

TENDÊNCIAS EM MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS AMPEROMÉTRICOS PARA APLICAÇÕES ELETROANALÍTICAS

Arnaldo César Pereira, Antonio de Santana Santos e Lauro Tatsuo Kubota*

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

Recebido em 21/8/01; aceito em 29/1/02

TRENDS IN AMPEROMETRIC ELECTRODES MODIFICATION FOR ELECTROANALYTICAL APPLICATIONS. The most relevant advances on the analytical applications of chemically modified electrodes (CME) are presented. CME have received great attention due to the possibility of electrode surface modification including chemisorption, composite generation and polymer coating. In recent years, the interest in CME has increased overall to improve the sensitivity and selectivity of the electroanalytical probes, considering the electron mediator incorporation and the new conducting polymers development. The general procedures employed for the electrode modification and the operational characteristics of some electrochemical sensors are discussed.

Keywords: modified electrodes; electroanalysis; biosensors.

INTRODUÇÃO

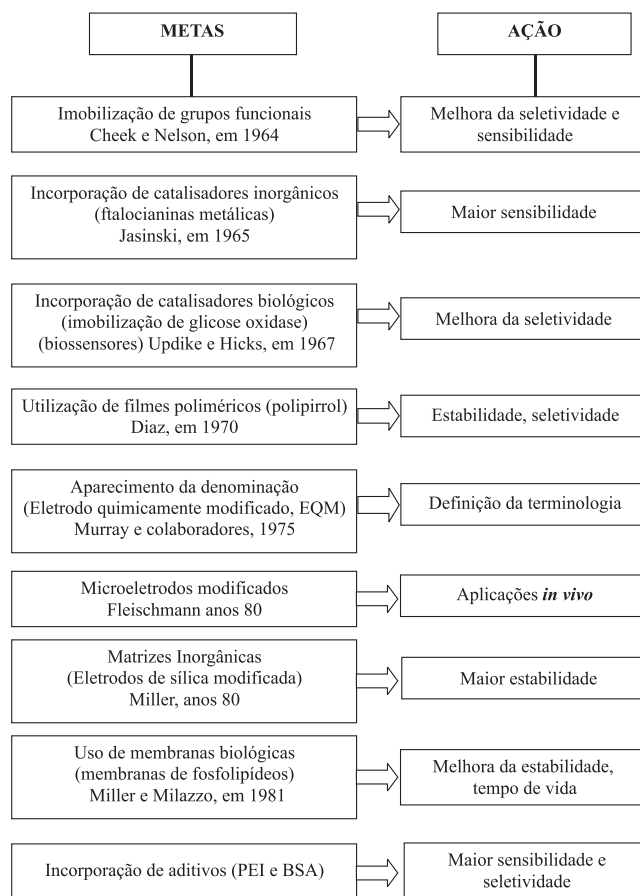
A denominação eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi inicialmente utilizada na eletroquímica por Murray e colaboradores¹, na década de 70, para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas na superfície desses dispositivos. O principal objetivo dessa modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução como uma forma de alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo assim, o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações, desde a catálise de reações orgânicas e inorgânicas² até a transferência de elétrons em moléculas de interesse³. Desta forma, avanços tecnológicos na área dos EQM's encontram aplicações nas mais variadas áreas de atuação, como por exemplo, na saúde pública⁴, onde sensores *in vivo* podem ser usados na detecção de drogas em situação de emergência; além disso, sensores com rápida detecção, alta sensibilidade e especificidade são requisitos importantes em hospitais ou laboratórios satélites^{5,6}. Os sensores também encontram vasta aplicação nas indústrias de alimentos⁷ e bioprocessos, onde o monitoramento em tempo real é muito valioso, ou ainda em aplicações ambientais² onde, tanto a indústria quanto os órgãos de vigilância ambiental, necessitam de sensores para análise quantitativa ou diferencial de inúmeros rejeitos industriais, tais como misturas gasosas, óleos, compostos orgânicos voláteis, metais pesados, etc.

A maior parte das aplicações analíticas de EQM's envolve técnicas voltamétricas ou amperométricas. Entretanto, é possível encontrar na literatura alguns casos de utilização de EQM's como eletrodos íon-seletivos. Em termos analíticos, a sensibilidade ou seletividade de uma determinação deve aumentar com a utilização de um EQM para que seu emprego seja justificado. Neste trabalho são discutidos alguns métodos de preparação mais usuais de EQM, bem como algumas determinações importantes de substratos de interesse clínico^{8,9} e industrial^{10,11} além de uma visão geral sobre os avanços incorporados nesta área ao longo do tempo.

ESTÁGIOS DA EVOLUÇÃO DOS EQM'S

Um EQM consiste de duas partes, isto é, o eletrodo base e uma

camada do modificador químico. A forma de preparação de um eletrodo quimicamente modificado é determinada pelas características analíticas desejadas do sensor. Os diversos estudos realizados com estes dispositivos, buscando otimizar suas performances, levaram a uma grande evolução destes sensores, a qual está sumarizada no Esquema 1.



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

A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá a modificação, é um aspecto muito importante da preparação de um EQM. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais podemos citar ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono e pasta de carbono. Carbono vítreo reticulado, material plástico condutor e vidros condutores estão incluídos entre os substratos menos usuais.

Esta grande variedade de materiais e possibilidades de combiná-los proporciona um grande campo de atuação destes dispositivos, sendo até mesmo utilizados em ambientes hostis, tais como o líquido intra-celular, durante a aplicação de um ultramicroeletrodo em medidas clínicas¹²⁻¹⁴.

Ao reduzirem o tamanho dos eletrodos a ultramicroeletrodos (UME's), os eletroquímicos não só criaram um dispositivo adequado para medidas na escala micro, mas também obtiveram algumas vantagens¹⁵ próprias dos UME's, tais como facilidade em alcançar o estado estacionário, medidas em solventes de alta resistência ôhmica, medidas em fase gasosa, medidas sem necessidade de eletrólito de suporte, voltametria ultra-rápida, miniaturização, queda ôhmica pequena, redução da corrente capacitiva e possibilidade de medidas *in vivo*¹⁶⁻¹⁸.

Desta forma, a utilização de EQM's é uma área em franca expansão, principalmente no aspecto do desenvolvimento de novos materiais e novos métodos de modificação de superfície de eletrodos, como na utilização de cerâmicas¹⁹, filmes de metal-hexacianoferrato²⁰ e macromoléculas, tais como DNA²¹, o que visa ampliar e potencializar as aplicações destes dispositivos que, em muitos casos, já estão disponíveis no mercado, como os sensores eletroquímicos, conhecidos como "relógios" para monitoramento de glicose, muito utilizados por diabéticos e atletas⁴, da mesma forma que os existentes para uréia. Também, pode-se destacar o programa "Sensors 2000", desenvolvido pela "National Aeronautical and Space Administration" (NASA)²², visando o desenvolvimento tecnológico de sensores e sistemas que possam operar sobre gravidade zero e em ambientes onde a substituição ou reparo é difícil. Desta forma, os EQM's vêm sofrendo contínuos avanços e encontrando inúmeras aplicações, o que poderá ser comprovado mais detalhadamente no decorrer deste trabalho.

MÉTODOS DE MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE ELETRODO

Na história do EQM, o uso de camadas de agentes modificadores sobre a superfície do eletrodo base tem sido a forma mais comum de modificar a superfície de um eletrodo.

De forma geral, os métodos²³ mais importantes utilizados para a introdução de um agente modificador sobre o eletrodo base consistem em adsorção irreversível direta, ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, recobrimento com filmes poliméricos ou ainda a preparação de eletrodos à base de pasta de carbono, com um modificador pouco solúvel em água para sua adsorção neste tipo de substrato, como resumido na Tabela 1.

Adsorção

A adsorção consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo a esta solução^{24,25}. Inicialmente, os trabalhos envolveram adsorção em eletrodos de platina porém, na maioria dos trabalhos subsequentes, as adsorções foram realizadas em eletrodos de grafite e carbono vítreo²⁶.

Tabela 1. Métodos de modificação de superfície de eletrodos

Modificações	Características
Adsorção	Incorporação simples e rápida de compostos em uma ampla gama de eletrodos base
Ligação covalente	Incorporação de um vasto número de substâncias, de maneira estável, através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo
Filmes poliméricos	Imobilização de policamadas da espécie ativa na superfície do eletrodo – Ampliação da resposta eletroquímica
Materiais compósitos	Possibilidade de modificação interna do material eletródico. Exemplos: pasta de carbono, resina epóxi, poliestireno, etc

A técnica de adsorção é bastante empregada, dada sua simplicidade e eficiência em muitos casos. No entanto, a mesma apresenta a desvantagem de produzir EQM's com no máximo uma monocamada do modificador imobilizado, o que geralmente limita a faixa de resposta linear. Por outro lado, a adsorção é um processo de equilíbrio, o que pode levar à ocorrência de dessorção do modificador para o meio durante sua utilização, resultando na perda de reprodutibilidade e redução da vida útil do EQM preparado desta forma²⁷.

Ligação covalente

Outra forma de imobilizar o agente modificador é através da ligação covalente²⁸⁻³¹, na qual o modificador é ligado covalentemente ao substrato do eletrodo. Reações de silanização, envolvendo organosilanos e óxidos presentes à superfície do eletrodo, são bastante exploradas. Eletrodos metálicos, quando oxidados em meio ácido, são recobertos com uma fina camada de óxido. Desta forma, um eletrodo metálico, após ser oxidado, pode ser silanizado e posteriormente reagir com outra molécula, levando à incorporação do grupo funcional que se queira imobilizar, ligado covalentemente.

Como os eletrodos à base de carbono apresentam grupos funcionais contendo oxigênio, tais como ácidos carboxílicos, álcoois (fenóis), anidridos e cetonas (quinonas) cuja concentração pode variar conforme reação de oxigenação de átomos de carbono presentes no material do eletrodo, estes são passíveis de modificação. Portanto, a modificação de eletrodos à base de carbono baseia-se na manipulação da reatividade de seus grupos funcionais oxigenados, frente a reagentes como aminas, cloreto de tionila, organosilanos e outros³².

O método de modificação via ligação covalente é bastante estável em relação aos demais métodos, contudo requer maior tempo para a realização, gera cobertura com no máximo uma monocamada imobilizada, além de ser mais difícil de se executar. Seu emprego é de especial interesse para a imobilização de enzimas, sendo amplamente empregado nesta área²⁷.

Filmes poliméricos

Esta técnica consiste no recobrimento da superfície do eletrodo com filmes poliméricos condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e à espécie de interesse. Ao contrário das técnicas vistas anteriormente, a modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de muitas monocamadas da espécie ativa na superfície

modificada, ampliando consideravelmente a resposta eletroquímica. Desta forma, filmes poliméricos têm sido empregados em eletrodos quimicamente modificados e usados no desenvolvimento de sensores para proteger a superfície dos eletrodos de impurezas³³, bloquear interferentes³⁴, imobilizar biocomponentes³⁵, incorporar mediadores³⁶ e fornecer biocompatibilidade³⁷.

Devido à grande variedade das características dos polímeros, pode-se explorar suas propriedades conforme o interesse. Dessa forma, polímero eletroativo (eletrocatalise), quimicamente ativo (propriedades ligantes ou de troca-iônica para pré-concentração) e inerte (apenas exclusão de interferentes) são frequentemente utilizados. No geral, os filmes poliméricos são classificados em 4 classes: condutores, de troca-iônica, não-condutores e de membranas compostas.

Filmes poliméricos condutores são amplamente usados devido à característica de aumentar a velocidade de transferência de elétrons. Geralmente os filmes poliméricos de troca-iônica possuem um componente redox ativo, o qual é um contra-íon de um filme poliônico como polivinilpiridina ou Nafion. Os polímeros não-condutores são frequentemente usados por sua característica permissível. Estes tipos de filmes poliméricos são empregados em biossensores para prevenir interferentes, impurezas sobre a superfície do eletrodo, imobilizar biocomponentes e mediadores de tal forma que estes não sejam lixiviados para a solução. A espessura típica para estes filmes formados por eletropolimerização é cerca de 10 nm.

Membranas compostas oferecem características de se combinar efetivamente com mais de um filme, embora exista a possibilidade de se obter filmes com as mesmas propriedades utilizando-se outras classes de filmes poliméricos. A literatura mostra um trabalho desenvolvido por Koopal *et al.*³⁸, onde este procedimento é empregado na preparação de um biossensor para glicose.

Imobilização por oclusão

Outro caminho muito utilizado para a imobilização de agentes modificadores é através da oclusão em gel^{36,39,40}, o qual é baseado em acoplar os mais diversos componentes, em rede de uma matriz polimérica ou inserindo-os em membranas semipermeáveis. Materiais como enzimas, células complexas, organelas e outros biocatalisadores são bastante apropriados para serem imobilizados através desta metodologia. Este método apresenta a vantagem do componente biológico não se ligar à matriz, o que pode ser muito importante para evitar possível diminuição da atividade enzimática devido ao processo de imobilização. As desvantagens são a possibilidade da enzima se lixiviar da rede polimérica (gel) e as propriedades não condutoras do gel.

Pasta de carbono

Os eletrodos preparados à base de pasta de carbono oferecem versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, modificação conveniente e facilidade de renovação da superfície. Devido a essas propriedades, os eletrodos à base de pasta de carbono estão em uso extensivo em eletroanálise⁴¹.

Pasta de carbono é uma mistura de grafite em pó e um líquido orgânico que é miscível em contato com soluções aquosas. A superfície dos eletrodos de pasta de carbono é muito complexa, com muitas possibilidades de interações. O líquido orgânico, denominado aglutinante, serve para fixar a pasta ao eletrodo, preencher as cavidades entre as partículas de grafite e “isolar” o mesmo do contato com soluções aquosas.

Uma das principais vantagens de pasta de carbono para a construção de sensores é que esses eletrodos possibilitam a modificação interna do material eletródico, diferentemente do que ocorre com os

eletrodos sólidos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície. Isto significa que é possível a co-imobilização de enzimas, cofatores, mediadores, estabilizadores resultando numa configuração de eletrodo sem a necessidade de adição de reagentes durante a determinação.

Materiais compósitos

Os materiais compósitos como o próprio nome indica são formados pela combinação de duas ou mais fases de diferente natureza. Cada fase mantém suas características individuais, mas a mistura pode apresentar novas características físicas, químicas ou biológicas. Compósitos com características condutoras são utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos com excelentes resultados⁴², como por exemplo o emprego de compósitos de grafite-epóxi na determinação amperométrica de pesticidas⁴³.

Os polímeros envolvidos nestes materiais fornecem uma certa estabilidade, da mesma forma que os compósitos gerados passam a adquirir características eletroquímicas particulares. Materiais à base de carbono formam fases condutoras ideais na elaboração de materiais compósitos, o que os torna muito empregados em sensores amperométricos⁴⁴. Estes materiais são bastante inertes quimicamente, apresentam grande intervalo de potencial de trabalho; baixa resistência (aproximadamente $10^{-4} \Omega \text{ cm}$) e baixa corrente residual⁴².

Biossensores empregando enzimas imobilizadas vêm sendo largamente utilizados em materiais à base de grafite-epóxi, como no desenvolvimento de biossensores empregando glicose oxidase. Estas oxidases são compatíveis com matrizes de grafite e vários materiais poliméricos, tais como resinas epóxi, silicone, poliéster, poliuretano, e Teflon[®]. Estes biocompósitos têm sido empregados para medidas de glicose baseadas na oxidação direta do peróxido de hidrogênio produzido na reação enzimática⁴². No entanto, a utilização desta classe de materiais vem sendo aplicada com sucesso na determinação de diferentes analitos, tais como etanol⁴⁵, lactato⁴⁶, acetilcolina⁴³, dopamina⁴⁷ etc.

Materiais inorgânicos

Os eletrodos modificados com materiais inorgânicos praticamente formam uma nova categoria dos eletrodos quimicamente modificados. Várias matrizes inorgânicas têm sido usadas como agentes modificadores de eletrodos convencionais. Estas incluem sílica-gel, óxidos e fosfatos metálicos, γ -alumina, zeólitas, entre outros tipos.

A variedade de materiais à base de sílica, juntamente com a química de sua superfície, implica num grande potencial para a aplicação dessas espécies em eletroquímica. Algumas das propriedades deste material, tais como capacidade de adsorção, química ácido-base, estabilidade térmica, podem ser vantajosamente exploradas, por exemplo, no acúmulo de espécies eletroativas antes da sua detecção eletroquímica. Além disso, a sílica pode ser enxertada com uma variedade de grupos funcionais, levando a um considerável enriquecimento de suas propriedades de superfície. A alta área superficial de sílicas sintéticas, quando combinada à sua química de superfície, torna esse material útil como suporte para vários catalisadores.

Apesar da fórmula simples do dióxido de silício, SiO_2 , a sílica existe em diferentes formas. Cada uma destas é caracterizada por uma estrutura (cristalina ou amorfa) e propriedades físicas e químicas tanto da estrutura quanto de sua superfície. A química da sílica tem sido extensivamente revisada, estando disponíveis na literatura na forma de livros, monografias e revisões, tratando a respeito de sua síntese, caracterização, modificação química, reatividade de superfície e usos práticos^{48,49}.

Kubota *et al.*^{50,51} têm realizado trabalhos explorando a versatilidade

de da sílica-gel em imobilizar vários componentes, tais como filmes de óxidos ou espécies eletroativas. Muitos dos estudos foram baseados na preparação de sílica-gel modificada com óxidos metálicos e utilização dos materiais resultantes como suporte para imobilização de vários mediadores de transferência de elétrons, que se mostraram interessantes quando integrados a biossensores amperométricos.

Outra matriz inorgânica bastante interessante, oriunda dos silicatos, são os chamados óxidos mistos, obtidos através do processo sol-gel, que são sínteses do tipo SiO_2/MO_2 (onde M é um metal de transição) que permite introduzir altas concentrações do metal de transição nestes materiais, promovendo homogeneidade na matriz e permitindo a obtenção de materiais com alta pureza e alta concentração destes metais na sua superfície⁵². Este processo consiste em uma técnica a baixa temperatura para produção de materiais cerâmicos por hidrólise e policondensação de alcóxidos. Estes materiais possuem algumas características, tais como rigidez física, inércia química, estabilidade térmica e baixa taxa de biodegradação. A porosidade destes materiais é importante para o desenvolvimento de biossensores e, no caso de utilização de enzima, a mesma retém suas características funcionais por longo tempo^{53,54}.

Os óxidos mistos têm atraído considerável atenção dos pesquisadores como novos materiais, catalisadores heterogêneos e suportes de catalisadores. A adição de titânio ou zircônio promove interações nos óxidos mistos SiO_2/MO_2 a nível molecular, que geram o aparecimento de sítios ácidos na superfície não encontrados sobre os óxidos puros. Assim, os sistemas binários são ativos para reações catalisadas por ácidos, além disso a alta concentração de titânio e zircônio nos óxidos mistos pode promover o aparecimento de propriedades trocadoras de íons e estruturais interessantes^{55,56}, podendo desta forma serem facilmente modificados e utilizados em desenvolvimento de sensores.

Dentro desta classe também podemos destacar o emprego do fosfato de zircônio que é muito bem conhecido devido à sua alta capacidade de troca-iônica e de suas propriedades de condutividade^{57,58}. Tais características são muito atrativas na utilização destes materiais como matrizes para a imobilização de espécies eletroativas. Alguns trabalhos vêm demonstrando que estes materi-

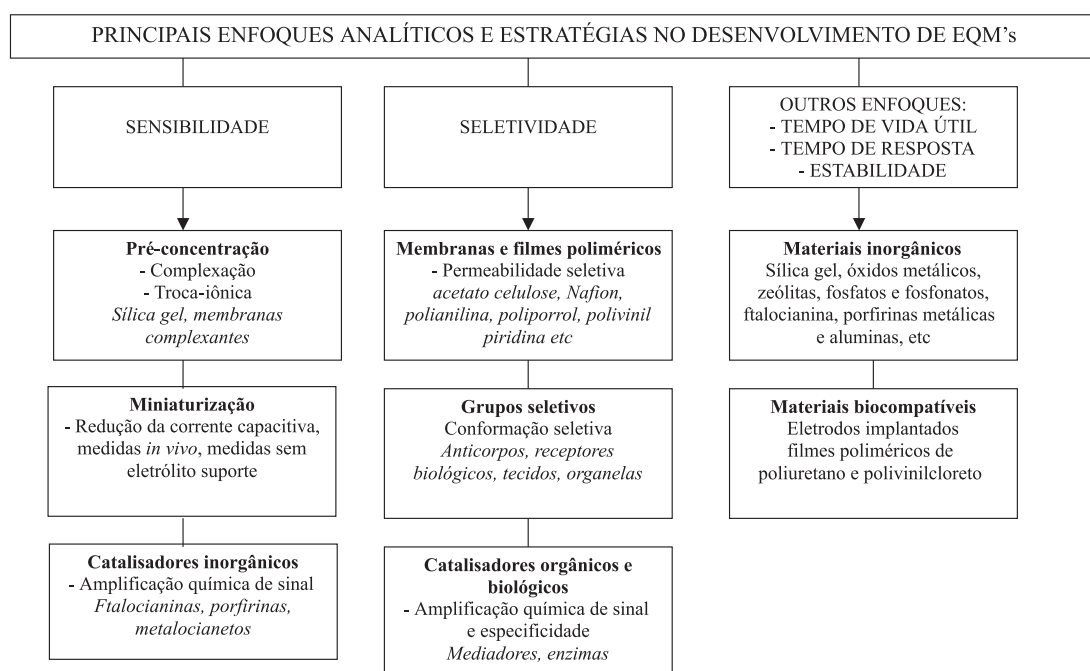
ais apresentam propriedades eletroquímicas importantes como o deslocamento do potencial formal do mediador adsorvido, tais como fenoxazinas, fenotiazinas, entre outros, para regiões mais positivas⁵⁹.

Outra classe a ser destacada envolve a utilização de zeólitas⁶⁰ e matrizes correlatas⁶¹, sendo que, assim como os fosfatos, incorpora as espécies eletroativas por mecanismo de troca-iônica. Estas matrizes são empregadas para o estudo do mecanismo de transferência de elétrons envolvidos em processos redox para espécies imobilizadas por esta matriz inorgânica. As matrizes à base de zeólitas possuem outras propriedades importantes, tais como melhoria na seletividade baseada no tamanho e forma dos reagentes juntamente com a estrutura tridimensional da zeólita, o que pode proporcionar características eletrocatalíticas importantes deste material. As zeólitas estão sendo empregadas em detecção amperométrica para alguns analitos, tais como oxigênio gasoso⁶², íons metálicos⁶³⁻⁶⁷, além de substâncias orgânicas como glicose⁶⁸⁻⁷⁰, hidrazina⁷¹, fenol⁷², dopamina⁷³, entre outras.

METAS DE EQM's

Há várias possibilidades para as funções básicas e aplicações de EQM's, e entre estas destacam-se interações seletivas e pré-concentração de um analito na camada modificadora, eletrocatalise de reações redox de um analito com transferência lenta de elétrons sobre o eletrodo base, permeseletividade com uso de membranas para inibir interferentes eletroativos, detecção eletroquímica de analitos iônicos não-redox, incorporação de biomoléculas, particularmente enzimas, no desenvolvimento de biossensores, incorporação de monocamadas em grupamentos pré-definidos em eletrodos auto arranjados^{74,75}, nas mais diversas funções de EQM's, bem como a incorporação de bicamadas lipídicas e monocamadas fosfolipídicas⁷⁶, explorando a permeabilidade destas membranas biológicas.

Em muitos casos estes conceitos e modificações estão combinados de tal forma que o sensor obtenha sensibilidade, seletividade, estabilidade, reprodutibilidade e aplicabilidade superiores àquelas de um eletrodo base sem prévia modificação. Isto pode ser melhor visualizado no Esquema 2, o qual retrata os principais enfoques analíticos e estratégias envolvidos no desenvolvimento de EQM's.



Esquema 2.

Pré-concentração do analito

Nos EQM a pré-concentração²⁷ dar-se-á através da complexação, troca iônica ou pela ligação covalente entre a espécie de interesse e um modificador imobilizado na superfície do eletrodo. Este agente modificador apresenta particular afinidade pela espécie de interesse, o que confere seletividade à medida voltamétrica. Atualmente, a utilização de sílica-gel em processos de pré-concentração vem despertando grande interesse em aplicações analíticas. A adsorção sobre esta matriz ou em uma de suas diversas formas modificadas, com objetivo de pré-concentrar analitos, é muito simples e útil. A Tabela 2 ilustra alguns exemplos de EQM's desenvolvidos para aplicação em determinações voltamétricas que envolvem uma etapa de pré-concentração.

Eletrocatalise

A eletrocatalise²⁷ consiste na redução da energia de ativação de transferência de elétrons numa célula eletroquímica. O processo redox de um substrato que apresenta uma cinética de transferência de elétrons lenta na superfície do eletrodo, é mediada por um sistema que leve a uma troca de elétrons mais rápida com o eletrodo e o substrato, acarretando a redução do sobrepotencial de ativação em processos que podem ser eletroquímico-químico ou na ordem inversa, químico-eletroquímico. O sobrepotencial de ativação consiste na aplicação de um potencial adicional a E^0 necessário para que o processo redox do sistema possa acontecer, desta forma o sobrepotencial está diretamente relacionado com a energia livre de Gibbs do sistema, tornando de grande importância mudanças no eletrodo que possam reduzir esta energia, aumentando a velocidade da reação. A redução do sobrepotencial aumenta a seletividade das medidas, uma vez que reduz a possibilidade de que os potenciais de eletrólise de espécies interferentes presentes sejam atingidos.

Dentre as espécies químicas utilizadas com o objetivo de diminuir o sobrepotencial, podemos destacar os mediadores redox, os

quais podem ser espécies tais como quinonas, tetratiofulvaleno, tetracianoquinodimetano; compostos organometálicos (ferrocenos, ftalocianinas, óxidos de rutênio, metaloporfirinas, etc.) ou enzimas. Estas espécies atuam em solução ou no caso de EQM's, imobilizadas na superfície do eletrodo. A Tabela 3 ilustra alguns exemplos de determinações voltamétricas e amperométricas, envolvendo EQM's com mediadores redox.

Membranas seletivas – minimização de interferentes

A presença de interferentes, os quais podem inibir ou mascarar a resposta eletroquímica da espécie de interesse, pode ocorrer em geral, devido aos seguintes fenômenos:

- à passivação do eletrodo, ou seja, adsorção do interferente à superfície do eletrodo, que impede o acesso da espécie de interesse;
- competição do interferente com a espécie de interesse pelos sítios ligantes existentes à superfície do eletrodo;
- eletrólise do interferente, pré-concentrado à superfície do eletrodo ou em solução, em valor de potencial próximo ao potencial de eletrólise da espécie de interesse.

O recobrimento da superfície do eletrodo com uma membrana polimérica, que possa, com base na carga e/ou tamanho bloquear o acesso do interferente, ser permeável à espécie de interesse é a principal maneira de diminuir o grau de interferência, por meios físicos²⁷. Filmes, tais como acetato de celulose ou Nafion, são muito utilizados para este fim. Nafion é um polieletrólito aniônico que é capaz de repelir espécies aniônicas, enquanto permite a passagem de cátions. Por sua vez, os filmes de acetato de celulose atuam com base no tamanho das espécies envolvidas. Outra maneira de excluir interferentes com base nas interações eletrostáticas pode ser através do recobrimento da superfície do eletrodo com monocamadas, como no caso dos eletrodos com monocamadas auto-arranjadas. Por exemplo, a incorporação de uma monocamada de fosfolípídeo a um eletrodo de mercúrio conferindo-lhe aumento na permeabilidade devi-

Tabela 2. Determinações eletroquímicas com EQM's envolvendo processo de acumulação

Sensor Base	Forma de Modificação	Analito	Tipo de Acumulação	Ref.
Carbônio vítreo	Formação de filme de polipirrol	Ag	Complexação e deposição eletroquímica	77
Pasta de carbono	Formação de compósito com sais inorgânicos (PbSO ₄)	C ₂ O ₄ ²⁻	Troca-iônica	78
Pasta de carbono	Formação de compósito com sílica (3 aminopropiletóxissilano)	Cu (II)	Complexação	79
Grafite pirolítico	Adsorção de violeta de pirocatecol	Al (III)	Complexação	80
Carbônio vítreo	Recobrimento por rotação [solução contendo Tosflex/8-quinolinol (oxina) com subsequente depósito de Hg]	Te (III)	Troca-iônica	81
Carbônio vítreo	Incorporação de dimetilglioxima em diferentes matrizes poliméricas, tais como: cloreto de polivinila e polianilina	Ni (II)	Complexação	82
Pasta de carbono	Mistura de pó de grafite com éter coroa ^a e óleo de parafina	Pb (II)	Complexação	83
Pasta de carbono	Mistura de pó de grafite com éter coroa ^b e óleo de parafina	Cu (II)	Complexação	84

a - Os éteres estudados neste caso foram: 18-coroa-6 e dibenzo-18-coroa-6

b - Os éteres estudados neste caso foram: 15-coroa-5; benzo-15-coroa-5 e dibenzo-18-coroa-6

Tabela 3. Exemplos de determinações envolvendo EQM's com mediadores de elétrons

Sensor Base	Forma de Modificação	Analito	Ref.
Carbono vítreo	Eletrodo modificado com poli(4-vinilpiridina) contendo Mo(CN) ₈ ⁴⁻	Ácido ascórbico	85
Pasta de carbono	Eletrodo modificado com sílica/fosfato de zircônio contendo diferentes mediadores	NADH	86
Carbono vítreo	Filme de polipirrol dopado com Fe(CN) ₆ ³⁻	Ácido ascórbico	87
Pasta de carbono	Eletrodo modificado com sílica/óxido de titânio/ ftalocianina de níquel tetrassulfonada	Hidrazina	88
Pasta de carbono	Eletrodo modificado com sílica/óxido de zircônio/[Ru(Na ₂ H ₂ EDTA)H ₂ O]	O ₂	89
Carbono vítreo	Eletrodo modificado com acetato de celulose contendo 2,6-diclorofenolindofenol	S ²⁻	90
Grafite espectroscópico	Adsorção de Riboflavina sobre a superfície do eletrodo	Hemoglobina	91
Grafite espectroscópico	Adsorção de Riboflavina sobre a superfície do eletrodo	O ₂	92

do à presença dos grupos hidrofóbicos na camada fosfolipídica. Por outro lado, a incorporação de compostos biológicos ativos a esta membrana pode levar a um aumento considerável na seletividade deste sensor⁷⁶. A Tabela 4 apresenta exemplos de EQM's projetados para promover a exclusão de interferentes.

Detecção de espécies sem processo redox

A determinação de analitos iônicos é baseada no efeito causado por estes no comportamento de polímeros condutores (por exemplo, polipirrol e polianilina) ou filmes com par redox imobilizado [por exemplo, hexacianoferrato (II)]. Polipirrol pode ser oxidado apenas na presença de ânions pequenos, os quais são capazes de penetrar no filme e compensar a carga positiva da forma oxidada deste polímero. Na redução do polímero, estes ânions são liberados. Tais processos de dopagem–desdopagem têm sido empregados em sistemas em fluxo onde um transiente de corrente anódico serve como uma medida

da concentração de ânions passando pelo eletrodo.

No caso de filmes com espécies negativamente incorporadas sobre a rede polimérica (por exemplo, cianocomplexos), o processo de dopagem–desdopagem é acompanhado pelo transporte de cátions pequenos da solução. A intercalação de cátions afeta a microestrutura do filme e, conseqüentemente, o potencial redox do mediador. Estes fenômenos são explorados para a determinação de metais alcalinos em sistemas em fluxo. Um importante aspecto destas análises é a possibilidade do controle de seletividade através do potencial aplicado ao sensor. A Tabela 5 apresenta exemplos de EQM's utilizados para detecção de espécies eletroinativas²³, nos potenciais de trabalho.

Biossensores eletroquímicos

Biossensor é um dispositivo capaz de fornecer informação analítica quantitativa ou semiquantitativa, usando um elemento de reconhecimento de origem biológica (receptor bioquímico), o qual está

Tabela 4. Determinações analíticas envolvendo EQM's para exclusão de interferentes

Sensor Base	Forma de Modificação	Analito	Limite de detecção	Ref.
Carbono vítreo	Filme de Nafion/politeofilina	Dopamina	5 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹	93
Filme de Hg	Filme de Nafion	Tl (I)	0,01 ppb	94
Ouro	Adsorção de ácido ω-mercaptopropiônico (monocamada auto-arranjada)	Dopamina	2 10 ⁻³ mol L ⁻¹	95
Platina	Recobrimento com membrana de PVC	Atividade de Glucose-6-fosfato desidrogenase/via oxidação de NADH	0,1 U mL ⁻¹	96
Filme de Hg	Filme de Nafion	Pb e Cd	n.d.	97
Ouro	Camadas auto-arranjadas - Tratamento da superfície do eletrodo com uma mistura de ácido 3-mercaptopropiônico com 3-mercaptopropanol - Posterior imobilização de citocromo-c	Atividade de peroxidase	n.d.	98
Carbono vítreo	Filme de Nafion/pirocloro-óxido de rutênio	Dopamina	0,1 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	99
Carbono vítreo	Filme de Nafion/pirocloro-óxido de rutênio	Serotonina	2 10 ⁻⁹ mol L ⁻¹	100

n.d. – não disponível

Tabela 5. Exemplos de detecção eletroquímica de espécies sem processo redox

Sensor Base	Forma de Modificação	Analito	Técnica	Ref.
Cobre	Ativação em meio ácido (pH = 3)	NO_3^- e NO_2^-	Voltametria cíclica	101
Pasta de carbono	Sílica-gel	Cu (II)	Voltametria de onda quadrada/redissolução anódica	102
Pasta de carbono	Sílica sol-gel/Dimetilglioxima	Ni (II)	Voltametria de pulso diferencial	103
Platina	Filme de polianilina/Nafion	Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}	FIA	104
Ouro em forma de disco	Membranas de polidifenilamina-dodecil sulfato	Determinação simultânea de (SO_4^{2-} , Cl^- , NO_3^-) e (Na^+ , NH_4^+ e K^+)	Voltametria de pulso diferencial	105

em contato espacial direto com um elemento de transdução. O elemento transdutor deve ser capaz de converter a resposta química em um sinal apropriado, podendo ser potenciométrico, amperométrico, condutimétrico, óptico, entalpimétrico ou ainda piezolétrico¹⁰⁶. Os elementos biológicos mais comuns incluem enzimas, antígenos, anticorpos, DNA, organelas, tecidos, entre outros.

Biossensores enzimáticos estão se tornando muito úteis em aplicações analíticas, devido à possibilidade de se combinar a seletividade e sensibilidade da enzima com a simplicidade dos transdutores eletroquímicos. A etapa fundamental no desenvolvimento de um biossensor é a imobilização e estabilização das enzimas ou proteínas sobre a superfície da matriz, no intuito de melhorar a estabilidade química destes materiais responsáveis pelo reconhecimento.

Desta forma, materiais que possam permitir a imobilização de espécies mediadoras e moléculas biológicas são de grande potencial para o desenvolvimento de sensores e biossensores. Como citado anteriormente, dentre os materiais inorgânicos, a sílica-gel apresenta um grande potencial de aplicação em eletroquímica, entretanto essa é uma área de pesquisa relativamente recente e que tende a crescer, como descreve Walcarus³² na sua recente revisão sobre o uso de materiais à base de sílica em estudos sobre eletrodos modificados direcionados para aplicações eletroanalíticas. Particularmente no caso de biossensores baseados em sílica, nos quais esta é utilizada como suporte para imobilização de enzimas, é possível incorporar outros materiais para aumentar a estabilidade e a sensibilidade destes dispositivos. Podemos destacar alguns biossensores eletroquímicos empregando eletrodos modificados à base de sílica, utilizados na determinação de analitos de interesse biológico, tais como etanol e lactato¹⁰⁷, frutose¹⁰⁸, glicose¹⁰⁹⁻¹¹⁰, peróxido de hidrogênio¹¹¹, penicilina¹¹², compostos fenólicos^{113,114} e salicilato¹¹⁵.

Outra possibilidade, é a associação das qualidades dos EQM's baseados em filmes poliméricos juntamente com a moderna instrumentação eletroquímica disponível atualmente, resultando em sensores com maior seletividade e sensibilidade. A literatura mostra que atualmente os filmes poliméricos têm sido muito empregados na preparação de EQM's, principalmente no desenvolvimento de biossensores, na imobilização de um grande número de enzimas, tais como urease¹¹⁶ e penicilase¹¹⁷, entre outras.

A Tabela 6 apresenta alguns exemplos de EQM's utilizados na determinação de importantes analitos, exercendo a função de biossensor.

Considerando-se que as enzimas desidrogenases catalisam reações de substratos de grande importância em química analítica, e a possibilidade de empregar o polipirrol para imobilizar enzimas, destacamos o uso deste polímero na imobilização de enzimas desidrogenases, incluindo álcool desidrogenase¹²⁷, glicose

desidrogenase¹²⁸, frutose desidrogenase³⁶, lactato desidrogenase¹²⁹ e glutamato desidrogenase¹³⁰. Estas enzimas são dependentes de um cofator, nicotinamida adenina dinucleotídeo, o qual pode existir na forma oxidada (NAD(P)^+) ou reduzida (NAD(P)H). Desde que a oxidação de NAD(P)H diretamente sobre filmes de polipirrol é difícil, estas enzimas dependem de uma reoxidação catalítica utilizando-se um mediador ligado ao filme ou incorporado com algum ligante. Dois exemplos de tais mediadores incluem ferricianeto¹³¹ e naftoquinonassulfonato¹³².

Dentre os três tipos de biossensores eletroquímicos, os condutimétricos são usualmente não-específicos e têm uma pobre razão sinal/ruído¹³³, por isso as técnicas potenciométricas e, principalmente, amperométricas têm sido as mais empregadas. O sensor amperométrico é mais rápido, mais sensível e preciso que o potenciométrico, pois não é necessário esperar que o equilíbrio termodinâmico seja obtido e a resposta é linear em uma faixa relativamente ampla de concentração do analito sendo, portanto, o mais empregado.

Os biossensores amperométricos são geralmente baseados em enzimas oxidorreduções, as quais comumente utilizam oxigênio (enzimas oxidases) ou coenzimas contendo anel piridínico [β - NAD(P)^+ , nicotinamida adenina dinucleotídeo] (enzimas desidrogenases ou hidroxilases) como aceptores de elétrons, regenerando a enzima após a reação com o substrato¹³⁴.

A associação dos biossensores com os ultramicroeletrodos vêm se tornando importante ferramenta em aplicações *in vivo*. Grandes avanços foram incorporados com o advento dos biossensores implantados na detecção de substâncias com importantes funções fisiológicas, como o uso de sensores capazes de monitorar a concentração de glicose associado a bombas de insulina (pâncreas artificiais)¹³⁵, usando um biossensor a base da enzima glicose oxidase¹³⁶.

O interesse no desenvolvimento de sensores e biossensores vem desde os anos setenta, quando em 1972, o primeiro biossensor foi comercializado pela Yellow Spring Instrument Co. Este fato ocorreu posteriormente através da Leeds, da Northrup e também pela Beckman Instruments¹³⁷, sendo todos para a detecção de glicose no corpo humano.

No entanto, o desenvolvimento de biossensores não se restringe apenas à utilização de enzimas purificadas. Também é possível a utilização de tecidos de plantas ou animais, os quais contêm uma multiplicidade de enzimas, podendo não ser tão seletivos quanto a enzima purificada. Contudo elas estão em seus ambientes naturais, sendo menos suscetíveis à degradação¹³⁸ e aumentando a estabilidade do biossensor.

Há também o emprego de anticorpos, resultando em sensores altamente seletivos, os quais são baseados nos princípios de fase

Tabela 6. Biossensores eletroquímicos empregando eletrodos modificados utilizados na determinação de analitos de interesse biológico

Analito	Enzima	Eletrodo Modificado	Técnica	Intervalo Linear (mol L ⁻¹)	Ref.
Glicose	<i>Glicose Oxidase</i>	Rh-grafite+enzima ocluída em sílica modificada com metila	Amperometria E _{ECS} = -0,15V	5,0 x 10 ⁻³ – 9,0 x 10 ⁻²	118
Peróxido de hidrogênio	<i>Horseradish peroxidase</i>	EPC ^a +enzima/ sílica sol-gel /TMOS ^b	Amperometria E _{Ag/AgCl} = 0,1V	1,0 x 10 ⁻⁶ – 3,5 x 10 ⁻⁴	119
Lactato	<i>Lactato oxidase</i>	GC ^c /Os-polímero/enzima/ sílica sol-gel/MTEOS ^d	Amperometria E _{Ag/AgCl} = 0,4V	1,0 x 10 ⁻⁴ – 9,0 x 10 ⁻³	120
Compostos organofosforados	<i>Acetilcolines-terase</i>	Grafite/epóxi+TCNQ ^e +enzima imobilizada em APTES ^f	Amperometria E _{Ag/AgCl} = 0,3V	2,5 x 10 ⁻⁶ – 1,0 x 10 ⁻⁴	121
Peróxido de hidrogênio	<i>Horseradish Peroxidase</i>	Eletrodo de C vítreo/Nafion/ verde de metileno/sílica sol-gel/enzima	Amperometria n. d.	n. d.	122
Hipoxantina	<i>Xantina oxidase</i>	Enzima imobilizada no interior da matriz grafite/ cerâmica	Amperometria n.d.	1,0 x 10 ⁻⁶ – 1,0 x 10 ⁻³	123
Isocitrato	<i>Isocitrato desidrogenase</i>	Imobilização sobre a superfície de um microeletrodo de Pt-Ir da enzima, NADP ⁺ e azul de Meldola através de eletropolimerização de pirrol	Amperometria E _{ECS} = -0,05V	7,7 x 10 ⁻⁶ - 1,04 x 10 ⁻⁴	124
Histamina	<i>Metilamina desidrogenase</i>	Imobilização da enzima e ferricianeto através da eletropolimerização de pirrol sobre microeletrodo de ouro	Amperometria E _{ECS} = 0,24-0,33 V	2,5 x 10 ⁻⁶ – 4 x 10 ⁻³	125
Glicose	<i>Glicose Oxidase</i>	Imobilização da enzima e Azul da Prússia através da eletropolimerização de pirrol sobre eletrodo de Pt	Amperometria E _{Ag/AgCl} = 0,6 V	n.d.	126

^aEPC – eletrodo de pasta de carbono; ^bTMOS – tetrametoxissilano; ^cGC – eletrodo de carbono vítreo; ^dMTEOS – metil-trietoxissilicato; ^eTCNQ – 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano; ^fAPTES – 3-aminopropiltriethoxissilano; ^gTEATS – tetraetilamônio tolueno-4-sulfonato; ECS = eletrodo de calomelano saturado; n. d. – não disponível

sólida de imunossaios e nos eventos físico-químicos resultantes da interação anticorpos (Ac) – antígenos (Ag)¹³⁹⁻¹⁴², sendo detectadas as concentrações de Ac ou Ag, tanto por mudanças diretas no transdutor, quanto por deslocamento no equilíbrio de reações^{143,144}. O uso deste tipo de sensor também alcança grande desenvolvimento, como no emprego de filmes poliméricos na confecção de imunossensores amperométricos¹⁴⁵, quando são utilizados marcadores enzimáticos ou substâncias redox.

Outra possibilidade é a utilização de microorganismos que podem assimilar compostos orgânicos resultando na mudança da atividade respiratória, além de poder produzir metabólitos eletroativos, como por exemplo o sensor para glicose contendo a bactéria *Pseudomonas fluorescens*¹⁴⁶.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho ilustra a utilidade dos EQM's que podem ser preparados de várias maneiras, dependendo das características analíticas desejadas, e de suas aplicações. Os materiais mais utilizados na preparação de EQM's são os materiais inorgânicos e filmes poliméricos. EQM's apresentam amplas condições de aplicação, dada a grande possibilidade de uso de novos materiais, as inúmeras possibilidades de imobilização e ligação de compostos com propriedades

catalíticas, bem como uma tendência para a produção em escala de sensores portáteis descartáveis ou não.

Está bem estabelecido que sensores e biossensores têm um papel importante na determinação de vários analitos de interesse industrial, clínico, ambiental e farmacológico. Neste sentido, eletrodos modificados são particularmente adequados não só para determinações analíticas, mas também para a investigação de processos e mecanismos físico-químicos tanto de espécies orgânicas como inorgânicas.

Entre os vários procedimentos de imobilização de biomoléculas, a oclusão destas em filmes eletropolimerizados constitui-se em uma estratégia versátil e poderosa para fabricar biossensores. Este procedimento não requer a adição de reagentes químicos, os quais podem desnaturar as biomoléculas, já a prevenção de interferentes e envenenamento da superfície dos eletrodos são pontos que fazem aumentar muito o uso desta classe de compostos.

Como perspectiva futura, um dos grandes desafios para a área eletroanalítica é o desenvolvimento de sensores eletroquímicos estáveis e com alto grau de seletividade, possibilitando a construção de dispositivos portáteis de fácil manipulação, que possam ser comercializados, como por exemplo os sensores para glicose e uréia, entre outros já disponíveis. Outra área de interesse busca o desenvolvimento de sensores para aplicações *in vivo*, os mais estáveis possíveis, através do uso de materiais biocompatíveis, pois o grau de re-

jeição do organismo ao corpo estranho (eletrodo implantado) depende fundamentalmente da forma e do material do eletrodo. Na área neurológica, surge a possibilidade do desenvolvimento de sensores específicos para drogas que atuam no sistema nervoso central, o que possibilitará estudos da interação destas drogas com os neurotransmissores, levando ao esclarecimento de dúvidas que persistem, como por exemplo o quanto estas drogas afetam o comportamento e o metabolismo dos usuários.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS

- Moses, P.R.; Wier, P.; Murray, R.W.; *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 1882.
- Katz, E.; Lotzbeyer, T.; Schlereth, D. D.; Schuhmann, W.; Schmidt, H.-L.; *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *373*, 189.
- Persson, B.; *J. Electroanal. Chem.* **1990**, *287*, 61.
- Wilkins, E.; Atanasov, P.; *Med. Eng. Phys.* **1996**, *18*, 273.
- Siggaard-Andersen, O.; Gotghen, I. H.; Fogh-Andersen, N.; *Acta Anaesth. Scand.* **1995**, *39*, 7.
- Turner, A. P. F.; *Acta Anaesth. Scand.* **1995**, *39*, 15.
- Udomsopagit, S.; Suphantharika, M.; Kunnecke, W.; Bilitewski, U.; Bhumiratana, A.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *14*, 543.
- Inoue, T.; Kirchhoff, J.R.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5755.
- Cai, C. X.; Xue, K. H.; *Chem. Res. Chin. Univ.* **2000**, *16*, 42.
- Liu, H.Y.; Deng, J. Q.; *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 103.
- Karyakin, A. A.; Karyakina, E. E.; Gorton, L.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1720.
- Malinski, T.; Taha, Z.; *Nature* **1990**, *358*, 676.
- Moscone, D.; Pasini, M.; Mascini, M.; *Talanta* **1992**, *39*, 1039.
- Gilligan, B. J.; Shults, M. C.; Rhodes, R. K.; Updike, S. J.; *Diabetes Care* **1994**, *17*, 881.
- Feeney, R.; Kounaves, S. P.; *Electroanalysis* **2000**, *12*, 677.
- Shram, N. F.; Netchiporouk, L. I.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Bonnet, C.; Cespeglio, R.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2618.
- Rigby, G. P.; Crump, P. W.; Vadgama, P.; *Analyst* **1996**, *121*, 871.
- McRipley, M. A.; Linsenmeier, R. A.; *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *414*, 235.
- Macha, S. S.; Fitch, A.; *Mikrochim. Acta* **1998**, *128*, 1.
- Mattos, I. L.; Gorton, L.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 200.
- La-Scalea, M. A.; Serrano, S. H. P.; Gutz, I. G. R.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 417.
- Weetall, H. H.; *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *14*, 237.
- Labuda, J.; *Selec. Electr. Rev.* **1992**, *14*, 33.
- Emr, S. A.; Yacynych, A. M.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 913.
- Albareda-Sirvent, M.; Merkoci, A.; Alegret, S.; *Sens. Actuators, B* **2000**, *69*, 153.
- Bartlett, P. N.; *Medical Biol. Eng. Comp.* **1990**, *28*, 10.
- Souza, M. F. B.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 191.
- Henke, L.; Krull, U. J.; *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.* **1999**, *44*, 61.
- Wink, T.; vanZuilen, S. J.; Bult, A.; vanBennekom, W. P.; *Analyst* **1997**, *122*, 43.
- Trojanowicz, M.; Krawczyk, T. K. V.; *Mikrochim. Acta* **1995**, *121*, 167.
- Downard, A. J.; *Electroanalysis* **2000**, *12*, 1085.
- Walcarious, A.; *Electroanalysis* **1998**, *10*, 1217.
- Persson, B.; Lan, H. L.; Gorton, L.; Okamoto, Y.; Hale, P. D.; Boguslavsky, L.; Skotheim, T.; *Biosens. Bioelectron.* **1993**, *8*, 81.
- Alvarez-Icaza, M.; Bilitewski, U.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 525.
- Wallace, G. G.; Smyth, M.; Zhao, H.; *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 245.
- Garcia, C. A. B.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *374*, 201.
- Ratner, B.D.; *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 797.
- Koopal, C. G. J.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1992**, *29*, 159.
- Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A.; *Electroquímica – Princípios, Métodos e Aplicações*, Oxford University Press: New York, 1993.
- Fernandes, J. C. B.; Kubota, L. T.; Oliveira Neto, G.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *385*, 3.
- Gorton, L.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 23.
- Alegret, S.; *Analyst* **1996**, *121*, 1751.
- Martorell, D.; Céspedes, F.; Martínez-Fàbregas, E.; Alegret, S.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, *290*, 343.
- Céspedes, F.; Martínez-Fàbregas, E.; Alegret, S.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, *284*, 21.
- Morales, A.; Céspedes, F.; Martínez-Fàbregas, E.; Alegret, S.; *Electrochim. Acta* **1998**, *43*, 3575.
- Wang, J.; Chen, Q.; *Electroanalysis* **1994**, *6*, 850.
- Wang, J.; Fang, L.; López, D.; *Analyst* **1994**, *119*, 455.
- Vansant, E.F.; Van der Voort, P.; Vrancken, K.C.; *Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface*, Elsevier: Amsterdam, 1995.
- Sjöberg, S.; *J. Non-Cryst. Solids* **1996**, *196*, 51.
- Rocha, R. F.; Rosatto, S. S.; Bruns, R. E.; Kubota, L. T.; *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *433*, 73.
- Perez, E. F.; Kubota, L. T.; Tanaka, A. A.; Oliveira Neto, G.; *Electrochim. Acta* **1998**, *43*, 1665.
- Brinker, C. J.; Scherer, G. W.; *Sol-Gel Science – The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press Inc.: San Diego, 1990.
- Li, J.; Tan, S. N.; Oh, J. T.; *Electroanal. Chem.* **1998**, *448*, 69.
- Li, J.; Chia, S.; Goh, N. K.; Tan, S. N.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *362*, 203.
- Miller, J. B.; Ko, E. I.; *J. Catal.* **1996**, *159*, 58.
- Wang, S. W.; Guo, J. K.; Huang, X. X.; Li, B. S.; *Mater. Lett.* **1995**, *25*, 151.
- Kubota, L. T.; Gorton, L.; *J. Solid State Electrochem.* **1999**, *3*, 370.
- Kubota, L. T.; Munteanu, F.; Roddick-Lanzilotta, A.; McQuillan, A. J.; Gorton, L.; *Quim. Anal.* **2000**, *19*, 15.
- Kubota, L. T.; Gorton, L.; *Electroanalysis* **1999**, *11*, 719.
- Song, C. J.; Villemure, G.; *Microporous Mesoporous Mater.* **2001**, *44*, 679.
- Dryfe, R. A. W.; Holme, S. M.; *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *483*, 144.
- Creasy, K. E.; Shaw, B. R.; *Electrochim. Acta* **1988**, *33*, 551.
- Demertzis, M.; Evmiridis, N. P.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1986**, *82*, 3647.
- Matysik, S.; Matysik, F.-M.; Mattusch, J.; Einicke, W.-D.; *Electroanalysis* **1998**, *10*, 98.
- Baker, M. D.; Senaratne, C.; *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 697.
- Baker, M. D.; Senaratne, C.; Zhang, J.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1992**, *88*, 3187.
- Senaratne, C.; Baker, M. D.; *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 13687.
- Wang, J.; Walcarious, A.; *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *404*, 237.
- Liu, B.; Hu, R.; Deng, J.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2343.
- Liu, B. H.; Hu, R. Q.; Liu, H. Y.; Deng, J. Q.; *Acta Chim. Sinica* **1998**, *56*, 682.
- Guerra, S. V.; Xavier, C. R.; Nakagaki, S.; Kubota, L. T.; *Electroanalysis* **1998**, *10*, 462.
- Kotte, H.; Grundig, B.; Vorlop, K.-D.; Strehlitz, B.; Stottmeister, U.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 65.
- Wang, J.; Walcarious, A.; *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *407*, 183.
- Gothelf, K. V.; *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *494*, 147.
- Finot, M. O.; McDermott, M. T.; *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *488*, 125.
- Nelson, A.; *Langmuir* **1996**, *12*, 2058.
- Song, F.-Y.; Shiu, K.-K.; *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *498*, 161.
- Cai, X.H.; Ogorevc, B.; Tavcar, G.; Kalcher, K.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 639.
- Borgo, C. A.; Ferrari, R. T.; Colpini, L. M. S.; Costa, C. M. M.; Baesso, M. L.; Bento, A. C.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *385*, 103.
- Bi, S. P.; Chen, G.; Liu, J.; Zou, G. W.; Gan, N.; *Acta Chim. Sinica* **2000**, *58*, 494.
- Yang, H. Y.; Sun, I. W.; *Electroanalysis* **1999**, *11*, 195.
- Bing, C.; Deen, R.; Khang, G. N.; Sai, C. L.; Kryger, L.; *Talanta* **1999**, *49*, 651.
- Ijeri, V. S.; Srivastaka, A. K.; *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 605.
- Ijeri, V. S.; Srivastaka, A. K.; Fresenius' *J. Anal. Chem.* **2000**, *367*, 373.
- Thangamuthu, R.; Pillai, K. C.; *Bull. Electrochem.* **1999**, *15*, 481.
- Malinauskas, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *224*, 325.
- Pournaghi-Azar, M.H.; Ojan, R.; *J. Solid. State Electrochem.* **2000**, *4*, 75.
- Perez, E. F.; Oliveira Neto, G.; Tanaka, A. A.; Kubota, L. T.; *Electroanalysis* **1998**, *10*, 111.
- Peixoto, C. R. M.; Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; *Anal. Proc.* **1995**, *32*, 503.
- Florou, A. B.; Prodromidis, M. I.; Tzouwaras-Karayanni, S. M.; *Talanta* **2000**, *52*, 465.
- Sun, W. L.; Kong, J. L.; Deng, J. Q.; *Anal. Lett.* **1996**, *29*, 2425.
- Sun, W. L.; Kong, J. L.; Deng, J. Q.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 115.
- Wang, Z. H.; Jia, J. B.; Li, G. G.; Zhou, S. P.; *Chin. J. Anal. Chem.* **2000**, *28*, 568.
- Lu, T. H.; Yang H. Y.; Sun, I. W.; *Talanta* **1999**, *49*, 59.
- Malen, F.; Mandler, D.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 37.
- Treloar, P. H.; Christie, I. M.; Kane, J. W.; Crump, P.; Nkohkwo, A. T.; Vadgama, P. M.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 216.
- Murimboh, J.; Lam, M. T.; Hassan, N. M.; Chakrabarti, C. L.; *Anal. Chim. Acta* **2000**, *423*, 115.

98. Zen, J. M.; Chen, I. L.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 537.
99. Zen, J. M.; Chen, I. L.; Shih, Y.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *369*, 103.
100. Gobi, K. V.; Mizutani, F.; *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *484*, 1723.
101. Davis, J.; Moorcroft, M. J.; Wilkins, S. J.; Compton, R. G.; Cardosi, M. F.; *Analyst* **2000**, *125*, 737.
102. Walcarius, A.; Despas, C.; Bessière, J.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *463*, 100.
103. Wang, J.; Pamidi, P. V. A.; Nascimento, V. B.; Angnes, L.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 689.
104. Sung, J. Y.; Huang, H. J.; *Anal. Chem.* **1991**, *246*, 275.
105. Xu, Q.; Xu, C.; Wang, Y. P.; Zhang, W.; Jin, L. T.; Tanaka, K.; Haraguchi, H.; Itoh, A.; *Fresenius' J. Anal. Chem.* **2000**, *368*, 791.
106. Scouten, W. H.; Luong, J. H. T.; Brown, R. S.; *Tibtech* **1995**, *13*, 178.
107. Wang, J.; Liu, J.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, *284*, 385.
108. Garcia, C. A. B.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; Grandin, L. A.; *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *418*, 147.
109. Wang, J.; Naser, N.; *Electroanalysis* **1994**, *6*, 571.
110. Li, J.; Chia, S.; Goh, N. K.; Tan, S. N.; Ge, H.; *Sens. Actuators, B* **1997**, *40*, 135.
111. Li, J.; Tan, S. N.; Ge, H.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *335*, 137.
112. Duarte, M. M. M. B.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; Lima Filho, J.L.; Pimentel, M. F.; Lima, F.; Lins, V.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *350*, 353.
113. Rossato, S. S.; Kubota, L. T.; Oliveira Neto, G.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *390*, 65.
114. Li, J.; Chia, S.; Goh, N. K.; Tan, S. N.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *362*, 203.
115. Kubota, L. T.; Milagres, B. G.; Gouvea, F.; Oliveira Neto, G.; *Anal. Lett.* **1996**, *29*, 893.
116. Adeloju, S. B.; Shaw, S.J.; Wallace, G. G.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, *281*, 611.
117. Sukeerthi, S.; Contractor, A.O.; *Indian J. Chem.* **1994**, *33*, 565.
118. Sampath, S.; Lev, O.; *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *426*, 131.
119. Li, J.; Tan, S. N.; Oh, J. T.; *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *448*, 69.
120. Park, T. M.; Iwuoha, E. I.; Smith, M. R.; Freaney, R.; McShane, A. J.; *Talanta* **1997**, *44*, 973.
121. Martorell, D.; Céspedes, F.; Martínez-Fàbregas, E.; Alegret, S.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *337*, 305.
122. Wang, B. Q.; Dong, S. J.; *Talanta* **2000**, *51*, 565.
123. Niu, J. J.; Lee, J. Y.; *Sens. Actuators, B* **2000**, *62*, 190.
124. Pereira, A. C.; Fertonani, F. L.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; Yamanaka, H.; *Talanta* **2001**, *53*, 801.
125. Zeng, K.; Tachikawa, H.; Zhu, Z. Y.; Davidson, V. L.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2211.
126. Garjonyte, R.; Malinauskas, A.; *Sens. Actuators, B* **2000**, *63*, 122.
127. Yabuki, S.; Shinohara, H.; Ikariyama, Y.; Aizawa, M.; *J. Electroanal. Chem.* **1990**, *277*, 179.
128. Yabuki, S.; Mizutani, F.; Asai, M.; *Biosens. Bioelectron.* **1991**, *6*, 311.
129. Cosnier, S.; Fontecave, M.; Innocent, C.; Niviere, V.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 685.
130. Yabuki, S.; Mizutani, F.; Katsura, T.; Asai, M.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1991**, *28*, 489.
131. Masue, T.; Yamada, H.; Chang, H. C.; Uchida, I.; Nagata, K.; Tomita, K.; *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1038*, 29.
132. Kajiya, Y.; Matsumoto, H.; Yoneyama, H.; *J. Electroanal. Chem.* **1991**, *319*, 185.
133. Duffy, P.; Saad, I.; Wallach, J.M.; *Anal. Chim. Acta* **1988**, *2*, 267.
134. Shu, H. C.; Wu, N. P.; *Talanta* **2001**, *54*, 361.
135. Kondo, T.; Ohkura, K.; Ito, K.; Ikeda, S.; *Diabetes Care* **1982**, *5*, 218.
136. Fischer, U.; Rebrin, K.; Woedtke, T. V.; Abel, P.; *Horm. Metab. Res.* **1994**, *26*, 515.
137. Weetall, H. H.; *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 237.
138. Wang, J.; Lin, M. S.; *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1545.
139. Skladal, P.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 737.
140. Collings, A. F.; Caruso, F.; *Rep. Prog. Phys.* **1997**, *60*, 1397.
141. Hock, B.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *347*, 177.
142. Katz, E.; Willner, I.; *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *418*, 67.
143. Marco, M. P.; Barcelo, D.; *Meas. Sci. Technol.* **1996**, *7*, 1547.
144. Gil, E. S.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* **1996**, *22*, 874.
145. Blonder, R.; Katz, E.; Cohen, Y.; Itzhak, N.; Riklin, A.; Willner, I.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3151.
146. Karube, I.; *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Turner, A. P. F.; Karube, I.; Wilson, G. S., eds., Oxford University Press: Oxford, 1987, chap. 2, p. 13.