

EMPREGO DE MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS**Renato S. Freire, Christiana A. Pessoa e Lauro T. Kubota***

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

Recebido em 18/7/02; aceito 9/10/02

SELF-ASSEMBLED MONOLAYERS APPLICATIONS FOR THE DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL SENSORS. Self-assembled monolayers (SAMs) modified electrodes exhibit unique behavior that can greatly benefit electrochemical sensing. This brief review highlights the applications of SAM modified electrodes in electroanalytical chemistry. After a general introduction, which includes the approaches for SAM development, different electrochemical systems for detecting inorganic and organic species are described and discussed. Special attention to the coupling of biological sensing element to the SAM is given, which can selectively recognize the analyte. Future prospects are also evaluated.

Keywords: chemically modified electrodes; self-assembled monolayers; electrochemical sensors.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da Química Analítica, principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, que têm levado a uma crescente busca por sensores com melhores características, tais como alta sensibilidade, seletividade e estabilidade¹⁻⁸. Apesar da grande versatilidade e perspectivas apresentadas pelos sensores eletroquímicos, a utilidade de um eletrodo é muitas vezes limitada devido a uma passivação gradual de sua superfície, que é consequência principalmente da adsorção dos produtos da própria reação de óxido-redução utilizada na detecção, ou ainda, dos sub-produtos destas reações que podem se polimerizar e se depositar sobre a superfície dos eletrodos⁶. Além disso, a sensibilidade de muitos analitos importantes pode ser prejudicada em função da cinética de transferência de elétrons entre estes compostos e os materiais dos eletrodos ser excessivamente lenta⁹. Uma outra limitação é a dificuldade de discriminar entre compostos alvos que possuam características redox similares⁹.

Uma área que oferece grande potencial para minimizar os problemas acima descritos, e conseqüentemente para aumentar a aplicabilidade e eficiência dos sensores eletroquímicos, é a que compreende os chamados eletrodos quimicamente modificados (EQM)^{9,10}. A habilidade para controlar e manipular deliberadamente as propriedades das superfícies dos eletrodos pode proporcionar uma variedade de efeitos atrativos, levando a superfícies com características que podem contornar efetivamente muitos dos problemas apresentados pelos sensores eletroquímicos tradicionais.

Estudos experimentais, suportados pela teoria, têm mostrado que a velocidade de transferência de elétrons pode ser sensivelmente afetada em função da modificação da superfície dos eletrodos¹¹. A classificação das reações do eletrodo pode ser feita com base no grau de interação entre os reagentes e a superfície do eletrodo, ocorrida durante o estado de transição da transferência de elétrons¹². Os processos de transferência de elétrons onde as interações entre as espécies reagentes e a superfície do eletrodo são fracas e não específicas, geralmente são definidos como sobreposições fracas. Neste caso, a energia livre de ativação para a transferência de elétrons não é afeta-

da pela proximidade das espécies eletroativas e o eletrodo. Em contraste, sobreposições fortes nos processos de transferência de elétrons envolvem interações fortes entre os centros de reação. Estas interações são extremamente importantes para reduzir a energia de ativação e, assim, determinar a cinética de transferência eletrônica¹².

Muitos processos eletroquímicos pertencem a esta última classe, e suas velocidades de transferência de elétrons podem ser significativamente afetadas e controladas alterando-se as superfícies dos eletrodos, isto é, modificando-as. Assim, muitos esforços têm sido direcionados para desenvolver diferentes abordagens de modificação das superfícies dos eletrodos^{9-10,13-14}. Existem muitos métodos para formar camadas funcionais finas sobre estas superfícies. A utilização de polímeros como modificadores tem sido muito popular, e muitos trabalhos sobre a modificação de superfícies de eletrodos empregando-se polímeros foram realizados¹⁵⁻¹⁷. Contudo, desde que as estruturas dos polímeros são heterogêneas, além de geralmente apresentarem uma grande variação em suas massas molares, é difícil realizar o controle das funções e das propriedades da camada modificadora em nível molecular. Além disso, é praticamente impossível discutir quantitativamente o mecanismo de transferência de elétrons e suas propriedades¹⁸. Estruturas mais ordenadas podem ser melhor controladas se a superfície for modificada por deposição seqüencial de monocamadas de moléculas funcionais. Neste caso, é muito mais fácil discutir a relação entre a estrutura e a função da superfície modificada.

Uma alternativa que tem sido muito usada nas últimas décadas envolve a formação de monocamadas auto-organizadas (SAM "self-assembled monolayers")^{12-14,19-22}. Este tipo de modificação emprega camadas monomoleculares que exibem uma alta organização e que são formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em solução constituída de moléculas anfóteras. Enquanto que a adsorção deste tipo de molécula é um resultado da afinidade de um grupo funcional do adsorvente, que apresenta certa especificidade para interagir com a superfície do substrato, a força motriz para a organização origina-se a partir de interações hidrofóbicas (por exemplo, do tipo van der Waals) das cadeias longas ligadas ao grupo funcional. Uma variedade de materiais (por exemplo, superfícies de Pt, Au, Ag, Cu etc.) e de moléculas anfóteras (como derivados alquil, álcoois, aminas, tióis etc.) têm sido empregados na confecção de sistemas organizados¹². As SAMs possuem

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

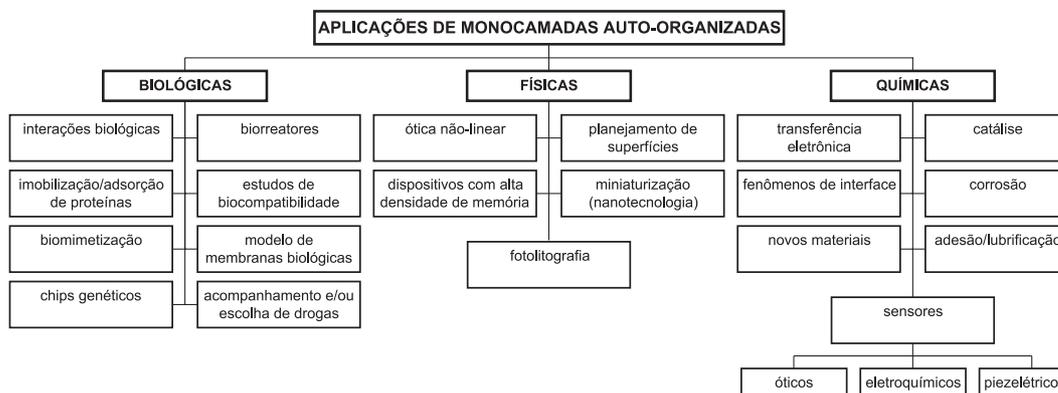


Figura 1. Organograma das principais aplicações das monocamadas auto-organizadas

uma ampla gama de aplicações, conforme é exemplificado esquematicamente na Figura 1. O presente trabalho irá abordar a aplicação das SAMs no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

Uma revisão da literatura científica revela que existem basicamente três diferentes abordagens por meio das quais as SAMs têm sido desenvolvidas e aplicadas em eletroanalítica. Elas podem ser classificadas de acordo com o mecanismo de fixação da monocamada sobre o eletrodo sólido¹². Historicamente, o primeiro tipo de SAM sobre eletrodos sólidos foi descrito por Sagiv²³⁻²⁵, que realizou a formação de monocamadas organizadas via o processo de silanização. Ele demonstrou que alquiltriclorosilanos sobre superfícies polares (por exemplo, possuindo grupos hidroxilas) levavam à formação de monocamadas organizadas quimicamente ligadas à superfície. A silanização tem sido largamente usada como um meio de modificação de superfícies de eletrodos. Assim, foi natural combinar a abordagem de Sagiv com procedimentos de silanização para montagem de monocamadas organizadas em superfícies ativadas (como SnO₂ e Al₂O₃) e numerosos estudos têm adotado esta via de modificação²⁶⁻²⁹.

A segunda abordagem para a confecção de SAM está relacionada com a técnica de Langmuir-Blodgett (LB) e envolve a formação de membranas lipídicas sobre os eletrodos sólidos. A adsorção, neste caso, é geralmente fraca e a organização das moléculas é estabilizada devido a forças intermoleculares. Este tipo de camada auto-organizada de moléculas anfóteras carregadas pode ser formada sobre uma variedade de superfícies sólidas, tais como superfícies metálicas, filmes finos de óxidos e mercúrio³⁰⁻³³.

A terceira categoria de monocamadas auto-organizadas tem crescido constantemente no decorrer dos últimos anos^{12,19-22}. Este tipo de formação de SAM faz uso da adsorção irreversível de alcanos funcionalizados sobre superfícies metálicas ordenadas. Apesar de uma grande variedade de alcanos funcionalizados e de superfícies metálicas terem sido examinadas, o grupo mais empregado e estudado é, indubitavelmente, de tióis sobre superfícies de ouro^{12,19-22}. Um emparelhamento perfeito entre os alcanotióis (geralmente com uma inclinação de 20 a 30 graus em relação à normal da superfície) e o retículo do ouro resulta numa estrutura altamente ordenada (Figura 2) e tem feito deste sistema objeto de um grande número de estudos por meios espectroscópicos, microscópicos e eletroquímicos¹². Vários trabalhos têm sido dedicados ao entendimento da estrutura e do ordenamento das monocamadas, que são caracterizadas pelo alto grau de organização e têm sido empregadas em estudos de transferência de elétrons³⁴⁻³⁹, adsorção de proteínas^{38,40-43} e, principalmente, em vários campos da eletroanalítica^{12,19-22,44-53}.

A preparação da monocamada possui um papel fundamental no desempenho eletroanalítico do eletrodo modificado. A estrutura da monocamada depende fortemente do substrato e de sua morfologia,

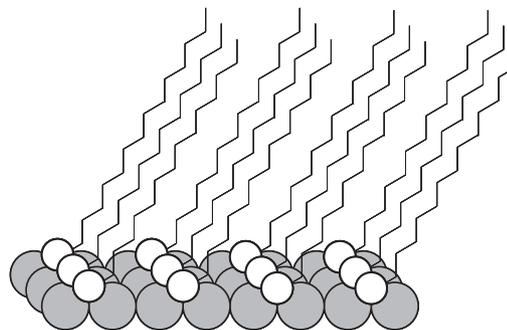


Figura 2. Esquema do emparelhamento entre os alcanotióis e o retículo do ouro numa camada auto-organizada. Átomos de enxofre representados em branco e átomos de ouro em cinza. Adaptado da ref. 54

da natureza do acoplamento e das forças intermoleculares entre as moléculas do adsorbato¹². Considerando-se que a espessura final da monocamada é de dimensão molecular e que, em muitos casos, o substrato não é atômica e plano sobre toda a superfície do eletrodo, a existência de defeitos na monocamada (que são muitas vezes chamados de “pin-holes”) é inevitável. Tais defeitos podem ter um efeito pronunciado no comportamento eletroquímico do eletrodo, que se pode assemelhar a um arranjo de ultramicroeletrodos. Assim, o pré-tratamento das superfícies dos eletrodos é muitas vezes um pré-requisito importante antes da montagem da monocamada. Uma grande variedade de procedimentos têm sido reportados e incluem tratamentos térmicos e químicos, ou ainda pré-tratamentos eletroquímicos, todos objetivando produzir superfícies limpas, homogêneas, relativamente planas e reprodutivas^{12,20-21}. Da mesma forma, muitos procedimentos descrevendo a formação de monocamadas têm sido reportados. Na maior parte dos casos, é aceito que o acoplamento do adsorbato é uma etapa relativamente rápida, que é seguida por um processo de organização muito mais lento. Estas etapas são usualmente realizadas em solventes orgânicos e a temperatura ambiente, por períodos de tempo que variam desde poucos minutos até muitos dias. A organização final da monocamada pode ser examinada empregando-se diferentes técnicas macroscópicas e microscópicas de superfície, principalmente espectroscópicas (espectroscopia de infravermelho, raios-X, microscopia etc.) e eletroquímicas (voltametria, impedância etc.). Estes métodos podem fornecer muitas informações detalhadas sobre a interface eletrodo-monocamada e também sobre a estrutura e orientação das monocamadas.

O emprego de monocamadas auto-organizadas pode oferecer vantagens substanciais para a eletroanalítica. Na Figura 3 são apresentadas algumas propriedades que podem ser empregadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. A habilidade para pré-projetar a monocamada possibilita desenvolver superfícies com propriedades e funções específicas, viabilizando interações quase específicas entre a superfície do eletrodo e os analitos alvos. A possibilidade de se obter uma estrutura molecular ordenada especificamente orientada faz com que seja possível otimizar processos, por exemplo de complexação e/ou de transferência de elétrons, que são fundamentais no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. A alta organização exibida pelas monocamadas assegura um comportamento homogêneo em toda a superfície do eletrodo, contribuindo para a obtenção de sensores com maior sensibilidade e reprodutibilidade. Além disso, a dimensão da monocamada, que se situa em escala molecular, evita uma difusão lenta das espécies eletroativas para a superfície, principalmente quando comparada com a cinética apresentada pelos eletrodos modificados com filmes poliméricos finos ou por compostos. As monocamadas organizadas ainda reduzem severamente as correntes residuais não faradáticas, e também a acumulação de espécies indesejadas sobre a superfície do eletrodo (passivação).

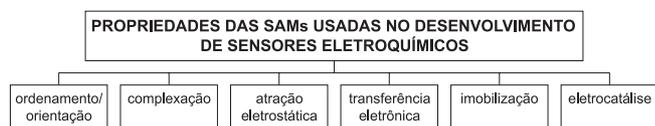


Figura 3. Organograma das principais propriedades das monocamadas auto-organizadas utilizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos

Neste trabalho será dedicada uma atenção especial às aplicações eletroanalíticas de monocamadas auto-organizadas de compostos orgânicos a base de enxofre na modificação da superfície de eletrodos (principalmente de ouro). Deste modo, aplicações de filmes de Langmuir-Blodgett e de métodos de silanização não serão abordadas no presente trabalho.

Monocamadas orgânicas ordenadas de compostos a base de enxofre sobre a superfície de eletrodos são de grande interesse, por razões fundamentais e práticas⁵⁴. O grupo terminal de enxofre destas moléculas é ligado ao ouro via uma ligação S-Au extremamente forte, enquanto que os grupos funcionais na outra extremidade da molécula controlam as propriedades da superfície do eletrodo, tais grupos podem ser manipulados de acordo com as mais variadas aplicações⁵⁴⁻⁵⁸. A SAM mais estudada e compreendida é a que emprega alcanotiois ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{S}^-$) sobre superfícies de Au(111). Para $n \geq 9$, o arranjo da SAM é proporcional ao do Au(111) subjacente e forma um entrelaçamento simples. Para cadeias menores, o empacotamento molecular costuma apresentar-se menos ordenado, devido às forças de van der Waals entre as cadeias não serem suficientemente fortes para alinhá-las paralelamente. Por exemplo, para butanotiolato ($n = 3$) uma fase líquida bidimensional e pouco ordenada predomina⁵⁹. Para muitas aplicações, grupos terminais como COOH e NH_2 são muito mais importantes que CH_3 . Por exemplo, ácido 3-mercaptopropiônico ($\text{COOH}(\text{CH}_2)_2\text{S}^-$, AMP) tem sido usado para acoplar grupos lisina do citocromo c e, deste modo, imobilizar a proteína sobre eletrodos mantendo sua conformação inalterada e promovendo o alinhamento dos centros redox da proteína em direção à superfície do eletrodo, para facilitar uma rápida transferência de elétrons^{58,59}.

Estas e outras aplicações serão exploradas e discutidas nas próximas seções que, para efeitos didáticos, foram divididas em função do tipo de composto alvo.

Eletrodos modificados com SAM - Análise de compostos inorgânicos

Um dos primeiros exemplos da utilização de eletrodos de ouro modificados com monocamadas auto-organizadas para o reconhecimento seletivo de íons metálicos foi descrito por Rubinstein e colaboradores⁶⁰. Eles observaram que uma monocamada mista composta por 2,2'-tiobisetilacetato (TBEA) e n-octadecil mercaptana (OM) sobre uma superfície de ouro reconhecia seletivamente Cu^{2+} na presença de outros íons, tais como Fe^{3+} . Esta seletividade foi obtida através de interações específicas entre os íons Cu^{2+} e o TBEA, ao passo que o OM serviu essencialmente para bloquear a difusão de outras espécies indesejáveis. Num trabalho posterior, Rubinstein e colaboradores⁶¹ utilizaram no lugar da OM, um outro agente bloqueador, o n-octadecil triclorosilano (OTS), conforme é apresentado esquematicamente na Figura 4. Este sistema produziu uma monocamada mais estável em relação àquela obtida empregando-se OM, tornando o sistema mais adequado para fins analíticos. Este eletrodo modificado possibilitou a determinação de Cu^{2+} (10^{-7} mol L^{-1}), Pb^{2+} (10^{-5} mol L^{-1}) e Zn^{2+} (10^{-9} mol L^{-1} , determinado por método indireto) com alta seletividade e mínima interferência de Fe^{3+} .

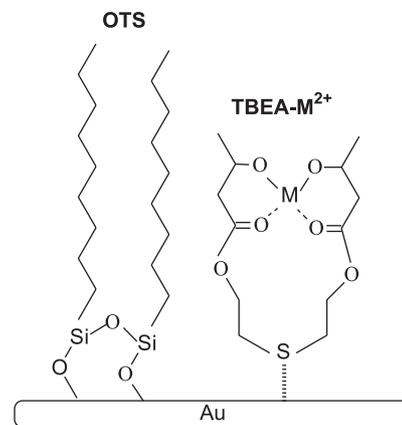


Figura 4. Representação esquemática de uma monocamada de TBEA + OTS sobre um eletrodo de ouro. M^{2+} = íon divalente ligado. Adaptado da ref. 61

Turyan e Mandler⁶² obtiveram limites de detecção extremamente baixos para Cd^{2+} (4×10^{-12} mol L^{-1} ou 0,45 ppb) ao utilizar eletrodos de ouro modificados com ácidos ω -mercaptopcarboxílicos. Tais eletrodos apresentaram uma alta estabilidade e fácil regeneração. A resposta destes eletrodos era baseada na extrema afinidade do cádmio (Cd^{2+}) por ácidos carboxílicos, formando complexos estáveis com os mesmos. Foi constatado que os eletrodos modificados com ácidos ω -mercaptopcarboxílicos de cadeia longa exibiram menor sensibilidade em relação aos modificados com monocamadas de ácidos de cadeia curta, isto provavelmente é devido à maior eficiência na transferência de elétrons apresentada por estes últimos. A seletividade dos eletrodos modificados foi avaliada pela determinação de íons Cd^{2+} na presença de outros íons que normalmente estão presentes em amostras de águas naturais. Foi constatado que vários dos possíveis íons interferentes (tais como Pb^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} e Cu^{2+}) não interferiram na determinação de Cd^{2+} , ao contrário dos íons Fe^{3+} e Cr^{3+} , que apresentaram resposta positiva, devido a suas afinidades por ácidos carboxílicos. Eletrodos modificados com monocamadas de ácidos ω -mercaptopcarboxílicos também foram investigados como eletrodos seletivos para Cu^{2+} e Ag^+ ^{63,64}, no entanto estes não apresentaram limites de detecção tão baixos quanto os verificados para Cd^{2+} ⁶².

Em um outro trabalho, Turyan e Mandler⁶⁵ desenvolveram um eletrodo modificado para especificação de Cr(VI) na presença de Cr(III), que foi baseado na formação de uma monocamada de 4-(mercaptan-*n*-alquil) piridínio sobre eletrodo de ouro. Os derivados de piridínio formam complexos fortes e estáveis com os íons CrO_4^{2-} e $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, assim, as monocamadas formadas extraem os íons Cr(VI), ao mesmo tempo que repelem cátions, como o Cr(III). Este eletrodo apresentou uma alta sensibilidade (limite de detecção abaixo de 1 ppt), além de uma alta seletividade por íons cromato.

A seletividade também pode ser adquirida através de interações eletrostáticas. Por exemplo, Crooks e colaboradores^{66,67} mostraram que o pH governa a atração de espécies carregadas, tanto orgânicas quanto inorgânicas, pelas SAMs de aminotiofenóis. Foi observado que quando o pH da solução é menor que o pKa da monocamada, ocorre a adsorção de íons carregados negativamente, como por exemplo 2,6-disulfonato-antraquinona. Por outro lado, espécies positivamente carregadas são repelidas pela superfície, tais como os íons $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. Um comportamento similar a este foi descrito por Chen e Brajter-Toth⁶⁸⁻⁷⁰ para uma monocamada de ácido tióico sobre ouro. A seletividade do filme de ácido tióico também pode ser controlada pelo pH da solução, já que o grupo carboxílico do ácido em contato direto com a solução tem um papel importante na carga apresentada pela monocamada. Como resultado desta característica a resposta, por exemplo, para ânion $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ pode ser efetivamente eliminada quando a carga da monocamada está negativa, isto é em pH mais alto quando o grupo carboxílico está dissociado. Por outro lado, um decréscimo significativo na resposta ao cátion $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ocorre quando a concentração de íons H^+ na solução é alta, o que resulta numa monocamada positivamente carregada, devido a uma alta concentração de íons H^+ no filme.

Em um trabalho interessante realizado por Whitesides e colaboradores⁷¹ foi construído um micros sensor voltamétrico para determinação de pH, utilizando-se uma monocamada mista de tióis de ferrocenil e quinona formada sobre um eletrodo de ouro. Como o potencial redox do ferroceno é insensível ao pH, enquanto que o da quinona é dependente do pH (deslocando-se 59 mV por unidade de pH), a diferença nas duas ondas de redução varia linearmente com o pH e, portanto, pode ser utilizada para determinar o pH voltametricamente.

Willner e colaboradores⁷² descreveram um sistema similar a este para a construção de um sensor de pH. No entanto neste caso, uma monocamada bifuncional foi formada, na qual a quinona foi ligada covalentemente ao ferroceno sobre o eletrodo de ouro, segundo o esquema mostrado na Figura 5. Este sistema foi utilizado para determinação de pH em soluções aquosas, de maneira similar ao descrito anteriormente por Whitesides e colaboradores⁷¹, mas sem a necessidade de um eletrodo de referência.

Em um trabalho realizado por Beulen e colaboradores⁷³, uma monocamada mista sobre eletrodo de ouro contendo sulfetos de ácido e ferroceno foi utilizada para a construção de um sensor para pH. Neste caso, o grupo carboxilato foi utilizado para influenciar o com-

portamento eletroquímico da unidade de ferroceno. A desprotonação do ácido leva a uma estabilização do estado oxidado do ferroceno, resultando no deslocamento catódico do potencial redox do mesmo.

Monocamadas auto-organizadas contendo éteres coroa têm sido utilizadas para a detecção de íons metálicos, tais como Na^+ , Li^+ , K^+ e Cs^+ , principalmente empregando-se a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. Neste sentido, Flink e colaboradores^{74,75} estudaram a coordenação de cátions metálicos a monocamadas de diferentes éteres coroa sobre eletrodos de ouro. Foi constatado que a combinação dos íons metálicos às monocamadas resulta em um aumento na sua capacitância, além de influenciar a resistência de transferência de carga. O monitoramento de ambos os parâmetros permitiu a determinação das constantes de associação para as interações entre vários íons metálicos com monocamadas formadas por éteres coroa de diferentes tamanhos.

Mais recentemente, aminoácidos e peptídeos têm sido empregados como elementos reconhecedores de íons sobre monocamadas auto-organizadas. Arrigan e Bihan⁷⁶ descreveram a obtenção de uma monocamada de L-cisteína sobre um eletrodo de ouro e realizaram o estudo da complexação de íons Cu^{2+} sobre esta por voltametria cíclica. Liu e colaboradores⁷⁷ mostraram a aplicação das monocamadas de L-cisteína na determinação eletroquímica de Cu^{2+} em níveis de ppb. Um estudo mais detalhado acerca da caracterização dessas superfícies foi realizado por Yang e colaboradores⁷⁸, usando uma combinação de técnicas eletroquímicas e espectroscópicas. De acordo com os resultados obtidos, eles propuseram que cada íon de cobre é complexado por duas cisteínas, através da coordenação com o grupo funcional ácido ($-\text{COO}^-$) e básico ($-\text{NH}_2$) da molécula de cisteína.

Em um outro trabalho, Yang e colaboradores⁷⁹ utilizaram um eletrodo de ouro modificado com uma SAM de um polipeptídeo, o ácido poli-L-aspártico (PLAsp), para determinação de Cu^{2+} em níveis de ppb. O PLAsp foi covalentemente ligado ao eletrodo de ouro modificado com ácido 3-mercaptopropiônico, através da ligação com a carbodiimida. A resposta do eletrodo aos íons cobre foi avaliada por voltametria cíclica e de onda quadrada.

Como pode ser observado, as SAMs contendo grupos específicos sobre eletrodos de ouro podem ser utilizadas com êxito para o reconhecimento seletivo de diferentes íons inorgânicos, com grande sensibilidade e seletividade. Uma das principais vantagens de se utilizar este tipo de superfície para construção de sensores eletroquímicos, principalmente para determinação de metais pesados, está no considerável aumento na sensibilidade em relação a outros eletrodos, como por exemplo os eletrodos modificados com matrizes poliméricas, possibilitando assim a determinação em amostras reais em níveis de partes por bilhão (ppb) e trilhão (ppt)⁵¹.

Eletrodos modificados com SAM - Análise de compostos orgânicos

A maioria das aplicações das SAMs em eletroanalítica consiste na determinação de espécies orgânicas de interesse biológico e

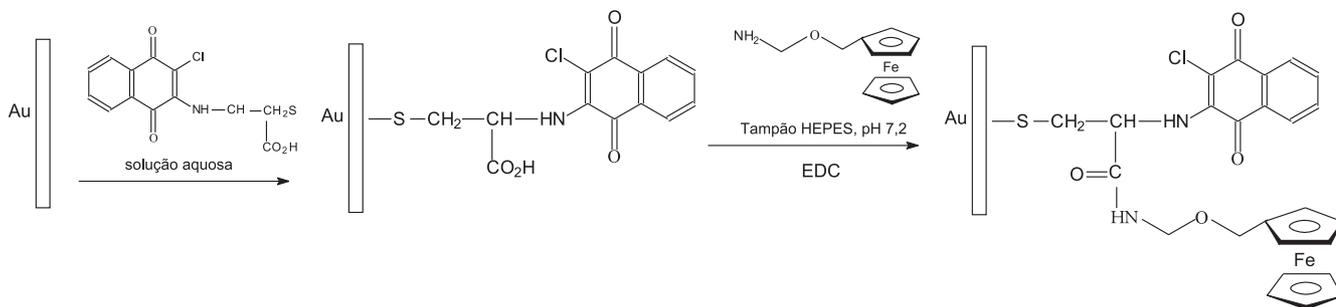


Figura 5. Formação de uma monocamada bifuncional de quinona-ferroceno sobre um eletrodo de ouro. Adaptado da ref. 72

ambiental. Isto pode ser atribuído a pelo menos três razões. Primeiramente, as monocamadas oferecem ambientes hidrofóbicos, similares aos utilizados em cromatografia de fase reversa, os quais são mais adequados para extração de moléculas orgânicas não iônicas. Além disso, há uma grande demanda no mercado de métodos analíticos simples e rápidos para determinação de substâncias orgânicas. Finalmente, as moléculas orgânicas apresentam maior gama de possíveis interações com a monocamada que os íons metálicos, possibilitando assim um aumento na seletividade.

Monocamadas de ácidos ω -mercaptocarboxílicos foram utilizadas por Malem e Mandler⁸⁰ como meio para induzir a diferenciação eletroquímica entre o neurotransmissor dopamina e o ácido ascórbico. Uma diferenciação ótima foi encontrada utilizando-se ácidos de cadeia média, como por exemplo o ácido 6-mercaptocarboxílico. Tal comportamento foi atribuído a um melhor compromisso entre uma monocamada bem organizada, que requer cadeias de tióis longas e uma razoável transferência de elétrons, a qual é geralmente observada com tióis de cadeia curta. Os autores também demonstraram a importância dos terminais COOH nas SAMs para definir a estrutura do empacotamento molecular e a dependência da estabilidade das monocamadas em função do potencial aplicado nos eletrodos. Giz e colaboradores⁵⁹ também estudaram o emprego de SAM a base de ácido mercaptopropiônico na confecção de sensores eletroquímicos para a determinação de dopamina, e concluíram que este método de modificação de superfícies apresenta vantagens frente a outros processos convencionais.

Ainda em relação à determinação de dopamina, Raj e Ohsaka⁸¹ utilizaram SAM para imobilizar um complexo macrocíclico de níquel sobre a superfície de um eletrodo de ouro. Este sensor foi utilizado para determinar ascorbato e dopamina com grande sucesso; empregando-se uma monocamada modificada, os autores obtiveram uma boa separação dos picos voltamétricos destas duas espécies (≈ 215 mV), o que permitiu a determinação simultânea destes compostos.

Wang e colaboradores⁸² mostraram que uma melhora substancial da seletividade no monitoramento amperométrico de sistemas em fluxo pode ser obtida utilizando-se como detector eletrodos de ouro recobertos com monocamadas de *n*-alcanotióis. Os autores realizaram a detecção amperométrica da droga clorpromazina em amostras de urina sem qualquer pré-tratamento inicial, utilizando tais eletrodos. Foi concluído que a seletividade do detector pode ser facilmente melhorada variando-se o tamanho da cadeia da monocamada. Uma propriedade atrativa da utilização de eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas como detectores em sistemas em fluxo está na inerente estabilidade do filme formado, mesmo sob condições hidrodinâmicas vigorosas.

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que são capazes de se coordenar a moléculas orgânicas dentro da sua cavidade hidrofóbica. Monocamadas auto-organizadas de α e β -ciclodextrinas modificadas com tióis e sulfetos têm sido preparadas para a detecção seletiva de compostos orgânicos⁸³⁻⁸⁷. Park e colaboradores⁸⁸ obtiveram monocamadas de β -ciclodextrinas sobre eletrodos de ouro e estudaram a inclusão de moléculas eletroativas com diferentes dimensões, tais como 2-metil-1,4-naftoquinona, *p*-benzoquinona e antraquinona. As moléculas capturadas nas cavidades foram detectadas por voltametria de varredura linear, obtendo-se limites de detecção na ordem de 10^{-8} mol L⁻¹. Além disso, a utilização dessas monocamadas conferiu seletividade em função do tamanho molecular.

D'Souza e colaboradores⁸⁹ utilizaram derivados de β -ciclodextrinas modificadas com um grupo antraquinona covalentemente ligado a uma das unidades de glicose. Neste caso, a adição de naftaleno deslocou o potencial redox do substituinte antraquinona. Kitano e colaboradores^{90,91} utilizaram monocamadas de α -ciclodex-

trinas para a detecção estereoseletiva do composto eletroquimicamente ativo 3,4-diidroxifenilalanina e compostos azo quirais.

Gadzekpo e colaboradores⁹², empregando eletrodos modificados com SAM, descreveram um sensor para detecção de heparina, um anticoagulante do sangue. Neste sensor, uma monocamada de ácido tióico foi formada sobre o eletrodo de ouro, e sobre esta monocamada foi imobilizado um policátion, a protamina. O analito, heparina, apresenta cargas negativas, que neutralizam as cargas positivas do receptor protamina. Em concentrações altas de heparina a superfície do eletrodo apresenta um excesso de cargas negativas, que causam repulsão dos íons [Fe(CN)₆]³⁻, utilizados como íons marcadores. Dessa forma, a resposta do sensor foi baseada na diminuição das correntes redox destes íons, que é uma função direta da concentração do analito. Eletrodos de ouro modificados com SAM de ácido tióico também foram utilizados para a detecção de protamina, baseados neste mesmo princípio utilizando, no entanto, o cátion [Ru(NH₃)₆]³⁺ como íon marcador⁹³.

A exploração de materiais biológicos tem se constituído em um fator positivo para o desenvolvimento da Química Analítica, promovendo avanços significativos sob os pontos de vista teórico, metodológico e aplicativo nos mais diferentes campos desta disciplina. Em relação à Eletroanalítica, nos últimos anos tem sido dada uma grande ênfase aos biossensores^{8,94,95}. Utilizando-se componentes biológicos, tais como enzimas e anticorpos, estes dispositivos têm demonstrado alta seletividade, sensibilidade e baixo custo, podendo ser empregados em métodos analíticos quase específicos para a determinação de compostos alvos^{6,96,97}. Biossensores eletroquímicos têm apresentado grande potencial para sua aplicação em análises de alimentos, clínicas e de controle ambiental^{6,98,99}.

Um dos grandes desafios para a construção de biossensores mais sensíveis, robustos e de maior confiabilidade é a imobilização das biomoléculas sobre superfícies condutoras, em sua forma estável e com a manutenção de suas propriedades biológicas de reconhecimento¹⁰⁰. Os procedimentos de adsorção, ligação cruzada, ligação covalente e encapsulamento em géis ou membranas são os métodos de imobilização de biomoléculas mais empregados^{101,102}. Contudo, estes processos produzem uma superfície altamente desorganizada, com as biomoléculas orientadas randomicamente, provocando mudanças conformacionais que afetam a atividade funcional do componente bioativo¹⁰³. Assim, somente uma pequena porcentagem das biomoléculas na superfície do eletrodo permanece ativa e mantém sua capacidade de interagir seletivamente com as moléculas do analito¹⁰³.

A auto-organização molecular tem se tornado um procedimento de derivação de superfícies bastante popular^{12,13,20-22,81,104-107}, principalmente devido à sua simplicidade, versatilidade e possibilidade de produzir, em escala molecular, estruturas altamente ordenadas. Este tipo de modificação tem apresentado uma excelente estabilidade frente a uma ampla faixa de potenciais de trabalho, e também fornece um microambiente favorável para a atividade biocatalítica das enzimas, pois pode simular membranas biológicas, aproximando o sistema das condições conformacionais ótimas observadas nos ambientes biológicos originais¹⁰⁵. Tais propriedades fazem da modificação por SAM um método de imobilização muito promissor para a construção de biossensores, pois permitem orientar as enzimas sobre a superfície dos eletrodos sem desnaturação, além de viabilizar a transferência eletrônica direta das enzimas para a superfície dos eletrodos^{12,38,108,109}.

Várias enzimas têm sido utilizadas em biossensores para determinar analitos de interesse clínico e ambiental. O acoplamento eletrônico entre as enzimas e o eletrodo nos biossensores pode ser realizado através de diferentes mecanismos: (i) pela eletroatividade do substrato ou produto enzimático (biossensores de primeira geração);

(ii) pelo auxílio de mediadores, livres em solução ou imobilizados juntamente com a enzima (biossensores de segunda geração) e, finalmente, (iii) pela transferência eletrônica direta entre a superfície do eletrodo e o centro ativo da enzima (biossensores de terceira geração)⁹⁵.

A utilização de SAM no desenvolvimento de biossensores apresenta potencialidade para aumentar o desempenho analítico dos três diferentes tipos de biossensores. A sensibilidade dos biossensores de primeira geração pode ser muito incrementada, pois este método de imobilização possui um efeito positivo na densidade, ambiente e disposição dos elementos biologicamente ativos³⁸. Estas características estão evidenciadas na Figura 6, que mostra esquematicamente a imobilização de uma biomolécula sobre a superfície de um eletrodo através dos métodos de adsorção, encapsulamento por ligação cruzada e por SAM³⁸. Este tipo de biossensor tem sido muito empregado na determinação de polifenóis¹¹⁰, DNA^{52,111} e, principalmente, de glicose¹¹²⁻¹¹⁵.

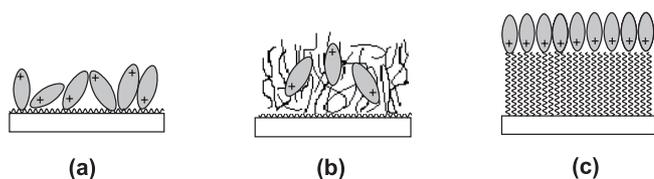


Figura 6. Representação esquemática dos processos de imobilização de biomoléculas por adsorção física (a), encapsulamento por ligação cruzada (b) e acoplamento orientado por monocamadas auto-organizadas (c)

Em relação aos biossensores de segunda geração, monocamadas contendo grupos eletroativos (mediador) fornecem uma possibilidade para estudar a transferência eletrônica a “longa distância” via o contato elétrico entre o elemento biocatalítico, o mediador e a superfície do eletrodo^{105,116}, conforme é exemplificado na Figura 7, onde o grupo viologênio foi utilizado como mediador eletrônico após a funcionalização de um composto tiol¹⁰⁵.

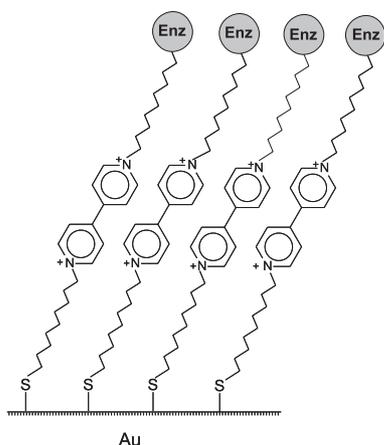


Figura 7. Representação esquemática de uma monocamada auto-organizada de tióis funcionalizados com o grupo viologênio sobre um eletrodo de ouro

Um dos maiores desafios para a obtenção de biossensores de segunda geração baseados em monocamadas auto-organizadas está justamente na obtenção de uma completa integração entre eletrodo, mediador e enzima. Por essa razão, várias estratégias de imobilização tanto do mediador quanto da enzima sobre a monocamada têm

sido desenvolvidas^{117,118}. O contato elétrico entre a proteína redox e o eletrodo pode ser obtido pela ligação covalente do mediador à estrutura da enzima. Por exemplo, em um eletrodo enzimático baseado na enzima glutatona redutase acoplada a uma SAM de um ácido carboxílico sobre eletrodo de ouro, o contato elétrico entre a enzima e o eletrodo foi estabelecido através da ligação covalente do N-metil-N'-carboxialquil-4,4-bipiridínio à estrutura da enzima^{118,119}. O eletrodo resultante electrocatalisou a redução da glutatona oxidada. Foi observado que a velocidade de formação do produto aumentava à medida que o tamanho da cadeia ligada aos grupos bipiridínicos aumentava, sendo este comportamento atribuído à melhora na comunicação elétrica com o sítio ativo da enzima¹¹⁹.

Uma outra maneira de se estabelecer melhor contato elétrico entre o centro redox da enzima e a superfície do eletrodo é por meio do método de reconstituição da enzima. Neste processo, o mediador é ligado diretamente ao centro redox da enzima, sendo a apoenzima (enzima sem o centro redox) posteriormente reconstituída sobre a superfície do eletrodo, de acordo com o esquema mostrado na Figura 8^{118,120}. Empregando-se este método foi construído um sensor para glicose¹²¹, onde o mediador pirroloquinolina quinona (PQQ) foi covalentemente ligado a uma monocamada de cisteamina e, posteriormente, reagido com um derivado amina do FAD, o N(6)-(2-aminoethyl)-FAD. A apo-glicose oxidase foi então reconstituída sobre esta superfície, apresentando propriedades bioeletrocatalíticas. Além da alta sensibilidade do biossensor resultante, a alta eficiência do contato elétrico estabelecido apresenta importantes conseqüências no desenvolvimento de futuros eletrodos enzimáticos.

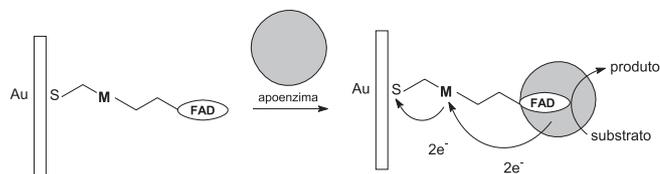


Figura 8. Esquema da reconstituição da apo-flavoenzima sobre eletrodo de ouro. M = mediador

A maioria das enzimas redox são dependentes de cofatores, tais como nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) ou fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP⁺). Para aplicação prática de um biossensor SAM baseado em uma enzima NAD⁺(P)-dependente é necessário que haja uma total integração do mediador, cofator e a enzima sobre a superfície SAM modificada, permitindo assim a ativação eletroquímica do biocatalisador. Isto é particularmente difícil uma vez que os cofatores NAD⁺ e NADP⁺ participam na transferência de elétrons via um processo difusional.

Willner e colaboradores¹²² desenvolveram um biossensor amperométrico para ácido málico utilizando uma enzima NAD(P)⁺-dependente. Para tanto, o mediador (pirroloquinolinaquinona (PQQ)) foi primeiramente imobilizado sobre uma monocamada de cisteamina sobre eletrodo de ouro sendo, posteriormente, a enzima covalentemente imobilizada utilizando-se carbodiimida (EDC). Neste caso, para que o biossensor respondesse ao substrato era necessária a adição do cofator NAD(P)⁺ à cela eletroquímica.

Como alternativa a este problema, os autores desenvolveram um sistema totalmente integrado, no qual enzima, mediador e cofator foram imobilizados conjuntamente sobre a monocamada auto-organizada. Para tornar isto possível, um derivado do cofator NAD⁺ foi sintetizado, o N-6-(2 aminoetil)-NAD⁺, sendo este então ligado covalentemente sobre o mediador PQQ, imobilizado sobre uma monocamada SAM de cisteamina. A enzima lactato desidrogenase

(LDH) foi imobilizada sobre o derivado amina do cofator através da ligação com glutaraldeído¹²³.

Um pré-requisito fundamental para o desenvolvimento de biossensores de terceira geração é o controle do processo de transferência de elétrons entre o sistema biocatalítico de reconhecimento e a superfície dos eletrodos. Esta transferência eletrônica depende, dentre vários fatores, da natureza do elemento biológico (somente um grupo reduzido de enzimas e proteínas apresenta esta propriedade) e da distância e orientação do centro de óxido-redução em relação à superfície do eletrodo. A imobilização empregando-se SAM permite um maior controle sobre estas duas últimas variáveis, facilitando a confecção deste tipo de sensor^{38,108,124,125}.

A transferência eletrônica entre o sítio ativo de um elemento biológico imobilizado e a superfície de um eletrodo é objeto de inúmeros estudos^{124,126-129}. Marcus e Sutin¹³⁰ demonstraram que a constante de velocidade da comunicação eletroquímica é governada pela diferença de potencial entre os centros redox envolvidos e, também, pela distância entre o sítio ativo e a superfície do eletrodo. SAMs têm sido largamente utilizadas na confecção de biossensores baseados na transferência direta de elétrons. Principalmente devido à sua homogeneidade, facilidade de preparação e possibilidade de variar tanto o comprimento das cadeias, como os grupos funcionais terminais, permitindo uma boa versatilidade para imobilizar compostos biocataliticamente ativos^{38,108,131,132}. Ainda, as SAMs possuem a habilidade de proteger as moléculas biocatalíticas da desnaturação, normalmente observada durante a interação com eletrodos não modificados³⁸.

Lötzbeier e colaboradores¹⁰⁸ estudaram o processo de transferência eletrônica direta entre diferentes biomoléculas e a superfície de um eletrodo de ouro modificada com monocamadas auto-organizadas, na tentativa de determinar as propriedades de uma “enzima ideal” para a construção de biossensores baseados na transferência direta de elétrons. Comparando a enzima HRP (“horseradish peroxidase”) nativa com as mini-enzimas MP-11 (microperoxidase 11) e hemina, ambas fragmentos do citocromo c, os autores concluíram que (1) a concentração superficial de biomoléculas menores (MP-11, hemina) pode ser significativamente superior que a observada para biomoléculas maiores (HRP), quando estes biocompostos são imobilizados em uma monocamada sobre a superfície do eletrodo; (2) a diferença na velocidade de transferência de elétrons entre a MP-11 ou hemina e o eletrodo demonstra que moléculas menores permitem uma aproximação maior do centro ativo em relação ao eletrodo, levando a um incremento na atividade eletrocatalítica; (3) para enzimas grandes (HRP, citocromo c) uma rápida transferência de elétrons somente pode ser atingida com uma orientação adequada do sítio ativo em relação à superfície do eletrodo. Neste caso, a difusão do substrato para o sítio ativo pode ser impedida por uma “concha” de proteínas.

Estes resultados abrem a possibilidade para a construção de sensores amperométricos sem a necessidade de imobilizar a enzima como um todo, mas somente seu sítio redox de interesse. A (bio)mimetização de componentes biológicos apresenta-se como uma alternativa atraente na busca de sensores mais sensíveis e robustos.

Com o objetivo de orientar o sítio ativo da enzima de maneira adequada sobre a superfície do eletrodo, para tornar a transferência direta de elétrons da HRP mais efetiva, Gorton e colaboradores¹³³ desenvolveram um eletrodo modificado baseado na reconstituição da enzima HRP sobre uma SAM. Para tanto, primeiramente uma monocamada de hemin-tiol foi formada sobre eletrodo de ouro e posteriormente imobilizada sobre esta a apoenzima HRP (enzima HRP sem o centro heme).

Gorton e colaboradores^{134,135} também estudaram a transferência de elétrons da enzima celubiose desidrogenase (CDH) sobre SAM. A CDH é uma enzima que contém dois sítios ativos, um grupo flavina

(FAD) e um grupo heme (citocromo b). Através da técnica de voltametria cíclica, foi observado que sobre eletrodos de ouro modificados com SAM de cisteamina, a parte heme da enzima CDH apresentava uma transferência de elétrons direta quase-reversível, diferentemente do observado para esta mesma enzima sobre eletrodos de grafite. Estes resultados mostraram claramente a importância da orientação da enzima sobre a superfície, uma vez que sobre a superfície de grafite é esperada uma orientação randômica, enquanto que sobre o eletrodo de ouro a enzima é capaz de se orientar de maneira a minimizar a distância entre o seu sítio ativo e a superfície do eletrodo facilitando, assim, a transferência de elétrons.

CONCLUSÕES E TENDÊNCIAS FUTURAS

O desenvolvimento de eletrodos eletroquímicos possui um grande interesse na comunidade científica, que pode ser comprovado pela quantidade crescente de publicações sobre este tipo de sensor. Tais dispositivos têm sido empregados na análise de um vasto número de substâncias de interesse clínico, biológico, ambiental e industrial. Entretanto, estes sensores ainda apresentam limitações, principalmente em relação à seletividade e robustez.

Sensores eletroquímicos baseados na modificação de suas superfícies por monocamadas auto-organizadas são muito atrativos, pois combinam a alta sensibilidade dos métodos eletroquímicos tradicionais com as novas possibilidades de aumento de seletividade e estabilidade promovidas pelas SAMs. Muitas das atuais limitações dos sensores eletroquímicos podem, potencialmente, ser superadas pela modificação/planejamento das superfícies em escala molecular, visando satisfazer as necessidades específicas de cada tipo de sensor eletroquímico, em função de sua aplicação. Assim, por exemplo, as monocamadas podem ser usadas não somente para aumentar a sensibilidade e seletividade de um determinado eletrodo, mas também contribuir para conferir um ambiente favorável para a análise dos compostos alvos, tornando o sensor menos susceptível às condições das amostras. Tais manipulações da arquitetura molecular na superfície dos eletrodos oferecem novos níveis de reatividade e aplicabilidade, que podem expandir consideravelmente o alcance dos sensores eletroquímicos.

A utilização de materiais auto-organizáveis no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos é relativamente recente, contudo tem demonstrado um amplo campo para ser explorado. Tal como descrito anteriormente, esta técnica pode ser empregada na confecção de eletrodos mais seletivos e sensíveis; no estudo da transferência eletrônica direta entre materiais biocatalíticos e eletrodos; na viabilização do uso de sistemas miméticos que empregam sistemas sintéticos com propriedades biocatalíticas, além de proporcionar uma melhor compreensão dos mecanismos de inúmeros processos químicos e biológicos. Devido à diversidade nas potencialidades de modificações (químicas e biológicas) dos eletrodos, várias novas aplicações das SAMs são esperadas num futuro próximo. Um exemplo bastante promissor é sua aplicação no desenvolvimento de nanotecnologias para a construção e modificação de arranjos de ultramicroeletrodos. O emprego de tais arranjos, modificados com diferentes enzimas (seletivas para determinadas classes de compostos) via SAM, apresenta grandes perspectivas para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos capazes de promover a determinação simultânea e *in situ* de uma série de compostos alvos presentes em vários tipos de matrizes complexas. Esta possibilidade é de grande interesse para uma ampla gama de aplicações, tais como clínica, farmacológica, alimentícia, industrial e ambiental.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Lawrence, N. S.; Beckett, E. L.; Davis, J.; Compton, R.G.; *Anal. Biochem.* **2002**, *303*, 1.
2. Svancara, I.; Vytras, K. I.; Barek, J.; Zima, J.; *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2001**, *31*, 311.
3. Budnikov, G. K.; *J. Anal. Chem.* **2000**, *55*, 1014.
4. Prodromidis, M. I.; Karayannis, M. I.; *Electroanalysis* **2002**, *14*, 241.
5. Wang, J.; *Talanta* **2002**, *56*, 223.
6. Rosatto, S. S.; Freire, R. S.; Durán, N.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 77.
7. Suzuki, H.; *Electroanalysis* **2000**, *12*, 703.
8. Vo-Dinh, T.; Cullum, B.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 540.
9. Wang, J.; *Electroanalysis* **1991**, *3*, 255.
10. Cox, J. A.; Tess, M. E.; Cummings, T. E.; *Rev. Anal. Chem.* **1996**, *15*, 173.
11. Murray, R. W. *Electroanalytical Chemistry*; Bard, A. J., ed.; Marcel Dekker: New York, 1984, vol. 13.
12. Mandler, D.; Turyan, I.; *Electroanalysis*, **1996**, *8*, 207.
13. Ferret, S.; Paynter, S.; Russell, D. A.; Sapsford, K. E.; Richardson, D. J.; *Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 530.
14. Linford, R. G.; *Electrochemical Science and Technology of Polymers*, Elsevier: London, 1987.
15. Malinauskas, A.; *Synth. Met.* **1999**, *107*, 75.
16. Schuhmann, W.; *Mikrochim. Acta.* **1995**, *121*, 1.
17. Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D.; *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 345.
18. Uoaski, K.; Sato, Y.; Kita, H.; *Langmuir* **1991**, *7*, 1510.
19. Ulman, A.; *Ultrathin Organic Films*, Academic Press, New York, 1991.
20. Wink, T.; van Zuilen, S. J.; Bult, A.; van Bennekon, W. P.; *Analyst* **1997**, *122*, 43R.
21. Chaki, N. K.; Vijayamohan, K.; *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 1.
22. Gooding, J. J.; Hibbert, D. B.; *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 525.
23. Sagiv, J.; *Isr. J. Chem.* **1979**, *18*, 339.
24. Sagiv, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 92.
25. Maoz, R.; Sagiv, J.; *J. Colloid Interface Sci.* **1984**, *100*, 465.
26. Britt, D. W.; Hlady, W.; *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *178*, 775.
27. Bunker, B. C.; Carpick, R. W.; Assink, R. A.; Thomas, M. L.; Hankins, M. G.; Voigt, J. A.; Sipola, D.; de Boer, M. P.; Gulley, G. L.; *Langmuir* **2000**, *16*, 7742.
28. Hatton, R. A.; Day, S. R.; Chesters, M. A.; Willis, M. R.; *Thin Solid Films* **2001**, *394*, 292.
29. Major, R. C.; Zhu, X. Y.; *Langmuir* **2001**, *17*, 5576.
30. Wolpers, M.; Viefhaus, H.; Stratmann, M.; *Appl. Surf. Sci.* **1990**, *45*, 167.
31. Zhao, C. X.; Zhang, J.; Liu, Z. F.; *Chem. Lett.* **1997**, *5*, 473.
32. Yu, H. Z.; Xia, N.; Zhang, J.; Liu, Z. F.; *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *448*, 119.
33. Meucci, S.; Gabrielli, G.; Caminati, G.; *Mater. Sci. Eng. C* **1999**, *8-9*, 135.
34. Krysinski, P.; Brzostowska-Smolka, M.; Mazur, M.; *Mater. Sci. Eng. C* **1999**, *8-9*, 551.
35. Fedurco, M.; *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *209*, 263.
36. Protsailo, L. V.; Fawcett, W. R.; *Electrochim. Acta* **2000**, *45*, 3497.
37. Haas, A. S.; Pilloud, D. L.; Redil, K. S.; Babcock, G. T.; Moser, C. C.; Blasie, J. K.; Dutton, P. L.; *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 11351.
38. Gilardi, G.; Fantuzzi, A.; *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 468.
39. Compton, D. L.; Laszlo, J. A.; *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *520*, 71.
40. Duan, C. M.; Meyerhoff, M. E.; *Mikrochim. Acta* **1995**, *117*, 195.
41. Disley, D. M.; Cullen, D. C.; You, H. X.; Lowe, C. R.; *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 1213.
42. Smith, A. M.; Ducey, M. W.; Meyerhoff, M. E.; *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 183.
43. Liu, Y. C.; Wang, C. M.; Hsiung, K. P.; *Anal. Biochem.* **2001**, *299*, 130.
44. Kinnear, K. T.; Mounbouquette, H. G.; *Biosens. Chem. Sens. Technol.* **1995**, *613*, 82.
45. Gerlache, M.; Senturk, Z.; Quarin, G.; Kauffmann, J. M.; *J. Solid State Electrochem.* **1997**, *1*, 155.
46. Yang, Z. P.; Kauffmann, J. M.; Valenzuela, M. I. A.; Osan, S.; *Mikrochim. Acta* **1999**, *131*, 85.
47. Alexander, P. W.; Rechnitz, G. A.; *Electroanalysis* **2000**, *12*, 343.
48. Cobi, K. V.; Ohsaka, T.; *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *485*, 61.
49. Cobi, K. V.; Sato, Y.; Mizutani, F.; *Electroanalysis* **2001**, *13*, 397.
50. Kim, J. M.; Park, J. Y.; Song, S. H.; Lee, B. J.; Muramatsu, H.; Chang, S. M.; *Sens. Actuators, B* **2001**, *76*, 74.
51. Turyan, I.; Atiya, M.; Mandler, D.; *Electroanalysis* **2001**, *13*, 653.
52. Xu, D. K.; Huang, K.; Liu, Z. H.; Li, Y. Q.; Ma, L. R.; *Electroanalysis* **2001**, *13*, 882.
53. Radford, P. T.; Creager, S. E.; *Anal. Chim. Acta.* **2001**, *449*, 199.
54. Ulman, A.; *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533.
55. Primer, K.L.; Whitesides, G.M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *115*, 2225.
56. Rubinstein, I.; Steingberg, S.; Tor, Y.; Shanzer, A.; Sagiv, Y.; *Nature* **1988**, *332*, 426.
57. Rojas, M. T.; Kaifer, A. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5883.
58. Clark, R. A.; Bowden, E. F.; *Langmuir*, **1997**, *13*, 559.
59. Giz, M. J.; Duong, B.; Tao, N. J.; *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *465*, 72.
60. Steinberg, S.; Tor, Y.; Sabatani, E.; Rubinstein, I.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5176.
61. Steinberg, S.; Rubinstein, I.; *Langmuir* **1992**, *8*, 1183.
62. Turyan, I.; Mandler, D.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 58.
63. Shen, H.; Mark, J. E.; Seliskar, C. J.; Mark, H. B.; Heineman, W. R.; *J. Solid State Electrochem.* **1997**, *1*, 241.
64. Nagaoka, T.; Chen, Z. D.; Okuno, H.; Nakayama, M.; Ogura, K.; *Anal. Sci.* **1999**, *15*, 857.
65. Turyan, I.; Mandler, D.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 894.
66. Sun, L.; Johnson, B.; Wade, T.; Crooks, R. M.; *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8869.
67. Jones, T. A.; Perez, G. P.; Johnson, B. J.; Crooks, R. M.; *Langmuir* **1995**, *11*, 1318.
68. Cheng, Q.; Brajter-Toth, A.; *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1998.
69. Cheng, Q.; Brajter-Toth, A.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2767.
70. Cheng, Q.; Brajter-Toth, A.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4180.
71. Hickman, J. J.; Ofer, D.; Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.; Wrighton, M. S.; *Science* **1991**, *252*, 688.
72. Lahav, M.; Katz, E.; Willner, I.; *Electroanalysis* **1998**, *10*, 1159.
73. Beulen, M. W. J.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N.; *Chem. Commun.* **1999**, *6*, 503.
74. Flink, S.; Boukamp, B. A.; van den Berg, A.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4652.
75. Flink, S.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N.; *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 6515.
76. Arrigan, D. W. M.; Bihan, L. L.; *Analyst* **1999**, *124*, 1645.
77. Liu, A. C.; Chen, D. C.; Lin, C. C.; Chou, H.; Chen, C. H.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1549.
78. Yang, W.; Gooding, J. J.; Hibbert, D. B.; *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *516*, 10.
79. Yang, W.; Gooding, J. J.; Hibbert, D. B.; *Analyst* **2001**, *126*, 1573.
80. Malem, F.; Mandler, D.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 37.
81. Raj, C. R.; Ohsaka, T.; *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *496*, 44.
82. Wang, J.; Wu, H.; Angnes, L.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 189.
83. Rojas, M. T.; Königer, R.; Stoddart, J. F.; Kaifer, A. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 336.
84. Lu, J. Y.; Park, S. M.; *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9940.
85. Choi, S. J.; Choi, B. G.; Park, S. M.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1998.
86. Sugawara, M.; Hirano, A.; Buhlmann, P.; Umezawa, Y.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, *75*, 187.
87. Suzuki, I.; Murakami, K.; Anzai, J.; *Mater. Sci. Eng. C* **2001**, *17*, 143.
88. Lee, J. Y.; Park, S. M.; *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9940.
89. Stine, K. J.; Andruskas, D. M.; Khan, A. R.; Forgo, P.; D'Souza, V. T.; *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *465*, 209.
90. Maeda, Y.; Fukuda, T.; Yamamoto, H.; Kitano, H.; *Langmuir* **1997**, *13*, 4187.
91. Fukuda, T.; Maeda, Y.; Kitano, H.; *Langmuir* **1999**, *15*, 1887.
92. Gadzekpo, V. P. Y.; Bühlmann, P.; Xiao, K. P.; Aoki, H.; Umezawa, Y.; *Anal. Chim. Acta* **2000**, *41*, 163.
93. Gadzekpo, V. P. Y.; Xiao, K. P.; Aoki, H.; Bühlmann, P.; Umezawa, Y.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5109.
94. Marko-Varga, G.; Emneus, J.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; *Trends Anal. Chem.* **1995**, *14*, 319.
95. Gilmartin, M. A. T.; Hart, J. P.; *Analyst* **1995**, *120*, 1029.
96. Wang, J.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 450R.
97. Karube, I.; Nomura, Y.; Arikawa, Y.; *Trends Anal. Chem.* **1995**, *14*, 295.
98. Wang, J.; Lu, J.; Ly, S. Y.; Tian, B.; Adeniyi, W. K.; Armendariz, R. A.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2659.
99. Yabuki, S.; Mizutani, F.; Asai, M.; *Biosens. Bioelectron.* **1991**, *6*, 311.
100. Freire, R. S.; Duran, N.; Kubota, L. T.; *Talanta* **2001**, *54*, 681.
101. Cosnier, S.; *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 443.
102. Kroger, D.; Liley, M.; Schiweck, W.; Skerra, A.; Vogel, H.; *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 1555.
103. Ramsden, J. J.; *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 593.
104. Muskal, N.; Turyan, I.; Mandler, D.; *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *409*, 131.
105. Dong, S.; Li, J.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1997**, *42*, 7.
106. Diao, P.; Jiang, D.; Cui, X.; Gu, D.; Tong, R.; Zhong, B.; *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *464*, 61.
107. Zhang, X.; Shen, J. C.; *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 1139.
108. Lötzbeyer, T.; Schuhmann, W.; Hanns-Ludwig, S.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1997**, *42*, 1.

109. Creager, S. E.; Olsen, K. G.; *Anal. Chim. Acta.* **1995**, *307*, 277.
110. Imabayashi, S.; Kong, Y. T.; Watanabe, M.; *Electroanalysis* **2001**, *13*, 408.
111. Sun, X. Y.; He, P. G.; Liu, S. H.; Ye, J. N.; Fang, Y. Z.; *Talanta* **1998**, *47*, 487.
112. Losic, D.; Gooding, J. J.; Shapter, J. G.; Hibbert, D. B.; Short, K.; *Electroanalysis* **2001**, *13*, 1385.
113. Gooding, J. J.; Situmorang, M.; Erokin, P.; Hibbert, D. B.; *Anal. Commun.* **1999**, *36*, 225.
114. Gooding, J. J.; Hall, E. A. H.; Hibbert, D. B.; *Electroanalysis* **1998**, *10*, 1130.
115. Karalemas, I. D.; Papastathopoulos, D. S.; *Anal. Lett.* **1998**, *31*, 913.
116. Katz, E.; Heleg-Shabtai, V.; Willner, B.; Willner, I.; Buckmann, A. F.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1997**, *42*, 95.
117. Willner, I.; Katz, E.; Willner, B.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 965.
118. Katz, E.; Riklin, A.; Hleg-Shabtai, V.; Willner, I.; Buckmann, A. F.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *385*, 45.
119. Willner, I.; Lapidot, N.; Riklin, A.; Kasher, R.; Zahavy, E.; Katz, E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1428.
120. Riklin, A.; Katz, E.; Willner, I.; Stocker, A.; Bückmann, A. F.; *Nature* **1995**, *376*, 672.
121. Willner, I.; Heleg-Shabtai, V.; Blonder, R.; Katz, E.; Tao, G.; Bückmann, A. F.; Heller, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10321.
122. Willner, I.; Riklin, A.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1535.
123. Bardea, A.; Katz, E.; Buckmann, A. F.; Willner, I.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9114.
124. Ferapontova, E. E.; Grigorenko, V. G.; Egorov, A. M.; Borchers, T.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *509*, 19.
125. Habermuller, K.; Mosbach, M.; Schuhmann, W.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 560.
126. Ghindilis, A.; Atanasov, P.; Wilkins, E.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 661.
127. Lindgren, A.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Baminger, U.; Haltrich, D.; Schulein, M.; *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *496*, 76.
128. Liu, H.; Ying, T.; Sun, K.; Li, H.; Qi, D.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *344*, 187.
129. Okawa, Y.; Nagano, M.; Hirota, S.; Kobayashi, H.; Ohno, T.; Watanabe, M.; *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 229.
130. Marcus, R. A.; Sutin, N.; *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265.
131. Katz, E.; Schmidt, H.L.; *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *368*, 87.
132. Edinger, K.; Golzhauser, A.; Demota, K.; Woll, C.; Grunze, M.; *Langmuir* **1993**, *9*, 4.
133. Zimmerman, H.; Lindgren, A.; Schuhmann, W.; Gorton, L.; *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 592.
134. Lindgren, A.; Larsson, T.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *494*, 105.
135. Lindgren, A.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Baminger, U.; Haltrich, D.; Schulein, M.; *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *496*, 76.