

Mauro A. La-Scalea, Sílvia H. P. Serrano*, Ivano G. R. Gutz

Instituto de Química - USP - Av. Prof. Lineu Prestes, 748 - CP 26.077 - 05599-970 - São Paulo - SP

Recebido em 22/5/98; aceito em 2/9/98

DNA-MODIFIED ELECTRODES: A NEW ALTERNATIVE FOR ELECTROANALYSIS. The first studies about DNA electrochemistry appeared at the end of the fifties. The voltammetric techniques became important tool for the DNA conformational analysis, producing evidences about DNA double helix polymorphism. The new techniques based on electrodes modification with nucleic acid enlarged the use of the electrochemical methods on the DNA research. DNA electrochemical biosensors are able to detect specific sequences of DNA bases, becoming important alternative for the diagnosis of disease, as well as in the carcinogenic species determination. Besides, the use of DNA biosensors in the mechanism study of biological drug actions can be useful for drug design.

Keywords: DNA electrochemistry; DNA modified electrodes; DNA biosensors.

INTRODUÇÃO

O comportamento eletroquímico do DNA e os efeitos de sua adsorção sobre diversos tipos de eletrodos vêm sendo pesquisados há quase 40 anos¹⁻⁵. A maioria destes estudos está centralizada na análise e identificação estrutural de ácidos nucleicos e a relação entre o comportamento polarográfico do DNA e sua conformação em solução⁶, mostrando as diferenças de resposta eletroquímica existentes entre DNA nativo (*double-strand*, dsDNA), desnaturado (*single-strand*, ssDNA) e degradado^{7,8}, utilizando-se principalmente eletrodos de mercúrio.

O uso de eletrodos sólidos estendeu de forma significativa o campo de aplicação dos métodos eletroquímicos para análise de ácidos nucleicos. Diversas são as possibilidades de emprego dos eletrodos modificados com DNA, como a determinação de espécies carcinogênicas e de fármacos, entretanto biossensores de DNA têm sido desenvolvidos para a análise e determinação de seqüências de bases do DNA com intuito de diagnóstico de doenças.

Este artigo apresenta uma visão geral da evolução do estudo e determinação eletroquímica de ácidos nucleicos utilizando-se eletrodos de mercúrio, além dos recentes avanços no desenvolvimento de eletrodos modificados com DNA aplicados à análise e estudo do mecanismo de ação biológica de fármacos, determinação de espécies de interesse ambiental e na identificação e seqüenciamento genético.

COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO DNA

Os fenômenos de adsorção de ácidos nucleicos naturais e biossintéticos foram estudados, predominantemente, por polarografia a.c.^{9,10}. Em soluções neutras, levemente alcalinas e moderada força iônica, ambos DNAs, nativo e desnaturado, podem ser adsorvidos na faixa de potencial entre 0 e -1,0 V, utilizando-se eletrodo de mercúrio. Nesta faixa de potencial todos os constituintes do DNA – resíduos de base, desoxirribose e grupo fosfato – podem ser envolvidos no processo de adsorção^{2,8,9}. A Figura 1a⁸ apresenta os diversos sinais tensamétricos possíveis de serem obtidos, pelos constituintes dos ácidos nucleicos, envolvendo o processo de adsorção/dessorção.

O pico 1, próximo de -1,2 V, produzido tanto pelo DNA nativo quanto pelo desnaturado indica a dessorção ou reorientação

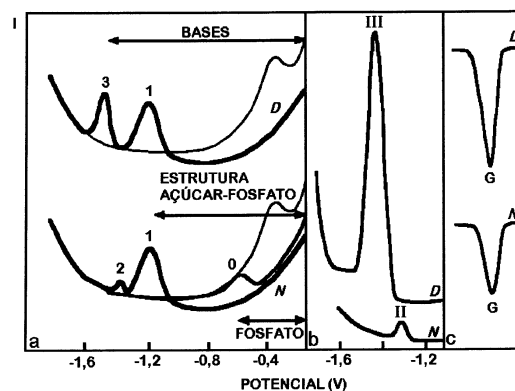


Figura 1. Representação esquemática das respostas polarográficas e voltamétricas de DNA nativo (N) e desnaturado (D). a - Polarogramas a.c. mostrando o comportamento de adsorção/dessorção de DNA nativo e desnaturado (resultados obtidos com eletrodo de mercúrio em solução levemente alcalina, o que evita a ocorrência de processo de redução envolvendo protonação das bases). b - Picos II e III, obtidos por polarografia de pulso diferencial, para DNA nativo e desnaturado, respectivamente. c - Pico anódico de guanina, G (~-0,3V para ambos DNA nativo e desnaturado) obtido por voltametria cíclica. Eletrodo de referência: calomelano saturado. [Ref. 8]

segmentada de regiões helicoidais adsorvida por meio do esqueleto açúcar-fosfato. Em determinadas condições o dsDNA produz o pico 2 devido à abertura das regiões da dupla-fita. O pico 3, produzido apenas pelo ssDNA, corresponde ao processo de dessorção de segmentos adsorvidos, preferencialmente, através das bases⁸.

Em determinadas condições, como baixa força iônica, o dsDNA apresenta o pico designado como 0. Este pico foi atribuído à adsorção eletrostática de ácidos nucleicos a potenciais negativos e dessorção/reorientação da molécula de DNA próxima ao potencial de carga zero⁸. O contato prolongado do DNA nativo com a superfície de eletrodos pode provocar desnaturação da molécula motivada pela força de repulsão entre a superfície do eletrodo e os grupos fosfato negativamente carregados¹¹⁻¹³. Quanto mais negativo o valor de potencial, mais facilmente ocorrerá a abertura da dupla hélice⁸.

A redução eletroquímica de ácidos nucleicos naturais e sintéticos, em eletrodo gotejante de mercúrio, demonstra que os resíduos de adenina e citosina^{4,5,8,14,15} e guanina^{8,16}, na cadeia

* e-mail: shps@iq.usp.br

do polinucleotídeo (Figura 2), são os pontos passíveis de redução a altos valores negativos de potencial, na qual a estrutura do DNA assume papel importante. A desoxirribose e os grupos fosfato não são reduzidos polarograficamente^{8,17}.

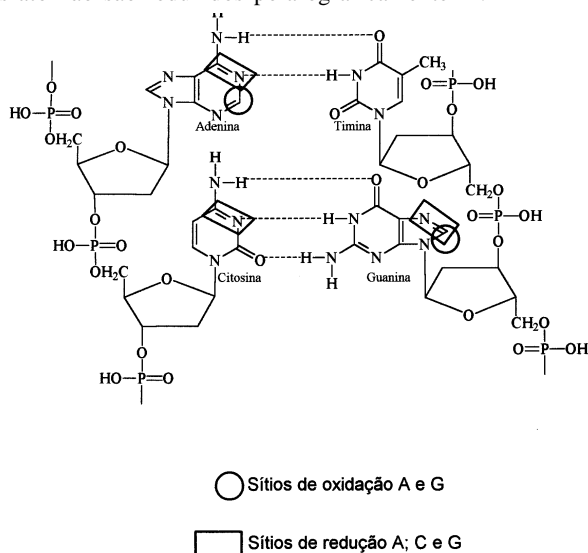
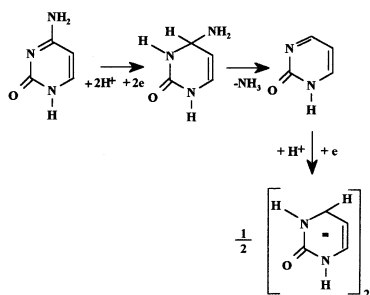


Figura 2. Pareamento Watson-Crick de bases e os respectivos sítios de oxidação e redução do DNA. [Ref. 8]

Os resíduos de adenina e citosina em ácidos nucleicos desnaturados são facilmente reduzidos em eletrodos de mercúrio (Figura 1b), apresentando maior valor de corrente e pico de redução cerca de 70 mV mais negativo do que o apresentado pelo DNA nativo⁸. Os sítios de redução, que fazem parte das ligações de hidrogênio, têm como condição primária a protonação de ambas as bases – em N-1 para adenina e N-3 para citosina – seguida da transferência de carga¹⁷. Os mecanismos de redução para citosina e adenina são apresentados na Figura 3.

Citosina



Adenina

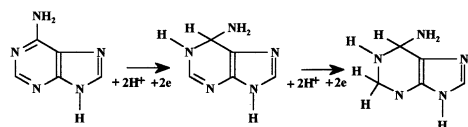


Figura 3. Mecanismos de redução para citosina e adenina. [Refs. 17,26]

Os picos anódicos – obtidos por voltametria cíclica para DNA nativo e desnaturado e apresentados na Figura 1c – correspondem à oxidação dos produtos de redução dos resíduos de guanina (potencial de pico $\sim -0,3$ V)¹⁶ após polarização do eletrodo de mercúrio a potenciais negativos (-1,8 V). Esses

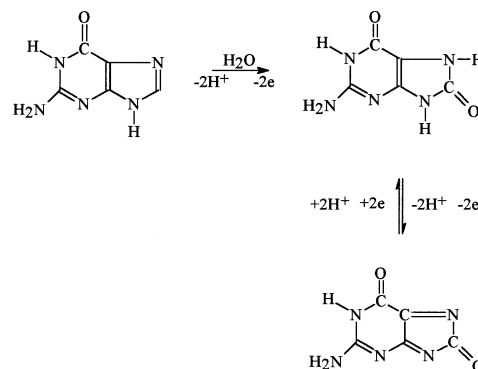
picos apresentaram pequena diferença de corrente, pois o sítio de redução primária da guanina não faz parte das ligações de hidrogênio do pareamento Watson-Crick (Figura 2) e desta forma menos suscetível às diferenças estruturais do DNA^{2,8}.

A oxidação eletroquímica de ácidos nucleicos naturais e sintéticos também tem sido amplamente estudada em eletrodos de grafite pirolítico¹⁸, grafite espectroscópico impregnado com parafina¹⁹ e carbono vítreo²⁰. A eletrooxidação do DNA, em meio ácido, relaciona-se à oxidação dos resíduos das bases purínicas, sendo as bases pirimidínicas eletroativas nessas condições. Recentemente, Brett e Matsysik²¹ registraram a possibilidade de oxidação de citosina e timina, por voltametria de pulso diferencial assistida por ultrassom. Na ausência de ultrassom a oxidação ocorreu apenas em meio básico (pH > 10).

Em pH 6,4, com eletrodo de grafite pirolítico e por voltametria de pulso diferencial, ácidos nucleicos naturais produzem dois picos bem definidos correspondentes à eletrooxidação dos resíduos de guanina (+0,88 V) e adenina (+1,15 V)¹⁹. Resultados mostraram que os potenciais de oxidação são deslocados linearmente no sentido negativo de potencial com aumento de pH^{18,22}. Estes picos têm sido utilizados para determinar o teor de adenina-timina (A-T) e guanina-citosina (G-C) na dupla hélice, durante suas variações conformacionais²³⁻²⁵.

A oxidação de guanina e adenina citada acima compreende duas etapas, ocorrendo a perda de quatro elétrons e quatro prótons^{2,26}; para ambos os casos a primeira etapa é determinante para a velocidade da reação. Dryhurst²⁷⁻²⁹ registrou extenso trabalho sobre o comportamento eletroquímico das bases purínicas utilizando eletrodos de carbono. A Figura 4 apresenta os mecanismos de oxidação para guanina e adenina.

Guanina



Adenina

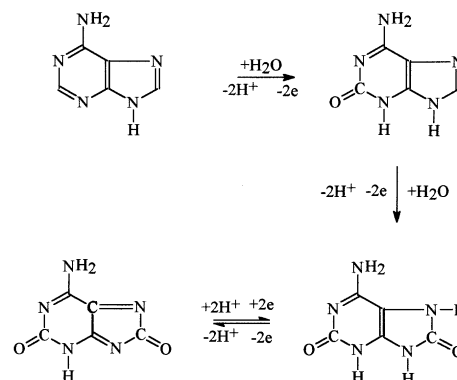


Figura 4. Mecanismos de oxidação para guanina e adenina. [Refs. 23,26]

O dsDNA sempre apresenta menores correntes de eletrooxidação quando comparado ao ssDNA^{18,20,23} desnaturado termicamente. A desnaturação envolve a ruptura das ligações de hidrogênio e desestabilização da estrutura de dupla hélice, que

pode ser acompanhada pela completa separação das duas fitas do DNA sob determinadas condições: valores extremos de pH, temperatura elevada, na presença de solventes apróticos. O rompimento de ligações covalentes não está envolvido na desnaturação do DNA⁸.

A diferença de correntes de oxidação entre DNA nativo e desnaturado não decorre apenas do fato de os sítios de oxidação do dsDNA estarem protegidos por participarem das ligações de hidrogênio da dupla hélice, mas também por sua menor flexibilidade e maior dificuldade de adsorção na superfície de eletrodos. Comparativamente, ssDNA apresentou melhor adsorção em eletrodos de grafite²³, facilitando a transferência de carga entre as bases oxidáveis e o eletrodo (Figura 5a, b). Por outro lado, também se pode observar aumento na altura de pico de oxidação das bases purínicas com a diminuição do peso molecular dos ácidos nucleicos^{20,23} (Figura 5c). Nos dois últimos casos existe maior proximidade entre os segmentos eletroxidáveis e a superfície do eletrodo de carbono.

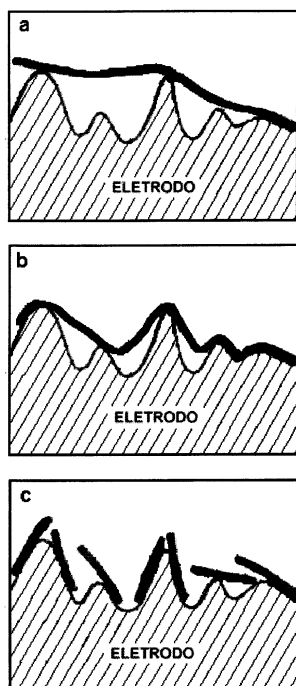


Figura 5. Representação esquemática da adsorção de DNA na superfície de carbono. (a) e (b) moléculas longas (DNA nativo e desnaturado, resp.); (c) moléculas pequenas (DNA degradado). [Adaptado das refs. 20 e 23]

Baseado no comportamento dos ácidos nucleicos utilizando eletrodos de carbono, Brabec²⁰ atribuiu a diferentes graus de degradação da amostra de DNA, os altos valores de corrente de oxidação, apresentadas por Yao *et al.*³⁰, utilizando eletrodo de carbono vítreo.

Brett e colaboradores²² apresentaram resultados, em pH 4,5, sobre a eletroxidação de DNA desnaturado em meio ácido, onde dois picos correspondentes à oxidação de guanina (+0,87 V) e adenina (+1,12 V) foram identificados por voltametria de pulso diferencial utilizando-se eletrodo de carbono vítreo.

Constatou-se por este trabalho que a eletroxidação dos resíduos de guanina e adenina não foi totalmente irreversível, e que as correntes observadas foram maiores do que as obtidas por outros pesquisadores^{18,20,23}. Esta diferença poderia ser explicada pela existência de pequenos fragmentos de DNA devido ao processo de desnaturação utilizado. Contudo, estes resultados, associados ao fato da necessidade de etapas de pré-adsorção, indicaram que os altos valores de correntes obtidas

eram consequência da modificação superficial do carbono vítreo por multicamadas de DNA adsorvido^{22,31}.

Determinação eletroquímica de DNA

A versatilidade das técnicas eletroquímicas propiciaram não apenas a análise estrutural dos ácidos nucleicos, como também sua determinação em baixos níveis de concentração. Com efeito, bases purínicas^{3,32-34} e pirimidínicas^{17,33}, além de oligonucleotídeos³⁵, foram determinadas por voltametria.

O clássico trabalho de Dryhurst²⁸ para determinação de guanina na presença de guanosina, merece destaque. Outro importante exemplo, foi a determinação de RNA na presença de DNA por voltametria de pulso diferencial registrada por Palecek e Fojta³⁶, atingindo limite de detecção de 100 pg de RNA.

A voltametria de redissolução associada à etapa de pré-concentração por adsorção constitui o mais eficiente método na detecção de baixas quantidades de ácidos nucleicos^{3,37} e de variações conformacionais^{35,38} do mesmo. Além disso, o estudo da interação destas macromoléculas com superfícies carregadas simula de forma apropriada o que pode ocorrer em nível biológico^{2,8}.

De forma análoga à voltametria de pré-concentração por adsorção, Palecek^{8,39,40} desenvolveu método analítico para a determinação de ácidos nucleicos. Inicialmente o eletrodo de gota de mercúrio foi imerso em solução de DNA⁴⁰ (10 µL de solução contendo subnanogramas de DNA), em seguida o eletrodo foi lavado em solução de eletrólito e transferido para a célula polarográfica, onde efetuaram-se as medidas. Limites de detecção na ordem de 0,1 µg/mL foram obtidos.

Recentemente o *stripping* potenciométrico vem sendo aplicado na determinação de ácidos nucleicos, utilizando-se tanto eletrodos de mercúrio^{41,42}, quanto eletrodos de pasta de carbono^{43,46}, com limites de detecção de 20 ng/mL para ssDNA⁴¹.

INTERAÇÃO DE ESPÉCIES ELETROATIVAS COM DNA

Perante o descrito, tornam-se evidentes as vantagens das técnicas eletroanalíticas na análise e identificação de ácidos nucleicos. A voltametria é praticamente insubstituível na análise qualitativa e quantitativa de muitos compostos orgânicos e na pesquisa de composição e estrutura de íons e moléculas eletroquimicamente ativos em níveis de concentração muito baixos. Com efeito, a literatura apresenta diversos exemplos⁴⁷⁻⁵⁰ do uso das técnicas voltamétricas no estudo da interação de espécies eletroativas com as moléculas de DNA, RNA e suas unidades.

Métodos eletroquímicos modernos vêm sendo utilizados na avaliação quantitativa da interação de íons metálicos e ácidos nucleicos^{47,49}. Tetróxido de ósmio, na presença de piridina, liga-se covalentemente às posições 5-6 de resíduos pirimidínicos dos fragmentos de ssDNA e essas alterações podem ser detectadas mediante uso das técnicas polarográficas⁴⁹. Complexos de platina – como a cisplatina –, Cu(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Pb(II), Eu(II), Mn(II), Co(II), Mg(II) provocam perturbações na estrutura da dupla hélice e alteram o comportamento de ácidos nucleicos desnaturados. Alguns desses íons são conhecidos por sua carcinogenicidade, pois provocam lesões na molécula de DNA alterando a fidelidade na síntese de ácidos nucleicos^{49,51}.

Bard *et al.*⁵²⁻⁵⁴ estudaram a intercalação dos complexos: Co(phen)₃^{3+/2+}, Fe(phen)₃^{2+/3+}, Co(bpy)₃^{3+/2+}, Fe(bpy)₃^{2+/3+} e Os(bpy)₃^{2+/3+} (bpy = 2,2'-bipiridila; phen = 1,10-fenantrolina) com DNA nativo. A reação entre os compostos de coordenação com DNA foi descrita como interação eletrostática entre o metal complexado e o esqueleto de açúcar-fosfato, além da interação hidrofóbica (intercalação) do íon central do complexo e a parte interna do DNA dupla hélice. Metaloporfirinas também interagem com DNA, porém a intercalação depende do íon metálico (Cu, Ni, Zn ou Cd) e do ligante porfirínico^{55,56}.

A estereosseletividade de interação entre complexos de Ru(phen)₃²⁺ e DNA foi estudada voltametricamente⁵⁷. Resultados indicaram que o enantiômero Δ- interage significativamente com DNA, enquanto a mistura racêmica apresentou comportamento intermediário entre as formas Δ- e Λ-. Por outro lado, o complexo Ru(bpy)₃³⁺ catalisa a oxidação do DNA através dos resíduos de guanina⁵⁸: estudos por voltametria cíclica indicaram que pequenas diferenças na acessibilidade do solvente, próximo à região dos resíduos de guanina, podem ser úteis para o seqüenciamento de DNA ou no mapeamento quantitativo de estruturas complexas de ácidos nucleicos.

O interesse pelo desenvolvimento de métodos para a determinação de espécies aromáticas com atividade carcinogênica vem crescendo nos últimos anos. Pandey e colaboradores⁵⁹ desenvolveram sistema de injeção em fluxo para a determinação de intercaladores do DNA, utilizando um derivado de 9,10-antraquinona como composto de referência para detecção fotoeletroquímica. Estes compostos podem ser fotoquimicamente oxidados e depois reduzidos na presença de doadores de elétrons, como glucose. A oxidação da forma reduzida da 9,10-antraquinona foi mediada pelo tetracianoquinodimetano (TCNQ), imobilizado na superfície de eletrodo de pasta de carbono coberto com membrana Nucleopore®, sendo o sinal eletroquímico medido: a corrente de oxidação do TCNQ reduzido quimicamente. A presença de DNA nativo provocou queda no valor da corrente anódica em função do processo de intercalação. Os autores encontraram relação linear entre a queda da resposta eletroquímica e a concentração de DNA, além de forte interferência do brometo de etídio, espécie conhecida por sua ação intercaladora.

Enquanto para o exemplo anterior brometo de etídio (brometo de 2,7-diamino-10-etil-9-fenil-fenantridínio, C₂₁H₂₀N₃Br) foi detectado como interferente, Chambers e colaboradores^{60,61} utilizaram-no para a determinação de DNA nativo. Os autores modificaram eletrodo de pasta de carbono com o sal de etídio-TCNQ. Ao se aplicar potencial de 0,5 V, TCNQ foi oxidado provocando a liberação do cátion Et⁺, detectado por fluorescência. Este sinal foi intensificado pela presença de dsDNA e o máximo de fluorescência foi proporcional à concentração de DNA.

Outra possibilidade de determinação de DNA foi proposta por Ihara *et al.*⁶² por meio da síntese de composto conjugado de oligonucleotídeo-ferroceno. Neste trabalho o poli(T)₁₂-ferrocenila forma complexos, por hibridização, com poli(A) e dsDNA, formando dupla e tripla hélices, respectivamente. A hibridização foi detectada pela diminuição dos valores de corrente de oxidação do conjugado oligonucleotídeo-ferroceno frente à formação dos complexos de DNA. Este método foi aplicado na determinação de polinucleotídeos por HPLC com detecção eletroquímica em eletrodo de grafite⁶³. O método apresentou limite de detecção na ordem de 20 femtomol.

Os agentes antineoplásicos são outra classe de compostos de interesse em virtude de sua capacidade de interação com ácidos nucleicos: deste grupo, os complexos de platina^{49,64} merecem destaque. Vrána e Brabec⁶⁵ registraram boa correlação entre a atividade antineoplásica dos compostos de platina e comportamento polarográfico de seus respectivos adutos com DNA. Os complexos de platina provocam distorções na molécula de DNA por formarem ligações cruzadas intrafitas do DNA⁴⁷ para duas bases de guanina consecutivas⁴⁹. Outros fármacos, como derivados de naftaleno, também apresentaram correlação entre a atividade antineoplásica e o comportamento eletroquímico⁶⁶.

Compostos capazes de produzir radicais, em especial as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio⁶⁷, também apresentam interesse no estudo de seu comportamento voltamétrico frente ao DNA e suas bases. Os derivados nitroimidazólicos são exemplos desse grupo de fármacos, por apresentarem amplo espectro de ação biológica. Experimentos demonstraram que o produto de redução do grupo nitro interage com ácidos nucleicos *in vitro*⁶⁸⁻⁷⁰ e acredita-se que o DNA seja o principal

alvo *in vivo*⁶⁸. Tanto DNA na forma de dupla hélice quanto o desnaturado sofrem ação dessa classe de fármacos^{71,72}.

O mecanismo de ação dos nitroimidazóis proposto por Edwards^{64,73}, admite que o radical R-NO₂[•] provoque lesão oxidativa sobre o DNA, induzindo a liberação do fosfato de timidina com a ruptura e destruição da dupla hélice do ácido nucleico. Resultados obtidos por voltametria cíclica mostraram que na presença das bases e seus nucleosídeos, metronidazol apresenta a seguinte ordem crescente de reatividade: adenina, guanina, timina, uracila, uridina e timidina⁷⁴⁻⁷⁶.

Por outro lado, estudos por polarografia d.c. e a.c. realizados por Declerck e De Ranter^{68,69} demonstraram que o metronidazol sofre alteração positiva no valor de E_{1/2} na presença das bases de DNA. Vale dizer que a onda catódica do metronidazol estudada corresponde à formação do derivado hidroxilamínico envolvendo quatro elétrons. Segundo os autores, adenina, guanina e citosina, e, esta última em menor extensão, interagem mais facilmente com os intermediários gerados durante a redução de nitroimidazóis.

ELETRODOS MODIFICADOS COM DNA

Em virtude das características estruturais da molécula de DNA – que pode ser imobilizada na superfície de eletrodos na forma de simples^{77,78}, dupla^{78,79} ou tripla hélices^{47,78,80,81} –, pela capacidade dos ácidos nucleicos formarem pares complementares com precisão, por suas propriedades condutoras^{82,83} e por apresentarem alta especificidade de interação com moléculas de baixa massa molecular^{51,77}, encontram-se várias revisões na literatura apresentando as mais diversas aplicações para os eletrodos modificados com DNA^{8,17,78,47,84-89}.

Eletrodos podem ser modificados com ácidos nucleicos por meio de ligações covalentes ou por adsorção. Yang e colaboradores⁷⁸ descreveram diversas estratégias de imobilização de ácidos nucleicos para o desenvolvimento de biossensores. Entretanto, Sukhorukov *et al.*⁹⁰ destacaram o inconveniente da imobilização covalente do DNA em superfícies de determinados transdutores. Estas superfícies podem conter grupos capazes de reagir e fragmentar a molécula de DNA, provocando lesões e alterando sua estrutura original. Como alternativa, os autores sugerem a imobilização de ácidos nucleicos em mono e multicamadas pelo método de Lagmuir-Blodgett ou preparação de filmes por adsorção sucessiva e alternada de ácidos nucleicos e policátions, como sanduíches⁷⁹.

Diversos são os materiais de eletrodo que podem ser modificados com DNA, vale dizer, mercúrio^{8,91-95}, ouro⁹⁶⁻¹⁰¹, grafite^{95,102}, pasta de carbono^{89,103-115} e carbono vítreo^{47,80,100,116-123}. Muitos destes exemplos já estão sendo, genericamente, denominados biossensores eletroquímicos de DNA ou genossensores⁷⁸.

A detecção de seqüências específicas de bases em ácidos nucleicos humanos, virais e bacterianos vem crescendo de importância no diagnóstico de doenças⁸⁸. Os eletrodos modificados com DNA têm sido comumente empregados na análise e seqüenciamento de bases por técnicas de hibridização^{78,84,88}. No processo de hibridização, o eletrodo modificado com ácido nucleico (polinucleotídeo) identifica a seqüência de bases complementar por meio da formação de dupla hélice híbrida. Esta identificação é eficaz e específica na presença de outras seqüências, não complementares^{78,87}.

Efetua-se a hibridização por imersão do eletrodo modificado com ssDNA, de seqüência de bases conhecida, na solução do polinucleotídeo a ser detectado. Após hibridização, o eletrodo é transferido para outro compartimento contendo o indicador de hibridização. A espécie indicadora apresenta eletroatividade e possui a capacidade de intercalar o dsDNA. A hibridização pode ser constatada por meio da variação de valores de corrente ou potencial – medida por cronopotenciometria⁸⁹ ou voltametria (cíclica ou de varredura linear)^{78,88} – produzida pela alteração do comportamento eletroquímico do intercalador frente ao DNA híbrido formado^{87,96}.

Millan e Mikkelsen¹²² registraram uma das primeiras descrições de biossensor capaz de efetuar seqüenciamento de ácidos nucleicos por imobilização de DNA e oligonucleotídeos em eletrodo de carbono vítreo utilizando indicadores eletroativos de hibridização. DNA desnaturado foi imobilizado covalentemente na superfície do eletrodo através dos resíduos de guanina, utilizando-se carbodiimida hidrossolúvel e *N*-hidroxissuccinimida. DNA *double-strand* – obtido por reação de hibridização – e ssDNA apresentaram diferenças nos valores de corrente na presença de Co(bpy)₃³⁺. O alto valor de corrente, registrado pelos autores, para o dsDNA foi atribuído à pré-concentração do complexo metálico na superfície do eletrodo.

A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de agentes intercaladores utilizados como indicadores de hibridização e outros exemplos podem ser encontrados em publicação feita por Hashimoto e co-autores⁹⁷. O complexo de Co(bpy)₃³⁺ também foi utilizado para avaliar o desempenho eletroquímico de eletrodos de carbono vítreo e ouro modificados com DNA na forma de dupla hélice^{100,101}. Maeda *et al.*⁹⁹ mostraram o efeito dos metais alcalino-terrosos sobre a resposta de eletrodo de ouro modificado com DNA nativo por intermédio do comportamento voltamétrico do par Fe(CN)₆^{4-/3-}.

As bicamadas lipídicas surgem como alternativa para o desenvolvimento de biossensores de DNA, devido à sua simplicidade de construção, facilidade de modificação, pelos métodos elétricos de detecção, rápido tempo de resposta e pelo fato de serem o principal componente estrutural de todas as biomembranas. Eletrodo de carbono vítreo foi modificado por membrana lipídica com ssDNA incorporado¹²³ e transdutor metálico foi modificado de forma semelhante visando a detecção de hibridização de ácidos nucleicos¹²⁸.

Outra aplicação comum dos eletrodos modificados com ácidos nucleicos é a detecção de pequenas lesões presentes na molécula de DNA. O método desenvolvido por Palecek^{8,39,40}, para a determinação de ácidos nucleicos por voltametria de pré-concentração adsorptiva, vem sendo utilizado como alternativa para a modificação de eletrodos de mercúrio^{81,93,129} e carbono⁸¹. Por este sistema foi possível detectar lesões presentes em menos de 2% da molécula de DNA⁹¹, além da determinação de traços de RNA na presença de DNA dupla hélice^{92,94}. Oligonucleotídeos também têm sido determinados na presença de DNA utilizando-se eletrodo de pasta de carbono modificado por membranas moleculares¹⁰⁶.

Alternativa promissora para o desenvolvimento de biossensores poderá ser a utilização de DNA como matriz para auxiliar a imobilização de enzimas. Eletrodo de pasta de carbono modificado com DNA-tirosinase – desenvolvido por Dantoni e colaboradores¹³⁰ – mostrou excelente desempenho na determinação de catecol em sistema em fluxo. Por esse processo de imobilização, o biossensor apresentou maior sensibilidade e tempo de vida em comparação aos biossensores preparados na ausência de DNA. Embora a função do DNA nestes biossensores não esteja ainda totalmente esclarecida, algumas hipóteses foram discutidas. A presença do DNA forneceu ambiente mais hidrofílico para a enzima, condição bem conhecida para a aceleração da atividade catalítica. Além disto, favoreceu a estabilização da estrutura terciária da enzima por meio da interação direta com os grupos funcionais dos aminoácidos da mesma, mediante o deslocamento da esfera de hidratação do DNA, provavelmente com as moléculas de água formando ligações de hidrogênio.

A rápida desativação da enzima tirosinase é geralmente atribuída aos radicais livres, derivados da semibenzoquinona, formados durante o ciclo catalítico. Estes radicais reagem com o grupo imidazol de um ou mais resíduos de histidina ligados ao cobre (centro ativo da enzima) provocando inativação. Como na presença de DNA o ambiente é mais hidrofílico, estes radicais são mais rapidamente protonados, tornando a inativação da enzima mais lenta.

Como já destacado, uma das vantagens dos eletrodos modificados com DNA é sua versatilidade de aplicação. Utilização importante destes eletrodos é o estudo de mecanismos de interação de compostos com DNA. Existem centenas de compostos capazes de reagir com ácidos nucleicos^{47,51,100}. Estas reações podem causar alterações na estrutura do DNA e na seqüência de bases no processo de replicação, além de modificações químicas das bases provocando mutações^{97,100}.

A interação de azul de metileno e DNA foi estudada por Kelley e Barton⁹⁸, utilizando-se eletrodo de ouro e eletrodo de ouro modificado com dsDNA contendo 15 pares de bases. Comparado ao eletrodo de ouro, o eletrodo modificado com DNA apresentou maior eficiência para o processo de transferência de carga e a baixa concentração do analito (1,0 μmol/L), detectada por voltametria cíclica, indicou a existência de pré-concentração do azul de metileno na superfície do eletrodo modificado.

Wang e colaboradores^{89,105,131} desenvolveram eletrodos de pasta de carbono modificados com DNA nativo para a determinação,

Tabela 1. Exemplos de espécies intercaladoras utilizadas como indicadores de hibridização.

Intercalador	Eletrodo	Deteção	E (V) vs Ag/AgCl	pH	AN imobilizado (n° bases)	AN detectado (n° bases)	Ref.
Tris-Os(bpy) ₃ 2+	carbono poroso	voltam.	0,71 ^b	7,0	20	12/20	124
Ru(bpy) ₃ ²⁺	ITO	voltam.	1,05 ^a	7,0	poli[dC]	poli[dG]	125
Co(bpy) ₃ ³⁺	carbono	cronopot.	—	7,0	25	15 - 42	104
Co(bpy) ₃ ³⁺	carbono vítreo	voltam.	0,075 ^c	7,0	20	4000	122
Co(phen) ₃ ³⁺	p. carbono	voltam.	0,130 ^c	7,0	18	4000	103
Co(phen) ₃ ³⁺	p. carbono	cronopot.	—	7,0	poli[dG]	poli[dC]	81
Co(phen) ₃ ³⁺	p. carbono	cronopot.	—	7,4	36	36	126
Co(phen) ₃ ³⁺	p. carbono	cronopot.	—	7,0	38	15-42	107
Co(phen) ₃ ³⁺	p. carbono	cronopot.	—	7,4	21/42	15/42	110
Co(phen) ₃ ³⁺	p. carbono	cronopot.	—	5,0/7,0	27/36	27/36	127
Co(phen) ₃ ³⁺	p. carbono	cronopot.	—	7,0	10/15	10/15	114
Co(phen) ₃ ³⁺	p. carbono	cronopot.	—	7,0	17	17/30	115
Hoechst 33258	ouro	voltam.	0,555 ^b	7,0	20	4200	96
daunorrubicina	grafite	voltam.	0,446 ^b	7,0	20	4200	97
daunorrubicina	carbono vítreo	voltam.	0,529 ^b	7,0	12-18	12-18	17
brometo de etídeo	grafite	voltam.	0,678 ^b	6,0	24	400	102

AN = ácido nucleico; ITO = óxido de índio-estanho

Valores de potencial: a - E_{1/2}; b - E_{p,a}; c - E_{p,c}

por cronopotenciometria, de espécies que interagem especificamente com ácidos nucleicos, a partir do sinal de oxidação produzido pelos resíduos de guanina. Dessa forma determinaram-se aminas aromáticas¹⁰⁹, hidrazinas¹¹¹ e fenotiazinas¹¹² e atingiram-se limites de detecção na ordem de nanomol/L. Em recente revisão⁸⁹, os autores destacaram as vantagens dos biosensores potenciométricos de DNA aplicados ao monitoramento ambiental.

Conhecendo-se o comportamento eletroquímico do DNA e de suas bases, Brett e colaboradores^{47,80,116-121} desenvolveram eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA. Este eletrodo foi preparado por recobrimento de um eletrodo de carbono vítreo com DNA nativo dissolvido em tampão acetato de pH 4,5.

Após secagem, o eletrodo foi condicionado em solução tampão acetato com aplicação de potencial de +1,4 V seguido do registro de linha base entre 0,0 V e +1,4 V. Em seguida o eletrodo foi transferido para solução de DNA desnaturado registrando-se o voltamograma na mesma faixa de potencial citada acima (Figura 6)^{47,121}. O filme hidratado de DNA modificado recobriu toda a área do eletrodo de carbono vítreo com espessura de aproximadamente 0,5 cm (condição de trabalho).

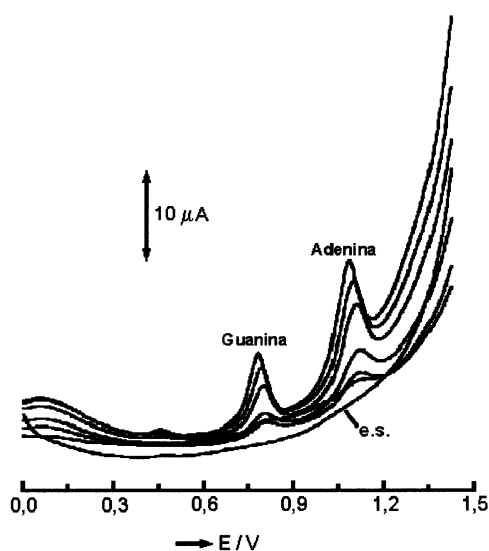


Figura 6. Voltamogramas de pulso diferencial sucessivos de eletrodo de carbono vítreo coberto com DNA nativo imerso em solução de DNA desnaturado durante modificação; e.s. - eletrólito de suporte: tampão acetato 0,1 mol/L, pH 4,5. Amplitude de pulso: 50mV; tempo de pulso: 70ms; velocidade de varredura: 5 mV/s. Eletrodo de referência: Ag/AgCl. [Ref. 47]

Durante o processo de condicionamento, o filme de DNA nativo interagiu com o ssDNA da solução. Os valores de corrente de guanina e adenina cresceram sucessivamente, a cada varredura, até atingirem a saturação, como indicado pela Figura 7. Neste ponto a modificação superficial tornou-se permanente e os resultados mostraram que nesta condição havia claro favorecimento no processo de transferência de carga. Assim, a modificação sofrida pela camada de DNA adsorvida originou um estado condensado com propriedades condutoras e com capacidade de proteger a superfície de carbono vítreo da adsorção de produtos de reação e conseqüente envenenamento⁴⁷. Avaliações preliminares indicaram tempo de vida útil de aproximadamente quatro dias trabalhando-se com solução de DNA desnaturado¹³².

O comportamento descrito acima foi explicado admitindo-se a provável formação de DNA na forma de tripla hélice^{47,132,133} na superfície do eletrodo. A obtenção de correntes estáveis para oxidação de guanina e adenina sugeriu a existência de número limitado de interações entre o DNA nativo imobilizado na

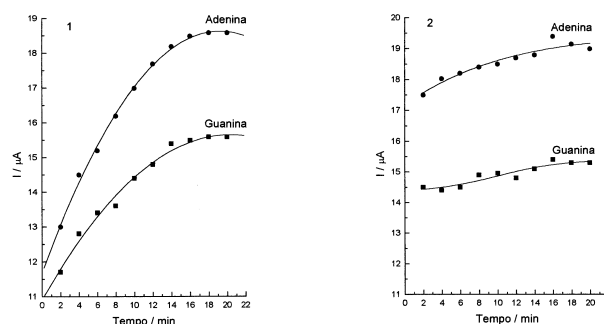


Figura 7. Curvas de corrente de pico de oxidação dos resíduos de guanina e adenina em função do tempo de adsorção correspondente à modificação superficial do eletrodo de carbono vítreo recoberto com DNA nativo: 1) condicionamento inicial; 2) condicionamento final; ambos em solução de DNA desnaturado. [Ref. 47]

superfície do eletrodo e o DNA desnaturado em solução. O desempenho desse eletrodo foi avaliado pelo comportamento voltamétrico de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ e da oxidação de guanosina- e adenosina-5'-monofosfatos⁴⁷. Para o par redox $\text{Fe}(\text{III})/\text{Fe}(\text{II})$, o uso do eletrodo modificado com DNA apresentou comportamento semelhante comparando-se ao eletrodo de carbono vítreo, entretanto obteve-se maior sensibilidade e reprodutibilidade de análise para ambos nucleotídeos estudados⁴⁷.

Esse eletrodo foi utilizado, com sucesso, na determinação de carboplatina em amostras de soro de pacientes com neoplasia, submetidos a tratamento quimioterápico com este fármaco¹²¹. Posteriormente, estudou-se o comportamento voltamétrico de nitroimidazóis¹¹⁸⁻¹²⁰, o que propiciou o estabelecimento de modelo para o mecanismo de interação deste grupo de fármacos com DNA⁸⁰.

CONCLUSÕES

Diante do exposto fica evidente que os eletrodos modificados com DNA representam excelente alternativa para a análise e determinação da seqüências de ácidos nucleicos, além de ampliar de forma significativa o potencial das técnicas eletroanalíticas aplicadas à análise farmacêutica.

O uso dos eletrodos modificados com ácidos nucleicos pode contribuir para o esclarecimento dos fatores que estabelecem a afinidade e a seletividade com que determinadas moléculas ligam-se ao DNA. De posse dessas informações tanto se pode estabelecer critérios para exposição humana a espécies tóxicas, quanto contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação de determinados quimioterápicos e o conseqüente desenvolvimento de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

- Berg, H. In *Comprehensive Treatise of Electrochemistry*; Srinivasan, S.; Chizmadzev, Y. A.; Bockris, J. O'M.; Conway, B. E.; Yeager, E.; Eds.; Plenum Press, New York 1985; v. 10, p. 189.
- Palecek, E. In *Topics in Bioelectrochemistry and Bioenergetics*; Milazzo, G.; Ed.; Wiley, New York 1983; vol.5, p. 65.
- Palecek, E.; *Anal. Biochem.* **1980**, *108*, 129.
- Palecek, E.; *Biochem. Biophys. Acta* **1961**, *51*, 1.
- Palecek, E.; *Nature* **1960**, *188*, 656.
- Palecek, E.; BRABEC, V.; *Biochem. Biophys. Acta* **1972**, *262*, 125.
- Jelen, F.; Fojta, M.; Palecek, E.; *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *427*, 49.
- Palecek, E.; *Electroanalysis* **1996**, *8*, 7.
- Brabec, V.; Palecek, E.; *Biopolymers* **1972**, *11*, 2577.

10. Krznicar, D.; Cosovic, B.; *Anal. Biochem.* **1986**, *156*, 454.
11. Brabec, V.; *Study Biophys.* **1983**, *94*, 135.
12. Brabec, V.; Palecek, E.; *Biophys. Chem.* **1976**, *4*, 79.
13. Valenta, P.; Nürnberg, H. W.; *Biophys. Struct. Mechanism* **1974**, *1*, 17.
14. Totir, N. D.; Ciucu, N.; *Rev. Roum. Chim.* **1995**, *40*, 805.
15. Totir, N. D.; Ciucu, N.; *Rev. Roum. Chim.* **1992**, *37*, 755.
16. Jelen, F.; Palecek, E.; *Biophys. Chem.* **1986**, *24*, 285.
17. Palanti, S.; Marazza, G.; Mascini, M.; *Anal. Lett.* **1996**, *29*, 2309.
18. Brabec, V.; Dryhurst, G.; *J. Electroanal. Chem.* **1978**, *89*, 161.
19. Brabec, V.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1980**, *7*, 69.
20. Brabec, V.; Koudelka, J.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1980**, *7*, 793.
21. Brett, A. M. O.; Matysik, F.-M.; *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *429*, 95.
22. Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O.; Serrano, S. H. P.; *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *366*, 225.
23. Brabec, V.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1981**, *8*, 437.
24. Brabec, V.; *Biopolymers* **1979**, *18*, 2397.
25. Gilmartin, M.A.T.; Hart, J.P.; *Analyst* **1992**, *117*, 1613.
26. Hart, J. P.; *Electroanalysis of Biologically Important Compounds*; Ellis Horwood, London 1990, 213 p.
27. Dryhurst, G.; In *Comprehensive Treatise of Electrochemistry*; Srinivasan, S.; Chizmadzhev, Y. A.; Bockris, J. O'M.; Conway, B. E.; Yeager, E.; Eds.; Plenum Press, New York 1985; v. 10, p. 131.
28. Dryhurst, G.; *Anal. Chim. Acta* 1971, *57*, 137.
29. Dryhurst, G.; *J. Electrochem. Soc.; Electrochem. Sci.* **1969**, *116*, 1411.
30. Yao, T.; Wasa, T.; Musha, S.; *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1978**, *51*, 1235.
31. Brett, A. M. O.; Serrano, S. H. P.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1995**, *6*, 97.
32. Cai, X.; Ogorevc, B.; Kalcher, K.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 1126.
33. Singhal, P.; Kuhr, W.G.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3552.
34. Wang, J.; Chen, L.; Chicharro, M.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *319*, 347.
35. Palecek, E.; Kolaf, V.; Jelen, F.; Heinemann, U.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1990**, *23*, 285.
36. Palecek, E.; Fojta, M.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1566.
37. Palecek, E.; Boubliková, P.; Jelen, F.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, *187*, 99.
38. Boubliková, P.; Vojtísková, M.; Palecek, E.; *Anal. Lett.* **1987**, *20*, 275.
39. Palecek, E.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1992**, *28*, 71.
40. Palecek, E.; *Anal. Biochem.* **1988**, *170*, 421.
41. Palecek, E.; Tomschik, M.; Stanková, V.; Havran, L.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 990.
42. Wang, J.; Grant, D. H.; Ozsoz, M.; Cai, X.; Tian, B.; Fernandes, J. R.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *349*, 77.
43. Cai, X.; Rivas, G.; Farias, P. A. M.; Shiraiishi, H.; Wang, J.; Palecek, E.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *332*, 49.
44. Wang, J.; Cai, X.; Jonsson, C.; Balakrishnan, M.; *Electroanalysis* **1996**, *8*, 20.
45. Wang, J.; Cai, X.; Wang, J.; Jonsson, C.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4065.
46. Wang, J.; Rivas, G.; Cai, X.; Chicharro, M.; Dontha, N.; Luo, D.; Palecek, E.; Nielsen, P.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 120.
47. Brett, A. M. O.; Serrano, S. H. P.; Piedade, J. A.; In *Comprehensive Chemical Kinetics*; Compton, R. G.; Ed.; Elsevier, Netherlands 1998, em impressão.
48. Cheng, G.; Dong, S.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 834.
49. Swiatek, J.; *J. Coord. Chem.* **1994**, *33*, 191.
50. Teijeiro, C.; Perez, P.; Marín, D.; Palecek, E.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1995**, *38*, 77.
51. Blackburn, G. M.; Gait, M. J.; Eds.; *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*; Oxford University Press, New York 1996; 528 p.
52. Carter, M.T.; Bard, A. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7528.
53. Carter, M.T.; Rodriguez, M.; Bard, A. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8901.
54. Rodriguez, M.; Bard, A. J.; *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2658.
55. Qu, F.; Li, N.-Q.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 1348.
56. Feng, Q.; Li, N.-Q.; Jiang, Y.-Y.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *344*, 97.
57. Mahadevan, S.; Palaniandavar, M.; *Bioconjugated Chem.* **1996**, *7*, 138.
58. Johnston, D. H.; Glasgow, K. C.; Thorp, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8933.
59. Pandey, P. C.; Weetall, H.H.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1236.
60. Swaile, B. A. H.; Chambers, J. Q.; *Anal. Biochem.* **1991**, *196*, 415.
61. Chambers, J. Q.; Lange, M. A. Trimble, D. S.; Mounts, R. D.; *J. Electroanal. Chem.* **1989**, *266*, 277.
62. Ihara, T.; Maruo, Y.; Takenaka, S.; Takagi, M.; *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4723.
63. Takenaka, S.; Uto, Y.; Kondo, H.; Ihara, T.; Takagi, M.; *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 436.
64. Edwards, D.I.; In *Comprehensive Medicinal Chemistry*; Hansch, C.; Ed.; Pergamon Press, New York 1990; vol 2, p 725.
65. Vrána, O.; Brabec, V.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1988**, *19*, 145.
66. Bruno, A. M.; Lo Balbo, A.; Asis, S.; Molina, D.; Conti, G.; Gaozza, C. H.; *Boll. Chim. Farm.* **1996**, *135*, 374.
67. Wiseman, H.; Halliwell, B.; *Biochem. J.* **1996**, *313*, 17.
68. Declerck, P. J.; De Ranter, C. J.; *J. Chem. Soc.* **1987**, *83*, 257.
69. Declerck, P. J.; De Ranter, C. J.; *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35*, 59.
70. Declerck, P. J.; De Ranter, C. J.; Volckaert, G.; *FEBS* **1983**, *164*, 145.
71. Lafleur, M. V. M.; Zahoor, A.; Knight, R. C.; Pluijmackers-Westmijze, E.J.; Loman, H.; Edwards, D.I.; *Int. J. Radiat. Biol.* **1985**, *48*, 917.
72. Soetekouw, R.; Loman, H.; Retèl, J.; *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *41*, 1649.
73. Edwards, D. I.; *J. Antimicrob. Chemother.* **1993**, *31*, 9.
74. Tocher, J. H.; Edwards, D. I.; *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1089.
75. Tocher, J. H.; Edwards, D.I.; *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1992**, *22*, 661.
76. Tocher, J. H.; *Gen. Pharmac.* **1997**, *28*, 485.
77. Evdokimov, YU. M.; Skuridin, S. G.; Salyanov, V. I.; Semeikin, A. S.; Palumbo, M.; *Molec. Biol.* **1989**, *23*, 1245.
78. Yang, M.; McGovern, M. E.; Thompson, M.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *346*, 259.
79. Skuridin, S. G.; Yevdokimov, Y. U.; Efimov, V. S.; Hall, J. M.; Turner, A. P. F.; *Biosens. Bioelec.* **1996**, *11*, 903.
80. Brett, A. M. O.; Serrano, S. H. P.; Gutz, I.; La-Scala, M. A.; Cruz, M.L.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 1132.
81. Cai, X.; Rivas, G.; Shiraiishi, H.; Farias, P. A. M.; Wang, J.; Tomschik, M.; Jelen, F.; Palecek, E.; *Anal. Chim. Acta.* **1997**, *344*, 65.
82. Lecompte, M. F.; Jozefowicz, M.; *Makromol. Chem.* **1977**, *178*, 1761.
83. Lecompte, M. F.; Muller, D.; Jozefowicz, M.; *Biopolymers* **1972**, *11*, 2563.
84. Downs, M. E. A.; *Biochem. Soc. Trans.* **1991**, *19*, 39.
85. Downs, M. E. A.; Kobayashi, S.; Karube, I.; *Anal. Lett.* **1987**, *20*, 1897.
86. Downs, M. E. A.; Warner, P. J.; Turner, A. P. F.; Fothergill, J. C.; *Biomaterials* **1988**, *9*, 66.
87. Junhui, Z.; Hong, C.; Ruifu, Y.; *Biotech. Advances* **1997**, *15*, 43.

88. Mikkelsen, S. R.; *Electroanalysis* **1996**, *8*, 15.
89. Wang, J.; Rivas, G.; Cai, X.; Palecek, E.; Nielsen, P.; Shiraishi, H.; Dontha, N.; Luo, D.; Parrado, C.; Chicharro, M.; Farias, P. A. M.; Valera, F. S.; Grant, D. H.; Ozsos, M.; Flair, M.N.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *347*, 1.
90. Sukhorukov, G. B.; Montrel, M. M.; Petrov, A. I.; Shabarchina, L. I.; Sukhorukov, B. I.; *Biosens. Bioelec.* **1996**, *11*, 913.
91. Fojta, M.; Palecek, E.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *342*, 1.
92. Fojta, M.; Doffková, R.; Palecek, E.; *Electroanalysis* **1996**, *8*, 420.
93. Fojta, M.; Havran, L.; Palecek, E.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 1033.
94. Fojta, M.; Tejeiro, C.; Palecek, E.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1994**, *34*, 69.
95. Palecek, E.; Jelen, F.; Tejeiro, C.; Fucik, V.; Jovin, T. M.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, *273*, 175.
96. Hashimoto, K.; Ito, K.; Ishimori, Y.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3830.
97. Hashimoto, K.; Ito, K.; Ishimori, Y.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, *286*, 219.
98. Kelley, S. O.; Barton, J. K.; *Bioconjugate. Chem.* **1997**, *8*, 31.
99. Maeda, M.; Nakano, K.; Uchida, S.; Tagaki, M.; *Chem. Letters* **1994**, *10*, 1805.
100. Pang, D.-W.; Zhang, M.; Wang, Z.-L.; Qi, Y.-P.; Cheng, J.-K.; Liu, Z.-Y.; *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *403*, 183.
101. Zhao, Y.-D.; Pang, D. W.; Wang, Z.-L.; Cheng, J.-K.; Qi, Y.-P.; *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *431*, 203.
102. Liu, S.; Ye, J.; He, P.; Fang, Y.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *335*, 239.
103. Millan, K.M.; Saraullo, A.; Mikkelsen, S.R.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2943.
104. Wang, J.; Rivas, G.; Cai, X.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 395.
105. Wang, J.; Cai, X.; Tian, B.; Shiraishi, H.; *Analyst* **1996**, *121*, 965.
106. Wang, J.; Cai, X.; Fernandes, J. R.; Grant, D.; Ozsos, M.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4056.
107. Wang, J.; Rivas, G.; Parrado, C.; Cai, X.; Flair, M.N.; *Talanta* **1997**, *44*, 2003.
108. Wang, J.; Grant, D. H.; Ozsoz, M.; Cai, X.; Tian, B.; Fernandes, J. R.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *349*, 77.
109. Wang, J.; Rivas, G.; Luo, D.; Cai, X.; Valera, F.L.; Dontha, N.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4365.
110. Wang, J.; Cai, X.; Rivas, G.; Shiraishi, H.; Farias, P. A. M.; Dontha, N.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2629.
111. Wang, J.; Chicharro, M.; Rivas, G.; Cai, X.; Dontha, N.; Farias, P. A. M.; Shiraishi, H.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2251.
112. Wang, J.; Rivas, G.; Cai, X.; Shiraishi, H.; Farias, P.A.M.; Dontha, N.; Luo, D.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *322*, 139.
113. Wang, J.; Rivas, G.; Cai, X.; Chicharro, M.; Dontha, N.; Luo, D.; Palecek, E.; Nielsen, P.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 120.
114. Wang, J.; Palecek, E.; Nielsen, P.; Rivas, G.; Cai, X.; Shiraishi, H.; Dontha, N.; Luo, D.; Farias, P. A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7667.
115. Wang, J.; Rivas, G.; Cai, X.; Chicharro, M.; Parrado, C.; Dontha, N.; Begleiter, A.; Mowat, M.; Palecek, E.; Nielsen, P. E.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *344*, 111.
116. Brett, A. M. O.; Serrano, S. H. P.; In *Topics in Biophysics*; Frangopol, P.; Nikolelis, D. P.; Krull, U. J., Ed.; University Press IASI, România **1997**; vol.6, p 1.
117. Brett, A. M. O.; Serrano, S. H. P.; *Port. Electrochem. Acta* **1995**, *13*, 467.
118. Brett, A. M. O.; Serrano, S. H. P.; La-Scalea, M.A.; In *Biosensors for direct monitoring of environmental pollutants in field*; Nikolelis, D. P.; Ed.; Kluwer Academic Publishers Netherlands 1998; p. 78.
119. Brett, A. M. O.; Serrano, S. H. P.; Gutz, I.; La-Scalea, M. A.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 110.
120. Brett, A. M. O.; Serrano, S. H. P.; Gutz, I.; La-Scalea, M. A.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1997**, *42*, 175.
121. Brett, A. M. O.; Serrano, S. H. P.; Macedo, T. A.; Raimundo, D.; Marques M. H.; La-Scalea, M.A.; *Electroanalysis* **1996**, *8*, 992.
122. Millan, K. M.; Mikkelsen, S. R.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2317.
123. Siontorou, C. G.; Brett, A. M. O.; Nikolelis, D. P.; *Talanta* **1996**, *43*, 1137.
124. Mishima, Y.; Motonaka, J.; Ikeda, S.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *345*, 45.
125. Napier, M. E.; Thorp, H. H.; *Langmuir* **1997**, *13*, 6342.
126. Wang, J.; Cai, X.; Rivas, G.; Shiraishi, H.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *326*, 141.
127. Wang, J.; Rivas, G.; Cai, X.; Chicharro, M.; Dontha, N.; Luo, D.; Palecek, E.; Nielsen, P.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 120.
128. Siontorou, C. G.; Nikolelis, D. P.; Piunno, P. A. E.; Krull, U. J.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 14.
129. Jelen, F.; Tomschik, M.; Palecek, E.; *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *423*, 141.
130. Dantoni, P.; Serrano, S. H. P.; Brett, A. M. O.; Gutz, I. G. R.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *366*, 137.
131. Cai, X.; Rivas, G.; Farias, P. A. M.; Shiraishi, H.; Wang, J.; Palecek, E.; *Electroanalysis* **1996**, *8*, 753.
132. La-Scalea, M. A.; *Tese de Doutorado - Instituto de Química, USP, S. Paulo*, 1998.
133. Soyfer, V.N.; Potaman, V. N.; *Triple-helical Nucleic Acids*. Springer, Berlin, 1995.