos de metais nobres e óxidos metálicos se destacam nesse contexto. Esses materiais demonstram interações sinérgicas resultantes da combinação de características únicas de metais nobres, como Au, Pt, Ag e Pd, com as propriedades específicas de óxidos metálicos, como TiO_2 , Fe_2O_3 , CuO , MnO_2 e ZnO (Kannan; Maduraiveeran, 2023). Especificamente, destaca-se o compósito estruturado a partir de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) e nanoesferas de platina (PtNs). O TiO_2 é um material semicondutor com band gaps de

energia de 3,2, 3,02 e 2,96 eV. Ele apresenta baixa toxicidade, resistência à foto-corrosão, atividade fotocatalítica e é passível de fabricação em larga escala a baixo custo. A capacidade de biossensoriamento do TiO_2 está tipicamente associada às suas propriedades estruturais, à localização da banda de valência e à geração e disponibilidade de lacunas na superfície do material capazes de aceitar elétrons livres externos. A interação entre o analito e a biomolécula pode gerar elétrons, prontamente capturados pelo TiO_2 devido às suas propriedades de aceitação de elétrons. Além disso, os nanomateriais de TiO_2 exibem características ecologicamente corretas e biocompatíveis, tornando-os adequados para servir como uma interface potencial para imobilizar biomoléculas (Shetti et al., 2019).

A incorporação de metais, como Sn, Zn, Au e Pt, em nanopartículas de TiO_2 tem sido empregada como uma estratégia para melhorar a estabilidade química e a condutividade elétrica, refinando, assim, a capacidade de detecção do TiO_2 em biossensores eletroquímicos. Hipotetiza-se que as estruturas eletrônicas podem ser modificadas pela deposição de metais em nanomateriais de óxido metálico, promovendo o desenvolvimento de vacâncias de oxigênio na região interfacial. Nesse contexto, a dopagem de nanopartículas de TiO_2 com nanoesferas de platina (PtNs) proporciona a obtenção de múltiplos sítios ativos e amplificação das propriedades eletroquímicas quando comparado aos constituintes originais. As PtNs exibem uma área de superfície específica substancial e alta capacidade de adsorção, facilitando a ligação aprimorada de biomoléculas. A inclusão de platina não só introduz centros catalíticos suplementares na nanoestrutura, mas também altera a distribuição de carga e os estados eletrônicos, afetando diretamente as propriedades de transferência de carga e a eficácia catalítica do compósito. A incorporação de platina induz a geração de defeitos e vacâncias na estrutura do TiO_2 , promovendo reações redox e melhorando a resposta eletroquímica do sistema de detecção. Além disso, a interação sinérgica entre as PtNs e o TiO_2 contribui para a estabilidade química e estrutural do material, garantindo um ambiente propício para a detecção bioanalítica (Maduraiveeran et al., 2016; Yu et al., 2021).

Continuando a explorar estratégias de modificação interfacial, infere-se que os polímeros condutores são considerados materiais funcionais para o desenvolvimento de plataformas de detecção (Dakshayini et al., 2019). O polímero polipirrol (PPy) está atualmente em investigação devido ao seu potencial na fabricação de biossensores altamente sensíveis. Atributos essenciais que contribuem significativamente para o

aprimoramento do desempenho analítico e da robustez em sistemas de detecção biológica incluem alta condutividade, cinética rápida de transferência de elétrons na interface eletrodo/solução, capacidade de armazenamento de carga, reversibilidade redox, compatibilidade biológica relativa e a presença de grupos químicos para a ancoragem direcionada de biomoléculas (Ramanavicius; Ramanavicius, 2021).

A síntese eletroquímica de polipirrol oferece vantagens distintas, proporcionando controle preciso sobre o processo de polimerização. Esse método permite a regulação da espessura, morfologia e condutividade do polímero, resultando na produção de filmes bem definidos e altamente condutivos. Essas capacidades de ajuste fino garantem a otimização do polipirrol para aplicações específicas em biossensores. Além disso, a síntese eletroquímica apresenta uma abordagem ecológica e econômica, minimizando o uso de reagentes perigosos e reduzindo a geração de resíduos. A simplicidade e a eficiência do procedimento eletroquímico contribuem para a escalabilidade e aplicabilidade de biossensores baseados em polipirrol em diversos contextos biotecnológicos. O polímero orgânico resultante exibe flexibilidade estrutural, estabilidade ambiental e compatibilidade com sistemas biológicos, posicionando-o como um candidato promissor para o avanço das tecnologias de biossensores (Avelino et al., 2021; Zhang et al., 2023).

Nesta investigação, um biossensor eletroquímico de DNA foi introduzido pela primeira vez para a detecção específica do oncogene quimérico TCF3-PBX1. A construção do biossensor envolveu a imobilização covalente de sequências de oligonucleotídeos em um filme de polipirrol (PPy) modificado com um nanocompósito híbrido $\text{TiO}_2@\text{Pt}$, que serviu como eletrodo de trabalho biossensível. Nos casos em que o oncogene quimérico TCF3-PBX1 está presente nas amostras (seja DNA plasmidial ou uma amostra clínica de leucemia), a sequência alvo hibridiza seletivamente com a sonda, iniciando a transdução do evento de bioreconhecimento. Essa transdução resulta em uma mudança mensurável que é diretamente proporcional à concentração da sequência alvo. Vale destacar que o sistema de biossensoriamento desenvolvido incorpora um material compósito ($\text{TiO}_2@\text{Pt}$) que, em conjunto com o filme polimérico, facilitou a obtenção de limites de detecção excepcionalmente baixos, na ordem de attomolar. Além disso, o sistema demonstra reprodutibilidade, alta seletividade, precisão analítica, custo-benefício e tempo de resposta rápido, tornando-o promissor para o diagnóstico laboratorial em casos de LLA.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Leucemia e o oncogene quimérico TCF3-PBX1

A leucemia é um tipo de câncer que se destaca entre as doenças malignas mais frequentes globalmente, sua incidência em 2020 foi de 474.519 novos casos (SUNG et al., 2021). Trata-se de uma patologia caracterizada pela desregulação do sistema hematopoiético, levando à produção excessiva de células sanguíneas anormais e à proliferação de formas imaturas, como linfoblastos (Advani; Pendergast, 2002). Essas alterações comprometem a funcionalidade do sangue, resultando em anemia severa, maior suscetibilidade a infecções e risco elevado de hemorragias. Além disso, células leucêmicas podem se disseminar para outros órgãos, como baço, cérebro e linfonodos, através da corrente sanguínea (Karrari et al., 2022).

As leucemias incluem um grupo diversificado de doenças com diferentes apresentações clínicas e características moleculares, que são classificadas com base em critérios genéticos, morfológicos e imunológicos. A classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) categoriza essas doenças segundo a linhagem celular afetada, como linfóide ou mieloide, e sua evolução, distinguindo-as em formas agudas ou crônicas (Choi et al., 2024).

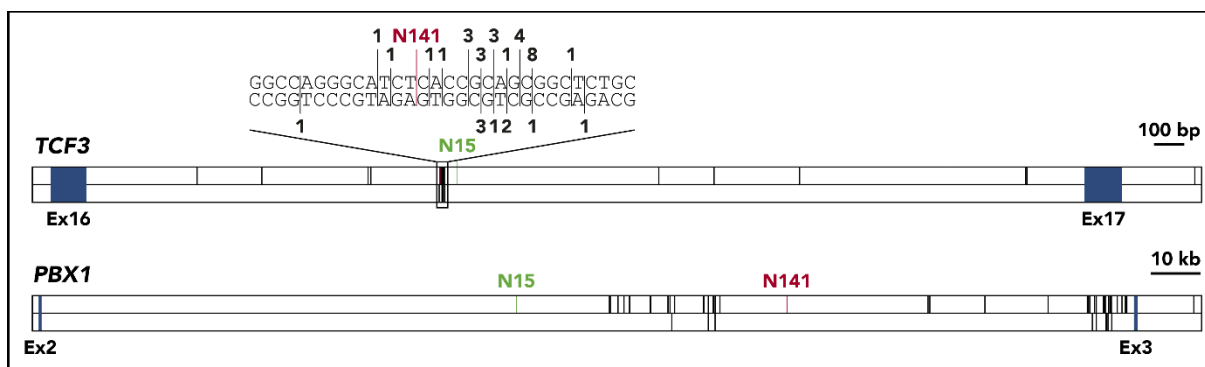
Uma característica central de muitos tipos de câncer, incluindo a leucemia, é a presença de alterações genéticas, como fusões de genes, que resultam em proteínas anormais com funções biológicas alteradas. Entre essas fusões, destaca-se o oncogene quimérico TCF3-PBX1, identificado principalmente em casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA). Essa anormalidade é resultado de uma translocação cromossômica entre os genes TCF3, localizado no cromossomo 19, e PBX1, encontrado no cromossomo 1, levando à formação de um gene híbrido (Lee et al., 2021).

O oncogene TCF3-PBX1 codifica uma proteína quimérica que atua como um fator de transcrição desregulado, alterando a expressão de genes relacionados ao ciclo celular e à sobrevivência celular. Essa modificação genética confere às células malignas vantagens proliferativas e de resistência à apoptose, contribuindo para o desenvolvimento da leucemia. Em pacientes pediátricos, a presença do TCF3-PBX1 está associada a um prognóstico intermediário, embora sua detecção seja

considerada um marcador útil no diagnóstico e no monitoramento da doença (Lee et al., 2021).

A Figura 1 ilustra a distribuição dos pontos de quebra nos genes TCF3 e PBX1, evidenciando as regiões envolvidas na translocação cromossômica responsável pela formação do oncogene quimérico.

Figura 1 - Distribuição dos pontos de quebra nos genes TCF3 e PBX1, ilustrando as regiões de translocação cromossômica que resultam no oncogene quimérico TCF3-PBX1.



Fonte: Adaptado de Hein et al. (2019).

O nível de expressão do TCF3-PBX1 pode variar ao longo do curso clínico da leucemia. Em estágios iniciais, geralmente são observados altos níveis dessa fusão gênica, indicando atividade tumoral elevada. Após o início do tratamento, a redução desses níveis pode sinalizar uma resposta terapêutica positiva, mas a presença residual da fusão em níveis baixos, conhecida como doença residual mínima, representa um risco de recaída. Métodos sensíveis e específicos para monitorar o TCF3-PBX1 são essenciais para avaliar a eficácia do tratamento, orientar decisões clínicas e prever desfechos no tratamento da leucemia (Hein et al., 2019).

2.1.1 Métodos convencionais de diagnóstico

A identificação da leucemia envolve uma abordagem multidisciplinar que combina exames hematológicos, análises citogenéticas e ensaios moleculares de alta precisão. O processo inicia-se com a anamnese e exame físico, conduzidos por um profissional qualificado, frequentemente um hematologista. Nesse momento, a história clínica do paciente é avaliada em detalhe, assim como sinais e sintomas específicos que possam levantar suspeitas para a doença (Hallek; Al-Sawaf, 2021).

Em casos de suspeita de leucemia, o próximo passo inclui a coleta de sangue periférico para realização de hemograma completo. Esse exame, essencial na triagem inicial, utiliza microscopia óptica para a análise detalhada das células do sistema hematopoiético, avaliando características como tipo, morfologia e contagem celular. Em pacientes com leucemia, é comum a presença de células imaturas, como linfoblastos e eritroblastos, circulando na corrente sanguínea. Paralelamente, observa-se uma diminuição significativa no número de plaquetas e células maduras funcionais, indicando comprometimento hematológico (Hallek; Al-Sawaf, 2021).

Embora o hemograma forneça fortes indícios da presença de leucemia, o diagnóstico definitivo exige testes adicionais, como a biópsia da medula óssea. Esse procedimento envolve a aspiração de uma amostra do tecido medular, seguida de análise microscópica para confirmar a doença e determinar sua classificação. Além disso, exames citogenéticos e moleculares são frequentemente requisitados para identificar biomarcadores específicos, como o oncogene quimérico TCF3-PBX1, amplamente associado à LLA (Hou; Tien, 2020).

A detecção do oncogene quimérico TCF3-PBX1 é realizada por meio de uma variedade de técnicas avançadas. Entre as principais estão:

- **Análise cromossômica:** Técnica citogenética fundamental para detectar alterações estruturais nos cromossomos. Por meio do cariótipo convencional, é possível visualizar grandes rearranjos cromossômicos, como deleções, inversões e translocações, incluindo a translocação associada ao cromossomo (TCF3-PBX1), comum em leucemias mieloides crônicas e alguns casos de leucemia linfoblástica aguda (Hou; Tien, 2020).
- **Hibridação *in situ* fluorescente (FISH):** Método baseado na utilização de sondas fluorescentes que se ligam a sequências específicas de DNA. O FISH permite a detecção precisa de alterações cromossômicas que podem não ser visíveis na análise cromossômica convencional, incluindo pequenas translocações, deleções e amplificações gênicas. É amplamente empregado para identificar a fusão TCF3-PBX1, proporcionando um diagnóstico eficiente (Duncavage et al, 2022).
- **Citometria de fluxo:** Técnica altamente sensível utilizada para caracterizar e quantificar células individuais com base em marcadores imunofenotípicos. A citometria de fluxo permite a análise de milhares de células por segundo, sendo

essencial para classificar os diferentes subtipos de leucemia de acordo com os padrões de expressão de antígenos de superfície e intracelulares. Essa abordagem é crucial para o diagnóstico, monitoramento da doença residual mínima e avaliação da resposta ao tratamento (Hou; Tien, 2020).

- Southern blot: Técnica clássica de biologia molecular utilizada para detectar e analisar fragmentos de DNA específicos dentro de uma amostra. O método envolve digestão enzimática do DNA, separação por eletroforese, transferência para uma membrana e hibridização com sondas marcadas. Embora menos utilizada atualmente devido ao avanço de técnicas mais rápidas e sensíveis, o *Southern blot* ainda é aplicado em estudos genéticos para confirmar rearranjos gênicos e mutações associadas à leucemia (Duncavage et al, 2022).
- Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR): Considerada o padrão-ouro para a detecção e quantificação de transcritos específicos, essa técnica permite medir a expressão de genes de fusão, como TCF3-PBX1, com alta sensibilidade e precisão. O qRT-PCR utiliza fluorescência para monitorar a amplificação do DNA em tempo real, tornando-se um método essencial no diagnóstico molecular da leucemia, na avaliação da carga tumoral e no monitoramento da doença residual mínima. Sua capacidade de detectar níveis extremamente baixos de transcritos faz dela uma ferramenta indispensável para prever recaídas e ajustar estratégias terapêuticas (Duncavage et al, 2022).

Embora altamente confiáveis e específicas, essas técnicas apresentam limitações significativas, como sensibilidade moderada em alguns casos, altos custos associados a equipamentos e manutenção, protocolos laboratoriais complexos e longos períodos de análise. Tais desafios restringem sua ampla implementação em laboratórios de menor porte e hospitais com recursos limitados (Hallek; Al-Sawaf, 2021).

Dado o impacto do diagnóstico precoce no prognóstico dos pacientes, o desenvolvimento de métodos moleculares mais acessíveis, simples e eficazes é de extrema relevância. Ensaio inovadores para detecção do TCF3-PBX1, capazes de superar as limitações das técnicas tradicionais, podem transformar o cenário do diagnóstico hematológico, promovendo avanços significativos no manejo e tratamento da leucemia (Hou; Tien, 2020).

As principais características das técnicas utilizadas para detecção do oncogene quimérico TCF3-PBX1 estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação das Técnicas de Detecção do Oncogene Quimérico TCF3-PBX1

Método	Detecção de Alterações Cromossômicas	Detecção de Fusões Gênicas	Quantificação de Transcritos	Alta Sensibilidade	Rapidez no Diagnóstico	Baixo custo
Análise cromossômica	X					
Hibridação In Situ Fluorescente (FISH)	X	X			X	
Citometria de Fluxo					X	
Southern Blot		X			X	
PCR em Tempo Real (qRT-PCR)		X	X	X	X	
Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	X	X	X	X	X	
Biossensores eletroquímicos		X	X	X	X	X

2.2 Desenvolvimento de biossensores e avanços da nanotecnologia

A nanotecnologia tem desempenhado um papel central na inovação e desenvolvimento de novas tecnologias, particularmente na criação de testes diagnósticos para uma vasta gama de doenças. Atuando em um campo interdisciplinar que abrange biologia molecular, bioquímica, engenharia e física, ela tem sido amplamente reconhecida como um catalisador para avanços tecnológicos (Thwala et al., 2023). Nas últimas décadas, mais de 65 mil artigos acadêmicos foram publicados e, desde a década de 1970, mais de 12 mil invenções relacionadas à nanotecnologia foram patenteadas. No campo dos diagnósticos clínicos, entre os anos de 2000 e 2010, foram registradas aproximadamente 2.200 patentes, e espera-se que esse número dobre até 2025 (Fialkoski; Malfatti, 2019). O mercado global de produtos nanotecnológicos movimenta bilhões de dólares, com destaque para os EUA, que lideram em produtividade per capita devido a investimentos consistentes em P&D. Em 2018, os EUA e a Europa geraram receitas semelhantes (~US\$ 940 milhões), mas a produtividade americana foi o dobro da europeia. A Ásia, apesar do maior mercado (US\$ 1,14 bilhão), apresenta baixa eficiência (US\$ 0,25 por pessoa), indicando necessidade de mais incentivos (Talebian et al., 2021).

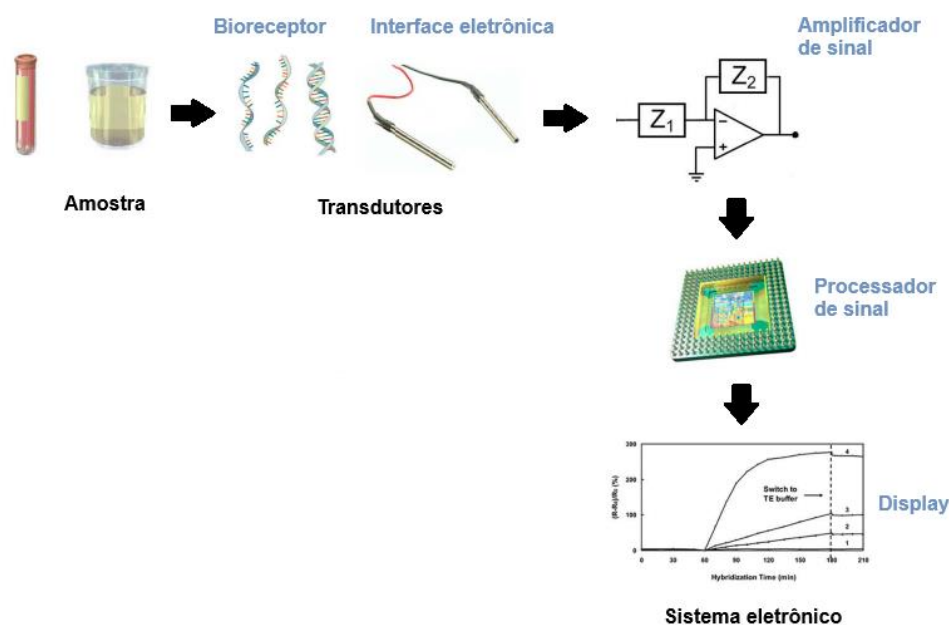
A bionanotecnologia, uma subárea da nanotecnologia, tem sido crucial para o desenvolvimento de dispositivos que utilizam componentes biológicos em diversas aplicações. Esses dispositivos podem desempenhar funções variadas, como detecção de agentes biológicos (microrganismos, vírus, enzimas) e análise de mutações cromossômicas, incluindo oncogenes quiméricos como o TCF3-PBX1 (Alanazi; Almukhaylid; Iqbal. 2024)

Dentro desse contexto, os biossensores representam uma classe específica de dispositivos de bionanotecnologia projetados para detectar e quantificar alvos biológicos ou químicos, com aplicações que vão desde a vida cotidiana e segurança alimentar até diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental e controle de qualidade industrial. O desenvolvimento de biossensores tem crescido exponencialmente devido à sua ampla aplicabilidade e potencial impacto em múltiplas áreas. Estimativas apontam que o mercado global, avaliado em US\$ 38,5 bilhões em 2021, alcance US\$ 68,4 bilhões até 2026 (Tiwari; Tiwari, 2022).

Por definição, biossensores são dispositivos eletrônicos que fornecem informações analíticas específicas sobre moléculas-alvo de forma quantitativa ou semi-quantitativa. Como ilustrado na figura 2, eles são compostos por três

componentes principais: o elemento de reconhecimento, o transdutor e o sistema de amplificação e processamento de sinal. O elemento de reconhecimento, que geralmente é uma molécula biológica, detecta o alvo molecular por meio de interações específicas ou reações catalíticas. O transdutor, por sua vez, converte essa resposta bioquímica em um sinal mensurável que é proporcional à concentração do analito detectado. Finalmente, o sistema eletrônico amplifica e processa esse sinal, permitindo sua visualização em um monitor, onde pode ser interpretado por especialistas (Smutok; Katz, 2022).

Figura 2 - Representação esquemática de um biossensor.



Fonte: Adaptado de Grieshaber et al. (2008).

Biossensores possuem uma variedade de características essenciais, como alta funcionalidade, sensibilidade superior, especificidade, seletividade apurada, baixo limite de detecção, precisão, linearidade, resposta rápida, reprodutibilidade, robustez, portabilidade, simplicidade no uso, estabilidade, capacidade de reutilização e baixo custo de produção. Graças a essas vantagens, os biossensores se mostram como ferramentas altamente promissoras para aplicações em diagnósticos clínicos e testes laboratoriais. No entanto, investigações mais detalhadas ainda são necessárias para assegurar a eficiência e viabilidade comercial desses sistemas de detecção biológica (Smutok; Katz, 2022).

2.2.1 Classificação dos biossensores com base no elemento sensor

Diversos elementos biológicos podem ser aproveitados na criação de biossensores, incluindo tecidos de plantas ou animais, células vivas, receptores celulares, organelas, enzimas, sistemas enzimáticos, anticorpos, antígenos, ácidos nucleicos, aptâmeros, lectinas e microrganismos. Embora existam inúmeras opções de biorreceptores, a escolha correta do elemento biológico é fundamental para garantir a especificidade do biossensor a ser desenvolvido (Mujica et al., 2022).

Biossensores podem ser organizados conforme o tipo de interação entre o elemento biológico e o analito, e os subsequentes eventos bioquímicos. Em termos gerais, eles se dividem em biossensores biocatalíticos ou de bioafinidade. Nos biossensores de bioafinidade, o receptor biológico interage com o alvo molecular formando um complexo estável, que resulta em um sinal transdutor. Estes sistemas geralmente utilizam anticorpos, lectinas e proteínas receptoras. Nesses casos, o equilíbrio químico é atingido sem o consumo do analito pela molécula biológica imobilizada. Já nos biossensores catalíticos, o elemento biológico catalisa uma reação, transformando o analito em subprodutos detectáveis, sendo que a interação entre o receptor e o analito provoca mudanças nas concentrações de substratos ou produtos (Mujica et al., 2022).

A classificação dos biossensores também pode ser feita com base na natureza dos elementos receptores.

- **Biossensores enzimáticos:** esses dispositivos utilizam enzimas como receptores, e o mecanismo de detecção se baseia no consumo ou na produção de substâncias em função da interação enzima-analito. Exemplos incluem enzimas como penicilinase, urease, álcool desidrogenase e glicose oxidase (Ahangari et al., 2021).
- **Genossensores:** são construídos a partir da imobilização de sequências de oligonucleotídeos, que permitem o reconhecimento molecular através de hibridação específica. O DNA ou RNA podem ser usados, e suas aplicações incluem o diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas. (Malecka-Baturo; Grabowska, 2024)

- **Imunossensores:** baseiam-se na fixação de antígenos ou anticorpos no transdutor, e a detecção ocorre via formação de complexos antígeno-anticorpo. Esses dispositivos são utilizados na detecção de hormônios, drogas, bactérias e vírus (Li et al., 2022).
- **Aptassensores:** aptâmeros são usados como receptores, sendo oligonucleotídeos sintetizados que adotam uma conformação específica para interagir com moléculas-alvo, como proteínas e íons. Por serem sintéticos, esses dispositivos também são chamados de biossensores miméticos (Zahra; Khan; Luo, 2021).
- **Biossensores microbiológicos:** microrganismos como bactérias, leveduras e fungos são utilizados como receptores, com destaque para aplicações em monitoramento ambiental e diagnóstico de doenças infecciosas (Moraskie et al., 2021).
- **Biossensores celulares:** utilizam células vivas como receptores e são versáteis, com aplicações que incluem desde a detecção precoce de doenças até a avaliação. Esses dispositivos podem também auxiliar no estudo do efeito de drogas sobre células cancerosas (Khan et al., 2023).

2.2.2 Classificação dos biossensores com base no elemento de transdução

Os biossensores podem ser classificados com base no mecanismo de transdução de sinal e na forma de energia medida. Dentre os tipos existentes, destacam-se:

- **Biossensores ópticos:** Estes dispositivos operam detectando mudanças nas propriedades ópticas para monitorar a concentração de um analito e estudar a construção dos biossensores. As propriedades ópticas, como absorção, transmitância, fluorescência e índice de refração, são amplamente exploradas nesse contexto. A tecnologia de biossensores ópticos é valorizada por sua alta sensibilidade, capacidade de detectar mudanças em tempo real, e sua integração facilitada em sistemas de análise sem a necessidade de marcadores adicionais. Dentro dessa categoria, a ressonância de plásmons de superfície se destaca como uma técnica avançada para detectar alterações ópticas sutis em biossensores (Kaur; Kumar; Kaushik, 2022).

- **Biossensores piezoelétricos:** Baseados na piezoeletricidade, esses biossensores utilizam materiais como o quartzo para detectar variações de massa ou outras propriedades relacionadas à interação com o analito. Aplicando-se uma tensão alternada sobre cristais piezoelétricos, uma frequência específica é gerada, a qual varia conforme a massa das substâncias acopladas à superfície do biossensor. A técnica mais comum neste campo é a microbalança de cristal de quartzo, usada para medir mudanças minúsculas de massa (Zhou et al., 2020).
- **Biossensores térmicos:** Desde os primeiros biossensores enzimáticos descritos por Clark e Lyons em 1962, o uso de transdução baseada em calorimetria vem sendo explorado. Biossensores térmicos detectam mudanças de temperatura associadas às reações bioquímicas, já que todas elas envolvem trocas de calor. Essas variações térmicas podem ser medidas por dispositivos de alta sensibilidade, como os termistores, sendo correlacionadas com a quantidade de reagentes ou produtos em um sistema. Esses biossensores são amplamente utilizados em estudos de hibridização de DNA e monitoramento ambiental (Naresh; Lee, 2021).
- **Biossensores eletroquímicos:** Representando uma das classes mais difundidas de biossensores, os eletroquímicos se destacam pela simplicidade e alta sensibilidade nas medições analíticas. Esses dispositivos detectam mudanças nas propriedades eletroquímicas de um sistema, como transferência de elétrons e difusão de espécies químicas, utilizando eletrodos inertes, como ouro ou carbono. (Wu et al., 2023) Dependendo da característica avaliada, os biossensores eletroquímicos podem ser classificados como:
 - **Amperométricos:** Medem a corrente gerada pela oxidação/redução de moléculas eletroativas (Ding et al., 2024).
 - **Potenciométricos:** Avaliam o potencial gerado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência (Walker et al., 2021).
 - **Condutimétricos:** Medem a condutância elétrica correlacionada à concentração do analito (Majeed et al., 2022).

- **Impedimétricos:** Analisam a impedância resultante da interação entre eletrodo e solução (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

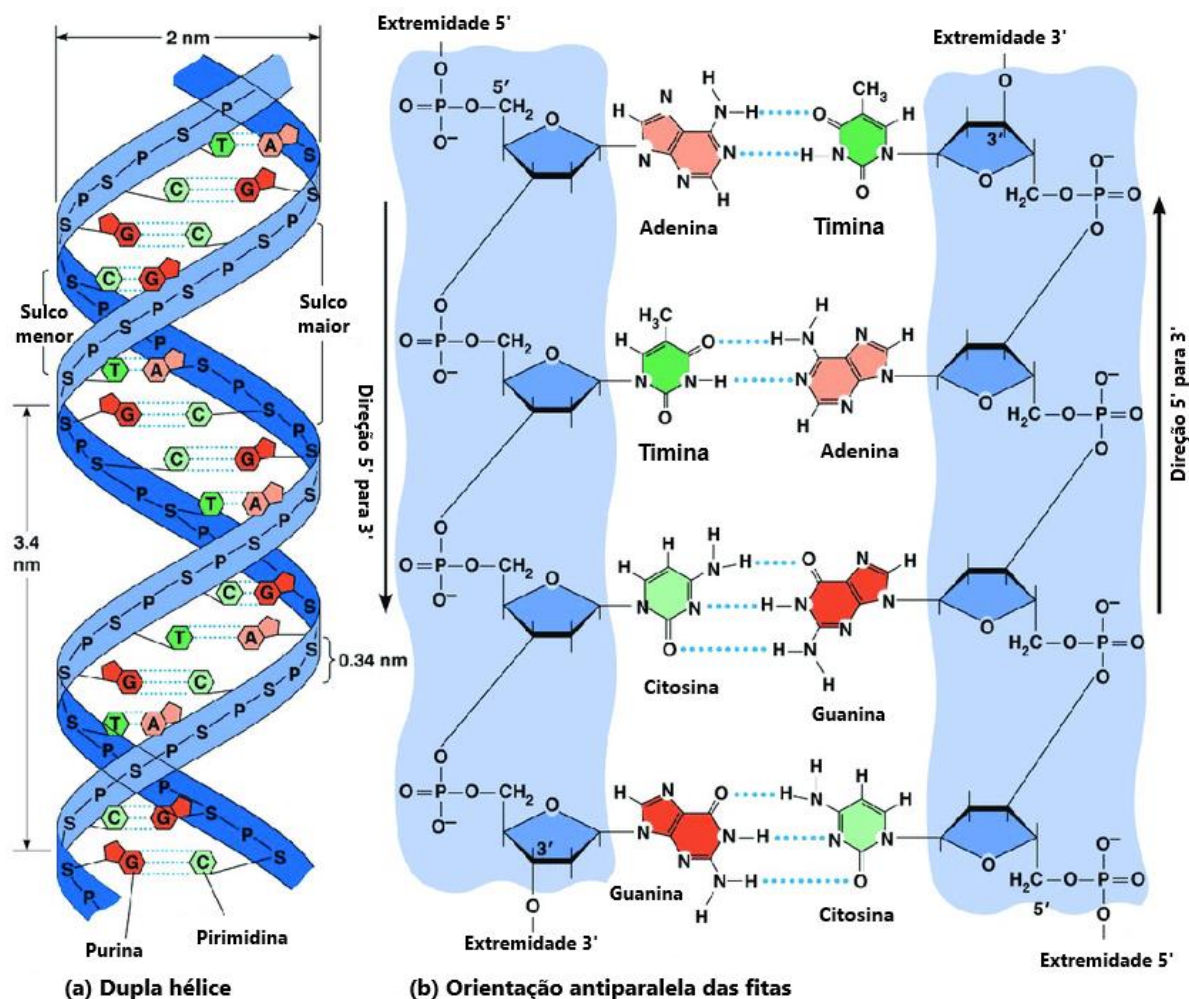
2.2.3 Biossensores eletroquímicos de DNA

Os genossensores eletroquímicos, ou biossensores de DNA baseados em eletroquímica, têm se destacado como ferramentas moleculares eficientes para o diagnóstico de diversas doenças, incluindo infecções virais, bactérias patogênicas e condições genéticas. Esses dispositivos são elaborados imobilizando sequências de DNA ou RNA na superfície de eletrodos, que atuam como transdutores eletroquímicos. O processo de fixação dos ácidos nucleicos à superfície do sensor é uma etapa fundamental para garantir o desempenho analítico e a estabilidade do genossensor. A eficácia na imobilização do DNA influencia diretamente na bioatividade da molécula e, portanto, no sucesso do reconhecimento biológico (Fuku; Bilibana; Iwuoha, 2022).

O princípio básico por trás dos genossensores envolve o uso de uma sonda de DNA de fita simples (ssDNA) que se liga especificamente ao DNA (figura 3) alvo complementar, formando uma estrutura de dupla hélice de DNA (dsDNA) através do processo conhecido como hibridização molecular. Esses dispositivos possuem grande potencial para aplicação em diagnósticos clínicos, uma vez que são capazes de realizar análises rápidas e de baixo custo de moléculas-alvo específicas. Além disso, o uso de transdução eletroquímica garante alta sensibilidade ao sistema, com a possibilidade de reuso e miniaturização do dispositivo, facilitando seu desenvolvimento e aplicação em larga escala (Fuku; Bilibana; Iwuoha, 2022).

Recentemente, pesquisas têm focado no desenvolvimento de genossensores para a detecção do oncogene quimérico TCF3-PBX1, que está associado a leucemias. As principais técnicas eletroquímicas usadas para monitorar o processo de identificação deste oncogene incluem voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria de pulso diferencial. Embora os genossensores já tenham demonstrado eficiência na detecção do TCF3-PBX1, desafios permanecem, como a necessidade de alcançar limites de detecção ainda mais baixos, o que ampliaria sua aplicação em estudos de doença residual mínima e outras áreas da medicina personalizada (Zhang et al., 2021)

Figura 3 - Estrutura molecular do DNA e as interações bioespecíficas entre suas bases nitrogenadas.



Fonte: Adaptado de Roy et al. (2019).

2.2.4 Métodos de imobilização de DNA

Os biossensores de DNA são amplamente utilizados no diagnóstico clínico devido à sua alta especificidade e habilidade em detectar mudanças mínimas nas sequências de nucleotídeos, como uma única base alterada. No entanto, esses dispositivos ainda enfrentam alguns desafios técnicos, como a estabilidade da sonda de DNA imobilizada e a reprodutibilidade dos resultados. Para melhorar a eficácia desses sistemas de detecção, o design do sensor e a estratégia de imobilização do DNA são aspectos fundamentais (Zhang et al., 2022).

Em geral, para desenvolver biossensores de DNA eficientes, as sondas precisam ser fixadas de maneira previsível, preservando sua capacidade de interagir

com o alvo. Isso exige que a adsorção não-específica seja minimizada e que a estabilidade da sonda ancorada seja mantida ao longo do tempo. Além disso, a orientação e acessibilidade da sonda de DNA são fatores cruciais para garantir a afinidade e a eficiência do processo de hibridização. Controlar essas variáveis é essencial para maximizar a sensibilidade e seletividade dos biossensores (Zhang et al., 2022).

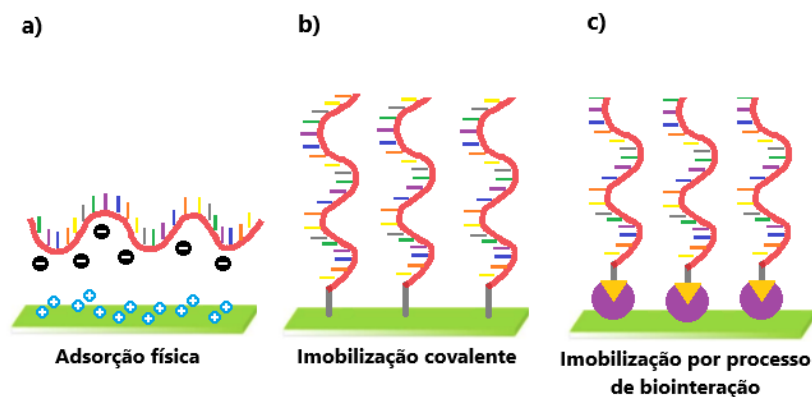
Os métodos de imobilização (figura 4) utilizados no desenvolvimento destes dispositivos incluem técnicas físicas, como a adsorção, e métodos químicos, como a ligação covalente, além de interações bioquímicas, como o uso de biotina-avidina. A adsorção física de sondas de DNA baseia-se na interação eletrostática entre os grupos fosfato do DNA e superfícies carregadas. Esta é uma técnica simples que não requer modificações na estrutura molecular do DNA (Zhang et al., 2022).

Já a imobilização química de DNA é amplamente aplicada para aumentar a estabilidade e repetibilidade dos sensores. Um exemplo comum é a quimissorção, que utiliza grupos tiol terminais em superfícies de ouro, formando uma ligação covalente estável. Essa abordagem evita que as moléculas de DNA sejam lixiviadas do sensor, o que assegura uma maior durabilidade do dispositivo. Além disso, a imobilização covalente pode ser realizada com reagentes de acoplamento, como o glutaraldeído, promovendo ligações entre grupos funcionais do DNA e substratos ativados (Foroughi; Jahani, 2022).

Outra técnica popular de imobilização baseia-se na afinidade biomolecular, como o uso de biotina e estreptavidina, que formam complexos de alta afinidade. As sondas de DNA podem ser modificadas com biotina e imobilizadas em superfícies tratadas com estreptavidina, o que facilita a orientação precisa das sondas para uma detecção mais eficaz (Park et al., 2020).

Com todas essas opções, a escolha da técnica de imobilização deve ser cuidadosamente analisada para garantir a funcionalidade do biossensor e evitar a dessorção da sonda de DNA. A avaliação minuciosa de cada protocolo experimental assegura que o biossensor atenda aos requisitos de estabilidade e eficiência necessários para sua aplicação clínica (Foroughi; Jahani, 2022).

Figura 4 - Estratégias de imobilização de DNA em superfícies sólidas. a) adsorção física, b) adsorção covalente e c) adsorção por biointeração.



Fonte: O autor (2024).

2.3 Plataformas nanoestruturadas

Nanoplataformas emergem como soluções promissoras para o desenvolvimento de dispositivos de alto desempenho analítico, especialmente em biossensores. Essas plataformas funcionam como uma interface eficaz entre as moléculas de biorreconhecimento e os transdutores, promovendo a ancoragem de biomoléculas como DNA por meio de ligações covalentes, de hidrogênio ou interações eletrostáticas, garantindo a estabilidade do sistema. A imobilização de DNA em superfícies sólidas, quando realizada de maneira controlada, minimiza a adsorção inespecífica e reduz a perda de material sensível, aspectos críticos para a durabilidade do sensor (Shi et al., 2022).

Protocolos de imobilização química favorecem uma orientação adequada das biomoléculas e ajudam a mitigar problemas como repulsão eletrostática e impedimentos físicos entre as cadeias de DNA, otimizando a eficiência do dispositivo. Contudo, o êxito da imobilização está intimamente relacionado às propriedades dos materiais transdutores e de interface. Dessa forma, uma caracterização detalhada dos materiais nanoestruturados, como nanopartículas, nanotubos de carbono, nanofios, nanoesferas e pontos quânticos, é fundamental para garantir a eficácia da hibridização, bem como a reprodutibilidade e robustez dos biossensores (Shi et al., 2022).

A seguir, procede-se à apresentação de uma análise acerca dos materiais nanotecnológicos e funcionais empregados na concepção da plataforma nanoestruturada, estrategicamente integrada ao sistema de detecção molecular delineado no escopo deste estudo.

2.3.1 Polipirrol

O polipirrol (PPy) é um polímero condutor que tem atraído atenção significativa na ciência dos materiais, especialmente no desenvolvimento de biossensores e plataformas nanoestruturadas para detecção biológica. Suas propriedades eletroquímicas únicas, alta biocompatibilidade e capacidade de funcionalização química o tornam ideal para aplicações sensíveis, como a detecção de marcadores moleculares específicos, incluindo biomarcadores relacionados a doenças oncológicas (Oliveira et al., 2023).

O PPy destaca-se pela sua alta condutividade elétrica, reversibilidade redox e estabilidade química em uma ampla faixa de potenciais, características essenciais para a transdução de sinais bioquímicos em sistemas eletroquímicos. A síntese eletroquímica do PPy em superfícies de eletrodos é amplamente utilizada devido à sua simplicidade e controle preciso sobre a espessura e a morfologia do filme formado. Esses parâmetros podem ser ajustados de acordo com a aplicação específica, garantindo melhor desempenho analítico e sensibilidade. Além disso, a modificação do PPy com materiais nanoestruturados, como nanopartículas metálicas (Au, Pt) ou óxidos metálicos (TiO_2 , ZnO), melhora sua capacidade de detecção. Essas combinações aumentam a área de superfície ativa e promovem uma interação mais eficiente entre a superfície do eletrodo e as moléculas-alvo (Nguyen et al., 2023).

No que tange às suas aplicações, o PPy é amplamente utilizado como material base para a fabricação de biossensores devido à sua capacidade de suportar a imobilização de biomoléculas, como DNA, proteínas ou enzimas. Estudos recentes demonstraram a eficácia de biossensores baseados em PPy para detectar biomarcadores de câncer, como o antígeno prostático específico (PSA), com alta sensibilidade e seletividade (Sarkar et al., 2022).

A funcionalização do PPy com sondas de DNA de fita simples (ssDNA) permite a detecção específica de sequências de DNA complementares por meio do processo de hibridização molecular. Essa interação é transduzida como uma variação nos sinais

eletroquímicos, como corrente, potencial ou impedância, que podem ser quantificados de maneira precisa (Chahma; Carruthers, 2021).

2.3.2 Óxido de Titânio (TiO₂)

O dióxido de titânio (TiO₂) é um material semicondutor amplamente estudado devido à sua alta estabilidade química, excelente resistência térmica e notáveis propriedades fotocatalíticas. Estruturalmente, o TiO₂ pode existir em diferentes fases cristalinas, como anatase, rutilo e brookita, sendo a anatase a mais frequentemente empregada em aplicações tecnológicas por suas superiores propriedades fotocatalíticas e maior área superficial. Sua estrutura eletrônica permite a geração de cargas opostas quando irradiado com luz de comprimento de onda adequado, conferindo-lhe alta reatividade em processos de oxidação e redução. Além disso, o TiO₂ possui uma superfície rica em grupos hidroxila, o que facilita a imobilização de biomoléculas e a funcionalização química, tornando-o ideal para aplicações em biossensores e outros dispositivos biomédicos. No contexto de sensores eletroquímicos, o TiO₂ desempenha um papel essencial como suporte catalítico devido à sua biocompatibilidade, estabilidade em diferentes condições químicas e capacidade de promover a transferência de elétrons em interfaces sólido-líquido. No entanto, sua condutividade elétrica relativamente baixa limita a eficiência de seus dispositivos eletroquímicos, o que motivou a pesquisa por materiais híbridos que combinem suas propriedades com outras características complementares (Ijaz; Zafar, 2021).

2.3.3 Nanoesferas de Platina (PtNs)

As nanoesferas de platina (PtNs) são nanomateriais metálicos altamente valorizados por sua excepcional atividade catalítica e condutividade elétrica. A platina é reconhecida como um dos melhores catalisadores devido à sua alta densidade de estados eletrônicos próximos ao nível de Fermi, o que facilita a adsorção e ativação de moléculas, tornando-a eficaz em reações de oxidação e redução. Em escala nanométrica, as PtNs oferecem uma relação superfície-volume extremamente favorável, o que aumenta significativamente o número de sítios catalíticos disponíveis e melhora a eficiência catalítica. A morfologia esférica das PtNs é particularmente vantajosa, pois maximiza a exposição de seus átomos superficiais, enquanto sua alta

condutividade elétrica promove uma rápida transferência de carga. Além disso, as PtNs são frequentemente sintetizadas com controle rigoroso de tamanho e dispersão, utilizando métodos como redução química, eletrodeposição e síntese coloidal. Essa precisão na fabricação é essencial para assegurar um desempenho uniforme em dispositivos híbridos. Contudo, o alto custo e a tendência à aglomeração das nanopartículas são desafios que podem ser mitigados ao combiná-las com outros materiais, como o TiO_2 (Khan; Al-Mamun; Ara, 2021).

2.3.4 Nanocompósito híbrido de nanopartículas de óxido de titânio e nanoesferas de platina

O desenvolvimento de nanocompósitos híbridos TiO_2 @PtNs (figura 5) une as propriedades únicas de ambos os materiais, criando plataformas altamente eficientes para aplicações em biossensores eletroquímicos. A incorporação das PtNs na matriz de TiO_2 melhora sua condutividade elétrica e densidade de sítios catalíticos. Além disso, a interação entre o TiO_2 e as PtNs pode gerar vacâncias de oxigênio na interface dos materiais, promovendo a adsorção e oxidação de moléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos (Bertel; Miranda; García-Martín, 2021).

Nos biossensores eletroquímicos, o TiO_2 @PtNs serve como uma plataforma transdutiva robusta e sensível. Sua capacidade de amplificar sinais eletroquímicos é especialmente útil na detecção de biomoléculas. Por exemplo, na hibridização de DNA, alterações nas propriedades redox do sistema podem ser monitoradas utilizando técnicas como voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Esses sensores híbridos têm demonstrado limites de detecção extremamente baixos, variando de femtomolar a attomolar, destacando-se como ferramentas precisas para diagnósticos clínicos avançados (Jeong et al., 2021).

Figura 5 - Representação do nanocompósito híbrido de TiO_2 @Pt.



Fonte: O autor (2024).

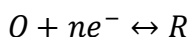
2.4 Técnicas eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas permitem a investigação detalhada dos processos de transferência de carga, interações moleculares e alterações na interface eletrodo/solução. As metodologias mais empregadas incluem voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica.

2.4.1 Voltametria cíclica

A VC é amplamente reconhecida como uma técnica essencial para explorar os processos eletroquímicos na interface eletrodo/solução. Sua principal contribuição reside na habilidade de fornecer dados detalhados sobre as propriedades redox de materiais, a cinética de transferência de carga e a reversibilidade das reações eletroquímicas. Na área de biossensores, a VC desempenha um papel crucial em diversas etapas, desde a fabricação de plataformas até a análise de interações biomoleculares. É frequentemente utilizada para técnicas de eletropolimerização e eletrodeposição, fundamentais para a criação de superfícies sensíveis, bem como para a caracterização de modificações moleculares na interface eletrodo/biomolécula (Avelino et al., 2022).

A VC baseia-se na variação controlada do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho (figura 6), enquanto a corrente gerada por reações redox das espécies eletroativas próximas ao eletrodo é registrada. Essas reações são representadas de forma geral pela Equação 1.



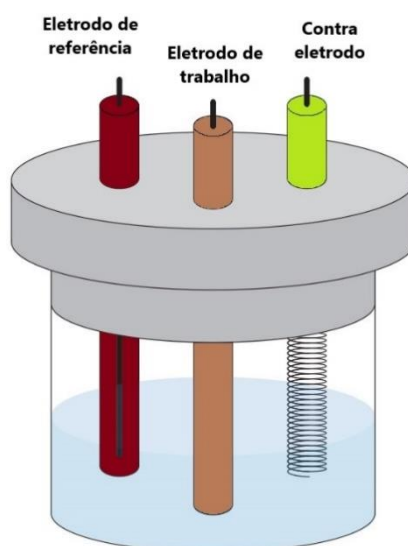
Equação 1

Na equação, *O* representa a espécie oxidada, *R* a reduzida e *ne⁻* o número de elétrons transferidos durante o processo de oxirredução (Avelino et al., 2022).

Os experimentos de VC são realizados em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar (figura 6). O potencial é aplicado entre o eletrodo de trabalho e o de referência, enquanto a corrente é medida entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar. Essa configuração permite um controle preciso do sistema eletroquímico e minimiza interferências. A variável ajustada é o potencial (*E*), enquanto a variável medida corresponde à corrente

resultante (i). Finalmente, os resultados da voltametria cíclica (VC) são apresentados graficamente em voltamogramas cíclicos, que representam a relação entre corrente e potencial.

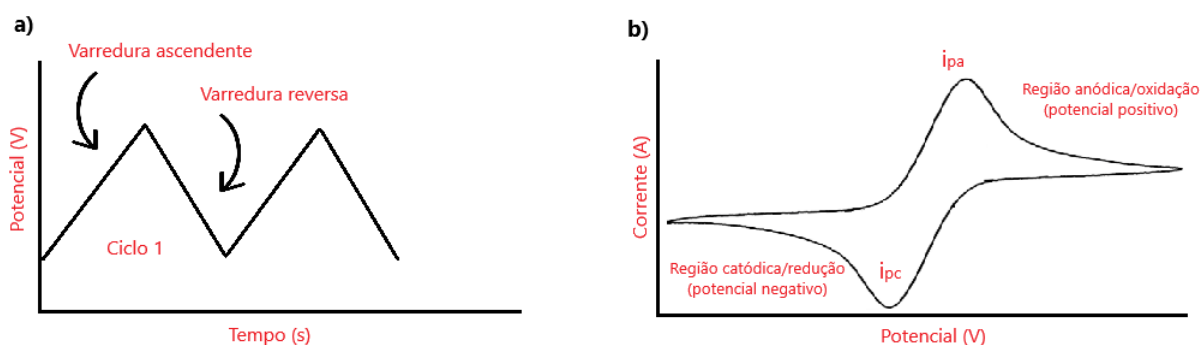
Figura 6 - Ilustração esquemática de uma célula eletroquímica de compartimento único contendo três eletrodos: eletrodo de referência, eletrodo de trabalho e contra eletrodo.



Fonte: O autor (2024).

O diferencial da VC em relação a outras técnicas de varredura voltamétrica está no perfil triangular (figura 7) de potencial aplicado ao longo do tempo. Esse padrão permite o estudo de ciclos repetidos de oxidação e redução, gerando voltamogramas cíclicos que refletem o comportamento redox das espécies em solução e na interface eletrodo/solução (Avelino et al., 2022).

Figura 7 - Gráfico de onda triangular demonstrado a forma em que o potencial é aplicado na técnica de VC (a) e o voltamograma cíclico resultante (b).



Fonte: O autor (2024).

O potencial inicial aplicado não induz reações de oxirredução, mas, à medida que aumenta na direção positiva, ocorre a oxidação das espécies redutíveis, gerando um pico de corrente anódica (i_{pa}). Esse pico é proporcional à concentração do analito na interface. Após a saturação do processo de oxidação, o potencial é revertido em direção a valores negativos, favorecendo a redução das espécies previamente oxidadas, o que resulta em um pico de corrente catódica (i_{pc}). O equilíbrio entre essas reações permite uma análise detalhada dos sistemas redox (Oliveira et al., 2023).

A voltametria cíclica é amplamente empregada no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos devido à sua capacidade de monitorar modificações na superfície do eletrodo e os processos de biorreconhecimento. Como exemplo, um biossensor eletroquímico para diagnóstico de leucemia foi desenvolvido com um nanocompósito híbrido composto por quitosana e nanopartículas de óxido de zinco imobilizado sobre um filme de PPy, com segmentos de DNA imobilizados de forma covalente, permitindo o reconhecimento biomolecular. (Avelino et al., 2022).

2.4.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica é amplamente reconhecida por sua aplicabilidade no exame de superfícies modificadas e no acompanhamento de processos interfaciais. Este método permite a obtenção de dados essenciais sobre as propriedades físico-químicas de diversos sistemas, como reações eletroquímicas, semicondutores, biossensores, e processos mecânicos (Chupradit et al., 2022).

O princípio da EIE baseia-se na aplicação de um estímulo elétrico em um sistema composto por eletrodos imersos em uma célula eletroquímica, seguido da análise da resposta gerada. O estímulo é geralmente uma pequena variação senoidal de potencial, que perturba minimamente o sistema, permitindo o estudo de processos próximos ao equilíbrio. Sobre este potencial contínuo, aplica-se uma série de frequências alternadas, induzindo uma corrente senoidal no sistema. Com base na relação entre o potencial e a corrente gerada, é possível calcular a impedância do sistema (Avelino et al., 2022).

A impedância elétrica combina três elementos principais: resistência, capacitância e indutância. A resistência reflete a perda de energia por calor, enquanto

a capacitância está associada ao armazenamento de energia eletrostática. Já a indutância decorre do acúmulo de energia em campos magnéticos.

$$Z = \frac{V(t)}{i(t)}$$

Equação 2

A impedância total (Z) é expressa em termos de valores complexos, compostos por uma parte real (Z') e uma parte imaginária (-Z''), ligadas à resistência e à capacitância do sistema (Oliveira et al., 2023). Conforme as equações 3 e 4 descritas abaixo, estas variáveis se relacionam da seguinte forma:

$$Z' = R_s + \frac{R_{CT}}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{CT}^2}$$

Equação 3

$$-Z'' = \frac{\omega C_{dl} R_{CT}^2}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{CT}^2}$$

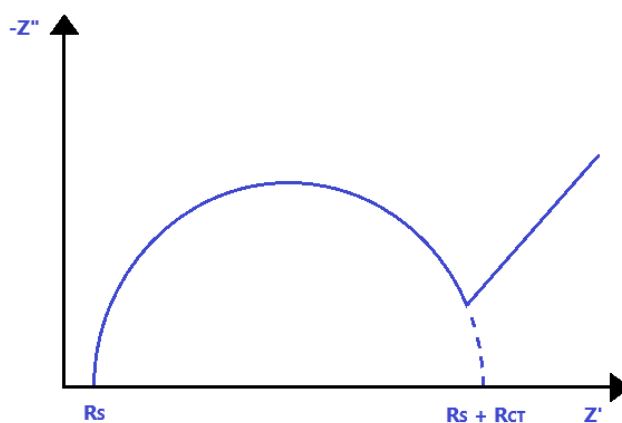
Equação 4

R_s representa a resistência da solução, R_{CT} refere-se à resistência à transferência de carga, ω indica a frequência angular, e C_{dl} corresponde à capacitância da dupla camada elétrica (Oliveira et al., 2023).

A análise gráfica mais comum dos dados de EIE é realizada através do diagrama de Nyquist, também chamado de semicírculo de Cole-Cole, onde a componente real da impedância é traçada contra sua componente imaginária (figura 8). Nesse diagrama, cada ponto simboliza a impedância total do sistema em uma frequência específica. Em altas frequências, forma-se um semicírculo que reflete os processos limitantes de transferência de carga, como R_s e R_{CT} . Em frequências mais baixas, uma linha reta aparece, associada ao processo difusional na dupla camada elétrica. O diagrama de Nyquist é amplamente usado em estudos de eletroquímica por sua capacidade de oferecer informações detalhadas sobre a cinética de transferência de elétrons e por sua facilidade de interpretação visual. Nos processos de transferência de elétrons extremamente rápidos, o espectro de impedância exibe

apenas a parte linear. Já nos processos muito lentos, destaca-se uma grande região semicircular, onde o diâmetro do semicírculo equivale à resistência à transferência de elétrons (Avelino et al., 2022).

Figura 8 - Representação do diagrama de Nyquist.



Fonte: O autor (2024).

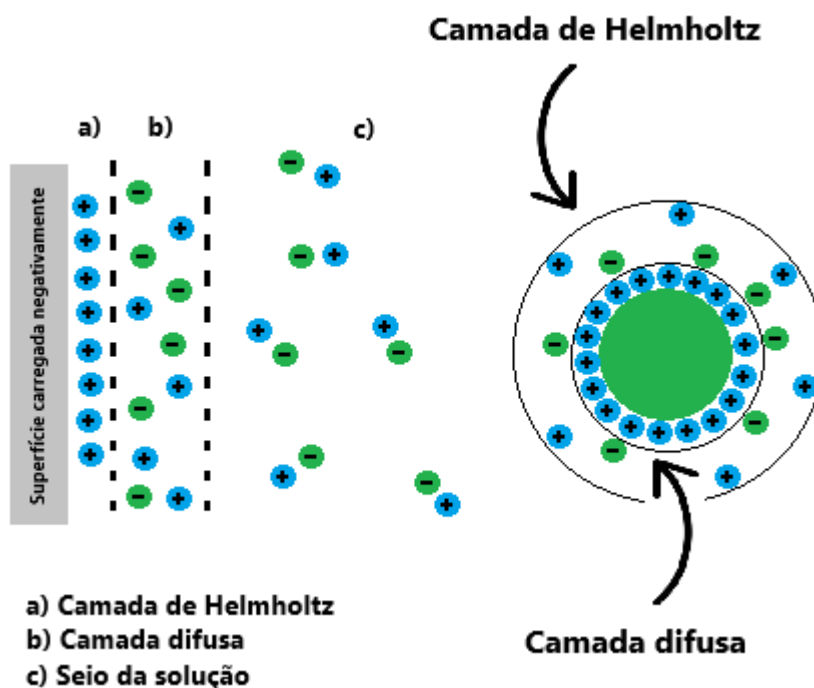
Nos estudos de espectroscopia de impedância, informações adicionais podem ser extraídas usando circuitos equivalentes ou modelos matemáticos. Devido à semelhança dos sistemas eletroquímicos com capacitores, resistores e indutores, circuitos equivalentes são usados para simular dados experimentais e interpretar espectros de impedância (Chupradit et al., 2022).

O circuito de Randles, amplamente utilizado em estudos de biossensores, permite analisar elementos relacionados aos processos físico-químicos na dupla camada elétrica. Ele é composto por: R_s , representando a resistência da solução eletrolítica ao transporte de íons; R_{CT} , associada à modificação do eletrodo e à passagem de elétrons; Z_w , a impedância de Warburg, que reflete a resistência ao transporte de massa das espécies eletroativas; e C_{dl} , a capacitância da dupla camada elétrica, oriunda da distribuição de cargas na interface eletrodo/solução (Chupradit et al., 2022).

A interface eletrodo/solução comporta-se como um capacitor de placas paralelas devido à distribuição de íons na dupla camada elétrica. Sob potencial aplicado, o eletrodo de trabalho adquire carga positiva ou negativa, formando uma camada compacta de íons opostos fortemente adsorvidos (camada de Helmholtz) próxima à superfície. Em regiões mais afastadas, os íons semiligados se distribuem

de maneira difusa (camada de Gouy-Chapman). Os íons livres na solução são responsáveis pela condutividade iônica (figura 9) (Chupradit et al., 2022).

Figura 9 - Distribuição de íons na interface eletrodo/solução.



Fonte: O autor (2024).

A EIE destaca-se por sua alta sensibilidade entre os métodos eletroquímicos. Originalmente desenvolvida na engenharia elétrica, atualmente é aplicada em diversas áreas, como análises clínicas, ciência dos materiais e tecnologia farmacêutica. Ela possibilita monitorar propriedades físico-químicas, como capacitância e resistência à transferência de elétrons, fornecendo insights sobre eventos moleculares na dupla camada elétrica. Além disso, permite caracterizar biossensores e entender fenômenos interfaciais, como processos de biodetecção em eletrodos modificados (Chupradit et al., 2022).

Um biossensor eletroquímico baseado em EIE foi desenvolvido para detectar o gene de fusão BCR/ABL. Esse biossensor foi construído com um nanocompósito híbrido composto por quitosana e nanopartículas de óxido de zinco imobilizado sobre um filme de PPy. Segmentos de DNA foram imobilizados de forma covalente, permitindo o reconhecimento biomolecular. O desempenho analítico do biossensor foi investigado utilizando plasmídeos recombinantes contendo o oncogene-alvo e amostras clínicas de pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC). O dispositivo

apresentou um limite de detecção de 1,34 fM, limite de quantificação de 4,08 fM e uma sensibilidade de 34,03 $\mu\text{A fM}^{-1}\text{cm}^2$ para o oncogene BCR/ABL. O sistema de detecção demonstrou alta especificidade, seletividade e reprodutibilidade, com um desvio padrão de 4,21%. Além disso, foi observada uma resposta linear no intervalo de 138,80 aM a 13,88 pM, com um coeficiente de regressão de 0,96 (Avelino et al., 2022).

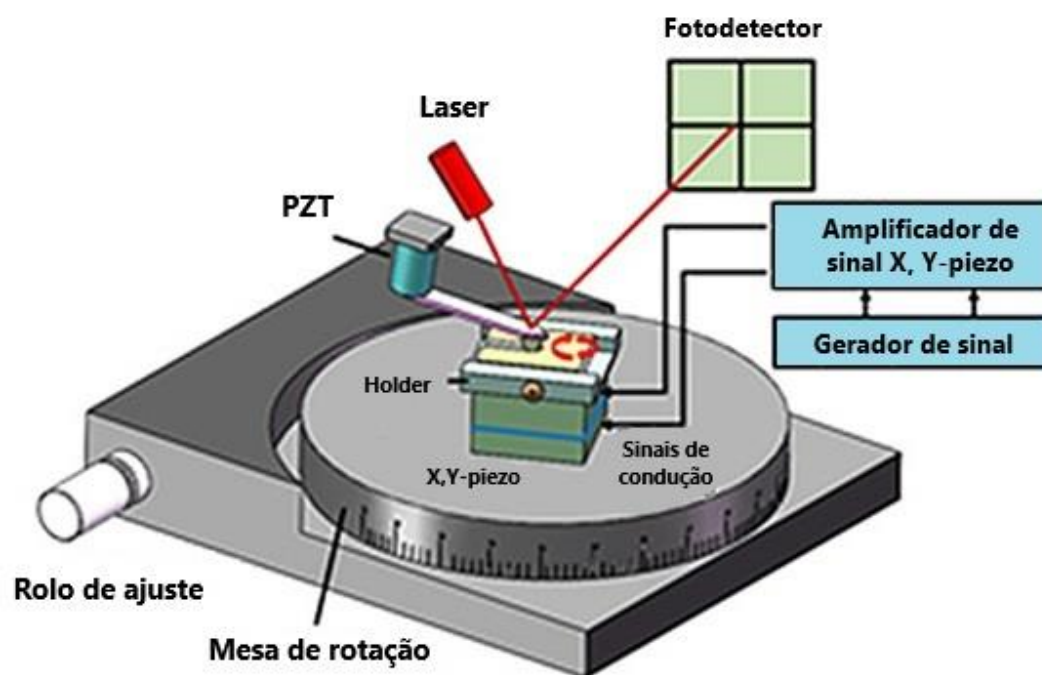
2.5 Microscopia de força atômica

Desenvolvida por Binning, Quate e Gerber em 1986, a Microscopia de Força Atômica (AFM) revolucionou o campo da caracterização de superfícies em nível atômico. A técnica é amplamente utilizada para analisar uma ampla variedade de amostras, incluindo biomoléculas, nanoestruturas, polímeros, filmes orgânicos, cerâmicas e materiais semicondutores, entre outros. Sua popularidade deve-se às vantagens em relação a outras técnicas, como alta resolução tridimensional, ausência de necessidade de recobrimentos condutores e a possibilidade de análises em líquidos, além da medição direta de propriedades como rugosidade e espessura de filmes ultrafinos. Isso torna a AFM uma ferramenta indispensável em áreas como ciência dos materiais, nanobiotecnologia e biologia celular (Joshi; Homburg; Ehrmann, 2022).

Um microscópio de força atômica (figura 10) é composto por elementos fundamentais: um cantilever com uma ponta (sonda), um laser que incide sobre a parte traseira do cantilever, um fotodiodo para detectar alterações no feixe refletido e um scanner piezoelétrico para posicionar a amostra em três dimensões com alta precisão (figura 10). O funcionamento baseia-se na interação entre os átomos da sonda e da superfície analisada. Ao escanear a amostra, o cantilever se deflete devido às forças interatômicas, desviando o laser incidente. As alterações são registradas por um fotodiodo, gerando uma topografia digital da superfície (Viljoen et al., 2021).

Quando a sonda se aproxima da superfície, forças atrativas, como Van der Waals e interações eletrostáticas, predominam. À medida que a distância diminui, forças repulsivas começam a agir devido à sobreposição dos orbitais eletrônicos, atingindo equilíbrio a uma distância característica de alguns ångströms. Este comportamento é representado por curvas de energia potencial, que mostram deflexões positivas ou negativas do cantilever em resposta às forças de interação (Viljoen et al., 2021).

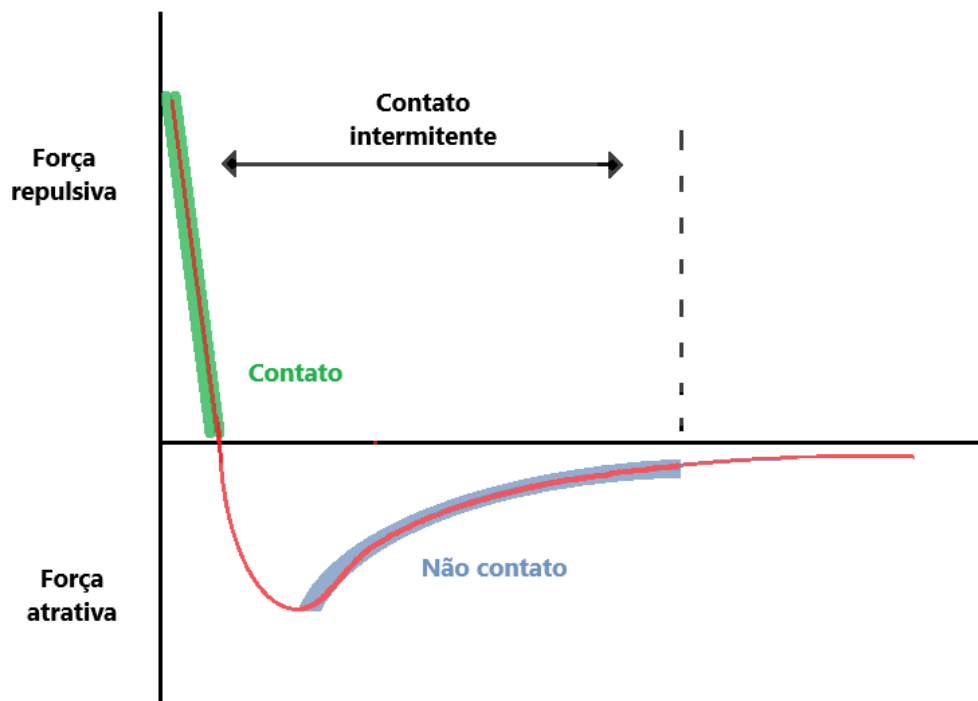
Figura 10 - Esquema ilustrativo do mecanismo de funcionamento de um microscópio de força atômica.



Fonte: Adaptado de Wang et al. (2021).

A AFM opera em três modos principais: contato, não contato e contato intermitente (figuras 11 e 12), cada um adequado a diferentes tipos de amostras e análises (Joshi; Homburg; Ehrmann, 2022).

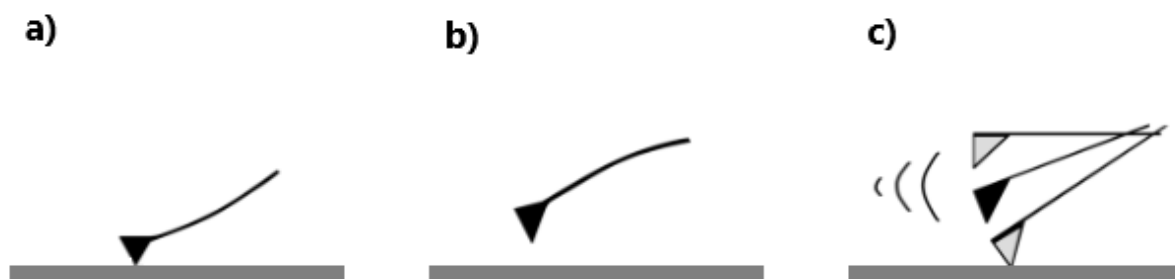
Figura 11 - Efeito da distância entre a sonda e a amostra sobre o regime de forças do sistema.



Fonte: O autor (2024).

1. **Modo de contato:** A ponta da sonda toca diretamente a amostra, predominando forças repulsivas. Este modo é ideal para obter imagens topográficas de alta resolução, mas exige cuidado para evitar danos à amostra (Joshi; Homburg; Ehrmann, 2022).
2. **Modo de não contato:** A sonda oscila a poucos nanômetros da superfície, interagindo apenas com forças atrativas. Esse modo é menos invasivo, ideal para amostras delicadas (Viljoen et al., 2021).
3. **Modo de contato intermitente:** Também conhecido como tapping mode, combina forças atrativas e repulsivas ao tocar a amostra periodicamente. É amplamente utilizado para caracterização de materiais macios ou frágeis (Viljoen et al., 2021).

Figura 12 - Modos de operação de um microscópio de força atômica: modo de contato (a), modo de não contato (b) e modo de contato intermitente (c).



Fonte: Adaptada de WIKIMEDIA COMMONS, 2016.

A precisão das análises por AFM pode ser impactada por fatores como umidade, impurezas na amostra e características da sonda. Erros ou artefatos podem surgir, ocultando detalhes importantes da superfície. Assim, a experiência do operador é essencial para minimizar tais problemas e obter micrografias confiáveis (Viljoen et al., 2021).

A AFM tem desempenhado um papel crucial no desenvolvimento de biossensores, permitindo a caracterização de superfícies nanoestruturadas e a análise de processos biomoleculares. Por exemplo, Avelino et al. aplicaram a AFM para monitorar a construção de um biossensor com PPy para detecção do oncogene quimérico BCR/ABL presente na leucemia mieloide aguda, destacando o potencial da técnica em pesquisas avançadas. A versatilidade da AFM como ferramenta de análise e caracterização destaca sua importância crescente em estudos interdisciplinares, especialmente no campo da nanobiotecnologia e ciência dos materiais (Avelino et al., 2022).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Desenvolver um biossensor eletroquímico à base de polipirrol e nanocompósito $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ para detecção do oncogene quimérico TCF3-PBX1 na leucemia linfoblástica aguda infantil.

3.2 Específicos

- Avaliar as propriedades interfaciais do compósito $\text{TiO}_2\text{@Pt}$ adsorvido em eletrodo de ouro através das técnicas de VC e EIE.
- Avaliar as mudanças nas propriedades ópticas do nanocompósito $\text{TiO}_2\text{@Pt}$ por UV-Vis, identificando o deslocamento no espectro de absorção após a funcionalização com APTES e MPTMS.
- Analisar o processo de adsorção eletrostática da sonda de DNA sobre o eletrodo de ouro modificado com $\text{TiO}_2\text{@Pt}$.
- Verificar a capacidade de reconhecimento bioespecífico e a sensibilidade do biossensor $\text{TiO}_2\text{@Pt}$ -sonda após sua interação com plasmídeos contendo o oncogene quimérico TCF3-PBX1 em concentrações variáveis (controle positivo).
- Avaliar a seletividade do biossensor $\text{TiO}_2\text{@Pt}$ -sonda frente à plasmídeos contendo segmentos de DNA não complementares (controle negativo).
- Determinar o limite de detecção do biossensor $\text{TiO}_2\text{@Pt}$ -sonda e realizar ensaios de biodetecção em amostras clínicas de pacientes com leucemia (amostras de cDNA).
- Realizar análise topográfica da camada $\text{TiO}_2\text{@Pt}$ -sonda e avaliar as características morfológicas de sua superfície após o processo de biodetecção por meio de AFM.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os seguintes produtos químicos foram obtidos da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, EUA): pirrol (98%), nanoesferas de platina funcionalizadas com citrato (PtNs, diâmetro aproximado de 30 nm), nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2 , <100 nm), 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES, $\geq 98\%$), 3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTMS, 95%), etanol ($\geq 99,5\%$), amônia, ácido clorídrico (HCl) (37%), ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) ($\geq 99,7\%$), glutaraldeído (25%), albumina de soro bovino (BSA) ($\geq 98\%$), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) ($\geq 99,0\%$), ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) (98,5–102,0%), fosfato de sódio monobásico e dibásico ($\geq 99,0\%$) e pasta de alumina

de 0,05 μm ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$). O Trizol foi adquirido da Invitrogen Co. Ltd. (Carlsbad, CA, EUA). Soluções de grau analítico foram preparadas utilizando água ultrapura de um sistema de purificação Milli-Q Plus (Billerica, EUA).

4.2 Sondas oligonucleotídicas e amostras clínicas

Os resultados analíticos do biossensor foram validados por meio de comparação com o método diagnóstico de referência, que inclui a PCR e a eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio. Para tanto, infere-se que espécimes clínicos, representadas por amostras de cDNA, e amostras plasmídicas foram empregadas. Destaca-se que as sequências quiméricas de DNA foram devidamente clonadas no vetor pTA, possibilitando a obtenção de plasmídeos recombinantes.

No tocante à obtenção das amostras biológicas, pacientes diagnosticados com leucemia foram submetidos à aspiração de osso ilíaco, sendo as amostras clínicas coletadas mediante consentimento informado, disponibilizadas pelo biobanco do Serviço de Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP, Recife, PE, Brasil). A análise genética foi conduzida em amostras de medula óssea, após a extração total de RNA de 5×10^6 células, utilizando o reagente Trizol. Posteriormente, realizou-se a transcrição reversa para a síntese de cDNA, utilizando-se um oligonucleotídeo iniciador. As sequências de oligonucleotídeos correspondentes a primers e sondas empregadas nos ensaios de biologia molecular estão detalhadas na Tabela 2. O presente estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ Pernambuco), conforme o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 13296913.3.0000.5190.

Tabela 2 - Sequências de oligonucleotídeos de primers e sondas utilizadas nos ensaios de biologia molecular.

Sequências de oligonucleotídeos	
Plasmídeo	5'CACAGCCGGCGACATGCACACGCTGCTGCCTGGCCACGGGGCGCTGG CCTCAGGTTTCACCGGCCCATGTCACTGGGCGGGCGGCACGCAGGCGCT GGTTGGAGGCAGCCACCCCGAGGACGGCCTCGCAGGCAGCACCAGCCT CATGCACAACCACGCGGCCCTCCCAGCCAGCCAGGCACCCTCCCTGAC CTGTCTCGGCCTCCCGACTCCTACAGTG TTTTGAGTATCCGAGGAGCCC AGGAGGAAGAACCACAGACCCCGAGCTGATGCGGCTGGACAACATGCT GTTAGCGGAAGGCGTGCGGGGCGCTGAGAAGGGCGGAGGGTTCGGCGG CAGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCTTCTGGAGGGGCAGGTTCA3'
Primers de PCR convencional	
E2A2	5'CACAGCCGGCGACATGCACAC3'
PBX1-2	5'TGAACCTGCCCCCTCCAGAAGC3'
Primers de qPCR	
ENF101	5'CCAGCCTCATGCACAAACA3'
ENP141	5'CCCTCCCTGACCTGTCTCGGCC3'
ENR161	5'GGGCTCCTCGGATACTCAAAA3'
Sonda sensora	H ₂ N-5'CCCTCCCTGACCTGTCTCGGCC3'

4.3 Síntese do nanocompósito de TiO₂@Pt

Para dispersar 100 mg de TiO₂, foram utilizados 40 mL de etanol. Em seguida, foram adicionados à suspensão 200 µL de APTES e 200 µL de MPTMS, juntamente com 2 mL de água e 2 mL de amônia, adicionados gradualmente. Após agitação contínua por 10 horas, as nanopartículas de TiO₂ foram funcionalizadas com grupos tiol e amino terminais. As partículas funcionalizadas foram coletadas por centrifugação extensiva e lavagem, e finalmente dispersas em 10 mL de água. Em seguida, 0,5 mL do TiO₂ previamente modificado foi misturado com 1 mL de PtNs (0,05 mg/mL). A mistura foi sonicada por 30 minutos e deixada por 12 horas à temperatura ambiente. O nanocompósito híbrido TiO₂@Pt foi obtido por centrifugação da mistura, que foi

dissolvida em 5 mL de água para formar uma suspensão cinza e estável (Wu et al., 2015).

4.4 Concepção da plataforma biossensora

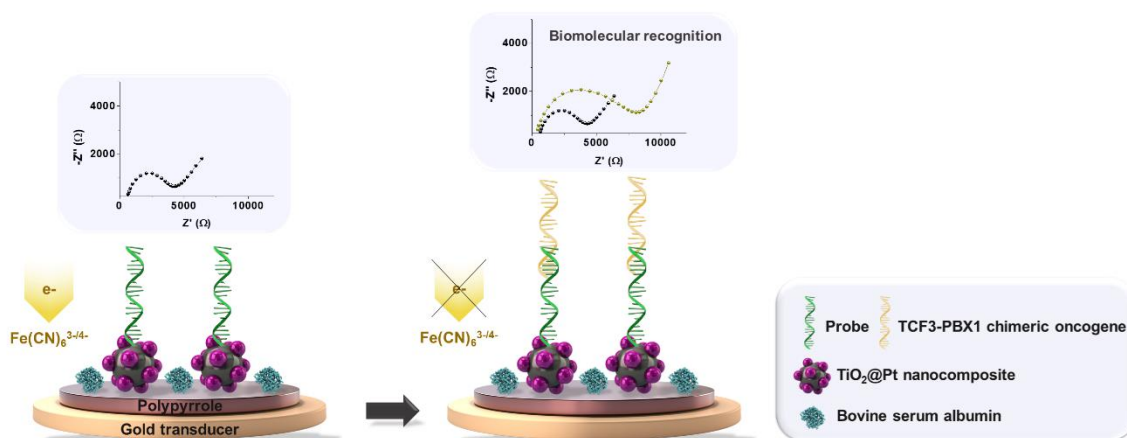
Inicialmente, o eletrodo de ouro foi polido com uma suspensão de alumina (Al_2O_3) com tamanho de partícula de 0,05 μm . Em seguida, foi lavado com água ultrapura, submetido a agitação ultrassônica por 10 minutos para eliminar partículas residuais e seco ao ar. A primeira etapa da plataforma de detecção envolveu a polimerização eletroquímica de PPy usando 20 mL de uma solução de HCl 0,5 M contendo 30 mM de monômero de pirrol. Foram realizados cinco ciclos voltamétricos no intervalo de potencial de -0,4 a +1,0 V a uma taxa de varredura de 100 mV/s.

A segunda etapa envolve a conjugação química do nanocompósito híbrido $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ no filme polimérico. Inicialmente, um agente de reticulação, glutaraldeído (volume = 2 μL), foi utilizado para ligar os grupos amino do PPy e os grupos amino do nanocompósito $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ por meio da formação de bases de Schiff. Em seguida, foi adicionada uma solução coloidal de 2 μL por 25 minutos para obter uma camada nanoestruturada auto-organizada.

A terceira etapa consiste na biofuncionalização da plataforma de interface PPy- $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ com sondas de DNA funcionalizadas com grupo amino terminal para identificar o oncogene quimérico TCF3-PBX1. A imobilização das sequências de oligonucleotídeos foi realizada adicionando 2 μL de glutaraldeído a 0,5% com um tempo de incubação de 10 minutos. Subsequentemente, foi aplicada uma solução de DNA de 2 μL com uma concentração de 25 pmol/ μL para imobilização biomolecular por 20 minutos.

Finalmente, a quarta etapa envolve o bloqueio dos sítios não específicos da camada do sensor com proteína BSA. Nesse passo, foram incorporados 2 μL de uma solução de BSA a 1% com pH de 7,4 na superfície do eletrodo para criar o sistema PPy- $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ -Probe-BSA (figura 13).

Figura 13 - Esquema da plataforma biossensora baseada em eletrodo de ouro funcionalizado com PPy-TiO₂@Pt para detecção do oncogene quimérico TCF3-PBX1.



Fonte: O autor (2024).

4.5 Estudos de detecção genética

A sensibilidade e a especificidade do biossensor eletroquímico foram avaliadas por meio de estudos de hibridização com plasmídeos recombinantes contendo o oncogene quimérico TCF3-PBX1 em várias concentrações, variando de 3,58 aM a 357,67 fM. Além disso, amostra clínica (amostra de cDNA) obtida de pacientes com leucemia linfoblástica aguda positiva para a translocação t(1;19) foi utilizada para triagem genética. O biossensor foi exposto a 2 µL da amostra por 15 minutos para o processo de biorreconhecimento. Para desnaturar o material genético antes do ensaio de biorreconhecimento, foi utilizada uma temperatura de 94°C. Diluições de todas as amostras biológicas foram realizadas utilizando solução salina tamponada com fosfato (PBS, 10 mM, pH 7,4) e armazenadas congeladas.

4.6 Medições eletroquímicas

As medições eletroanalíticas foram realizadas utilizando um Autolab PGSTAT 128 N em modo potenciostático (Metrohm Autolab Inc., Países Baixos), controlado pelo software NOVA 1.11. Foi empregada uma configuração de três eletrodos com

uma célula eletroquímica, e os eletrodos foram imersos em um eletrólito de suporte de PBS (10 mM, pH 7,4) contendo 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ (1:1, v/v). O eletrodo de trabalho foi um eletrodo de ouro nanobiomodificado ($\phi = 2$ mm), enquanto eletrodos de referência e contra foram Ag/AgCl saturado com 3 M KCl e fio de platina, respectivamente.

Voltamogramas cíclicos foram obtidos aplicando potenciais entre -0,2 e +0,7 V com uma taxa de varredura de 50 mV/s para caracterizar as propriedades interfaciais. Diagramas de Cole-Cole foram registrados em uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz com um potencial de 10 mV e um tempo de integração de 0,125 s. A análise eletroquímica foi realizada pelo menos três vezes de forma independente à temperatura ambiente dentro de uma caixa de Faraday.

4.7 Análises de AFM e UV-Vis

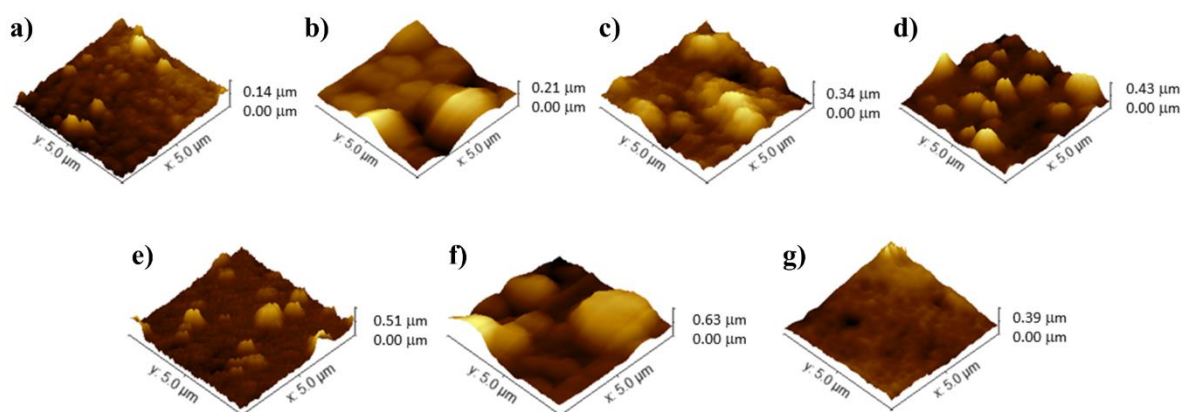
O microscópio de força atômica (SPM-9500; Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão) foi utilizado para a caracterização morfológica da construção do biossensor e suas interações com o oncogene TCF3-PBX1. O modo de contato não foi empregado, utilizando-se cantilêveres de AFM com uma sonda de silício revestida de alumínio (Nanoworld, Japão; frequência ressonante = 300 kHz; constante de força = 42 N/m) à temperatura ambiente. As micrografias topográficas (512 pontos por linha) foram coletadas em uma área de varredura de 5×5 μ m. As imagens 3D resultantes foram processadas e analisadas utilizando o software Gwyddion. Os espectros de absorbância foram coletados na faixa de 200 a 700 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (KASHI, modelo K37-UVVIS).

5 RESULTADOS

5.1 Análise topográfica

A técnica de AFM foi utilizada para monitorar as características da superfície do biossensor e investigar interações biomoleculares na presença do oncogene quimérico TCF3-PBX1 em amostras biológicas (figura 14).

Figura 14 - Análise da evolução topográfica do biossensor PPy-TiO₂@Pt durante a funcionalização e detecção do oncogene TCF3-PBX1, com base em parâmetros de rugosidade e altura máxima das superfícies.



Fonte: O autor (2024).

Durante as análises microscópicas, foram considerados parâmetros fundamentais, como a rugosidade média (R_a), a rugosidade quadrática média (R_q) e a altura máxima das irregularidades da superfície. A síntese potentiodinâmica do PPy resultou na formação de uma matriz polimérica com morfologia nodular, caracterizada por uma espessura média de 140 nm ($R_a = 14,48$ nm; $R_q = 18,66$ nm) (figura 14a). De acordo com a literatura, filmes finos de PPy eletropolimerizados apresentam uma topografia superficial semelhante a couve-flor, contribuindo para uma melhor permeação do eletrólito e condutividade elétrica (Zhu et al., 2020). O desenvolvimento dessas estruturas depende de fatores como os estados de oxidação-redução do polímero, concentração de pirrol, propriedades dos íons dopantes, espessura do filme polimérico e os parâmetros específicos de eletrossíntese aplicados (Zhu et al., 2020).

Após a conjugação química do nanocompósito híbrido, foi projetado um filme de PPy-TiO₂@Pt, apresentando estruturas esféricas proeminentes com altura máxima de até 210 nm ($R_a = 21,42$ nm; $R_q = 28,83$ nm) (figura 14b), indicando a bem-sucedida estruturação do nanomaterial. O aumento significativo na rugosidade e heterogeneidade da superfície, aliado a um acréscimo notável na altura máxima para 340 nm ($R_a = 58,91$ nm; $R_q = 75,65$ nm) após a imobilização covalente das sondas de DNA, evidencia a eficácia do processo de funcionalização. Isso resulta em uma alteração substancial na topografia do filme, sugerindo uma integração robusta das sequências de oligonucleotídeos no transdutor nanoestruturado, conforme ilustrado na figura 14c. A modificação do eletrodo, por meio da adição de moléculas de BSA para bloquear locais não funcionais do biossensor, foi evidenciada pela presença de picos e vales bem distribuídos e discerníveis, alcançando até 430 nm ($R_a = 72,99$ nm; $R_q = 87,80$ nm) (figura 14d).

A exposição do biossensor PPy-TiO₂@Pt-Probe-BSA ao oncogene TCF3-PBX1 resultou em um aumento significativo de aproximadamente 80 nm nas medições de rugosidade da superfície após a biodetecção na amostra de plasmídeo e 200 nm na amostra clínica de cDNA, atingindo alturas máximas respectivas de 510 nm ($R_a = 87,30$ nm; $R_q = 122,40$ nm) e 630 nm ($R_a = 121,50$ nm; $R_q = 168,30$ nm) (figura 14e e 14f). Notadamente, o ensaio de seletividade com sequências genéticas não complementares revelou uma morfologia não granular com picos máximos de 390 nm ($R_a = 77,13$ nm; $R_q = 83,40$ nm) (figura 14g). Esses resultados indicam a sensibilidade e seletividade do biossensor na detecção do distúrbio genômico, destacando seu potencial para aplicações clínicas no diagnóstico oncológico.

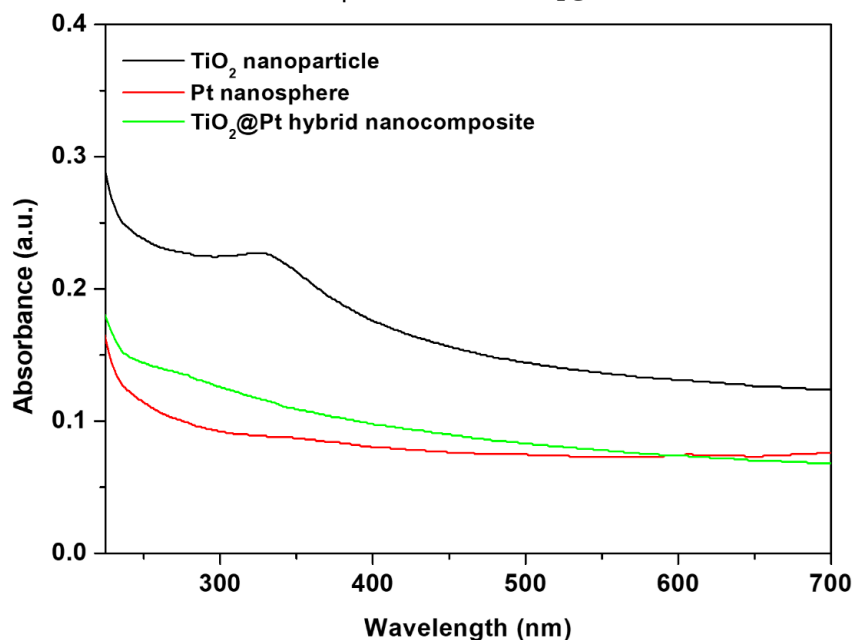
5.2 Caracterização Espectral por UV-Vis

A análise espectroscópica UV-Vis das nanopartículas de TiO₂ revelou a presença de ressonâncias plasmônicas de superfície, conforme ilustrado na figura 15. O espectro de absorção das nanopartículas de TiO₂ apresentou uma borda de absorção distinta em torno de 400 nm, atribuída às características de absorção do material relacionadas ao seu band gap. Notavelmente, as amostras de platina não exibiram propriedades significativas de absorção na região do visível.

Após a modificação superficial das nanopartículas de TiO₂ com APTES e MPTMS, seguida pela conjugação com nanoesferas de Pt, o nanocompósito híbrido TiO₂@Pt resultante demonstrou um deslocamento perceptível no comprimento de

onda de absorção. Esses resultados indicam a bem-sucedida preparação do material nanostruturado, evidenciada pelas alterações em suas propriedades de absorção.

Figura 15 - Espectro UV-Vis comparativo de nanopartículas de TiO_2 , nanoesferas de Pt e o nanocompósito híbrido $\text{TiO}_2@\text{Pt}$.

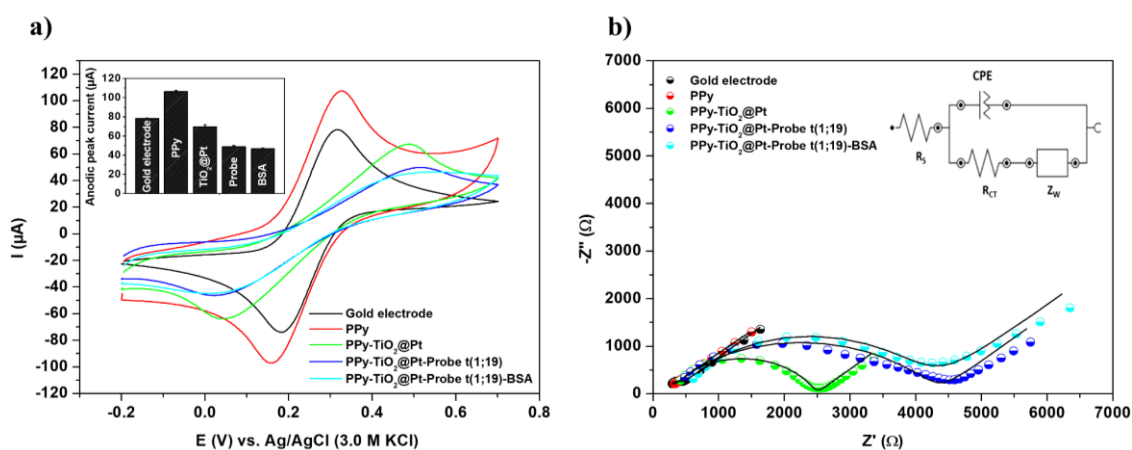


Fonte: O autor (2024).

5.3 Perfil eletroquímico da plataforma biossensora

A análise dos aspectos físico-químicos das etapas de preparação do biossensor de DNA é apresentada na figura 16.

Figura 16 – Análise eletroquímica do biossensor PPy- $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ nas etapas de funcionalização: voltametria cíclica (a) e espectroscopia de impedância eletroquímica (b).



Fonte: O próprio autor (2024).

Voltamogramas cíclicos em formato triangular fornecem informações sobre a corrente (I) em função do potencial (E) (figura 16a). A interpretação desses gráficos permite avaliar parâmetros importantes, como corrente de pico catódico (I_{pc}), potencial de pico catódico (E_{pc}), corrente de pico anódico (I_{pa}) e potencial de pico anódico (E_{pa}) (tabela 3). Esses indicadores são essenciais para compreender os processos de modificação superficial, taxa de transferência de carga, interações entre bioreceptores e analitos, reversibilidade de processos eletroquímicos e potenciais de oxidação-redução de espécies eletroativas (Avelino et al., 2022).

Tabela 3 – Correntes de pico anódica e catódica obtidas durante as etapas de construção do biossensor de DNA após exposição às amostras analíticas. Três análises consecutivas foram realizadas para cada procedimento metodológico, e os valores experimentais são apresentados como média $\pm$ desvio padrão

Eletrodo modificado	Concentração da amostra	Corrente de pico catódica (μA)	Corrente de pico anódica (μA)	ΔI (%)
Eletrodo de ouro	--	-76.24 $\pm$ 0.33	78.36 $\pm$ 0.16	--
PPy	--	-97.25 $\pm$ 2.75	106.30 $\pm$ 1.11	--
PPy-TiO ₂ @Pt	--	-64.45 $\pm$ 0.60	69.58 $\pm$ 1.98	--
PPy-TiO ₂ @Pt-Sonda	--	-45.94 $\pm$ 0.43	48.75 $\pm$ 1.26	--
PPy-TiO ₂ @Pt-Sonda-BSA	--	-46.12 $\pm$ 1.19	46.90 $\pm$ 0.45	--
Ensaio de sensibilidade (plasmídeo recombinante)				
Biossensor	--	-46.12 $\pm$ 1.19	46.90 $\pm$ 0.45	--
Biossensor-Oncogene t(1;19)	35.77 aM	-32.78 $\pm$ 1.47	46.43 $\pm$ 0.71	1.04 $\pm$ 1.55
Biossensor-Oncogene t(1;19)	357.67 aM	-29.23 $\pm$ 2.30	42.49 $\pm$ 0.26	10.39 $\pm$ 0.68
Biossensor-Oncogene t(1;19)	3.58 fM	-24.45 $\pm$ 1.73	40.16 $\pm$ 0.10	16.79 $\pm$ 0.28
Biossensor-Oncogene t(1;19)	35.77 fM	-23.47 $\pm$ 2.63	35.74 $\pm$ 0.11	31.24 $\pm$ 0.40
Biossensor-Oncogene t(1;19)	357.67 fM	-18.45 $\pm$ 3.00	29.64 $\pm$ 0.29	58.27 $\pm$ 1.57
Ensaio de sensibilidade (amostra de paciente com LLA)				
Biossensor-Clinical Amostra t(1;19)	1 ag/ μ L	-19.96 $\pm$ 0.83	35.24 $\pm$ 0.08	33.08 $\pm$ 0.28
Biossensor-Clinical Amostra t(1;19)	10 ag/ μ L	-16.10 $\pm$ 0.99	26.06 $\pm$ 1.63	80.47 $\pm$ 11.64
Biossensor-Clinical Amostra t(1;19)	100 ag/ μ L	-13.86 $\pm$ 0.61	23.26 $\pm$ 1.29	102.10 $\pm$ 11.40
Biossensor-Clinical Amostra t(1;19)	1 fg/ μ L	-12.79 $\pm$ 0.44	22.32 $\pm$ 1.21	110.56 $\pm$ 11.65
Biossensor-Clinical Amostra t(1;19)	10 fg/ μ L	-12.71 $\pm$ 0.58	21.67 $\pm$ 1.68	117.29 $\pm$ 17.35

Biossensor-Clinical Amostra	100 fg/ μ L	-12.49 $\pm$ 0.39	20.93 $\pm$ 1.55	124.91 $\pm$ 17.08
t(1;19)				

Adicionalmente, as respostas de impedância foram analisadas por meio de ajustes a uma simulação teórica dos dados experimentais, utilizando o circuito equivalente de Randles (inserção da figura 16b). Os componentes do circuito incluíram a resistência ôhmica da solução (R_s), a impedância de Warburg (ZW), relacionada ao transporte de massa da sonda redox da solução para a dupla camada elétrica, um elemento de fase constante (CPE), que reflete características não ideais da interface elétrica devido a heterogeneidades de superfície, e a resistência de transferência de carga (R_{CT}), influenciada pelas mudanças na concentração dos analitos-alvo. Os valores desses componentes, obtidos a partir do ajuste de impedância, estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Valores dos elementos do circuito equivalente obtidos por meio do ajuste dos resultados de impedância para cada etapa da montagem do biodispositivo. Três análises consecutivas foram realizadas para cada procedimento metodológico, e os valores experimentais são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Eletrodo modificado	Concentra- ção da amostra	R_{CT} (kΩ)	ΔR_{CT} (%)	Θ (%)
Eletrodo de ouro	--	0.45 $\pm$ 0.004	--	--
PPy	--	-38.25 $\pm$ 1.48	--	--
PPy-TiO ₂ @Pt	--	2.28 $\pm$ 0.04	--	--
PPy-TiO ₂ @Pt-Sonda	--	4.19 $\pm$ 0.07	--	--
PPy-TiO ₂ @Pt-Sonda-BSA	--	4.21 $\pm$ 0.01	--	--
Ensaio de sensibilidade (Plasmídeo recombinante)				
Biossensor	--	4.21 $\pm$ 0.01	--	--
Biossensor-Oncogene t(1;19)	3.58 aM	4.56 $\pm$ 0.11	8.10 $\pm$ 2.70	7.46 $\pm$ 2.33
Biossensor-Oncogene t(1;19)	35.77 aM	5.15 $\pm$ 0.04	22.18 $\pm$ 1.09	18.15 $\pm$ 0.73
Biossensor-Oncogene t(1;19)	357.67 aM	5.98 $\pm$ 0.01	41.95 $\pm$ 0.14	29.55 $\pm$ 0.07
Biossensor-Oncogene t(1;19)	3.58 fM	6.58 $\pm$ 0.02	56.11 $\pm$ 0.41	35.94 $\pm$ 0.17
Biossensor-Oncogene t(1;19)	35.77 fM	7.31 $\pm$ 0.17	73.35 $\pm$ 4.04	42.29 $\pm$ 1.35
Biossensor-Oncogene t(1;19)	357.67 fM	8.22 $\pm$ 0.37	95.14 $\pm$ 8.89	48.70 $\pm$ 2.34
Ensaio de sensibilidade (Espécime de paciente com LLA)				

Biossensor-Clinical amostra t(1;19)	1 ag/ μ L	5.05 $\pm$ 0.04	19.73 $\pm$ 0.96	16.48 $\pm$ 0.67
Biossensor-Clinical amostra t(1;19)	10 ag/ μ L	6.07 $\pm$ 0.20	43.93 $\pm$ 4.80	30.47 $\pm$ 2.36
Biossensor-Clinical amostra t(1;19)	100 ag/ μ L	6.45 $\pm$ 0.03	53.10 $\pm$ 0.83	34.68 $\pm$ 0.36
Biossensor-Clinical amostra t(1;19)	1 fg/ μ L	7.07 $\pm$ 0.07	67.73 $\pm$ 1.68	40.38 $\pm$ 0.60
Biossensor-Clinical amostra t(1;19)	10 fg/ μ L	7.52 $\pm$ 0.08	78.33 $\pm$ 1.84	43.92 $\pm$ 0.58
Biossensor-Clinical amostra t(1;19)	100 fg/ μ L	7.73 $\pm$ 0.03	83.51 $\pm$ 0.84	45.51 $\pm$ 0.25
Ensaio de especificidade				
Biossensor-Oncogene t(4;11)	355.19 fM	4.38 $\pm$ 0.09	3.91 $\pm$ 2.13	3.74 $\pm$ 1.98
Biossensor-Oncogene t(17;19)	374.62 fM	4.53 $\pm$ 0.08	7.39 $\pm$ 1.99	6.86 $\pm$ 1.74
Biossensor-Clinical amostra t(4;11)	100 fg/ μ L	4.21 $\pm$ 0.03	-0.12 $\pm$ 0.63	-0.12 $\pm$ 0.63
Biossensor-Clinical amostra t(17;19)	100 fg/ μ L	4.09 $\pm$ 0.08	-2.96 $\pm$ 1.94	-3.08 $\pm$ 2.08
Ensaio de interferência analítica				
Biossensor-Glicina	100 mg/dL	4.08 $\pm$ 0.04	-3.12 $\pm$ 0.90	-3.23 $\pm$ 0.96
Biossensor-Glicose	100 mg/dL	4.29 $\pm$ 0.08	1.86 $\pm$ 2.02	1.79 $\pm$ 1.94
Biossensor-Ácido ascórbico	100 mg/dL	4.09 $\pm$ 0.07	-2.89 $\pm$ 1.78	-2.99 $\pm$ 1.89
Biossensor-Colesterol	100 mg/dL	4.26 $\pm$ 0.12	1.19 $\pm$ 2.85	1.13 $\pm$ 2.79

Na figura 16a, o eletrodo de ouro não modificado exibiu picos anódicos e catódicos simétricos e bem definidos, com valores de corrente de pico de $I_{pa} = 78,36 \pm 0,16 \mu A$ e $I_{pc} = -76,24 \pm 0,33 \mu A$, respectivamente. O espectro de impedância (figura 16b) demonstrou uma resposta quase linear, caracterizada por uma baixa resistência de transferência de carga ($R_{CT} = 0,45 \pm 0,004 k\Omega$). Esses resultados indicam que as reações de oxidação e redução dos componentes eletrolíticos no eletrodo de ouro não modificado foram limitadas por cinéticas de transporte por difusão (Polli et al., 2023).

A eletropolimerização do monômero de pirrol resultou em um aumento no sinal voltamétrico. As correntes de oxidação ($I_{pa} = 106,30 \pm 1,11 \mu A$) e redução ($I_{pc} = -97,25 \pm 2,75 \mu A$) aumentaram devido à transferência eletrônica mediada pelo PPy. A redução na resistência eletroquímica de $0,45 \pm 0,004 k\Omega$ (no eletrodo de ouro) para $-38,25 \pm 1,48 k\Omega$ (no eletrodo de ouro modificado com PPy) confirmou a presença do filme condutor na superfície metálica. Esses achados indicam que o polímero PPy

melhora a eficiência de transferência de carga em dispositivos bioanalíticos, promovendo estabilidade química, sensibilidade e seletividade (Kavitha et al., 2022).

Após a estruturação molecular do nanocompósito PPy-TiO₂@Pt sobre a matriz polimérica, observou-se uma redução na área voltamétrica ($I_{pa} = 69,58 \pm 1,98 \mu A$ e $I_{pc} = -64,45 \pm 0,60 \mu A$) e uma diminuição na transferência de carga na dupla camada elétrica ($R_{CT} = 2,28 \pm 0,04 k\Omega$). A incorporação do nanomaterial híbrido no polímero PPy aumentou significativamente a área superficial, introduziu grupos amino (-NH₂) para imobilização covalente de oligonucleotídeos e estabeleceu um microambiente biocompatível crucial para preservar a conformação tridimensional das biomoléculas imobilizadas (Yu et al., 2019).

Após a imobilização química das sondas de DNA no transdutor nanoestruturado PPy-TiO₂@Pt, observou-se uma resposta voltamétrica reduzida ($I_{pa} = 48,75 \pm 1,26 \mu A$; $I_{pc} = -45,94 \pm 0,43$) e um aumento na resistência interfacial ($R_{CT} = 4,19 \pm 0,07 k\Omega$). Este fenômeno é atribuído à menor acessibilidade da sonda redox no sistema sensorial, devido à repulsão eletrostática entre os grupos fosfato das sondas de DNA e as cargas negativas dos íons [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻. Isso leva a um bloqueio parcial das reações de oxidação-redução próximas à superfície do eletrodo biomodificado (Meng et al., 2024). Conforme esperado, a introdução de moléculas de BSA para bloquear locais de ligação inespecíficos no biossensor resultou em uma diminuição nas correntes voltamétricas ($I_{pa} = 46,90 \pm 0,45 \mu A$; $I_{pc} = -46,12 \pm 1,19$) e um aumento na impedância eletroquímica ($R_{CT} = 4,21 \pm 0,01 k\Omega$) (Manzano et al., 2018).

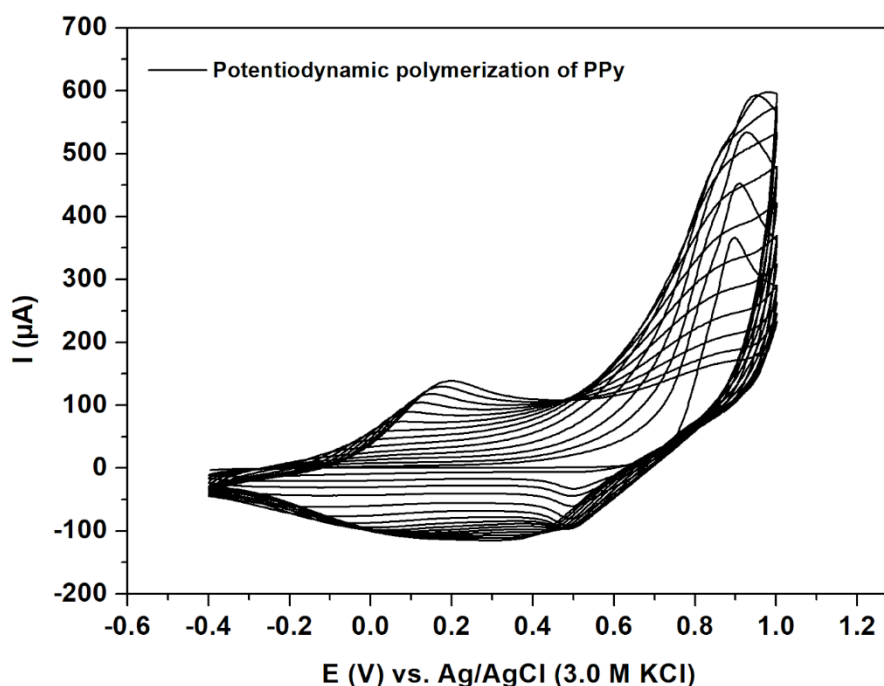
5.4 Otimização das variáveis experimentais

5.4.1 Eletrodeposição de filmes de polipirrol

A figura 17 apresenta os dados voltamétricos obtidos durante a polimerização potenciodinâmica do pirrol. Ao longo de 15 ciclos de polimerização, as características eletroquímicas da superfície do eletrodo foram avaliadas, revelando uma redução na corrente anódica após o 5º ciclo de varredura. Essa observação está de acordo com investigações anteriores e é atribuída ao aumento da resistência da camada de polímero condutor, à diminuição da capacitância da dupla camada elétrica e à redução dos monômeros de pirrol consumidos durante a síntese (Avelino et al., 2021; Mahmoudian et al., 2011). Consequentemente, para obter um revestimento polimérico

reprodutível com resposta de condutividade máxima e espessura controlada, cinco ciclos de eletropolimerização foram considerados ideais.

Figura 17 – Voltamogramas cíclicos da polimerização eletroquímica do pirrol em 15 ciclos: formação e estabilização do filme condutor de polipirrol (PPy).



Fonte: O autor (2024).

5.4.2 Estudo da conjugação química do nanocompósito $\text{TiO}_2@\text{Pt}$

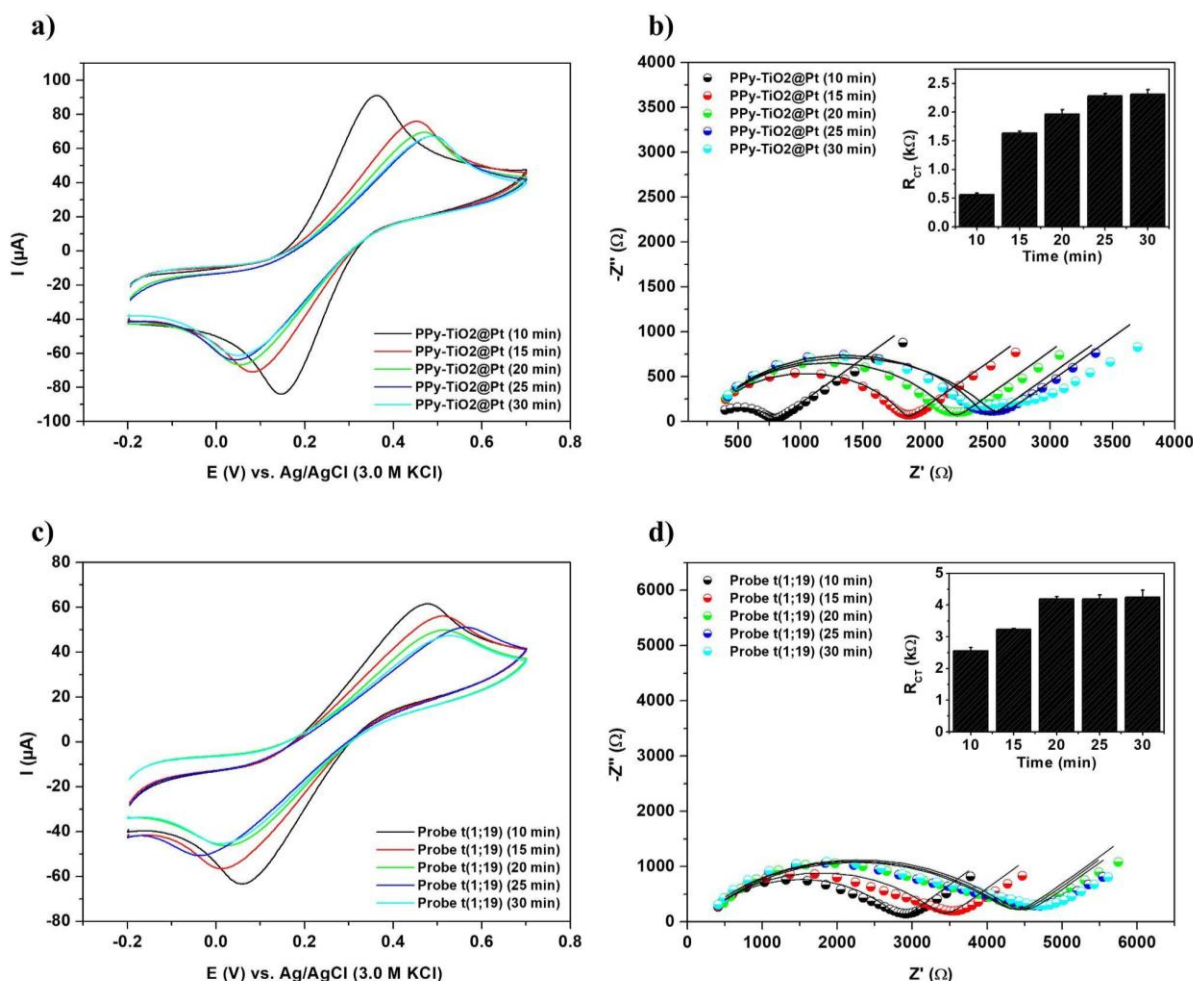
A investigação analisou a camada de nanocompósito híbrido $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ auto-organizada sobre o eletrodo de ouro previamente modificado com PPy, utilizando diferentes tempos de adsorção (10, 15, 20, 25 e 30 minutos). Com o aumento do tempo de adsorção, as curvas voltamétricas tornaram-se mais sigmóides, exibindo uma diminuição nas correntes anódicas e catódicas (figura 18a).

Conforme mostrado na figura 18b, o diâmetro do espectro de impedância aumentou proporcionalmente ao tempo de adsorção. Esses resultados sugerem que a duração da incubação influencia a quantidade de nanomaterial depositada no transdutor, resultando em uma mudança correspondente no sinal de resistência.

No entanto, por meio da análise de R_{CT} (inserção da figura 18b), foi determinado que um período de incubação de 25 minutos leva à saturação do eletrodo, com um bloqueio moderado das reações redox ocorrendo na dupla camada

elétrica. Consequentemente, o tempo de 25 minutos demonstrou cinética de adsorção ideal para o arranjo molecular do nanocompósito $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ no filme polimérico.

Figura 18 – Avaliação eletroquímica dos tempos de adsorção do nanocompósito $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ e de imobilização de oligonucleotídeos sobre a superfície do biossensor $\text{PPy-TiO}_2@\text{Pt}$.



Fonte: O autor (2024).

5.4.3 Estudo da conjugação química das sequências de oligonucleotídeos

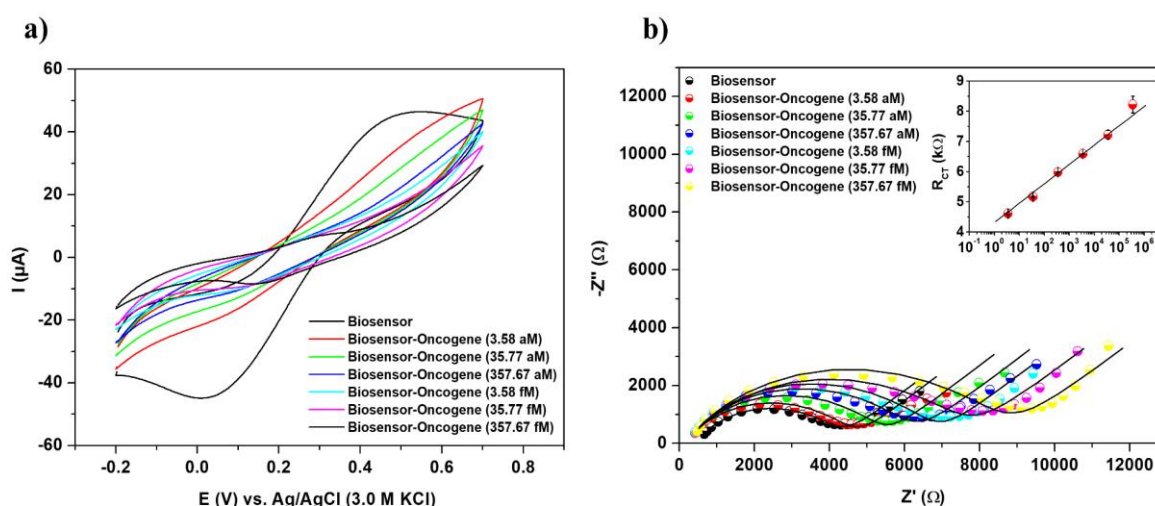
O exame do impacto do tempo de ancoragem covalente das sequências de oligonucleotídeos no transdutor nanoestruturado $\text{PPy-TiO}_2@\text{Pt}$ (em intervalos de 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) demonstrou que o tempo de incubação mais eficiente foi observado em 20 minutos. Constatou-se que, entre 10 e 20 minutos, houve uma diminuição gradual nos picos redox e um aumento no valor de R_{CT} (variando de $2,56 \pm 0,11 \text{ k}\Omega$ para $4,19 \pm 0,07 \text{ k}\Omega$). No entanto, intervalos de tempo mais longos não resultaram em alterações significativas nas respostas eletroquímicas, conforme

ilustrado nas figuras 18c e 18d, sugerindo uma densidade relativamente constante de sondas de DNA imobilizadas.

5.5 Desempenho analítico da plataforma sensora

O desempenho analítico do biossensor foi avaliado utilizando diversas concentrações de plasmídeos recombinantes contendo o oncogene quimérico TCF3-PBX1, variando de 3,58 aM a 357,67 fM (figura 19).

Figura 19 – Avaliação do desempenho analítico do biossensor PPy-TiO₂@Pt na detecção do oncogene quimérico TCF3-PBX1: respostas voltamétricas (a) e espectros de impedância eletroquímica com curva de calibração (b).



Fonte: O próprio autor (2024).

Observou-se uma redução no sinal voltamétrico, marcada pela diminuição das alturas dos picos anódicos e catódicos, ao expor o sistema PPy-TiO₂@Pt-Probe-BSA a amostras de DNA sintético (figura 19a). A diminuição nos valores de corrente, proporcional ao aumento da concentração de conjugados de DNA na interface do transdutor, foi atribuída à formação de uma barreira biomolecular ao transporte eletrônico. Esse fenômeno eletroquímico indica o reconhecimento bioquímico caracterizado pela hibridização de cadeias de DNA, levando ao aumento da repulsão eletrostática entre os íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e os grupos fosfato carregados negativamente das moléculas do oncogene (Shamsipur et al., 2020).

Para compreender a sensibilidade do biossensor em relação à faixa de concentrações testada, foi utilizada a fórmula matemática para o desvio relativo da variação da corrente anódica (ΔI):

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

Equação 5

Nesta equação, I_b e I_a representam a corrente de pico anódica antes e após a captura do oncogene, respectivamente. Notavelmente, com o aumento da concentração de DNA sintético, os valores de ΔI demonstraram um aumento linear, culminando em uma variação máxima de 58,27%, observada após o ensaio de biodeteção realizado com uma amostra de plasmídeo de 357,67 fM (tabela 3).

Os resultados do ensaio de sensibilidade, focados na análise do diagrama de Cole-Cole ($Z'/\Omega \times Z''/\Omega$), oferecem uma representação visual abrangente das mudanças na impedância elétrica do sistema em resposta às diferentes concentrações do oncogene quimérico TCF3-PBX1 (figura 19b). A análise dos valores de R_{CT} revelou uma correlação progressiva com as concentrações testadas, evidenciando um aumento de R_{CT} de $4,56 \pm 0,11 \text{ k}\Omega$ para $8,22 \pm 0,37 \text{ k}\Omega$ à medida que as concentrações de DNA sintético aumentavam (tabela 4). Este aumento significativo dos valores de R_{CT} ao longo do gradiente de concentração demonstra a capacidade do biossensor de discernir e responder a variações nos níveis do analito.

Com base na sensibilidade dos valores de R_{CT} , esse parâmetro eletroquímico foi utilizado para gerar o gráfico de calibração analítica (inserção da figura 19b). A equação de ajuste linear, $y = 4.31587 + 0.64008 \cdot \ln(x)$, apresentou um elevado coeficiente de determinação (R^2) de 0.99752. Nesta equação, os valores de y representam R_{CT} , e os valores de x correspondem à concentração (em attomoles, aM) das amostras examinadas. O biossensor exibiu uma faixa de medição de 3,58 aM a 357,67 fM, acompanhado por um desvio padrão (SD) of 4.12 (S/N = 3). O ensaio analítico alcançou um limite de detecção de 0,41 aM, um limite de quantificação de 1,24 aM, e demonstrou uma sensibilidade de $20,37 \text{ k}\Omega/\text{aM cm}^2$.

O biossensor apresentou uma reprodutibilidade satisfatória, evidenciada por um desvio padrão relativo de 3,66%. A avaliação da reprodutibilidade foi realizada calculando o valor percentual do desvio padrão a partir de três biossensores distintos,

todos fabricados sob condições metodológicas e experimentais idênticas no mesmo dia. A repetibilidade foi confirmada por desvios padrão relativos inferiores a 4,54% em todos os testes envolvendo concentrações variáveis do oncogene, com cada dispositivo sensor sendo submetido a, no mínimo, três testes no mesmo dia.

A Tabela 5 apresenta uma análise comparativa do biossensor desenvolvido neste estudo com outras tecnologias de detecção biológica relatadas na literatura para investigação eletroquímica de marcadores genéticos relacionados à leucemia. Os dispositivos de DNA eletroquímicos têm avançado significativamente nos últimos anos, empregando estratégias como o uso de intercaladores (exemplo, azul de metileno, peroxidase de rábano e moléculas biotiniladas) e nanomateriais (ex.: nanopartículas de ouro, grafeno e óxido de zinco revestido com sílica) para melhorar a sensibilidade e a estabilidade.

Embora intercaladores possam causar danos às moléculas de oligonucleotídeos e gerar interações inespecíficas, os biossensores *label-free*, como o proposto neste estudo, eliminam a necessidade de marcadores ou indicadores, permitindo detecção direta e em tempo real com alta sensibilidade e velocidade analítica (Hai et al., 2020). Este avanço reduz a complexidade e o custo do processo de fabricação, enquanto melhora o desempenho analítico.

A integração do nanocompósito $\text{TiO}_2@\text{Pt}$ em um filme condutor de PPy possibilitou o desenvolvimento do primeiro biossensor nanostruturado documentado na literatura científica para detectar o oncogene quimérico TCF3-PBX1. Esta ferramenta bioanalítica, utilizando volumes mínimos de espécimes biológicos (2 μL), demonstrou o menor limite de detecção registrado para translocações leucêmicas, alcançando a escala atomolar. Além disso, exibe limites notáveis de quantificação, alta sensibilidade e especificidade, parâmetros essenciais para avaliação precoce de distúrbios malignos e monitoramento de doenças residuais mínimas.

Tabela 5 – Análise comparativa do biossensor desenvolvido neste estudo em relação a outras tecnologias de detecção biológica documentadas na literatura para a investigação eletroquímica de biomarcadores genéticos da leucemia.

Estratégia de detecção	Alvo molecular	Técnica analítica	Marcador de Gybridizaçã o	Tempo de detecçã o	Faixa de detecçã o	Limite de detecçã o	Limite de quantificaçã o	Sensibilidad e	Referência
Transdutor de ouro / PPy / TiO ₂ @Pt / Sonda / BSA	Oncogene quimérico TCF3-PBX1	VC e EIE	Sem marcador	15 min	3.58 aM para 357.67 fM	0.41 aM	1.24 aM	20.37 kΩ/aM cm ²	Este trabalho
ITO* / PPy / Grefeno quantum dots / Sonda ^{APLB}	PML/RARα fusion gene	VC e EIE	Sem marcador	15 min	1 pM para 100 pM	0.214 pM para sequên- cia APLB	0.648 pM para sequência APLB	--	OLIVEIRA et al., 2023
ITO* / PPy / Grafeno quantum dots / Sonda ^{M7}						0.677 pM para sequên- cia M7	2.05 pM para sequência M7		
Transdutor de ouro / PPy / Nanocompósit o de quitosana e nanopartículas de óxido de zinco / Sonda / BSA	Gene de fusão BCR/ABL	VC e EIE	Sem marcador	15 min	138.80 aM para 13.88 pM	1.34 fM	4.08 fM	34.03 μA/fM cm ²	AVELINO et al., 2022
Eletrodo de carbono vítreo / Nanopartícula s de ouro / Nanoclusters de ouro estabilizados e	Gene de fusão BCR/ABL	VC, EIE e DVP	Azul de metileno	30 min	0.1 aM para 10 pM	0.03 fM	--	--	SHAMSIPUR et al., 2020

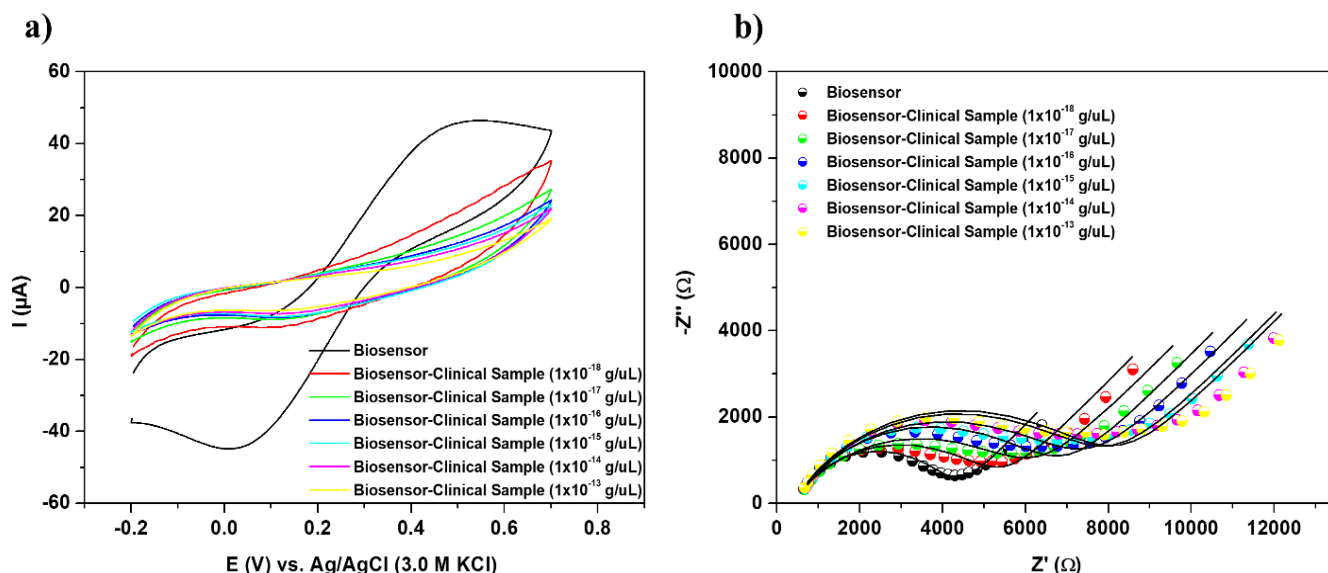
revestidos com hemoglobina graphene nanosheets / Probe									
Eletrodo de carbono vítreo magnético / Microesferas magnéticas de DNA ligadas a enzimas	BCR/ABLp21 0 fusion gene	Amperometri a	Peroxidase Horseradish	--	Duas relações lineares: 1 aM para 50 fM 1 fM para 1 pM	1 aM	--	--	YANG et al., 2024
Eletrodo de carbono vítreo / Óxido de grafeno reduzido / Nanopartícula s de ouro	MicroRNA- 128	VC, EIE e SWV	Azul de metileno	40 min	0.01 fM para 0.09 fM	0.00956 fM	--	--	MOHAMMADNEJA D et al., 2023

*ITO: Óxido de Índio e Estanho
*SWV: Voltametria de onda quadrada
*DPV: Voltametria de pulso diferencial

Fonte: O autor (2024)

5.6 Triagem eletroquímica em amostra biológica

Figura 20 – Respostas voltamétricas (a) e espectros de impedância eletroquímica (b) do biossensor



PPy-TiO₂@Pt na detecção de cDNA clínico com o oncogene TCF3-PBX1 em diferentes concentrações.

Os testes de detecção biomolecular foram realizados utilizando amostras de cDNA obtidas de pacientes (crianças) diagnosticados com LLA para avaliar a robustez das medições genéticas. Foram observadas respostas de corrente reduzidas, conforme ilustrado na Fig. 20a, após o biossensor interagir com as amostras biológicas. Essas amostras positivas, que expressam o oncogene quimérico TCF3-PBX1 em concentrações variando de 1 ag/ μ L a 100 fg/ μ L, induziram variações significativas no sinal e voltamogramas sigmóides, com valores de ΔI variando de 33,08% $\pm$ 0,28 a 124,91% $\pm$ 17,08, respectivamente (tabela 4). As discrepâncias nas amplitudes dos sinais eletroanalíticos podem ser atribuídas a variações nos níveis de expressão da translocação cromossômica t(1;19)(q23;p13) e, conseqüentemente, à progressão do câncer de células sanguíneas (Avelino et al. 2022). Esses achados comprovam a viabilidade e eficácia do aparato nanotecnológico para triagem genética em amostras clínicas de cDNA.

A Fig. 20b mostra que a captura de sequências oncogênicas na superfície do biossensor resulta em um aumento gradual dos semicírculos de Nyquist, o que

correlaciona com a concentração molecular do alvo. Esse comportamento revela uma redução no fluxo de carga na dupla camada elétrica, atribuída às propriedades isolantes das estruturas de DNA hibridizadas. Dada a excelente adequação do componente R_{CT} para monitorar o fenômeno de biossensoriamento, o desempenho analítico do biossensor foi caracterizado pela variação relativa do R_{CT} (ΔR_{CT}) da seguinte forma:

$$\Delta R_{CT} = \frac{R_{CT(Biosensor-oncogene)} - R_{CT(Biosensor)}}{R_{CT(Biosensor)}} \times 100$$

Equação 6

O termo $R_{CT(Biosensor-oncogene)}$ representa o valor computado após o reconhecimento do oncogene TCF3-PBX1, enquanto $R_{CT(Biosensor)}$ representa a resposta inicial do biossensor PPy-TiO₂@Pt-Probe-BSA (Tabela 4). Amostras positivas para LLA exibiram mudanças significativas na impedância, indicadas pela variação relativa ΔR_{CT} , variando de $19.73\% \pm 0.96$ para $83.51\% \pm 0.84$.

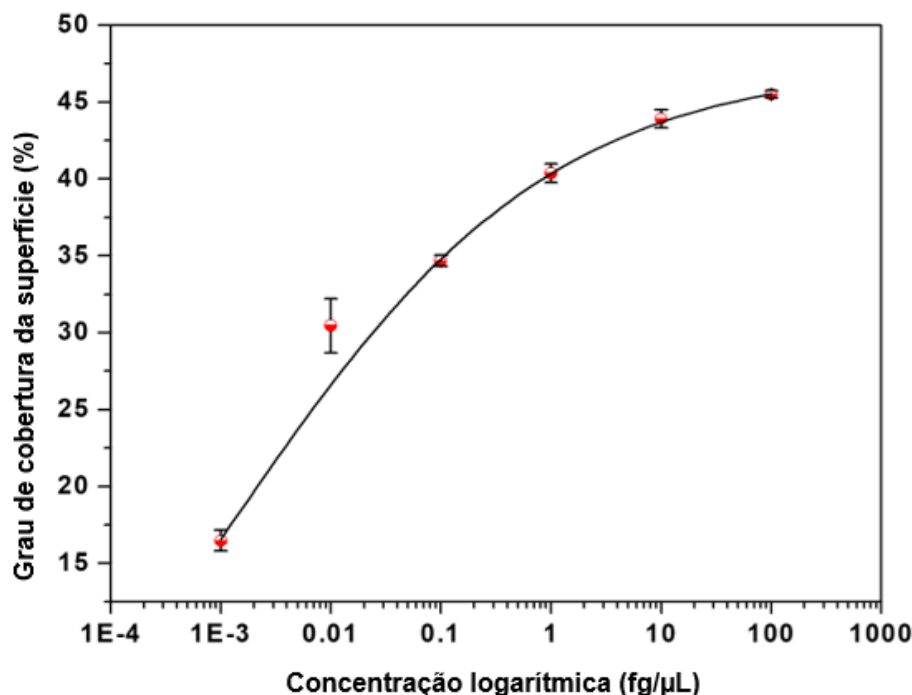
O grau de cobertura superficial (θ) foi empregado como um parâmetro adicional para avaliação diagnóstica. Os valores de θ foram determinados após a interação da plataforma de biodeteção com amostras clínicas de cDNA, utilizando a seguinte equação:

$$(\%) = 1 - \frac{R_{CT(Biosensor)}}{R_{CT(Biosensor-oncogene)}} \times 1$$

Equação 7

$R_{CT(Biosensor)}$ representa o valor de R_{CT} do biossensor PPy-TiO₂@Pt-Probe-BSA. Por outro lado, $R_{CT(Biosensor-oncogene)}$ denota o valor correspondente do biossensor quando exposto a amostras clínicas. A cobertura da superfície está diretamente relacionada à quantidade de DNA oncogênico hibridizado com uma sonda de oligonucleotídeo na plataforma analítica. A presença de ácidos nucleicos hibridizados na camada sensora nanoestruturada resulta em um aumento no grau de cobertura da superfície. Valores distintos de θ foram calculados para várias concentrações de amostras de pacientes, variando de 1 ag/μL a 100 fg/μL. Os valores obtidos variaram de $16,48\% \pm 0,67$ a $45,51\% \pm 0,25$, correspondendo às respectivas concentrações das amostras.

Figura 21 – Curva logarítmica de saturação do grau de recobrimento superficial do biossensor em função da concentração de DNA-alvo.



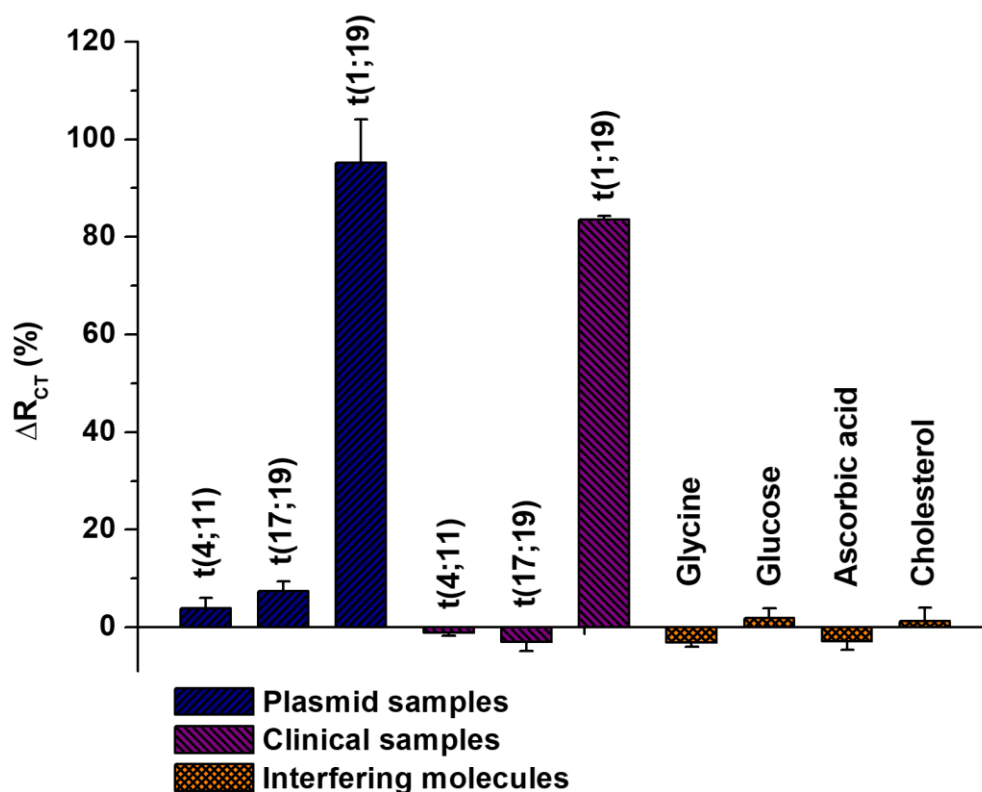
Fonte: O autor (2024).

Com base nas informações apresentadas na figura 21, que mostra uma curva logarítmica com tendência à saturação, sugere-se que concentrações acima de 100 fg/μL podem levar à saturação dos sítios de ligação na superfície do biossensor. Nesse contexto, foi demonstrada a capacidade do biossensor de realizar ensaios para identificação de DNA-alvo em amostras clínicas.

5.7 Estudo de interferentes biológicos

No presente estudo, investigamos a aplicabilidade do biodispositivo eletroquímico em um ensaio de especificidade, utilizando amostras de plasmídeos recombinantes e espécimes clínicos contendo translocações cromossômicas não específicas, como t(4;11) e t(17;19) (figura 22).

Figura 22 – Especificidade do biossensor PPy-TiO₂@Pt na detecção da translocação cromossômica t(1;19).



Fonte: O autor (2024).

É importante destacar que esses espécimes clínicos são amostras de cDNA que, além das translocações t(4;11) e t(17;19), contêm o material genético constitutivo do paciente, o que também pode interferir nos resultados bioanalíticos. Os resultados revelaram que o biossensor apresentou valores de ΔR_{CT} (%) não significativos, variando de $-2,96\% \pm 1,94$ a $7,39\% \pm 1,99$, conforme detalhado na tabela 4. Esse intervalo de valores indica a capacidade do biossensor de distinguir eficazmente amostras na ausência do analito alvo.

Além disso, valores não significativos de ΔR_{CT} foram observados quando o sistema de biossensoriamento foi exposto a amostras contendo interferentes comuns do sangue, como glicose, glicina, colesterol e ácido ascórbico, mesmo em concentrações de até 100 mg/dL (Tabela 3). Esses achados sugerem que interferentes biológicos não comprometem a funcionalidade do biossensor, melhorando, assim, a confiabilidade do método para aplicações práticas. Em contraste, observamos uma sensibilidade pronunciada do sistema biomolecular quando exposto a amostras de plasmídeos recombinantes ($\Delta R_{CT} = 95,14\% \pm 8,89$) e

a espécimes clínicos contendo a translocação cromossômica t(1;19) ($\Delta RCT = 83,51\% \pm 0,84$). Esses resultados destacam a capacidade do biossensor de detectar especificamente a translocação cromossômica t(1;19).

6 DISCUSSÃO

A tabela 5 apresenta uma análise comparativa do biossensor proposto em relação a outras tecnologias de detecção biológica relatadas na literatura para a investigação eletroquímica de biomarcadores genéticos associados à leucemia. Avanços recentes em biossensores eletroquímicos de DNA para detectar translocações leucêmicas têm demonstrado progressos significativos. Diversas estratégias têm sido empregadas para melhorar a estabilidade, reduzir os custos e simplificar o processo de preparação. Por exemplo, intercalantes como azul de metileno (Mohammadnejad et al. 2023), peroxidase de rábano (Yang et al. 2024) e fosfatase alcalina marcada com estreptavidina (Chen et al. 2015) foram utilizados como marcadores redox ou indicadores no processo de biossensoriamento para detectar eventos de hibridização.

Biossensores sem marcadores emergiram como uma alternativa promissora, considerando que os intercalantes podem danificar as moléculas de oligonucleotídeos. Os intercalantes podem comprometer a integridade e estabilidade dos oligonucleotídeos e também causar interações não específicas significativas com moléculas biológicas, levando a falsos positivos e, conseqüentemente, interferindo na detecção de alvos específicos. Dispositivos sem marcadores eliminam a necessidade de anexar marcadores ou indicadores separados das moléculas-alvo, permitindo uma detecção direta, em tempo real, com alta sensibilidade e análise rápida. Além disso, a adoção de biossensores sem marcadores reduz a complexidade e o custo do processo de fabricação (Hai et al. 2020).

Outro avanço envolve a otimização da imobilização de sequências de oligonucleotídeos em superfícies de eletrodos para melhorar a eficiência da hibridização. Elementos nanotecnológicos e materiais funcionais são comumente utilizados na arquitetura de plataformas de interface biológica como estratégia. Esses materiais incluem PPy (Oliveira et al. 2023), polianilina (Chen et al. 2015), nanotubos de polianilina (Soni et al. 2018), folhas de grafeno (Chen et al. 2015), nanopartículas

de ouro (Ensafi et al. 2011), nanoclusters de ouro (Shamsipur et al. 2020), nanopartículas de óxido de zinco revestidas com sílica (Pandey et al. 2016), nanocompósitos de quitosana e nanopartículas de óxido de zinco (Avelino et al. 2022) e nanoestruturas híbridas de polianilina-MoS₂ (Soni et al. 2019). Entretanto, biossensores eletroquímicos baseados em nanocompósitos metal-óxido metálico são destacados por sua capacidade de atingir limites de detecção abaixo da faixa femtomolar, exibir desempenho otimizado em uma ampla faixa de detecção e demonstrar excelente seletividade na análise de biomarcadores genéticos (Kannan e Maduraiveeran 2023).

Sob essa perspectiva, a integração do nanocompósito TiO₂@Pt em um filme de PPy eletrocondutor possibilitou o desenvolvimento do primeiro biossensor nanoestruturado documentado na literatura científica para a detecção do oncogene quimérico TCF3-PBX1. A instrumentação bioanalítica proposta requer volumes mínimos de espécimes biológicos, especificamente dois microlitros, facilitando o reconhecimento rápido e preciso da translocação cromossômica (1;19)(q23;p13). Até onde sabemos, essa ferramenta bioanalítica alcançou o menor limite de detecção para translocações leucêmicas, atingindo a escala attomolar. Além disso, apresenta um notável limite de quantificação, bem como alta sensibilidade e especificidade, parâmetros que são críticos para a avaliação precoce de desordens malignas e o monitoramento de doença residual mínima.

7 CONCLUSÃO

O sistema eletroquímico desenvolvido se destaca como um método potencial para a investigação precisa do oncogene quimérico TCF3-PBX1, um biomarcador significativo na LLA. A plataforma inovadora de nanotecnologia, que incorpora uma camada de PPy eletrossintetizada e o nanocompósito funcional TiO₂@Pt, apresenta características de superfície aprimoradas, melhor transporte de elétrons e um microambiente compatível biologicamente. Demonstrando robustez analítica excepcional, além de alta sensibilidade, especificidade e seletividade, a ferramenta de biossensoriamento mostrou-se eficaz em testes de biodetecção utilizando volumes mínimos de amostras de plasmídeos recombinantes e espécimes clínicos.

O biossensor demonstra sinais eletroanalíticos sem a necessidade de marcadores, medidos em intervalos regulares, com limites de detecção e quantificação na faixa attomolar. A alta especificidade do sistema sensorial o torna uma ferramenta promissora para fornecer resultados negativos em testes de amostras que não contenham o analito alvo, minimizando, assim, falsos positivos e aumentando a confiabilidade dos testes. Por outro lado, a notável sensibilidade do biossensor na detecção da translocação cromossômica $t(1;19)$ sugere seu potencial como uma ferramenta eficaz de triagem para identificar pacientes com essa condição específica. Até onde sabemos, este biossensor representa o primeiro biodevice nanoestruturado especificamente projetado para a investigação do oncogene quimérico TCF3-PBX1. Portanto, o aparato nanotecnológico pode ser considerado uma ferramenta promissora para aplicações clínicas no diagnóstico precoce da LLA e no monitoramento da doença residual mínima, potencialmente impactando positivamente a qualidade de vida dos pacientes com câncer.

REFERÊNCIAS

- ADVANI, A. S.; PENDERGAST, A. M. BCR-ABL variants: biological and clinical aspects. **Leukemia Research**, v. 26, p. 713-720, 2002.
- AHANGARI, Hossein et al. Latest trends for biogenic amines detection in foods: Enzymatic biosensors and nanozymes applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 75-87, 2021.
- ALANAZI, Nawaf; ALMUKHAYLID, Sarah; IQBAL, Zafar. Innovations in Pathophysiology, Diagnosis, Genomic Medicine and. **Common Childhood Diseases- Diagnosis, Prevention and Management: Diagnosis, Prevention and Management**, p. 157, 2024.
- AVELINO, Karen YPS et al. Electrochemical DNA biosensor for chronic myelocytic leukemia based on hybrid nanostructure. **Bioelectrochemistry**, v. 147, p. 108176, 2022.
- 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. Impedimetric sensing platform for human papillomavirus and p53 tumor suppressor gene in cervical samples. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 7, n. 1, p. 100411, 2022.
- BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. A review on impedimetric biosensors. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 248-262, 2016.
- BARBOSA, Thayana Conceição et al. A novel PAX5 rearrangement in TCF3-PBX1 acute lymphoblastic leukemia: a case report. **BMC Medical Genomics**, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2018.
- BARD, A. J. et al. Fundamentals and applications. **Electrochemical Methods**, v. 2, 2001.
- BERTEL, Linda; MIRANDA, David A.; GARCÍA-MARTÍN, José Miguel. Nanostructured titanium dioxide surfaces for electrochemical biosensing. **Sensors**, v. 21, n. 18, p. 6167, 2021.
- BURMEISTER, Thomas et al. Molecular characterization of TCF3:: PBX1 chromosomal breakpoints in acute lymphoblastic leukemia and their use for measurable residual disease assessment. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 15167, 2023.
- CARQUIGNY, Stephanie et al. Effect of electrolyte solvent on the morphology of polypyrrole films: Application to the use of polypyrrole in pH sensors. **Synthetic Metals**, v. 158, n. 11, p. 453-461, 2008.

CHAHMA, M.'hamed; CARRUTHERS, Cassidy. Electrochemical detection of oligonucleotides using polypyrroles. **Sensors and Actuators Reports**, v. 3, p. 100039, 2021.

CHANG, B. Y.; PARK, S. M. Electrochemical impedance spectroscopy. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 207-229, 2010.

CHAUHAN, N. et al. An electrochemical sensor for detection of neurotransmitter-acetylcholine using metal nanoparticles, 2D material and conducting polymer modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 377-383, 2017.

CHEN, Xueping et al. Coupling a universal DNA circuit with graphene sheets/polyaniline/AuNPs nanocomposites for the detection of BCR/ABL fusion gene. **Analytica Chimica Acta**, v. 889, p. 90-97, 2015.

CHIARETTI, Sabina et al. Clinico-biological features of 5202 patients with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the Italian AIEOP and GIMEMA protocols and stratified in age cohorts. **haematologica**, v. 98, n. 11, p. 1702, 2013.

CHOI, John K. et al. OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION CLASSIFICATION OF TUMORS OF THE HEMATOPOIETIC AND LYMPHOID TISSUES. **Modern Pathology**, p. 100466, 2024.

CHUPRADIT, Supat et al. Various types of electrochemical biosensors for leukemia detection and therapeutic approaches. **Analytical Biochemistry**, v. 654, p. 114736, 2022.

DAKSHAYINI, B. S. et al. Role of conducting polymer and metal oxide-based hybrids for applications in amperometric sensors and biosensors. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 7-24, 2019.

DING, Shengyong et al. Electrochemical biosensors for clinical detection of bacterial pathogens: advances, applications, and challenges. **Chemical Communications**, 2024.

DRUMMOND, T. G.; HILL, M. G.; BARTON, J. K. Electrochemical DNA sensors. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 1192-1199, 2003.

DUFRÊNE, Y. F. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 19, p. 5205-5213, 2002.

DUNCAVAGE, Eric J. et al. Genomic profiling for clinical decision making in myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 140, n. 21, p. 2228-2247, 2022.

ELDFORS, S. et al. Idelalisib sensitivity and mechanisms of disease progression in relapsed TCF3-PBX1 acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 31, n. 1, p. 51-57, 2017

ENSAFI, Ali A. et al. Sensitive DNA impedance biosensor for detection of cancer, chronic lymphocytic leukemia, based on gold nanoparticles/gold modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 24, p. 8176-8183, 2011.

FIALKOSKI, Diego; MALFATTI, Carlos Ricardo Maneck. Nanotecnologia: uma prospecção tecnológica no âmbito nacional e internacional. **Cadernos de Prospecção**, v. 12, n. 3, p. 590-590, 2019.

FRITEA, Luminita et al. Metal nanoparticles and carbon-based nanomaterials for improved performances of electrochemical (Bio) sensors with biomedical applications. **Materials**, v. 14, n. 21, p. 6319, 2021.

FUKU, Xolile; BILIBANA, Mawethu P.; IWUOHA, Emmanuel. Genosensor design and strategies towards electrochemical deoxyribonucleic acid (DNA) signal transduction: mechanism of interaction. **Journal of Molecular Structure**, v. 1269, p. 133810, 2022.

GARCIA, R; PEREZ, R. Dynamic atomic force microscopy methods. **Surface Science Reports**, v. 47, n. 6, p. 197-301, 2002.

GONG, Q.; WANG, Y.; YANG, H. A sensitive impedimetric DNA biosensor for the determination of the HIV gene based on graphene-Nafion composite film. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 565-569, 2017.

GOVINDHAN, Maduraiveeran; LIU, Zhonggang; CHEN, Aicheng. Design and electrochemical study of platinum-based nanomaterials for sensitive detection of nitric oxide in biomedical applications. **Nanomaterials**, v. 6, n. 11, p. 211, 2016.

GRIESHABER, Dorothee et al. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.

GUIDUCCI, C. et al. A biosensor for direct detection of DNA sequences based on capacitance measurements. In: **Proceeding of the 32nd European Solid-State Device Research Conference**. 2002. p. 24-26.

GUZMAN, M. L.; ALLAN, J. N. Concise review: leukemia stem cells in personalized medicine. **Stem Cells**, v. 32, n. 4, p. 844-851, 2014.

HALLEK, Michael; AL-SAWAF, Othman. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. **American journal of hematology**, v. 96, n. 12, p. 1679-1705, 2021.

HEIN, Daniel et al. The preleukemic TCF3-PBX1 gene fusion can be generated in utero and is present in $\approx 0.6\%$ of healthy newborns. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 134, n. 16, p. 1355-1358, 2019.

HOBSON, D. W. The Commercialization of Medical Nanotechnology for Medical Applications. In: Intracellular Delivery III. **Springer International Publishing**, p. 405-449, 2016.

HOU, Hsin-An; TIEN, Hwei-Fang. Genomic landscape in acute myeloid leukemia and its implications in risk classification and targeted therapies. **Journal of biomedical science**, v. 27, n. 1, p. 81, 2020.

HUSHEGYI, A. et al. Ultrasensitive detection of influenza viruses with a glycan-based impedimetric biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 644-649, 2016.

IJAZ, Mohsin; ZAFAR, Maria. Titanium dioxide nanostructures as efficient photocatalyst: Progress, challenges and perspective. **International Journal of Energy Research**, v. 45, n. 3, p. 3569-3589, 2021.

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

JARA-PALACIOS, M. José et al. Cyclic voltammetry to evaluate the antioxidant potential in winemaking by-products. **Talanta**, v. 165, p. 211-215, 2017.

JEONG, Hongin et al. Non-enzymatic glucose biosensor based on highly pure TiO₂ nanoparticles. **Biosensors**, v. 11, n. 5, p. 149, 2021.

JIANG, J.; KUCERNAK, A. Nanostructured platinum as an electrocatalyst for the electrooxidation of formic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 520, n. 1, p. 64-70, 2002.

KANNAN, Palanisamy; MADURAVEERAN, Govindhan. Metal Oxides Nanomaterials and Nanocomposite-Based Electrochemical Sensors for Healthcare Applications. **Biosensors**, v. 13, n. 5, p. 542, 2023.

KAUR, Baljinder; KUMAR, Santosh; KAUSHIK, Brajesh Kumar. Recent advancements in optical biosensors for cancer detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 197, p. 113805, 2022.

KAVITHA, N. et al. Polymer nanohybrid composites as conductive platform for the electrochemical sensing of pathogens. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, p. 100316, 2022.

KHAN, Humaira et al. Cancer biomarkers and their biosensors: A comprehensive review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 158, p. 116813, 2023.

KHAN, Md Abu Rayhan; AL MAMUN, Muhammad Shamim; ARA, Mosummath Hosna. Review on platinum nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications. *Microchemical Journal*, v. 171, p. 106840, 2021.

KUMAR, Kishore R.; COWLEY, Mark J.; DAVIS, Ryan L. Next-generation sequencing and emerging technologies. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis*. Thieme Medical Publishers, 2024.

LEE, Shawn H. R. et al. Genome-wide association study of susceptibility loci for TCF3-PBX1 acute lymphoblastic leukemia in children. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 113, n. 7, p. 933-937, 2021.

LIU, Jie et al. A novel perspective on interfacial interactions between polypyrrole and carbon materials for improving performance of supercapacitors. **Applied Surface Science**, v. 573, p. 151626, 2022.

LIU, Lei et al. Study of Pt/TiO₂ nanocomposite for cancer-cell treatment. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 98, n. 3, p. 207-210, 2010.

LUNA, D. M. N. et al. Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 565-572, 2015.

MAGAR, Hend S.; HASSAN, Rabeay YA; MULCHANDANI, Ashok. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): Principles, construction, and biosensing applications. **Sensors**, v. 21, n. 19, p. 6578, 2021.

MAHMOUDIAN, M. R. et al. Electrochemical characteristics of coated steel with poly (N-methyl pyrrole) synthesized in presence of ZnO nanoparticles. **Thin Solid Films**, v. 520, n. 1, p. 258-265, 2011.

MALECKA-BATURO, Kamila; GRABOWSKA, Iwona. Efficiency of electrochemical immuno-vs. apta (geno) sensors for multiple cancer biomarkers detection. *Talanta*, p. 126870, 2024.

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.

MENG, Jinting et al. Development of a regenerable dual-trigger tripedal DNA walker electrochemical biosensor for sensitive detection of microRNA-155. **Analytica Chimica Acta**, v. 1285, p. 342026, 2024.

MOHAMMADNEJAD, Javad et al. Electrochemical nanobiosensor based on reduced graphene oxide and gold nanoparticles for ultrasensitive detection of microRNA-128. **International Immunopharmacology**, v. 117, p. 109960, 2023.

MORASKIE, Michael et al. Microbial whole-cell biosensors: Current applications, challenges, and future perspectives. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 191, p. 113359, 2021.

MORITA, S. et al. (Ed.). **Noncontact atomic force microscopy**. Springer, 2015.

MIYAGI, A. et al. High-speed atomic force microscopy shows that annexin V stabilizes membranes on the second timescale. **Nature Nanotechnology**, 2016.

MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M.; ŠTURDÍK, E. Biosensors-classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109-120, 2012.

MORITA, S. et al. (Ed.). **Noncontact atomic force microscopy**. Springer, 2015.

MUJICA, Michael López et al. Biorecognition Elements in Biosensors. In: **Biosensors**. CRC Press, 2022. p. 107-122.

NARESH, Varnakavi; LEE, Nohyun. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. **Sensors**, v. 21, n. 4, p. 1109, 2021.

Nathan PC, Schiffman JD, Huang YS, et al. Childhood Cancer Survivorship Research: The Importance of Longitudinal Cohorts. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2020;40:e183-e196. doi: 10.1200/EDBK_280011

NGUYEN, Thi Thuy et al. Anticancer polypyrrole-polyethylenimine drug-free nanozyme for precise B-cell lymphoma therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 160, p. 114397, 2023.

OLIVEIRA, Léony S. et al. Flexible genosensors based on polypyrrole and graphene quantum dots for PML/RAR α fusion gene detection: A study of acute promyelocytic leukemia in children. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 235, p. 115606, 2023.

ORGANISTA-NAVA, Jorge et al. Regulation of the miRNA expression by TEL/AML1, BCR/ABL, MLL/AF4 and TCF3/PBX1 oncoproteins in acute lymphoblastic leukemia. **Oncology Reports**, v. 36, n. 3, p. 1226-1232, 2016.

PANDEY, Chandra Mouli et al. Controlled deposition of functionalized silica coated zinc oxide nano-assemblies at the air/water interface for blood cancer detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 937, p. 29-38, 2016.

PATOIS, Tilia et al. Characterization of the surface properties of polypyrrole films: Influence of electrodeposition parameters. **Synthetic Metals**, v. 161, n. 21-22, p. 2498-2505, 2011.

POLLI, Francesca et al. ASu@ MNPs-based electrochemical immunosensor for vitamin D3 serum samples analysis. **Talanta**, v. 251, p. 123755, 2023.

RACK, Katrina et al. Optimizing the diagnostic workflow for acute lymphoblastic leukemia by optical genome mapping. **American Journal of Hematology**, v. 97, n. 5, p. 548-561, 2022.

RAMANAVICIUS, Simonas; RAMANAVICIUS, Arunas. Charge transfer and biocompatibility aspects in conducting polymer-based enzymatic biosensors and biofuel cells. **Nanomaterials**, v. 11, n. 2, p. 371, 2021.

RASHID, Jahwarhar Izuan Abdul; YUSOF, Nor Azah. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. **Sensing and bio-sensing research**, v. 16, p. 19-31, 2017.

ROUNTREE, E. S. et al. Evaluation of homogeneous electrocatalysts by cyclic voltammetry. **Inorganic Chemistry**, 2014.

ROY, Tamal et al. Conformation and dynamics of long-chain end-tethered polymers in microchannels. **Polymers**, v. 11, n. 3, p. 488, 2019.

SARKAR, Sourav et al. Biosensors for detection of prostate cancer: a review. **Biomedical Microdevices**, v. 24, n. 4, p. 32, 2022.

SHAHDEO, Deepshikha; GANDHI, Sonu. Next generation biosensors as a cancer diagnostic tool. In: **Biosensor Based Advanced Cancer Diagnostics**. Academic Press, 2022. p. 179-196.

SHAMSIPUR, Mojtaba et al. Dual-modal label-free genosensor based on hemoglobin@ gold nanocluster stabilized graphene nanosheets for the electrochemical detection of BCR/ABL fusion gene. **Talanta**, v. 217, p. 121093, 2020.

SHETTI, Nagaraj P. et al. Nanostructured titanium oxide hybrids-based electrochemical biosensors for healthcare applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, p. 385-394, 2019.

SHI, Shi et al. Biointerface engineering with nucleic acid materials for biosensing applications. **Advanced Functional Materials**, v. 32, n. 37, p. 2201069, 2022.

SHORT, Nicholas J. et al. Recommendations for the assessment and management of measurable residual disease in adults with acute lymphoblastic leukemia: a consensus of North American experts. **American journal of hematology**, v. 94, n. 2, p. 257-265, 2019.

SKOTHEIM, Rolf I. et al. A universal assay for detection of oncogenic fusion transcripts by oligo microarray analysis. **Molecular cancer**, v. 8, p. 1-9, 2009.

SMUTOK, Oleh; KATZ, Evgeny. Biosensors: electrochemical devices—general concepts and performance. **Biosensors**, v. 13, n. 1, p. 44, 2022.

SONI, Amrita et al. Electrochemical genosensor based on template assisted synthesized polyaniline nanotubes for chronic myelogenous leukemia detection. **Talanta**, v. 187, p. 379-389, 2018.

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.

SUNG, Hyuna et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SUPRAJA, Patta et al. Electrospun tin (IV) oxide nanofiber based electrochemical sensor for ultra-sensitive and selective detection of atrazine in water at trace levels. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 141, p. 111441, 2019.

SZCZEPANSKI, Tomasz. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia?. **Leukemia**, v. 21, n. 4, p. 622-626, 2007.

TALEBIAN, Sepehr et al. Facts and figures on materials science and nanotechnology progress and investment. **ACS nano**, v. 15, n. 10, p. 15940-15952, 2021.

TEPPO, Susanna et al. Transcriptional Regulatory Landscape of TCF3-PBX1-Positive Leukemia and Novel Targeted Treatments. **Blood**, v. 128, n. 22, p. 4077, 2016.

THWALA, Lungile Nomcebo et al. Nanotechnology-based diagnostics for diseases prevalent in developing countries: current advances in point-of-care tests. **Nanomaterials**, v. 13, n. 7, p. 1247, 2023.

TIWARI, Sadhana; TIWARI, Rajnish. Leveraging bionanotechnology for sustainable and inclusive growth: prospects for Indo-German collaboration in ensuring affordable healthcare. 2022.

VILJOEN, Albertus et al. Force spectroscopy of single cells using atomic force microscopy. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 1, n. 1, p. 63, 2021.

WANG, Jiqiang et al. Towards understanding the machining mechanism of the atomic force microscopy tip-based nanomilling process. **International Journal of Machine Tools and Manufacture**, v. 162, p. 103701, 2021.

WEN, Y. et al. Imprinted voltammetric streptomycin sensor based on a glassy carbon electrode modified with electropolymerized poly (pyrrole-3-carboxy acid) and electrochemically reduced graphene oxide. **Microchimica Acta**, p. 1-7, 2017.

WU, Jie et al. Device integration of electrochemical biosensors. **Nature Reviews Bioengineering**, v. 1, n. 5, p. 346-360, 2023.

WU, Xiaoyan et al. An electrochemical biosensor for sensitive detection of microRNA-155: combining target recycling with cascade catalysis for signal amplification. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 1, p. 713-720, 2015.

XING, Y. F.; O'SHEA, S. J.; LI, S. F. Y. Electron transfer kinetics across a dodecanethiol monolayer self assembled on gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 542, p. 7-11, 2003.

YANG, Liang-Yong et al. A split-type electrochemical biosensor using enzyme-linked DNA magnetic beads realizes the detection of BCR/ABLp210 fusion gene in clinical samples: Duplex ligation chain reaction coupled with OR logic gate design. **Chemical Engineering Journal**, v. 479, p. 147683, 2024.

YU, Han et al. Recent progress of the practical applications of the platinum nanoparticle-based electrochemistry biosensors. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 677876, 2021.

YU, Mingzhu et al. Titanium dioxide and polypyrrole molecularly imprinted polymer nanocomposites based electrochemical sensor for highly selective detection of p-nonylphenol. **Analytica Chimica Acta**, v. 1080, p. 84-94, 2019.

ZAHRA, Qurat ul ain; KHAN, Qaiser Ali; LUO, Zhaofeng. Advances in optical aptasensors for early detection and diagnosis of various cancer types. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 632165, 2021.

ZANETTE, S. I. et al. Theoretical and experimental investigation of the force–distance relation for an atomic force microscope with a pyramidal tip. **Surface Science**, v. 453, n. 1, p. 75-82, 2000.

ZHANG, Hao et al. DNA crosslinking and recombination-activating genes 1/2 (RAG1/2) are required for oncogenic splicing in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Communications**, v. 41, n. 11, p. 1116-1136, 2021.

ZHANG, Honghong et al. Prognostic factors of childhood acute lymphoblastic leukemia with TCF3:: PBX1 in CCCG-ALL-2015: A multicenter study. **Cancer**, v. 129, n. 11, p. 1691-1703, 2023.

ZHANG, Lulu et al. Recent progresses in electrochemical DNA biosensors for MicroRNA detection. **Phenomics**, v. 2, n. 1, p. 18-32, 2022.

ZHANG, Xindan et al. Application of Polypyrrole-Based Electrochemical Biosensor for the Early Diagnosis of Colorectal Cancer. **Nanomaterials**, v. 13, n. 4, p. 674, 2023.

ZHOU, L. et al. Silver nanocluster based sensitivity amplification of a quartz crystal microbalance gene sensor. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 2, p. 881-887, 2016.

ZHU, Qin et al. 3D bimetallic Au/Pt nanoflowers decorated needle-type microelectrode for direct in situ monitoring of ATP secreted from living cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 153, p. 112019, 2020.