



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE
MATERIAIS**

Thaís Maria Alves Marinho

**AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA UREASE EM MEMBRANAS DE
QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM BIOSSENSOR AMPERIMÉTRICO DE
UREIA**

Campina Grande - PB

2016

Thaís Maria Alves Marinho

**AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA UREASE EM MEMBRANAS DE
QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM BIOSSENSOR AMPERIMÉTRICO DE
UREIA**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Co-orientador: Ramdayal Swarnakar

Agência Financiadora: CAPES

Campina Grande – PB

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

M339a Marinho, Thaís Maria Alves.
Avaliação da imobilização da urease em membranas de quitosana para aplicação em biossensor amperiométrico de ureia / Thaís Maria Alves Marinho. – Campina Grande, 2016.
75 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2016.
"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, Prof. Dr. Ramdayal Swarnakar".
Referências.

1. Quitosana – Engenharia de Materiais. 2. Urease - Imobilização. 4. Biossensor| Amperométrico. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Swarnakar, Ramdayal. III. Título.

CDU 620.1:677.473(043)

CURRÍCULO VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Thaís Maria Alves Marinho

Filiação: Josevaldo Rodrigues Marinho E Tânia Cristina Alves Marinho

Nascimento: 03/07/1988, João Pessoa – PB

Carteira de Identidade: 3084723/ SSP / PB

C.P.F.: 060.160.254-45

Endereço Residencial: Rua João Julião Martins, 413, Ap 203, Campina Grande – PB

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais (2014/2015)

Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

Título: Avaliação Da Imobilização Da Urease Em Membranas De Quitosana Para Aplicação Em Biossensor Amperiométrico De Ureia

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Graduação em Engenharia de Materiais (2008/2013)

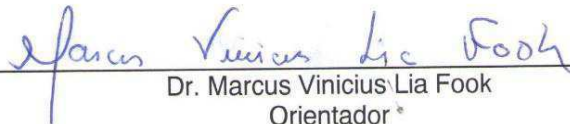
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

THAÍS MARIA ALVES MARINHO

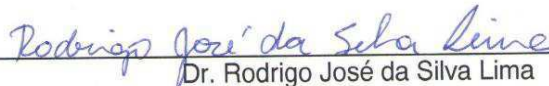
**AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE UREASE EM MEMBRANAS DE
QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM BIOCENSORES AMPEROMÉTRICOS
DE UREIA**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais como requisito
parcial à obtenção do título de **Mestre
em Ciência e Engenharia de
Materiais.**

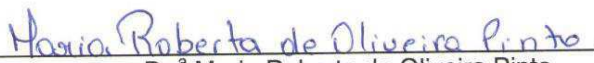
Aprovado em: 08/03/2016



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
Orientador*
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr. Rodrigo José da Silva Lima
Examinador Externo
UAF/UFCG



Dr.^a Maria Roberta de Oliveira Pinto
Examinadora Externa
UAQ/UFCG

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me ajudou, dando força, coragem e atitude para não desistir dessa caminhada, sobretudo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Tânia e Josevaldo, que me deram educação, incentivo e amor incondicional que, sem dúvida nenhuma, foi o que me fez chegar até aqui.

Aos meus irmãos Roberta e Júnior que amo tanto, que me deram muita força e sempre desejaram o meu bem.

Ao meu esposo Ruan, que sempre me deu amor e força nos momentos difíceis e felizes, e também por toda a força de continuar.

A toda minha família pelo desejo de me ver vencer.

As minhas amigas, em especial a Michele e Samilla que além de amigas são minhas irmãs, agradeço por estar sempre comigo em todos os momentos, mesmo que distante. Pela minha Maria que me faz tão feliz.

As minhas xuxinhas Jucélia, Mayelli, Suellem e Milena por todos incentivos e por todos os momentos de descontração junto com delas. A Imarally pela amizade que construímos fora do país em uma das melhores experiências vividas por mim e, sei que vai perdurar para o resto da vida.

Aos meus amigos Marcio e Hugo por terem trabalho comigo no grupo de biossensores e por sempre me ajudar no que fosse preciso.

Aos meus amigos do Certbio Ítalo, Kleilton, Willams, Toninho, Lívia, Claydson, Valeria, Francisco, Flavia, Tânia, Zélia, Suyana, Prof Roberta, Rosembergue, Bianca, Thiago, Isabel, Sandro, Gloria, Greyce, Pedro, Josy, Rosita, Paulinha e dona Val, por estar comigo no dia a dia e fazerem uma família. Por todos os apertos e por todos que puderam me ajudar no que foi preciso, meu muito obrigada.

Aos meus amigos Juliana, Itamara, Alexandre, Netinho, Ytalo, Tamires, Clarissa, por estarem presentes em minha vida, pelas saídas e hospedagens, e por tudo o que fizeram pra me ajudar aqui, quando eu estava fora de casa.

A Rodrigo que me orientou diretamente, agradeço por todas as ideias, sugestões, por tirar minhas dúvidas, por me defender, por todo o ensinamento dado, pela amizade construída, por nunca medir esforços pra me ajudar e por todas as

noites que dormiu de madrugada pra corrigir meu trabalho, sem sua ajuda meu trabalho não seria o mesmo.

A professor Swarnakar por ter me dado toda atenção no início do trabalho.

Ao professor Marcus Vinicius por todas as oportunidades que me proporcionou, nesses dois anos e meio no Certbio. Por agir como um pai, pelos ensinamentos, conselhos e puxões de orelha, meu muito obrigada.

Aos professores Raul e Peniche pela ajuda dada ao trabalho, mostrando de maneira clara como realizar a pesquisa. Em especial ao professor Raul, por sempre me ajudar em todos os momentos que precisei.

Ao laboratório Certbio por toda a estrutura, que foram essenciais para a realização do meu trabalho.

A todos os funcionários do departamento de Ciências e Engenharia de Materiais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Com o ascendente desenvolvimento de novas tecnologias, a procura por novos sistemas de sensoriamento vem aumentando, pois há uma necessidade de obter uma melhor precisão nos resultados de análises biológicas, com baixo custo e em tempo real, diante disso, os biossensores são dispositivos capazes de proporcionar esse tipo de resultado. Doenças ligadas a insuficiência renal necessitam desse tipo de precisão e rapidez, que é caracterizada pela concentração de ureia no sangue ou na urina, eliminado assim uma série de procedimentos laboratoriais. Logo, para montagem de um biossensor de ureia é preciso um biocomponente seletivo e específico, que possa identificar a ureia sem nenhuma interferência, como é o caso da enzima. A enzima capaz de catalisar a hidrólise de ureia é a uréase, formando como produto da reação o gás carbônico e a amônia. Para ser aplicado em um biossensor, a enzima precisa ser imobilizada, pois dessa forma confere uma maior estabilidade operacional e um maior armazenamento da mesma. Essa imobilização pode ser realizada por meio de polímeros. A quitosana é um polímero natural que vêm ganhando destaque para esta aplicação, diante de suas propriedades como baixo custo, abundância na natureza, fácil processamento, capacidade de formação membrana, entre outras. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho é imobilizar a enzima urease utilizando como matriz a quitosana e quitosana/glutaraldeído, avaliando diferentes condições de preparação das membranas. As membranas foram depositadas sobre um transdutor que utilizou como suporte fitas de aço inox, eletrodepositadas com antimônio. Logo após, foram realizadas caracterizações por microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), para avaliar as superfícies das membranas. Também, foram realizados testes de bioresposta dos eletrodos, para avaliar a efetividade da enzima imobilizada, através das respostas de sensibilidade, seletividade, estabilidade, tempo de resposta, faixa de linearidade, especificidade e repetibilidade dos biossensores. E foi observado que, a enzima imobilizada com quitosana e com adição do reticulante glutaraldeído, proporcionou melhores respostas, com mais estabilidade operacional e maior armazenamento da enzima, melhorando assim o tempo de vida da mesma.

Palavras-chave: Imobilização, Quitosana, Urease, Biossensor Amperométrico.

ABSTRACT

With the upward development of new technologies, demand for new sensing systems is increasing because there is a need for better accuracy in the results of biological analyzes, with low cost and in real time, before that, the biosensors are devices capable of provide that kind of result. Diseases related to renal insufficiency require such precision and rapidity, which is characterized by the concentration of urea in blood or urine, thus eliminating a series of laboratory procedures. Therefore, for assembling a urea biosensor is needed a selective and specific bio-component that can identify the urea without any interference, as in the case of the enzyme. The enzyme capable of catalyzing the hydrolysis of urea is urease, forming a reaction product of carbon dioxide and ammonia. To be used in a biosensor, the enzyme must be immobilized, as this way confer greater operational stability and a longer storage thereof. This immobilization can be performed by means of polymers. Chitosan is a natural polymer that become increasingly more important for this application, on its properties such as low cost, abundance in nature, easy processing capacity of membrane formation, among others. Given the above, the objective of this work is to immobilize the enzyme urease as a matrix using chitosan and chitosan / glutaraldehyde, evaluating different conditions of preparation of membranes. Membranes were deposited on a transducer used as a support of stainless steel strips, electrodeposited with antimony. Soon after, characterizations were performed by optical microscopy (OM) and scanning electron microscopy (SEM) to evaluate the surfaces of the membranes. Also, the bioresponse electrode tests were performed to evaluate the effectiveness of the immobilized enzyme, through sensitivity responses, selectivity, stability, response time, linearity range, specificity and reproducibility of biosensors. It was observed that the immobilized enzyme with chitosan and crosslinking addition of glutaraldehyde gave the best responses with more operational stability and increased storage of the enzyme, thereby improving the lifetime thereof.

Keywords: Immobilization, Chitosan, urease, Amperometric Biosensor.

PUBLICAÇÕES

MARINHO, T. M. A.; CARDOSO, M. J. B.; EULÁLIO, H. Y. C.; LEITE, M. D. R.; LIMA, R. J. S.; SWARNAKAR, R.; FOOK, M. V. L. Imobilização de urease com a quitosana pelo método de gotejamento sobre um eletrodo transdutor amperométrico. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. *Artigo aceito para publicação*.

MARINHO, T. M. A.; LEITE, M. D. R.; FOOK, M. V. L. **Avaliação da atividade da enzima urease extraída do jack bean comercial e Imobilizada em Acetato de Celulose para desenvolvimento de Um biossensor de uréia**. In: 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, Paraíba.

LEITE, M. D. R.; **MARINHO, T. M. A.**; FOOK, M. V. L. Obtenção e caracterização de Scaffolds de Policaprolactona produzidos a partir do sistema BioExtruder. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. *Artigo aceito para publicação*.

EULÁLIO, H. Y. C.; CARDOSO, M. J. B.; **MARINHO, T. M. A.**; LIMA, R. J. S.; SWARNAKAR, R.; FOOK, M. V. L. Estudo da Imobilização da Urease, extraída da semente de Canavalia ensiformis, em membranas de quitosana para uso em biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. *Artigo aceito para publicação*.

LEITE, M. D. R.; SILVA, M. C.; **MARINHO, T. M. A.**; FIDELES, T. B; FREITAS, D. M. F.; BÁRTOLO, P. J.; ALMEIDA, H. A.; FOOK, M. V. L. **Obtenção e Caracterização de Scaffolds de PCL e PCL/Mel a partir do Sistema De Bioextrusão**. In: 21 Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, Cuiabá.

LEITE, M. D. R.; **MARINHO, T. M. A.**; FIDELES, T. B; FREITAS, D. M. F.; BÁRTOLO, P. J.; ALMEIDA, H. A.; FOOK, M. V. L. **Avaliação da Citotoxicidade de scaffolds PCL/Mel**. In: 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, Paraíba.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1- Esquema de montagem de um biossensor	16
Figura 2- Efeito catalítico da enzima em uma reação	19
Figura 3- Modelo Chave-Fechadura de Fischer	20
Figura 4- Modelo Chave-Fechadura Induzida de Koshland	21
Figura 5- Representação da hidrólise de ureia catalisada por uréase.	21
Figura 6- Representação esquemática dos sítios ativos da uréase	22
Figura 7- Representação dos tipos de imobilização: a) adsorção, b) a ligação covalente, c) a encapsulação e d) a ligação cruzada.....	23
Figura 8- Estrutura química da quitina e da quitosana.	25
Figura 9- Representa o processo de catalisação da ureia (Massafera, 2010).	26
Figura 10- Fitas de aço inox para ser utilizada como suporte de transdução.	30
Figura 11- Exemplo da eletrodeposição de antimônio em fitas de aço para a voltagem de 9 volts.	31
Figura 12- Suporte de aço inox eletrodepositado com antimônio para ser aplicado como transdutor.	31
Figura 13- Esquema de confecção do biossensor de ureia com membranas de quitosana/urease/glutaraldeído.	34
Figura 14- Esquema do circuito para medição amperiométrica das concentrações de ureia.	37
Figura 15- Superfície do eletrodo com eletrodeposição em diferentes voltagens, com o aumento de 1050x: a) com 4 volts; b) com 6 volts e c) com 9 volts.	41
Figura 16- Superfície de um eletrodo eletrodepositado com antimônio sob uma voltagem de 9 volts, com aumento de a) 100x e b) 350x.	42
Figura 17- Difração de raios-X do suporte de aço inox eletrodepositado com antimônio.	43
Figura 18- Difração de Raios-x do suporte de aço inox eletrodepositado com antimônio após tratamento térmico.....	44
Figura 19- Microscopia óptica dos eletrodos sensor (quitosana/urease) com magnificação de 350X, 1050X e 2100X, onde a) é o eletrodo com uma camada de enzima imobilizada com quitosana, b) com duas e c) com três camadas.....	45
Figura 20- Microscopia óptica dos eletrodos sensor (quitosana/urease/glutaraldeído) com magnificação de 350X, 1050X e 2100X, onde a) é o eletrodo com uma camada de enzima imobilizada com quitosana e glutaraldeído, b) com duas camadas de enzimas e c) com três camadas de enzimas.....	46
Figura 21- Imagens obtidas por MEV para as membranas de quitosana/urease sobre o suporte transdutor, onde a) é o eletrodo com 1 camada de enzima, b) 2 camadas e c) 3 camadas, com a magnitude de 2000x, 8000x e 16000x.	48
Figura 22- Imagens obtidas por MEV para as membranas de quitosana/urease/glutaraldeído sobre o suporte transdutor, onde a) é o eletrodo com 1 camada de enzima, b) 2 camadas e c) 3 camadas, com a magnitude de 2000x, 8000x e 16000x.....	49

Figura 23- Gráfico do teste de voltagem, onde mostra os quatro tipos de potencial utilizado, 0,2V, 0,5V, 1,0V e 1,5V, respectivamente.....	51
Figura 24- Curvas de biorespostas dos eletrodos sensores sem glutaraldeído e imobilizados com quitosana, onde a) tem 1 camada, b) 2 camadas e c) 3 camadas de enzima urease.....	53
Figura 25- Curvas de biorespostas dos eletrodos sensores com glutaraldeído e imobilizados com quitosana, onde a) tem 1 camada, b) 2 camadas e c) 3 camadas de enzima urease.....	55
Figura 26- Gráficos de faixa de linearidade do biossensor de ureia sem glutaraldeído onde a) é o eletrodo com 1 camada, b) com 2 e c) com 3 camadas de enzima urease, no quais os pontos representam as concentrações de ureia e a reta representa o ajuste linear.	57
Figura 27- Gráficos de faixa de linearidade do biossensor de ureia com glutaraldeído onde a) é o eletrodo com 1 camada, b) com 2 e c) com 3 camadas de enzima urease, no quais os pontos representam as concentrações de ureia e a reta representa o ajuste linear.	59
Figura 28- Curvas cronoamperométrica de sensibilidade do sensor com 2 camadas de enzima imobilizada com quitosana e glutaraldeído na solução de 0,1M.	61
Figura 29- Curva de especificidade do eletrodo sensor com 2 camadas de enzima imobilizada com glutaraldeído na solução de 0,1M.	62
Figura 30- Curvas do teste de repetibilidade dos sensores com diferentes números de camadas de enzima imobilizada com quitosana sem glutaraldeído, utilizando 5 repetições do mesmo teste na solução de 0,1M de ureia, onde a) é o sensor com 1 camada, b) com 2 e c) com 3 camadas.	64
Figura 31- Curvas do teste de repetibilidade dos sensores com diferentes números de camadas de enzima imobilizada com quitosana com glutaraldeído, utilizando 5 repetições do mesmo teste na solução de 0,1M de ureia, onde a) é o sensor com 1 camada de enzima, b) com 2 e c) com 3 camadas.	66

SUMÁRIO

1.0- INTRODUÇÃO	13
2.0 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	15
2.1- Biossensor	15
2.1.1 Biossensores Amperométricos	16
2.2- Transdutores.....	17
2.3- Enzima.....	19
2.3.1- Enzima Uréase	21
2.4- Imobilização de Enzimas	22
2.5- Polímeros Naturais	23
2.5.1- Quitosana	24
2.6- Ureia	26
3.0- MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1- Materiais	28
3.2- Preparação dos eletrodos de trabalho	28
3.2.1- Preparação do suporte do transdutor	29
3.2.1.1 Preparação das fitas aço inox	29
3.2.1.2- Preparação do transdutor sobre o suporte	30
3.2.3- Preparação dos eletrodos sensores	32
3.2.3.1- Preparação da solução de quitosana	32
3.2.3.2- Preparação da solução da enzima urease	32
3.2.3.3- Preparação da solução de glutaraldeído	32
3.2.3.4- Imobilização da urease sobre o eletrodo sensor	33
3.2.4- Preparação dos eletrodos referência.....	34
3.2.5- Preparação das soluções para os testes de bioresposta dos biossensores	35
3.2.5.1- Solução de ureia	35
3.2.5.2- Solução de creatinina	35
3.3- Caracterizações dos eletrodos.....	35
3.3.1- Microscopia Óptica (MO)	35
3.3.2 - Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).....	36
3.3.3- Difração de Raios X (DRX).....	36
3.3.4– Caracterizações de bioresposta em termos de corrente (A)	36
4.0- RESULTADOS E DISCURSÃO	41

4.1- Caracterizações dos suportes.....	41
4.1.1- Microscopia óptica dos suportes eletrodepositados	41
4.1.2- Difração de raios X dos suporte eletrodepositado	42
4.2- Caracterizações dos eletrodos sensores	44
4.2.1- Microscopia óptica das membranas imobilizadas nos transdutores	44
4.4- Microscopia Eletrônica de Varredura dos eletrodos imobilizados	47
4.5- Caracterização dos biossensores através de bioresposta.....	50
<i>Teste de Potencial</i>	50
<i>Teste de Tempo de Resposta e Estabilidade do Sensor</i>	51
<i>Linearidade e Sensibilidade</i>	56
<i>Sensibilidade</i>	60
<i>Especificidade e Seletividade</i>	61
<i>Repetibilidade</i>	62
<i>Análise comparativa dos biossensores</i>	66
CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS	70

1.0- INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os biossensores têm motivado grande atenção como uma ferramenta alternativa de detecção, pelo baixo custo, rapidez e facilidade de análise (Soylemez et al., 2015); demonstrando também grandes perspectivas devido às características de portabilidade, seletividade, possibilidade de miniaturização, entre outros (Alfaya; Kubota, 2002). Com base nessas características a sua aplicação é muito ampla na área industrial, alimentícia, no meio ambiente e na área clínica (Barhoumi et al., 2006; Perumal; Hashim, 2014).

Biossensor é um dispositivo analítico que é incorporado há um elemento biológico (enzimas, anticorpos, micróbios, etc.) e ligado a um transdutor, que é capaz de converter o sinal biológico em sinal elétrico, proporcional à concentração do analito. Dependendo do transdutor o biossensor pode ser eletroquímico (potenciométrico, amperométrico e condutométrico), óptico, piezoelétrico ou térmicos (Prayoga et al., 2014; Xia et al., 2010). Os biossensores amperimétricos enzimáticos são considerados um dos mais propícios a serem fabricados, por possuírem boas características como rapidez na detecção, simplicidade e baixo custo (Gabrovska et al., 2011).

A doença renal crônica é uma lesão do órgão com perda progressiva e irreversível da função dos rins, o que leva o indivíduo a filtrar o sangue através da hemodiálise. Diante disto, na área médica há vários relatos dessa doença e, com isso uma crescente necessidade de diagnósticos rápidos e precisos, visto que um diagnóstico prévio de doenças renais evitaria que o paciente atingisse o estado avançado da doença, prevenindo assim a necessidade de um tratamento de hemodiálise. A concentração excessiva de ureia no corpo (no soro ou na urina) é um indicador dessas doenças, e essas análises em laboratórios clínicos são realizadas frequentemente. Com esses dispositivos facilitaria o meio de detecção, pois seria mais uma alternativa de medição, já que em laboratórios clínicos que exige um certo tempo, preparação das amostras e elevado custo (Dhawan; et al., 2009; Braga, 2012). Além do mais, os biossensores também poderiam auxiliar no tratamento de hemodiálise, pois durante o processo os níveis de ureia poderiam ser monitorados.

A ureia é um subproduto metabolizado pelo corpo e suas diferentes concentrações ocasionam sinais patológicos (Barhoumi et al., 2006). Contudo, para este tipo de detecção pode ser confeccionado um biossensor enzimático, capaz de

determinar a quantidade de ureia no corpo através de uma enzima específica (Mulyasuryani et al., 2010). A enzima capaz de catalizar a hidrólise de ureia é a enzima urease, que tem como produto o dióxido de carbono e a amônia (Ivanova et al., 2013). A urease é uma metaloenzima que é dependente do níquel, podendo ser encontrada em bactérias, leveduras e várias plantas superiores (Sujoy; Aparna, 2013).

Um dos pontos principais para a confecção de um biossensor enzimático é a imobilização da enzima, pois essa imobilização é capaz de conferir ao sensor uma estabilidade operacional e um maior armazenamento do biocomponente, diminuindo assim a lixiviação da enzima durante a análise. A tecnologia de imobilização de enzimas tem um importante campo na biomedicina e na biotecnologia, onde é responsável pelo desenvolvimento do biossensor e está ligada diretamente com as propriedades e qualidades dos mesmos (Gabrovska et al., 2011; Mendes et al., 2011).

Uma matriz de imobilização adequada, deve fixar a enzima sobre a superfície do eletrodo e manter a sua estrutura durante as medições, sem qualquer tipo de desnaturação. Hoje em dia, a escolha dessas matrizes ainda é um desafio e o centro das aplicações científicas (Soylemez et al., 2015).

Essas matrizes imobilizadoras podem ser produzidas através de membranas poliméricas, onde muitos estudos apresenta a facilidade de produção e a grande variedade de composição (Gabrovska et al., 2011). A utilização de polímeros naturais como matriz imobilizadora é considerada propícia para essa aplicação (Gabrovska et al., 2011). Dentre esses polímeros, destaca-se a quitosana, por possuir uma ótima capacidade de formação de membrana, alta permeabilidade (facilitando o contato entre o substrato e o analito), resistência mecânica, não toxicidade, biocompatibilidade e possui um baixo custo (Rawal et al., 2012; Zaborska et al., 1991).

Para a confecção do biossensor se faz necessário um suporte capaz de suportar as camadas que constituem o eletrodo capaz de transmitir o sinal obtido na reação, para um sistema de detecção. Neste trabalho foi utilizado como suporte, fitas de aço inox e como transdutor, essas fitas foram recobertas por meio de uma eletrodeposição de antimônio, logo o antimônio foi utilizado por apresentar uma relação quase linear com o pH, que estará presente na solução. Portanto, este trabalho tem como objetivo imobilizar a enzima urease com a quitosana e a quitosana/glutaraldeído e, avaliar os diferentes números de camadas das membranas, sobre um eletrodo de fita de aço inox eletrodepositado com antimônio utilizado como transdutor, para aplicação como um biossensor amperométrico de ureia.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1- Biossensor

Nos últimos anos alguns avanços tecnológicos importantes forneceram os mecanismos e materiais fundamentais para construir dispositivos como os biossensores (Perumal; Hashim, 2014). O primeiro foi desenvolvido em 1962 por Clark e Lyons através de um eletrodo sensor de oxigênio, que foi realizado uma experiência utilizando a glicose oxidase, observando à diminuição da concentração de oxigênio proporcional a concentração da glicose (Clark; Lyons, 1962). Depois disto, muitas melhorias foram feitas na sensibilidade, seletividade e no aumento da capacidade de detecção do biossensor moderno (Perumal; Hashim, 2014).

Xia et al (2010) define biossensor como um dispositivo analítico capaz de converter à concentração de um analito (sinal biológico) em outro sinal proporcional a concentração do analito, através da integração de um elemento biológico com um transdutor.

Este novo instrumento representa uma alternativa propícia para complementar as técnicas já existentes, devido as suas características singulares como a seletividade, resposta rápida, simplicidade, especificidade, custo relativamente baixo, potencial para miniaturização e a facilidade de automação (Melo, 2008). Entretanto a principal desvantagem dos biossensores é a sua dependência direta do elemento biológico (receptor), com isso esta técnica geralmente é menos reproduzível quando comparada aos métodos químicos tradicionais (Rubens et al., 2008). Logo, um biossensor deve ser diferenciado de um sistema bioanalítico, onde este requer etapas adicionais de processamento como adição de reagentes. Já nos biossensores não são necessárias etapas adicionais, pré-tratamentos morosos e grandes volumes de amostra (Gossypiumhirsutum et al., 2013).

A seletividade é um dos fatores mais críticos na química analítica, no entanto, existem na natureza alguns componentes biológicos altamente seletivos como enzimas, anticorpos, microrganismos, entre outros, que combinados com um transdutor constituem um biossensor (Silva, 2011). A Figura 1 representa um esquema dos componentes constituintes de um biossensor: analito, componente biológico, transdutor e o detector/processador. Onde o analito é o alvo a ser detectado, o componente biológico é o elemento que vai reagir com o analito e transmitir uma

resposta biológica. Já o transdutor é capaz de transformar a resposta biológica em resposta elétrica, onde o detector/processador fornece a resposta.

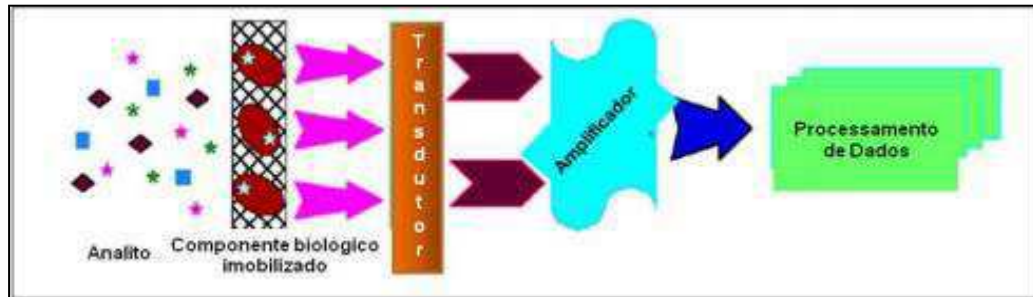


Figura 1- Esquema de montagem de um biossensor (Arya et al., 2008).

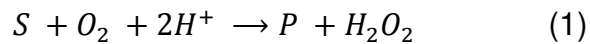
A classificação dos biossensores pode ser de acordo com o tipo de biocomponente e do transdutor utilizado. Com relação à biocamada, os biossensores podem ser classificados como enzimáticos; imunossensor; sensor celular; sensor tecido; sensor organela (Hansen, 2011); e sensor microbiológico (Malhotra; Turner, 2003; Nakamura; Karube, 2003). O componente biológico é o elemento ativo que interage especificamente com o analito, sendo ele o responsável tanto pelo reconhecimento do analito como também pela especificidade e sensibilidade do sensor. É interessante destacar a capacidade intrínseca que estes sistemas biológicos têm de reconhecer suas contrapartes, como por exemplo, uma enzima reconhece seu substrato, um anticorpo liga-se seletivamente ao seu antígeno correspondente, e assim por diante. Logo o objetivo desses componentes é a reação com o analito, gerando uma espécie capaz de ser detectada pelo transdutor (Andrade, 2006). Quanto ao transdutor este pode ser do tipo: ópticos, calorimétricos, piezoelétricos, eletroquímicos (potenciométrico, amperométrico e condutométrico); termométrico e transistores de efeito de campo (“Field effect transistors” – FET) (Singh et al., 2008). Os biossensores amperiométricos são os mais utilizados pela simplicidade e pela boa exatidão nos resultados.

2.1.1 Biossensores Amperométricos

Os biossensores amperométricos apresentam um método de análise eletroquímica na qual mede a corrente produzida durante a oxidação ou redução de espécies eletroativas (um produto ou um reagente), através da aplicação de um

potencial constante, onde essa corrente é linearmente dependente da concentração da substância a analisar. Logo possuem alta sensibilidade, boa precisão, resposta rápida e larga faixa de linearidade tornando-os assim os mais utilizados. Vários biossensores amperométricos têm sido desenvolvidos a fim de detectar os mais diferentes analitos como polifenóis, triglicerídeos, colesterol, ácido úrico, dentre outros (Hansen, 2011) (Nicolini, 2013).

Durante a evolução dos sensores amperométricos à base de oxidase das enzimas, foram desenvolvidos três métodos principais de transdução, como mostra o a equação:



Onde S e P são o substrato e o produto da reação enzimática, respectivamente.

Dessa forma, os primeiros biossensores amperiométricos de enzimas se basearam no monitoramento eletroquímico de consumo de oxigênio ou formação de peróxido de hidrogênio. Já na segunda geração, os sensores de oxigênio são substituídos por um receptor de elétrons (mediador redox), que podem ser incorporados juntamente com a enzima na camada biocatalítica. E na terceira geração, o objetivo é a realização de transferência eletrônica direta, que ocorre a partir da enzima para o eletrodo sem presença de mediadores produzindo assim um sinal elétrico (Banica, 2012).

O biossensor de enzima amperiométrico tem uma boa posição entre os outros sistemas de biossensores, pois tem a combinação da especificidade da enzima que atua para o reconhecimento de um dado analito alvo, com a transdução direta da taxa da reação biocatalítica para um sinal de corrente. Dessa forma, o acoplamento de enzimas mais eletrodos amperiométricos permitem a determinação rápida e simples dos analitos alvo (Wang, 1999).

2.2- Transdutores

Um dos maiores problemas na confecção de um biossensor eficiente é a limitada estabilidade do receptor e a resistência difusional da matriz usada para imobilizar o receptor próximo ao transdutor. Sobretudo, há ainda a necessidade de amplificar o sinal gerado, sem que haja interferências. Portanto, dependendo da

natureza das interações bioquímicas com o analito, um transdutor mais adequado às características do dispositivo deve ser adaptado ao biossensor (Deshpande; Amalnerkar, 1993).

Geralmente nos biossensores eletroquímicos a variação de alguma grandeza elétrica está ligada a concentração do analito na amostra biológica. É deste tipo a maioria dos transdutores usados em biossensores comerciais, pois são biossensores com elevada sensibilidade, seletividade e com equipamentos de medição mais simples, quando comparados com os outros tipos de transdução, como os biossensores piezoelétricos e óticos. Os eletroquímicos funcionam com a imersão de um eletrodo numa solução eletrolítica que resulta na troca de elétrons entre o transdutor e o analito (Silva, 2011).

O transdutor de sinais é responsável pela detecção e conversão desse sinal, em uma resposta mensurável, em um sinal como som, luz, corrente elétrica, diferença de potencial elétrico ou variação de temperatura e, a partir disso, o sistema de processamento de dados terá a função de modelar esses sinais eletrônicos do transdutor, para apresentá-los em um medidor, um display ou tela de computador, e/ou armazená-los (Furtado et al., 2008; Silva, 2011; Guimarães, 2009; Mehrvar; Abdi, 2004).

Esses transdutores podem ser classificados pelo princípio de energia envolvida na transdução como os eletroquímicos (eletrólise de espécies que sofrem oxidação-redução), óticos (medida da luminescência ou fluorescência), piezoelétricos (medida da frequência de vibração relacionada à variação de tensão) e térmicos (variação de temperatura entre a amostra e o meio) (Skládal, 2003; Chaubey; Malhotra, 2002).

Para que um transdutor seja eficiente na interação com o material biológico, o mesmo deve detectar apenas um reagente ou um produto específico (seletivo), não respondendo a outras substâncias presentes na amostra analisada (Fatibello Filho; Capelato, 1992). Neste sentido, a utilização de metais com boa condutividade e pouca reatividade química com o analito, se faz necessária para um sinal de resposta mais fidedigno, como é o caso do aço inox. Além dessas propriedades, a boa resistência mecânica auxilia no suporte dos outros constituintes do transdutor como, por exemplo, as camadas eletrodepositadas, camadas poliméricas e enzimáticas.

Para uma melhor conversão do sinal biológico em sinal elétrico, o antimônio (Sb) pode ser adicionado ao aço inox por eletrodeposição, por ser um semi-metal e possuir quatro estados de oxidação Sb(V), Sb(III), Sb(0) e Sb(-III) (Ungureanu et al.,

2015). O antimônio e seus compostos apresentam várias propriedades que podem ser utilizadas em diversas aplicações, pois apresentam propriedades como a relação quase linear entre força eletromotriz (f.e.m.) e pH (de 2 a 12); leituras reprodutíveis e estáveis; fácil fabricação e baixo custo (Chan, 2012).

2.3- Enzima

Enzimas constituem um grupo de macromoléculas biológicas e são definidas quimicamente como proteínas, com elevada atividade catalítica, especificidade e seletividade (An et al., 2015).

Um catalizador é uma substância que acelera uma reação química, tornando-a instantânea e diminuindo assim, a energia de ativação (energia mínima necessária para que os reagentes possam se transformar em produtos). Como catalizadores, as enzimas atuam em pequena quantidade e se recuperam indefinidamente. Logo, não leva em consideração reações que sejam energeticamente desfavoráveis, como também não modificam o sentido dos equilíbrios químicos, apenas aceleram a reação (Kieling, 2002). A Figura 2 representa o efeito catalítico de uma enzima.

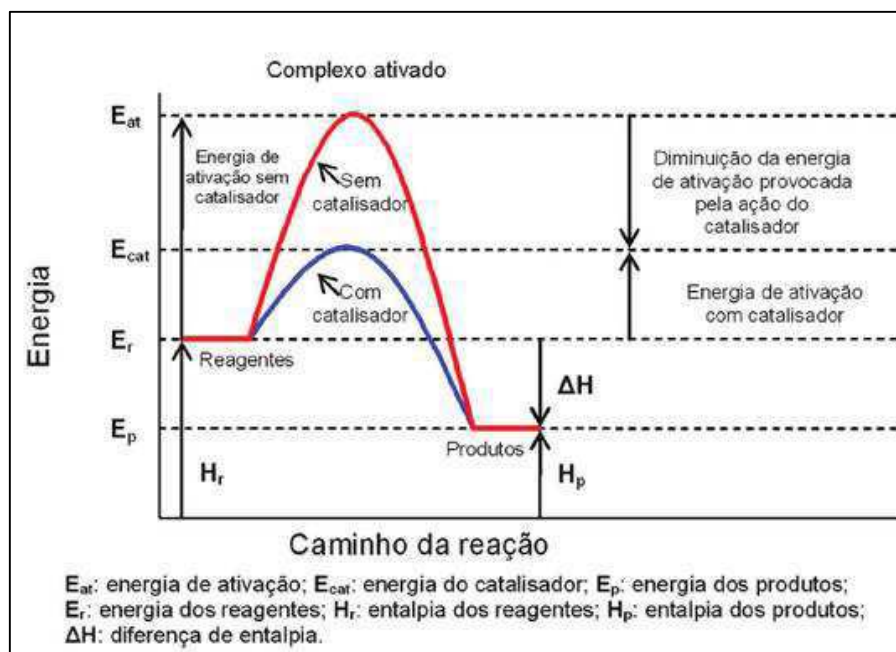


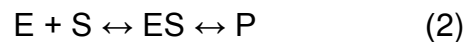
Figura 2- Efeito catalítico da enzima em uma reação (Almeida et al., 2008).

As reações enzimáticas tem como grande vantagem a elevada especificidade dos substratos utilizados e os produtos que são gerados. A atividade enzimática pode

ser afetada pela temperatura, tendo em vista que, diferentes enzimas têm intervalos ótimos de temperaturas para uma boa atividade. O pH, a pressão e a concentração do substrato também podem afetar a atividade enzimática (Hansen, 2011).

As enzimas têm uma boa característica que é a alta especificidade pelos seus substratos, podendo ser absoluta ou relativa. Especificidade absoluta acontece quando as enzimas se ligam a apenas um tipo de substrato catalisando uma única reação, já a especificidade relativa, é quando a enzima se liga a diferentes tipos de substratos quimicamente semelhantes, catalisando assim várias reações (Hansen, 2011).

As interações entre o substrato e a enzima ocorrem através de um sítio ativo presente na estrutura enzimática. O sítio ativo é a região que contém resíduos de aminoácidos capazes de interagir com o substrato e catalisar a transformação química. Logo, o substrato deve ser capaz de se ligar especificamente à enzima, a fim de possibilitar o produto final da reação (Nelson; Cox, 2002). Como demonstrado na equação (2):



onde E é enzima, S é substrato e P é produto da reação.

Em 1894, Emil Fischer propôs o modelo tipo chave-fechadura, para a ligação da enzima-substrato (Figura 3), onde a enzima e o substrato têm formas estruturais complementares, fazendo com que se encaixem os pares específicos. Anos depois em 1958, Daniel Koshland propôs o modelo chave-fechadura induzido (Figura 4), afirmando que os sítios ativos das enzimas eram estruturas flexíveis que alteram a sua estrutura de acordo com a interação com o substrato (Nelson; Cox, 2002; Martins, 2008).

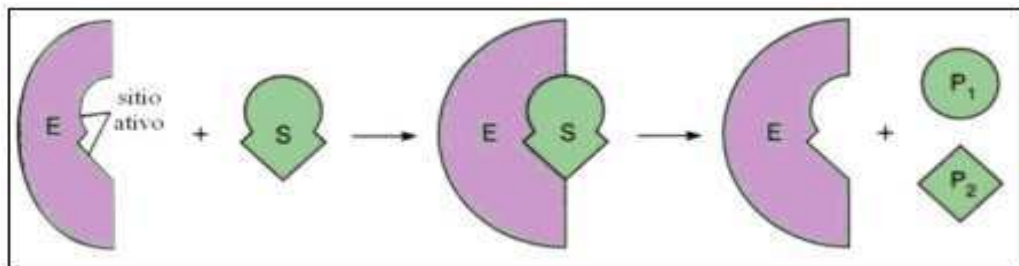


Figura 3- Modelo Chave-Fechadura de Fischer (Martins, 2008).

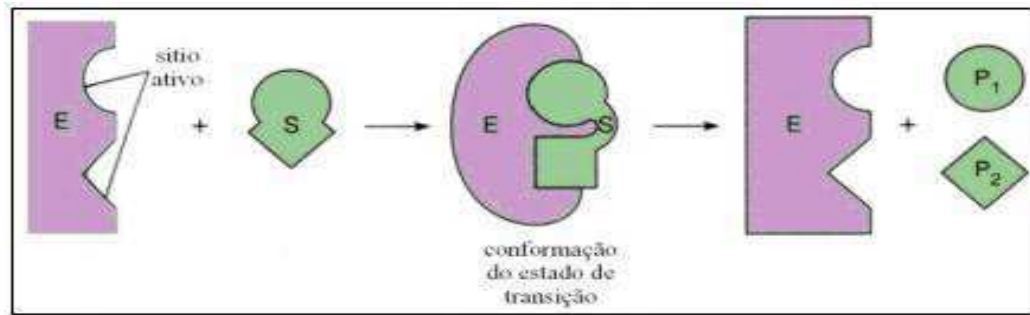


Figura 4- Modelo Chave-Fechadura Induzida de Koshland (Martins, 2008).

2.3.1- Enzima Uréase

Os elementos catalisadores de reconhecimento baseados em enzimas são muito atraentes para a aplicação em biossensores, devido a algumas vantagens como a variedade de produtos de reações mensuráveis de processo catalítico, incluindo prótons, elétrons, luz e calor. A enzima uréase pode ser utilizada como elemento de reconhecimento, devido a sua capacidade de determinar e/ou monitorar a ureia, tanto em aplicações médicas ou ambientais (Barhoumi et al., 2006).

A uréase é uma metaloenzima dependente do níquel, capaz de catalisar a hidrólise de ureia, produzindo assim duas moléculas de amônia e uma de gás carbônico, como mostra a Figura 5, podendo ser extraída de sementes leguminosas, bactérias ou fungos. Mas, a mais estudada é a uréase extraída do *jack bean* (feijão de porco), que também pode ser identificada como *Canavalia ensiformis*, que foi a primeira enzima a ser cristalizada (Sujoy; Aparna, 2013; Nelson; Cox, 2002).

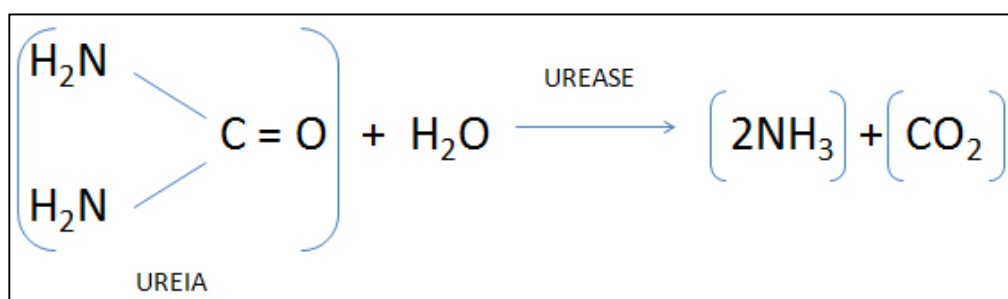


Figura 5- Representação da hidrólise de ureia catalisada por uréase.

De acordo com Lee et al. (2008b), a estrutura molecular da uréase que foi determinada por análises de difração raios X, fornece o sítio ativo da enzima, que

contém dois íons de níquel em ponte, ligado por uma lisina carbamilada e um íon de hidróxido, como mostra a Figura 6. Cada níquel coordena dois resíduos de histidina e uma molécula de água. A esfera de coordenação de um centro de níquel, **Ni(2)**, é completado por um aspartato terminalmente resultando em um ambiente pseudo-octaédrico; enquanto que outro íon de níquel, **Ni(1)**, possui uma geometria piramidal quadrada distorcida.

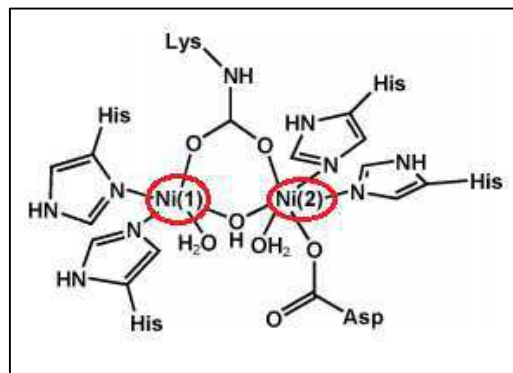


Figura 6- Representação esquemática dos sítios ativos da uréase (Lee et al., 2008b).

A uréase é uma das poucas enzimas que requerem o níquel para sua atividade. Visto que, a ligação do níquel a uréase é muito específica e segura, e para uma remoção de íons metálicos precisa-se de um tratamento forte com ácidos ou agentes desnaturantes, que não é o caso das outras metaloenzimas (Balasubramanian; Ponnuraj, 2010).

2.4- Imobilização de Enzimas

A imobilização é uma etapa fundamental na fabricação de um biossensor, pois tem o objetivo promover o contato íntimo do elemento de reconhecimento biológico com o eletrodo. Dentre os materiais geralmente utilizados para o reconhecimento biológico (enzimas, anticorpos, células, ácido nucleico, micro-organismos, etc.), destacamos as enzimas, que são mais comumente utilizadas e estudadas para obtenção de dispositivos. Um inconveniente no uso de enzimas como reagentes analíticos é o custo elevado, principalmente se forem purificadas, sendo imobilização enzimática uma solução prática, já que, a princípio, podem ser usadas repetidas vezes (Santos, 2012; Fernandes, 2012; Andrade, 2006).

O suporte adequado para imobilização de enzimas deve possuir algumas características como se ligar facilmente a enzima e ser quimicamente inerte (Gerard; Malhotra, 2005).

Alguns suportes utilizados como matrizes de imobilização são vidros, membranas, polímeros, nanomateriais, sol-gel, hidro-gel, fibras e grafite. É interessante ressaltar a importância da estabilidade das enzimas por longos períodos de tempo quando imobilizadas no suporte, tornando assim fundamental para eficiência de um biossensor. Isso depende do tipo de técnica de imobilização utilizada para fixar o material biológico na superfície do transdutor. Várias técnicas são utilizadas nesse processo de imobilização da enzima no suporte, dentre elas destaca-se a adsorção, a ligação covalente, a encapsulação e a ligação cruzada, como mostra a Figura 7 (Guimarães, 2009; Santos, 2012; Fatibello Filho; Capelato, 1992b).

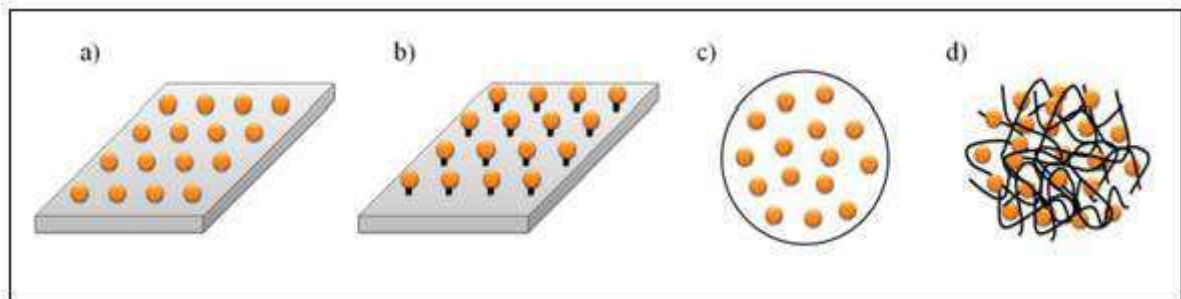


Figura 7- Representação dos tipos de imobilização: a) adsorção, b) a ligação covalente, c) a encapsulação e d) a ligação cruzada (Andrade, 2006).

O tipo de imobilização pode afetar na perda de atividade catalítica da enzima, devido à desnaturação e desativação. Outros fatores como a área superficial, a porosidade e o caráter hidrofílico do suporte também afetam a atividade, contudo, a imobilização prolonga o tempo de meia-vida do biocomponente. Portanto, técnicas para aumentar a estabilidade operacional e de armazenamento do biocomponente são importantes para aplicação de biossensores (Andrade, 2006; Singh et al., 2008).

2.5- Polímeros Naturais

Polímeros são formados por cadeias macromoleculares que são constituídas por unidades repetitivas de mero, ligadas entre si por ligações covalentes e possuindo alta massa molar. Podendo assim, possuir cadeias lineares, com ou sem ramificações,

ou ainda cadeias ligadas entre si formando estruturas tridimensionais. Essa diversidade de estruturas macromoleculares pode diversificar os tipos de polímeros como os naturais e sintéticos (termoplásticos, termofixos e elastômeros). Os polímeros sintéticos se formam a partir de substâncias naturais processadas, ou seja, deve haver algum tipo de processamento para a sua obtenção. Já os polímeros naturais são extraídos diretamente da natureza, todavia não se tem nenhum processamento para a sua obtenção, como por exemplo, o látex, algodão, celulose e quitosana (Challa, 1993; Franchetti; Marconato, 2006).

Os polímeros naturais possuem uma síntese que envolve geralmente reações catalisadas por enzimas e reações de crescimento de cadeia a partir de monômeros ativados, que se formam dentro das células por processos metabólicos complexos (Franchetti; Marconato, 2006).

Dentre os polímeros naturais existentes a quitosana apresenta boas propriedades para o uso em imobilização de enzimas para aplicação em biossensores. É um polímeros de fácil disponibilidade, pois são encontrados em abundância na natureza, o que diminui os custo, são biodegradáveis, biocompatíveis, possuem boas propriedades físico-química e tem facilidade de ser processada de várias formas como membranas, filmes, esferas, entre outras (Magalhães; Machado, 1998; Narang; Pundir, 2011).

2.5.1- Quitosana

Em 1859 foi a primeira vez que a quitosana foi descrita, embora só em 1894 o nome quitosana surgiu devido às características semelhantes entre a ela e a quitina. Naquela época a quitosana foi caracterizada como um polímero insolúvel em água e como um ótimo ligante. Porém, devido à grande semelhança entre a quitosana, a quitina e a celulose, constitui-se entre elas uma grande desordem que manteve-se até o início do século XX, quando pesquisas concretizaram que se tratavam de substâncias diferentes. Na época, a celulose por ser bastante explorada nas indústrias de papel e têxtil, passou a ter grande investimento tecnológico. Já a quitina e a quitosana ficaram restritas as pesquisas básicas e com pouco investimento financeiro (Antonino, 2007).

A quitosana é um polímero natural obtido através da desacetilação da quitina, que se encontra presente abundantemente nos exoesqueletos de crustáceos como o

camarão e o caranguejo (Abreu et al., 2013). A quitina é um polissacarídeo com estrutura química composta com unidades de monômeros de 2-acetamido 2-deoxi- β -D- glicose ligadas através do β (1 \rightarrow 4), como mostra a Figura 8. A posição do C₂ no anel de glicose do monômero tem um grupo acetamida, onde o grau de conversão do grupo acetamida para o grupo amina não está realmente completa, isto é dado pelo o grau de desacetilação da quitosana. A N-desacetilação de quitina leva a formação da quitosana, na qual depende do grau de desacetilação da quitina (Aravamudhan et al., 2014).

O grau de desacetilação confere à quitosana o número de unidades desacetiladas e pode ser definido como o número de grupos amino em relação aos grupos amida da cadeia polimérica (Antonino, 2007).

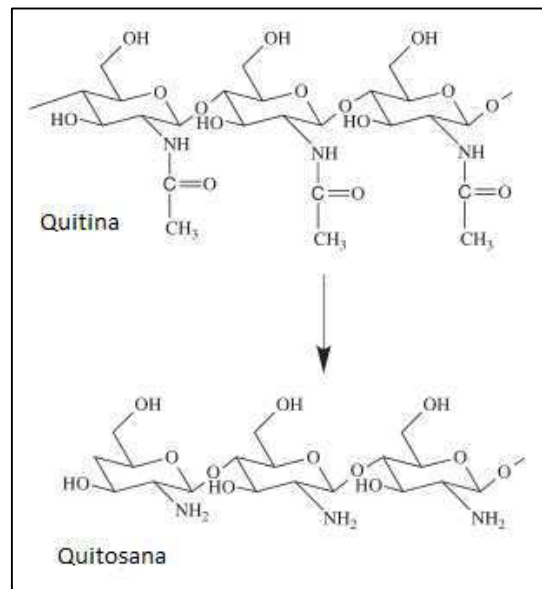


Figura 8- Estrutura química da quitina e da quitosana (Aravamudhan et al., 2014).

A quitosana possui algumas características por ser um polímero natural, de baixo custo, renovável, biocompatível, biodegradável, atóxico e de grande importância econômica e ambiental. Suas propriedades dependem principalmente de sua massa molar aparente e do grau de desacetilação, ambos os parâmetros são importantes para definir a solubilidade do polissacarídeo em meio aquoso (Abreu et al., 2013; Mendes et al., 2011).

A quitosana é considerada ideal para utilização como suporte de imobilização de enzimas, em virtude de apresentar um grande percentual de grupos amino e de hidroxilas disponíveis em sua estrutura química. Com a capacidade de ser processada

de várias formas (gel, membrana, filmes, fio, entre outros). Além disso, a quitosana pode ser aplicada em várias áreas como a medicina, em produtos farmacêuticos, na agricultura, em biotecnologia, na indústria de cosméticos e de alimentos e, também, como adsorvente na remoção de corantes e no tratamento de efluentes industriais (Oliveira; Vieira, 2006).

2.6- Ureia

A ureia no organismo humano se encontra como um produto natural da etapa final do metabolismo das substâncias nitrogenadas no organismo, formada principalmente pelo fígado, depois é filtrada pelos rins e eliminada pela urina; é caracterizada por ser um composto tóxico cuja fórmula é $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (Braga, 2012). A ureia também pode ser encontrada na natureza e a sua análise é importante na química dos alimentos e no monitoramento ambiental (presentes em solos e águas contaminadas) (Soares, 2011).

Segundo Sodré et al., 2007, a ureia é o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas pelo organismo, sendo 90% excretados pelos rins e correspondendo a aproximadamente 75% do nitrogênio não-proteico excretado. O restante da ureia é eliminado basicamente pelo trato gastrointestinal e pela pele. A degradação das proteínas inicia-se com o processo de proteólise que, na maioria das vezes, é mediado enzimaticamente. Várias enzimas têm a capacidade de degradar as proteínas, algumas delas com ações bem específicas; outras, agindo em sítios comuns a todas as proteínas. Após o processo de degradação das proteínas em aminoácidos, a biossíntese da ureia se dá exclusivamente em processo hepático intracelular, no qual o nitrogênio contido no aminoácido é convertido em ureia por um ciclo enzimático.

A ureia é catalisada pela enzima uréase, formando assim duas amônias e um gás carbônico, como mostra a Figura 9.

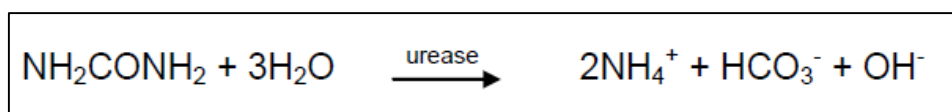


Figura 9- Representa o processo de catalisação da ureia (Massafera, 2010).

O nível normal de ureia em soro é de 8-20 mg/dL, todavia se houver um excesso de ureia no corpo pode ser indícios de uma insuficiência renal, obstrução da área urinária, desidratação e sangramento gastrointestinal. Já a diminuição na concentração de ureia causa fracasso hepático entre outras síndromes (Braga, 2012; Soares, 2011).

A insuficiência renal crônica é uma lesão no órgão com perda progressiva e irreversível da função dos rins, ou seja, é a perda súbita da capacidade dos rins filtrarem resíduos, sais e líquidos do sangue. A principal causa de doenças renais é a hipertensão e o diabetes. Mas, se diagnosticada precocemente e com condutas terapêuticas apropriadas serão reduzidos o sofrimento dos pacientes. Logo, pacientes com insuficiência renal crônica, em programa de hemodiálise são levados a conviver diariamente com uma doença irreversível que obriga a uma forma de tratamento dolorosa e de longa duração (Higa et al., 2008).

Diante disto, há vários relatos de doenças renais e, com isso uma crescente necessidade de diagnóstico rápidos e precisos. Logo há uma grande importância de confeccionar ferramentas analíticas para o monitoramento de ureia em tempo real, com portabilidade, com baixo custo (eliminando o procedimento laboratorial) e rapidez.

3.0- MATERIAIS E MÉTODOS

Toda pesquisa, foi realizada na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO.

3.1- Materiais

- Fita de aço inox (ASTM 301);
- Potássio Antimônio (III) tartarato hidratado – $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot xH_2O$ – PM = 613.83 g/mol – **Sigma Aldrich**;
- Quitosana médio peso molecular (~90% de desacetilação) – Fabricada no Laboratório **Certbio**;
- Ácido Acético Glacial - **Sigma Aldrich**;
- Urease (50 – 100 u/ml) - **Sigma Aldrich**;
- PBS - Tampão fosfato-salino – **Sigma Aldrich**;
- Ureia – PM = 60,06g/mol – CH_4N_2O – **Sigma Aldrich**;
- Glutaraldeído – **Sigma Aldrich**;
- Equipamento de aquisição de dados – **Agilent 34970A**;
- Fonte de tensão 9 (EA-OS 2032-050);
- Creatinina – **Sigma Aldrich**;
- Vidrarias de laboratório: Béquer, balão, vidro de relógio, bastão;
- Balança digital;

3.2- Preparação dos eletrodos de trabalho

Os eletrodos sensor e referência foram construídos de acordo com o seguinte fluxograma (Figura 10), que deve ser seguido para uma melhor compreensão da montagem do eletrodo e para avaliação da imobilização da enzima urease com a quitosana com diferentes números de camadas e composição diferente.



Figura 10 - Fluxograma da imobilização da enzima com quitosana e quitosana/glutaraldeído.

3.2.1- Preparação do suporte do transdutor

Para suporte do biossensor foi escolhido o aço inox, por ser um bom condutor elétrico, relativamente barato e inerte ao analito, com essas características esse suporte vai auxiliar o transdutor na transferência do sinal.

3.2.1.1 Preparação das fitas aço inox

Para a preparação dos eletrodos, o aço inox foi cortado em fitas com dimensões 5mm de largura e 50mm de comprimento, para ser utilizado como suporte de transdução nas etapas subsequentes. Com isso, esse transdutor proporciona baixo custo na produção dos eletrodos, portabilidade, praticidade, boa condutividade e é um material inerte ao analito e as demais camadas presentes no eletrodo. A Figura 11 representa as fitas.

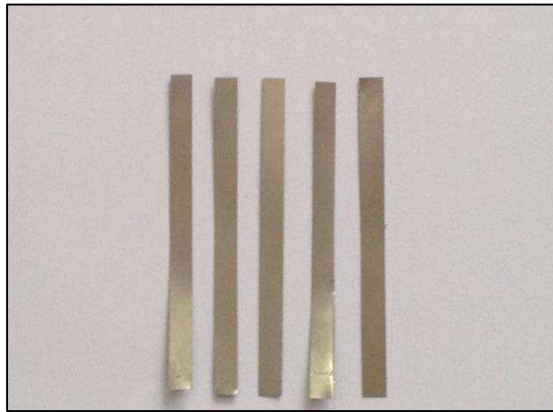


Figura 11- Fitas de aço inox para ser utilizada como suporte de transdução.

3.2.1.2- Preparação do transdutor sobre o suporte

Para uma melhor condução do sinal elétrico, os suportes (fitas de aço inox) foram eletrodepositadas utilizando Potássio de Antimônio(III) Tartarato Hidratado. Para a solução, foram utilizados 2 g de potássio de antimônio(III) tartarato hidratado em 50 ml de água destilada. As fitas foram mergulhadas na solução, cobrindo cerca de 20mm de seu comprimento e em seguida foi aplicado uma diferença de potencial durante 5 minutos, período que o antimônio se eletrodeposite na região desejada formando uma camada de (Sb/Sb_2O_3) . Essa diferença de potencial foi produzida por meio de uma fonte de voltagem, com diferenças de potencial de 4, 6 e 9 volts, adaptado de (Tymecki et al., 2006), como mostra o esquema da Figura 12 e na Figura 13 os transdutores.

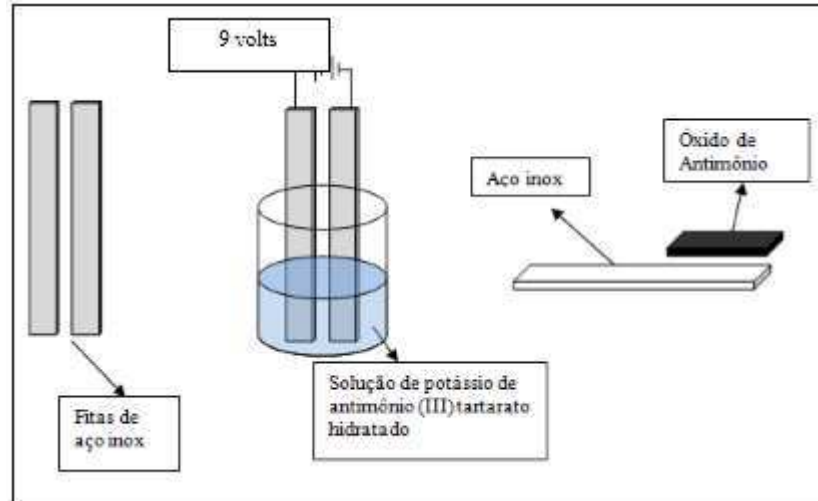


Figura 12- Exemplo da eletrodeposição de antimônio em fitas de aço para a voltagem de 9 volts.

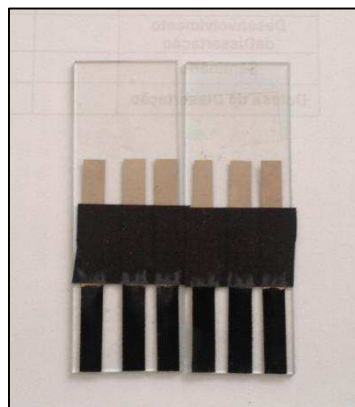


Figura 13- Suporte de aço inox eletrodepositado com antimônio para ser aplicado como transdutor.

Essa eletrodeposição foi realizada para todos os eletrodos, tanto o sensor quanto o de referência, para a preparação do transdutor de sinal. Depois, foi avaliada qual eletrodeposição era mais satisfatória, observando o aspecto superficial dos eletrodos de acordo com a homogeneidade, presença de poros, formação de aglomerados e melhor recobrimento. Em seguida, todos os transdutores passaram por um tratamento térmico em 550°C durante 1 hora, para a formação com óxido de antimônio.

3.2.3- Preparação dos eletrodos sensores

A imobilização da enzima é uma das etapas mais importantes na construção de um eletrodo sensor, pois confere ao sensor uma maior estabilidade operacional e um maior armazenamento do biocomponente, possibilitando assim, uma maior repetibilidade de análises. Essa imobilização consiste em possibilitar o confinamento da enzima em uma matriz, para que não ocorra lixiviação da enzima durante as análises.

A imobilização da quitosana/uréase e quitosana/urease/glutaraldeído foi aplicada apenas para a confecção dos eletrodos sensores, pois os eletrodos referência foram apenas cobertos por membranas de quitosana.

3.2.3.1- Preparação da solução de quitosana

Inicialmente foi preparado uma solução de quitosana (0,5%), onde este polímero encontra-se na forma de pó e é dissolvido em ácido acético (0,1 Mol/L) sob agitação magnética durante 4 horas, depois a solução foi filtrada numa bomba a vácuo para a retirada dos resíduos, adaptado de (Tan et al., 2010).

3.2.3.2- Preparação da solução da enzima urease

Para a solução da enzima urease foi pesado 1,0 mg da enzima e foi dissolvida em 1,0 mL de solução de tampão fosfato de sódio (PBS), adaptado de (Garcia et al., 2007).

3.2.3.3- Preparação da solução de glutaraldeído

Foram preparadas concentrações de glutaraldeído de 0,05%, 0,25%, 0,5%, 1% e 2%, para avaliar a melhor concentração a ser utilizada para imobilizar as camadas de quitosana/urease sobre o suporte. Essas soluções foram aplicadas sobre as membranas, reticulando as mesmas. Logo, foi observado que quase todas as concentrações de glutaraldeído causaram o rompimento nas membranas, após a evaporação do solvente, apenas com a concentração de 0,05% as membranas foram

imobilizadas sem rompimento. Por fim, foi utilizado a concentração 0,05% em todas as camadas dos eletrodos com glutaraldeído.

3.2.3.4- Imobilização da urease sobre o eletrodo sensor

Depois de todas as soluções prontas, foi realizado a imobilização da enzima urease. A solução de quitosana e a solução da enzima urease foi gotejada sobre o eletrodo sensor como mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Montagem do eletrodo sensor com as membranas de quitosana/urease.

Camadas de Enzima	Gotejamento						
1 camada (E1)	Quitosana	Urease	Quitosana				
2 camadas (E2)	Quitosana	Urease	Quitosana	Urease	Quitosana		
3 camadas (E3)	Quitosana	Urease	Quitosana	Urease	Quitosana	Urease	Quitosana

Para uma melhor imobilização da membrana foi realizado estudos com as membranas quitosana/urease/glutaraldeído (Magalhães; Machado, 1998), pois o uso de reticulante pode melhorar a imobilização e aumentar o armazenamento da enzima.

Diante disto, foi utilizado a solução de glutaraldeído (0,05%) para imobilizar as membranas, como mostra a Tabela 2 e o esquema da Figura 14.

Tabela 2- Montagem do eletrodo sensor com as membranas de quitosana/urease/glutaraldeído.

Camadas de Enzima	Gotejamento					
1 camada (E1GA)	Quitosana	Urease	Quitosana	Glutaraldeído (0,05%)		
2 camadas (E2GA)	Quitosana	Urease	Quitosana	Urease	Quitosana	Glutaraldeído (0,05%)

3 camadas (E3GA)	Quitosana	Urease	Quitosana	Urease	Quitosana	Urease	Quitosana	Glutaraldeído(0,05%)
-------------------------	-----------	--------	-----------	--------	-----------	--------	-----------	----------------------

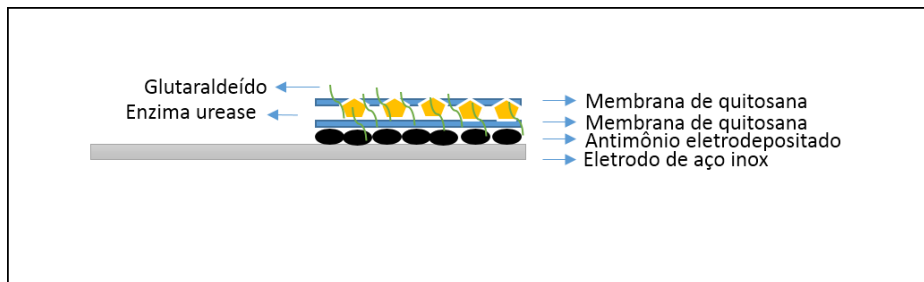


Figura 14- Esquema de confecção do biossensor de ureia com membranas de quitosana/urease/glutaraldeído.

3.2.4- Preparação dos eletrodos referência

Os eletrodos referências foram confeccionados através de gotejamento de quitosana e quitosana/glutaraldeído sobre as fitas de aço eletrodepositadas com antimônio. Nesses eletrodos o gotejamento foi realizado da mesma forma que o eletrodo sensor, só não utilizou a enzima urease, para cada sensor uma referência de acordo com a montagem. Como mostra a Tabela 3.

Tabela 3- Montagem do eletrodo referência.

Camadas	Gotejamento			
1 camada (E1)	Quitosana			
2 camadas (E2)	Quitosana	Quitosana		
3 camadas (E3)	Quitosana	Quitosana	Quitosana	
1 camada (E1GA)	Quitosana	Glutaraldeído 0,05%		
2 camadas (E2GA)	Quitosana	Quitosana	Glutaraldeído 0,05%	
3 camadas (E3GA)	Quitosana	Quitosana	Quitosana	Glutaraldeído 0,05%

3.2.5- Preparação das soluções para os testes de bioresposta dos biossensores

Para realização dos testes de bioresposta, foi preciso a preparação de soluções em várias concentrações de ureia. Para os testes de seletividade e especificidade da enzima urease foi preparada uma solução de creatinina.

3.2.5.1- Solução de ureia

As soluções de ureia foram preparadas em várias concentrações de 0,01 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,5 M, 1,0 M e 1,5 M. Como foi utilizado 50 ml da solução tampão de PBS para dissolver a ureia, então foram pesados os seguintes valores de concentrações (0,03 g, 0,15 g, 0,3 g, 1,5 g, 3,0 g e 4,5 g) de ureia cada um em um recipiente para medição do biossensor. Essas concentrações foram utilizadas para avaliar as curvas de bioresposta dos sensores, verificando assim a efetividade da imobilização da enzima urease sobre o eletrodo sensor. Também, foi preparada uma solução de ureia com 4,0 M para a análise de sensibilidade enzima urease no eletrodo sensor com melhor performance nas medidas.

3.2.5.2- Solução de creatinina

A solução de creatinina foi preparada em uma concentração de 4,0 Mol/L, onde foi pesado 4,52 g em 10 ml de solução tampão de PBS, para a análise de seletividade e especificidade da enzima urease no eletrodo sensor.

3.3- Caracterizações dos eletrodos

3.3.1- Microscopia Óptica (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 dos suportes eletrodepositados com diferentes voltagens foram obtidas com diferentes magnificações, para observar o aspecto e homogeneidade das superfícies.

Já as micrografias das membranas de quitosana/urease e quitosana/urease/glutaraldeído sobre o eletrodo, foram obtidas com magnificações de 350x, 1050x e/ou 2000x, como também os eletrodos referências sem a enzima, só com a quitosana. Foram avaliados os tipos de imobilização da enzima com diferentes números de camadas, como descritas na metodologia de montagem das membranas.

3.3.2 - Microscópio Eletrônico 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 com e sem glutaraldeído, como também os eletrodos referências sem a enzima, só com a quitosana. Foram avaliados, as imobilizações da enzima urease observando a morfologia das membranas sobre os eletrodos.

3.3.3- Difração de Raios X (DRX)

A caracterização por DRX foi realizada com o objetivo de determinar as fases cristalinas presentes e o tamanho de cristalitos. As análises de difração de raios X foram conduzidas a temperatura ambiente em aparelho XRD-7000 Shimadzu, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), tensão de 40kV e corrente 30mA, examinados com ângulo de incidência fixo em 5 graus em um intervalo de 2θ entre 25,0 e 80,0 graus a uma velocidade de varredura de $2\theta/\text{min}$.

O DRX foi obtido para verificar a presença do óxido de antimônio (Sb_2O_3 e/ou Sb_2O_5) nas fitas de aço eletrodepositadas e nas fitas que foram submetidas ao tratamento térmico.

3.3.4– Caracterizações de bioresposta em termos de corrente (A)

A bioresposta dos eletrodos sensores foram obtidas medindo a corrente em função da concentração de ureia (M), ou seja, com a variação da concentração de

ureia há uma variação de corrente, formando assim uma curva de calibração do biossensor. Para a obtenção da corrente foi montado um circuito composto por uma fonte de voltagem, um aparelho de aquisição de dados e os eletrodos (sensor e referência), como mostra a Figura 15 que representa o esquema do circuito para a avaliação dos biossensores em termos de corrente (A). O circuito funciona com a aplicação de uma voltagem fixa no eletrodo e leitura da corrente gerada. Dessa forma, uma variação de corrente estará condicionada a uma variação de concentração de ureia na solução. Para a escolha da voltagem mais adequada foram realizados testes utilizando apenas um tipo de eletrodo sensor e uma concentração, com isso foi avaliado a melhor voltagem para realizar os ensaios de bioresposta amperiométrica.

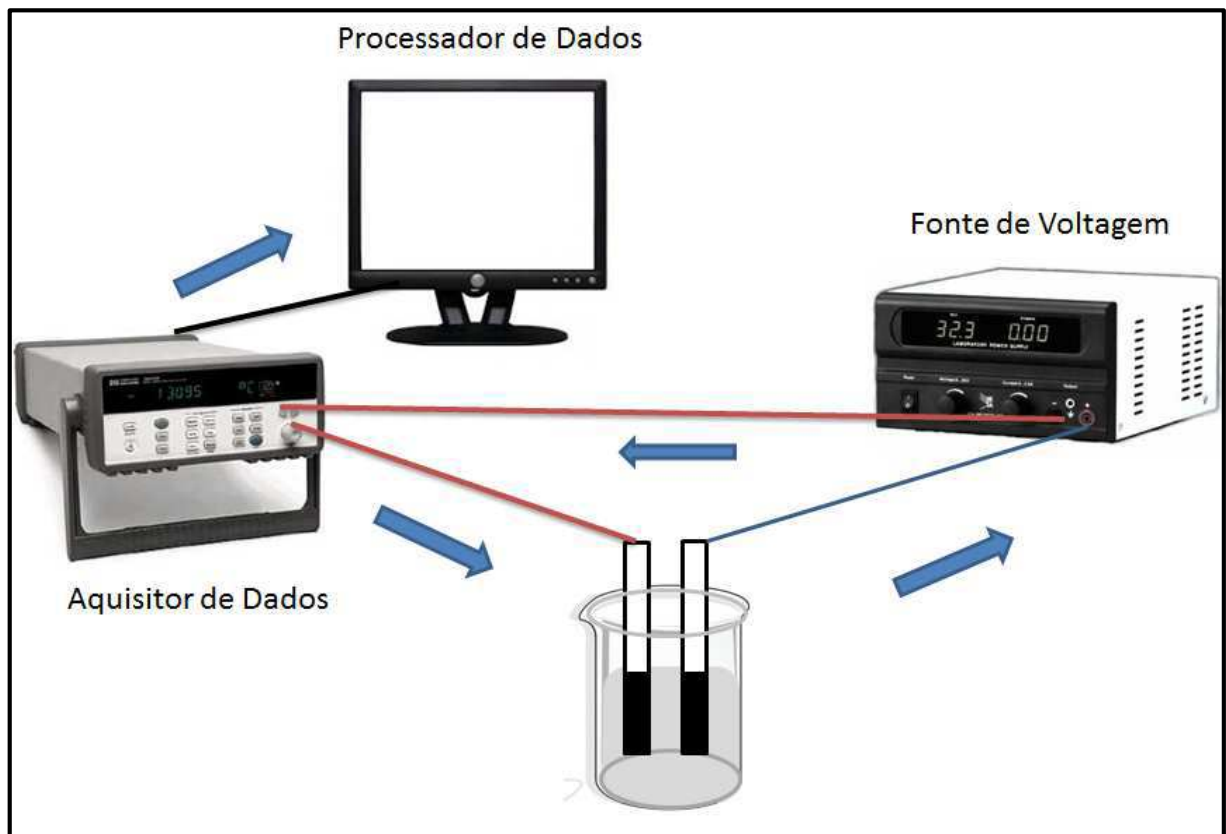


Figura 15- Esquema do circuito para medição amperiométrica das concentrações de ureia.

Essas biorespostas são fundamentais para a avaliação da efetividade da enzima imobilizada com quitosana e quitosana/glutaraldeído, pois os eletrodos devem apresentar características de biossensores em termos de bioresposta, como estabilidade, tempo de resposta, faixa de linearidade, sensibilidade, seletividade, especificidade e repetibilidade do eletrodo sensor, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4- Características de biossensores.

Estabilidade	Corrente (mA) X Tempo (s)	A estabilidade é considerada um dos fatores essenciais na performance de um biossensor, podendo variar de acordo com a geometria do sensor, com o método de preparação, com o receptor e o transdutor. Condições operacionais como concentração do analito, contato contínuo ou esporádico do biossensor com a solução do analito, temperatura, pH, presença de solventes orgânicos e composição da matriz da amostra, interferem na resposta do biossensor (Andrade, 2006).
Tempo De Resposta	Corrente (mA) X Tempo (s)	Quanto menor o tempo necessário para que uma variação na concentração do analito seja mensurada como uma variação no sinal de saída do biossensor, mais rápida será sua resposta. Uma série de fatores determina a velocidade do biossensor, incluindo o pH da solução, cinética das reações, difusão do substrato na solução, como também propriedades físicas e o tamanho relativo do biossensor (Andrade, 2006).
Faixa De Linearidade	Corrente (mA) X Concentração de ureia (M)	A faixa de linearidade do biossensor tem que apresentar resultados constantes desde a concentração nula até a concentração máxima de substrato que possa ser fisicamente dissolvida no meio de medida. Na prática, a região de linearidade é normalmente restrita a um determinado intervalo de concentrações de substrato (Barbosa, 2008).
Sensibilidade	Corrente (mA) x Tempo (s)	A sensibilidade é determinada pela relação entre o sinal de saída (sinal elétrico) e o sinal

	<p>de entrada (sinal biológico) no transdutor. Comumente, acontece na alteração de concentração de um correagente ou de um coproduto com uma reação química, com isso são medidos os substratos de interesse (o analito), que deverá em seguida ser relacionado diretamente com as espécies químicas detectadas através de estequiometria adequada (Barbosa, 2008).</p>
<p>Seletividade Corrente (A) X Tempo (s)</p>	<p>A seletividade é capacidade que o biossensor tem de diferenciar a molécula de interesse na presença de outras moléculas ou impurezas. Essa característica está relacionada com a especificidade do biossensor, assim quanto mais específico o biossensor, maior será a sua seletividade (Furtado et al., 2008).</p>
<p>Especificidade Corrente (A) X Tempo (s)</p>	<p>A especificidade do biossensor está ligado diretamente entre o biocomponente e o analito alvo, quanto mais específico for esse biocomponente do analito, maior será a seletividade e sensibilidade do sensor.</p>
<p>Repetibilidade Corrente (A) X Tempo (s)</p>	<p>A repetibilidade é a capacidade que o biossensor tem de detectar resultados semelhantes, sem que perca a confiabilidade nas biorespostas, com o mesmo biossensor sendo utilizado várias vezes (Alqasaimh et al., 2007).</p>

A *estabilidade* e o *tempo de resposta* foram avaliados através da corrente versus tempo, isso para cada eletrodo sensor. Já a *faixa de linearidade* foi avaliada através da concentração de ureia versus corrente, observando as curvas de acordo com a mudança de concentração. O teste de *sensibilidade* da enzima foi realizada com a escolha de um eletrodo e uma concentração de ureia (E2-GA e a concentração 0,1Mol/L), sendo realizado uma cronoanálise adicionando a cada 100 segundos alíquotas (de 50 µL) de ureia (concentração de 4,0Mol/L) na solução durante as

medidas, para verificar a sensibilidade do sensor imobilizado. A *seletividade* e a *especificidade* foram avaliadas através de ensaios com corrente versus tempo, de forma semelhante com o teste anterior. Foi utilizado um sensor e uma concentração que apresentava boa resposta (E2-GA e a concentração 0,1Mol/L), logo o sensor foi submetido a uma corrente de 0,5V e durante a medição foi adicionado a cada 50 segundos, alíquotas de 50 µl de creatinina na solução, para observar se seletividade e especificidade do sensor/e ou/urease na presença de outra substancia (creatinina). Para a *repetibilidade* foi escolhido apenas uma concentração (0,1Mol/L), onde foi avaliado através das medições de corrente versus o tempo, onde esse eletrodo por 5 medições sucessivas, para observação da coerência entre os resultados de biorespostas.

4.0- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos em preparação dos suportes, avaliação da imobilização da enzima urease com quitosana e quitosana/glutaraldeído através de microscopia e as medições de corrente gerada no teste de biossensores, para mostrar a efetividade da enzima imobilizada.

4.1- Caracterizações dos suportes

4.1.1- Microscopia óptica dos suportes eletrodepositados

Uma boa eletrodeposição confere ao eletrodo maior confiabilidade nos resultados, pois é o transdutor que converte o sinal biológico em sinal elétrico. Então, foi realizado um estudo prévio das eletrodeposições de antimônio, que consiste na verificação da influência da voltagem aplicada na eletrodeposição das fitas de aço inox. A diferença de voltagem e a distância do eletrodo implica na variação da morfologia do revestimento do sensor. Para isto, foram realizadas análises de microscopia óptica para avaliar a superfície da eletrodeposição do antimônio nos eletrodos e, verificar a melhor cobertura e homogeneidade, em relação ao tipo de voltagem que foi aplicada (4, 6 e 9 volts). A Figura 16 apresenta as micrografias superficiais dos revestimentos de antimônio para cada condição de eletrodeposição.



Figura 16- Superfície do eletrodo com eletrodeposição em diferentes voltagens, com o aumento de 1050x: a) com 4 volts; b) com 6 volts e c) com 9 volts.

Na Figura 16 a), verificamos que o recobrimento de antimônio não foi uniforme, já na b), houve uma melhora no recobrimento, mas teve regiões que não ficou homogênea. Mas a imagem c), observa-se que a superfície que foi eletrodepositada com 9 volts obteve uma camada homogênea, compacta, sem a presença de trincas e

com uniformidade satisfatória, quando comparadas com as outras superfícies de 4 e 6 volts. Portanto, foi determinado a utilização de 9 volts para realizar eletrodeposições nas fitas de aço inox. Observa-se na Figura 17, a superfície do eletrodo (de 9 volts) em magnificações menores de 100x e 350x, onde apresenta uma estrutura rugosa de partículas de antimônio.

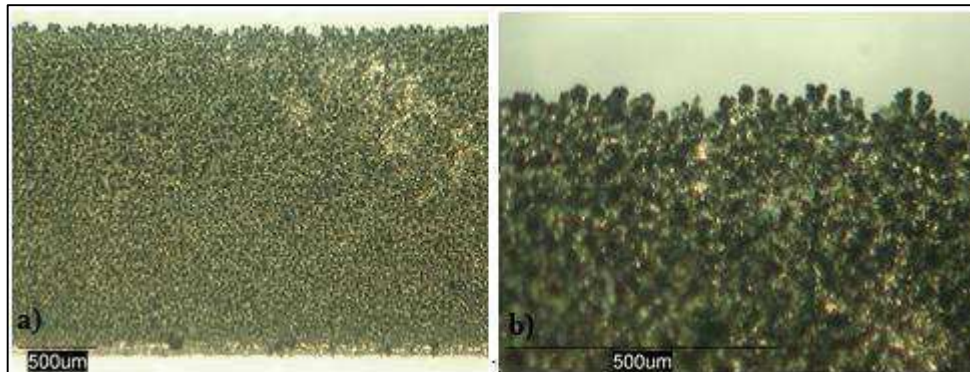


Figura 17- Superfície de um eletrodo eletrodepositado com antimônio sob uma voltagem de 9 volts, com aumento de a) 100x e b) 350x.

Essa superfície com estrutura rugosa promove à fita de aço inox uma melhor adesão e maior fixação das camadas subsequentes na construção do biossensor, onde essas camadas são compostas pela imobilização de quitosana/urease ou quitosana/urease/glutaraldeído. Contudo, foi determinado a utilização de 9 volts para a eletrodeposição do antimônio nos suportes de fitas de aço inox, para ser aplicado como transdutor do biossensor.

4.1.2- Difração de raios X dos suporte eletrodepositado

Para a verificação da estrutura cristalina formada na eletrodeposição de antimônio sobre o suporte de transdução, foi realizado um ensaio de difração de raios X. Na Figura 18, o difratograma mostra picos de reflexão (0 2 1), (1 0 4), (1 1 0) e (2 0 2) referentes a presença de uma única fase de antimônio (Sb) com simetria romboédrica e grupo espacial $R-3m$. Esse resultado é bastante importante, visto que a literatura de Barrett et al., 1963, versa que nessa metodologia usada para eletrodeposição, teríamos a formação do óxido de antimônio. O mesmo pode estar sendo formado, mas em camadas superficiais e muito delgadas, ou seja, não sendo possível sua detecção por DRX.

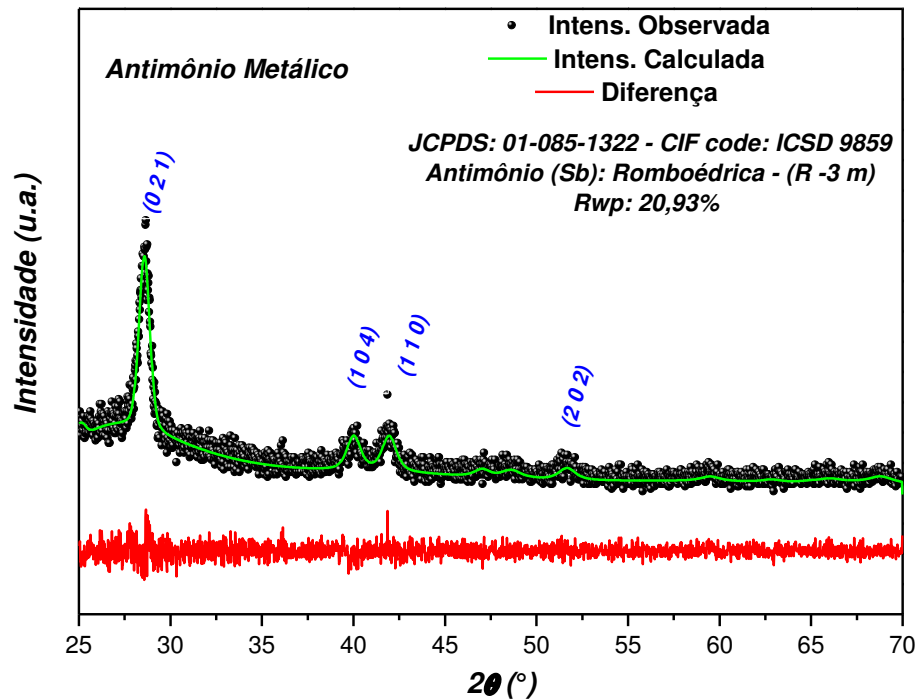


Figura 18- Difração de raios-X do suporte de aço inox eletrodepositado com antimônio.

As fitas de aço eletrodepositadas com antimônio foram submetidas a um tratamento térmico e em seguida a ensaios de DRX, onde foi observado no difratograma (Figura 19) do óxido de antimônio (Sb_2O_3) de simetria ortorrômbica e grupo espacial de Pccn (Svensson, 1974). Também foi observado a presença de óxido de antimônio (Sb_2O_5) de simetria cúbica e grupo espacial Fd-3m (Dehlinger, 1928). Portanto, é possível verificar que há a formação do óxido de antimônio após o tratamento térmico nos suportes eletrodepositados com antimônio, melhorando assim a transdução de elétrons no biossensor.

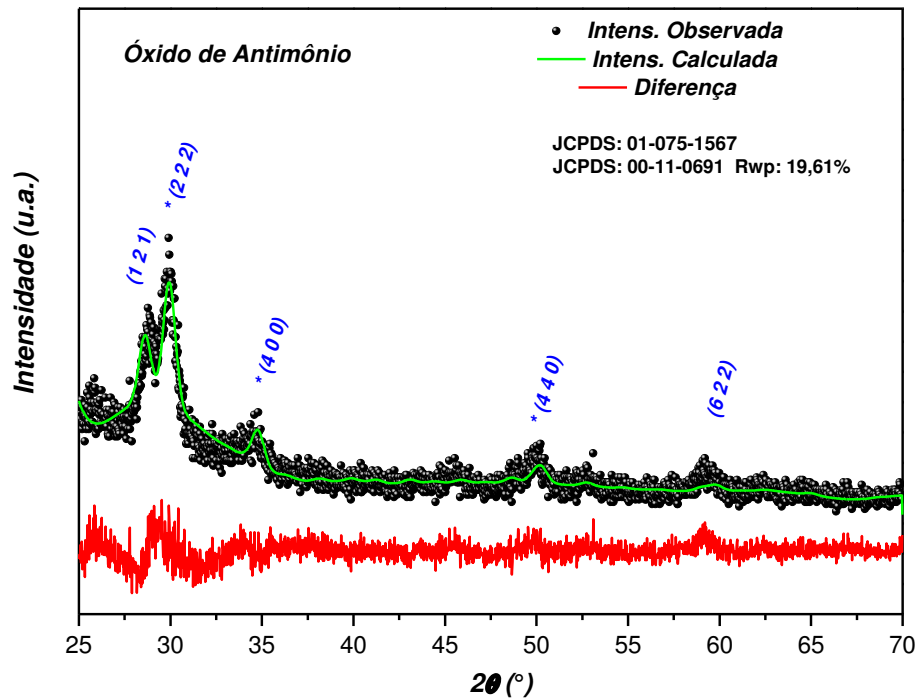


Figura 19- Difração de Raios-x do suporte de aço inox eletrodepositado com antimônio após tratamento térmico.

Todos os transdutores utilizaram o suporte de fita de aço inox eletrodepositados após o tratamento térmico, pois a presença do óxido de antimônio no suporte transdutor, melhora a transmissão do sinal elétrico para o processador de dados.

4.2- Caracterizações dos eletrodos sensores

4.2.1- Microscopia óptica das membranas imobilizadas nos transdutores

As imagens obtidas por microscopia óptica estão exibidas na Figura 20, são referentes as membranas imobilizadas com quitosana/urease sobre o suporte transdutor com diferentes números de camadas, onde é possível verificar que a membrana com 1 camada apresenta uma superfície porosa, homogênea e rugosa, sem muitos aglomerados. Logo, eletrodos com 1 camada de enzima foram imobilizados com poucas membranas de quitosana, consequentemente pouca cobertura do suporte transdutor. Já com o aumento do número de camadas quitosana/uréase é possível observar que há formação de aglomerados e diminuição

de poros nas amostras com 2 e 3 camadas. A porosidade na imobilização pode ser interpretada de maneira positiva, pois confere ao eletrodo melhor permeabilidade na reação entre o analito, à enzima e o eletrodo.

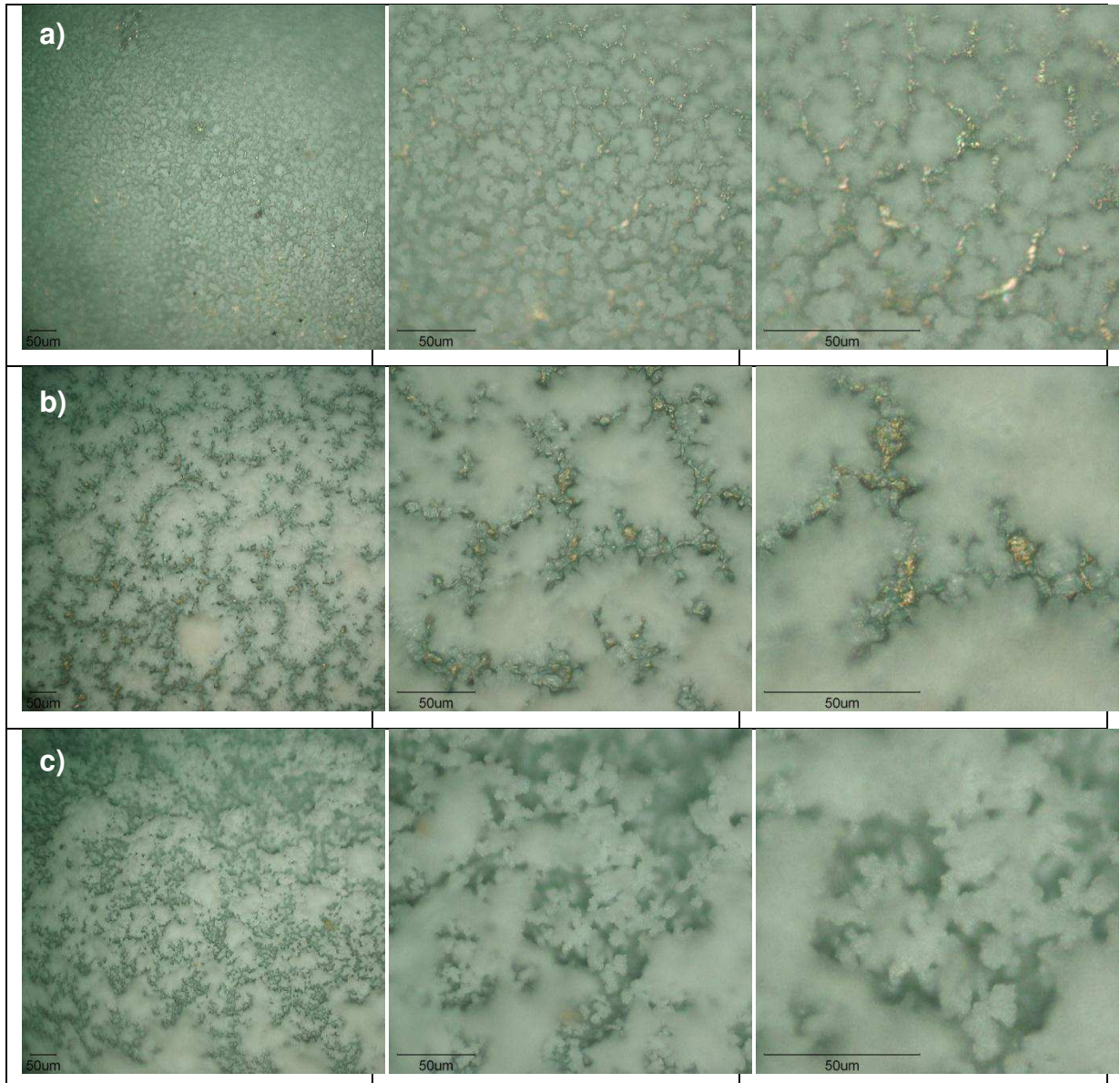


Figura 20- Microscopia óptica dos eletrodos sensor (quitosana/urease) com magnificação de 350X, 1050X e 2100X, onde a) é o eletrodo com uma camada de enzima imobilizada com quitosana, b) com duas e c) com três camadas.

Na Figura 21, observamos micrografias das membranas imobilizadas com quitosana/urease/glutaraldeído no suporte transdutor com diferentes números de camadas. Nas imagens com 1, 2 e 3 camadas com a presença do reticulante, o glutaraldeído, não foi possível avalia-las visualmente, pois todos os eletrodos apresentaram membranas com muitos aglomerados, poros e uma superfície

heterogênea. A presença do glutaraldeído proporciona a membrana, uma superfície esponjosa que protege a enzima de lixiviação quando submetida a reação, o que possivelmente seja responsável por uma maior repetibilidade do biossensor.

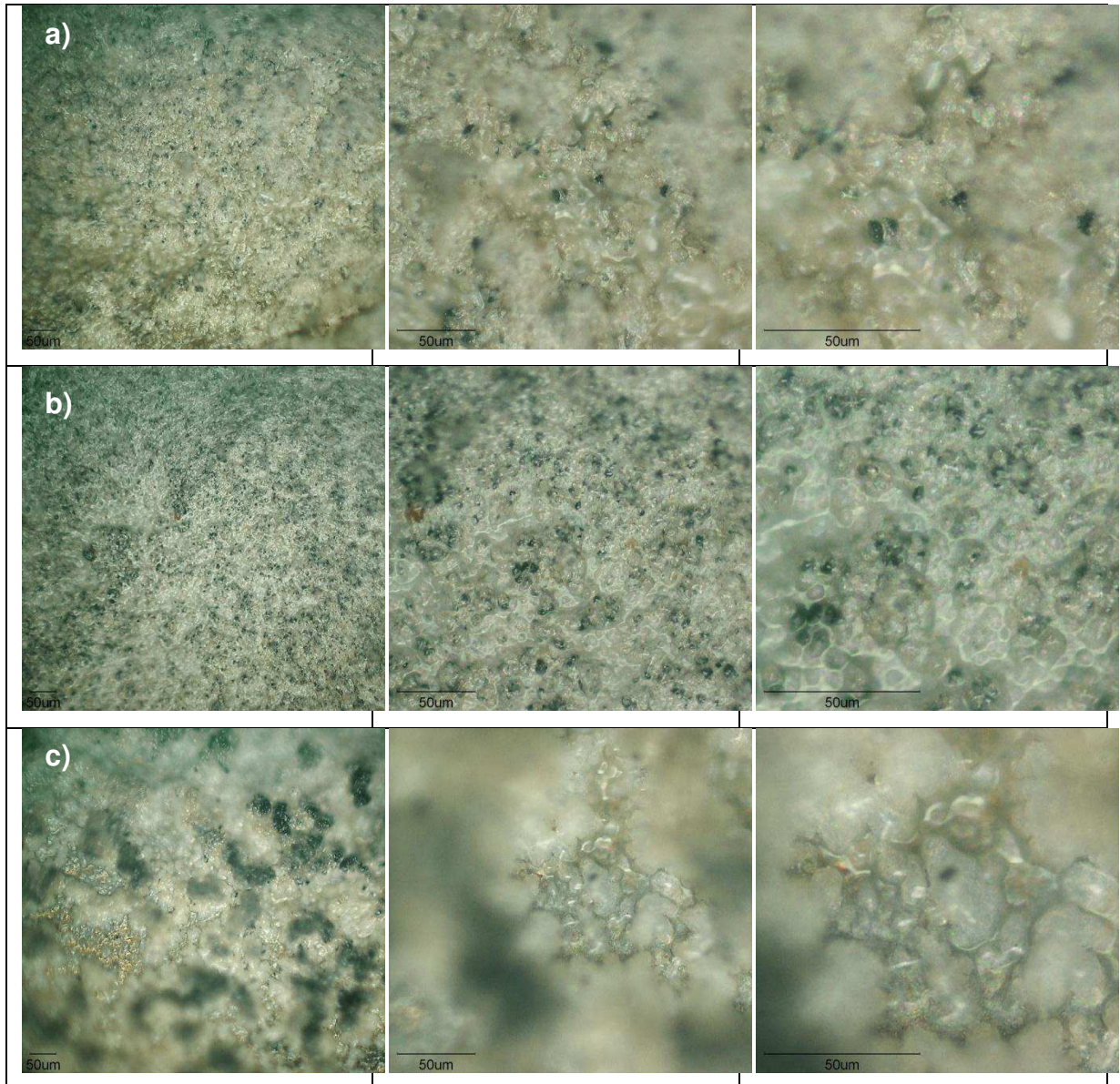


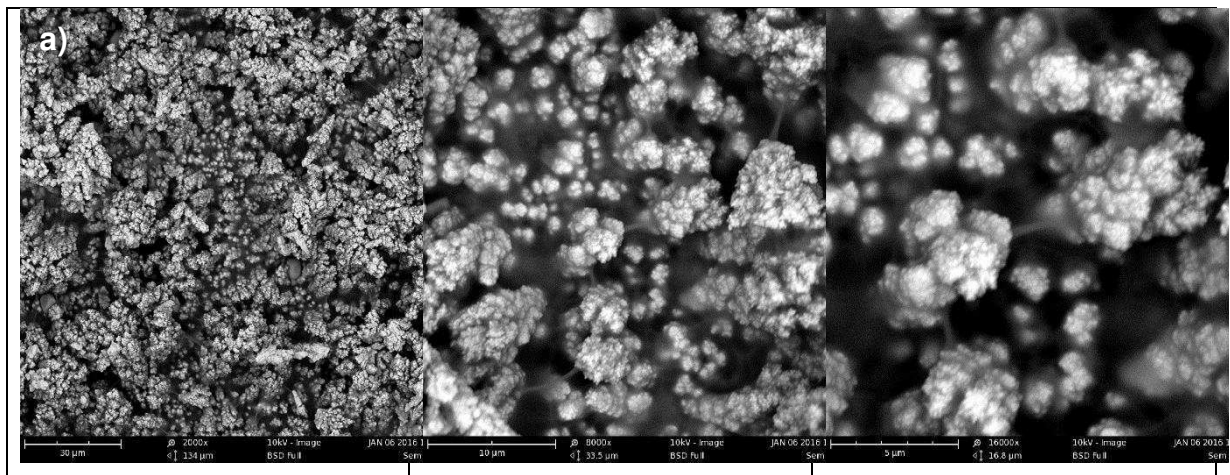
Figura 21- Microscopia óptica dos eletrodos sensor (quitosana/urease/glutaraldeído) com magnificação de 350X, 1050X e 2100X, onde a) é o eletrodo com uma camada de enzima imobilizada com quitosana e glutaraldeído, b) com duas camadas de enzimas e c) com três camadas de enzimas.

Através das imagens de MO é possível observar a presença da membrana sobre a camada de antimônio eletrodepositado no suporte transdutor, e além do mais, a formação de aglomerados nas membranas é causada pelos aglomerados da eletrodeposição, pois é possível constatar que com o aumento do número de camadas

esses aglomerados aumentam. É certo que, a enzima urease esteja imobilizada nessa membrana de quitosana e quitosana/glutaraldeído e, com isso, esses aglomerados estão aprisionando as partículas de enzima de maneira desordenada e o ideal seria uma distribuição uniforme, podendo afetar a atividade da mesma.

4.4- Microscopia Eletrônica de Varredura dos eletrodos imobilizados

As imagens obtidas por MEV, mostradas na Figura 22, tratam-se das membranas de quitosana imobilizando a urease sobre o transdutor, onde é possível observar que a superfície do eletrodo com apenas 1 camada de enzima Figura 22 (a), encontram-se com menos aglomerados, mais espaços vazios e com uma melhor homogeneidade quando comparada com as outras membranas de 2 e 3 camadas na Figura 22 (b) e (c), respectivamente. As membranas formadas de quitosana/urease com várias camadas possibilitam uma melhor adesão do elemento biológico à matriz polimérica imobilizadora, o que permite um melhor armazenamento da enzima imobilizada, favorecendo assim uma maior repetibilidade do sensor. Como também, permite que o eletrodo tenha uma melhor resposta de sensibilidade com a ureia, pois a enzima urease encontra-se em maior quantidade.



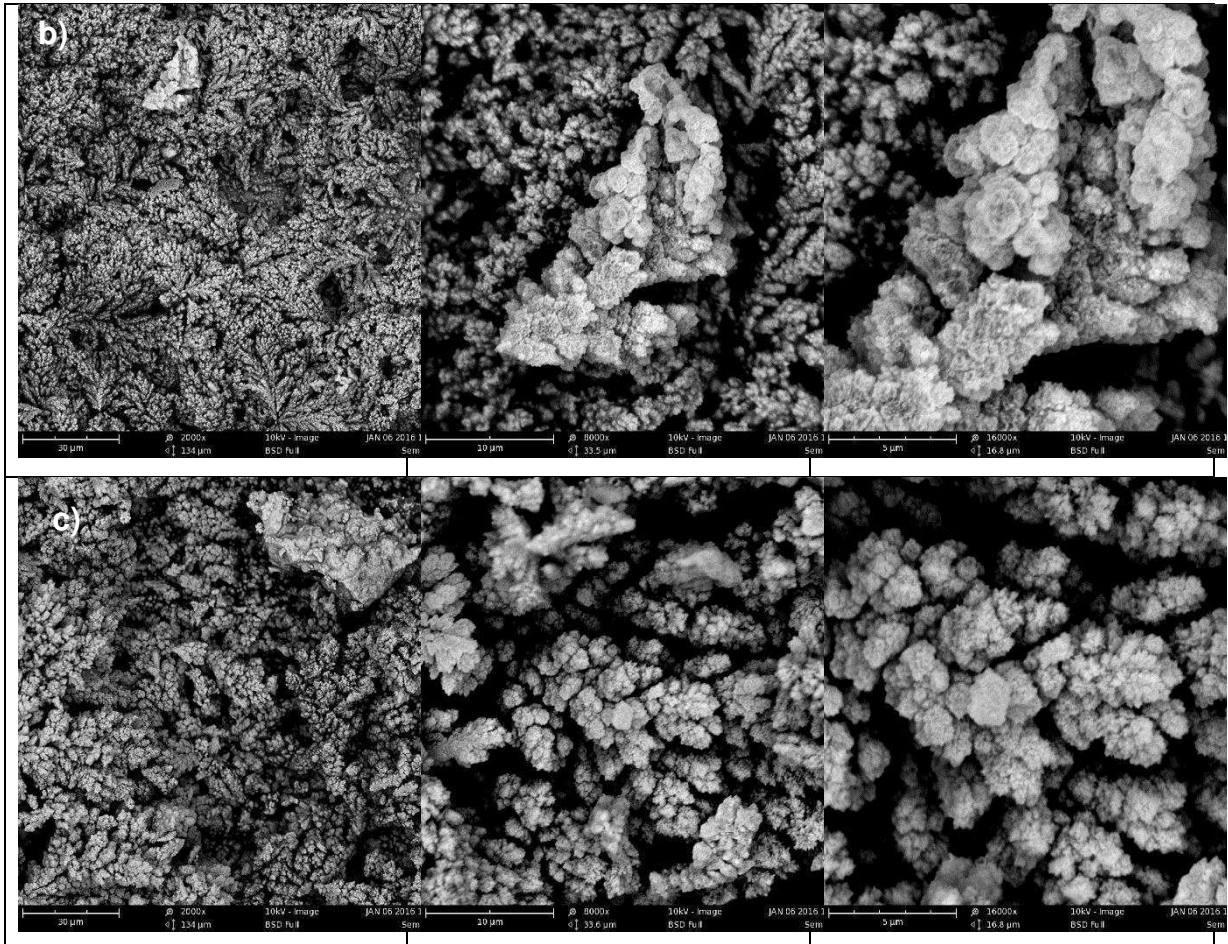


Figura 22- Imagens obtidas por MEV para as membranas de quitosana/urease sobre o suporte transdutor, onde a) é o eletrodo com 1 camada de enzima, b) 2 camadas e c) 3 camadas, com a magnitude de 2000x, 8000x e 16000x.

Na Figura 23 é possível verificar as membranas de quitosana/urease/glutaraldeído sobre o suporte transdutor, onde apresentam a mesma morfologia das amostras sem a presença do glutaraldeído nas membranas. Observa-se que as membranas com 1 camada se comportam da mesma forma que a da Figura 23 (a), de maneira semelhante as membranas com 2 e 3 camadas de enzima. Mas, a presença do reticulante, o glutaraldeído, acarreta em uma imobilização de ligação cruzada, que mesmo não sendo diferenciada pela caracterização morfológica, o glutaraldeído melhora as características de resposta do biossensor, pois diminui a chance de lixiviação da enzima durante o uso do sensor e, conseqüentemente, temos um tempo de vida mais longo para enzima. Como relata (Magalhães; Machado, 1998) e (Tan et al., 2010) em seus trabalhos.

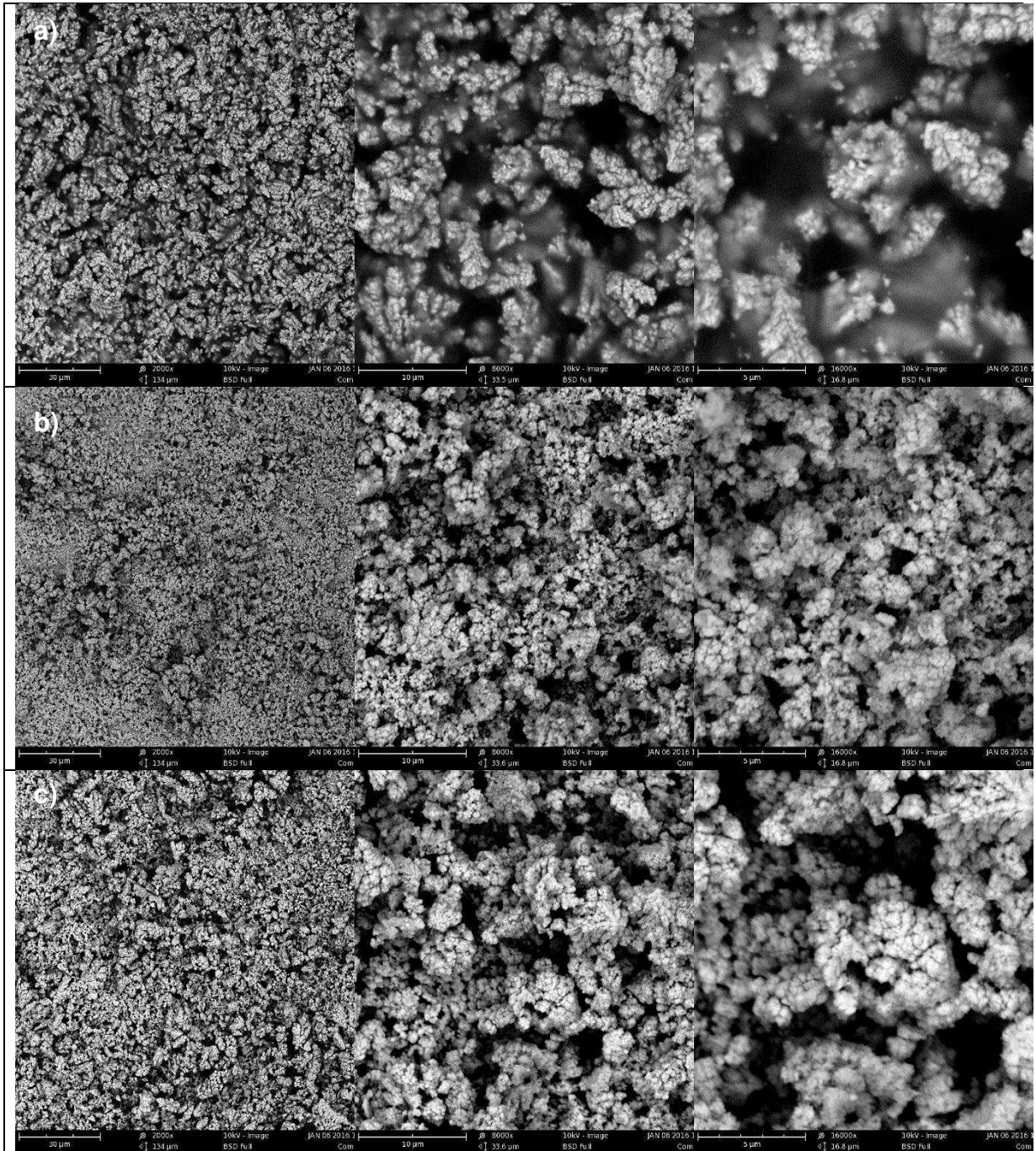


Figura 23- Imagens obtidas por MEV para as membranas de quitosana/urease/glutaraldeído sobre o suporte transdutor, onde a) é o eletrodo com 1 camada de enzima, b) 2 camadas e c) 3 camadas, com a magnitude de 2000x, 8000x e 16000x.

Os resultados de microscopia eletrônica de varredura completam os da microscopia óptica, onde é possível observar nas membranas de quitosana/urease e quitosana/urease/glutaraldeído, os poros, as rugosidades e a presença dos aglomerados nos eletrodos, mas a distribuição das partículas da enzima não foi possível visualizar pela microscopia. Os aglomerados e a heterogeneidade das superfícies dos eletrodos sensor, pode promover incerteza nas biorespostas quando

o eletrodo for submetido a medição, pois a distribuição da enzima urease no eletrodo pode modificar o resultado da leitura, por isso, a importância de uma boa homogeneidade na superfície. Segundo Holanda et al., 2014, a membrana pura de quitosana é uniforme, lisa, plana e sem a presença de poros visíveis. Portanto, o aparecimento dos poros e a pouca uniformidade dos eletrodos com membrana de quitosana devem aos aglomerados das partículas de antimônio presente no transdutor e, é provável que as membranas de quitosana imobilizando a enzima aumente os aglomerados por conta das partículas da urease.

4.5- Caracterização dos biossensores através de bioresposta

Após a escolha do suporte, da eletrodeposição de antimônio (com 9 volts), da imobilização da enzima urease com a quitosana e quitosana/glutaraldeído, os biossensores foram caracterizados através de bioresposta amperiométrica, para avaliar suas propriedades e confirmar a efetividade da imobilização da enzima. As caracterizações da bioresposta foi subdivididas em tempo de resposta, faixa de linearidade, estabilidade, sensibilidade, seletividade, especificidade e repetibilidade, para atender as características preconizadas a biossensores. Para dar início as caracterizações das biorespostas, foi avaliado o melhor potencial a ser aplicado ao circuito.

Teste de Potencial

Na Figura 24, podemos observar as curvas de voltagens que foram aplicadas no circuito para esse teste e, verificamos que para o potencial de 1,5 V o eletrodo atinge resultados de corrente elevados, mas com um nível de ruído elevado e consequentemente muita instabilidade. Para o teste realizado com o potencial de 1,5V observou-se a degradação de todo o eletrodo dentro da solução, portanto, incapacitando o uso de 1,5 V de potencial. Para a voltagem potencial de 1,0 V, percebe-se que o eletrodo fornece um sinal ruidoso, além de valores de corrente crescerem com o tempo de medição, como pode ser visto no inserte da Figura 24. Já, o potencial de 0,5 V, apresentou uma boa densidade de corrente, sem variações significativas da corrente em função do tempo, exibindo uma satisfatória estabilidade

de resposta. O teste com o potencial de 0,2 V, não apresentou corrente, ou seja, que não houve resposta do sensor em termos de corrente.

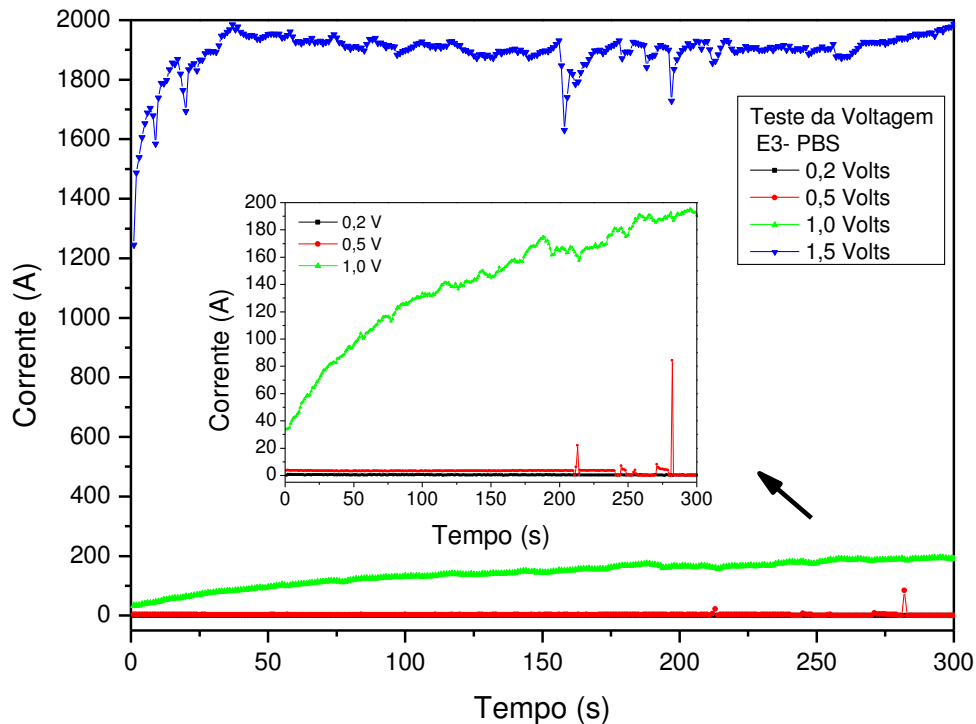


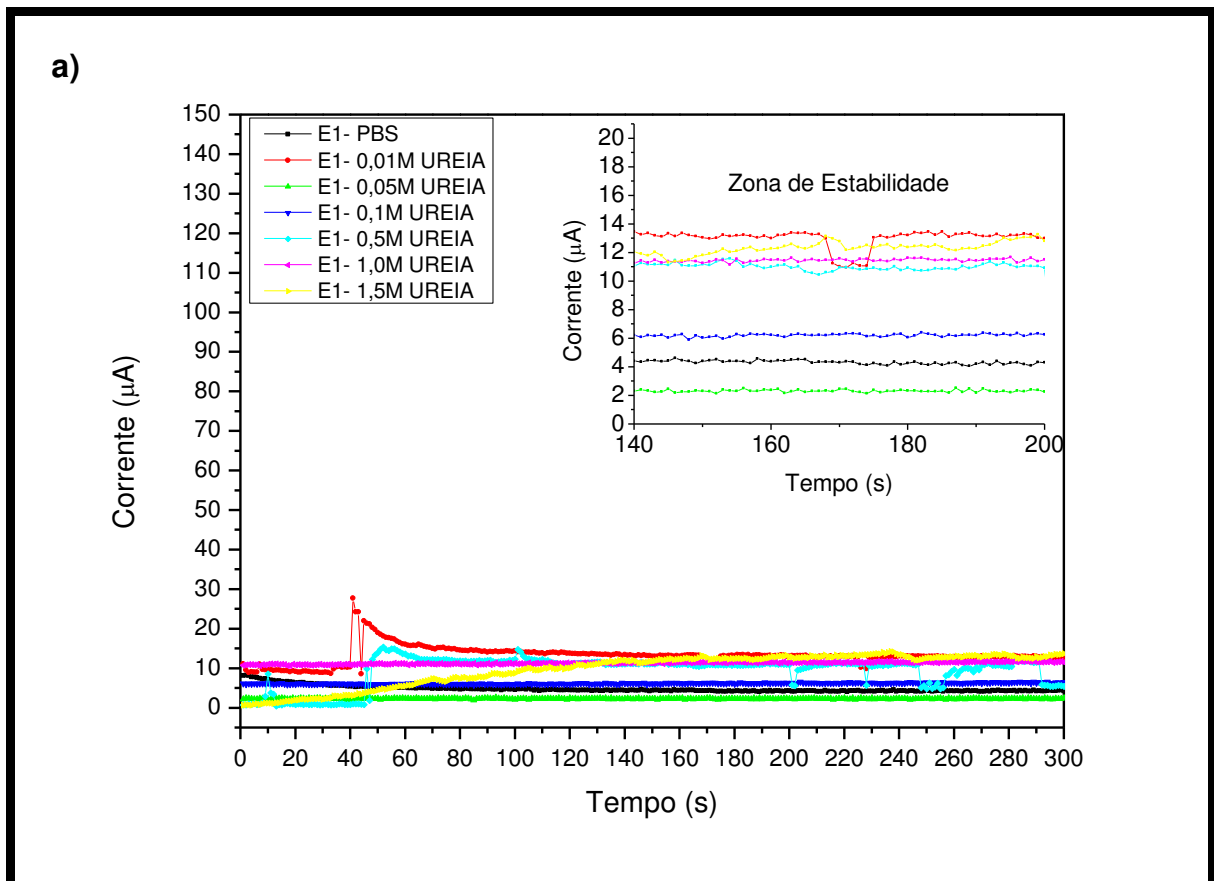
Figura 24- Gráfico do teste de voltagem, onde mostra os quatro tipos de potencial utilizado, 0,2V, 0,5V, 1,0V e 1,5V, respectivamente.

Diante das curvas obtidas no teste de voltagem, foi escolhida a utilização da voltagem 0,5 V. Muitos estudos como Hao et al., 2015, Massafra; Torresi, 2011, Garcia et al., 2007, Gabrovská et al., 2011, entre outros, também realizaram testes de potencial, antes de definir a melhor voltagem para obter a corrente de acordo com o tipo de biossensor.

Teste de Tempo de Resposta e Estabilidade do Sensor

Os biossensores foram submetidos a um potencial de 0,5 V fixo, para medição das biorespostas em termos de corrente, produzida a partir do produto da reação eletroquímica da enzima urease com a variação de concentração do analito ureia, ou seja, para cada concentração de ureia uma corrente específica (Massafra; Torresi,

2011b). Na Figura 25, podemos observar as curvas que foram plotadas a partir das biorespostas dos sensores sem o reticulante glutaraldeído. Na Figura 25 a), o eletrodo sensor com 1 camada de enzima urease e sem glutaraldeído, apresentou um tempo de resposta de aproximadamente 140 segundos, onde em todas as curvas foi possível verificar que há uma estabilidade de resposta entre 140 s à 200 s, pois depois dos 200 s o eletrodo apresenta uma desestabilidade, onde é possível observar alguns ruídos em determinadas concentrações. Na Figura 25 b), é possível observar as curvas de biorespostas do eletrodo com 2 camadas de enzima urease, no qual apresenta um tempo de resposta de 150 segundos e uma faixa de estabilidade entre 150 s à 300 s. Já o biossensor com 3 camadas de enzima urease (Figura 25 (c)), obteve um tempo de resposta de 70 s e uma faixa de estabilidade entre 70 s à 160 s.



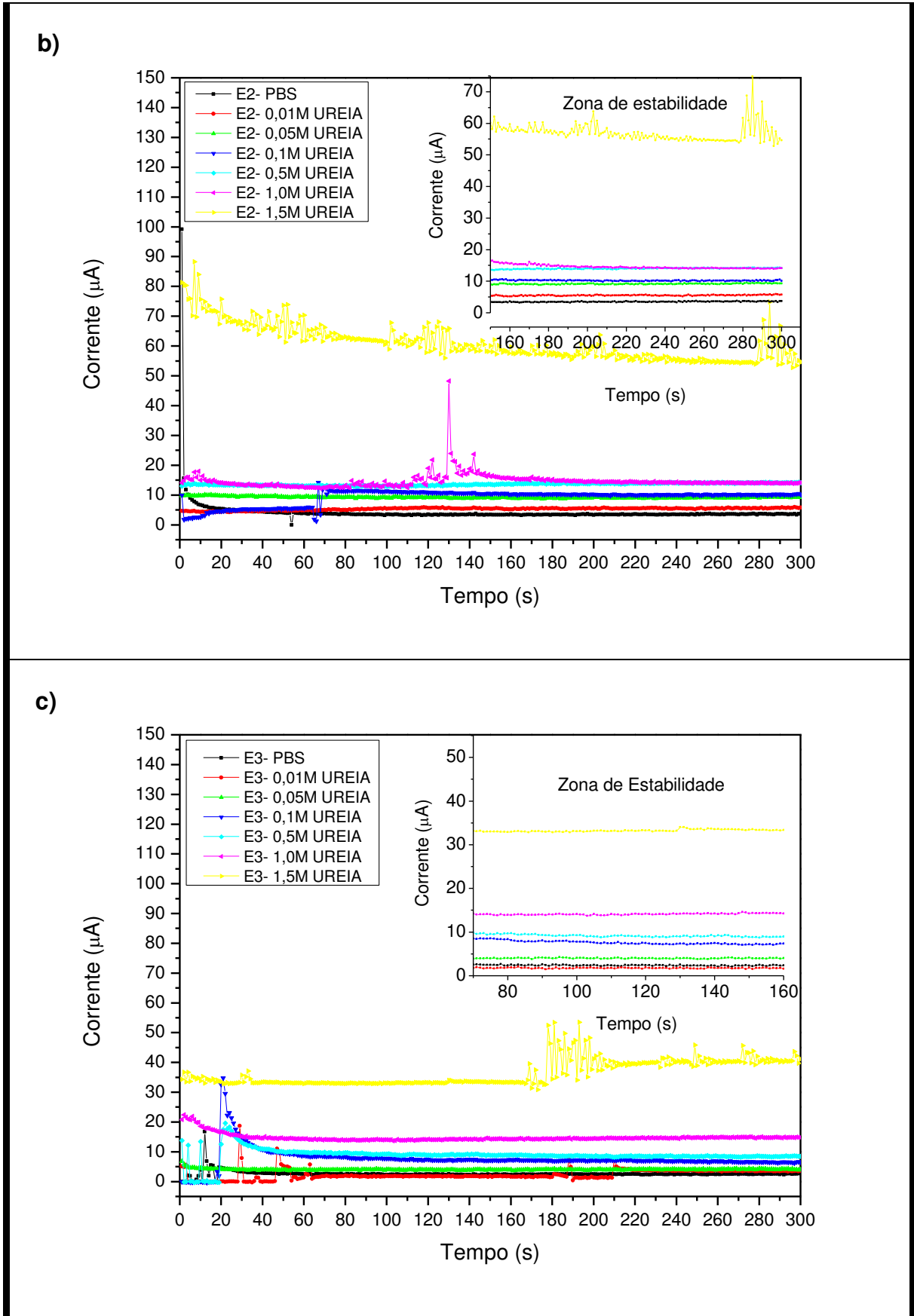
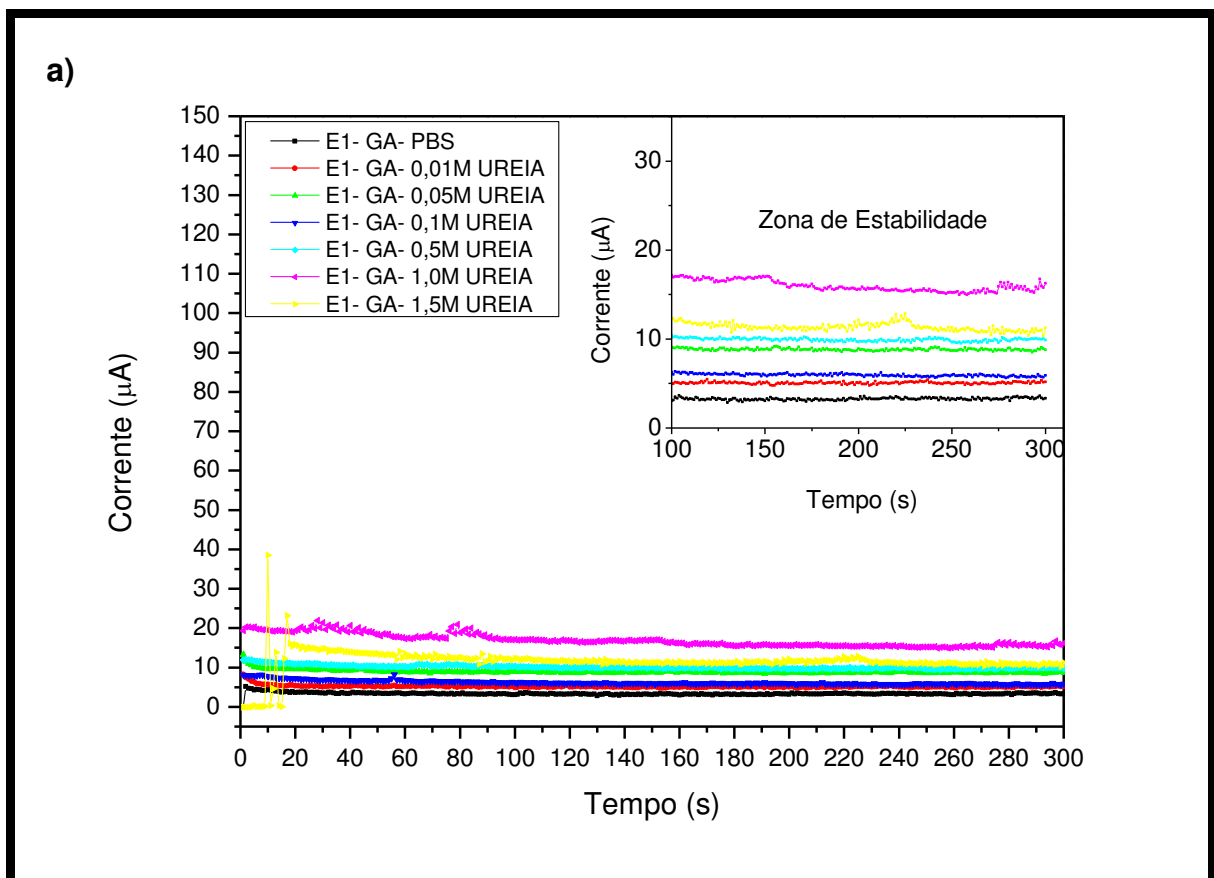


Figura 25- Curvas de biorespostas dos eletrodos sensores sem glutaraldeído e imobilizados com quitosana, onde a) tem 1 camada, b) 2 camadas e c) 3 camadas de enzima urease.

Os eletrodos sensores com a presença do glutaraldeído apresentaram um melhor tempo de resposta e uma maior estabilidade nas medições. Na Figura 26 a), é possível observar as curvas do eletrodo com 1 camada de enzima imobilizada com quitosana e glutaraldeído. Esse biossensor apresentou um tempo de resposta de 100 s e uma zona de estabilidade entre 100 s à 300 s, ou seja, o sensor mostrou-se bastante estável quando comparado com os sensores sem glutaraldeído. Da mesma forma, aconteceu com os eletrodos com 2 e 3 camadas (Figura 26 (b) e (c)), onde apresentaram um bom tempo de resposta, de 50 s e 140 s e, com estabilidade de 50 s à 300 s e 140 s à 300 s, respectivamente. Observando que o biossensor com 2 camadas obteve o melhor tempo de resposta e a maior zona de estabilidade, quando comparado com todos os outros sensores que foram submetidos a análise de medição amperiométrica. Aonde é possível observar que a presença do glutaraldeído possibilitou uma imobilização por ligações cruzadas, favorecendo um melhor aprisionamento e rendimento da enzima.



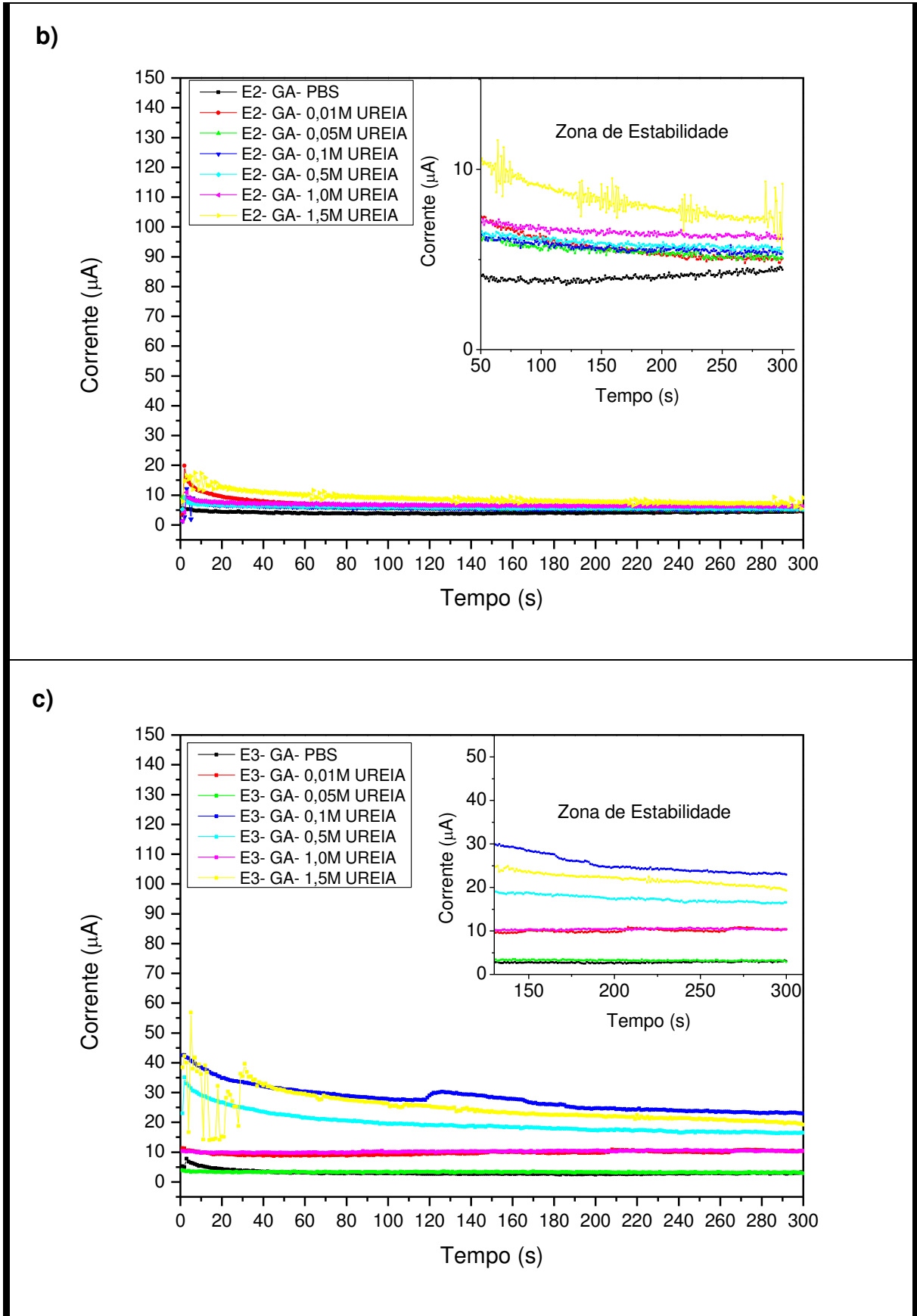
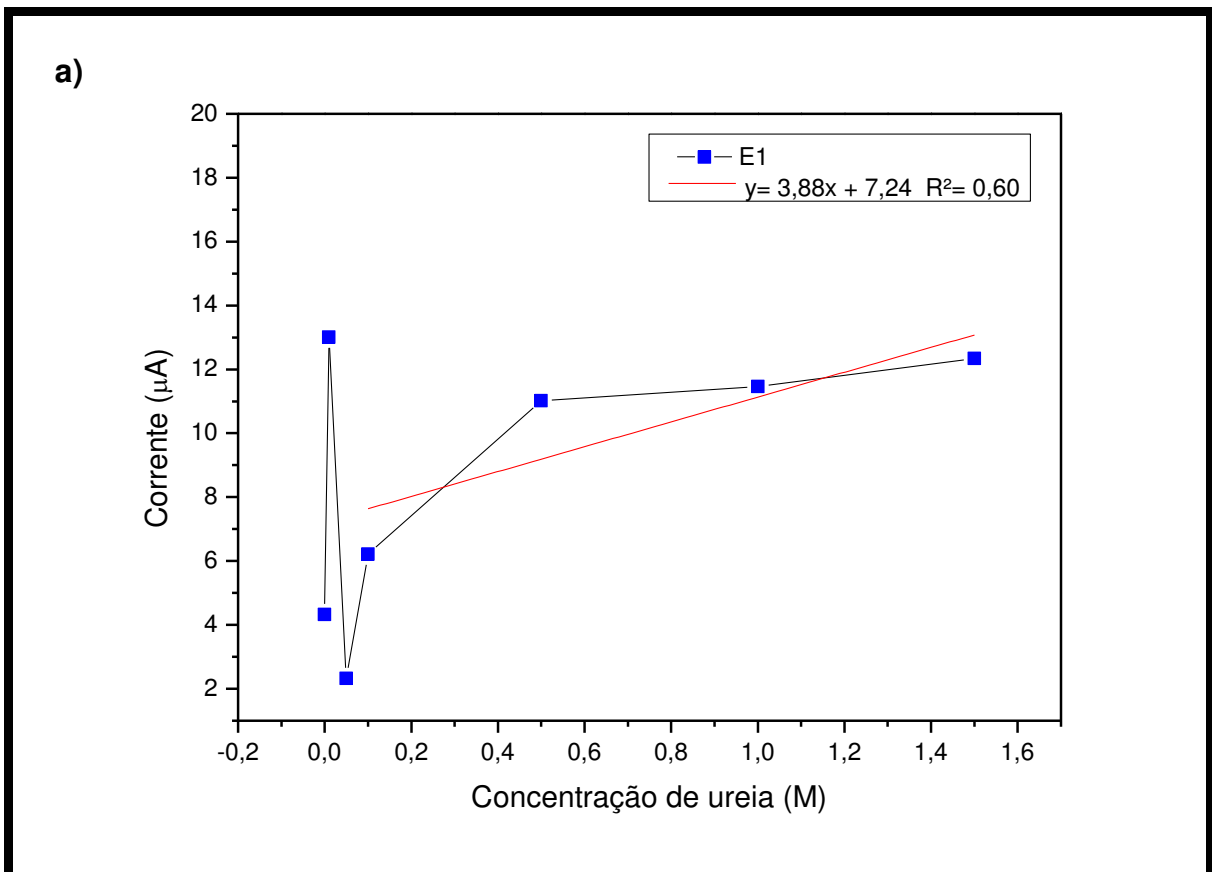


Figura 26- Curvas de biorespostas dos eletrodos sensores com glutaraldeído e imobilizados com quitosana, onde a) tem 1 camada, b) 2 camadas e c) 3 camadas de enzima urease

Linearidade e Sensibilidade

Na Figura 27, é possível observar os resultados de linearidade e sensibilidade dos sensores imobilizados sem glutaraldeído. Na Figura 27 a), podemos verificar que esse tipo de imobilização com 1 camada de enzima, promove uma pequena faixa de linearidade entre 0,1 à 1,5M de ureia e com o coeficiente de correlação de 0,60. Da mesma forma ocorreu com os outros eletrodos com 2 e 3 camadas de enzima imobilizada sem glutaraldeído (Figura 27 b) e c)), que apresentou uma faixa de 0,05 à 1,0 M de ureia para os dois sensores e com baixos coeficientes de correlação de 0,63 e 0,85, respectivamente (Massafera; Torresi, 2011b).



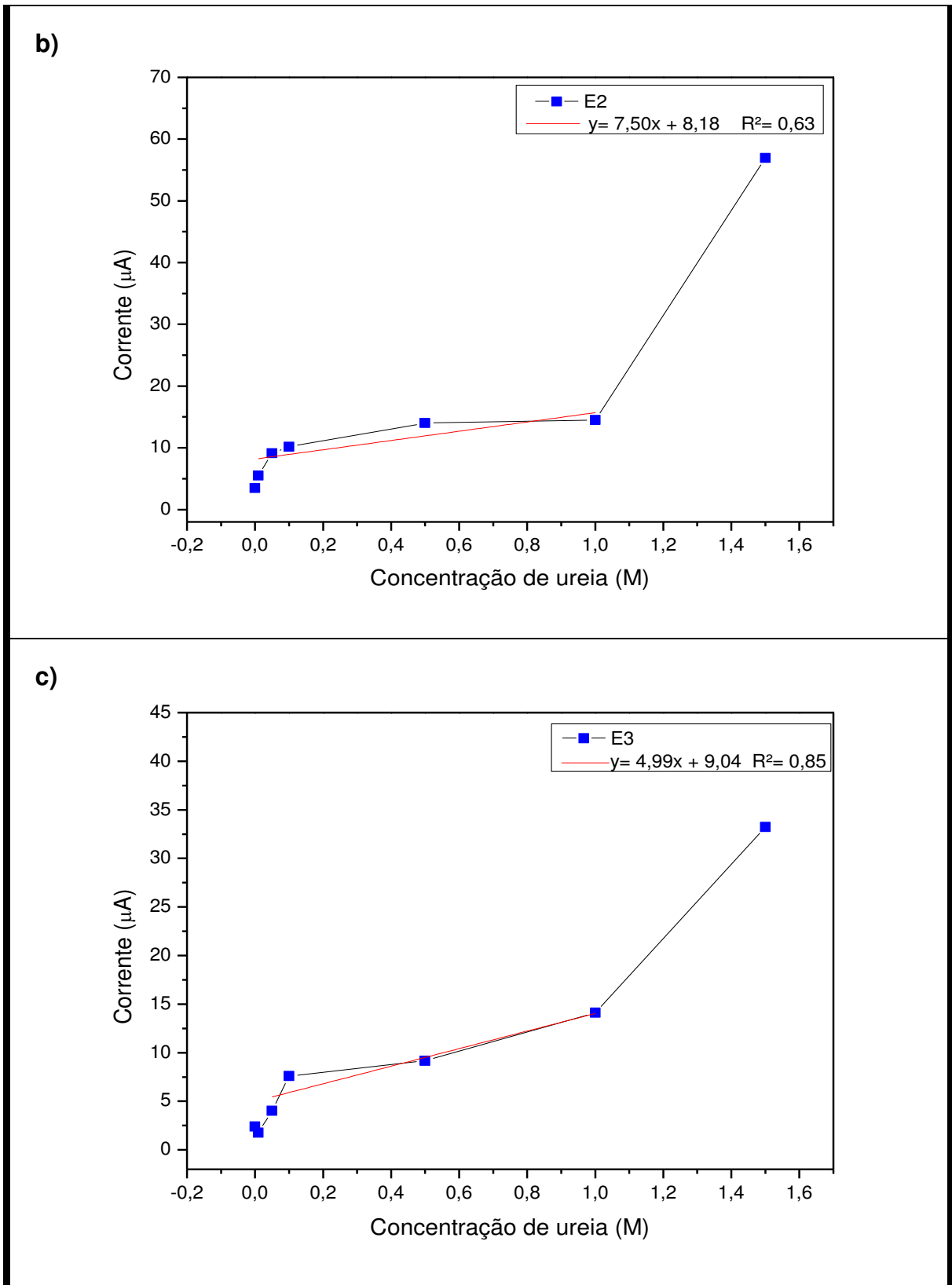
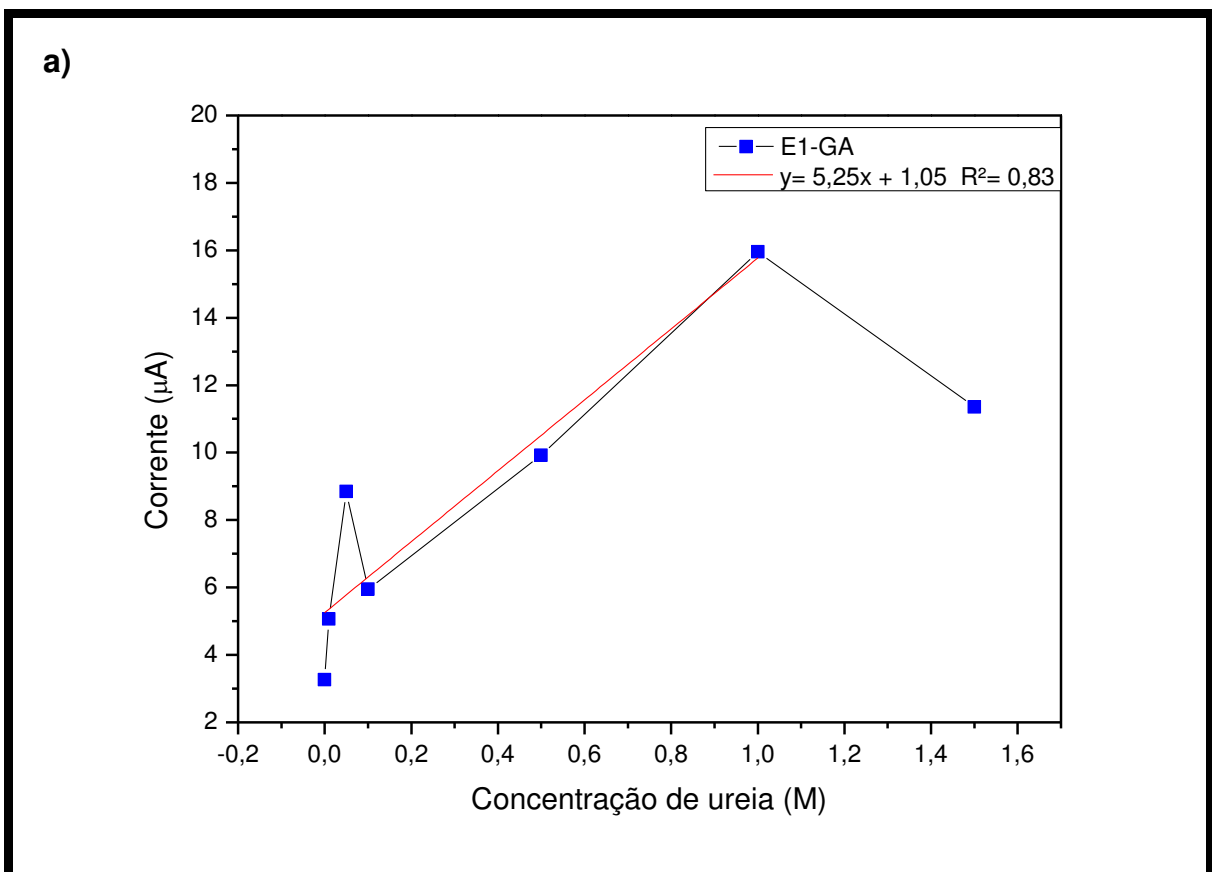


Figura 27- Gráficos de faixa de linearidade do biossensor de ureia sem glutaraldeído onde a) é o eletrodo com 1 camada, b) com 2 e c) com 3 camadas de enzima urease, no quais os pontos representam as concentrações de ureia e a reta representa o ajuste linear.

Já os biossensores imobilizados com quitosana e glutaraldeído apresentaram na Figura 28 a), b) e c) suas respectivas sensibilidades e as faixas de linearidades dos sensores de acordo com a concentração de ureia em relação as medidas de corrente, que é produzida através da reação eletroquímica. No sensor com 1 camada de enzima e com glutaraldeído (Figura 28 a)), é possível observar uma boa sensibilidade do eletrodo e uma faixa de linearidade entre 0,01 à 1,0M de ureia. Já o eletrodo com 2 camadas (Figura 28 b)) apresentou uma maior sensibilidade e uma maior faixa de linearidade (0 à 1,5M) entre todos os sensores, e com um coeficiente de correlação de 0,86. O eletrodo com 3 camadas obteve resultados insatisfatórios em relação a sensibilidade e a faixa de linearidade, isso pode ser decorrente do número de camadas quitosana/urease que possivelmente dificulta a difusão do sinal a ser detectado.



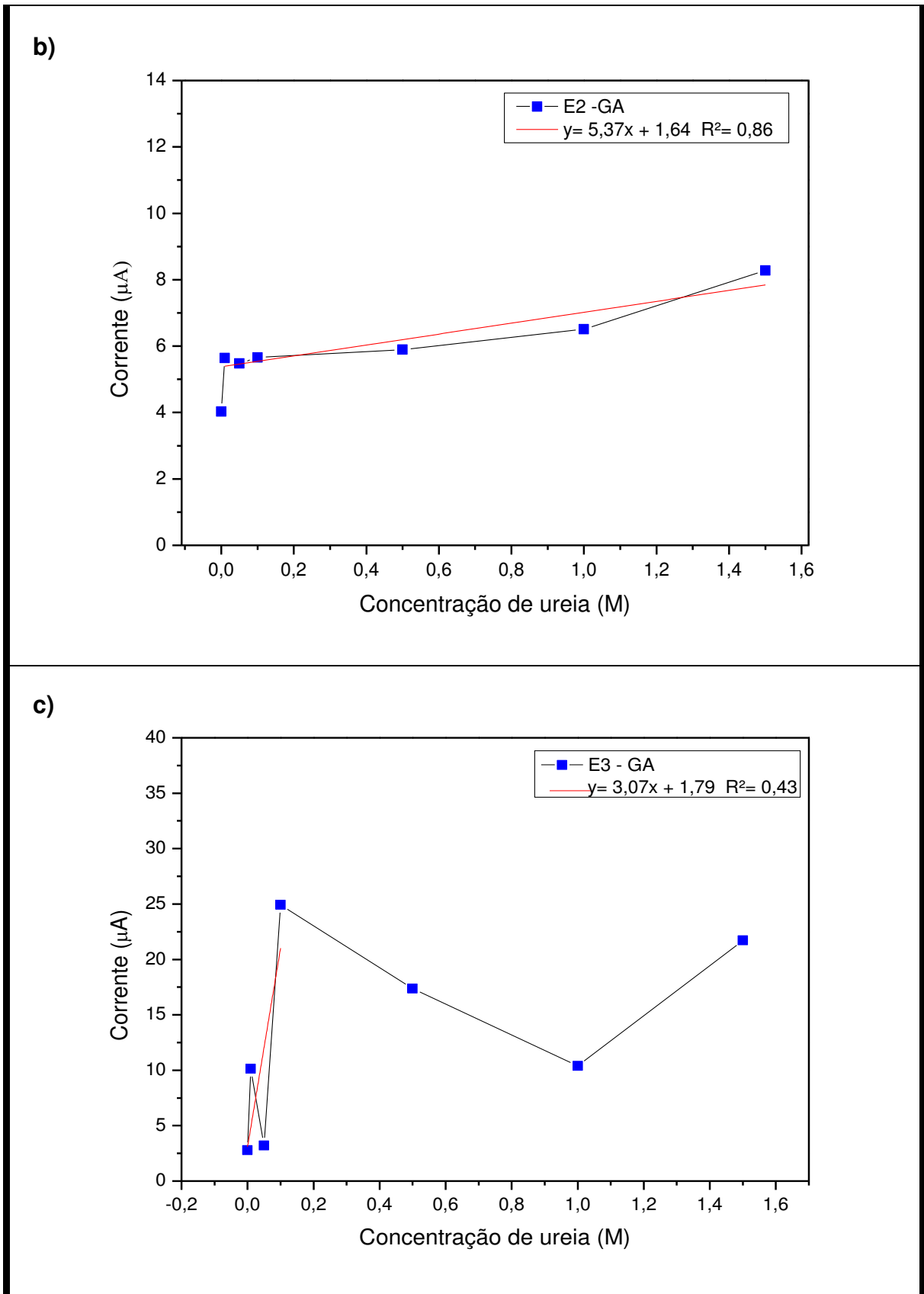


Figura 28- Gráficos de faixa de linearidade do biossensor de ureia com glutaraldeído onde a) é o eletrodo com 1 camada, b) com 2 e c) com 3 camadas de enzima urease, no quais os pontos representam as concentrações de ureia e a reta representa o ajuste linear.

Diante dos resultados obtidos a presença do glutaraldeído na imobilização da enzima com quitosana, favoreceu uma melhora no aprisionamento do biocomponente (urease) e promoveu uma boa estabilidade nas biorespostas, visto que apresentaram melhores resultados de sensibilidade, faixa de linearidade, apresentando também um melhor coeficiente de correlação quando comparados com os resultados dos eletrodos imobilizados apenas com a quitosana (Tan et al., 2010; Narang; Pundir, 2011; Gabrovska et al., 2011).

Sensibilidade

A sensibilidade do biossensor é observada na Figura 29, onde foi avaliado através de um teste com o eletrodo de 2 camadas de enzima imobilizada com quitosana e glutaraldeído (E2-GA). As medições cronoamperométricas foram realizadas para avaliar a sensibilidade do sensor, aonde podemos observar que a curva apresenta boa sensibilidade no teste com alíquotas de ureia (4,0M) concentrada, que foi adicionada a cada 100 segundos na solução. Logo, com o aumento da concentração de ureia a resposta amperiométrica aumenta, mostrando assim a sensibilidade do sensor (Massafera; Torresi, 2011b; Hao, et al., 2015).

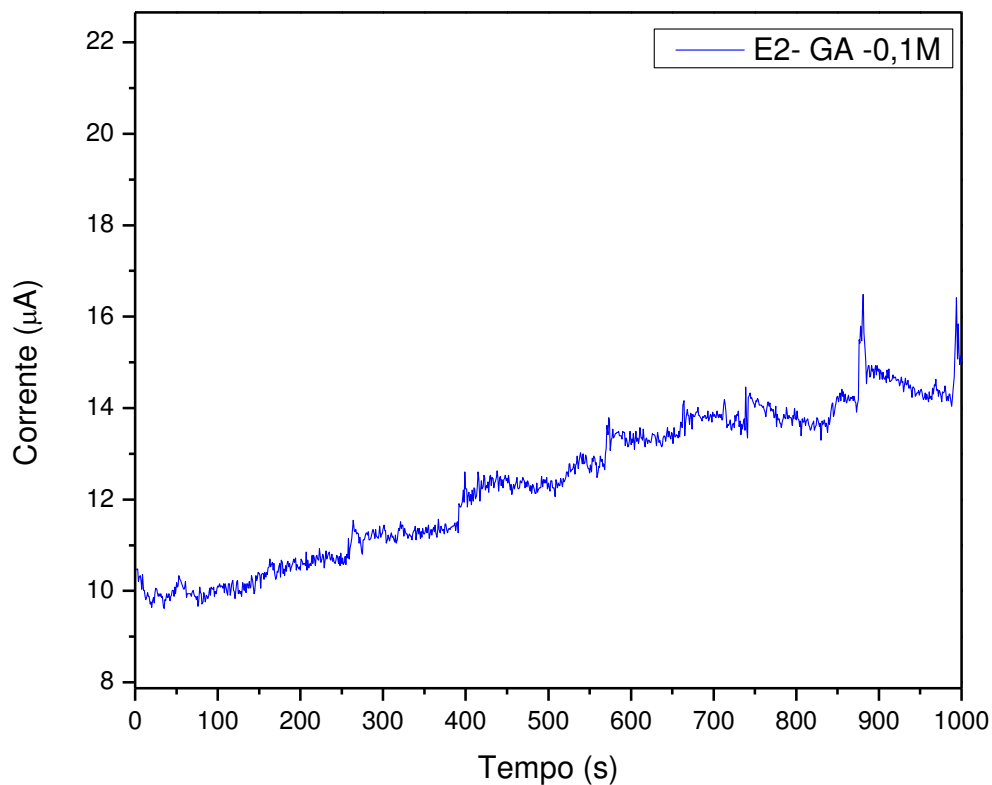


Figura 29- Curvas cronoamperométrica de sensibilidade do sensor com 2 camadas de enzima imobilizada com quitosana e glutaraldeído na solução de 0,1M.

Especificidade e Seletividade

O teste de especificidade e seletividade da enzima também foi realizado para o eletrodo com 2 camadas de urease imobilizado com quitosana/glutaraldeído (E2-GA) e a solução de 0,1M de ureia, a Figura 30 representa as leituras desse teste. Logo, é possível verificar que a enzima urease é bastante específica a ureia e, que o sensor na presença de outras substâncias (creatinina), que foi sendo adicionada durante a medição a cada 50 s, não apresentou sensibilidade, pois não houve variação de corrente. Logo, o sensor é seletivo e específico a ureia, apresentando assim resultados confiáveis.

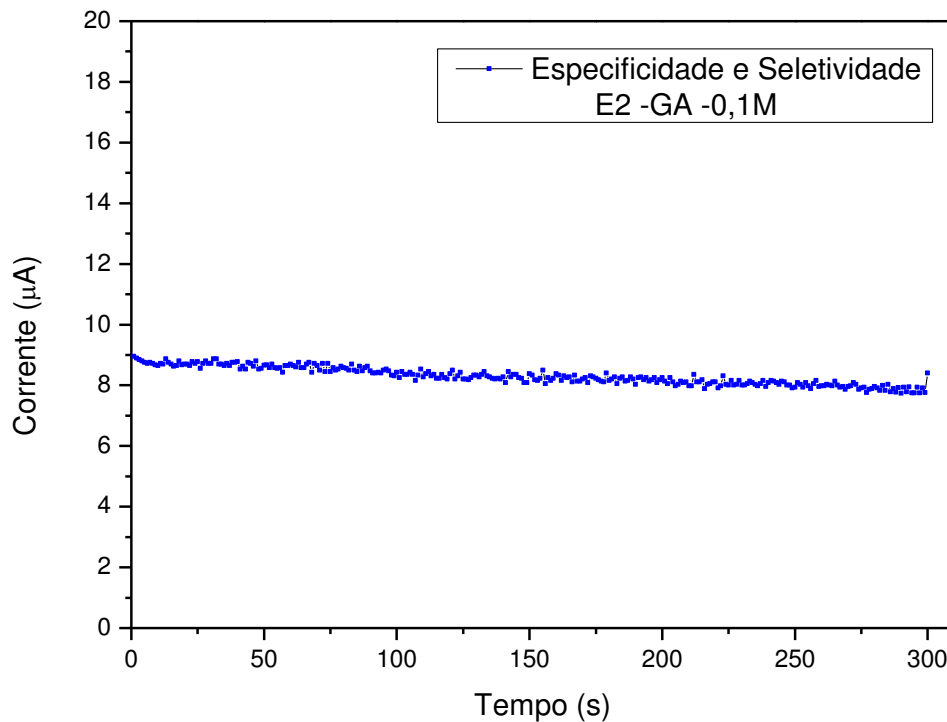


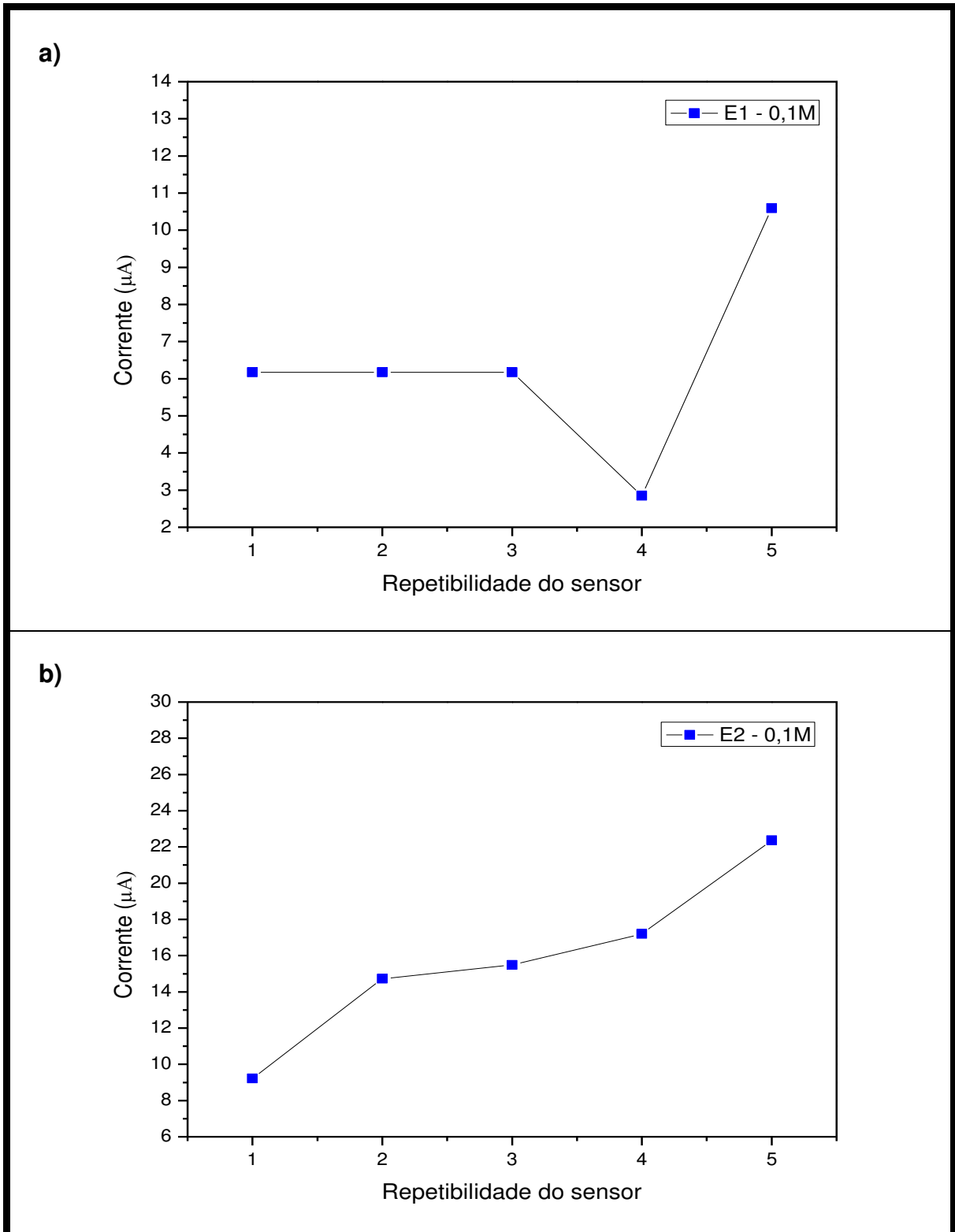
Figura 30- Curva de especificidade do eletrodo sensor com 2 camadas de enzima imobilizada com glutaraldeído na solução de 0,1M.

Portanto, o teste mostrou que no ensaio de medição da corrente gerada na reação de urease com a ureia não sofreram variação com a presença de alíquotas de creatinina na solução e, comprovou que a urease imobilizada com quitosana/glutaraldeído matem uma atividade específica com a ureia.

Repetibilidade

O teste de repetibilidade foi realizado apenas com uma solução de ureia (0,1M), onde essa concentração foi escolhida por representar um ponto na faixa linearidade para todos os eletrodos. Podemos observar o comportamento das curvas com a repetição das análises com o mesmo sensor 5 vezes, para os sensores imobilizados sem glutaraldeído na Figura 31. A Figura 31 a), sensor de 1 camada, exibe respostas estáveis para as três primeiras medidas, para quarta e quinta, o eletrodo perdeu a estabilidade de medição. Para o sensor com 2 camadas de enzima sem glutaraldeído (Figura 31 b), houve uma boa repetibilidade apenas na segunda, terceira e quarta vez.

Já a Figura 31 c), apresentou estabilidade na repetição apenas na quarta e quinta vez, pois as primeiras leituras o sensor não conseguiu estabilizar as medições.



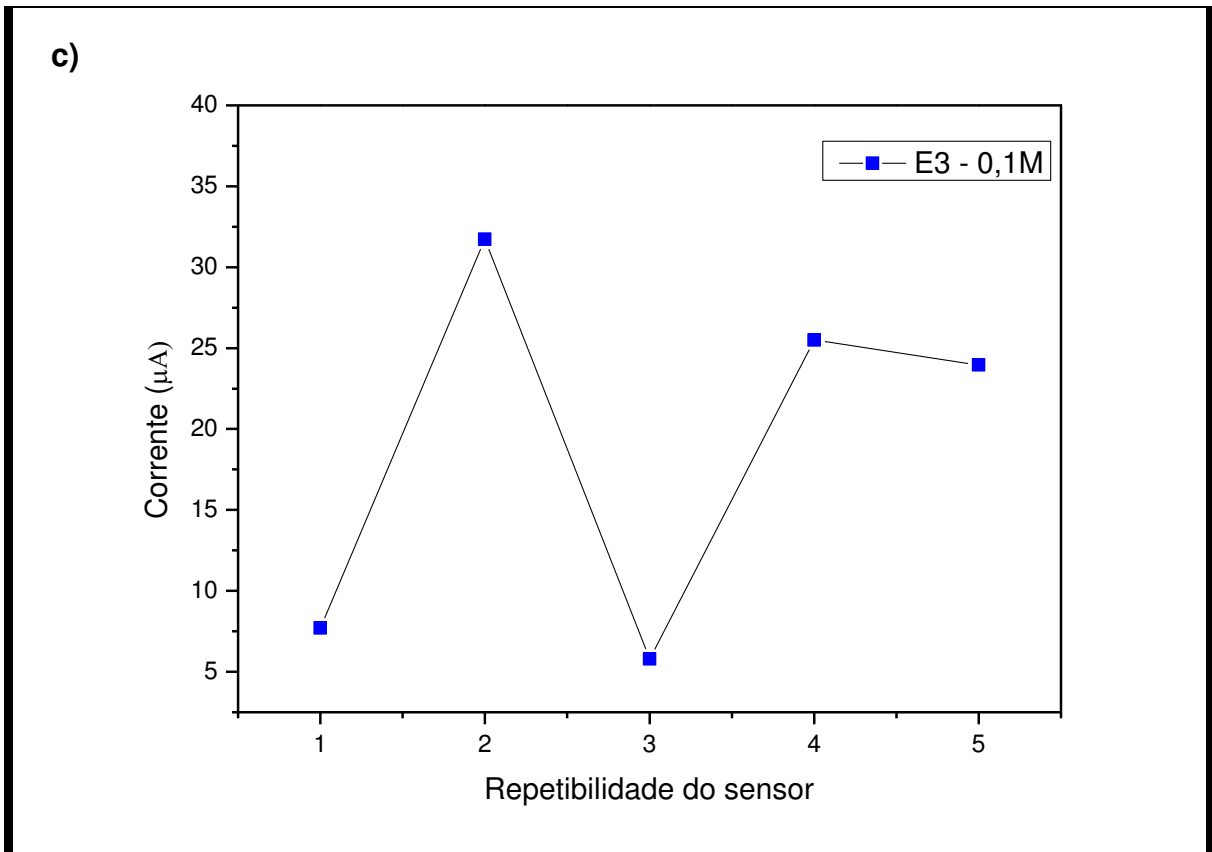
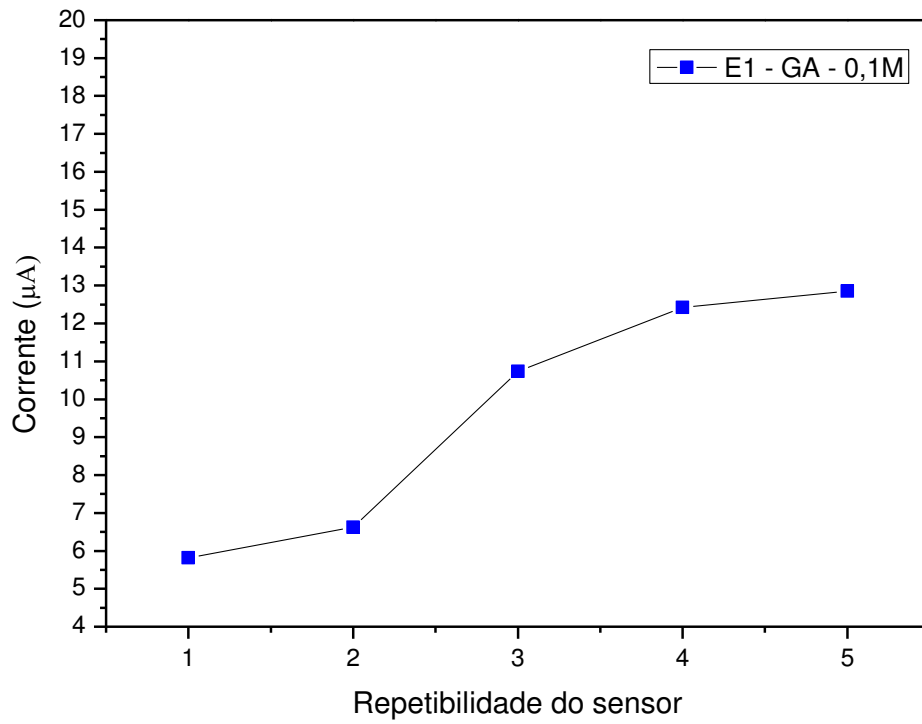


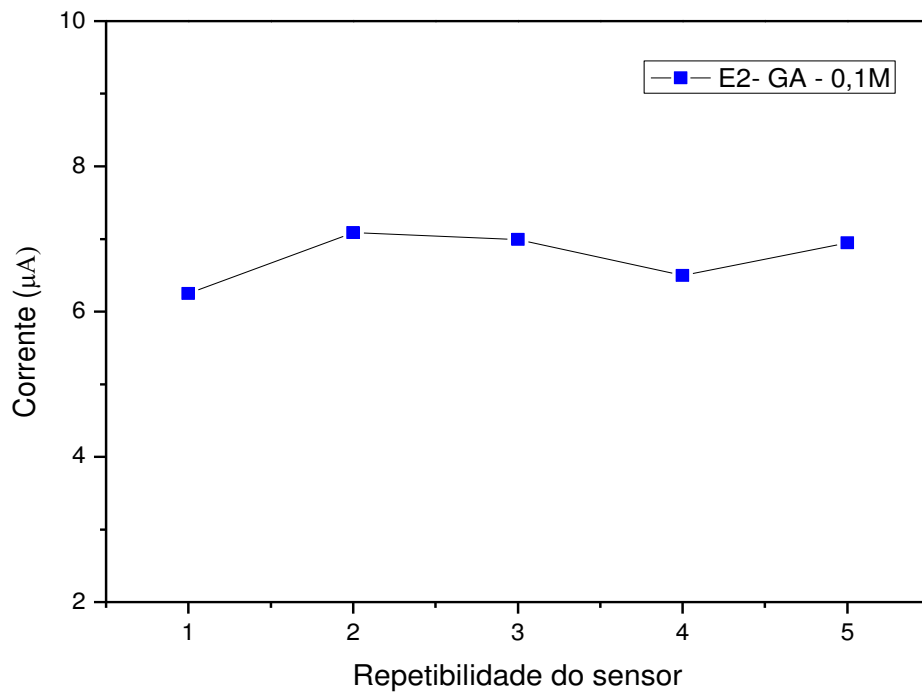
Figura 31- Curvas do teste de repetibilidade dos sensores com diferentes números de camadas de enzima imobilizada com quitosana *sem* glutaraldeído, utilizando 5 repetições do mesmo teste na solução de 0,1M de ureia, onde a) é o sensor com 1 camada, b) com 2 e c) com 3 camadas.

Na imobilização da enzima com quitosana/glutaraldeído foram obtidos resultados satisfatórios em relação a repetibilidade. Observando as curvas é possível verificar a estabilidade dos resultados, que podem estar relacionadas a esse tipo de imobilização que diminui a perda de enzima durante os testes aumentando a estabilidade da enzima no eletrodo. Na Figura 32 a), observamos que o sensor foi estável a partir da terceira repetição, onde no começo das medições o resultado é inconstante. Já no sensor com 2 camadas (Figura 32 b), podemos verificar que as curvas estão exibindo uma melhor estabilidade nas respostas, e com essa imobilização o eletrodo consegue manter a medição estável pelas 5 repetições. O sensor com 3 camadas na Figura 32 c), apresentou um resultado constante nas repetições, a partir da segunda (Tan et al., 2010; Gabrovská et al., 2011).

a)



b)



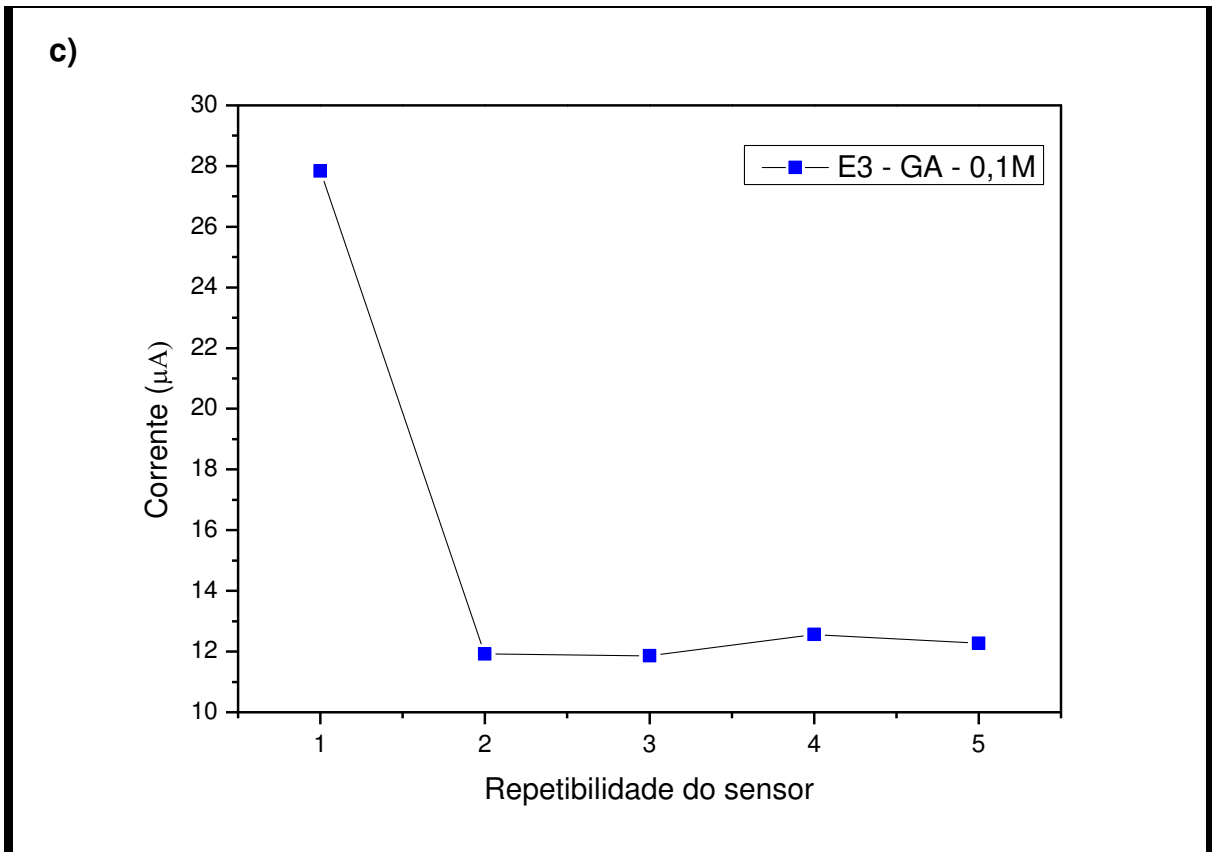


Figura 32- Curvas do teste de repetibilidade dos sensores com diferentes números de camadas de enzima imobilizada com quitosana com glutaraldeído, utilizando 5 repetições do mesmo teste na solução de 0,1M de ureia, onde a) é o sensor com 1 camada de enzima, b) com 2 e c) com 3 camadas.

Análise comparativa dos biossensores

Essa análise comparativa resultados de biorespostas obtidos dos biossensores com diferentes números de camadas e dos dois tipos de imobilizações da enzima apresentada na Tabela 5.

Tabela 5- Análise comparativa de dados dos biossensores, que avalia as biorespostas diante dos tipos de imobilização e dos números de camadas.

Sensores	Tempo de resposta	Estabilidade	Faixa de linearidade e Sensibilidade	Teste de Sensibilidade	Seletividade e especificidade	Repetibilidade (conc. de ureia de 0,1M)
E1	140 s	140-200 s	0,1-1,5 M	-	-	1, 2, e 3x
E2	150 s	150-300 s	0,05-1,0 M	-	-	2, 3, e 4x
E3	70 s	70-160 s	0,05-1,0 M	-	-	4 e 5x
E1- GA	100 s	100-300 s	0,01-1,0 M	-	-	3, 4 e 5x
E2- GA	50 s	50-300 s	0,01-1,5 M	Resultado satisfatório na adição do concentração de ureia na solução.	Resultado satisfatório, sem nenhuma alteração na presença de outra substância (creatinina).	Todas as vezes
E3 -GA	140 s	140-300 s	0,01-0,1 M	-	-	2, 3, 4 e 5x

Diante dos resultados, percebemos que os sensores produzidos com a imobilização da enzima urease com quitosana e glutaraldeído apresentaram melhores respostas de estabilidade, menor tempo de resposta, maior faixa de linearidades das concentração e melhores repetibilidade. Provavelmente, esses bons resultados são provenientes da presença do reticulante glutaraldeído, que possibilitou um melhor aprisionamento da enzima, garantindo uma melhor estabilidade de resposta. Apenas o eletrodo com 3 camadas de enzima e com a presença de glutaraldeído, apresentou resultados incoerentes, provavelmente decorrente do número de camadas. As respostas satisfatórias do sensor E2 - GA e por todos os sensores apresentarem sensibilidade a concentração de 0,1 M, foram critérios para serem escolhidos para realização dos testes de cronoamperométrica, seletividade e especificidade e repetibilidade dos sensores.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, é possível concluir que a quitosana tem a capacidade de imobilizar a enzima urease, pela habilidade de formação de membrana, biocompatibilidade e por ser insolúvel em água. Desse modo, a quitosana foi utilizada nos dois tipos de imobilizações (adsorção e ligações cruzadas) e com diferentes números de camadas para confecção do eletrodo. Onde foram avaliadas, as imobilizações de quitosana/urease e quitosana/urease/glutaraldeído através das análises de microscopia e de bioresposta do sensor.

Antes de imobilizar a enzima é preciso de um suporte transdutor para depositar as camadas das membranas, então foi utilizado fitas aço inox como suporte e o antimônio eletrodepositado para atuar como transdutor. A camada de antimônio sobre o suporte foi avaliada através de microscopia óptica que mostrou que a eletrodeposição com potencial com 9 volts apresentou uma boa homogeneidade na superfície do suporte.

Os transdutores também foram caracterizadas por DRX, sendo constatado que a camada eletrodepositada tinha a presença do antimônio metálico. Dessa forma, os suportes eletrodepositados foram submetidos a um tratamento térmico para formação do óxido de antimônio. Os resultados de DRX indicam que o tratamento térmico foi eficaz para formação do Sb_2O_3 e Sb_2O_5 , essencial para transdução do sinal.

Foram realizados ensaios de MO e o MEV para as membranas com os dois tipos de imobilizações e os diferentes números de camadas, onde as membranas apresentaram algumas características como aglomerados, superfícies rugosas, poros e pouco homogeneidade. Foi verificado um aumento de aglomerados na superfície do transdutor para os sensores com mais camadas imobilizadas. É importante ressaltar que esses aglomerados devem-se também das superfícies eletrodepositadas de antimônio dos suportes transdutores.

A avaliação da efetividade da enzima imobilizada com quitosana e quitosana/glutaraldeído foi através da bioresposta amperiométrica, onde foi possível observar que os eletrodos atenderam as características preconizadas para os biossensores. A enzima urease mostrou-se eficiente com relação a sensibilidade, tempo de resposta, faixa de linearidade, estabilidade, seletividade, especificidade e repetibilidade. Também foi constatado, que a imobilização da enzima urease com as membranas de quitosana e a adição do reticulante glutaraldeído apresentaram

melhores respostas nas análises, pois o reticulante possibilitou a formação de ligações cruzadas nas membranas de quitosana com urease, favorecendo um melhor armazenamento do biocomponente (urease), conseqüentemente um maior tempo de vida da enzima no biossensor, além disso o eletrodo apresenta uma maior estabilidade operacional.

Por fim, é válido considerar que a imobilização foi efetiva e que a enzima dispõe da sua atividade quando imobilizada e a imobilização com reticulante proporciona um melhor ambiente para a mesma. Além do mais, foi visto que os biossensores podem ser confeccionados para funcionarem como um dispositivo de precisão, resposta rápida e baixo custo, para aplicação na detecção de ureia. Ressaltando ainda, que a imobilização é uma das etapas mais importantes na confecção desses dispositivos, visto que as características e parâmetros de produção influenciam fortemente nos mesmos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. O. M. D. S. et al. Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exoesqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Micro-Ondas. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 23, n. 5, p. 630–635, 2013.
- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A Utilização de Materiais Obtidos pelo Processo de Sol-Gel na Construção de Biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835–841, 2002.
- ALMEIDA, V. V. et al. Catalisando a Hidrólise da Ureia em Urina. In: **Química Nova**. [s.l.: s.n.]. p. 42–46.
- ALQASAIMAH, M. S.; HENG, L. Y.; AHMAD, M. A Urea Biosensor from Stacked Sol-Gel Films with Immobilized Nile Blue Chromoionophore and Urease Enzyme. **Sensors**, v. 7, n. 10, p. 2251–2262, 2007.
- AN, N. et al. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. **Applied Clay Science**, v. 114, p. 283–296, 2015.
- ANDRADE, V. M. **Confecção de Biossensores através de Imobilização de Biocomponentes por Eletropolimerização de Pirrol**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- ANTONINO, N. D. A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana. p. 89, 2007.
- ARAVAMUDHAN, A. et al. **Natural Polymers: Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications**. [s.l.] Elsevier Inc., 2014.
- ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 7, p. 1083–1100, 2008.
- BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 3, p. 274–283, 2010.
- BANICA, F.-G. Amperometric Enzyme Sensors. In: **Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications**. [s.l.: s.n.]. p. 50–65.
- BARBOSA, A. R. D. B. **Construção De Um Biossensor Para O Doseamento De Ureia Baseado Na Inibição Enzimática Da Amidase De Pseudomonas Aeruginosa Com Recurso A Um Eléctrodo Selectivo De Iões Amônio**. [s.l.] Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2008.
- BARHOUMI, H. et al. Urea biosensor based on Zn₃Al-Urease layered double hydroxides nanohybrid coated on insulated silicon structures. **Materials Science and Engineering C**, v. 26, n. 2-3, p. 328–333, 2006.
- BARRETT, C. S.; CUCKA, P.; HAEFNER, K. The crystal structure of antimony at 4.2, 78 and 298°K. **Acta Crystallographica**, v. 16, p. 451, 1963.

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.** [s.l.] Universidade Federal de Campina Grande, 2012.

CHALLA, G. **Polymer Chemistry - An Introduction.** London: [s.n.].

CHAN, K. M. Quantitative Chemistry Experimental Technique (I): pH Measurement by Antimony Electrode. **Innovative School-level - XXXIV**, n. August, p. 75–88, ago. 2012.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 6-7, p. 441–456, 2002.

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the new york academy of sciences**, p. 17, 1962.

DEHLINGER, U. "VI. Über die Kristallstruktur der Antimonoxyde." **Zeitschrift für Kristallographie-Crystalline Materials**, v. 66.1-6, p. 108–119, 1928.

DESHPANDE, M. V.; AMALNERKAR, D. P. Biosensors prepared from electrochemically-synthesized conducting polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 18, n. 4, p. 623–649, 1993.

DHAWAN, G.; SUMANA, G.; MALHOTRA, B. D. Recent developments in urea biosensors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 42–52, 2009.

FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Quimica Nova**, v. 15, n. 1, p. 28–39, 1992.

FERNANDES, E. G. R. **Imobilização de Enzimas em Plataformas (sub) Microestruturadas para Aplicação em Biossensores.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis - Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Quimica Nova**, v. 29, n. 4, p. 811–816, 2006.

FURTADO, R. F. et al. Aplicações de Biossensores na Análise da Qualidade de Alimentos. In: **Embrapa** 1º. ed. Fortaleza - CE: [s.n.]. p. 14.

GABROVSKA, K. et al. Immobilization of urease on nanostructured polymer membrane and preparation of urea amperometric biosensor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 4, p. 620–626, 2011.

GARCIA, A. et al. Ferrocene branched chitosan for the construction of a reagentless amperometric hydrogen peroxide biosensor. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, n. 4, p. 435–439, 2007.

GERARD, M.; MALHOTRA, B. D. Application of polyaniline as enzyme based biosensor. **Current Applied Physics**, v. 5, n. 2, p. 174–177, 2005.

GOSSYPIUMHIRSUTUM, L.; FREITAS, S. DE; SOUZA, S. R. DE. Aplicabilidade De Um Biodiesel De Algodão. 2013.

GUIMARÃES, J. A. **Estudo de Filmes de Langmuir e Langmuir-blodgett Visando o Desenvolvimento de Biossensor de Colesterol**. [s.l.] Universidade Federal da Rio de Janeiro, 2009.

HANSEN, B. **Metodologia para Produção de Biossensores Amperométricos Enzimáticos Utilizando Polímeros Condutores: Caso Polianilina**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

HAO, W.; DAS, G.; YOON, H. H. Fabrication of an amperometric urea biosensor using urease and metal catalysts immobilized by a polyion complex. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 747, p. 143–148, 2015.

HIGA, K. et al. Qualidade de vida de pacientes portadores de insuficiência renal crônica em tratamento de hemodiálise. **ACTA Paulista de Enfermagem**, v. 21, n. SPEC.ISS., p. 203–206, 2008.

HOLANDA, A. L.; FOOK, M. V. L.; SWARNAKAR, R. Preparation and Characterization of Chitosan-Insulin-Tripolyphosphate Membrane for Controlled Drug Release: Effect of Cross Linking Agent. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 5, p. 211–219, 2014.

IVANOVA, S. .; IVANOV, Y. .; GODJEVARGOVA, T. Urea Amperometric Biosensors Based on Nanostructured Polypyrrole and Poly Ortho-Phenylenediamine. **Open Journal of Applied Biosensor**, v. 2, p. 12–19, 2013.

KIELING, D. D. **Enzimas: Aspectos gerais**. Florianópolis: [s.n.].
LEE, W.-Z. et al. Dinickel complexes of disubstituted benzoate polydentate ligands: mimics for the active site of urease. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 2, n. 19, p. 2538–2541, 2008.

MAGALHÃES, J. M. C. S.; MACHADO, A. A S. C. Urea potentiometric biosensor based on urease immobilized on chitosan membranes. **Talanta**, v. 47, n. 1, p. 183–191, 1998.

MALHOTRA, B. D. .; TURNER, A. P. F. **Advances in Biosensors: Perspectives in Biosensors**. 1°. ed. [s.l.] Stamford: JAY Press INC, 2003.

MARTINS, M. P. Biotransformação de epóxidos com fungos de origem marinha e síntese de cloroidrinas. 2008.

MASSAFERA, M. P. **Desenvolvimento de novas plataformas poliméricas para detecção eletroquímica de amônia e uréia**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.

MASSAFERA, M. P.; DE TORRESI, S. I. C. Urea amperometric biosensors based on nanostructured polypyrrole. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2534–2540, 2011a.

MASSAFERA, M. P.; DE TORRESI, S. I. C. Urea amperometric biosensors based on nanostructured polypyrrole. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2534–2540, 2011b.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. **Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1113–1126, 2004.

MELO, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um Biossensor enzimático pra determinação de taninos hidrolisáveis**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MULYASURYANI, A.; ROOSDIANA, A.; SRIHARDYASTUTIE, A. The potentiometric urea biosensor using chitosan membrane. v. 10, n. 2, p. 162–166, 2010.

NAKAMURA, H.; KARUBE, I. Current Research Activity in Biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, p. 446–468, 2003.

NARANG, J.; PUNDIR, C. S. Construction of a triglyceride amperometric biosensor based on chitosan-ZnO nanocomposite film. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 4, p. 707–715, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3^o. ed. São Paulo-SP: [s.n.].

NICOLINI, J. V. **Biossensores baseados em Nanotubos de Titanato e Peroxidase para Detecção do Peróxido de Hidrogênio**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

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**, v. 29, n. 5, p. 932–939, 2006.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2014.

PRAYOGA, I.; MULYASURYANI, A.; PRASETYAWAN, S. Construction and Characterization of Conductometric Biosensor for Determination of the Diazinon Concentration. **Makara Journal of Science**, v. 18, n. 1, p. 26–30, 2014.

RAWAL, R. et al. Construction of Amperometric Uric Acid Biosensor Based on Uricase Immobilized on PBNPs/cMWCNT/PANI/Au Composite. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 112–118, 2012.

RUBENS, P. et al. Biosensors to monitor the exposition to environmental pollutants. **Cad. Saúde Colet.**, v. 16, n. 4, p. 677 – 700, 2008.

SANTOS, J. C. C. **Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores**. [s.l.] UNiversidade de São Paulo, 2012.

SILVA, L. M. D. C. Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental. p. 152, 2011.

SINGH, M. et al. Urea biosensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 134, n. 1, p. 345–351, 2008.

SKLÁDAL, P. Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 4, p. 491–502, 2003.

SOARES, J. C. **Biossensores Eletroquímicos Fabricados a partir da Imobilização da Urease em Filmes de Polipirrol**. São Carlos- SP: Universidade de São Paulo, 2011.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 329–337, 2007.

SOYLEMEZ, S. et al. 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**, v. 212, p. 425–433, jun. 2015.

SUJOY, B.; APARNA, A. Enzymology , Immobilization and Applications of Urease Enzyme. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 6, p. 51–56, 2013.

SVENSSON, C. H. R. I. S. T. E. R. The crystal structure of orthorhombic antimony trioxide, Sb₂O₃. **Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry**, v. 30.2, p. 458–461, 1974.

TAN, Y. et al. Immobilization of enzymes at high load/activity by aqueous electrodeposition of enzyme-tethered chitosan for highly sensitive amperometric biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 12, p. 2644–2650, 2010.

TYMECKI, L.; ROZUM, B.; KONCKI, R. A Very Simple Biosensing System for Educational Purposes. **Chemical Analytical**, v. 51, p. 977–985, 2006.

UNGUREANU, G. et al. Arsenic and antimony in water and wastewater: Overview of removal techniques with special reference to latest advances in adsorption. **Journal of Environmental Management**, v. 151, p. 326–342, 2015.

WANG, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, n. 1-2, p. 47–53, 1999.

XIA, L.; WEI, Z.; WAN, M. Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 341, n. 1, p. 1–11, 2010.

ZABORSKA, W.; KRAJEWSKA, B.; LESZKO, M. Chitosan membrane with covalently immobilized urease. Pore size distribution. **Journal of Membrane Science**, v. 61, p. 279–288, 1991.