

SPR - UMA NOVA FERRAMENTA PARA BIOSENSORES

Rosângela M. de Carvalho, Susanne Rath e Lauro T. Kubota*

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas - SP

Recebido em 4/1/02; aceito em 27/6/02

SPR - NEW TOOL FOR BIOSENSORS. This paper reviewed the development and theoretical aspects of surface plasmon resonance (SPR) technique and discusses this powerful sensor technology in the development of biosensors, as well as for the investigation of biological interactions and clinical assays. The SPR has been proven to be a valuable tool to investigate dynamic processes, such as adsorption, degradation, determination of dielectric properties, association/dissociation kinetics, affinity constants of specific ligand-ligand interactions, allowing real-time analysis at almost any surface. The SPR as a complementary technique alongside electrochemical methods is also presented.

Keywords: surface plasmon resonance-SPR; electrochemistry; biosensors and biomolecules interactions.

INTRODUÇÃO

Durante as duas últimas décadas houve um avanço significativo no desenvolvimento de sensores e biosensores ópticos para determinações de espécies de interesse químico e biológico. O primeiro sensor com transdução químico óptico foi baseado na medida de mudanças no espectro de absorção e foi desenvolvido para determinações de CO_2 e O_2 . Desde então, uma variedade de sistemas ópticos de detecção estão sendo utilizados em sensores e biosensores, incluindo, entre outros, elipsometria, espectroscopia (luminescência, fosforescência, fluorescência, Raman), interferometria (interferometria de luz branca, interferometria modal) e, finalmente, a ressonância de plasma de superfície (SPR – “surface plasmon resonance”). Nestes sensores, a quantificação da espécie de interesse é realizada por medidas do índice de refração, quantidade de luz absorvida, propriedades fluorescentes das moléculas analisadas ou um meio de transdução químico-óptico¹.

O potencial da ressonância de plasma de superfície, para caracterização de filmes finos e monitoramento de processos em interfaces metálicas, foi reconhecido no final dos anos 70^{2,3}, logo após Nylander e Liedberg^{4,5} terem demonstrado a viabilidade do emprego da SPR como sistema de detecção em sensores e biosensores para detecção de gases. Estes estudos contribuíram para o desenvolvimento do primeiro biossensor comercial em 1990. Desde então, a ressonância de plasma de superfície recebe contínua atenção da comunidade científica, o que se verifica pelo desenvolvimento de novas configurações, bem como nas aplicações de aparelhos utilizando a técnica de SPR para medidas físicas, químicas e biológicas. No entanto, o grande avanço da SPR relatado em vários artigos está na sua bio-sensibilidade, sendo que mais de 80% dos artigos publicados tem como objetivo o estudo de interações biomoleculares, Figura 1. Nesta área, a SPR acoplada aos métodos de superfície orientada mostra um grande potencial para desenvolvimento e preparação de biossensores de afinidade, permitindo análise em tempo real de interações bio-específicas sem uso de marcadores. Nos últimos anos, a técnica de ressonância de plasma de superfície está sendo acoplada às mais diferentes técnicas, dentre estas, em destaque, as eletroquímicas.

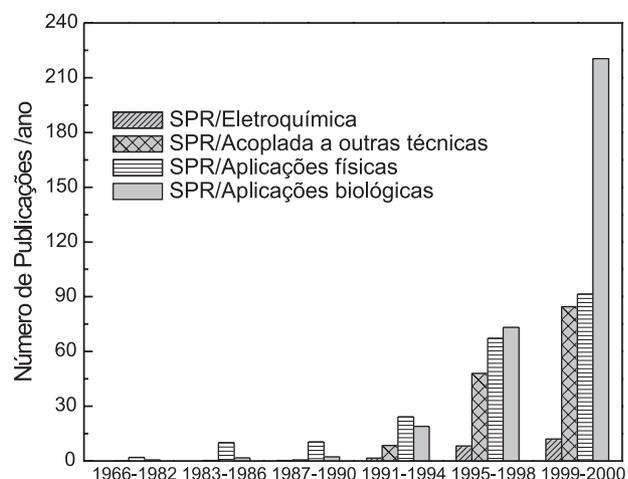


Figura 1. Publicações referentes ao emprego da técnica de ressonância de plasma de superfície em 34 anos. Dados obtidos através do Institute for Scientific Information® (ISI®)

ASPECTOS TEÓRICOS

A técnica de ressonância de plasma de superfície baseia-se nas propriedades ópticas e pode ser empregada para estudos de fenômenos de superfície, monitorando a medida da mudança do índice de refração devido, por exemplo, a ligação de uma camada orgânica à superfície do metal⁶⁻¹³. O efeito de ressonância de plasma de superfície é uma oscilação da densidade de carga longitudinal, ao longo da interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é metal e outro, um dielétrico^{14,15}. A escolha do metal a ser usado é crítica, pois o metal deve exibir comportamento de elétrons livres. Os metais mais adequados são prata, ouro, cobre e alumínio, dentre os quais a prata e o ouro são os mais empregados^{16,17}. Para excitação do plasma de superfície dois diferentes sistemas experimentais foram desenvolvidos, um por Otto¹⁸ e outro por Kretschmann¹⁹, porém a configuração de refletância total atenuada, desenvolvida por Kretschmann, é normalmente usada na maior parte dos instrumentos de SPR^{7,14}.

*e-mail: kubota@iqm.unicamp.br

A configuração de Kretschmann, Figura 2, baseia-se no fenômeno de reflexão interna total. Este fenômeno ocorre quando a luz polarizada atravessa um meio óptico denso (ex. vidro) e alcança uma interface entre este meio e um meio de densidade óptica menor (ex. ar), e é refletida de volta para o meio mais denso. Embora a luz incidente seja totalmente refletida internamente, uma componente desta radiação, onda ou campo evanescente, penetra na interface do meio menos denso, até a distância de um comprimento de onda, 1λ . Em um determinado ângulo de incidência, quando o vetor de onda do plasma é igual ao vetor de onda do campo evanescente ($K_{sp} = K_{ev}$), parte da radiação acopla com os elétrons livres oscilantes (plasma) no filme metálico, ocorrendo a ressonância de plasma de superfície. Em consequência, ocorre uma perda de energia da luz incidente para o filme metálico, resultando na redução da intensidade da luz refletida, a qual pode ser detectada como um arranjo bidimensional de fotodiodos.

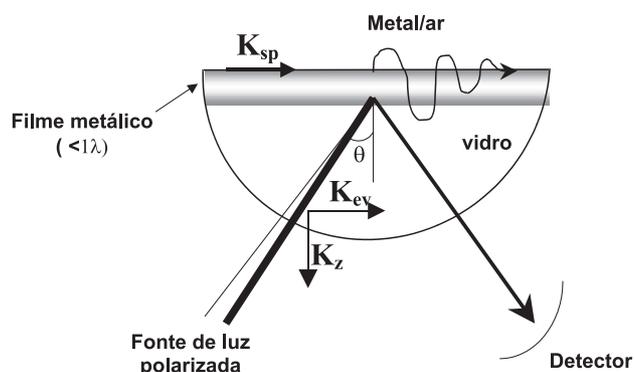


Figura 2. Configuração de Kretschmann para SPR. Ressonância de um plasma de superfície é excitada na interface metal/ar quando o ângulo de incidência da luz é tal que a componente evanescente do próprio vetor onda (K_{ev}) é igual ao vetor onda da propagação do plasma de superfície (K_{sp}). Adaptada da ref. 14

Os instrumentos de SPR empregam, geralmente, uma fonte de luz monocromática p -polarizada e a interface entre os dois meios opticamente densos é coberta com um filme metálico fino de espessura menor que um comprimento de onda da luz. O vetor de onda do campo evanescente (K_{ev}) é dado por:

$$K_{ev} = (W_0/c) \eta_g \sin\theta \quad (1)$$

onde, W_0 é a frequência da luz incidente, η_g o índice de refração do meio denso (vidro), θ o ângulo de incidência da luz e c a velocidade da luz no vácuo. O vetor de onda do plasma de superfície (K_{sp}) pode ser aproximado para:

$$K_{sp} = (W_0/c) [(\epsilon_m \eta_s^2) / (\epsilon_m + \eta_s^2)]^{1/2} \quad (2)$$

onde, ϵ_m é a constante dielétrica do filme metálico e η_s o índice de refração do meio dielétrico.

O vetor de onda do plasma de superfície K_{sp} é dependente do índice de refração (Eq. 2), do meio água/ar acima do filme metálico, o qual pode ser monitorado para a espessura de aproximadamente 300 nm acima da superfície do metal (dentro dos limites de detecção da SPR). Se o índice de refração imediatamente acima da superfície do metal sofre alguma alteração, pela adsorção de uma camada protéica, ou qualquer outra molécula, uma mudança no ângulo de incidência é requerida para que a excitação do plasma de superfície

ocorra. Através do monitoramento deste ângulo no qual ocorre a ressonância, durante um processo de adsorção em função do tempo, um perfil de adsorção pode ser obtido pela técnica de SPR. Variações em torno de 0,5 miligraus, correspondente a uma resolução de aproximadamente 1×10^{-5} de índice de refração (para $\lambda_i = 670$ nm), podem ser detectadas^{6, 14}, porém a resolução depende do comprimento de onda da luz incidente (λ_i).

Uma configuração esquemática de um instrumento típico de SPR é apresentada na Figura 3. A superfície do SPR (lâmina) pode ser modificada para monitorar processos de adsorção/interação para uma variedade de superfícies por ligação/acoplamento de camadas finas sobre o filme metálico. Estas camadas podem constituir-se de monocamadas agrupadas pela variação dos grupos funcionais e terminais, bicamadas lipídicas ou filmes poliméricos.

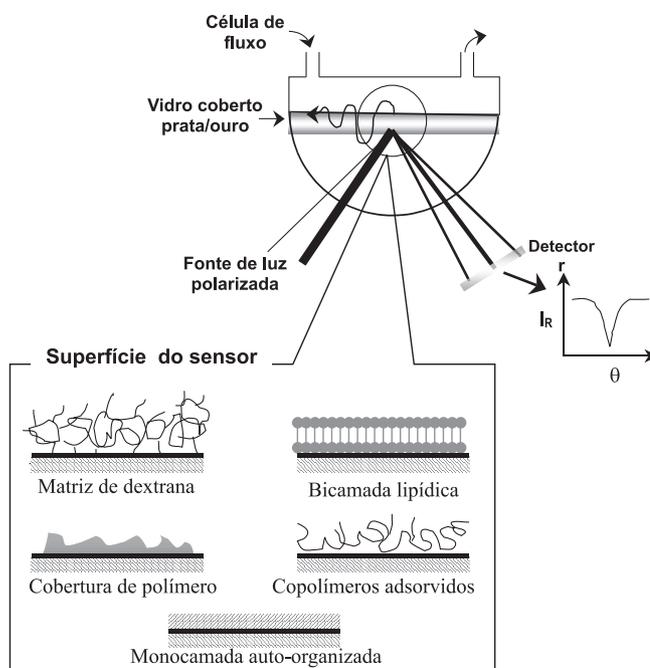


Figura 3. Representação esquemática de um instrumento típico de SPR. Uma lâmina de vidro recoberta com prata/ouro é emparelhada sob um prisma, através do qual o feixe de luz convergente é focado sobre o lado de baixo do filme de prata/ouro, a qual é refletida para um detector de arranjo bidimensional de fotodiodos. As soluções dos analitos passam através da célula de fluxo em velocidade e temperatura definidas. A superfície do filme de prata/ouro pode ser modificada originando uma variedade de superfícies sensoras. Adaptada da ref. 14

Um esquema de um perfil típico de adsorção de SPR durante a adsorção de uma monocamada protéica sobre uma superfície metálica coberta com polímero é mostrado na Figura 4. Inicialmente, a superfície é preparada com uma solução tampão adequada para gerar uma linha base sob a curva SPR. Uma vez que a proteína entra em contato com a superfície, ocorre uma adsorção rápida, a qual resulta em um aumento no ângulo de ressonância do SPR, seguido por um patamar no perfil de adsorção, devido à saturação da superfície com a proteína ou porque o processo atingiu o equilíbrio. Finalmente, a solução protéica é trocada pelo tampão, que remove somente o material fracamente ligado. A diferença entre o ângulo de ressonância inicial e o final fornece uma indicação sobre a extensão da adsorção. O gradiente positivo da curva de adsorção do SPR determina a velocidade de adsorção¹⁴. Além da avaliação de afinidades

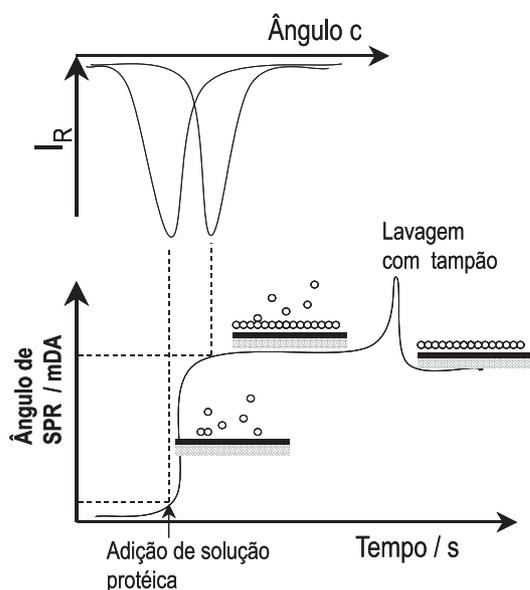


Figura 4. Um exemplo esquemático de um perfil de adsorção do SPR para adsorção de uma proteína a um filme polimérico. A mudança no valor do ângulo do SPR em função do tempo é usada para monitorar as cinéticas de adsorção. Onde I_R - intensidade de radiação refletida (reflexibilidade) e mDA - millograus de ângulo (do inglês "millidegree of angle"). Adaptada da ref. 14

e interações moleculares, a técnica de SPR pode, ainda, ser utilizada para análises quantitativas, estudos de especificidade, análises cinéticas, avaliação de efeitos alostéricos e para comparação de modelos de ligação de diferentes espécies.

Mais de 80% dos artigos publicados utilizando a técnica de SPR destinam-se a aplicações nas áreas biológica e clínica para o estudo de interações biomoleculares e bioespecíficas⁶, embora a técnica também tenha sido aplicada no campo da física, principalmente envolvendo estudos de monocamadas, bicamadas orgânicas, bem como filmes poliméricos. Outro ponto de grande relevância, que é destacado neste trabalho é a associação da técnica de SPR com outras técnicas, em que se destaca a associação da técnica de SPR com a eletroquímica, como ferramenta para o desenvolvimento de sensores e biossensores.

Aplicações biológicas e clínicas

A espectrometria de ressonância de plasma de superfície pode ser utilizada para uma série de estudos, envolvendo cinéticas de adsorção-desorção, interações antígeno-anticorpo, proteína-ligante, receptor-ligante, proteína-DNA, DNA-DNA, RNA-RNA, etc²⁰⁻⁴³.

No emprego da espectrometria de SPR como elemento de transdução dos biossensores e/ou imunossensores, o anticorpo ou antígeno pode ser imobilizado sobre a superfície do metal, por adsorção direta ou por um acoplamento indireto através de uma matriz de carboximetildextrana, ponte avidina-biotin, ou hidrogel à base de dextrana, sobre o metal^{32,44-46}. A camada hidrofílica aumenta a sensibilidade do SPR, protege o metal da adsorção de proteínas não específicas e permite a regeneração da superfície devido à ligação reversível do anticorpo ou antígeno à matriz. Quando um analito interage com a espécie imobilizada, o índice de refração da interface metal-solução sofre alteração^{21,14}.

O emprego da SPR como sistema de transdução em imunossensores destaca-se em investigações de modelos de interações de processos de reconhecimento molecular^{22,47-50}. Tsoi e colaboradores²²

empregaram a SPR para estudar interações entre uma série de dupla hélice de DNA (dsDNA) e DNA de enzimas polimerases. As moléculas de DNA foram imobilizadas sobre a superfície de ouro por um procedimento controlado de monocamada de biotina, avidina e uma camada de fita dupla de DNA biotina. Os resultados deste estudo demonstraram a facilidade do uso da SPR para estudar eventos de reconhecimento molecular como uma base simples para discriminação, envolvendo interações proteína-DNA. Outros artigos desta natureza foram publicados, sendo que muitos destes fazem referência a medidas de hibridização de DNA e RNA^{23,24}. Alguns exemplos estão descritos na Tabela 1.

Dos estudos de interações antígeno-anticorpo, cita-se o realizado por Shaw e colaboradores⁵¹ que verificaram a interação entre antígeno (5T4) de diferentes carcinomas e anticorpos (mAB5T4). Estes estudos são de grande relevância, pois o uso de um anticorpo específico oferece a possibilidade de uma terapia específica com toxicidade reduzida aos tecidos normais, comparados com tratamentos convencionais. Destacam-se, também, estudos de interações antígeno-anticorpo, realizados por Otamiri e colaboradores⁴¹, pois estas interações possuem um papel importante em reações imunológicas durante um transplante, visto que a rejeição de órgãos transplantados muitas vezes está associada com interação de anticorpos com carboidratos incompatíveis.

Além da aplicação da técnica de SPR para caracterização de interações biomoleculares, a técnica também pode ser utilizada para quantificação dessas interações (alguns exemplos podem ser visualizados na Tabela 2). Cita-se o trabalho realizado por Gómara e colaboradores⁵², onde utiliza-se um biossensor comercial (BIACORE 1000, Biacore AB, Uppsala) para detecção do vírus da hepatite A (HAV), através da imobilização de peptídeos sintéticos (VP3) com carbodiimida. Os resultados demonstraram alta eficiência analítica e um potencial clínico no diagnóstico da hepatite A. Este dispositivo mostrou ser uma ferramenta poderosa para rastreamento clínico, de fácil uso, rápido e confiável. Outras aplicações dessa natureza podem ser encontradas na literatura⁵³⁻⁵⁸.

A SPR também pode ser usada para monitorar interações proteína-proteína, ou proteína-ligante em tempo real e ainda permite a quantificação das espécies que estão interagindo. Para proteínas de 20 KDa (ex. interleucina e interferons), o limite de detecção da técnica é de 10^{-8} mol L⁻¹. Logo, a aplicação de SPR em análises de fluidos biológicos é restrita para concentrações nesta ordem de grandeza. Entretanto, verifica-se a partir da literatura, esforços no sentido de melhorar esse limite de detecção da SPR^{8,59,60}.

Lahiri e colaboradores⁶¹ utilizaram SPR para quantificar a ligação da anidrase carbônica (CA) a grupos benzenosulfonamida de monocamadas auto-organizadas. Ainda em outro trabalho, os autores descrevem dois procedimentos para imobilização de 10 proteínas de baixo peso molecular sobre monocamadas auto-organizadas. Comparações de constantes cinéticas e termodinâmicas foram realizadas⁶². A importância de estudos nesta área é o conhecimento das cinéticas de ligações bioespecíficas de proteínas em superfícies.

Uma outra forma de caracterização das interações macromoleculares é através da análise das constantes cinéticas. A técnica de SPR é uma ferramenta poderosa para este fim, pois as análises podem ser feitas em tempo real. Análises cinéticas para avaliação e determinação de constantes de afinidades (associação, dissociação), ordem de reação, entre outros, foram apresentadas em diversos artigos⁶³⁻⁷³.

Vários tipos de imunossensores, biossensores e sensores já foram desenvolvidos, utilizando SPR como elemento de transdução⁷⁴⁻⁸⁰. Dentre as aplicações destacam-se a determinação de pesticidas, como antrazina^{77,78}, análise de interações entre albumina de soro humano e fármacos, entre outras, ácido salicílico, diazepam e cumarina⁷⁹, e monitoramento de mudanças conformacionais de proteínas imobilizadas.

Tabela 1. Exemplos de aplicações biológicas da técnica de SPR para investigação de processos de reconhecimento molecular

Tipo de Estudo	Descrição	Ref.
- anticorpo-antígeno	- Afinidade do anticorpo scFv e antígeno 5T4 foi medida em tempo real por SPR e comparada com ELISA.	51
	- Métodos para estudos de interações de anticorpo-antígeno de baixo peso molecular são apresentados. Análise cinética para determinação de constantes de associação e dissociação são descritas.	26
	- Estudo de anticorpos monoclonais (Mab) e antígenos. Imobilização do ácido-traseolide sobre a superfície sensora. Variações no índice de refração devido às reações de associação e dissociação dos Mab foram verificadas.	71
	- Investigação da atividade de anticorpo. Modelo de interação anticorpo policlonal IgC e anti-IgC.	28
	- Análise da interação de 16 anticorpos monoclonais com hemoglobina humana.	31
- proteína -ligante	- Estudos de interações entre glicosaminoglicanas com colágenos e outras glicoproteínas em matrizes extracelulares.	42
	- Ensaios com interferons e interleucinas (glico-proteínas de baixo peso molecular), em matrizes biológicas.	21
	- Imobilização de proteínas de baixo peso molecular, sob monocamadas auto-organizadas (SAMs), de alcanotiolatos.	62
	- Estudos de interações de proteína fosfatase e resíduos N-terminal de fosfatase de miosina.	38
	- Análise de interações entre proteína da bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> (Cry1Ac) e suas proteínas de ligação	30
- DNA-RNA	- Medidas de imagens de SPR para detectar ligação de seqüências específicas de RNA ribossômico 16S de <i>E. coli</i> sobre arranjos de DNA.	23
- DNA-DNA	- Estudos de interações entre fita de DNA (dsDNA) e enzimas de DNA polimerase com atividades polimerase e exonuclease. Moléculas de DNA foram imobilizadas sobre superfície de ouro através de monocamada de biotín com fosfolípido.	22
- RNA-RNA	- Estudo de interações entre riboenzimas “Hammerhead” e substratos de RNA. Duas riboenzimas puderam ser diferenciadas, observando suas afinidades. Foram estudados aspectos fundamentais das cinéticas de RNA-RNA em processos de dissociação e clivagem.	20
Estudos cinéticos	- Análise fractal utilizada para determinação das cinéticas de ligação e dissociação do receptor-analito. Relações são apresentadas para coeficientes de velocidades de ligação e dissociação como função de suas dimensões fractais, ou grau de heterogenidade da superfície.	95, 96
	- Determinação das constantes cinéticas do citocromo-C e citocromo-b utilizando fluxo contínuo e HPLC.	85
	- Revisão que reúne 3 dezenas de artigos sobre o emprego de SPR, utilizando a tecnologia BIAcore™ para avaliar interações bioespecíficas, estudos de dissociação-associação, etc.	72, 27
	- Avaliação do estradiol quimioluminescente. Determinação de constantes de dissociação (K_D), de sondas de estradiol (E_2) com um fragmento anti- E_2 .	46, 48
	- Determinação de constantes de ligação entre trombina e seu cofator anticoagulante trombosmodulina.	25
	- Determinação de constante de dissociação e associação de interações entre peptídeos antimicrobiano e membrana de bicamadas híbridas.	56, 57
	- Estudos cinéticos de dissociação e associação, analito –receptor através de análise fractal.	65, 94
	- Determinação de constantes cinéticas de interação para inibidores de protease do vírus HIV-1.	66, 67, 39
	- Interpretação de desvios de comportamento cinético de reações de pseudo-primeira ordem.	70

zadas⁸⁰. Os imunossensores, sensores e biossensores podem ser empregados em combinação com outras técnicas de detecção altamente sensíveis e seletivas, como espectrometria de massa, cromatografia e espectroscopia fotoeletrônica de raios-X, etc⁸¹⁻⁸⁶. Alguns exemplos podem ser visualizados na Tabela 3.

Aplicações físicas

Inicialmente a técnica de SPR era aplicada principalmente no estudo das propriedades dielétricas de filmes metálicos. Atualmente encontra-se aplicação em uma faixa extensa de materiais, para determinação de características de superfícies, incluindo propriedades dielétricas, processos de adsorção, degradação ou hidratação de su-

perfícies. Estes estudos tornaram-se realidade a partir da deposição de filmes de Langmuir-Blodgett ou monocamadas auto-organizadas (SAMs – “self-assembled monolayers”) na superfície metálica^{87,88}. A espessura e as propriedades dielétricas de filmes orgânicos foram calculadas por análises de SPR para diversos sistemas, incluindo camadas finas de politetrafluoroetileno, filmes de ftalocianinas, filmes de Langmuir-Blodgett e filmes utilizando métodos de imobilização de monocamadas auto-organizadas⁸⁹.

A espectrometria de SPR como transdutor em sensores e biossensores

Nos últimos anos, o emprego de biossensores e de sensores está

Tabela 2. Aplicação da técnica SPR como sistema de detecção em biossensores, imunossensores, sensores, para determinação e quantificação de espécies

Espécie determinada	Tipo de matriz	Descrição	Faixa de detecção	Ref.
Sulfametazina	Urina de porco	- Utilização de um anticorpo monoclonal para sulfametazina. As reações de interação foram caracterizadas com respeito à atividade e propriedades cinéticas	5 – 100 µg /L	58
Atrazina	Óleo	- Atrazina como um ligante foi imobilizado na superfície do aminosilano através da albumina como molécula ponte. Os parâmetros cinéticos foram determinados. O imunossensor foi aplicado para procedimentos competitivos de atrazina em amostras de óleo	0.1 – 10 µg /L	78
Ácido fólico	Leite em pó e cereais	- Biossensor baseado em imuno-atividade. O sistema apresentou desvio padrão relativo de repetibilidade e reprodutibilidade de 2 – 8 % e 4 – 10 %, respectivamente.	–	76
Enterotoxina A stafilococcal	Alimentos preparados (cachorro quente, salada de batata, leite e cogumelos)	- O imunoenensaio do tipo sanduíche. A toxina liga-se inicialmente ao anticorpo, o qual está ligado covalentemente à superfície do transdutor. O segundo anticorpo liga-se à toxina capturada	10 –100 ng/ g	60
Vapor de benzeno	–	- Determinação de espessura e índice de refração de filmes de tetra-undecil-tetra(4-aminometil-4''nitrobenzenil)Calix[4]resorcina (Azo2), e investigação da sensibilidade para exposição de vapor de benzeno e tolueno	> 400 µg /L	74
Heparina	Plasma sanguíneo	- Desenvolvimento de um biossensor de afinidade, utilizando polietilenoimina (PEI) na superfície da célula sensora	0,2 - 2 U /ml	75
Fibrina Humana	–	- Estudo da afinidade entre antígeno e anticorpo	1 – 30 mg /ml	49

Tabela 3. Associação de SPR com outras técnicas e exemplos de modificação da superfície sensora dos detectores

Técnica	Descrição	Ref.
Espectrometria de massa (MS)	- Análise de interação de resíduos de pequenas moléculas de proteínas em sistemas biológicos complexos	64, 71
	- Detecção e caracterização de proteínas em fluidos biológicos complexos, a nível de subfentomol	83
Cromatografia líquida	- Sistema imunossensitivo baseado em SPR usado para detecção <i>on line</i> e caracterização de moléculas de carboidratos separados por cromatografia líquida de alta eficiência. - Anticorpos não relevantes foram usados como referência na célula de fluxo. A sensibilidade do sistema foi dependente do peso molecular do carboidrato e afinidade da ligação	86
Modificação da superfície sensora do SPR	Descrição	
SPR – comercial	- Imobilização de ligantes para imobilização adicional de reagentes específicos sensíveis para determinação de diversas espécies. Dentre as modificações cita-se a derivatização da matriz carboxilada, a qual está presente no biossensor comercial (Biacore™), com N-etil-N''-(3 dietilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS), biotin/strepavidina, etc	32, 43, 44, 52
	- Uso da matriz carboximetildextrana para imobilização de proteínas	80
	- Imobilização de albumina de soro humano (BSA), para análise de afinidade de drogas, como cumarina, salbutamol, quinino, ácido salicílico, etc	79

umentando significativamente. As aplicações vão desde emprego no monitoramento e controle ambiental, agricultura até emprego em diferentes segmentos industriais, em especial, nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Biossensores também podem satisfazer a necessidade do monitoramento contínuo, em tempo real *in vivo* para substituir a tecnologia analítica intermitente usada na indústria química e

análises clínicas. Mais de 1000 publicações relevantes aparecem desde 1995, indicando a atividade de pesquisa devotada para este importante assunto⁹⁰.

A descrição sistemática de um biossensor deve incluir 5 pontos marcantes: (1) a detecção ou parâmetro de medida; (2) o princípio de funcionamento do transdutor; (3) o modelo físico e químico/

bioquímico; (4) a aplicação e (5) a tecnologia e os materiais para fabricação do sensor. Muitos parâmetros indicam as características dos sensores e biossensores. Alguns são comumente usados para avaliar as propriedades funcionais e qualidade do sensor, como a sensibilidade, estabilidade e tempo de resposta, outros parâmetros são correlacionados com a aplicação⁹⁰.

Quando se deseja construir um novo sensor ou biossensor, uma questão fundamental que precisa ser respondida é qual o modelo físico e/ou químico/bioquímico que pode ser atribuído à resposta do sensor ou biossensor, ou seja, o mecanismo de resposta, desde que já se tenha estabelecido os outros parâmetros como material e forma de construção do mesmo. Para o entendimento do processo de interação analito/superfície sensora, seja interações a nível biológico (no caso dos biossensores e imunossensores, ex. enzima-substrato, anticorpo-antígeno), ou a nível não biológico (no caso de sensores para onde o elemento de reconhecimento não é uma biomolécula, ex. membrana-analito), faz-se necessário dois procedimentos básicos: análise estrutural e funcional. É neste sentido que a associação da técnica de SPR com a eletroquímica é muito vantajosa, pois o estudo de reações analito-receptor pode ser realizado em tempo real. A SPR é uma técnica que não requer marcadores radioativos ou bioquímicos, possui um planejamento experimental flexível e promove análises automáticas e rápidas¹. Em termos de análises fundamentais, a SPR é usada para investigar a formação e/ou redução de óxidos, adsorção de íons e adsorção induzida eletroquimicamente⁹¹⁻⁸⁹.

Muitas vezes faz-se necessário caracterizar as reações que ocorrem na superfície do biossensor na presença das limitações difusionais que estão inevitavelmente presentes nestes tipos de sistemas. É essencial caracterizar não somente as reações associativas ou de ligação (através dos coeficientes de ligação, K_{lig} ou K_{ads}), mas também as reações de desorção ou dissociação (através dos coeficientes de desorção, K_{des} ou K_{diss}). Isto auxilia significativamente no aumento dos parâmetros de desempenho do biossensor. A razão de K_{diss} e K_{lig} (igual a K) pode ser usada para auxiliar a caracterizar o sistema receptor-analito-biossensor/sensor. Os detalhes de associação/dissociação do analito para o receptor, imobilizado sob uma superfície é de grande significado no desenvolvimento de sistemas destinados ao imunodiagnóstico, bem como para sensores e biossensores⁹³⁻⁹⁵. Muitos estudos foram realizados neste âmbito, porém somente a associação e ligação do analito ao receptor é analisada⁹⁶⁻¹⁰¹. Aparentemente, até agora, as cinéticas de dissociação (do complexo analito-receptor sob a superfície) não foram discutidas ou apresentadas com grandes detalhes. Estas caracterizações necessitam de técnicas que monitorem estas interações em tempo real, e a SPR é uma técnica que pode ser perfeitamente utilizada nestes casos, ainda mais quando associada à eletroquímica.

Associação da espectrometria de SPR e Eletroquímica

O fenômeno de SPR, quando estudado *in-situ* durante um experimento eletroquímico, fornece informações muito úteis para o desenvolvimento de biossensores, eletrodos modificados, processos de eletropolimerização, etc. Há um número razoável de modificações estáveis nas superfícies de eletrodos que podem exibir mudanças no índice de refração concomitantemente com eventos redox¹⁰². Esta combinação de técnicas vem sendo descrita por um grande número de diferentes grupos¹⁰²⁻¹²⁰. As investigações iniciais fazem referência a estudos da dupla camada elétrica¹⁰⁹⁻¹¹³. Mais recentemente a técnica de SPR foi empregada com associação à voltametria de redissolução anódica para detectar íons metálicos^{114,115}, bem como para estudar as mudanças de um filme orgânico sob a influência de um campo eletrostático (ou potencial do eletrodo)^{102,103}.

A combinação da técnica de SPR com a eletroquímica para modi-

ficação de superfícies, já tem mostrado resultados promissores, um exemplo é a eletropolimerização de um fenol com peptídeo modificado para uso em interações entre ligante-receptor, realizada por Kienle e colaboradores¹²¹. Outros exemplos que podem ser citados são os estudos de monocamadas auto-organizadas⁸⁹, como mostrado anteriormente e filmes com mono e multicamadas¹²²⁻¹²⁴. A grande importância destes estudos é o desenvolvimento de novos suportes para materiais biológicos que podem ser utilizados para o desenvolvimento de biossensores. Além disso, a dimensão do campo eletrostático dentro da região interfacial do eletrodo quimicamente modificado é um parâmetro fundamental que controla a reatividade eletroquímica de qualquer espécie incorporada dentro do filme. Hanken e colaboradores^{122,123} demonstraram que uma extensão da técnica de SPR, chamada ressonância de plasma de superfície eletroquimicamente modulada (EM-SPR – “electrochemically modulated surface plasmon resonance”), pode ser empregada para monitorar campos eletrostáticos dentro de monocamadas orgânicas e filmes de multicamadas na superfície de eletrodos. Estes experimentos monitoram as mudanças no índice de refração de um filme que ocorre sob a modulação do potencial do eletrodo.

A técnica de SPR acoplada à eletroquímica (ESPR – “electrochemistry surface plasmon resonance”) pode ser utilizada juntamente com as diversas técnicas eletroquímicas existentes, como voltametria cíclica, voltametria de redissolução anódica, etc. Os experimentos podem ser realizados medindo-se a velocidade de reação no eletrodo (através das medidas de corrente), observando o efeito físico acumulativo das reações no eletrodo (por meio das medidas de SPR). Os dados obtidos com SPR podem ser exibidos das seguintes formas: espectro de transmissão sem refinamento, espectro de transmissão normalizado, uma série de tempo ou de comprimento de onda de acoplamento. O espectro não normalizado é um registro em tempo real da intensidade de radiação transmitida (reflexibilidade). A razão deste espectro pelo espectro de transmissão de referência (tipicamente feito em ar, onde não ocorre excitação do plasma ressonante, sob um determinado comprimento de onda) resulta no espectro de transmissão normalizado. O comprimento de onda de acoplamento corresponde ao mínimo de um espectro normalizado, e seu gráfico é denominado de gráfico de tendências. Estes dados, quando obtidos concomitantemente com técnicas eletroquímicas, podem ser graficados, entre outros, em função da corrente e potencial¹¹⁹.

Nas reações envolvendo difusão e/ou adsorção, a superfície ou as concentrações das espécies eletroquimicamente ativas na camada de difusão são moduladas como resultados destes processos sobre uma escala de tempo para cada condição voltamétrica. A técnica de SPR será sensível a ambas espécies adsorvidas e a razão de concentração de moléculas redox dissolvidas, alterada eletroquimicamente. A corrente faradaica é proporcional ao gradiente de concentração na superfície do eletrodo, enquanto os dados da SPR fornecem a concentração na superfície¹¹⁹.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante a última década a técnica de SPR foi desenvolvida dentro de uma tecnologia viável visando numerosas aplicações. Suas capacidades permitem realizar, com importante impacto, as análises de superfícies e interações moleculares sobre estas. A técnica de SPR é uma ferramenta valiosa para investigar um número grande de eventos dinâmicos, e sua diversidade permite realizar análises interfaciais em muitas superfícies. Além disso, é possível por meio desta técnica determinar propriedades dielétricas (índice de refração ou espessura do filme), bem como monitorar processos interfaciais *in situ* envolvendo adsorção/dessorção, hidratação e desidratação. Estes, por sua vez, são parâmetros muito importantes que precisam ser conhecidos

e determinados quando se deseja desenvolver um novo biossensor ou sensor. Além do mais, a flexibilidade das configurações de células em fluxo permite estudar estes processos em condições relevantes, como temperatura, velocidade de fluxo, pH e força iônica. O uso técnica de SPR combinada à eletroquímica (ESPR), embora ainda pouco utilizada, mostra-se muito promissora.

É de fundamental importância para quem deseja desenvolver um novo sensor ou biossensor, conhecer e avaliar constantes de afinidades, constantes de equilíbrios, fenômenos de interface (sólido/líquido) associados com interações enzima/substrato, etc. Isto permitirá o desenvolvimento de sensores e biossensores mais sensíveis, seletivos e principalmente mais estáveis que, desta forma, terão um maior potencial para produção comercial. Contudo, espera-se que as combinações das medidas voltamétricas e SPR possam fornecer informações sobre processos eletroquímicos no campo da eletroquímica, principalmente no desenvolvimento de biossensores.

REFERÊNCIAS

- Brecht, A.; Gauglitz, G.; *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 923.
- Pockrand, I.; Swalen, J. D.; Gordon, J. G.; Philpott, M. R.; *Surf. Sci.* **1978**, *74*, 237.
- Gordon, J. G.; Ernst, S.; *Surf. Sci.* **1980**, *101*, 499.
- Nylander, C.; Liedberg, B.; Lind, T.; *Sens. Actuators, B* **1982**, *3*, 79.
- Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundström, I.; *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, R1-R9.
- Jonsson, U.; Fagerstam, L.; Ivarsson, B.; Karlsson, R.; Lundh, K.; Lofas, S.; Persson, B.; Roos, H.; Ronnberg, L.; Jonsson, B.; Slojander, S.; Stenberg, E.; Stahlberg, R.; Urbaniczak, Y.; Ostlin, H.; Malmqvist, M.; *BioTechniques* **1991**, *11*, 620.
- Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G.; *Sens. Actuators, B* **1999**, *54*, 3.
- O'Brien, M. J.; Pérez-Luma, V. H.; Brueck, S. R. J.; López, G. P.; *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 97.
- Akimoto, T.; Sasaki, S.; Ikebukuro, K.; Karube, I.; *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 355.
- Rich, R. L.; Myszka, D. G.; *J. Mol. Recognit.* **2000**, *13*, 388.
- Lechuga, L.M.; Calle, A.; Prieto, F.; *Quim. Anal.* **2000**, *19*, 54.
- Myszka, D. G.; *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 390.
- Vadgama, P.; Grump, P. W.; *Analyst* **1992**, *117*, 1657.
- Green, R. J.; Frazier, R. A.; Shakesheff, K. M.; Davies, M. C.; Roberts, C. J.; Tandler, S. J. B.; *Biomaterials* **2000**, *21*, 1823.
- Pisarchick, M. L.; Gesty, D.; Thompson, N. L.; *Biophys. J.* **1992**, *63*, 215.
- Rich, L. R.; Myszka, D. G.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 54.
- Steiner, G.; Sablinskas, V.; Hübner, A.; Kuhne, C.; Salzer, R.; *J. Mol. Struct.* **1999**, *509*, 265.
- Otto, A.; *Z. Phys.* **1967**, *185*, 232.
- Kretschmann, E.; Kroger, E.; *J. Opt. Soc. Am.* **1975**, *65*, 150.
- Nyholm, T.; Andäng, M.; Bandholtz, A.; Maijgren, C.; Persson, B.; Hotchkiss, G.; Fehniger, T. E.; Larsson, S.; Åhrlund-Richter, L. J.; *Biochem. Biophys. Methods* **2000**, *44*, 41.
- Sparreboom, A.; Rongen, H. A. H.; van Bennekom, W. P.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, *295*, 1.
- Tsoi, P. Y.; Yang, J.; Sun, Y.-T.; Sui, S.-F.; Yang, M.; *Langmuir* **2000**, *16*, 6590.
- Nelson, B. P.; Grimsrud, T. E.; Liles, M. R.; Goodman, R. M.; Corn, R. M.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1.
- Wink, T.; Beer, J.; Hennink, W. E.; Bult, A.; van Bennekom, W.P.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 801.
- Baerga-Ortiz, A.; Rezaie, A. R.; Komives, E.A.; *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 651.
- Adamczyk, M.; Moore, J. A.; Yu, Z. G.; *Methods* **2000**, *20*, 319.
- Silin, V.; Plant, A.; *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 353.
- Pei, R.; Cui, X.; Yang, X.; Wang, E.; *Talanta* **2000**, *53*, 481.
- Dyr, J. E.; Rysavá, J.; Suttmar, J.; Homola, J.; Tobiska, P.; *Sens. Actuators, B* **2001**, *74*, 69.
- Okumura, S.; Akao, T.; Mizuki, E.; Ohba, M.; Inouye, K.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *47*, 177.
- Sonezaki, S.; Yagi, S.; Ogawa, E.; Kondo, A.; *J. Immunol. Methods* **2000**, *238*, 99.
- Sévin-Landais, A.; Rigler, P.; Tzartos, S.; Hucho, F.; Hovius, R.; Vogel, H.; *Biophys. Chem.* **2000**, *85*, 141.
- Quinn, J. G.; O'Neill, S.; Doyle, A.; McAtammey, C.; Diamond, D.; MacCraith, B. D.; O'Kennedy, R.; *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 135.
- Ivanov, Y. D.; Kanaeva, I. P.; Gnedenko, O. V.; Pozdnev, V. F.; Shumyantseva, V. V.; Samenkova, N. F.; Kuznetsova, G. P.; Tereza, A. M.; Shimid, R. D.; Archakov, A. I.; *J. Mol. Recognit.* **2001**, *14*, 185.
- Hatta, T.; Konishi, H.; Katoh, E.; Natsume, T.; Ueno, N.; Kobayashi, Y.; Yamazaki, T.; *Biopolymers* **2000**, *55*, 399.
- RichaletSecordel, P. M.; Poisson, F.; van Regenmortel, M. H. V.; *Clin. Diagn. Virol.* **1996**, *5*, 111.
- Liparoto, S. F.; Ciardelli, T. L.; *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 316.
- Toth, A.; Kiss, E.; Herberg, F. W.; Gergely, P.; Hartshone, D. J.; Erdodi, F.; *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1687.
- Alterman, M.; Sjobom, H.; Safsten, P.; Markgren, P. O.; Danielson, U. H.; Hamalainen, M.; Lofas, S.; Hulten, J.; Classon, B.; Samuelsson, B.; Hallberg, A.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 203.
- Webster, C. I.; Cooper, M. A.; Packman, L. C.; Williams, D. H.; Gray, J. C.; *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1618.
- Otamiri, M.; Nilsson, K. G. I.; *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *26*, 263.
- Munakata, H.; Takagaki, K.; Majima, M.; Endo, M.; *Glycobiology* **1999**, *9*, 1023.
- Adamczyk, M.; Mattingly, P.G.; Shreder, K.; Yu, Z. G.; *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1032.
- O'Shannessy, J. D.; Brigham-Burke, M.; Peck, K.; *Anal. Biochem.* **1992**, *205*, 132.
- Brockaman, J. M.; Frutos, A. G.; Corn, R. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8044.
- Adamczyk, M.; Chen, Y.-Y.; Gebler, J. C.; Johnson, D. D.; Mattingly, P. G.; Moore, J. A.; Reddy, R. E.; Wu, J.; Yu, Z.; *Steroids* **2000**, *65*, 295.
- Deckert, F.; Legay, F.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *23*, 403.
- Kaiser, T.; Gudat, P.; Stock, W.; Pappert, G.; Grol, M.; Neumeier, D.; Lupp, P. B.; *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 173.
- Mu, Y.; Zhang, H.; Zhao, X.; Wang, Z.; Cao, Y.; Liang, F.; Jin, Q.; *Quim. Anal.* **1999**, *18*, 277.
- Kukanski, K.; Elkind, J.; Melendez, J.; Murphy, T.; Miller, G.; Garner, H.; *Anal. Biochem.* **1999**, *274*, 7.
- Shaw, D. M.; Embleton, M. J.; Westwater, C.; Ryan, M. G.; Myers, K. A.; Kingsman, S. M.; Carroll, M. W.; Stern, P. L.; *Biochem. Biophys. Acta* **2000**, *1524*, 238.
- Gómara, M. J.; Ercilla, G.; Alsina, M. A.; Haro, I.; *J. Immunol. Methods* **2000**, *246*, 13.
- Gomes, P.; Giral, E.; Andreu, D.; *Vaccine* **1999**, *18*, 362.
- van Regenmortel, M. H. V.; Altschub, D.; Chatellier, J.; *Immunol. Invest.* **1997**, *26*, 67.
- Viking, T. P.; Askendal, A.; Liedberg, B.; Lindahl, T.; Tengvall, P.; *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 1257.
- Mozsolits, H.; Wirth, H.-J.; Werkmeister, J.; Aguilar, M.-I.; *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1512*, 64.
- Osinaga, E.; Bay, S.; Tello, D.; Babino, A.; Pritsch, O.; Assemat, K.; Cantacuzene, D.; Hakada, H.; Alzari, P.; *FEBS Lett.* **2000**, *469*, 24.
- Akkoyun, A.; Kohen, V. F.; Bilitewski, U.; *Sens. Actuators, B* **2000**, *70*, 12.
- Perkins, E. A.; Squirrel, D. J.; *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *14*, 853.
- Rasooly, L.; Rasooly, A.; *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *49*, 119.
- Lahiri, J.; Isaacs, L.; Grzybowski, B.; Garbeck, D. J.; Whitesides, G. M.; *Langmuir* **1999**, *15*, 7186.
- Lahiri, J.; Isaacs, L.; Tien, J.; Whitesides, G. M.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 777.
- De Mol, N. J.; Plomp, E.; Fischer, M. J. E.; Ruijtenbeek, R.; *Anal. Biochem.* **2000**, *279*, 61.
- Nedelkov, D.; Nelson, R.W.; *J. Mol. Recognit.* **2000**, *13*, 140.
- Sadana, A.; *Anal. Biochem.* **2001**, *291*, 34.
- Markgren, P. O.; Lindgren, M. T.; Gertow, K.; Karlsson, R.; Hamalainen, M.; Danielson, U. H.; *Anal. Biochem.* **2001**, *291*, 207.
- Markgren, P. O.; Hamalainen, M.; Danielson, U. H.; *Anal. Biochem.* **2001**, *279*, 71.
- Domagala, T.; Konstantopoulos, N.; Smyth, F.; Jorissen, R. N.; Fabri, L.; Geleick, D.; Lax, I.; Schlessinger, J.; Sawyer, W.; Howlett, G. J.; Burgess, A. W.; Nice, E.C.; *Growth Factors* **2000**, *18*, 11.
- Jung, L. S.; Shumaker-Parry, J. S.; Campbell, C. T.; Yee, S. S.; Gelb, M.H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4177.
- Oshannessy, D. J.; Winzor, D. J.; *Anal. Biochem.* **1996**, *236*, 275.
- Visser, N. V.; Smit-Kingma, I. E.; *Spectrochim. Acta, Part A* **1999**, *55*, 2271.
- Fivash, M.; Towler, E. M.; Fisher, R. J.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 97.
- Hall, D.; *Anal. Biochem.* **2001**, *288*, 109.
- Hassan, A. K.; Ray, A. K.; Nabok, A. V.; Davis, F.; *Sens. Actuators, B* **2001**, *77*, 638.
- Gaus, K.; Hall, E. A. H.; *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 1307.
- Caselunghe, M. B.; Lindeberg, J.; *Food Chem.* **2000**, *70*, 523.

77. Bilitewski, U.; *Anal. Chem.* **2000**, *1*, 682A.
78. Skládál, P.; Deng, A.; Kolár, V.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *399*, 29.
79. Frostell-Karlsson, A.; Remaeus, A.; Andersson, K.; Borg, P.; Hämäläinen, M.; Karlsson, R.; *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1986.
80. Zako, T.; Harada, K.; Mannen, T.; Yamaguchi, S.; Kitayama, A.; Ueda, H.; Nagamune, T.; *J. Biochem.* **2001**, *129*, 1.
81. Nedelkov, D.; Nelson, R. W.; *Anal. Chim. Acta* **2000**, *423*, 1.
82. Lu, H.B.; Campbell, C. T.; Castner, D. G.; *Langmuir* **2000**, *16*, 1711.
83. Nelson, R. W.; Nedelkov, D.; Tubbs, K. A.; *Anal. Chem.* **2000**, *1*, 404A.
84. Catimel, B.; Weinstock, J.; Nerrie, M.; Domagala, T.; Nice, E. C.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *869*, 261.
85. Shank-Retzliff, M. L.; Sligar, S. G.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4212.
86. Jungar, C.; Strandh, M.; Ohlson, S.; Mandenius, C. F.; *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 151.
87. Friggeri, A.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N.; *Langmuir* **1998**, *14*, 5457.
88. Terrettaz, S.; Stora, T.; Duschl, C.; Vogel, H.; *Langmuir* **1993**, *9*, 1361.
89. Georgiadis, R.; Peterlinz, K. A.; Ahn, J. R.; Peterson, A. W.; Grassi, J. H.; *Langmuir* **2000**, *16*, 6759.
90. Zhang, S.; Wright, G.; Yang, Y.; *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 273.
91. Lavers, C. R.; Harris, R. D.; Hao, S.; Wilkinson, J. S.; Odwyer, K.; Brust, M.; Schiffrin, D. J.; *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *387*, 22.
92. Chinowsky, T. M.; Saan, S. B.; Yee, S. S.; *Sens. Actuators, B* **1996**, *35*, 37.
93. Sadana, A.; Vo-Dinh, T.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2001**, *33*, 17.
94. Ramakrishnan, A.; Sadana, A.; *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *229*, 628.
95. Ramakrishnan, A.; Sadana, A.; *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 651.
96. Sadana, A.; Madagula, A.; *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 45.
97. Sadana, A.; Sii, D.; *Biosens. Bioelectron.* **1992**, *7*, 559.
98. Sadana, A.; Sii, D.; *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *151*, 166.
99. Glaser, R. W.; *Anal. Biochem.* **1993**, *213*, 152.
100. Sadana, A.; Beelaram, A. M.; *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 301.
101. Morton, T. A.; Myszka, D. G.; Chaiken, I. M.; *Anal. Biochem.* **1995**, *227*, 176.
102. Brennan, C. B.; Sun, L. F.; Weber, S. G.; *Sens. Actuators, B* **2001**, *72*, 1.
103. Dijkema, M.; Kamp, B.; Hoogvliet, J. C.; van Bennekom, W.P.; *Langmuir* **2000**, *16*, 3852.
104. Beulen, M. W. J.; Bugler, J.; de Jong, M. R.; Lammerink, B.; Huskens, J.; Schonherr, H.; Vancso, G. J.; Boukamp, B. A.; Wieder, H.; Offenhauser, A.; Knoll, W.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N.; *Chem. - Eur. J.* **2000**, *6*, 1176.
105. Yang, J. S.; Lee, C. C.; Yau, S. L.; Chang, C. C.; Lee, C. C.; Leu, J. M.; *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 871.
106. Friggeri, A.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N.; *Chem. - Eur. J.* **1999**, *5*, 359.
107. Iwasaki, Y.; Horiuchi, T.; Morita, M.; Niwa, O.; *Surf. Sci.* **1999**, *428*, 195.
108. Kajikawa, K.; Hara, M.; Sasabe, H.; Knoll, W.; *Jpn. J. Appl. Phys., Part 2* **1997**, *2*, L1116.
109. Jory, M. J.; Bradberry, G.W.; Cann, P.S.; Sambles, J.R.; *Sens. Actuators, B* **1996**, *35*, 197.
110. Tadjeddine, A.; *Electrochim. Acta* **1989**, *34*, 29.
111. Kotz, R.; Kolb, D. M.; Sass, J. K.; *Surf. Sci.* **1977**, *69*, 359.
112. Gordon, J. G.; Ernst, S.; *Surf. Sci.* **1980**, *101*, 499.
113. Tadjeddine, A.; Rahmani, A.; Costa, M.; *Chem. Phys.* **1990**, *141*, 15.
114. Jung, C. C.; Saban, S. B.; Yee, S. S.; Darling, R. B.; *Sens. Actuators, B* **1996**, *32*, 143.
115. Chinowsky, T. M.; Saban, S. B.; Yee, S. S.; *Sens. Actuators, B* **1996**, *35-36*, 37.
116. Salamon, Z.; Meyer, T. E.; Tollin, G.; *Biophys. J.* **1995**, *68*, 648.
117. Salamon, Z.; Wang, Y.; Tollin, G.; Macleod, H. A.; *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1195*, 267.
118. Salamon, Z.; Wang, Y.; Brown, M. F.; Macleod, H. A.; Tollin, G.; *Biochemistry* **1994**, *33*, 13706.
119. Iwasaki, Y.; Horiuchi, T.; Morita, M.; Niwa, O.; *Sens. Actuators, B* **1998**, *50*, 145.
120. Myszka, D. G.; Morton, T. A.; Doyle, M. L.; Chaiken, I. M.; *Biophys. Chem.* **1997**, *64*, 127.
121. Kienle, S.; Lingler, S.; Kraas, W.; Offenhäusser, A.; Knoll, W.; Jung, G.; *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 779.
122. Hanken, D. G.; Naujok, R. R.; Gray, J. M.; Corn, R. M.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 240.
123. Hanken, D. G.; Corn, R. M.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3665.
124. Lang, H.; Duschl, C.; Vogel, H.; *Langmuir* **1994**, *10*, 197.