

“BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS MULTICOMPONENTE PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS”

Os compostos fenólicos constituem-se numa das classes de compostos orgânicos de maior relevância. Estes compostos despertam interesse sob vários pontos de vista, tais como: 1) clínico e farmacológico - vários neurotransmissores e medicamentos possuem estrutura fenólica; 2) alimentício – alguns derivados fenólicos são responsáveis pelas propriedades organolépticas de muitas frutas e flores, e influem na qualidade de, por exemplo, azeites e bebidas (principalmente sucos e vinhos); 3) industrial - esta classe de composto é empregada nos processos de produção de plásticos, corantes, desinfetantes, resinas, polímeros sintéticos, pesticidas, papel e celulose, etc.; 4) ambiental – os produtos de degradação de muitos pesticidas e as atividades industriais acima descritas são responsáveis por um elevado grau de contaminação ambiental de solos e corpos d'água pelos compostos fenólicos (Nistor e col., Anal Chim Acta 387 (1999) 309; Rossato e col., Quim Nova 24 (2001) 77). A contaminação ambiental por fenóis merece destaque, uma vez que fenóis substituídos, como cloro e nitrofenóis, são altamente tóxicos para o homem. Mesmo em pequenas concentrações ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$), os compostos fenólicos afetam o gosto e odor de águas potáveis e peixes. Muitos destes compostos possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois facilmente penetram pela pele e membranas celulares, determinando um amplo espectro de genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos hepatotóxicos (Russel e Burton, Anal Chim Acta 389 (1999) 161).

Dentro deste contexto, é importante contar com novas metodologias de determinação e quantificação dos diversos tipos de compostos fenólicos, com rapidez, seletividade e sensibilidade. Biossensores apresentam-se como uma ferramenta ideal no monitoramento desta classe de composto, principalmente devido a sua habilidade em operar com matrizes complexas, respostas rápidas e dimensões pequenas (Dennison e col., Biotech. Adv. 13 (1995) 1). Nos últimos anos biossensores eletroquímicos modificados com as enzimas tirosinase (Russel e col., Anal Chim Acta 389 (1999) 161), HRP (Rosatto e col., Anal. Chim. Acta 390 (1999) 65) e lacase (Yaropolov e col., Anal. Chim. Acta, 308 (1995) 137; Bogdanovs e col.,

Patente DD280790-A; Kubota e col., Patente PI 0004323) têm sido desenvolvidos para a determinação de fenóis.

Lacase e tirosinase são oxidases que contém cobre e catalisam a redução de oxigênio molecular por diferentes doadores de elétrons, como por exemplo, compostos fenólicos. A oxidação de fenóis por essas enzimas é dada por uma seqüência de reações similares, as moléculas de enzima na superfície do eletrodo são oxidadas pelo oxigênio, sendo em seguida reduzida pelos compostos fenólicos. Durante esta última reação, os fenóis são basicamente convertidos em quinonas e/ou radicais livres, e esses produtos, eletroativos, são reduzidos na superfície do eletrodo em potenciais próximos de 0 V vs ECS (eletrodo de calomelano saturado). A corrente de redução medida é proporcional à concentração do composto fenólico na solução (Marko Varga e col., Trends Anal Chem 14 (1995) 319).

O sistema apresentado neste processo foi desenvolvido utilizando-se eletrodos de fibra de carbono; lacase; tirosinase e um potenciostato multicanal.

Antes da imobilização das enzimas as fibras foram pré-tratadas com a aplicação de um potencial estacionário em meio tamponado. Após este processo a imobilização das enzimas sobre as fibras de carbono foi realizada por ligação covalente com carbodiimida/glutaraldeído.

O efeito do potencial aplicado e do pH na resposta dos biossensores a base de lacase e tirosinase foi avaliado, obtendo-se para ambos os biossensores uma resposta máxima em pH próximo a 5,0 e potencial aplicado de -100 mV. Apesar destes biossensores apresentarem uma resposta semelhante frente a variação de pH e potencial, observou-se que eles apresentavam diferentes respostas relativas para compostos fenólicos distintos. A Tabela 1 apresenta uma comparação da resposta relativa para diferentes compostos fenólicos obtida com os biossensores a base de lacase e tirosinase.

A determinação simultânea de compostos fenólicos é de grande interesse em várias áreas. Na maior parte dos trabalhos descritos, a determinação de espécies fenólicas é realizada após uma etapa de separação química e/ou física. Esta estratégia é bastante importante, mas o consumo de reagentes, tempo e geração de resíduos são geralmente altos. Além disso, os compostos fenólicos são, de um

modo geral, instáveis e podem se decompor durante as etapas de pré-tratamento. Deste modo, o desenvolvimento de novos métodos que possibilitem a determinação simultânea destas espécies sem separação prévia é um tema de extrema relevância (Kubota e col., Anal Chim Acta 420 (2000) 109).

5 No sistema amperométrico aqui descrito, utilizou-se a diferença de sensibilidade entre os biossensores a base de lacase e tirosinase frente a diferentes compostos fenólicos, aliada a técnicas de calibração multivariada (PCA e PLS) para a determinação quantitativa de misturas de espécies fenólicas. Utilizando-se um potenciostato multicanal, os biossensores a base de lacase e tirosinase foram
10 monitorados simultaneamente. A aplicabilidade deste sistema, na determinação de espécies fenólicas, foi confirmada, num primeiro estágio, em misturas binárias de fenol/clorofenol, catecol/fenol, cresol/clorocresol e fenol/cresol. Para cada mistura, foram obtidos conjuntos de calibração e validação dos modelos, que foram modelados empregando-se o algoritmo quimiométrico PLS com dois componentes
15 principais e com dados de corrente monitoradas em três potenciais diferentes. As Figuras 1 e 2 mostram os resultados obtidos para a mistura fenol/clorofenol. O desvio padrão médio entre os valores previstos e adicionados obtido pelo modelo de validação foi de 3,5% e 3,1% para fenol e clorofenol, respectivamente. Estes valores, juntamente com o coeficiente de correlação (r^2); 0,9958 para fenol e 0,9981
20 para clorofenol; indicam que o modelo proposto apresenta uma excelente eficácia na determinação e quantificação simultânea destas espécies fenólicas. Uma eficiência da mesma ordem foi observada empregando-se as misturas de catecol/fenol (Figuras 3 e 4), cresol/clorocresol (Figuras 5 e 6) e fenol/cresol (Figuras 7 e 8), conforme mostra a Tabela 2.

25 O sistema de biossensores amperométricos multicomponente também apresentou uma excelente sensibilidade, conforme mostram as Figuras de 1 à 8, onde pode-se observar que a concentração das espécies fenólicas analisadas situavam-se entre $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $8 \mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, o sistema também está capacitado para ser empregado em análise de amostras com concentrações
30 algumas ordens de grandeza inferiores.

O sistema desenvolvido para a análise simultânea de compostos fenólicos

em misturas mostrou-se extremamente eficiente na detecção e quantificação de diferentes compostos fenólicos e clorofenólicos em diferentes matrizes. A versatilidade deste sistema, torna-o ideal para monitoramento ambiental de efluentes industriais, contribuindo para diminuir o tempo e o custo envolvidos na análise de poluentes, proporcionando uma melhor eficiência no gerenciamento ambiental.

Tabela 1

Composto	LACASE		TIROSINASE	
	Sensibilidade (nA/ μ mol L ⁻¹)	Resposta relativa (%)	Sensibilidade (nA/ μ mol L ⁻¹)	Resposta relativa (%)
Catecol	80,3	100,0	45,7	100,0
Hidroquinona	9,8	15,0	2,2	2,3
Fenol	0,4	2,6	14,2	25,0
Clorofenol	0,1	1,9	20,0	41,0
Cresol	0,7	4,1	4,5	9,0
Clorocresol	0,6	3,7	30,7	52,0
Guaiacol	17,6	26,3	0,2	0,4
Cloroguaiacol	4,8	10,8	0,2	0,3

Tabela 2

Mistura composto1/composto2	Composto 1		Composto 2	
	SEP	Desvio padrão (%)	SEP	Desvio padrão (%)
Catecol/fenol	0,0852	2,1	0,1603	3,5
Fenol/clorofenol	0,2344	3,5	0,1728	3,1
Cresol/clorocresol	0,5029	6,5	0,1553	2,6
Fenol/cresol	0,0931	1,8	0,2116	3,5

REIVINDICAÇÕES

1. **“BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS MULTICOMPONENTE PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS”**, caracterizado por desenvolver, descrever, montar e otimizar um sistema amperométrico, capaz de
5 determinar e quantificar simultaneamente diferentes compostos fenólicos em uma mistura sem nenhuma etapa prévia de tratamento ou separação.
2. **“BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS MULTICOMPONENTE PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS”**, caracterizado por imobilizar lacase e tirosinase em eletrodos de materiais carbonáceos,
10 principalmente em fibra de carbono, para determinar compostos fenólicos.
3. **“BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS MULTICOMPONENTE PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS”**, caracterizado por usar um potenciostato multicanal para monitorar simultaneamente diferentes biossensores amperométricos.
- 15 4. **“BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS MULTICOMPONENTE PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS”**, caracterizado por usar técnicas de calibração multivariada, algoritmos PCA e PLS, no tratamento dos dados de monitoramento dos biossensores.
- 20 5. **“BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS MULTICOMPONENTE PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS”**, caracterizado por usar o sistema de biossensores amperométricos em análises de amostras de interesse clínico, industrial e ambiental.

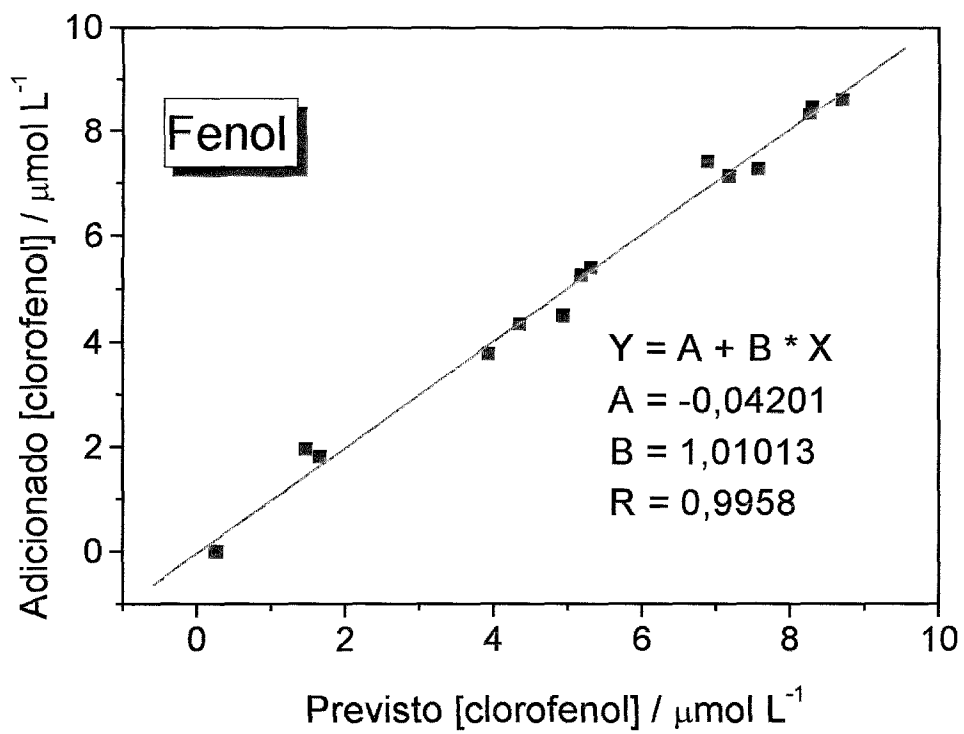


Figura 1

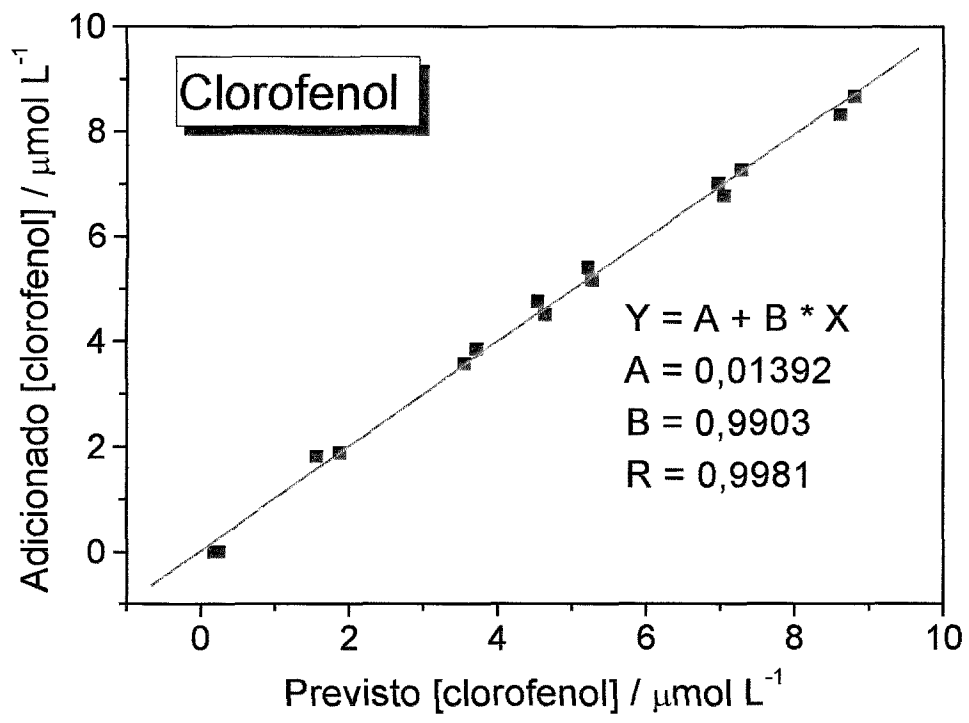


Figura 2

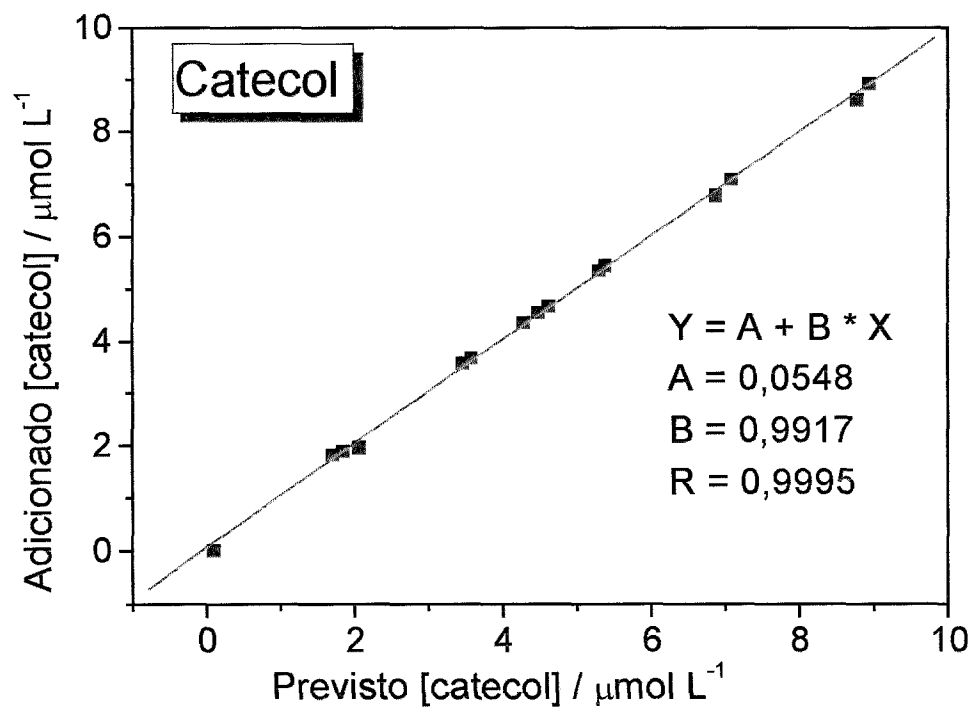


Figura 3

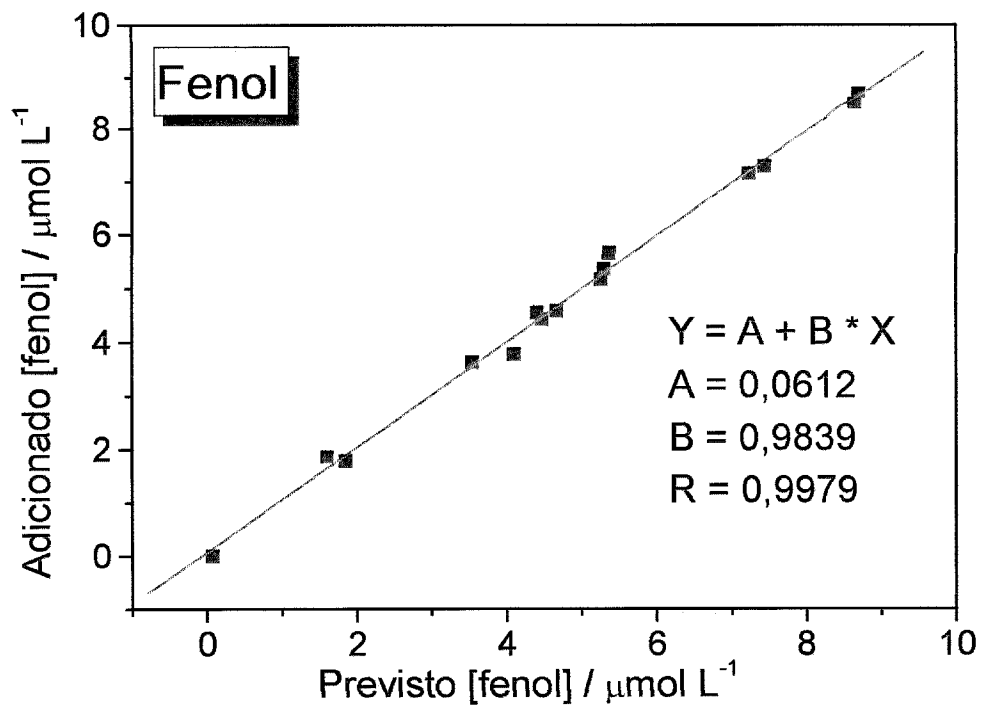


Figura 4

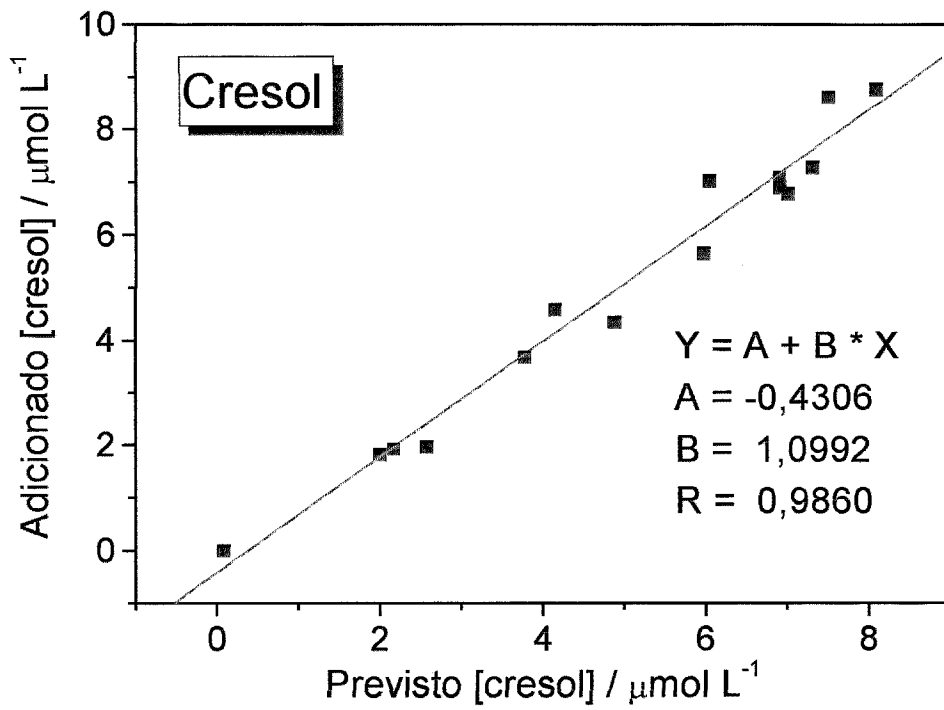


Figura 5

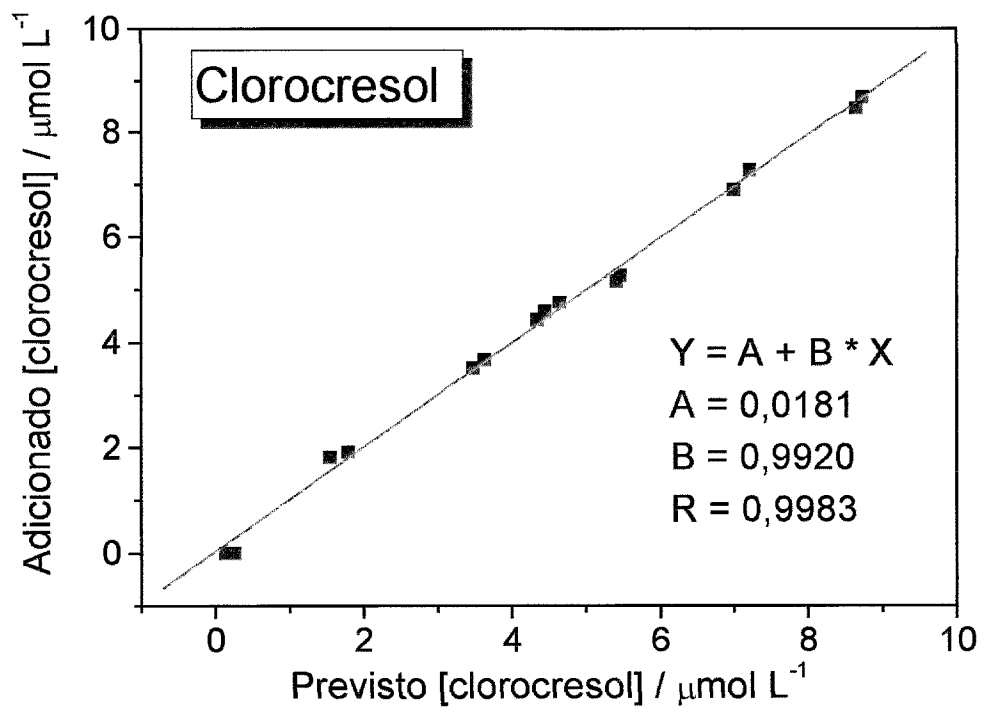


Figura 6

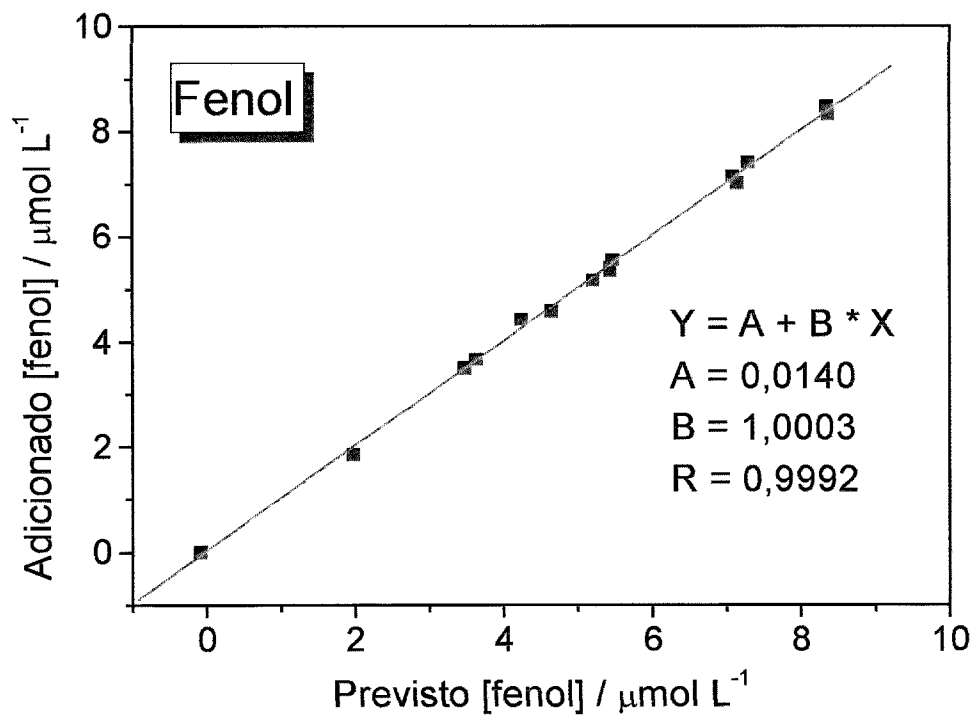


Figura 7

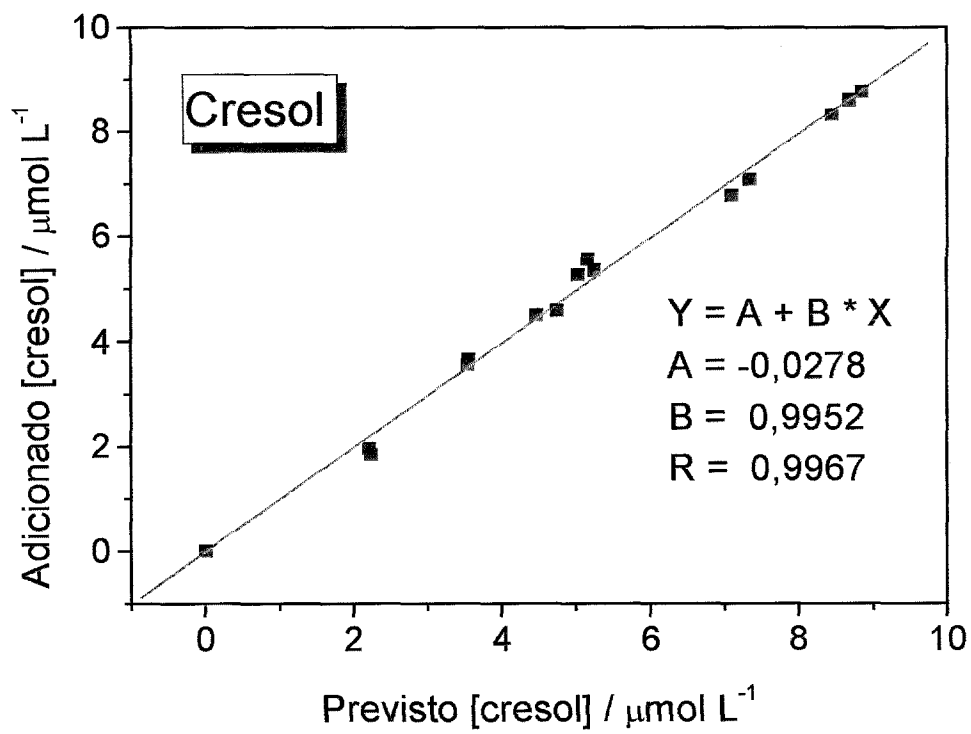


Figura 8

RESUMO

“BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS MULTICOMPONENTE PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS”

5 Este processo descreve o desenvolvimento de um sistema amperométrico multicanal que emprega biossensores e calibração multivariada (PCA e PLS) na determinação e quantificação simultânea de diferentes compostos fenólicos.

10 As enzimas lacase (extrato bruto) e tirosinase foram imobilizadas em eletrodos de fibra de carbono utilizando-se carbodiimida e glutaraldeído. Estes biossensores apresentaram diferentes sensibilidades para compostos fenólicos distintos. Utilizando-se um potenciostato multicanal os biossensores de lacase e tirosinase foram monitorados simultaneamente. A aplicabilidade deste sistema na determinação quantitativa de misturas de espécies fenólicas foi avaliada em misturas binárias de fenol/clorofenol, catecol/fenol, cresol/clorocresol e fenol/cresol. Os resultados obtidos com estes conjuntos de compostos mostraram uma excelente
15 eficácia na determinação quantitativa e simultânea de uma grande gama de espécies fenólicas, sem a necessidade de nenhuma etapa prévia de separação ou pré-tratamento. Demonstrando que este sistema pode ser empregado com eficiência na análise de amostras de interesse clínico, industrial e ambiental.