

UNE BIOCAPTEURS DE TYPE JETABLE POUR LA DÉTECTION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DANS DES MATRICES COMPLEXES

V. Dragancea

Université Technique de Moldova

INTRODUCTION

Les composés phénoliques sont largement utilisés dans la fabrication de résines, des polymères et des produits pharmaceutiques [1]. Les plus suivant ils sont étudiés en raison de leur propriété antioxydante et cancérigène. Les phénols sont probablement les composés organiques le plus souvent associés à des problèmes organoleptiques; ils provoquent des problèmes de goût et d'odeur à des concentrations aussi faibles que 1 µg/l [2].

Cependant, le coût élevé et les temps de rotation lents des méthodes photométriques et chromatographiques conventionnelles [3] utilisé pour le dosage de dérivés phénoliques, indiquent un besoin de techniques analytiques plus rapides. Pour répondre à ce besoin, un système à base de détecteur simple d'utilisation, peu coûteux, jetable (accessible) et fortement sensible aux phénols, devient de plus en plus important dans l'analyse environnementale et les produits agroalimentaires. De ce fait, des méthodes alternatives parfaitement adaptées telles que les biocapteurs sont de plus en plus utilisées pour des analyses de routine.

Un nombre relativement important de biocapteurs ampérométriques enzymatiques pour la détection du phénol a été déjà mis au point à partir de la tyrosinase (Tyr) [2 ; 4-6]. Mais le problème de détection rapide des dérivés phénolique reste toujours actuel et surtout la détection de ces composés dans de matrice complexe.

Le but de notre travail a été de mettre au point un biocapteur à base de tyrosinase qui sera facilement utilisé dans les matrices complexes de certains produits fumés.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Réactifs

Phénol, glutaraldehyde (SIGMA). P-crésol, m-crésol, guaiacol, crésol, eugénol, 4-ethylguaiacol (ACROS), syringol, o-crésol (ALDRICH) , isoeugenol (LANCASTER), 4-propylguaiacol for SAFC, dichlorophénol, tyrosinase (E.C. 1.14.18.1,

approximately 3216 U/mg) from Fluka, poly (allylamine hydrochloride) for Alfa Acsar. Le stock des solutions standards de composés phénoliques a été préparé dans le méthanol de grade HPLC (PROLABO).

Les produits analyses bacon, poulet, jambon et saumon fumée ont été achete dans le marcher local (Nantes, France).

2.2. Fabrication d'un système à trois électrodes sérigraphiées

Au cours de cette étude, nous avons mis au point et utilisé le système à trois électrodes sérigraphiées. La figure 1 présente en réalité quatre systèmes identiques qui peuvent être facilement séparés en cassant la plaque d'alumine prédécoupée.

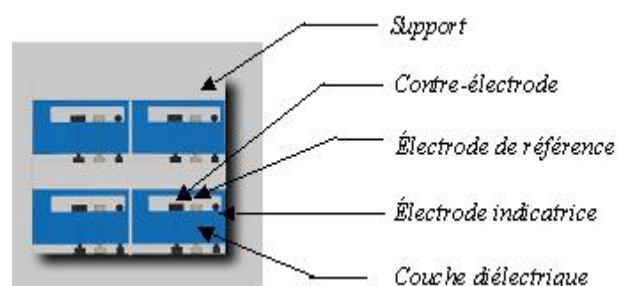


Figure 1. Systèmes à trois électrodes sérigraphiées préparés au laboratoire

Dans le cas des électrodes sérigraphiées (figure 1) on utilise un montage à trois électrodes composé, d'une électrode de référence à base d'argent sérigraphiée à partir d'une encre commerciale (Lti, Gwent, Pontypool, GB), d'une électrode de travail (ou indicatrice) et d'une électrode auxiliaire toutes deux à base de graphite.

Les substrats utilisés pour la sérigraphie dans le cadre de ce travail sont des plaques d'alumine prédécoupées provenant de chez LAZER COATING UK. Les encres utilisées ont été formulées soit au sein de notre laboratoire, soit obtenues de chez GEM (Gwent Electronics and Materials, Pontypool, Ltd, UK).

2.3. Protocol de préparation du biocapteur a base de tyrosinase

Les électrodes modifiées sont préparées par le dépôt sur l'électrode de travail d'un mélange de trois composés : la tyrosinase; le Paa - poly (allylamine) à 0,05% et la Glutaraldéhyde (Glut) à 0,0125%. Les solutions de Paa et Glut sont préparées chaque jour. La modification des électrodes se fait par un dépôt manuel à 3µL de mélange sur l'électrode de travail. Les électrodes sont ensuite laissées à sécher 1h.

2.4. Apparatus and procedures

• FIA

Le dispositif expérimental utilisé durant cette étude pour l'analyse par injection en flux continu est constitué d'une pompe péristaltique multicanaux (Ismatec) permettant un réglage du débit volumique, d'une valve d'injection six voies (Rhéodyne) munie d'une boucle d'injection de volume égal à 100 µL, d'un potentiostat (BAS CV-1B), d'un enregistreur $i=f(t)$ (Linseis L200E) et d'une cellule électrochimique de détection de type *wall-jet* fabriquée au laboratoire. Les mesures ont été réalisées dans la solution tampon phosphate 0,1M, pH=6 avec un ajout de 0,1M KCl. L'Analyse par injection en flux continu a été utilisée en premier temps pour tester le biocapteur en termes de sensibilité, stabilité, reproductibilité et linéarité. En deuxième temps pour le dosage de produits phénolique dans des échantillons réels.

• CPG

Le système chromatographique est représenté par une chromatographe en phase gazeuse Hewlett – Packard HP 6891, l'échantillon est injecté manuellement à l'aide d'une microsiringue à 1µl et d'un détecteur à ionisations de flamme (FID). Le mode d'injection est un mode splitless, la colonne utilisée est une colonne HP5 ayant les dimensions suivantes : 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm. La colonne utilisé est une colonne capillaire Agilent, avec une polarité intermédiaire composée à 95% de diméthylsiloxane et à 5% de copolymère diphényle. De ce fait l'analyse s'effectue en chromatographie de partage (gaz/liquide). La température du détecteur est de 260°C, celle de l'injecteur est à 290°C.

Le four a été programmé de la façon suivante : 80°C (1,5) min ; 80°C à 290°C à 50°C/min est maintenu à température finale pour 10 minutes. La réponse du détecteur est enregistrée à l'aide du logiciel HP ChemStations.

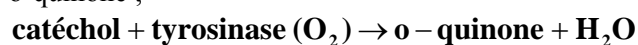
3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les biocapteurs ampérométriques basés sur l'immobilisation de la Tyr permettent la détection des dérivés monophénoliques et o-diphénoliques. Selon la plupart d'auteurs [7-9] le mécanisme de catalyse de l'oxydation du phénol par la tyrosinase peut être représenté en quelques étapes :

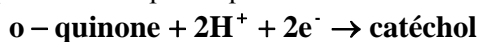
- première étape : utilisant l'oxygène moléculaire, la tyrosinase catalyse l'hydroxylation du monophénol avec la formation d'o-diphénol (la catéchol) ;



- deuxième étape : l'oxydation d'o-diphénol à o-quinone ;



- troisième étape : l'o-quinone peut être électrochimiquement réduite en o-diphénol avec un surpotentiel bas par l'équation suivante.



Ainsi, la détection du phénol repose sur le contrôle de la quantité de la quinone formée ou sur la détermination du cofacteur de consommation de l'oxygène. Le fonctionnement du biocapteur est basé sur la mesure du courant de réduction de l'ortho - quinone enzymatique générée au potentiel 0V /Ag/AgCl. La réponse ampérométrique de l'électrode est directement liée à la concentration en substrat dans la solution.

Nous nous sommes intéressés à tester et valider, le biocapteur de type sérigraphiée à base de tyrosinase en les couplant à la technique d'analyse par injection en flux continu pour l'analyse de certains phénols standard.

Pour une détection rapide de composé phénolique une recherche des conditions optimales d'analyses (l'influence du pH, du potentiel, du solvant organique) a été imposée.

Influence de pH sur la réponse du biocapteur.

La cinétique d'une réaction enzymatique est toujours dépendante de la valeur du pH dans l'environnement de l'enzyme. Le point isoélectrique de la tyrosinase est situé aux alentours de $\text{pH}_i = 4.7 - 5$, nous avons donc choisi de réaliser l'étude entre pH 4 à 8, pour une concentration de phénol de 50µM. L'expérience a été réalisée sur la même électrode. La figure 2 montre la variation de l'intensité du courant en fonction du pH du milieu réactionnelle. La dépendance présente une forme caractéristique en cloche. Nous avons obtenu une réponse ampérométrique optimale pour un pH de 6.0. Ensuite pour l'électrode à tyrosinase, nous avons choisi une valeur de pH de 6 pour le milieu d'analyse.

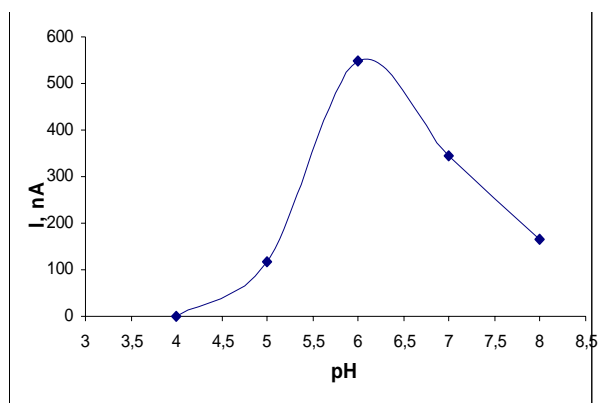


Figure 2. Influence du pH sur la réponse ampérométrique d'une électrode Tyr/Paa/Glut.

Choix du potentiel de travail

L'ortho-quinone produit par la réaction enzymatique est un composé qui peut être réduit électrochimiquement en ortho-diphénol correspondant. Pour déterminer le choix du potentiel nous avons mesuré la réponse en courant du biocapteur pour une concentration de phénol de 50 μ M, dans l'intervalle de potentiel compris entre -0.3 et +0.3V/Ag/AgCl et pour un débit et un volume d'injection constants. Le courant de réduction maximal se situe à un potentiel $E = -0.3$ V (Figure 3).

Même si la sensibilité du biocapteur est maximale au potentiel de -0,3 V vs Ag,AgCl, cependant ce potentiel présente certains

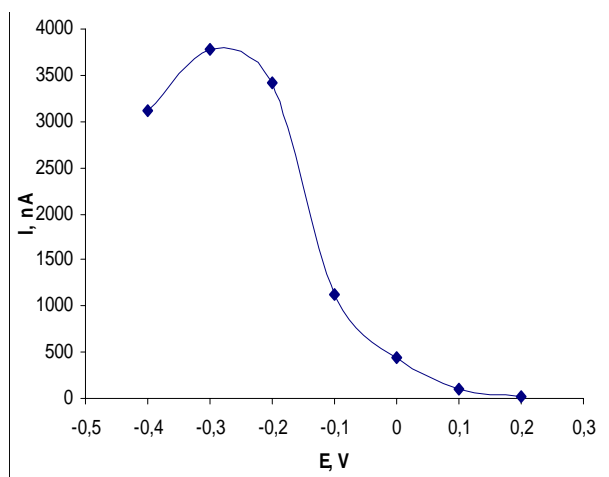


Figure 3. Influence du potentiel de mesure sur la réponse de biocapteur Tyr/Paa/Glut.

inconvenients tels que la durée nécessaire pour la stabilisation de la ligne de base. En effet, environ deux heures sont nécessaires pour que la ligne de base se stabilise lorsque le potentiel de travail est fixé à -0,3 V. A une valeur de potentiel de 0 V, nous avons constaté que seulement 5 à 7 min sont nécessaires pour obtenir une ligne de base stable

avec de très faibles bruits. Il faut également noter qu'à 0 V, on minimise les réactions de réductions électrochimiques de l'oxygène

Pour la suite des expériences et pour minimiser le courant de base, nous avons choisi d'effectuer notre étude à une valeur de potentiel de 0V /Ag/AgCl.

En optimisant le fonctionnement du biocapteur nous avons testé l'électrode pour le dosage du phénol. La courbe d'étalonnage (figure 4) présente une zone de linéarité pour des concentrations en phénol allant de 10 μ M jusqu'à 150 μ M. Les calibrations des électrodes ont été

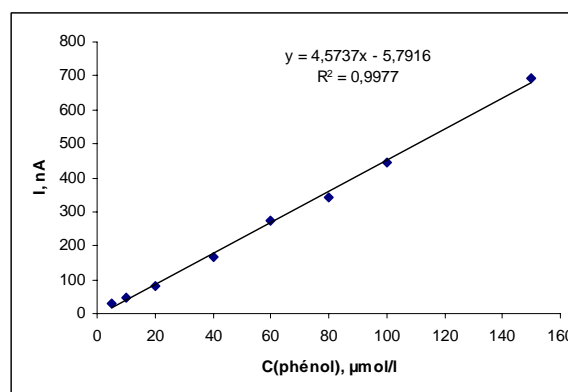


Figure 3. Courbe d'étalonnage (FIA) pour l'électrode Tyr/Paa/Glut. Potentiel de travail : 0 V vs. Ag/AgCl, tampon phosphate (0,1 mol/L, pH = 6,0 + KCl 0,1 mol/L)

faites sur des solutions de phénol de concentrations connues préparées dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 6,0 avec du KCl 0,1M comme électrolyte support.

Ensuite nous avons testé la réponse du biocapteur pour autre substrat comme guaiacol, créosol, syringol, phénol, 4-ethylguaiacol, o-crésol, eugénol, isoeugénol, p-crésol, 4-propylguaiacol et m-crésol qui sont les principaux composés phénoliques présents dans les produits fumés [Sérot et coll., 2004]. En résultat nous avons obtenu que le biocapteur à tyrosinase détecte le phénol, le m- et le p-crésol. Les résultats de l'étalonnage de l'électrode avec des solutions de phénol, p-crésol et m-crésol sont présentés dans le tableau 1.

Les résultats montrent que la performance analytique du biocapteur étudié dépend du type de composé phénolique utilisé pour l'étalonnage. L'électrode reflète une meilleure sensibilité pour le p-crésol mais en ceux qui concerne le domaine de linéarité les meilleurs résultats on obtient pour le phénol. Pour le dosage des composés phénoliques dans les échantillons réels on a utilisé courbe d'étalonnage avec la solution de phénol.

Tableau 1 La réponse ampérométrique du biocapteur pour différents substrats

Composés	Equations	Coefficient de Corrélation	Sensibilité, $nA \cdot cm^{-2} \cdot \mu mol \cdot l^{-1}$	Linéarité, $\mu mol/l$	Limite de détection, $\mu mol/l$
Phénol	$y = 4,6062x + 26,637$	$R^2 = 0,9955$	4,61	5 - 150	5
m-crésol	$y = 2,1746x + 25,206$	$R^2 = 0,9943$	2,17	5 - 100	10
p-crésol	$y = 14,52x - 1,8761$	$R^2 = 0,9999$	14,52	5 - 50	5

Dans le but de valider les résultats des mesures obtenus pour le dosage des composés phénoliques dans les produits fumés avec le biocapteur, nous avons comparé avec les résultats obtenus à l'aide de la méthode par chromatographie en phase gazeuse. Bien que les méthodes utilisées

varient fortement au niveau de leur principe de fonctionnement et de préparation des échantillons, nous avons trouvé pour les mesures de dérivés phénoliques dans les produits fumés une bonne corrélation entre les résultats obtenus en CPG et en biocapteur tableau 2.

Tableau 2. Corrélation entre la teneur en phénol et p-crésol obtenue par le biocapteur en mode FIA et par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Produits analyses	FIA	CPG
Jambon fumé	Phénol + p-crésol : 44.44 ± 1.09	Phénol : 40.23 ± 1.38 p-crésol : 2.92 ± 0.42 Total : 45.1 ± 1.54
Bacon fumé	Phénol + p-crésol : 39.1 ± 0.99	Phénol : 36.68 ± 7.31 p-crésol : 2.32 ± 0.39 total : 39 ± 7.7
Filet de poulet fumé	Phénol + p-crésol : 41.4 ± 2.35	Phénol : 35.13 ± 1.12 p-crésol : 17.21 ± 1.73 total : 52.34 ± 2.85
Saumon fumé	Phénol + p-crésol : 7.07 ± 1.86	Phénol : 30.76 ± 0.86 p-crésol : 7.5 ± 1.34 total : 38.26 ± 2.2

Les résultats suivants sont les moyennes de trois déterminations successives.

4. CONCLUSION

En conclusion on peut dire que les biocapteurs peuvent apporter les contributions déterminantes en contrôle des bioprocédés. La possibilité d'avoir des biocapteurs, multiparamétriques et présentant une stabilité accrue favoriserait certainement une utilisation plus large.

Nous avons mis au point un biocapteur simple à mettre en œuvre pour la détection du phénol. La composition de l'électrode a été optimisée pour améliorer les performances analytiques (sensibilité et stabilité) du biocapteur final.

L'électrode Tyr/PAA/Glut peut être utilisée pour déterminer les faibles concentrations en phénol dans des échantillons réels d'aliments fumés, tels que le jambon, le bacon, le poulet et le saumon. Les

résultats obtenus lors de l'utilisation du biocapteur en FIA ont une bonne corrélation avec les résultats obtenus en CPG.

La détermination électro – enzymatique des dérivés phénoliques pourrait constituer une méthode alternative très prometteuse pour les dosages en routine de composés phénoliques dans les produits fumés dans les sites industriels.

Référence bibliographiques

1. *Manahan, S.E., 1991. Environmental Chemistry. Lewis Publishers, Inc, Chelsea, USA.*
2. *Onnerfjord P., Emnus J., Marko-Varga G., Gorton Lo, Ortega F. et Dominguez E., Tyrosinase graphite-epoxy based composite electrodes for detection of phenols. Biosensors & Bioelectronics 10 (1995) 607-619.*

3. **Janda, V., Krijt, K.**, 1984. Recovery of phenols from water by continuous steam distillation extraction. *J. Chromatogr.* 283, 309_314.
4. **Zhou Y., Ru Hai Tian, Jin Fang Zhi,** Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized on a boron-doped diamond electrode, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 822–828
5. **Cosnier S., Popescu I. C.**, Poly (amphiphilic pyrrole) -tyrosinase-peroxidase electrode for amplified flow injection-amperometric detection of phenol, *Analytica Chimica Acta* 319 (1996) 145-151.
6. **Carralero V., Mena M.L., Gonzalez-Cortes A., Yanez-Sedeno P., Pingarron J.M.** Development of a high analytical performance-tyrosinase biosensor based on a composite graphite–Teflon electrode modified with gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2006) 730–736.
7. **Cooksey, C. J., Garratt, P. J., Land, E. J., Pavel, S., Ramsden, C. A., Riley, P. A. and Smit, N. P. M.**, Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, 272, (42), 1997, 26226-26235.
8. **Cooksey, C. J., Garratt, P. J., Land, E. J., Ramsden, C. A. and Riley, P. A.** Tyrosinase kinetics: failure of the auto-activation mechanism of monohydric phenol oxidation by rapid formation of a quinomethane intermediate. *Biochem. J.*, 333, (3), 1998, 685-691.
9. **Rodriguez-Lopez, J. N., Fenoll, L. G., Penalver, M. J., Garcia-Ruiz, P. A., Varon, R., Martinez-Ortiz, F., Garcia-Canovas, F. and Tudela, J.**, Tyrosinase action on monophenols: evidence for direct enzymatic release of o-diphenol. *BBA-Protein Struct. M.*, 1548, (2), 2001, 238-256.