

## CERTAIN PHENOLIC COMPONENTS DETECTION USING SERIGRAPHY TYPE BIOSENSORS

Dragancea V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>University of Nantes, Nantes, France

<sup>2</sup>Technical University of Moldova, Chisinau, Republic of Moldova

**Résumé:** Ce travail porte sur la préparation et l'étude d'électrode sérigraphiées modifiées par la tyrosinase. Cependant une électrode de carbone de type sérigraphiée modifiée en surface par la tyrosinase (SPCE-Tyr/Paa/Glut) a été élaboré. La composition de l'électrode Tyr/Paa/ Glut a été optimisée pour un fonctionnement en mode d'analyse par injection en flux continu (FIA) à 0 V vs. Ag/AgCl. Le dosage des certaines composés phénoliques dans les solutions standard a été effectué. Les résultats obtenus avec le biocapteur en mode d'analyse par injection en flux continu ont été comparés avec les résultats obtenus par la méthode chromatographie en phase gazeuse.

**Mots clés:** Phénol; Tyrosinase ; Sérigraphie ; Analyse par injection en flux continu ; Electrodes sérigraphiée.

### Introduction

Un nombre considérable de dérivés phénoliques sont largement répandu partout dans l'environnement et représente de facteurs de contamination importants dans les aliments, dans les médicaments et dans l'environnement. 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 antioxydant 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 dérives phénolique reste toujours actuel.

Le but de notre travail a été de mettre au point un biocapteur à base de tyrosinase qui serra facilement utilisé pour la détection de certains composés phénoliques avec la possibilité de dosé ensuite les composés phénoliques que sont présent dans les produits fumés.

## Matériels et méthodes

### Réactifs.

Phénol, glutaraldehyde (SIGMA). P-crésol, m-crésol, guaiacol, créosol, 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).

### 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 présente dans la figure 1.

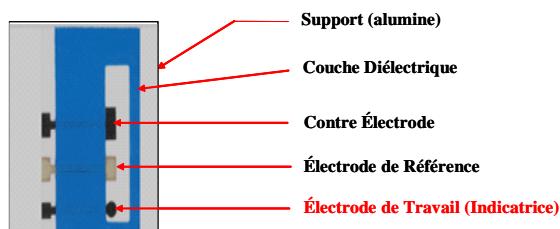


Fig.1. Systèmes à trois électrodes sérigraphiées préparés au laboratoire

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 (LtJ, Gwent, Pontypoll, 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).

#### *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%. La modification des électrodes se fait par un dépôt manuel sur l'électrode de travail à 3 $\mu$ L de mélange. Les électrodes sont ensuite laissées à sécher 1h.

### 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  $\mu$ L, 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 pour tester le biocapteur en termes de sensibilité, stabilité, répétabilité et linéarité.

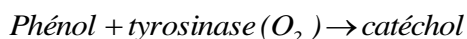
**CPG** – Le système chromatographique est représenté par une chromatographe en phase gazeuse Hewlett – Packard HP 6891, l'échantillon est injecté manuellement à l'aide d'une microsiringue a 1µl et d'un détecteur à ionisations de flamme (FID). Le mode d'injection est un mode splitless, la colonne utilisée 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 a 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 du 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 finals pour 10 minutes. La réponse du détecteur est enregistrée à l'aide du logiciel HP ChemStations.

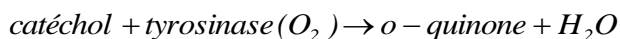
### Résultats et discussions

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:

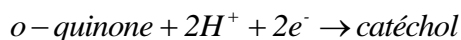
- première étape : utilisant l'oxygène moléculaire, la tyrosinase catalyse l'hydroxylation du monophénol avec la formation d'o-diphénol (la catéchol) ;



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



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

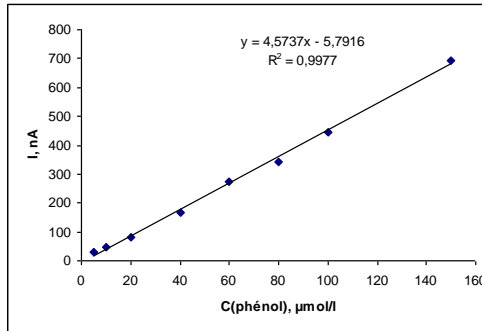


Ainsi, la détection du phénol repose sur le contrôle de la quantité de la quinone formée ou sur la détermination du cofacteur de consommation de l'oxygène. Le fonctionnement du biocapteur est basé sur la mesure du courant de réduction de l'ortho - quinone enzymatique générée au potentiel 0V /Ag/AgCl. 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 a base de tyrosinase en les couplant à la technique d'analyse par injection en flux continu pour l'analyse de certains phénols standard.

L'utilisation de l'électrode modifiée avec la tyrosinase pour la détection du phénol a nécessité la recherche des conditions optimales d'analyse. Nous avons étudié l'influence de potentiel, de pH et du solvant organique sur la réponse du biocapteur.

En optimisant le fonctionnement du biocapteur nous avons testé l'électrode pour le dosage du phénol.



**Fig. 2.** 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)

La courbe d'étalonnage (figure 1) présente une zone de linéarité pour des concentrations en phénol allant de 5 µmol/L jusqu'à 150 µmol/L la sensibilité est de 4,7 nA.cm-1/µM.. Les calibrations des électrodes ont été 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.

Après la calibration de l'électrode la justesse des mesures (Tableau 1) a été vérifiée en injectant différentes solutions de phénol de concentrations connues.

**Tableau 1.** Dosage de solutions standards de phénol par l'électrode modifiée par la tyrosinase

Standard	C théorique, (µmol/L)	C mesurée, (µmol/L)	Erreur, %
1	16	16,75	4,70
2	35	34,34	1,89
3	70	69,05	1,36
4	90	86,54	3,85

La concentration est ensuite déterminée à partir de l'équation de la droite d'étalonnage. L'erreur calculée est ici inférieure à 5% pour les 4 solutions testées. Nous pouvons donc considérer que la méthode ampérométrique utilisant l'électrode modifiée est juste.

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 2.

**Tableau 2.** 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, $\mu mol/l$
<b>Phénol</b>	$y = 4,6062x + 26,637$	$R^2 = 0,9955$	4,61	5 - 150	5
<b>m-crésol</b>	$y = 2,1746x + 25,206$	$R^2 = 0,9943$	2,17	5 - 100	10
<b>p-crésol</b>	$y = 14,52x - 1,8761$	$R^2 = 0,9999$	14,52	5 - 50	5

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.

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

**Tableau 3.** Corrélation entre la teneur en phénol et p-crésol obtenue par le biocapteur en mode FIA et par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

	FIA	CPG
<b>Phénol</b>	$44.44 \pm 1.09$	$45.1 \pm 1.54$
<b>p-crésol</b>	$39.1 \pm 0.99$	$38.32 \pm 0.39$
<b>m-crésol</b>	$49.4 \pm 2.35$	$51.34 \pm 2.85$

Les résultats suivants sont les moyennes de trois déterminations successives. 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 une bonne corrélation entre les résultats obtenus en CPG et en biocapteur tableau 3.

### 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 de certaines composés phénoliques. La composition de l'électrode a été optimisée pour améliorer les performances analytiques (sensibilité et stabilité) du biocapteur final.

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.

### Remerciements:

Ce travail a été effectué au sein du Groupe Ingénierie de Matériaux fonctionnels du CEISAM-CNRS 6230 dans le cadre de la coopération entre l'Université de Nantes sous la direction de M. M. Boujtita et l'Université Techniques de Moldavie sous la direction de Mme Rodica Sturza a qui j'apporte mes remerciements profonds.

Je voudrais remercier également le Gouvernement Français pour le financement octroyé pour la réalisation de ma thèse

### 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.**, 1997. Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, 272, (42), 26226-26235.
8. **Cooksey, C. J., Garratt, P. J., Land, E. J., Ramsden, C. A. and Riley, P. A.**, 1998. Tyrosinase kinetics: failure of the auto-activation mechanism of monohydric phenol oxidation by rapid formation of a quinomethane intermediate. *Biochem. J.*, 333, (3), 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.**, 2001. Tyrosinase action on monophenols: evidence for direct enzymatic release of o-diphenol. *BBA-Protein Struct. M.*, 1548, (2), 238-256.