

POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS EM QUÍMICA ANALÍTICA. PARTE 2: APLICAÇÕES DE MIP (“MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS”) NO DESENVOLVIMENTO DE SENSORES QUÍMICOS

César Ricardo Teixeira Tarley, Maria Del Pilar Taboada Sotomayor e Lauro Tatsuo Kubota*

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

Recebido em 10/12/04; aceito em 3/3/05; publicado na web em 10/8/05

BIOMIMETIC POLYMERS IN ANALYTICAL CHEMISTRY. PART 2: APPLICATIONS OF MIP (MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS) IN THE DEVELOPMENT OF CHEMICAL SENSORS. The aim of this paper is the description of the strategies and advances in the use of MIP in the development of chemical sensors. MIP has been considered an emerging technology, which allows the synthesis of materials that can mimic some highly specific natural receptors such as antibodies and enzymes. In recent years a great number of publications have demonstrated a growth in their use as sensing phases in the construction of sensors. Thus, the MIP technology became very attractive as a promising analytical tool for the development of sensors.

Keywords: molecularly imprinted polymers; biomimetic sensors.

INTRODUÇÃO

A biomimetização de interações bioquímicas é um dos maiores desafios em várias áreas da ciência. A partir deste ponto de vista, polímeros sintéticos com impressão molecular, mais conhecidos como MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) têm atraído considerável atenção na última década, pois aparecem como uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de sistemas com reconhecimento biomimético semelhante aos sistemas específicos enzima-substrato e/ou antígeno-anticorpo¹. As vantagens dos MIP em relação aos materiais biológicos (enzimas e anticorpos) incluem fácil preparo, baixo custo; possibilidade de síntese em situações onde nenhuma biomolécula (receptor ou enzima) se encontra disponível ou quando elas possuem um alto preço e, resistência a ambientes adversos, nos quais biomoléculas naturais não resistiriam, como na presença de ácidos, bases, íons metálicos, solventes orgânicos, altas temperaturas e alta pressão^{2,3}. Ainda, os MIP podem ser armazenados a seco em temperatura ambiente por longos períodos de tempo, sem perda do desempenho inicial.

Devido aos sítios de ligação dos MIP, que apresentam afinidades e seletividades aproximadas aos dos sistemas anticorpo-antígeno, estes materiais são designados como polímeros biomiméticos. Neste sentido, não é surpreendente que exista atualmente uma forte tendência do seu uso como elementos de reconhecimento em sensores biomiméticos, em face da grande seletividade e sensibilidade inerentes às interações anticorpo-antígeno ou enzima-substrato.

Os MIP são obtidos por polimerização na presença de uma molécula molde a ser impressa, de tal forma que um esqueleto polimérico é formado ao redor do futuro analito ou de uma molécula com estrutura análoga. Após a polimerização a molécula que foi impressa é removida por dissolução ou evaporação (quando são analitos voláteis), revelando sítios de ligação (cavidades) que são complementares em forma e tamanho do analito (Figura 1). Com esta estratégia, o resultado é uma “memória” molecular no polímero, que é apropriada para que ocorra um processo de inclusão reversível e um enriquecimento seletivo do analito. A primeira etapa da síntese consiste em misturar o monômero contendo grupos funcio-

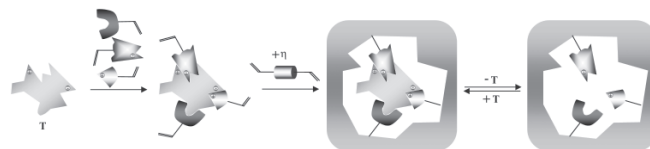


Figura 1. Representação esquemática do processo de impressão molecular

nais complementares àqueles da molécula molde, o que permite formar em solução o complexo “monômero-molécula molde”, por meio de interações (covalentes ou não covalentes) entre os respectivos grupos funcionais complementares. Posteriormente, são adicionados ao meio reacional o reagente de ligação cruzada e o iniciador radicalar de polimerização. Finalmente, a polimerização é induzida por meio de calor e/ou luz UV na ausência de oxigênio.

O método mais comum de preparo dos MIP é a polimerização em “bulk” onde, após a reação, o polímero obtido é triturado, resultando em pequenas partículas com impressão molecular, usualmente na escala de micrômetros. Este processo é bem estabelecido e bastante empregado quando o polímero é utilizado em colunas para HPLC, em ensaios biomiméticos de imunoafinidade e em espectrofluorimetria. Se necessário, o controle das partículas pode ser realizado por meio de peneiras e/ou por sedimentação. Contudo, este procedimento consome tempo e implica uma perda de material, obtendo-se apenas uma produção de partículas úteis de aproximadamente 20%⁴. Para contornar esta desvantagem um método alternativo foi introduzido e é chamado de geração das micropérolas ou micro-esferas^{5,6}. Estes materiais podem ser usados diretamente após sua obtenção, assim que a molécula molde for removida da cavidade seletiva por meio de extração com solvente. A grande vantagem do uso destas micropérolas é o tamanho uniforme das partículas obtidas. Desta forma, no uso em cromatografia resultados mais reprodutíveis poderão ser obtidos se a fase estacionária do MIP apresentar uma estrutura bem definida, com cavidades e tamanhos dos poros uniformes. Partículas deste tipo podem ser preparadas pela polimerização por suspensão em meio aquoso⁷, precipitação⁸, expansão em multi-etapas⁹ e polimerização sobre superfície modificada¹⁰. Para algumas aplicações a polimerização pode ser realizada *in situ*¹¹⁻¹⁴, como por ex., no caso da micro-extração em fase sólida, onde a polimerização é

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

realizada sobre um cabo de fibra óptica silanizada¹⁵. Polimerização *in situ* também pode ser usada para obtenção dos MIP sobre superfícies de transdutores, visando a construção de sensores químicos, em especial, para preparação de sensores potenciométricos¹⁶.

Os MIP têm apresentado real potencial como receptores biomiméticos para aplicações em técnicas de separação¹⁷, ensaios de fluoroafinidade^{18,19} e radioafinidade^{17,20}, e para desenvolvimento de sensores químicos^{16,17,19,21-24}. Neste sentido, a tecnologia de impressão molecular tem crescido rapidamente nos últimos anos, sendo empregada em áreas de grande importância como na indústria de alimentos²⁵, no monitoramento e controle de poluentes ambientais^{26,27}, na área de defesa e segurança, monitorando armas químicas de destruição em massa²⁸ e, mais recentemente, como uma ferramenta para o desenvolvimento de sistemas de liberação de drogas (“DDS - drug delivery systems”), atualmente em um estado incipiente²⁹.

O objetivo deste trabalho é mostrar em detalhe os avanços recentes no emprego dos MIP no desenvolvimento e aplicação de sensores biomiméticos, visando complementar o trabalho anterior³⁰, no qual foram descritas a preparação dos MIP e suas aplicações em técnicas de extração e separação.

EMPREGO DOS MIP NO DESENVOLVIMENTO DE SENSORES BIOMIMÉTICOS

Nas décadas passadas presenciou-se um grande aumento na atividade de desenvolvimento de sensores químicos; em particular, aquela relacionada ao desenvolvimento de biossensores tem tido um crescente interesse, principalmente devido às características oferecidas por estes dispositivos, tais como boa seletividade (decorrente do reconhecimento biomolecular) e possibilidade de serem portáteis, devido a seu tamanho pequeno e sua rápida resposta. Estas características os tornam potencialmente promissores para aplicação em indústrias farmacêutica, alimentícia, de contro-

le de processos industriais nas áreas médica, de análises clínicas e ambiental.

Um sensor químico ou biossensor pode ser definido como um dispositivo que emprega um elemento de reconhecimento intimamente acoplado a um transdutor, onde o elemento de reconhecimento é o responsável pela interação seletiva com o analito de interesse, sendo a parte crítica destes dispositivos. O transdutor tem como objetivo converter a energia do evento de reconhecimento em um sinal mensurável^{31,32}. Nos biossensores o reconhecimento seletivo é realizado por biomoléculas (receptores biológicos), tais como anticorpos ou enzimas, que possuem a capacidade de suprir as demandas analíticas para uma ampla gama de analitos de interesse². Contudo, a principal desvantagem destas biomoléculas em sensores está associada à pobre estabilidade química e física, resultando em uma falta de estabilidade operacional e de armazenagem, razões pelas quais os receptores artificiais têm atraído crescente interesse.

Uma metodologia alternativa que envolve o uso de receptores artificiais é a de impressão molecular. A alta estabilidade e seletividade destes materiais surgem como uma alternativa para o desenvolvimento de sensores biomiméticos, e isto fica bastante claro quando são comparadas as vantagens oferecidas pelos MIP em relação às biomoléculas naturais (Tabela 1). O termo sensor biomimético refere-se àqueles sensores nos quais os elementos biológicos, usados nos biossensores convencionais, são substituídos por compostos ou materiais que permitem a ocorrência de interações de reconhecimento de forma seletiva para um determinado analito, de forma similar ao que ocorre com o elemento biológico.

As tentativas iniciais que testaram as propriedades de reconhecimento dos MIP, visando seu emprego na construção de sensores, incluem medidas elipsométricas em finas camadas de MIP impressas com Vitamina K₁³³ e estudos da permeabilidade de membranas com impressão molecular³⁴. O primeiro sensor biomimético empregando MIP como elemento de reconhecimento foi um sensor de

Tabela 1. Comparação entre as características oferecidas pelas biomoléculas naturais (enzimas, anticorpos, receptores) e os MIP, em relação ao seu emprego na construção de biossensores e sensores biomiméticos

BIOMOLÉCULAS	MIP
Apresentam estabilidade variável, dependendo da estrutura e da fonte. São química, física e termicamente frágeis.	Apresentam altas estabilidades químicas, físicas e térmicas, por longos períodos de tempo.
Algumas enzimas e receptores, apesar de serem de fácil obtenção, apresentam custo elevado.	Geralmente são baratos e fáceis de preparar sempre que a quantidade da molécula molde for suficiente.
São restritas ao uso em meio aquoso. Muitas apresentam pobre desempenho em meio não aquoso.	Apresentam melhor desempenho em meio orgânico, porém também podem ser usados em meio aquoso.
A integração de várias biomoléculas com a finalidade de construir um dispositivo multicanal (contendo vários biossensores) pode ser dificultada, devido à variação nas características operacionais de cada biossensor (pH, força iônica, temperatura, substrato).	Como sofrem pouca influência da variação dos parâmetros operacionais (pH, força iônica, temperatura), em relação aos biossensores, são adequados para construção de dispositivos multicanais.
Precisam de condições especiais para armazenagem.	Podem ser estocados a seco e em temperatura ambiente.
Apresentam constantes de afinidade (constante de Michaelis-Menten) e cinética (velocidades “turnover”) com valores elevados.	Ainda nas melhores situações, as constantes de afinidade e cinética são menores que as obtidas com biomoléculas.
Considerações éticas podem estar envolvidas, principalmente no caso do uso de fontes animais.	São sintéticos e não precisam de nenhuma fonte natural.
Nos casos onde é conhecida a interação entre o reconhecedor biológico e o analito, podem ser usadas na construção de biossensores.	Podem ser sintetizados para analitos para os quais ainda não se conhece o elemento de reconhecimento biológico.
A preparação, separação, purificação e/ou liofilização consomem tempo, porém, uma vez que a biomolécula é isolada, pode ser realizada uma produção reprodutível em grande escala.	A preparação é relativamente rápida e com boa reprodutibilidade.
Não são reutilizáveis.	São reutilizáveis.

capacitância, desenvolvido pelo grupo de Mosbach, em 1991^{2,35}. O dispositivo consistiu de um capacitor de efeito de campo contendo uma fina membrana polimérica impressa com anilida de fenilalanina, na qual a ligação deste analito resultava em uma mudança na capacitância do sistema, permitindo a detecção qualitativa do mesmo. Posteriormente, um grande número de trabalhos descrevendo a aplicação dos MIP no desenvolvimento de sensores químicos foi publicado usando diversos tipos de transdutores, dentre os quais destacam-se: os eletroquímicos, tais como os transistores de efeito de campo (“FETs – field effect transistors”) e os eletrodos; os piezelétricos, que são transdutores sensíveis a variações de massa, tais como osciladores de onda acústica de superfície (“SAW – surface-acoustic wave oscillator”) e as microbalanças de quartzo (“QCM – quartz crystal microbalance”), e ópticos, baseados no uso de fibras ópticas como guias de luz.

No intuito de construir estes sensores químicos, a imobilização do MIP na superfície do transdutor é de grande importância e, a seguir, são descritas as estratégias de imobilização que têm sido empregadas com este propósito. Ademais, serão apresentados outros métodos de preparo de sensores biomiméticos, cuja formação dos sítios seletivos não se dá por meio da síntese convencional dos MIP.

ACOPLAMENTO DE RECEPTORES SINTÉTICOS SELETIVOS NOS DIFERENTES TIPOS DE TRANSDUTORES

De maneira análoga à construção de biossensores, um ponto muito importante na construção dos sensores biomiméticos é encontrar uma forma adequada de acoplar o material sintético contendo o receptor seletivo ao transdutor, com finalidade de colocá-los em contato íntimo. Neste sentido, a estratégia para acoplar o MIP com o transdutor dependerá da natureza física do transdutor. Se o transdutor for um eletrodo sólido, tal como ouro e carbono vítreo, a imobilização pode ser dividida basicamente em dois grupos. O primeiro compreende o encapsulamento do MIP dentro de matrizes suportes, cujo material resultante é posteriormente depositado sobre a superfície do transdutor. No segundo grupo e também o mais empregado, a imobilização do material seletivo contempla a formação de filmes sobre a superfície do transdutor. Neste caso, diferentes estratégias adotadas na formação dos filmes têm sido propostas, tais como, a polimerização direta do MIP sobre o transdutor; a polimerização *in situ* do MIP, a qual é realizada por eletropolimerização; filmes com impressão molecular empregando monocamadas auto-organizadas e filmes com impressão molecular empregando o processo sol-gel. Quando o transdutor possuir características granulares, por ex. grafite em pó, o MIP é facilmente misturado com o grafite formando um compósito. Com base no exposto, a seguir são descritas as estratégias que têm sido empregadas para construção destes sensores biomiméticos.

Imobilização do MIP por oclusão

Esta é a estratégia de imobilização mais simples, e baseia-se no encapsulamento de partículas de MIP dentro de matrizes suportes, tais como géis³⁶ ou polímeros solúveis inertes^{37,38}, para formar membranas que podem ser fixadas mecanicamente na superfície do transdutor. Os MIP ainda podem ser encapsulados como uma fina camada de partículas poliméricas, entre a superfície do transdutor e uma membrana inerte^{39,40}.

Contudo, apesar da facilidade da imobilização, existem algumas desvantagens que devem ser consideradas²¹, entre elas, as mais importantes são limitações difusionais resultando em sensores com tempo de resposta longo; ligações não específicas do analito po-

dem acontecer na matriz suporte, ou, ainda, diminuição da capacidade de ligação, originada pelo bloqueio dos sítios específicos por parte do material usado como matriz suporte.

No tipo de imobilização por oclusão são empregadas partículas de MIP previamente sintetizadas, que podem ter sido obtidas pelo método de polimerização em “bulk” ou na forma de microesferas. O emprego de partículas obtidas pelo método em “bulk” é mais comum, devido à facilidade inerente de obtenção. Já o uso de micropérolas tem sido apenas recentemente mostrado na construção de sensores piezelétricos^{41,42}.

Este tipo de estratégia de imobilização tem sido restringida ao desenvolvimento de sensores piezelétricos, pois, no caso de sensores ópticos e eletroquímicos a adsorção não específica tem sido observada.

Imobilização de MIP em compósitos

Outro procedimento para preparo de sensores modificados com MIP, particularmente os eletroquímicos, baseia-se na formação de materiais compósitos à base de grafite em pó^{43,44}. A vantagem desta imobilização é tornar os processos de limpeza destes sensores (extração do analito do MIP) mais simples. Desta forma, após cada uso, a superfície do sensor pode ser facilmente renovada por meio de um simples polimento mecânico da superfície.

Uma estratégia para construção de sensores biomiméticos usando este tipo de imobilização é o uso de pastas de carbono modificadas, que permitem fácil incorporação de partículas de MIP no desenvolvimento de sensores amperométricos e voltamétricos. Contudo, a necessidade freqüente do uso de solventes orgânicos restringe a aplicação deste tipo de sensores, a menos que o desempenho do MIP tenha sido testado em meio aquoso. Apenas Yamasaki e colaboradores^{44,45} têm mostrado o emprego de pasta de carbono modificada na construção de sensores biomiméticos baseados em MIP em meio aquoso. Estes autores, recentemente relataram um sensor amperométrico à base de pasta de carbono modificada com partículas de MIP para determinação de frutossil-valina (Fru-val), como um indicador do grau da diabetes⁴⁴. As partículas de MIP foram obtidas usando Fru-val como molécula molde, utilizando-se o método de polimerização em “bulk”, as quais foram trituradas, peneiradas e, posteriormente, misturadas com grafite em pó e um aglutinante, no caso óleo mineral, para obtenção da pasta de carbono.

Por outro lado, Pizzariello e colaboradores⁴³ relataram a preparação de um sensor voltamétrico para determinação de clenbuterol em ácido perclórico contendo 10% de etanol. O compósito foi preparado misturando-se partículas de MIP (previamente obtidas pelo método de polimerização em “bulk”), grafite em pó e *n*-eicosano usado como matriz sólida de ligação.

Formação de filmes seletivos sobre superfície de transdutores para desenvolvimento de sensores biomiméticos

Polimerização direta do MIP sobre a superfície do transdutor

O uso de filmes na superfície dos transdutores é a estratégia mais amplamente empregada na construção de sensores baseados em MIP. Nestes casos, o controle da espessura da camada sensora é necessário para se obter tempo de resposta e sensibilidade adequadas para aplicação do sensor⁴⁶. Existem várias estratégias para obtenção de filmes de MIP na superfície dos transdutores e a seguir, são descritos os procedimentos mais comumente empregados. Cabe lembrar que em todos os procedimentos, a síntese do polímero é realizada sobre a superfície do transdutor.

Os filmes podem ser preparados sobre a superfície dos transdutores, por meio da polimerização de monômeros funcionais

derivados do ácido meta-acrílico (MAA), vinil piridina (VP) ou acrilamida, seguindo procedimentos similares àqueles usados na obtenção de partículas MIP por polimerização em “bulk”, usando reagentes de ligação cruzada, molécula molde e iniciadores de polimerização⁴⁷⁻⁵⁵. Para iniciar a polimerização térmica, o composto 2,2'-azo (*bis*)2-isobutironitrila (AIBN) tem sido amplamente empregado; já para promover a polimerização fotoquímica, além do AIBN, também têm sido usados derivados de benzofenonas^{51,53} ou acetofenonas⁵⁵ como iniciadores radiculares.

Para obtenção dos filmes nas superfícies dos transdutores, várias alternativas têm sido empregadas. A mais simples é a adição de pequenas quantidades (μL) da solução de polimerização sobre a superfície dos transdutores, cujo procedimento é comumente conhecido como a técnica do sanduíche, e tem sido usada na preparação de sensores piezelétricos^{27,56,57}, de efeito de campo (ISFETs)⁵⁴ e na preparação de membranas para condutometria⁴⁸. Outra possibilidade de obtenção dos filmes consiste na imersão do transdutor em uma solução onde a polimerização já tenha sido iniciada, ficando retida uma fina camada do polímero na ponta do transdutor; este é o caso de sensores baseados em feixes de fibras ópticas^{49,52} e eletrodos de ouro⁵¹. Em alguns casos, a silanização da superfície do eletrodo deve ser previamente realizada, com finalidade de ativar a superfície para a interação com as moléculas do polímero^{21,58}. Outra alternativa inclui o uso da técnica de “spin-coating”, cujo procedimento consiste na adição de uma alíquota da mistura de polimerização sobre a superfície do transdutor. Este, por sua vez, é submetido a uma alta rotação, em geral maior que 500 rpm, para retirar o excesso da mistura de polimerização e somente deixar uma fina camada do polímero na superfície do eletrodo⁵⁵. Finalmente, o enxerto da superfície do transdutor estimulada por fotopolimerização (“grafting photopolymerization”) tem sido proposto para-se obter filmes finos na superfície dos transdutores. Neste processo, o iniciador de polimerização é primeiramente adsorvido na superfície do transdutor, após a mistura contendo o monômero e a molécula molde ser depositada, permitindo que a polimerização ocorra na presença de radiação UV. Após a polimerização e remoção do excesso, apenas um fino filme permanece na superfície do transdutor. Esta técnica tem sido empregada na construção de sensores de capacitância usando eletrodos de ouro^{51,53}.

Cabe ressaltar que nas imobilizações baseadas em monômeros derivados de VP, MAA e acrilamina, a preparação do polímero deve ser realizada em condições isentas de oxigênio, já que a presença deste pode inibir o processo de polimerização, devido à formação de radicais livres secundários. Isto implica em que os transdutores devam ser apropriadamente condicionados em atmosfera inerte, o que poderá acarretar alguma dificuldade de execução.

Membranas de MIP também podem ser obtidas por meio da evaporação de soluções de polímeros lineares pré-formados contendo o analito. Estes polímeros lineares atuam simultaneamente como polímero funcional para interagir com a molécula molde e como matriz polimérica⁵⁹⁻⁶². A evaporação de uma solução destes polímeros na superfície do transdutor resultará em uma membrana rígida que é insolúvel em água e em solventes orgânicos, e cuja porosidade e permeabilidade podem ser controladas pelo ajuste da concentração de polímero e da molécula molde na solução que será evaporada. Uma grande vantagem desta técnica é a simplicidade para construção dos sensores. Por outro lado, a síntese do polímero linear é muito trabalhosa e consome bastante tempo. Ademais, é difícil controlar e direcionar a conformação adotada pelo polímero durante a solidificação⁶³.

Uma variação do uso de polímeros pré-formados para obtenção de membranas, é a técnica de precipitação pela inversão da fase (“phase inversion precipitation”)^{60,61,64}. Neste tipo de metodologia primeiramente é preparada uma solução orgânica contendo um polímero linear e a molécula molde. A seguir, um deter-

minado volume é colocado em uma superfície plana (que serve como base para se obter membranas uniformes) a qual, a seguir, é colocada em água (troca de fase) para promover a “coagulação” a uma temperatura adequada. Uma vez realizada a coagulação do polímero contendo a molécula molde, este é mantido em água a fim de se retirar todo excesso de solvente orgânico, usado na preparação da mistura polímero/molécula molde. O polímero resultante (que se apresenta na forma de membrana) é submetido à extração da molécula molde. Com base nesta metodologia, Kobayashi e colaboradores⁶⁴ desenvolveram um sensor piezelétrico para determinação de cafeína, no qual a membrana foi obtida pela técnica de precipitação pela inversão da fase, empregando o polímero PAN-co-AA (poli-acrilonitrila-co-acrílico).

Polimerização *in situ*

A síntese dos MIP *in situ* é comumente realizada por meio de eletropolimerização sobre superfícies condutoras, tal como ouro^{65,66} ou grafite⁶⁷. Os MIP preparados por esta técnica não requerem tratamento especial do material resultante, podendo ser imediatamente usados após a extração da molécula molde.

Esta técnica é bastante atraente devido à facilidade da preparação, a qual é realizada por sucessivas varreduras cíclicas de potencial, em soluções contendo o monômero e a molécula molde. Na polimerização *in situ* podem ser obtidos filmes muito finos, com boa reprodutibilidade, em uma ampla gama de substratos condutores, tornando-se conveniente para integração da etapa de imobilização em um processo automático de produção em massa¹⁶. Por outro lado, devido ao fato de que polímeros obtidos por meio deste método não foram ainda estudados a fundo, em relação à possibilidade de estarem sendo de fato molecularmente impressos, seu uso é menos comum que aqueles baseados em monômeros derivados de MAA e VP²¹. Adicionalmente, a eletropolimerização limita sua aplicação para construção de sensores que possuam transdutores com superfícies condutoras, como é no caso dos eletroquímicos e piezelétricos. Sensores ópticos e membranas condutométricas estarão fora deste alcance, porém outras técnicas de imobilização do MIP *in situ* poderão vir a serem desenvolvidas para este tipo de sensores.

Em 1999, Malitesta e colaboradores⁶⁵ relataram o primeiro sensor obtido pela eletropolimerização de *orto*-fenilenodiamina na presença de glicose (molécula molde), na superfície de um eletrodo de platina, pertencente a um dispositivo piezelétrico. No mesmo ano, Panasyuk e colaboradores⁶⁶ relataram a eletropolimerização de fenol na superfície de eletrodos de ouro na presença de fenilalanina (molécula molde), na construção de um sensor de capacitância. Recentemente, Weetall e Rogers⁶⁷ descreveram a eletropolimerização de uma mistura equimolar de resorcinol e *orto*-fenilenodiamina na presença do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) na superfície de grafite HB usado para desenho, para realização de medidas voltamétricas empregando a voltametria de onda quadrada.

Outra alternativa interessante aos polímeros não condutores (MAA e VP), e que tem sido empregada na construção de sensores usando a técnica de eletropolimerização *in situ*, é a preparação de MIP usando polímeros condutores⁶⁸⁻⁷². Este método torna-se bastante adequado, considerando-se a capacidade que os polímeros condutores possuem para detectar moléculas, usando a cavidade gerada por uma molécula dopante, de forma semelhante ao que ocorre nos MIP convencionais. No caso particular do polipirrol, a formação dos sítios de ligação seletiva está baseada na sobre-oxidação irreversível que sofre o polipirrol em potenciais mais altos que aqueles nos quais ocorre a entrada e saída reversível da molécula dopante, conhecido como efeito “doping/undoping”. Durante o processo de sobre-oxidação, a molécula dopante (molécula molde) é expelida da estrutura

polimérica. Esta nova estratégia de impressão molecular elimina a etapa de extração da molécula molde⁴⁶.

Filmes com impressão molecular empregando monocamadas auto-organizadas

As monocamadas auto-organizadas com impressão molecular podem ser imaginadas como nano-estruturas bidimensionais rígidas, organizadas ao redor de uma molécula molde⁴⁶. A preparação destas monocamadas é relativamente fácil, envolvendo a adsorção simultânea do mercaptano (alcanotiol) e da molécula molde em superfície metálica (geralmente ouro), com posterior dessorção da molécula molde. A formação da monocamada seletiva somente será possível se ocorrer formação de um complexo estável entre a molécula molde e o alcanotiol⁴⁶. Exemplo deste tipo de imobilização foi apresentado por Piletsky e colaboradores⁷³, que desenvolveram um sensor amperométrico para determinação seletiva de colesterol, usando uma monocamada auto-organizada de hexadecil-mercaptano na superfície de eletrodos de ouro contendo sítios seletivos para colesterol. Uma importante consideração acerca destes sensores biomiméticos deve-se ao fato de que as cavidades seletivas são formadas sem necessidade da síntese convencional dos MIP. Isto significa que preparar os sensores biomiméticos por meio de monocamadas não requer o emprego de monômeros, reagentes de ligação cruzada e iniciadores radiculares. Apesar disso, devido à formação de cavidades seletivas, os referidos sensores podem figurar perfeitamente entre os sensores biomiméticos, tais como aqueles modificados com MIP.

As pequenas espessuras das monocamadas auto-organizadas com impressão molecular fornecem um meio ótimo para minimizar os problemas relacionados às barreiras difusionais. Contudo, a principal desvantagem que estas monocamadas impressas apresentam, é a falta de estabilidade da organização das moléculas na superfície do eletrodo, ocorrendo rapidamente a perda total das propriedades seletivas de reconhecimento molecular⁴⁶. Este fato tem sido explicado como sendo consequência da difusão lateral de moléculas através das monocamadas. No intuito de solucionar este problema, Mirsky e colaboradores⁷⁴ propuseram um procedimento alternativo, que chamaram de “spreader-bar”⁷⁵. Neste procedimento, a obtenção das monocamadas é realizada por meio da co-adsorção de duas moléculas na superfície do eletrodo, uma delas correspondendo às da matriz (um alcanotiol de cadeia longa) e a outra, a uma molécula molde com estrutura similar à do analito, porém contendo grupos tióis, para permitir que ocorra a ligação na superfície do eletrodo. Neste tipo de arranjo, as moléculas molde não são dessorvidas da superfície do eletrodo, obtendo-se uma monocamada mista com poros que apresentam a mesma morfologia da molécula molde e, por sua vez, adequada para o analito. Devido à formação de “nano-tunéis” onde o analito pode-se encaixar perfeitamente, a diferença notada entre os sensores preparados com monocamadas impressas bidimensionais e os sensores construídos usando a técnica “spreader-bar”, é que estes últimos apresentam maior estabilidade, já que o problema da difusão lateral é diminuído.

Filmes com impressão molecular empregando o processo sol-gel

Materiais sol-gel com impressão molecular podem ser preparados a partir de uma solução orgânica contendo os precursores sol-gel e a molécula molde. Trabalhos relacionados ao uso de matérias sol-gel com impressão molecular ainda são relativamente escassos⁷⁶⁻⁷⁹, e basicamente filmes de TiO₂ têm sido empregados. Este é o caso dos sensores para determinação dos ácidos 4-clorofenoxiacético e 2,4-D, desenvolvidos por Lahav e colaboradores⁷⁷. Estes sensores estão baseados no uso de transdutores de efeito de campo (FETs), sobre os quais foram depositados filmes

de TiO₂ molecularmente impressos com os respectivos ácidos carboxílicos (usados como moléculas molde). Para preparação dos materiais sol-gel, utilizou-se uma solução orgânica (etanol/tolueno) de butóxido de titânio (IV) e o ácido carboxílico correspondente. Esta solução contendo o complexo butóxido de titânio (IV)/carboxilato foi depositada sobre a porta de SiO₂ do FET, seguida pela polimerização sol-gel da mistura, resultando no filme de TiO₂ impresso com o carboxilato correspondente. O tratamento do filme com solução de amônia a 1% (v/v) resulta na eliminação do carboxilato e na formação dos sítios seletivos no filme de TiO₂.

Como pode ser observado, são muitas as possibilidades de acoplamento dos MIP em superfícies transdutoras e cabe ao químico optar por aquela que for mais conveniente para a aplicação desejada.

CONFIGURAÇÕES USADAS PARA OBTENÇÃO DA RESPOSTA ANALÍTICA EM SENSORES BIOMIMÉTICOS

Em biossensores o sinal analítico é gerado pela interação entre o analito e o elemento de reconhecimento; após isto, o transdutor é encarregado de converter este sinal em um sinal de saída quantificável que, em muitos casos, é elétrico. O mesmo princípio é aplicado se um MIP é usado como elemento de reconhecimento em substituição da biomolécula, como mostrado na Figura 2.

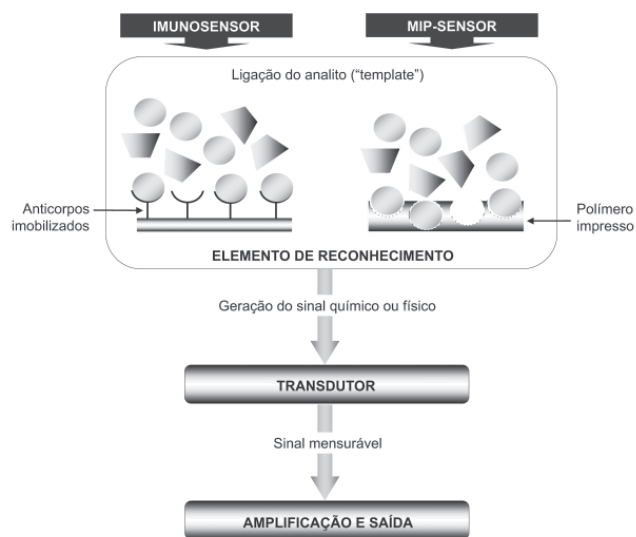


Figura 2. Esquema comparativo entre o mecanismo de resposta de um biossensor (imunossensor) e um sensor biomimético (MIP-sensor)

Nos sensores biomiméticos baseados em MIP, determinadas variações nas propriedades de um ou mais parâmetros físico-químicos do sistema após a interação com o analito podem ser usadas para detecção. Alternativamente, algumas propriedades específicas do analito, tais como fluorescência ou atividade eletroquímica, podem ser exploradas na construção do sensor. Em outros casos, em situações onde nenhuma das alternativas anteriores é possível, ou visando ainda um aumento na resposta do sensor, algumas moléculas ou grupos funcionais chamadas de “elementos reportadores” podem ser incorporados dentro do próprio polímero, para gerar diretamente um sinal físico-químico após a interação com o analito.

Resposta analítica baseada na interação analito/elemento receptor seletivo

Os dispositivos que têm sido bastante usados na construção de sensores baseados em MIP referem-se àqueles transdutores de onda

acústica sensíveis a variações de massa, tais como os SAW e as QCM, estas últimas em particular têm-se tornado muito úteis na construção de sensores biomiméticos. As QCM consistem de um fino disco de quartzo coberto com eletrodos de ouro em ambos dos lados, que pode ser colocado em oscilação usando o efeito piezolétrico. Para construção do sensor, uma fina camada de MIP pode ser depositada em um dos lados do disco. O acúmulo de analito no MIP resultará em uma variação na massa que, por sua vez, causará uma diminuição na frequência de oscilação que pode ser facilmente quantificada pelo detector de frequência; desta forma, o sinal analítico neste tipo de sensores é obtido diretamente por meio da interação analito/MIP. Entre as razões pelas quais este tipo de transdutor tem tido tanto sucesso na construção de sensores baseados em MIP estão seu relativo baixo custo, sua robustez, sua facilidade de uso e, principalmente, a facilidade de acoplamento dos MIP à superfície das QCM. Neste sentido, a literatura relata desde o uso de matrizes a base de MIP, obtidas por procedimentos comuns (polimerização direta) empregando polímeros a base de acrílico⁸⁰, passando pela eletrossíntese (polimerização *in situ*) da membrana com impressão molecular sobre a superfície da QCM⁶⁵, até o uso de finas camadas de material com impressão molecular obtida pelo processo sol-gel⁸¹.

Outro princípio de transdução que também pode utilizar a interação analito/elemento receptor seletivo, para obtenção do sinal analítico, é o condutométrico^{39,82,83}. Neste tipo de sensores condutométricos, dois eletrodos são separados por um MIP preparado geralmente na forma de membrana. A ligação do analito ao polímero produz uma variação na condutividade do sistema, que é proporcional à concentração de interesse.

Sensores usando a variação direta da capacitância do sistema eletroquímico após a interação entre o analito e o MIP têm sido amplamente descritos na literatura^{51,53,66,84}. A construção destes sensores tem sido realizada diretamente pela eletropolimerização^{66,84} do MIP sobre a superfície do eletrodo de trabalho na presença da molécula molde, ou por meio da fotopolimerização usando radiação UV^{51,53}. Visto que eletrodos de ouro têm sido empregados, a primeira etapa para obtenção das camadas receptoras seletivas consiste na formação de uma monocamada auto-organizada usando moléculas de mercaptanas. Neste tipo de dispositivos a interação do analito na superfície dos eletrodos modificados provoca uma queda na capacitância do sistema, como consequência do deslocamento de moléculas polares de água da superfície do eletrodo por moléculas menos polares do analito⁸⁴.

Entre os outros sistemas transdutores que também permitem o aproveitamento da interação analito/MIP têm-se a transdução impedimétrica, potenciométrica, incluindo os transistores de efeito de campo de íon seletivo (ISFET)⁴⁶.

Resposta analítica baseada nas propriedades inerentes do analito

Resposta analítica deste tipo é obtida quando o analito exibe propriedades químicas inerentes, como fluorescência ou atividade eletroquímica. Transdutores que se tornam altamente viáveis para este tipo de configuração são aqueles baseados em fibras ópticas. Desta forma, membranas ou MIP polimerizados *in situ* podem ser imobilizados na superfície de fibras ópticas. Neste tipo de sensores, após a interação com o analito fluorescente, um feixe de luz correspondente ao comprimento de onda de excitação pode ser irradiado por meio das fibras ópticas e entrar em contato com as moléculas fluorescentes ligadas ao MIP, as quais emitirão fluorescência no comprimento de onda característico, podendo ser medido pelo sistema de detecção como sendo proporcional à concentração de analito na amostra. Nestes dispositivos além da seletividade inerente ao MIP, são obtidos ganhos em sensibilidade devido ao aumento do rendi-

mento quântico do analito retido na cavidade. Exemplos destes tipos de sensores são relatados na literatura^{50,85}. Um problema que pode surgir quando a fluorescência do analito é usada para obtenção do sinal analítico, reside no fato de que as moléculas molde comumente não são totalmente extraídas do polímero, o que gera um sinal de fundo elevado, resultando em uma diminuição da sensibilidade. Para contornar este problema o MIP pode ser obtido usando-se uma molécula não fluorescente com estrutura muito próxima à do analito²¹.

No caso do analito apresentar atividade eletroquímica, as técnicas de amperometria e voltametria podem ser empregadas para se obter sinal analítico nos sensores biomiméticos baseados em MIP. Porém, considerações importantes em relação à difusão das espécies em direção ao eletrodo de trabalho e à solução de medida devem ser consideradas, a fim de evitar a passivação da superfície do eletrodo⁴⁶. Desta forma, a porosidade da camada de MIP, seja qual for a natureza do elemento de reconhecimento, é essencial para fornecer os canais necessários para a difusão das espécies e as reações de transferência de elétrons sobre a superfície do eletrodo. A obtenção do sinal analítico neste tipo de sensores envolverá um primeiro passo de extração seletiva do analito (incubação), seguido pela transferência de elétrons na superfície do eletrodo¹⁶. Contudo, um outro experimento não poderá ser realizado imediatamente a seguir, pois o sensor não apresentará sinal até que a superfície do transdutor esteja livre dos produtos adsorvidos, independentemente da reversibilidade de ligação do analito ao MIP. No intuito de contornar este problema e aproveitando a facilidade de preparação dos MIP, assim como seus baixos custos, têm sido construídos sensores descartáveis, usando eletrodos de carbono obtidos pela técnica de "screen-printed". Neste sentido, Kroger e colaboradores⁴⁰ têm demonstrado o uso de eletrodos de carbono "screen-printed" impressos com o herbicida, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). O sinal analítico foi obtido por voltametria de pulso diferencial. Para isto, primeiramente foi realizada a incubação do sensor em solução do herbicida 2,4-D por 1 h, após o qual foi retirado, enxaguado, transferido para uma célula eletroquímica para quantificação do 2,4-D, ligado no sensor e, finalmente, descartado.

Outra configuração versátil é a preparação de compósitos contendo partículas de MIP em uma matriz sólida⁴³, a qual após o uso pode ser facilmente polida para se retirar os produtos da reação eletroquímica da superfície do sensor.

Se o analito por si só não apresenta nenhuma propriedade inerente que possa ser medida, há a possibilidade de "marcar" o analito tornando-o com características ópticas ou eletroquímicas ou, então, pode-se empregar um agente competitivo ("nonrelated probes")^{43,86} que se ligue ao MIP. Neste último caso, a adição do analito na solução de medida promove o deslocamento do agente competitivo ligado ao MIP, resultando em um sinal mensurável. Por ex., na determinação do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) por método eletroquímico⁸⁴ e fluorescente⁸⁷, 2,4 diclorofenol (DCP) e 7-carboximetoxi-4-metilcumarina (CMMC) foram usados, respectivamente, como agentes competitivos ("nonrelated probe") (Figura 3).

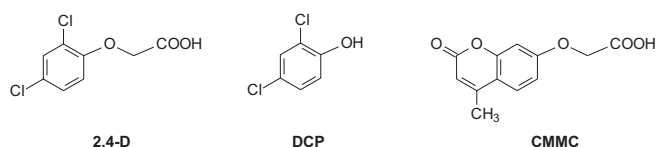


Figura 3. Estruturas químicas de moléculas que têm sido comumente usadas como "nonrelated probe" na determinação eletroquímica ou óptica do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). DCP: 2,4 diclorofenol e CMMC: 7-carboximetoxi-4-metilcumarina

Resposta analítica baseada nas propriedades introduzidas ao receptor sintético seletivo

Uma forma alternativa de se obter sinal analítico nos sensores biomiméticos, é explorar alguma mudança físico-química, no próprio material sintético impresso molecularmente^{2,21,88,89}. Para isto o material sintético deverá ser preparado na presença de um elemento ou grupo “reportador”, que será encarregado de emitir, gerar ou ainda alterar algum sinal físico-químico que pode ser relacionado à interação da cavidade seletiva com o analito. Este tipo de configuração é extremamente promissor, pois independe de alguma propriedade especial do analito, facilitando, desta forma, a construção de sensores e estendendo sua aplicação para uma gama de compostos.

Um exemplo deste tipo de configuração foi relatado por Jenkins e colaboradores⁴⁹. Os autores descrevem a construção de um optrodo altamente sensível ao produto da hidrólise do agente de arma química Soman, o metilfosfonato de pinacolina (PMP). O sensor foi construído usando-se uma fibra óptica sobre a qual o MIP contendo o elemento reportador luminescente (Eu³⁺) foi copolimerizado. A obtenção do sinal analítico baseia-se na formação do complexo luminescente entre os íons Eu³⁺ e o analito, o qual foi monitorado a 610 nm. Este sensor apresentou-se bastante sensível para determinação de PMP, mostrando um limite de detecção da ordem de ng L⁻¹.

Os sensores mostrados anteriormente fornecem sinais analíticos bidimensionais, que fornecem pouca ou nenhuma informação em relação à composição da amostra. Embora isto seja normalmente compensado pela elevada seletividade dos MIP, uma estratégia diferente é o uso de mecanismos transdutores “inteligentes”, os quais geram sinais com maior conteúdo de informação. Uma forma de se obter isto pode ser explorando a grande especificidade molecular de espectros de absorção na região espectral do infravermelho médio (3500 – 500 cm⁻¹). Desta forma, a combinação de MIP e espectrofotometria FTIR (“Fourier Transform Infrared”) permitirá resolver problemas analíticos onde apenas o emprego de MIP não é o bastante, como por ex., no caso de amostras com matrizes complexas, ou quando analitos com estrutura muito semelhantes estão presentes na amostra. A caminho disto, um sistema sensor para determinação de 2,4-D foi relatado por Jakusch e colaboradores⁹⁰. Os autores combinaram a tecnologia MIP e espectroscopia de onda evanescente na região do IV. O sistema sensor foi preparado depositando-se um filme de MIP seletivo para 2,4-D sobre um cristal de ZnSe, que serviu como elemento de atenuação da refletância total, o qual foi colocado em uma cela de fluxo. O sinal analítico foi obtido diretamente pelo espectrofotômetro FTIR logo após acumulação do 2,4-D na camada de MIP.

Protocolos empregados para realização das medidas

Na aplicação de sensores baseados em MIP vários protocolos para obtenção do sinal analítico têm sido propostos, visando a correlação da quantidade de analito na amostra com a resposta fornecida pelo transdutor. Um resumo dos protocolos mais usados nos últimos 10 anos pode ser observado na Figura 4, e podem ser divididos em dois grupos, o primeiro, que é o mais comumente empregado, refere-se àquele no qual não é necessária a extração prévia da molécula molde para realização da medida^{69,74}. O segundo, que é mais elaborado, baseia-se na extração prévia da molécula molde, seguida pela incubação do sensor na amostra contendo o analito e, finalmente, pela sua determinação, que pode ser realizada no mesmo meio de incubação ou em um meio diferente, no qual a medida pode ser realizada direta ou indiretamente, por meio de reações competitivas^{40,43}. Neste último caso, deve-se frisar que a determinação indireta do

analito é empregada quando o mesmo não apresenta propriedades eletroquímicas. Desta forma, a incubação é realizada num meio contendo o agente competidor (eletroativo), onde a adição do analito (não eletroativo) ao meio promove o deslocamento do agente competidor e o conseqüente sinal analítico.

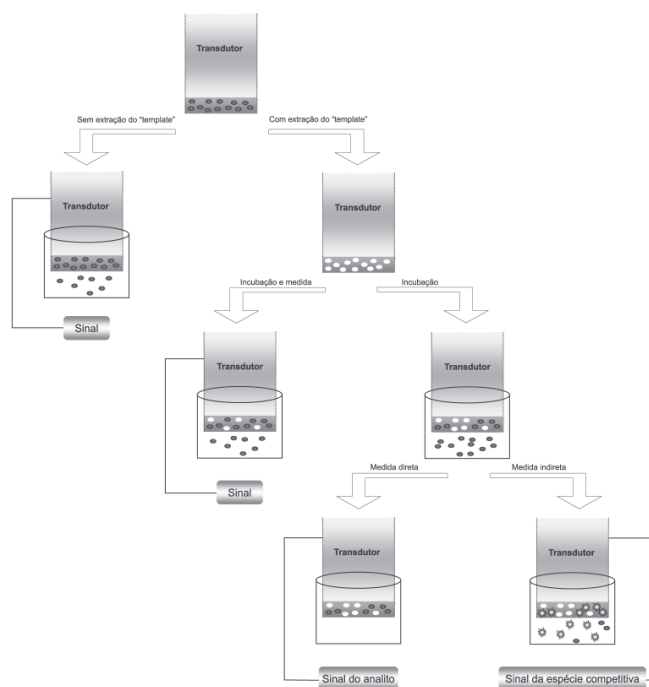


Figura 4. Protocolos empregados na realização das medidas usados na determinação de diversos analitos usando MIP-sensores

Sensores que permitem realizar a medida diretamente na solução de incubação são aqueles baseados em transdução piezométrica, em medidas de capacitância, em medidas condutométricas e em medidas fluorimétricas, quando o MIP é dopado com grupos “reportadores”. Sensores que realizam a determinação em um meio diferente ao da incubação são aqueles baseados na transdução amperométrica, voltamétrica e fluorescente, podendo esta ser realizada direta ou indiretamente (por reações competitivas).

Sensores biomiméticos baseados em MIP relatados na literatura

As Tabelas a seguir mostram as características mais importantes de sensores baseados em MIP, usando transdução eletroquímica (Tabelas 2-4), piezométrica (Tabela 5) ou óptica (Tabela 6), relatados na literatura. A alta seletividade e estabilidade dos MIP os tornam alternativas promissoras em detrimento às enzimas, aos anticorpos e receptores naturais usados na tecnologia de sensores. Monitoramentos ambientais e remotos são considerados como áreas particularmente atraentes para aplicação de sensores baseados em MIP. Contudo, os fatores que limitam o desenvolvimento destes sensores são a ausência de um protocolo geral para preparação dos MIP; o pobre desempenho dos MIP em meio aquoso e dificuldade na conversão do evento de ligação (MIP-analito) em um sinal mensurável. Porém, com os progressos adicionais na ciência dos polímeros estes problemas poderão ser solucionados, presenciando o nascimento de uma nova geração de sensores biomiméticos.

Visto que os MIP promovem uma mudança na massa da fase sensora nos sensores biomiméticos, aqueles baseados em QCM têm

Tabela 2. Sensores eletroquímicos baseados em MIP descritos na literatura: transdução potenciométrica e condutométrica

Análito	"Template"	Tipo de transdução	Estratégia de acoplamento ao transdutor	Resposta analítica	Protocolo empregado	Características ou aplicações	Ref.
Nitrato	Nitrato de sódio	Potenciométrico (ISE)	Eletropolimerização <i>in situ</i> de polipirrol em eletrodo de carbono vítreo	Interação Analito/MIP	Sem extração do "template" e medida direta após adição do analito	Altamente seletivo, LD=20 µmol L ⁻¹	69
Ácido 4-clorofenoxi- acético (4-CFA) e Ácido 2,4-D	Ácido (4-CFA) ou Ácido 2,4-D	Potenciométrico (PET)	Filmes de TiO ₂ obtidos pelo processo sol-gel	Interação Analito/MIP adição do analito	Extração do "template" e medida direta após re-usável após tratamento (Incubação)	Tempo de resposta de apenas 5 min. O sensor é com solução aquosa ao 1% (v/v) de amônia	77
Herbicidas a base de triazinas	Derivados de triazina	Potenciométrico (PET)	Filmes preparados sobre a superfície dos FETs, através da co-polimerização de acrilamida e MAA	Interação Analito/MIP	Extração do "template" e medida direta após adição do analito (Incubação)	Tempos de resposta < 3 min. Estabilidade de 30 dias. Aceitável repetibilidade das medidas e na preparação de vários sensores	54
Nucleotídeos e mono-sacarídeos	Os respectivos nucleotídeos ou monosacarídeos	Potenciométrico (PET)	Filmes preparados sobre a superfície dos FETs, através da co-polimerização de acrilamida e ácidos <i>m</i> -acrilamidafenilborônicos	Interação Analito/MIP	Extração do "template" e medida direta após adição do analito (Incubação)	Tempo de resposta de 5 min	94
Íons benzil-trifenilfosfônio	Cloreto de benzil-trifenilfosfônio	Condutométrico	Oclusão de partículas de MIP obtidas pelo método de polimerização em "bulk"	Interação Analito/MIP	Extração do "template" e medida direta após adição do analito (Incubação)	Tempo de resposta longo (> 1 h)	39
L-fenilalanina; 6-aminopropil-luracil; atrazina ou ácido siálico	L-fenilalanina; 6-aminopropil-luracil; atrazina ou ácido siálico	Condutométrico	Filmes preparados sobre superfícies de vidro, através da polimerização, respectivamente, de DEAE, MAA, AA ou vinil-tetrafenilboronato, com EDMA e AIBN	Interação Analito/MIP	Extração do "template" e medida direta após adição do analito (Incubação)	Boa seletividade e estabilidade (tempo de vida de 4 meses), pobre reprodutibilidade das medidas e da preparação dos filmes	48
Atrazina	Atrazina	Condutométrico	Membrana flexível obtida pela técnica do sanduíche, através da fotopolimerização de MAA com TEDMA, AIBN e OUA	Interação Analito/MIP	Extração do "template" e medida direta após adição do analito (Incubação)	Tempo de vida de 3 a 6 meses. Tempos de resposta na ordem de min	82
Ácidos halo-acéticos; monocloraacético; monobromoacético; dicloroacético; dibromoacético e tricloroacético	Ácido tricloroacético	Condutométrico	Oclusão de partículas de MIP em PVC (polímero inerte) e dibutil-ftalato (plastificante). Os MIPs foram obtidos pelos métodos de polimerização em "bulk" e de expansão em multi-etapas	Interação Analito/MIP	Extração do "template" e medida direta após adição do analito (Incubação)	Determinação de misturas complexas de ácidos halo-acéticos em águas de bebidas	83

"Template": molécula molde; L.D.: Limite de detecção; 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; MAA: ácido meta-acrílico; DEAE: (dietilamino)etil metacrilato; AA: alilamina; EDMA: etilenoglicol dimetacrilato; AIBN: 2,2'-azo (bis)-2-isobutromitrila; TEDMA: trietilenoglicol dimetacrilato; OUA: oligouretano acrilato; PVC: cloreto de polivinila.

Tabela 3. Sensores eletroquímicos baseados em MIP descritos na literatura: medidas de capacitância, impedância e corrente

Análito	“Template”	Tipo de transdução	Estratégia de acoplamento ao transdutor	Resposta analítica	Protocolo empregado	Características ou aplicações	Ref.
Ácido barbitúrico	Ácido tiobarbitúrico	Capacitância	Monocamadas auto-organizadas (SAMs) usando a técnica de “spreader-bar”	Interação Analito/MIP	Sem extração do “template” e medida direta após adição do analito	Tempo de resposta de 3 min	74
L-fenilalanina	L-fenilalanina	Capacitância	Eletropolimerização de fenol entre SAMs de 4-mercaptotoleno e 1-octanotol, antes e depois da polimerização, respectivamente sobre ouro	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (Incubação)	Pouco seletivo. Tempo de resposta longo (1 h)	66
Glicose	Glicose	Capacitância	Eletropolimerização de <i>o</i> -fenilenediamina sobre eletrodo de ouro. Após acoplamento de 1-dodecanotol para aumentar a densidade da camada sensora e torná-la mais isolante	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (Incubação)	Tempo de resposta de 20 min Pouca estabilidade operacional (10 h). Resposta linear entre 0,1 e 20 mmol L ⁻¹	84
Creatinina	Creatinina	Capacitância	Filmes preparados pela técnica de “grafting photopolimerization” (Benzofenona, AMPS, MBA) sobre eletrodos de ouro cobertos com hexadecanotol.	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (Incubação)	Re-usável. Altamente estável (6 meses) e seletivo. Tempo de resposta 15 min	51
Herbícidas a base de triazinas, desmetrin, metribuzina, atrazina e terbumeton	Desmetrin	Capacitância	Filmes preparados pela técnica de “grafting photopolimerization” (Benzofenona, AMPS, MBA) sobre eletrodos de ouro cobertos com hexadecanotol.	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (Incubação)	Tempo de resposta de 5 min. Realizadas em meio aquoso. Estável por 6 meses	53
Nucleotídeos: AMP, GMP, CMP, e UMP	Os respectivos nucleotídeos	Impedância	Filmes preparados sobre a superfície de um fio de ouro, através da eletropolimerização de acrilamida e ácido <i>m</i> -acrilamidafetilborônico	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (Incubação).	Facilmente regenerável e altamente seletivo	94
Morfina	Morfina	Amperométrico	Oclusão de partículas de MIP (sintetizado pelo método de polimerização em “bulk”, com MAA e EDMA) em gel e agarose	Resposta eletroquímica do analito	Extração do “template”, incubação com o analito, ligação competitiva de outra espécie sem atividade eletroquímica e medida	Tempo de resposta longo (24 h). L.D. 0,05 µg mL ⁻¹	36
Frutossil-valina	Frutossil-valina	Amperométrico	Pasta de carbono modificada com partículas de MIP obtidas pelo método de polimerização em “bulk”, a partir da polimerização de 4-vinilfenilboronato com EDMA e AIBN	Resposta eletroquímica do analito	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Tempo de resposta 4 min. Altamente seletivo	44

“Template”: molécula molde; L.D.: Limite de detecção; AMPS: ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propano sulfônico; MBA: *N,N*-metilenediacrilamida; AMP: adenosina 5'-monofosfato; GMP: guanosina 5'-monofosfato; CMP: citosina 5'-monofosfato; UMP: uridina 5'-monofosfato; MAA: ácido metacrílico; EDMA: etilenoglicol dimetacrilato; AIBN: 2,2'-azo (bis)2-isobutironitrila.

Tabela 4. Sensores eletroquímicos baseados em MIP descritos na literatura com transdução voltamétrica

Análito	“Template”	Tipo de transdução	Estratégia de acoplamento ao transdutor	Resposta analítica	Protocolo empregado	Características ou aplicações	Ref.
Catecol e catecolaminas	Catecol, dopamina ou epinefrina	Voltamétrico	Filmes de 3-amino-propiltietoxissilano e “template” na superfície de micro-eletrodos de ouro	Resposta eletroquímica do analito	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Tempo de resposta suficientemente rápido para tornar o sistema reversível. Altamente seletivo para o MIP de catecol	95
Coolesterol	Coolesterol	Voltamétrico	SAM bidimensional de hexadecil-mercaptopano	Resposta eletroquímica do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	Extração do “template”, incubação com o analito, uso de ferrocianeto de potássio como uma “nonrelated probe” e medida direta	Tempo de resposta de 5 min. Boa repetibilidade na preparação dos sensores	73
2,4-D	2,4-D	Voltamétrico	Oclusão de partículas MIP entre a superfície dos eletrodos “screen-printed” e um filme de agarose	Resposta eletroquímica do ácido 2,5-diiodo-fenilacético (HGA)	Extração do “template”, incubação com o analito e HGA (“nonrelated probe”), troca de solução e medida indireta	Descartáveis. Longo tempo de resposta (30 a 60 min)	84
Clenbuterol	Clenbuterol	Voltamétrico	Composto de grafite em pó, <i>n</i> -eicosano e partículas de MIP obtidas pelo método de polimerização em “bulk”, a partir da polimerização de MAA com EDMA e AIBN	Resposta eletroquímica do clenbuterol	Extração do “template”, incubação com o analito, troca de solução, adição de ligante competitivo não eletroquímico e medida	Boa repetibilidade nas medidas e na preparação dos sensores. Aplicado em amostras de fígado de gado. Protocolo muito elaborado	43
Fenoxinaftaleno quinona	Fenoxinaftaleno quinona	Voltamétrico	SAM bidimensional de cistamina e carboximidina cíclica em fios de ouro	Resposta eletroquímica do analito	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Tempo de resposta de 25 min	96
Rifamicina SV	Rifamicina SV	Voltamétrico	Membranas obtidas na superfície de eletrodo de carbono vítreo, após evaporação da solução de poli-fosfazeno (polímero pré-formado) em THF	Resposta eletroquímica do analito	Extração do “template”, incubação com o analito, troca de solução e medida	Tempo de resposta curto 1 min	63
Ácido vanilil-mandélico (VMA)	VMA	Voltamétrico	Filme depositado sobre eletrodo de carbono vítreo usando a técnica de <i>spin-coating</i> , através da fotopolimerização com MAA, EDMA e DPP	Resposta eletroquímica do analito	Extração do “template”, incubação com o analito, troca de solução e medida	Tempo de resposta 2 min. Pouco seletivo.	55
Atrazina	Rifamicina SV	Voltamétrico	Filme obtido pela fotopolimerização de MAA com EDMA e AIBN, depositado sobre ouro modificado com alilmercaptano e 1-butanotol	Resposta eletroquímica do analito	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Tempo de vida útil 3 dias ou 12 determinações sucessivas. Pouco seletivo	97
2,4-D	2,4-D	Voltamétrico	Eletropolimerização de resorcinol e <i>o</i> -fenilendiamina sobre grafite comercial HB	Resposta eletroquímica do polímero	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (Incubação)	Alta sensibilidade quando comparado com o modificado com NIP	67
Diquat (Herbicida)	Diquat	Polarográfico	Eletrodo de gota de mercúrio modificado com partículas de MIP obtidas pela co-polimerização de ácido <i>p</i> -aminobenzóico e dicloroetano	Resposta eletroquímica do polímero	Extração do “template”, acumulação do MIP na gota de Hg, troca de solução, incubação e medida	Tempo de resposta 1 min. Altamente sensível. LD. 0,34 nmol L ⁻¹	98

“Template”: molécula molde; 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; MAA: ácido meta-acrílico; EDMA: etilenoglicol dimetacrilato; AIBN: 2,2'-azobisisobutironitrila; THF: tetra-hidrofurano; DPP: 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona; L.D.: Limite de detecção.

Tabela 5. Sensores piezoelétricos baseados em MIP descritos na literatura

Análito	“Template”	Estratégia de acoplamento ao transdutor	Resposta analítica	Protocolo empregado	Características ou aplicações	Ref.
Glicose	Glicose	Eletrólimerização <i>in situ</i> de o-fenilendiamina sobre eletrodo de Pt pertencente à uma QCM	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Tempo de resposta de 17 min. Tempo de vida útil 1 mês	65
2-metil-isoborneol (MIB) e geosmin	MIB	Filmes preparados sobre a superfície de um dos eletrodos de Au da QCM, pela adição de 5 µL da solução de polimerização de MMA, EDMA e V-65	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Tempo de resposta > 30 min. LD: 200 µg L ⁻¹ . Pouco seletivo. Aplicação em amostras de <i>Phormidium tenue</i>	56
MIB e geosmin	MIB	Filmes preparados pela adição de 5 µL da solução de polimerização de MMA, EDMA e V-65, sobre um dos eletrodos de Au da QCM previamente cobertos com Nylon	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Limite de detecção (LD) 10 µg L ⁻¹	57
Misturas de óleos automotivos	Óleos frescos e óleos usados	Filmes preparados pela adição da mistura polimérica à superfície de uma QCM	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Monitoramento da degradação de óleo de máquinas automotivas	27
Caféina	Caféina	Membranas obtidas pela técnica de precipitação pela inversão da fase e fixadas mecanicamente em uma QCM	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Tempo de resposta de 15 min. Pouca seletividade	64
Nucleotídeos: AMP, GMP, CMP e UMP	Os respectivos nucleotídeos	Eletrólimerização de acrilamida e ácido <i>m</i> -acrilamidafenilborônico, sobre a superfície de ouro de uma QCM	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Boa seletividade. Tempo de resposta entre 10 e 12 min. Pouco sensíveis	94
Herbicidas a base de triazinas	Derivados de triazina	Eletrólimerização de acrilamida e metacrilato de sódio, sobre a superfície de Au de uma QCM	Interação Analito/MIP	Extração do “template”, incubação em solução do herbicida, troca de meio, seca em fluxo de Ar e medida de ressonância realizada em Ar	Altamente seletivo. Tempos de resposta de 15 min	54
Microsistina-LR	Microsistina-LR	Oclusão de partículas de MIP em PVC. Os MIPs foram obtidos pela polimerização de AMPSA, UAEE, EDMA e AIBN	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Tempo de resposta de 25 min. LD: 0,35 nmol L ⁻¹ . Análise de água de torneira	99
Nanodrol	Éster de 4-bifenil-carbonato de nanodrol	Oclusão de partículas de MIP em PVC. Os MIPs foram obtidos pela polimerização de AMPSA, MAA, EDMA e AIBN	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Baixa repetibilidade nas medidas (pouca estabilidade). Boa repetibilidade na construção dos sensores. Altamente sensível	37
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH)	Naftaleno	Filmes preparados sobre os dispositivos piezoelétricos, através de <i>spin-coating</i> da mistura de polimerização contendo bisfenol A, <i>p,p'</i> -di-isocianodifenilmetano e floroglucinol	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Limite de detecção na faixa de ppm. Tempo de resposta 5 min. Resposta reversível	100
Derivados de xantina (xantina, caféina e teofilina), e extratos de café	Caféina ou o extrato de café adequado	Filmes preparados sobre a superfície da QCM, pela adição da solução de polimerização de MAA, divinil-benzeno e AIBN	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Respostas reversíveis. Avaliação da qualidade e grau de torrefação de amostras de café	100

“Template”: molécula molde; MAA: ácido meta-acrílico; EDMA: etileno(glicol) dimetacrilato ; V-65: 2,2'-azo bis-(2,4-dimetil)valeronitrila; AMP: adenosina 5'-monofosfato; AMP: adenosina 5'-monofosfato; CMP: citosina 5'-monofosfato; UMP: Uridina 5'-monofosfato; L.D.: Limite de detecção.

Tabela 5. Continuação.

Análito	“Template”	Estratégia de acoplamento ao transdutor	Resposta analítica	Protocolo empregado	Características ou aplicações	Ref.
Fermentos e bactérias biofilizadas	Saccharomyces cerevisiae (SC)	Membranas obtidas pela técnica da estampa (“stamping procedure”) usando uma mistura de bisfenol A, <i>p,p'</i> -di-isocianodifenilmetano e floroglucinol	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Resposta reversível. Tempo de resposta de 40 min. Altamente seletivo para sacaromíces cerevisiae	100
Vapores de compostos orgânicos: tolueno, benzeno, tricloroetileno, tetracloroetileno e heptano	Hidroquinona e fenol	Oclusão em poli-isobutileno de partículas de MIP obtidas pelo método “bulk” e na forma de micropérolas.	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Tempo de resposta 5 a 12 s Altamente reversíveis	41
L-histidina e D-histidina	L-histidina ou D-histidina	Eletropolimerização de <i>N,N'</i> -metileno-bis-acrilamida no eletrodo de Au da QCM.	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Altamente seletivo, inclusive, não reconhecendo o estereoisômero (L ou D). Tempo de resposta de 10 min	101
Sorbitol	Sorbitol	Eletropolimerização de <i>o</i> -fenilenediamina no eletrodo de ouro de uma QCM.	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Tempo de resposta 22 min. Boa seletividade	102
Vírus do tabaco, TMV (tobacco mosaic viruses)	TMV	Membranas obtidas pela técnica da estampa (“stamping procedure”) usando uma mistura de polimerização de bisfenol A, <i>p,p'</i> -di-isocianodifenilmetano e tri-isocianato.	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Tempo de resposta 3 h	103
Vírus do tabaco, TMV (tobacco mosaic viruses)	TMV	Filmes preparados sobre os dispositivos piezoelétricos, através de “spin-coating” da mistura de polimerização de EDMA, MAA e AIBN.	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Detecção qualitativa de TMV em folhas infetadas	103
Eritromicina	Eritromicina	Oclusão em PVC de micropérolas de MIP obtidas pela polimerização por precipitação.	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Tempo de resposta 12 min. Altamente seletivo	42
Componentes de uma adubagem química: Água, 1-propanol, etilacetato e limoneno	Água, 1-propanol, etilacetato e limoneno	Filmes preparados sobre as respectivas QCM, através da técnica de “spin-coating”	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Arranjo de sensores para aplicação em monitoramento “on-line” de processos de adubagem química	104
Uracila de 5-fluoro-1-(tetrahidro-2-furil) (Tegafur)	Tegafur	Eletropolimerização de <i>m</i> -aminofenol em um dos eletrodos de ouro da QCM	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Tempo de resposta 7 min. Boa seletividade	105
Nicotina	Nicotina	Oclusão em PVC de partículas de MIP obtidas pelo método “bulk” pela polimerização de MAA, EGDMA e AIBN	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Potencial aplicação em amostras de soro e urina	106
Hidrocarbometos aromáticos policíclicos (PAH)	Antraceno, benzo-antraceno, criseno, pireno ou benzo-perileno	Filmes preparados sobre dispositivos piezoelétricos, através da adição de um pequeno volume da mistura de polimerização contendo bisfenol A, <i>p,p'</i> -di-isocianato-difenilmetano e floroglucinol	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito (incubação)	Tempo de resposta 30 min	50

“Template”: molécula molde; AMPSA: ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico; UAEE: éster etílico do ácido urocânico; EDMA: etilenoglicol dimetacrilato; AIBN: 2,2'-azo (bis)-2-isobutironitrila; MAA: ácido meta-acrílico; SAW: “surface acoustic wave”; L.D.: Limite de detecção.

Tabela 6. Sensores ópticos baseados em MIP descritos na literatura

Análito	“Template”	Tipo de transdução	Estratégia de acoplamento ao transdutor	Resposta analítica	Protocolo empregado	Características ou aplicações	Ref.
L-fenilalanina	Dansil-L-fenilalanina	Óptica (fluorescente)	Oclusão de partículas de MIP entre o feixe de fibras ópticas e uma rede de nylon	Fluorescência do analito marcado com reagente fluorescente	Extração do “template” e medida direta após adição do analito marcado	O sensor apresenta estereoespecificidade para reconhecimento do isômero L(-) em relação ao D(-)	85
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH)	Antraceno, benzoantraceno, criseno, pireno, perileno ou benzo-perileno	Óptica (fluorescente)	Filmes preparados sobre guias de onda planas de quartzo, através de adição da mistura de polimerização contendo bisfenol A, <i>p,p'</i> -di-isocianatodifenilmetano e floroglucinol.	Fluorescência nativa do analito	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Altamente seletivos	50
Produtos de hidrólise do Soman (arma química): Pinacolil-metilfosfonato (PMP)	Complexo Eu-PMP (1:1)	Óptica (luminescência)	Filmes preparados pela imersão da fibra óptica na solução de polimerização contendo estireno, divinilbenzeno e AIBN.	Luminescência do complexo Eu-PMP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Limite de detecção 7 ppt (partes por trilhão). Tempo de resposta de 30 min	49
Inseticidas e pesticidas organofosforados e organotiofosforados	Complexo (1:1): Eu-Inseticida ou Eu-Pesticida	Óptica (luminescência)	Filmes preparados pela imersão da fibra óptica na solução de polimerização contendo estireno, divinilbenzeno e AIBN.	Luminescência do complexo Eu-Inseticida (Pesticida)	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Tempo de resposta de 15 min. Resposta reversível. Limite de detecção 10 ng L ⁻¹	52
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH)	Mistura de PAHs com 2 e 4 anéis: Naftaleno e criseno, Naftaleno e pireno	Óptica (fluorescente)	Filmes preparados sobre guias de onda planas de quartzo, através de adição da mistura de polimerização contendo bisfenol A, <i>p,p'</i> -di-isocianatodifenilmetano e floroglucinol.	Fluorescência nativa do analito	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Altamente seletivos e sensíveis	100
2,4-D (herbicida)	2,4-D	Óptica (quimiluminescente)	Capilares de vidro modificados com 3-metacrilóxi-propil-trimetoxissilano e preenchidos com solução de polimerização contendo trimetacrilato de trimetilpropano, 4-vinilpiridina e AIBN.	Chemiluminescência do 2,4-D marcado com peroxidase	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Altamente sensível. Faixa de resposta entre 22,5 pmol L ⁻¹ e 450 nmol L ⁻¹	107
Ácidos (2R,3R)- e (2S,3S) di- <i>o</i> -benzoil-tartárico	Ácidos (2R,3R)-(-)-di- <i>o</i> -benzoil-tartárico; ou (2S,3S)-(+)-di- <i>o</i> -benzoil-tartárico	Óptica (interferometria)	Filmes preparados sobre guias de ondas planas de vidro, através da adição da mistura de polimerização contendo etileno-dimetacrilato, dietil-4-vinilbenzamida e AIBN.	Interação Analito/MIP	Extração do “template” e medida direta após adição do analito	Arranjo de sensores. Tempo de resposta 30 min	108

“Template”: molécula molde; 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; AIBN: 2,2'-azo (bis)-2-isobutironitrila; THF: tetraidrofurano; DPP: 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona.

a configuração mais adequada e promissora para o desenvolvimento de sensores, evitando protocolos demorados para realização dos experimentos. Contudo, sensores ópticos baseados em mudanças de cor também poderão ser construídos, visto que alguns trabalhos relatados na literatura, já reportaram a preparação de MIP que podem ser usados com esta finalidade⁹¹⁻⁹³.

CONCLUSÕES E TENDÊNCIAS

Este trabalho descreve os avanços recentes no emprego da tecnologia de polímeros com impressão molecular (MIP) na construção de sensores químicos. Esta tecnologia apresenta-se como uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de sensores químicos, principalmente no que diz respeito à seletividade e estabilidade. Muitos sensores têm sido descritos, usando diferentes estratégias para imobilização dos MIP na superfície dos transdutores, utilizando diversos fenômenos físico-químicos para obtenção do sinal analítico e empregando os mais diversos protocolos para realização das medidas. Sensores eletroquímicos são mais comuns, contudo os piezelétricos permitem a determinação direta do analito evitando o emprego de protocolos muito elaborados para obtenção do sinal analítico. Por outro lado, sensores ópticos ainda são escassos, e a maioria deles baseados em fluorescência, porém muitas pesquisas têm sido direcionadas com a finalidade de preparar filmes de MIP com propriedades ópticas, incluindo simples mudanças de cor, os quais podem ser empregados na construção de optrodos, acoplando-os mecanicamente na superfície das fibras ópticas.

Apesar das características promissoras que estes sensores apresentam, algumas delas ainda deverão ser melhoradas para que os mesmos passem a adquirir algumas características desejáveis dos biossensores. Muitos destes sensores apresentam respostas não lineares, mesmo quando usados com escala logarítmica, tempos de resposta extremamente longos ou, ainda, protocolos de medidas bastante elaborados limitando sua popularidade.

Pode-se concluir que a tecnologia de polímeros com impressão molecular oferece uma nova ferramenta na procura de sensores químicos, sem dúvida nenhuma, mais estáveis, robustos e seletivos. Porém, para serem aplicados em amostras reais, seria desejável desenvolver sensores com tempos de resposta curtos e com protocolos de medidas simples. Atingindo-se estes propósitos, a tecnologia MIP aliada a de sensores químicos poderá, de fato, oferecer a tão esperada metodologia simples, de baixo custo e confiável para detecção de muitos analitos em amostras reais, que possa ser produzida em larga escala.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPESP pelo auxílio financeiro. C.R.T. Tarley agradece à FAPESP pela concessão da bolsa de Pós-Doutorado (Processo nº 04/00615-6).

REFERÊNCIAS

- Verli, H.; Barreiro, E. J.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 95.
- Haupt, K.; Mosbach, K.; *Biochem. Soc. Trans.* **1999**, *27*, 344.
- Piletsky, S.; Alcock, S.; Turner, A. P. F.; *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 9.
- Bruggemann, O.; Haupt, K.; Ye, L.; Yilmaz, E.; Mosbach, K.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *889*, 15.
- Ye, L.; Corack, P. A. G.; Mosbach, K.; *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 187.
- Ye, L.; Mosbach, K.; *React. Funct. Polym.* **2001**, *48*, 149.
- Matsui, J.; Okada, M.; Tsuruoka, M.; Takeuchi, T.; *Anal. Commun.* **1997**, *34*, 85.
- Ye, L.; Corack, P. A. G.; Mosbach, K.; *Anal. Commun.* **1998**, *36*, 35.
- Haginaka, J.; Sanbe, H.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *913*, 141.
- Quaglia, M.; De Lorenzi, E.; Sulitzky, C.; Massolini, G.; Sellergren, B.; *Analyst* **2001**, *126*, 1495.
- Nilsson, S.; Schweitz, L.; Andersson, L. I.; *Electrophoresis* **1997**, *18*, 884.
- Bruggemann, O.; Freitag, R.; Whitcombe, M. J.; Vulfson, E. N.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *781*, 43.
- Matsui, J.; Kato, T.; Takeuchi, T.; Suzuki, M.; Yokoyama, K.; Tamiya, E.; Karube, I.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2223.
- Matsui, J.; Miyoshi, Y.; Matsui, R.; Takeuchi, T.; *Anal. Sci.* **1995**, *11*, 1017.
- Koster, E. H. M.; Crescenzi, C.; Den Hoedt, W.; Ensing, K.; De Jong, G. J.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3140.
- Merkoçi, A.; Alegret, S.; *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 717.
- Ansell, R.; Kriz, D.; Mosbach, K.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 89.
- Lavignac, N.; Allender, C.; Brain, K.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *510*, 139.
- Haupt, K.; *Analyst* **2001**, *126*, 747.
- Andersson, L. I.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2000**, *745*, 3.
- Haupt, K.; Mosbach, K.; *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2495.
- Yano, K.; Karube, I.; *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 199.
- Dickert, F. L.; Hayden, O.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, *364*, 506.
- Al-Kindy, S.; Badía, R.; Suárez-Rodríguez, J. L.; Díaz-García, M. E.; *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2000**, *30*, 291.
- Ramstrom, O.; Skudar, K.; Haines, J.; Patel, P.; Bruggemann, O.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2105.
- Kroger, S.; Piletsky, S.; Turner, A. P. F.; *Mar. Pollut. Bull.* **2002**, *45*, 24.
- Dickert, F. L.; Forth, P.; Lieberzeit, P. A.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 802.
- Reynolds, J. G.; Hart, B. R.; *JOM* **2004**, *56*, 36.
- Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2004**, *804*, 231.
- Tarley, C. R. T.; Sotomayor, M. D. P. T.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova*, no prelo.
- De La Guardia, M.; *Microchim. Acta* **1995**, *120*, 243.
- Wang, J.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *19*, 47.
- Andersson, L. I.; Mandenius, C. F.; Mosbach, K.; *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5437.
- Piletsky, S. A.; Parhometz, Y. P.; Lavryk, N. V.; Panasyuk, T. L.; El'skaya, A. V.; *Sens. Actuators, B* **1994**, *18-19*, 629.
- Hedborg, E.; Winquist, F.; Lundstrom, I.; Andersson, L. I.; Mosbach, K.; *Sens. Actuators, A* **1993**, *36-38*, 796.
- Kriz, D.; Mosbach, K.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *300*, 71.
- Percival, C. J.; Stanley, S.; Braithwaite, A.; Newton, M. I.; McHale, G.; *Analyst* **2002**, *127*, 1024.
- Liang, C.; Peng, H.; Bao, X.; Nie, L.; Yao, S.; *Analyst* **1999**, *124*, 1781.
- Kriz, D.; Kempe, M.; Mosbach, K.; *Sens. Actuators, B* **1996**, *33*, 178.
- Kroger, S.; Turner, A. P. F.; Mosbach, K.; Haupt, K.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3698.
- Fu, Y.; Finklea, H. O.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5387.
- Zhang, Z.; Liu, Y.; Long, Y.; Nie, L.; Yao, S.; *Anal. Sci.* **2004**, *20*, 291.
- Pizzariello, A.; Stred'ansky, M.; Stred'anska, S.; Miertus, S.; *Sens. Actuators, B* **2001**, *76*, 286.
- Yamasaki, T.; Ohta, S.; Yanai, Y.; Sode, K.; *Anal. Lett.* **2003**, *36*, 75.
- Yamasaki, T.; Meng, Z.; Mosbach, K.; Sode, K.; *Electrochemistry* **2001**, *69*, 969.
- Blanco-López, M. C.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P.; *Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 36.
- Hedborg, E.; Winquist, F.; Lundstrom, I.; Andersson, L. I.; Mosbach, K.; *Sens. Actuators, A* **1993**, *37-38*, 796.
- Piletsky, S. A.; Piletskaya, E. V.; Panasyuk, T. L.; El'skaya, A. V.; Levi, R.; Karube, I.; Wulff, G.; *Macromolecules* **1998**, *31*, 2137.
- Jenkins, A. L.; Uy, O. M.; Murray, G. M.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 373.
- Dickert, F. L.; Tortschanoff, M.; Bulst, W. E.; Fischerauer, G.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4559.
- Panasyuk-Delaney, T.; Mirsky, V. M.; Wolfbeis, O. S.; *Electroanalysis* **2002**, *14*, 221.
- Jenkins, A. L.; Yin, R.; Jensen, J. L.; *Analyst* **2001**, *126*, 798.
- Panasyuk-Delaney, T.; Mirsky, V. M.; Ulbricht, M.; Wolfbeis, O. S.; *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 157.
- Pogorelova, S. P.; Bourenko, T.; Kharitonov, A. B.; Willner, I.; *Analyst* **2002**, *127*, 1484.
- Blanco-López, M. C.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P.; *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 353.
- Ji, H. S.; McNiven, S.; Ikebukuro, K.; Karube, I.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *390*, 93.
- Ji, H. S.; McNiven, S.; Lee, K. H.; Saito, T.; Ikebukuro, K.; Karube, I.; *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 403.
- Yoshimi, Y.; Ohdaira, R.; Iiyama, C.; Sakai, K.; *Sens. Actuators, B* **2001**, *73*, 49.
- Wang, H. Y.; Kobayashi, T.; Fujii, N.; *Lagmuir* **1996**, *12*, 4850.
- Wang, H. Y.; Kobayashi, T.; Fukaya, T.; Fujii, N.; *Lagmuir* **1997**, *13*, 5396.
- Kobayashi, T.; Wang, H. Y.; Fujii, N.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *365*, 81.
- Yoshikawa, M.; Izumi, J.; Ooi, T.; Kitao, T.; Guiver, M. D.; Robertson, G. P.; *Polym. Bull.* **1998**, *40*, 517.

63. Gutierrez-Fernandez, S.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P.; Carriedo, G. A.; Gracia-Alonso, F. J.; Fidalgo, J. I.; *Electroanalysis* **2001**, *13*, 1399.
64. Kobayashi, T.; Murawaki, Y.; Ressay, P. S.; Abe, M.; Fujii, N.; *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 141.
65. Malitesta, C.; Losito, I.; Zamboni, P. G.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1366.
66. Panasyuk, T. L.; Mirsky, V. M.; Piletsky, S. A.; Wolfbeis, O. S.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4609.
67. Weetall, H. H.; Rogers, K. R.; *Talanta* **2004**, *62*, 329.
68. Piletsky, S. A.; Turner, A. P. F.; *Electroanalysis* **2002**, *14*, 317.
69. Hutchins, R. S.; Bachas, L. G.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1654.
70. Vidal, J. C.; García-Ruiz, E.; Castillo, J. R.; *Microchim. Acta* **2003**, *143*, 93.
71. Spurlock, L. D.; Jaramillo, A.; Praserthdam, A.; Lewis, J.; Brajter-Toth, A.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *336*, 37.
72. Deore, B.; Chen, Z.; Nagaoka, T.; *Anal. Sci.* **1999**, *15*, 827.
73. Piletsky, S. A.; Piletskaya, E. V.; Sergeeva, T. A.; Panasyuk, T. L.; *Sens. Actuators, B* **1999**, *60*, 216.
74. Mirsky, V. M.; Hirsch, T.; Piletsky, S. A.; Wolfbeis, O.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1108.
75. Mirsky, V. M.; *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 439.
76. Makote, R.; Collinson, M.; *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 2440.
77. Lahav, M.; Kharitonov, A. B.; Katz, O.; Kunitake, T.; Willner, I.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 720.
78. Zayats, M.; Lahav, M.; Kharitonov, A. B.; Willner, I.; *Tetrahedron* **2002**, *58*, 815.
79. Lahav, M.; Kharitonov, A. B.; Willner, I.; *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3992.
80. Haupt, K.; Noworyta, K.; Kutner, W.; *Anal. Commun.* **1999**, *36*, 391.
81. Dickert, F. L.; Hayden, O.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1302.
82. Sergeeva, T. A.; Piletsky, S. A.; Brovko, A. A.; Slinchenko, E. A.; Sergeeva, L. M.; El'skaya, A. V.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *392*, 105.
83. Suedee, R.; Srichana, T.; Sangpagai, C.; Tunthana, C.; Vanichapichat, P.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *504*, 89.
84. Cheng, Z.; Wang, E.; Yang, X.; *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 179.
85. Kriz, D.; Ramstrom, O.; Svensson, A.; Mosbach, K.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2142.
86. Piletsky, S. A.; Terpetschnik, E.; Andersson, H. S.; Nicholls, L. A.; Wolfbeis, O. S.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, *364*, 512.
87. Haupt, K.; Mayes, A. G.; Mosbach, K.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3936.
88. Haupt, K.; *Chem. Commun.* **2003**, *2*, 171.
89. Ye, L.; Haupt, K.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1887.
90. Jakusch, M.; Janotta, M.; Mizaikoff, B.; Mosbach, K.; Haupt, K.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4786.
91. Sasaki, D. Y.; Alam, T. M.; *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 1400.
92. Syu, M. J.; Deng, J. H.; Nian, Y. M.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *504*, 167.
93. Mohr, G. J.; Citterio, D.; Demuth, C.; Fehlmann, M.; Luzi, J.; Lohse, C.; Moradian, A.; Nezel, T.; Rothmaier, M.; Spichiger, U. E.; *J. Mater. Chem.* **1999**, *9*, 2259.
94. Sallacan, N.; Zayats, M.; Bourenko, T.; Kharitonov, A. V.; Willner, I.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 702.
95. Morita, M.; Iwasaki, Y.; Horiuchi, T.; Niwa, O.; *Denki Kagaku* **1996**, *64*, 1239.
96. Lahav, M.; Katz, E.; Willner, I.; *Langmuir* **2001**, *17*, 7387.
97. Shoji, R.; Takeushi, T.; Kubo, I.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4882.
98. Prasad, B. B.; Arora, B.; *Electroanalysis* **2003**, *15*, 108.
99. Chianella, I.; Piletsky, S. A.; Tothill, I. E.; Chen, B.; Turner, A. P. F.; *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 119.
100. Deickert, F. L.; Hayden, O.; Halikias, K. P.; *Analyst* **2001**, *126*, 766.
101. Liao, H.; Zhang, Z.; Nie, L.; Yao, S.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *59*, 75.
102. Feng, L.; Liu, Y.; Tan, Y.; Hu, J.; *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1513.
103. Deickert, F. L.; Hayden, O.; Bindeus, R.; Mann, K. J.; Blaas, D.; Waigmann, E.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1929.
104. Deickert, F. L.; Lieberzeit, P. A.; Achatz, P.; Palfinger, C.; Fassnauer, M.; Schmid, E.; Werther, W.; Horner, G.; *Analyst* **2004**, *129*, 432.
105. Liao, H.; Zhang, Z.; Li, H.; Nie, L.; Yao, S.; *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, 4101.
106. Tan, Y.; Yin, J.; Liang, C.; Peng, H.; Nie, L.; Yao, S.; *Bioelectrochemistry* **2001**, *53*, 141.
107. Surugiu, I.; Svitel, J.; Ye, L.; Haupt, K.; Danielsson, B.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4388.
108. Nopper, D.; Lammershop, O.; Wulff, G.; Gauglitz, G.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 608.