



Imobilização de urease com a quitosana pelo método de gotejamento sobre um eletrodo transdutor amperométrico

T. M. A. Marinho*, M. J. B. Cardoso, H. Y. C. Eulálio, M. D. R. Leite,
R. J. S. Lima, R. Swarnakar, M. V. L. Fook

Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de Campina Grande
Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais CERTBIO
Aprígio Veloso 882, Bodocongó, Campina Grande, PB – CEP 58429 – 900

(Recebido em 03/02/2016; revisado em 07/03/2016; aceito em 07/03/2016)
(Todas as informações contidas neste artigo são de responsabilidade dos autores)

Resumo:

Os biossensores podem ser empregados para testes de detecção dos níveis de uréia no organismo humano, pois a alteração desses níveis é um indicador de insuficiência renal. A urease é a enzima que catalisa a reação de hidrólise da ureia, formando duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono. Uma das etapas mais importante para a confecção de um biossensor é a imobilização da enzima, pois uma matriz adequada promove uma estabilidade operacional e melhor armazenamento da enzima. A quitosana é um polímero que possui boas propriedades e pode ser processada em várias formas, logo é considerada uma ótima matriz. Com isso, o objetivo desse trabalho é avaliar a imobilização da enzima urease com o polímero quitosana em eletrodos sensores. Onde, essa imobilização foi realizada sobre um suporte transdutor e pelo método de gotejamento. Depois os eletrodos foram caracterizados morfologicamente e submetidos a teste de sensibilidade, através de bioresposta amperométrica. Por fim, foram obtidos resultados satisfatório da efetividade da imobilização.

Palavras-chave: Imobilização; quitosana; enzima uréase; biossensores.

Abstract:

Biosensors can be used for detection tests urea levels in the human body because the change of these levels is an indicator of kidney failure. Urease is an enzyme that catalyzes the hydrolysis reaction of urea, to form two molecules of ammonia and carbon dioxide. One of the most important steps for manufacturing a biosensor is immobilization of the enzyme, since a suitable matrix promotes operational stability and improved enzyme storage. Chitosan is a polymer that has good properties and can be processed into various forms, so it is considered a great matrix. Thus, the aim of this study is to evaluate the immobilization of the enzyme urease with the chitosan polymer sensor electrodes. Where this was immobilized on a transducer support and the dripping method. After the electrodes were characterized morphologically and subjected to sensitivity testing through bioresponse amperometric. Finally, satisfactory results of the effectiveness of immobilization were obtained.

Keywords: Immobilization; chitosan; urease enzyme; biosensors.

1. Introdução

Nos últimos anos, os biossensores têm motivado grande atenção como uma ferramenta alternativa de detecção, pelo baixo custo, rapidez e facilidade de análise [1]; demonstrando também grandes perspectivas devido às características de portabilidade, seletividade, possibilidade de miniaturização, entre outros [2].

Diante disto, na área clínica, há vários relatos de doenças renais e, com isso uma crescente necessidade de diagnósticos rápidos e precisos [3]. A concentração excessiva de ureia no corpo (no soro ou na urina) é um indicador dessas doenças renais. Contudo, para este tipo de detecção pode ser confeccionado um biossensor (ou eletrodo sensor) enzimático,

capaz de determinar a quantidade de ureia no corpo através de uma enzima específica [4].

A enzima capaz de catalizar a hidrólise de ureia é a enzima urease, que tem como produto o dióxido de carbono e a amônia [5]. A tecnologia de imobilização de enzimas vem se tornando um importante campo da biomedicina e da biotecnologia, onde é responsável pelo desenvolvimento do biossensor e está ligada diretamente com as propriedades e qualidades dos mesmos [6,7]. Essa imobilização confere uma maior estabilidade operacional e um maior armazenamento do biocomponente, quando aplicada ao biossensor [8].

Existe um grande número de materiais bioativos, tais como medicamentos, proteínas, células animais e vegetais e microrganismo de várias classes, que já foram imobilizados e

*Email: thaismariamarinho@yahoo.com.br (T. M. A. Marinho)

obtiveram ótimo rendimento em suportes adequados, onde esses suportes promovem estabilidade [6]. Atualmente, a escolha desses suportes para a imobilização de enzimas ainda é um desafio e o centro das aplicações científicas [1].

Uma matriz (ou suporte) de imobilização adequada deve fixar a biomolécula sobre a superfície do eletrodo e manter a estrutura da enzima durante as medições sem qualquer tipo de desnaturação [1]. Esses suportes são utilizados como matriz imobilizadora e podem ser produzidos através de membranas poliméricas, o que tem atraído muitos estudos pela facilidade de produção e pela grande variedade de composição [6]. Dentre os diversos suportes naturais para a imobilização, destaca-se a quitosana que é obtida através da desacetilação da quitina, que se encontra presente abundantemente nos exoesqueletos de crustáceos como o camarão e o caranguejo [9]. A quitosana possui boas características por ser de baixo custo, renovável, biocompatível, biodegradável, atóxico e de grande importância econômica e ambiental [9]. E ainda por possuir a capacidade de ser processada de várias formas como membranas, filmes, fios, entre outros [10]. O objetivo desse trabalho é avaliar a imobilização da enzima urease com a quitosana, avaliando a sua morfologia e das medições de bioresposta do biossensor.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Foram utilizados:

- eletrodos de aço eletrodepositado com antimônio para servir como suporte transdutor, que foram preparados em laboratório;
- quitosana obtida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO [11];
- enzima uréase - Sigma Aldrich;

- phosphate buffered saline (PBS) - Sigma Aldrich;
- ácido acético glacial - Sigma Aldrich;
- ureia

2.2 Métodos

- Preparação das Soluções de Quitosana e Urease

Inicialmente foi preparada uma solução de quitosana de (0,5% m/v), onde o polímero na forma de pó foi dissolvido com uma solução de ácido acético a 0,1M sob agitação mecânica constante com temperatura ambiente durante 12 horas e em seguida a solução foi filtrada. Depois foi preparada uma solução da enzima, onde foi pesado 5,0 mg de urease em 0,5 ml tampão fosfato de sódio, adaptado de [12].

- Preparação da imobilização da Urease com a Quitosana sobre um eletrodo sensor

A solução de quitosana foi gotejada em cima do eletrodo, para formação de uma camada de polímero, em seguida, foi gotejada a solução da enzima uréase formando outra camada e por fim, outra camada de quitosana, esse processo foi realizado para o eletrodo de 1 camada enzima (E1) e, depois esse processo foi repetido por 2 e 3x, aumentando assim o número de camadas de quitosana/uréase, como mostra o Tabela 1.

Depois do gotejamento das soluções para formar as camadas, os eletrodos foram mantidos em temperatura ambiente por 12 horas para evaporar o solvente.

- Caracterizações dos eletrodos

Os eletrodos foram caracterizados, avaliando a superfície das amostras e verificando a bioresposta.

Tabela 1. Metodologia de montagem das membranas quitosana/urease sobre o eletrodo sensor

Camadas de Enzima	Etapa						
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a
1 camada (E1)	quitosana	urease	quitosana				
2 camadas (E2)	quitosana	urease	quitosana	urease	quitosana		
3 camadas (E3)	quitosana	urease	quitosana	urease	quitosana	urease	quitosana

- Microscopia Ótica (MO)

As caracterizações por MO foram realizadas por um Microscópio Óptico HIROX, com magnificação máxima de 3500x, onde o mesmo pode operar com luz transmitida ou refletida, acoplado a uma estação de captura de imagens digitais.

As micrografias das membranas de quitosana/urease sobre o eletrodo, foram obtidas com magnificações de 350x, 1050x e/ou 2000x. Foram avaliados os diferentes números de camadas, como descritas na metodologia de montagem das membranas.

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização por MEV foi realizada em um Microscópio Eletrônico de Varredura da Hitachi, modelo TM-1000, com magnificação máxima de 50000x, profundidade de foco de 1mm, resolução de 30nm, 15KV, baixo vácuo e pressão variada (1 à 270Pa).

As imagens de MEV foram obtidas com diferentes magnificações de 2000x, 8000x e 16000x, nas membranas de quitosana com 1, 2 e 3 camadas de enzima urease, para avaliar a imobilização da enzima com quitosana, através da morfologias.

• Teste de bioresposta nos eletrodos

Foram realizados testes de bioresposta nos eletrodos sensor para confirmação da efetividade da imobilização da enzima, através de medidas amperométricas, com isso obtemos a sensibilidade e a seletividade do biossensor de acordo com a variação de concentração de ureia. Para isso, foi montado um circuito amperométrico, que foi utilizado um potencial de 0,5V, onde o transdutor detectava a corrente formada pela reação da concentração do analito (uréia) com a enzima urease. Então, com a variação da concentração de ureia obtivemos um corrente proporcional.

3. Resultados e Discussão

As imagens de MO dos eletrodos com as membranas de quitosana/urease com diferentes números de camadas mostram que o eletrodo denominado E1 (Figura 1), indica uma superfície porosa, mais homogênea e rugosa, sem muitos

aglomerados. Para os eletrodos com um maior número de alternância de camadas quitosana/uréase é possível observar que há formação de aglomerados e a diminuição de poros, o que é possível verificar nas imagens das camadas 2 e 3. A porosidade na imobilização pode ser interpretada de maneira positiva, pois confere ao eletrodo melhor permeabilidade na reação entre o analito e à enzima.

Na Figura 2, temos as imagens de microscopia eletrônica de varredura que complementam as interpretações da microscopia óptica, onde é possível observar a rugosidade do eletrodo com a membrana quitosana/urease e a presença de aglomerados em eletrodos com mais de uma camada. Mas, os eletrodos formados de quitosana/urease com várias camadas possibilitam uma melhor adesão do elemento biológico à matriz polimérica imobilizadora, o que permite um bom armazenamento e confinamento da enzima, como também permite que o eletrodo tenha melhora a resposta de sensibilidade com a uréia

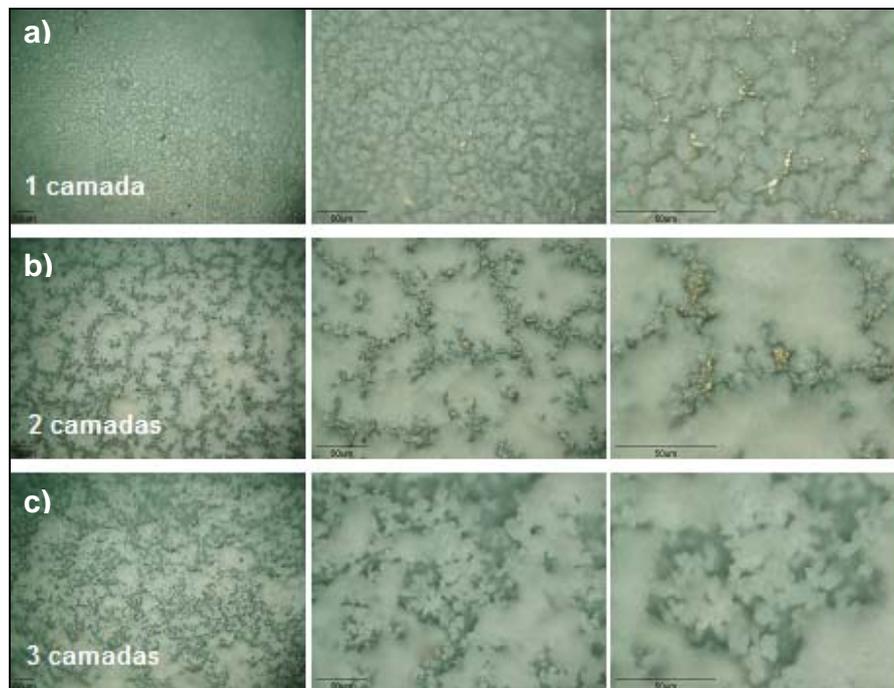


Figura 1. Microscopia Óptica com aumento de 350x, 1050x e 2100x das membranas de quitosana/urease sobre um eletrodo sensor, onde a) é o eletrodo com 1 camada, b) com 2 e c) com 3 camadas de enzima imobilizada

É possível observar na Figura 3, as curvas de bioresposta, que reflete na sensibilidade e seletividade que o sensor de ureia possui, com isso é fácil observar que a imobilização da enzima foi efetiva e que a enzima exerce sua atividade quando em contato com a analito alvo sob aplicação de um potencial fixo e variação da concentração. Assim, podemos avaliar que as curvas dos diferentes números de camadas apresentam um comportamento diferente uma da outra, pois uma maior presença de enzima no eletrodo melhora a bioresposta e a faixa de linearidade do sensor. Avaliando o eletrodo

imobilizado com 1 camada de enzima, pode-se observar que o sensor foi sensível a variação da concentração de ureia, mas a faixa de linearidade desse sensor foi de 0,05 a 1,0M, pois abaixo e acima desses valores o sensor não tem estabilidade e, com isso não foi possível observar a linearidade. Já no eletrodo com 2 camadas de enzima imobilizada, verificou-se que a faixa de linearidade dos resultados foi mais estável, com uma boa sensibilidade a variação da concentração de ureia, só na concentração maior de 1,5M esse eletrodo não foi linear a essa faixa.

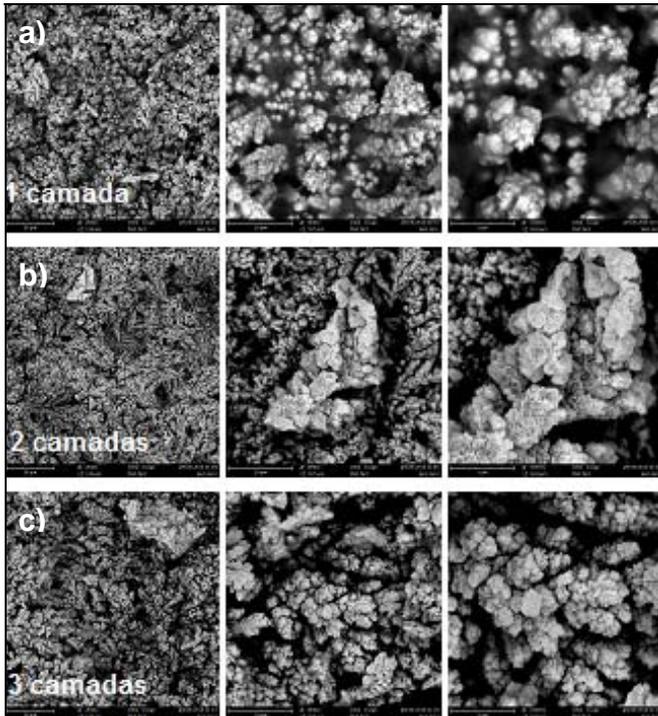


Figura 2. Microscopia Eletrônica de Varredura com aumento de 2000x, 8000x e 16000x das membranas de quitosana/urease sobre um eletrodo sensor, onde a) é o eletrodo com 1 camada, b) 2 camadas e c) 3 camadas de enzima

A curva do eletrodo imobilizado com 3 camadas descreve o comportamento e sensibilidade desse sensor na presença de diferentes concentrações de ureia, o tempo de resposta e a linearidade dos resultados ocorrem em tempos diferentes. Cada pico desse gráfico, identifica a mudança de uma concentração para outra e, com alguns segundos depois é possível observar que a resposta fica linear. Mas na concentração de 1,5M o eletrodo não responde de uma forma contínua perdendo assim a sensibilidade no final da medida. Observamos que todos os três tipos de eletrodos não têm a sensibilidade e faixa de linearidade em concentração maiores que 1,5M de ureia, pois todos nessa faixa apresentaram descontinuidade nos resultados

4. Conclusões

Pode-se concluir que a quitosana é capaz de imobilizar a enzima urease, formando assim uma membrana sobre o eletrodo sensor. É preciso melhorar a metodologia de formação de camadas, para que a superfície do eletrodo sensor obtenha uma melhor homogeneidade e uniformidade, reduzindo assim os aglomerados. Os resultados dos eletrodos em termos de bioresposta foram interpretados de maneira positiva e foi observado que a diferença de números de camadas de enzimas imobilizadas apresentou uma maior

sensibilidade e linearidade nas respostas. Também foi visto que, todos os eletrodos com diferentes números de camadas não foram lineares em respostas acima de 1,5M de ureia.

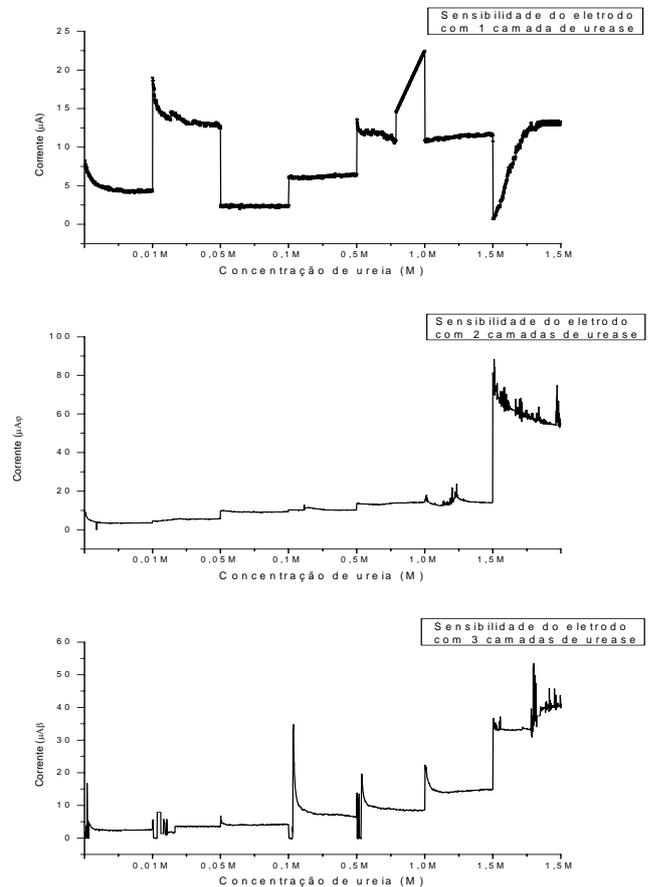


Figura 3. Resultados de biorespostas de medidas de corrente dos eletrodos sensor imobilizados com diferentes números de camadas de quitosana/enzima urease, através da variação de concentração de ureia

Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) e seus colaboradores, e a Universidade Federal de Campina Grande.

Referências

- [1] Soylemez, S., Udum, Y., Kesik, M., Gundogdu, H. C., Ergun, Y., Toppare, L. Electrochemical and optical properties of a conducting polymer and its use in a novel biosensor for the detection of cholesterol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 212, 425–433,

- 2015.
- [2] Alfaya, A. A. S., Kubota, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Química Nova*, 25 (5), 835–841, 2002.
- [3] Braga, C. R. C. Desenvolvimento e caracterização de membranas quitosana/silicatos em camadas para uso como suporte enzimático na construção de um biossensor de uréia. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal de Campina Grande, 2012.
- [4] Mulyasuryani, A., Roosdiana, A., Srihardyastutie, A. The potentiometric urea biosensor using chitosan membrane. 10, 2, 162–166, 2010.
- [5] Ivanova, S., Ivanov, Y., Godjevargova, T. Urea amperometric biosensors based on nanostructured polypyrrole and poly ortho-phenylenediamine. *Open Journal of Applied Biosensor*, 2, 12–19, 2013.
- [6] Gabrovska, K., Ivanov, J., Vasileva, I., Dimova, N., Godjevargova, T. Immobilization of urease on nanostructured polymer membrane and preparation of urea amperometric biosensor. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48 (4), 620–626, 2011.
- [7] 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. *Química Nova*, 34 (5), 831–840, 2011.
- [8] Singh, M., Verma, N., Garg, A. K., Redhu, N. Urea biosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 134 (1), 345–351, 2008.
- [9] Abreu, F. O. M. D. S., Castro, A. M., Silva, P. V., Cavalcante, L. G., Nascimento, A. P., Matos, J. E. X. Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de micro-ondas. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, 23 (5), 630–635, 2013.
- [10] Oliveira, I. R. W. Z., Vieira, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. *Química Nova*, 29 (5), 932–939, 2006.
- [11] Antonino, R. S. C. M. Q., Lima, R. J. S., Fook, M. V. L., Lisboa, H. M. O., Vasconcelos, J. S. Produção de quitina e quitosana a partir de exoesqueleto de camarão. 2016, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020160045720, data de depósito: 12/02/2016, título: "produção de quitina e quitosana a partir de exoesqueleto de camarão", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial
- [12] Garcia, A., Peniche, C. C., Chico, B., Simpson, B. K., Villalonga, R. Ferrocene branched chitosan for the construction of a reagentless amperometric hydrogen peroxide biosensor. *Macromolecula Bioscience*, 435–439, 2007.