

UFSCar – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CCET – CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DQ – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
Trabalho de Conclusão de Curso

Ronewalber Balboena Gomes

**Uma breve contextualização dos biossensores
eletroquimiluminescentes voltados para a área clínica e seus
princípios**

2024

São Carlos

Ronewalber Balboena Gomes

**Uma breve contextualização dos biossensores
eletroquimiluminescentes voltados para a área clínica e seus
princípios**

Trabalho de conclusão de curso
apresentada ao Departamento de
Química da Universidade Federal de
São Carlos, para obtenção do título de
Bacharel em Química

Orientador(a): Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

2024

São Carlos

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS****DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQ/CCET**

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905

Telefone: (16) 33518206 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 35/2024/DQ/CCET

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso**Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)****FOLHA DE APROVAÇÃO****RONEWALBER BALBOENA GOMES****UMA BREVE CONTEXTUALIZAÇÃO DOS BIOSSENSORES ELETROQUÍMILUMINESCENTES VOLTADOS PARA A ÁREA CLÍNICA E SEUS PRINCÍPIOS****Trabalho de Conclusão de Curso****Universidade Federal de São Carlos – Campus São Carlos**

São Carlos, 09 de setembro de 2024

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria
Membro da Banca 1	Prof. Dr. Odair Donizeti Leite
Membro da Banca 2	Dr. Gabriel Henrique Ribeiro

Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Samuel Schwab, Professor(a)**, em 12/09/2024, às 11:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **1580194** e o código CRC **F6F5BC3E**.**Referência:** Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.001933/2024-38

SEI nº 1580194

Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos que constituem minha base e formação como homem, pois são meus exemplos de apoio de toda a vida.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à minha família por todo o apoio e carinho que me proporcionaram durante toda a vida. Principalmente aos meus pais, Luciana e Valdair, pelo apoio leal e intenso, principalmente durante os anos de graduação que permaneci distantes fisicamente deles, mas foi possível fortalecê-los ainda mais durante todas as voltas para casa.

Agradeço aos meus irmãos, Renato e Roberwal, por toda a convivência e experiências compartilhadas, pois tenho certeza de que aprendemos muito juntos e mesmo que não tenhamos tanto contato eu sei que posso confiar em cada um.

Agradeço a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela oportunidade de realizar minha formação superior, em especial, aos docentes do Departamento de Química, principalmente, ao professor Ronaldo e ao professor Kleber por me receber em seus laboratórios de pesquisa, aos outros pelo conhecimento e aprendizado durante todas as disciplinas da graduação, por estarem dispostos a ensinar e compartilhar seus ensinamentos.

Meus agradecimentos para todos os meus amigos de São Carlos e Novo Horizonte pela amizade, carinho e respeito. Por passarem comigo diversas experiências e momentos juntos garantindo assim tantas risadas em boas situações quanto suporte em momentos ruins.

Por último, agradeço a todos que participaram e contribuíram comigo de alguma forma por esses últimos anos.

Resumo

A eletroquimiluminescência (ECL) surgiu na segunda metade do século 20, mas só foi abordada no contexto de biossensores décadas depois. As pesquisas voltadas aos biossensores ECL tem ganhado força nos últimos anos com o crescente desejo de realizar a detecção de patógenos e biomarcadores. O biossensores em sua maioria ainda estão presentes apenas no âmbito acadêmico. Diante desse contexto, um crescente número de biossensores estão sendo desenvolvidos e reportados, novas abordagens e modificações contribuem significativamente para a melhora do dispositivo diante dos diversos analitos envolvidos como RNA, DNA, enzimas, proteínas ou antígenos. Portanto, expor brevemente quais são os princípios gerais que fundamentam os biossensores ECL, os desafios enfrentados e apresentar alguns exemplos de abordagens relatadas na literatura são comentados nesse trabalho.

Abstract

Electrochemiluminescence (ECL) emerged in the second half of the 20th century but was only addressed in the context of biosensors decades later. Research focused on ECL biosensors has gained momentum in recent years with the growing desire to detect pathogens and biomarkers. Most biosensors are still present only in the academic field. In this context, a growing number of biosensors are being developed and reported, new approaches and modifications contribute significantly to the improvement of the device in view of the various analytes involved, such as RNA, DNA, enzymes, proteins or antigens. Therefore, this work briefly explains the general principles that underlie ECL biosensors, the challenges faced and presents some examples of approaches reported in the literature.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Publicações nas áreas de biossensor ECL	11
Figura 2 - Estrutura do 9,10-Difenilantraceno e rubreno	13
Figura 3 - Estrutura do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	13
Figura 4 - Proposta de mecanismo para $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	14
Figura 5 - Proposta de mecanismo ECL envolvendo TPA e $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	15
Figura 6 - esquema com os mecanismos dos estados singleto e tripleto.....	16
Figura 7 - Esquema de biossensor ECL no formato sanduíche.....	17
Figura 8 - Divisão esquemática dos ensaios.....	17
Figura 9 - Esquema de biossensor ECL competitivo	18
Figura 10 - Esquema de biossensor ECL sanduíche	18
Figura 11 - Biossensor para IL-6 e PSA desenvolvido	19
Figura 12 - Biossensor de microarrajós para VEGF, IL-8 e TIMP-1	20
Figura 13 - Esquema de um biossensor uma camada de surfactante por cima do eletrodo	21

Lista de Siglas e Abreviações

DPA	<i>9,10-Difenilantraceno</i>
ECL	<i>eletroquimiluminescência</i>
MLCT	<i>capacidade de transferência de carga metal-ligante</i>
RT-PCR	<i>cadeia da polimerase por transcrição reversa em tempo real</i>
RUB	<i>rubreno</i>
TPA	<i>tripropilamina</i>

Sumário

Introdução	11
Eletroquimiluminescência	13
Mecanismo <i>Annihilation</i> para ECL.....	14
Mecanismo <i>Coreactant</i> para ECL.....	14
Biossensores	16
Método Competitivo	18
Método Sanduíche.....	18
Aperfeiçoando os biossensores ECL.....	19
Considerações Finais	23
Referências Bibliográficas	24

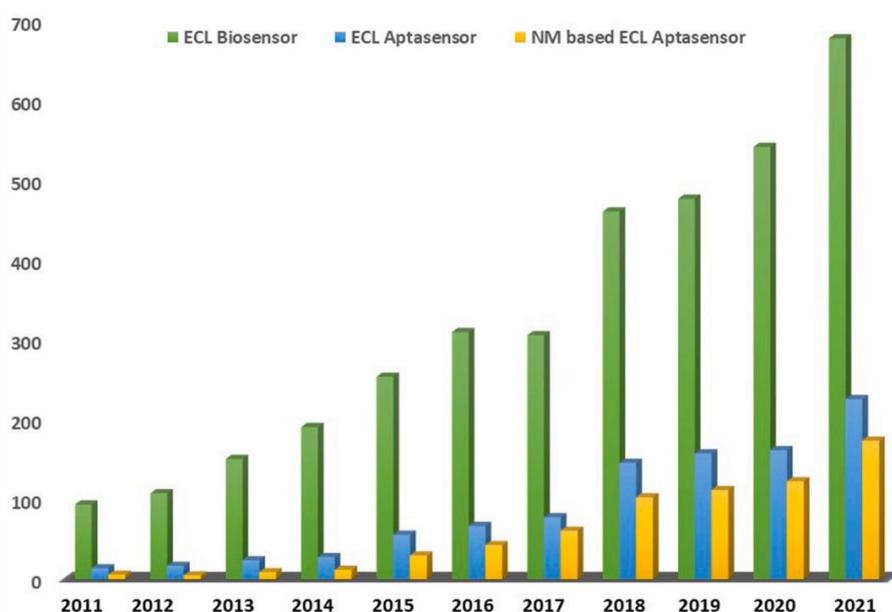
INTRODUÇÃO

Os biossensores já fazem parte de dezenas de setores em nosso cotidiano, sendo aplicados extensivamente para controle de qualidade de alimentos, solos, águas, para a descoberta de toxinas e drogas e, principalmente, no diagnóstico de doenças^{1,2}. O desenvolvimento de técnicas de detecção de patógenos/biomarcadores é crucial para atender os pacientes e realizar um diagnóstico mais imediato, nesse contexto, os biossensores no geral vem demonstrando ótimos resultados, sendo um método prático, rápido e barato, como já é relatado na literatura algumas propostas de biossensores de diferentes tipos para a detecção doenças como Covid-19³ e cancer⁴ ou infecções como a gripe⁵.

Os biomarcadores recebem grande destaque quando se trata de realizar o diagnóstico de pacientes, tais compostos biológicos são produtos consequentes de processos bioquímicos no corpo e podem indicar um processo patológico, uma resposta farmacológica ou um processo dentro da normalidade, a quantificação desses compostos também é fundamental para atribuir um grau de risco ao indivíduo, assim auxiliando médicos no dia a dia⁶.

A introdução da eletroquimiluminescência no âmbito dos biossensores tem se tornado uma ferramenta adicional para a técnica. Recentemente, Chitra e colaboradores reportaram um panorama geral das pesquisas na área de biossensores ECL tanto no geral (barra verde) como alguns envolvendo também a utilização de aptâmeros em sua funcionalidade (barra azul e amarela) como é exposto na figura 1⁷.

Figura 1 - Publicações nas áreas de biossensor ECL⁷



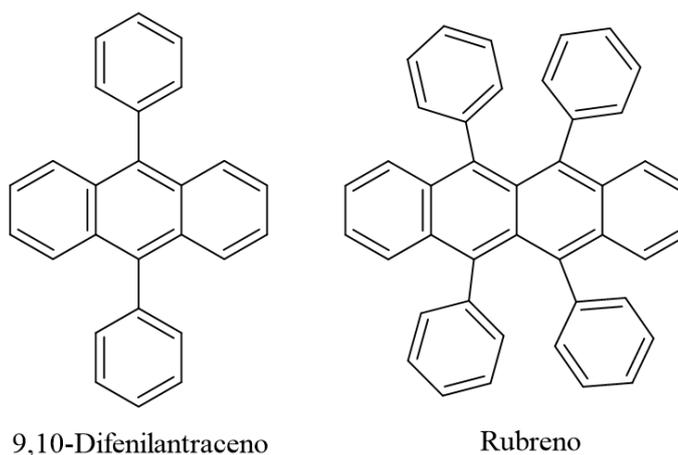
O número cada vez mais crescente de artigos nessa área acarreta diversas abordagens e modificações para a melhora das técnicas. Muitas das pesquisas relatadas nessa área envolvem a

detecção de biomarcadores como anticorpos, antígenos, enzimas, proteínas, DNA e RNA são exemplos usuais de biomarcadores. Desse modo, desenvolver mecanismos para quantificar seletivamente esses biomarcadores pode ser peça chave para o diagnóstico diferencial. A quantificação de biomarcadores por meio da emissão de luminosidade em amostras tem se mostrado com grande potencial, exemplos de biossensores com baixos limites de detecção já podem ser encontrados na literatura, portanto, seus princípios gerais e alguns exemplos de artigos publicados na área são abordados nesse trabalho.

ELETROQUIMILUMINESCÊNCIA

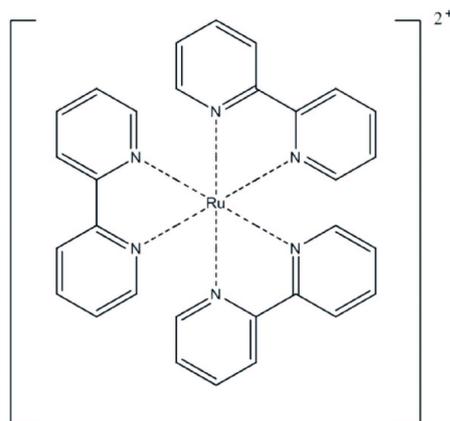
A *eletroquimiluminescência* (ECL) é o processo de geração de luminóforos excitados por meio da transferência eletrônica via eletrodos⁸. O termo foi reportado pela primeira vez na literatura em meados de 1964, os trabalhos envolviam a aplicação de tensões e correntes nas superfícies de eletrodos em contato com os compostos orgânicos rubreno (RUB) e 9,10-Difenilantraceno (DPA) para a geração de luz, suas estruturas podem ser observadas abaixo na figura 2.

Figura 2 - Estrutura do 9,10-Difenilantraceno e rubreno



Quase 10 anos depois, Tokel e colaboradores notaram que os compostos reportados possuíam alto grau de conjugação eletrônica e estudaram a possibilidade de empregar ligantes (piridinas e triazinas) com essa mesma propriedade em complexos com Rutênio⁹. Um dos complexos estudados pode ser visualizado abaixo na figura 3, o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ envolvendo ligantes bipyridina (bpy).

Figura 3 - Estrutura do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$



Essas refletiram na geração de um grande interesse em entender como esses processos ocorriam, quais compostos tinham essa capacidade de emitir luz, o motivo pelo qual isso ocorria, quais eram os mecanismos reacionais envolvidos na ECL bem como poderiam aprimorá-los. Com

estudos posteriores, foram desenvolvidos outros diversos luminóforos¹⁰ e propostas dos mecanismos reacionais, desse modo, destaca-se dois mecanismos: *Annihilation* e *Coreactant*.

Mecanismo *Annihilation* para ECL

No mecanismo chamado como *annihilation* somente o composto eletroquimiluminescente interage com o eletrodo para a excitação. Estudos demonstram que a luminescência de DPA, RUB e $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ podem ocorrer via esse mecanismo¹¹. A partir da aplicação de pulsos alternados de potencial é possível gerar espécies oxidadas (eq. 1) e reduzidas (eq. 2) do complexo de rutênio na superfície do eletrodo que, posteriormente, reagiram entre si produzindo uma espécie no estado fundamental e uma espécie no estado excitado (eq. 3) e, por fim, a luminescência foi notada com o decaimento para o estado fundamental da espécie excitada (eq. 4). A sequência de reações envolvidas pode ser acompanhada com a figura 4.

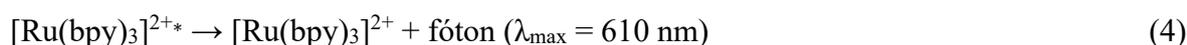
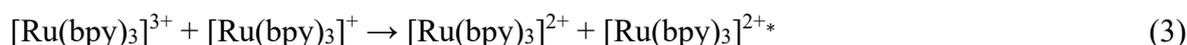
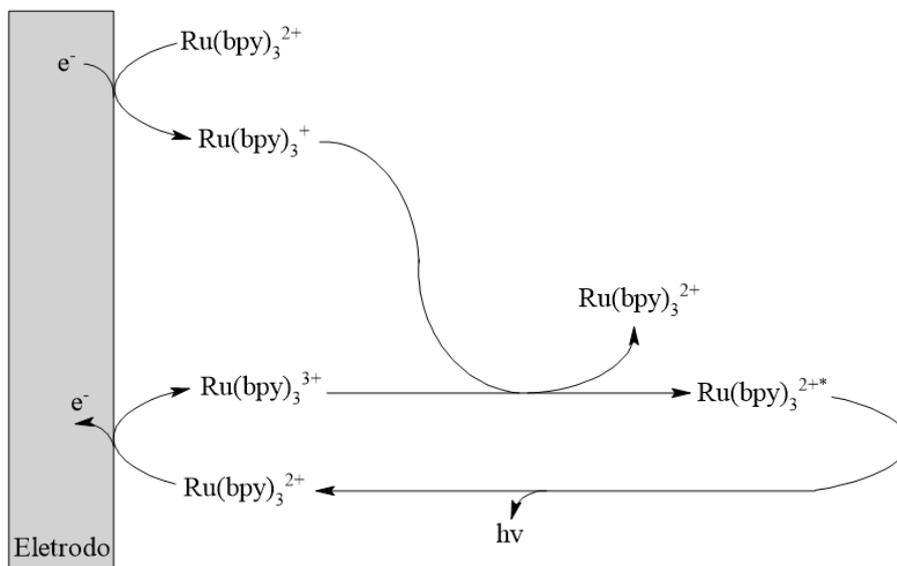


Figura 4 - Proposta de mecanismo para $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$



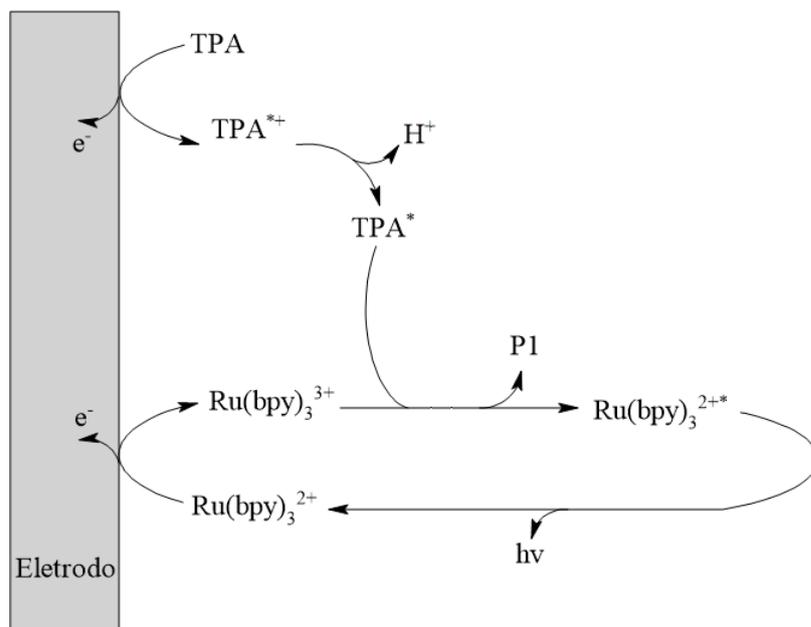
Estudos complementares estimaram os potenciais de cada uma das reações (oxidação e redução) com voltametria cíclica.

Mecanismo *Coreactant* para ECL

Diferentemente do mecanismo anterior, implementa-se aqui a utilização de um correagente para a transferência eletrônica na superfície do eletrodo. A tripropilamina (TPA) vem

sendo empregada rotineiramente como um reagente de sacrifício para gerar o estado excitado do complexo de rutênio como pé apresentado na figura 5.

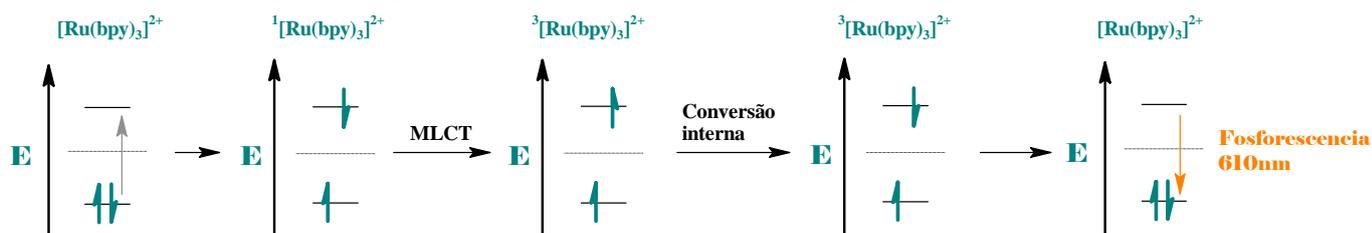
Figura 5 - Proposta de mecanismo ECL envolvendo TPA e $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.⁵



A vantagem em utilizar um correagente para promover a ECL é, principalmente, realizar todo o mecanismo no mesmo eletrodo e sem alternar os potenciais aplicados, pois tanto o TPA quanto o complexo de rutênio oxidam juntos na superfície, outra vantagem é poder realizar o ensaio em meio aquoso, o que facilita a solubilidade/estabilidade de moléculas biológicas¹². Além disso, vale destacar sobre a energia livre dessas reações, as ECLs tendem a serem altamente exergônicas, ou seja, liberam energia para o meio reacional, no caso de TPA e $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ o ΔG aproxima-se de -2,3 eV, facilita a excitação do composto luminescente.

O $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ possui uma propriedade interessante que é a capacidade de transferência de carga metal-ligante (MLCT), a conjugação eletrônica dos ligantes bipyridina com os orbitais do rutênio chamou a atenção de pesquisadores, pois possuem a capacidade de gerar um estado tripleto e, portanto, promovendo a fosforescência como é apresentado na figura 6. Como há inversão do spin do elétron excitado, isso demanda uma nova conversão interna para finalmente ocorrer a emissão energética e retornar ao estado fundamental, portanto, todo o mecanismo possui um tempo de vida mais prolongado, isso impacta diretamente na facilidade de realizar a detecção da luminosidade¹³.

Figura 6 - esquema com os mecanismos dos estados singlete e tripleto¹⁴.



Bhasikuttan e colaboradores desenvolveram um estudo sobre a fosforescência desse complexo em diferentes solventes e comparando parâmetros como difusão da luz em diferentes soluções¹³.

Além disso, outros fatores podem impactar diretamente nos mecanismos ECL como, pH do meio, a concentração do correagente e rutênio, composição do eletrodo, utilização de surfactante e hidrofobicidade na superfície do eletrodo¹⁵.

BIOSSENSORES

Os biossensores são dispositivos analíticos que receberam boa atenção nos últimos anos. Com grande avanço e desejo de combater as doenças da atualidade como as várias doenças infecciosas, fisiológicas etc., os biossensores prometem ser uma ferramenta para talvez ajudar no diagnóstico precoce de doenças ou complicações e, assim, possibilitando uma triagem mais imediata¹⁶.

Biossensores podem ser classificados como um subgrupo dos sensores químicos e sua principal característica consiste na alta seletividade biológica que apresentam¹⁷. Os biossensores são classificados pelo tipo de elemento de afinidade que possuem para seletividade, por exemplo, há biossensores ECL com anticorpo para o caso do analito ser um antígeno ou sondas para a detecção de DNA ou RNA¹⁸.

De modo geral, os biossensores são definidos como um dispositivo analítico que converte um determinado sinal gerado por um evento eletroquímico que foi derivado de um evento biológico próximo ao eletrodo. O evento eletroquímico é a geração de um sinal físico-químico que, posteriormente, será transformada em um sinal mensurável, em casos de sensores ópticos, a transformação da intensidade de luz emitida durante o ensaio para a determinação da concentração do analito. O evento biológico é o analito sendo capturado na superfície do eletrodo pelo elemento de afinidade.

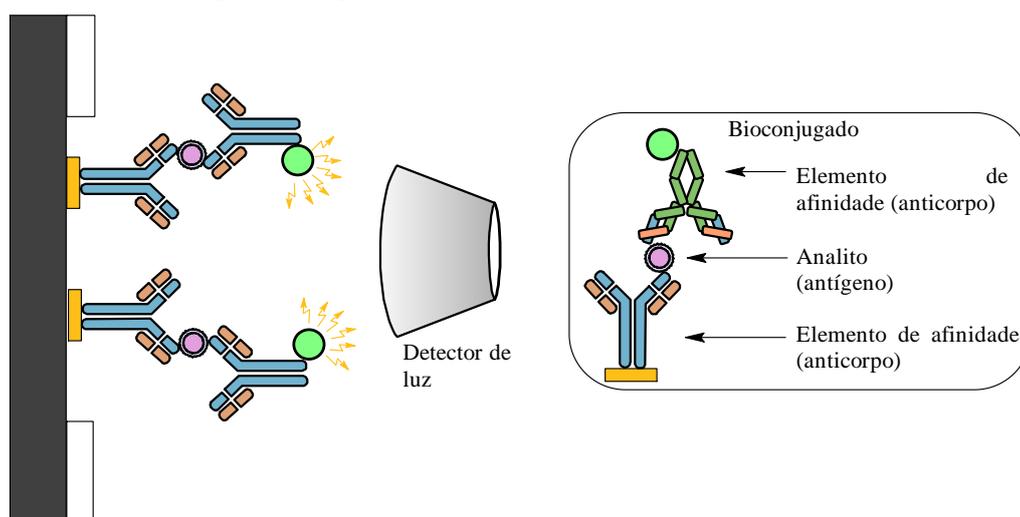
Dentre as vantagens dos biossensores destaca-se:

- Alta seletividade devido a especificidade do elemento de afinidade (sonda de imobilização/detecção)

- Baixo custo, não exigindo centro clínicos avançados
- Portátil
- Baixo ruído de fundo, uma vez que a análise é feita na ausência de luz no caso de biossensores ópticos.

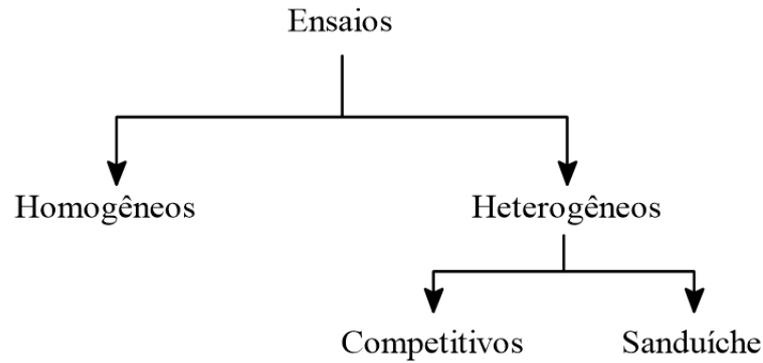
De modo geral, um ensaio ECL consiste em uma célula eletrolítica, um bioconjugado (analito + sondas de captura e detecção) e um transdutor. Um elemento de afinidade é escolhido de acordo com o analito que se queira determinar como um anticorpo específico para a detecção de um determinado antígeno como é apresentado na figura 7. A superfície escura simboliza o eletrodo onde acontecerá a transferência de carga e em um caso envolvendo o complexo de rutênio (partícula verde) ele será oxidado. Tanto o anticorpo fixado na superfície do eletrodo quanto o anticorpo que está ligado ao complexo de rutênio interagem com o analito formando um bioconjugado.

Figura 7 - Esquema de biossensor ECL no formato sanduíche



De acordo com Wehmeyer e colaboradores, os ensaios são divididos em dois formatos: ensaios homogêneos e ensaio heterogêneos. Os ensaios homogêneos não há processos de separação da amostra antes da detecção ou não há suportes sólidos para a imobilização da sonda de captura. Os ensaios heterogêneos, por sua vez, contêm etapas de separação e até acabam tendo melhores limites de detecção por conta disso, ademais, eles são divididos em competitivos ou sanduíche como pode ser observado na figura 8¹⁹.

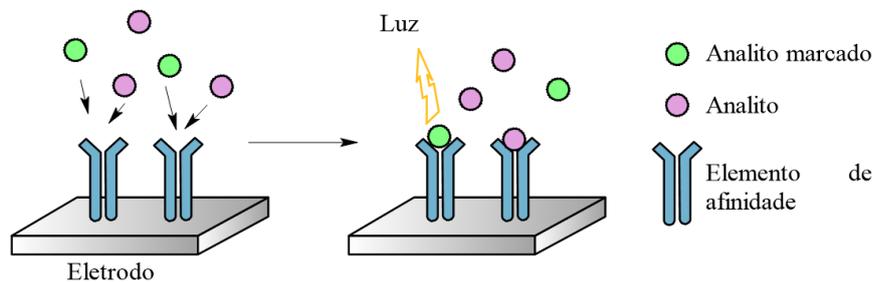
Figura 8 - Divisão esquemática dos ensaios



Método Competitivo

No método competitivo para o biossensores ECL como é apresentado na figura 9, o analito de interesse disputa com um analito marcado, ou seja, com um luminóforo acoplado ao analito marcado, para se ligar em um elemento de afinidade, assim, durante o ensaio apenas o analito marcado irá emitir luz e a diferença de intensidade luminosa do ensaio em relação ao branco será proporcional a concentração de analitos. Além disso, a abordagem de competitiva é voltada para analitos pequenos como estradiol²⁰.

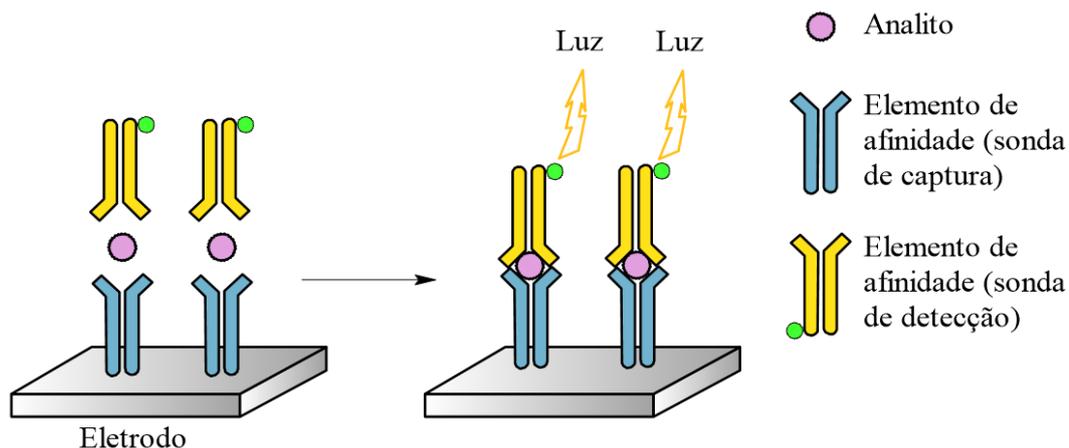
Figura 9 - Esquema de biossensor ECL competitivo



Método Sanduíche

O método sanduíche é o mais abordado, baseando-se na utilização de dois elementos de afinidade durante o ensaio como é visto na figura 10. Um deles é fixado ao eletrodo para a realizar captura do analito em solução, um outro fixado ao luminóforo que inicialmente está em solução, mas irá se ligar ao analito que ficou preso e manter o luminóforo próximo a superfície do eletrodo, conseqüentemente, a aproximação do luminóforo ao eletrodo facilitará a geração da ECL.

Figura 10 - Esquema de biossensor ECL sanduíche



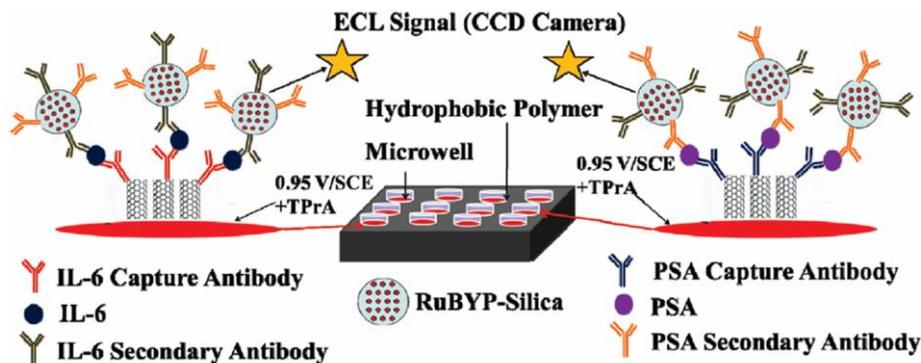
A garantia de seletividade dos biossensores esta, principalmente, no elemento de afinidade biológica, pois é ele quem irá interagir com o analito e não com outros compostos interferentes na amostra, por isso, é comum a utilização de anticorpos, aptâmeros, ácidos nucleicos ou peptídeos fazendo essa função²¹.

Aperfeiçoando os biossensores ECL

Com o desenvolvimento cada vez mais tecnológico dos biossensores ECL, novas artimanhas de realizar os ensaios são propostos como algumas estratégias de imobilização de elementos de afinidade, nanopartícula de luminóforos e a adição de surfactantes na superfície do eletrodo são exemplos já presentes na literatura.

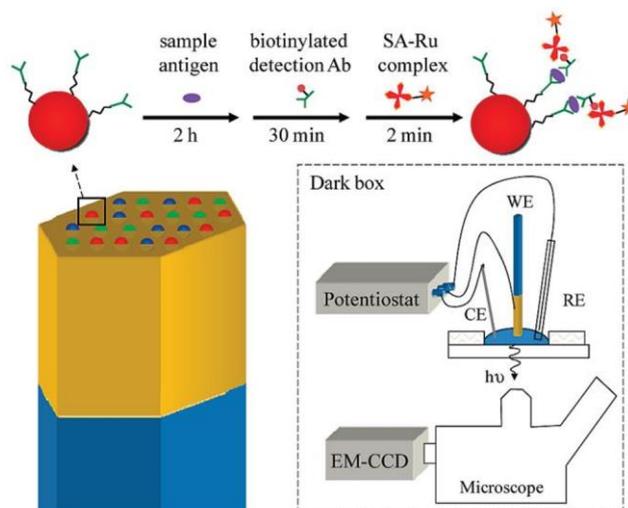
Naimish e colaboradores reportam um estudo de biossensor ECL envolvendo o ensaio tipo sanduíche para a detecção da enzima PSA e a proteína Interleucina-6 (IL-6) que são biomarcadores para câncer de próstata. Os autores conseguiram realizar a detecção em concentrações próximas de 1 pg/mL dos biomarcadores e reportam adaptações diferenciais como é visto na figura 11 para obter esse nível de detecção. Os nanotubos de carbono podem ser funcionalizados e possuem alta área superficial, permitindo facilmente a ligação de muitos compostos de interesse, nesse caso, os anticorpos, além disso, possuem alta condutividade elétrica, o que facilita a transferência de carga e a ECL no meio reacional. O mecanismo reportado para a ECL envolveu a utilização do complexo de rutênio e tripropilamina, um mecanismo idêntico a figura 5, entretanto, os autores também sintetizaram nanopartículas de sílica dopadas com $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ e as ligaram aos anticorpos secundários, desse modo, os autores reportam intensificação do sinal por conta da alta densidade do complexo na nanopartícula^{22,23}.

Figura 11 - Biossensor para IL-6 e PSA desenvolvido²².



Frédérique Deiss e colaboradores, por sua vez, desenvolveram um ensaio também no formato sanduíche para a detecção múltipla de antígenos: o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), a Interleucina-8 (IL-8) e o inibidor tecidual de metaloproteinases 1 (TIMP-1). Resumidamente, os autores desenvolveram um microarranjo para microesferas magnéticas e as funcionalizaram para que seja possível acoplar os elementos de afinidade, nesse caso, utilizaram anticorpos biotinados como elementos de afinidade para um ensaio do tipo sanduíche²⁴. A VEGF é considerada a maior responsável pela angiogênese, crescimento de vasos sanguíneos, nos olhos. Interleucina-8, por sua vez, é encontrada em regiões tumorais e sua concentração é proporcional ao tamanho do tumor por conta da sua funcionalidade sendo na imunobiologia dessas células. Por fim, TIMP-1 ajuda na regulação da homeostase tecidual e está presente diretamente no desenvolvimento de alguns tipos de câncer. As microesferas são feitas de poliestireno e revestidas com ouro, em sua superfície foi acoplada os anticorpos para a imobilização dos analitos, na sonda de detecção os mesmos anticorpos foram novamente utilizados e foram ligadas estreptavidina com $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ como pode ser observado na figura 12.

Figura 12 - Biossensor de microarrajões para VEGF, IL-8 e TIMP-1²⁴.



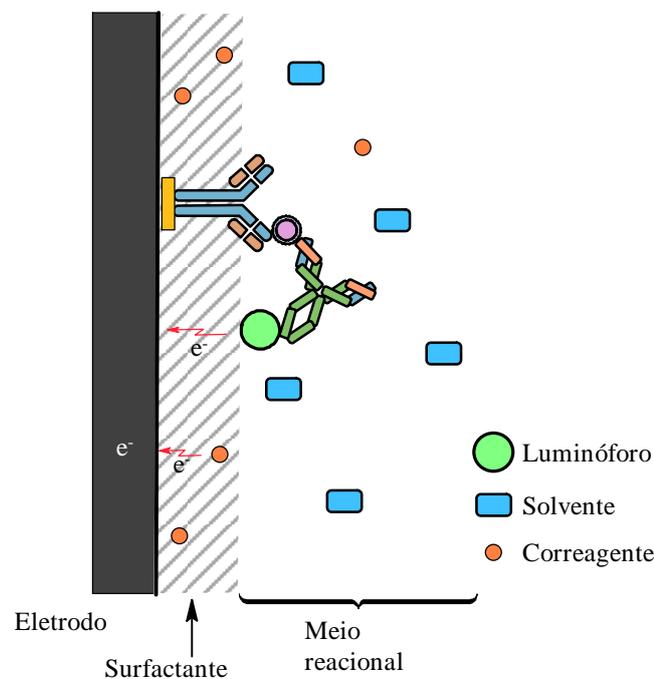
Em paralelo, um biossensor agora foi desenvolvido para a detecção de dietilestilbestrol (DES), um hormônio sintetizado e utilizado em animais na agropecuária, portanto, esse hormônio

chega ao ser humano pelo consumo de carne e pode acarretar dano como mutações genéticas ou câncer, portanto, Romana Manzoor e colaboradores relatam um método ECL para realizar a detecção desse hormônio. Diferentemente dos casos anteriores, os autores utilizam luminol, um reagente quimioluminescente, em toda a área superficial de nanopartículas de ouro com carbonetos de molibdênio (Mo_2C) sendo carreadores de carga, além disso, reportam o uso de peróxido de hidrogênio como o responsável por promover a excitação do luminol. A quantificação foi com curvas de calibração do analito competitivamente com os analitos marcados²⁵.

Por fim, Erin e colaboradores realizaram um levantamento bibliográfico no ano de 2016 sobre os artigos publicados entre 2012 e 2016, separando os artigos entre os tipos de luminóforos utilizados e não propondo o desenvolvimento de biossensores ECL de 2012 até 2016 e as separaram os artigos conforme os tipos de luminóforo utilizado como rutênio e luminol e comparando as matrizes biológicas reportadas²⁶.

A adição de surfactante, por sua vez, atua de modo a criar uma superfície hidrofóbica no eletrodo, impedindo assim que a água ou compostos polares interajam com o eletrodo ao invés do luminóforo ou o correagente, outro impacto gerado pela adição de surfactante é contribuição para a solubilidade de compostos biológicos como proteínas e membranas. Feng Li e Yanbing Zu reportam o efeito causado pelo uso dos surfactantes Triton X-100 e Fluorsurfactante Zonyl® FSP²⁷.

Figura 13 - Esquema de um biossensor uma camada de surfactante por cima do eletrodo.



De modo geral, os protocolos de ECL possuem algumas limitações em comuns, principalmente, a impossibilidade de evitar falso-positivos ou falso-negativo, portanto, acabam

influenciando a eficiência instrumental do dispositivo. Uma boa parte dos exemplos acima envolveram a utilização de nanomateriais, o que foi fundamental para a amplificação de sinal, mas precisam ter uma boa qualidade, pois podem impactar diretamente na reprodutibilidade dos biossensores.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Definitivamente, cada vez mais surgem novas propostas de biossensores ECL na literatura. O amplo desejo de criar esses dispositivos cada vez menores, novas tecnologias são necessárias para ajudar no aprimoramento e otimização dos biossensores, a utilização de nanopartículas magnéticas ou nanotubos de carbono são exemplos para amplificar o sinal físico-químico. Outras pesquisas na área abordam a contextualização de biossensores microfluídicos de modo a automatizar o processo e diminuir os erros experimentais. Espera-se que muitos dos sensores que estão sendo desenvolvidos não fiquem apenas nos laboratórios de pesquisa e sejam aplicados diariamente para agregar na área da saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andréa dos Santos Rodrigues. *Estudo Para Viabilidade Do Desenvolvimento de Um Biossensor Para Metano e Metanol Em Combustíveis*. (2013).
2. LETÍCIA RAPHAELA GONÇALVES LACERDA. *Sensores e Biossensores Como Alternativas Viáveis Na Determinação de Contaminantes No Milho: Uma Revisão*. www.feq.ufu.br (2021).
3. Santos, D. J. A. dos *et al.* An electrochemical genomagnetic assay for detection of SARS-CoV-2 and Influenza A viruses in saliva. *Biosens Bioelectron* **255**, 116210 (2024).
4. Barhoum, A., Altintas, Z., Devi, K. S. S. & Forster, R. J. Electrochemiluminescence biosensors for detection of cancer biomarkers in biofluids: Principles, opportunities, and challenges. *Nano Today* **50**, 101874 (2023).
5. Radecki, J. & Radecka, H. Mechanisms of Analytical Signals Generated by Electrochemical Genosensors: Review. *J Mex Chem Soc* **59**, 276–281 (2015).
6. Zamora-Obando, H. *et al.* BIOMARCADORES MOLECULARES DE DOENÇAS HUMANAS: CONCEITOS FUNDAMENTAIS, MODELOS DE ESTUDO E APLICAÇÕES CLÍNICAS. *Quim Nova* (2022) doi:10.21577/0100-4042.20170905.
7. Padmakumari Kurup, C., Abdullah Lim, S. & Ahmed, M. U. Nanomaterials as signal amplification elements in aptamer-based electrochemiluminescent biosensors. *Bioelectrochemistry* **147**, (2022).
8. Richter, M. M. ELECTROCHEMILUMINESCENCE. *Optical Biosensors* 317–384 (2008) doi:10.1016/B978-044453125-4.50009-7.
9. Tokel-Takvoryan, N. E., Hemingway, R. E. & Bard, A. J. Electrogenerated Chemiluminescence. XIII. Electrochemical and Electrogenerated Chemiluminescence Studies of Ruthenium Chelates. *J Am Chem Soc* **95**, (1973).
10. Meng, X., Pang, X., Yang, J., Zhang, X. & Dong, H. Recent Advances in Electrochemiluminescence Biosensors for MicroRNA Detection. *Small* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.1002/sml.202307701> (2024).
11. Richter, M. M. Electrochemiluminescence (ECL). *Chem Rev* **104**, 3003–3036 (2004).
12. Forster, R. J., Bertocello, P. & Keyes, T. E. Electrogenerated chemiluminescence. *Annual Review of Analytical Chemistry* **2**, 359–385 (2009).
13. Bhasikuttan, A. C., Suzuki, M., Nakashima, S. & Okada, T. Ultrafast fluorescence detection in tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) complex in solution: Relaxation dynamics involving higher excited states. *J Am Chem Soc* **124**, (2002).

14. Müller, A. V., Gonçalves, M. R., Ramos, L. D., Polo, A. S. & Frin, K. P. M. A importância do estado excitado 3MLCT de compostos DE Ru(II), Re(I) E Ir(III) no desenvolvimento de fotossensores, OLEDs e fotorredução de CO₂. *Quimica Nova* vol. 40 Preprint at <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160170> (2017).
15. Ferreira, B. S. *Desenvolvimento de Um Biossensor Eletroquímico Para a Detecção de Um Biomarcador Associado a Doenças Neurodegenerativas*. (2021).
16. Amador Salomão, P. E. Produção e Aplicação de Biossensores: Uma Breve Revisão. *Research, Society and Development* **7**, (2018).
17. Teles, F. S. R. R. *Desenvolvimento de Um Biossensor Para Detecção e Identificação Do Vírus Da Dengue*. (2006).
18. Song, S., Xu, H. & Fan, C. Potential diagnostic applications of biosensors: Current and future directions. *Int J Nanomedicine* **1**, 433–440 (2006).
19. Wehmeyer, K. R., White, R. J., Kissinger, P. T. & Heineman, W. R. Electrochemical Affinity Assays/Sensors: Brief History and Current Status. *Annual Review of Analytical Chemistry* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061417-125655> (2021).
20. Manzoor, R. *et al.* Competitive ECL immunosensor for ultrasensitive 17 β -estradiol detection based on synergistic promotion strategy using CdSe–ZnSe nanocomposites. *Talanta* **267**, 125160 (2024).
21. Mathew, B. C., Biju, R. S. & Thapalia, N. An overview of electrochemiluminescent (ECL) technology in laboratory investigations. *Kathmandu University Medical Journal* vol. 3 no. 1 Preprint at (2005).
22. Sardesai, N. P., Barron, J. C. & Rusling, J. F. Carbon nanotube microwell array for sensitive electrochemiluminescent detection of cancer biomarker proteins. *Anal Chem* **83**, 6698–6703 (2011).
23. Sardesai, N., Pan, S. & Rusling, J. Electrochemiluminescent immunosensor for detection of protein cancer biomarkers using carbon nanotube forests and [Ru-(bpy)₃]²⁺-doped silica nanoparticles. *Chemical Communications* 4968–4970 (2009) doi:10.1039/b909220j.
24. Deiss, F. *et al.* Multiplexed sandwich immunoassays using electrochemiluminescence imaging resolved at the single bead level. *J Am Chem Soc* **131**, 6088–6089 (2009).
25. Manzoor, R. *et al.* Ultrasensitive competitive electrochemiluminescence immunosensor based on luminol-AuNPs@Mo₂C and upconversion nanoparticles for detection of diethylstilbestrol. *Microchemical Journal* **158**, 105283 (2020).

26. Gross, E. M., Maddipati, S. S. & Snyder, S. M. A review of electrogenerated chemiluminescent biosensors for assays in biological matrices. *Bioanalysis* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.4155/bio-2016-0178> (2016).
27. Li, F. & Zu, Y. Effect of Nonionic Fluorosurfactant on the Electrogenerated Chemiluminescence of the Tris(2,2' -bipyridine)ruthenium(II)/Tri-n-propylamine System: Lower Oxidation Potential and Higher Emission Intensity. *Anal Chem* **76**, 1768–1772 (2004).