

Desarrollo de un biosensor amperométrico de tirosinasa para la determinación de contenido fenólico total en aguas superficiales

Development of an amperometric tyrosinase biosensor for total phenolic content determination in superficial waters

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

Palabras clave:

Sensores biológicos, enzima, electroquímica, fenoles, curtiembres

Keywords:

Biological sensors, enzyme, electrochemistry, phenols, tanneries

ABSTRACT

Phenolic compounds are present in environmental fields due to their drainage of waste water to superficial water. They are generated during the production of pesticides and as a result of natural processes. As these compounds are highly toxic for environmental and human beings, their detection and quantitative estimation have analytical significance to minimize their hazardous effects. Thus, national and international legislation establishes maximum values for phenols in water by using reference methods. The aim of this work is to develop and to validate a new analytical methodology based on the use of biosensors to improve the control of toxic residues in environmental samples. An amperometric tyrosinase biosensor was constructed in our laboratory to evaluate phenolic concentration in superficial water in Santa Fe Province. The enzyme tyrosinase was Nafion entrapped to immobilize it on the electrode. The amount of deposited enzyme was 100 UI by electrode.

Amperometric experiments were carried out using an electrochemical analyzer. A conventional three-electrode system was employed with the enzyme electrode as a working electrode, a platinum wire as the counter electrode, and the Ag|AgCl electrode as a reference electrode. All experiments were performed at 30°C, and fixed potential of -0.100 V in the electrochemical cell containing phosphate buffer at pH=6.80 under constant stirring with a magnetic bar.

The matrix effect and interferences were evaluated in each sample. Their recovery was studied with a standard addition assay. Five evaluated samples from the north, and south center of Santa Fe showed recovery values over 120%, indicating possible presence of phenols.

RESUMEN

Los fenoles ingresan en los ecosistemas a través del drenaje de las aguas residuales a las aguas superficiales, como efecto de la producción y uso de plaguicidas y como resultado de procesos naturales. La determinación de estos compuestos tiene importancia analítica, debido a su toxicidad tanto para seres humanos como para el medio ambiente, y en las legislaciones nacionales e internacionales se fijan valores máximos permitidos de fenoles en agua obtenidos utilizando métodos de referencia. El objetivo de este trabajo es desarrollar y validar nuevas metodologías analíticas basadas en el uso de biosensores, para mejorar el control de residuos tóxicos presentes en matrices ambientales. Para esto, se utilizó un biosensor amperométrico de tirosinasa construido y optimizado en nuestro laboratorio para evaluar el nivel de contaminación por fenoles totales en aguas superficiales de la Provincia de Santa Fe. La inmovilización de la enzima sobre el electrodo composite de carbono se llevó a cabo mediante entrapamiento con Nafion, en una concentración de 100 UI de tirosinasa por electrodo. Este electrodo de trabajo, sumado a uno de referencia Ag|AgCl y uno auxiliar de hilo de platino, conforman el sistema que conectado a un analizador electroquímico permitió la obtención de las mediciones correspondientes. Las medidas amperométricas 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, bajo agitación constante. Se evaluó el efecto matriz y la presencia de interferencias de cada una de las muestras, como así también se estudió la recuperación obtenida en un ensayo de adición estándar. Cinco de siete muestras evaluadas pertenecientes a localidades del norte, este y centro sur de la provincia de Santa Fe, presentaron niveles de recuperación por encima de 120 %, indicando la posible presencia de fenoles.

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

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

* Autor para correspondencia: +54 342 6154477. malcaraz@fbcb.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son compuestos derivados del benceno y contienen uno o más grupos hidroxilos unidos directamente al anillo aromático. Todos ellos comparten la estructura básica del fenol (Vermerris & Nicholson, 2006). Son relativamente raros en plantas y su presencia en el medio ambiente es consecuencia de la actividad de las industrias químicas, petroleras, petroquímicas y farmacéuticas. Estos compuestos 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).

Dada la toxicidad de estos compuestos sobre organismos vivos, las legislaciones nacionales e internacionales fijan valores máximos permitidos de fenoles en aguas. Los valores permitidos son variados y dependen del uso y del tipo de agua que se está evaluando. Los reglamentos y recomendaciones para proteger la salud pública pueden ser impuestos por ley y en Estados Unidos la Agencia de Protección Ambiental (EPA), la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA) y la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) son ejemplos de agencias federales que desarrollan reglamentos para sustancias tóxicas. Las recomendaciones proveen instrucciones valiosas para proteger la salud pública, pero no pueden ser impuestos por ley. La Agencia para Sustancias Tóxicas y El Registro de Enfermedades (ATSDR) y el

Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH) son dos agencias federales de Estados Unidos que desarrollan recomendaciones para sustancias tóxicas. 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 (ASTDR, 2008).

Los métodos analíticos comúnmente utilizados para la determinación de compuestos fenólicos simples, son métodos espectrofotométricos basados en colorimetría. 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. (APHA, 1998).

Por otra parte, se han desarrollado ciertos métodos cromatográficos que permiten la identificación de los compuestos fenólicos presentes en muestras de agua. Estos métodos presentan la ventaja de ser muy sensibles y selectivos. Sin embargo, no permiten la determinación en campo, demandan mucho tiempo, y también requieren de personal entrenado para llevar a cabo el análisis. Los costos para este tipo de técnicas son elevados; es por ello, que es de interés para muchos grupos de trabajo, desarrollar métodos que no sólo sean sensibles y selectivos, sino que permitan la determinación *in situ* y, por consiguiente, la disminución de los costos.

Los métodos electroquímicos constituyen una alternativa prometedora para el análisis de compuestos fenólicos, ya que son sustancias electroactivas fácilmente oxidables. Estos métodos analíticos tienen costos reducidos, son robustos, demandan cortos tiempos de análisis y presentan muy buena reproducibilidad. Sin embargo, algunas técnicas electroquímicas, como la amperometría, no permiten la identificación de los compuestos individuales, sino que determinan contenido total de compuestos fenólicos.

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, como se observa en la Figura 1, 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.

La determinación del sustrato mediante el biosensor enzimático presentado en

la Figura 2, se lleva a cabo midiendo la reducción electroquímica de las quinonas producidas enzimáticamente, y generadas en la reacción (producto de la oxidación de fenoles). La *o*-quinona producida es reducida por el electrodo, regenerando el fenol original. Finalmente, la enzima es oxidada por el oxígeno a su forma nativa con producción de agua formando, así, un ciclo de amplificación bio-electrocatalítico (Sapelnikova *et al.*, 2003).

Las curtiembres son un ejemplo de industrias con alto potencial de impacto ambiental y sobre la seguridad laboral. Esto es así, principalmente, por el uso de compuestos químicos para el curtido, solventes, pigmentos, etc., entre otros elementos que suelen ser tóxicos y persistentes en el ambiente (Labunska *et al.*, 2000).

En este trabajo se utilizó un biosensor de tirosinasa construido y optimizado en nuestro laboratorio con el cual se determinaron compuestos fenólicos en muestras de agua tomadas en distintas localidades de la Provincia de Santa Fe. Estas zonas fueron elegidas para el muestreo ya que, en cada una de ellas, se encuentran empresas dedicadas al curtido de cuero, las cuales utilizan, en su proceso, alguno de los compuestos fenólicos estudiados.

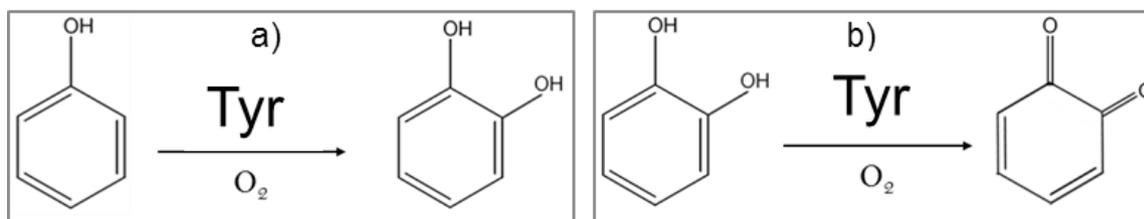


Figura 1. Reacción de la Tyr frente a monofenoles, con producción de catecol (a.) y con producción de *o*-quinona (b).

Figure 1. Schematic reaction of the hydroxylation of monophenols and dehydrogenation of *o*-diphenols to *o*-quinones by tyrosinase

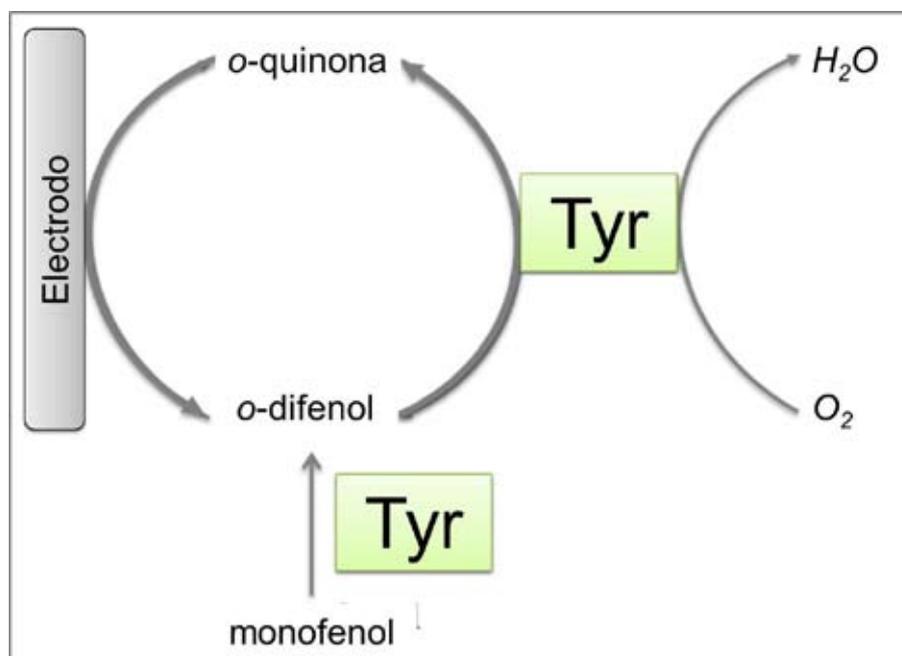


Figura 2. Reacción global del biosensor de Tirosinasa para la detección de fenoles.

Figure 2. Global reaction for phenol detection through tyrosinase biosensor

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 fue 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

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 entrampamiento 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 bio-reconocimiento 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 $5 \mu\text{L}$ 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.

Como se muestra en la Figura 3 la inmovilización se realizó inmediatamente antes de cada determinación y, posteriormente se procedió a la renovación de la superficie de los electrodos modificados mediante un nuevo pulido, pudiendo así ser reutilizados.

Para la calibración se utilizó una técnica amperométrica, ya que la intensidad de corriente producida por la reducción de la quinona generada, presentó relación directa con la cantidad de sustrato presente. Para

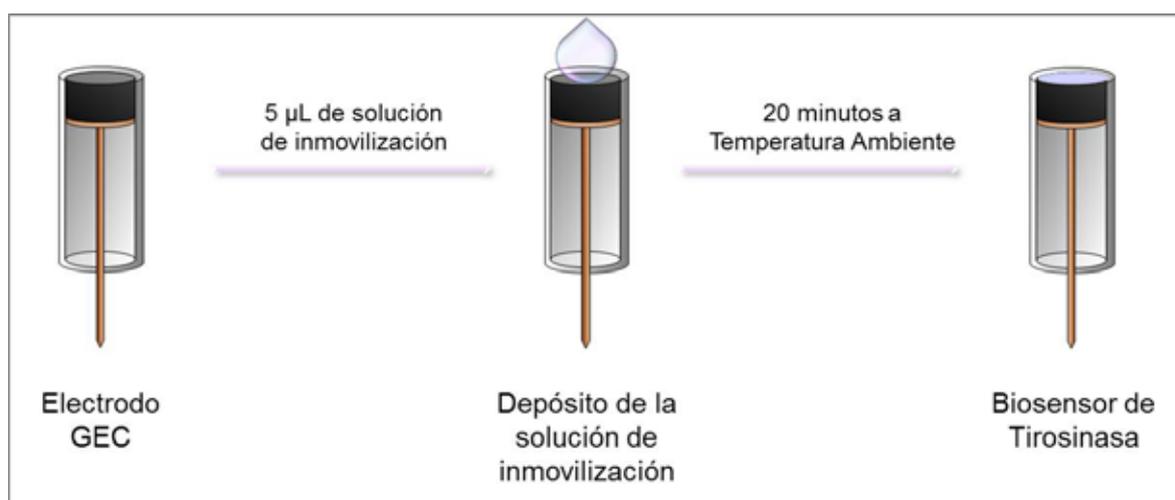


Figura 3. Representación esquemática de la secuencia de inmovilización de la enzima sobre transductor GEC.

Figure 3. Schematic representation of GEC material showing the experimental procedure for tyrosinase immobilization representation of GEC material showing the experimental procedure for tyrosinase immobilization

todas las determinaciones, se utilizó el catecol como sustrato modelo, por lo que la puesta a punto del método se llevó a cabo con dicho analito.

Para realizar las medidas amperométricas, se agregaron 10.00 mL de solución buffer de fosfato de sodio 0.100 mol L^{-1} pH 6.80 y KCl 0.100 mol L^{-1} en una celda electroquímica con previa incubación en baño termostatizado a 30°C . Se sumergieron los tres electrodos y se aplicó un potencial constante al electrodo de trabajo de -0.100 V , bajo agitación constante. El potencial aplicado, permite la reducción de la o-quinona formada por la reacción enzimática al sustrato correspondiente. Todos estos parámetros fueron optimizados mediante un método de factor a factor.

Comenzada la corrida amperométrica, se dejó estabilizar la corriente hasta obtener una línea de base recta; el tiempo de estabilización fue de 1 minuto, aproximadamente. Luego, se añadió a la celda electroquímica una cantidad conocida del compuesto fenólico, que generó un salto en la intensidad de corriente, debido a la reducción de la o-quinona producida. Llegado el estado estacionario, donde la intensidad de corriente se mantiene constante, se realizó una nueva adición de sustrato, dando lugar a otro incremento en la intensidad de corriente; y así sucesivamente, hasta la quinta adición.

Las concentraciones son aditivas, es decir, la corriente generada por la segunda adición, por ejemplo, es la generada por una concentración igual a la suma de las concentraciones de la primera y segunda adición.

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 evaluar si existe efecto matriz y/o presencia de interferencias, se realizó una comparación de líneas de regresión, esto es, se evaluó la existencia de diferencias estadísticamente significativas tanto en las pendientes como en las ordenadas al origen de las curvas de calibrado realizadas en muestras reales y la curva de calibrado realizada con estándar puro en buffer de trabajo. Esta comparación se llevó a cabo mediante un test de hipótesis de comparación de medias, ANOVA, para ambos parámetros.

Para el estudio de la recuperación se adicionó a cada una de las muestras acondicionadas una cantidad exactamente conocida (valor nominal) del sustrato catecol, por triplicado y en 3 niveles de concentración. Se realizó la determinación y el porcentaje de recuperación %R, fue calculado siguiendo la fórmula $\%R = (ce/ct) * 100$, donde ce es el valor obtenido y ct es valor nominal.

RESULTADOS

Para la obtención de los amperogramas descriptos en la Figura 4, derivados de

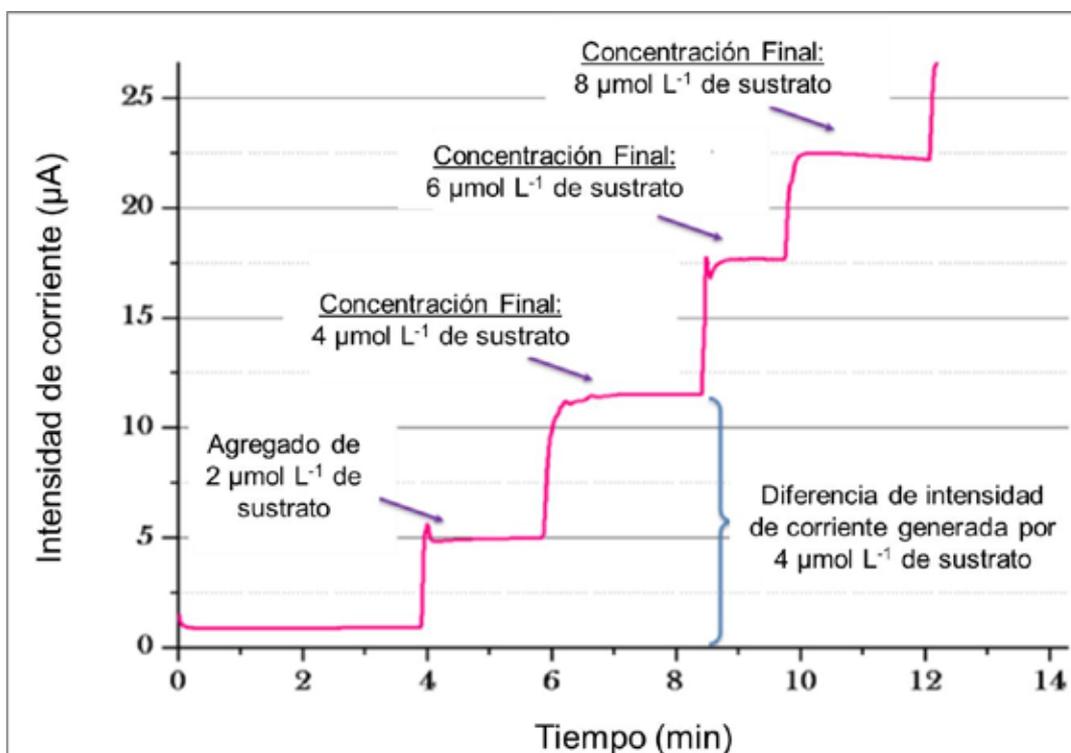


Figura 4. Amperograma obtenido con el biosensor de Tirosinasa a distintas concentraciones de catecol (adiciones sucesivas de 0 a 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Condiciones de trabajo (ver en texto).

Figure 4. Amperometric responses of a GEC-Tyrosinase biosensor to catechol (concentration between 0 and 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Working conditions (read main text).

la técnica amperométrica, se utilizó una calibración univariada donde la intensidad de corriente producida por la reducción de la quinona generada presentó relación directa con la cantidad de sustrato presente. Como las concentraciones son aditivas, la corriente generada por la segunda adición es la generada por una concentración igual a la suma de las concentraciones de la primera y segunda respectivamente; y así sucesivamente.

El método desarrollado para la detección de fenoles en agua superficial, fue optimizado y validado en nuestro laboratorio. En esta primera parte del desarrollo analítico se trabajó para asegurar fundamentalmente la obtención de respuestas con características de precisión aceptables. El estudio se orientó al análisis de la linealidad mediante

la construcción de curvas de calibrado, para asegurar que parámetros tales como sensibilidad, rango lineal, límites de detección y cuantificación, fueran adecuados; dejándose la comparación de los resultados obtenidos por el mismo con los obtenidos por métodos considerados como de referencia, para una etapa posterior de nuestro trabajo. Los datos de precisión y exactitud se muestran en la Tabla 1.

Cada curva de calibrado se llevó a cabo mediante el agregado de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol, en 5 adiciones, es decir, el rango de las curvas de calibrado fue de 1 -5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol.

Para todas las muestras se realizaron triplicados de las curvas de calibrado. En la Figura 5 se muestran las curvas de calibrado obtenidas.

Niveles de concentración ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Repetibilidad		Precisión		Exactitud	
	%		Precisión intermedia*		Recuperación	
			Día	%	Niveles de concentración ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	%
5	9.41		1	8.62	0.5	102 ± 7
10	8.28		2	7.87	2.0	108 ± 13
20	7.46		3	6.25	3.5	104 ± 10
			4	8.76		

*ANOVA t(n-1)=9 y p para $\alpha=0.05$, fueron 0.603 y 0.617, respectivamente. Se aceptó H_0 , indicando que no existió diferencia estadísticamente significativa en las medidas realizadas en distintos días.

Tabla1. Datos de precisión y exactitud del biosensor de tirosinasa.

Table1. Results obtained through accuracy and precision assays of Tyrosinase biosensor

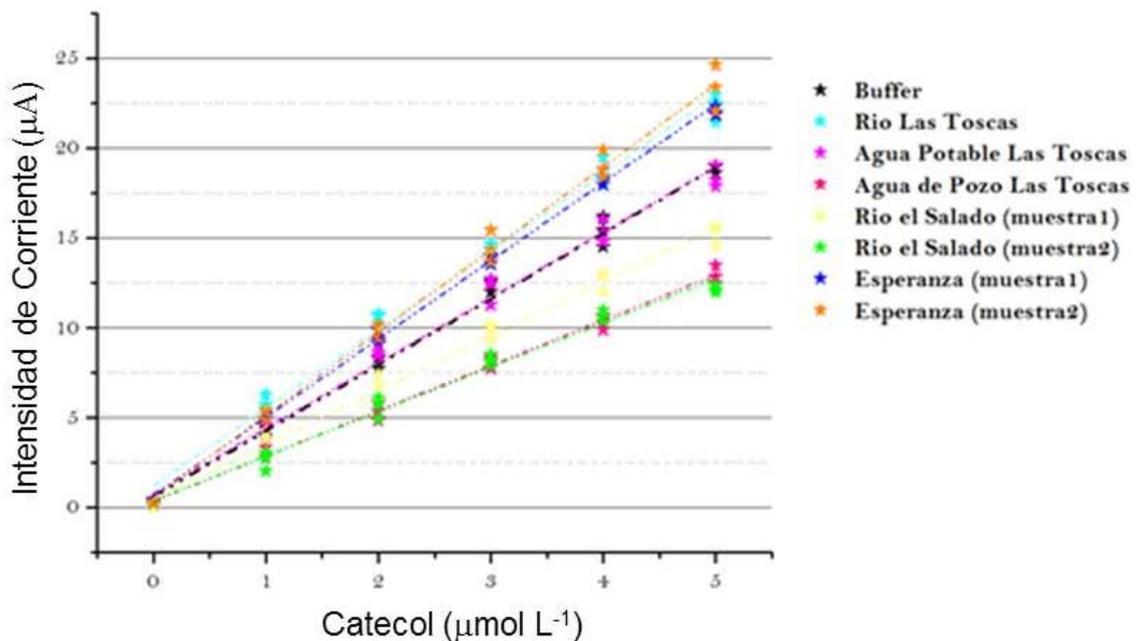


Figura 5. Curvas de calibrado de catecol en buffer y en las distintas matrices analizadas, utilizando el biosensor de tirosinasa.

Figure 5. Dose-response curves of tyrosinase biosensor for catechol in buffer and different matrices

El test de hipótesis de comparación de medias, ANOVA, para pendiente y ordenada al origen de las curvas de calibrado realizadas en muestras reales y buffer de trabajo se describen en la Tabla 2. La comparación de las líneas de regresión se realizó para valores de $F_{(n-3)}=3$ y p para $\alpha=0.01$.

Todas las muestras estudiadas, a excepción de la muestra de agua de río El Salado (muestra 1), mostraron tanto efecto matriz como interferencia, ya que los dos parámetros comparados mostraron diferencias estadísticamente significativa.

Los resultados obtenidos en el ensayo de recuperación mediante adición estándar se describen en la Tabla 3.

Para los 3 niveles de concentración, se realizó un test t de hipótesis, prueba t de comparación de una media de las unidades de muestreo de cada sitio con un valor de

referencia o nominal. En este caso, los valores nominales fueron 0.5, 2 y 3.5.

Para la recuperación de $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$, se encontraron diferencias significativas frente al valor nominal en las muestras 2, 5, 6 y 7 ($p<0.05$). En cambio, para la recuperación de 2 y $3.5 \mu\text{mol L}^{-1}$, no se encontró diferencia significativa frente al valor nominal para la muestra 5, pero, sí para la muestra 1. Esto podría indicar la presencia compuestos fenólicos en la muestra, ya que los porcentajes están por arriba del valor máximo del rango establecido para recuperación. Excepto para la muestra 1, las tres restantes presentaron efecto matriz y presencia de interferencia positiva, lo que indica que el aumento en la recuperación pudo estar dado también por alguna interferencia en la muestra.

Par evaluado (Buffer vs Muestra agua de)	Ordenada		Pendiente		Significancia ¹
	F_3	$p_{0.01}$	F_3	$p_{0.01}$	
Río Las Toscas	110.10	<0.0001	26.26	<0.0001	S
Río El Salado (muestra 1)	0.14	0.7091	0.06	0.8079	NS
Río El Salado (muestra 2)	342.88	<0.0001	132.46	<0.0001	S
corriente Las Toscas	81.45	<0.0001	31.64	<0.0001	S
Pozo Las Toscas	298.38	<0.0001	119.47	<0.0001	S
superficie de Esperanza (muestra 1)	109.93	<0.0001	48.31	<0.0001	S
superficie de Esperanza (muestra 2)	112.80	<0.0001	56.99	<0.0001	S

¹ S=significativo; NS= No significativo

Tabla 2. ANOVA de los valores obtenidos de la comparación de medias para la ordenada al origen y pendiente.

Table 2. ANOVA of the values obtained from the comparison of means for the intercept and slope

Tipo de muestra	Concentración adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentración predicha ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	%R
Agua del río Las Toscas	0.5	0.6 ± 0.3	119 ± 63
	2.0	2.5 ± 0.4	122 ± 20
	3.5	4.3 ± 0.4	123 ± 10
Agua del río El Salado (muestra 1)	0.5	0.8 ± 0.2	155 ± 45
	2.0	3 ± 1	155 ± 56
	3.5	4.8 ± 0.6	142 ± 17
Agua del río El Salado (muestra 1)	0.5	0.5 ± 0.1	99 ± 33
	2.0	2.0 ± 0.7	101 ± 37
	3.5	3.2 ± 0.9	91 ± 27
Agua potable Las Toscas	0.5	0.7 ± 0.3	137 ± 69
	2.0	1.9 ± 0.3	98 ± 32
	3.5	4 ± 1	130 ± 55
Agua de Pozo Las Toscas	0.5	0.69 ± 0.09	139 ± 19
	2.0	2.5 ± 0.5	124 ± 28
	3.5	4.3 ± 0.9	124 ± 27
Agua superficial de Esperanza (muestra 1)	0.5	0.7 ± 0.1	148 ± 25
	2.0	3 ± 1	163 ± 55
	3.5	4 ± 1	137 ± 35
Agua superficial de Esperanza (muestra 2)	0.5	0.9 ± 0.3	180 ± 62
	2.0	4.3 ± 0.9	216 ± 42
	3.5	6.65 ± 0.6	190 ± 18

Tabla 3. Porcentajes de recuperación (%R) de catecol en distintas muestras de agua.

Table 3. Recovery values (%R) obtained for catechol in different water samples.

En el caso de las interferencias hay señalar que, si bien no se analizó el comportamiento en particular, de diferentes sustancias interferentes, como por ejemplo los detergentes que, debido a sus propiedades tensoactivas podrían afectar la superficie del electrodo alterando la señal obtenida, la comparación de las curvas de calibrado construidas con analito puro y con el analito en las distintas muestras

de agua, como así también las experiencias donde se evalúa recuperación, muestran que en algunos casos existe efecto matriz y/o interferencias. Por esta razón, es necesario analizar en una etapa posterior, la aplicación de procedimientos de pre-tratamiento de muestras, calibración por el método de adición estándar y calibración multivariada. En el mismo sentido, se podría considerar la interferencia de fenoles integrantes de

la materia orgánica disuelta en aguas naturales, como es el caso particular de las fracciones solubles de estas últimas, los ácidos fúlvicos; si bien el método analítico desarrollado está orientado a la determinación del contenido fenólico total en aguas superficiales, incluyendo el procedente de procesos naturales. Con respecto al caso específico de los ácidos fúlvicos, la hipótesis planteada en relación a la posibilidad de ser determinados por el método desarrollado se basa en los siguientes puntos: a) Estos polímeros pigmentados de peso molecular de alrededor de 2000 difícilmente podrían atravesar la membrana de nafion que recubre la superficie del electrodo donde está inmovilizada la enzima y así tener acceso a la reacción enzimática descrita en este trabajo, b) Del mecanismo de acción de la enzima tirosinasa, hidroxilando monofenoles con posterior oxidación del difenol producido a o-quinona, se sugiere que o,m-monofenoles y p-catecoles pueden ser detectados por el biosensor de tirosinasa y que la respuesta a los compuestos individuales difieren en la intensidad de la señal. En la estructura química de estos componentes ácidos se observa que los grupos fenoles están sustituidos en todas las posiciones lo que haría difícil la intervención de la enzima para llevar a cabo la reacción. No obstante, esta hipótesis debería ser corroborada experimentalmente en futuros trabajos de investigación.

El tiempo total que se necesitó para evaluar la presencia de fenoles simples en muestras de agua fue de 5 minutos, que representa el tiempo necesario para estabilizar la señal generada por el derivado fenólico presente en la muestra.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que los electrodos composite grafito-epoxi (GEC) constituyen sensores robustos que

pueden ser utilizados para la construcción de biosensores enzimáticos.

Se logró diseñar y desarrollar un biosensor de tirosinasa para la detección 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 eficaz basada en amperometría para la detección de fenoles simples en agua residuales, con un tiempo total de ensayo de 5 minutos. Si bien esta técnica sólo cuantifica contenido fenólico total, resulta de gran utilidad para el control de estos contaminantes, por ejemplo en efluentes industriales.

El método amperométrico desarrollado presentó un LOD (entre 10 y 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, según el analito ensayado) que, 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 resultaron útiles para la determinación de compuestos fenólicos en este tipo de matrices. Para el método amperométrico se observó efecto matriz o interferencias, pero debe considerarse que las muestras fueron analizadas sin pre-tratamiento, y que las mismas pueden ser corregidas mediante una calibración por el método de adición estándar.

Para la recuperación de 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, se encontraron diferencias significativas frente al valor nominal en las muestras 2, 5, 6 y 7 ($p < 0.05$). En cambio, para la recuperación de 2 y 3.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, no se encontró diferencia estadísticamente significativas frente al valor nominal para la muestra 5, pero, sí para la muestra 1. Esto podría indicar la presencia compuestos fenólicos en la muestra, ya que los porcentajes están por encima del valor máximo del rango establecido para recuperación (115%).

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 C A, Dickey E C & Pishko MV (ed) *Encyclopedia of Sensors*. Vol 10. Pennsylvania State University, University Park, USA
- ASTDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) 2008. *Toxicological Profile for Phenol*. United States Public Health Service. Disponible en:
http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs115.html
- 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
- APHA (American Public Health Association). 1998. Aggregate organic constituents. En: *Standard method of Water and Wastewater*, Washington, DC: 1085 p
- Labunska I, Brigden K, Stringer R, Johnston P, Santillo D & Ashton J. 2000. Identificación y trascendencia ambiental de contaminantes orgánicos y metales pesados asociados con la curtiembre Arlei S.A., Las Toscas, Provincia de Santa Fe, Argentina. Disponible en:
<http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=466#chapid1245>
- Michalowicz J & Duda W. 2006. Phenol-Sources and Toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(3): 3347-3362
- Pividori MI, Lermo A, Zacco E, Hernández S, Fabiano S & Alegret S. 2007. Bioaffinity platforms based on carbon-polymer biocomposites for electrochemical biosensing. *Thin Solid Films*, 516: 284-292
- Sapelnikova S, Dock E, Ruzgas T & Emneus J. 2003. Amperometric sensors based on tyrosinase-modified screenprinted arrays. *Talanta*, 61: 473-483
- Vermerris W & Nicholson R. 2006. *Phenolic compound biochemistry*. Springer. West Lafayette, IN, USA: 276 p