

BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE FENÓIS USANDO UM EXTRATO BRUTO DE INHAME (*Alocasia macrorrhiza*)

Cássia Aparecida Signori

Instituto de Química da UNESP - Araraquara - Caixa Postal 355 - CEP. 14800-900 - Araraquara - SP

Orlando Fatibello Filho

Laboratório de Eletroanalítica e Bioanalítica - Departamento de Química - UFSCar - Caixa Postal 676 - CEP. 13560-970 - São Carlos - SP

Recebido em 7/6/93; cópia revisada em 9/9/93

Crude extracts of various vegetables and fruits such as eggplant (*Solanum melongena*), potato (*Solanum tuberosum*), manioc (*Manihot utilissima*), yam (*Alocasia macrorrhiza*), apple (*Pirus malus*), dwarf banana (*Musa acuminata*), apple-flavored banana (*Musa parasidiaca*), most common variety of banana—"banana-prata" (*Musa parasidiaca*), pear (*Pirus communis*) and peach (*Prunus persica*) are studied as a biocatalytic material for the aerobic oxidation of phenolic substrates. Of those, yam (*Alocasia macrorrhiza*) crude extract is found to be the best source of polyphenol oxidase [E.C.1.10.3.1], due their stability and/or activity (u/mg). Thus, an amperometric biosensor is constructed by the immobilization of yam crude extract with glutaraldehyde and bovine serum albumin onto an oxygen electrode. The proposed bioamperometric sensor provides a linear response for pyrogallol, catechol, phenol and p-cresol in the concentration ranges of 2.5×10^{-5} — 8.0×10^{-5} M; 1.0×10^{-5} — 8.5×10^{-5} M; 1.0×10^{-5} — 9.0×10^{-5} M and 1.0×10^{-5} — 1.0×10^{-4} M respectively; with response time of 1-4 min. and a useful lifetime of at least two weeks. Application of this biosensor for the determination of phenols in local industries waste waters is presented.

Keywords: enzyme electrode; phenolic substrates; catechol; pyrogallol; yam crude extract.

INTRODUÇÃO

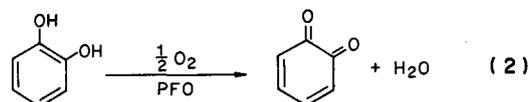
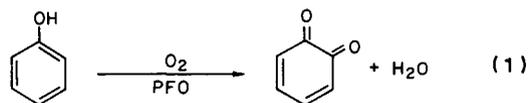
Tem aumentado o interesse da aplicação de extratos brutos e/ou tecidos vegetais em lugar de enzimas purificadas na construção de biossensores^{1,2}. Macholán e Shánel^{3,4} empregaram a polifenol oxidase de cogumelos e batatas imobilizada sobre uma membrana externa de um eletrodo de oxigênio para determinar substratos fenólicos em águas residuais de cozinhas industriais. Neujam⁵ determinou catecol em urina humana e em fígado de galinha usando um biossensor contendo a enzima Catecol 1,2-oxigenase imobilizada diretamente sobre a membrana de teflon de um eletrodo de oxigênio. Uchiyama et al⁶ desenvolveram um biossensor seletivo a catecol utilizando folhas de espinafre picadas suportadas por uma membrana de diálise (Technicon "C"). Pedacos de beterraba foram afixados em um eletrodo de oxigênio, por Schubert et al⁷ para determinar tirosina em um intervalo de concentração de 30 a 900 $\mu\text{mol/L}$. Rechnitz et al⁸ construíram um eletrodo de pasta de carbono contendo pedacos de beringela para determinação de catecol em concentrações da ordem de micromolar. Botre et al⁹ desenvolveram um biossensor seletivo à catecol utilizando um eletrodo de oxigênio com uma fatia pequena de tecido de batata (diâmetro 10mm e espessura 100 μm) afixada em uma membrana de diálise.

Desenvolveu-se no presente trabalho, um biossensor para substratos fenólicos utilizando como fonte enzimática extrato bruto de polifenol oxidase oriundo de diversos vegetais e frutas como inhame (*Alocasia macrorrhiza*), mandioca (*Manihot utilissima*), batata (*Solanum tuberosum*), beringela (*Solanum melongena*), pêssego (*Prunus persica*), maçã, (*Pirus malus*), banana nanica (*Musa acuminata*), banana prata (*Musa parasidiaca*), pera (*Pirus communis*) e banana maçã, (*Musa parasidiaca*), imobilizado com glutaraldeído, sobre uma membrana de acetato de celulose de um eletrodo de oxigênio.

Polifenol oxidase (PFO) catalisa a oxidação de monofenóis (eq.1) e difenóis (eq.2) pelo oxigênio molecular¹⁰⁻¹² com produção de quinonas. As quinonas formadas nessas reações polimerizam-se formando melaninas.

O decréscimo da concentração de oxigênio nas reações enzimáticas (equações 1 e 2) é inversamente proporcional as concentrações dos substratos fenólicos. Assim, os fenóis (pirogallol, catecol, fenol e p-cresol) podem ser dosados diretamente em soluções com esse biossensor.

Daqueles tecidos vegetais estudados, o inhame (*Alocasia macrorrhiza*) apresentou os melhores resultados, desta maneira foi usado na construção do biossensor.



EXPERIMENTAL

Aparelhos

O eletrodo amperométrico utilizado foi um eletrodo de oxigênio da FAC, modelo 203 A, que consiste de um cátodo de platina e um ânodo de Ag/AgCl com um potencial de polarização de -600mv. Todas as medições amperométricas foram feitas sob agitação constante, em célula de vidro de 30 ml

termostatizada a $25,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$, por meio de um analisador de oxigênio da FAC, modelo 204 A (São Carlos/S.P.). O eletrodo de oxigênio foi previamente calibrado em 0% de oxigênio com uma solução saturada de bissulfito de sódio (Carlo Erba) e em 100% de oxigênio com uma solução saturada de O_2 .

O espectrofotômetro de absorção molecular utilizado foi o Micronal, modelo B 342 II.

A centrífuga utilizada foi a Du Pont Instruments Sorvael, modelo RC-5B, provida de rotor com diâmetro igual a 23 cm, modelo SS-34.

Reagentes

Reagentes de grau analítico foram usados, para preparar tampões e soluções padrão. Catecol, fenol, p-cresol e pirogalol foram obtidos da Sigma Chemical Co (St.Louis,Mo,USA) e suas soluções foram preparadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0. Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada.

Procedimento

Obtenção do extrato bruto

Cem gramas do vegetal e/ou fruta, descascados e picados em pequenos pedaços, foram homogeneizados em liquidificador com 200ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, contendo 10 g de policlar A.T. (Polivinil Pirrolidona, PVP) durante 15 minutos. Utilizou-se policlar A.T. para diminuir a oxidação da enzima *polifenol oxidase* durante o processo. A seguir, o material foi filtrado em gase e centrifugado à 16000 r.p.m. durante 30 min., a 5°C . As soluções sobrenadantes foram armazenadas em refrigerador a 4°C utilizadas como fonte enzimática na construção dos biossensores.

Determinação da atividade da *polifenol oxidase* e proteína total

A atividade da *polifenol oxidase* solúvel presente nos vegetais e/ou frutas foi determinada pela medida de absorbância em $\lambda = 410 \text{ nm}$, da melanina resultante da polimerização da quinona, formada após a reação entre 0,2 ml da solução sobrenadante e 2,8 ml de solução 0,05M de catecol em tampão fosfato 0,1M (pH 7,0), a 25°C . A reação foi monitorada durante 2 minutos, tempo necessário para inativação da enzima *polifenol oxidase* em presença de catecol¹⁰.

Uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto nas condições mencionadas acima¹³.

A proteína total das soluções sobrenadantes foi determinada pelo método do biureto¹⁴.

Preparação do eletrodo

Uma membrana de acetato de celulose foi utilizada como suporte para a imobilização de *polifenol oxidase* presente na solução sobrenadante. A área circular desta membrana foi coberta com uma mistura de 24U de solução de *polifenol oxidase*, 25 μl de soro albumina bovina 1% e 25 μl de glutaraldeído 25% m/V. A membrana foi seca em dessecador a 4°C e estocada em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, na mesma temperatura. Para efetuar as medições, a membrana foi colocada sobre o topo do eletrodo de oxigênio e fixada com um anel de borracha "o-ring".

Determinação da concentração de substratos fenólicos

O eletrodo de oxigênio com a membrana enzimática (biossensor) foi colocado em uma célula de vidro contendo 20ml de solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, a 25°C . Após a estabilização da leitura inicial de corrente, adicionaram-se volumes crescentes de solução de substrato 10mM (50-550 μl) em intervalos de 1 min. entre cada adição, com agitação cons-

tante. A adição do substrato causa uma diminuição na concentração de O_2 com consequente diminuição da corrente de redução desta espécie.

A concentração de amostra desconhecida foi determinada pelo mesmo procedimento, usando a curva analítica assim obtida e também por espectrofotometria de absorção molecular (determinação de fenóis totais¹⁵).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade da *polifenol oxidase* e proteína total

Extratos bruto de alguns vegetais e frutas tais como beringela, batata, mandioca, inhame, maçã, banana prata, banana nanica, banana maçã, pera e pêssego foram estudados como material biocatalítico para a oxidação aeróbica de substratos fenólicos.

A Tabela 1 mostra a atividade (u/ml), atividade específica (U de *polifenol oxidase*/mg de proteína total) e proteína total(mg/ml) encontrada nos extratos destes vegetais e frutas. Extratos bruto da beringela e batata ficaram marrom escuros, os de pera, maçã, banana nanica, banana maçã marrom, enquanto aqueles do inhame, mandioca e banana prata desenvolveram pouca cor. Isso indica que os extratos de inhame, mandioca e banana prata podem ser mais estáveis que os demais extratos estudados e por isso são preferencialmente utilizados, apesar de possuírem menor atividade enzimática. Estudos da estabilidade (tempo de vida) desses biossensores mostraram que o eletrodo de inhame possui o melhor tempo de vida, ao redor de 14-15 dias (150 determinações por membrana de *polifenol oxidase* imobilizada); assim esse extrato foi escolhido para a construção do biossensor para determinação de fenóis.

Tabela 1. Atividade, proteína total e atividade específica da *polifenol oxidase* encontrada em extratos bruto de vegetais e frutas.

Material	Atividade (u/ml)x10 ³	Proteína Total (mg/ml)	Atividade Específica (u/mg de proteína)x10 ³
Maçã	0,066	3,35	0,020
Mandioca	0,130	2,50	0,052
Pera	0,300	3,70	0,081
Banana-nanica	0,401	2,85	0,141
Banana-prata	0,776	5,00	0,155
Inhame	1,20	6,37	0,188
Pêssego	0,138	0,35	0,393
Banana-maçã	2,44	3,35	0,729
Batata	2,81	3,70	0,760
Beringela	14,1	7,50	1,88

Efeito da concentração de enzima

O efeito da concentração da enzima (unidades) imobilizada sobre a resposta do biossensor e/ou estabilidade foi estudado. A resposta do biossensor aumenta com o aumento da concentração de enzima imobilizada sobre a membrana externa do eletrodo de oxigênio até 24 unidades, decrescendo para as concentrações superiores estudadas. A Figura 1 mostra este efeito. O decréscimo de resposta em concentrações superiores a 24 unidades pode estar relacionado com o aumento da espessura da camada enzimática, dificultando assim o transporte do substrato e, especialmente do oxigênio molecular, acceptor

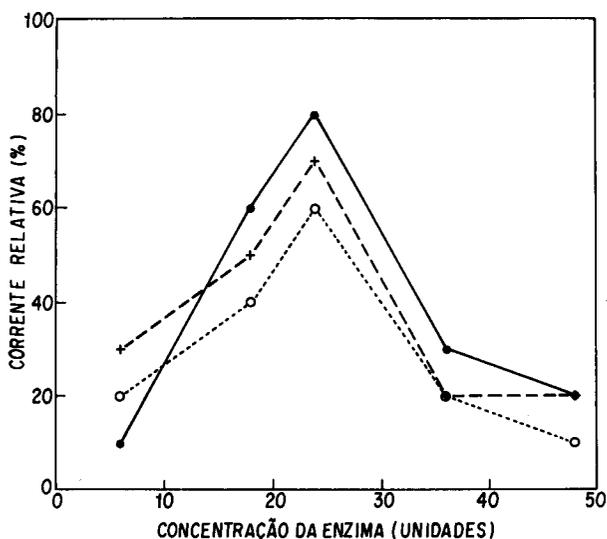


Figura 1. Efeito da concentração da enzima polifenol oxidase (unidades) sobre a resposta (I_i/I_t) do biossensor, em tampão fosfato 0,1M (pH 7,0), a 25°C, para os substratos $5 \times 10^{-5}M$ (...:catecol; +++:pirogalol e ooo:fenol).

eletrônico na oxidação enzimaticamente catalisada do fenol à respectiva quinona, com isto o consumo de O_2 é menor e a corrente relativa (I_i/I_t) diminui, onde I_i e I_t representam respectivamente a corrente na ausência e na presença de substrato. O aumento da concentração da enzima de 6 à 48 unidades causou um aumento do tempo de resposta do biossensor à catecol de 200 à 400 s, sendo de 300 s o tempo de resposta do eletrodo contendo 24 unidades de enzima imobilizada.

Efeito do pH

O efeito do pH (4,0 — 8,0) sobre a resposta amperométrica do biossensor de extrato bruto de inhame para os substratos catecol $5,0 \times 10^{-5}M$ e pirogalol $5,0 \times 10^{-5}M$ é mostrado na Figura 2. Como pode ser observado dessa figura, o melhor pH foi

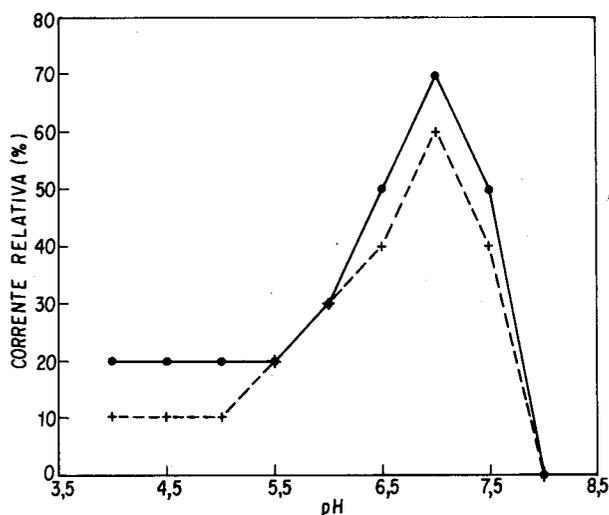


Figura 2. Efeito do pH sobre a resposta (I_i/I_t) do biossensor com 24 unidades de polifenol oxidase, a 25°C para os substratos $5 \times 10^{-5}M$ (...:catecol; +++:pirogalol), utilizando tampão acetato 0,1M (pH 4,0 — 5,5) e tampão fosfato 0,1M (pH 6,0 — 8,0).

7,0; conseqüentemente todos os estudos posteriores foram realizados neste tampão. O pH determinado nesse estudo foi o mesmo encontrado em estudos anteriores^{1,16}, utilizando-se a enzima polifenol oxidase purificada.

Características analíticas do eletrodo

Curvas analíticas típicas para alguns fenóis usando o eletrodo de extrato bruto de inhame estão apresentados na Figura 3. A resposta do eletrodo foi linear nos intervalos de concentrações de $2,5 \times 10^{-5}$ — $8,0 \times 10^{-5}M$; $1,0 \times 10^{-5}$ — $8,5 \times 10^{-5}M$; $1,0 \times 10^{-5}$ — $9,0 \times 10^{-5}M$; $1,0 \times 10^{-5}$ — $1,0 \times 10^{-4}M$, para pirogalol, catecol, fenol e p-cresol, respectivamente. O tempo de resposta variou de 1-4 min., dependendo da concentração e/ou tipo de substrato utilizado (Figuras 4 e 5). O eletrodo de enzima foi estável por 14-15 dias aproximadamente (Figura 6).

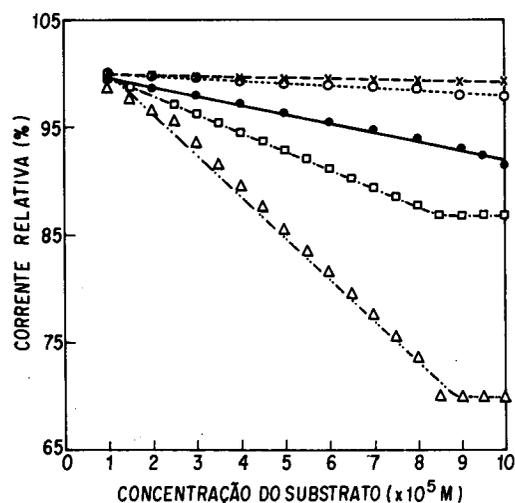


Figura 3. Curvas analíticas típicas do eletrodo para fenóis, a 25°C, 24 unidades de polifenol oxidase, tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) para os substratos ($\Delta\Delta\Delta$:pirogalol; $\square\square\square$ catecol; ...:fenol; ooo:p-cresol; xxx:m-cresol, o-cresol e eletrodo sem membrana enzimática).

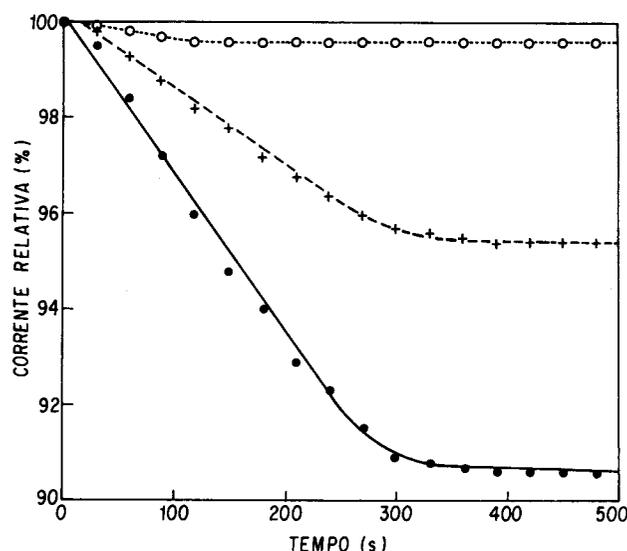


Figura 4. Estudo do tempo de resposta do biossensor com 24 unidades de polifenol oxidase, a 25°C, tampão fosfato 0,1M, (pH 7,0) para o substrato pirogalol nas concentrações: ...: $2,5 \times 10^{-5}M$; +++: $5,0 \times 10^{-4}M$; ooo: $5,0 \times 10^{-5}M$.

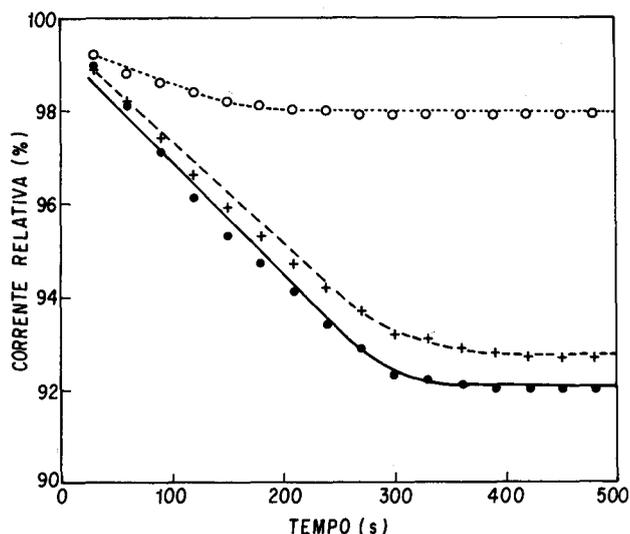


Figura 5. Estudo do tempo de resposta do biossensor com 24 unidades de polifenol oxidase, a 25°C, tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) para o substrato catecol nas concentrações:....: 2,5x10⁻³M; +++:5,0x10⁻⁴M;ooo:5,0x10⁻⁵M.

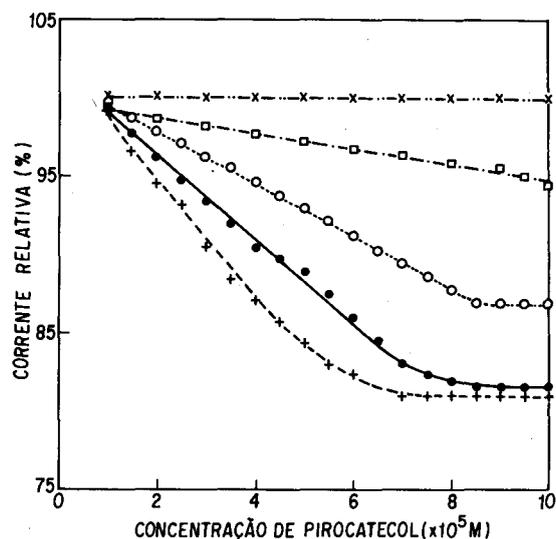


Figura 6. Estudo do tempo de vida do biossensor com 24 unidades de polifenol oxidase, a 25°C, tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) para o substrato catecol (...:primeiro dia;+++ :quarto dia; : ooo oitavo dia; □□□: décimo-primeiro dia;xxx:décimo-quarto dia).

A Tabela 2, mostra a resposta relativa do eletrodo de enzima para estes substratos (pirogalol, catecol, fenol, p-cresol, o-cresol e m-cresol). O eletrodo mostrou-se mais sensível para pirogalol seguido do catecol, fenol e p-cresol, não apresentando resposta para o orto e meta-cresol.

Tabela 2. Resposta relativa do eletrodo de extrato bruto de inhamo para alguns substratos 2,5x10⁻³M em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0.

Substrato	Resposta Relativa (%)
Pirogalol	100,0
Catecol	96,1
Fenol	5,2
p-Cresol	3,9
m-Cresol	0
o-Cresol	0

Efeito do metal ativador

Vários cátions metálicos foram estudados como ativadores da polifenol oxidase tais como cobre (II), manganês (II), cobalto (II) e ferro (III) (Tabela 3). Os cátions Co(II) e Fe(III) não tiveram nenhum efeito sobre a resposta desse biossensor; Mn(II) apresentou pequeno efeito ativador, sendo que a melhor resposta foi encontrada usando cobre (II) 4,0x10⁻²M. Assim, todos os estudos posteriores foram realizados com este ativador naquela concentração supramencionada.

Tabela 3. Efeito da concentração de alguns cátions metálicos sobre a resposta do biossensor para catecol 5,0x10⁻⁵M, 25°C.

Concentração do cátion metálico (x10 ² M)	Resposta do biossensor (% O ₂)			
	ΔI* _{Cu(II)}	ΔI* _{Mn(II)}	ΔI* _{Co(II)}	ΔI* _{Fe(III)}
0,7	0,40	0,20	0,30	0,20
2,0	4,6	1,6	0,30	0,20
4,0	15	1,0	0,30	0,20
5,0	1,2	1,1	0,30	0,20
7,0	1,0	1,0	0,30	0,20

* ΔI = I_i - I_f, onde I_i = corrente antes da adição do substrato
I_f = corrente após a adição do substrato.

Tabela 4. Análise de fenóis em água residual de indústrias locais por espectrofotometria¹⁵ e pelo método amperométrico proposto.

Amostras*	Concentrações de Fenóis(mg/L)		Erro Relativo (%)
	Espectrofotometria	Amperometria	
Água em tratamento(1)	51,8 ± 3,3	52,5 ± 0,5	1,4
Água tratada (1)	43,8 ± 2,5	43,0 ± 1,9	- 1,8
Água em tratamento (2)	32,5 ± 2,2	31,7 ± 1,2	- 2,5
Água tratada (2n)	25,3 ± 2,7	24,8 ± 0,8	- 2,0
Água em tratamento (3)	1,5 ± 0,6	1,1 ± 0,1	- 26,7
Água tratada (3)	ND	ND	

* 1. Indústria de Tintas; 2. Indústria de Celulose; 3. Indústria de Bebidas.
ND: Não Detectado.

Análise de amostras de águas residuais industriais

As substâncias fenólicas normalmente encontradas em águas residuais de indústrias são o fenol, catecol, e/ou p-cresol. Sendo assim, analisou-se fenóis totais pelo método proposto e por espectrofotometria de absorção molecular (determinação de fenóis totais¹⁵). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Como pode ser verificado os valores encontrados são bastante concordantes, dentro do erro experimental destes métodos analíticos, onde o coeficiente de correlação entre o método proposto e o usado como padrão foi igual a 0,9996. O valor elevado do erro relativo entre o método amperométrico e o espectrofotométrico para a água em tratamento (3) deve ser devido as baixas concentrações de fenol, o-,m- e p-cresol presentes nessa amostra, uma vez que o biossensor desenvolvido responde preferencialmente à pirogalol e catecol e/ou correntes relativas (I_i / I_t) extremamente pequenas. O método amperométrico desenvolvido pode ser utilizado como um método alternativo prático e rápido para a análise e/ou monitoramento de fenóis em águas residuais industriais. Estuda-se atualmente a adaptação deste método em análise em fluxo contínuo (FIA), a fim de aumentar a frequência analítica destas determinações.

CONCLUSÕES

O biossensor de extrato bruto de inhame desenvolvido nesse trabalho, apresentou um melhor desempenho analítico que aqueles construídos com outros extratos bruto de vegetal e/ou fruta. A aplicabilidade desse biossensor foi comprovada nas análises de compostos fenólicos de águas residuais industriais. O que limita a sensibilidade do biossensor às mais baixas concentrações são as diferenças de corrente extremamente pequenas que devem ser monitoradas, o que evidentemente eleva o erro da medida. Por outro lado, às mais altas concentrações do substrato, ocorre perda da linearidade das curvas analíticas, devido a solubilidade do oxigênio em solução aquosa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o PADCT/CNPq, processo nº 620060/91.3 e também ao CNPq pela bolsa de doutoramento de Cássia Ap. Signori, ao grupo de Biofísica do Instituto de

Física da USP, campus São Carlos, pelo uso da centrífuga e ao Prof. Dr. Juarez Soares do Departamento de Botânica da UFSCar pela classificação dos vegetais e/ou frutas estudados.

REFERÊNCIAS

1. Macholán, L.; Shánel, L.; *Coll. Czech. Chem. Commun.*, (1977), **42**, 3667.
2. Macholán, L.; "Biocatalytic Membrane Electrodes" In: "Bioinstrumentation and Biosensors", Ed by D.L.Wise, Marcel Dekker, N.Y., (1990), cap.12.
3. Bendall, D.S., Gregory, R.P.F.; "The Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds", J.B.Pridham, Ed. Pergamon Press, Oxford, (1963).
4. Skladal, P.; *Collect.Chem.Commun.*, (1991), **56**, 1427.
5. Neujahr, H.Y.; *Biotechnol.Bioeng.*, (1980), **22**, 913.
6. Uchiyama, S.; Tamata, M.; Tojuku, Y.; Suzuki, S.; *Anal.Chim.Acta*, (1988), **208**, 287.
7. Shubert, F.; Wollenberger, U.; Sheller, F.; *Biotechnology Letters*, (1983), **5**, 239.
8. Navaratne, A.; Lin, M.S.; Rechnitz, G.A.; *Anal.Chim.Acta*, (1990), **237**, 107.
9. Mazzei, F.; Lanzi, M.; Lorenti, G.; Botrè, C.; *Anal.Chim.Acta*, (1991), **255**, 59.
10. Summer, J.B.; Myrbäck, K.; "The Enzymes-Chemistry and Mechanism Action", Academic Press Inc., Publishers, New York, vol.III, part I, cap.57 (1951).
11. Keevil, T.; Howard, M.S.; "Molecular Oxygen in Biological Oxidations-An Overview" In: "Methods in Enzymology" Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. Eds.; Academic Press Inc., London LTD, vol. LII, part C, (1978), cap.1.
12. Lopez, J.N.R.; Rosmartinez, J.R.; Varón, R.; Cánovas, F.G.; *Anal. Biochem.*, (1992), **202**, 356.
13. Shannon, C.T.; Prat, D.E.; *J.Food Sci.*, (1977), **32**, 479.
14. Gornael, A.G.; Bardwill, C.J.; David, M.M.; *J.Biol.Chemistry*, (1949), **177**, 751.
15. Assoc. Off Anal. Chemists, "Official Methods of Analytical Chemists", 14^a Ed. Washinhton, A.O.A.C. (1984).
16. Arnold, M.A.; Rechnitz, G.A.; "Biosensors Based on Plant and Animal Tissue" In: "Biosensors Fundamentals and applications" Ed by A.D.F. Turner; I.Karube; G.S.Wilson. Oxford University Press. New York, (1987), cap.3.

Publicação financiada pela FAPESP