
Comportamiento electroquímico de un biosensor para la determinación de compuestos fenólicos usando la enzima polifenol oxidasa

Maria de los Á. Arada Pérez^{2*}, Lucio Angnes¹, Fabiana S. Felix³

^{1,3}Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000, São Paulo, Brazil

²Departamento de Química Analítica, Universidad de Oriente, Cuba.

Electrochemical Behavior of biosensor by determination the catechol and phenolic compounds using the enzyme PPO

Comportament electroquímic d'un biosensor per a la determinació de compostos fenòlics emprant l'enzim polifenol oxidasa

Recibido: 22 de mayo de 2009; revisado: 28 de julio de 2009; aceptado: 10 de septiembre de 2009

RESUMEN

Fue construido un biosensor electroquímico usando polifenol oxidasa (PPO) para la determinación de compuestos fenólicos. La PPO empleada como enzima, fue obtenida de *Archontophoenix Cunninghamiana*. El biosensor mostró un rango de linealidad de 1×10^{-3} a 1×10^{-4} mol/L y un límite de detección de 1×10^{-4} mol/L. El pH óptimo resultó ser 6,7 en un medio buffer de fosfato. El tiempo de vida del biosensor fue de 1 mes, guardado en solución de buffer fosfato 0,1 mol/L a temperatura ambiente.

Palabras claves: Biosensor de pasta de carbón, catecol, polifenol oxidasa.

SUMMARY

An electrochemical biosensor using poly-phenol oxidasa (PPO) was constructed for the determination of phenolic compounds. The PPO employed with enzyme, it was obtained from *Archontophoenix Cunninghamiana*. The biosensor showed range of linearity in the range of 1×10^{-3} to 1×10^{-4} mol/L and a detection limit of 1×10^{-4} mol/L. The optimal pH was 6,7 in medium phosphate buffer. The lifetime of the biosensors was 1 months, stored in phosphate buffer solution 0.1 mol/L to ambient temperature.

Key words: Carbon paste biosensor, catechol, polyphenol oxidase.

RESUM

Es construeix un biosensor electroquímic emprant polifenol oxidasa (PFO) per a la determinació de compostos fenòlics. La PFO emprada com enzim s'obté a partir d'*Archontophoenix cunninghamiana*. El biosensor mostra un rang de linealitat d' 1×10^{-3} a 1×10^{-4} mol/L, i un límit de detecció d' 1×10^{-4} mol/L. El pH òptim ha resultat ser 6,7 en un medi tampó de fosfato. El temps de vida del biosensor és d'1 mes, guardat en solució de tampó fosfat 0,1 mol/L a temperatura ambient.

Mots clau: Biosensor de pasta de carbó, catecol, polifenol oxidasa.

*Autor para la correspondencia:
may@cnt.uo.edu.cu

INTRODUCCIÓN

La determinación de derivados de fenol es muy importante en alimentos, en la medicina y en el medio ambiente. Algunos de los derivados fenólicos pueden causar peligro a la salud y resultar contaminante del medio ambiente por su toxicidad inherente.

Han sido desarrollados numerosos métodos analíticos para la determinación de compuestos fenólicos, por ejemplo, cromatografía líquida, la espectrofotometría UV, cromatografía de gases, la electroforesis capilar, entre otros¹⁻⁴. Sin embargo, estos métodos requieren de un tiempo de análisis mayor, además de necesitar en ocasiones pretratamiento de las muestras, por lo que resultan inconvenientes para un monitoreo in situ.

El catecol es una especie importante en la biología y la química, por su facilidad para transferir electrones e interactuar con metales de transición^{5,6}. Sin embargo, en solución acuosa, la electroquímica de la misma es complicada, debido a las reacciones secundarias que pudieran ocurrir, dependiendo de la concentración del catecol, del pH y del potencial aplicado⁷⁻⁹. Por tales problemas, la mayor parte de los métodos actuales para la determinación de catecol se basan en el empleo de biosensores¹⁰⁻¹³ y los métodos relacionados a estos.

En el presente artículo, desarrollamos un biosensor electroquímico para catecol utilizando la enzima PPO, la respuesta del biosensor enzimático fue monitoreada por un período de 1 mes.

EXPERIMENTAL

Los experimentos del Análisis por inyección en flujo FIA amperométrico fueron realizados usando una celda de flujo, la cual está configurada por tres electrodos: el biosensor amperométrico construido, el electrodo Ag/AgCl_{sat} y un electrodo de auxiliar de acero inoxidable. Además se emplea para la propulsión de la solución amortiguadora buffer un sistema gravitacional (2.3 mL min⁻¹).

El FIA como metodología analítica, está basado en el uso de un flujo no segmentado, donde una muestra es inyectada. Se produce un transporte de ese "trozo" de muestra a través del sistema, pudiendo ocurrir procesos físico-químicos adicionales. La dispersión del analito puede manipularse a través de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema. Con esto, se produce una mezcla incompleta pero reproducible que da lugar a un gradiente de concentración variable con el tiempo a lo largo del sistema. Se usa además un sistema de detección continua que proporciona una señal transitoria, en el momento de detección de la señal no se ha alcanzado equilibrio físico ni químico. En consecuencia, el tiempo de operación deberá ser muy reproducible.

Todos los reactivos empleados en este estudio fueron de grado analítico: Catecol de Sigma, KH₂PO₄ y Na₂HPO₄ de Merck, Araldita y Endurecedor Faberfix, grafito de Acheson (grado 38). Las soluciones de catecol fueron preparadas diariamente con agua bidestilada. Todas las medidas se realizaron con Autolab Type III. Potentiostat/Galvanostat. El sistema Electroquímico Purpose general (GPES). pH Lab Metrohm 827. Todas las medidas fueron efectuadas a temperatura ambiente.

Construcción del biosensor

La mezcla grafito (50 %, w/w), Araldita-endurecedor (35 %, w/w), se homogenizo, lográndose una resistencia menor a dos KΩ o igual a este, luego se mezcló con el tejido fino de la Latania Sp. (15 %, w/w) y fue empaquetado firmemente en un tubo plástico junto con el alambre de cobre empleado como contacto eléctrico.

Parámetro operacional del biosensor.

Se determinó el pH óptimo para el trabajo, así como el potencial de registro, la corriente de flujo del portador y el volumen de inyección de la muestra. Los resultados demostraron que el pH juega un rol importante en la respuesta del biosensor amperométrico, resultando por ambos métodos empleados para el estudio (el FIA amperométrico y la Voltametría Cíclica) el pH 6,7 como el óptimo (ver tabla 1).

El potencial operativo fue estudiado y E = -0,4V fue seleccionado. La corriente de flujo del portador de 2.3 mL min⁻¹ asociado a un volumen de muestra inyectado de 200 μL fue encontrada como óptimo. Estas condiciones fueron adoptadas en todo el trabajo desarrollado (tabla 1).

En la figura 1 se observa una microscopia obtenida para el biosensor construido con fibra y sin fibra, bajo las mismas condiciones experimentales; como puede apreciarse en la misma la morfología de la imagen en la que está ausente la fibra que contiene la enzima (a), tiene un aspecto más brillante la pasta de carbón; no así cuando está presente la fibra (b).

Tabla 1: Optimización de los parámetros de trabajo del biosensor.

| Parámetros | Rango estudiado | Valor Óptimo |
|--|-----------------|--------------|
| pH | 2.0-7.0 | 6,7 |
| Volumen de inyección (μL) | 50-300 | 200 |
| Potencial de registro (V) | -0,1 - 0,5 | -0,4 |
| Corriente de flujo (mL min ⁻¹) | 2,3 | 2,3 |

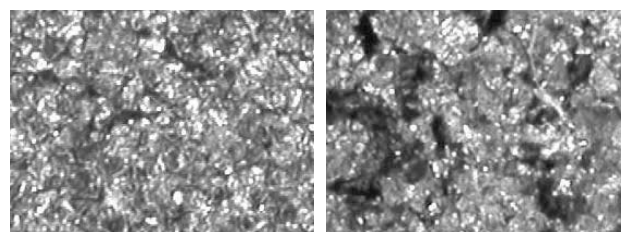


Figura 1: Morfología del biosensor en etapas diferentes. (a) sin fibra, y (b) con fibra.

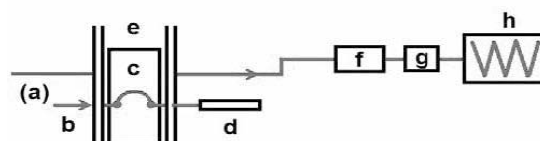


Figura 2: Representación esquemática del sistema de análisis de inyección en flujo empleado en este estudio (FIA). (a) Solución del transportador, (b) lazo de muestra, (c) muestra, (d) Jeringa, (e) inyector, (f) celda electroquímica, (g) detector, (h) señal amperométrica.

Características de respuesta del biosensor.

Se emplearon los métodos de Voltametría Cíclica y el de Análisis de inyección en flujo para establecer el pH óptimo, en una solución amortiguadora buffer de fosfato como transportadora de la muestra, variándose el pH de trabajo. Como puede apreciarse en las figuras 3 y 4, la respuesta obtenida esta estrechamente relacionada al pH de trabajo, obteniéndose la máxima respuesta a pH 6.7. Este valor de pH fue usado a todo lo largo del trabajo.

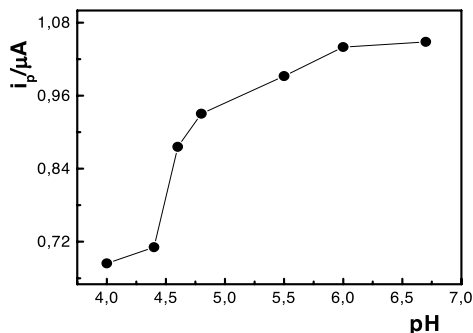


Figura 3: Respuesta del biosensor al variar la corriente del pico (i_p) vs pH, para una solución de catecol 1×10^{-4} mol/L, en solución amortiguadora buffer de fosfato por el método de análisis de inyección en flujo.

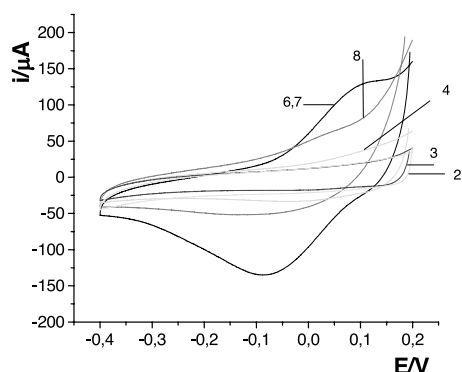


Figura 4: Voltamperogramas cíclicos obtenidos en solución de catecol 1×10^{-4} mol/L, en solución amortiguadora buffer de fosfato a pH: 8; 6,7; 4; 3; 2.

Se estudio por Voltamperometría Cíclica el comportamiento oxidación-reducción de una solución de catecol 1×10^{-4} mol/L. Como se ilustra en la figura 5, la enzima polifenol oxidasa es capaz de catalizar la oxidación del catecol a o-quinona como un producto primario; pero en los registros obtenidos se observaron dos reducciones, una correspondiente a la reducción electroquímica de la o-quinona a catecol a un potencial de - 0.1V y una segunda correspondiente a la reducción de catecol a catecol monofosfato (CMP), la cual es obtenida - 0.4V aproximadamente.

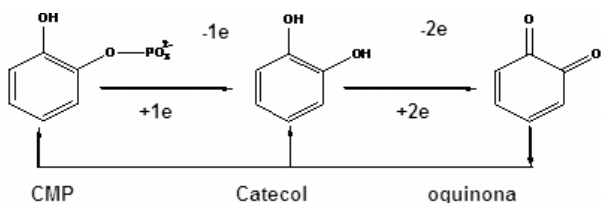


Figura 5: Representación esquemática de la reducción-oxidación electroquímica del catecol en presencia de la enzima polifenol oxidasa.

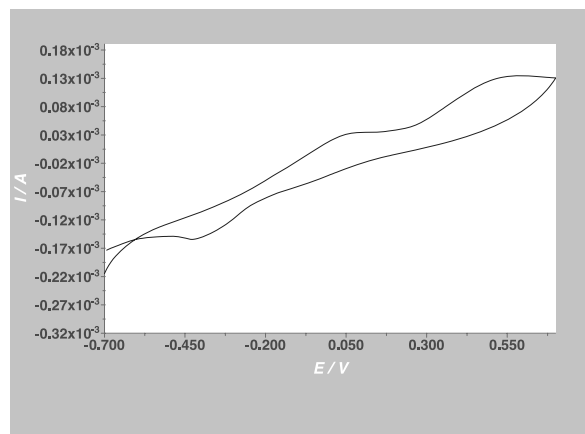


Figura 6: Voltamperograma Cíclico (CV, $i / \mu A$ vs E/V) de la reducción electroquímica del catecol a CMP en solución del amortiguador de fosfato (pH 6,7).

En la figura 6 puede apreciarse la reducción electroquímica de o-quinona a catecol mono fosfato (CMP) muy cercano a -0,4 V.

La respuesta obtenida a la variación de la concentración de catecol en solución buffer 6,7 por el método CV ($i/\mu A$ vs E/V), es representada en la figura 7, en la cual se aprecia el correspondiente crecimiento de la onda de reducción de o-quinona catecol a un potencial de -0,1V.

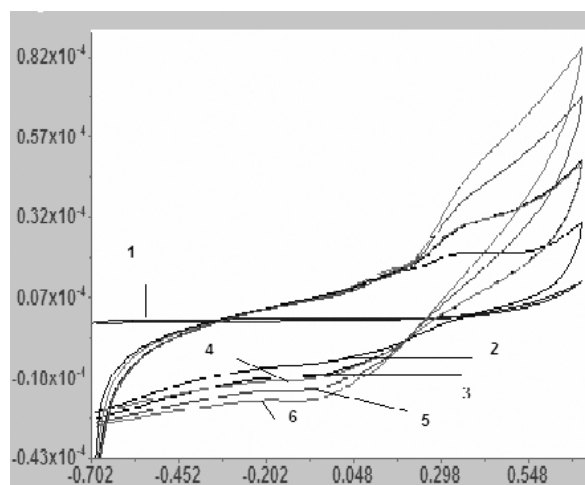


Figura 7: Estudio por el método CV ($i/\mu A$ vs E/V) de la respuesta del biosensor en presencia de solución amortiguadora de fosfato pH 6,7 para concentraciones del catecol desde $6,66 \times 10^{-5}$ (1); 2×10^{-4} (2); $2,66 \times 10^{-4}$ (3); $3,3 \times 10^{-4}$ (4); $1,06 \times 10^{-3}$ (5) y $2,06 \times 10^{-3}$ mol/L(6).

Curva de Calibración

Se realizó la determinación de la curva de calibración a través del método de análisis en flujo en un rango de concentración de 1×10^{-3} a 3×10^{-4} mol/L de catecol. Como puede apreciarse en la figura 8, se obtuvo una buena relación lineal entre las corrientes culminantes catódicas obtenidas en el registro para las concentraciones de catecol testadas con un lazo de muestra de 200 μL a una corriente de flujo del portador del buffer fosfato de 2.3 $mL \min^{-1}$, con un coeficiente de correlación de 0.99756.

En la figura 9 se muestra la buena repetibilidad obtenida en el registro para 25 determinaciones consecutivas de una solución de catecol de concentración 9.0×10^{-4} mol/L a pH 6,7

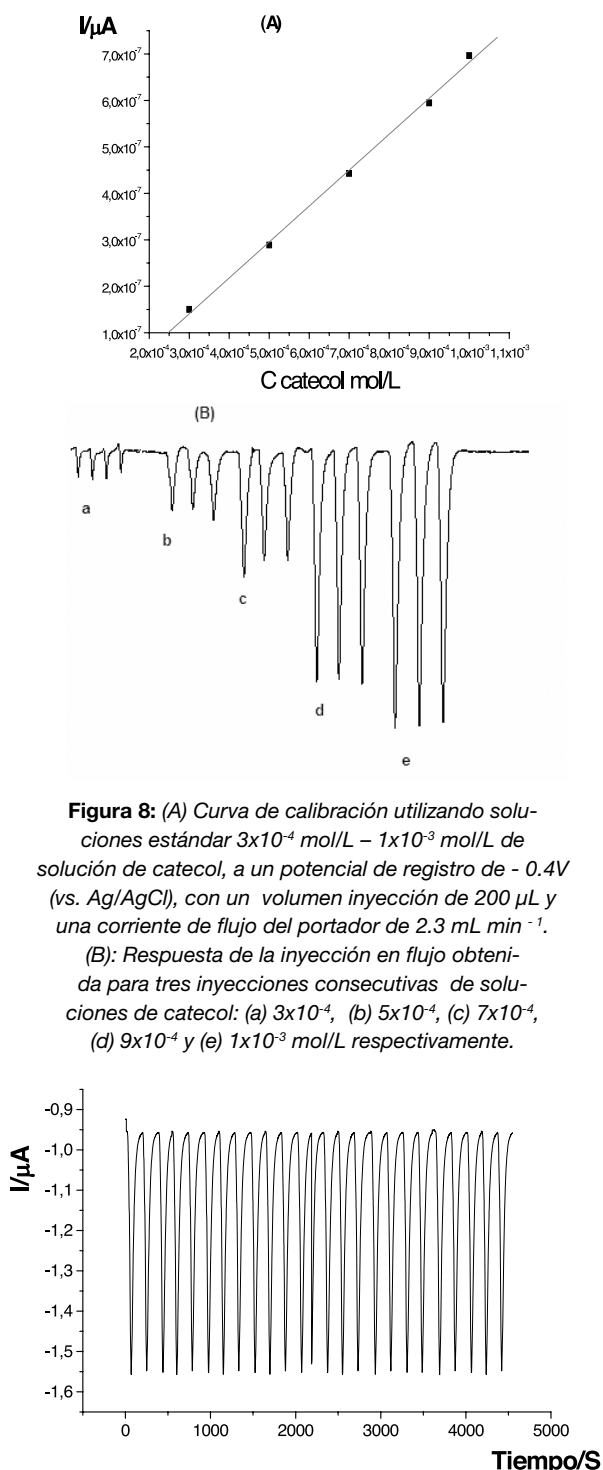


Figura 8: (A) Curva de calibración utilizando soluciones estándar 3×10^{-4} mol/L – 1×10^{-3} mol/L de solución de catecol, a un potencial de registro de - 0.4V (vs. Ag/AgCl), con un volumen inyección de 200 μL y una corriente de flujo del portador de 2.3 mL min^{-1} . (B): Respuesta de la inyección en flujo obtenida para tres inyecciones consecutivas de soluciones de catecol: (a) 3×10^{-4} , (b) 5×10^{-4} , (c) 7×10^{-4} , (d) 9×10^{-4} y (e) 1×10^{-3} mol/L respectivamente.

Figura 9: Repetibilidad obtenida en la respuesta para 25 inyecciones consecutivas de una solución de catecol 9×10^{-4} mol/L, con solución portadora buffer de fosfato a pH 6,7.

Determinación preliminar de ácido caféico y ácido salicílico.

Se hicieron registros de soluciones de ácido caféico y ácido salicílico de concentración 1×10^{-4} mol/L, empleando el método de análisis de inyección a flujo. En la figura 10 puede verse los registros obtenidos para estos compues-

tos, comparados con el registro obtenido de la mezcla de la pasta de carbón sin fibra. Los picos obtenidos son bastante reproducibles en las 5 inyecciones consecutivas registradas.

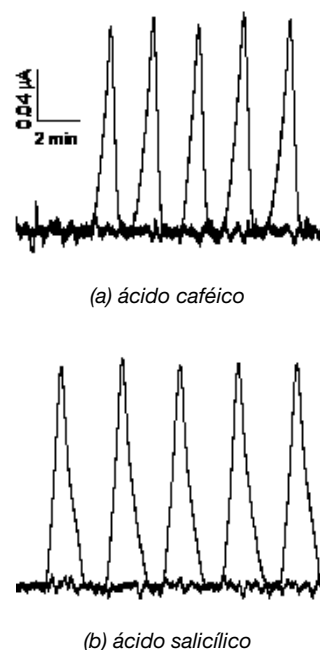


Figura 10: Registro obtenido por el método CV, para soluciones estándar 1×10^{-4} mol/L de ácido caféico y ácido salicílico, en portador buffer fosfato pH 6,7.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un biosensor amperométrico para la determinación de catecol y otros compuestos fenólicos, empleando la enzima polifenol oxidasa inmovilizada en una pasta de carbón con una resistencia $\leq 2 \text{ K}\Omega$, lo cual minimiza los ruidos en el sistema de registro. Fue determinada las características analíticas de este biosensor, tales como el pH de trabajo óptimo, su rango de respuesta lineal. El biosensor mostró buena estabilidad operacional, así como fácil fabricación.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue soportado por el Instituto de Química de Sao Paulo, a través de una beca CAPE MES.

BIBLIOGRAFÍA

1. W. Ren, H. Q. Luo and N. B. Li. Electrochemical Behavior of Epinephrine at a Glassy Carbon Electrode Modified by Electrodeposited Films of Caffeic Acid. *Sensors* 6 (2006) 80-89.
2. S. Cosnier, A. Lepellec, B. Guidetti, I. Rico-Lattes, Enhancement of biosensor sensitivity in aqueous and organic solvents using a combination of poly(pyrrole-ammonium) and poly(pyrrole-lactobionamide) films as host matrices, *J. Electroanal. Chem.* 449 (1998) 165-171.

-
3. S. Timur, N. Pazarliogly, R. Pilloton, A. Telefoncu, Thick film sensors based on lactases from different sources immobilized in polyaniline matrix, *Sens. Actuators B* 97 (2004) 132–136.
 4. M.D.P.T. Sotomayor, A.A. Tanaka, L.T. Kubota, Development of an enzymeless biosensor for the determination of phenolic compounds, *Anal. Chim. Acta* 455 (2002) 215–223.
 5. M.Santhyago, I. Cruz Vieira. L-Cysteine determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on laccase from *Aspergillus oryzae* *Sens. Actuators B* (2007) 279–285.
 6. O. Fatibello-Filho, I.da C. Viera. L-Ascorbic Acid Determination in Pharmaceutical Formulations using a BIOSENSOR base don carbon paste modified extract of Zucchini. *J. Braz. Chem. Soc.*, 11, 4 (2000) 412–418.
 7. D. Szydłowska, M. Campas, J.L. Marty, M. Trojanowicz. Catechol monophosphate as a new substrate for screen-printed amperometric biosensors with immobilized phosphatases. *Sens. Actuators B* 113 (2006) 787–796.
 8. I. Cruz Vieira. L-Cysteine determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on laccase from *Aspergillus oryzae* Murilo Santhyago. *Sens. Actuators B* 128 (2007) 279–285.
 9. Y.C. Tsai, C. C. Chiu. Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. *Sens. Actuators B* 125 (2007) 10–16.
 10. Cobalt salophen-modified carbon-paste electrode incorporating a cationic surfactant for simultaneous voltammetric detection of ascorbic acid and dopamine. S. Shahrokhian, H. R. Zare-Mehrjardi. *Sens. Actuators B* 121 (2007) 530–537.
 11. F. J. Anaissi, H. E. Toma. Catechol incorporation and detection using bentonite-vanadium(V) oxide xerogels. *Sens. Actuators B* 110 (2005) 175–180.
 12. J. Li, X. Lin. Simultaneous determination of dopamine and serotonin on gold nanocluster/overoxidized-polypyrrole composite modified glassy carbon electrode. *Sens. Actuators B* 124 (2007) 486–493.
 13. F. S. Felix, M. Yamashita, L. Angnes. Epinephrine quantification in pharmaceutical formulations utilizing plant tissue biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 2283–2289.