

5º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

Desenvolvimento de um biossensor amperométrico de fenol usando tecido do macrofungo *Agaricus bisporus* e o eletrodo de oxigênio

AUTORES:

SILVA, L. M. C.^{*1}; SALGADO, A. M.¹; COELHO, M. A. Z.¹

INSTITUIÇÃO:

Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Desenvolvimento de um biossensor amperométrico de fenol usando tecido do macrofungo *Agaricus bisporus* e o eletrodo de oxigênio

Abstract

The measurement of the quantities of phenols present in many industrial effluents is quite important due to the high toxic pollutant impact in the environment. Usually the analyses of the phenolic species have been carried out by the chromatographic and spectrophotometric methodology. Both methods however showed to have the disadvantage of being very expensive. In addition they have a sluggish response time also demanding a trained operator to perform the measurements since they are difficult to be implemented *in situ* in a continued-monitoring basis as well. The present work is, in deed, an effort to develop an analitical method, which intends to demonstrate that a continuous monitoring of phenols is achievable by using the mushroom tissue of *Agaricus bisporus* through the activity feature of the tyrosinase. The tyrosinase would be the biocomponent sensitive to phenols in a biosensor. Meanwhile the oxygen electrode would operate as a transducer. The tyrosinase as a polyphenol oxidase would be capable to convert the phenols into products less soluble in water - the quinones.

The experimental methodology adopted in the development in this work aimed to construct the biosensor. The linear relationship between the variation of dissolved oxygen and concentration of phenol in aqueous solution was investigated. For the calibration of the instrument, studying the time of reaction and amount of tissue needed to promote reliable answers and with less error from the analysis. The influence of saturation of the solution with air before reading and washing of the electrode were also studied.

During the preparation of a biosensor system the time of the reaction was set as 1 minute for an amount of 5g of the biocomponent. The process of washing the electrode did not promote positive change in the response of the biosensor, but the initial air saturation promoted minor variations between the answers using the instrument. It was expected that could exist a linear relationship between the variation of the concentration of the oxygen versus the concentration of the phenol using the configuration of the biosensor forementioned. The results of the tests did not show this behavior.

Introdução

A determinação de fenóis possui importância ambiental, visto que um número considerável de poluentes orgânicos possui estrutura fenólica. Fenóis e seus derivados são conhecidos pela sua elevada toxicidade e por serem compostos comuns em efluentes industriais (Topçu *et al.*, 2004) e, até o presente momento, suas análises têm sido realizadas, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos, cromatográficos e fluorimétricos. Entretanto, estas técnicas não permitem, facilmente, um monitoramento contínuo *in situ*, pois são caras, lentas e necessitam de operadores treinados (Rosatto, 2000; Rosatto *et al.*, 2001).

Nesse contexto de grande preocupação com o meio ambiente, reafirma-se a necessidade de sistemas de detecção mais versáteis para o monitoramento ambiental. Neste contexto, os biossensores, novas técnicas de preparação de sensores que combinam a alta especificidade dos sistemas biológicos com as várias possibilidades de projetos de circuitos eletrônicos ganham destaque (Sharmat & Rogers, 1994). Estes instrumentos representam ferramentas promissoras para suplementar as técnicas existentes, devido às suas características únicas, tais como: seletividade, relativo baixo custo de construção e

estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis.

O funcionamento de um biossensor, de uma forma geral, envolve a especificidade e alta sensibilidade do componente biológico com o substrato de interesse. Em seguida, como produto desta interação entre a molécula biológica e o substrato, variações de um ou mais parâmetros físico-químicos são gerados e convertidos em um sinal elétrico quantificável e processável pelo uso de um transdutor adequado (Rosatto, 2000).

Na busca por componentes biológicos mais baratos e eficazes para a produção de biossensores para detecção de compostos fenólicos, as polifenol oxidases, em especial a tirosinase, vêm sendo bastante pesquisada nos últimos anos (Rosatto, 2000; Topçu *et al.*, 2004; Carralero *et al.*, 2006; Tembe *et al.*, 2007; Kochana *et al.*, 2008; Zejli *et al.*, 2008). Na literatura, encontram-se vários trabalhos utilizando a tirosinase presente no cogumelo *Agaricus bisporus* como biocomponente na montagem de sensores enzimáticos (Topçu *et al.*, 2004; Marin-Zamora *et al.*, 2006). No entanto, esta não foi utilizada na forma imobilizada naturalmente no tecido. Neste contexto, o presente trabalho visa estudar a utilização do tecido íntegro deste macrofungo como fonte da enzima tirosinase e o eletrodo de oxigênio na confecção de um biossensor amperométrico para fenol.

Metodologia

Testes de escolha do tempo de reação e quantidade do biocomponente

Os primeiros testes visaram escolher a melhor quantidade de tecido fúngico e o tempo de reação enzimática que promoveriam resposta, na variação da concentração de oxigênio dissolvido, com menor desvio padrão. Os testes foram realizados em um bécher de vidro sob temperatura ambiente, com a presença de solução padrão de fenol de 10ppm. Utilizou-se tampão fosfato de sódio pH 8,0 para diluição e tecido fúngico cortado em forma de cubos de 1cm³. As leituras, em cinco réplicas, foram realizadas após estabilização do eletrodo na solução. A fim de escolher a melhor quantidade do biocomponente foram escolhidas 1g, 3g e 5g. Além disso, para a escolha do melhor tempo reacional foi selecionada a faixa de 1 a 30 minutos. A cada teste, o eletrodo de oxigênio foi lavado com água destilada e seco com papel macio.

Testes visando obter a calibração do sistema biossensor (tecido fúngico e eletrodo de oxigênio)

A fim de realizar a calibração do sistema biossensor, foram realizados testes, com 5 réplicas, variando a concentração do analito, solução de fenol, em uma faixa de concentração de 0 a 10ppm e analisando a progressão das leituras de variação de oxigênio dissolvido.

Estudos de repetibilidade do biossensor e de análise da influência e necessidade de lavagem do transdutor a cada leitura

Para analisar a viabilidade da reutilização dos pedaços (1,0cm³) de tecido fúngico em sucessivas análises e a influência e a necessidade da lavagem do eletrodo de oxigênio entre cada leitura, ensaios foram conduzidos inserindo o transdutor em solução de fenol, na faixa de 0 a 5ppm, diluídas em tampão fosfato de sódio pH 8,0, em um bécher sob temperatura ambiente, contendo 5g de tecido fúngico no tamanho de 1cm³. As análises foram realizadas a cada 1 minuto de reação transcorrido e, ao final de cada leitura, o transdutor foi ou não lavado com água destilada e seco com papel macio.

Testes de estudo da influência da saturação de ar inicial das soluções nas leituras

Testes foram realizados com o intuito de avaliar a influência da saturação inicial das soluções nas leituras realizadas com o biossensor. Para isto foi realizado borbulhamento de ar nas mesmas antes de cada análise. O objetivo desse procedimento era fazer com que todas as soluções comesçassem com a mesma concentração inicial de oxigênio, evitando assim, mais interferentes na resposta final em relação à variação de oxigênio dissolvido obtida resultante da reação enzimática. Os testes foram conduzidos como descrito anteriormente, acrescentando-se o borbulhamento de ar por 5 minutos (Silva, 2008), empregando-se uma bomba de aquário.

Cabe ressaltar que paralelamente a todos os testes, foram realizados ensaios para avaliar a variação da concentração de oxigênio dissolvido devido apenas à inserção do transdutor na solução de fenol, sendo um “teste em branco” para avaliar possíveis interferências nas medidas. Os ensaios foram conduzidos do mesmo modo como foi descrito anteriormente, no entanto não foi utilizado o biocomponente.

Resultados e Discussão**Estudo das melhores condições relativas à quantidade de massa de tecido fúngico e tempo de reação para a construção do biossensor**

Os resultados dos testes realizados, que visaram estudar a melhor quantidade do biocomponente e o melhor tempo de reação, são mostrados na Tabela 1. São mostrados os módulos das médias das cinco réplicas, e o desvio encontrado, realizadas em cada condição utilizando as três quantidades estudadas 1g, 3g e 5g nos tempos de 1 a 30 minutos de reação.

Tabela 1: Resultados dos testes visando estudar a melhor quantidade do biocomponente e o melhor tempo de reação.

Quantidade de tecido fúngico	Tempo (minutos)							
	Módulo da média da variação de O ₂							
	1	3	5	10	15	20	25	30
1g	0,72±0,34	2,10±0,43	0,74±0,98	0,74±1,18	0,62±1,19	0,46±1,07	0,44±1,06	0,36±1,13
3g	0,22±0,34	0,70±0,19	3,27±0,52	3,70±0,79	4,23±0,91	4,23±1,01	4,30±1,07	4,27±1,18
5g	0,18±0,10	1,18±0,13	4,20±0,38	5,20±0,46	5,65±0,6	5,95±0,68	6,35±0,95	6,45±1,24

Os resultados mostram que os menores desvios entre as análises são decorrentes dos menores tempos quando se utilizaram as três quantidades do biocomponente. Além disso, pode-se verificar a tendência de aumento numérico da variação de oxigênio dissolvido com o aumento de tempo reacional. Este fato pode ser explicado pelo fato do eletrodo de oxigênio possuir uma membrana que separa o eletrólito interno e os eletrodos (catodo e ânodo) do meio externo. Essa membrana é permeável ao oxigênio que se difunde até o catodo de platina reduzindo-se num processo redox envolvendo quatro elétrons, gerando assim uma corrente proporcional à concentração de oxigênio no meio reacional. Assim, quanto maior for a concentração do substrato na solução a ser analisada (ou solução padrão) e/ou maior o tempo de reação maior será a diminuição observada da concentração de O₂.

Analisando os resultados obtidos, observa-se que o sistema que apresenta menor desvio entre as cinco réplicas é quando se utiliza 5g de tecido fúngico em reação de 1 a 3 minutos. A fim de ter um instrumento com maior confiabilidade nas suas análises, foi escolhido usar 5g de tecido e 1 minuto de reação para os testes seguintes.

Estudos de repetibilidade do sistema biossensor (eletrodo de oxigênio e tecido fúngico) e análise da influência e necessidade de lavagem do eletrodo de oxigênio a cada leitura

Em seguida, estudos foram realizados visando avaliar a repetibilidade do mesmo e, concomitantemente, a influência da lavagem do transdutor entre as leituras. As curvas de calibração foram traçadas usando um conjunto de pontos experimentais obtidos observando o sinal de saída do transdutor (eletrodo de oxigênio) para um determinado valor do sinal de entrada (faixa de concentração fenólica de 0 a 5ppm). O objetivo foi estudar se o método de análise desenvolvido tinha mesma faixa linear do teste colorimétrico (Apha, 1992). Uma linearidade das respostas indicaria que há uma relação direta entre o *input* (concentração de fenol) e *output* (sinal do eletrodo de oxigênio). Porém, através das curvas obtidas, pode-se verificar que não houve resposta dentro da faixa de concentração de fenol estudada e a repetibilidade dos dados usando o mesmo tecido fúngico de 1,0cm³ sob as condições escolhidas durante o trabalho. Além disso, observou-se que o processo de lavagem não proporcionou melhor resposta do sistema biossensor proposto.

A falta de repetibilidade pode ser devido à formação de melaninas nos interstícios do tecido fúngico usado, fato constatado pelo escurecimento do mesmo. A formação desses produtos de condensação das quinonas leva a aumentos consideráveis do tempo de resposta do biossensor e principalmente à diminuição da sensibilidade do mesmo, uma vez que o polímero formado bloqueia os interstícios da camada biológica do biossensor, dificultando a difusão do analito e também causa diminuição da atividade catalítica da enzima, tirosinase, presente no tecido fúngico (Fatibello-Filho & Vieira, 2002).

Testes de estudo da influência da saturação inicial das soluções em relação ao oxigênio dissolvido, nas leituras do eletrodo de oxigênio

Como a configuração inicial não promoveu resposta linear na faixa estudada, tentou-se adicionar o procedimento de borbulhamento de ar nas soluções por 5 minutos antes da leitura do tempo inicial com o biossensor e aumentar a faixa de estudo para 0 a 10ppm de fenol. Os resultados para verificação da influência deste processo no “teste em branco” são mostrados na Figura 1.

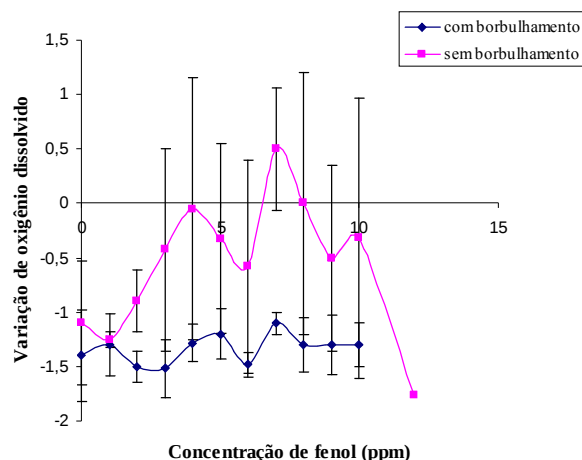


Figura 1: Testes comparativos de influência do borbulhamento de ar antes das leituras com o eletrodo de oxigênio, onde não houve presença do tecido fúngico e nem procedimento de lavagem do eletrodo.

O procedimento testado promoveu menores variações e erros entre as leituras ao longo da faixa de concentração de fenol. Com isso, espera-se que as respostas dos próximos testes com a adição do biocomponente, após o borbulhamento de ar, sofram modificações, tornando-se mais coerentes e com melhor repetibilidade.

Conclusões

Para a montagem do sistema biossensor para análise de compostos fenólicos, a melhor quantidade do biocomponente foi de 5g e o tempo de resposta escolhido foi de 1 minuto. Além disso, o procedimento de lavagem do eletrodo de oxigênio entre as análises não interferiu positivamente na resposta e a etapa de borbulhamento de ar promoveu menor variação entre as leituras do “teste em branco”.

Referências Bibliográficas

- Apha. (1992) *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, 18th ed. American Public Health Association, Inc. New York.
- Carralero, V.; Mena, M. L.; Gonzalez-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P. e Pingarrón, J. M. (2006), Development of a high analytical performance-tyrosinase biosensor based on a composite graphite-Teflon electrode modified with gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, p. 730–736.
- Fatibelo-Filho, O. e Vieira, I. C. (2002), Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 455-464.
- Kochana, J.; Nowak, P.; Jarosz-Wilkolazka, A. e Bieroń, B. (2008), Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*, v. 89, p. 171-174.
- Marín-Zamora, M. E.; Rojas-Melgarejo, F.; García-Cánovas, F. e García-Ruiz, P. A. (2006), Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on D-sorbitol cinnamic ester. *Journal of Biotechnology*, v. 126, n. 3, p. 295-303.
- Rosatto, S. S. (2000), Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e silica modificada. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
- Rosatto, S. S.; Freire, R. S.; Durán, N. e Kubota, L. T. (2001), Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 77-86.
- Sharmat, F. e Rogers, K. (1994), Article review - Biosensors, *Meas Sci. Technology*, v. 5, p. 461-472.
- Silva, R. L. L. (2008), Remoção de cor de efluente sintético com cogumelos *Agaricus bispora*. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Tembe, S.; Inamdar, S.; Haram, S.; Karve, M. e D'Souza, S. F. (2007), Electrochemical biosensor for catechol using agarose–guar gum entrapped tyrosinase. *Journal of Biotechnology*, v. 128, p. 80–85.

Topçu, S.; Sezgintürk, M. K. e Dinçkaya, E. (2004), Evaluations of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 20, p. 592-597.

Zejli, H.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J. L.; Naranjo-Rodriguez, I.; Liu, B.; Temsamani, K. R. e Marty, J. L. (2008), Phenol biosensor based on sonogel-carbon transducer with tyrosinase alumina sol-gel immobilization. *Analytica Chimica Acta*, v. 612, p. 198-203.