



X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Universidade Severino Sombra
Vassouras – RJ – Brasil

ESTUDOS PRELIMINARES DO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR ELETROQUÍMICO UTILIZANDO PASTA DE CARBONO E O FUNGO *AGARICUS BISPORUS*, PARA DETECÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

G. A.; ROSSINI*¹, A. C. A.; de CARVALHO*¹, L. M.; SILVA², A. M.; SALGADO³

¹Aluno da EQ/UFRJ ²Pós-Graduanda do DEB/UFRJ ³Professor da DEB/UFRJ
Departamento de Engenharia Bioquímica - Universidade Federal do Rio de Janeiro
Endereço- Laboratório de Sensores Biológicos, Escola de Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro – Avenida Horácio Macedo, 2030 – Cidade Universitária, Ilha do Fundão, CEP: 21949-909, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. email: andrea@eq.ufrj.br

RESUMO - Um dos principais problemas relacionados à poluição refere-se ao aumento do uso de produtos químicos nos processos produtivos. Muitas vezes não existe preocupação com os impactos ambientais dos mesmos, tornando-se necessário o desenvolvimento de alternativas para o controle da produção de resíduos ambientais. Nesse contexto, o uso de biossensores torna-se uma alternativa de monitoramento. O presente trabalho teve como principal objetivo realizar estudos preliminares do biocomponente e do eletrodo a base de carbono para o desenvolvimento de um biossensor amperométrico para detecção de fenol. Foi testada a imobilização do pó de cogumelo (fonte de tirosinase) na superfície da pasta de carbono e do bastão de grafite e misturada à pasta. Foram realizados testes com o substrato fenólico e também referentes ao tempo reacional. A melhor proporção encontrada para preparação da pasta foi de 1:1 (massa de pó de grafite:volume de óleo), podendo ser observado os picos de oxidação a uma taxa de velocidade de varredura de 0,05 V/s. Em relação ao teste com pó de cogumelo, a formação dos picos foi melhor evidenciada utilizando a imobilização em superfície tanto do bastão quanto da pasta de carbono. Quanto aos testes utilizando o substrato fenólico, pode-se observar uma resposta linear do biossensor.

Palavras chave: agrotóxico, tirosinase, grafite

INTRODUÇÃO

Atualmente fala-se muito sobre poluição de solos por ação de compostos orgânicos, dentre eles podemos encontrar os compostos fenólicos. Estes compostos se encontram em diversos efluentes industriais além de serem utilizados como pesticidas e herbicidas na agricultura. Embora este composto seja biodegradável, ele possui um alto índice de toxicidade para os seres-vivos, e por esta razão

estes compostos e seus derivados tem sido definidos como poluentes perigosos. A resolução CONAMA n° 357, publicada em 18 de março de 2005, define como padrão de lançamento para efluentes industriais o teor de 0,5 mg/L de fenóis totais (PASSOS et al, 2009).

A maioria dos métodos desenvolvidos para determinação de compostos fenólicos está baseada na cromatografia gasosa, na cromatografia líquida de alta eficiência e na

espectrometria de massas. Tais métodos necessitam que a amostra passe por uma etapa de pré-tratamento, além de serem métodos de alto custo e dispendiosos. Desta forma a busca por uma metodologia capaz de fornecer seletividade, baixo custo, facilidade na construção e resposta rápida se torna válida (ROSATTO et al, 2001).

Nesse contexto, os biossensores aparecem como uma alternativa para análise química de compostos fenólicos, uma vez que são definidos como sensores que combinam a alta seletividade de um elemento biológico ligado a um transdutor que converte o sinal biológico em sinal elétrico proporcional a concentração do analito (OLIVEIRA et al, 2006). Uma outra alternativa que também agrega maior sensibilidade ao sensor é a modificação da superfície do eletrodo com ftalocianina de cobalto (II), que catalisa a oxidação dos referidos fenóis, promovendo um aumento na corrente de oxidação eletroquímica, bem como um aumento da estabilidade do eletrodo.

Os eletrodos normalmente utilizados devem apresentar características adequadas para imobilização enzimática. Entre os materiais mais utilizados podemos encontrar ouro, platina e carbono, que pode ser utilizado como grafite sólido ou como pasta de carbono (PEREIRA et al, 2002).

Os elementos biológicos utilizados podem ser enzimas, anticorpos, microorganismos etc. Desta forma, uma grande diversidade de configurações de biossensores pode ser encontrada na literatura. Geralmente, o elemento biológico apresenta especificidade para uma determinada classe de compostos. Por exemplo, a enzima tirosinase tem sido muito utilizada na preparação de eletrodos eletroquímicos para serem utilizados na determinação de compostos fenólicos (substratos da tirosinase) em amostras biológicas, alimentos e amostras ambientais. A tirosinase é uma enzima que possui em sua forma oxigenada dos átomos de Cu (II) coordenados a três moléculas de histidina.

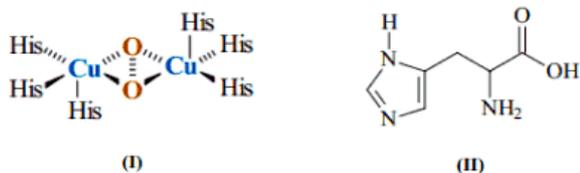
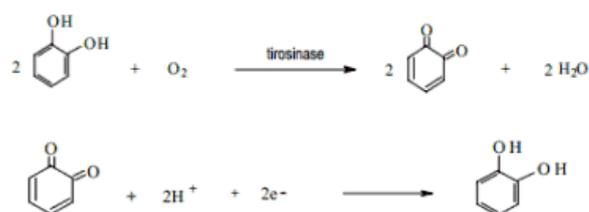


Figura 1: Estruturas (I) centro ativo da tirosinase e (II) molécula de histidina.

O funcionamento desses biossensores baseia-se na inibição da enzima pelos compostos fenólicos, na oxidação do substrato fenólico à correspondente o-quinona, em presença de O₂ dissolvido. A o-quinona produzida é então reduzida eletroquimicamente ao seu respectivo composto fenólico. A detecção das reações de oxidação e redução é realizada pelo uso dos transdutores eletroquímicos. A reação de oxidação do catecol, catalisada pela enzima tirosinase, e posterior redução eletroquímica é representada a seguir:



Os biossensores eletroquímicos podem ser preparados pela imobilização da enzima no eletrodo. Muitos métodos tem sido propostos, dentre eles a incorporação da enzima em superfície de pasta de carbono com o uso de glutaraldeído, através de ligações cruzadas.

Para determinação dos potenciais de oxidação e redução dos compostos fenólicos, a técnica de voltametria cíclica pode ser utilizada. Esta é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, realizada em uma célula eletroquímica composta por um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho (eletrodo com enzima imobilizada), eletrodo de referência (permite o monitoramento do potencial do eletrodo de trabalho) e o contra-eletrodo (atua no controle da passagem de corrente para que a reação ocorra) (BOLLO et al, 2007).

No perfil voltamétrico, os processos de oxidação e redução são representados por correntes de pico anódicas e catódicas. Outros parâmetros importantes a serem levados em consideração são os potenciais de pico anódico e catódico e a velocidade de varredura do potencial.

OBJETIVOS

O presente trabalho possui como objetivo principal o desenvolvimento de um biossensor amperométrico a base da enzima tirosinase para o monitoramento da concentração de compostos fenólicos em amostras ambientais.

Os objetivos específicos consistem em:

- Investigar a resposta do biossensor utilizando-se fenol como substrato;
- Otimizar a preparação do eletrodo suporte, avaliando-se as proporções de pasta de carbono a serem utilizadas e a influência do comprimento e polimento das extremidades do eletrodo de bastão de grafite;
- Otimizar a resposta do biossensor, realizando testes de velocidade de varredura, tempo reacional, concentração de substrato e potencial de oxidação e redução aplicados.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Construção dos eletrodos

O preparo do bastão de grafite se resumiu em cortá-lo e lixá-lo antes da análise, uma vez que, segundo a literatura, esses pré-tratamentos otimizam os resultados. Foi realizado teste de voltametria cíclica em Potenciostato com o bastão de grafite usando-se solução de ferricianeto e ferrocianeto de potássio 6mM em cloreto de potássio 1M (eletrólito suporte).

Para a construção do eletrodo de pasta de carbono, realizou-se alguns testes com proporções diferentes de nujol (óleo mineral) e pó de grafite. A proporção escolhida foi a de 80 mg de grafite para 2 gotas de nujol, devido a consistência da pasta obtida. Feito o eletrodo, este foi submetido ao teste de voltametria cíclica em potenciostato, utilizando o mesmo método com ferricianeto e ferrocianeto de potássio 6mM em cloreto de potássio 1M.

Efeito da velocidade de análise

Foi testada também, sobre as mesmas condições, o efeito da velocidade da análise. Foram feitas medições em 5 velocidades de

varredura diferentes (0,1 , 0,2 , 0,3 , 0,4 , 0,5 V/s) para determinar a melhor velocidade para a análise em questão.

Imobilização da Tirosinase oriunda do pó do fungo

Após os testes preliminares, começou a pesquisa para uma melhor maneira de imobilizar a enzima Tirosinase (proveniente do pó de fungo) nos eletrodos. Realizou-se então uma mistura do pó de fungo à pasta de carbono em diversas proporções, testando sua eficiência também em potenciostato. Realizou-se também a imobilização do pó de fungo na superfície do eletrodo de pasta de carbono, a pasta era então colocada no suporte para eletrodo deixando sempre um espaço para uma fina camada de pó de fungo na superfície do mesmo. A imobilização foi realizada com glutaraldeído e o eletrodo permanecia em geladeira por 24 horas após o procedimento. Após esse período, realizou-se então o teste em potenciostato.

Testou-se a imobilização do fungo sobre o eletrodo de bastão de grafite, para isto utilizamos dois métodos: imobilização do fungo na ponta do bastão e imobilização utilizando um suporte de teflon, que deixava um espaço ente o bastão e a superfície para uma fina camada de pó de fungo. Nos dois métodos, foi utilizado o mesmo procedimento de imobilização, utilizando glutaraldeído. Após 24 horas, os eletrodos foram submetidos a testes em potenciostato para testar a eficiência da imobilização.

Voltametria cíclica utilizando fenol

Foram utilizados os eletrodos com fungo imobilizado, tanto bastão, quanto pasta, para testes com solução de fenol.

Para observar o comportamento dos eletrodos (Pasta de carbono e bastão de grafite) quando submetidos à solução fenólica, foram realizados testes de voltametria cíclica com diversas concentrações da solução de fenol.

Estudo do tempo de reação

Realizamos teste de **cronoamperometria**, para avaliar a variação da corrente ao longo do tempo. Fixamos um potencial (para oxidação 0,5V e para redução -

0,1V) e usamos um tempo reacional de 30 min. Esse teste foi realizado com solução de fenol 0,5 ppm.

Também para avaliar o tempo reacional do biossensor, fizemos um teste semelhante ao anterior, com adições de alíquotas de fenol em determinados espaços de tempo até que a corrente se estabilize. A média dos tempos até a estabilização é dita como tempo reacional. Foram realizadas adições sucessivas de alíquotas de fenol para se chegar a concentração final de 5 ppm. Estes testes foram realizados para o potencial do pico de redução.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Construção dos eletrodos

Foram realizados testes de análise para a preparação do eletrodo de bastão de grafite, utilizando os seguintes parâmetros:

Start potencial: 0V

First vertex potencial: 0,8V

Second vertex potencial: 0V

Scan Rate: 0,1 V/s

Estes parâmetros foram escolhidos a partir de estudos em teses anteriores que mostraram que essa faixa de potencial é a mais adequada para realizar a análise.

Percebeu-se então que com o polimento e o corte os resultados eram mais expressivos e os picos de oxidação e redução da solução eram mais claramente visualizados, por isso, o grafite sempre foi lixado antes das análises, visando a otimização dos resultados. Na figura 3, os gráficos obtidos com o grafite sendo lixado somente uma vez e com o grafite sendo lixado novamente podem ser visualizados:

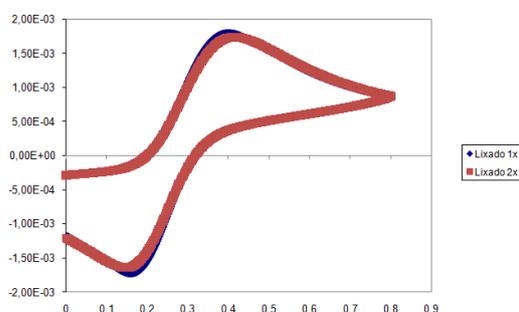


Figura 3. Teste de confecção do eletrodo com polimento do grafite.

Para a análise por voltametria cíclica do eletrodo de pasta de grafite confeccionado,

os parâmetros utilizados foram alterados de forma a obter uma melhor visualização da curva obtida. Os novos parâmetros utilizados são mostrados abaixo:

Start potencial: 0V

First vertex potencial: 0,8V

Second vertex potencial: -0,2V

Scan Rate: 0,5 V/s

Deste teste em diante, foram utilizados sempre estes parâmetros de análise. Os testes para a reprodutibilidade (testes sequenciais com o mesmo eletrodo de pasta de grafite) são apresentados na figura 4:

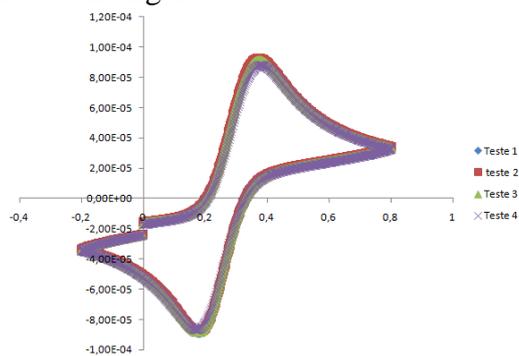


Figura 4. Teste de reprodutividade do eletrodo de pasta de grafite.

Efeito da velocidade de análise

Foi testada a variação de velocidade de varredura de forma a determinar qual seria a melhor velocidade para realização de análises posteriores. Os testes foram realizados com o eletrodo de bastão de grafite. O gráfico comparativo das 5 velocidades analisadas pode ser visto na figura 5.

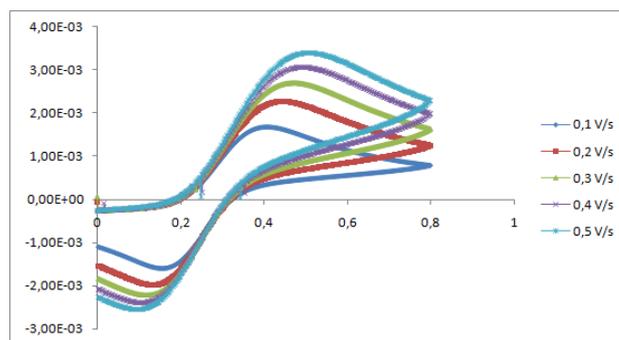


Figura 5. Teste de variação de velocidades de varredura.

A velocidade de 0,5 V/s foi escolhida pois a mesma otimiza a visualização dos picos.

Imobilização da Tirosinase oriunda do pó do fungo

A figura 6 mostra o gráfico comparativo para todos os métodos de imobilização testados.

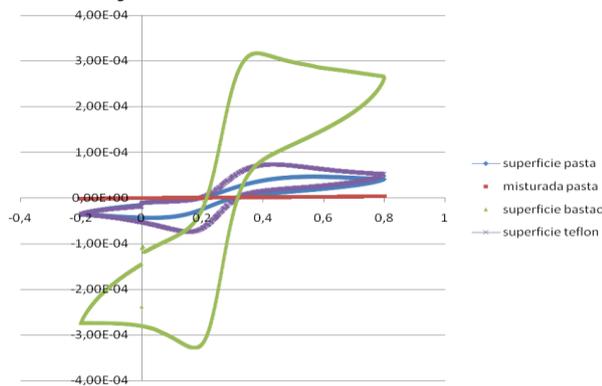


Figura 6. Gráfico comparativo das imobilizações realizadas.

Pode-se observar pela análise do gráfico que a melhor imobilização obtida foi aquela onde a enzima foi imobilizada na superfície do bastão de grafite. Isso se deve a maior superfície de contato da solução com o grafite. Pode-se observar que a curva para o fungo misturado a pasta de carbono não apresentaram resultados expressivos. Uma justificativa para isso é que a enzima misturada ao pó de grafite interfira expressivamente nos resultados, uma vez que as partículas de fungos presentes diminuem a superfície de contato do grafite com a solução. Desta forma, a imobilização no eletrodo de pasta de carbono foi sempre realizada na superfície.

Voltametria cíclica utilizando fenol

Os eletrodos de pasta de carbono e de bastão de grafite foram submetidos à solução fenólica de diversas concentrações para avaliar seu comportamento. As curvas obtidas se encontram nas figuras 7 e 8.

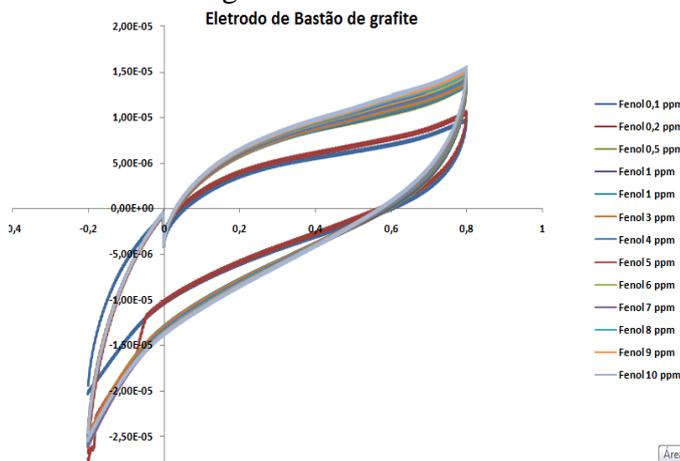


Figura 7. Gráfico comparativo entre as curvas obtidas com diferentes concentrações de fenol.

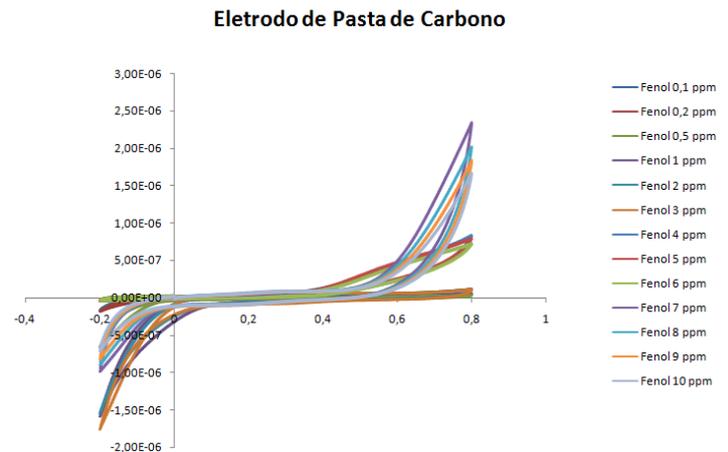


Figura 8. Gráfico comparativo entre as curvas obtidas com diferentes concentrações de fenol.

Pode-se observar uma mudança significativa das curvas proporcional ao aumento da concentração da solução. Isso determina a linearidade do método. Para o presente trabalho, é importante a detecção de concentrações baixas, uma vez que se espera baixas concentrações de fenol na amostra real de estudo.

Estudo do tempo de reação

Para o estudo do tempo de reação, foi utilizada a técnica de cronoamperometria, onde o eletrodo foi submetido a uma solução de fenol 0,5 ppm por um período de 30 minutos. Os resultados estão expostos nos gráficos abaixo.

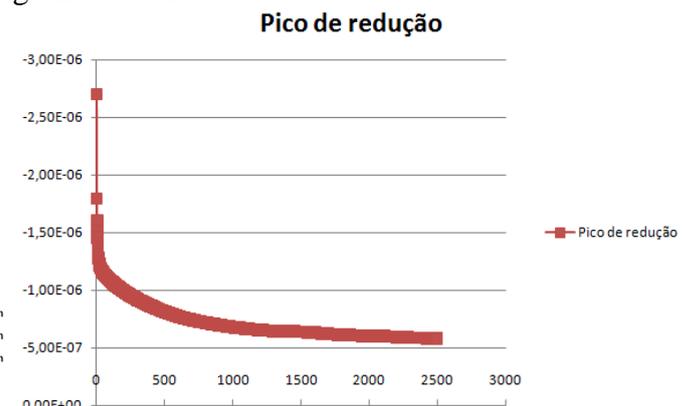


Figura 9. Gráfico obtido através do teste de cronoamperometria para o pico de redução (-0,1 V)

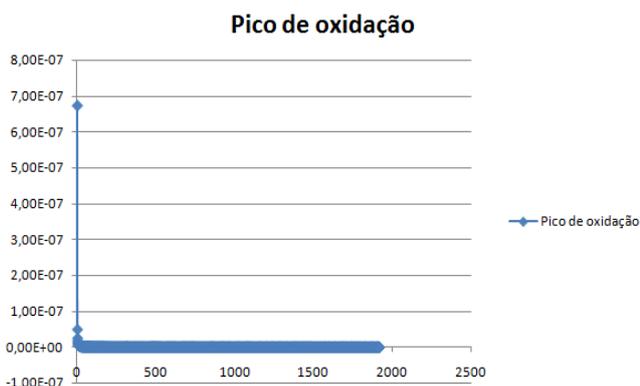


Figura 10. Gráfico obtido através do teste de cronoamperometria para o pico de oxidação (0,5 V)

Para este teste, foi possível apenas observar o tempo de reação para o pico de redução, isso se deve ao fato de as curvas possuírem maior resposta nesse potencial, onde as mesmas se mostram mais acentuadas.

Outro teste para estudo do tempo de reação foi realizado, com adições sucessivas de solução fenólica. As adições foram realizadas após um tempo de estabilização em tampão.

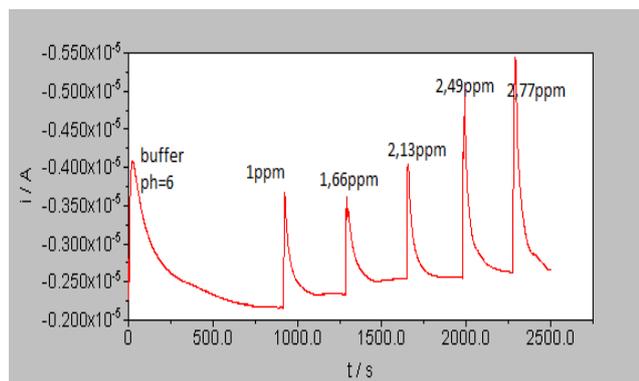


Figura 11. Gráfico obtido através do teste de cronoamperometria com adições de 5 mL de fenol 5ppm.

Na figura 11 foram sempre adicionadas um valor fixo de concentração de fenol 5ppm, ou seja, após a estabilização com a solução tampão, foram adicionados sempre 5 mL da solução de fenol. O tempo de reação foi calculado através da média aritmética dos tempos de reação de cada adição de fenol, sendo o tempo de reação de 130 segundos.

CONCLUSÃO

Os objetivos preliminares do estudo foram alcançados, uma vez que foram realizadas análises de otimização da resposta do eletrodo suporte, determinando-se a melhor proporção de pó de grafite/óleo mineral para a pasta e a

influência do comprimento e polimento do bastão, análises para otimização da medição, determinando-se a melhor velocidade de varredura, tempo reacional, concentração do substrato e potenciais aplicados, bem como a investigação da resposta do biossensor em diferentes concentrações de substrato, assim como o tempo necessário para que a enzima detecte o máximo de substrato.

REFERÊNCIAS

- PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M; KALIL, S. J.; BURKET, C. A. V. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. Isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 950-954, 2009.
- ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p.77-86, 2001.
- OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 932-939, 2006.
- PEREIRA, A.C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.
- OLLO, S.; FINGER, S.; STURM, J. C.; NÚÑEZ-VERGARA, J. A.; SQUELLA, J. A. Cyclic voltammetry and scanning electrochemical microscopy studies of the heterogeneous electron transfer reaction of some nitroaromatic compounds *Electrochimica Acta*, v. 52, n. 15, p. 4892-4898, 2007.
- FERREIRA, L. F.; ALBUQUERQUE, Y.D.T. Biossensor amperométrico à base de tirosinase aplicado na determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia.