

BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE INTERESSE AMBIENTAL**Simone Soares Rosatto, Renato Sanches Freire, Nelson Durán e Lauro Tatsuo Kubota***

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas - SP

Recebido em 15/12/99; aceito em 30/8/00

AMPEROMETRIC BIOSENSORS FOR PHENOLIC COMPOUNDS DETERMINATION IN THE ENVIRONMENTAL INTEREST SAMPLES. Phenols are widely used in many areas and commonly found as industrial by-products. A great number of agricultural and industrial activities realise phenolic compounds in the environmental. Waste phenols are produced mainly by the wood-pulp industry and during production of synthetic polymers, drugs, plastics, dyes, pesticides and others. Phenols are also released into the environmental by the degradation of pesticides with phenolic skeleton. The phenols level control is very important for the environmental protection. Amperometric biosensor has shown the feasibility to complement laboratory-based analytical methods for the determination of phenolic compounds, providing alternatives to conventional methods which have many disadvantages. This brief review considers the evolution of an approach to amperometric measurement using the catalytic properties of some enzymes for phenolic compounds monitoring.

Keywords: phenolic compounds; amperometric biosensor; bioanalytical; environmental analysis.

INTRODUÇÃO

O aumento inadvertido na produção e utilização de produtos químicos, verificado nas últimas décadas, tem causado problemas de poluição ambiental de maneira generalizada, praticamente em todas as partes do mundo. A proteção ambiental vem adquirindo grande importância na sociedade contemporânea, que tem cobrado mecanismos, rápidos e eficientes, de controle dos processos de contaminação ambiental. Dentro deste contexto, é importante contar com novas metodologias de determinação e quantificação dos diversos tipos de poluentes, com rapidez, seletividade e sensibilidade, características encontradas nos biossensores.

Um número considerável de poluentes orgânicos, que encontram-se largamente distribuídos no meio ambiente, possuem estrutura fenólica¹. Fenóis e seus derivados, como clorofenóis e compostos aromáticos relacionados, são conhecidos devido a sua elevada toxicidade e por serem compostos comuns em efluentes industriais, oriundos das atividades de produção de: plásticos, corantes, tintas, drogas, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, pesticidas, detergentes, desinfetantes, refinaria de óleo e principalmente de papel e celulose¹⁻⁸.

Compostos fenólicos também estão largamente presentes na natureza como componentes naturais da madeira (lignina e tanino) e são responsáveis pelas propriedades organolépticas e cores de muitas frutas e flores⁸. Assim, a qualidade dos alimentos pode estar relacionada com a presença de substâncias fenólicas em sua composição, principalmente em bebidas alcoólicas e sucos.

Vários fenóis substituídos, como cloro e nitrofenóis, são altamente tóxicos para o homem e organismos aquáticos^{5-6,8-9}. Estes dois grupos de fenóis substituídos, são os principais produtos de degradação de pesticidas organofosforados e fenoxi-ácidos clorados¹⁻². Mesmo em pequenas concentrações (<1 ppm), os compostos fenólicos afetam o gosto e o odor de águas potáveis e peixes⁵. 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, além de afetarem as velocidades das reações biocatalisadas nos processos de respiração e fotossíntese⁵⁻⁶. Assim, fenóis e especialmente seus derivados clorados, nitrados e alquilados têm sido definidos como poluentes perigosos devido a sua alta toxicidade e persistência no ambiente, e estão presentes na lista de substâncias perigosas e poluentes prioritários da EC (Comissão Européia)¹⁰ e da EPA (Agência de Proteção Ambiental Norte Americana)^{2,11-12}. A diretiva (80/778 EEC)^{1,13} da Comunidade Econômica Européia, por exemplo, determinou como concentração máxima permitida, para todos os tipos de fenóis em meio aquoso, o valor de 0,5 mg L⁻¹ e 0,1 mg L⁻¹ para fenóis individuais. O Instituto Nacional Norte-Americano para Saúde e Segurança Ocupacional, estabeleceu como limite de exposição a concentração de 5 mg L⁻¹ para fenol e, por exemplo, 2,3 mg L⁻¹ para isômeros de cresol. Assim, o desenvolvimento de procedimentos para a detecção e determinação simultânea destas espécies químicas em diferentes matrizes é de grande interesse¹³.

Deste modo, atualmente existe um consenso universal a respeito da necessidade de monitorar continuamente o teor de contaminantes químicos nos cursos de águas naturais e nos inúmeros efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos¹⁴⁻¹⁷. O tempo e o custo envolvidos com a detecção de poluentes ambientais (por exemplo, aquisição da amostra, preparação da amostra, análise de laboratório) tem imposto limitações no número de amostras que podem ser analisadas para um determinado projeto de monitoramento ambiental¹⁶. O aumento na quantidade de dados analíticos tende a aumentar a confiabilidade nas decisões de gerenciamento ambiental, por aumentar a eficiência na caracterização dos compostos poluentes "in situ" e caracterizar melhor os riscos ou ainda a eficiência dos procedimentos de descontaminação^{14,17}. A limitação no número das análises tem criado uma demanda por tecnologias analíticas que possam permitir um aumento no número destas análises num menor tempo e com custos acessíveis^{1-2,14, 18}.

Até o presente momento, análises tanto de fenol como de espécies fenólicas têm sido realizadas, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos (cromatografia gasosa com ionização em chama ou acoplada com espectrometria de massa; ou ainda, utilizando-se cromatografia

*e-mail: kubota@iqm.unicamp.br

líquida de alta eficiência)¹⁹⁻²¹. Entretanto, estas técnicas não permitem, facilmente, um monitoramento contínuo “*on site*”, pois são caras, lentas, necessitam de operadores bem treinados, e em alguns casos, requerem etapas de extração ou pré-concentração, que aumentam o risco de perda de amostra^{2,17,22}.

A necessidade de métodos analíticos mais versáteis para o monitoramento ambiental tem estimulado a produção de uma grande variedade de métodos analíticos. Os biossensores revelam grandes perspectivas quanto a sua utilização no monitoramento “*on-line*” de efluentes (e outras matrizes de interesse ambiental), possibilitando uma rápida adaptação nos processos de tratamento. A incorporação de moléculas com atividade biológica em metodologias analíticas tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, obtendo sucesso nos mais variados procedimentos analíticos, principalmente nos que visam a área de controle ambiental^{5,14-21,23-36}.

Biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas existentes, devido as suas características únicas, tais como: seletividade; relativo baixo custo de construção e estocagem; potencial para miniaturização; facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento “*on site*” rápido. Entretanto, é necessário enfatizar que estas ferramentas não podem e não devem ser vistas como alternativas para técnicas analíticas clássicas, mas sim como um complemento a elas, pois alguns biossensores ainda podem apresentar problemas de estabilidade¹.

Devido ao recente avanço nas áreas de microeletrônica, biotecnologia, fibras óticas, etc., a definição de um biossensor evoluiu do conceito clássico de um eletrodo associado a uma enzima para uma variedade de métodos analíticos e dispositivos baseados em biocatálise ou bioafinidade¹⁵. Entretanto, para os propósitos desta revisão, um biossensor será definido como um dispositivo analítico composto de um elemento biológico de reconhecimento intimamente em contato com um transdutor. Assim, um biossensor é um dispositivo que combina a especificidade de um elemento biológico ativo para o analito de interesse com a sensibilidade de um transdutor para converter o sinal proporcional a concentração do analito³⁷.

Há uma grande diversidade de configurações de biossensores para aplicações ambientais, e esta diversidade abrange os elementos de reconhecimento biológico (enzimas, anticorpos, microorganismos, etc.), os transdutores físicos (eletroquímicos, óticos, acústicos, etc.) e a metodologia analítica. Esta gama de configurações confere uma grande versatilidade aos biossensores, que podem ser genéricos, dando uma indicação da presença de um contaminante que tenha algum bioefeito (por exemplo, sensores de toxicidade) ou de um grupo de contaminantes (ex.: pesticidas como inibidores de enzimas); ou ainda específicos, fazendo vantagem da especificidade de uma biomolécula para uma determinada classe ou composto¹⁹.

BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA FENÓIS

Fenóis podem ser determinados amperometricamente através de uma oxidação eletroquímica direta³⁸⁻³⁹. Entretanto, este procedimento possui uma série de desvantagens, principalmente, devido a uma alta sobrevoltagem. O alto potencial aplicado provoca uma grande corrente de fundo, e conseqüentemente, um alto nível de ruído. Além disto, nas oxidações diretas de fenóis, um grande número de reações paralelas podem ocorrer levando, principalmente, a formação de produtos poliméricos que passavam a superfície do eletrodo. Biossensores amperométricos podem minimizar estes obstáculos na determinação de fenóis, uma vez que operam com um baixo potencial aplicado em relação a um eletrodo de referência, que de um modo geral, processam-se em potenciais ao redor de 0 mV. Nesse potencial, a contribuição de espécies interferentes (facilmente oxidadas ou reduzidas)^{17,39-41} é minimizada, Figura 1.

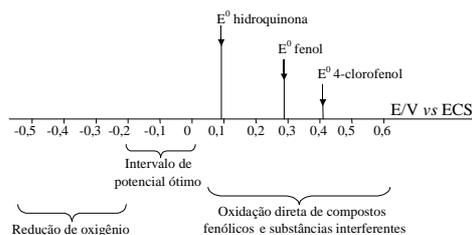


Figura 1. Intervalo de potencial ótimo para a operação de biossensores amperométricos. E^0 hidroquinona, E^0 fenol e E^0 4-clorofenol são os potenciais formais dos pares redox hidroquinona/quinona, fenol/radical fenoxi e 4-clorofenol/4-clorofenoxi, respectivamente¹⁷.

Dentre os materiais de eletrodo que podem ser usados para a construção de biossensores amperométricos, os materiais carbonáceos têm sido os mais utilizados. Estes materiais podem ser divididos em carbono vítreo, grafite pirolítico, pasta de carbono e grafite compósito^{42,43}.

As enzimas redox tirosinase, lacase e peroxidase são as mais utilizadas para a construção de biossensores amperométricos para fenóis. Apesar destas enzimas possuírem diferentes mecanismos de ação, como será discutido neste trabalho, suas atuações em biossensores amperométricos para a detecção de compostos fenólicos têm sido esquematizadas como uma seqüência de reações similares, conforme mostra a Figura 2¹⁷.

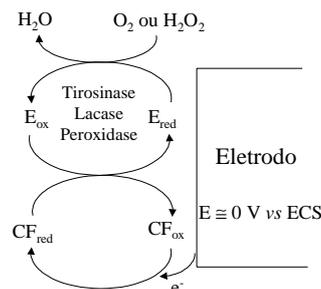


Figura 2. Mecanismo das reações nos eletrodos modificados pelas enzimas para a determinação de compostos fenólicos. E_{red} e E_{ox} são as formas reduzida e oxidada, respectivamente das enzimas; CF = composto fenólico.

As moléculas de enzima na superfície do eletrodo são oxidadas pelo oxigênio (no caso da tirosinase e lacase) ou peróxido de hidrogênio (no caso da peroxidase), sendo em seguida reduzida por compostos fenólicos. Durante esta última reação, os fenóis são basicamente convertidos em quinonas e/ou radicais livres, e esses produtos, usualmente eletroativos, podem ser 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. A detecção do consumo de O_2 ou H_2O_2 é uma outra possibilidade de se monitorar a concentração dos compostos fenólicos. Entretanto, o método de detecção dos fenóis baseado na redução dos produtos gerados pelas reações enzimáticas apresenta vantagens tais como: simplicidade de construção e manuseio; proteção do eletrodo contra o acúmulo de produtos poliméricos secundários sobre sua superfície (passivação), que usualmente são observados durante oxidação eletroquímica direta de fenóis; amplificação da resposta como uma conseqüência da redução de quinonas e/ou radicais fenoxi ao composto fenólico inicial, além da performance dos eletrodos se enquadrar no intervalo de potenciais ótimo para medidas eletroquímicas¹⁷ (Figura 1).

Os biossensores amperométricos para a determinação de compostos fenólicos tem sido construídos sobre a base de duas

diferentes configurações principais¹⁷: 1) eletrodos de grafite sólido com a superfície modificada, onde a enzima é fisicamente adsorvida, covalentemente imobilizada ou retida com o auxílio de uma membrana, e 2) eletrodos compósitos com o material do eletrodo modificado, onde as partículas de grafite são modificadas com enzimas, por procedimentos semelhantes ao do eletrodo de grafite sólido, e em seguida misturadas com óleos, resinas epoxi ou partículas de Teflon®.

Entretanto, a maior parte das investigações sobre os mecanismos dos biossensores enzimáticos foram realizadas usando eletrodos de grafite sólido, devido a uma maior sensibilidade. As respostas relativas dos eletrodos de grafite modificados, com diferentes enzimas, para vários compostos fenólicos são apresentadas na Tabela 1¹⁷. Pode-se observar que os eletrodos modificados com tirosinase usualmente apresentam melhores resultados para a detecção de catecol, embora também possa ser empregado para a análise de monofenóis e difenóis. Eletrodos modificados com peroxidase possibilitam a determinação de um número maior de compostos fenólicos. A co-imobilização de enzimas distintas, por exemplo lacase e tirosinase, também permite a determinação de uma gama maior de espécies fenólicas.

Apesar da resposta satisfatória obtida com eletrodos sólidos, há necessidade de alternativas para melhorar sua estabilidade operacional e estocagem. Isto tem levado a um aumento nas pesquisas e desenvolvimento de eletrodos compósitos. O material compósito é barato, fácil de preparar e versátil, e apresenta como uma das principais vantagens a possibilidade de co-imobilização de enzimas, cofatores, mediadores, estabilizadores, etc.

Biossensores amperométricos modificados com mediadores⁴⁴, têm sido um dos principais campos de pesquisa com eletrodos enzimáticos. Já que empregando-se mediadores, os eletrodos podem ser operados em um potencial menor em relação ao requerido sem a presença de mediador, reduzindo a possibilidade de interferências na resposta⁴⁰⁻⁴¹. Mediadores são substâncias redox de baixa massa molar (tais como: ferroceno, hexacianoferrato, azul de metileno, quinonas, etc.), que facilitam a transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo. Um grande interesse tem sido dado na construção e emprego destes eletrodos, principalmente, devido aos recentes desenvolvimentos nas técnicas de imobilização de mediadores e enzimas⁴⁵. Os mediadores têm sido incorporados aos eletrodos por adsorção, oclusão em filme polimérico, ligação covalente ou misturados em pasta de carbono.

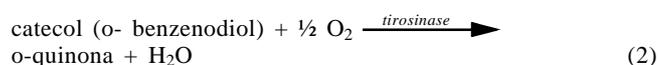
A maioria das investigações com biossensores amperométricos foram inicialmente otimizadas utilizando-se compostos puros. As análises de compostos fenólicos em amostras de

interesse ambiental, foram favorecidas à medida que os biossensores desenvolvidos conseguiram melhores sensibilidade e estabilidade. Atualmente, a literatura mostra o emprego com sucesso, destes biossensores em análise de fenóis em águas de rio^{26,46-48}, análise de águas superficiais^{33,36,49} e efluentes industriais^{50,51}.

Biossensores a base de tirosinase

Tirosinases (polifenoloxidase, EC 1.14.18.1.) são enzimas tetraméricas, com uma massa molar na ordem de 120 kDa e com dois sítios ativos por molécula. Cada um destes sítios consiste em dois átomos de cobre coordenados com histidinas¹⁷. As enzimas tirosinases estão amplamente distribuídas na natureza⁵². A tirosinase obtida a partir de cogumelo, é a utilizada na maioria dos estudos com biossensores amperométricos. Esta enzima existe em múltiplas formas, distribuídas diferencialmente em várias partes do cogumelo. Essas formas podem apresentar diferentes características cinéticas e termodinâmicas⁵³.

A tirosinase exibe atividade hidroxilase (monofenolase) para monofenóis e atividade oxidase (difenoilase) para o-difenóis que são convertidos à o-quinonas^{17,54}. A tirosinase promove a conversão dos monofenóis em duas etapas consecutivas, que envolvem o oxigênio molecular, conforme mostram as equações 1 e 2. Na primeira etapa o monofenol é hidroxilado ao seu correspondente o-difenol (a atividade hidroxilase da enzima). Na segunda etapa, o o-difenol é oxidado à sua correspondente o-quinona (a atividade difenoilase da enzima), enquanto que a enzima é oxidada de volta à sua forma nativa pelo oxigênio molecular.



O forte poder oxidante do oxigênio torna a reação global irreversível⁵⁵. A última reação (equação 2) ocorre via três estados, relacionados aos estados de oxidação dos íons cobre denominados *met*, *deoxi* e *oxi*. O ciclo enzimático da tirosinase para o-difenóis, esquematizado na Figura 3, também pode ser representado pelas equações 3, 4 e 5

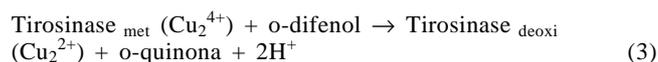


Tabela 1. Respostas relativa dos eletrodos modificados com diferentes enzimas para compostos fenólicos¹⁷.

Composto fenólico	Resposta relativa (%)			
	Tirosinase ³¹	Lacase ³¹	Tirosinase/lacase ³¹	Peroxidase ³³
p-cresol	100	100	100	100
Catecol	3500	560	900	100
Hidroquinona	2	560	143	
4-clorofenol	50	13	20	82
2-clorofenol	0,4	0	0	0
Resorcinol	1	3	0,5	33
Fenol	200	3	95	21
Terbutalina sulfato	0,4	1		
2-amino-4-clorofenol		94	111	532
2,4-diclorofenol				76
4-cloro-3-metilfenol				159
Vanilina				71
3,4-dihidroxibenzaldeído				39
Ácido3,4-dihidroxibenzóico				37
Tirosina				4

Para os eletrodos modificados com tirosinase, lacase e tirosinase coimobilizada com lacase, a concentração dos compostos fenólicos na solução tampão foi 1 mM, enquanto que 0,01 mM dos fenóis foi usado para o eletrodo modificado com peroxidase.

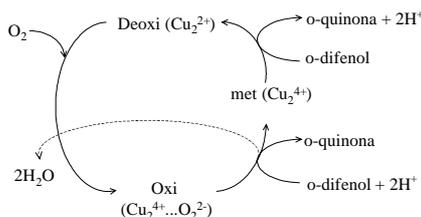
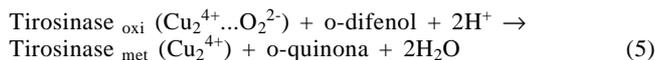
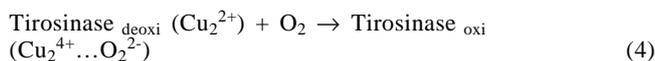


Figura 3. Ciclo catalítico da tirosinase.



A monofenolase ocorre via a conversão da forma $\text{Tirosinase}_{\text{oxi}}$ para a forma $\text{Tirosinase}_{\text{deoxi}}$ por monofenóis com concomitante produção de o-quinona e água. Em preparações frescas de tirosinase de cogumelo predomina a forma $\text{Tirosinase}_{\text{met}}$, um estado monofenolase inativo, enquanto que a forma $\text{Tirosinase}_{\text{oxi}}$, estado monofenolase ativo, existe apenas em pequenas proporções⁵⁶⁻⁵⁷. Isto explica porque a velocidade inicial de reação para monofenóis é muito lenta, a menos que um doador de dois elétrons adequado proporcione a conversão da enzima ao estado monofenolase ativo⁵⁶⁻⁵⁷.

Os esforços para usar tirosinase como uma ferramenta analítica para a determinação de fenóis e catecóis com transdução eletroquímica iniciaram em 1977 com o trabalho de Macholan e Schanel⁵⁸. Desde então, muitos biossensores baseados em tirosinase têm sido elaborados para a determinação de fenol envolvendo várias formas de detecção eletroquímica: detecção do consumo de oxigênio⁵⁸⁻⁶⁰, redução direta da o-quinona gerada^{34-35,61-71} e redução mediada da o-quinona^{72,73}.

O princípio da detecção do consumo de oxigênio está baseado no eletrodo de oxigênio de Clark, ao qual é incorporado um biocatalisador que utiliza oxigênio na presença de um substrato específico⁷⁴. A presença do analito causa um decréscimo na corrente monitorada pelo eletrodo enzimático. Estes eletrodos apresentam a desvantagem de terem sua resposta influenciada por flutuações na concentração de oxigênio dissolvido, resultantes de variações no pH, temperatura, força iônica ou pressão parcial.

A redução eletroquímica dos intermediários quinonas da reação enzimática proporciona vantagens de ativação da enzima e da reciclagem eletroenzimática de catecol (um segundo substrato enzimático e ativador da enzima), dando origem a uma amplificação do sinal^{34,35,63,66,71,75}, conforme mostra a Figura 4. Devido a estas vantagens, este princípio é o mais empregado nas análises com os biossensores amperométricos para fenóis, tanto em solventes aquosos como orgânicos. Além disso, a etapa de eletro-redução pode tornar-se mais eficiente sobre superfícies cataliticamente ativas, um fato que pode ser possível se um mediador adequado for incorporado sobre a superfície do eletrodo. Supõe-se que este efeito de amplificação é responsável pelos baixos limites de detecção reportados para fenol e o-difenol^{34,35,63,66,71,75}. Os mediadores ou modificações de superfície de maior sucesso para tal propósito são o tetracianoquinodimetano (TCNQ)⁷³ e metilfenazônio²³.

Eletrodos enzimáticos a base de tirosinase têm sido utilizados para a determinação seletiva de fenóis em matrizes ambientais^{1,2,6,8,65,66,69,76-78}. Tais dispositivos são comumente baseados na detecção amperométrica redutiva das espécies quinonas liberadas. Para este propósito, a tirosinase é imobilizada sobre a superfície do transdutor ou incorporada (misturada) dentro de uma matriz pasta de carbono.

Recentemente foi demonstrado que para análises de amostras reais¹⁹, a confiabilidade dos sensores para fenol pode melhorar se

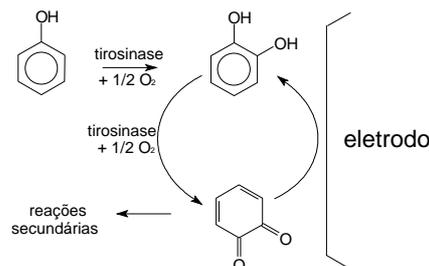


Figura 4. Mecanismo de transferência de elétrons de um eletrodo modificado com tirosinase para a determinação de monofenóis e/o o-difenóis.

a imobilização for otimizada. Parellada e col.¹⁹, utilizaram grafite espectroscópico para a construção de um sensor com tirosinase. A enzima foi imobilizada via reação com carbodimida e adição de polivinilpiridina previamente derivatizada com bromoetilamina. O biossensor foi usado para análise de fenóis em amostras de águas superficiais, e os resultados foram comparados com o método oficial para determinação de fenol, baseado na reação com 4-aminoantipirina. Os autores encontraram uma boa correlação, entre os resultados obtidos com o biossensor e o método oficial, para as amostras estudadas.

Wang e Chen²⁶ descreveram um biossensor amperométrico para monitoramento remoto de compostos fenólicos que consiste em um eletrodo enzimático a base de tirosinase conectado a um cabo de comunicação. Os limites de detecção para cresol (2×10^{-7} mol L⁻¹) e fenol (3×10^{-7} mol L⁻¹) foram similares àqueles obtidos com biossensores a base de tirosinase convencionais (não remotos)^{8,66,69,76}. Os autores observaram uma alta sensibilidade num amplo intervalo de pH (4,5-6,5), que é a faixa relevante para a maioria das amostras de águas naturais, para valores de pH mais altos houve um decréscimo na resposta. Quando este eletrodo foi utilizado em amostras de rios e de lençóis freáticos, contendo cresol e fenol, as respostas foram menores que as observadas em solução tampão. Tal diferença na resposta do eletrodo foi atribuída à efeitos da matriz (particularmente a presença de metais pesados). Contudo, os autores sugerem que procedimentos de calibração "in situ" podem ser utilizados para minimizar os efeitos da matriz, e deste modo, o reconhecimento biológico, acoplado ao baixo potencial de operação (0 V vs Ag/AgCl) pode permitir a seleção de analitos fenólicos em matrizes ambientais complexas.

Wang e Chen⁷⁹ descreveram uma nova estratégia para aumentar a sensibilidade de eletrodos modificados com tirosinase, baseada num processo de acumulação biocatalítica. Tal rota de bioacumulação consiste em separar o bioreconhecimento e a transdução do sinal no domínio de tempo, permitindo assim, a acumulação dos produtos quinonas (sobre condições de circuito aberto) antes da sua quantificação cronoamperométrica. Essa estratégia difere dos procedimentos de amplificação por regeneração do substrato baseado nos sistemas multienzimáticos⁸⁰ ou na adição de redutores⁸¹. A resposta analítica obtida por este processo, é substancialmente maior do que a obtida para biossensores análogos sem bioacumulação. Estes autores demonstraram que a reação biocatalítica, e não a acumulação, é a responsável pelo incremento da resposta. Foi observada uma amplificação do sinal de 28 vezes para 3 min de bioacumulação. Os autores também investigaram a aplicabilidade desta estratégia na determinação de fenóis em amostras de interesse ambiental, obtendo uma resposta bem definida para as amostras de água potável e de lençóis freáticos, após um tempo de bioacumulação de 1 min.

Também é descrita na literatura a incorporação de vários aditivos em biossensores a base de tirosinase para aumentar a estabilidade e sensibilidade para a determinação de compostos fenólicos^{23,29,34,82,83}.

Biossensores a base de lacase

As lacases são cuproproteínas do pequeno grupo de enzimas chamadas cupro-proteínas azuis, cuprooxidases azuis ou ainda apenas oxidases azuis. Os outros membros deste grupo são a ascorbato oxidase, a ceruloplasmina e a fenoxazinona sintetase⁸⁴⁻⁸⁸. A molécula de lacase, é uma glicoproteína dimérica ou tetramérica, que usualmente contém quatro átomos de cobre por monômero, ligados a três sítios redox, os quatro átomos de cobre diferem entre si por seus estados de oxidação (tipo 1, 2 e 3)⁸⁸. Este tipo de enzima encontra-se amplamente distribuída na natureza, mais de 60 tipos de lacases foram isoladas a partir de plantas, insetos, bactérias e fungos. Embora os centros de cobre sejam similares para todas as lacases de fungos, diferenças significantes nas propriedades termodinâmicas e cinéticas são observadas em função do microorganismo de origem⁸⁸.

As lacases são fenol-oxidases, que catalisam a oxidação de várias substâncias aromáticas (particularmente mono, di e polifenóis) e inorgânicas com a concomitante redução de oxigênio para água. O ciclo catalítico das lacases compreende três principais passos: 1) redução do cobre tipo 1 pelo substrato (analito); 2) transferência eletrônica interna do cobre tipo 1 para os cobs tipos 2 e 3; 3) redução de oxigênio molecular para água através de sua interação com os cobs de tipo 2 e 3⁸⁸. Em geral, as lacases apresentam baixa especificidade para os substratos redutores, quando comparada com sua alta preferência pelo O₂ como substrato oxidante. A oxidação dos substratos redutores tipicamente envolve a formação de radicais livres, após a transferência de um elétron para a lacase. O radical pode sofrer uma oxidação catalisada pela lacase (por exemplo, formar quinonas a partir de fenol) ou reagir por rotas não enzimáticas (exemplo, polimerização)^{24,84-88}.

Apesar da lacase e da tirosinase serem cupro-proteínas que catalisam a oxidação de compostos fenólicos, a suas especificidades e mecanismos são distintos. A tirosinase catalisa a hidroxilação de monofenóis para catecóis, os quais são oxidados a o-quinonas. Esta enzima não apresenta atividade para a oxidação de *para* e *meta*-benzenodióis e seus derivados substituídos. A lacase, por outro lado, pode catalisar a oxidação destes compostos, assim como, de orto-benzenodióis e fenol. Entretanto, os produtos de reação formados durante a atuação da lacase ainda não são completamente conhecidos em detalhes⁹⁷.

Yaropolov e col.³¹, demonstraram que a resposta amperométrica para compostos fenólicos, utilizando biossensores a base de lacase, é muito estável, permitindo a utilização de análises em fluxo, com uma frequência superior a 40 amostras/h sem nenhuma queda na atividade de lacase.

Bier e col.⁸⁹, utilizaram a capacidade da lacase de oxidar vários substratos fenólicos, para determinar uma série de aminofenóis e catecolaminas. Wang e Lin⁹⁰, demonstraram a utilidade de biossensores com lacase na determinação de compostos fenólicos em meios orgânicos, utilizando análises em fluxo. Rella e col.⁹¹, fazendo uso da alta termo-estabilidade da lacase desenvolveram um biossensor capaz de operar na faixa de 35-55 °C. Este sensor também pôde ser operado em uma ampla faixa de pH (4-8) e apresentou reprodutibilidade durante mais de 4 meses.

Biossensores a base de peroxidases

Esta classe de enzimas é assim denominada devido ao peróxido de hidrogênio ser o seu principal substrato. As peroxidases constituem uma ampla classe de enzimas, que encontram-se extensivamente distribuídas no reino animal e vegetal. As peroxidases são hemeproteínas (sítio ativo: Fe³⁺ protoporfirínico) com um ciclo catalítico comum⁹², conforme esquematizado na Figura 5.

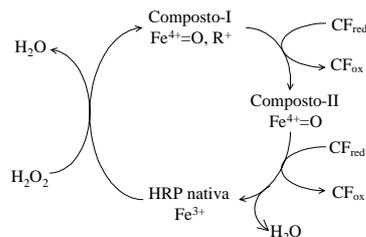
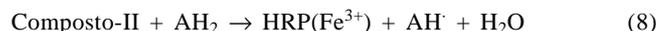


Figura 5. Ciclo catalítico da enzima peroxidase (HRP). R[•] = radical protoporfirina. CF = composto fenólico.

A peroxidase de raiz forte (HRP, do inglês horseradish peroxidase) tem sido a mais freqüentemente utilizada, devido principalmente a sua alta estabilidade por longos períodos de tempo à temperatura ambiente e em um amplo intervalo de pH; além de ser relativamente barata e disponível comercialmente em diferentes graus de pureza.

A reação enzimática da peroxidase (HRP) ocorre em três etapas distintas, como mostram as equações 6-8^{92,93}:



Na primeira etapa, a enzima reduz H₂O₂ formando um composto oxidado intermediário (Composto-I). A forma oxidada da enzima é então, reduzida à sua forma nativa em duas etapas, sendo que em cada etapa uma substância orgânica é oxidada. A Figura 5, ilustra o ciclo catalítico da HRP.

Ruzgas e col.⁹³, fizeram uma revisão sobre as propriedades catalíticas, estruturais e eletroquímica de peroxidases. Quando a enzima peroxidase está imobilizada na superfície de um eletrodo, os intermediários oxidados da enzima, Composto-I e Composto-II, podem ser reduzidos de volta ao seu estado nativo por dois caminhos: uma transferência de elétrons direta ou mediada^{32,93}. Na transferência de elétrons direta as formas oxidadas da enzima são reduzidas por elétrons doados do próprio eletrodo, principalmente se este for grafite^{41,93}. Já na transferência mediada de elétrons, a enzima recebe elétrons de substâncias doadoras (AH₂), como por exemplo fenóis, amins aromáticas, ferrocenos^{33,93,94}. Na presença de uma substância doadora de elétrons a enzima é regenerada e as espécies AH formadas são reduzidas eletroquimicamente no eletrodo, resultando em uma corrente de redução proporcional à concentração da substância doadora³³. O mecanismo de transferência de elétrons mediado em eletrodos modificados com peroxidase é mostrado na Figura 6. É conhecido que uma alta concentração de peróxido pode levar a uma forma inativa da peroxidase⁹⁵.

Deste modo, os fenóis podem atuar como doadores de elétrons na reação da peroxidase com peróxidos⁹⁴, sendo este o princípio da utilização de eletrodos modificados com peroxidase para a detecção de espécies fenólicas^{32,33,96-97}. Ruzgas e col.³³, demonstraram a possibilidade de utilizar os eletrodos de grafite sólido e de pasta de carbono modificados com HRP para a determinação de fenóis e compostos relacionados. Os autores observaram que os compostos fenólicos oxidados pela peroxidase na presença de peróxido podem ser eletroquimicamente reduzidos em eletrodos de grafite sólido e em pasta de carbono. Entretanto, a redução eletroquímica dos radicais na superfície da pasta não foi efetiva. Uma rápida redução eletroquímica dos radicais é muito importante para a obtenção de eletrodos estáveis e sensíveis. Nesse sentido, a adsorção de peroxidase sobre eletrodos de grafite sólido promoveu um melhor desempenho. Entre os 20 compostos fenólicos testados por estes autores, o biossensor a base de peroxidase apresentou uma maior sensibilidade para os compostos 2-amino-4-clorofenol (85 nA cm⁻² μM⁻¹) e 4-cloro-3-metilfenol (14 nA cm⁻² μM⁻¹).

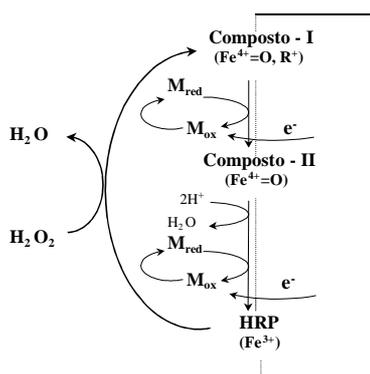


Figura 6. Mecanismo de transferência de elétrons mediada (por exemplo, por fenol) em eletrodos modificados com peroxidase. M_{ox} e M_{red} são as formas oxidada e reduzida do mediador, respectivamente. R^{\bullet} = radical protoporfirina

O mecanismo de ação direta e mediada de um biossensor a base de HRP, também foi estudado por Ruzgas e col.³², empregando compostos fenólicos, tais como, p-cresol, fenol e p-clorofenol. Os autores observaram que a transferência de elétrons direta entre a peroxidase e o grafite é um processo lento e reafirmaram a eficiência do processo mediado. Analisando a redução dos Compostos-I e II (equações 6-8) por ambos os mecanismos simultaneamente, os autores concluíram que as moléculas de HRP sobre a superfície de grafite não estão igualmente envolvidas nos dois processos, e calcularam que somente 40% das moléculas de HRP adsorvidas são capazes de participar na redução bioeletrocatalítica direta de H₂O₂.

Tem sido verificado que durante a determinação de compostos fenólicos, em análises em fluxo (FIA), com eletrodos modificados com HRP, uma fonte contínua de H₂O₂ resulta em uma corrente de estado-estacionário devido à redução eletroquímica da peroxidase, aparecendo um pequeno pico sobre o topo da corrente de background, quando um composto fenólico é injetado, devido à redução mediada da peroxidase. Esse comportamento sugere que uma fração de moléculas de HRP está adsorvida ou ligada de uma forma que proporciona uma transferência de elétrons direta efetiva, enquanto que outras moléculas HRP estão mais distantes ou orientadas de modo que as torne disponíveis apenas para transferência de elétrons mediada⁹⁶⁻⁹⁷.

Na busca de eletrodos modificados, com peroxidase, com maior sensibilidade e melhor limite de detecção, Lindgren e col.⁹⁶ estudaram diferentes técnicas de imobilização da enzima na superfície de grafite sólido, incluindo adsorção e ligação covalente. Neste estudo os autores verificaram que os biossensores preparados com grafite previamente submetido a um tratamento térmico apresentaram um menor ruído e melhores limites de detecção e sensibilidade. O tratamento térmico ativa a superfície para redução bioeletroquímica direta de H₂O₂⁴⁰. Quando os eletrodos foram preparados usando glutaraldeído, a detecção de H₂O₂ foi mais efetiva do que a de fenol. A estabilidade dos eletrodos com a enzima acoplada covalentemente (com carbodiimida) foi igual a dos eletrodos com a enzima adsorvida. Independente do método de preparação, os eletrodos apresentaram inicialmente um rápido decréscimo na corrente de estado estacionário para H₂O₂, e a resposta para p-cresol foi aproximadamente constante por duas semanas.

Lindgren e col.⁹⁶ também investigaram a utilização de peroxidases de diferentes origens para a construção dos eletrodos para a detecção de compostos fenólicos. Foram utilizadas peroxidase de raiz forte (HRP), peroxidase de *Arthromyces ramosus* (ARP), peroxidase de soja (SBP), cloroperoxidase de fungo *Caldariomyces* (ChIP), lactoperoxidase de leite de vaca (LP) e peroxidase de tabaco, *Nicotiana glauca* (TOP). Foi observado que a relação entre a resposta para p-cresol e a

corrente de estado estacionário para H₂O₂ difere significativamente entre as diferentes peroxidases, o que indica diferenças na habilidade em receber elétrons das substâncias doadoras de elétrons. Estes biossensores mostraram resposta em fluxo para vários compostos fenólicos, entretanto o perfil de seletividade varia significativamente entre as peroxidases de diferentes origens biológicas.

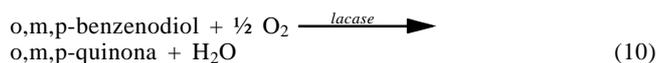
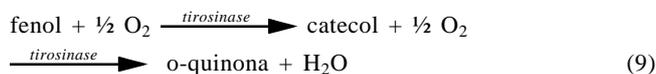
Munteanu e col.⁹⁷ usaram HRP, TOP e peroxidase de amendoim (PNP) na construção de eletrodos para a detecção de fenóis e aminas aromáticas. Foi verificado que a estrutura do substrato afeta a reatividade da enzima, indicando que peroxidases de origens diferentes apresentam diferenças significativas na sensibilidade. Os limites de detecção de 10 nmol L⁻¹ para determinação de o-aminofenol e o- e p-fenilendiamina conseguidos com o eletrodo modificado com a peroxidase de tabaco, prometem progressos na sensibilidade e limite de detecção destes biossensores para determinação de poluentes fenólicos. Neste sentido, os esforços futuros estão sendo focados sobre arranjos de biossensores, usando diferentes peroxidases que possibilitem discriminar as estruturas dos diferentes poluentes.

A sensibilidade dos biossensores a base de peroxidase para a detecção de fenol é limitada pela corrente produzida pela transferência de elétrons direta entre a enzima e o eletrodo na presença apenas de peróxido⁹⁶⁻⁹⁷, sendo interessante uma diminuição neste processo para aumentar a sensibilidade do biossensor para fenol. Kubota e col.⁹⁸ descreveram a imobilização de HRP sobre sílica gel modificada com óxido de titânio e seu uso no desenvolvimento de um biossensor a base de pasta de carbono. A transferência de elétrons direta da redução de peróxido de hidrogênio por HRP foi bloqueada quando imobilizada sobre sílica-titânio, rendendo ao biossensor uma alta sensibilidade para fenol em um potencial aplicado de 0 mV vs ECS. O biossensor mostrou um intervalo de resposta linear entre 10 e 50 μmol L⁻¹ de fenol, com um tempo de resposta de cerca de 3 s.

A estabilidade do biossensor desenvolvido por Kubota e col.⁹⁸ foi menor comparada à obtida com a peroxidase imobilizada diretamente sobre grafite, provavelmente devido ao seu ambiente. Entretanto, num estudo sobre a influência de aditivos na sensibilidade e estabilidade deste biossensor, verificou-se que a adição de albumina de soro bovino e principalmente DNA melhoraram o tempo de vida do biossensor, e que a incorporação de DNA, além de grande aumento da estabilidade do biossensor, melhora também a sua sensibilidade para fenol⁹⁹.

Biossensores bienzimáticos

Lacase e tirosinase são oxidases que contêm cobre e catalisam a redução de oxigênio molecular por diferentes doadores de elétrons, como por exemplo, compostos fenólicos. A oxidação de fenóis por essas duas enzimas pode ser representada pelas equações 9 e 10:



A especificidade de substrato e o mecanismo das duas enzimas são diferentes, mas suas ações em biossensores para a detecção de compostos fenólicos são baseadas na detecção amperométrica do produto formado na reação enzimática. Assim a co-imobilização de lacase e tirosinase sobre o material de eletrodo permite a detecção de um número maior de compostos fenólicos³¹.

Cosnier e col.¹⁰⁰, buscando aumentar a sensibilidade, para a determinação de fenol, dos biossensores a base de polifenol oxidase (PPO), co-imobilizaram HRP e PPO sobre a superfície de um eletrodo e usaram o sensor bienzimático resultante na presen-

ça de H_2O_2 . A associação do sistema HRP- H_2O_2 ao PPO induz uma amplificação da sensibilidade e uma extensão do intervalo linear da curva de calibração. Os dois fenômenos produzindo este efeito foram a maior eficiência do sistema HRP- H_2O_2 em gerar o-quinona a partir de catecol devido a maior atividade específica e menor massa molar de HRP comparado a PPO, e o aumento do conteúdo de oxi-tirosinase, com a presença de peróxido¹⁰¹, que é a única forma de PPO ativa na ortohidroxilação de fenol e sua subsequente oxidação a o-quinona¹⁰².

Biossensores a base de tecidos animais ou vegetais

Em vez de tentar estabilizar enzimas purificadas em configurações de biossensor, uma alternativa pode ser o uso de células inteiras, tecidos ou organelas¹⁰³⁻¹⁰⁶. Deste modo, as enzimas estão em seu ambiente natural com todos os estabilizadores e ativadores necessários. Materiais ricos em tirosinase e polifenol oxidase em combinação com pasta de carbono tem sido muito utilizado, e alguns exemplos deste tipo de eletrodo são mostrados na Tabela 2^{72,107-112}. Esta tabela é um indicativo da potencialidade destes diferentes materiais biológicos na construção de biossensores para compostos fenólicos, embora ainda pouco empregados em amostras de interesse ambiental.

Forzani e col.¹¹³, determinaram derivados de fenol empregando tecidos de pera, batata, amendoim e fungos. Os biossensores apresentaram boa reprodutibilidade e baixos limites de detecção. Canofeni e col.⁶⁰, utilizando um sistema em fluxo e tecidos de batata e fungos, determinaram fenóis em amostras de interesse ambiental com boa reprodutibilidade.

Biossensores a base de extratos brutos

Vieira e Fatibello-Filho¹¹⁴, desenvolveram um biossensor para fenol baseado em extrato bruto de batata doce contendo tirosinase. O biossensor foi construído pela imobilização de extrato bruto de batata doce com glutaraldeído e albumina de soro bovino sobre uma membrana de um eletrodo de oxigênio. Os autores empregaram com sucesso o biossensor desenvolvido em análises de efluentes industriais.

Bassi e McGrath¹¹⁵, prepararam um biossensor baseado em extrato da casca da semente de soja contendo peroxidase, que demonstrou resultados promissores na determinação de fenol. Sobre a superfície de um eletrodo de pasta de carbono quimicamente

modificado construído combinando-se dimetilferroceno, grafite em pó e óleo mineral, foi feita a deposição do extrato contendo a enzima através de ligação cruzada com glutaraldeído. As vantagens desta técnica de preparação foram uma resposta rápida, baixo custo e estabilidade do biossensor que pode ser operado por até 3 semanas. Em termos de resposta para detecção de fenol, o biossensor desenvolvido foi menos sensível que outros biossensores previamente reportados baseados em SBP ou HRP purificadas ou sobre extrato bruto de batata doce¹¹⁴ que têm limites de detecção no intervalo de micromol para fenol, o que pode ser devido à baixa atividade do extrato de enzima utilizado na investigação.

Signori e Fatibello-Filho¹¹⁶, desenvolveram um biossensor para substratos fenólicos utilizando como fonte enzimática extrato bruto de polifenol oxidase, oriunda de diversos vegetais e frutas, imobilizado com glutaraldeído, sobre uma membrana de acetato de celulose de um eletrodo de oxigênio. Os autores concluíram que o extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*) foi a melhor fonte de polifenol oxidase, devido a sua estabilidade e atividade ($U\ mg^{-1}$). O biossensor que respondeu preferencialmente à pirogalol e catecol, apresentou um tempo de resposta de 1-4 minutos e um tempo de vida útil de no mínimo duas semanas. Os autores mostraram a aplicabilidade deste biossensor em análises de compostos fenólicos em efluentes industriais, encontrando resultados concordantes com a determinação de fenóis por espectrofotometria de absorção molecular.

Biossensores a base de microorganismos

Biossensores usando células, usualmente chamados sensores microbianos, exploram as funções metabólicas dos organismos vivos tais como bactérias, leveduras e fungos para medir poluentes. Sensores microbianos podem ser considerados como uma forma de bioensaio em que o organismo está combinado com um transdutor adequado. As vantagens de usar esses materiais em vez de enzimas purificadas é que células podem ser facilmente isoladas da natureza (rios, sedimentos, solo, etc.). Além disso, sensores microbianos são menos sensíveis à inibição por outros compostos presentes na matriz, são mais tolerantes a variações de pH, temperatura e geralmente tem maior tempo de vida. Entretanto, algumas limitações inerentes aos sensores microbianos são os tempos de resposta mais longos e menor seletividade do que a obtida com enzimas isoladas,

Tabela 2. Biossensores amperométricos para análise de compostos fenólicos a base de tecidos e células⁴⁵.

Tecido/célula	Enzima(s)	Análito	E vs Ag/AgCl (pH)	Referência
Cogumelo	tirosinase	Fenol (0,16-15 ppm)	-0,2 V (7,5)	72
Banana	Polifenol oxidase	Dopamina (5-90 μ M), Catecol, L-dopa, epinefrina, hidroquinona	-0,2 V (7,4)	107
Banana ou Cogumelo	polifenol oxidase ou tirosinase	Dopamina (0,4-10 μ M), L-dopa, Norepinefrina	+0,1 V (7,4)	108
Banana	Polifenol oxidase	Dopamina, epinefrina, Norepinefrina	-0,2 V (4,5)	109
Cogumelo	tirosinase	Fenol, p-cresol, p-clorofenol	-0,2 V (5,0)	109
Beringela	Polifenol oxidase	Dopamina (50-250 μ M) L-dopa (100-600 μ M) Catecol (5-45 μ M)	0,2 V (7,0)	110
Espinafre	Catecol oxidase	Dopamina (2-160 μ M), L-dopa, norepinefrina	-0,2 V (8)	111
Espinafre	Polifenol oxidase	Dopamina (50 mM-?)	-0,2 V (7,4)	112

Composição dos eletrodos: grafite em pó e óleo mineral

devido à variedade de processos metabólicos ocorrendo em uma célula viva. Os princípios deste tipo de biossensor, bem como as características envolvidas em sua construção e aplicação, foram revisados^{16,117}.

Sensores eletroquímicos microbianos usualmente consistem de uma membrana contendo microorganismos imobilizados em contato com um dispositivo eletroquímico. O transdutor pode detectar o consumo de oxigênio ou o aparecimento/desaparecimento de um metabólito eletroquimicamente ativo. Sensores eletroquímicos microbianos também têm sido desenvolvidos para a detecção de compostos fenólicos¹¹⁸⁻¹²¹.

Riedel e col.¹²⁰ utilizaram espécies *Rhodococcus* imobilizadas por oclusão e aplicadas a um eletrodo de oxigênio para a determinação de fenol e clorofenóis. Para aumentar a seletividade e sensibilidade do sensor microbiano, o sensor foi pré incubado no substrato teste. A especificidade estudada por injeções de fenol junto com seus cloroderivados mostrou que o sensor com o *Rhodococcus* foi mais sensível para monoclórofenóis do que para di ou tri clorofenóis.

A maioria dos sensores microbianos para fenol^{118,122-124} e seus derivados clorados^{120,125} foram baseados em sistemas com solventes aquosos e empregando eletrodos para oxigênio convencionais do tipo Clark.

Bachmann e col.¹²⁶ utilizaram células induzidas de *Pseudomonas putida* DSM 48 imobilizadas sobre eletrodo para oxigênio de Clark para desenvolver um sensor microbiano para fenol, ácido benzóico e derivados clorados, que pode ser usado em água e n-hexano. O melhor desempenho deste sensor foi em termos de sensibilidade, estabilidade operacional e armazenagem, comparando-se com outros sensores microbianos reportados. O sensor apresentou resposta linear até uma concentração de fenol de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Monoclórofenóis foram detectados até uma concentração de 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com uma forte dependência do substrato usado no cultivo da célula. O desempenho do sensor em n-hexano mostrou maior sensibilidade comparada com a obtida em tampão Tris, entretanto a estabilidade operacional foi menor. Esse mesmo trabalho¹²⁶ descreve outro biossensor que foi desenvolvido baseado na imobilização dos microorganismos diretamente sobre a superfície silanizada do eletrodo, e apresentou características similares ao anterior em termos de sensibilidade e estabilidade, com um rápido tempo de equilíbrio (5 minutos).

Rainina e col.¹¹⁸ descreveram um sensor baseado em células microbianas imobilizadas em álcool polivinílico na forma de criogel. O biossensor foi desenvolvido pelo uso de células de *Pseudomonas putida* GFS-8 que foram cultivadas em meio LB e transferidas para um meio com fenol como única fonte de carbono. Este biossensor permite a determinação de fenol no intervalo de concentração de 0,1-1 mg L^{-1} . O tempo total para análise foi 5 minutos e o mesmo biossensor pôde ser utilizado para determinar fenol por no mínimo 10 vezes, sendo que após cada uso, é necessário lavar o eletrodo por pelo menos 10 min. Para avaliar a aplicabilidade do biossensor, fenol foi medido em soluções modelo de multicomponentes, similares à águas residuais. Soluções de anilina, acetofenona, dimetilfenilcarbinol, acetona, cumeno, e cloreto de alumínio, isoladas ou em combinação com fenol foram usadas como substratos para as células imobilizadas. Dentre esses compostos apenas a anilina influenciou a determinação de fenol causando uma diminuição na velocidade do consumo de oxigênio.

TENDÊNCIAS FUTURAS SOBRE A APLICAÇÃO DOS BIOSENSORES

A detecção de substâncias em tempo real é a tendência da química analítica para o futuro. É cada vez maior a preocupação dos químicos de determinar em tempo real, e preservando ao máximo as condições existentes na natureza, os compostos ou substâncias presentes em alimentos e materiais de interesse

clínico, biológico e ambiental. Isso justifica o grande interesse no desenvolvimento de biossensores em diversas áreas.

Entretanto, certas considerações práticas devem ser levadas em conta para a aplicação de biossensores no monitoramento "on-line" de espécies fenólicas, por exemplo, os biossensores necessitam de condições brandas de temperatura e pH para manter o elemento biológico ativo. Além disso, para maximizar a resposta de um biossensor, as condições de operação devem ser otimizadas com respeito ao pH, temperatura e força iônica. Isto faz com que o uso de biossensores para monitoramento de fenóis "in-situ" ainda não tenha atingido todo o seu potencial de atuação. Tem sido demonstrado que a combinação da técnica de análise por injeção em fluxo (FIA) com biossensores melhora o desempenho dos métodos analíticos. Esta combinação tem sido empregada para a investigação com muitos dos biossensores amperométricos para compostos fenólicos que têm sido desenvolvidos visando o monitoramento ambiental.

Os problemas de falta de estabilidade operacional, estocagem e sensibilidade (exceto para os melhores substratos da enzima) dos biossensores para fenóis têm sido contornados através de modificações que podem ser desde a etapa de construção dos biossensores, como materiais de eletrodos, diferentes técnicas de imobilização do componente biológico, adição de mediadores, estabilizadores, até a análise em si. Dessa forma, a literatura dispõe de muitas publicações considerando biossensores amperométricos que atingiram os limites de detecção necessários para análise de amostra de interesse ambiental. Porém, nas análises em amostras reais, um parâmetro também importante é a eliminação de interferentes. Em alguns casos, este fato tem levado à utilização de sistemas mais robustos, que de um modo geral são menos sensíveis, ou novos métodos de compensação de sinal, que são os objetivos de muitos esforços para aumentar a versatilidade dos biossensores amperométricos.

Para que tais biossensores sejam úteis em análises ambientais, é necessário melhorar os mecanismos de transdução e combinar tais progressos com a escolha das seqüências de reações biológicas em novos materiais na transdução eletroquímica. Contudo, a configuração final depende da matriz analítica.

O emprego de arranjos de eletrodos modificados com diferentes enzimas (seletivas para determinados compostos fenólicos) e diferentes processos de imobilização, assim como o tratamento dos dados experimentais através de métodos quimiométricos (PLS, redes neurais), desponta como uma grande perspectiva para a determinação simultânea e "in situ" de todas as espécies fenólicas presentes em amostras de interesse ambiental. Esta possibilidade é de grande interesse nos estudos de toxicidade e tratamento de efluentes industriais.

Os progressos conseguidos em relação à estabilidade dos biossensores para fenóis através da incorporação de aditivos, principalmente o DNA, são bastante promissores para aplicação destas configurações em situações que requeiram monitoramento contínuo, possibilitando o monitoramento remoto em futuro breve.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Nistor, C.; Ennéus, J.; Gorton, L.; Ciucu, A.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *387*, 309.
2. Svitel, J.; Miertus, S.; *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 828.
3. Freire, R. S.; Pelegrini, R.; Kubota, L. T.; Peralta-Zamora, P.; Durán, N.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 504.
4. Barceló, D.; *Environmental Analysis-Techniques, Applications and Quality Assurance* Elsevier, Amsterdam, 1993, p 1.

5. Ortega, F.; Domínguez, E.; Burestedt, E.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; *J. Chromatogr., A* **1994**, *675*, 65.
6. Russell, I. M.; Burton, S. G.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *389*, 161.
7. Calvo, E. J.; Danilowicz, C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1997**, *8*, 563.
8. Campanella, L.; Beone, T.; Sammartino, M. P.; Tomassetti, M.; *Analyst* **1993**, *118*, 979.
9. Zimmermann, F.; Taylor-Mayer, R.; *Mutagenicity Testing in Environmental Pollution Control*, John Wiley and Sons, New York, 1985, p 1.
10. Vincent, G.; In *Organic Micropollutants in the Aquatic Environmental*; Angeletti, G.; Bjorseth, A. (Eds); Klumer Dordrecht, 1991, p285.
11. EPA Method 604, Phenol. Environmental Protection Agency, Part III, 40 CFT Part 136, *Fed Regist*, 1984, p 58.
12. Ambient Water Quality Criteria for Phenol, U.S. EPA 440/5-80-066; U.S. EPA, Washington, DC, 1980.
13. Puig, D.; Ruzgas, T.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; Barceló, D.; *Electroanalysis* **1996**, *8*, 885.
14. Vilchez, J. L.; del Olmo, M.; Diez, C.; Molina, A.; Orbe, I.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *335*, 23.
15. Rogers, K. R.; Willians, L. R.; *Trends Anal. Chem.* **1995**, *14*, 289.
16. Karube, I.; Nomura, Y.; Arikama, Y.; *Trends Anal. Chem.* **1995**, *14*, 295.
17. Marko-Varga, G.; Emnéus, J.; Lo Gorton; Ruzgas, T.; *Trends Anal. Chem.* **1995**, *14*, 319.
18. Denninson, M. J.; Turner, A. P. F.; *Biotechnol. Adv.* **1995**, *13*, 1.
19. Parellada, J.; Narváez, A.; López, M. A.; Domínguez, E.; Fernández, J. J.; Pavlov, V.; Katakis, I.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *362*, 47.
20. Puig, D.; Barcelo, D.; *Trends Anal. Chem.* **1996**, *15*, 362.
21. Norberg, J.; Emnéus, J.; Jönson, J. A.; Mathiasson, L.; Burestedt, E.; Knutsson, M.; Marko-Varga, G.; *J. Chromatogr., B* **1997**, *701*, 39.
22. Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes, EPA Manual 600/4-79-020, Method 420.1: Phenolic, total recoverable; Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, 1983.
23. Kotte, H.; Gründig, B.; Vorlop, K. D.; Strehlitz, B.; Stottmeister, V.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 65.
24. Nistor, C.; Emnéus, J.; *Waste Manage.* **1999**, *19*, 147.
25. May, S. W.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 370.
26. Wang, J.; Chen, Q.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *312*, 39.
27. Sigrist, H.; Gao, H.; *Chimia* **1999**, *53*, 81.
28. Bogdanovskaya, V. A.; Tarasevich, M. R.; *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 853.
29. Hedenmo, M.; Narváez, A.; Domínguez, E.; Katakis, I.; *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *425*, 1.
30. Burestedt, E.; Narvaez, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; Emnéus, J.; Domínguez, E.; Marko-Varga, G.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1605.
31. Yaropolov, A. J.; Kharybin, A. N.; Emnéus, J.; Marko-Varga, G.; Gorton, L.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *308*, 137.
32. Ruzgas, T.; Gorton, L.; Emnéus, J.; Marko-Varga, G.; *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *391*, 41.
33. Ruzgas, T.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *311*, 245.
34. Lutz, E. S. M.; Burestedt, E.; Emnéus, J.; Jarskog, S.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *305*, 8.
35. Önerfjord, P.; Emnéus, J.; Marko-Varga, G.; Gorton, L.; Ortega, F.; Domínguez, E.; *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 607.
36. Burestedt, E.; Emneus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; Dominguez, E.; Ortega, F.; Navaez, A.; Irth, H.; Puig, D.; Bárcelo, D.; *Chromatographia* **1995**, *41*, 207.
37. Mulchandani, A.; Bassi, A. S.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **1995**, *15*, 105.
38. King, W. P.; Joseph, K. T.; Kissinger, P. T.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1980**, *63*, 137.
39. Burestedt, E.; Narvaez, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; Emnéus, J.; Domínguez, E.; Marko-Varga, G.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1605.
40. Csöregi, E.; Jönsson-Pettersson, G.; Gorton, L.; *J. Biotechnol.* **1993**, *30*, 315.
41. Gorton, L.; Jönsson-Petersson, G.; Csöregi, E.; Johansson, K.; Domínguez, E.; Marko-Varga, G.; *Analyst* **1992**, *117*, 1235.
42. Kinoshita, K.; *Carbon: Electrochemical and Physicochemical Properties*, Wiley, New York, 1988, p 1.
43. Razumas, V. J.; Jasaitis, J. J.; Kulys, J. J.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1989**, *12*, 297.
44. Bartlett, P. N.; Tebbutt P.; Whitaker, R. G.; *Kinetics aspects of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry*. In Cundall, R.B.; Kemp, T.J., Ed., *Prog. React. Kinet.*, 1991, p 55.
45. Gorton, L.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 23.
46. Wang, J.; Chen, Q.; *Anal. Lett.* **1995**, *28*, 1131.
47. Wang, J.; Lu, F.; Kane, S. A.; Choi, Y. K.; Smyth, M. R.; Rogers, K.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 1102.
48. Rogers, K. R.; Becker, J. Y.; Wanh, J.; Lu, F.; *Field Anal. Chem. Technol.* **1999**, *3*, 161.
49. Schimidt, J. C.; *Field Anal. Chem. Technol.* **1998**, *2*, 351.
50. Campanella, L.; Favero, G.; Pastorino, M.; Tomassetti, M.; *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 179.
51. Paterson, B.; Cowie, C. E.; Jackson, P. E.; *J. Chromatogr., A* **1996**, *731*, 95.
52. Bendall, D. S.; Gregory, R. P. F.; *Purification of phenol oxidases*. In Pridham, J.B., Ed. *Enzyme chemistry of phenolic compounds*. Pergamon, Oxford, 1963, p 7.
53. Rodriguez, M. O.; Flurkey, W. H.; *J. Chem. Educ.* **1992**, *69*, 767.
54. Sánchez-Ferrer, A.; Rodríguez-Lopez, J. M.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F.; *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, *1247*, 1.
55. Ortega, F.; Domínguez, E.; Jönsson-Pettersson, G.; Gorton, L.; *J. Biotechnol.* **1993**, *31*, 289.
56. Naish-Byfield, S.; Riley, P. A.; *Biochem. J.* **1992**, *288*, 63.
57. Naish-Byfield, S.; Cooksey, C. J.; Riley, P. A.; *Biochem. J.* **1994**, *304*, 155.
58. Macholan, L.; Schanel, L.; *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1977**, *42*, 3667.
59. Campanella, L.; Sammartino, M. P.; Tomassetti, M.; *Sens. Actuators, B* **1992**, *7*, 383.
60. Canofeni, S.; Di Sario, S.; Mela, J.; Pilloton, R.; *Anal. Lett.* **1994**, *27*, 1659.
61. Hall, G. F.; Best, D. J.; Turner, A. P. F.; *Anal. Chim. Acta.* **1988**, *213*, 113.
62. Skáládal, P.; *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1991**, *56*, 1427.
63. Cosnier, S.; Innocent, C.; *J. Electroanal. Chem.* **1992**, *328*, 361.
64. Wang, J.; Naser, N.; Kwon, H.-S.; Cho, M. Y.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, *264*, 7.
65. Wang, J.; Reviejo, A. J.; Mannino, S.; *Anal. Lett.* **1992**, *25*, 1399.
66. Cosnier, S.; Innocent, C. H.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1993**, *31*, 147.
67. Wang, J.; Lin, Y.; Chen, Q.; *Electroanalysis* **1993**, *5*, 23.
68. Wang, J.; Lin, Y.; Chen, Q.; *Analyst* **1993**, *118*, 277.
69. Wang, J.; Fang, L.; Lopez, D.; *Analyst* **1994**, *119*, 455.
70. Besombes, J. L.; Cosnier, S.; Labbé, P.; Reverdy, G.; *Anal. Lett.* **1995**, *28*, 405.
71. Wang, J.; Lu, F.; Lopez, D.; *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 9.
72. Bonakdar, M.; Vilchez, J. L.; Mottola, H. A.; *J. Electroanal. Chem.* **1989**, *226*, 47.
73. Kulys, J.; Schmid, R. D.; *Anal. Lett.* **1990**, *23*, 589.

74. Clark, L. C.; *The enzyme electrode*. In *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Turner, A. P. F.; Karube, I.; Wilson, G. S., (Eds.); Oxford University Press, Oxford, 1970, p3.
75. Schiller, J. G.; Chen, A. K.; Liu, C. C.; *Anal. Biochem.* **1978**, *85*, 25.
76. Ortega, F.; Cuevas, J.; Centerena, J.; Dominguez, E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1992**, *10*, 789.
77. Kaisheva, A.; Iliou, I.; Kazareva, R.; Christov, S.; Wollenberger, U.; Scheller, F.; *Sens. Actuators, B* **1996**, *33*, 39.
78. Adeyolu, O.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; *Analyst* **1996**, *121*, 1885.
79. Wang, J.; Chen, Q.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 746.
80. Schubert, F.; Scheller, F.; Krasteva, N.; *Electroanalysis* **1990**, *3*, 347.
81. Uchiyama, S.; Hasebe, Y.; Schimuzu, H.; Ishihara, H.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, *276*, 341.
82. Min, R. W.; Rajendran, V.; Larsson, N.; Gorton, L.; Planas, J.; Hahn-Hägerdal, B.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *366*, 127.
83. Dantoni, P.; Serrano, S. H. P.; Brett, A. M. O.; Gutz, I. G. R.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *366*, 137.
84. Thurston, C. F.; *Microbiology* **1994**, *140*, 19.
85. Malmström, B. G.; Andréasson, L. E.; Reinhammar, B.; *Copper-containing oxidases and superoxide dismutase*. In *The enzymes*; Boyer, P. D., (Ed.); New York: Academic Press, 1975, p 507.
86. Yaropolov, A. I.; Skorobogatko, O. V.; Vartanov, S. S.; Varfolomeyev, S. D.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1994**, *40*, 257.
87. Karhunen, E.; Niku-Paavola, M.-L.; Viikari, L.; Haltia, T.; Meer, R. A.; van der Duine, J. A.; *FEBS Lett.* **1990**, *267*, 6.
88. Gianfreda, L.; Xu, F.; Bollag, J. M.; *Bioremediation J.* **1999**, *3*, 1.
89. Bier, F. F.; Ehrentreich-Förster, E.; Scheller, F. W.; Makower, A.; Eremenko, A.; Wollenberger, U.; Bauer, C. G.; Pfeiffer, D.; Michael, N.; *Sens. Actuators, B* **1996**, *33*, 5.
90. Wang, J.; Lin, Y.; *Anal. Lett.* **1997**, *26*, 197.
91. Rella, R.; Ferrara, D.; Barinson, G.; Donetti, L.; Lora, S.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1996**, *24*, 83.
92. Dunford, H. B.; *Horseradish Peroxidase: Structure and Kinetics Properties*. In *Peroxidases in Chemistry and Biology*; Everse, J.; Everse, K. E.; Grishan, M. B., (Eds.); CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, 2.
93. Ruzgas, T.; Csöregi, E.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *330*, 123.
94. Kulys, J.; Bulitewski, U.; Schmid, R. D.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1991**, *26*, 277.
95. Adeiran, S. A.; Lambeir, A.-M.; *Eur. J. Biochem.* **1989**, *186*, 571.
96. Lindgren, A.; Emnéus, J.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *347*, 51.
97. Monteanu, F.-D.; Lindgren, A.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Csöregi, E.; Ciucu, A.; van Hwystee, R. B.; Gazaryan, I. G.; Lagrimini, L. M.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2596.
98. Rosatto, S. S.; Kubota, L. T.; Oliveira Neto, G.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *390*, 65.
99. Rosatto, S. S.; Kubota, L. T.; Oliveira Neto, G.; XI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica; **1999**, anais p.208.
100. Cosnier, S.; Popescu, I. C.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *319*, 145.
101. Eickman N. C.; Solomon, E. I.; Larrabee, J. A.; Spiro, T. G.; Lerch, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 6529.
102. Winkler, M. E.; Solomon, E. I.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4015.
103. Lima, A. W. O.; Nascimento, V. B.; Pedrotti, J. J.; Angnes, L.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *354*, 325.
104. Lima A. W. O.; Vidsiunas, E. K.; Nascimento, V. B.; Angnes, L.; *Analyst* **1998**, *123*, 2377.
105. Wang, J.; Reviejo, A. J.; Angnes, L.; *Electroanalysis* **1993**, *5*, 575.
106. Vieira, I. C.; Fatibello-Filho, O.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *366*, 111.
107. Wang, L.; Lin, M. S.; *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1545.
108. Wang J.; Brennsteiner, A.; *Anal. Lett.* **1988**, *21*, 1773.
109. Connor, M. P.; Wang, J.; Kubiak, W.; Smyth, M.R.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, *229*, 139.
110. Navaratne, A.; Lin, M. S.; Rechnitz, G. A.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, *237*, 107.
111. Lin, Z. H.; Qiao, W. J.; Wu, M.; *Anal. Lett.* **1992**, *25*, 1171.
112. Wang, J.; Naser, N.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1992**, *27*, 441.
113. Forzani, E. S.; Rivas, G. A.; Solís, V. M.; *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *435*, 77.
114. Vieira, I. C.; Fatibello-Filho, O.; *Anal. Lett.* **1997**, *30*, 895.
115. Bassi, A. S.; McGrath, C.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 322.
116. Signori, C. A.; Fatibello-Filho, O.; *Quim. Nova* **1994**, *17*, 38.
117. Karube, I.; Nakanishi, K.; *IEEE Eng. Med. Biol.* **1994**, *365*, 11.
118. Rainina, E. I.; Badalian, I. E.; Ignatov, O. V.; Fedorov, A. Y.; Simonian, A. L.; Varfolomeyev, S. D.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1996**, *56*, 117.
119. Campanella, L.; Favero, G.; Tomassetti, M.; *Sci. Total Environ.* **1995**, *171*, 227.
120. Riedel, K.; Hensel, J.; Rothe, S.; Neumann, B.; Scheller, F.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1993**, *38*, 556.
121. Riedel, K.; Boronin, A. M.; Golovlera, L. A.; Stein, H. J.; Scheller F.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, *35*, 559.
122. Ciucu, A.; Magearu, V.; Fleschin, S.; Lucaciu, L.; David, F.; *Anal. Lett.* **1991**, *24*, 567.
123. Neujahr, H. Y.; Kjellen, K. G.; *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, *21*, 671.
124. Thavarunkul, P.; Hakanson, H.; Mattiasson, B.; *Anal. Chim. Acta* **1991**, *249*, 17.
125. Riedel, K.; Beyersdorf-Radeck, B.; Neumann, B.; Scheller; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *43*, 7.
126. Bachmann, T. T.; Bilitewski, U.; Schmid, R. D.; *Anal. Lett.* **1998**, *31*, 2361.