

DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR PARA A DETECÇÃO DE UREIA BASEADO EM NANOFIBRAS CONDUTORAS MODIFICADAS COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

Fernanda L. Migliorini ¹, Rafaela C. Sanfelice ², Luiza A. Mercante ^{1,3}, Rafaela S. André ¹, Luiz H. C. Mattoso ^{1,3} and Daniel. S. Correa ¹

¹ LNNA, Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP, Brasil.

² Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG, Brasil.

³ PPGCEM, DEMA, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil

fernandamigliorini@yahoo.com.br

Classificação: Desenvolvimento de sensores e biossensores nanoestruturados.

Resumo

O uso de técnicas analíticas confiáveis para avaliação de produtos lácteos, são de extrema importância para garantir a segurança alimentar contra contaminantes. Entre as possíveis substâncias empregadas como adulterantes no leite, a ureia causa profunda preocupação devido aos seus efeitos deletérios para a saúde do consumidor. No presente estudo, desenvolveu-se uma nova plataforma para detecção eletroquímica de ureia. A plataforma desenvolvida baseia-se em eletrodos convencionais de óxido de estanho dopado com flúor (FTO), modificados com nanofibras poliméricas de poliamida 6 (PA6) e polipirol (PPy) modificadas com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO). Além disso, foi realizada a imobilização da enzima urease na superfície da nanofibra modificada a partir das excelentes características das nanopartículas de ZnO para imobilização eletrostática da enzima. Os resultados impedimétricos do biossensor (FTO/ PA6/ PPy /ZnO /Urease) mostraram uma alta sensibilidade para a detecção de ureia visando aplicações em biossensores de produtos lácteos.

Palavras-chave: Detecção eletroquímica; Ureia; Biossensor; Nanofibras poliméricas; Nanopartículas ZnO.

DEVELOPMENT OF BIOSENSOR FOR DETECTION OF UREA BASED ON MODIFIED CONDUCTIVE NANOFIBRAS WITH ZINC OXIDE

Abstract

The use of reliable analytical techniques for the evaluation of dairy products is extremely important to ensure food safety against contaminants. Among the possible substances used as adulterants in milk, urea causes deep concern due to its deleterious effects on consumer health. In the present study, a new platform for electrochemical detection of urea was developed. The developed platform is based on conventional fluorine doped tin oxide (FTO) electrodes modified with polymeric electrospun nanofibers of polyamide 6 (PA6) and polypyrrole (PPy), which were further modified with zinc oxide nanoparticles (ZnO). In addition, immobilization of the urease enzyme on the surface of the modified nanofiber was performed due to the excellent characteristics of the ZnO nanoparticles for electrostatic immobilization of the enzyme. The impedimetric results (FTO/ PA6/ PPy/ ZnO/ Urease) showed a high sensitivity for the detection of urea, evidencing the great potential of the platform developed for applications in dairy biosensors.

Keywords: Electrochemical detection; Urea; Biosensor; Polymeric nanofibers; ZnO nanoparticles.

1 INTRODUÇÃO

A indústria de produtos lácteos busca o desenvolvimento de análises precisas e em tempo real com o objetivo de garantir a segurança alimentar dos consumidores finais. Desta forma, as técnicas para monitorar a quantidade de ureia é uma ferramenta altamente valiosa para o controle do teor de ureia em amostras de leite. A ureia pode ser utilizada para adulterar o leite e assim modificar o teor de

proteína existente na amostra (KUMAR et al., 2015). No entanto, além de um certo limite, a ureia tem efeitos deletérios sobre a saúde humana, pois pode causar indigestão, insuficiência renal, obstrução do trato urinário, sangramento gastrointestinal e câncer (NIKOLELI et al., 2010). Portanto, o desenvolvimento de uma plataforma de detecção de ureia com maior precisão é de extrema importância.

Neste trabalho, desenvolvemos uma plataforma impedimétrica para a detecção de ureia usando nanofibras eletrofiadas de poliamida 6 (PA6) e polipirrol (PPy) modificadas com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO). A Urease foi imobilizada na superfície das nanofibras modificadas com nanopartículas de ZnO usando processo eletrostático.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A solução de PA6/ PPy (7:1 w/w) foi preparada em ácido fórmico numa concentração otimizada de 10% (w/v) e submetida a agitação vigorosa durante 4h à temperatura ambiente. As nanofibras eletrofiadas foram coletadas diretamente nos substratos de FTO obtendo os eletrodos (FTO/ PA6/ PPy). As nanopartículas de ZnO (1 mg mL^{-1}) foram dispersas em água destilada contendo 0.5% (w/w) de Liosperse 511 no ultra-som a 20 kHz durante 5 min. Em seguida, as nanofibras eletrofiadas foram imersas na dispersão de ZnO durante 24 h e após enxaguadas com água destilada e secas em temperatura ambiente. A imobilização da enzima urease no eletrodo FTO/ PA6/ PPy/ ZnO foi realizada através da adsorção eletrostática entre a urease e o ZnO. A enzima foi imobilizada por imersão do eletrodo FTO/ PA6/ PPy/ ZnO numa solução de tampão fosfato (PBS) contendo 1 mg mL^{-1} de urease por 4 h. O biossensor FTO/ PA6/ PPy/ ZnO/ Urease foi então lavado em solução de tampão fosfato e mantido em PBS (pH 7,4) refrigerado a 4°C até à sua utilização. Para avaliar a morfologia das nanofibras, utilizou-se Microscopia Eletrônica de varredura (MEV (JEOL 6510)). A adsorção das nanopartículas de ZnO na superfície das nanofibras foi confirmada por espectroscopia de fotoelétrons de raio X (XPS) usando um sistema XPS de ScientaOmicron, ESCA +. Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando um potenciostato (PGSTAT30 Autolab (Metrohm)) controlado pelo software nova. As medidas eletroquímicas foram realizadas por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado de caracterização morfológica através de imagens de MEV confirmou um revestimento eficiente da superfície das nanofibras com as nanopartículas de ZnO. A estabilidade da camada modificadora foi testada através de várias etapas de lavagem (com água destilada), confirmando a forte adsorção de ZnO na superfície das nanofibras. Na Figura 1 está sendo apresentado uma imagem das nanofibras PA6/ PPy modificadas com as nanopartículas de ZnO.

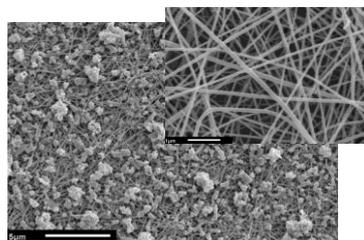


Figura 1. Imagem MEV do FTO/ PA6/ PPy/ ZnO após 24h de imersão na dispersão de ZnO. A inserção mostra as nanofibras antes da modificação.

Através dos resultados de XPS foi possível confirmar a adsorção das nanopartículas de ZnO na superfície das nanofibras devido a presença dos picos atribuídos às bandas Zn 2p, O 1s e C 1s. Através das caracterizações eletroquímicas foi possível verificar a influência das nanopartículas de ZnO e da enzima nas propriedades condutoras das nanofibras. Os resultados de VC e EIS mostram a melhor condutividade do eletrodo depois da modificação com as nanopartículas de ZnO (associado às

propriedades condutoras das nanopartículas de ZnO) e a diminuição da condutividade do eletrodo após a imobilização da enzima (associado às características isolantes da urease).

A resposta impedimétrica do biossensor desenvolvido foi analisada em função da concentração de ureia. A Figura 2 (a) mostra o aumento da resistência à transferência de carga (R_{ct}) em função do aumento da concentração de ureia e a Figura 2 (b) é a curva de calibração obtida para os valores de R_{ct} em função do log da concentração de ureia).

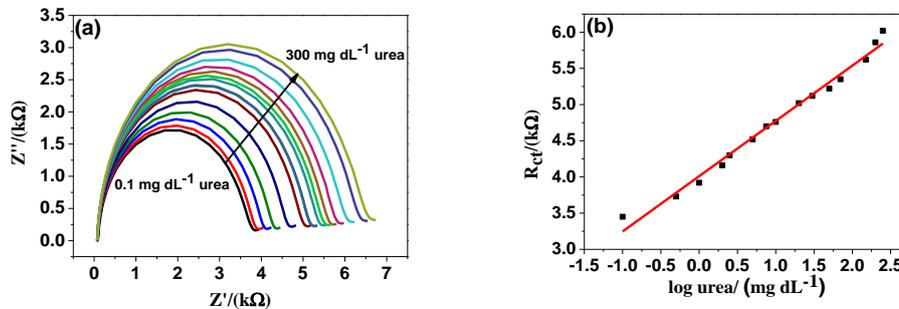


Figura 2. (a) Espectros de impedância em função do aumento de concentração da ureia . b) Curva de calibração obtida para os valores de R_{ct} em função do log da concentração de ureia.

O limite de detecção (LD) para o biossensor desenvolvido foi determinado como 0.011 mg dL^{-1} . O sensor eletroquímico desenvolvido apresenta desempenho semelhante ou melhor em comparação com outros sensores baseados em ZnO relatados na literatura. A seletividade do biossensor para a determinação de ureia também foi estudada. Observou-se uma interferência máxima de 8% na presença de ácido úrico, revelando a alta seletividades da plataforma desenvolvida para a detecção de ureia. Além disso, também foi realizado análises em amostras reais (dois tipos de leite bovino) indicando que o biossensor desenvolvido pode ser utilizado para a determinação precisa de ureia em análises de amostras reais.

4 CONCLUSÃO

Um novo biossensor de ureia impedimétrico foi desenvolvido com base em eletrodos convencionais de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) modificados com nanofibras poliméricas eletrofiadas de poliamida 6 (PA6) e polipirrol (PPy), modificadas com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e urease. O biossensor apresentou alta sensibilidade, um baixo limite de detecção de 0.011 mg dL^{-1} para uma faixa linear de detecção de 0.1 a 250 mg dL^{-1} . Além disso, a plataforma de detecção revelou-se ser útil para detectar ureia em amostras reais de leite e mostrou um bom desempenho para a detecção seletiva da mesma na presença de compostos interferentes. Assim, a plataforma eletroquímica desenvolvida pode ser considerada uma alternativa potencial para monitorar produtos lácteos (como o leite) em relação à contaminação por ureia.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado financeiramente pela FAPESP (Números de Subsídios: 2014 / 16789-5; 2016 / 23793-4), CNPq, CAPES (PNPD20131474 - 33001014004P9), MCTI-SisNano e Rede Agronano (EMBRAPA) do Brasil..

REFERÊNCIAS

KUMAR, P.; RAMULU, L. P.; KUMAR, N. Non-enzymatic detection of urea using unmodified gold nanoparticles based aptasensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 72, p. 340–347, 2015.

NIKOLELI, G.P.; NIKOLELIS, D.P.; METHENITIS, C. Construction of a simple optical sensor based on air stable lipid film with incorporated urease for the rapid detection of urea in milk. *Analytica Chimica Acta*, v. 675, p. 58–63, 2010.