



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

BIANCA DE ARAUJO LOPES

**GENOSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM
NANOESTRUTURAÇÃO DE POLÍMERO E NANOPARTÍCULA
DE OURO PARA O DIAGNÓSTICO DA LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA**

Recife

2025

BIANCA DE ARAUJO LOPES

**GENOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM
NANOESTRUTURAÇÃO DE POLÍMERO E
NANOPARTÍCULA DE OURO PARA O DIAGNÓSTICO DA
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Graduação em
Biomedicina na Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à obtenção
do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador: César Augusto Souza de Andrade

Recife

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Lopes, Bianca de Araújo.

Genossensor eletroquímico baseado em nanoestruturação de polímero e nanopartícula de ouro para o diagnóstico da leucemia linfoblástica aguda / Bianca de Araújo Lopes. - Recife, 2025.

55p. : il., tab.

Orientador(a): Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador(a): César Augusto Souza de Andrade

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2025.

Inclui referências.

1. Genossensor. 2. Eletroquímica. 3. Nanopartículas. 4. Leucemia. 5. Diagnóstico. I. Oliveira, Maria Danielly Lima de. (Orientação). II. Andrade, César Augusto Souza de. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

BIANCA DE ARAUJO LOPES

**GENOSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM
NANOESTRUTURAÇÃO DE POLÍMERO E NANOPARTÍCULA DE
OURO PARA O DIAGNÓSTICO DA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Graduação em
Biomedicina na Universidade Federal de
Pernambuco como pré-requisito à obtenção
do título de Bacharel em Biomedicina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dra^a. Maria Danielly Lima de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco/Depto. de Bioquímica

Coorientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade
Universidade Federal de Pernambuco/Depto. de Bioquímica

Prof^a Dr^a. Raiza Pereira Santos de Lucena
Universidade Federal de Pernambuco/Depto. de Bioquímica

Prof^a. Ms. Léony Soares de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco/Depto. de Bioquímica

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todas as forças espirituais e da natureza que me sustentam, me fortalecem, protegem e guiam cada passo por mim dado.

Agradeço à minha família que me cobre de coragem, sustento e inspiração em todos os sentidos. Em especial minhas mães Priscilla e Luci, que acompanham de perto minha jornada acadêmica desde o planejamento, no ensino médio, até o fim da graduação, e sempre me incentivaram, acreditaram em mim e me deram forças para continuar. Agradeço ao meu pai Fabiano, minhas avós Lita e Socorro, minha tia Fabricia, meu tio Fábio, meus irmãos Lincoln e Victória. Agradeço ao meu avô Cassimiro, que sempre me incentivou a estudar e sonhava em ter uma neta universitária. Eu o perdi na terra pouco antes de iniciar a graduação, mas sei que meu voinho me acompanha e se orgulha em outro plano.

Agradeço à Prof^a Maria Danielly, minha orientadora, que viu em mim um potencial e me deu a oportunidade de fazer parte do laboratório e de me inserir na área da pesquisa. Obrigada pelo voto de confiança, pela paciência e por todos os ensinamentos. Também sou grata ao Prof. César Andrade, meu co-orientador, pela oportunidade e por todo o aprendizado.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, BIONANO, que me receberam e me auxiliaram durante o processo de iniciação científica. Não só pelas trocas de experiências acadêmicas e apoio nos experimentos, mas também sou grata pelos momentos de descontração e risadas, trazendo leveza aos dias de trabalho.

Agradeço aos amigos que fiz na infância, Ana, Carol, Ceci, Elô, Gabi e João. Me sinto privilegiada por poder escrever palavras de afeto e gratidão para as pessoas que as aprenderam junto comigo. Obrigada pela nossa trajetória e por terem, em todos os sentidos, crescido junto comigo. Obrigada por toda a força e apoio nesta e em todas as etapas desafiadoras que envolvem esse processo de nos tornarmos “gente grande”. Obrigada por estarem comigo desde o primeiro rabisco. Seguiremos juntos até o bê-a-bá.

Agradeço às amigas que fiz na escola, Bia, Jéssica, Lara, Maysa, Milena e Vitória. Muito obrigada. Nos encontramos numa fase de descobertas e amadurecimento, nos

unimos como uma rede desde o início e até hoje sustentamos umas às outras. Além de gratidão, sinto também muito orgulho por termos nos esforçado juntas e estarmos todas hoje conquistando (ou a caminho de) conquistar os nossos diplomas nas universidades que sonhamos. Em especial, gostaria de agradecer a Maysa, que me incentivou a cursar Biomedicina e, assim, me ajudou a me encontrar profissionalmente. Vocês todas foram, são e serão sempre essenciais na minha vida. Obrigada.

Agradeço aos amigos que fiz na universidade, Caio, Clara e David. Agradeço pela amizade desde o início da graduação e pela conexão que se estende para além da vida acadêmica. Pelo apoio, pela companhia, pelos momentos compartilhados e, principalmente, pela força. Compartilhar os desafios da graduação com pessoas tão incríveis foi essencial ao longo de todos os semestres. Sem vocês, essa trajetória seria insustentável. Que permaneçamos unidos, agora como profissionais, nessa relação de alegria, apoio e fortalecimento.

Agradeço aos profissionais do Laboratório de Análises Clínicas do Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE - UPE), que me receberam de braços abertos durante o estágio curricular, me apoiaram e ensinaram durante todo o período. Todos foram responsáveis por contribuir de alguma forma para a minha construção enquanto profissional. Obrigada.

Agradeço à FACEPE pelo fomento na pesquisa.

Por fim, agradeço ao corpo docente de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco cujos conhecimentos, dedicação e orientação foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço especialmente aos professores que, com sua expertise e incentivo, contribuíram para minha formação acadêmica e profissional. É com gratidão que reconheço o impacto positivo que cada um teve em minha trajetória acadêmica e no aprimoramento deste estudo.

RESUMO

As leucemias agudas são neoplasias hematológicas caracterizadas pela proliferação exacerbada de glóbulos brancos. Sua sintomatologia é inespecífica, cursando principalmente com anemia e leucocitose. Esses quadros podem ser classificados de acordo com a linhagem celular mutada. Nas leucemias linfóides, há um aumento de linfócitos, enquanto nas mielóides, outros tipos de leucócitos são alterados. Também são classificadas pelo grau de maturação das células: leucemias crônicas envolvem escalonamento de maturação, enquanto as leucemias agudas são marcadas pela proliferação exacerbada de células imaturas, que surgem na medula óssea e podem gerar a perda de função do órgão, reduzindo a hematopoiese. É essencial que o diagnóstico da leucemia seja feito de forma precoce, a fim de permitir que o tratamento se inicie a tempo de prevenir maiores complicações pelo avanço da doença. O oncogene TCF3-PBX1 é um dos mais comuns em casos de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), tornando-se, portanto, um alvo importante de investigação para conclusão diagnóstica desses quadros. As técnicas moleculares, formas convencionais de diagnóstico das leucemias, apresentam limitações relacionadas a custo, tempo de análise e instalação, que reduzem sua capacidade de difusão e aplicação pelo sistema de saúde. Frente a isso, é essencial o desenvolvimento de novas técnicas que permitam detecções rápidas, precisas e acessíveis. Uma solução promissora é a criação de um genossensor eletroquímico, baseado em polímero e nanopartículas de ouro, capaz de identificar o oncogene de interesse. Foi construída uma plataforma sensora baseada em ácido poli(3-tiofeno) acético, nanopartículas de ouro e sonda oligonucleotídica de DNA referente à translocação 1;19 para detecção do gene de fusão leucêmico TCF3-PBX1. As técnicas de voltametria cíclica (CV), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e microscopia de força atômica (AFM) foram utilizadas para caracterizar a construção da plataforma e as etapas de biodetecção. Os resultados obtidos sugerem que o genossensor foi capaz de identificar o oncogene TCF3-PBX1 em amostras positivas de plasmídeos e amostras clínicas de pacientes com LLA com rapidez e sensibilidade. Assim, o genossensor construído pode ser considerado como uma ferramenta promissora na detecção precoce, rápida e sensível de oncogenes relacionados à leucemia.

Palavras-chave: Genossensor; Eletroquímica; Nanopartículas; Leucemia; Diagnóstico.

ABSTRACT

Leukemias are hematologic cancers characterized by the excessive proliferation of white blood cells. Their symptoms are nonspecific, especially presenting as anemia and leukocytosis. These conditions can be classified based on the mutated lineage. In lymphoid leukemias, there is an increase in lymphocytes, while in myeloid leukemias, other types of leukocytes are affected. Leukemias are also classified by the degree of cell maturation: chronic leukemias involve mature cells, while acute leukemias are marked by the excessive proliferation of immature cells, which can infiltrate the bone marrow and replace the healthy tissue. It is essential that leukemia diagnosis is made in early stages in order to allow treatment to begin in time to prevent further complications due to disease progression. The TCF3-PBX1 oncogene is one of the most common in cases of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), therefore, it is an important target for investigation in the diagnostic process of this condition. Conventional molecular techniques for leukemia diagnosis have limitations related to cost, analysis time, and installation, which reduce their ability to be widely implemented and applied within the healthcare system. In this context, the development of new techniques that enable rapid, precise, and accessible detection is essential. A promising solution is the creation of an electrochemical genosensor based on polymer and gold nanoparticles, capable of identifying the oncogene of interest. A sensor platform was constructed using poly(3-thiophene) acetic acid, gold nanoparticles, and a DNA oligonucleotide probe targeting the 1;19 translocation for the detection of the TCF3-PBX1 leukemia fusion gene. Cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), and atomic force microscopy (AFM) techniques were used to characterize the platform construction and the stages of biodetection. The results obtained suggest that the genosensor was able to identify the TCF3-PBX1 oncogene in plasmid samples and clinical samples from patients with ALL with speed and sensitivity. Therefore, the constructed genosensor can be considered a promising tool for the early, rapid, and sensitive detection of leukemia-related oncogenes.

Keywords: Genosensor; Electrochemistry; Nanoparticles; Leukemia; Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema ilustrativo comparando o sangue normal e o sangue leucêmico.....	16
Figura 2. Principais técnicas utilizadas para o diagnóstico das leucemias. A) Técnica de PCR; B) Técnica de Hibridização in situ por fluorescência (FISH).....	20
Figura 3. Esquema geral representativo dos elementos componentes de um sistema biossensor.....	21
Figura 4. Esquema representativo de um ensaio de biodeteção em um genossensor através da hibridização da sonda específica com o DNA alvo.....	23
Figura 5. Formatos em que são sintetizadas as nanopartículas de ouro.....	25
Figura 6. Estrutura química do poli (ácido 3-tiofenoacético).....	27
Figura 7. Representação esquemática de um gráfico de voltametria cíclica e seus componentes: Epa (potencial de pico anódico), Epc (potencial de pico catódico), Ipa (corrente de pico anódica) e Ipc (corrente de pico catódica).....	28
Figura 8. Circuito equivalente de Randles.....	30
Figura 9. Representação do gráfico de Nyquist na EIS.....	31
Figura 10. Representação esquemática dos componentes de um microscópio de força atômica.....	33
Figura 11. Esquema representativo das etapas de montagem do biossensor.....	36
Figura 12. Topografia tridimensional via AFM referente à morfologia da superfície do eletrodo de trabalho nas etapas de construção e de testes com amostras. Em (A), a camada de PTAA; (B) referente à imobilização da nanopartícula de ouro; (C) representativo da imobilização da sonda oligonucleotídica de DNA; em (D) a imagem referente ao teste de validação com amostra positiva e em (E) visualização da etapa de especificidade com amostra negativa.....	38
Figura 13. Caracterização voltamétrica da eletropolimerização do ácido 3-tiofeno acético.....	40
Figura 14. Análises de CV e EIS das etapas de construção do sistema: Voltamograma cíclico (A) e diagrama de Nyquist (B) antes e após a eletropolimerização do PTAA sobre o eletrodo de ouro.....	41

- Figura 15.** Voltamograma cíclico (A) e diagrama de Nyquist (B) referentes às etapas seguintes de montagem: adsorção da nanopartícula de ouro após ativação por EDC:NHS, seguido de glutaraldeído, que proporciona a ligação covalente com a última camada do biossensor, referente à sonda oligonucleotídica.....42
- Figura 16.** Caracterização por CV dos testes de validação da plataforma através de amostras de plasmídeos positivos para o oncogene TCF3-PBX1 em (A); Em (B), voltamograma referente ao teste de imobilização das amostras clínicas de cDNA.....44
- Figura 17.** Caracterização por EIS dos testes de validação da plataforma através de amostras de plasmídeos positivos para o oncogene TCF3-PBX1 em (A); Em (B), gráfico de Nyquist referente ao teste de imobilização das amostras clínicas de cDNA.....45
- Figura 18.** Variação do RCT nos testes em triplicata das amostras de plasmídeo (25pg), cDNA (25pg), controle negativo 12;21 (25pg) e ácido ascórbico (1g/mL).....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados numéricos obtidos no circuito de Randles após a caracterização impedimétrica...47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica, do inglês “Atomic Force Microscopy”
AuNPS	Nanopartículas de ouro
CDL	Capacitância de dupla camada
cDNA	DNA complementar
CV	Voltametria cíclica, do inglês “Cyclic voltammetry”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EIS	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, do inglês “Electrochemical impedance spectroscopy”
EPA	Potencial de pico anódico
EPC	Potencial de pico catódico
FISH	Hibridização in situ fluorescente, do inglês “Fluorescent in situ hybridization”
IPA	Corrente de pico anódica
IPC	Corrente de pico catódica
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfoblástica crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
NHS	N-hidroxissuccinimida
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de Polimerase
PTAA	Poli (ácido tiofeno 3-acético)

Q	Carga Elétrica
RCT	Resistência a transferência de carga
RS	Resistência da solução eletrolítica
RT-qPCR	Reação em cadeia de Polimerase Transcriptase reversa quantitativa, do inglês “Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction”
Z	Impedância
ZW	Impedância de Warburg

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 FISIOPATOLOGIA DAS LEUCEMIAS.....	16
2.2 CONTEXTO HISTÓRICO DO DIAGNÓSTICO DAS LEUCEMIAS.....	18
2.3 BIOUSSENSORES.....	20
2.3.1 BIOUSSENSORES ELETROQUÍMICOS.....	21
2.3.2 GENOSENSORES.....	22
2.4 NANOMATERIAIS.....	23
2.4.1 NANOPARTÍCULA DE OURO.....	24
2.5 POLÍMEROS.....	26
2.5.1 ÁCIDO POLI(3-TIOFENO) ACÉTICO.....	26
2.6 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS.....	27
2.6.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	27
2.6.2 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA.....	29
2.7 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 MATERIAIS.....	35
4.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA PTAA-NPSAU-SONDATCF3-PBX1.....	35
4.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS E ENSAIOS DE DETECÇÃO.....	36
4.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 PLATAFORMA PTAA-NPSAU-SONDATCF3-PBX1.....	37
5.1.1 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA.....	37
5.1.2 ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO ÁCIDO (3-TIOFENO) ACÉTICO.....	39
5.1.3 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA CONSTRUÇÃO DO BIOUSSENSOR.....	40
5.1.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ENSAIOS DE BIODETECÇÃO DA PLATAFORMA.....	42
5.1.5 ENSAIOS DE ESPECIFICIDADE E INTERFERENTES DA PLATAFORMA.....	46
6. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias ocupam o segundo lugar entre as principais causas de morte no mundo no ano de 2021 (Sung et al. 2021). Entre os tipos de câncer mais comuns, a leucemia é caracterizada pela presença de uma quantidade anormal de células neoplásicas sanguíneas na circulação. Essa condição é multifatorial, e comumente se relaciona com mutações genéticas de caráter esporádico (Huang et al. 2020). Quanto a sua classificação, elas podem ser classificadas em leucemias agudas ou crônicas. Ambas apresentam subtipos específicos, que cursam com diferentes manifestações clínicas, prognóstico e patogênese (Instituto Nacional do Câncer, 2023).

Uma das principais complicações desenvolvidas pelo avanço clínico dos quadros de leucemias agudas consiste na substituição progressiva da medula óssea saudável por leucócitos imaturos neoplásicos, reduzindo os níveis de eritrócitos e plaquetas no sangue periférico (Tebbi, 2021). Dentre as formas de leucemia aguda, a leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o tipo mais frequente em crianças e representa a principal causa de morte relacionada ao câncer infantil em todo o mundo (May-Hau et al., 2022). A translocação cromossômica t(1;19), que leva à formação do gene quimérico TCF3-PBX1, é a terceira alteração genética mais comum em pacientes com LLA, estando associada a um pior prognóstico (Burmeister et al., 2023).

Atualmente, os principais métodos para diagnosticar o monitoramento da expressão de oncogenes consistem em técnicas moleculares. A técnica de Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa quantitativa (RT-qPCR) é uma das principais abordagens para essa finalidade (Oliveira et al., 2023). Esse método é baseado na amplificação da sequência alvo, seguida pela detecção por meio da fluorescência da quantificação do número de cópias (Harshitha; Arunraj, 2021). Já a Hibridização in situ por fluorescência (FISH) é uma técnica que se baseia na hibridização entre sonda de DNA específica marcada por molécula fluorescente e sequência alvo, sendo amplamente empregada na pesquisa de anormalidades cromossômicas. Ambas as técnicas apresentam desvantagens, como análise em múltiplas etapas, as tornando amplamente suscetíveis a contaminações durante sua execução e exige reagentes de alto custo (Allegra et al., 2023). Além disso, para a técnica de FISH, é preciso um microscópio de fluorescência e pode apresentar um resultado incompatível com a realidade, representativo de uma baixa sensibilidade (Chrzanowska; Kowalewski; Lewandowska, 2020).

Frente a isso, o desenvolvimento de ensaios moleculares simples e efetivos para a detecção dos genes de fusão relacionados às malignidades hematológicas é de grande interesse para a promoção da saúde de pacientes com leucemia (Yeung; Egan; Radich, 2016). Dessa forma, os biossensores eletroquímicos são ferramentas capazes de superar essas dificuldades presentes nos métodos comuns de biodetecção. Isso acontece porque são dispositivos que possibilitam miniaturização, favorecendo uma operação simples com baixo uso de reagentes, além de oferecer respostas analíticas sensíveis e específicas (Allegra et al., 2023).

Os biossensores de DNA, também denominados genossensores, são aplicáveis ao diagnóstico precoce de neoplasias, visto que são dispositivos capazes de detectar a presença de oncogenes através da hibridização entre sonda oligonucleotídica específica e sequência de DNA compatível. Para tal, nanopartículas associadas na plataforma sensora são capazes de ampliar a capacidade analítica do dispositivo graças às suas propriedades eletrônicas, de biocompatibilidade e de promover estabilidade química no sistema. Além disso, aumentam a área de superfície sem prejudicar as interações moleculares (Chupradit et al., 2022).

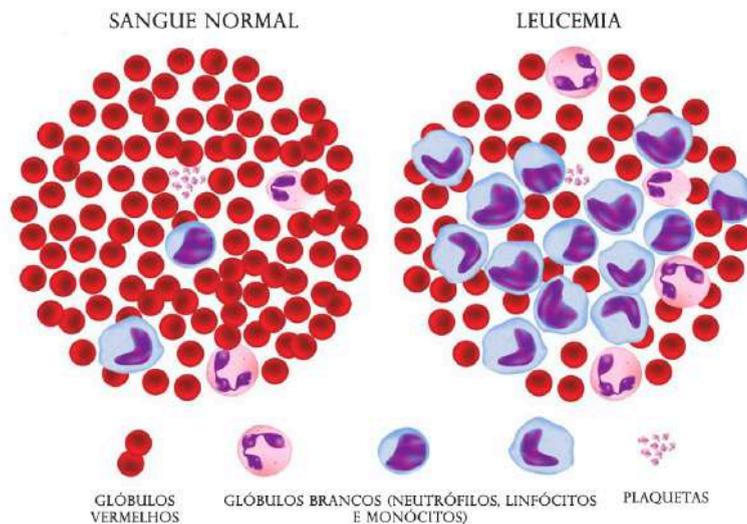
O presente estudo aborda o desenvolvimento de um sistema biossensor formado por filme polimérico de ácido poli(3-tiofeno) acético e nanopartículas de ouro associados à sonda oligonucleotídica referente à translocação 1;19 como elemento de bioreconhecimento. As etapas de caracterização eletroquímica para avaliação das etapas de construção e validação da plataforma foram feitas por meio das técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (CV) para determinar a capacidade de biodetecção do sensor frente a amostras plasmidiais e de cDNA contendo as sequências de interesse.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FISIOPATOLOGIA DAS LEUCEMIAS

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, com um grande impacto na saúde pública, sendo um grande contribuinte para um desbalanço no envelhecimento populacional internacional (Sung et al., 2021). As leucemias são um tipo de câncer que afeta o tecido sanguíneo, caracterizando-se pela presença de uma quantidade anormal de células sanguíneas mutadas na circulação (Tebbi, 2021). Diversas alterações genéticas foram identificadas como fatores de risco para o desenvolvimento de quadros leucêmicos, como as síndromes de Down e de Klinefelter, além de alterações em genes como RUNX1 e CEPBA (Chennamadhavuni et al., 2025). Entre as alterações mais comuns, destacam-se as mutações genéticas, que podem desencadear a produção e interação anormais de proteínas, além de inibir a apoptose e manter o ciclo celular funcionando de forma ininterrupta (Huang et al., 2020).

Figura 1. Esquema ilustrativo comparando o sangue normal e o sangue leucêmico. Disponível em: <https://www.richet.com.br/entenda-a-leucemia/>



As leucemias podem ser classificadas em agudas e crônicas. Ambas apresentam subtipos específicos, que cursam com diferentes manifestações clínicas, prognóstico e patogênese (Instituto Nacional do Câncer, 2023). Os blastos, que são células imaturas e, portanto, ainda disfuncionais, normalmente correspondem a cerca de 1% a 5% das células presentes na medula óssea. As leucemias agudas se caracterizam pela presença de mais de 20% de blastos no sangue periférico ou na medula óssea, resultando em um

início mais rápido dos sintomas. Por outro lado, na leucemia crônica, a quantidade de blastos é inferior a 20%, e o aparecimento dos sintomas tende a ser mais gradual. A fase acelerada ou blástica corresponde à transformação da leucemia mieloide crônica em uma fase aguda, com um aumento significativo na quantidade de blastos (Chennamadhavuni et al., 2025).

As leucemias mielóides crônicas (LMCs) são neoplasias mieloproliferativas que apresentam o crescimento descontrolado de células de linhagem mielóide em diferentes estágios de maturação. Essa condição se divide em três estágios, sendo eles as fases crônica, acelerada e a blástica. Na fase blástica, há um aumento na porcentagem dos blastos mielóides, podendo atingir até 70% (Minciacchi et al., 2021). Nas leucemias linfóides crônicas (LLCs), há a proliferação clonal de linfócitos CD5+. As LLCs são o tipo de leucemia cujo desenvolvimento sofre maior influência de fatores herdados geneticamente e progridem de forma mais lenta em relação a linfomas mais agressivos e às leucemias agudas (Chiorazzi et al., 2021).

Entre os quadros agudos, as leucemias mielóides agudas (LMAs) apresentam caracteristicamente mais de 20% de blastos mielóides. É a forma de leucemia mais comum em adultos, cujo prognóstico varia de acordo com as particularidades moleculares daquela mutação (Chennamadhavuni et al., 2025). A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o câncer pediátrico mais comum e é a principal causa de morte relacionada ao câncer em crianças em todo o mundo (May-Hau et al., 2022). A translocação cromossômica t(1;19), que resulta na formação do gene quimérico TCF3-PBX1, é a terceira mutação mais frequentemente observada em pacientes com LLA. Esse oncogene tem a capacidade de bloquear a maturação dos linfócitos e inibir os mecanismos de apoptose, favorecendo, assim, a proliferação dos blastos linfóides (Burmeister et al., 2023).

Os quadros de leucemia aguda podem evoluir, inibindo a produção de células saudáveis pela medula óssea, resultando na redução de eritrócitos e plaquetas no sangue periférico (Tebbi, 2021). Isso faz com que a demanda de células sanguíneas não seja suprida pela medula e, a partir disso, outros órgãos, como fígado e baço, exercem a hematopoese extramedular. Isso pode gerar sobrecarga, com hepatoesplenomegalia, e avançar para a falência desses órgãos (Gözdaşoğlu et al., 2022).

Ao considerar a alta velocidade com que as células mutadas se proliferam e se expandem nas leucemias agudas, é importante que o diagnóstico seja feito de forma rápida, a fim de evitar que as complicações pelo avanço da doença sejam alcançadas. Além disso, é crucial que a técnica aplicada ao diagnóstico seja de alta sensibilidade, característica que favorece a detecção precoce, e específica, a fim de identificar com precisão o alvo relacionado à leucogênese (Zhou et al., 2021). A necessidade de um diagnóstico precoce se reflete no estudo de Inaba et al. (2021), que identificou o aumento contínuo, nos últimos 50 anos, das taxas de sobrevivência dos pacientes com LLA. Os fatores que se associam a essa melhora envolvem os avanços nas formas de tratamento e, especialmente, a adoção de novas tecnologias de diagnóstico, capazes de atuar com maior eficiência na detecção precoce do quadro neoplásico.

2.2 CONTEXTO HISTÓRICO DO DIAGNÓSTICO DAS LEUCEMIAS

O surgimento do microscópio proporcionou importantes avanços para a medicina. No século XVIII, os cientistas já haviam identificado e descrito os glóbulos vermelhos e brancos. (Alessandro De Freitas; Levy; Paulo Bydlowski, 2022). Atualmente, morfolologistas ainda se utilizam das características das células sanguíneas, como forma, tamanho e granularidade, para classificar os tipos celulares com o auxílio de um microscópio óptico. Após essa análise, realizam diagnósticos com base em diretrizes estabelecidas. Contudo, o diagnóstico morfológico tradicional é um processo que exige tempo e não garante alta sensibilidade, além de resultar em diagnósticos que podem ser subjetivos (Zhou et al., 2021).

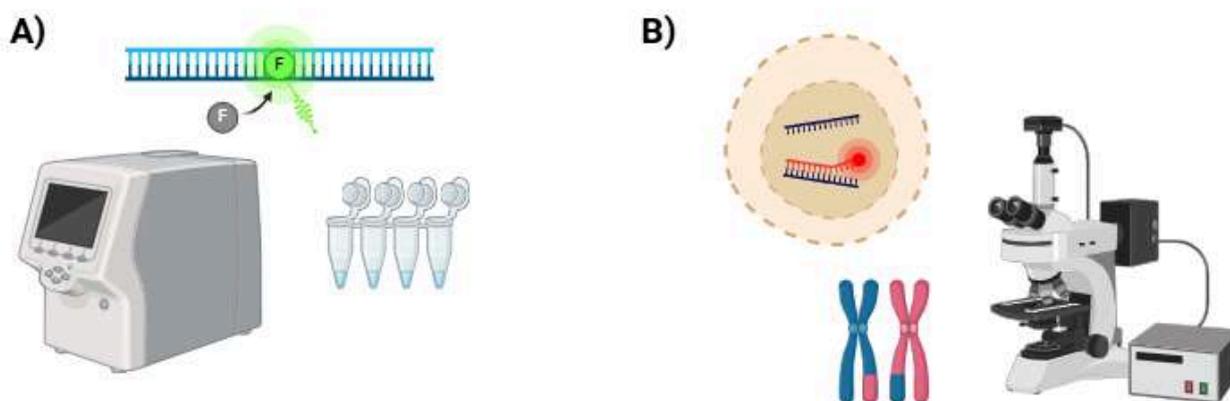
Desde o desenvolvimento do microscópio, diversas tecnologias aplicadas ao diagnóstico das leucemias foram introduzidas, permitindo avanços significativos na detecção e compreensão dessa doença. Para o diagnóstico inicial, comumente são realizados exames como o hemograma, a hematoscopia, o painel de coagulação e os testes de função hepática. Além disso, é frequentemente indicada a biópsia de medula óssea, um procedimento invasivo que permite a avaliação detalhada do padrão celular presente no tecido. Embora esses exames sejam essenciais, a análise molecular se tornou cada vez mais fundamental. Ela permite identificar as mutações específicas presentes no paciente, o que é crucial para determinar o tipo de leucemia e, assim,

elaborar um protocolo de tratamento personalizado e mais eficaz (Chennamadhavuni et al., 2025).

Atualmente, a RT-qPCR, representada na figura 2 (A), variante da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, se destaca como uma das abordagens mais utilizadas para o monitoramento da expressão de oncogenes (Oliveira Et Al., 2023). Esse método atua pela amplificação da sequência referente ao oncogene produzido, e pela posterior quantificação através da detecção do aumento da fluorescência da molécula alvo à medida em que ocorre a amplificação do molde (Harshitha; Arunraj, 2021). Entretanto, essa técnica apresenta desvantagens, visto que, além de ser constituída por múltiplas etapas, é amplamente suscetível a contaminações durante sua execução e exige reagentes de alto custo (Allegra et al., 2023).

A técnica de hibridização in situ por fluorescência (FISH) (figura 2B) é amplamente empregada na pesquisa de anormalidades genéticas. Baseia-se na hibridização entre sonda de DNA específica marcada por molécula fluorescente e sequência alvo. Apesar de proporcionar reações com especificidade, necessita de microscópio de fluorescência e, diante de baixa porcentagem de células tumorais na análise, podendo apresentar uma baixa sensibilidade (Chrzanowska; Kowalewski; Lewandowska, 2020).

Figura 2. Principais técnicas utilizadas para o diagnóstico das leucemias. A) Técnica de PCR; B) Técnica de Hibridização in situ por fluorescência (FISH). Fonte: Próprio autor (2025).



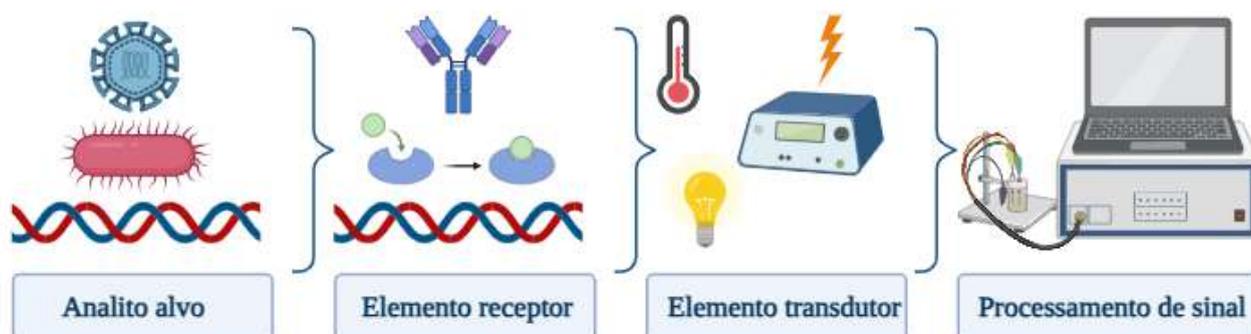
As técnicas tradicionais apresentam limitações que elevam o custo e o tempo de análise para a obtenção do diagnóstico (Avelino et Al., 2022). Frente a isso, os biossensores eletroquímicos são ferramentas capazes de superar essas dificuldades presentes nos métodos comuns de biodeteccção. Isso acontece, porque são dispositivos que possibilitam miniaturização, favorecendo uma operação simples com baixo uso de reagentes, além de oferecer respostas analíticas sensíveis e específicas (Allegra et al., 2023)

2.3 BIOSSENSORES

Biossensores são dispositivos que funcionam com base em reações biológicas que acontecem graças à interação que acontece entre o analito alvo que o biossensor visa identificar e um elemento biológico que atua como seu receptor. São biodispositivos compostos tipicamente por um elemento bioreceptor responsável pela reação de bioreconhecimento, um elemento transdutor, que mensura perturbações no meio causadas pela reação de biodeteccção, e um complexo eletrônico, que permite a interpretação dos dados obtidos com a reação biológica através de um sistema computadorizado de interpretação (Naresh; Lee, 2021). Os componentes essenciais de um biossensor estão representados na figura 3.

Figura 3. Esquema geral representativo dos elementos componentes de um sistema biossensor.

Fonte: Próprio autor (2025).



Os elementos receptores são biomoléculas que, imobilizadas sobre a superfície transdutora, são capazes de realizar ligações específicas para a detecção de analitos-alvo na amostra. Como bioreceptores, é possível utilizar moléculas, como imunoglobulinas, enzimas, ácidos nucleicos e células (Andriukov et al., 2020).

O elemento transdutor consiste em uma superfície sensora capaz de converter a perturbação gerada pela reação bioquímica em um sinal eletrônico, e enviar para um sistema de processamento. A escolha para a natureza desse elemento deve levar em consideração fatores, como a aplicação do biossensor e a reação que se busca detectar (Smutok; Katz, 2022).

2.3.1 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a natureza do elemento transdutor. O biossensor calorimétrico é um tipo de dispositivo capaz de monitorar alterações de temperatura, enquanto o biossensor acústico funciona com base na detecção da alteração das propriedades físicas de uma onda acústica (Naresh; Lee, 2021). Já os mais comuns são os biossensores ópticos, que detectam alterações em parâmetros físicos e ópticos, e, por fim, os eletroquímicos, que se baseiam na medição das mudanças nas interações elétricas por aplicação de potencial (Andriukov et al., 2020).

Os biossensores eletroquímicos são compostos por um eletrodo de referência, que apresenta um potencial fixo, um eletrodo de trabalho, que representa o biossensor e será a superfície sobre a qual a reação de bioreconhecimento deverá acontecer, e um contra-eletrodo, que controla o potencial aplicado. Esse sistema permite a detecção de sinais elétricos proporcionais às concentrações dos analitos (Chupradit Et al., 2022).

Esses biodispositivos são capazes de proporcionar respostas sensíveis através de procedimentos simples, sem o uso de reagentes custosos ou tóxicos. A detecção eletroquímica pode ser feita por técnicas amperométricas, que detectam a corrente resultante na superfície após a aplicação de potencial, além de potenciométricas, que se baseiam em medidas de potencial (Allegra et al., 2023). Os biossensores eletroquímicos condutométricos funcionam através da análise da alteração das propriedades condutoras da superfície de trabalho, enquanto os impedimétricos avaliam a resistência à transferência de cargas elétricas sobre a área analisada (Naresh; Lee, 2021).

2.3.2. GENOSSENSORES

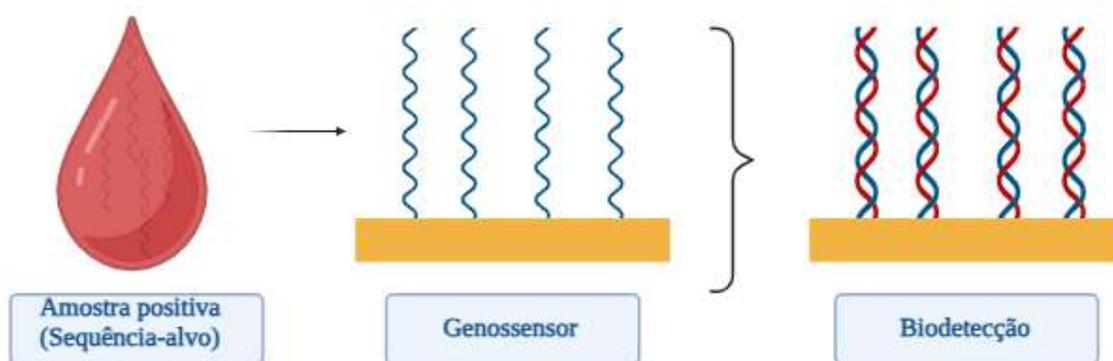
É possível classificar os biossensores de acordo com o elemento receptor, capaz de se ligar ao analito-alvo na amostra adicionada. Os imunossensores, através de imunoglobulinas específicas imobilizadas na superfície transdutora, detectam reações antígeno-anticorpo (Zhang Et Al., 2021). Os biossensores enzimáticos utilizam enzimas, geralmente oxidases, conferindo seletividade ao dispositivo por meio da detecção da ligação enzima-substrato (Fan; Guo; Ge, 2023).

A utilização de microrganismos, como leveduras e bactérias, como elemento de reconhecimento se faz presente nos biossensores baseados em células, que respondem às toxinas de forma fisiológica (Rozman et al., 2022). Os biossensores que se baseiam na detecção de DNA, também chamados de genossensores (Figura 4) detectam a hibridização entre sonda oligonucleotídica imobilizada na superfície transdutora e sequência alvo correspondente (Avelino et al., 2022).

Os genossensores apresentam vantagens associadas à sua operação, que ocorre por protocolos simples, baixo custo e baixa quantidade de amostras e reagentes necessários para a análise, que acontece com rapidez (Oliveira et al., 2023). Ademais, apresentam possibilidade de miniaturização, detecção não invasiva e alta sensibilidade.

Essas características permitem estabelecer que os genossensores são aplicáveis não só no diagnóstico das patologias, mas também na avaliação da eficácia do tratamento através da análise da doença residual mínima (Allegra et al., 2023).

Figura 4. Esquema representativo de um ensaio de biodeteção em um genossensor através da hibridização da sonda específica com o DNA alvo. Fonte: Próprio autor (2025).



Uma das principais aplicabilidades dos genossensores é o diagnóstico precoce de patologias, como o câncer, visto que o biossensor de DNA é capaz de detectar a presença de oncogenes. Para tal, nanopartículas associadas na plataforma sensora são capazes de ampliar a capacidade analítica do dispositivo, visto que apresentam propriedades eletrônicas, além de aumentarem a área de superfície sem prejudicar as interações moleculares, e possuem diversas possibilidades de formato, escolhido de forma a melhor servir ao propósito do sensor (Chupradit et al., 2022).

2.4 NANOMATERIAIS

Os nanomateriais podem ser sintetizados a partir de diferentes moléculas e em diversas formas. Mais comumente, são utilizados os nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas, óxidos metálicos, nanoclusters metálicos e estruturas metal-orgânicas. Levando em conta as vantagens exclusivas associadas aos efeitos de condutividade, volume e superfície, os nanomateriais têm atraído crescente interesse para uma variedade de aplicações em análises ambientais, médicas, biológicas e químicas. Nos últimos tempos, os sensores e biossensores eletroquímicos fundamentados em

nanomateriais têm sido objeto de extensos estudos, em virtude de suas destacadas propriedades em condutividade, seletividade e biocompatibilidade (Luo, 2023).

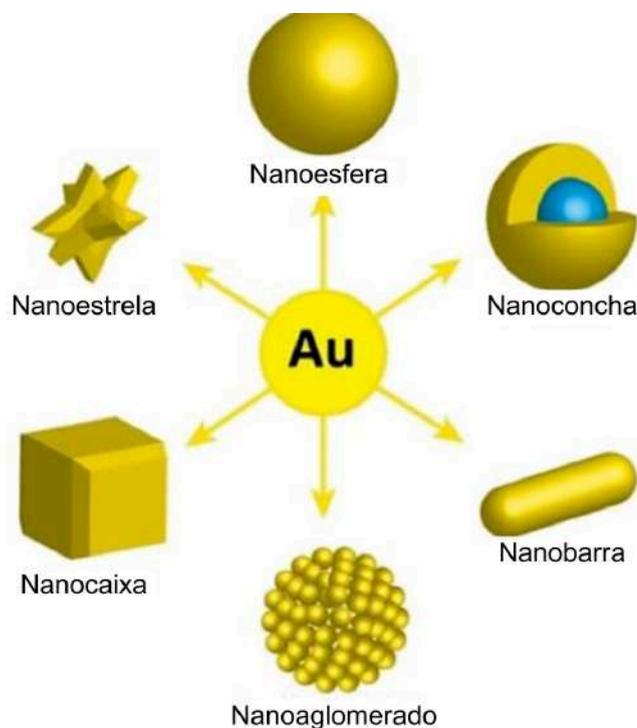
O uso de nanomateriais nos biossensores eletroquímicos se faz otimizado quando eles são imobilizados de forma intermediária entre a superfície transdutora e o elemento receptor, visto que, dessa forma, são capazes de auxiliar o processo de transferência de elétrons e a sinalização biossensora (Chupradit et al., 2022).

Ademais, os polímeros condutores (PCs) têm sido amplamente utilizados em diversas áreas graças à flexibilidade dos polímeros e à sua capacidade de conduzir eletricidade, semelhante aos metais. Quando aplicados aos biossensores, tornam-se ferramentas de melhoria das respostas analíticas, visto que fornecem à plataforma vantajosas propriedades físico-químicas, como ampla área de superfície, alta condutividade elétrica e estabilidade mecânica (Le et al., 2024).

2.4.1 NANOPARTÍCULA DE OURO

As nanopartículas de ouro (AuNPs) fazem parte da classe de nanopartículas de metais nobres. Suas propriedades ópticas, eletrônicas e físico-químicas as tornam alvo importante de pesquisa biomédica (Naresh; Lee, 2021). Uma das principais vantagens do uso do ouro é sua biocompatibilidade e a capacidade de formar fortes ligações. Além disso, é possível utilizar nanomateriais de ouro em diferentes formas, como nanopartículas, nanoesferas e nano-estrelas (Geraldo et al., 2023). Os diferentes formatos de síntese das nanopartículas de ouro estão esquematizados na figura 5.

Figura 5. Formatos em que são sintetizadas as nanopartículas de ouro. Fonte: Geraldo et al. (2023).



As AuNPs apresentam características vantajosas, como técnicas de síntese simples, estabilidade química, biocompatibilidade e vasto potencial eletroquímico. As suas propriedades estratégicas não só facilitam a detecção de moléculas, mas também aumenta consideravelmente a sensibilidade dos diagnósticos (Li et al., 2023). Além disso, são capazes de catalisar as reações biológicas quando aplicadas em biossensores (Naresh et al. 2021).

Ademais, investigações recentes demonstraram que sondas de captura de DNA imobilizadas em sensores com nanopartículas de ouro são eficazes na detecção de biomarcadores prognósticos específicos, com detecção de alta precisão, alcançando níveis femtomolares (Avelino et Al., 2022). Esses desenvolvimentos ressaltam o potencial das AuNPs como ferramentas eficazes no campo do diagnóstico, principalmente na identificação precoce de condições patológicas (Li et al. 2023).

2.5 POLÍMEROS

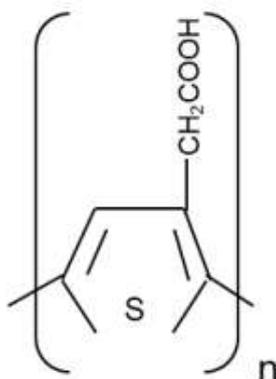
2.5.1 ÁCIDO POLI(3-TIOFENO) ACÉTICO

A presença de filmes de polímeros nos eletrodos proporciona uma alta concentração de grupos funcionais na superfície, facilitando a fixação de outras moléculas. Quando se trata de DNA imobilizado, esse sistema polimérico apresenta propriedades, como a capacidade de ajustar a condutividade. Essas características tornam os filmes poliméricos um material altamente apropriado para o desenvolvimento de genossensores químicos ultrassensíveis (Allegra et al., 2023).

O politiofeno se destaca por seu baixo custo e sua grande versatilidade estrutural. Sua capacidade de conduzir eletricidade de maneira eficiente o torna ideal para o desenvolvimento de sensores e dispositivos que interagem com sistemas biológicos (Aydin; Aydin; Sezgintürk, 2020).

A estrutura do politiofeno o torna um material de importante aplicabilidade eletrônica, visto que apresenta considerável regiorregularidade, sendo unidades repetitivas organizadas de maneira consistente ao longo da cadeia, facilitando o trânsito de elétrons. Além disso, é capaz de fornecer grupamentos carboxílicos, que devem interagir com outras moléculas quando aplicados em sensores, a fim de aumentar sua seletividade (Torres, 2012). Assim, o politiofeno apresenta propriedades que elegem seu emprego no desenvolvimento de biossensores (Aydin; Aydin; Sezgintürk, 2020).

Figura 6. Estrutura química do poli (ácido 3-tiofenoacético). Fonte: Lucena et al (2021).



2.6 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

As técnicas de análise eletroquímica representam formas altamente informativas a respeito de processos de óxido-redução em reações bioquímicas. Isso acontece, porque elas são capazes de oferecer meios para a adição e remoção de elétrons de forma controlada em superfícies de interesse (Pilz et al. 2023).

Métodos de transdução eletroquímica são uma abordagem analítica de importante aplicação para a caracterização de biomoléculas, visto que facilitam processos de miniaturização dos biodispositivos e obtêm a resposta de forma direta, sem a necessidade do desenvolvimento de processos secundários para determinação da análise obtida (Banerjee et al. 2020).

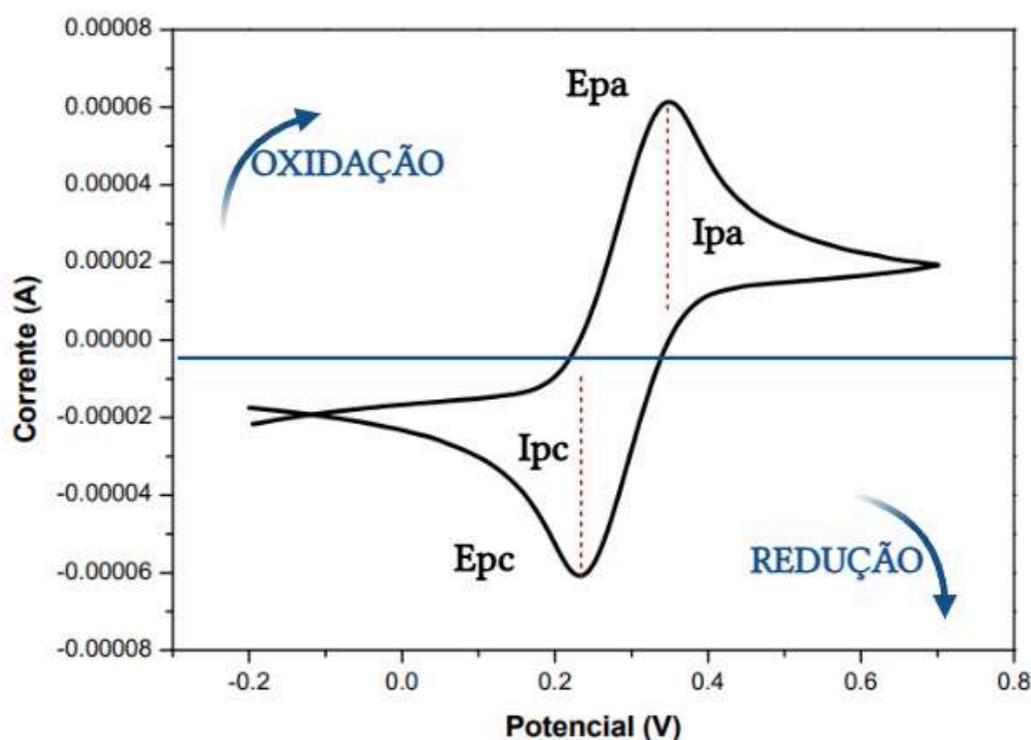
Existem diversas estratégias de análise eletroquímica que podem ser empregadas nos biossensores a fim de avaliar as reações redox causadas ao longo dos processos de montagem das plataformas e de reações de bioreconhecimento. Dentre as principais técnicas, estão a voltametria, a amperometria e a espectroscopia de impedância eletroquímica (Monteil et al. 2021).

2.6.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA

A voltametria cíclica (CV) é uma das técnicas eletroquímicas mais populares. Nesse método, aplica-se um potencial de varredura, permitindo a medição da corrente resultante. A resposta é apresentada em um gráfico em forma de sino, que mostra os

picos de oxidação e redução que aconteceram no eletrodo de trabalho, entre a superfície do sensor e a sonda redox. Essa representação visual ajuda a entender melhor as reações eletroquímicas em ação. (Piliz; Kielb, 2023).

Figura 7. Representação esquemática de um gráfico de voltametria cíclica e seus componentes: E_{pa} (potencial de pico anódico), E_{pc} (potencial de pico catódico), I_{pa} (corrente de pico anódica) e I_{pc} (corrente de pico catódica). Fonte: Próprio autor (2025).



O gráfico resultante da voltametria cíclica, representado na Figura 7, revela, no eixo X, o potencial aplicado (E), que é um componente controlado no sistema. No eixo Y, observa-se a resposta gerada, representada pela corrente resultante (i). Os termos cátodo e ânodo nessa técnica referem-se aos fenômenos de óxido-redução que ocorrem na aplicação do potencial de varredura. No cátodo, ocorre o processo de redução, no qual a superfície analisada recebe elétrons. Já no ânodo, acontece a oxidação do analito, que sofre a perda de elétrons. À medida que o potencial é varrido nas direções positiva e negativa, o cátodo e o ânodo se alternam, resultando em dois picos redox observados no gráfico (Elgrishi et al., 2018).

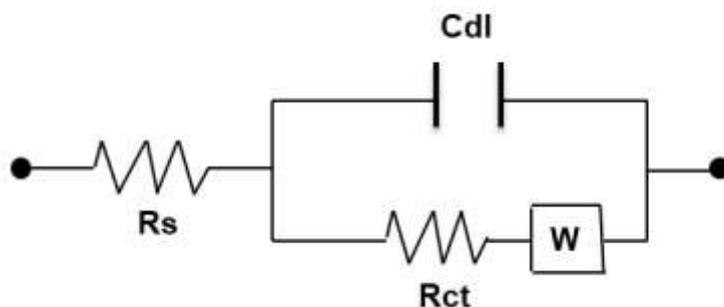
Dessa forma, a voltametria cíclica é uma técnica que permite estudar o desempenho eletrocatalítico dos eletrodos e as transferências eletrônicas durante reações redox. Nesse método, uma tensão fixa é aplicada ao sistema de três eletrodos: um eletrodo de trabalho, um contra-eletrodo e um eletrodo de referência, sobre os quais a corrente flui. As posições, formas e amplitudes dos picos de oxidação e redução que aparecem no voltamograma cíclico são influenciadas pela taxa de transferência de elétrons e pela estabilidade química do(s) analito(s) em análise. (Banerjee Et Al., 2020).

2.6.2 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

A Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma técnica capaz de fornecer grande riqueza de informações ao caracterizar o sistema eletroquímico. Ela opera através da aplicação de um potencial em onda de formato sinusoidal cujos resultados podem ser interpretados através de componentes resistivos e capacitivos do sistema elétrico (Pilz et al. 2023). A resposta gerada pela aplicação do potencial será uma corrente de mesma frequência, entretanto, sua magnitude deve variar de acordo com a resistência que a amostra analisada fornece à troca de cargas no sistema. Esses dados são medidos e representados graficamente, utilizando um software (Monteil; Casson; Jones, 2021).

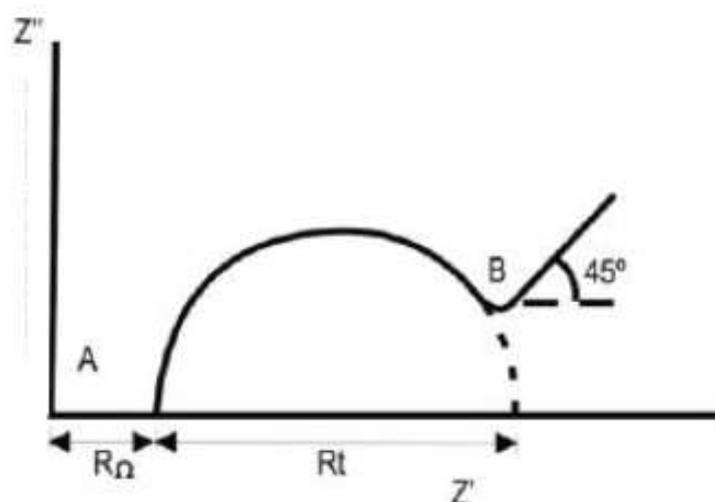
Circuitos equivalentes são utilizados para permitir a interpretação dos fenômenos eletroquímicos através da associação com elementos, como resistores e capacitores. A resistência às trocas iônicas entre a superfície do eletrodo e a sonda redox ou eletrólito é representada como um componente resistor, sendo referida como a resistência à transferência de cargas. O modelo de Randles é o mais comumente utilizado para a interpretação da EIS aplicada em biossensores (Ceseweki et al., 2020). Esse circuito foi empregado para ajustar os dados impedimétricos obtidos nos ensaios e inclui a resistência da solução eletrolítica (RS), o elemento de fase constante (CDL), a resistência à transferência de carga (RCT) e a impedância de Warburg (W), representados na figura 8. O modelo permite uma avaliação quantitativa das reações eletrolíticas na superfície do eletrodo nos estudos de EIS.

Figura 8. Circuito equivalente de Randles. Fonte: Lucena et al., 2021.



O diagrama de Nyquist é uma opção de representação gráfica dos fenômenos associados ao circuito de Randles. Esse gráfico, representado na figura 9, possui uma região inicial onde predomina o valor do R_{ct} , que é representado de forma proporcional ao diâmetro do semicírculo formado. À medida que a frequência reduz, a superfície passa a apresentar uma transferência de espécies redox mais intensa, sendo observada através da formação de uma linha oblíqua num ângulo de 45° , denominada “região de Warburg”, referente a uma região de mínima resistência à transferência de cargas (Laschuk et al., 2021).

Figura 9. Representação do gráfico de Nyquist na EIS. Fonte: Ribeiro et al., (2015).



A avaliação da biointeração e a consequente hibridização podem ser investigadas por meio da relação matemática entre o R_{ct} pós-hibridização e o R_{ct} da plataforma genossensora (Equação 1). O R_{ct} relativo reflete a quantidade do analito adsorvido na interface do bioeletrodo:

Equação 1

$$\frac{\Delta R_{ct} (\%) = R_{CT} (cDNA) - R_{CT} (Genossensor) \times 100}{R_{CT} (Genossensor)}$$

Nessa equação, o R_{ct} (genossensor) corresponde à resistência a transferência de carga ofertada pela plataforma sensora e o R_{ct} (cDNA) é o valor medido da resistência à transferência de carga após o reconhecimento das amostras de DNA complementar (Butterworth Et Al., 2019; Avelino Et Al., 2020).

A imobilização bem sucedida das camadas do biossensor, bem como a detecção do analito-alvo através de uma reação de bioreconhecimento bem sucedida, são observadas através, principalmente, do aumento da resistividade do sistema, que reflete a formação de camadas espessas que dificultam as interações de óxido-redução diretamente na superfície transdutora (Ribeiro et al., 2021).

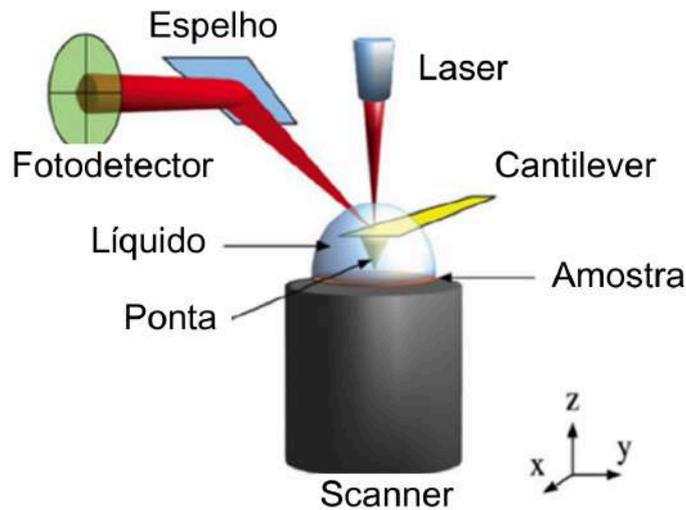
Dessa forma, a EIS é uma técnica de análise eletroquímica largamente empregada na análise de materiais condutores. Ela é capaz de promover uma caracterização rápida, efetiva e não invasiva (Laschuk et al., 2021). Esse método apresenta propriedades, como alta sensibilidade, detecção sem a necessidade de marcadores e baixo consumo de energia, assim, se consolida como uma ferramenta útil para análises de biossensoramento. (Monteil; Casson; Jones, 2021).

2.7 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Os biossensores podem ser caracterizados por técnicas microscópicas, como microscopia de varredura, microscopia de transmissão eletrônica e microscopia de força atômica. A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica que possibilita a análise da topografia tridimensional de uma superfície, alcançando uma amplitude de centenas de micrômetros e uma resolução na faixa subnanométrica (Xia; Youcef-Toumi, 2022).

O princípio fundamental da microscopia de força atômica (AFM) consiste em uma ponta extremamente afiada, com dimensões na ordem de nanômetros, que é fixada em uma estrutura denominada cantilever, flexível, e desliza sobre uma superfície, referente à amostra. As forças de interação que variam com a distância entre a ponta e a amostra são medidas pelo cantilever, de forma a identificar a proximidade da superfície, permitindo a formação de uma imagem à medida que a ponta acompanha os contornos da superfície (Hammond; Ryadnov; Hoogenboom, 2021). Um feixe de laser é refletido na parte traseira do cantilever, e sua deflexão é captada por um fotodetector, possibilitando a coleta de dados sobre as características topográficas e mecânicas (Bian et al., 2021). Os componentes do microscópio de força atômica estão representados na figura 10.

Figura 10. Representação esquemática dos componentes de um microscópio de força atômica. Fonte: Hammond et al. (2021). (Modificado).



As propriedades da técnica de AFM permitem que ela se torne fundamental na análise da construção de biossensores, já que é uma microscopia que, através do mapeamento da distribuição das biomoléculas na superfície amostral, é capaz de fornecer dados relativos à topografia e às propriedades biomecânicas dos componentes do sistema biológico do dispositivo (Holuigue et al., 2022).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de um genossensor baseado em filme polimérico de PTAA para a detecção de oncogenes de importância clínica no diagnóstico da leucemia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar as propriedades interfaciais dos filmes de PTAA e nanoestruturas metálicas (NMT) obtidos diretamente sobre superfície metálica através de síntese eletroquímica;
- Analisar o processo de imobilização da sonda TCF3/PBX1 sobre o eletrodo de ouro modificado com PTAA e NpsAu;
- Verificar a especificidade do nanobioeletrodo PTAA-NMT-sondaTCF3/PBX1 após sua interação com plasmídeos contendo o oncogene quimérico TCF3-PBX1 (controle positivo);
- Avaliar a seletividade do nanobioeletrodo PTAA-NMT-sondaTCF3/PBX1 frente à plasmídeos contendo segmentos de DNA não complementar (controle negativo);
- Determinar o limite de detecção do nanobioeletrodo e realizar ensaio de biodetecção em amostras clínicas de pacientes com LLA;
- Determinar as correntes de pico anódicas (ipa) e catódicas (ipc) dos voltamogramas cíclicos para cada etapa de montagem dos eletrodos biossensíveis e após o processo de biodetecção;
- Realizar simulação teórica dos resultados experimentais obtidos a partir de espectroscopia de impedância eletroquímica;
- Caracterizar a morfologia e a topografia do eletrodo modificado com ptaa-nmt-sondaTCF3/PBX1 através da técnica de microscopia de força atômica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

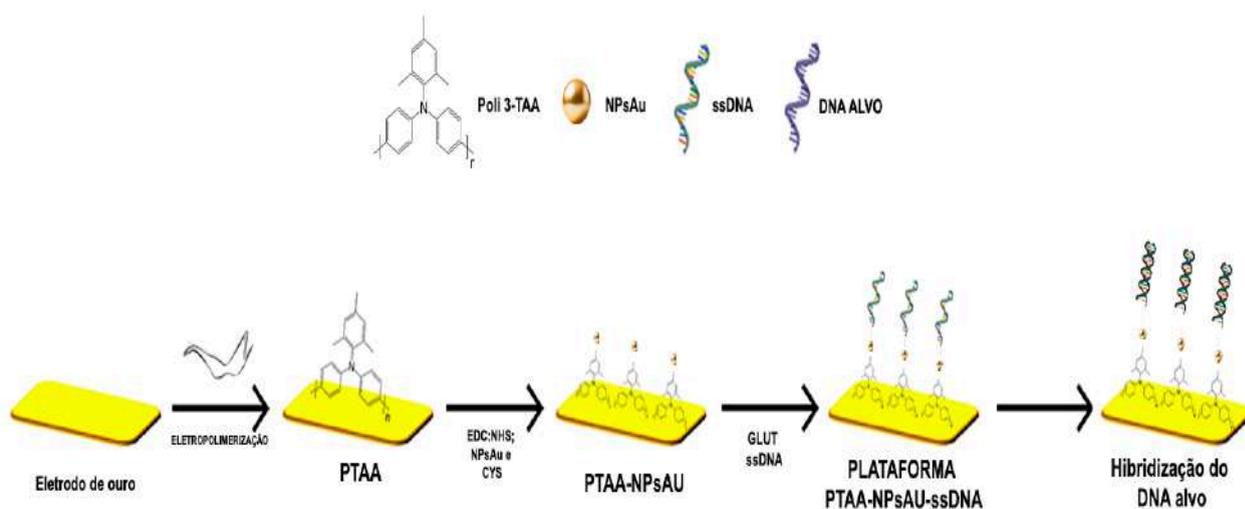
4.1 MATERIAIS

Ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) foram adquiridos da VETEC (Brasil). O ácido tetracloroaurico ($HAuCl_4$), o ácido (3-tiofeno) acético (TAA), o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e a N-hidroxisuccinimida (NHS) são obtidos na Sigma Aldrich Co. (St Louis, USA). A água ultrapura usada na preparação das soluções será obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q Plus (Billerica, EUA). Os materiais utilizados no estudo de bioatividade, como a sonda específica de DNA t(1;19), plasmídeos recombinantes – controles positivos e negativos - e os produtos de amplificação de PCR derivados de amostras clínicas de pacientes com leucemia contendo o gene quimérico TCF3-PBX1 foram fornecidos pela Profa. Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva, do Laboratório de Imunogenética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz (Recife, Brasil). Todas as amostras e sondas foram diluídas em solução de Tris-EDTA (pH 8.0, 10Mm) em água deionizada (Thermo Fisher) e foram mantidas congeladas.

4.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA PTAA-NpsAu-sondaTCF3-PBX1

O eletrodo de trabalho, com superfície de ouro, foi polido com alumina 0,5 μ m. Posteriormente, o eletrodo de trabalho foi levado a banho ultrassônico imerso em béquer com água deionizada durante 1 minuto. Em seguida, foi realizada a eletropolimerização do filme polimérico de PTAA, a partir de uma solução contendo ácido clorídrico a 1M e ácido 3-tiofeno acético. Através de técnica de voltametria cíclica, foram aplicados 20 ciclos de polimerização, com potencial variante de a -0.198 V a 1500 V e taxa de varredura de 50mV.s⁻¹. Após lavagem com água deionizada, foi feita a adição de 2 μ L do agente ativador EDC/NHS imobilizado por 10 minutos. Na próxima etapa, por 15 minutos, sobreposta ao agente ativador, foram adicionados 2 μ L da nanopartícula de ouro (NPSAu), durante 15 minutos. Ao fim desse intervalo, é feita a adição de 2 μ L da cisteamina (CYS) a 50mM, por 10 minutos. Em seguida, diante do eletrodo modificado com PTAA/AuNPs, o mesmo foi submetido à adição de Glutaraldeído a 1% por 10 minutos, seguido da adição da sonda t(1;19) - TCF3-PBX1 por 15 minutos, sendo formado o sistema PTAA-NMT-sondaTCF3-PBX1 (Figura 11).

Figura 11. Esquema representativo das etapas de montagem do biossensor. Fonte: Próprio autor (2024).



4.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS E ENSAIOS DE DETECÇÃO

Após a obtenção do sistema PTAA-NpsAu-sondaTCF3-PBX1, e lavagem com água deionizada, o eletrodo modificado pôde ser submetido aos ensaios de biodetecção. Os estudos de hibridação foram realizados com plasmídeos recombinantes contendo o oncogene quimérico TCF3-PBX1 e produtos de amplificação de PCR derivados de amostras clínicas de pacientes com leucemia, a fim de testar a capacidade de bioreconhecimento do genossensor. Já os testes de seletividade foram realizados com amostras de sequências de oligonucleotídeos não-complementar à sonda TCF3-PBX1. Nos ensaios, as amostras são submetidas a uma temperatura de 90°C por 90 segundos e têm 5 µL adicionados sobre a superfície sensora para promover o processo de biorreconhecimento. Por fim, para a comprovação e análise da biodetecção e bioseletividade serão feitas leituras eletroquímicas de CV e EIS.

4.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

A análise eletroquímica da adsorção de cada uma das camadas da plataforma foi feita através de um potenciostato/galvanostato, utilizando uma célula eletroquímica composta por 3 eletrodos, sendo um contra eletrodo de platina, um eletrodo de referência Ag/AgCl e um eletrodo de trabalho de disco de ouro, usando a solução de

ferro-ferricianeto de potássio, $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ (1:1), pH 7,4, responsável por estabelecer as trocas eletrolíticas com o meio. Foram realizadas análises de voltametria cíclica (CV), com potencial entre -0.2V e 0.7 e taxa de varredura de $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, nas quais é avaliada a corrente do sistema estabelecida através de uma variação de potencial, sendo analisada pelos picos de oxidação e redução. Na eletroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi aplicada uma faixa de frequência de 100mHz a 100 kHz e um potencial de 0.2 V. O software NOVA 1.11 foi utilizado no controle do galvanostato e na aquisição dos dados obtidos nas análises eletroquímicas, e o software Origin 6.0 para confecção dos gráficos.

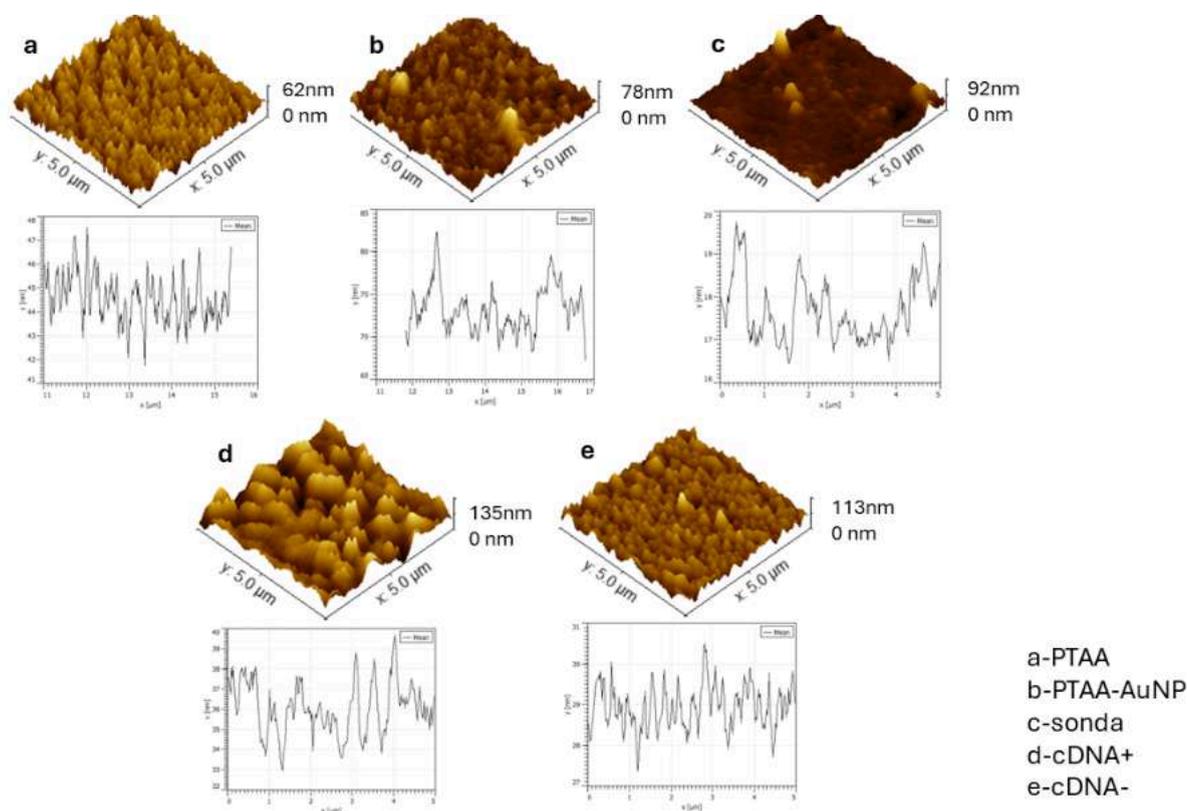
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PLATAFORMA PTAA-NpsAu-sondaTCF3-PBX1

5.1.1 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA

A microscopia de força atômica permitiu a caracterização da topografia tridimensional do eletrodo observada a nível atômico. As análises foram realizadas nas etapas de montagem do sensor e também em testes de validação e seletividade utilizando, respectivamente, amostras de controle positivas e negativas. As imagens obtidas estão representadas na Figura 12.

Figura 12. Topografia tridimensional via AFM referente à morfologia da superfície do eletrodo de trabalho nas etapas de construção e de testes com amostras. Em (A), a camada de PTAA; (B) referente à imobilização da nanopartícula de ouro; (C) representativo da imobilização da sonda oligonucleotídica de DNA; em (D) a imagem referente ao teste de validação com amostra positiva e em (E) visualização da etapa de especificidade com amostra negativa. Fonte: Próprio autor (2025).



Em 12A, é possível observar a topografia da superfície amostral após a formação do filme de PTAA, que atingiu um pico máximo de superfície de 62 nm. O padrão morfológico exibiu uma estrutura granular, compatível com a presença de grupamentos -COOH (Mousavi et al., 2021). Em 12B, a adição da nanopartícula causou uma leve alteração no perfil morfológico, conforme observado por Wood et al. (2024), que destacam que a inclusão de novas camadas resulta em um aumento na espessura da superfície e, conseqüentemente, em uma morfologia menos definida ou granular. Além disso, o pico máximo de superfície aumentou para 78 nm.

Na figura 12c, a imobilização do ssDNA t (1;19) foi confirmada pelo aumento do pico máximo de superfície para 92 nm e pela modificação do perfil morfológico, que passou a apresentar uma granulação menor. A adição da amostra clínica de DNA

complementar resultou em um aumento significativo de 42 nm no pico de superfície em relação ao genossensor, além de uma alteração considerável no perfil morfológico, que passou a exibir um padrão nodular, observado em 12D. Esse comportamento é explicado pelo estudo de Garcia et al. (2022), que atribui a formação de estruturas maiores e menos flexíveis à presença de oligonucleotídeos de dupla hélice, que são mais largas do que as sequências de fita simples.

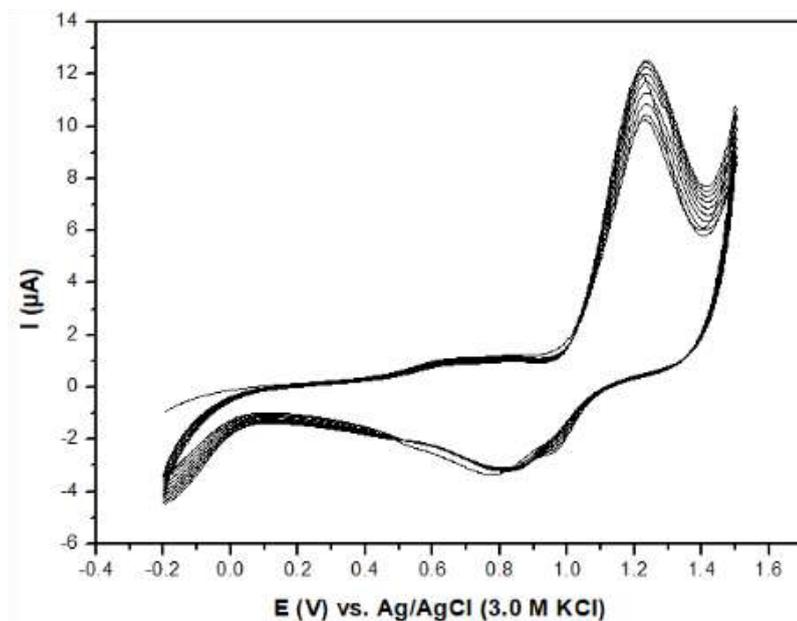
Na avaliação da amostra clínica de DNA não complementar (em 12E), foi identificado um aumento de 21 nm no pico de superfície, em comparação com o valor obtido na análise do genossensor. Esse valor foi 50% inferior ao aumento observado na amostra positiva de cDNA (Figura 12D). Além dessa diferença nos valores do pico de superfície, o teste negativo exibiu um padrão morfológico mais granular. Esses resultados indicam a ausência de hibridização na amostra negativa, demonstrando a boa especificidade da plataforma, capaz de distinguir sequências complementares de não complementares.

5.1.2 ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO ÁCIDO (3-TIOFENO) ACÉTICO

O processo de eletropolimerização para obtenção do filme de ácido 3-tiofeno acético ocorreu pela aplicação de 20 ciclos voltamétricos. A formação da camada automontada proporciona uma superfície de interações covalentes com biomoléculas. O gráfico obtido ao final do processo, representado na Figura 13, apresentou um comportamento representativo da formação do filme, visto que foram demonstrados elevados picos catódicos sucessivos, compatíveis com a formação de grupamentos carboxílicos (Mousavi et al., 2021).

Figura 13. Caracterização voltamétrica da eletropolimerização do ácido 3-tiofeno acético.

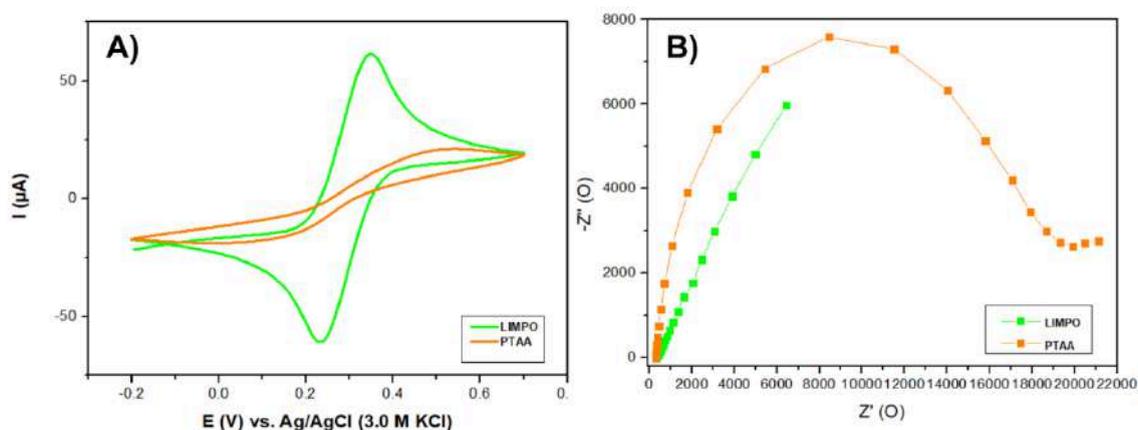
Fonte: Próprio autor (2024).



5.1.3 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR

O genossensor foi submetido a caracterização eletroquímica em todas as etapas de construção e, posteriormente, nos testes de validação, especificidade e interferentes. Inicialmente, foi feita a caracterização do eletrodo de trabalho nos processos de construção. Na figura 14, é possível observar os gráficos obtidos nas análises eletroquímicas antes e depois da eletropolimerização com obtenção do filme de ácido 3-tiofeno acético. Em 14A, o voltamograma referente ao eletrodo limpo aponta picos anódicos e catódicos bem definidos (Elgrishi et al., 2018). Em seguida, após a eletropolimerização, observa-se uma redução importante nesses picos, fenômeno que atesta a formação do filme de PTAA, visto que os grupamentos carboxílicos desse polímero em pH fisiológico apresentam cargas negativas, o que aumenta as forças de repulsão entre a superfície e as cargas de mesmo sinal presentes na sonda redox (Mousavi et al., 2021).

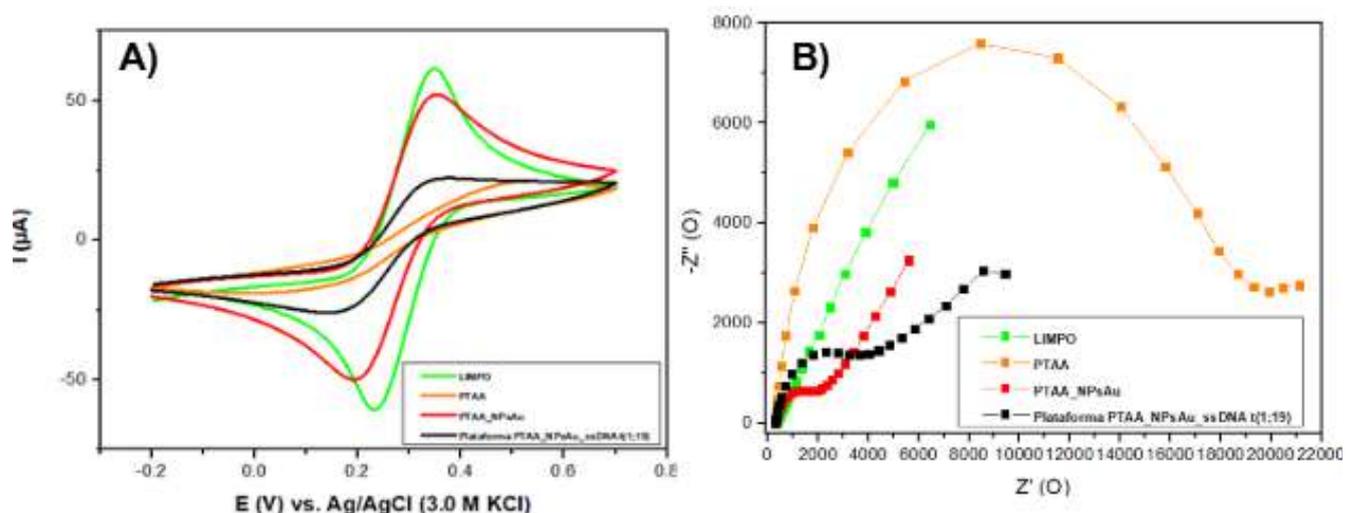
Figura 14. Análises de CV e EIS das etapas de construção do sistema: Voltamograma cíclico (A) e diagrama de Nyquist (B) antes e após a eletropolimerização do PTAA sobre o eletrodo de ouro



Em 14B, o eletrodo limpo é representado pela mínima formação de um semicírculo, o que representa uma baixa resistência à transferência de cargas (Laschuk et al., 2021). Isso acontece porque o eletrodo de trabalho é uma superfície de ouro, que apresenta boa condutividade. Em seguida, a análise feita após o processo de eletropolimerização revela uma formação bem sucedida do filme de PTAA pelo aumento da concentração de cargas negativas na superfície e, conseqüentemente, aumento das forças de repulsão. Assim, houve um aumento importante na resistência à transferência de cargas, que observamos através da elevação considerável do diâmetro do semicírculo (Garcia-Melo et al., 2022).

Os gráficos referentes à caracterização das camadas subsequentes estão representados na figura 15. A eletropolimerização é seguida pela imobilização da nanopartícula de ouro. Considerando as propriedades condutoras presentes nesse nanomaterial, a caracterização aponta para um aumento considerável das reações de óxido-redução na superfície do eletrodo (Li et al., 2023). Isso é observado com o crescimento dos picos anódicos e catódicos no voltamograma, em 14A. Já pela análise por EIS, o diâmetro do semicírculo (Fig. 14B) referente à adsorção da nanopartícula reduz drasticamente, já que, diante do aumento na condutividade, a transferência de cargas acontece de forma mais acentuada (Ribeiro et al., 2021).

Figura 15. Voltamograma cíclico (A) e diagrama de Nyquist (B) referentes às etapas seguintes de montagem: adsorção da nanopartícula de ouro após ativação por EDC:NHS, seguido de glutaraldeído, que proporciona a ligação covalente com a última camada do biossensor, referente à sonda oligonucleotídica. Fonte: Próprio autor (2024).



Em seguida, a sonda de DNA é imobilizada sobre a nanoestrutura metálica. Na análise voltamétrica dessa etapa, em 15A, é possível observar uma redução importante dos picos que representam as trocas redox. Isso acontece porque as cargas negativas dos grupamentos fosfato presentes na cadeia externa do DNA dificultam as trocas de elétrons entre a superfície de trabalho e a sonda redox, devido a um aumento nas forças de repulsão na interface (ZHANG et al., 2022). Em 15B, a caracterização por EIS dessa etapa permite observar um comportamento coerente com o obtido na voltametria cíclica. Observamos um aumento no diâmetro do semicírculo, reflexo de uma maior resistência à transferência de cargas pela presença das cargas negativas da sequência oligonucleotídica sobre o eletrodo de trabalho (Garcia et al., 2022).

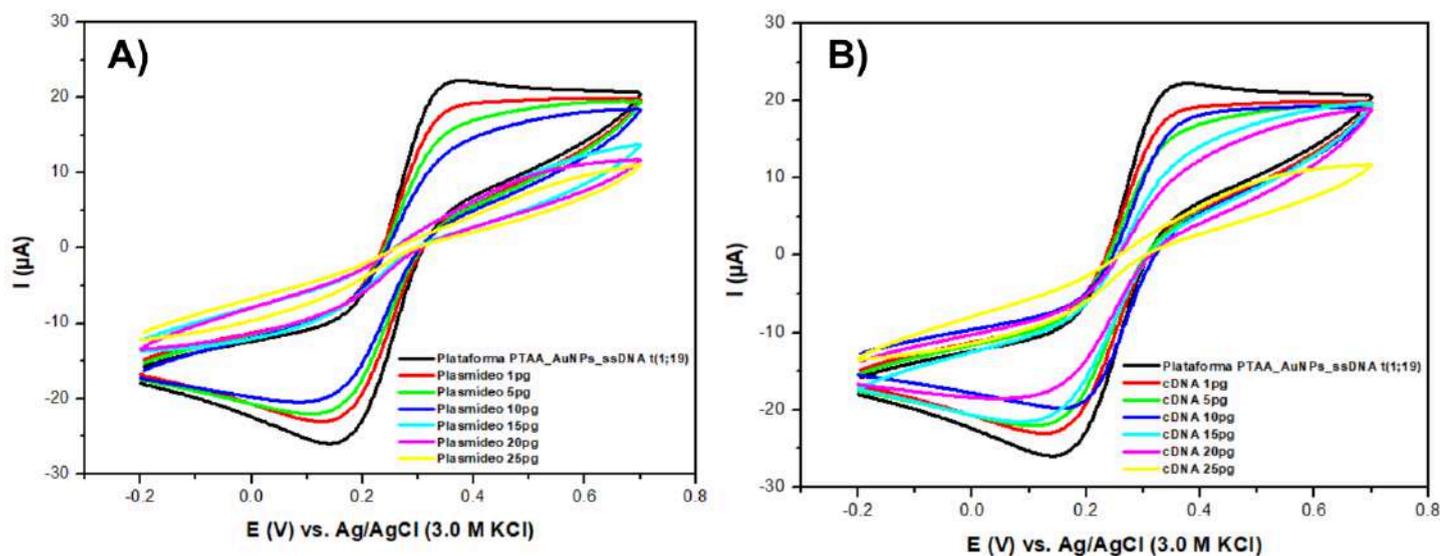
5.1.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ENSAIOS DE BIODETECÇÃO DA PLATAFORMA

Foram avaliadas amostras de controle positivo, compostas por plasmídeos bacterianos contendo o oncogene de interesse (TCF3-PBX1), nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20 e 25 pg/μL. Essas amostras permitiram realizar um estudo de validação e de sensibilidade da plataforma, com cada etapa sendo analisada por CV e EIS. Além disso,

foram realizados testes clínicos, que incluíram a imobilização de amostras de cDNA obtidas por RT-qPCR de pacientes com LLA positivos para a translocação 1;19, testadas nas mesmas concentrações das amostras plasmidiais previamente avaliadas.

As amostras de plasmídeos passam por etapas de purificação, portanto, são capazes de atuar como amostras de controle positivo. Por outro lado, as amostras de cDNA são obtidas por amplificação por RT-qPCR e podem conter resíduos de reagentes provenientes dos testes realizados. Portanto, é importante que ambos os tipos de amostras sejam testados no desenvolvimento do genossensor, a fim de validar, bem como avaliar a sensibilidade do dispositivo. Os gráficos de caracterização eletroquímica referentes a esse estudo estão apresentados nas figuras 16, voltamogramas, e 17, gráficos de Nyquist.

Figura 16. Caracterização por CV dos testes de validação da plataforma através de amostras de plasmídeos positivos para o oncogene TCF3-PBX1 em (A); Em (B), voltamograma referente ao teste de imobilização das amostras clínicas de cDNA. Fonte: Próprio autor (2024).



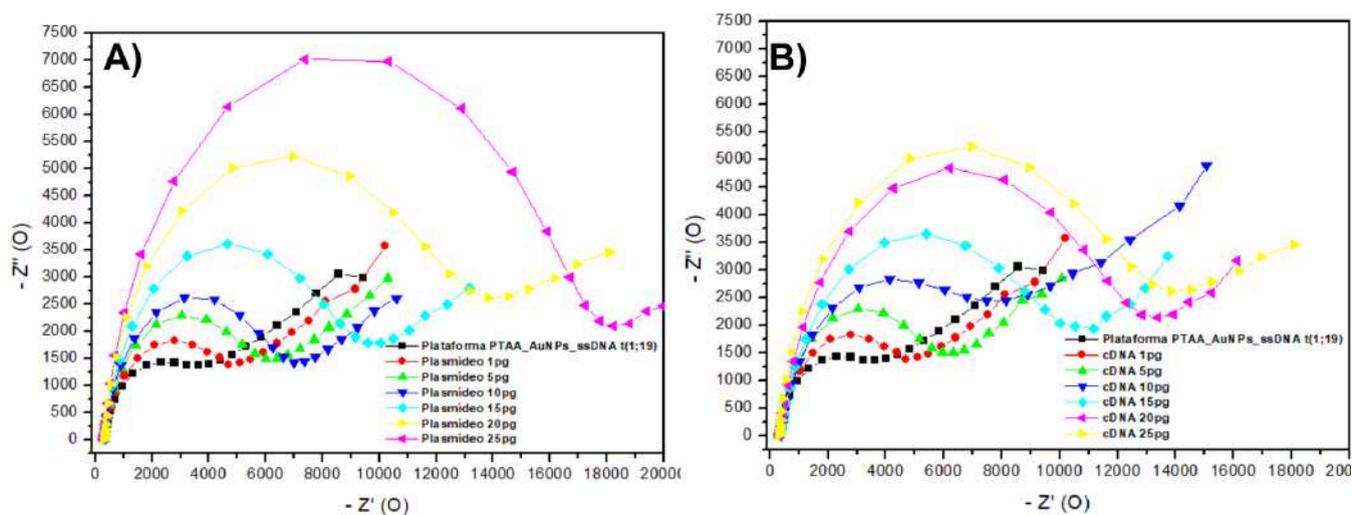
As reações de bioreconhecimento entre a sonda oligonucleotídica t(1;19) e o oncogene presente nas amostras positivas foram confirmadas pela técnica de Voltametria Cíclica, apresentou uma redução dos picos anódicos e catódicos nos voltamogramas observados na figura 16. Isso acontece, porque, uma vez formados os complexos de hibridização, há uma maior concentração de cargas negativas sobre o eletrodo de trabalho. Esse fenômeno faz com que forças de repulsão eletrostática atuem, de forma a reduzir as trocas iônicas entre a superfície do eletrodo e a sonda redox (Oliveira et al., 2023).

A diminuição das reações redox sobre o eletrodo é observada desde a adição da amostra menos concentrada (1pg/ μ L), o que reflete a sensibilidade do eletrodo pela capacidade de realizar a biodeteção formação da dupla hélice em uma amostra de baixa concentração. Além disso, à medida que a concentração do analito aumenta, observamos uma redução progressiva dos picos anódicos e catódicos. Isso é compatível com o comportamento observado no estudo realizado por Banerjee et al. (2020), e justifica-se pelo aumento progressivo de cargas negativas na superfície do eletrodo.

Na análise por espectroscopia de impedância eletroquímica, observa-se, na figura 17, uma variação na magnitude da resposta obtida, que se altera de acordo com o

aumento da impedância do sistema que a amostra hibridizada é capaz de gerar (Monteil; Casson; Jones, 2021).

Figura 17. Caracterização por EIS dos testes de validação da plataforma através de amostras de plasmídeos positivos para o oncogene TCF3-PBX1 em (A); Em (B), gráfico de Nyquist referente ao teste de imobilização das amostras clínicas de cDNA. Fonte: Próprio autor (2024).



O aumento do diâmetro do semicírculo dos gráficos de Nyquist, representativo da resistência à transferência de cargas, ou R_{ct} , foi observado desde a imobilização da amostra menos concentrada, que permite apontar o genossensor como um dispositivo de detecção sensível (Ribeiro et al., 2021). A elevação dessas medidas acontece de forma proporcional à concentração dos analitos de forma semelhante à observada na VC. Esse comportamento justifica-se pelo aumento progressivo das cargas negativas referentes ao grupamentos fosfatos presentes nos oligonucleotídeos, que gera uma inibição eletrostática da transferência de cargas elétricas na superfície (Garcia et al., 2022).

É possível observar uma ligeira discrepância na intensidade das respostas obtidas nos testes de controle positivo com amostras plasmidiais e nos ensaios clínicos com cDNA. Na adsorção de amostras de pacientes (Fig. 16B e 17B), é comum que haja a formação de ligações não específicas, enquanto as amostras plasmidiais (Fig. 16A e 17A) passam por processos de purificação. Assim, se ligam em maior escala à sequência oligonucleotídica, formando maior quantidade de complexos de hibridização (Oliveira et al., 2023).

5.1.5 ENSAIOS DE ESPECIFICIDADE E INTERFERENTES DA PLATAFORMA

A fim de testar a especificidade da plataforma, foram realizados testes com amostra não complementar, referente ao cDNA positivo para a translocação 12;21, na concentração de 25pg/ μ L. Também foram feitos estudos de analitos interferentes na plataforma, visto que alguns analitos podem ser identificados com respostas semelhantes às amostras nos dispositivos, portanto, é importante testar a especificidade das reações (Liu et al., 2020). O ácido ascórbico (1g/mL) foi o interferente testado que apresentou um comportamento consistente com as expectativas descritas na literatura, sem interferir nas trocas eletroquímicas do meio. Testes adicionais foram realizados com amostras de glicose, lactose e colesterol; no entanto, essas substâncias demonstraram uma resposta inesperada no eletrodo, o que levou à interrupção do estudo envolvendo esses interferentes. Na Tabela 1, é possível observar os resultados correspondentes à variação do RCT de acordo com as amostras analisadas.

Tabela 1. Dados numéricos obtidos no circuito de Randles após a caracterização impedimétrica. Fonte: Próprio Autor (2024).

MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE OURO	Rct (kΩ)	N	Q (μF)	%ΔRct
PTAA_NPsAu_ssDNA t(1;19)	5.05 ± 0.770	0.83 ± 0.046	2.153 ± 0.824	-
Genossensor - Plasmídeo 1pg/μL	4.78 ± 0.095	0.81 ± 0.817	1.77 ± 0.04	5,34
Genossensor - Plasmídeo 5pg/μL	5.67 ± 0.157	0.85 ± 0.003	1.39 ± 0.026	12,27
Genossensor - Plasmídeo 10pg/μL	6.72 ± 0.323	0.86 ± 0.001	1.39 ± 0.011	33,07
Genossensor - Plasmídeo 15pg/μL	8.33 ± 0.513	0.87 ± 0.002	1.1 ± 0.091	64,95
Genossensor - Plasmídeo 20pg/μL	12.83 ± 0.404	0.88 ± 0.005	1 ± 0.321	154,05
Genossensor - Plasmídeo 25pg/μL	17.63 ± 0.737	0.89 ± 0.002	1 ± 0.023	249,1
Genossensor - cDNA 1pg/μL	4.78 ± 0.095	0.82 ± 0.008	1.77 ± 0.04	5,34
Genossensor - cDNA 5pg/μL	5.52 ± 0.27	0.85 ± 0.003	1.36 ± 0.04	9,3
Genossensor - cDNA 10pg/μL	6.78 ± 0.944	0.84 ± 0.29	1.49 ± 0.369	34,25
Genossensor - cDNA 15pg/μL	9.11 ± 0.797	0.8 ± 0.036	1.79 ± 0.508	80,39
Genossensor - cDNA 20pg/μL	12.86 ± 0.929	0.87 ± 0.017	1.22 ± 0.217	144,75
Genossensor - cDNA 25pg/μL	13.2 ± 0.797	0.89 ± 0.002	1 ± 0.230	161,38
Genossensor - cDNA t(12;21) 25pg/μL	4.973 ± 0.179	0.82 ± 0.008	1.8 ± 0.026	1,58
Genossensor - Ácido ascórbico 1g/mL	5.7 ± 0.292	0.85 ± 0.003	1.91 ± 0.051	12,87

Os dados representados na tabela demonstram que o genossensor foi capaz de reconhecer as sequências compatíveis de DNA em diferentes concentrações. Isso porque a formação dos complexos de hibridização aumenta a concentração de cargas negativas na superfície, o que reduz a transferência de cargas por gerar maior repulsão entre o eletrodo e a sonda redox (Garcia et al., 2022).

Além disso, foi capaz de diferenciar as amostras não complementares, adsorvidas nos experimentos de especificidade (cDNA 12;21). A variação do Rct na análise da amostra negativa foi mínima em relação à plataforma previamente analisada. Assim, é possível apontar que as cargas negativas presentes no sistema durante a caracterização

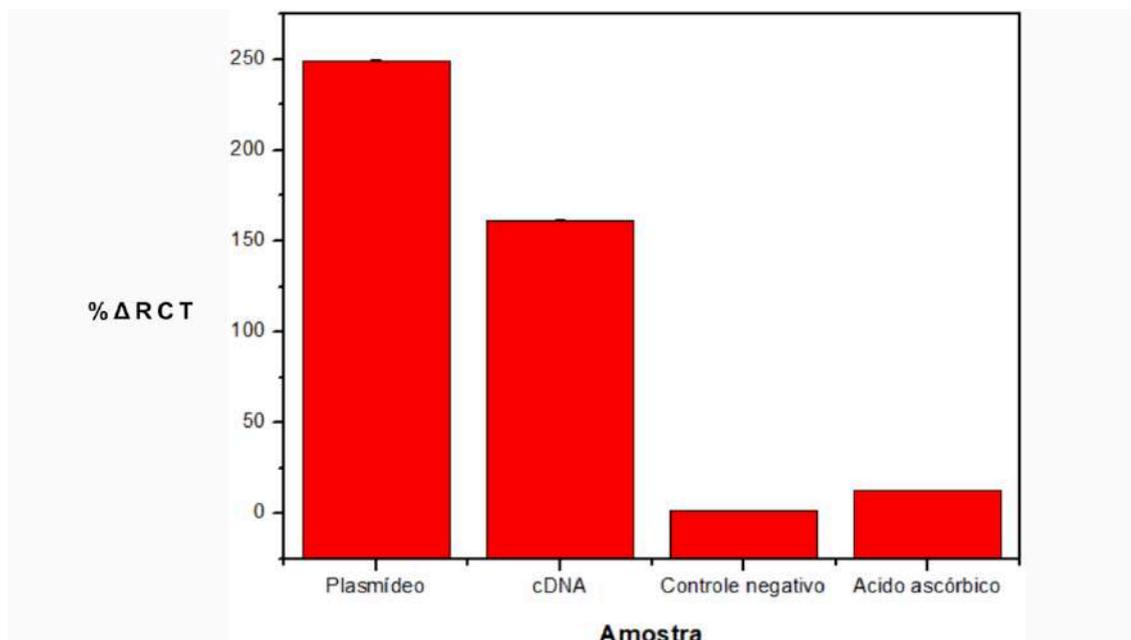
da sonda não sofreram aumento (Zhang et al., 2022). Com isso, é possível concluir que não foram formados os complexos de hibridização e, portanto, o sistema foi capaz de atuar com especificidade.

O ácido ascórbico é uma espécie de importante pesquisa entre os possíveis interferentes dos biossensores, visto que podem ser oxidados diretamente no eletrodo e afetar a atividade bioeletrocatalítica do dispositivo (Lielpetere, 2023). Diante disso, as análises eletroquímicas da plataforma durante os ensaios de interferentes com ácido ascórbico não revelaram alteração nas trocas redox nem na resistência à transferência de cargas. Assim, conclui-se que esse analito não afetou os processos eletroquímicos do genossensor e, portanto, não representa risco de interferir no seu processo de bioreconhecimento.

Dentre os elementos elétricos do circuito de Randles, verifica-se que o R_{ct} é o componente que responde às modificações que ocorrem na superfície do eletrodo. A magnitude do R_{ct} reflete a resistência à transferência de cargas como reflexo da quantidade de moléculas adsorvidas química ou fisicamente na interface do eletrodo. No estudo realizado, o R_{ct} apresentou aumento proporcional à concentração dos analitos testados. Isso se deu pelas interações de carga entre a superfície e a sonda redox. Esse comportamento pode variar de acordo com as propriedades de cada analito. Em adição, o elemento n é um componente do elemento de fase constante (CPE), que está intrinsecamente relacionado ao comportamento interfacial verificado no estudo. Elemento n acima de 0,5 reflete camadas adsorvidas com propriedades resistivas.

As análises de validação com plasmídeos e cDNA, bem como os ensaios de seletividade utilizando controle negativo e o estudo de interferentes com ácido ascórbico estão expostas na figura 18 em gráfico de barras referente à variação do R_{ct} no sistema. É possível observar que o genossensor possui um potencial de interação superior para o plasmídeo e cDNA, o que reflete a adequada hibridização entre as bases nitrogenadas (Oliveira et al., 2023). A baixa resistência relativa observada para a amostra negativa e o ácido ascórbico revelam que o sistema desenvolvido possui elevada especificidade de interação a analito específico. Para avaliar a reprodutibilidade e o desvio experimental padrão, os dados foram apresentados como resultado de três repetições realizadas para cada amostra.

Figura 18. Variação do RCT nos testes em triplicata das amostras de plasmídeo (25pg/ μ L), cDNA (25pg/ μ L), controle negativo 12;21 (25pg/ μ L) e ácido ascórbico (1g/mL). Fonte: Próprio Autor (2024).



6. CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um genossensor eletroquímico baseado em filme polimérico de ácido 3-tiofeno acético (PTAA) e nanoestruturas de ouro associados a sequência oligonucleotídica referente à translocação entre os cromossomos 1 e 19. A eletropolimerização permitiu que o PTAA fornecesse grupamentos carboxílicos na superfície, ativados pelo EDC:NHS, possibilitando ligações amida com a nanopartícula de ouro, funcionalizada com cisteamina. A capacidade condutora desses dois compostos aumentou a superfície de contato e facilitou a passagem de corrente elétrica sobre a plataforma de trabalho. O glutaraldeído promoveu a ligação entre a nanopartícula e a sonda (ssDNA) funcionalizada com grupamento amina. Essa fita simples de DNA atuou como elemento de reconhecimento na plataforma. Todas as etapas de construção, bem como os ensaios de validação, especificidade e interferentes foram caracterizadas através das técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). O sensor foi exposto a ensaios de biodeteção com a imobilização de amostras plasmidiais positivas para o oncogene e de amostras clínicas de pacientes com leucemia, ambos os tipos de amostra testados em 5 concentrações diferentes. Foi possível observar a detecção bem sucedida desses analitos através da análise dos dados

obtidos pela caracterização eletroquímica. O aumento do raio do semicírculo na EIS e a redução dos picos anódicos e catódicos na CV diante da exposição do sensor às amostras positivas ocorreu de forma proporcional ao aumento das concentrações. Esse comportamento indicou a ocorrência da reação de hibridização entre sonda e analito. Além disso, foi testada a especificidade da plataforma pela adsorção de uma amostra referente a outra translocação, 12;21, e a capacidade do ácido ascórbico de interferir na análise feita pelo sensor. Como resposta, o sistema desenvolvido apresentou boa especificidade, demonstrada pelo baixo sinal eletroquímico após interação do sistema com amostra negativa, sendo o mesmo comportamento também observado no ensaio de interferência. Frente aos dados obtidos, o genossensor apresentado revela-se um instrumento inovador na identificação de oncogenes de interesse clínico, capaz de superar limitações apresentadas por métodos tradicionais de diagnóstico.

REFERÊNCIAS

FREITAS, A. et al. Leucemias: Um Breve Histórico. **ANAIS DA ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA**, 2022. p. 111–120. v. 193, n. 2.

ALLEGRA, A. et al. Electrochemical Biosensors in the Diagnosis of Acute and Chronic Leukemias. **CancersMDPI**, 1 jan. 2023.

ANDRIUKOV, B. G. et al. Biosensor technologies in medicine: From detection of biochemical markers to research into molecular targets (review). **Sovremennye Tehnologii v Medicine**, v. 12, n. 6, p. 70–83, 2020.

AVELINO, Karen YPS et al. Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. 113249, 2020.

AVELINO, K. Y. P. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for chronic myelocytic leukemia based on hybrid nanostructure. **Bioelectrochemistry**, v. 147, 1 out. 2022.

AYDIN, E. B.; AYDIN, M.; SEZGINTÜRK, M. K. Construction of succinimide group substituted polythiophene polymer functionalized sensing platform for ultrasensitive detection of KLK 4 cancer biomarker. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 325, p. 128788, dez. 2020.

BANERJEE, S. et al. Electrochemical Detection of Neurotransmitters. **BiosensorsMDPI**, , 1 ago. 2020.

BIAN, K. et al. Scanning probe microscopy. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 1, n. 1, p. 36, 13 maio 2021.

BURMEISTER, T. 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, 2023.

BUTTERWORTH, Adrian et al. SAM composition and electrode roughness affect performance of a DNA biosensor for antibiotic resistance. **Biosensors**, v. 9, n. 1, p. 22, 2019.

CESEWSKI, E. et al. Electrochemical biosensors for pathogen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier Ltd, [s.l.], v. 159, p. 112214, 1 jul. 2020.

CHENNAMADHAVUNI A. et al. Leukemia. **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025

CHIORAZZI, N. et al. Chronic Lymphocytic Leukemia. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 11, 1 Feb. 2021.

CHRZANOWSKA, N. M.; KOWALEWSKI, J.; LEWANDOWSKA, M. A. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) in diagnosis and tailored therapies in solid tumors. **MoleculesMDPI AG**, 1 abr. 2020.

CHUPRADIT, S. et al. Various types of electrochemical biosensors for leukemia detection and therapeutic approaches. **Analytical BiochemistryAcademic Press Inc.**, 1 out. 2022.

ELGRISHI, Noémie et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.

FAN, Y.-F.; GUO, Z.-B.; GE, G.-B. Enzyme-Based Biosensors and Their Applications. **Biosensors**, v. 13, n. 4, p. 476, 14 abr. 2023.

GARCIA-MELO, L. et al. "Development of a Nanostructured Electrochemical Genosensor for the Detection of the K-ras Gene." **Journal of analytical methods in chemistry** vol. 2022 6575140. 17 out. 2022.

GERALDO, Jony & Montañó Valencia, Carlos USO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER: DA RADIOTERAPIA À TERAPIA GENÉTICA. **Mário Penna Journal**. 1. 18-33. 2023.

GÖZDAŞOĞLU, S. Infant Leukemia. *Leukemia*, edited by Weijie Li, **Exon Publications**, 16 October 2022.

HAMMOND, K.; RYADNOV, M. G.; HOOGENBOOM, B. W. Atomic force microscopy to elucidate how peptides disrupt membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1863, n. 1, p. 183447, jan. 2021.

HARSHITHA, R.; ARUNRAJ, D. R. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 49, n. 5, p. 800–812, 1 set. 2021.

HOLUIGUE, H. et al. Force Sensing on Cells and Tissues by Atomic Force Microscopy. **Sensors**, v. 22, n. 6, p. 2197, 11 mar. 2022.

HUANG, F. L. et al. Pathogenesis of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: Molecular pathways and disease treatments (Review). **Oncology Letters**, v. 20, n. 1, p. 448–454, 1 jul. 2020.

INABA, H.; PUI, C. H. Advances in the diagnosis and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 9, 1 maio 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2023. ISBN 978-65-88517-10-9. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>>.

LASCHUK, N. al. Reducing the resistance for the use of electrochemical impedance spectroscopy analysis in materials chemistry. **RSC advances**, v. 11, p. 27925-27936. 18 Aug. 2021.

LE, C. VAN; YOON, H. Advances in the Use of Conducting Polymers for Healthcare Monitoring. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 3, p. 1564, 26 jan. 2024.

LI, C.-H. et al. Gold Nanoparticles as a Biosensor for Cancer Biomarker Determination. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 364, 2 jan. 2023.

LIELPETERE, A. et al. Cross-Linkable Polymer-Based Multi-layers for Protecting Electrochemical Glucose Biosensors against Uric Acid, Ascorbic Acid, and Biofouling Interferences. **ACS sensors** v. 8,4. 2023.

LIU, Y. et al. Tuning Biosensor Cross-Reactivity Using Aptamer Mixtures. **Analytical chemistry** vol. 92,7, 2020.

LUO, L. Recent Advances in Functional Nanomaterials for Electrochemical Sensors and Biosensors. **Molecules**, v. 28, n. 19, p. 6798, 25 set. 2023.

LUCENA R.P., Impedimetric genosensor based on graphene nanoribbons for detection and identification of oncogenic types of human papillomavirus. **J Chem Technol Biotechnol**, 96: 1496-1503. 2021.

MAY-HAU, D. I. et al. Underexpression of LINC00173 in TCF3/PBX1-Positive Cases Is Associated With Poor Prognosis in Children With B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2022.

MINCIACCHI, V. et al. Chronic Myeloid Leukemia: A Model Disease of the Past, Present and Future. **Cells** vol. 10,1 117. 10 Jan. 2021.

MONTEIL, S.; CASSON, A. J.; JONES, S. T. Electronic and electrochemical viral detection for point-of-care use: A systematic review. **PLoS ONE Public Library of Science**, , 1 set. 2021.

MOUSAVI, S. et al. "Recent Advancements in Polythiophene-Based Materials and their Biomedical, Geno Sensor and DNA Detection." **International journal of molecular sciences** vol. 22,13 6850. 25 Jun. 2021.

NARESH, V.; LEE, N. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. **Sensors** (Switzerland)MDPI AG, , 2 fev. 2021.

OLIVEIRA, L. 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, 25 out. 2023.

PILZ, F. H.; KIELB, P. Cyclic voltammetry, square wave voltammetry or electrochemical impedance spectroscopy? Interrogating electrochemical approaches for the determination of electron transfer rates of immobilized redox proteins. **BBA Advances**, v. 4, 1 jan. 2023.

RIBEIRO, D. et al. Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais**. v. 8, p. 529-546. 2015.

RIBEIRO, K. L. et al. IMPEDIMETRIC CLAVMO PEPTIDE-BASED SENSOR DIFFERENTIATES PLOIDY OF CANDIDA SPECIES. **Biochemical Engineering Journal**, v. 167, 1 mar. 2021.

ROZMAN, M. et al. A HepG2 Cell-Based Biosensor That Uses Stainless Steel Electrodes for Hepatotoxin Detection. **Biosensors**, v. 12, n. 3, p. 160, 4 mar. 2022.

SMUTOK, O.; KATZ, E. Biosensors: Electrochemical Devices—General Concepts and Performance. **Biosensors**, v. 13, n. 1, p. 44, 28 dez. 2022.

SUNG, H. 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, maio 2021.

TEBBI, C. K. Etiology of acute leukemia: A review. **CancersMDPI**, , 1 maio 2021.

TORRES, B. B. M. Filmes finos do ácido poli 3-tiofeno acético. **São Carlos: Universidade de São Paulo**, 1 fev. 2012.

WOOD, Jonathan et al. AFM for Nanomechanical Assessment of Polymer Overcoatings on Nanoparticle-Decorated Biomaterials. **Nanomaterials** (Basel, Switzerland) vol. 14,18 1475. 11 set. 2024.

XIA, F.; YUCEF-TOUMI, K. Review: Advanced Atomic Force Microscopy Modes for Biomedical Research. **Biosensors**, v. 12, n. 12, p. 1116, 2 dez. 2022.

ZHANG W, et al. Rapid electrochemical quantification of trace Hg²⁺ using a hairpin DNA probe and quantum dot modified screen-printed gold electrodes. **RSC Adv.** 2022

ZHANG, Z. et al. Carbon Material Based Electrochemical Immunosensor for Gastric Cancer Markers Detection. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 31 ago. 2021.

ZHOU, M. et al. Development and Evaluation of a Leukemia Diagnosis System Using Deep Learning in Real Clinical Scenarios. **Frontiers in Pediatrics**, v. 9, 24 jun. 2021.