

## Avaliação da imobilização da enzima uréase extraída da semente de *Canavalia ensiformis* em membranas de quitosana, para uso em biossensores para detecção de uréia

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

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 23/02/2016; aceito em 26/02/2016)

(Todas as informações contidas neste artigo são de responsabilidade dos autores)

### Resumo:

Uma grande variedade de dispositivos para diagnósticos em saúde vem sendo desenvolvido e a imobilização enzimática tem grande importância nesses produtos. Uma enzima imobilizada refere-se àquela enzima que está confinada em uma região bem definida e que mantém sua atividade catalítica. A enzima uréase foi escolhida para esse trabalho por ser amplamente utilizada como um biorreceptor em sensores de reconhecimento, devido às suas aplicações na determinação e monitoramento da saúde e dos parâmetros ambientais e também por estar presente em vegetais, microorganismos eucarióticos e bactérias. Dentre os polímeros que são utilizados na imobilização, a quitosana, derivada da quitina, obtida da casca de camarão foi empregada. Este trabalho tem o objetivo avaliar a imobilização de enzima em filmes poliméricos de quitosana, preparadas por procedimentos distintos de imobilização, a partir de um composto enzimático extraído de sementes de *Canavalia ensiformis*. Foram preparadas as membranas de quitosana com o composto nas concentrações desde 10 ml a 40 ml de composto de uréase extraída e caracterizadas por microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) com mapeamento por espectroscopia por energia dispersiva (EDS). Para confirmação da presença da uréase imobilizada foram preparados eletrodos de aço inox com deposição de antimônio com recobrimento das membranas de quitosana e realizados testes de biorespostas. As micrografias por MO e MEV não confirmam a presença da uréase, o EDS não indicam a presença do níquel presente na estrutura da uréase. Entretanto os teste de biorespostas mostram que o composto extraído e imobilizado na membrana de quitosana, apresenta uma bioatividade, sendo um indicativo da presença da uréase imobilizada, podendo por tanto ser aplicado para uso em biossensores enzimáticos de ureia.

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

### Abstract:

A wide variety of health diagnostic devices have been developed, and enzyme immobilization is very important in these products. An immobilized enzyme refers to that enzyme that is contained in a defined region which keeps its catalytic activity. The urease enzyme was chosen for this work because is widely used as a biomarker used in recognition sensor due to its applications in the determination/monitoring health and environmental parameters and also to be present in vegetables, eukaryotic microorganisms and bacteria. Among polymers used for immobilization, was used chitosan, derived from chitin, obtained from shrimp shells. This study aims to evaluate the enzyme immobilization in chitosan films, prepared by a different immobilization procedure, from an enzymatic compound extracted from *Canavalia ensiformis* seeds. The chitosan membranes were prepared with the concentrations solutions from 10 ml to 40 ml of urease extracted and characterized by optical microscopy (OM) and scanning electron microscopy (SEM) with mapping by energy dispersive spectroscopy (EDS). To confirm the presence of immobilized urease, were prepared stainless steel electrodes with antimony electrodeposited with chitosan membranes coating and realized bio answer tests. The OM and SEM micrographs don't confirm the presence of urease, the EDS doesn't indicate the nickel, presents in the urease structure. However bio answers tests show that the compound extracted and immobilized on chitosan membrane has bioactivity, and it is an indication that the immobilized urease is present and, therefore, it should be applied for use in urea biosensor.

**Keywords:** Immobilization; urease enzyme; chitosan.

\*Email: hugoyves20@hotmail.com (H. Y. C. Eulálio)

## 1. Introdução

Uma enzima imobilizada pode ser definida como uma enzima que está fisicamente confinada em uma certa região definida, enquanto mantém sua atividade catalítica [1]. O processo de imobilização de enzima é de grande importância para que o bom desempenho do biossensor. Deve-se conter uma grande quantidade de enzimas junto ao eletrodo, fazendo com que as enzimas imobilizadas tenham uma melhor estabilidade e melhor resposta quando comparadas às em solução [2].

Um fator de grande importância, para o aumento da vida útil do biossensor, trata-se da imobilização da enzima, que pode ser realizada por vários métodos que são classificados em dois comportamentos: os físicos (envolve interações fracas entre o suporte e a enzima) e os químicos (formam-se ligações covalentes com a enzima) [3].

Tendo com objetivo avaliar a imobilização da enzima uréase extraída do feijão de porco (*Canavalia ensiformis*), por distintos procedimentos de imobilização. Realizando um teste de bioresposta de biossensores eletroquímicos enzimáticos para confirmação da bioatividade e presença da enzima extraída.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Extração da Enzima

Para obtenção da uréase, a partir do feijão de porco, foram realizados alguns procedimentos. Inicialmente, foram pesados 100 gramas de feijão e adicionados a eles 100 ml de água destilada para que houvesse o intumescimento dos grãos de feijão. Deixou-os de repouso durante 24 horas. Após este tempo, triturou-se os grãos intumescidos em liquidificador convencional até formar uma massa pastosa para que se tornasse possível a retirada do extrato (parte líquida). O extrato foi retirado pressionando a massa pastosa para que a parte líquida escorresse. Em seguida, o extrato foi filtrado em filtros de papel com maioria dos poros no tamanho de 28  $\mu\text{m}$  e armazenado em tubos Falcon para que fossem centrifugados a 3500 rpm numa temperatura de 4 °C, para finalizar a separação a parte sólida da líquida. Após centrifugação, foi retirado o decantado e aproveitado apenas o líquido, contendo a enzima. Armazenou-os em geladeira a uma temperatura de aproximadamente 8 °C, para posterior uso [4-5].

### 2.2. Procedimento para imobilização da enzima

A principal diferença entre os dois procedimentos está na quantidade de água utilizada na diluição do ácido acético para a produção das membranas, pois no novo método diluiu-se o ácido acético no líquido já contido no extrato, para que a concentração de enzima aumentasse, procedimento não realizado na metodologia normal.

Um fator que influencia diretamente na atividade enzimática, trata-se do pH. Cada enzima tem seu pH ótimo de

atuação, no qual sua atividade é máxima. A literatura não expõe um valor exato para a uréase, porém são citados valores de pH ótimo na faixa de 6,0 a 8,0 [4,6].

### 2.3. Procedimento Normal

Trata-se do método utilizado nos trabalhos científicos, nele, primeiramente, é realizado a preparação da membrana polimérica de quitosana para que, posteriormente, seja adicionado na solução da enzima urease extraída, numa proporção de 1 ml de solução de enzima extraída para 10 ml de solução de quitosana a 1% m/v. Para a solução de quitosana foram utilizados 1 g de quitosana para 100 ml de ácido acético. Dessa forma, foi visto que a solução ficava muito diluída, pouco viscosa, o que dificultava a formação da membrana.

### 2.4. Novo Procedimento

Foram utilizados três tipos de concentrações. Para melhor compreensão, os três métodos serão codificados por P1, P2 e P3, referente a cada concentração. Em todos os procedimentos, para a produção da membrana, foi utilizada a proporção de 1 g de quitosana para 50 ml de ácido acético 1% v/v já contendo a enzima uréase extraída, variando apenas a concentração destes 50 ml. Para o P1, foram utilizadas as quantidades de 10 ml de solução de enzima extraída + 89 ml de água + 1 ml de ácido acético. Para o P2, foram utilizadas as quantidades de 20 ml de solução de enzima extraída + 79 ml de água + 1 ml de ácido acético. Para o P3, foram utilizadas as quantidades de 40 ml da solução de enzima extraída + 59 ml de água + 1 ml de ácido acético.

Realizou-se testes para se medir a acidez da solução e os valores de pH obtidos ficaram dentro da faixa de pH ótimo encontrada na literatura.

### 2.5 Medição da Biorresposta

Para confirmação da presença de enzima uréase, nas membranas produzidas, foram realizados testes de biorrespostas com as mesmas. Inicialmente foram preparados os eletrodos de trabalho, após a deposição de antimônio, o eletrodo foi envolto com a membrana de quitosana contendo a solução enzimática extraída, pelo método de mergulho, por cerca de 30 (trinta) segundos, em seguida colocadas para secagem em atmosfera e temperatura ambiente. Em seguida, foram preparados os eletrodos referência, estes, minutos após realizada eletrodeposição, foram mergulhados em soluções de quitosana, sem enzima, por cerca de 30 segundos e em seguida colocados para secagem em atmosfera e temperatura ambiente.

Para esse teste foi utilizado o equipamento de aquisição de dados da marca Agilent - modelo 340970A. Este foi programado para medir a diferença de potencial a cada segundo, entre os dois eletrodos da célula eletrolítica (eletrodo de trabalho e eletrodo de referência). Diferença de potencial

que ocorre devido a reação catalítica entre a enzima uréase presente na membrana e o analito alvo, no caso a ureia.

## 2.6. Caracterizações

Para verificação da imobilização e manutenção da atividade catalítica, foram realizadas microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura com mapeamento por EDS e testes de biorresposta em biossensores de uréia.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Microscopia Óptica

Para tentar visualizar a imobilização da enzima, foram realizadas imagens de microscopia óptica com o equipamento de marca HIROX, modelo KH-1300. As Figuras 1a e 1b, mostram imagens referentes a P1, nas quais não foi possível observar imagens da enzima na membrana.

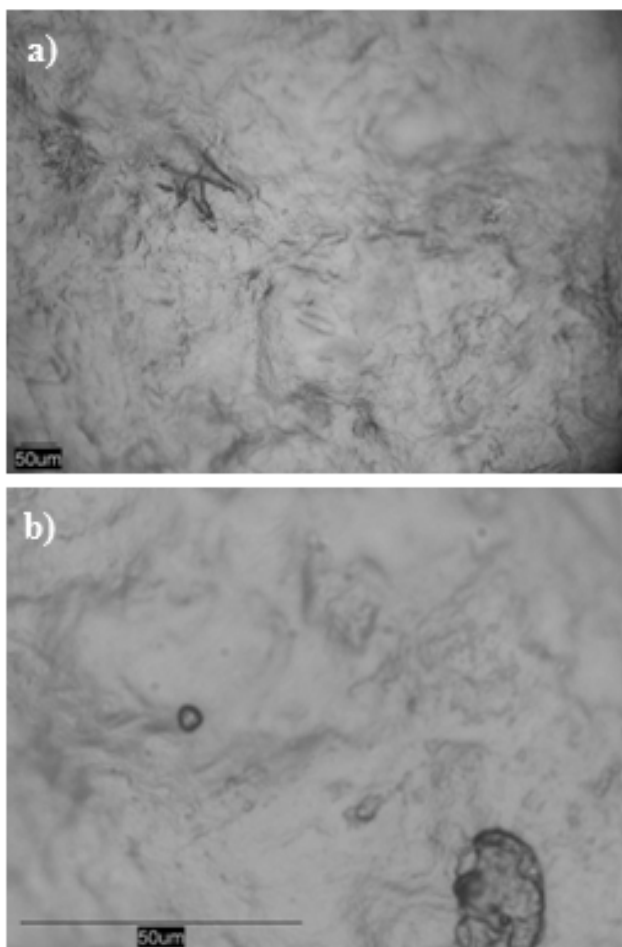


Figura 1. (a) 10 ml de solução enzima extraída 350x (b) 10 ml de solução de enzima extraída 3500x

Realizou-se, também, imagens das membranas referentes a P2, onde foi possível visualizar pequenos pontos sobre a

superfície da membrana, porém devido a ao limite de aumento do microscópio não foi possível ter a certeza que seriam enzimas aprisionadas, como pode ser visto nas Figuras 2a e 2b.

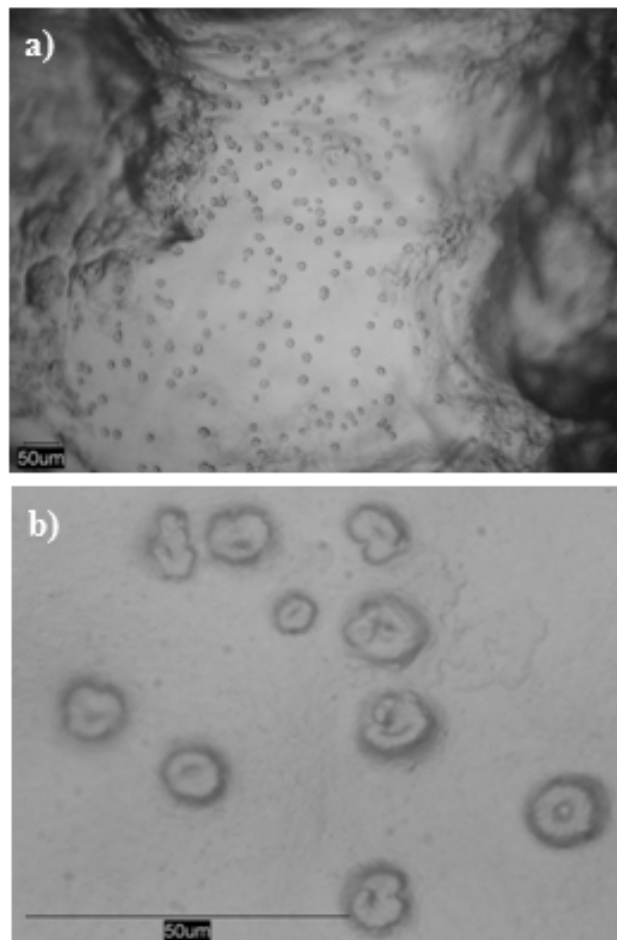


Figura 2. (a) 20 ml de solução de enzima extraída 350x e (b) 20 ml de solução de enzima extraída 3500x

Conforme as outras membranas P1 e P2 realizaram-se também imagens de P3, onde foram visualizadas algumas elevações na superfície da membrana, que se suspeita que possa ser enzimas, porém nada pôde ser afirmado, necessitando a realização de outras caracterizações, para se confirmar a presença ou não das enzimas imobilizadas. As Figuras 3a e 3b ilustram o que foi dito.

### 3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Tendo em vista a impossibilidade de visualização dos cristallitos de uréase imobilizados na membrana de quitosana, foi-se necessário a realização de novas análises como maiores aumentos. Para tal análise utilizou-se o microscópio de eletrônico de varredura da marca PHENOM e modelo PRO-X 800-07344. Foram obtidas imagens com aumento de 5000x.

As Figuras 4(a), 4(b) e 4(c) mostram as imagens obtidas pelo MEV, nelas aparecem heterogeneidades que inicialmente suspeitou-se que fossem cristais de uréase, porém ao serem realizadas análises com auxílio do EDS (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*), viu-se que não era uréase, por não acusar a presença do níquel (molécula presente na estrutura da enzima).

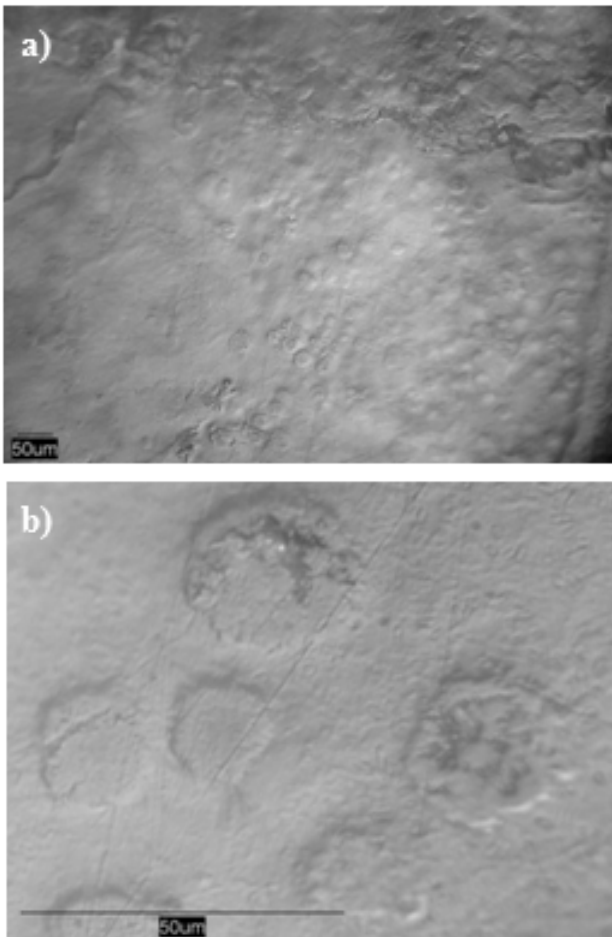


Figura 3. (a) 40 ml de solução de enzima extraída 350x (b) 40 ml de solução de enzima extraída 350x

Como mostrado na Figura 5, pode-se perceber que de fato não existe a presença do níquel na composição da heterogeneidade. A mesma provavelmente seria composta de Ca, O, K, S, P, Mg e C. Porém as energias associadas aos elétrons presentes na heterogeneidade não foram precisas, ou seja, o EDS não acusou 100% de certeza para nenhum elemento citado na composição

Devido ao biossensor ser necessariamente um dispositivo seletivo, os elementos que possivelmente foram encontrados na heterogeneidade não iriam influenciar na atividade de biorresposta, visto que a uréia apenas reagiria com seu catalisador, que no caso é a uréase, gerando os sinais necessários para as medições

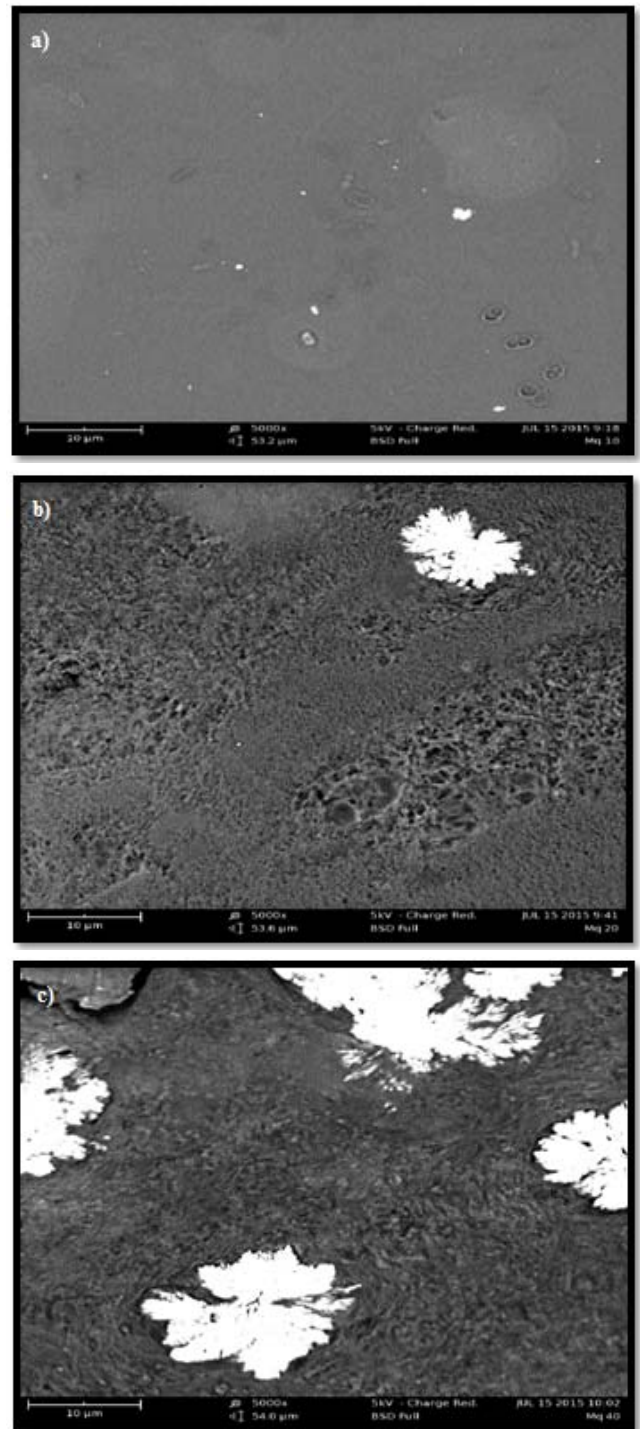


Figura 4. (a) membrana P1 a 5000x, (b) membrana P2 a 5000x e (c) membrana P3 a 5000x

A Figura 5 apresenta o ponto onde foi realizado a análise e a composição do mesmo.

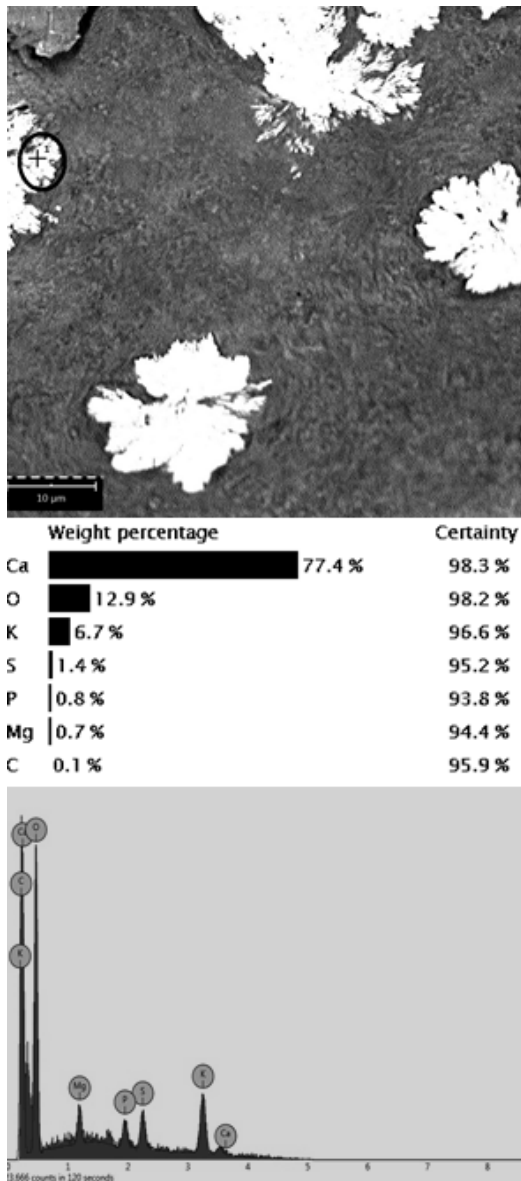


Figura 5. Análise realizada pelo EDS

### 3.3. Testes de Biorrespostas

As medições foram realizadas segundo a segundo por meio do equipamento de aquisição de dados, por aproximadamente 10 minutos. Foram utilizadas uma solução de PBS pura e quatro de PBS + ureia, aumentando as concentrações de 2 a 10 mmol. Foram utilizados 50 ml de solução de PBS em cada concentração. Observa-se nas figuras abaixo que existem 5 curvas distintas em cada gráfico, o que corresponde a cinco concentrações diferentes, utilizadas nas medições. A primeira trata-se da solução de PBS e as quatro seguintes trata-se de soluções de PBS + ureia, com concentrações crescentes de ureia.

Através das Figuras 6, 7 e 8 pode-se afirmar que houve biorresposta, ou seja, diferença de potencial entre os eletrodos o que, possivelmente, confirma a presença da enzima uréase imobilizada nas membranas de quitosana

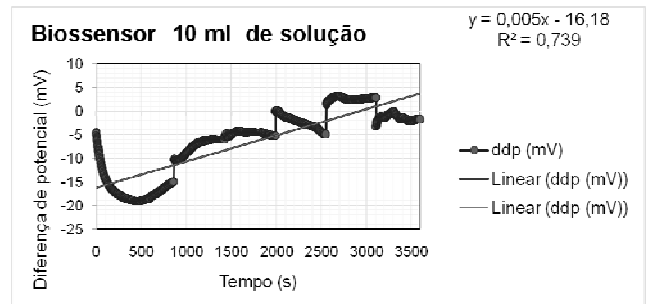


Figura 6. Biorresposta para 10 ml de solução de uréase

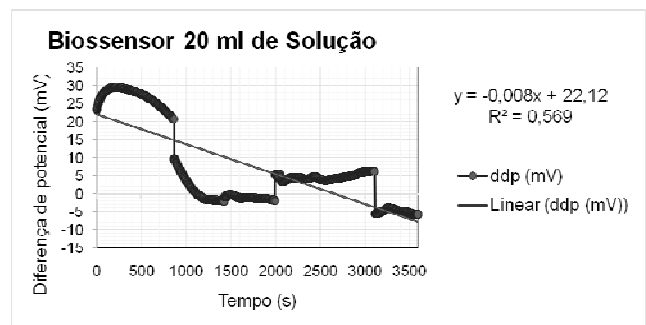


Figura 7. Biorresposta para 20 ml de solução de uréase

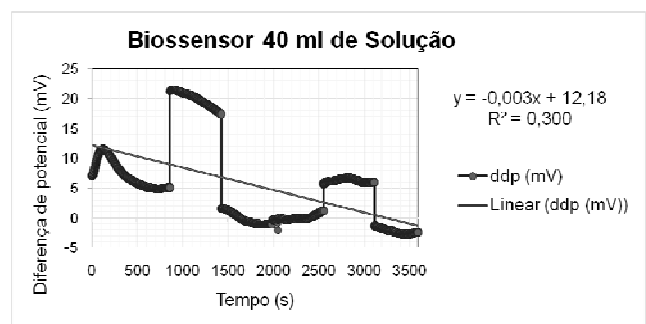


Figura 8. Biorresposta para 40 ml de solução de uréase

### 4. Conclusões

A partir das caracterizações e resultados obtidos, pode-se concluir que, possivelmente, existem enzimas imobilizadas nas membranas de quitosana, visto que se obteve biorresposta, isto implica que o método utilizado para imobilização da enzima uréase foi eficaz, apresentando, ainda, a sensibilidade que é uma característica importante no uso em biossensores.

## Referências

- [1] Zhao, X., Qi, F., Yuan, C., Du, W., Liu, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 44, 182–197, 2015.
- [2] Soares, J. C. Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol. [Tese de Doutorado]. Universidade de São Paulo, 2011.
- [3] Krajewska, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme Microb. Technol.*, 35, 126–139, 2004.
- [4] De Almeida, V. V., Bonafé, E. G., Stevanato, F. B., Souza, N. E., Visentainer, J. E. L., Matsushita, M., Visentainer, J. V. Catalisando a hidrólise da uréia em urina. *Química Nova na Escola*, 28, 42–46, 2008.
- [5] Hamzah, N. A. Main properties of urease partially purified from seeds of Syrian mesquite (*Prosopis farcta*). *J. Babylon Univ. Appl. Sci.*, 22 (3), 1071–1079, 2014.
- [6] Worthington Biochemical Corporation, Effects of pH (Introduction to Enzymes)”, 2015. [Online]. Disponível em: <http://www.worthington-biochem.com/introBiochem/ffectspH.html>.