

Estudo *in situ* da funcionalização de superfície de ouro para imobilização de proteína

Adriano dos Santos, Willian Campos Ribeiro, Paulo Roberto Bueno*

UNESP – Instituto de Química, Rua Prof. Francisco Degni n° 55, CEP 14800-900, Araraquara/SP.

*prbueno@iq.unesp.br

Resumo: A estratégia de formação de monocamada automontada (SAM) mista para a imobilização de material biológico é atualmente utilizada na construção de biossensores, tanto para fins analíticos como para estudos de afinidade entre proteínas. Este trabalho aborda o estudo da formação, em tempo real, de SAM mista contendo ácido-11-mercaptopundecanoico (MUA) e o 6-mercaptop-1-hexanol, na proporção de 1:3, sobre superfície de ouro utilizando as técnicas de QCM-D e voltametria cíclica. Por meio dos resultados, foi possível verificar que a SAM é um filme empacotado e rígido, apresentando elevado grau de cobertura superficial. Com exemplo de adsorção de proteína sobre a SAM, foi estudado, por QCM-D, o processo de adsorção utilizando gelatina. Os resultados evidenciam que esse processo ocorre em uma única etapa, culminando com a formação de uma monocamada de proteína.

Palavras-chave: SAM, QCM-D, adsorção de proteína.

***In situ* study of gold functionalization surface for protein immobilization**

Abstract: The SAM approach for biological material immobilization is currently used in biosensors devices, for analytical and protein affinity studies. This paper focuses on the study of real time SAM formation consisted of mixed SAM of 11-mercaptopundecanoic acid (MUA) and 6-mercaptop-1-hexanol, in a molar ratio of 1:3, on the gold surface, by QCM-D and cyclic voltammetry techniques. It was confirmed that

the SAM is a packed film, with a high degree of surface coverage. As an example of protein adsorption on the SAM, it was studied, by QCM-D technique, the adsorption process of gelatin. The results demonstrate that the adsorption and coverage processes occur in a single step, resulting in the formation of a protein monolayer. This is an interesting result since it partially assures the use of Langmuir isotherm model to study protein affinity and analytical responses.

Keywords: SAM, QCM-D, protein adsorption.

1. Introdução

No desenvolvimento de biossensores, a eficácia na etapa de imobilização do material biológico sobre o transdutor é de grande importância devido à sua estreita relação com a eficiência do dispositivo a ser construído. O uso de determinada metodologia também está relacionada com o objetivo do biossensor desenvolvido, seja para fins analíticos [1-2] como para estudos de afinidade [3-5], sendo que diversas metodologias podem ser encontradas na literatura [6]. Por exemplo, para o estudo de afinidade entre proteínas utilizando modelos de isothermas, em especial a de Langmuir, é importante que o material biológico seja imobilizado de tal forma a permitir que a interação entre ele e o analito não seja prejudicada devido à presença de interações receptor-ligante adjacentes a um receptor não ocupado [7]. Neste caso, para a imobilização do material biológico, geralmente é utilizada a abordagem de monocamadas automontadas [8-9] (SAM, do inglês *Self-Assembled Monolayer*) mistas, que consiste na formação de um filme fino a partir de uma solução contendo duas moléculas de tiol de tamanhos e grupos funcionais diferenciados. Um dos grupos, geralmente o carboxila (-COOH) presente no tiol de maior cadeia carbônica, é utilizado com a finalidade de servir de ligação entre o transdutor e a molécula biológica. O outro grupo, como o hidroxila (-OH) presente na molécula de tiol de menor cadeia carbônica, é empregado como espaçador entre as moléculas do outro tiol, com o intuito de fornecer dimensionamento ideal para o processo de interação receptor-ligante em que o modelo de isoterma possa ser prelevado. Neste tipo de abordagem, é utilizado diferentes proporções dos tióis na mistura, visto que a razão molar dos tióis na solução resulta em similar razão molar na SAM mista [7]. Neste caso, por exemplo, alguns estudos trazem o uso do ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) com o 2-mercaptoetanol [3, 10], bem

como o MUA e 6-mercaptop-1-hexanol [11-12], ambas as misturas com cada tiol em proporção diferente.

Embora a formação dessas monocamadas seja um importante passo na construção de biossensores, poucos trabalhos abordam a formação desses filmes em tempo real, ou seja, durante o processo de construção da monocamada [13]. Uma técnica conveniente que pode ser utilizada para estudar em tempo real a formação de SAM é a Microbalança a Cristal de Quartzo com Fator Dissipativo (QCM-D, do inglês *Quartz Crystal Microbalance*). Essa técnica é fundamentada na propriedade piezométrica do cristal de quartzo, ou seja, na propriedade intrínseca desse material oscilar numa determinada frequência quando um potencial alternado é aplicado sobre ele. Sauerbrey [14-15] foi o primeiro a desenvolver uma equação matemática que relaciona a variação de frequência de oscilação do cristal com um aumento de massa sobre ele (Equação 1):

$$\Delta f' = -\frac{f_0^2}{F_q \rho_q A_{el}} \Delta m \quad (1)$$

em que $\Delta f'$ é a variação da frequência devido ao recobrimento do eletrodo, f_0 a frequência fundamental do cristal, Δm a massa do material depositado, ρ_q a densidade do cristal, F_q é a constante de frequência ($F_q = f_0 d_q$, onde d_q é a espessura do cristal) e onde A_{el} é a área do eletrodo depositado sobre o cristal. Essa equação pode ser reescrita de forma simplificada (Equação 2):

$$\Delta f' = -n \frac{1}{C} \Delta m \quad (2)$$

sendo n o número do harmônico ($n = 1, 3, 5, 7, \dots$) e C o coeficiente de sensibilidade teórica da QCM ($17,7 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ para cristal de 5 MHz). O sinal negativo da equação evidencia que um aumento de massa sobre o cristal está relacionado a um decréscimo de sua frequência de oscilação.

No caso em que a massa aderida não for rígida, significa que seu movimento não está acoplado totalmente ao movimento oscilatório do cristal, causando perdas energéticas. Nesses casos, apenas os valores de frequência não são adequados para estimar a massa aderida sobre o substrato e se faz necessário conhecer os valores de dissipação energética (*fator D*), fornecendo informações a respeito da viscoelasticidade da camada formada. Esse parâmetro é definido como [15] (Equação 3):

$$D = \frac{E_{dissipada}}{2\pi E_{armazenada}} \quad (3)$$

sendo $E_{dissipada}$ a energia dissipada por ciclo de oscilação do cristal e $E_{armazenada}$ a energia total armazenada no sistema oscilatório.

Com o intuito de estudar a formação da monocamada *in situ* a partir de solução etanólica mista de tióis utilizada em processo de construção de biossensores, esse trabalho traz o uso da técnica de QCM-D na investigação da formação de monocamada a partir de solução mista de MUA e 6-mercaptop-1-hexanol. Será mostrado também, por meio da mesma técnica, o processo de adsorção de proteína (gelatina) sobre a superfície dessa monocamada. Além disso, o uso de medidas voltamétricas visa auxiliar a observação do processo de imobilização da SAM.

2. Procedimento Experimental

Os cristais de quartzo utilizados (QSX-301, especificações: corte AT, frequência fundamental de $4,95\text{MHz} \pm 50 \text{ KHz}$, 14 mm de diâmetro e 0,3 mm de espessura) são recobertos com fina camada de ouro policristalino em ambos os lados. A frequência de oscilação do cristal de quartzo de 5 MHz é sensível a pequenas variações de massa, na ordem de nanogramas por unidade de frequência ($17,7 \text{ ng Hz}^{-1}\text{cm}^{-2}$).

Os cristais foram limpos em solução piranha* (H_2SO_4 (concentrado): H_2O_2 ; 3 : 1, v/v, reagentes obtidos da Qhemis) previamente preparada, lavados exaustivamente com água Milli-Q (Millipore, Sistema Simplicity, $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C) e acetona e secos em nitrogênio. Os cristais foram utilizados imediatamente após limpeza.

Na montagem da célula (modelo QFM 401), os cristais de quartzo são dispostos de forma que uma de suas faces fica em contato com a solução de tiol sendo investigada (capacidade de volume sobre o cristal de quartzo $\approx 40 \mu\text{L}$). A célula permite controle de temperatura de $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Para a injeção das soluções de tiol e de gelatina foi utilizada uma bomba peristáltica Ismatec - modelo IPCN de quatro canais.

2.1 Estudo da formação da SAM mista de MUA e 6-mercaptop-1-hexanol.

* Cuidado. Solução de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ é extremamente corrosiva. Contato com matéria orgânica resulta em rápida oxidação.

Para a realização dos ensaios, o terceiro harmônico de oscilação do cristal de quartzo ($\Delta f_{n=3}$) e o respectivo parâmetro D ($\Delta D_{n=3}$) foram estabilizados injetando-se etanol em fluxo contínuo (100 $\mu\text{L}/\text{min.}$) por 10 minutos. Após a estabilização, uma solução etanólica contendo 2,5 mM de MUA 95% (Sigma-Aldrich) e 7,5 mM de 6-mercaptop-1-hexanol 97% (Sigma-Aldrich) foi injetada ao sistema e o fluxo desligado. Após 12h de formação da monocamada, fluxo de etanol foi novamente utilizado para lavar a superfície da monocamada e retirar as moléculas de tiol não adsorvidas quimicamente na superfície do ouro. As medidas foram realizadas em triplicata.

A imobilização da monocamada de tiol também foi acompanhada por medidas de voltametria cíclica com o intuito de verificar o bloqueio do eletrodo frente a processos eletroquímicos utilizando 1mM do par redox ferri/ferro ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ~ 99% (Sigma-Aldrich), $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \geq 99\%$ (Sigma-Aldrich)) em uma solução tampão fosfato salino 0,1M e $\text{pH}=7,0$ ($\text{NaCl} \geq 99,5\%$ (Sigma), KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} \geq 99,0\%$ (Sigma-Aldrich)) antes e após a formação da monomacada. Para esta análise, um potenciostato/galvanostato da Autolab (AUTOLAB PGSTAT 30) utilizando um sistema de três eletrodos em uma célula eletroquímica desenvolvida pela empresa Q-sense (modelo QEM 401). O cristal de quartzo modificado com a monocamada de tiol foi usado como eletrodo de trabalho, o contra-eletrodo era uma placa de platina com área geométrica ligeiramente superior a área do eletrodo de ouro depositado no cristal de quartzo e o eletrodo de referência utilizado foi um eletrodo comercial (World Precision Instruments, Dri-Ref 2SH) de Ag/AgCl sólido. A janela de potencial estudada foi de $-0,1\text{V}$ até $0,5\text{V}$, com potencial inicial de $0,22\text{V}$ e velocidade de varredura de $100\text{mV}/\text{s}$.

2.2 Estudo da adsorção de gelatina sobre superfície de ouro funcionalizada com SAM.

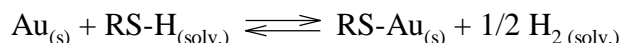
Após a formação da monocamada, os cristais foram expostos por duas horas a uma solução aquosa contendo 10 mM de N-etil-N-(dimetilaminopropil)carboiimida, EDC $\geq 99\%$ (Fluka), e 20 mM de N-hidroxissuccinimida 98%, NHS (Sigma-Aldrich), objetivando transformar os grupos carboxilas do MUA em ésteres NHS. Essa etapa é conhecida como ativação.

Após a ativação, os cristais foram lavados com água, secos em nitrogênio e recolocados na célula de fluxo da Q-SENSE. Para a realização das medidas, esperou-se que o terceiro harmônico de oscilação de cada cristal de quartzo ($\Delta f_{n=3}$) e o respectivo parâmetro D ($\Delta D_{n=3}$) fossem estabilizados injetando-se solução tampão Tris-HCl pH 8,0 (Sigma-Aldrich) contendo 20 mM de NaCl (Sigma) em fluxo contínuo (100 μ L/min.) por 10 minutos. Após a estabilização, uma solução de gelatina Synth (0,1 mg/mL) em solução tampão Tris-HCl pH 8,0 foi injetado ao sistema e o fluxo desligado. Depois de duas horas e trinta minutos de processo de adsorção o fluxo de solução tampão foi novamente utilizado para lavar a superfície de cada cristal objetivando retirar as moléculas de gelatina não adsorvidas quimicamente na superfície da monocamada. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3. Resultados e Discussão

3.1 Formação da SAM.

Tióis ligam-se no ouro devido à afinidade do enxofre por esse metal. A reação química que explica a formação de ligação entre o enxofre e o ouro é descrita por meio da formação de tiolato (Au-SR), um processo em equilíbrio químico com desprotonação da molécula de tiol seguida da eliminação de molécula H_2 da superfície do metal [16]:



Sabe-se que o processo de formação desses filmes ocorre basicamente em duas etapas: a primeira, rápida, em que a molécula de tiol se liga na superfície metálica, e a segunda, que dura horas, que corresponde ao processo organizacional da monocamada [9, 17].

Na Figura 1, é mostrado o processo de adsorção da monocamada a partir de solução mista de MUA e 6-mercaptop-1-hexanol.

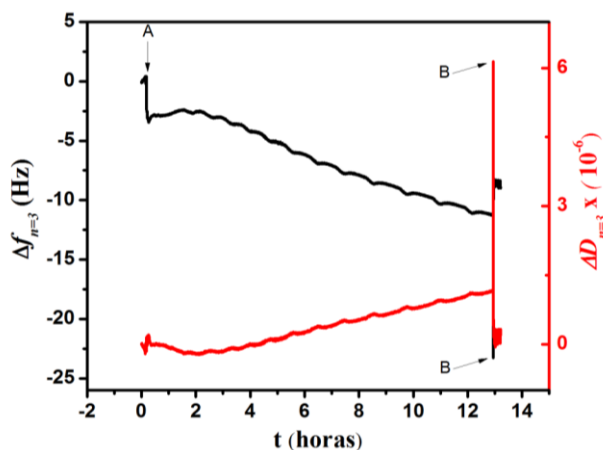


Figura 1. Processo de formação da SAM obtida pela solução etanólica contendo 2,5mM de MUA e 7,5mM de 6-mercaptop-1-hexanol. A seta em A indica o início do processo de injeção da amostra, enquanto em B indica o início da lavagem do cristal com etanol.

A seta em A indica o início da injeção de solução de tiol sobre a superfície de ouro do cristal de quartzo. A partir desse ponto, ocorre uma rápida queda de Δf , seguindo de decaimento lento, até em B, momento em que é ligado o fluxo de etanol para a lavagem do cristal. Após a lavagem, Δf aumenta até valor final de $\Delta f_{\text{final}} = 9,5 \pm 3,8$ Hz. O valor final do parâmetro D para a formação da monocamada é $\Delta D_{\text{final}} = (3 \pm 1) \times 10^{-7}$.

Importante notar que o comportamento da curva $\Delta f(t)$ ao longo do processo reflete estágios cinéticos diferenciados. No momento em que é iniciado o fluxo de solução da mistura dos tióis, ocorre uma rápida queda, evidenciando rápido processo de adsorção dessas moléculas no ouro. A queda acentuada é seguida de uma mais suave que evidencia processo adsorptivo lento. Esse fato sugere que, inicialmente, as moléculas de tiol se ligam desorganizadamente sobre a superfície de ouro e que, com o tempo, devido às interações intermoleculares entre as espécies adsorvidas adjacentes, ocorre o processo de organização da monocamada. Esse processo envolve a desocupação de espaços que, devido a ligação das moléculas de tiol de forma desorganizada sobre o ouro, estavam indisponíveis para adsorção. Nestes novos espaços livres, moléculas de tiol podem se adsorver, ocasionando decréscimo nos valores de Δf no tempo, como pode ser observado na Figura 1.

É conhecido que SAMs obtidas a partir de tióis de cadeia longa são relativamente compactas e rígidas [18]. Uma forma de verificar essa evidência é por meio do parâmetro D : baixos valores de dissipação são característicos de camadas rígidas. Quanto menor a relação $-\Delta D/\Delta f$ para a formação do filme, mais rígida é a camada formada. Campiña *et. al.* [18], por exemplo, ao estudarem a adsorção de 11-amino-1-undecanotiol sobre superfície de ouro encontrou valores normalizados de ΔD em $2,5 \times 10^{-6}$ e $\Delta f = -22$ Hz para a formação dessa monocamada rígida. A relação $-\Delta D/\Delta f$ pode ser obtida, encontrando valor de $1,1 \times 10^{-7} \text{Hz}^{-1}$, ou seja, quocientes entre ΔD_{final} e Δf_{final} com valores até $1,1 \times 10^{-7} \text{Hz}^{-1}$ podem ser considerados como evidência de formação de filmes rígidos. Neste trabalho, o valor encontrado para essa relação para a formação da monocamada mista é $(3 \pm 2) \times 10^{-8} \text{Hz}^{-1}$, ou seja, muito abaixo daquele encontrado por Campiña para filmes rígidos. Dessa forma, é possível afirmar que a monocamada formada é rígida, e portanto, a relação de Sauerbrey pode ser utilizada para estimar a massa superficial do filme formado. Utilizando a Equação 2, encontra-se o valor médio de $168 \pm 68 \text{ng cm}^{-2}$. Por meio desse valor e levando em consideração a relação estequiométrica da solução de mistura de tiol utilizada, 1:3 (MUA:6-mercaptop-1-hexanol), é possível estimar a cobertura superficial, Γ (mol cm^{-2}), da monocamada formada, igual a $(1,1 \pm 0,4) \times 10^{-9} \text{mol cm}^{-2}$. O valor encontrado é consistente com aqueles que representam alto grau de cobertura de monocamada formada a partir de tióis de grande cadeia carbônica sobre superfície de ouro, de $0,76 \times 10^{-9} \text{mol cm}^{-2}$ [19]. Cancino [20] ao estudar a formação de monocamada mista de MUA e 6-mercaptop-1-hexanol sobre superfície de ouro utilizando diferentes proporções estequiométricas desses tióis, encontrou valores de cobertura superficial em torno de $\approx 1,1 \times 10^{-9} \text{mol cm}^{-2}$, evidenciando que a SAM obtida pela mistura dos dois tióis na proporção aqui descrita possui alto grau de cobertura superficial.

Em biossensores, as medidas de voltametria cíclica auxiliam na verificação da imobilização de biomoléculas na superfície do eletrodo pela observação da variação do perfil voltamétrico [20]. Em um eletrodo limpo e sem biomoléculas imobilizadas em sua superfície, um par redox fornece um voltamograma com picos de oxidação e redução. A curva *Au* na Figura 2 apresenta esta situação para o processo redox do par ferri/ferro em ouro. Com a imobilização de uma biomolécula, há o impedimento físico do eletrodo e, desta maneira, as espécies eletroativas tem dificuldade em reduzir ou

oxidar. Como consequência, os picos de oxidação/redução se distanciam um do outro e o sinal de corrente diminui, evidenciando que o sistema está se tornando cada vez mais irreversível. A curva *SAM* da Figura 2 exemplifica esta descrição e mostra que o uso da mistura de 6-mercaptop-1-hexanol com MUA bloqueia totalmente o processo redox do par ferri/ferro e, portanto, evidencia um elevado grau de recobrimento da superfície de ouro, corroborando os valores encontrados por meio da técnica de QCM.

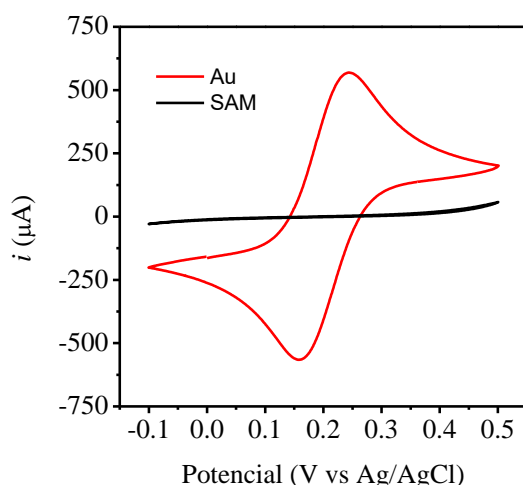


Figura 2. Observação do processo de imobilização da mistura de tióis sobre o eletrodo de ouro no cristal de quartzo por voltametria cíclica antes da imobilização (curva *Au*) e após a imobilização (curva *SAM*). A inexistência de picos na curva do sistema com a SAM evidencia a imobilização dos tióis na superfície de ouro do cristal de quartzo.

3.2 Adsorção de gelatina sobre a superfície de ouro funcionalizada com SAM.

Como exemplo de adsorção de proteína sobre a superfície de ouro funcionalizada com SAM mista, foi utilizada uma solução de gelatina 0,1 mg/mL em tampão Tris-HCl (pH 8,0) contendo 20 mM de NaCl. Gelatina é uma proteína comumente empregada para bloqueio em estudos de afinidade entre proteínas, como entre lectina-glicoproteína [3].

Na Figura 3 é mostrado o monitoramento de $\Delta f_{n=3}$ e $\Delta D_{n=3}$ em função do tempo para a adsorção da gelatina, durante um período de duas horas e trinta minutos.

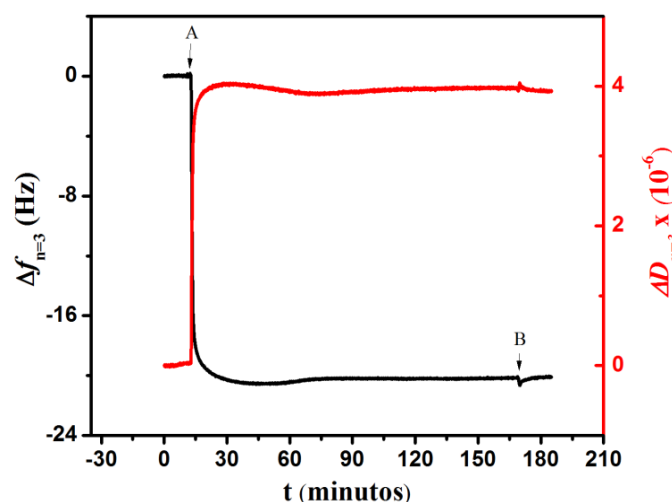


Figura 3. Processo de adsorção de gelatina 0,1mg/mL em solução tampão Tris-HCl (pH 8,0) sobre superfície de ouro funcionalizada com a SAM. A seta em A indica o início do processo de injeção da amostra, enquanto em B o início da lavagem do cristal com solução tampão.

A seta em A mostra o início da injeção de solução de gelatina. Antes desse ponto corresponde ao intervalo de tempo destinado à estabilização de Δf e ΔD . Após iniciar a injeção de solução de gelatina, foi possível observar rápido decaimento de Δf . Conforme a relação de Sauerbrey (Equação 1), como um decréscimo de Δf corresponde ao aumento de massa sobre o cristal de quartzo, é possível afirmar que a variação positiva de massa corresponde ao processo de adsorção da gelatina. Após o decaimento rápido, Δf alcança um mínimo em -20 Hz durante todo o período destinado ao processo de adsorção. Após iniciar o processo de lavagem, indicado pela seta em B, Δf praticamente não se altera e permanece constante até o final do processo. O valor encontrado em triplicata para o processo é $\Delta f_{\text{final}} = 24,3 \pm 3,8$ Hz.

Diferentemente da formação da monocamada, a curva $\Delta f(t)$ possui um rápido decréscimo quando o a injeção de gelatina é iniciada e permanece praticamente inalterada ao longo de todo o processo de adsorção, evidenciando que a adsorção de gelatina é um processo rápido.

Os valores de dissipação energético em função do tempo, $\Delta D(t)$, possuem uma cinética parecida, mas não idêntica ao comportamento da curva de $\Delta f(t)$. Ao injetar a solução de gelatina, ΔD aumenta até valores próximos de 4×10^{-6} , permanecendo praticamente inalterável até mesmo após a etapa de lavagem. O valor encontrado em triplicada é $\Delta D_{\text{final}} = (3,6 \pm 0,2) \times 10^{-6}$.

A relação encontrada de $-\Delta D/\Delta f$, neste caso, de $(1,5 \pm 0,3) \times 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$ é um valor maior daquele encontrado por Campiña para formação de filme rígido, e representa um filme com propriedade viscoelástica, ou seja, não é um filme rígido.

Outra análise que pode ser realizada por meio da técnica de QCM-D, em especial em processos de adsorção de proteínas, é por meio da elaboração de gráfico de $\Delta D \times \Delta f$, conhecido com *D-f plot*. Neste tipo de gráfico, mostrado na Figura 4, o parâmetro tempo está implícito, e é possível observar, pontualmente, quanto de dissipação energética é perdido por unidade de variação de frequência (massa). Por meio desse gráfico, é possível verificar diferentes etapas no processo de adsorção e evidenciar a formação de uma ou múltiplas camadas de proteína sobre o substrato [21-23].

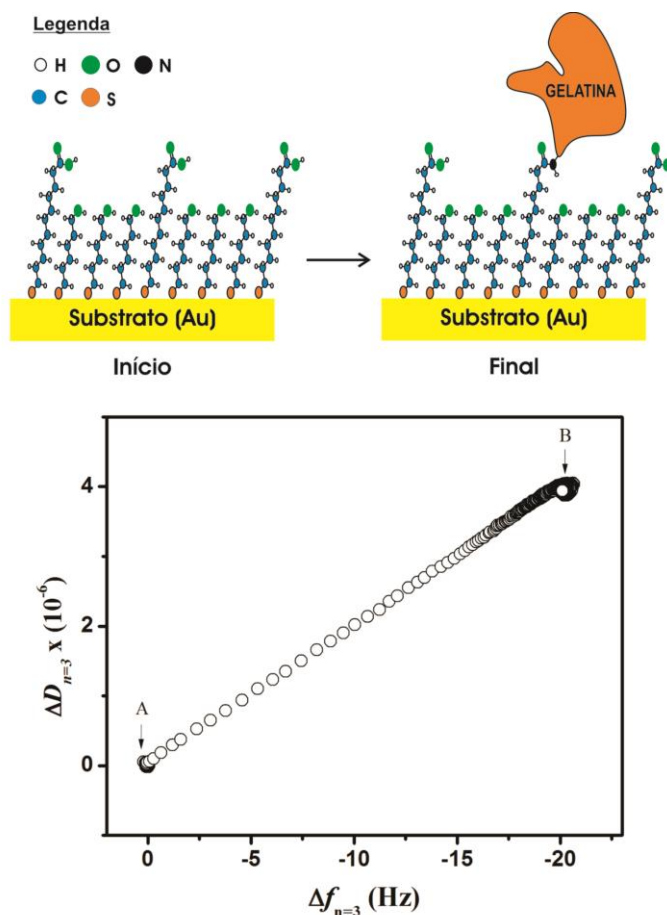


Figura 4. Curva D-f para o processo de adsorção de gelatina sobre a superfície da SAM mista. A seta em A mostra o início da injeção da amostra de gelatina (0,1mg/mL), enquanto a B, o início da injeção de solução tampão Tris-HCl (pH 8,0) para a lavagem do cristal. Perceba que a relação $\Delta D/\Delta f$ é praticamente linear em todo o processo de

adsorção. O esquema mostrado acima exemplifica a ligação da gelatina na superfície da SAM.

É possível observar na curva $D-f$ mostrada na Figura 4 comportamento linear na relação $\Delta D/\Delta f$ durante todo o processo de adsorção da gelatina sobre a SAM mista. Este comportamento é indício de que a proteína se adsorve em uma única etapa que pode ser atribuída a formação de uma simples camada. Um desvio da linearidade pode ser indicativo de várias etapas no processo de adsorção com alteração na propriedade viscoelástica do filme, conforme descrito nos trabalhos de Höök [21-23].

4. Conclusão

A formação da SAM pode ser descrita por um processo com duas etapas de cinética diferenciada. A primeira em que as moléculas de tiol se adsorvem rapidamente na superfície metálica, acompanhada pela segunda em que ocorre o processo organizacional, permitindo novas moléculas de adsorverem. Tanto os resultados obtidos pela técnica de QCM como pelos perfis voltamétricos antes e depois da imobilização dos tióis evidenciaram alto recobrimento da superfície de ouro e, como consequência, poucos defeitos na monocamada formada.

Como exemplo de adsorção de proteína sobre a SAM foi estudado a adsorção de gelatina. Por meio da técnica de QCM-D, foi possível verificar que o processo de adsorção ocorre em uma única etapa, resultado na formação de uma monocamada com propriedade viscoelástica, ou seja, não rígida quando comparada com a SAM.

5. Agradecimentos

Os autores agradem à CAPES, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro.

6. Referências

- [1] T.-Y. Lin, C.-H. Hu, T.-C. Chou, Biosens. Bioelectron. 20(1) (2004) 75.
- [2] R. S. Lima, G. S. Nunes, T. Nogueira, J.-L. Marty, Quim. Nova 30(1) (2007) 9.
- [3] N. C. Pesquero, M.M.Pedroso, A.M.Watanabe, M.H.S.Goldman, R.C.Faria, M. C. Roque-Barreira, P.R.Bueno, Biosens. Bioelectron. 26(1) (2010) 36.
- [4] C. Ayela, F. Roquet, L. Valera, C. Granier, L. Nicu, M. Pugnère, Biosens. Bioelectron. 22(12) (2007) 3113.
- [5] K. Lebed, A. J. Kulik, L. Forró, M. Lekka, J. Colloid Interface Sci. 299(1) (2006) 41.

- [6] O. Fatibello-Filho, M. D. Capelato, *Quim. Nova* 15(1) (1992) 28.
- [7] T. Wink, S. J. V. Zuilen, A. Bult, W. P. V. Bennekom, *Analyst* 122(4) (1997) 43R.
- [8] S. Ferretti, S. Paynter, D. A. Russell, K. E. Sapsford, D. J. Richardson, *Trends Anal. Chem.* 19(9) (2000) 530.
- [9] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* 105(4) (2005) 1103.
- [10] P. R. Bueno, A. M. Watanabe, R. C. Faria, M. L. Santos, C. S. Riccardi, *J. Phys. Chem. B* 114(49) (2010) 16605.
- [11] E. Briand, M. Salmain, C. Compère, C.-M. Pradier, *Colloids Surf., B* 53(2006) 215.
- [12] R. Hao, D. Wang, X. E. Zhang, G. Zuo, H. Wei, R. Yang, Z. Zhang, Z. Cheng, Y. Guo, Z. Cui, Y. Zhou, *Biosens. Bioelectron.* 24(5) (2009) 1330.
- [13] K. B. Rodenhausen, B. A. Duensing, T. Kasputis, A. K. Pannier, T. Hofmann, M. Schubert, T. E. Tiwald, M. Solinsky, M. Wagner, *Thin Solid Films* 519(2011) 2817.
- [14] G. Z. Sauerbrey, *Z. Phys.* 115(2) (1959) 206.
- [15] M. A. Cooper, V. T. Singleton, *J. Mol. Recognit.* 20(2007) 154.
- [16] D. S. Karpovich, G. J. Blanchard, *Langmuir* 10(9) (1994) 3315.
- [17] A. Ulman, *Chem. Rev.* 96(4) (1996) 1553.
- [18] J. M. Campiña, H. K. S. Souza, J. Borges, A. Martinsa, M. P. Gonçalves, F. Silva, *Electrochim. Acta* 55(2010) 8779.
- [19] C. A. Widrig, C. Chung, M. D. Porter, *J. Electroanal. Chem.* 310(1-2) (1991) 335.
- [20] J. C. Cancino, *Dissertação de mestrado (Mestre em Ciências - Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, São Carlos (2008) 125 f*
- [21] F. Höök, M. Rodahl, B. Kasemo, P. Brzezinski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(1998) 12271.
- [22] F. Höök, M. Rodahl, P. Brzezinski, B. Kasemo, *Langmuir* 14(1998) 729.
- [23] M. Rodahl, F. Höök, C. Fredriksson, C. A. Keller, A. Krozer, P. Brzezinski, M. Voinova, B. Kasemo, *Faraday Discuss.* 107(1997) 229.