



7^{mo}
Congreso de
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

**DETERMINACIÓN DE CONTENIDO FENÓLICO TOTAL EN
AGUA SUPERFICIAL DE DISTINTOS PUNTOS DE LA
PROVINCIA DE SANTA FE – ARGENTINA – HACIENDO USO
DE UN BIOSENSOR ENZIMÁTICO MEDIANTE CALIBRACIÓN
MULTIVARIADA POR CUADRADOS PARCIALES MÍNIMOS, PLS**

**Total phenolic content determination in surface waters from different points of the
province of Santa Fé –Argentina- employing an enzymatic biosensor and partial
least squares multivariate calibration**

Mirta R Alcaraz^{1*}, Silvia N Fabiano¹, María S Cámara²

¹Laboratorio de Sensores y Biosensores, Cátedra de Química Analítica I, Facultad de
Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.
sfabiano@fcb.unl.edu.ar

²Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos, Cátedra de Química Analítica I, Facultad
de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.
mcamara@fcb.unl.edu.ar

* Autor para correspondencia: +54 342 6154477. malcaraz@fcb.unl.edu.ar

*Palabras claves: sensores biológicos, electroquímica, quimiometría, fenoles,
curtiembres*

Keywords: biological sensors, electrochemistry, chemometrics, phenols, tanneries

Título abreviado: Determinación de fenoles con biosensores

ABSTRACT

Phenolic compounds are a group of organic pollutants present in the environment as a result of various processes such as industrial, biogeochemical and as pesticide degradation products. Due to their toxicity and persistence, a number of phenolic compounds have been included in the international legislation. Numerous analytical methodologies have been developed for detecting phenolic compounds, for example, ultraviolet spectrophotometric analyses, gas chromatography, liquid chromatography, and capillary electrophoresis. However, these were time consuming, complex to perform, require samples pre-treatment, and may not be suitable for in situ monitoring. Recently, a large number of efforts have been made for the simple and effective determination of phenolic compounds. Biosensors represent a potential screening method in environmental studies, for instance in the analysis of phenolic compounds. As an analytical detector, biosensors have advantageous properties such as high selectivity and sensitivity. The production cost is also relatively low and the analysis time is short compared to conventional analytical methods.

In this work, the dynamic peak responses from a single amperometric tyrosinase-based sensor are used with multivariate data analysis for quantitative determination of catechol *p*-chlorophenol, phenol and cresol in water samples. Partial least square regression (PLS) was utilized in order to resolve hard overlapped electrochemical signals. Measurements were made with a composite graphite electrode modified with tyrosinase enzyme and Nafion at an applied potential of -0.1 V versus Ag/AgCl by square wave voltammetry (SWV) technique. All experiments were performed at the temperature of 30°C , in the electrochemical cell containing phosphate buffer at $\text{pH}=6.80$. Several groundwater and superficial water samples belonging to localities of Santa Fe were assayed. All the samples were containing catechol and *p*-chlorophenol but they were not phenol and cresols.

RESUMEN

El fenol y sus derivados son contaminantes orgánicos presentes en el medio ambiente como resultado de procesos industriales, biogeoquímicos y como productos de degradación de los pesticidas. Debido a su gran toxicidad y persistencia en el ambiente, éstos están incluidos en la legislación internacional. Se han desarrollado distintas metodologías analíticas para su determinación, como por ejemplo análisis por

espectrometría UV, cromatografía gaseosa, cromatografía líquida, electroforesis capilar; sin embargo estas técnicas consumen tiempo, son complejas de llevar a cabo, requieren pre tratamiento de las muestras y no son convenientes para monitoreo en campo. Es por ello, que se hacen esfuerzos considerables para lograr determinaciones sencillas y efectivas. Los biosensores representan métodos potenciales para el análisis de fenoles debido a sus propiedades de alta sensibilidad y selectividad; siendo el costo de producción relativamente bajo y el tiempo de análisis mucho menor comparado con los métodos convencionales. En este trabajo, se utilizó un biosensor enzimático de tirosinasa para la determinación e identificación de catecol, *p*-clorofenol, fenol y cresoles en muestras de agua de distintas localidades de la provincia de Santa Fe. Ésta se llevó a cabo mediante calibración multivariada de primer orden utilizando la regresión de cuadrados mínimos parciales (PLS-1). Las medidas voltamétricas realizadas por voltametría de onda cuadrada (VOC) se llevaron a cabo a pH 6.80 en una celda de medición con previa incubación a 30°C a un potencial de trabajo de -0.100 V. Todas las muestras evaluadas presentaron catecol y *p*-clorofenol, no encontrándose fenol y cresol en las mismas.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos penetran en los ecosistemas como resultado del drenaje de las aguas residuales municipales e industriales a las aguas superficiales. Por otra parte, la presencia de estos fenoles en el medio ambiente se deriva de la producción y el uso de numerosos plaguicidas, como así también de biocidas fenólicos y pesticidas. Algunos fenoles se forman como resultado de procesos naturales, como la formación de fenol y *p*-cresol durante la descomposición de materia orgánica o la síntesis de fenoles clorados por los hongos y las plantas (Michalowicz & Duda, 2006).

El *fenol* es rápidamente absorbido a través de la piel y del tracto gastrointestinal; además, sus vapores son fácilmente absorbidos por el aparato respiratorio. En humanos, la intoxicación aguda por fenol produce vasodilatación, insuficiencia cardíaca, hipotermia, coma y paro respiratorio (Stellman, 1998).

Una característica importante del fenol es la reactividad que presenta con el cloro. En el proceso de cloración para la desinfección de agua se pueden producir (si el agua contiene fenol o un derivado de éste) *clorofenoles*, ya que el cloro puede sustituir fácilmente a los átomos de hidrogeno del anillo aromático (Baird, 2004). Los compuestos fenólicos clorados, son los biocidas más poderosos, pero también, son los más tóxicos para la salud humana.

Los compuestos fenólicos metilados, denominados *cresoles*, presentan efectos tóxicos similares a los del fenol. Estos pueden ser absorbidos a través de la piel, por el sistema respiratorio y a través del sistema digestivo. Los cresoles son los principales componentes usados por las industrias petroleras, petroquímicas y fotográficas (Stellman, 1998).

El *pirocatecol* o *catecol* es un fenol *o*-hidroxilado y es más tóxico que el fenol. Se usa, particularmente, como antioxidante en las industrias químicas, industrias de procesamiento de caucho y hasta en empresas cosméticas y farmacéuticas (Stellman, 1998).

Dada la toxicidad de estos compuestos sobre organismos vivos, las legislaciones nacionales e internacionales fijan valores máximos permitidos de fenoles en aguas. La

EPA ha determinado que la exposición (no consumo) a una concentración de fenol de 6 mg L⁻¹ en el agua potable durante un período de hasta 10 días no causará efectos adversos en un niño. También ha determinado que la exposición (no consumo) de por vida a 2 mg L⁻¹ de fenol en el agua potable no causará efectos adversos. Por otro lado, la FDA ha determinado que la concentración de fenol en el agua potable para consumo no debe exceder 0.001 mg L⁻¹ (Ambiental, 2008). En nuestro país, existe el Decreto Reglamentario de la Ley 24051 sobre régimen de desechos peligrosos, en el cual se establecen niveles guía de calidad de agua para protección de vida acuática en aguas saladas superficiales. Según este decreto, la cantidad de fenol en agua no debe ser mayor a 1 µg L⁻¹ y no mayor a 30 para clorofenol (Secretaría de ambiente y desarrollo sustentable).

El método de referencia en la Comunidad Europea y adoptado por nuestro país para el análisis de fenoles en agua es un método colorimétrico basado en el acoplamiento oxidativo de fenoles con 4-aminoantipirina en solución alcalina en presencia de ferricianuro de potasio, con el cual se obtiene un producto de reacción coloreado. No es posible usar este método para diferenciar los fenoles, sino que se miden fenoles totales. El límite de detección oscila entre 0.006 y 1.000 mg L⁻¹, dependiendo de las condiciones del medio (Green, 2002).

Los biosensores son sensores químicos que acoplan un transductor electroquímico con una molécula de reconocimiento biocatalítico (Alegret *et al.*, 2006). En este trabajo se utilizó un biosensor de tirosinasa, en el cual la molécula de reconocimiento es la enzima tirosinasa que actúa con su función polifenoloxidasas.

La tirosinasa cataliza la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles en presencia de oxígeno, y además cataliza la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (Ameer & Adeloju, 2009). Estas *o*-quinonas pueden ser electroquímicamente reducidas a catecol sin ningún mediador sobre la superficie electródica.

En este trabajo se utilizó un biosensor de tirosinasa construido y optimizado por nuestro laboratorio con el cual se determinaron compuestos fenólicos en muestras de aguas de distintas calidades tomadas de diferentes localidades de la Provincia de Santa Fe, elegidas teniendo en cuenta que estaban próximas a industrias que utilizan los compuestos estudiados en su proceso.

Una de las desventajas que presenta el método de referencia es la falta de identificación de los compuestos analizados. Es por ello, que se llevó a cabo una calibración multivariada por cuadrados parciales mínimos, PLS (sus siglas en inglés) para poder individualizar cada analito estudiado.

METODOLOGÍA

Instrumentación y equipamiento

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo con un analizador electroquímico modelo Epsilon[®] BioAnalytical System (USA) conectado a un ordenador DELL[®] y controlado desde el software BASI Epsilon EC 2.13.77.

Las mediciones se realizaron en una celda electroquímica con un sistema de tres electrodos compuesto por un electrodo de referencia Ag|AgCl, un electrodo auxiliar de hilo de platino y un electrodo de trabajo de composite grafito epoxi modificado con la enzima.

Los programas informáticos utilizados para la obtención de datos como así también para el procesamiento de los mismos fueron BASI Epsilon EC 2.13.77 de BioAnalytical Systems, Inc., OriginPro[®] 8 SRO de OriginLab Corporation, SPSS[®] Statistics 18 de IBM Company, MatLab[®] 7.8.0 R2009a de The MathWorks, Inc., Statgraphic[®] Plus de Statical Graphics Corp., Desing-Expert[®] 7.0.0. de Stat-Ease, Inc.

Reactivos

La enzima tirosinasa se presentó de manera liofilizada y fue provista por Sigma-Aldrich[®]. El Ácido perfluorosulfónico-copolimer PTFE (Nafion[®]) (Alfa-Aesar) se utilizó directamente, sin dilución previa. El pirocatecol, fenol, p-clorofenol, p-cresol y m-cresol fueron provistos por Sigma-Aldrich[®]. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Todas las soluciones fueron preparadas diariamente con agua ultrapura Milli-Q.

Procedimiento experimental

En primer lugar, la enzima tirosinasa se disolvió en buffer de fosfatos 0.010 mol L^{-1} , pH 7.00, obteniéndose una solución de 25 mg mL^{-1} de tirosinasa. Por último, se fraccionaron y se conservaron en freezer a -20°C .

Para la construcción de los biosensores de tirosinasa se utilizaron electrodos de grafito composite-epoxi, estos últimos contruidos según protocolo descripto anteriormente (Pividori, *et al.*, 2007). La inmovilización de la enzima al transductor se llevo a cabo mediante entrapamiento de la enzima con Nafion.

La solución de inmovilización se preparó mezclando, en un eppendorf, cantidades adecuadas de enzima tirosinasa, ácido perfluorosulfónico-polímero PTFE 5% p/p (Nafion) y solución buffer estabilizada. Todos estos parámetros fueron optimizados mediante diseño experimental.

Para la inmovilización del elemento de biorreconocimiento al transductor electroquímico, se siguió el siguiente protocolo:

1. Pulido de la superficie del electrodo a utilizar, para obtener una superficie espejada, perfectamente lisa.
2. Lavado con ultrasonido durante 2 minutos de los electrodos pulidos, para eliminar restos de polvo que hayan quedado a causa del pulido.
3. Depósito de 5 μ L de la solución de inmovilización sobre la superficie del transductor, en forma homogénea, cubriendo toda la superficie del mismo, evitando el contacto con el cuerpo de PVC.
4. Secado a temperatura ambiente, en un lugar seco y libre de polvo, durante un tiempo no menor a 20 minutos.

La inmovilización se realizó inmediatamente antes de cada determinación y, posteriormente al uso de los electrodos modificados, se procedió a la renovación de la superficie de los mismos mediante un nuevo pulido, pudiendo así ser reutilizados.

En primer lugar, se realizaron voltametrías de onda cuadrada (VOC) con un electrodo de trabajo desnudo, con el objetivo de fijar rangos de potencial tentativos en los cuales se produzca la reducción del sustrato, pero no la oxidación del mismo, ya que es la enzima que lleva a cabo dicha acción. Las condiciones de cada ensayo fueron las siguientes: $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sustrato en buffer PBS 0.100 mol L^{-1} , KCl 0.100 mol L^{-1} pH 6.8.

Una vez fijados los potenciales de reducción para cada sustrato, se realizaron barridos de potencial, mediante VOC en el sentido de reducción, para cada sustrato sobre un electrodo de trabajo desnudo, con el objetivo de verificar que no se produjese la oxidación. Además, se realizaron barridos de potencial del buffer de trabajo en ausencia de sustrato, considerando a éste como blanco de trabajo.

Paso seguido, se realizaron VOC de los sustratos utilizando los biosensores de tirosinasa y se registró la corriente generada por la reducción de las o-quinonas producidas enzimáticamente, de los sustratos individuales. Las señales se registraron cada 20 segundos durante 5 minutos, de manera de analizar el tiempo de reacción de la enzima con el sustrato. Los rangos de potencial fueron de 0.050 a -0.200 V para catecol, de 0.300 a -0.200 V para fenol y 0.050 a 0.300 V para los demás sustratos. En el caso del fenol se registró la corriente en todo el rango de potencial ya que uno de los productos de la reacción enzimática del fenol con la tirosinasa es catecol, lo que podría generar solapamientos de picos de corriente en el rango establecido para el catecol.

También se realizó un estudio de recuperación. Para ello, se le adicionó a cada una de las muestras una cantidad conocida de los distintos sustratos, y se utilizaron mezclas para cubrir 3 niveles de concentración para cada sustrato. El esquema de concentraciones agregadas de cada sustrato se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Esquema de concentraciones agregadas de cada analito a las muestras para realizar los ensayos de recuperación.

Table 1. Concentrations of each analyte added in recovery tests.

	<i>Catecol</i> ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	<i>Fenol</i> ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	<i>Cresol</i> ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	<i>p-Clorofenol</i> ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
	0.2	0.5	0.5	0.5
Niveles de concentración	1.1	1.25	1.25	1.25
	2.0	2.00	2.00	2.00

Fijados los potenciales de barrido y el tiempo de reacción, se llevaron a cabo las curvas de calibración y predicción para mezclas de concentración conocida. Para obtener las concentraciones de las mezclas de calibración se realizó un diseño central compuesto y para las de predicción, un diseño factorial de dos niveles. De esta manera, se obtuvieron 30 mezclas de calibración separadas en 2 bloques para 5 niveles de concentración y 16 de validación separados en 2 bloques para 2 niveles de concentración.

Tratamiento de Muestras

Las muestras se recolectaron en botellas de vidrio de 1 L de capacidad, color caramelo, limpias y secas. La toma de muestra fue puntual y una vez recolectada, estas fueron cerradas, almacenadas y refrigeradas hasta su medición. Las muestras correspondieron

al río Las Toscas de la localidad de Las Toscas, Santa Fe y dos puntos diferentes del Río Salado de la localidad de Sauce Viejo, Santa Fe, agua corriente y agua de pozo de la localidad de Las Toscas y agua superficial de la localidad de Esperanza, Santa Fe. Estas localidades fueron elegidas para el muestreo ya que, en cada una de estas localidades, se encuentran empresas dedicadas al curtido de cuero, las cuales utilizan, en su proceso, alguno de los compuestos fenólicos estudiados. Todas las muestras fueron adecuadamente acondicionadas y reguladas a pH 6.8.

Para verificar si las muestras presentan alguno de los compuestos fenólicos estudiados, en el presente trabajo se procedió a realizar las correspondientes VOC sobre las mismas.

RESULTADOS

Una de las desventajas que presenta la técnica amperométrica es la falta de identificación de sustratos, o sea, al trabajar a potencial fijo y constante, se dificulta la individualización de los sustratos en una mezcla de éstos. Es por ello, que se llevó a cabo una calibración multivariada por cuadrados parciales mínimos, PLS.

En la Figura 1 se puede ver que los voltamogramas de los sustratos no presentaron diferencia alguna en comparación con el voltamograma blanco. Lo que se puede observar es una leve diferencia en la corriente de base, pero esto se debe a que se trabajó con electrodos distintos, por lo que dicha diferencia, se supone, estuvo dada por la variabilidad de los electrodos. Esto significa que, al no producirse la oxidación, el

sustrato no puede reducirse y, por lo tanto, no se observaron picos de corriente. De esta manera, se evidenció la no oxidación debida al potencial de los sustratos estudiados.

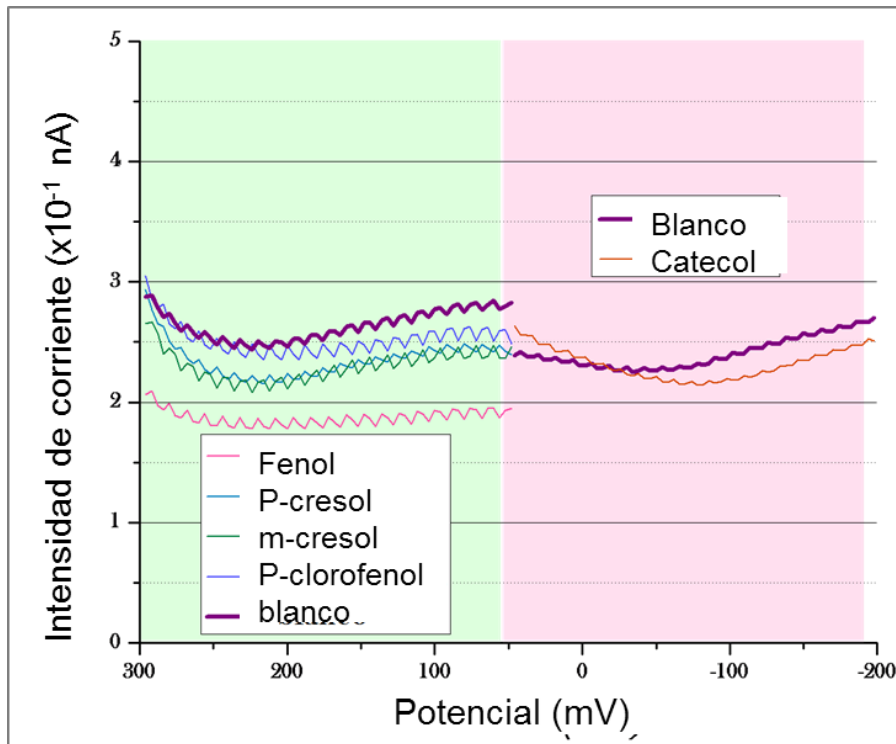


Figura 1. Voltamogramas obtenidos por voltametría de onda cuadrada (VOC) para los sustratos estudiados sobre un electrodo de trabajo sin modificar con la enzima.

Figure 1. Voltammograms obtained by square wave voltammetry (SWV) for all phenolic compounds at composite graphite epoxy working electrode.

Paso seguido, se realizaron las VOC de los sustratos utilizando los biosensores de Tyr y se registró la corriente generada por la reducción de las *o*-quinonas producidas enzimáticamente, de los sustratos individuales de acuerdo a la metodología descrita en el procedimiento experimental. En la Figura 2 se muestran los gráficos correspondientes obtenidos. El criterio de elección quedó definido por el menor tiempo necesario que garantice una respuesta detectable, sin generación de subproductos reactivos.

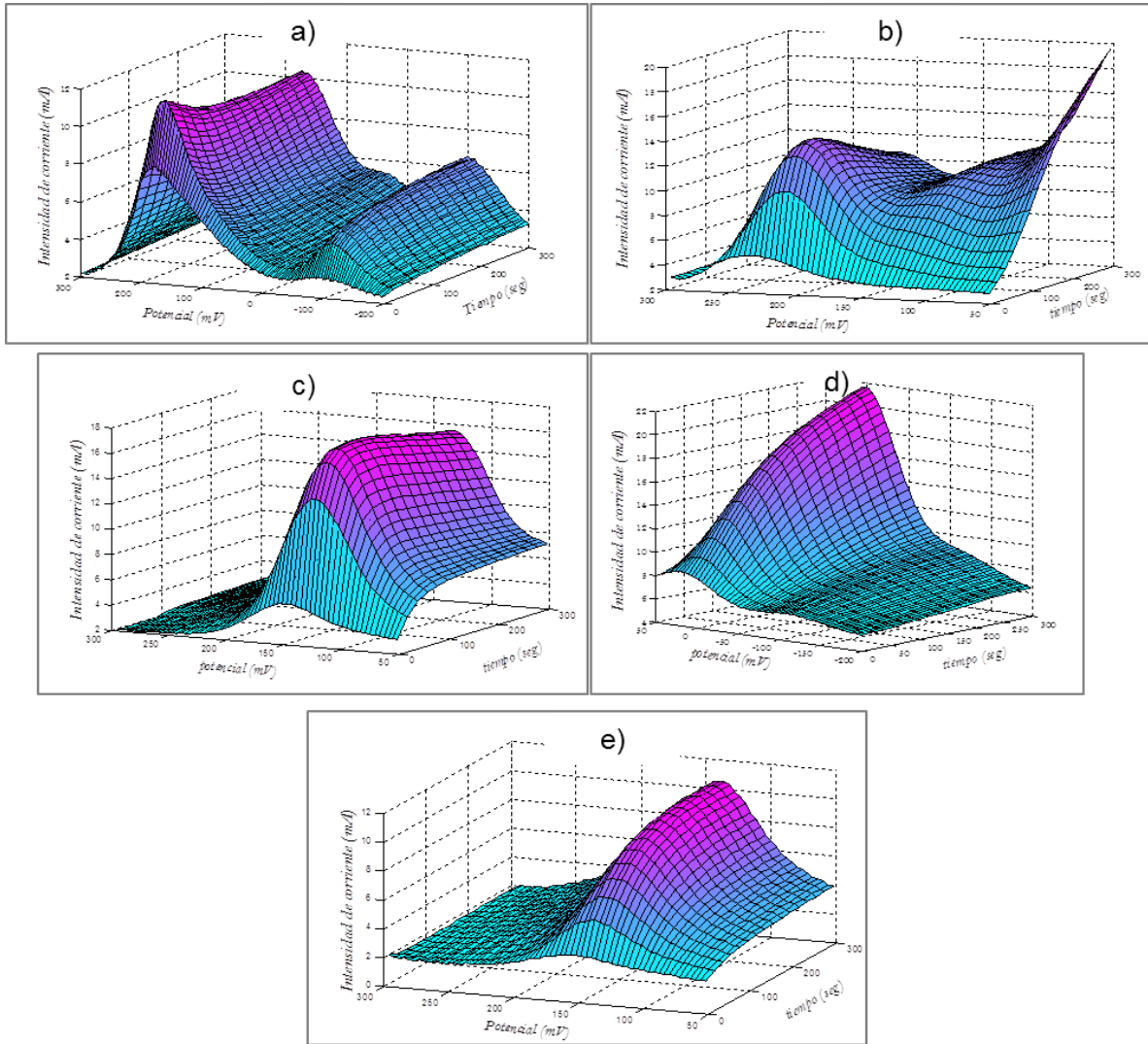


Figura 2. Gráficos de superficie mostrando la interacción de las variables estudiadas para los distintos sustratos.

Figure 2. Three-dimensional response surface plots for studied variables for the different substrates.

El tiempo quedó fijado en 60 segundos, ya que la intensidad de la señal de reducción fue lo suficientemente alta para la determinación de sustratos y mínima para las reacciones de subproductos.

Para el fenol se observa el pico del subproducto de reducción desde el tiempo cero, sin embargo no resultó significativo frente a la señal del catecol a los 60 segundos. En el caso del p-cresol y el m-cresol, los picos de reducción coinciden exactamente en potencial, por lo que a partir de este momento se consideran a éstos como cresoles en general. Así, los rangos de potencial fijados para llevar a cabo la calibración se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados obtenidos para potenciales de reducción y rango de barrido de potencial para llevar a cabo la calibración.

Table 2. Results obtained of reduction potential peaks and optimized scan potentials for the calibration.

	Catecol	Fenol	p-Cresol	m-Cresol	p-Clorofenol
Pico de potencial (V)	0.005	0.180	0.140	0.140	0.210
Potencial inicial (V)	0.050	0.300	0.300	0.300	0.300
Potencial final (V)	-0.200	0.050	0.050	0.050	0.050

Una vez fijados los potenciales de barrido y el tiempo de reacción, se llevaron a cabo las curvas de calibración y predicción para mezclas de concentración conocida. Los datos se procesaron mediante MVC1 en MatLab. En la etapa de calibración, el número de factores se seleccionó por validación cruzada según el criterio de Haaland. El pre-procesamiento utilizado fue SNV, establecido por default. En la Tabla 3 se muestran las cifras de mérito obtenidas mediante PLS1, para cada sustrato estudiado. Los resultados obtenidos para cada sustrato en las mezclas de predicción se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3. Cifras de mérito obtenidas de la calibración multivariada para los distintos analitos.

Table 3. Figures of merit obtained for multivariate calibration of different analytes.

Sustrato	Cifras de mérito			
	Sensibilidad analítica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Selectividad	REM	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Catecol	2.31	0.10	0.004	110.9
Fenol	3.27	0.21	0.047	171.09
Cresol	3.00	0.16	0.002	111.36
p-Clorofenol	0.67	0.15	0.003	199.68

Tabla 4. Porcentajes de recuperación (%R) obtenidos de la calibración multivariada de los distintos sustratos en las mezclas de validación.

Table 4. Recovery experimental results (%R) obtained from multivariate calibration to different substrates in validation mixtures.

Sustrato	Concentración adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentración predicha ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	%R
Catecol	0.2	0.3 ± 0.1	163 ± 50
	2.0	1.9 ± 0.06	91 ± 28
Fenol	0.5	0.7 ± 0.1	142 ± 26
	2.0	1.81 ± 0.02	90 ± 1
Cresol	0.5	0.7 ± 0.2	140 ± 40
	2.0	1.9 ± 0.1	99 ± 6
p-Clorofenol	0.5	0.6 ± 0.3	120 ± 58
	2.0	1.6 ± 0.2	80 ± 11

Para verificar si las muestras presentan alguno de los compuestos fenólicos estudiados en la presente tesina, se realizaron VOC a las muestras, en los rangos detallados en la tabla 2.

Obtenidos los voltamogramas de cada muestra, se confeccionaron matrices de señal.

Posteriormente, se procesaron los datos mediante MVC1 en MatLab En este caso, no

hay vectores de concentración ya que la concentración de las muestras es, hasta el momento, desconocida. Los resultados obtenidos de la presencia o ausencia de cada contenido fenólica en cada muestra se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Contenido de los compuestos fenólicos en las diferentes muestras de agua.

Table 5. Concentrations of phenolic compounds identified in water samples from different sources.

<i>Tipo de muestra</i>	<i>Catecol</i> ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	<i>Fenol</i> ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	<i>Cresol</i> ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	<i>p-Clorofenol</i> ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Agua del río Las Toscas	1.0 \pm 0.5	ND	ND*	2 \pm 1
Agua del río El Salado (M1)	0.19 \pm 0.05	ND	ND	0.6 \pm 0.1
Agua del río El Salado (M2)	0.4 \pm 0.3	ND	ND	1.0 \pm 0.5
Agua potable Las Toscas	0.37 \pm 0.09	ND	ND	1.9 \pm 0.4
Agua de Pozo Las Toscas	0.8 \pm 0.2	ND	ND	0.68 \pm 0.08
Agua superficial de Esperanza (M1)	1.0 \pm 0.5	ND	ND	0.8 \pm 0.2
Agua superficial de Esperanza (M2)	0.8 \pm 0.2	ND	ND	0.30 \pm 0.01

* ND=No detectado M1= muestra 1 M2= muestra 2

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que todas las muestras presentaron catecol y p-clorofenol. No se encontraron vestigios de fenol ni de cresol. Para los ensayos de recuperación, se le adicionó a cada una de las muestras una cantidad conocida de los distintos sustratos cuyas concentraciones se muestran en la Tabla 1 de la parte experimental. Los % de recuperación para las distintas muestras se observan en la Tabla 6.

Tabla 6. Porcentajes de recuperación (%R) de los diferentes sustratos en las distintas muestras de agua.

Table 6. Recovery experimental results (%R) obtained to phenolic compounds in different samples of water.

Muestra	Sustrato	Concentración adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentración predicha ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	%R	
Agua del río Las Toscas	Catecol	0.20	0.11	55.0	
		1.10	1.00	90.9	
		3.00	2.90	101.0	
	Fenol	0.50	0.37	74.0	
		1.25	1.31	104.8	
		2.00	2.02	101.0	
	Cresol	0.5	0.64	128.0	
		1.25	1.17	93.6	
		2.00	1.42	71.0	
p-Clorofenol	0.50	0.47	94.0		
	1.25	1.71	136.8		
	2.00	2.39	119.5		
Agua del río El Salado (muestra 1)	Catecol	0.20	0.23	101.8	
		1.10	1.12	115.0	
		3.00	3.13	101.0	
	Fenol	0.50	0.41	81.8	
		1.25	1.19	95.2	
		2.00	2.45	122.5	
	Cresol	0.50	0.26	75.0	
		1.25	0.95	52.0	
		2.00	1.47	73.5	
	p-Clorofenol	0.50	0.52	122.4	
		1.25	1.53	104.0	
		2.00	1.98	99.0	
	Agua del río El Salado (muestra 1)	Catecol	0.20	0.80	72.7
			1.10	0.90	45.0
			3.00	2.78	100.9
Fenol		0.50	0.52	102	
		1.25	0.98	78.4	
		2.00	2.21	110.5	
Cresol		0.50	0.46	92	
		1.25	1.35	108	
		2.00	1.89	94.5	
p-Clorofenol		0.50	0.56	112.0	
		1.25	1.11	88.8	
		2.00	2.10	105.0	
Agua potable Las Toscas		Catecol	0.20	0.40	200
			1.10	1.40	127.3
			3.00	3.12	101.0

	Fenol	0.50	0.32	64.0
		1.25	0.73	58.4
		2.00	1.95	97.5
	Cresol	0.50	0.59	118.0
		1.25	1.34	107.2
		2.00	1.81	90.5
	p-Clorofenol	0.50	0.52	104.0
		1.25	1.30	104.0
		2.00	2.34	117.0
Agua de Pozo	Catecol	0.20	0.80	90.0
		1.10	0.18	72.7
Las Toscas		3.00	2.75	100.9
	Fenol	0.50	0.69	138.0
		1.25	1.96	156.8
		2.00	2.06	103.05
	Cresol	0.50	0.95	190.0
		1.25	1.30	104.0
		2.00	1.83	91.5
	p-Clorofenol	0.50	0.45	87.2
		1.25	1.09	90.0
		2.00	2.04	102.0
Agua superficial de Esperanza	Catecol	0.20	0.28	140.0
		1.10	1.23	111.8
		3.00	2.92	101.0
(muestra 1)	Fenol	0.50	0.58	116.0
		1.25	1.12	89.6
		2.00	2.13	106.5
	Cresol	0.50	0.53	106.0
		1.25	1.17	93.6
		2.00	1.47	73.5
	p-Clorofenol	0.50	0.67	134.0
		1.25	1.34	107.2
		2.00	2.21	110.5
Agua superficial de Esperanza (muestra 2)	Catecol	0.20	0.15	75.0
		1.10	0.98	89.1
		3.00	3.23	101.1
	Fenol	0.50	0.57	114.0
		1.25	0.74	59.2
		2.00	1.55	77.5
	Cresol	0.50	0.88	176.0
		1.25	1.52	121.6
		2.00	1.78	89.0
	p-Clorofenol	0.50	0.32	64.0
		1.25	1.12	89.6
		2.00	1.72	86.0

Para todas las muestras se realizó un análisis utilizando la gráfica de elipse, con el objetivo de evaluar la exactitud y la precisión de la recuperación. Este método se utilizó para comparar una población de datos contra un valor nominal. En la figura 3 se muestran las gráficas correspondientes para cada muestra por separado.

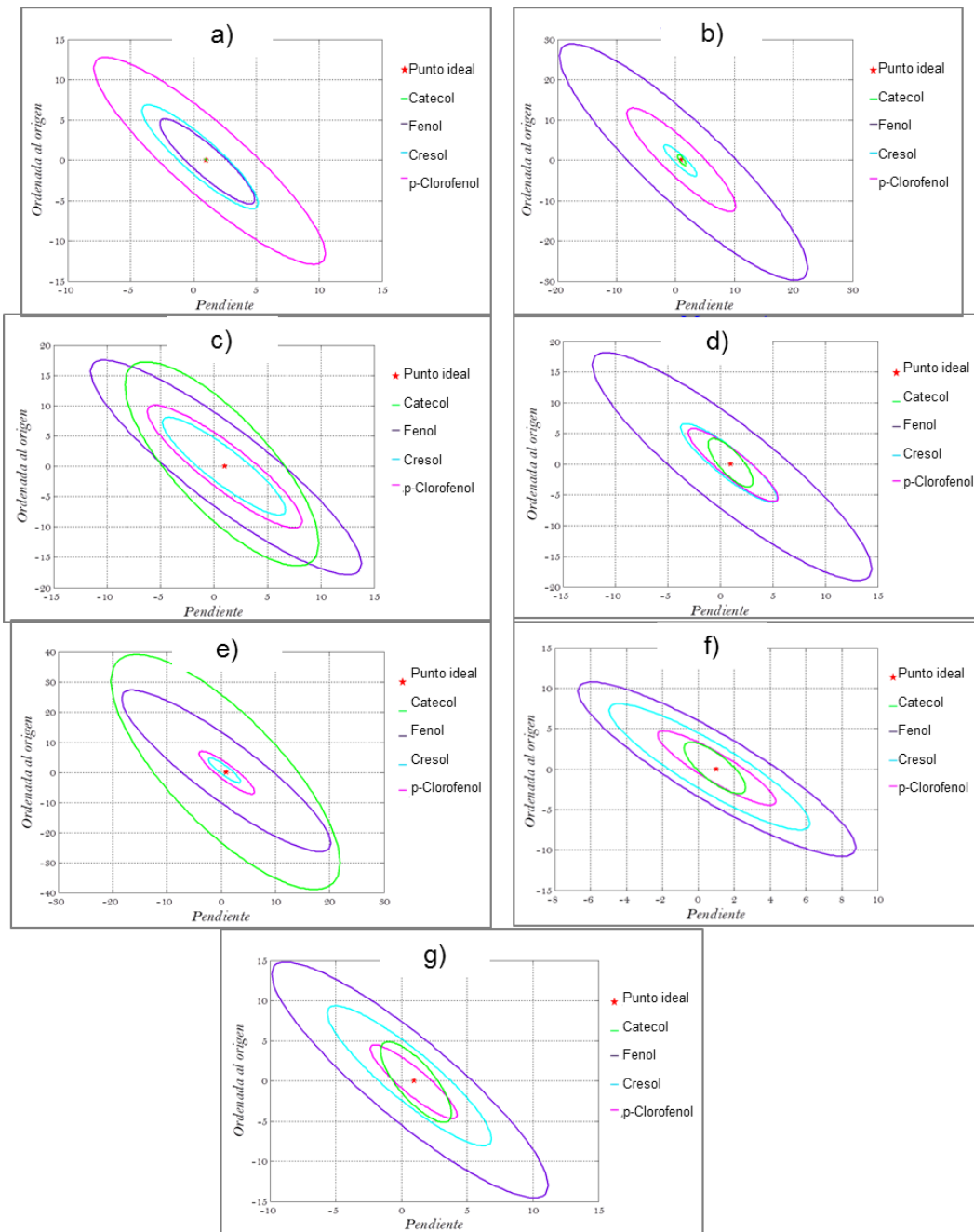


Figura 3. Gráficas de tipo elipse construidas con método OLS para los distintos sustratos en las siguientes muestras: a) agua del Río Las Toscas, b) agua del Río Salado (muestra 1), c) del Río Salado (muestra 2), d) agua potable Las Toscas, e) agua de pozo

Las Toscas, f) agua superficial Esperanza (muestra 1), g) agua superficial Esperanza (muestra 2).

Figure 3. EJCR test results using OLS method for the different phenolic compounds in the following samples of water: a) Las Toscas river, b) Salado river (sample 1), c) Salado river (sample 2), d) drinking water from Las Toscas, e) groundwater from Las Toscas, f) superficial water from Esperanza (sample 1), g) superficial water from Esperanza (sample 2). The ellipses show ideal points (1,0).

Claramente se ve que el método de recuperación fue exacto para todos los sustratos en todas las muestras, si bien no preciso para algunos de ellos, ya que la amplitud de la elipse con respecto al punto ideal fue muy grande.

El tiempo que demandó la recuperación, es decir, el tiempo que se necesitó para evaluar la presencia de fenoles simples en muestras de agua fue de 2 minutos, que es el tiempo que demanda la corrida de la voltametría de onda cuadrada.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que los electrodos composite grafito-epoxi (GEC) constituyen sensores robustos que pueden ser utilizados para la construcción de biosensores enzimáticos, estos constituyen una alternativa para la construcción de sensores químicos más económicos, con materiales de origen nacional.

Se logró diseñar y desarrollar un biosensor de tirosinasa para la detección e identificación de fenoles simples en aguas residuales, sin pérdida de actividad de la enzima y con una precisión adecuada.

Se consiguió optimizar una metodología cuantitativa sencilla, rápida y eficiente basada en voltametría de onda cuadrada para la detección, identificación y cuantificación de fenoles simples en agua residuales, con un tiempo total de ensayo de 5 minutos.

El método desarrollado presentó un Límite de detección (LOD) entre 110-200 $\mu\text{g L}^{-1}$, según el compuesto y, si bien no son tan bajos como se requiere para aguas potables de consumo (1 $\mu\text{g L}^{-1}$), se encuentran por debajo de los límites establecidos para aguas residuales y potables de no consumo (6-10 mg L^{-1}).

Los ensayos realizados en muestras reales de agua permitieron comprobar que el método de calibración multivariada resultó de utilidad para la determinación de compuestos fenólicos simples en esta matriz. En las experiencias realizadas se obtuvieron buenos resultados de recuperación. Debe considerarse que las muestras fueron analizadas sin pre-tratamiento. Todas las muestras presentaron catecol y p-clorofenol. No se encontraron vestigios de fenol ni de cresol.

AGRADECIMIENTOS

El grupo de investigación del Laboratorio de Sensores y Biosensores de la UNL agradece a la Dra. María Isabel Pividori y su grupo de trabajo de la Universidad Autónoma de Barcelona, España, por su colaboración en la formación de recursos humanos y en la provisión de algunos reactivos de laboratorio que se utilizaron para el desarrollo de este trabajo de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alegret S, Merkoçi A, Pividori M & del Valle M. 2006. Electrochemical (Bio)Sensors Based on Rigid Conducting Carbon-Polymer Composites. P 1-22
En: Grimes ECCA, *Encyclopedia of Sensors*. American Scientific Publishers, Barcelona
- Ambiental D d. 2008. Fenol. *ATSDR* , Madrid, en prensa
- Ameer Q & Adeloju S. 2009. Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 140: 5-11
- Baird C. 2004. *Química Ambiental*. Reverté, Barcelona
- Green C. 2002. *Phenolics, Total Recoverable*. Spectrophotometric, Manual 4-AAP With
Distillation, Division of Water Quality Laboratory Section, Cincinnati
- Michalowicz J & Duda W. 2006. Phenol-Sources and Toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(3): 3347-362
- Stellman JM. 1998. *Encyclopaedia of occupational Health and Safety*. 4ta ed. International Labour Office, Geneva
- Secretaria de ambiente y desarrollo sustentable
<http://www.ambiente.gov.ar/?aplicacion=normativa&IdSeccion=3&IdNorma=5>
[38](#)