

DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR MINIATURIZADO A BASE DE TIROSINASE PARA DETECÇÃO DE CLOROFENOL EM ÁGUAS NATURAIS

DEVELOPMENT OF MINIATURIZED BIOSENSOR BASED ON TYROSINASE TO DETECT CHLOROPHENOL IN NATURAL WATERS

DESARROLLO DE BIOSENSOR MINIATURIZADO A BASE DE TIROSINASA PARA LA DETECCIÓN DE CLOROFENOL EN AGUAS NATURALES

Bianca Fidele de Godoi¹

Maria Thereza de Almeida Fernandes²

Renata Kelly Mendes³

92

Resumo: Devido a toxicidade, o monitoramento de fenóis em águas tem sido relevante. Como alternativa aos métodos convencionais, destacam-se os biossensores, que são ferramentas interessantes devido a simplicidade, sensibilidade e alta seletividade. A construção destes dispositivos com nanocompósitos auxilia no processo de imobilização do elemento de reconhecimento, pois combinam vantagens de amplificação do sinal pelas nanopartículas com a biocompatibilidade fornecida pelo biopolímero. O biossensor proposto apresentou limite de detecção de 870 nmol L⁻¹ para clorofenol e repetibilidade de 2,1%. O baixo erro relativo obtido na aplicação em água, indica que as outras espécies presentes na amostra não interferiram na análise do contaminante.

Palavras chave: Biossensor. Tirosinase. Clorofenol. Nanocompósito.

Abstract: Owing the toxicity, the monitoring of phenols in waters have been relevant. As alternative to conventional methods, can be emphasized the biosensors that are interesting tools due to simplicity, sensitivity and high selectivity. The construction of these dispositives by nanocomposite assist in the immobilization process of the recognizer element because it combine the advantages of signal amplification by nanoparticles with the biocompatibility provided by biopolymer. The biosensor presented limit of detection of 870 nmol L⁻¹ for chlorophenol and repeatability of 2.1%. The low relative error obtained in the application in water indicates that the other species in the sample did not interfere in the analysis of the contaminant.

Keywords: Biosensor. Tyrosinase. Chlorophenol. Nanocomposite.

1 Graduação em Química pela PUC-Campinas. Bolsista de Iniciação Científica. E-mail: bifidele.bf@gmail.com

2 Graduação em Química pela PUC-Campinas. Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq). E-mail: mariatafernandes@hotmail.com

3 Professora pesquisadora da PUC-Campinas. E-mail: renatavalente@puc-campinas.edu.br

Resumen: Debido a la toxicidad, el monitoreo de fenoles en aguas ha sido relevante. Como alternativa a los métodos convencionales, se destacan los biosensores, que son herramientas interesantes debido a la sencillez, sensibilidad y alta selectividad. La construcción de estos dispositivos con nanocompuestos auxilia en el proceso de inmovilización del elemento de reconocimiento, pues combinan ventajas de amplificación del signo por las nanopartículas con la biocompatibilidad suministrada por el biopolímero. El biosensor propuesto presentó límite de detección de 870 nmol L^{-1} para clorofenol y repetibilidad del 2.1%. El bajo error relativo obtenido en la aplicación en agua, indica que las otras especies presentes en la muestra no interfirieron en el análisis del contaminante.

Palabras clave: Biosensor. Tirosinasa. Clorofenol. Nanocompuesto.

Envio 23/04/2018

Revisão 23/04/2018

Aceite 05/09/2018

Introdução

Os compostos fenólicos são substâncias que podem ser encontradas naturalmente, normalmente em vegetais e frutas, porém em águas naturais a principal fonte é a antropogênica, devido ao descarte inadequado dos efluentes, especialmente das indústrias de papel, farmacêutica e de petróleo (Oliveira *et al.*, 2015). Apesar de suas propriedades interessantes, tais como antioxidantes (Vieira *et al.*, 2015), alguns deles podem ser extremamente tóxicos e persistentes no meio ambiente à degradação biótica e/ou abiótica (Yang *et al.*, 2015). Seus efeitos tóxicos incluem a permeabilidade celular e coagulação citoplasmática, irritação da pele, distúrbios gastrointestinais, mau funcionamento dos rins, falha no sistema circulatório e até edemas pulmonares (Karim; Lee, 2013).

Fenóis e seus derivados estão agrupados como poluentes prioritários pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos, assumindo a 11ª posição de 129 substâncias químicas (Bazrafshan; Mostafapour; Mansourian, 2013). A toxicidade destes compostos em matrizes aquáticas tem sido constantemente estudada, estabelecendo-se limites de ppm para a ocorrência de alteração das propriedades organolépticas da água, devido a seu sabor medicinal e desagradável. Além disso, há a possibilidade de formação de clorofenóis, conhecidamente carcinogênicos e genotóxicos, durante o processo de cloração no tratamento para potabilidade dessa água (Britto; Rangel, 2008). Adicionalmente, a ingestão humana de clorobenzenos também pode ser uma rota metabólica para a produção de clorofenóis (Schmidt; Göen, 2017).

Na literatura há vários métodos descritos para a determinação de fenóis em matrizes de interesse ambiental ou fluidos biológicos, incluindo técnicas instrumentais de análise como as cromatografias gasosa (Eskandarpour *et al.*, 2016), líquida de alta eficiência (Wang *et al.*, 2014) e eletroforese capilar (Wei; Yin; He, 2008). No entanto, são métodos conhecidamente mais caros, complexos e que necessitam de analistas altamente treinados. Métodos de análise de clorofenóis envolvendo maior simplicidade e rapidez têm se tornado preferencial em relação aos mais sofisticados.

Uma das alternativas se refere ao uso de biossensores devido a rapidez nas análises, alta seletividade e sensibilidade, possibilidade de miniaturização e baixa geração de resíduos, contribuindo para a Química Verde (Apetrei; Apetrei, 2015). Estes dispositivos utilizam como elemento de reconhecimento um composto biológico, sendo as enzimas os mais utilizados, pois apresentam custos mais baixos que anticorpos ou fragmentos de DNA, por exemplo. Em relação às

oxidoredutases, a tirosinase possui ampla seletividade aos compostos fenólicos, além da possibilidade de obtenção utilizando-se extratos de vegetais (Oliveira; Fernandes; Vieira, 2006). Os extratos vegetais brutos como fonte enzimática permitem a diminuição brusca do custo do dispositivo, além de evitar os processos de importação, que são geralmente demorados. A obtenção dos extratos requer procedimentos que apresentam simplicidade, associados a rapidez e eficiência, além do extrato manter a atividade da biomolécula por um tempo maior (Fatibello-Filho; Vieira, 2002).

Uma das etapas mais críticas do processo de desenvolvimento dos biossensores está relacionada à imobilização da enzima na superfície sensora. Isso porque, se não estiver efetivamente fixada, pode lixiviar para a solução, diminuindo a sensibilidade do aparato. Os nanomateriais, na construção destes dispositivos, oferecem características únicas e são promissores de respostas mais rápidas e maior sensibilidade do que em configurações de superfícies planares (Zhao *et al.*, 2013). Devido às suas pequenas dimensões, o aumento da área superficial e fortes propriedades de adsorção, tem tornado esse material um dos mais utilizados atualmente como plataforma para a imobilização de biomoléculas (Zhang; Wei, 2016). Atenção maior tem sido apresentada às nanopartículas que possuem propriedades magnéticas, tais como as de Fe_3O_4 . Isso porque esses nanomateriais respondem a aplicação de um campo magnético e possuem a vantagem de se re-dispersarem quando este campo é removido, ou seja, oferecem a conveniência da separação magnética. Dessa maneira, as partículas podem ser separadas facilmente de uma fase líquida usando um pequeno ímã (Mendes *et al.*, 2012).

Para melhorar ainda mais o processo de imobilização, o uso de ligações covalentes entre a enzima e o nanosuporte sólido permitem maior estabilidade do dispositivo, evitando lixiviação do elemento de reconhecimento. Uma das formas de permitir que a reação química ocorra, se refere a adição de grupos funcionais às nanopartículas magnéticas. Isso pode ser realizado por meio da formação de filmes de biopolímeros, como a quitosana, que apresenta excelente biocompatibilidade, elevada resistência mecânica, baixo custo, fácil manuseio e não é tóxica (Mendes *et al.*, 2011). Neste caso, formam-se os chamados nanocompósitos. Hassanein e colaboradores utilizaram um nanocompósito formado com nanopartículas de ZnO , recobertas com polipirrol e quitosana para a determinação do vasodilatador cloridrato de isoxsuprina em amostras reais. O biossensor permaneceu com 96% de sua resposta após 14 dias de uso, indicando boa estabilidade do modificador (Hassanein *et al.*, 2017). Em outro trabalho, um nanocompósito formado por nanopartículas de Au/Fe recobertas

com quitosana foi usado como suporte para imobilização de glutatona oxidase para determinação do aminoácido em amostras. O biossensor apresentou limite de detecção menor que outros similares da literatura, além de estabilidade das medidas após estocagem durante 4 meses (Chauhan *et al.*, 2012).

Os nanocompósitos, além de plataformas para imobilização de biomoléculas, podem contribuir para a produção de biossensores miniaturizados (Pandiaraj *et al.*, 2014). Atualmente, o desenvolvimento de eletrodos com pequenas dimensões é um importante objeto de estudo, contribuindo para o campo da nanobiotecnologia. A razão para isto tem a ver com as vantagens de sistemas miniaturizados, destacando que as análises usam pequenos volumes de amostra (muitas vezes gotas de amostra são necessárias), por conseguinte, geram menos resíduos. Além disso, dispositivos de pequenas áreas podem ser usados para monitoramento do poluente em campo, diminuindo o tempo da análise (Ammam, 2014). Há ainda ganho na sensibilidade do sistema, uma vez que se trata de microescala, permitindo que limites de detecção mais baixos sejam alcançados.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um biossensor miniaturizado a base de tirosinase imobilizada sobre nanocompósito híbrido orgânico/inorgânico, formado por nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 recobertas com o biopolímero quitosana, para a detecção de um contaminante altamente prejudicial, o clorofenol, em amostra de água natural.

Parte Experimental

Reagentes

Fosfato de sódio bibásico heptahidratado e fosfato de potássio monobásico foram obtidos pela Synth (São Paulo). Quitosana, glutaraldeído, hidroquinona e clorofenol foram obtidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Todas as soluções foram usadas a temperatura ambiente e diluídas, quando necessário, com água deionizada ($>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, Milli-Q, Millipore).

Obtenção do extrato vegetal enzimático

Com a finalidade de usar o mesmo produto, foi selecionada uma área do plantio exclusivamente para a retirada do inhame (Signori; Fatibello-Filho, 1994) utilizado para a extração da enzima tirosinase. Após lavagem e secagem, 25 g do vegetal descascado foram picados e homogeneizados em um liquidificador com 100 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Em seguida, filtrou-se o extrato em quatro camadas de gaze, e em tubos de ensaio foi centrifugado a

1800 rpm durante 20 minutos. A solução sobrenadante foi então separada e dividida em diversas alíquotas, armazenadas em refrigerador a 4°C e utilizadas posteriormente como fonte enzimática de tirosinase para a construção dos biossensores.

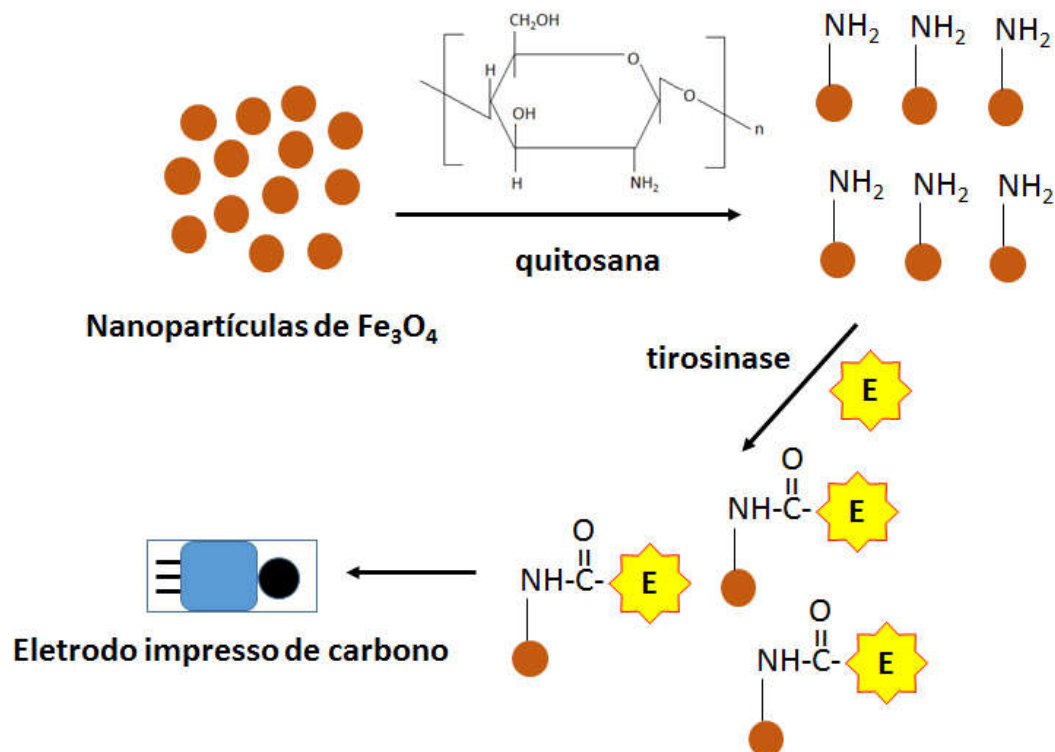
Determinação da atividade enzimática

A atividade da enzima tirosinase obtida a partir do inhame foi determinada pelas medidas de absorbância no comprimento de onda de 410 nm durante 15 minutos, monitorando a formação do o-quinona, conforme metodologia descrita na literatura por Louzada *et al.*, 2004. Segundo a definição, uma unidade de atividade, U mL⁻¹ (unidade/mL), corresponde a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto, nas condições acima mencionadas.

Construção do biossensor

Para a construção do biossensor, primeiramente, 50 µL da solução contendo nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ foram transferidas para um frasco Eppendorf®. Após, foram adicionados 100 µL da solução tampão fosfato e o frasco foi agitado durante 1 min. A seguir, com o auxílio de um ímã, foi retirado o sobrenadante e as nanopartículas foram lavadas pela segunda vez, repetindo o procedimento anterior. Após, adicionou-se 25 µL da solução de quitosana 4 mg mL⁻¹ ao sistema. Agitou-se por 1 min e o frasco foi colocado na geladeira por mais 10 min, para produção do nanocompósito. Após completar o tempo, foi retirada a solução sobrenadante e, em seguida, adicionou-se 100 µL de solução de glutaraldeído, agitou-se e o sistema permaneceu em repouso por 15 min. Com o auxílio de um ímã, a solução foi retirada e o sistema foi lavado com solução tampão fosfato. Finalmente, adicionou-se 200 µL do extrato enzimático, agitou-se e levou-se à geladeira por mais 60 min, para o processo de ligação covalente entre a enzima e o nanocompósito funcionalizado. Então, o excesso foi retirado, o sistema foi lavado e estava pronto para uso. Após, o nanocompósito modificado foi gotejado sobre eletrodos miniaturizados de grafite e usados como biossensor. A Figura 1 apresenta o esquema de construção do biossensor.

Figura 1 - Esquema de construção do biossensor proposto.



Medidas Eletroquímicas

As medidas voltamétricas foram realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, entre 0 a 800 mV, com 25 mV de amplitude e 25 mV s⁻¹. Nos experimentos utilizou-se um eletrodo impresso de grafite (Dropsens), com dimensões gerais de 3,4 x 1,0 x 0,05 cm e eletrodo de referência e contatos elétricos feitos de prata. Todas as medidas foram realizadas em um micropotenciostato PGSTAT 101 da marca AUTOLAB (Metrohm). As amostras de água foram obtidas em uma lagoa natural localizada em um clube de lazer da região de Campinas (SP).

Resultados e Discussão

Avaliação da resposta do biossensor com nanocompósito

A proposta principal do trabalho se refere a determinação de clorfenol em amostras de interesse ambiental. No entanto, como é bastante tóxico e altamente prejudicial ao meio ambiente,

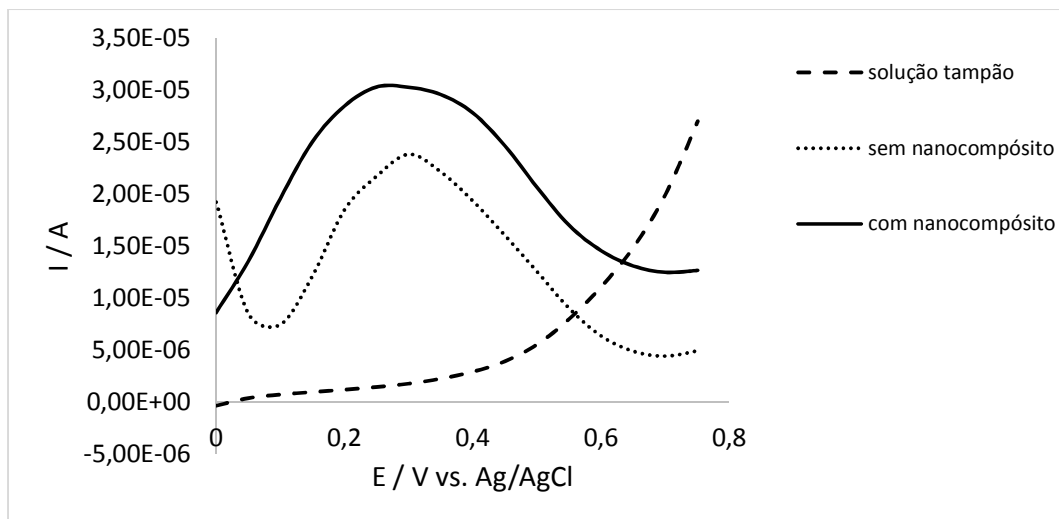
a parte da otimização das condições experimentais e testes iniciais foram realizados com hidroquinona. Isso porque, a hidroquinona é também um composto fenólico, com função de despigmentante há mais de 50 anos, podendo ser encontrada em cosméticos, como cremes e tinturas de cabelos, ainda como antioxidantes ou até inibidora de polimerização, desde que em baixas concentrações (Metsavaht, 2017).

O primeiro estudo trata-se de uma avaliação preliminar do comportamento do biossensor utilizando nanocompósito (Fe_3O_4 /quitosana) para imobilização do elemento de reconhecimento. Neste caso, a imobilização da enzima ocorre por meio de uma reação covalente cruzada entre o nanocompósito, que possui grupos terminais $-\text{NH}_2$ pela adição de quitosana (que recobre as nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4), e os grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) da enzima, via glutaraldeído. Assim, espera-se melhora na estabilidade do dispositivo, pois as ligações químicas são mais resistentes às variações das condições experimentais. Além disso, a quitosana é um biopolímero, que torna o ambiente favorável à manutenção da atividade enzimática.

Portanto, para avaliar o comportamento do biossensor com nanocompósito para imobilização da enzima, o mesmo foi testado apenas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e após a adição de 20 mmol L^{-1} de hidroquinona (composto fenólico) ao meio. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 2.

Observando a Figura 2 é possível verificar que o biossensor em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 não apresenta sinal de corrente elétrica. Isso porque não há nenhum composto eletroativo presente. Um aumento significativo é observado na corrente elétrica quando se adiciona hidroquinona ao sistema. Além disso, a vantagem do uso dos nanocompósitos na construção do biossensor é evidente. Isso porque é conhecido que as nanopartículas possuem alta relação área/volume, permitindo que maior quantidade de biomolécula seja imobilizada (Vidotti *et al.*, 2011). E também podem contribuir para o aumento da taxa de transferência de elétrons, que é importante em se tratando de biossensores eletroquímicos. Adicionalmente, a quitosana é um meio biocompatível que permite manutenção da atividade da tirosinase.

Figura 2 – Voltamogramas de pulso diferencial referentes ao comportamento do biossensor apenas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, e após a adição de 20 mmol L^{-1} de hidroquinona, com o sem adição do nanocompósito. Velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} e 25 mV de amplitude de pulso.



Estudo da influência da concentração da enzima na resposta do biossensor

Para que o biossensor possa ser finalmente utilizado para análise de fenóis em amostras de águas industriais, é necessária a otimização das condições experimentais envolvendo a confecção do dispositivo. Um parâmetro importante se refere à concentração da enzima necessária ao melhor funcionamento do dispositivo. Este fator influencia o desempenho do biossensor e pode aumentar/diminuir a sua sensibilidade/estabilidade. Para a realização das medidas, foram testadas quatro concentrações distintas de tirosinase: 140; 280; 550 e 1390 U mL^{-1} .

Para a visualização dos resultados obtidos, construiu-se a Tabela 1 com os valores das correntes elétricas obtidas para cada concentração enzimática.

Tabela 1 - Valores de corrente obtidas para o biossensor contendo quatro concentrações distintas de tirosinase, em solução tampão fosfato pH 7,0 e 20 mmol L⁻¹ de hidroquinona.

Ensaio	Concentração de tirosinase (U mL ⁻¹)	Corrente (μA)
1	140	32
2	280	28
3	550	28
4	1390	27

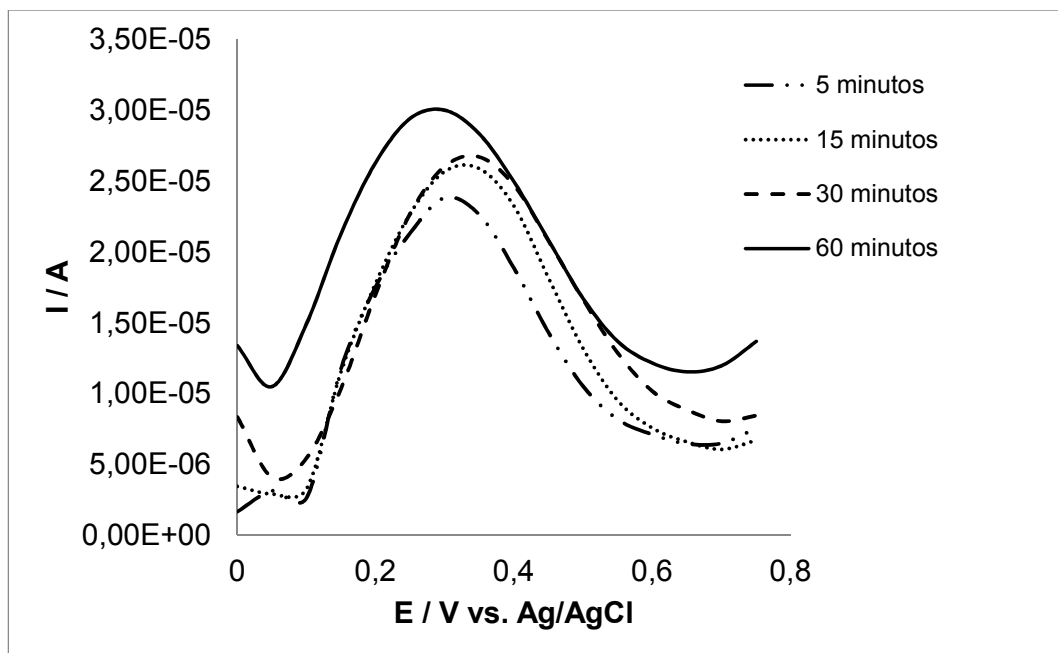
De acordo com a Tabela 1, o resultado que teve melhor desempenho em relação à concentração foi o ensaio 1, com concentração da enzima igual a 140 U mL⁻¹, a menor concentração estudada. Concentrações menores a estas não foram consideradas pois o biossensor, neste caso, não apresentou reprodutibilidade. Observa-se que aumentando a concentração da tirosinase é possível verificar a diminuição dos valores da corrente. Esse decréscimo de resposta em concentrações superiores ocorre em função de um aumento da espessura da camada de tirosinase no eletrodo, que acaba funcionando como uma barreira para a transferência de elétrons, diminuindo a corrente elétrica (Signori; Fatibello-Filho, 1994).

101

Estudo de contato do nanocompósito modificado com a enzima e a superfície eletrodica

Após a otimização da concentração enzimática, a próxima etapa envolveu o estudo do melhor tempo de contato do nanocompósito modificado com a enzima tirosinase. Este parâmetro é importante e influencia diretamente na estabilidade do sensor. Quando a biomolécula está fracamente aderida ao suporte sólido, pode ocorrer sua lixiviação e, conseqüentemente queda de sinal. A Figura 3 apresenta os valores obtidos.

Figura 3 - Voltamogramas de pulso diferencial referentes ao comportamento da corrente nos diferentes tempos de contato do sistema nanocompósito/enzima com a superfície do eletrodo, em solução fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 contendo 20 mmol L⁻¹ de hidroquinona. Velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹ e 25 mV de amplitude de pulso.



De acordo com a Figura 3, foi possível verificar que a melhor resposta foi com o maior tempo, ou seja, em 60 minutos. Aumentando-se o tempo de contato, provavelmente, há um ganho na estabilidade do sistema e, portanto, menor lixiviação enzimática durante as etapas de lavagem. No entanto, tempos maiores não foram estudados, pois torna o processo de construção do biossensor mais moroso. Assim, o tempo de 60 minutos foi selecionado para os experimentos posteriores.

Estudo de repetibilidade de medida e reprodutibilidade de construção do biossensor

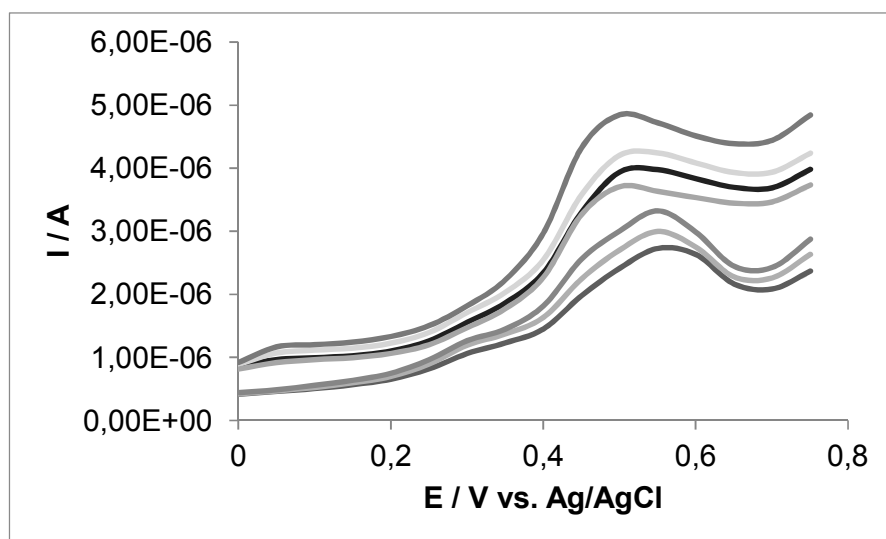
Após otimização das condições experimentais foram obtidos os parâmetros referentes ao sistema envolvendo o biossensor. A repetibilidade de medida é importante, pois investiga se a resposta eletroquímica do sensor se mantém constante ou com pouca variação de medida durante a análise. Para isso, construiu-se um biossensor nas melhores condições de trabalho de acordo com os estudos de otimizações e as correntes foram obtidas em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, contendo 20 mmol L⁻¹ de hidroquinona e repetidas 10 vezes sem a troca do dispositivo ou da solução obtendo-se um erro relativo de 2,06%.

O outro estudo consistiu em verificar se o método de preparo do sensor é reprodutível, ou seja, se há variação significativa entre um sensor e outro nas medidas. Dessa forma, construíram-se cinco sensores distintos e realizou-se uma medida eletroquímica para cada um, nas mesmas condições experimentais: solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, contendo 20 mmol L^{-1} hidroquinona. O erro relativo obtido foi de 3,15% e considerado baixo, o que indica que o biossensor apresenta excelente reprodutibilidade de preparação.

Curva analítica

Após a otimização das condições experimentais, foi realizada a curva de calibração utilizando-se, agora, o clorofenol. A Figura 4 apresenta o comportamento do biossensor com adição de clorofenol ao sistema.

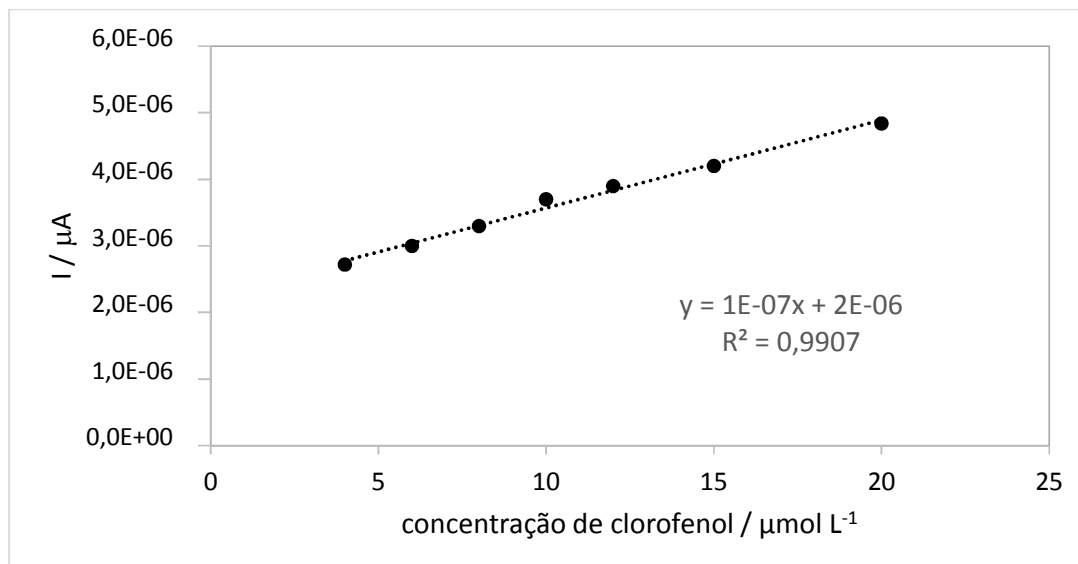
Figura 4 – Voltamogramas de pulso diferencial do comportamento do biossensor em diferentes concentrações de clorofenol em solução tampão fosfato pH 7,0, usando 25 mV de amplitude a 25 mV s^{-1} .



A Figura 4 mostra o aumento da resposta do sensor com a elevação da concentração do clorofenol no meio. Este fenol possui a característica de adsorver fortemente na superfície eletródica com a varredura de potencial, ocasionando inutilização do sensor após a terceira medida. No entanto, como o biossensor proposto é miniaturizado e descartável, esse problema foi contornado

uma vez que havia a troca do dispositivo a cada nova medição. A partir da Figura 4 construiu-se a curva de calibração que é apresentada na Figura 5.

Figura 5 – Curva de calibração para biossensor proposto em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, em diferentes concentrações de clorofenol.



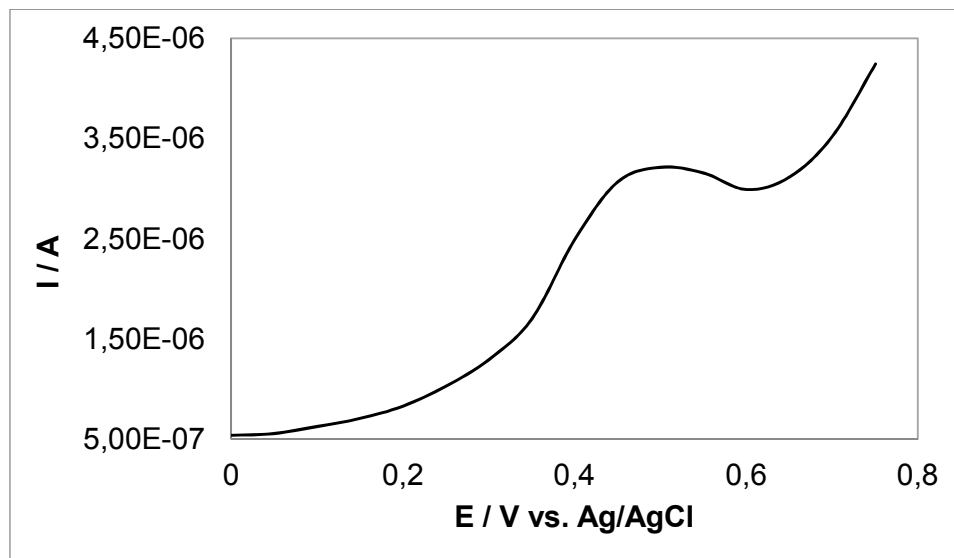
A curva de calibração indica que o biossensor possui uma faixa linear de 4 a 20 µmol L⁻¹. Por meio da curva de calibração, calculou-se também o limite de detecção para o biossensor ($LOD = 3s$ (desvio padrão de 10 medidas do branco) / coeficiente da curva analítica) que foi de 0,87 µmol L⁻¹. Percebe-se que o dispositivo apresentou sensibilidade e é propício para ser utilizado na análise de clorofenóis em amostras de interesse ambiental.

Aplicação do biossensor na determinação de clorofenol em amostras de interesse ambiental

O biossensor foi testado para quantificação de clorofenol em amostra de água de uma lagoa da região de Campinas, que foi propositalmente contaminada com 10 µmol L⁻¹ do poluente. Pela corrente de pico encontrada no voltamograma (Figura 6) e pela equação da reta obtida na curva analítica, foi encontrada a concentração de clorofenol na amostra. Como a análise na amostra de água da lagoa foi realizada em quadruplicata, utilizou-se um valor médio, cuja concentração encontrada foi de 9,62 µmol L⁻¹, que corresponde a um erro relativo de 3,8%, o que mostra que o biossensor pode ser usado para analisar clorofenol em amostra de águas de interesse ambiental com

exatidão e confiabilidade, além de ser seletivo, pois identificou somente o fenol, as outras substâncias presentes na amostra não interferiram na quantificação do contaminante.

Figura 6 – Voltamograma de pulso diferencial do comportamento do biossensor na determinação de clorofenol em amostra de água da lagoa, usando 25 mV de amplitude a 25 mV s⁻¹.



Conclusão

O uso de biossensores na determinação de clorofenol em amostras reais apresenta características vantajosas quanto aos métodos clássicos laboratoriais como menor tempo de análise, possibilidade de miniaturização, menor custo operacional, uma vez que se utiliza enzimas de extratos vegetais, e quantidade de amostra utilizada (em torno de μL), o que reduz a geração de resíduos contribuindo para a Química Verde.

Com os resultados obtidos, o dispositivo se mostrou bastante sensível, preciso e exato, pois os erros relativos encontrados em diferentes estudos foram considerados baixos, para esse tipo de análise. O erro relativo para determinação de clorofenol em água de lagoa foi de 3,8%, conferindo ao biossensor seletividade, mostrando que as outras substâncias presentes na amostra real não interferiram na quantificação do contaminante, sendo, portanto, uma alternativa interessante e eficiente para a determinação de contaminantes orgânicos (resistente à biodegradação) em amostras de interesse ambiental.

Agradecimentos

Agradecemos a a PUC-Campinas e ao CNPQ pelas bolsas de Iniciação Científica concedidas.

Referências

- AMMAM, M. Electrochemical and electrophoretic deposition of enzymes: Principles, differences and application in miniaturized biosensor and biofuel cell electrodes. **Biosens. Bioelectron.** v. 28, p. 121-131, 2014.
- APETREI, I.M.; APETREI, C. The biocomposite screen-printed biosensor based on immobilization of tyrosinase onto the carboxyl functionalised carbon nanotube for assaying tyramine in fish products. **J. Food Eng.** v. 149, p.1-8, 2015.
- BAZRAFSHAN, E.; MOSTAFAPOUR, F.K.; MANSOURIAN, H.J. Phenolic compounds: health effects and its removal from aqueous environments by low cost adsorbents. **Health Scope.** v. 2, n. 2, p. 65-66, 2013.
- BRITTO, J.M.; RANGEL, M.C. Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais. **Quim. Nova** v. 31, n. 1, p. 114-122, 2008.
- CHAUHAN, N.; NARANG, J.; MEENA; PUNDIR, C.S. AN amperometric glutathione biosensor based on chitosan-iron coated gold nanoparticles modified Pt electrode. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 51, n.5, p.879-886, 2012.
- ESKANDARPOUR, N.; SERESHTI, H.; NAJARZADEKAN, H.; GAIKANI, H. Polyurethane/polystyrene-silica electrospun nanofibrous composite for the headspace solid-phase microextraction of chlorophenols coupled with gas chromatography. **J. Sep. Sci.** v. 39, n. 23, p. 4637-4644, 2016 .
- FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Quim. Nova**, v. 25, n.3, p. 455-464, 2002.
- HASSANEIN, A.; SALAHUDDIN, N.; MATSUDA, A.; KAWAMURA, G.; ELFIKY, M. Fabrication of biosensor based on Chitosan-ZnO/Polypyrrole nanocomposite modified carbon paste electrode for electroanalytical application. **Mater. Sci. Eng. C** v. 80, p. 494-501, 2017.
- KARIM, N.; LEE, H.J. Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase on Au nanoparticle modified screen printed carbon electrodes. **Talanta**, v. 116, p. 991-996, 2013.
- LOUZADA, E. S; LUCCAS, P. O; DE MAGALHÃES, C. S. Construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para determinação de pirogalol. **Revista Analytica** v. 11, p.52-56, 2004.
- MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quim. Nova** vol. 34, nº 5, 831-840, 2011.
- MENDES, R.K.; LASCHI, S.; STACH-MACHADO, R.; KUBOTA, L.T.; MARRAZZA, G. A disposable voltammetric immunosensor based on magnetic beads for early diagnosis of soybean rust. **Sensors Actuat. B** vol. 166-167, p. 135-140, 2012.

METSAVAHT, L.O. Hidroquinona: vilã ou heroína? **Surg. Cosmet. Dermatol** v. 9, p. 201-203, 2017.

OLIVEIRA, D.P.C.; RIBEIRO, F.W.P.; BECKER, H.; LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N. Biossensor eletroquímico baseado na enzima tirosinase para a determinação de fenol em efluentes. **Quim. Nova** v.38, p. 924-931, 2015.

OLIVEIRA, I.R.W.Z.; FERNANDES, S.C.; VIEIRA, I.O. Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 41, n. 2, p. 366-372, 2006.

PANDIARAJ, M.; BENJAMIN, A.R.; MADASAMY, T.; VAIRAMANI, K.; ARYA, A.; SETHY, N.K.; BHARGAVA, K.; KARUNAKARAN, C. A cost-effective volume miniaturized and microcontroller based cytochrome c assay. **Sensor. Actuat. A** v. 220, p.290-297, 2014.

SCHMIDT, L.; GÖEN, T. Simultaneous determination of the full chlorophenol spectrum in human urine using gas chromatography with tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta** v. 965, n. 1, p.123-130, 2017.

SIGNORI, C.A.; FATIBELLO-FILHO, O. Biossensor amperométrico para a determinação de fenóis usando extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*). **Quim. Nova** v.17, p.38-42, 1994.

VIDOTTI, M.; CARVALHAL, R.F.; MENDES, R.K.; FERREIRA, D.C.M.; KUBOTA, L.T. Biosensors based on gold nanostructures. **J. Braz. Chem. Soc.** v.22, p.3-20, 2011.

VIEIRA, L. M.; CASTRO, C.F.S.; DIAS, A.L.B.; SILVA, A.R. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.** v.17, p.521-527, 2015.

WANG, J.; WANG, W.; WU, Q.; WANG, C.; WANG, Z. Extraction of some chlorophenols from environmental waters using a novel graphene-based magnetic nanocomposite followed by HPLC determination. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** v. 37, p. 2349-2362, 2014.

WEI, W.; YIN, X.-B.; HE, X.-W. pH-mediated dual-cloud point extraction as a preconcentration and clean-up technique for capillary electrophoresis determination of phenol and m-nitrophenol. **J. Chromatogr. A** v.1202, n. 2, p.212-215, 2008.

YANG, L.; FAN, S.; DENG, G.; LI, Y.; RAN, X.; ZHAO, H.; LI, C-P. Bridged β -cyclodextrin-functionalized MWCNT with higher supramolecular recognition capability: The simultaneous electrochemical determination of three phenols. **Biosens. Bioelectron.** v. 68, p.617-625, 2015.

ZHANG, Y.; WEI, Q. The role of nanomaterials in electroanalytical biosensors: A mini review. **J. Electroanal. Chem.** Volume v. 781, p.401-409, 2016.

ZHAO, W.; FANG, Y.; ZHU, Q.; WANG, K.; LIU, M.; HUANG, X.; SHEN, J. A novel glucose biosensor based on phosphonic acid-functionalized silica nanoparticles for sensitive detection of glucose in real samples. **Electrochim. Acta** vol. 89, p. 278-283, 2013.