

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

Kleilton Oliveira Santos

**BIOSENSOR ELETROQUÍMICO DE UREIA COM DETECTOR
POTENCIOMÉTRICO PARA MONITORAMENTO DE DOENÇA RENAL CAUSADA
PELO SARS-COV-2**

Campina Grande – PB

2024

Kleilton Oliveira Santos

**BIOSENSOR ELETROQUÍMICO DE UREIA COM DETECTOR
POTENCIOMÉTRICO PARA MONITORAMENTO DE DOENÇA RENAL CAUSADA
PELO SARS-COV-2**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Agência financiadora: CAPES

Campina Grande – PB

2024

S237b

Santos, Kleilton Oliveira.

Biossensor eletroquímico de ureia com detector potenciométrico para monitoramento de doença renal causada pelo SARS-COV-2 / Kleilton Oliveira Santos. – Campina Grande, 2024.

123 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2024.

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook".

Referências.

1. Biossensores. 2. Insuficiência Renal – COVID-19. 3. Biossensor Eletroquímico de Ureia. 4. Monitoramento de Doença Renal – Biossensor. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Título.

CDU 621.357(043)

VITAE DO CANDIDATO

Kleilton Oliveira Santos

- Técnico em Eletroeletrônica - SENAI (2013)
- Químico Industrial pela Universidade Estadual da Paraíba (2015).
- Mestre em Química pela Universidade Estadual da Paraíba (2018).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
POS-GRADUCAO CIENCIA ENG. DE MATERIAIS
Rua Aprigio Veloso, 882, - Bairro Universitario, Campina Grande/PB, CEP 58429-900

FOLHA DE ASSINATURA PARA TESES E DISSERTAÇÕES

KLEILTON OLIVEIRA SANTOS

BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE UREIA COM DETECTOR POTENCIOMÉTRICO PARA MONITORAMENTO DE DOENÇA RENAL CAUSADA PELO SARS-COV-2

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

Aprovado em: 24 de Maio 2024

Marcus Vinícius Lia Fook
Orientador
UFCG/UAEMa/PPG-CeMat

Márcio José Batista Cardoso
Examinador Externo
UFPB/DEMAT

Albaniza Alves Tavares
Examinadora Externa
CERTBIO/UFCG

Suedina Maria de Lima Silva
Examinadora Interna
UFCG/UAEMa/PP-CEMat

Gelmires de Araújo Neves
Examinador Interno
UFCG/UAEMa/PPG-CEMat



Documento assinado eletronicamente por **MARCUS VINICIUS LIA FOOK, PROFESSOR 3 GRAU**, em 27/05/2024, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **Márcio José Batista Cardoso, Usuário Externo**, em 27/05/2024, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **Albaniza Alves Tavares, Usuário Externo**, em 27/05/2024, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **GELMIRES DE ARAUJO NEVES, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 27/05/2024, às 15:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **SUEDINA MARIA DE LIMA SILVA, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 27/05/2024, às 16:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **4416978** e o código CRC **71636A93**.

*Dedico este trabalho a Deus,
bem como à minha mãe, pai, esposa, filho, irmãos e a
todas as pessoas que acreditaram no meu potencial e
contribuíram neste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a **Deus**, o que seria de mim sem a fé que eu tenho Nele, que iluminou o meu caminho durante esta caminhada. Tu és a fonte de toda sabedoria e inspiração, e sem a Tua orientação e graça, este trabalho não teria sido possível.

Aos meus pais, **Adilson** e **Inaldete** por absolutamente tudo, cada um de seus atos foram uma oportunidade que eu tive para crescer e me tornar o que sou. Aos meus irmãos, **Kleiton** e **Mikaelle** e sobrinha **Helena**, pelo apoio e amor incondicional e que felizmente posso dizer ser recíproco.

Gostaria de agradecer de forma especial e carinhosa à minha esposa, **Thaislânia Lucena**, por me proporcionar forças e coragem, apoiando-me nos momentos mais difíceis. Ao meu filho, **Arthur Lucena**, cujo nascimento coincidiu com o período do doutorado, trazendo-me imensa alegria e renovando minhas energias para os estudos. Agradeço profundamente por compreenderem os momentos em que precisei me ausentar para me dedicar aos estudos e pesquisas. Vocês foram minha constante fonte de motivação e conforto nos desafios enfrentados ao longo dessa jornada.

Quero expressar meu sincero agradecimento aos amigos que fiz ao longo do curso, pela verdadeira amizade que cultivamos. Em especial, agradeço a **Alanne Silva e Thiago Henrique**, que esteve sempre ao meu lado ao longo desses anos. Os momentos compartilhados juntos foram inestimáveis e contribuíram significativamente para a conclusão deste trabalho.

Expresso meu profundo agradecimento aos meus amigos do laboratório CERTBIO da UFCG: **Wladymyr, Rosseberg, Albaniza, Maria Roberta, Pedro, Henrique, Márcio, William, Glauber, Wvanderson, Klaidson, Thiago Caju, Israel, Eunice, Paulinha, Sérgio Pereira, Isla, Edileuza, Tânia, Lívia, Toninho, Socorro, João, Taynah, Lucas** e a todos que fazem parte deste laboratório. Vocês foram fundamentais, direta ou indiretamente, ao longo de toda essa jornada.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook**, quero expressar minha profunda gratidão pela confiança depositada em meu trabalho, pelas oportunidades concedidas, pelos ensinamentos preciosos e pelo reconhecimento do meu potencial, tanto academicamente quanto como pessoa. Suas palavras e apoio constante foram

uma fonte inesgotável de motivação, incentivando-me a dar sempre o meu melhor e jamais desistir.

Obrigado por ser um orientador exemplar e por contribuir de maneira significativa para o meu crescimento e desenvolvimento ao longo deste percurso acadêmico.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Ciência e engenharia de Materiais, pela paciência, dedicação e ensinamentos disponibilizados nas aulas, cada um de forma especial contribuiu para a conclusão desse trabalho e conseqüentemente para minha formação profissional.

Ao **corpo docente** de Engenharia de Materiais.

Á **CAPES**, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O COVID-19 é conhecido por causar danos alveolares difusos e insuficiência respiratória aguda, podendo afetar os rins e levar à Insuficiência Renal Aguda (IRA), uma condição grave e potencialmente fatal. A prevenção e o diagnóstico precoce são fundamentais, pois muitas doenças renais só se tornam evidentes clinicamente quando mais de 50% a 75% da função renal já está comprometida. Com base nesses desafios, o desenvolvimento de biossensores para diagnóstico renal tem sido uma área de pesquisa significativa. Esses dispositivos possibilitam um diagnóstico precoce, permitindo intervenções terapêuticas mais eficazes e melhorando os desfechos clínicos dos pacientes. Este trabalho teve por objetivo desenvolver um biossensor eletroquímico de ureia com detector potenciométrico para auxiliar no monitoramento da insuficiência renal associada ao coronavírus SARS-CoV-2. O biossensor foi produzido utilizando a técnica de impressão em tela, resultando na formação de dois eletrodos (sensor e referência) em uma fita condutiva de cobre. Posteriormente, foi realizada a eletrodeposição de antimônio nos eletrodos e aplicação de tinta de prata contendo a enzima urease sobre o eletrodo sensor. A enzima urease foi extraída do feijão de porco e caracterizada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), atividade enzimática/parâmetros cinéticos e potencial hidrogeniônico (pH). Os biossensores foram caracterizados por microscopia ótica (MO), difração de raios X (DRX), resistência e condutividade elétrica, sensibilidade e faixa de linearidade, período de estabilidade/tempo de resposta e reprodutibilidade. O detector potenciométrico foi desenvolvido a partir de um software “Proteus” e do software “Arduino IDE”, que em seguida foram transferidos para um microcontrolador arduino nano. Sua carcaça foi desenvolvida no software Shapr 3D e impressa em uma impressora 3D, utilizando o polímero poliácido láctico (PLA), ao qual foi inserido o seu sistema eletrônico e software necessários para seu funcionamento. O extrato de feijão de porco contendo a enzima urease, apresentou bandas de absorção características da enzima urease e comportamento de Michaelis – Menten, apresentando afinidade com seu substrato ureia a concentrações máximas de 60mmol.L^{-1} . Os biossensores apresentaram uma estrutura lisa e plana sob uma determinada orientação com efetiva eletrodeposição de antimônio sobre toda a superfície do cobre e presença de partículas de prata em toda a superfície do eletrodo-sensor. Na análise de DRX, foram observados picos característicos de materiais cristalinos, o que favorece o desempenho dos biossensores ao manterem suas propriedades de condutividade, essenciais para o seu funcionamento. A resposta potenciométrica do biossensor foi analisada em relação a diferentes concentrações de solução de ureia, demonstrando uma faixa linear e sensibilidade nas concentrações variando entre 15 e 75 mg/dL. O limite de detecção foi investigado e estabelecido em 75 mg/dL. Além disso, o tempo de resposta do biossensor foi determinado como sendo 60 segundos, apresentando boa reprodutibilidade. O detector potenciométrico foi capaz de realizar medidas diretas, convertendo a diferença de potencial (ddp) obtida na reação dos biossensores, em concentração de ureia presente nas amostras em mg/dL. Com esses resultados podemos inferir que a metodologia aplicada no desenvolvimento do biossensor eletroquímico e do seu detector foi eficaz como biossensor eletroquímico de ureia.

Palavras – chave: Insuficiência renal. COVID-19. Biossensores. Ureia.

ABSTRACT

COVID-19 is known to cause widespread damage to the tiny air sacs in the lungs and acute respiratory failure, which can also affect the kidneys and result in Acute Renal Failure (ARF), a severe and potentially deadly condition. Early prevention and diagnosis are crucial, as many kidney issues only become apparent when more than half to three-quarters of kidney function is already compromised. Given these challenges, there has been significant research into developing biosensors for renal diagnosis. These devices enable early detection, allowing for better treatment and improving patients' outcomes. This study focuses on creating an electrochemical urea biosensor with a potentiometric detector to aid in monitoring renal failure associated with the SARS-CoV-2 virus. The biosensor was made using the screen-printing technique, forming two electrodes (sensor and reference) on a conductive copper tape. Antimony was then deposited on the electrodes, and silver paint containing the enzyme urease was applied to the sensor electrode. The urease enzyme, extracted from jack beans, was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), enzyme activity/kinetic parameters and hydrogen potential (pH). The biosensors were characterized by optical microscopy (OM), X-ray diffraction (XRD), electrical resistance and conductivity, sensitivity and linearity range, stability period/response time and reproducibility. The potentiometric detector was developed using "Proteus" software and "Arduino IDE" software, which were then transferred to an Arduino nano microcontroller. Its housing was developed using the Shapr 3D software and printed on a 3D printer using the polymer polylactic acid (PLA), into which the electronic system and software necessary for its operation were inserted. The jack bean extract containing the urease enzyme showed absorption bands characteristic of the urease enzyme and Michaelis – Menten behavior, showing affinity with its substrate urea at maximum concentrations of 60mmol.L^{-1} . The biosensors presented a smooth and flat structure under a certain orientation with effective electrodeposition of antimony over the entire copper surface and the presence of silver particles over the entire surface of the sensor electrode. In the XRD analysis, characteristic peaks of crystalline materials were observed, which favors the performance of the biosensors by maintaining their conductivity properties, essential for their functioning. The potentiometric response of the biosensor was analyzed in relation to different concentrations of urea solution, demonstrating a linear range and sensitivity at concentrations ranging between 15 and 75 mg/dL. The detection limit was investigated and established at 75 mg/dL. Furthermore, the response time of the biosensor was determined to be 60 seconds, showing good reproducibility. The potentiometric detector converted the potential difference obtained from the biosensor reaction into urea concentration in mg/dl, indicating the effectiveness of the methodology used in their development as an electrochemical urea biosensor.

Keywords: Renal failure. COVID-19. Biosensors. Urea.

PUBLICAÇÕES

BARROS, V. J. G. F.; SANTOS, K. O.; SOUSA, W. J. B. D.; CARDOSO, M. J. B.; LIMA, R. J. D. S.; FOOK, M. V. L. Biossensores eletroquímicos em tiras de aço inoxidável com deposição de antimônio para detecção de ureia. **Conjecturas**, v. 22, n. 11, p. 251-260, 2022.

SANTOS, K. O.; FREITAS, K. F. D.; SOUSA, W. J. B. D.; CARDOSO, M. J. B.; LIMA, R. J. D. S.; FOOK, M. V. L. Efeito do tratamento térmico na eletrodeposição de antimônio para produção de eletrodos. **Concilium (Brasil)**, v. 22, p. 457, 2022.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sistema urinário e função renal (Barros, 2017).	22
Figura 2 – Insuficiência renal: aguda e crônica (Barros, 2017).	22
Figura 3 – Configuração de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais (Pastusiak, 2021).	26
Figura 4 – Classificação dos biossensores.	28
Figura 5 – Estrutura química da ureia.	33
Figura 6 – Estrutura da enzima urease (Pacheco e Colla, 2019).	34
Figura 7 – Mecanismo de catálise da ureia pela urease (Zambelli <i>et al.</i> , 2011).	35
Figura 8 – Velocidade de uma reação enzimática em função da concentração do substrato (Nelson e Cox, 2018).	40
Figura 9 – Gráfico duplo-recíproco de Lineaweaver-Burk (Nelson e Cox, 2018).	41
Figura 10 - Apresentação esquemática do processo de serigrafia (Kuscer, 2021). ..	45
Figura 11 - Fórmula estrutural do tartarato de potássio e antimônio (III) hidratado (Sigmaaldrich, 2022).	48
Figura 12 – Fluxograma de preparação e caracterizações dos biossensores	51
Figura 13 – Processo de obtenção da enzima urease em solução.	52
Figura 14 – Procedimento de obtenção da tinta de prata enzimática.	53
Figura 15 – a) preparação da tela de serigrafia; b) emulsionamento da tela.	54
Figura 16 – a) Desenho para gravação na tela (b) processo de gravação da tela.	54
Figura 17 – Tela de Serigrafia revelada.	55
Figura 18 – Placas fenolíticas.	55
Figura 19 – Processo de pintura das placas.	56
Figura 20 - Remoção de todo o cobre não pintado das placas.	56
Figura 21 – Eletrodos de cobre.	57
Figura 22 - Processo de eletrodeposição de antimônio nos eletrodos de cobre.	58
Figura 23 – Descrição dos eletrodos sensor e referência.	58
Figura 24 – Montagem do biossensor.	59
Figura 25 – Aquisição de dados.	59
Figura 26 – Carça do detector potenciométrico	60
Figura 27 – Carcaça do detector potenciométrico	61
Figura 28 – Circuito eletrônico na Plataforma Proteus	61
Figura 29 – Circuito amplificador	62

Figura 30 – Placa microcontroladora Arduino nano.....	63
Figura 31 – Display LCD ST7735T.....	63
Figura 32 - Bateria de Lítio.....	64
Figura 33 – módulo de carregador TP4056.....	64
Figura 34 - Conversor de impulso passo-up.....	65
Figura 35 – Chave Botão com trava.....	65
Figura 36 – Chave Tactil.....	65
Figura 37 – Minigarras tipo Jacaré.....	66
Figura 38 – Logo CERTBIO (Primeira tela desenvolvida).....	67
Figura 39 – Molécula amônia com animação (segunda tela desenvolvida).....	68
Figura 40 - Menu (terceira tela desenvolvida).....	70
Figura 41 – Menu específico para Ureia (Quarta tela desenvolvida).	71
Figura 42 – Tela de resultado processado (Quinta tela desenvolvida).....	73
Figura 43 – Detector potenciométrico.....	75
Figura 44 – Espectro de FTIR do filme de PVP.....	80
Figura 45 - Espectro de FTIR do filme de urease.....	81
Figura 46 - Espectro de FTIR dos filmes de urease 15, 25 e 35%.....	82
Figura 47 – Velocidade da reação enzimática em função da concentração de ureia como substrato.	83
Figura 48 – Ajuste linear do gráfico obtido pelo inverso da velocidade inicial vs o inverso da concentração de ureia para determinação de velocidade máxima e da constante de Michaelis-menten.....	84
Figura 49 – pH em função da concentração de ureia em mmol.L ⁻¹	85
Figura 50 – Micrografias de superfície das fitas de cobre, deposição de antimônio sobre a superfície do cobre, tinta de prata/urease depositada sobre a superfície do antimônio nos aumentos de 20 e 80X.	86
Figura 51 - Difrátograma de raios X da placa de cobre.	88
Figura 52 - Difrátograma de raios X das partículas de antimônio.	88
Figura 53 - Difrátograma de raios X das partículas de prata.	89
Figura 54 - Difrátograma de raios X do biossensor.....	89
Figura 55 – Cuva de sensibilidade do biossensor.....	93
Figura 56 – Curva de linearidade do biossensor.....	94
Figura 57 - Tempo de resposta dos biossensores.....	95
Figura 58 – Curva de Reprodutibilidade.....	96

Figura 59- Curva de linearidade do biossensor amplificada	97
Figura 60 – Curva de linearidade de validação do detector potenciométrico	98
Figura 61 – Conexão biossensor/detector	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais tecidos utilizados para extração de enzimas	37
Tabela 2 – Materiais utilizados para o processo de obtenção dos biossensores e detector potenciométrico.....	50
Tabela 3 – Reagentes, fórmulas moleculares e procedência dos reagentes utilizados neste trabalho.	50
Tabela 4 – Resistência e Condutividade Elétrica	91
Tabela 5 – Resultados de tensões obtidas a partir de concentrações conhecidas ...	92
Tabela 6 – Tensões amplificadas a partir de concentrações conhecidas	97
Tabela 7 – Concentrações em mg/dL geradas pelo detector a partir das tensões em V.	98
Tabela 8 – Testes do biossensores junto ao seu detector potenciométrico	99

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 História do coronavírus	20
2.2 Insuficiência renal	21
2.3 Biossensores.....	25
2.3.1 Classificação dos biossensores	27
2.3.1.1 Biossensor enzimático.....	28
2.3.1.2 Biossensor eletroquímico	30
2.3.2 Componentes dos biossensores	31
2.3.2.1 Analito - ureia.....	33
2.3.2.2 Bioreceptor - Urease.....	33
2.3.2.3 Feijão de porco como fonte de urease	36
2.3.2.4 Imobilização do Componente Biológico.....	37
2.3.2.5 Cinética enzimática.....	39
2.3.2.6 Transdutor	41
2.3.2.7 Detector potenciométrico.....	42
2.3.3 Biossensores descartáveis.....	43
2.3.3.1 Impressão em tela	44
2.4 Eletrodeposição	46
2.4.1 Antimônio	47
2.5 Célula Eletroquímica e Eletrodos	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 Materiais.....	50
3.2 Métodos	51
3.2.1 Extração da urease	52
3.2.2 Preparação da tinta de prata enzimática.....	53
3.2.3 Construção do modelo do Eletrodo	53
3.2.3.1 Produção da tela de serigrafia.....	54
3.2.3.2 Impressão das placas.....	55
3.2.4 Produção dos eletrodos: sensor e referência.....	57
3.2.4.1 Eletrodeposição	57

3.2.4.2 Montagem do biossensor	58
3.2.5 Construção do Detector Potenciométrico.....	59
3.2.5.1 Modelagem – Detector potenciométrico	60
3.2.5.2 Circuito eletrônico - Detector potenciométrico.....	61
3.2.5.3 Software – Detector potenciométrico.....	66
3.2.5.4 Montagem - Detector potenciométrico.....	74
3.2.6 Caracterizações.....	75
3.2.6.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	75
3.2.6.2 Determinação da atividade enzimática.....	75
3.2.6.3 Potencial Hidrogeniônico	76
3.2.6.4 Microscopia Ótica	76
3.2.6.5 Difração de Raios X.....	77
3.2.6.6 Resistência e Condutividade Elétrica	77
3.2.6.7 Sensibilidade e Faixa de linearidade	77
3.2.6.8 Período de estabilidade / Tempo de resposta	78
3.2.6.9 Reprodutibilidade.....	78
3.2.6.10 Validação do Detector potenciométrico	79
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	80
4.2 Determinação da atividade enzimática	83
4.3 Potencial Hidrogeniônico	85
4.4 Microscopia Ótica.....	86
4.5 Difração de Raios X	87
4.6 Resistência e Condutividade Elétrica.....	90
4.7 Sensibilidade e Faixa de Linearidade	92
4.8 Período de estabilidade / Tempo de resposta	94
4.9 Reprodutibilidade	95
4.10 Validação do Detector potenciométrico	96
5 CONCLUSÕES.....	100
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXO I	113

1 INTRODUÇÃO

A cada dia têm-se visto notícias de novos vírus com alto grau de mortalidade em humanos (SARS-Cov-2, Varíola dos macacos, Langya henipavirus, Marburg, etc), acarretando preocupação e responsabilidade no âmbito da saúde pública. Dentre estes podemos destacar o novo Coronavírus (SARS-CoV-2) que provocou uma disseminação mundial (pandemia) (Pandey, 2020; Priyadarshi *et al.*, 2020; Wang, K. *et al.*, 2020; Ezhilan *et al.*, 2021; Júnior *et al.*, 2023).

A doença causada pelo coronavírus (COVID-19), pode gerar uma série de complicações aos pacientes infectados, entre elas, insuficiência renal aguda, disfunção cardíaca e, em casos mais graves, a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), o que requer desde terapias de oxigênio até intubação e ventilação mecânica invasiva. Um estudo com 3.993 pacientes hospitalizados com COVID-19 em um sistema de saúde da cidade de Nova York mostrou que 46% dos pacientes apresentaram IRA, entre eles 19% necessitaram de diálise e metade foram a óbito. O estudo mostrou que esta alteração é comum entre pacientes com COVID-19 e está associada a maior mortalidade do que em pacientes sem (Rocha *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020; Chan *et al.*, 2021; Júnior *et al.*, 2023).

A avaliação da função renal é de extrema importância, uma vez que a maioria das doenças renais só se manifesta clinicamente quando mais de 50% a 75% da função renal está comprometida. A insuficiência renal pode se apresentar de forma aguda ou crônica sendo a incapacidade dos rins em desempenhar sua função de filtração, reabsorção, homeostase e funções metabólicas, acarretando o aumento de toxinas no sangue (Kupske *et al.*, 2023)

A insuficiência Renal Aguda (IRA) resulta de uma perda abrupta da função do rim e está fortemente associada ao aumento da morbidade e mortalidade. A sua previsão de risco e a identificação precoce são fundamentais na tentativa de reduzir este problema mediante de ensaios de creatinina e ureia no sangue (Vanmassenhove *et al.*, 2017; Cheng *et al.*, 2020).

Uma histopatologia renal realizada por microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para analisar as anormalidades renais em 26 necropsias de pacientes cuja morte foi à insuficiência respiratória associada à síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, indicando que nove dos 26 pacientes apresentaram sinais clínicos de lesão

renal que incluíam creatinina sérica aumentada e/ou proteinúria (Su *et al.*, 2020; Chan *et al.*, 2021).

O monitoramento da função metabólica renal pode ser determinado pela quantidade de ureia no sangue e urina, que ocasiona sérios riscos à saúde, deve, portanto, ser enfatizado mesmo em pacientes com sintomas respiratórios leves. A função renal alterada deve receber atenção especial após admissão na prática clínica (Chan *et al.*, 2021).

A detecção precoce, intervenção eficaz da lesão renal e o tratamento de anormalidades renais, incluindo suporte hemodinâmico adequado e o não uso de drogas nefrotóxicas, pode ajudar a melhorar o prognóstico vital de COVID-19 (Cheng *et al.*, 2020; Ke *et al.*, 2021).

O sensoriamento biológico é uma ferramenta fundamental para a compreensão de sistemas vivos, sendo muito utilizados dispositivos analíticos enzimáticos (biossensores) para o monitoramento dessas alterações biológicas (Barros, 2017).

Os métodos laboratoriais mais usados para a dosagem de ureia baseiam-se em técnicas enzimáticas colorimétricas. A grande maioria emprega a enzima urease, que degrada a ureia (em íons amônio e CO₂), seguida de um processo analítico de quantificação do íon amônio pelo método espectrofotométrico. É nessa fase que há o monitoramento da variação cromática para a determinação dos valores de ureia (Dusse *et al.*, 2017).

Embora se encontrem disponíveis nos laboratórios os métodos enzimáticos e colorimétricos para a determinação da concentração de ureia, a técnica utilizada para quantificação por espectrofotometria, torna o processo caro e demorado, visto que o monitoramento da função renal em pacientes graves acometidos pela COVID – 19 precisam ser mais rápidos, já que a IRA está associada a maior mortalidade dos pacientes (Su *et al.*, 2020; Chan *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de novos biossensores para diagnóstico precoce, estratificação de risco e prognóstico de lesão renal tem sido um dos principais alvos das pesquisas envolvendo o sistema renal (Dusse *et al.*, 2017). Diante deste pressuposto, esta pesquisa propõe o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico de ureia com detector potenciométrico para auxiliar no monitoramento da insuficiência renal associada ao coronavírus SARS-CoV- 2.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 História do coronavírus

Recentemente, três novos vírus foram implicados em doença aguda grave e que são frequentemente fatais, nomeadamente Síndrome Respiratória Aguda Grave-Corona-Vírus (SARS-CoV), Síndrome Respiratória Aguda Grave-Corona-Vírus 2 (SARS-CoV-2) e Síndrome Respiratória do Oriente Médio- Corona-Virus (MERS-CoV) (Versteeg *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2020; Loforte *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2020; Ezhilan *et al.*, 2021).

Em dezembro 2019 um surto de pneumonia de causa desconhecida afetou alguns grupos de pacientes na cidade de Wuhan, na província de Hubei, na China, causando uma síndrome respiratória aguda grave. Posteriormente, os cientistas sequenciaram e reconheceram um novo β -coronavírus com RNA de fita única a partir do fluido de lavagem bronco alveolar de um paciente. Este novo coronavírus tem cerca de 86,5% de semelhanças com outros tipos de coronavírus, como o morcego-SL-COVZXC21 e morcego-SL-COVZC45 (Rocha *et al.*, 2020; Ezhilan *et al.*, 2021).

A doença causada pelo novo coronavírus descoberto foi denominada de COVID-19 que mais tarde foi identificado e denominado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus de SARS-CoV-2 (Bemtgen *et al.*, 2020; Long, C. *et al.*, 2020; Vogels *et al.*, 2020; Ezhilan *et al.*, 2021).

A transmissão do vírus entre humanos aumentou rapidamente, espalhando-se por quase todo o planeta. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou o surto de COVID-19 como uma pandemia em 12 de março de 2020 e está sendo considerado um dos maiores desastres de saúde (Bemtgen *et al.*, 2020; Vogels *et al.*, 2020).

Até Março de 2023, já se registra mais de 676.609.955 pacientes confirmados positivos para o novo coronavírus em todo o mundo, sendo mais de 6.881.955 de mortes devido à insuficiência respiratória aguda ou outras complicações respiratórias (Hopkins, 2023).

Devido ao avanço do surto de COVID-19 vários ensaios baseados com anticorpos estão sendo experimentados para detecção e diagnóstico da SARS-CoV-2. A escassez de capacidades e reagentes de testes moleculares baseados em laboratórios clínicos, fez com que várias empresas de testes para diagnósticos

estabelecessem e começassem a comercializar ferramentas rápidas e simples de usar para aprimorar a triagem de pacientes com COVID-19 (Versteeg *et al.*, 2007; Pandey, 2020; Priyadarshi *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2020; Wang, K. *et al.*, 2020).

Alguns dos testes de imunodiagnóstico pontual do COVID-19 são os kits de teste rápido, teste sorológico, RT-PCR e antígeno, que dependem do reconhecimento das proteínas virais SARS-CoV-2 em amostras respiratórias ou na identificação de anticorpos humanos presentes no sangue ou soro em resposta à infecção viral. No entanto, eles devem ser testados nos grupos e ambientes relevantes antes que tais avaliações possam ser aprovadas (Versteeg *et al.*, 2007; Pandey, 2020; Priyadarshi *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2020; Wang, K. *et al.*, 2020).

Embora dano alveolar difuso e insuficiência respiratória aguda sejam as principais características do COVID-19, o envolvimento de outros órgãos precisa ser explorado. Após infecção pulmonar, o vírus pode entrar no sangue, se acumular no rim, provocando danos às células renais residentes e causar uma Lesão Renal Aguda e conseqüentemente a insuficiência renal (IRA) (Cheng *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020).

2.2 Insuficiência renal

Os rins são órgãos presentes no sistema urinário e desempenham um papel importante no processo de homeostase, ou seja, de manter o equilíbrio hidroeletrólítico do corpo, com manutenção do pH e pressão arterial, através no processo de filtração do sangue que vai desde a reabsorção de água e sais minerais até a eliminação do excesso de água, sais minerais e das substâncias tóxicas do organismo a creatinina e ureia na forma de urina (Neves *et al.*, 2021). A Figura 1, ilustra o sistema urinário e sua função renal.

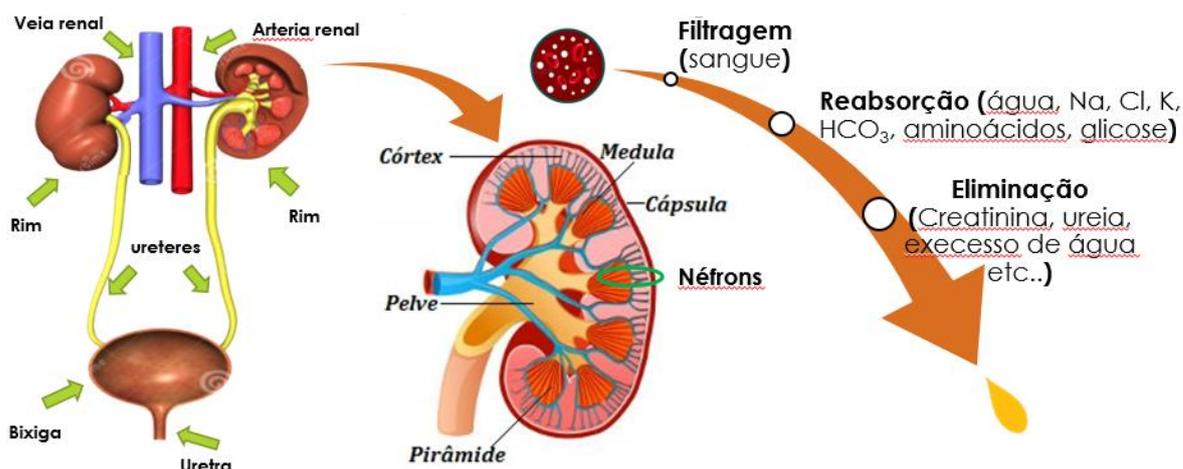


Figura 1 – Sistema urinário e função renal (Barros, 2017).

As doenças renais estão entre as causas mais importantes de óbito e incapacidade em diversos países do mundo. Alterações renais podem levar ao comprometimento multissistêmico, podendo acarretar distúrbios em diversos órgãos. As doenças renais graves podem ser divididas em duas categorias principais: (1) insuficiência renal aguda e (2) insuficiência renal crônica (Figura 2) (Crews *et al.*, 2019).

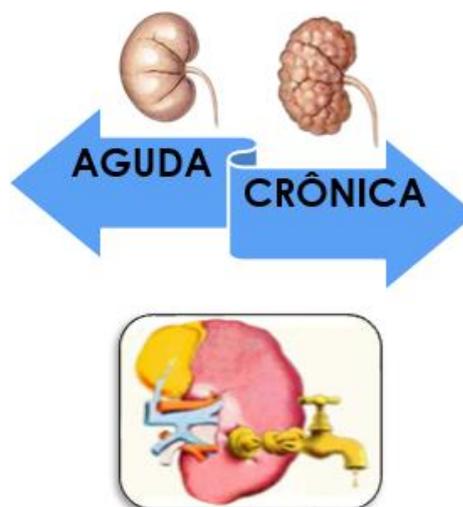


Figura 2 – Insuficiência renal: aguda e crônica (Barros, 2017).

Insuficiência renal aguda sendo a incapacidade, súbita, dos rins em filtrar as impurezas, resíduos, sais e líquidos do sangue. Os aumentos de resíduos alteram a composição química do sangue podendo levar, perigosamente, ao desequilíbrio na qual os rins subitamente param de funcionar de totalmente ou quase total, mas que podem em um período futuro recuperar o funcionamento quase normal. A Insuficiência renal crônica, na qual ocorre perda progressiva da função de um número crescente

de néfrons que, gradualmente e vão diminuindo a função geral dos rins de forma irreversível (Junior, 2018; Crews *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2020).

A doença, em fase aguda, pode ser reversível, dependendo do estado de saúde do paciente, rapidez no diagnóstico e implementação do tratamento adequado, entretanto, quando se torna crônica, a morbidade e mortalidade crescem, bem como os custos com terapias (Junior, 2018; Crews *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2020).

Os principais fatores de risco são: sedentarismo, hipertensão/hipotensão, diabetes, idade acima de 50 anos, fumantes, sobrepeso, doenças vasculares, hereditariedade, desidratação, trauma, internação prolongada e uso abusivo de medicação. Os pacientes podem apresentar sonolência, inapetência, fadiga, dispneia, confusão mental, inchaço nas pernas, tornozelos ou pés, náuseas, vômitos, dor ou aperto no peito e, em casos mais graves, convulsões ou coma (Junior, 2018).

A Doença Renal é um problema global de saúde pública que afeta mais de 750 milhões de pessoas em todo o mundo (Bikbov *et al.*, 2018). No mundo, a incidência da Doença Renal Crônica (DRC) gira em torno dos 24% a 48% em pessoas acima de 64 anos. Já no Brasil, este número supera os 10 milhões, onde 90 mil estão em diálise e a taxa de morbimortalidade chega a 12,77% (Crews *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2020).

O Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS) disponibiliza a diálise e hemodiálise como os tratamentos complexos para a IRC. Estima-se que, em 2013, o total de gastos do SUS com os tratamentos para IRC foram de R\$305.589.824,67, em 2014, de R\$ 343.252.964,84 e, em 2015, de R\$ 357.376.199,04, expressando tendência de crescimento no triênio 2013 a 2015. Ainda nesse contexto, no mesmo triênio, observou-se o aumento do número de internações pela doença que foi de 95.186 em 2013 para 102.110 em 2015. Percebe-se, então, os altos custos com os tratamentos e, conseqüentemente, uma necessidade de maiores investimentos governamentais destinados ao setor de saúde pública que refletem na economia do país (Alcalde e Kirsztajn, 2018; Souza *et al.*, 2020).

Os recursos diagnósticos utilizados para identificar o paciente com insuficiência renal são a avaliação da taxa de filtração glomerular (TFG), alterações parenquimatosas - o exame sumário de urina (EAS) e os exames de imagem, como a ultrassonografia, tomografia e ressonância magnética dos rins e vias urinárias (Brasil, 2021).

Uma parte importante do processo patológico é relativa aos efeitos renais que a COVID-19 pode apresentar. A Insuficiência renal aguda (IRA) é uma importante complicação da COVID-19, ocorrendo em 0,5-7% dos casos e em 2,9-23% dos pacientes em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (Cheng *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020; Wang, D. *et al.*, 2020).

Os potenciais mecanismos de dano renal nesses pacientes podem ser didaticamente classificados em: (i) dano estimulado por citocinas, (ii) crosstalk de órgãos e (iii) efeitos sistêmicos. Esses mecanismos estão profundamente interconectados e têm implicações importantes para a terapia (Ronco e Reis, 2020).

Conforme a Sociedade Brasileira de Nefrologia, os principais fatores de risco para a IR no Brasil são idade avançada, Diabetes Mellitus (DM) - nefropatia diabética, doenças cardiovasculares (insuficiência cardíaca, doença coronariana, doença vascular periférica) e Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS). À medida que a população brasileira envelhece, a prevalência de doenças renais, em especial a DRC, aumenta, o que demanda maiores investimentos nos tratamentos (Souza *et al.*, 2020).

Entre eles os renais crônicos, hipertensos, diabéticos, transplantados, idosos, anêmicos e portadores de doenças autoimunes estão mais propensos a sofrer prejuízos clínicos da resposta inflamatória ocasionada pela infecção de SARS-CoV-2. Sabe-se que uma das portas de entrada do vírus no hospedeiro é através da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2), presente em grandes quantidades, no coração e nos rins (Rodrigues *et al.*, 2020).

Pacientes, cuja morte foi à insuficiência respiratória associada à síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, apresentaram lesões difusas do túbulo proximal com perda da borda em escova, degeneração vacuolar não isométrica e até necrose franca. No exame ainda foram observados aglomerados de partículas semelhantes a coronavírus com pontas distintas no epitélio tubular e podócitos. Além disso, o receptor de SARS-CoV-2, ACE2 foi encontrado para ser regulado positivamente em pacientes com COVID-19, e a imunomarcagem com anticorpo nucleoproteína SARS-CoV foi positiva nos túbulos (Su *et al.*, 2020).

O tempo decorrido entre a detecção da SARS-CoV-2 no sangue e a ocorrência de IRA foi de aproximadamente sete dias. Os efeitos citopáticos do SARS-CoV-2 nos podócitos e nas células dos túbulos proximais podem causar IRA nos pacientes com COVID-19, especialmente em pacientes com presença do SARS-CoV-2 nas amostras de sangue (Pan *et al.*, 2020).

Pacientes infectados com SARS-CoV-2 são alvo de afecções renais, tropismo renal, entre outras complicações multiorgânicas. A insuficiência renal relacionada ao COVID-19 é relatada não apenas em pacientes com insuficiência renal crônica, mas também naqueles sem história prévia de doença renal (Soliman, 2021).

Finalmente o monitoramento da função renal pode apontar para o diagnóstico de doenças sob variadas situações clínicas, tomamos como exemplo a uremia, síndrome causada principalmente pelo acúmulo de ureia, e outros íons, no sangue, que são substâncias tóxicas produzidas no fígado após a digestão de proteínas, e que são, normalmente, filtradas pelos rins (Costa *et al.*, 2021; Ke *et al.*, 2021).

O seu diagnóstico precoce pode representar a prevenção da cura da doença e/ou evitar sua cronicidade. É necessário estar atento e monitorar precocemente a função renal para prevenir infecções acidentais (Costa *et al.*, 2021; Ke *et al.*, 2021).

Os biossensores são dispositivos que podem ser desenvolvidos para monitorar a concentração de analitos em amostras de fluídos biológicos e fornecer uma resposta com rapidez e alta sensibilidade, tanto em ambiente hospitalar como domiciliar. Os resultados podem ser facilmente analisados pelo usuário, como nos testes de gravidez, sendo uma das aplicações mais difundidas de biossensores portáteis (Ananias *et al.*, 2022).

2.3 Biossensores

A IUPAC define formalmente um sensor químico como sendo “um dispositivo que transforma informações químicas, variando da concentração de um componente específico da amostra até a análise da composição total, em um sinal analiticamente útil” e biossensores como “sensores químicos em que o sistema de reconhecimento utiliza um mecanismo bioquímico” (Ananias *et al.*, 2022; Botewad *et al.*, 2023).

Os biossensores são dispositivos analíticos que apresentam características que tornam as medidas mais rápidas, possibilidade de miniaturização, portabilidade, menor custo operacional, seletividade, bom limite de detecção, aplicações online e no campo de medição, por dispensarem elaborado pré-tratamento das amostras (praticidade), entre outras (Cardoso, 2016; Moreira *et al.*, 2017; Ananias *et al.*, 2022; Botewad *et al.*, 2023).

Esses dispositivos analíticos são constituídos por quatro componentes fundamentais: analito (elemento que deseja identificar e quantificar); bioreceptor

(elemento de reconhecimento biológico); transdutor (conversor de um sinal elétrico, químico ou mecânico em outro sinal correspondente) e o detector/processador (tornar o sinal visível, mensurável), capazes de converter a concentração de um analito em outro sinal proporcional a sua concentração, através da integração de um elemento biológico sensor com um transdutor (Cardoso, 2016; Moreira *et al.*, 2017; Ananias *et al.*, 2022).

Nas últimas décadas, muitos avanços tecnológicos importantes forneceram as ferramentas e materiais necessários para construir dispositivos biossensores. Desde a primeira invenção do sensor de eletrodo de oxigênio Clark, tem havido muitas melhorias na sensibilidade, seletividade e multiplexação da capacidade do biossensor moderno. Antes dos vários tipos de tecnologias de biossensores e aplicações serem discutidas, é importante compreender e definir "biossensor" (Bhalla *et al.*, 2016; Chadha *et al.*, 2022; Botewad *et al.*, 2023).

Um biossensor (Figura 3), consiste em analito, sendo a substância de interesse que precisa de detecção. O bioreceptor, uma molécula que reconhece especificamente o analito, alguns exemplos de bioreceptores são: as enzimas, células, aptâmeros, ácido desoxirribonucléico (DNA) e anticorpos. O transdutor um elemento que converte uma forma de energia em outra, seu papel é converter o evento de bio-reconhecimento em um sinal mensurável. A unidade processadora é a parte de um biossensor que processa o sinal transduzido e o prepara para exibição (Bhalla *et al.*, 2016; Chadha *et al.*, 2022; Botewad *et al.*, 2023).

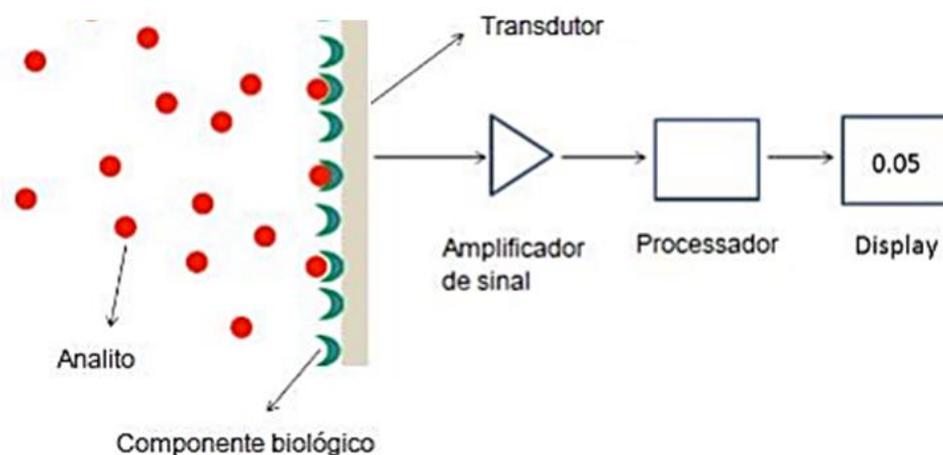


Figura 3 – Configuração de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais (Pastusiak, 2021).

Atualmente, os biossensores são majoritariamente empregados na área da saúde para diagnosticar, tratar e monitorar doenças usando amostras de sangue, urina e saliva. Além disso, são vastamente aplicados em testes de gravidez e fertilidade, detecção de microrganismos causadores de doenças (vírus, bactérias e fungos) e biomarcadores (Troponina I, homocisteína, glypican-1) (Faria e Zucolotto, 2019; Carneiro *et al.*, 2020; Ananias *et al.*, 2022).

Os biossensores apresentam três principais vantagens em relação a outras técnicas: são extremamente simples, rápidos e portáteis. Que somadas a outras, como a alta especificidade e baixos limites de detecção, fazem com que esse tipo de sensor represente uma das mais proeminentes tecnologias para inúmeras análises, tais como a de vírus, análise forense, monitoramento ambiental, detecção de contaminantes em alimentos, de alergênicos em alimentos, de armas biológicas, de explosivos, de marcadores de câncer, entre outras (Faria e Zucolotto, 2019; Carneiro *et al.*, 2020; Ananias *et al.*, 2022).

Os biossensores desempenham um papel muito importante na vida moderna e os números mostram que eles ficarão ainda mais presentes no cotidiano das pessoas, aumentando a qualidade e a expectativa de vida (Faria e Zucolotto, 2019; Carneiro *et al.*, 2020; Ananias *et al.*, 2022).

2.3.1 Classificação dos biossensores

Existem certos atributos estáticos e dinâmicos que cada biossensor possui. A otimização dessas propriedades se reflete no desempenho do biossensor, como a seletividade, reprodutibilidade, estabilidade, sensibilidade, linearidade (Bhalla *et al.*, 2016; Chadha *et al.*, 2022).

Os biossensores podem ser classificados pelo tipo de mecanismo de sinalização que utilizam (bioreceptor, sinal biológico) e/ou pelo tipo de sinal transdução que eles empregam, (Chadha *et al.*, 2022). Como ilustrados na Figura 4.

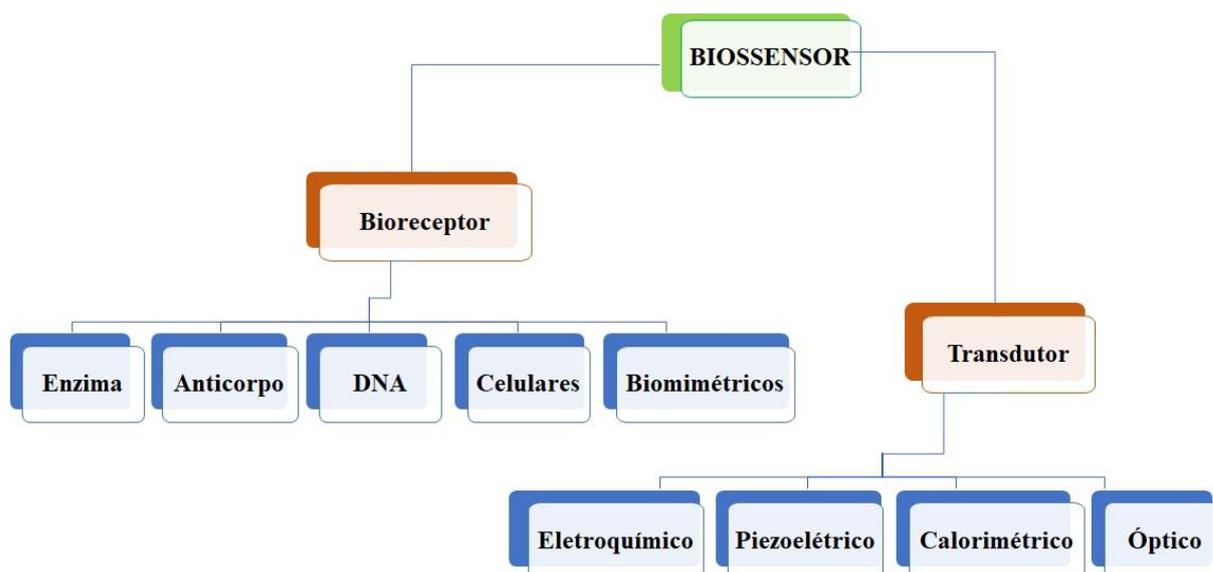


Figura 4 – Classificação dos biossensores.

Com base no mecanismo de sinalização do sinal biológico (bioreceptor), os biossensores podem ser classificados em **enzimáticos**, imonubiossensores (anticorpo), DNA, celulares e biomimético. Já quanto ao mecanismo de sinalização do sinal de transdução os biossensores podem ser classificados em **eletroquímico**, piezoelétrico, calorimétrico e óptico (Pastusiak, 2021; Chadha *et al.*, 2022).

Os biossensores enzimáticos são dispositivos que utilizam como elemento de reconhecimento biológico as enzimas, sendo catalizadores biológicos altamente específicos e seletivos, como a oxidase de glicose utilizada na medição de glicose no sangue. Além do uso de oxidase de glicose, várias outras enzimas são utilizadas na construção de biossensores, tais como a urease, a penicilinase e a dehidrogenase de álcool (Cardoso, 2016; Naresh e Lee, 2021; Chadha *et al.*, 2022).

Os biossensores eletroquímicos consistem de dois componentes - um elemento biológico que reconhece o analito alvo e o transdutor que converte o sinal gerado entre o elemento biológico e analito em um sinal mensurável. Os biossensores eletroquímicos podem ser de três tipos: potenciométrico, amperométrico e condutimétrico (Cardoso, 2016; Naresh e Lee, 2021; Chadha *et al.*, 2022).

2.3.1.1 Biossensor enzimático

A maioria dos biossensores desenvolvidos utiliza como componente biológico enzimas, em geral imobilizadas. As enzimas são biocatalisadores eficientes

específicos e seletivos, que têm a capacidade para reconhecer especificamente seus substratos e catalisar. Essas propriedades únicas tornam as enzimas ferramentas poderosas para desenvolver dispositivos analíticos (Cardoso, 2016; Naresh e Lee, 2021; Chadha *et al.*, 2022).

Enzimas são, em sua maioria, proteínas de elevado peso molecular, com propriedades catalíticas específicas presentes em todos os seres vivos. Elas possuem uma estrutura tridimensional complexa de uma ou várias cadeias polipeptídicas. Como outros catalisadores elas aceleram as reações promovendo o alcance do equilíbrio sem alterá-las, através da diminuição da energia de ativação. Além da sua função catalítica, enzimas são caracterizadas por sua alta especificidade. Elas catalisam uma certa espécie de reação química com um único reagente ou um número de reagentes estruturalmente similares. Dessa forma, a razão principal para o amplo uso de enzimas em biossensores envolve sua “especificidade” e suas propriedades catalíticas (Queiroz e Sousa, 2020).

Comparados com os catalisadores químicos, as enzimas apresentam um alto nível de especificidade com o substrato, devido principalmente à ligação forte na molécula de substrato pelo seu sitio ativo envolvendo fatores do meio ambiente reacional tais como, tamanho da molécula substrato, polaridade, grupos funcionais ligados e relativa energia de ligação (Queiroz e Sousa, 2020).

Idealmente, a ação catalítica da enzima pode ser influenciada por vários fatores, como a concentração do substrato, presença de um competitivo e não competitivo inibidor, variação das condições físico-químicas do meio reacional como temperatura, pressão e pH que garantam a manutenção da atividade enzimática. Esses fatores favorecem para uma baixa estabilidade da enzima no substrato (Queiroz e Sousa, 2020).

Os biossensores podem ser definidos em biocatalíticos e de bioafinidade, dependendo do mecanismo de interação entre o elemento biológico e o analito. Os biossensores biocatalíticos se baseiam nas reações catalisadas pelo componente biológico, três estratégias podem ser utilizadas, por meio do consumo do elemento biológico, da reciclagem de um dos produtos da reação e pela detecção do estado do centro ativo redox biocatalítico na presença do substrato (Barros, 2017).

Nos biossensores de bioafinidade, a operação é baseada na interação do analito com o material biológico através da ligação química entre macromoléculas, ou

moléculas automontadas. Assim, o equilíbrio é alcançado sem o consumo do analito pela molécula biológica imobilizada, formando um composto estável (Barros, 2017).

Existem vários componentes biológicos com potencial a serem utilizados em sistemas de biossensores, tais como: micro-organismos, anticorpos, ácidos nucleicos, células, organelas, enzimas, proteínas entre outros fixados no transdutor por diferentes técnicas (Cardoso, 2016; Barros, 2017; Naresh e Lee, 2021; Chadha *et al.*, 2022).

2.3.1.2 Biossensor eletroquímico

Um biossensor eletroquímico é um sistema autônomo integrado, que pode fornecer dados quantitativos específicos ou informação analítica semiquantitativa usando um elemento de reconhecimento (receptor bioquímico) mantido em contato espacial direto com uma transdução eletroquímica (Naresh e Lee, 2021; Pastusiak, 2021).

O princípio básico de funcionamento dos biossensores eletroquímicos está na ocorrência de reações químicas, entre o elemento de reconhecimento biológico (bioreceptor) e o analito alvo, produzindo ou consumindo íons ou elétrons, os quais afetam as medições elétricas da solução, como a corrente elétrica ou potencial (Naresh e Lee, 2021; Pastusiak, 2021).

Os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos em quatro categorias dependendo da natureza das mudanças eletroquímicas detectadas durante um evento de biorreconhecimento, sendo eles amperométrico, potenciométrico e condutimétrico (Naresh e Lee, 2021; Pastusiak, 2021).

Biossensores amperométricos: são baseados na medição de corrente em função do tempo resultante da oxidação e redução de uma espécie eletroativa em uma reação bioquímica que depende principalmente da concentração de um analito com um potencial fixo (Naresh e Lee, 2021; Pastusiak, 2021).

Biossensores potenciométrico: dependem do uso de um íon seletivo eletrodo e transistor de efeito de campo sensível a íons para obter a informação analítica. Em tais sensores, o biológico elemento de reconhecimento converte o processo de reconhecimento em um sinal potencial para fornecer um sinal analítico. Em geral, são formados por dois eletrodos um de referência e outro seletivo (sensor),

que se baseiam na produção de um potencial significativo no eletrodo de íons seletivos, devido ao acúmulo de carga na superfície do eletrólito (Pastusiak, 2021).

Nesse contexto, o bioreceptor consome ou produz espécies químicas fortemente polares ou íons, em decorrência da reação química (catálise), e essas espécies químicas são detectadas pelo eletrodo de íons seletivos sendo transformadas em um sinal possível de ser lido e determinado (Cardoso, 2016; Naresh e Lee, 2021; Pastusiak, 2021).

Biossensores condutimétricos: se baseiam na medição da condutância gerada pelas reações catalíticas das soluções, produzindo ou consumindo espécies químicas que alteram a condutividade global da solução (Cardoso, 2016; Naresh e Lee, 2021).

Neste método, a informação analítica é obtida por medir a condutividade do eletrólito, que varia com mudanças na concentração das espécies iônicas. Em outras palavras, a transdução com base condutométrica fornece informações sobre a capacidade de uma solução eletrolítica de conduzir uma corrente elétrica entre eletrodos (Cardoso, 2016; Pastusiak, 2021; Chadha *et al.*, 2022).

2.3.2 Componentes dos biossensores

Os dispositivos analíticos são constituídos pelo analito, bioreceptor, transdutor e o detector/processador. Na construção de biossensores o analito se apresenta como o elemento que se deseja identificar e quantificar. Normalmente este é combinado com um elemento biológico fornecendo informações confiáveis sobre o analito de interrogatório (Cardoso, 2016; Moreira *et al.*, 2017; Naresh e Lee, 2021; Chadha *et al.*, 2022).

O bioreceptor ou elemento de reconhecimento biológico é a característica distintiva significativa de um biossensor, ele tem a função de reconhecer, interagir e traduzir informações do domínio bioquímico, geralmente a concentração de um analito, em um sinal de saída químico ou físico com uma sensibilidade definida. O principal objetivo do sistema de reconhecimento é fornecer ao sensor um alto grau de seletividade para o analito a ser medido. Embora todos os biossensores sejam mais ou menos seletivos (não específicos) para um analito particular, alguns são, por design e construção, apenas específicos de classe, uma vez que usam classe de

enzimas, por ex. biossensores de compostos fenólicos, ou todo células, por ex. usado para medir a demanda de oxigênio biológico (Pastusiak, 2021).

A parte do transdutor do sensor serve para transferir o sinal do domínio de saída do reconhecimento sistema, principalmente para o domínio elétrico. Por causa do significado geral da palavra, um transdutor fornece transferência de sinal bidirecional (não elétrico para elétrico e vice versa); a parte do transdutor de um sensor também é chamada de detector, sensor ou eletrodo, mas o termo transdutor é preferível para evitar confusão (Pastusiak, 2021).

O transdutor tem a função de converter de forma mensurável um evento de reconhecimento biológico em um sinal elétrico direto gerado pela interação entre o elemento biológico e o analito alvo. Conforme o princípio de energia envolvida na transdução, são classificados em quatro classes: eletroquímicos (eletrólise de espécies que sofrem oxidação-redução), óticos (medida da luminescência ou fluorescência), piezelétricos (alteração de massa e/ou micro viscosidade) e térmicos (absorção ou emissão de radiação eletromagnética) (Barros, 2017; Pastusiak, 2021; Chadha *et al.*, 2022).

O detector potenciométrico é a parte de um biossensor que processa o sinal transduzido e o prepara para exibição. Ele consiste em um circuito eletrônico complexo que realiza o condicionamento do sinal, como amplificação e conversão de sinais analógicos para a forma digital. Os sinais processados são então quantificados pela unidade de exibição do biossensor e enviados ao display que consiste em um sistema de interpretação do usuário, como o display de cristal líquido de um computador ou uma impressora direta que gera números ou curvas compreensíveis pelo usuário. Esta parte geralmente consiste em uma combinação de hardware e software que gera resultados do biossensor de uma maneira amigável. O sinal de saída no display pode ser numérico, gráfico, tabular ou uma imagem, dependendo dos requisitos do usuário final (Bhalla *et al.*, 2016; Naresh e Lee, 2021).

A construção de biossensores para a detecção de ureia é crucial para a saúde humana, uma vez que a concentração de ureia no sangue e na urina atua como um indicador de doenças renais. Para isto, é necessário a presença de um elemento biológico com função de reconhecer e interagir seletivamente com o analito, fornecendo assim um sinal que será convertido em um transdutor e interpretados por um detector (Costa *et al.*, 2021; Ke *et al.*, 2021).

2.3.2.1 Analito - ureia

A ureia (Figura 5) é um composto orgânico, cristalino, incolor, tóxica, formada principalmente no fígado, filtrada e excretada principalmente pelos rins e eliminada na urina e no suor, composto por duas moléculas do grupo funcional amino (-NH₂) ligado por um grupo funcional carbonilo (C = O), um importante produto natural que constitui a etapa final do metabolismo das substâncias nitrogenadas no organismo de mamíferos sendo excretada principalmente pelos rins (Nelson e Cox, 2018; Ozbek *et al.*, 2022).

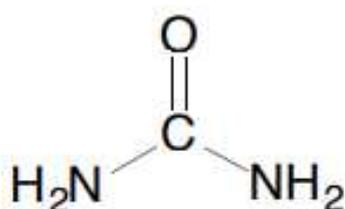


Figura 5 – Estrutura química da ureia.

Os valores de referência da ureia variam entre 15 e 45mg/dL. Concentração excessiva de uréia é responsável por doenças como indigestão, acidez, úlceras, câncer, mau funcionamento dos rins, insuficiência renal, obstrução do trato urinário, desidratação, choque, queimaduras, sangramento gastrointestinal e assim por diante. Além disso, abaixo do nível normal pode causar insuficiência hepática, síndrome nefrítica e caquexia. (Junior, 2018; Nelson e Cox, 2018; Ozbek *et al.*, 2022; Botewad *et al.*, 2023).

2.6.3.2 Bioreceptor - Urease

A urease é um grupo de enzimas altamente proficientes, amplamente distribuídas na natureza produzida por bactérias, plantas, fungos, algas e invertebrados e possui função catalítica de hidrolisar a ureia, formando como produto final ácido carbônico e amônia, aumentando o pH do meio como efeito da reação (Pacheco e Colla, 2019).

A estrutura da enzima urease contém dois íons de níquel separados por uma distância de 3,5-3,7 Å ligados por uma lisina carbamilada. Quatro moléculas de água/hidróxido constituem um aglomerado tetraédrico no sítio ativo, um destes (B) liga simetricamente os dois íons Ni, proposto na forma de hidróxido. Um dos íons de níquel

(Ni1) é coordenado por duas histidinas e uma molécula de água adicional H₂O (1) formando uma geometria piramidal quadrada distorcida, como observadas na Figura 6. A coordenação do níquel (Ni₍₂₎) é semelhante à do (Ni₍₁₎) e inclui dois resíduos de histidina, uma molécula de água adicional H₂O (2) e um aspartato ligado terminalmente resultando em um ambiente pseudo-octaédrico. A quarta água H₂O (3) não está envolvida em nenhuma ligação de coordenação com o Ni, mas é parte de uma rede de ligações de hidrogênio completando um grupo tetraédrico (Kafarski e Talma, 2018; Kappaun *et al.*, 2018; Mazzei *et al.*, 2019; Pacheco e Colla, 2019; Mazzei *et al.*, 2020).

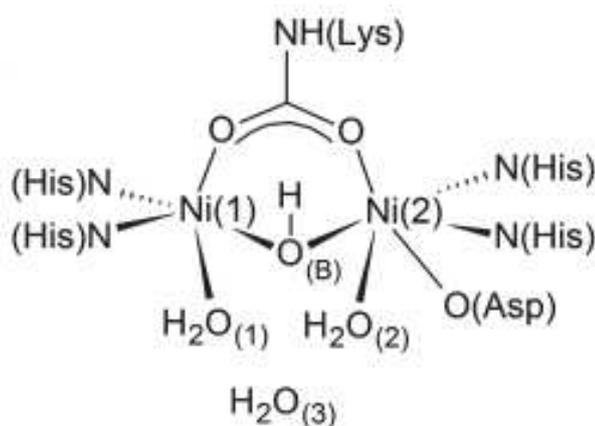


Figura 6 – Estrutura da enzima urease (Pacheco e Colla, 2019).

A função catalítica da urease é a hidrólise da ureia, produzindo ácido carbâmico e amônia, mecanismo proposto na (Figura 7). A hidrólise dos produtos da reação induz um aumento geral do pH que tem implicações negativas tanto na saúde humana e animal. Elas são sintetizadas por inúmeros organismos, incluindo plantas, bactérias, algas, fungos e invertebrados, e também ocorrem em solos como enzima do solo (Cardoso, 2016; Mazzei *et al.*, 2019).

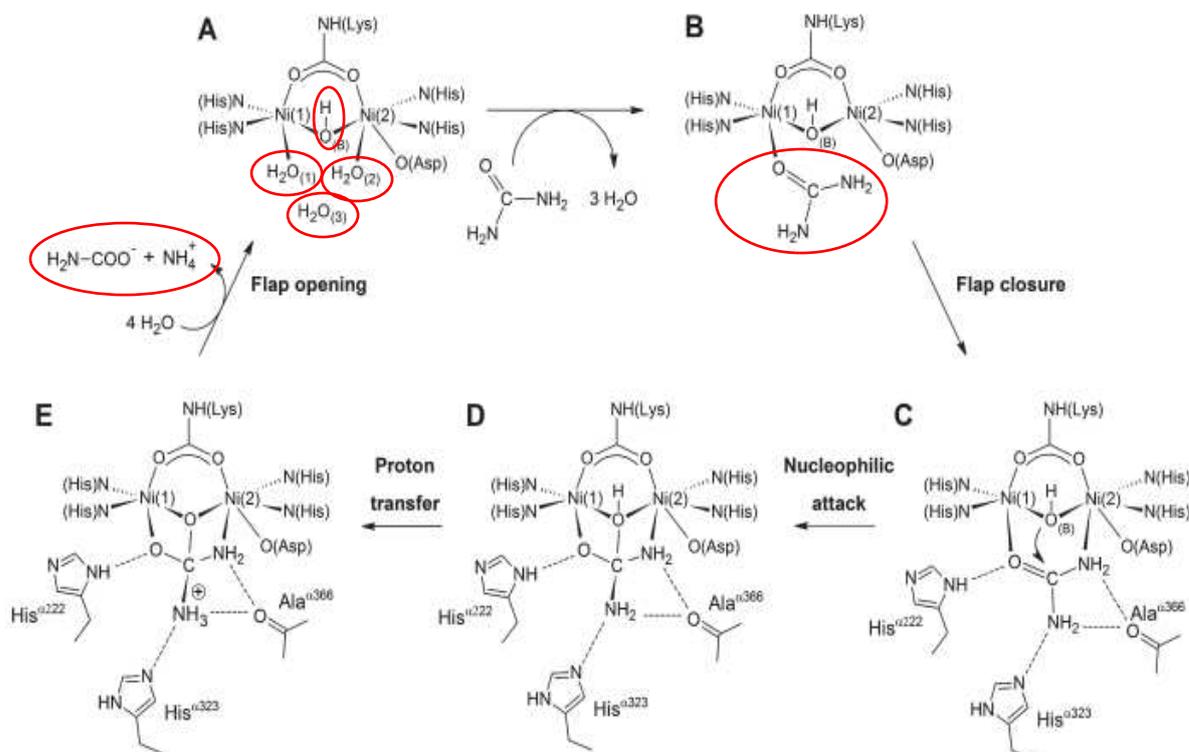


Figura 7 – Mecanismo de catálise da ureia pela urease (Zambelli *et al.*, 2011).

O mecanismo envolve um estado hidratado da enzima (Figura 7A) que, após a entrada da ureia, quando a aba é aberta, evolui para dar um substrato inicial ligado no intermediário (Figura 7B). A ureia se liga ao Ni (1) usando o carbonil oxigênio deslocando as moléculas de água, permitindo o fechamento da aba e facilitando coordenação da ureia para o segundo Ni (2) através de seu grupo NH_2 , estabilizado por uma rede de ligação H específica (Figura 7C). Nesta ligação situação, o átomo de carbono da ureia sofre o processo nucleofílico ataque pelo hidróxido de ligação Ni^{2+} , cujas ligações com os íons metálicos foram enfraquecidas pela ligação do substrato, levando ao intermediário tetraédrico (Figura 7D) (Kafarski e Talma, 2018; Mazzei *et al.*, 2020).

O grupo OH^- de ponte de níquel, agora parte de um diamino, fração (hidroxi) metanolato e, portanto, muito ácida, podendo transferir o átomo de hidrogênio para o grupo NH_2 de ureia distal. Este evento pode ocorrer através do átomo de oxigênio próximo do Aspartato ligado ao Ni (2) (Kafarski e Talma, 2018; Mazzei *et al.*, 2020).

A cadeia lateral de imidazol neutra do sítio ativo conservou o resíduo de histidina, movendo-se para mais perto do sítio ativo após fechamento do retalho, estabiliza o grupo $C-NH_3^+$ (Esquema 5E). A ligação C-N distal está quebrada, a

amônia está liberada, e o carbamato resultante se decompõe em NH_4^+ e bicarbonato. A abertura da aba pode facilitar a liberação de produtos e permitir que a água em massa reidrate o sítio ativo para produzir o estado nativo da enzima (Figura 7A). Essas etapas podem ocorrer de maneira combinada. Este mecanismo está de acordo com todos os dados de cinética (Kafarski e Talma, 2018; Mazzei *et al.*, 2020).

Na fabricação de biossensores as enzimas são componentes de extrema importância como elementos de reconhecimento biológico pela alta sensibilidade e seletividade que as reações enzimáticas apresentam. A sua imobilização no transdutor, de forma estável, mantendo suas propriedades físico-químicas de reconhecimento é um dos pontos fundamentais na construção de um biossensor (Nelson e Cox, 2018; Ozbek *et al.*, 2022).

2.6.3.3 Feijão de porco como fonte de urease

O Brasil constitui uma grande variedade de tecidos vegetais (Tabela 1), ricos em enzimas que podem ser utilizados na construção de biossensores, eles apresentam propriedade analíticas específicas para o seu uso, além de baixo custo e fácil extração. O tempo de vida desses tecidos que contém enzimas é muito maior em relação ao tempo de vida de enzimas purificadas, melhorando o custo benefício (Soares, 2011; Barreto *et al.*, 2023).

O feijão de porco (*urease from Canavalia ensiformis (Jack bean)*) é uma leguminosa cultivada em regiões tropicais e equatoriais. O valor principal dessa espécie consiste na sua notável rusticidade e adaptação aos solos de baixa fertilidade com a propriedade de imediatamente enriquecê-los. É recomendada para adubação verde, no começo da floração, aproximadamente três meses após o plantio. Estudos fitoquímicos mostram que o feijão de porco apresenta uma série de compostos, como: saponinas, terpenóides, alcalóides e taninos. Além disso, extratos de diversas regiões das plantas têm apresentado potencial atividade herbicida e fungicida (Soares, 2011; Kappaun *et al.*, 2018; Barreto *et al.*, 2023).

Diversos trabalhos utilizam esse tecido vegetal como fonte da enzima urease com aplicações em diversas áreas, dentre elas, a construção de biossensores para ureia (Soares, 2011; Kappaun *et al.*, 2018; Barreto *et al.*, 2023).

Tabela 1 – Principais tecidos utilizados para extração de enzimas

Analito	Tecido enzimático	Elemento sensível
Piruvato	Milho	CO ₂
Ureia	Feijão de porco	NH ₃
Fosfato	Batata	O ₂
Dopamina	Banana	O ₂
Tirosina	Beterraba	O ₂
Cisteína	Pepino	NH ₃
Catecol	Abacate, abobrinha	O ₂ /H ₂ O ₂

Fonte: Soares (2011)

2.6.3.4 Imobilização do Componente Biológico

As enzimas são biocatalisadoras que possuem alta especificidade para catalisar reações químicas nos biossensores, são solúveis em água e funcionam em meio aquoso. No entanto, a falta de estabilidade a longo prazo e a dificuldade de reutilização em condições de processo as tornam inviáveis para seu uso. Portanto, o uso como componente biológico de biossensores, insolubilização (ou seja, imobilização) é uma etapa obrigatória para garantir que os processos biotecnológicos sejam mais favoráveis, práticos e econômicos (Muguruma, 2018; Zakaria *et al.*, 2021).

A imobilização fornece suporte para as enzimas, sendo uma técnica especialmente projetada para limitar o seu movimento. Enzimas podem ser física ou quimicamente confinadas ou localizadas em uma região definida de espaço, enquanto retêm atividades catalíticas que podem ser usadas repetida e continuamente (Mohamed *et al.*, 2016).

O processo de imobilização ocorre diretamente na superfície do eletrodo (transdutor), ou no eletrodo via matriz, em qualquer caso podem ser utilizados os processos de, adsorção, ligação covalente, aprisionamento, encapsulamento e ligação covalente cruzada (Mohamed *et al.*, 2016).

A adsorção física é o método mais simples e o mais empregado para imobilização de enzimas. Nesse caso, o biocatalisador é estabilizado por interações fracas com o suporte como forças de Van Der Waals (interações hidrofóbicas), pontes de hidrogênio e ligações iônicas. As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura

conformacional da enzima é pouco alterada. A grande desvantagem é a dessorção da enzima devido às variações de temperatura, pH e força iônica (Muguruma, 2018).

A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Esta técnica não é comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção (Cardoso, 2016; Cavalcanti *et al.*, 2022).

A imobilização por aprisionamento funciona como uma armadilha, as enzimas são retidas nas matrizes porque seu tamanho de malha é menor do que a molécula de enzima, a vantagem é a não modificação da enzima. A desvantagem é a taxa de resposta por barreira de difusão (Muguruma, 2018).

A encapsulação consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa constituída geralmente por polímeros entrecruzados como poliacrilamida, gelatina, alginato, carragenana, resinas de poliuretano e silanos. As principais vantagens da encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato e da enzima no interior de um volume relativamente pequeno, e à possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa (Muguruma, 2018).

A ligação covalente cruzada é o método de imobilização que se baseia na formação de uma rede tridimensional de ligações covalentes, formada entre o agente de reticulação e a enzima. Este método tem como vantagem a ligação entre o transdutor e a enzima através do agente de ligação covalente ou do agente de reticulação. A desvantagem é que esta ligação (transdutor/enzima) pode introduzir barreiras dificultando o processo de difusão, levando a um tempo maior de resposta do biossensor (Cardoso, 2016; Camilo, 2019) .

Para o processo de imobilização dos elementos biológicos em transdutores podem ser utilizados diversos materiais, entretanto, as matrizes poliméricas como: gelatinas, poliacrilamida, colágeno, triacetato de celulose e alginato são as mais utilizadas no desenvolvimento dos biossensores enzimáticos, devido as suas propriedades físico-químicas, biológicas e disponibilidade (Cavalcanti *et al.*, 2022).

A interação entre o analito e o elemento biológico imobilizado em contato com um transdutor gera outro sinal físico que pode ser medido de forma mensurável e convertido por um detector (Bhalla *et al.*, 2016).

2.6.3.5 Cinética enzimática

A cinética enzimática é a velocidade com que o substrato é convertido em produto de acordo com o tempo, o seu estudo é importante para se compreender as propriedades gerais das enzimas, bem como o seu mecanismo de ação. Os parâmetros cinéticos são usados para comparar as atividades das enzimas através do aumento ou redução da velocidade da reação (Nelson e Cox, 2018).

Leonor Michaelis e Maud Menten publicaram um artigo em 1913, que originou uma teoria de mecanismo geral da atividade enzimática, bem como a cinética dessas reações para explicar ação das enzimas em um substrato. Esse mecanismo ficou conhecido como “mecanismo de Michaelis-Menten” (Moreira *et al.*, 2019)

A teoria de Michaelis - Menten explica que uma enzima (E) ao se combinar com um substrato (S), forma um complexo intermediário (ES) com constante de velocidade direta K_1 e inversa K_{-1} . Em seguida, este complexo se quebra para formar o produto (P) e regenerar a enzima com constante de velocidade direta K_2 . Para uma reação enzimática, envolvendo apenas um substrato tem-se a seguinte expressão geral de reação (equação 1) (Nelson e Cox, 2018; Moreira *et al.*, 2019).



A medida que a concentração aumenta, a atividade catalítica de uma concentração fixa de uma enzima aumenta de uma forma hiperbólica, aproximando-se de uma velocidade máxima (V_{max}) quando toda enzima está presente na forma de (ES); e em função de K_m , a constante de Michaelis - Menten, que é a concentração do substrato na qual a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima, ou seja, a metade dos sítios ativos da enzima está preenchida por moléculas do substrato, logo temos as duas equações (2) e (3), respectivamente (Nelson e Cox, 2018; Moreira *et al.*, 2019).

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \quad (3)$$

O valor de K_m é muito variável, para a maioria das enzimas, ela depende do tipo de substrato e em condições ambientais, tais como pH, temperatura, força iônica, e de outras condições da reação. No entanto, ele situa-se geralmente entre 10^{-1} M e 10^{-7} M (Machado e Gomes, 2019; Moreira *et al.*, 2019; Pacheco e Colla, 2019).

Os valores de K_m e de $V_{m\acute{a}x}$ podem ser obtidos a partir do gráfico da velocidade de reação em função da concentração do substrato, como mostra na Figura 8.

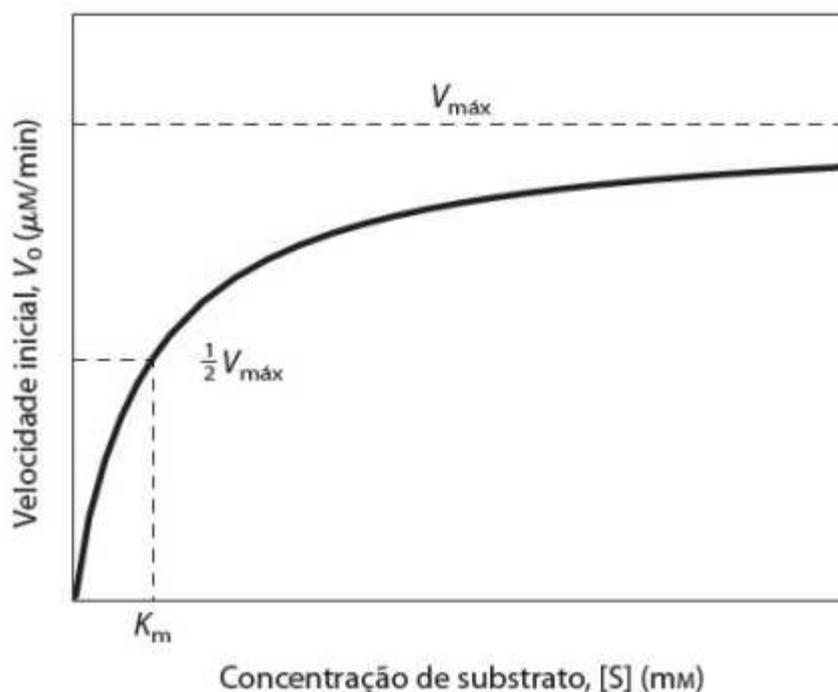


Figura 8 –Velocidade de uma reação enzimática em função da concentração do substrato (Nelson e Cox, 2018).

O valor de K_m irá indicar o grau de afinidade da enzima pelo substrato, ou seja, quanto menor o valor de K_m , maior será a afinidade da enzima pelo substrato. No caso de biossensores, o valor de K_m é um parâmetro quantitativo importante que não depende da concentração de enzima (Nelson e Cox, 2018; Machado e Gomes, 2019).

A equação de Michaelis - Menten pode ser transformada algebricamente em outras equações que são mais úteis para a análise dos dados cinéticos experimentais. A linearização da equação de Michaelis - Menten é uma representação dos duplos recíprocos, também chamada representação de Lineweaver – Burk, equações (4) e (5) (Nelson e Cox, 2018; Machado e Gomes, 2019).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{m\acute{a}x}[S]} \quad (4)$$

Rearranjando a equação (4), temos:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (5)$$

Dessa forma, a equação de Michaelis - Menten pode ser reescrita para que os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ sejam obtidos graficamente. Ao traçar um gráfico de $(1/V_0)$ versus a recíproca da concentração inicial $(1/[S])$, fornece uma linha com inclinação K_m/V_{max} (coeficiente angular) em um gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk. O ponto onde essa linha intercepta a ordenada $(1/V_0)$ é igual a $1/V_{m\acute{a}x}$ (coeficiente linear), o ponto de intersecção na abscissa $(1/[S])$ é igual a $-1/K_m$, Esse é a chamada de equação de Lineweaver - Burk como mostra a Figura 9 (Nelson e Cox, 2018; Machado e Gomes, 2019).

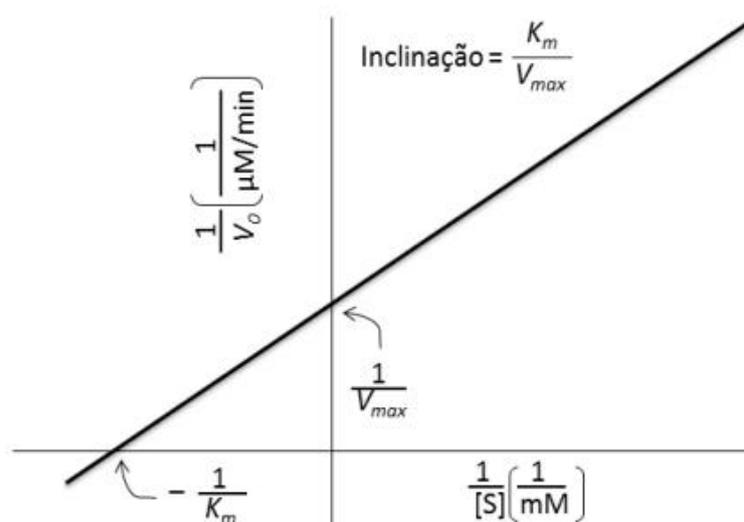


Figura 9 – Gráfico duplo-recíproco de Lineaweaver-Burk (Nelson e Cox, 2018).

2.6.3.6 Transdutor

Um componente fundamental para os biossensores, trata-se do transdutor, responsável por transformar e conduzir os sinais gerados devido às reações entre analito alvo e biorreceptor (Pastusiak, 2021).

Os transdutores eletroquímicos (potenciométricos) são os mais comuns e estudados para os biossensores, isso baseado no fato de que durante o processo de

biointeração, as espécies eletroquímicas (elétrons) são consumidas ou geradas, produzindo assim um sinal eletroquímico (Cardoso, 2016; Barros, 2017).

O princípio das medidas potenciométricas é desenvolver potenciais sobre um eletrodo pelo acúmulo de cargas, aumentando assim a densidade de carga na superfície de um eletrodo. Este processo ocorre pela medida do potencial de célula eletroquímica na ausência de uma corrente apreciável. A diferença de potencial desenvolvida entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência é proporcional ao logaritmo da atividade, ou concentração da espécie analítica (Pastusiak, 2021).

Os materiais utilizados para formação desses diferentes transdutores dependem do tipo de energia envolvida na transdução e das propriedades intrínsecas dos materiais podendo ser: metálicos (ouro, platina, prata, níquel, cobre, antimônio, ligas etc.), poliméricos (polianilina – PANI, polipirrol, politiofeno etc.) e cerâmicos (titanato de bário, titanato zirconato de chumbo, óxido de zinco etc.) (Cardoso, 2016).

Os metais são materiais condutores caracterizados por diversas grandezas, dentre as quais se destacam a condutividade ou resistividade elétrica, coeficiente de temperatura, condutividade térmica, potencial de contato, comportamento mecânico, etc. Estas grandezas são importantes na escolha adequada dos materiais, uma vez que, a partir dessas são avaliadas se são capazes de desempenhar as funções que lhe são atribuídas (Callister e Rethwisch, 2020).

Após o transdutor converter o evento biológico em um sinal elétrico, se faz necessário o uso de um detector/processador para que o sinal possa ser amplificado e transferido para um monitor ou dispositivo, onde é feita a visualização e interpretação dos dados (Bhalla *et al.*, 2016).

2.6.3.7 Detector potenciométrico

Os dispositivos eletrônicos apresentam uma grande diversidade de configurações e um número enorme de aplicações, entretanto, o objetivo final da maioria dos projetos é o desenvolvimento de um sistema de análise totalmente portátil e automatizado, com capacidade de processamento rápido entre a inserção da amostra e a obtenção exata do resultado da análise, explorando a capacidade de integração de vários componentes e operações analíticas em uma única plataforma miniaturizada (Agustini, 2018).

O desenvolvimento de biossensores portáteis e totalmente integrados possibilita a realização da transição dos sistemas fabricados em laboratório para a aplicação em campo. Entretanto, até pouco tempo atrás, os dispositivos construídos necessitavam de componentes elétricos, mecânicos e ópticos complexos. Com o advento, nos últimos anos, dos módulos eletrônicos universais em miniatura, foi possível a fabricação de biossensores portáteis mais simples, com um menor custo, um maior nível de automação e um alto volume de informações coletadas (Agustini, 2018).

Os módulos eletrônicos universais miniaturizados são caracterizados por serem unidades programáveis genéricas de fonte aberta e tecnologia, com custos acessíveis e com uma implementação simples, dispensando conhecimento especializado em eletrônica, requerendo apenas a leitura de tutoriais sobre a sua instalação e utilização. Circuitos integrados, placas de prototipagem, microcontroladores e arranjo de portas programáveis são alguns dos exemplos de módulos eletrônicos universais. Dentre eles, destacam-se os microcontroladores Arduino, Teensy, Raspberry Pi e Beagle Bone, devido a sua versatilidade e alta precisão, além de serem prontamente programados através de linguagens de alto nível, como C, C++, JavaScript ou Python e poderem ser conectados com smartphones e redes de teleinformática (Agustini, 2018).

O detector potenciométrico construído a partir de microcontroladores como o Arduino nano, apresenta facilidades, pois, se utiliza de um sistema de código aberto de fácil programação, é baseada no microcontrolador Microchip ATmega328P e desenvolvida pela Arduino.cc. Esta placa está equipada com conjuntos de pinos de entrada / saída digitais e analógicos que podem ser conectados a várias placas de expansão e outros circuitos, facilitando a aquisição de sinais de corrente e potência, permitindo o processamento e visualização dos dados de um determinado analito presente na amostra que se deseja identificar (ARDUINO UNO, 2021).

2.3.3 Biossensores descartáveis

A utilização de biossensores descartáveis vem crescendo paralelamente ao crescimento da demanda por análises onde se faz necessário um resultado rápido, confiável e uma aparelhagem de baixo custo e fácil transporte, culminando com um

resultado onde não é necessário o transporte e manuseio da amostra gerando uma descentralização das análises (Squissato, 2019; Ince e Sezgintürk, 2021).

Os biossensores descartáveis se tornam extremamente atrativos devido à alta reprodutibilidade, produção em massa e baixo custo, além da possibilidade de total automação na fabricação de um sistema completo contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, todos impressos no mesmo suporte através de um processo simples de impressão em tela, denominado de *Screen Printed* (Squissato, 2019; Ince e Sezgintürk, 2021).

A um crescente número de publicações nos últimos anos demonstrando o interesse da comunidade científica acerca dos eletrodos impressos por *Screen Printed Electrodes* utilizado na fabricação dos biossensores descartáveis (Mentana *et al.*, 2020; Reda *et al.*, 2021).

2.3.3.1 Impressão em tela

A impressão em tela é um método para depositar uma camada padronizada de tinta em vários substratos (PVC, plástico, cerâmica, papel, placa fenólica de cobre etc.) pressionando uma suspensão, chamada pasta de impressão em tela, através de uma malha no substrato. É considerada uma tecnologia de manufatura altamente competitiva para a fabricação escalonável e rápida de microeletrônica impressa, devido aos seus méritos avançados de baixo custo, facilidade de operação e escalabilidade, satisfazendo parcialmente a necessidade de sensores adequados às amostras de interesse industrial, ambiental e alimentício (Kuscer, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

No processo de serigrafia convencional, a pasta é colocada na malha da máscara de tela e o substrato plano é colocado sob a máscara de tela. O substrato é mantido no suporte por um sistema de retenção de vácuo durante a impressão. Uma pequena lacuna de 0,5 – 1 mm é mantida entre a malha e o substrato. Para depositar o padrão sobre o substrato, o rodo, que consiste em uma borracha de poliuretano em um suporte de metal, pressiona o colar através das áreas abertas da malha preenchida com uma certa velocidade e força sobre o substrato, manual ou automaticamente. Após a deposição, a máscara da tela é removida, deixando a pasta no substrato. O princípio do processo de impressão da tela é mostrado na Figura 10 (Kuscer, 2021).

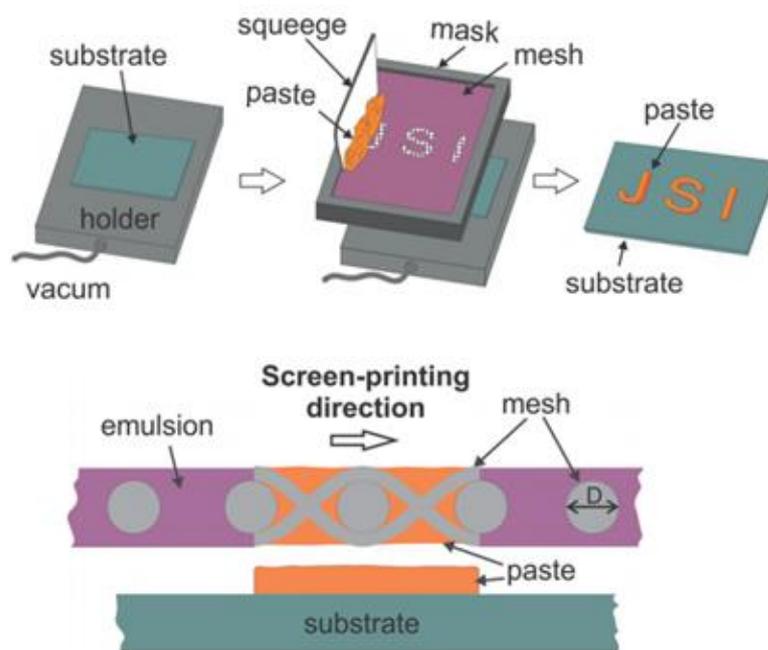


Figura 10 - Apresentação esquemática do processo de serigrafia (Kuscer, 2021).

A máscara de tela consiste em uma estrutura de metal rígida sobre a qual uma malha, revestida com uma emulsão fotossensível, é esticada. A malha é um tecido trançado de seda, fibras sintéticas ou fios de metal com janelas bem definidas que reproduzem o padrão a ser impresso. O padrão a ser impresso é feito revestindo a malha com uma emulsão fotossensível, geralmente um acetato de polivinila ou álcool polivinílico, sensibilizado com uma solução de dicromato. Em seguida, o padrão a ser impresso é mascarado com uma máscara fotográfica e a malha é exposta à luz ultravioleta (UV). A emulsão fotossensível que não foi exposta à luz ultravioleta é lavada com água e se torna a área para impressão (Kuscer, 2021).

Tintas condutoras e isolantes comerciais, originalmente desenvolvidas para aplicações na elaboração de circuitos impressos na área da eletrônica têm-se mostrado apropriadas para serem utilizadas como substrato na confecção dos eletrodos impressos. Tintas com elevada condutividade, usadas para produção de contatos elétricos, contêm pó de metais, tais como Au, Pt, Ag e Pd. E, portanto podem ser amplamente empregadas na confecção de eletrodos impressos (Squissato, 2019).

A grande versatilidade apresentada pelos eletrodos impressos reside na diversidade de formas com que estes eletrodos podem ser modificados. A composição das tintas utilizadas como substrato pode ser alterada pela adição de várias substâncias como metais, enzimas, polímeros, agentes complexantes, etc. Além da

possibilidade de se modificar o eletrodo já fabricado através da deposição de metais, em filmes polímeros e enzimas. Desta forma os eletrodos impressos são classificados conforme a modificação do eletrodo de trabalho, sendo chamados de EI sem modificação, modificados por filme, modificados por enzima e modificado por antígeno-anticorpo (Squissato, 2019).

2.4 Eletrodeposição

A eletrodeposição é um método bem conhecido para produzir revestimentos metálicos *in situ* pela ação de uma corrente elétrica sobre um material condutor imerso em uma solução contendo um sal do metal a ser depositado (Huang *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2022).

Para a realização de análises, a sensibilidade e/ou a seletividade do que se quer determinar deve ser aumentada com a modificação da superfície do eletrodo. Uma melhoria na sensibilidade e na seletividade pode ser alcançada utilizando recobrimentos poliméricos em forma de membranas, pois as mesmas evitam o acesso direto de espécies que interferem na superfície do eletrodo (Cardoso, 2016; Eulálio, 2016).

O crescente uso da eletrodeposição deve-se, também, a vantagens apresentadas pelo método, quando comparadas a técnicas comumente aplicadas, tais vantagens são: instrumentação de baixo custo, possibilidade de obtenção de depósitos em diferentes formas, microestrutura e composição química da eletrodeposição, espessura desejada e taxa de crescimento elevada (Eulálio, 2016; Huang *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2022).

A composição e a microestrutura do eletrodepositado podem ser controladas por alguns parâmetros que interferem diretamente nas características físicas e químicas do metal a ser eletrodepositado (Eulálio, 2016; Garcia *et al.*, 2021) que são:

- **Densidade de Corrente:** influencia na taxa de deposição do metal. É a medida mais prática para taxa de qualquer processo eletroquímico, desde que seu valor seja prontamente determinado a partir de um amperímetro que consiga ler e a área do eletrodo seja conhecida. A densidade de corrente é, normalmente, tida como uniforme na superfície. Entretanto qualquer superfície real, possui propriedades heterogêneas, e o processo começa em locais que possuem maior energia, chamados de centro

ativos. Como consequência disto, a densidade de corrente, inicialmente, se dá de forma não uniforme e sua distribuição tende a variar durante a eletrodeposição (Garcia *et al.*, 2021).

- **Temperatura:** é um dos fatores mais importantes, a faixa de funcionamento está entre 15° e 70° C, em alguns casos chegando a 99°. Temperaturas elevadas aumentam a solubilidade e a condutividade elétrica, porém aceleram a evaporação e a corrosão do processo. Uma baixa temperatura proporciona uma queda na densidade de corrente e, consecutivamente, na taxa de eletrodeposição (Garcia *et al.*, 2021).
- **Material e Superfície:** influencia no processo de deposição, principalmente, na etapa inicial. Isso ocorre porque a taxa de nucleação no substrato difere da que foi recém-depositada. Uma superfície polida suavemente tem pouca influência na eletrodeposição, tendo em consideração que o ataque químico aumenta tais influências. O tipo de material determina o tipo de tratamento superficial necessário para a remoção de filmes ou contaminantes, promovendo uma boa aderência do depositado (Garcia *et al.*, 2021).
- **Concentração de Íons Reativos:** Ao realizar eletrodeposição a partir de soluções diluídas, obtêm-se bons resultados com recobrimentos mais refinados a uma menor taxa de deposição. Cátions e ânions presentes na solução que não participam das reações também podem influenciar no processo de eletrodeposição devido à adsorção ao substrato, à variação da força iônica e à condutividade da solução (Garcia *et al.*, 2021).
- **pH da Solução:** O pH determina o equilíbrio da massa eletroquímica e a concentração relativa de vários componentes formados por espécies eletroativas. É importante, também, devido à sua influência na evolução do hidrogênio (efeito que ocorre durante a deposição dos metais, formação de bolhas) e na precipitação de hidróxidos (Gamburg e Zangari, 2014; Eulálio, 2016).

2.4.1 Antimônio

O antimônio (Sb) é um semi-metal é o quarto elemento do grupo 5A da tabela periódica. Possui quatro estados de oxidação Sb (+5), Sb (+3), Sb (0), e Sb (-3). O antimônio e seus compostos apresentam várias propriedades que podem ser utilizados em diversas aplicações (Long, X. *et al.*, 2020).

A síntese e caracterização de materiais semicondutores tem sido objeto de considerável atenção devido às suas excelentes propriedades e potenciais aplicações em diferentes campos, como catálise, eletrônica, fotônica, optoeletrônica, sensoriamento e conversão de energia solar. Os óxidos à base de antimônio são semicondutores importantes do grupo V-VI, exibindo excelentes propriedades ópticas e optoeletrônicas. Entre os óxidos de antimônio, o trióxido de antimônio (Sb_2O_3) é um membro importante devido ao seu grande e direto band gap localizado na região do ultravioleta próximo (Capra *et al.*, 2018).

Cerca de 60% do antimônio extraído são utilizados em retardantes de chama e 20% utilizado em ligas. Os outros 20% restantes são empregados em semicondutores, placas de baterias, equipamentos de transmissão de energia, chapas e tubagens e em pigmentos para tintas (Long, X. *et al.*, 2020).

Estudos mostram, também, aplicações como transdutor em biossensores, devido a propriedades como: relação quase linear entre força eletromotriz (f.e.m.) e pH (de 2 a 12), leituras reprodutíveis e estáveis, fácil fabricação, baixo custo e baixa resistência (Eulálio, 2016; Chan, 2019).

Uma das formas do antimônio ser eletrodepositado é através do sal tartarato de potássio e antimônio hidratado cuja fórmula química é $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ e possui massa molecular de 613,83 g/mol. Este sal é um composto de antimônio bem conhecido e solúvel em água, cuja fórmula estrutural está apresentada na Figura 11 (Eulálio, 2016)

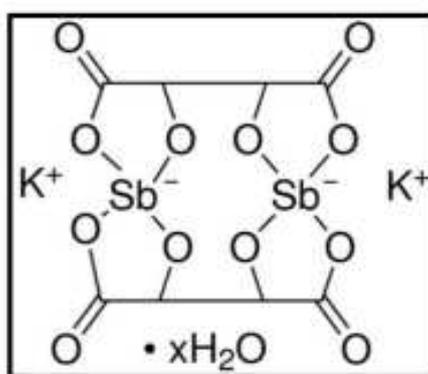


Figura 11 - Fórmula estrutural do tartarato de potássio e antimônio (III) hidratado (Sigmaaldrich, 2022).

2.5 Célula Eletroquímica e Eletrodos

Célula eletroquímica pode ser definida como um sistema composto por 2 ou mais eletrodos que dão condições para ocorrer uma reação eletroquímica e que a mesma seja mensurada (Gutierrez-Capitan *et al.*, 2022).

Os eletrodos estudados neste trabalho podem ser compostos por materiais distintos: Cobre recoberto por antimônio e cobre recoberto por antimônio, prata e membranas de polímeros naturais. Eles são classificados como:

Eletrodo de Trabalho: é o eletrodo que obtém a resposta vinda do analito alvo. É nele que se dá todo o tratamento na superfície, ou seja, é onde as enzimas a serem utilizadas nos biossensores serão imobilizadas para poderem reagir com o analito desejado (Eulálio, 2016; Gutierrez-Capitan *et al.*, 2022).

Eletrodo de Referência: é o que possui potencial constante, independente da concentração do analito alvo. Este potencial serve de parâmetro para o potencial que será medido no eletrodo de trabalho (Eulálio, 2016; Gutierrez-Capitan *et al.*, 2022).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os materiais e reagentes utilizados para o desenvolvimento dos biossensores e do detector potenciométrico estão descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 – Materiais utilizados para o processo de obtenção dos biossensores e detector potenciométrico.

Materiais	Marca
Béquer, balão, vidro de relógio, bastão de vidro.	Plena Lab
Fita de aço inox 301	Destaco
Aquisição de dados	Agilent
Multímetro digital	Minipa
Fonte de corrente e tensão	Power Supply
Vortex Mixer	XHC
Estufa Bacteriológica	CETEC modelo TIC 17rgt
Arduíno nano	Arduino
Placa Fenolítica	AMT
Lixa 1200	Worker
PLA	Voolt 3d
Display LCD ST7735T	TFT
Bateria de Lítio Top New	Energy
Módulo de carregador TP4056	Diymore
Conversor de impulso passo-up	CN (Origem)
Chave Botão com trava	Eletrodex
Chave Táctil	Eletrodex
Minigarras Jacaré	Eletrodex

Tabela 3 – Reagentes, fórmulas moleculares e procedência dos reagentes utilizados neste trabalho.

Reagentes	Fórmula Molecular	Procedência
Água Ultrapura	H ₂ O	CERTBIO
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	Neon
Sementes de Feijão de porco	-----	BRSEEDS
Ureia	CH ₄ N ₂ O	Sigma Aldrich
Tampão Fosfato PBS	-----	Inlar
Nitrato de prata	AgNO ₃ (P.A)	Dinâmica
Tartarato de antimônio (III) e potássio trihidratado	K ₂ (SbO) ₂ C ₈ H ₄ O ₁₀ * 3 H ₂ O	Sigma Aldrich
Emulsão verde Serifoto	-----	Gêneseis
Sensibilizante	-----	Gêneseis
Tinta serigráfica sintética	-----	Saturno
Brilhante R853	-----	Saturno
Solvente químico R853	-----	Saturno
Polivilpirrolidona	(C ₆ H ₉ NO) _n	ACS Científica

3.2 Métodos

Os procedimentos metodológicos para o desenvolvimento dos biossensores, bem como suas caracterizações, foram realizados conforme fluxograma da Figura 12.

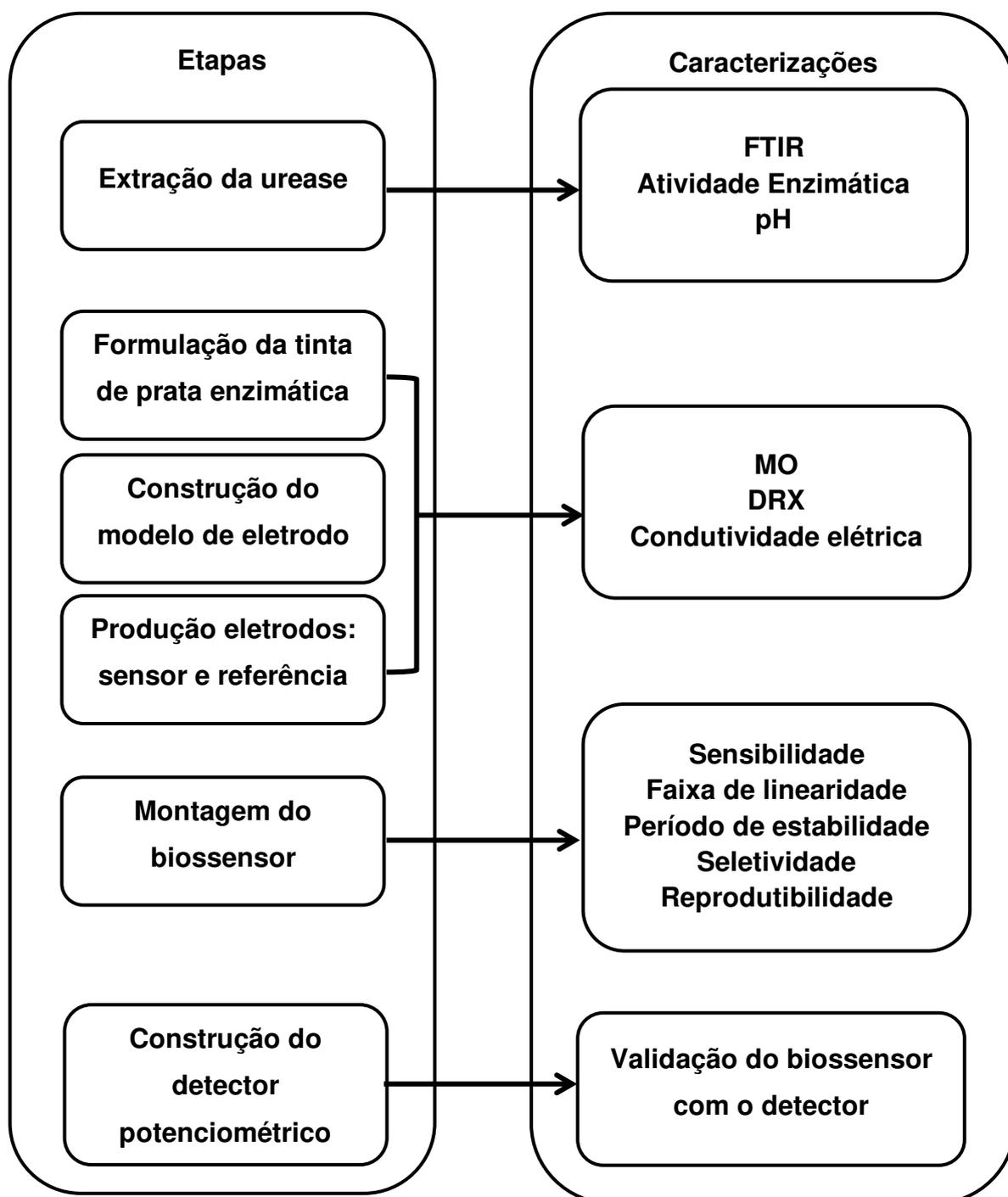


Figura 12 – Fluxograma de preparação e caracterizações dos biossensores

Conforme observado no fluxograma da (Figura 12) o processo foi conduzido em cinco etapas distintas: (1) Extração da urease a partir do feijão de porco para obter uma solução enzimática; (2) Formulação da tinta de prata enzimática; (3) Preparação modelo dos eletrodos; (4) produção dos eletrodos: sensor e referência, e montagem do biossensor; e (5) construção do detector potenciométrico. Por fim, foram realizadas caracterizações da enzima, eletrodos e validação do biossensor.

3.2.1 Extração da urease

Para obter a solução contendo a enzima urease do feijão de porco (conforme mostrado no fluxograma da Figura 13), seguimos a metodologia descrita por (Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

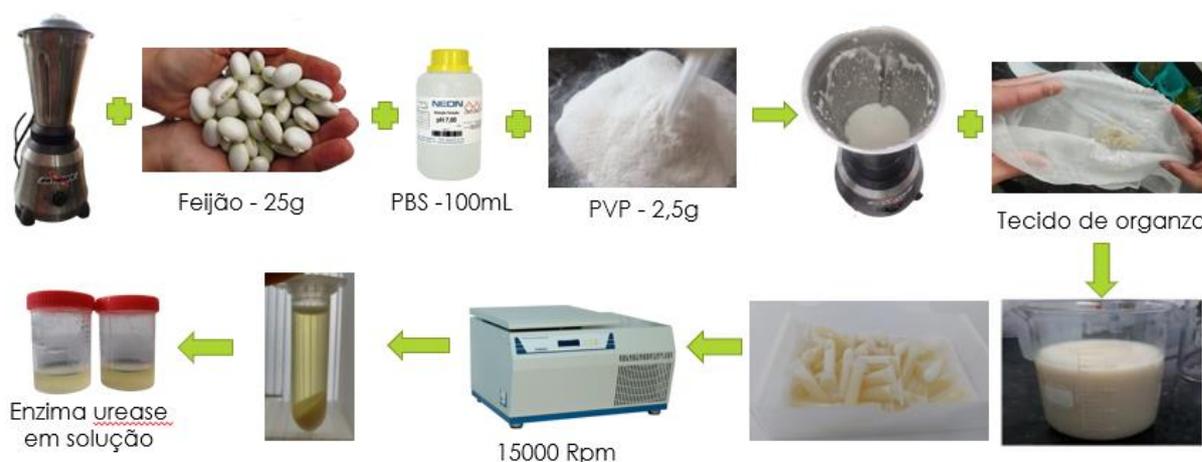


Figura 13 – Processo de obtenção da enzima urease em solução.

Inicialmente, triturou-se em um liquidificador 25 gramas de feijão de porco com 100 mL de solução tampão Fosfato – PBS de concentração $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ com pH 7 e 2,5 g de agente protetor (polivinilpirrolidona - PVP) por 3 min, até formar uma massa pastosa. Utilizando um tecido de organza, o extrato líquido foi separado da massa pastosa. O líquido resultante foi então centrifugado a 15000 rpm a uma temperatura de 4°C por 15 minutos para completar a separação da parte sólida remanescente da parte líquida. Após a centrifugação, alíquotas do sobrenadante contendo a enzima foram retiradas, transferidas para recipientes e armazenadas em geladeira a uma temperatura de aproximadamente 8°C .

3.2.2 Preparação da tinta de prata enzimática

Para preparação da tinta de prata enzimática (Figura 14), a partir da solução saturada de nitrato de prata (AgNO_3), foi utilizada uma metodologia adaptada de (Fatibello-Filho e Vieira, 2002).



Figura 14 – Procedimento de obtenção da tinta de prata enzimática.

Com o auxílio de uma fonte tensão e corrente, realizou-se o processo de eletrodeposição a 0.5 amperes e 12V em fita de aço inox na solução saturada de AgNO_3 . A solução resultante, contendo partículas de prata, foi filtrada através de papel de filtro e submetida a uma estufa a aproximadamente 100°C para eliminar a umidade e queimar parte da matéria orgânica presente. Em seguida, realizou-se o processo de maceração utilizando um pistilo e almofariz, seguido pelo peneiramento em uma peneira de malha 325 mesh. O pó resultante foi então misturado numa concentração de 2% m/V da solução de urease obtida (conforme item 3.3.1) sob agitação em vortex por 30 minutos, dando origem à tinta condutora de prata enzimática.

3.2.3 Construção do modelo do Eletrodo

Os eletrodos foram preparados utilizando a técnica de serigrafia, conhecida como *screen printing*. Nesse processo, uma tela de serigrafia foi preparada e revelada, seguida pela impressão dos circuitos nas placas fenolíticas de cobre.

3.2.3.1 Produção da tela de serigrafia

Para a confecção da tela de serigrafia, utilizou-se um tecido de poliéster de 120 fios esticado sob um quadro de madeira 30x30 cm (Figura 15a). Lavou-se a tela para retirada de toda sujeira e/ou gordura presente na mesma.

Com a tela limpa e seca realizou-se o processo de emulsão, ou seja, aplicou-se uma emulsão fotossensível sob a tela esticada e com um soprador térmico realizou-se o processo de secagem (Figura 15b).

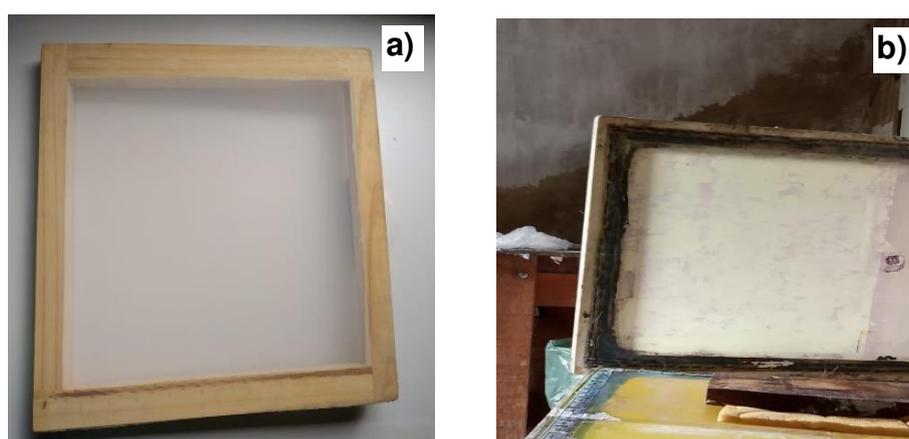


Figura 15 – a) preparação da tela de serigrafia; b) emulsão da tela.

Após a emulsão da tela e sua completa secagem, procedeu-se à gravação da mesma. O desenho a ser gravado na tela, representando o biossensor (Figura 16a), foi impresso em uma folha de ofício. Em seguida, esta folha foi fixada sob a tela. A tela foi então colocada sobre uma mesa de luz para o processo de gravação, que teve a duração de 10 minutos (Figura 16b).

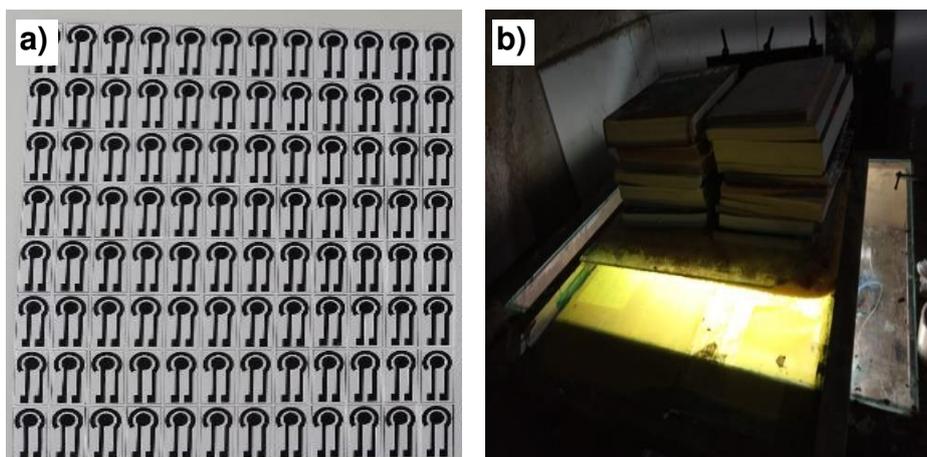


Figura 16 – a) Desenho para gravação na tela (b) processo de gravação da tela.

Após a gravação da tela, procedeu-se à etapa de revelação. Nesse processo, aplicaram-se jatos de água sobre a tela para remover toda a emulsão fotossensível que não foi exposta à luz. As áreas removidas durante esse processo tornaram-se as áreas para impressão dos eletrodos, conforme observado na Figura 17.

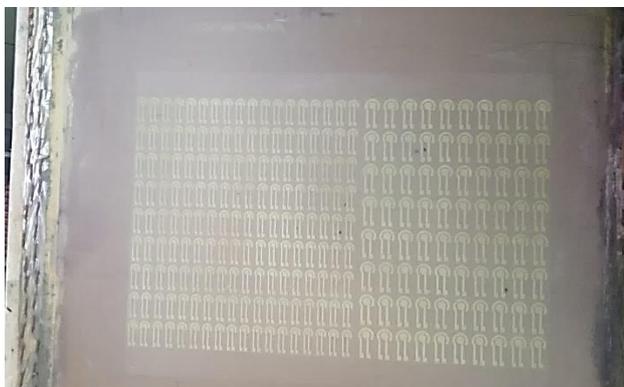


Figura 17 – Tela de Serigrafia revelada.

3.2.3.2 Impressão das placas

Para o processo de impressão das placas utilizou-se placas fenolíticas de cobre de tamanho 20x20 cm como apresentado na Figura 18.



Figura 18 – Placas fenolíticas.

As placas fenolíticas de cobre foram submetidas ao processo de pintura. Utilizando a tela de serigrafia preparada conforme descrito no item 3.2.3.1, posicionou-se sobre as placas e aplicou-se a tinta serigráfica sintética Brilhante R853 na tela. Em seguida, utilizando um rodo de borracha, a tinta foi friccionada sobre a superfície da placa, formando assim o desenho dos eletrodos, conforme ilustrado na Figura 19.

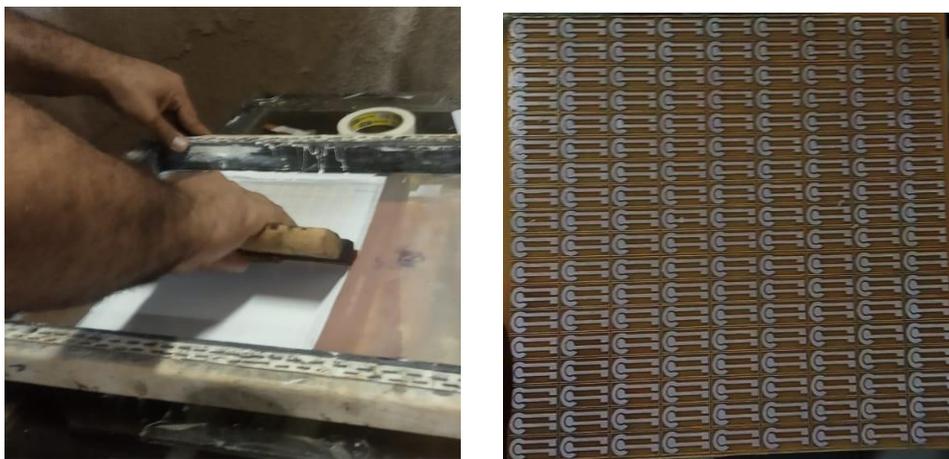


Figura 19 – Processo de pintura das placas.

Após a pintura das placas, estas foram submersas em uma solução de perclorato de ferro para remover todo o cobre ainda exposto na placa, como mostrado no processo ilustrado na Figura 20.



Figura 20 - Remoção de todo o cobre não pintado das placas.

Após a remoção de todo o cobre, as placas passaram por um processo de corte, limpeza e lixamento. Utilizando um estilete, as placas foram cortadas conforme necessário. Em seguida, toda a tinta serigráfica foi removida com o auxílio de um solvente químico R853. Posteriormente, as placas foram lixadas com lixa d'água de granulometria 1200, realizando movimentos horizontais sobre a superfície dos eletrodos, com o objetivo de obter uma superfície lisa, plana e com orientações definidas, conforme mostrado na Figura 21



Figura 21 – Eletrodos de cobre.

3.2.4 Produção dos eletrodos: sensor e referência

Com os modelos dos eletrodos obtidos conforme descrito no item 3.2.3.2, iniciou-se o processo de montagem dos biossensores. Primeiramente, realizou-se a eletrodeposição de antimônio nos eletrodos de cobre. Em seguida, procedeu-se à adição da tinta de prata enzimática nos eletrodos-sensores.

3.2.4.1 Eletrodeposição

No processo de eletrodeposição, a fita a ser revestida é imersa em um recipiente contendo o eletrólito e o contra eletrodo. Em seguida, os dois eletrodos são conectados a uma fonte de alimentação externa para permitir o fluxo de corrente. O objeto a ser revestido é conectado ao terminal negativo da fonte de alimentação, o que resulta na redução dos íons metálicos para átomos do suporte condutor, formando o depósito na superfície.

Nesta etapa, os eletrodos de cobre passaram por um processo de eletrodeposição em uma solução de 0,1 mol/L de tartarato de antimônio, sob uma tensão de 3,5V por 2 minutos, conforme ilustrado no processo mostrado na Figura 22.



Figura 22 - Processo de eletrodeposição de antimônio nos eletrodos de cobre.

Observa-se na Figura 23, que os biossensores produzidos apresentam dois eletrodos de cobre revestidos com partículas de antimônio. O eletrodo externo é denominado de eletrodo-referência e o interno de eletrodo-sensor.

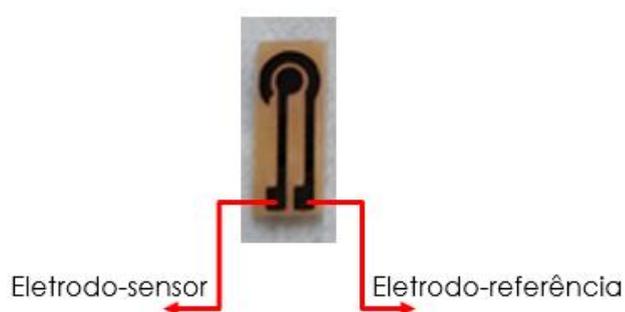


Figura 23 – Descrição dos eletrodos sensor e referência.

3.2.4.2 Montagem do biossensor

A Figura 24 ilustra o processo de montagem do biossensor, onde foram adicionados 12 μ l de tinta de prata enzimática, cobrindo toda a área central formando o eletrodo-sensor e eletrodo-referência, onde, não houve nenhuma modificação.

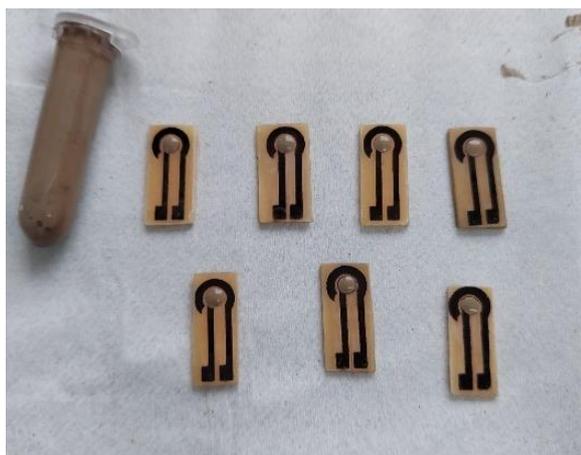


Figura 24 – Montagem do biossensor.

Para validar os biossensores, foi criado um banco de dados utilizando o Equipamento de Aquisição de Dados modelo 34970A AGILENT (Figura 25). Nesse processo, avaliamos a diferença de potencial (ddp) obtida nas fitas em resposta à concentração de ureia, em uma faixa de concentração de 15, 30, 45, 75 e 128 mg/dL de ureia em soro fisiológico.



Figura 25 – Aquisição de dados.

3.2.5 Construção do Detector Potenciométrico

Para construção do dispositivo que será utilizado para validação do biossensor. Foi realizado a modelagem, construção do circuito eletrônico, e o desenvolvimento da programação do software. Etapas descritas a seguir:

3.2.5.1 Modelagem – Detector potenciométrico

Para desenvolver a carcaça do detector potenciométrico (Figura 26), utilizou-se o software de modelagem 3D "*Sharpr 3D*", na versão estudante. Este software emprega a tecnologia Siemens Parasolid™, que oferece recursos de processamento para o desenvolvimento do dispositivo, além de um formato de arquivo que possibilita a impressão dos projetos em impressoras 3D.

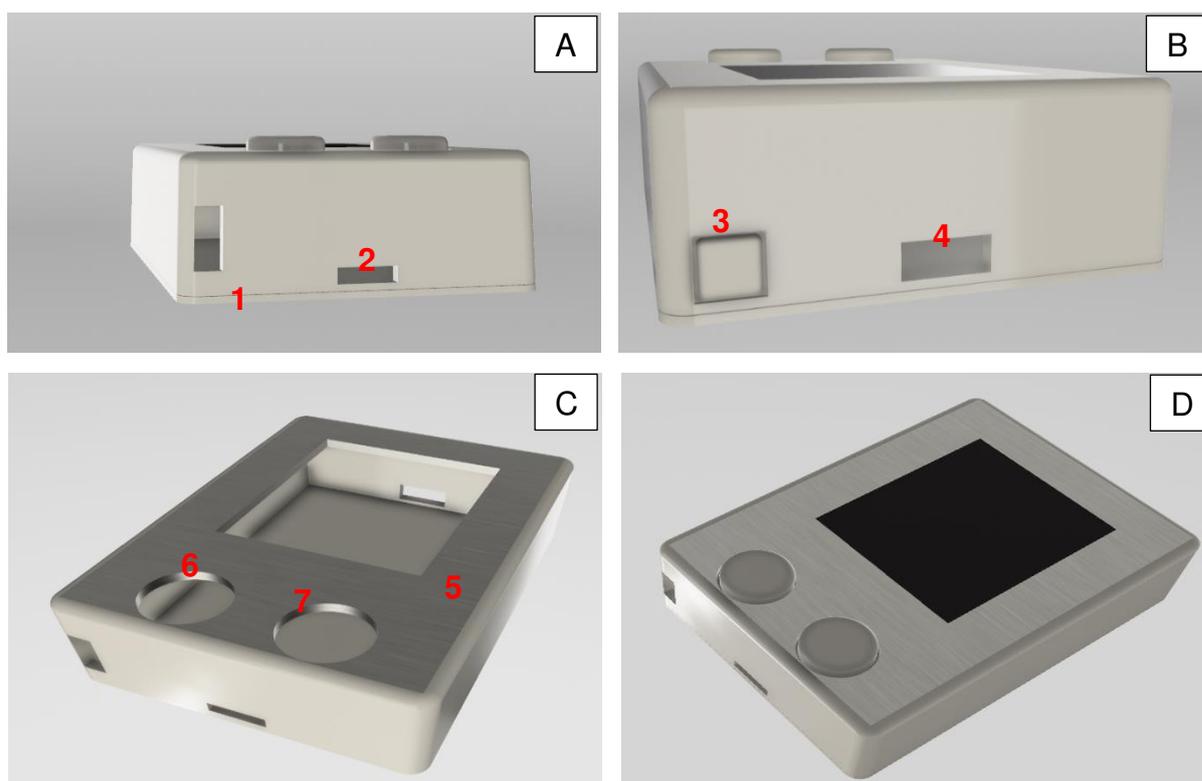


Figura 26 – Carça do detector potenciométrico

A Figura 26 A, é um apresentado da parte de baixo do protótipo, com as saídas para conexão do microcontrolador Arduino nano (1) e do Biossensor (2). Na parte de cima do protótipo Figura 26 B, temos o botão de ligar e desligar o circuito (3) e a saída (4) para carregamento da bateria que alimenta todo o circuito interno. A Figura 26 C, representa a parte da frente do protótipo, onde serão inseridos a tela de apresentação (5) e os dois botões tab (6) e select (7). A Figura 26 D é um apresentado do protótipo finalizado.

Após o processo de modelagem do protótipo, o mesmo foi impresso em PLA uma impressora 3D, Cloner DH Plus. A Figura 27 A é um apresentado da carcaça e a Figura 27 B tampa traseira e dos botões frontais do detector potenciométrico.

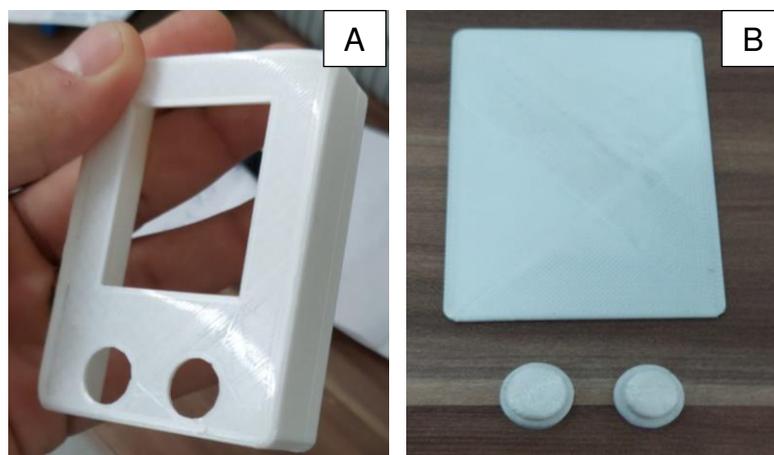


Figura 27 – Carcaça do detector potenciométrico

3.2.5.2 Circuito eletrônico - Detector potenciométrico

O circuito eletrônico do detector potenciométrico foi projetado e desenvolvido em uma plataforma virtual de software chamada "Proteus" (conforme mostrado na Figura 28).

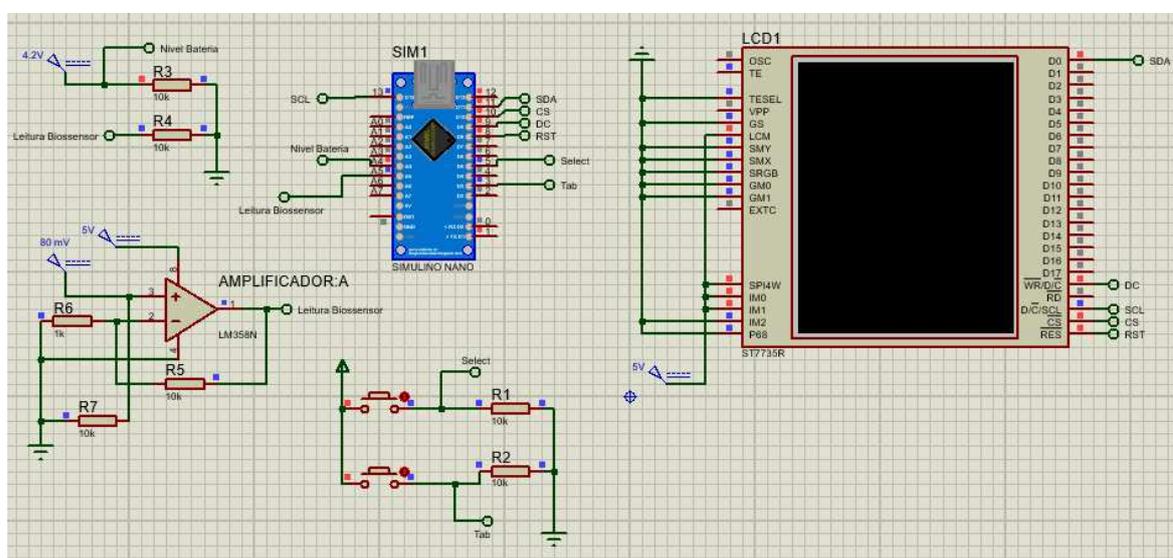


Figura 28 – Circuito eletrônico na Plataforma Proteus

Observando o circuito na Figura 28, nota-se que foi utilizada a porta analógica A4 do microcontrolador Arduino Nano, a fim de controlarmos o nível de bateria do circuito e a porta analógica A5 para realizarmos as leituras dos biossensores vindas do amplificador. Nota-se que ambas as portas são conectadas a um resistor de 10K ligadas ao GND, permitindo que o valor lido pela porta quando não conectado, não flutue, o que previne leituras indesejadas.

As portas digitais D3 e D5 foram alocadas para os botões Tab e Select respectivamente, para controlar o sistema operacional do dispositivo. O select que é responsável por selecionar os menus e executar a função para fazer a leitura dos sensores, enquanto o tab, é utilizado para alternar cujas funções são mudar o analito selecionado no menu principal e voltar para o menu anterior. Nota-se que ambas as portas digitais também estão conectadas a resistores de 10K ligados ao GND, garantindo um valor de nível lógico 0 na porta quando o botão não está acionado. Quando o botão é acionado, esse nível lógico muda para 1, iniciando a função desejada.

Na Figura 28, além do mencionado anteriormente, observa-se também a presença de um sistema amplificador e um display LCD ST7735T para apresentação dos resultados. Para a conexão do display, foram utilizadas as portas digitais D8, D9, D10, D11, D13 e as saídas GND e 3,3V do Arduino.

Na Figura 29, é possível observar o circuito do amplificador montado. Este amplificador tem a função de amplificar o sinal gerado pelos biossensores. No contexto deste projeto, o sinal é amplificado em 5,5X, para isso é realizado um cálculo a partir da equação 6, utilizando os resistores de 10K e 2,2K.

$$V_{saída} = \left(1 + \frac{10K}{2,2K}\right) * V_{entrada} \quad (6)$$

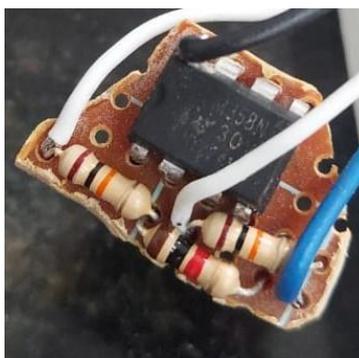


Figura 29 – Circuito amplificador

A tensão de entrada (V_{entrada}) é o valor que será inserido a partir da reação do biossensor, logo esse valor será multiplicado pela relação dos resistores, no qual passa a ser amplificado em 5,5 vezes, gerando uma tensão de saída ($V_{\text{saída}}$). Essa tensão de saída é lida pela porta analógica A5 do Arduino. Está amplificação é necessária para que o Arduino possa ler tensões mais precisas.

Após os testes na plataforma virtual, o detector potenciométrico foi construído sob uma placa microcontroladora de Arduino nano (Figura 30) e Display LCD ST7735T 128x160 polegadas full color screen (Figura 31) para apresentação dos resultados.



Figura 30 – Placa microcontroladora Arduino nano

O Arduino Nano (Figura 30) é um microcontrolador que possui o chip ATmega328, ele tem 32KB de memória Flash (sendo que 2KB são utilizados pelo bootloader), 2KB de memória SRAM, 14 portas digitais e 8 portas analógicas. Ele suporta uma tensão de entrada de 7 a 12V e sua tensão de operação é de 5V e correntes de pinos de 40mA.



Figura 31 – Display LCD ST7735T

O Display LCD ST7735T (Figura 31) com resolução de 128x160 pixels, full color screen é um display de cristal líquido e transitor de filme fino. O cristal líquido TFT fornece um interruptor do semiconductor para cada pixel, e cada pixel pode

diretamente ser controlado por um pulso do ponto, assim que cada nó é relativamente independente e pode ser controlado continuamente. Este display apresenta bom brilho, alto contraste e cores brilhantes. Sua tensão de alimentação de 3.3V, e seu nível de sinal dos pinos de dados, o display é tolerante a 5V.

Para manter o sistema em funcionamento utilizou-se uma bateria de lítio recarregável de alta qualidade e capacidade de marca Top new Energy 3.7V e 1250mAh, como observado na Figura 32.



Figura 32 - Bateria de Lítio

Para o carregamento desta bateria utilizou-se um módulo de carregador de baterias de Lítio TP4056 (Figura 33) de fácil conexão por cabo tipo C, possibilitando que a bateria seja recarregada diretamente no compartimento onde se encontram, sem a necessidade de removê-las do circuito.

Este módulo apresenta um led vermelho que indica que está carregando e um led azul indicando que a carga está completa. O mesmo apresenta proteção contra sobrecarga, corrente de carregamento de 1A e tensão de entrada de 4,5 ~ 5,5V.

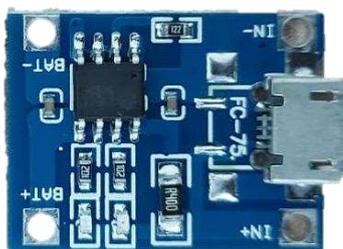


Figura 33 – módulo de carregador TP4056

A tensão de entrada do Arduino é 5V, mas nossa bateria fornece apenas 3,7V. Portanto, precisamos de um módulo conversor de impulso passo-up (Figura 34) para elevar a tensão da entrada de 3,7V para 5V. Esse módulo tem a função específica de aumentar o nível de tensão, garantindo que o circuito funcione mesmo com uma queda

de tensão de até 2,6V. Em resumo, esse circuito corrige a alimentação da placa microcontroladora, garantindo seu funcionamento adequado.

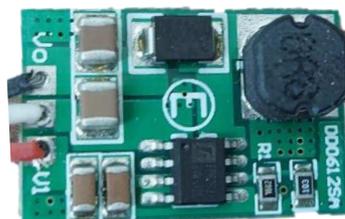


Figura 34 - Conversor de impulso passo-up

Para ligar e desligar todo o sistema, utilizamos uma Chave Botão de 7x7mm com trava (Figura 35).



Figura 35 – Chave Botão com trava

Este tipo de chave botão apresenta contatos normalmente abertos (NA) e normalmente fechados (NF), permitindo manter o circuito acionado de forma constante em vez de pulsante.

Para operar as funções Select e Tab do biossensor Menu, desenvolvido no item 4.9, foram utilizadas chaves Táctil de 6x6x7mm com 4 Terminais (Figura 36).



Figura 36 – Chave Táctil

Este tipo de chave táctil foi empregado para o acionamento momentâneo das funções tab e select, retornando à posição original quando solto. Essa característica permite que o botão seja utilizado para iniciar uma ação específica no circuito.

Para a conexão do biossensor ao dispositivo, foram utilizados mini cliques tipo garras de jacaré de 27 mm Figura 37.



Figura 37 – Minigarras tipo Jacaré

3.2.5.3 Software – Detector potenciométrico

O Arduino utiliza a linguagem C++ para programação. Para compilar o código e traduzi-lo para linguagem de máquina, é necessário um ambiente de desenvolvimento, como o "Arduino IDE", que inclui um compilador integrado. Todo o desenvolvimento do código é realizado nesse aplicativo. O código completo está disponível no anexo I.

Para começar o desenvolvimento do software, o primeiro passo é importar as bibliotecas necessárias como **math.h**, **Adafruit_GFX.h** e **Adafruit_ST7735.h** para realizar animações e controlar o display LCD no compilador Arduino IDE..

Em seguida é necessário especificar em quais portas digitais do arduino os pinos **CS**, **RST** e **DC** do Display LCD estão conectados. O pino CS foi conectado na porta digital D10, o pino RST foi conectado na porta digital D8 e o pino DC foi conectado na porta digital D9.

Por fim, uma instância da classe **Adafruit_ST7735** é criada passando como parâmetro os pinos que foram definidos. É através dela que as funções do display serão controladas para desenhar os elementos na tela.

- **Desenhando a logo CERTBIO**

Para criar a primeira tela do dispositivo, a logo do CERTBIO, foi necessário ajustar a imagem para as dimensões de 40x50 pixels. Em seguida, essa imagem foi processada no programa "LCD Image Converter", que gerou o código hexadecimal para cada pixel da imagem. Esse código foi então inserido dentro da constante "logo", que é um inteiro sem sinal de 16 bits.

O comando "PROGMEM" é uma diretiva especial utilizada em sistemas embarcados, indicando que o valor da variável deve ser armazenado na memória flash em vez da memória RAM. Isso é necessário porque desenhar a logo dessa forma consome bastante espaço, e a memória flash tem uma capacidade de armazenamento maior do que a RAM. Essa abordagem permite que a imagem seja armazenada de forma eficiente, sem sobrecarregar a memória RAM disponível no dispositivo.

Uma função específica foi criada para desenhar a logo, ela recebe como parâmetro o tempo de duração que esta imagem vai ficar na tela. Primeiro dois loops (um para as linhas e outro para as colunas) vão desenhar a logo na tela. Os inteiros "h" e "w" representam o número total de linhas e colunas respectivamente, "row" e "col" serão definidos como 0 e incrementados até chegarem nos valores de "h" e "w" respectivamente. A cada interação a função **drawPixel** da biblioteca Adafruit vai ser chamada, recebendo como parâmetro a posição no eixo X, a posição no eixo Y e a cor que será lida da memória com a variável buffidx (alguns cálculos com o tamanho da tela são necessários para alinhar a imagem no centro). Depois o cursor é colocado abaixo da imagem, a cor e tamanho da fonte são definidos e o nome do laboratório é desenhado na tela. Esta imagem então permanece até acabar a duração (que por padrão são 2 segundos). Sendo essa a primeira tela de apresentação criada "logo CERTBIO", Figura 38.



Figura 38 – Logo CERTBIO (Primeira tela desenvolvida)

- **Criando animação da molécula de amônia**

A segunda tela criada no software é uma animação da molécula de amônia (produto da transformação da uréia) girando. As letras "H" e "N" representam os

átomos de hidrogênio e nitrogênio respectivamente, enquanto os círculos representam os orbitais atômicos (Figura 39).

Para criar uma animação fluida, sem travamentos, os elementos são desenhados na tela e após 5 milissegundos eles são redesenhados tudo em preto, que é a cor de fundo, para apagar da tela, então a próxima posição para os círculos e o texto é calculada e os elementos são desenhados novamente. Esta foi uma estratégia de otimização adotada para criar a animação de forma mais eficiente no arduino nano, pois, ao invés de desenhar novamente todos os pixels da tela, são desenhados apenas aqueles necessários para compor a imagem.

Ela recebe como parâmetro o número de giros que a molécula vai dar, a velocidade, a cor do nitrogênio e a cor do hidrogênio respectivamente. As cores são valores hexadecimais passados para as funções **“setTextColor”** e **“drawCircle”** para modificar a cor dos elementos e dentro dos loops os valores de spin e velocidade são utilizados para multiplicar valores padrões que vão modificar o comportamento da animação, o código desenvolvido que representa a molécula.

As novas posições dos círculos e do texto são calculadas utilizando as funções de seno e cosseno da biblioteca math.h, isso é o que dá o efeito da molécula girando Figura 39 A. Essa função é chamada dentro do setup após a imagem da logo do laboratório e reutilizada como transição do menu do analito com as instruções e valor de referência para o menu que mostra o resultado da leitura do sensor, por isso ela possui uma verificação com **“If”** para saber se o estado da variável **“loading_result”** é true, pois se for, vai desenhar o texto **“Carregando...”** na parte de baixo, Figura 39 B.

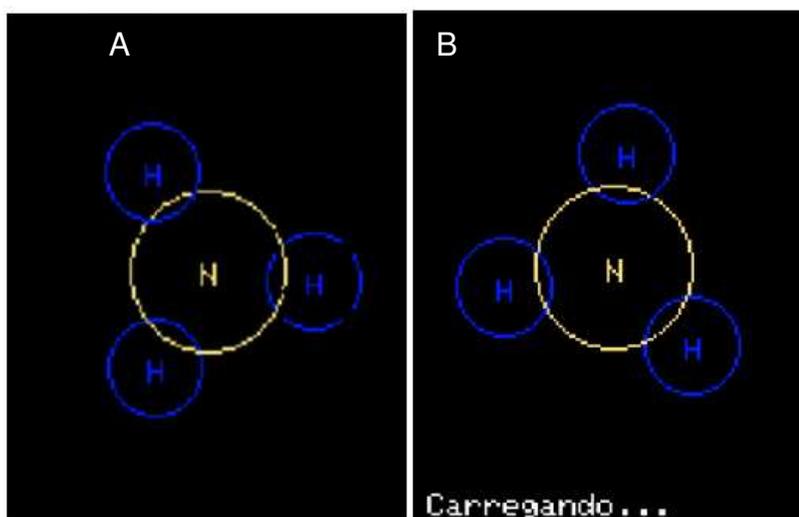


Figura 39 – Molécula amônia com animação (segunda tela desenvolvida)

- **Obtendo o retorno dos botões**

Para detectar os botões do dispositivo quando pressionados, é possível utilizar uma mesma função, ela vai receber dois parâmetros, o primeiro é o número da porta digital associada ao botão e o outro é o último estado do botão.

Estes botões de pressão geralmente possuem um problema que quando pressionados, as chapas de metal dentro dele não fazem um contato perfeito de primeira, elas batem uma na outra e se separam várias vezes antes de se estabilizarem deixando a corrente fluir. Esse fenômeno é imperceptível aos olhos humanos, mas para o computador que lê os sinais elétricos em uma velocidade muito alta, faz significativa diferença, então o que era para ser apenas um clique acaba sendo percebido como múltiplos cliques.

Uma das soluções para resolver este problema é ler o estado atual do botão, comparar com o último estado e se for diferente espera um determinado tempo para realizar outra leitura, depois espera um determinado tempo e atualiza o estado atual do botão. Os valores de 130 mS e 20 mS foram obtidos por tentativa e erro para este dispositivo, dessa forma, quando o botão é pressionado apenas uma vez, apenas um clique é registrado e quando o usuário aperta e segura o botão, múltiplos cliques são detectados de uma vez. O código que descreve a função dos botões.

Essa função é interessante para projetar a mudança de analitos no menu principal oferecendo uma boa experiência do usuário, podendo selecionar cada analito precisamente e não precisando pressionar o botão múltiplas vezes para chegar em um analito distante em uma longa lista. Essa é chamada dentro da função loop do programa para cada botão para sempre estar atualizando o estado atual deles.

- **Desenvolvimento do menu principal**

O menu principal, Figura 40, é desenhado com um conjunto de 4 funções. A primeira função é a “***drawMainMenuTitle***”, que vai fazer as linhas e a animação do nome “Biossensor Menu” na tela, desenhando na tela letra por letra com um delay de 50 milissegundos entre cada uma.

A segunda função é a “***drawMainMenuScrollBar***” vai desenhar um quadrado preto no lado direito da tela abaixo de onde a linha do título foi desenhada até o final para apagar a barra de rolagem anterior, depois desenha pequenos quadrados com

um for loop do início ao fim e depois um quadrado branco maior por cima dos pequenos, cuja posição vai variar proporcionalmente com a variável `active selection` e a quantidade de elementos na lista.

A função terceira função “***drawMenuItems***” é a que encapsula a lógica praticamente toda da mudança de estado do menu principal, quando a seleção do analito estiver abaixo de 7, o que varia é a posição do quadrado que representa o analito selecionado, a partir do elemento 7, o que mudará será os elementos que são desenhados na tela.

A variável `active_selection` que é atualizada dentro da função loop juntamente com o tamanho da lista são utilizados para fazer a lógica para desenhar o estado atual do menu. Esta função ainda possui uma estratégia de otimização que em vez de desenhar um quadrado preto em cima de todos os elementos para apagar, os elementos e quadrados desenhados no estado anterior são desenhados primeiro na cor preta para apagar, então os novos aparecem por cima na cor branca.

Por fim, a quarta função “***drawMainMenu***” é a que vai chamar as outras com base no valor das variáveis `change_state` e `first_render` para desenhar na tela só o necessário.

A terceira tela desenvolvida que representa todas essas funções pode ser observada na Figura 40. É nesta tela que o usuário irá escolher e selecionar o tipo de análise a ser medida, está tela é a terceira tela gerada pelo software.

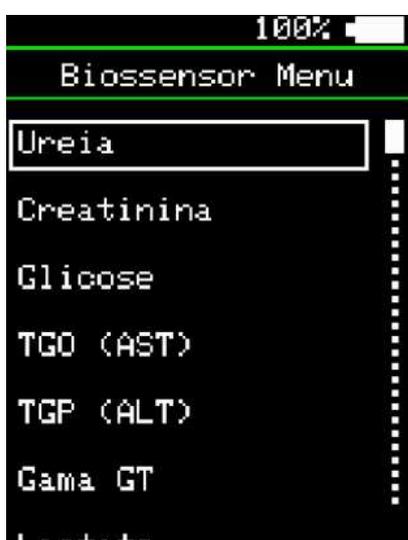


Figura 40 - Menu (terceira tela desenvolvida)

O menu desenvolvido apresenta a função **ureia** que é o objetivo proposto neste projeto, porém, outras funções como a Creatinina, Glicose, TGO, TGP, Gama GT, Lactato e Bilirrubina serão estudadas e implementadas neste software em projetos futuros.

- **Desenvolvimento dos menus específicos para os biossensores**

Os menus específicos são desenhados com a função “**drawSensorScreen**”. As listas “*analytes*” e “*reference_values*” possuem as informações dos analitos a serem analisados e seus respectivos valores de referência na mesma posição. A variável *active_selection* é utilizada para determinar qual o analito que está selecionado, ela começa em 0 e é atualizada dentro do loop quando o botão tab é pressionado. A função para desenhar o menu começa limpando a tela, desenhando as linhas e depois posicionando o cursor, em seguida, é desenhado na tela o nome do analito cujo índice na lista é igual ao valor de *active_selection*, depois o cursor e novamente posicionado e o mesmo processo é feito para desenhar o valor de referência, pegando o elemento na lista cujo índice é o mesmo. Por fim, as instruções de uso são desenhadas e o resultado anterior que fica salvo na variável “*result*” é mostrado na tela.

A quarta tela desenvolvida que representa todas essas funções criadas pode ser observada na Figura 41. Esta tela é responsável por guiar o usuário para a realização da medida, sendo está a quarta tela gerada pelo software.

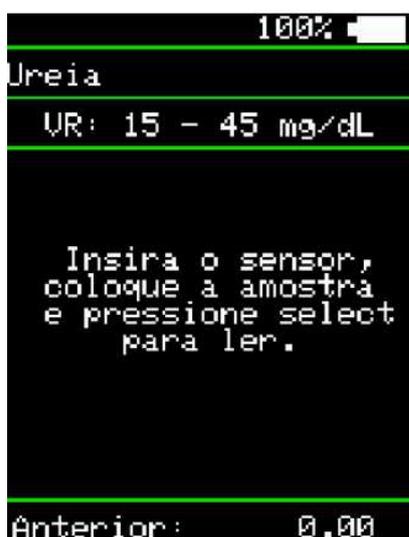


Figura 41 – Menu específico para Ureia (Quarta tela desenvolvida).

- **Processamento da informação do biossensor**

A informação do sensor vem da porta analógica A5 do arduino, as variáveis do tipo *float result*, *vout* e *vin*, são utilizadas para armazenar o resultado da tensão de saída do sensor e calcular a concentração de ureia em função da tensão que chega no arduino. Uma função específica chamada "*readSensor*" vai encapsular as ações para ler o sensor e desenhar o resultado atualizado na tela.

Primeiro ela começa posicionando o cursor na tela com a função *setCursor*, depois lê a porta analógica A5, calcula a tensão multiplicando por 5 e dividindo por 1023.0 para converter de binário para volts e salva na variável *vout*. Esse valor de *vout* é então ajustado: primeiro é somado 0,1, depois dividido por 0,0047 e, por fim, subtraído de 526. Estes valores foram determinados pela equação da reta, obtida pela curva de linearidade dos biossensores no item 4.10. O resultado final é armazenado na variável *vin*, que é atualizada e exibida na tela. Esta função é chamada dentro da função "*drawResultScreen*", que é onde mostra o resultado da leitura dos sensores em mg/dL.

Ela basicamente recebe como parâmetro a variável que vai determinar. Se é a primeira vez que será renderizado, vai limpar a tela cobrindo com pixels pretos, definir a cor do texto como branco e verificar se o analito escolhido é a ureia (sensor em desenvolvimento), então chama a função para ler e desenhar o valor do sensor, coloca o cursor no centro e desenha uma mensagem personalizada baseado no valor lido.

Observamos na quinta tela desenvolvida (Figura 42), que além do resultado em mg/dL o software ainda informa se a concentração de ureia está alta, baixa ou normal (bom). Esta tela é responsável por fornecer o resultado ao usuário de forma clara e segura.

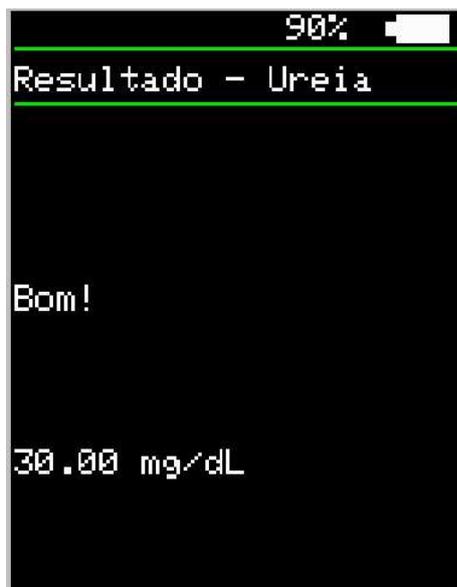


Figura 42 – Tela de resultado processado (Quinta tela desenvolvida)

- **Nível de bateria**

O nível de bateria é controlado por 3 funções. A primeira função é a “**getBatteryLevel**”, ela vai ler a porta analógica A4, converter a tensão de binário para volts, após a conversão esse valor é subtraído por *low_battery* (2,6V) e multiplicado por 62,5.

Os valores 2,6V e 62,5 foram determinados de acordo com o módulo conversor de impulso *passo-up* utilizado neste projeto. Esse módulo mantém o nível de tensão do sistema em 5V. Quando a bateria vai sendo consumida pelo sistema e atinge 2,6V, o nosso conversor deixa de manter o sistema em 5V, logo, consideramos o nosso 0% da bateria equivalente a 2,6V, abaixo disso o sistema acusa “bateria fraca” e nos protege de eventuais problemas de leitura do Arduino. Sabendo que a tensão máxima da bateria é 4,2V, subtraímos 2,6V deste valor e encontramos 1,6V que equivale a 100% da bateria, ou seja, o nosso sistema só permitirá variações de até 1,6V. Quando dividimos 100% da bateria pelo fator de 1,6V, encontramos o fator de 62,5 usado na equação.

A segunda função, “**lowBatteryInfo**”, será chamada quando a bateria estiver em 0%, ela vai limpar a tela, posicionar o cursor e escrever “Bateria fraca” na tela. A terceira função, o “**drawBatteryLevel**” vai atualizar o valor da porcentagem de bateria e se o contador for igual a 1, a informação será desenhada na tela. O valor deste

contador será alterado dentro da função loop quando ele chegar em 300000 milissegundos (que equivale a 5 minutos) ou quando o mudar o menu.

- **Função Setup**

A função setup será a primeira chamada pelo arduino para fazer as configurações iniciais e iniciar o sistema. Primeiro os pinos de entrada são definidos, depois a logo é desenhada, então o nível da bateria é medido, se for baixo o dispositivo não liga para executar suas funções, ele apenas chama a função “*lowBatteryInfo*” para dizer que a bateria está fraca, caso contrário, executa a animação da molécula e depois gera o menu principal e a função acaba dando sequência para o loop.

- **Função Loop**

A função loop, é a que ficará a informação do nível de bateria é igual a 300000 milissegundos (que equivale a 5 minutos), em seguida verifica se o nível de bateria é suficiente, se não for, vai apenas apresentar a mensagem de bateria fraca, caso contrário, o sistema começa a funcionar. Primeiro é atualizado o estado dos botões para saber se eles foram pressionados, depois duas variáveis (*first_render* e *change_state*) são utilizadas para controlar quando o menu deve ser atualizado e quando ele deve ser renderizado todo de novo, essa é uma estratégia de otimização para que a tela só seja redesenhada quando necessário.

3.2.5.4 Montagem - Detector potenciômetro

Após a modelagem da carcaça, impressão 3D, montagem do circuito eletrônico e desenvolvimento do software, procedemos com a montagem do detector potenciômetro, conforme ilustrado na Figura 43.

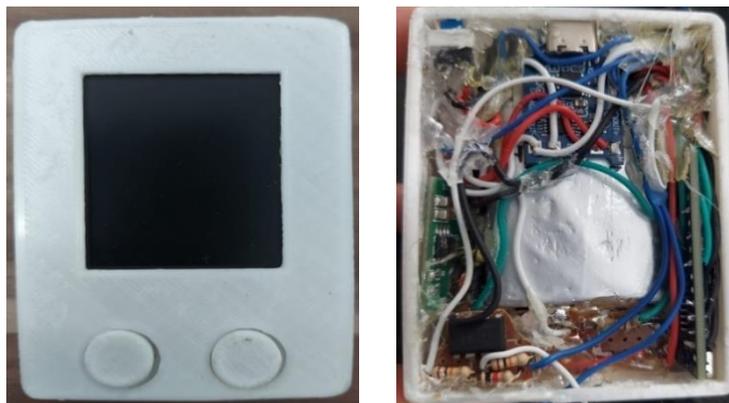


Figura 43 – Detector potenciométrico

A carcaça foi projetada de modo a acomodar todos os componentes de forma precisa, preenchendo todo o espaço disponível. Esse projeto foi elaborado visando manter o detector compacto e ergonômico.

3.2.6 Caracterizações

3.2.6.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier dos filmes de PVP e PVP/urease foram realizadas em temperatura ambiente (25°C) nas faixas de varredura de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando-se o equipamento Spectrum 400 da Perkin Elmer. Esta técnica foi utilizada para identificar as bandas características dos grupos funcionais das amostras, além de confirmar a incorporação da urease no PVP.

3.2.6.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade do extrato bruto de urease, bem como os seus parâmetros cinéticos, foram determinados pelo procedimento adaptado proposto pela Sigma-Aldrich, que consiste do método titrimétrico.

Preparou-se soluções de ureia a diferentes concentrações, juntamente com 1 mL do extrato bruto de urease. Foram colocadas para reagir por 10 minutos em meio a uma solução tampão fosfato, pH 7,4. Após o tempo de reação, esta solução básica, devido à formação de íons NH_3 , foi titulada com HCl (0,1 mol.L^{-1}) até o ponto de viragem, da coloração alaranjada para a coloração rosada, em meio ao indicador

alaranjado de metila. O volume de HCl gasto na titulação equivale à quantidade de amônia formada na catálise da ureia, pela urease, durante os 10 minutos.

Também foi realizado o branco, mas sem houver decorridos os 10 minutos de reação, ou seja, mistura-se ureia (diferentes concentrações) e urease e, em seguida, titula-se uma solução com HCl.

Dessa forma, tem-se a equação 7 que:

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mL}_{enzima}} = \frac{0,1 \text{ mol/L } V_{HCl} * (1000) * (df)}{10 \text{ min.} * (1 \text{ mL})_{enzima}} \quad (7)$$

Assim, uma unidade de enzima ativa irá liberar 1 μmol de amônia por minuto e equivalem a 1 I.U. ou 0,054 Summer.

3.2.6.3 Potencial Hidrogeniônico

Para a realização das medidas de pH, utilizou-se um pHmetro digital de bancada Modelo T-100 TEKNA. Preparou-se soluções de ureia com concentrações de 2, 4, 8, 10, 20, 60, 80 e 140 mmol/L em tampão fosfato (PBS) e acrescentou-se 1 mL do extrato bruto de urease em cada solução, esperou-se um tempo de reação de 10 minutos e logo após realizou-se a medida de pH, afim de avaliar a estabilidade das soluções e posteriormente a sensibilidade e faixa de linearidade dos biossensores.

3.2.6.4 Microscopia Ótica

A técnica de microscopia ótica foi utilizada para analisar a morfologia de superfície das fitas de cobre, da deposição de antimônio no cobre, e da tinta de prata/urease sobre a superfície do antimônio. Essas amostras foram submetidas à análise pelo método de iluminação por reflexão de luz visível com um canhão acoplado a estação de captura de imagem da série Mx sendo o Mx (G) – 2016Z. O Software utilizado para a obtenção das imagens foi o 2D measure e o equipamento foi o Microscópio Hirox modelo KH-1300, com duas magnificações de 20X e 80X.

3.2.6.5 Difração de Raios X

As análises de difração de raios-X da placa de fenolite com 100% de cobre recoberto, das partículas de antimônio (Sb), de prata (Ag) e do biossensor montado, 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. A caracterização por DRX foi realizada a fim de determinar as fases e estruturas cristalinas dos materiais, no intervalo de 2θ entre 10 e 80° a uma velocidade de 1°/min.

3.2.6.6 Resistência e Condutividade Elétrica

A verificação da resistência elétrica da fita de cobre, da fita de cobre com antimônio e da fita de cobre com partículas de antimônio e tinta de prata foi realizada com um multímetro digital ET-1649 da Minipa. A partir dessas medições, foram calculadas as resistividades e, posteriormente, a condutividade elétrica de cada material. Esses parâmetros são essenciais para avaliar se houve bloqueio nas trilhas, ou seja, se houve alguma dificuldade na passagem de corrente elétrica, o que poderia invalidar o biossensor. Essa análise permite garantir que as trilhas condutoras estão em boas condições para o funcionamento adequado do dispositivo.

3.2.6.7 Sensibilidade e Faixa de linearidade

A sensibilidade é definida como a alteração na magnitude do sinal de “saída” do biossensor como resposta à alteração da concentração de uma espécie química específica. A determinação da sensibilidade do biossensor de ureia será medida inicialmente por uma unidade de aquisição, comutação e registro de dados, Aquisição de dados – Agilent modelo 34970A da keysight Technologies, avaliando a diferença de potencial (ddp) obtida em resposta à concentração de ureia, numa faixa de concentração de 15, 30, 45, 75 e 128 mg/dL de ureia em soro fisiológico.

A sensibilidade de um biossensor será definida pela equação (8), onde observa-se que a sensibilidade é uma função linear em relação a concentração da espécie química “[Ureia]” e a variação do potencial elétrico “ ΔmV ”.

$$\text{Sens.} = \frac{\Delta mV}{[\text{Ureia}]} \quad (8)$$

Um biossensor perfeitamente linear apresentará a sua sensibilidade constante desde a concentração nula de substrato até à máxima concentração de substrato que possa ser fisicamente dissolvida no meio de medida. Para a determinação da linearidade do biossensor de ureia foi medida inicialmente por uma unidade de aquisição de dados modelo 34970A, avaliando a diferença de potencial (ddp) obtida em resposta à concentração de ureia, numa faixa de concentração de 15, 30, 45, 75 e 128 mg/dL de ureia em soro fisiológico.

3.2.6.8 Período de estabilidade / Tempo de resposta

O período de estabilidade indica o tempo necessário para que a resposta “diferença de potencial” do biossensor se estabilize e apresente um valor estável. Para determinação do período de estabilidade foi avaliado o tempo necessário para estabilidade das medidas de diferença de potencial nas concentrações de 15, 30, 45, 75 e 128 mg/dL de ureia em soro fisiológico, as quais foram aplicadas ao biossensor conectado ao sistema de Aquisição de Dados Agilent, modelo 34970A da Keysight Technologies, por um período de 100 segundos.

3.2.6.9 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é um parâmetro que indica a capacidade e precisão de biossensores com as mesmas condições de preparação, parâmetros e análises de apresentarem respostas similares.

Para determinar a reprodutibilidade dos biossensores, foram realizados testes em três biossensores com as mesmas condições de preparação e parâmetros de análise. Observou-se os desvios entre as respostas obtidas por cada biossensor. Esse processo é fundamental para avaliar a consistência e confiabilidade dos resultados produzidos pelo biossensor em diferentes amostras ou em diferentes momentos de análise. Uma boa reprodutibilidade indica que os biossensores são consistentes e podem ser confiavelmente utilizados para análises subsequentes.

3.2.6.10 Validação do Detector potenciométrico

Para validar o detector potenciométrico, foram realizados testes aplicando os valores de tensões geradas pelos biossensores, conforme obtidos pela curva de linearidade no item 3.2.6.7. Utilizando uma fonte de tensão e corrente, foram simulados os sinais gerados pelos biossensores, que posteriormente foram convertidos para a unidade de mg/dL. Esses testes permitem verificar a precisão e confiabilidade do detector na medição e conversão dos sinais elétricos em unidades de concentração, garantindo sua adequação para as aplicações desejadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Os filmes de PVP e PVP com extrato bruto de urease extraído do feijão de porco foram preparados e caracterizados por FTIR, cujas bandas podem ser observadas nas Figuras 44 e 45, respectivamente.

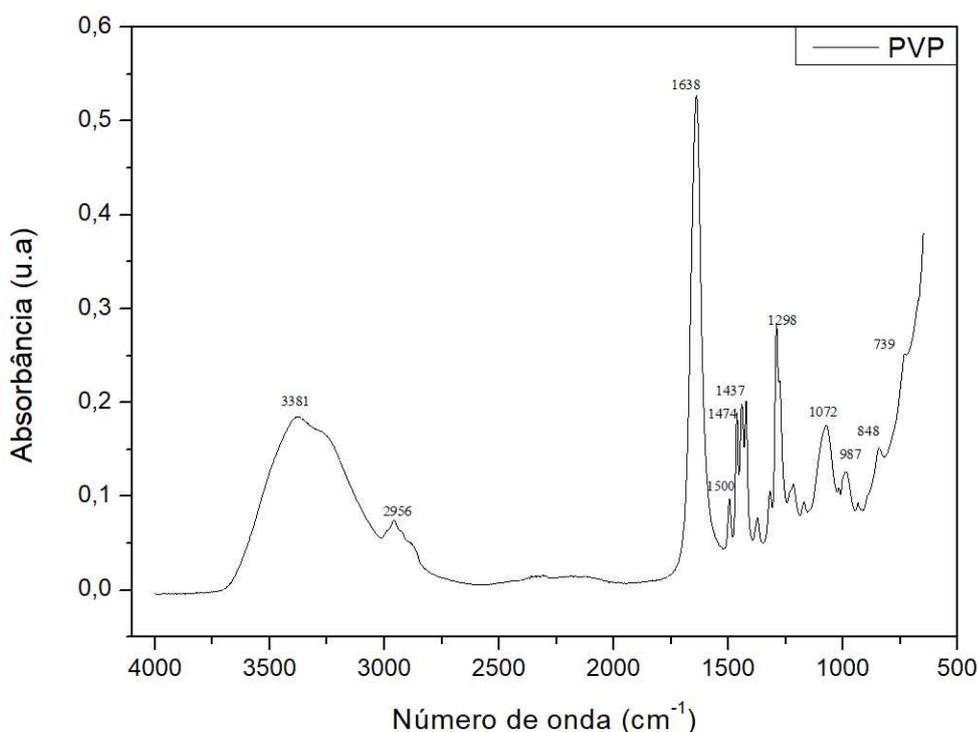


Figura 44 – Espectro de FTIR do filme de PVP.

O PVP apresenta uma banda larga em torno de 3381 cm^{-1} que corresponde à vibração de estiramento do grupo hidroxila (OH) devido à presença de água no filme, uma vez que o PVP é altamente hidrofílico. Outra banda de absorção localizada em 2956 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento assimétrico CH_2 . Além disso, a banda vibracional em cerca de 1638 cm^{-1} corresponde ao alongamento $\text{C}=\text{O}$, enquanto uma banda de absorção menor em cerca de 1500 cm^{-1} é referida à vibração característica de $\text{C}-\text{N}$ do anel pirrolidona (Abdelghany *et al.*, 2016; Safo *et al.*, 2019; Zidan *et al.*, 2019; Consendey *et al.*, 2021).

A flexão $\text{C}-\text{H}$ da flexão CH_2 ou OH está localizada em 1474 cm^{-1} , enquanto a banda em 1437 cm^{-1} é atribuída às vibrações de tesoura CH_2 . A banda vibracional

observada em 1298 cm^{-1} pode ser atribuída à torção de CH_2 ou abanar de PVP. Modo de flexão C–H fora do plano em 845 cm^{-1} e modo de balanço C–H em 745 cm^{-1} (Abdelghany *et al.*, 2016; Contardi *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022).

Em 1072 e 987 cm^{-1} é possível observar as bandas de vibração de estiramento e flexão de P–O respectivamente, presentes na estrutura do tampão fosfato PBS utilizado na preparação do filme de PVP (Amorim *et al.*, 2020).

O espectro de Infravermelho mostrado na Figura 45 apresenta as bandas características do extrato bruto contendo a enzima urease.

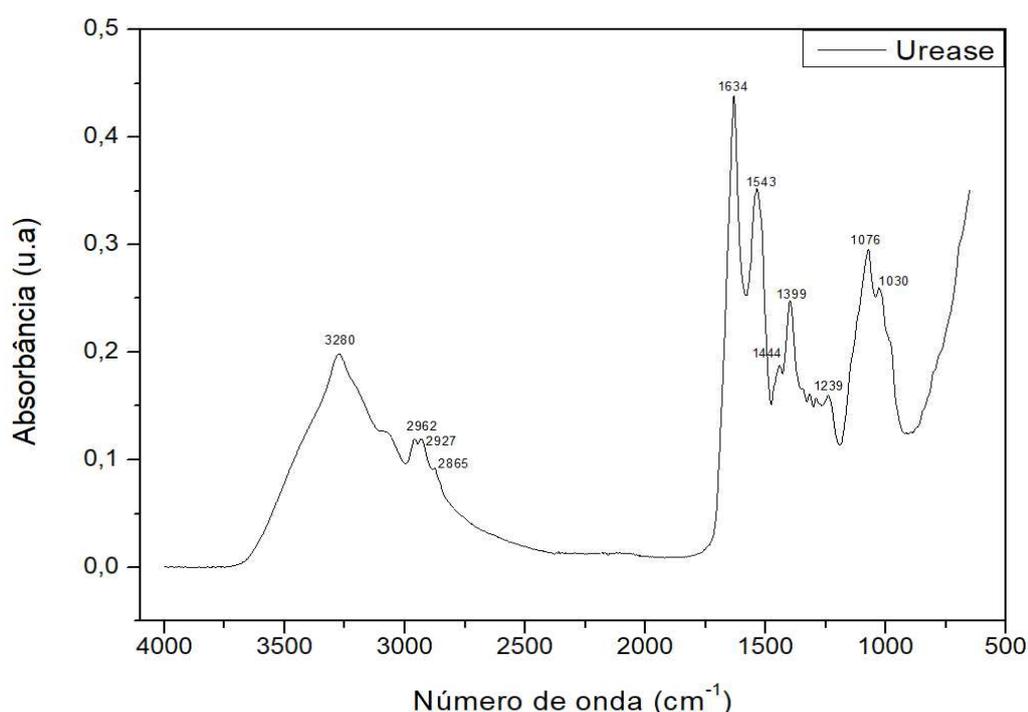


Figura 45 - Espectro de FTIR do filme de urease.

Com uma banda larga em cerca de 3280 cm^{-1} que corresponde à vibração de estiramento do grupo hidroxila (OH), a banda de absorção localizada em 2962 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento assimétrico CH_2 (Abdelghany *et al.*, 2016; Zidan *et al.*, 2019).

A presença da enzima urease no extrato bruto pode ser evidenciada analisando as bandas polipeptídicas e os grupos R (CH_3 , $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, etc.) pertencentes aos aminoácidos. Observamos vibrações em 1634 , 1543 e 1239 cm^{-1} que correspondem ao alongamento C=O de amida I, deformação N-H de amida II, vibrações mistas envolvendo C-N e N-H de amida III respectivamente, pertencentes as frequências das ligações polipeptídicas. As bandas em torno de 2927 , 1444 , 1399 e 1239 cm^{-1} , são

devidas às vibrações de estiramento CH e deformação CH do grupo CH₂, respectivamente, pertencentes as frequências do grupo R (Ogura *et al.*, 1998; Soares, 2011).

Foram preparados filmes de PVP com extratos brutos de feijão de porco com percentuais de 15, 25 e 35% de feijão. O espectro de FTIR com suas bandas de absorção podem ser observadas na Figura 46.

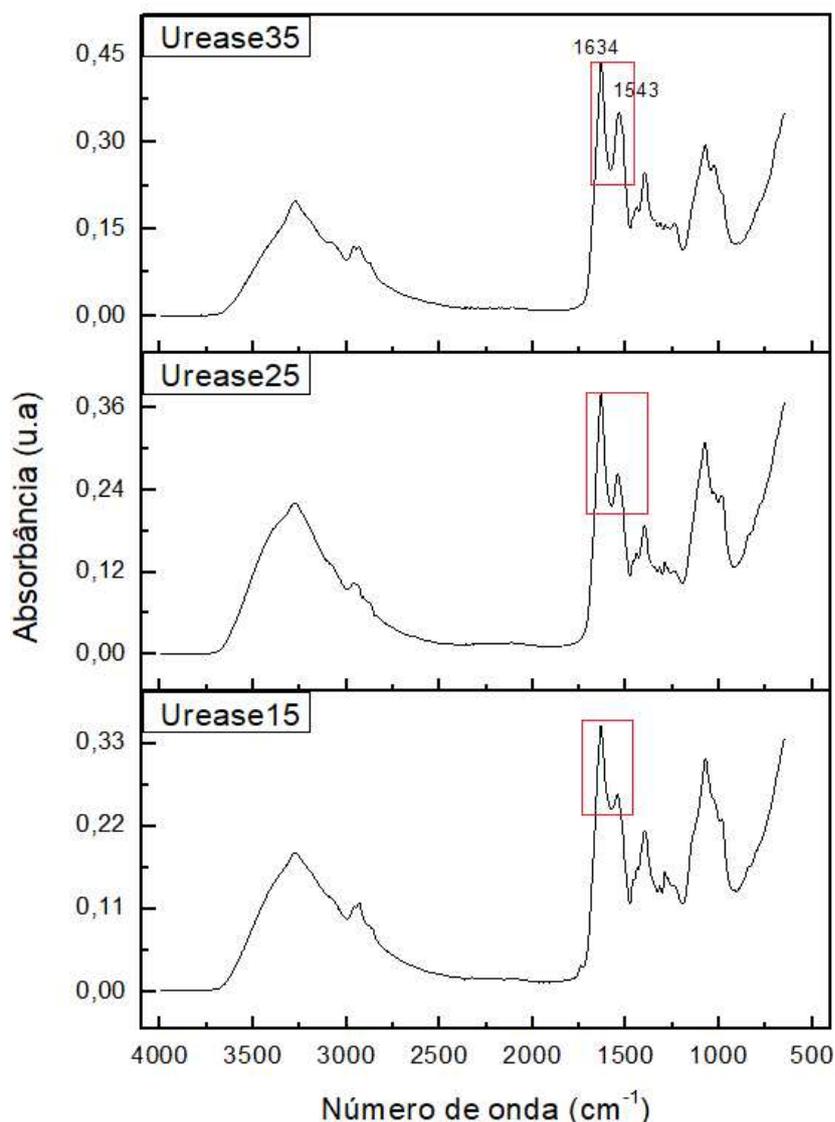


Figura 46 - Espectro de FTIR dos filmes de urease 15, 25 e 35%.

Comparando as intensidades 1634 e 1543 cm⁻¹ das bandas referentes à amida I e amida II respectivamente, nos espectros da Figura 46, observa-se um aumento nessas intensidades à medida que a quantidade de feijão aumenta. Isso pode estar associado a uma maior quantidade de grupos amidas I e II em sua estrutura, o que pode ser fundamental para a velocidade de reposta nos biossensores produzidos.

4.2 Determinação da atividade enzimática

Foram preparadas várias concentrações de ureia e, a partir delas determinadas a atividade enzimática e sua cinética de velocidade (K_m e $V_{máx}$) por meio de titulação de acordo com a equação 1.

Essa velocidade da reação está intimamente relacionada à atividade enzimática e, conseqüentemente, à concentração de amônia liberada por minuto.

A Figura 47 representa a velocidade da reação enzimática em μmol de amônia por minuto em função da concentração de ureia em mmol.L^{-1} .

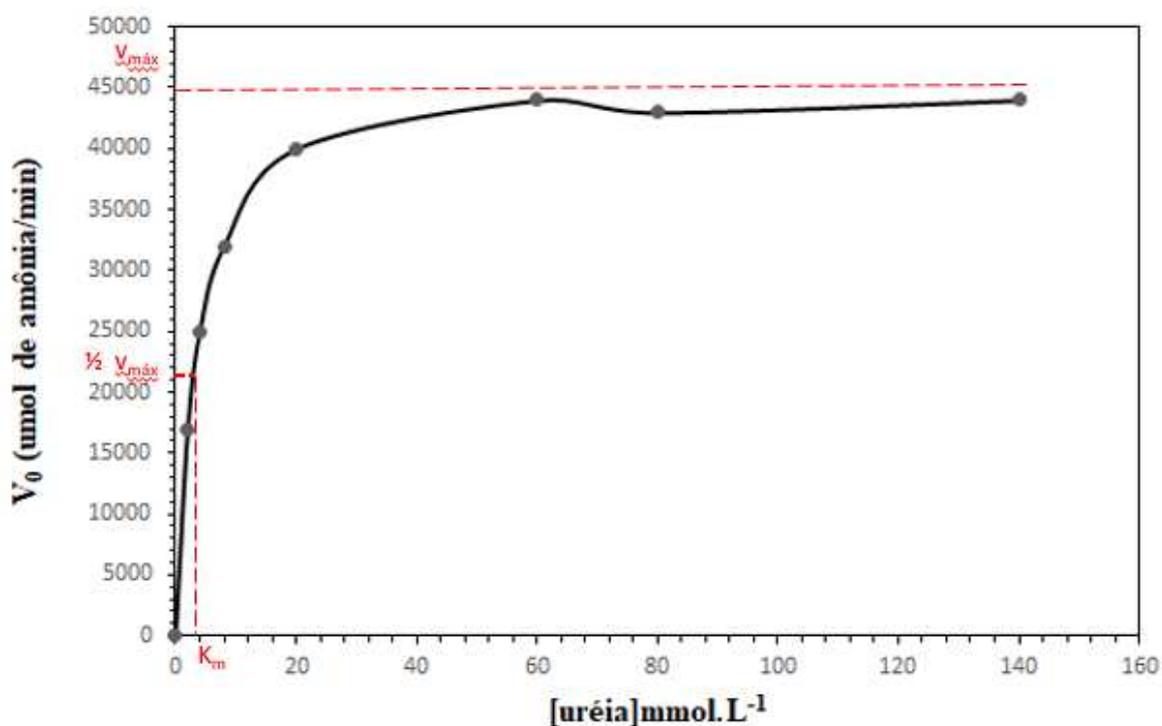


Figura 47 – Velocidade da reação enzimática em função da concentração de ureia como substrato.

Observa-se na Figura 47 que a velocidade da reação enzimática aumenta com o aumento da concentração de ureia até atingir um valor máximo de velocidade de aproximadamente 45000 μmol de amônia por minuto. A partir desse ponto, o aumento da concentração de ureia não afeta mais a velocidade da reação, indicando que a enzima está saturada. Portanto, a constante de Michaelis (K_m) pode ser determinada como a concentração do substrato quando a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima. Neste caso a constante de Michaelis (K_m) obtido foi de 3,5 mmol.L^{-1} .

Este parâmetro K_m representa a afinidade da enzima pelo substrato: quanto menor o seu valor, maior será a afinidade enzima/substrato, o que influencia na sensibilidade do biossensor (Krajewska, 2009; Pacheco e Colla, 2019; Evli *et al.*, 2024).

A Figura 48 representa o ajuste linear do gráfico obtido pelo inverso da velocidade inicial em função do inverso da concentração de ureia, utilizando o método descrito por Lineweaver - Burk para determinação de velocidade máxima e da constante de Michaelis-Menten.

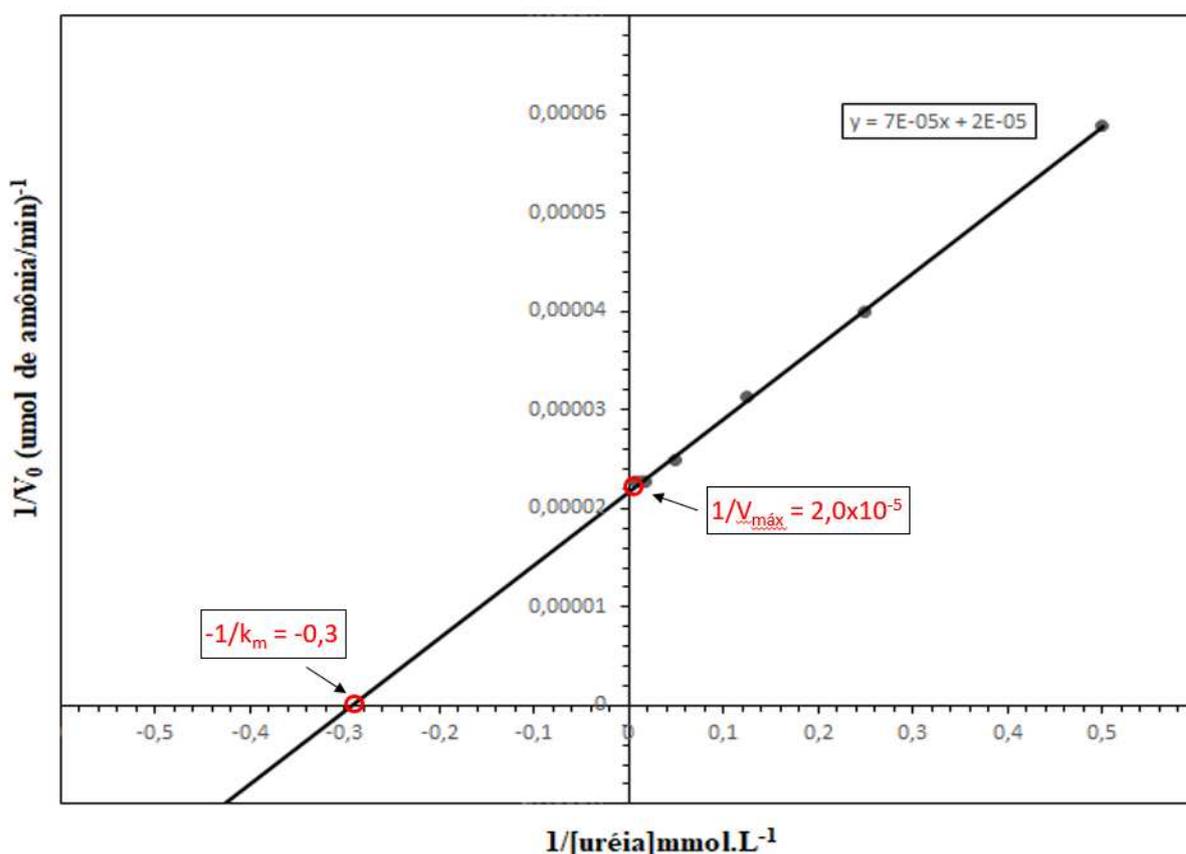


Figura 48 – Ajuste linear do gráfico obtido pelo inverso da velocidade inicial vs o inverso da concentração de ureia para determinação de velocidade máxima e da constante de Michaelis-Menten.

Os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) também foram analisados no método de Lineweaver - Burk (Figura 48), onde um gráfico $1/V_0$ em função de $1/[ureia]$ foi traçado, resultando em uma reta com coeficiente angular de K_m/V_{max} , e intersecção de $1/V_{max}$ no eixo $1/V_0$ e de $-1/K_m$ no eixo $1/[ureia]$. Os valores encontrados foram $3,33 \text{ mmol.L}^{-1}$ para K_m e $50000 \text{ } \mu\text{mol de amônia por minuto}$ para V_{max} para a urease na forma de extrato bruto.

De acordo com a literatura, a urease extraída do feijão de porco exibe um comportamento de Michaelis - Menten bastante simples. Normalmente, os valores de K_m estão na faixa entre 2,9 e 3,6 mM, como mostrado para a urease extraída do feijão de porco neste trabalho (Krajewska, 2009; Pacheco e Colla, 2019; Evli *et al.*, 2024).

Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois verificou-se que a urease presente no extrato bruto obedece à equação de Michaelis – Menten, indicando que a enzima apresenta afinidade pela ureia.

4.3 Potencial Hidrogeniônico

Preparou-se soluções de ureia com concentrações de 2, 4, 8, 10, 20, 60, 80 e 140 mmol/L em tampão fosfato (PBS) e adicionou-se 1 mL do extrato bruto de urease em cada solução. Após um tempo de reação de 10 minutos, realizou-se a medida de pH.

A Figura 49 representa o pH das soluções de ureia em função de suas concentrações após o período de 10 minutos de reação catalítica com a enzima urease.

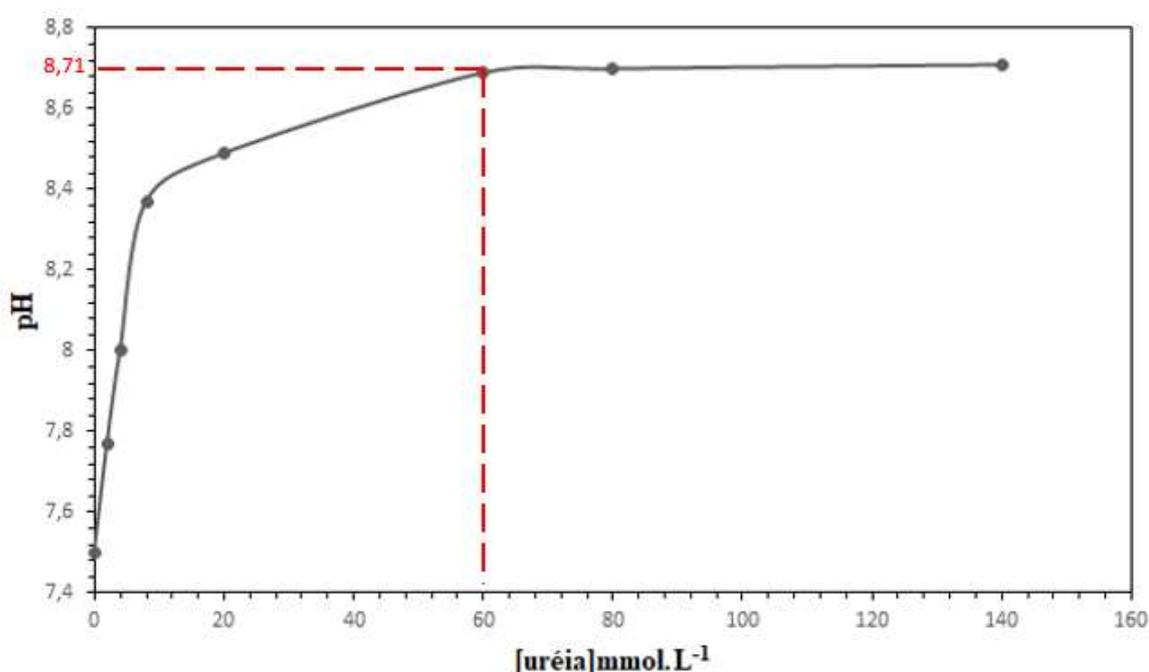


Figura 49 – pH em função da concentração de ureia em mmol.L⁻¹.

Observa-se na Figura 49 que, após transcorridos os 10 minutos de reação da ureia com o extrato bruto de enzima urease, o pH da solução aumenta com o aumento da concentração de ureia devido a formação de amônia no meio reacional. Esse

aumento é evidente até atingir um valor máximo de pH de 8,71 para uma concentração de 60mmol.L^{-1} de ureia. A partir desse ponto, o aumento da concentração de ureia não afeta mais o pH da solução, indicando que não há variação na quantidade de amônia produzida. Isso é justificado pelo volume fixo de extrato bruto de urease utilizado, ou seja, há uma saturação de ureia em relação à urease livre para reagir. Este resultado corroborando com a cinética de velocidade de formação de amônia vista no item 4.2.

4.4 Microscopia Ótica

A Figura 50 representa as micrografias das amostras obtidas sob diferentes condições de preparação, com ampliações de 20 e 80X.

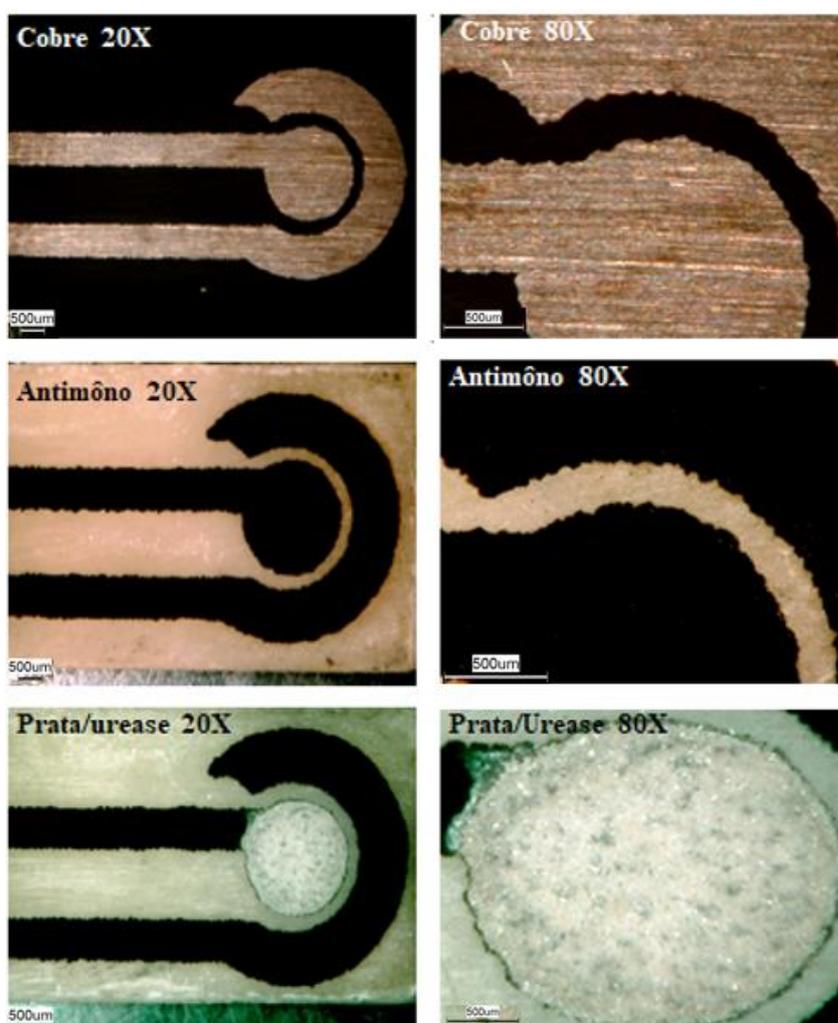


Figura 50 – Micrografias de superfície das fitas de cobre, deposição de antimônio sobre a superfície do cobre, tinta de prata/urease depositada sobre a superfície do antimônio nos aumentos de 20 e 80X.

Na Figura 50, observa-se as micrografias das fitas de cobre nas magnificações de 20 e 80X, revelando uma superfície com ranhuras direcionadas em toda área analisada. Essa direção é resultado do pelo processo de lixamento realizado no item 3.2.3.2, no qual movimentos horizontais foram realizados com uma lixa 1200 sobre a superfície das fitas para obter uma superfície plana e lisa. Essa direção é crucial para facilitar a passagem de corrente elétrica no circuito.

Além disso, nas micrografias da deposição de antimônio sobre a superfície do cobre, observadas nas magnificações de 20 e 80X, realizadas pelo processo de eletrodeposição descrito no item 3.3.4.1, verifica-se uma superfície uniforme e sem defeitos. Isso demonstra a eficácia da eletrodeposição de antimônio sobre toda a superfície do cobre. Essa eficiência no processo de eletrodeposição é crucial para garantir que toda a superfície do cobre seja recoberta, prevenindo oxidações do cobre e protegendo-o contra variações de pH que ocorrem durante as reações.

Por fim, as micrografias da tinta de prata enzimática aplicada sobre a superfície do antimônio apenas no eletrodo-sensor, observadas nas magnificações de 20 e 80X, mostram a presença de uma superfície branca e uniforme em toda região do eletrodo-sensor. Esse revestimento é evidenciado ainda mais no contorno do eletrodo-sensor na magnificação de 80X, indicando que toda a superfície foi coberta. Esse revestimento é vantajoso, pois permite uma área de contato maior da enzima presente na tinta com o substrato (ureia) que será analisado, potencialmente aumentando a velocidade de resposta dos biossensores.

4.5 Difração de Raios X

As Figuras 51, 52 e 53 são caracterizações por difração de raios X para identificação dos seus perfis cristalográficos, da placa fenolítica com 100% de cobre recoberto, das partículas de antimônio (Sb) e de prata (Ag) respectivamente, utilizadas na construção dos biossensores.

Na Figura 51, é possível observar o perfil de difração típico de material cristalino de cobre (Cu). Verifica-se que apresenta apenas uma fase cristalina, com os picos de difração em torno de 43°, 50° e 74°. Esses picos são consistentes com o perfil do cobre em fase cúbica, com grupo espacial Fm-3m, conforme registrado no banco de dados da Crystallography Open Database (COD), sob o código 96-151-2505 do Crystallographic Information File (CIF).

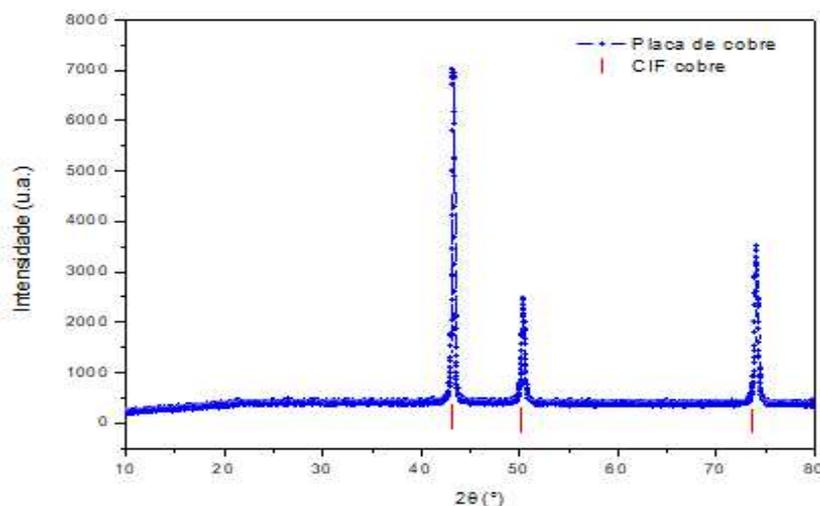


Figura 51 - Difratoograma de raios X da placa de cobre.

Na Figura 52, é possível observar o perfil de difração típico de material cristalino do pó de antimônio (Sb). Verifica-se que ele apresenta apenas uma fase cristalina, com picos de difração em torno de 24°, 27°, 30°, 40°, 43°, 50°, 59°, 66° e 74°. Esses picos correspondem ao perfil do antimônio metálico em fase hexagonal, com grupo espacial R3-m, conforme registrado no banco de dados da Crystallography Open Database (COD), sob o código 96-900-9655 do Crystallographic Information File (CIF).

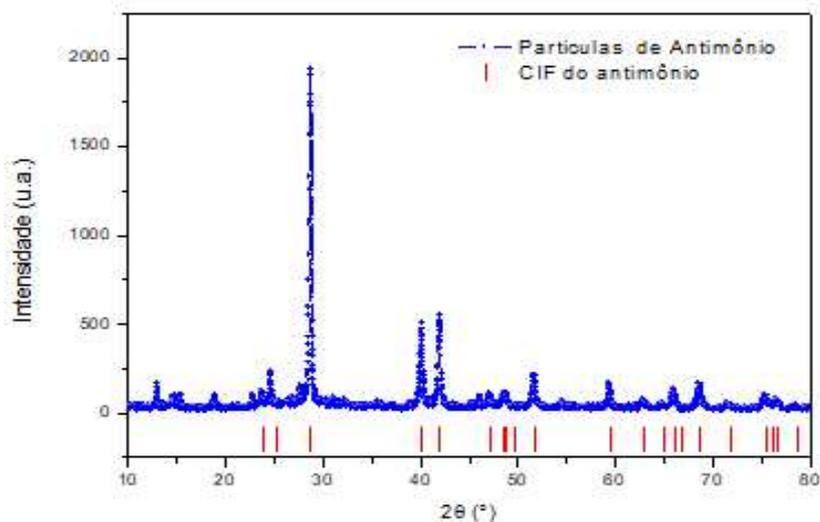


Figura 52 - Difratoograma de raios X das partículas de antimônio.

Na Figura 53, é possível observar o perfil de difração de raios X das partículas de prata (Ag), onde constata-se apenas uma fase cristalina, com picos de difração em torno de 38°, 44°, 64° e 77°. Esses picos correspondem ao perfil da prata metálica em fase cúbica, com grupo espacial Fm-3m, conforme registrado no banco de dados da

Crystallography Open Database (COD), sob o código 96-110-0137 do Crystallographic Information File (CIF).

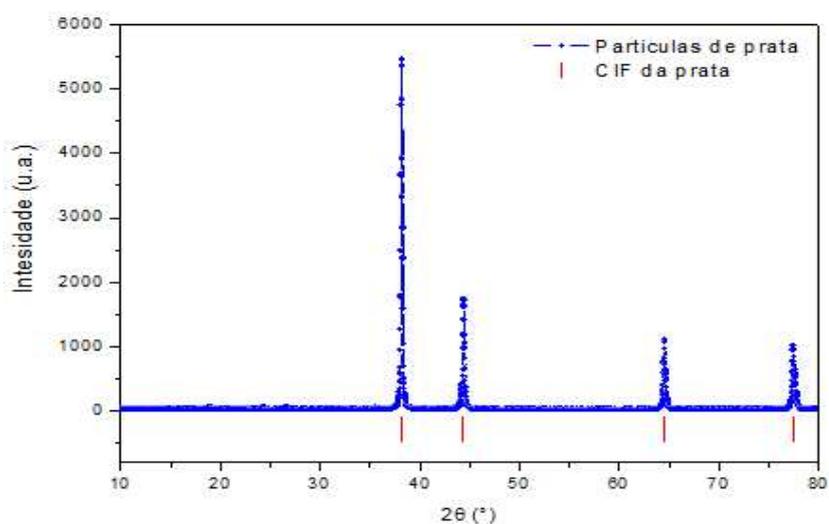


Figura 53 - Difratoograma de raios X das partículas de prata.

Após o processo de caracterização dos materiais, placa de cobre, partículas de antimônio e de prata que serviram como base para construção dos biossensores, foi realizado a difração de raios X (Figura 54) no biossensor montado, processo descrito no item 3.2.4.2, afim de verificarmos as camadas de revestimento.

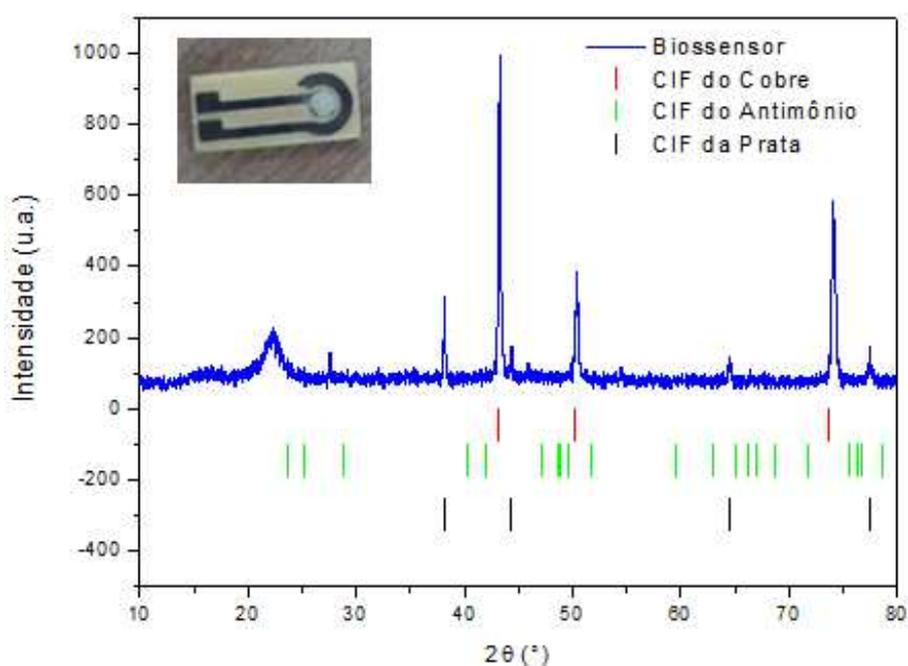


Figura 54 - Difratoograma de raios X do biossensor

Na Figura 54, observa-se o perfil de difração de raios X do biossensor montado. Verifica-se a presença de uma banda de difração mais larga e amorfa em torno de 22°, a qual é atribuída à presença do fenolítico sem a camada de cobre na base dos biossensores montados. Além disso, são identificados picos de difração em torno de 43°, 50° e 74°, correspondentes ao perfil cristalográfico do cobre (Cu), em aproximadamente 38°, 44°, 64° e 77° da prata (Ag), e picos em 27° e 52° do antimônio (Sb).

É observada uma redução na intensidade de difração no difratograma, a qual pode estar correlacionada com a utilização de tintas poliméricas de Ag e com a própria construção do biossensor, uma vez que este é montado camada sobre camada.

4.6 Resistência e Condutividade Elétrica

Um requisito fundamental no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos é compreender suas propriedades elétricas, incluindo a condutividade elétrica, resistência, impedância e condutância. Os valores médios da resistência elétrica, bem como os valores calculados da resistividade e condutividade elétrica das trilhas de cobre, cobre com partículas de antimônio e cobre com partículas de antimônio e prata, são apresentados na Tabela 4.

Para calcular a resistividade, foi inicialmente medida a resistência elétrica utilizando um multímetro digital nas trilhas de cobre, cobre com partículas de antimônio e cobre com partículas de antimônio e prata, entre dois pontos a uma distância de 0,012 m, com área de seção transversal aproximada de $1,2 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ e aplicou-se a equação (9).

$$\rho = \frac{R.A}{L} \quad (9)$$

Onde:

ρ é a resistividade elétrica (em ohm metros, $\Omega.m$);

R é a resistência elétrica de um espécime uniforme do material (em ohms, Ω);

L é o comprimento do espécime (medido em metros);

A é a área da seção transversal do condutor (em metros quadrados, m^2).

Com os valores de resistividade elétrica calculados, determinamos a condutividade elétrica utilizando a equação 10.

$$\sigma = \frac{1}{\rho} \quad (10)$$

Onde:

σ é a condutividade do material [$(\Omega \cdot m)^{-1}$];

ρ é a resistividade elétrica ($\Omega \cdot m$).

Tabela 4 – Resistência e Condutividade Elétrica

	Fita de cobre	Fita de cobre + Antimônio	Fita de cobre + Antimônio + Prata
Resistência Elétrica (Ω) Eletrodo sensor	0,57 ± 0,02	3,50 ± 0,02	1,10 ± 0,02
Resistência Elétrica (Ω) Eletrodo referência	0,56 ± 0,02	4,10 ± 0,02	–
Resistividade ($\Omega \cdot m$) Eletrodo sensor	6,27 x 10 ⁻⁵	3,85 x 10 ⁻⁴	1,21 x 10 ⁻⁴
Resistividade ($\Omega \cdot m$) Eletrodo referência	6,16 x 10 ⁻⁵	4,51 x 10 ⁻⁴	–
Condutividade Elétrica ($\Omega \cdot m$)⁻¹ Eletrodo sensor	1,59 x 10 ⁴	2,44 x 10 ³	8,26 x 10 ³
Condutividade elétrica ($\Omega \cdot m$)⁻¹ Eletrodo referência	1,62x10 ⁴	2,22 x 10 ³	–

Ao analisarmos a resistência elétrica dos materiais, observamos um aumento quando incorporamos as partículas de antimônio na fita de cobre. Isso era esperado, uma vez que o antimônio é um semi-metal e apresenta naturalmente uma resistividade maior que o cobre, que é um metal. No entanto, ao adicionar a tinta de prata no eletrodo sensor, observamos uma redução na resistência elétrica, resultando em uma diminuição na resistividade. Esse efeito melhora significativamente as propriedades elétricas do biossensor.

A escolha do antimônio como transdutor nos biossensores é respaldada por sua estabilidade em uma ampla faixa de pH (2-12) e pela relação quase linear da força

eletromotriz (f.e.m), conforme discutido nos estudos de Chan (2012) e Marinho (2016). Além disso, o antimônio oferece proteção contra a oxidação do cobre quando exposto ao oxigênio. Considerando que o biossensor eletroquímico para ureia desenvolvido neste trabalho utiliza a urease, que catalisa a ureia produzindo íons que alteram o pH do meio, o transdutor feito com antimônio se mostra ideal para o dispositivo (Cardoso 2016 e Barros 2017).

Ao avaliar a condutividade elétrica dos materiais, notamos uma diminuição quando incorporamos as partículas de antimônio na fita de cobre. No entanto, essa redução não resultou no isolamento das trilhas de cobre, garantindo assim a passagem de corrente elétrica. Com a adição da tinta de prata no eletrodo sensor, observamos um leve aumento na condutividade, o que favorece a condução elétrica. Portanto, os materiais utilizados se mostram adequados para aplicação no biossensor eletroquímico enzimático, possibilitando respostas satisfatórias.

4.7 Sensibilidade e Faixa de Linearidade

Para determinar a sensibilidade e a faixa de linearidade do biossensor, construíram-se curvas de concentração em mg/dL em função da diferença de potencial gerada. Para isso, foram preparadas soluções com concentrações de 15, 30, 45, 75 e 128 mg/dL de ureia em soro fisiológico e aplicadas ao biossensor conectado à aquisição de dados, por um período de 1 minuto, obtendo assim valores em mV. Esses valores estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados de tensões obtidas a partir de concentrações conhecidas

Concentrações (mg/dL)	Tensões obtidas (mV)	Tensões obtidas (V)
15	460	0,460
30	475	0,475
45	496	0,496
75	511	0,511
128	490	0,490

Os valores da Tabela 5 foram inseridos em uma planilha do Excel e utilizados para obter as curvas de sensibilidade (Figura 55) e de linearidade do biossensor (Figura 56).

Conforme observado na Figura 55, os biossensores demonstram sensibilidade dentro da faixa de concentração estudada (de 15 a 75 mg/dL). No entanto, acima de 75 mg/dL, os valores de bioresposta em mV tendem a diminuir, o que dificulta análises com concentrações superiores a esse nível. Serão necessários ajustes adicionais para otimizar as respostas e minimizar os erros inerentes à detecção rápida por biossensores para concentrações acima de 75 mg/dL.

No entanto, na faixa de 15 a 75 mg/dL, observamos uma resposta crescente e proporcional ao aumento da concentração de ureia. Esta faixa torna-se um ponto de interesse para o desenvolvimento do biossensor, uma vez que a ureia é o analito que se busca identificar e quantificar. Ela apresenta-se no corpo humano em quantidades menores que 45 mg/dL nos adultos, ou 18 mg/dL em crianças, e acima desse valor pode representar um sinal precoce de doença renal (Ozbek *et al.*, 2022; Botewad *et al.*, 2023).

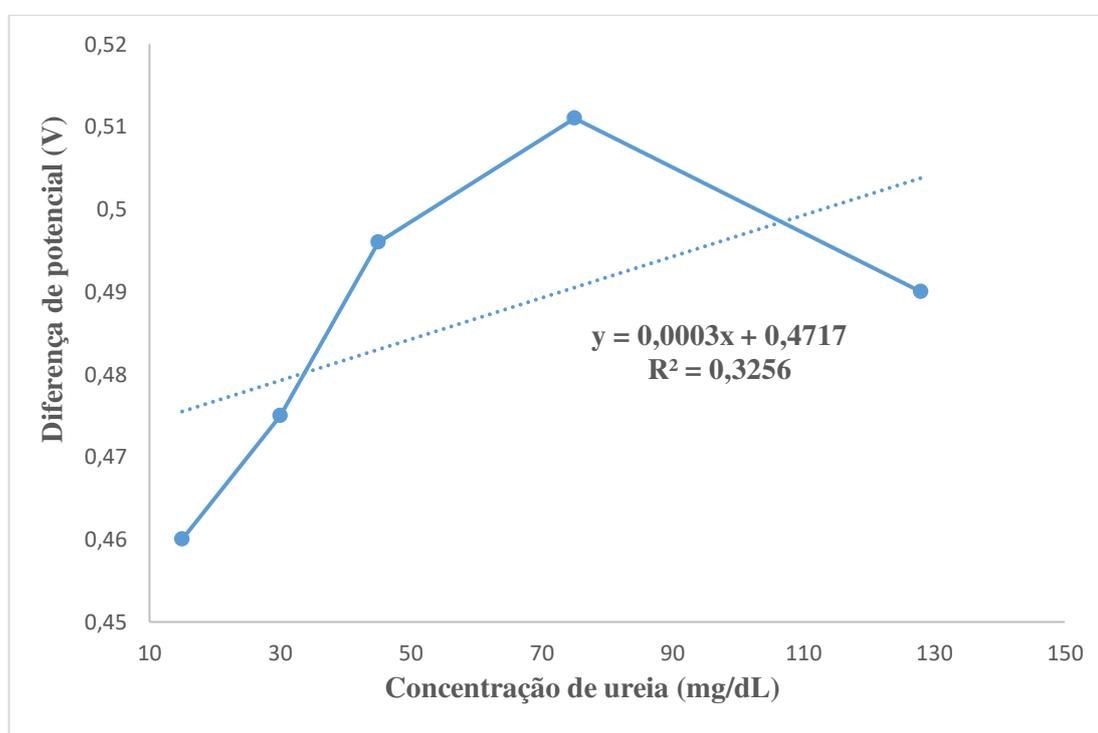


Figura 55 – Cuva de sensibilidade do biossensor

A faixa de linearidade do biossensor foi determinada a partir da curva de sensibilidade, como mostrado na Figura 56, onde observamos uma faixa linear de 15 a 75 mg/dL. A equação média gerada revela uma linearidade aceitável, com um coeficiente de determinação (R^2) próximo a 1.

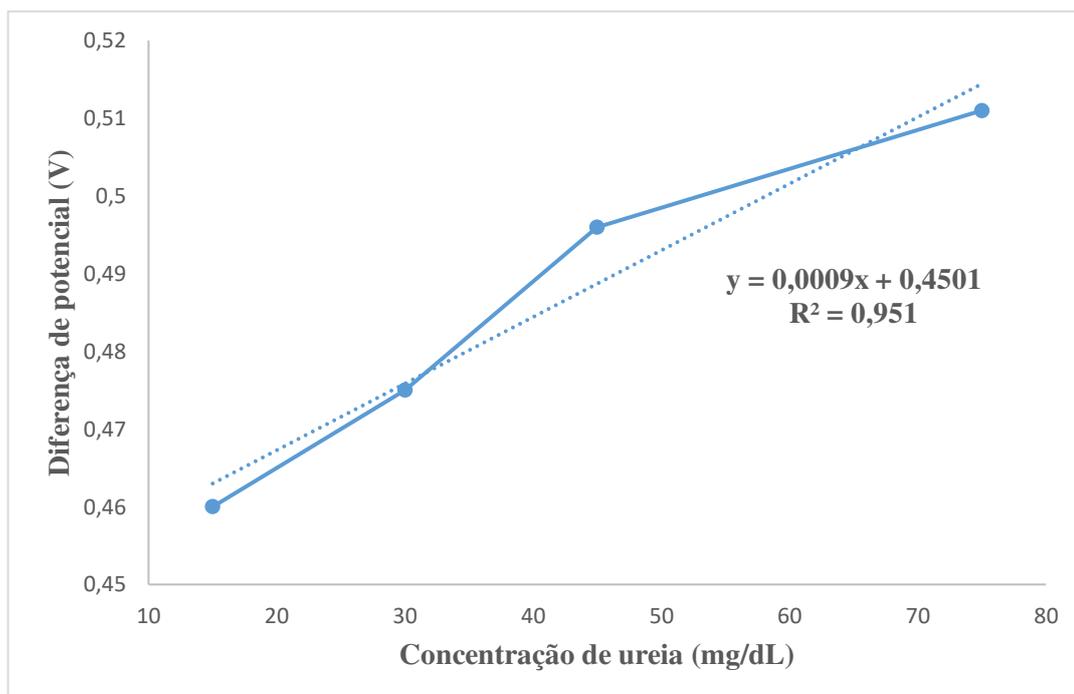


Figura 56 – Curva de linearidade do biossensor

Ambas as curvas de sensibilidade e faixa de linearidade foram obtidas com base em médias estatísticas de três biossensores, visando reduzir o erro experimental. Os testes de sensibilidade e faixa de linearidade são propriedades avaliadas em diversos tipos de biossensores, e eles demonstram um crescimento linear do sinal de resposta em função da concentração do analito a ser identificado e quantificado, como evidenciado em várias pesquisas (Öndeş *et al.*, 2021; Evli *et al.*, 2024).

4.8 Período de estabilidade / Tempo de resposta

Devido à alta eficiência de imobilização e atividade da enzima urease, os biossensores desenvolvidos possibilitaram uma ampla faixa de detecção nas concentrações de 15, 30, 45, 75 e 128 mg/dL de ureia, conforme mostrado na Figura 57.

O tempo de resposta para a estabilidade dos biossensores de ureia foi investigado ao longo de 100 segundos, sendo observado um tempo de resposta de 60 segundos, calculado como o intervalo entre a redução da concentração de ureia na superfície do eletrodo e a obtenção da resposta. Esse intervalo de tempo de resposta demonstrou ser comparável aos estudos anteriores que utilizaram

biossensores potenciométricos de ureia para detecção de ureia (Öndeş *et al.*, 2021; Evli *et al.*, 2024).

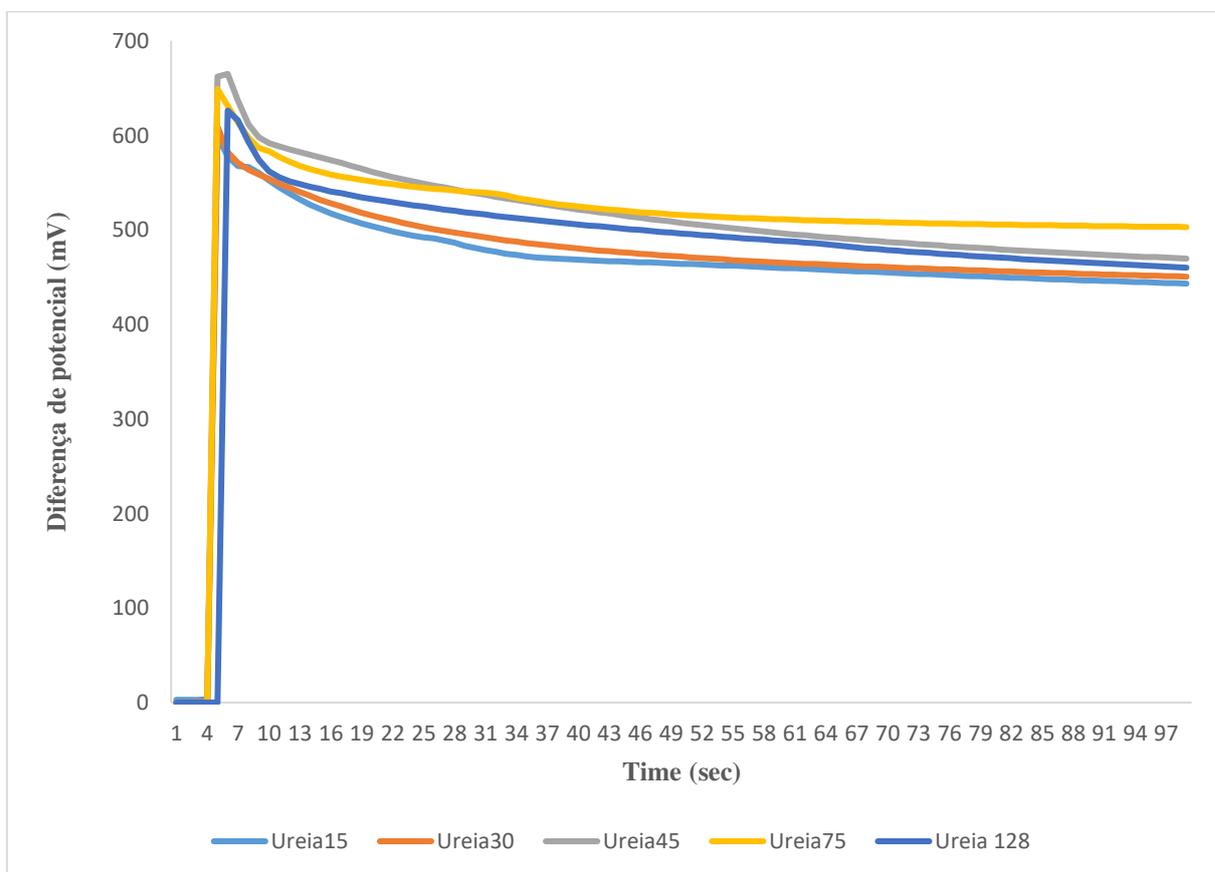


Figura 57 - Tempo de resposta dos biossensores

Esse resultado também confirma a alta sensibilidade do sistema sensor de urease para as moléculas de ureia, conforme ilustrado na Figura 57.

4.9 Reprodutibilidade

Após os testes de sensibilidade, faixa de linearidade, período de estabilidade e tempo de resposta, os biossensores foram avaliados quanto à reprodutibilidade, verificando a variação da resposta em mV em função da concentração de ureia em mg/dL, conforme mostrado na Figura 58.

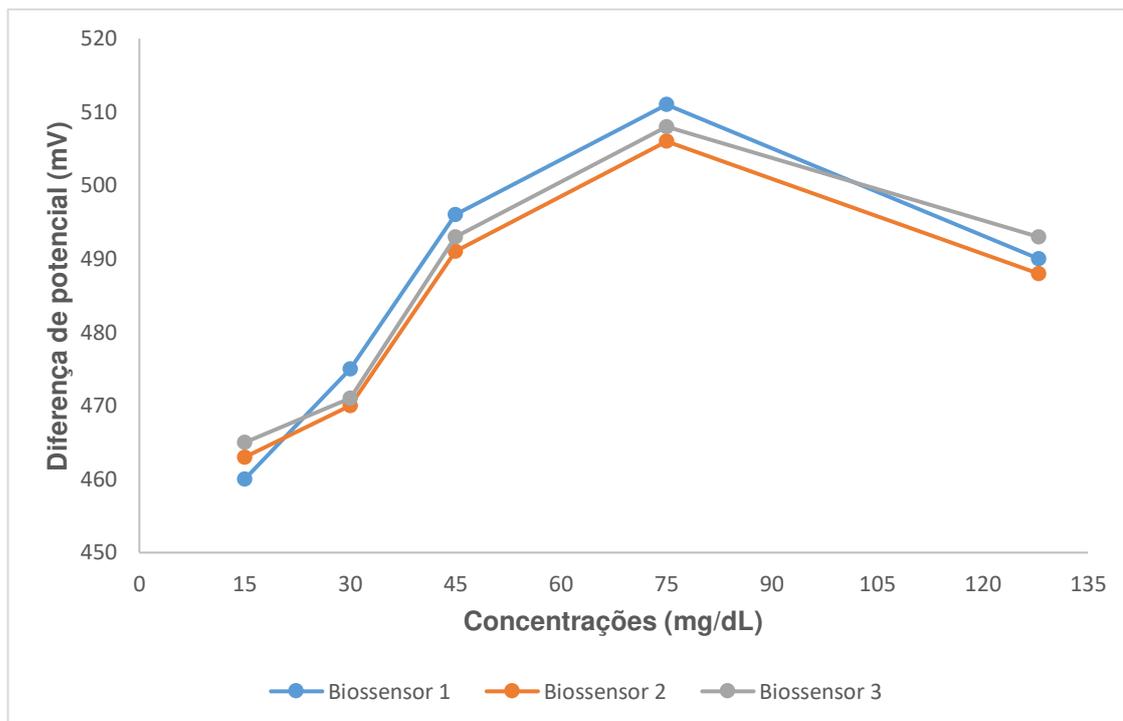


Figura 58 – Curva de Reprodutibilidade

Analisando a Figura 58, observamos que as curvas de bioresposta apresentadas para cada um dos biossensores sofrem pequenas alterações entre elas, o que indica uma boa reprodutibilidade do biossensor. Isso demonstra que a metodologia utilizada na construção dos biossensores é eficaz, corroborando com estudos anteriores (Öndeş *et al.*, 2021; Evli *et al.*, 2024).

4.10 Validação do Detector potenciométrico

Para validar o detector potenciométrico, precisamos gerar uma nova curva de linearidade utilizando os valores de tensão obtidos das reações dos biossensores da Tabela 5. Isso ocorre porque o detector desenvolvido amplifica os valores lidos em 5,5 vezes, esse valor de amplificação foi calculado para que os valores lidos pelo detector, não ultrapassassem 5V. Em outras palavras, cada valor de concentração de ureia resultará em uma tensão de reação, cujo valor será amplificado e registrado pelo detector. Os valores amplificados pelo detector potenciométrico estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Tensões amplificadas a partir de concentrações conhecidas

Concentrações (mg/dL)	Tensões obtidas (V)	Tensões amplificadas (V)
15	0,460	2,530
30	0,475	2,610
45	0,496	2,730
75	0,511	2,810

Os valores das tensões amplificadas foram inseridos em uma planilha do Excel para obter a nova curva de linearidade dos biossensores com as tensões amplificadas, conforme mostrado na Figura 59.

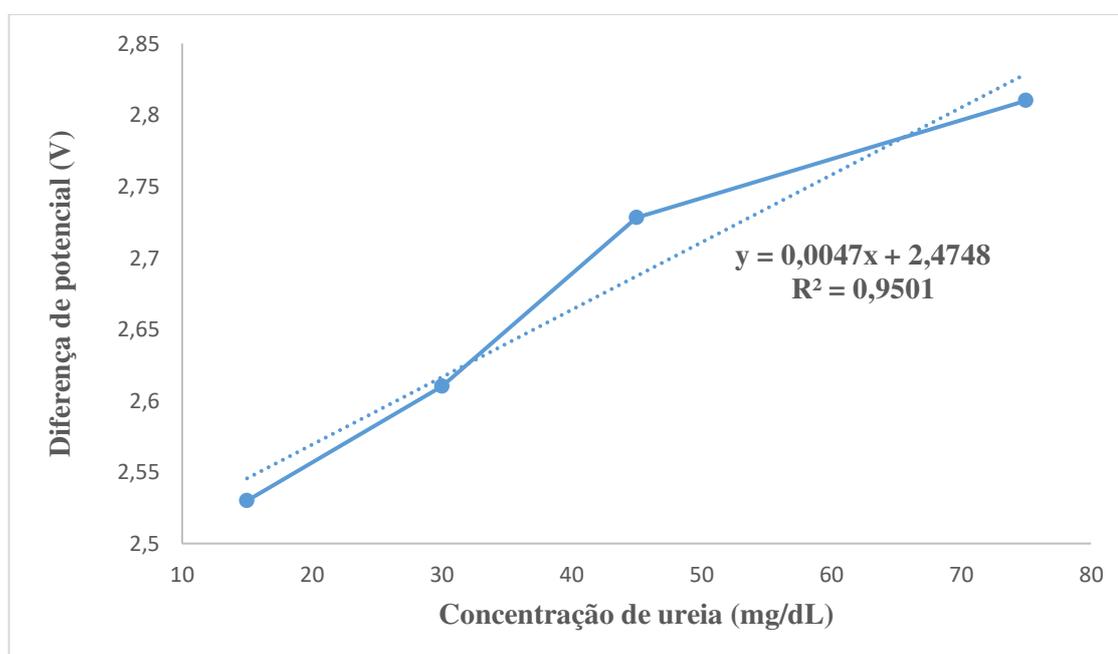


Figura 59- Curva de linearidade do biossensor amplificada

Na Figura 59, é possível observar uma nova equação linear média gerada para os valores amplificados, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9501, indicando uma linearidade aceitável. Essa equação foi integrada ao software do detector potenciométrico para possibilitar a conversão dos valores de tensão lidos das reações dos biossensores em mV para concentrações de ureia em mg/dL.

Após a integração da equação linear no software do detector, foi realizada a validação do mesmo aplicando as tensões conhecidas dos biossensores através de

uma fonte de tensão e corrente. O objetivo foi obter valores de concentrações próximos ou iguais aos conhecidos, como apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentrações em mg/dL geradas pelo detector a partir das tensões em V.

Tensões aplicadas (V)	Tensões amplificadas (V)	Concentrações conhecidas (mg/dL)	Concentrações geradas (mg/dL)
0,460	2,530	15	8
0,475	2,610	30	26
0,496	2,730	45	48
0,511	2,810	75	65

Com base nos valores das tensões amplificadas e das concentrações geradas, ou seja, fornecidas pelo detector potenciométrico, foi construída uma nova curva de linearidade para o detector potenciométrico, conforme mostrado na Figura 60.

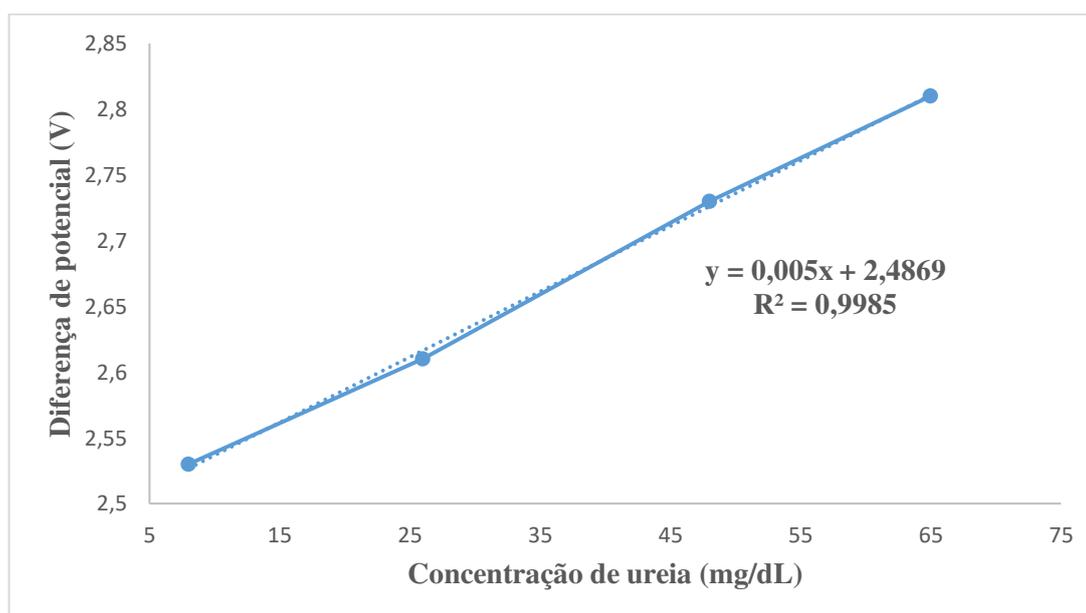


Figura 60 – Curva de linearidade de validação do detector potenciométrico

Analisando a Figura 60, observa-se que à medida que a diferença de potencial da fonte aumenta, também aumenta a concentração em mg/dL. Isso indica que o detector potenciométrico está convertendo efetivamente o sinal de volts recebido pela fonte em uma unidade de concentração mg/dL, demonstrando a eficácia do cálculo

matemático a partir da equação da reta inserida. Comparando com a Figura 59, nota-se um ajuste na equação linear da reta, resultando em um R^2 de 0,9985, indicando uma melhor linearidade proporcionada pelo detector desenvolvido.

Após a validação do detector potenciométrico, foram inseridos biossensores no mesmo e realizada algumas medidas testes, com concentrações de ureia conhecidas (Figura 61).



Figura 61 – Conexão biossensor/detector

Os resultados dos testes com os biossensores, juntamente com o seu detector potenciométrico, estão apresentados na Tabela 8. Esses resultados representam as médias geradas por 3 biossensores para cada concentração.

Tabela 8 – Testes do biossensores junto ao seu detector potenciométrico

Biossensores	Concentrações conhecidas (mg/dL)	Concentrações geradas (mg/dL)
Biossensor 1	15	12 ± 0,66
Biossensor 2	30	33 ± 0,88
Biossensor 3	45	53 ± 0,44
Biossensor 4	75	81 ± 1,11

Os resultados obtidos sugerem que o detector é capaz de realizar medidas diretas, convertendo a diferença de potencial (ddp) obtida na reação dos biossensores, em resposta à concentração de ureia presente nas amostras em mg/dL.

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de ureia utilizando a técnica de impressão em tela mostrou-se eficaz e apresentou vantagens para a produção em larga escala. A Espectroscopia de Infravermelho confirmou as bandas características de absorção típicas da enzima urease no extrato bruto do feijão de porco. A cinética da reação seguiu o modelo de Michaelis-Menten, demonstrando uma afinidade com a ureia e produzindo amônia, o que resultou em um aumento do pH.

As imagens de Microscopia Óptica revelaram eletrodos planos, com eficiente eletrodeposição de antimônio e distribuição uniforme de partículas de prata no eletrodo sensor, o que melhorou a condutividade elétrica e a resposta do sensor. As análises de DRX identificaram a presença de materiais cristalinos, contribuindo para o desempenho dos biossensores.

Os testes realizados nos biossensores indicaram uma resposta linear na faixa de 15 a 75 mg/dL e uma boa estabilidade, com tempo de resposta de 60 segundos. A reprodutibilidade foi confirmada, e o detector potenciométrico desenvolvido mostrou uma relação linear entre a tensão e a concentração de ureia.

Esses resultados indicam que a técnica desenvolvida é promissora para a produção de biossensores eletroquímicos de ureia. Quanto ao detector potenciométrico, esses resultados evidenciam, que o mesmo se apresenta como uma ferramenta portátil e eficaz para monitoramento de ureia.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Desenvolver um plano experimental que varie tanto a concentração da enzima urease quanto a concentração de ureia, com o objetivo de alcançar uma estabilização mais eficiente e, por conseguinte, reduzir o tempo de resposta.
- ✓ Investigar o impacto do design dos biossensores, explorando estruturas flexíveis e outras formas geométricas, visando facilitar a integração com o detector potenciométrico.
- ✓ Aprimorar o processo de fabricação dos biossensores para possibilitar a produção a nível industrial, visando a escalabilidade do projeto.
- ✓ Realizar ensaios clínicos utilizando os biossensores em conjunto com o detector potenciométrico, comparando os resultados com os métodos tradicionais de análise clínica para validar sua eficácia.
- ✓ Avaliar o design do detector potenciométrico visando um sistema mais ergonômico, com conexão ágil e segura, visando melhorar a usabilidade e praticidade do dispositivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGHANY, A. M.; ABDELRAZEK, E. M.; BADR, S. L.; MORSI, M. A. Evaluation of optical parameters and structural variations of UV irradiated (PEO/PVP)/Au polymer nanocomposites. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, p. 1877-1890, 2016.

AGUSTINI, D. **DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS BASEADOS EM FIOS DE ALGODÃO PARA APLICAÇÕES ELETROANALÍTICAS**. 2018. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.

ALCALDE, P. R.; KIRSZTAJN, G. M. Expenses of the Brazilian Public Healthcare System with chronic kidney disease. **J Bras Nefrol**, v. 40, n. 2, p. 122-129, 2018.

AMORIM, M. O. D.; MEAZZA, K.; OLIVEIRA, A. A.; JÚNIOR, J. C. C. S.; RUIZ, Y. L.; ANDRADE, J. C. S. **Synthesis and characterization of natural hydroxyapatite extracted from pirarucu scales (Arapaima gigas)**. *Revista Matéria*. 25 2020.

ANANIAS, D.; G. ROCHA JR, J.; N. CASTRO, R.; R. W. Z. DE OLIVEIRA, I. Electrochemical Biosensors Based on Peroxidase: A Review. **Revista Virtual de Química**, 2022.

ARDUINO UNO. 2021. Disponível em: < <https://store.arduino.cc/usa/arduino-uno-rev3> >. Acesso em: 10/07/2021.

BARRETO, Y. C.; OLIVEIRA, R. S.; BORGES, B. T.; ROSA, M. E.; ZANATTA, A. P.; DE ALMEIDA, C. G. M.; VINADE, L.; CARLINI, C. R.; BELO, C. A. D. The neurotoxic mechanism of Jack Bean Urease in insects involves the interplay between octopaminergic and dopaminergic pathways. **Pestic Biochem Physiol**, v. 189, p. 105290, 2023.

BARROS, V. J. G. F. **Desenvolvimento de biossensor enzimático e eletroquímico para detecção de ureia**. 2017. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais). Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Campina Grande - PB.

BEMTGEN, X.; KRUGER, K.; SUPADY, A.; DUERSCHMIED, D.; SCHIBILSKY, D.; BAMBERG, F.; BODE, C.; WENGENMAYER, T.; STAUDACHER, D. L. First Successful Treatment of Coronavirus Disease 2019 Induced Refractory Cardiogenic Plus Vasoplegic Shock by Combination of Percutaneous Ventricular Assist Device

and Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Case Report. **ASAIO J**, v. 66, n. 6, p. 607-609, 2020.

BHALLA, N.; JOLLY, P.; FORMISANO, N.; ESTRELA, P. Introduction to biosensors. **Essays Biochem**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 2016.

BIKBOV, B.; PERICO, N.; REMUZZI, G.; ON BEHALF OF THE, G. B. D. G. D. E. G. Disparities in Chronic Kidney Disease Prevalence among Males and Females in 195 Countries: Analysis of the Global Burden of Disease 2016 Study. **Nephron**, v. 139, n. 4, p. 313-318, 2018.

BOTEWAD, S. N.; GAIKWAD, D. K.; GIRHE, N. B.; THORAT, H. N.; PAWAR, P. P. Urea biosensors: A comprehensive review. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 70, n. 2, p. 485-501, 2023.

Doença renal crônica atinge 10% da população mundial. 2021. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/saude/2015/03/doenca-renal-cronica-atinge-10-dapopulacao-mundial> >. Acesso em: 05/07/2021.

CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Materials Science and Engineering: An Introduction**.9. 2020.960 ISBN 978-1118324578.

CAMILO, D. E. **FILMES NANOESTRUTURADOS PARA DETECÇÃO DO ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE OURO**. 2019. 71. Dissertação (Mestre). Ciência dos Materiais, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS Sorocaba – SP

CAPRA, L.; MANOLACHE, M.; ION, I.; STOICA, R.; STINGA, G.; DONCEA, S. M.; ALEXANDRESCU, E.; SOMOGHI, R.; CALIN, M. R.; RADULESCU, I.; IVAN, G. R.; DEACONU, M.; ION, A. C. Adsorption of Sb (III) on Oxidized Exfoliated Graphite Nanoplatelets. **Nanomaterials (Basel)**, v. 8, n. 12, 2018.

CARDOSO, M. J. B. **DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO COM IMOBILIZAÇÃO DA UREASE EM MEMBRANAS POLIMÉRICAS**. 2016. 134f Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais). Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Campina Grande - PB.

CARNEIRO, P.; MORAIS, S.; DO CARMO PEREIRA, M. Biosensors on the road to early diagnostic and surveillance of Alzheimer's disease. **Talanta**, v. 211, p. 120700, 2020.

CAVALCANTI, M. H. S.; ALVES, L. B.; DUARTE, A.; MENDES, A. A.; SILVA, J. M. S. F.; SILVEIRA, N. J. F.; ESCOTE, M. T.; VIRTUOSO, L. S. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase via ionic adsorption on superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Facile synthesis and improved catalytic performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 431, 2022.

CHADHA, U.; BHARDWAJ, P.; AGARWAL, R.; RAWAT, P.; AGARWAL, R.; GUPTA, I.; PANJWANI, M.; SINGH, S.; AHUJA, C.; SELVARAJ, S. K.; BANAVOTH, M.; SONAR, P.; BADONI, B.; CHAKRAVORTY, A. Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 109, p. 21-51, 2022.

CHAN, K. M. INNOVATIVE SCHOOL-LEVEL QUANTITATIVE CHEMISTRY EXPERIMENTAL TECHNIQUE (I): PH MEASUREMENT BY ANTIMONY ELECTRODE. **African Journal of Chemical Education**, v. 9, n. 3, p. 162-173, 2019.

CHAN, L.; CHAUDHARY, K.; SAHA, A.; CHAUHAN, K.; VAID, A.; ZHAO, S.; PARANJPE, I.; SOMANI, S.; RICHTER, F.; MIOTTO, R.; LALA, A.; KIA, A.; TIMSINA, P.; LI, L.; FREEMAN, R.; CHEN, R.; NARULA, J.; JUST, A. C.; HOROWITZ, C.; FAYAD, Z.; CORDON-CARDO, C.; SCHADT, E.; LEVIN, M. A.; REICH, D. L.; FUSTER, V.; MURPHY, B.; HE, J. C.; CHARNEY, A. W.; BOTTINGER, E. P.; GLICKSBERG, B. S.; COCA, S. G.; NADKARNI, G. N.; MOUNT SINAI, C. I. C. AKI in Hospitalized Patients with COVID-19. **J Am Soc Nephrol**, v. 32, n. 1, p. 151-160, 2021.

CHENG, Y.; LUO, R.; WANG, K.; ZHANG, M.; WANG, Z.; DONG, L.; LI, J.; YAO, Y.; GE, S.; XU, G. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. **Kidney Int**, v. 97, n. 5, p. 829-838, 2020.

CONSENDEY, M. E. E.; CELESTINO, G. D. G.; SHIGUIHARA, A. L.; JUNIOR, J. A. Preparation and characterizaion of PVP/PAADDA blends. **Brazilian Journal of Development**, v. v.7, p. 95067-95080, 2021.

CONTARDI, M.; KOSSYVAKI, D.; PICONE, P.; SUMMA, M.; GUO, X.; HEREDIA-GUERRERO, J. A.; GIACOMAZZA, D.; CARZINO, R.; GOLDONI, L.; SCOPONI, G.; RANCAN, F.; BERTORELLI, R.; DI CARLO, M.; ATHANASSIOU, A.; BAYER, I. S. Electrospun polyvinylpyrrolidone (PVP) hydrogels containing hydroxycinnamic acid derivatives as potential wound dressings. **Chemical Engineering Journal**, v. 409, 2021.

COSTA, R. L. D.; SORIA, T. C.; SALLES, E. F.; GERECHT, A. V.; CORVISIER, M. F.; MENEZES, M. A. M.; AVILA, C. D. S.; SILVA, E. C. F.; PEREIRA, S. R. N.; SIMVOULIDIS, L. F. N. Acute kidney injury in patients with Covid-19 in a Brazilian ICU: incidence, predictors and in-hospital mortality. **J Bras Nefrol**, 2021.

CREWS, D. C.; BELLO, A. K.; SAADI, G. 2019 World Kidney Day Editorial - burden, access, and disparities in kidney disease. **J Bras Nefrol**, v. 41, n. 1, p. 1-9, 2019.

DUSSE, L. M. S.; RIOS, D. R. A.; SOUSA, L. P. N.; MORAES, R. M. M. E. S.; DOMINGUETI, C. P.; GOMES, K. B. Biomarkers of Renal Function: What Is Currently Available? **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 1, 2017.

EULÁLIO, H. Y. C. **ESTUDO DA ELETRODEPOSIÇÃO E DA ELETROCORROSÃO EM SUPORTES METÁLICOS, PARA USO EM BIOCENSORES ELETROQUÍMICOS**. 2016. 73. Dissertação. Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande - PB.

EVLI, S.; KILIMCI, U.; KARAGÖZ, M.; UYGUN, M.; AKTAŞ UYGUN, D. Preparation of nanocomposite-based biosensor for amperometric urea determination in urine. **Microchemical Journal**, 2024.

EZHILAN, M.; SURESH, I.; NESAKUMAR, N. SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2: A Diagnostic Challenge. **Measurement (Lond)**, v. 168, p. 108335, 2021.

FARIA, H. A. M.; ZUCOLOTTO, V. Label-free electrochemical DNA biosensor for zika virus identification. **Biosens Bioelectron**, v. 131, p. 149-155, 2019.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. USO ANALÍTICO DE TECIDOS E DE EXTRATOS BRUTOS VEGETAIS COMO FONTE ENZIMÁTICA. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.

GAMBURG, Y. D.; ZANGARI, G. **Theory And Practice Of Metal Electrodeposition**. 2014.

GARCIA, D. G.; SANTOS, K. O.; FREITAS, K. F. D.; CARDOSO, M. J. B.; FOOK, M. V. L. Síntese De Nanopartículas De Prata Pela Técnica De Eletrodeposição Para Desenvolvimento De Biossensores / Synthesis of Silver Nanoparticles by Electrodeposition Technique for Biosensor Development. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 31130-31145, 2021.

GE, C.; LI, M.; LI, M.; PEYGHAN, A. A. Au-decorated BN nanotube as a breathalyzer for potential medical applications. **J Mol Liq**, v. 312, p. 113454, 2020.

GUTIERREZ-CAPITAN, M.; BALDI, A.; MERLOS, A.; FERNANDEZ-SANCHEZ, C. Array of individually addressable two-electrode electrochemical cells sharing a single counter/reference electrode for multiplexed enzyme activity measurements. **Biosens Bioelectron**, v. 201, p. 113952, 2022.

COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). 2023. Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>>. Acesso em: 10/07/2021.

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L.; ZHAO, J.; HU, Y.; ZHANG, L.; FAN, G.; XU, J.; GU, X.; CHENG, Z.; YU, T.; XIA, J.; WEI, Y.; WU, W.; XIE, X.; YIN, W.; LI, H.; LIU, M.; XIAO, Y.; GAO, H.; GUO, L.; XIE, J.; WANG, G.; JIANG, R.; GAO, Z.; JIN, Q.; WANG, J.; CAO, B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

HUANG, Z.; LI, X.; XIANG, X.; GAO, T.; ZHANG, Y.; XIAO, D. Porous NiCoP in situ grown on Ni foam using molten-salt electrodeposition for asymmetric supercapacitors. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 6, n. 46, p. 23746-23756, 2018.

İNCE, B.; SEZGINTÜRK, M. K. A high sensitive and cost-effective disposable biosensor for adiponectin determination in real human serum samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 328, 2021.

JIANG, W.; LI, H.; LAO, Y.; LI, X.; FANG, M.; CHEN, Y. Synthesis and characterization of amorphous NiCoP alloy films by magnetic assisted jet electrodeposition. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 910, 2022.

JUNIOR, J. E. R. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n. 3, p. 1-3, 2018.

JÚNIOR, O. B. D.; SILVA, B. M. G. D.; FERREIRA, I. D. S.; LOPES, G. D. S.; LABORDA, E. B. C.; LIMA, L. A. D.; FONSECA, Q. L. D.; LIMA, E. C. D.; NETO, W. D. D. S. A relação da insuficiência renal aguda com a COVID-19. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 23, n. 2, 2023.

KAFARSKI, P.; TALMA, M. Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. **J Adv Res**, v. 13, p. 101-112, 2018.

KAPPAUN, K.; PIOVESAN, A. R.; CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureasases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties - A review. **J Adv Res**, v. 13, p. 3-17, 2018.

KE, C.; XIAO, J.; WANG, Z.; YU, C.; YANG, C.; HU, Z. Characteristics of patients with kidney injury associated with COVID-19. **Int Immunopharmacol**, v. 96, p. 107794, 2021.

KRAJEWSKA, B. Ureasases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p. 9-21, 2009.

KUPSKE, J. W.; KRUG, M. M.; KRUG, R. D. R. Cognitive Function of Patients with Chronic Renal Insufficiency in Hemodialysis: A Systematic Review. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 39, 2023.

KUSCER, D. Screen Printing. In: (Ed.). **Encyclopedia of Materials: Technical Ceramics and Glasses**, 2021. p. 227-232. ISBN 9780128222331.

LOFORTE, A.; GLIOZZI, G.; MARTIN SUAREZ, S.; PACINI, D. Contributory Role of Positron Emission Tomography in a Left Ventricular Assist Device Recipient at the Time of COVID-19 Pandemic. **ASAIO J**, v. 66, n. 6, p. 599-602, 2020.

LONG, C.; XU, H.; SHEN, Q.; ZHANG, X.; FAN, B.; WANG, C.; ZENG, B.; LI, Z.; LI, X.; LI, H. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? **Eur J Radiol**, v. 126, p. 108961, 2020.

LONG, X.; WANG, X.; GUO, X.; HE, M. A review of removal technology for antimony in aqueous solution. **J Environ Sci (China)**, v. 90, p. 189-204, 2020.

MACHADO, M. L. D. M.; GOMES, R. D. S. Modelagem matemática do processo de hidrólise da produção de etanol por meio do mecanismo enzimático de Michaelis-Menten. **Science and Knowledge in Focus**, v. 2, n. 1, 2019.

MAZZEI, L.; CIANCI, M.; BENINI, S.; CIURLI, S. The Structure of the Elusive Urease-Urea Complex Unveils the Mechanism of a Paradigmatic Nickel-Dependent Enzyme. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 58, n. 22, p. 7415-7419, 2019.

MAZZEI, L.; MUSIANI, F.; CIURLI, S. The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. **J Biol Inorg Chem**, v. 25, n. 6, p. 829-845, 2020.

MENTANA, A.; NARDIELLO, D.; PALERMO, C.; CENTONZE, D. Accurate glutamate monitoring in foodstuffs by a sensitive and interference-free glutamate oxidase based disposable amperometric biosensor. **Anal Chim Acta**, v. 1115, p. 16-22, 2020.

MOHAMED, H.; TAMER, T.; AHMED, O. Methods of Enzyme Immobilization. **International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research**, v. 7, p. 385-392, 2016.

Biosensores: Tecnologia e Aplicações. 2017. Disponível em: <
<http://www.biologia.seed.pr.gov.br/arquivos/File/biotecnologia/biosensores.pdf> >.
Acesso em: 21/07/2021.

MOREIRA, R. F.; ALMEIDA, O. D.; CHAVES NETO, A. M. D. J.; MACHADO, N. T. Estudo de misturas de enzimas (complexo celulásico, complexo enzimático, xilanase, beta-glucanase e xilanase, beta-glucosidase e Glucoamilase) na bioconversão do bagaço da cana-de-açúcar em etanol. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 6, p. 6860-6875, 2019.

MUGURUMA, H. Biosensors: Enzyme immobilization chemistry. **Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry**, p. 64-71, 2018.

NARESH, V.; LEE, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. **Sensors (Basel)**, v. 21, n. 4, 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7ª edição. 2018. 1312 páginas ISBN 8582715331.

NEVES, E. I. D. S.; NASCIMENTO, F. D. A. D. V.; LEAL, M. A. C.; OLEGÁRIO, R. G. Papel dos rins na regulação do ph sanguíneo / The role of the kidneys in blood ph regulation. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 90149-90159, 2021.

OGURA, K.; NAKAOKA, K.; NAKAYAMA, M.; KOBAYASHI, M.; FUJII, A. Thermogravimetry/mass spectrometry of urease-immobilized sol-gel silica and the application of such a urease-modified electrode to the potentiometric determination of urea. **Analytica Chimica Acta**, v. 384, n. 2, p. 219-225, 1998.

ÖNDEŞ, B.; AKPINAR, F.; UYGUN, M.; MUTI, M.; AKTAŞ UYGUN, D. High stability potentiometric urea biosensor based on enzyme attached nanoparticles. **Microchemical Journal**, v. 160, 2021.

OZBEK, O.; BERKEL, C.; ISILDAK, O.; ISILDAK, I. Potentiometric urea biosensors. **Clin Chim Acta**, v. 524, p. 154-163, 2022.

PACHECO, V. L.; COLLA, L. M. **UREASE ENZYME AND ITS APPLICATION ON THE AGRICULTURE AND ENGINEERING**. Revista de Ciências Exatas Aplicadas e Tecnológicas da Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo. 11: 1-21 p. 2019.

PAN, X. W.; XU, D.; ZHANG, H.; ZHOU, W.; WANG, L. H.; CUI, X. G. Identification of a potential mechanism of acute kidney injury during the COVID-19 outbreak: a study based on single-cell transcriptome analysis. **Intensive Care Med**, v. 46, n. 6, p. 1114-1116, 2020.

PANDEY, L. M. Design of engineered surfaces for prospective detection of SARS-CoV-2 using quartz crystal microbalance-based techniques. **Expert Rev Proteomics**, v. 17, n. 6, p. 425-432, 2020.

PASTUSIAK, C. F. **Sensores e biosensores associados à nanotecnologia e sua vinculação com a inteligência artificial e a indústria 4.0**. 2021. 53. Monografia (Graduação). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

PRIYADARSHI, K.; NAG, V. L.; KOMBADE, S. P.; GADEPALLI, R. S.; MISRA, S.; SINGH, K. Molecular Diagnosis of COVID-19: An Update and Review. **Annals of the National Academy of Medical Sciences (India)**, v. 56, n. 03, p. 126-137, 2020.

QUEIROZ, C.; SOUSA, A. C. B. D. Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 51849-51860, 2020.

REDA, A.; EL-SAFETY, S. A.; SELIM, M. M.; SHENASHEN, M. A. Optical glucose biosensor built-in disposable strips and wearable electronic devices. **Biosens Bioelectron**, v. 185, p. 113237, 2021.

ROCHA, F. E. V.; MOREIRA, F. F.; RIBEIRO, D. C.; BINI, A. C. D. O uso da posição prona em pacientes com diagnóstico de COVID-19: uma revisão sistemática. **FisiSenectus**, v. 8, p. 133-142, 2020.

RODRIGUES, C. M. B. R.; COSTA, N. B.; VIEIRA, V. R.; GABRIEL, A. E.; GABRIEL, S. A. Covid 19 : sistema renal e cardíaco. **ULAKES Journal of Medicine**, v. 1, p. 60-66, 2020.

RONCO, C.; REIS, T. Kidney involvement in COVID-19 and rationale for extracorporeal therapies. **Nat Rev Nephrol**, v. 16, n. 6, p. 308-310, 2020.

SAFO, I. A.; WERHEID, M.; DOSCHE, C.; OEZASLAN, M. The role of polyvinylpyrrolidone (PVP) as a capping and structure-directing agent in the formation of Pt nanocubes. **Nanoscale Advances**, v. 1, n. 8, p. 3095-3106, 2019.

Potassium antimony(III) tartrate hydrate. 2022. Disponível em: <
<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/substance/potassiumantimonyiiitartratehydrate61383anhydrousbasis331753561> >. Acesso em: 13/06/2022.

SOARES, J. C. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol**. 2011. 125f. (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais,). Programa de Pós Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, , Universidade de São Paulo, São Paulo - SP.

SOUZA, A. C. S. V.; ALENCAR, K. C.; LANDIM, N. L. M. P.; OLIVEIRA, P. M. D. S.; LEITE, C. M. D. C. Perfil epidemiológico da morbimortalidade e gastos públicos por Insuficiência Renal no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, 2020.

SQUISSATO, A. L. **ELETRODOS IMPRESSOS DESCARTÁVEIS: APLICAÇÕES EM AMOSTRAS AMBIENTAIS, ALIMENTÍCIAS E COMBUSTÍVEIS**. 2019. 174. tese (tese). Departamento de Química, UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, Uberlândia.

SU, H.; YANG, M.; WAN, C.; YI, L. X.; TANG, F.; ZHU, H. Y.; YI, F.; YANG, H. C.; FOGO, A. B.; NIE, X.; ZHANG, C. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. **Kidney Int**, v. 98, n. 1, p. 219-227, 2020.

TIAN, B.; GAO, F.; FOCK, J.; DUFVA, M.; HANSEN, M. F. Homogeneous circle-to-circle amplification for real-time optomagnetic detection of SARS-CoV-2 RdRp coding sequence. **Biosens Bioelectron**, v. 165, p. 112356, 2020.

VANMASSENHOVE, J.; KIELSTEIN, J.; JÖRRES, A.; BIESEN, W. V. Management of patients at risk of acute kidney injury. **The Lancet**, v. 389, n. 10084, p. 2139-2151, 2017.

VERSTEEG, G. A.; BREDENBEEK, P. J.; VAN DEN WORM, S. H.; SPAAN, W. J. Group 2 coronaviruses prevent immediate early interferon induction by protection of viral RNA from host cell recognition. **Virology**, v. 361, n. 1, p. 18-26, 2007.

VOGELS, C. B. F.; BRITO, A. F.; WYLLIE, A. L.; FAUVER, J. R.; OTT, I. M.; KALINICH, C. C.; PETRONE, M. E.; CASANOVAS-MASSANA, A.; CATHERINE MUENKER, M.; MOORE, A. J.; KLEIN, J.; LU, P.; LU-CULLIGAN, A.; JIANG, X.; KIM, D. J.; KUDO, E.; MAO, T.; MORIYAMA, M.; OH, J. E.; PARK, A.; SILVA, J.; SONG, E.; TAKAHASHI, T.; TAURA, M.; TOKUYAMA, M.; VENKATARAMAN, A.; WEIZMAN, O. E.; WONG, P.; YANG, Y.; CHEEMARLA, N. R.; WHITE, E. B.; LAPIDUS, S.; EARNEST, R.; GENG, B.; VIJAYAKUMAR, P.; ODIO, C.; FOURNIER, J.; BERMEJO, S.; FARHADIAN, S.; DELA CRUZ, C. S.; IWASAKI, A.; KO, A. I.; LANDRY, M. L.; FOXMAN, E. F.; GRUBAUGH, N. D. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. **Nat Microbiol**, v. 5, n. 10, p. 1299-1305, 2020.

WANG, D.; HU, B.; HU, C.; ZHU, F.; LIU, X.; ZHANG, J.; WANG, B.; XIANG, H.; CHENG, Z.; XIONG, Y.; ZHAO, Y.; LI, Y.; WANG, X.; PENG, Z. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061-1069, 2020.

WANG, K.; KANG, S.; TIAN, R.; ZHANG, X.; ZHANG, X.; WANG, Y. Imaging manifestations and diagnostic value of chest CT of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the Xiaogan area. **Clin Radiol**, v. 75, n. 5, p. 341-347, 2020.

YANG, X.; YU, Y.; XU, J.; SHU, H.; XIA, J. A.; LIU, H.; WU, Y.; ZHANG, L.; YU, Z.; FANG, M.; YU, T.; WANG, Y.; PAN, S.; ZOU, X.; YUAN, S.; SHANG, Y. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 5, p. 475-481, 2020.

ZAKARIA, N. I.; MOHAMMAD, R.; HANIFAH, S. A.; KAMARUDIN, K. H.; AHMAD, A. Low cost and eco-friendly nanoparticles from cockle shells as a potential matrix for the immobilisation of urease enzyme. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 4, 2021.

ZAMBELLI, B.; MUSIANI, F.; BENINI, S.; CIURLI, S. Chemistry of Ni²⁺ in Urease: Sensing, Trafficking, and Catalysis. **Accounts of Chemical research**, p. 520-530, 2011.

ZHANG, J.; CHEN, K.; DING, C.; SUN, S.; ZHENG, Y.; DING, Q.; HONG, B.; LIU, W. Fabrication of chitosan/PVP/dihydroquercetin nanocomposite film for in vitro and in vivo evaluation of wound healing. **Int J Biol Macromol**, v. 206, p. 591-604, 2022.

ZHANG, Y.; ZHU, Y.; ZHENG, S.; ZHANG, L.; SHI, X.; HE, J.; CHOU, X.; WU, Z.-S. Ink formulation, scalable applications and challenging perspectives of screen printing for emerging printed microelectronics. **Journal of Energy Chemistry**, 2021.

ZIDAN, H. M.; ABDELRAZEK, E. M.; ABDELGHANY, A. M.; TARABIAH, A. E. Characterization and some physical studies of PVA/PVP filled with MWCNTs. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 8, n. 1, p. 904-913, 2019.

ANEXO I

CÓDIGOS DE DESENVOLVIMENTO DO SOFTWARE DO DETECTOR POTENCIOMÉTRICO

- **Animação da molécula de amônia**

```

void drawMolecule(int spin_count = 1, int velocity_num = 1, int
nitrogen_color = 0xFF0F, int hydrogen_color = 0x00FF) {
    tft.fillScreen(ST7735_BLACK);

    if (loading_result) {
        tft.setCursor(5, 150);
        tft.println("Carregando...");
    }

    tft.setTextColor(nitrogen_color);
    tft.setTextSize(1);

    int number_of_elements = 3;
    float angle = 2 * 3.14159 / number_of_elements;
    float e_angle;

    tft.setCursor(tft.width()/2 - 2, tft.height()/2 - 2);
    tft.println("N");

    int spin = spin_count * 1500;
    int velocity = velocity_num * 50;

    for (int i = 0; i <= 1500; i += velocity) {
        tft.drawCircle(tft.width()/2, tft.height()/2, 25, nitrogen_color);
        for (int j = 1; j < number_of_elements + 1; j++) {
            e_angle = (angle * j * 60) + (((i - velocity) + 10) /
(number_of_elements + 1));
            tft.setCursor(35 * cos(radians(e_angle)) + 62, 35 *
sin(radians(e_angle)) + 78);
            tft.setTextColor(0x0000);
            tft.println("H");
            tft.drawCircle(35 * cos(radians(e_angle)) + 64, 35 *
sin(radians(e_angle)) + 80, 15, 0x0000);
            tft.setTextColor(hydrogen_color);

            e_angle = (angle * j * 60) + ((i + 10) / (number_of_elements +
1));

            tft.setCursor(35 * cos(radians(e_angle)) + 62, 35 *
sin(radians(e_angle)) + 78);
            tft.println("H");
            tft.drawCircle(35 * cos(radians(e_angle)) + 64, 35 *
sin(radians(e_angle)) + 80, 15, hydrogen_color);
        }
        delay(5);
    }

    tft.setTextColor(ST7735_WHITE);
}

```

Código molécula amônia

- **Obtendo retorno dos botões**

```
int tab_button = 3;
int select_button = 5;

bool tab_button_state = LOW;
bool select_button_state = LOW;

bool detectButtonPress(int pinNumber, int lastState) {
    bool stateNow = digitalRead(pinNumber);

    if (stateNow != lastState) {
        delay(130);
        stateNow = digitalRead(pinNumber);
    }

    delay(20);

    return stateNow;
}
```

Código de retorno dos botões

```
tab_button_state = detectButtonPress(tab_button, tab_button_state);
select_button_state = detectButtonPress(select_button, select_button_state);
```

Função detectButtonPress

- **Desenvolvimento do menu principal**

```
void drawMainMenuTitle() {
    tft.drawLine(0, 10, 127, 10, 0x0F00);
    tft.drawLine(0, 25, 127, 25, 0x0F00);
    tft.setCursor(0, 15);
    for (int j = 0; j < menu_title.length(); j++){
        tft.print(menu_title[j]);
        if (menu_title[j] != " ") {
            delay(50);
        }
    }
}

void drawMainMenuScrollBar() {
    tft.fillRect(117, 32, 6, 123, 0x0000);
    for (int i = 0; i < 29; i++) {
        tft.fillRect(119, 32 + (4 * i), 2, 2, 0xFFFF);
    }
    tft.fillRect(117, 32 + (active_selection * 105 /
((sizeof(analytes)/sizeof(analytes[0])) - 1)), 6, 10, 0xFFFF);
}
```

A

```

void drawMainMenuItens(bool change) {
    if (sizeof(analytes)/sizeof(analytes[0]) < 7) {
        // Se sim, não desenha a barra de rolagem

        if (active_selection == 0) {
            tft.drawRect(tft.width()/2 - 124/2, ((20 *
sizeof(analytes)/sizeof(analytes[0])) + 12), 110, 15, 0x0000);
            tft.drawRect(tft.width()/2 - 124/2, 32, 110, 15, 0xFFFF);
        } else {
            if (change) {
                tft.drawRect(tft.width()/2 - 124/2, ((20 * (active_selection)) +
12), 110, 15, 0x0000);
                tft.drawRect(tft.width()/2 - 124/2, ((20 * (active_selection + 1)) +
12), 110, 15, 0xFFFF);
            } else {
                tft.drawRect(tft.width()/2 - 124/2, ((20 * (active_selection + 1)) +
12), 110, 15, 0xFFFF);
            }
        }
        for (int i = 0; i < sizeof(analytes)/sizeof(analytes[0]); i++) {
            tft.setCursor(5, ((20 * (i + 1)) + 15));
            tft.println(analytes[i]);
        }
    } else {
        // Se não, desenha a barra de rolagem
        if (active_selection == 0) {
            tft.drawRect(tft.width()/2 - 124/2, ((20 * 0) + 12), 110, 15, 0x0000);
            tft.drawRect(tft.width()/2 - 124/2, 32, 110, 15, 0xFFFF);
            tft.setTextColor(0x0000);
            for (int i = 0; i <= 6; i++) {
                tft.setCursor(5, ((20 * (i + 1)) + 15));
                tft.println(analytes[i + (sizeof(analytes)/sizeof(analytes[0]) -
6)]);
            }
            tft.fillRect(0, 150, 113, 10, 0x0000);
            tft.setTextColor(0xFFFF);
        } else if (active_selection == (sizeof(analytes)/sizeof(analytes[0]) -
1)) {
            tft.fillRect(0, 150, 113, 10, 0x0000);
        }

        // Verifica se o analito selecionado é o número 5 ou menor
        if (active_selection <= 5) {
            // Se sim, a posição do retângulo varia

            if (change) {
                tft.drawRect(tft.width()/2 - 124/2, ((20 * (active_selection)) +
12), 110, 15, 0x0000);
            }
        }
    }
}

```

B

```

        tft.drawRect(tft.width()/2 - 124/2, ((20 * (active_selection + 1)) +
12), 110, 15, 0xFFFF);
    } else {
        tft.drawRect(tft.width()/2 - 124/2, ((20 * (active_selection + 1)) +
12), 110, 15, 0xFFFF);
    }
    for (int i = 0; i <= 6; i++) {
        tft.setCursor(5, ((20 * (i + 1)) + 15));
        tft.println(analytes[i]);
    }
} else {
    // Se não, a posição do retângulo fica fixa na posição 5 e os
    elementos na tela variam

    // Verifica se o tamanho da lista menos a seleção atual é menor que a
    quantidade de itens que cabem na tela
    if (sizeof(analytes)/sizeof(analytes[0]) - (active_selection - 1) < 7)
    {

        // Verifica se é o último elemento da lista
        if (sizeof(analytes)/sizeof(analytes[0]) - (active_selection - 1) ==
2) {
            tft.setTextColor(0x0000);
            for (int i = 0; i < 6; i++) {
                tft.setCursor(5, ((20 * (i + 1)) + 15));
                tft.println(analytes[i + (active_selection - 6)]);
            }
            tft.setTextColor(0xFFFF);
            for (int i = 0; i < 6; i++) {
                tft.setCursor(5, ((20 * (i + 1)) + 15));
                tft.println(analytes[i + (active_selection - 5)]);
            }
        } else {
            tft.setTextColor(0x0000);
            for (int i = 0; i <= 6; i++) {
                tft.setCursor(5, ((20 * (i + 1)) + 15));
                tft.println(analytes[i + (active_selection - 6)]);
            }
            tft.setTextColor(0xFFFF);
            for (int i = 0; i <= 6; i++) {
                tft.setCursor(5, ((20 * (i + 1)) + 15));
                tft.println(analytes[i + (active_selection - 5)]);
            }
        }
    }

} else {
    tft.setTextColor(0x0000);
    for (int i = 0; i < sizeof(analytes)/sizeof(analytes[0]) -

```

```

(active_selection - 1); i++) {
    tft.setCursor(5, ((20 * (i + 1)) + 13));
    tft.println(analytes[i + (active_selection - 5)]);
}
tft.setTextColor(0xFFFF);
for (int i = 0; i < sizeof(analytes)/sizeof(analytes[0]) -
(active_selection - 1); i++) {
    tft.setCursor(5, ((20 * (i + 1)) + 18));
    tft.println(analytes[i + (active_selection - 5)]);
}
tft.drawRect(tft.width()/2 - 150/2, ((20 * 5) + 12), 110, 15, 0xFFFF);
drawMainMenuScrollBar();
}
}

void drawMainMenu(bool change_state, bool first_render) {
    if (change_state || !first_render) {
        if (first_render) {
            tft.fillScreen(ST7735_BLACK);
            drawMainMenuTitle();
            drawMainMenuItems(false);
        } else {
            drawMainMenuItems(true);
        }
    }
}
}
}

```

Funções: drawMainMenuTitle (A); drawMainMenuScrollBar (A); drawMenuItems (B) e drawMainMenu (C).

- **Desenvolvimento dos menus específicos para os biossensores**

```

String analytes[] = {
    "Ureia",
    "Creatinina",
    "Glicose",
    "TGO (AST)",
    "TGP (ALT)",
    "Gama GT",
    "Lactato",
    "Bilirrubina",
};

String reference_values[] = {
    " VR: 15 - 45 mg/dL ",
    " VR: 0.6 - 1.2 mg/dL ",
    " VR: 70 - 100 mg/dL ",
    " VR: 5 - 40 U/L ",
    " VR: 7 - 56 U/L ",
    " VR: 0 - 30 U/L ",
    " VR: 1 - 4 mmol/L ",
    " VR: 0.2 - 1.2 mg/dL ",
};

int active_selection = 0;

void drawSensorScreen(bool change_state, bool first_render) {
    if (change_state || first_render) {
        tft.fillScreen(ST7735_BLACK);
        tft.setTextColor(0xFFFF);

        tft.drawLine(0, 10, 127, 10, 0xF00);
        tft.drawLine(0, 25, 127, 25, 0xF00);
        tft.setCursor(0, 15);
        tft.print(analytes[active_selection]);

        tft.setCursor(0, 30);
        tft.println(reference_values[active_selection]);
    }
}

```

```

tft.drawLine(0, 40, 127, 40, 0x0F00);

tft.setCursor(0, 70);
tft.println("  Insira o sensor, ");
tft.println("  coloque a amostra ");
tft.println("  e pressione select ");
tft.println("      para ler.      ");

tft.drawLine(0, 145, 127, 145, 0x0F00);
tft.setCursor(2, 150);
tft.print("Anterior: ");
tft.setCursor(90, 150);
tft.print(result);
}

```

Desenvolvimento das listas dos analitos e valores de referência (A) e Instruções de uso (B).

- **Processamento da informação do biossensor**

```

float result = 0.00;
float vout;
float vin;

void readSensor() {
  tft.setCursor(0, 120);
  int analogValue = analogRead(read_sensor);
  float vout = (analogValue * 5.0) / 1023.0;
  tft.fillRect(0, 120, 127, 20, 0x0000);
  float vin;
  if (vout == 0.0) {
    vin = 0.0;
  } else {
    vin = round((vout + 0.1) / 0.0047) - 526;
  }
  result = (vin);
  tft.print(result);
  tft.print(" mg/dL ");
  delay(100);
}

```

Cálculo de conversão mV para mg/dL

```

void drawResultScreen(bool first_render) {
  if (first_render) {
    tft.fillScreen(ST7735_BLACK);
    tft.setTextColor(0xFFFF);
    if (active_selection == 0) {
      tft.drawLine(0, 10, 127, 10, 0x0F00);
      tft.drawLine(0, 25, 127, 25, 0x0F00);
      tft.setCursor(0, 15);
      tft.println("Resultado - Ureia");
      readSensor();
      tft.setCursor(0, 75);
      if (result < 15.00) {
        tft.println("Valor de ureia baixo!");
      } else if (result < 45.00) {
        tft.println("Bom!");
      } else {
        tft.println("Valor de ureia alto!");
      }
    } else {
      tft.setCursor(0, 15);
      tft.println("Em desenvolvimento...");
    }
  }
}

```

Função drawResultScreen

- **Nível de bateria**

```

int battery_percentage = -1;
int new_battery_percentage;
int counter = 0;
int read_battery_level = A4;

int getBatteryLevel() {
  battery_percentage = round((((analogRead(read_battery_level) * 5)/1023.0
- low_battery) * 62.5);
  return battery_percentage;
}

void lowBatteryInfo() {
  tft.fillScreen(ST7735_BLACK);
  tft.setTextColor(ST7735_WHITE);
  tft.setCursor(tft.width()/2 - 50, tft.height()/2 - 20);

  tft.print("Bateria fraca");
}

void drawBatteryLevel() {
  new_battery_percentage = getBatteryLevel();
  if (counter == 1) {
    tft.fillRect(73, 1, 30, 8, 0x0000);
    tft.setCursor(77, 1);
    battery_percentage = getBatteryLevel();
    tft.print(String(battery_percentage) + "%");
    Serial.println(battery_percentage);
    tft.fillRect(108, 1, 15, 8, 0xFFFF);
    tft.fillRect(105, 3, 3, 4, 0xFFFF);
  }
}

```

Funções: getBatteryLevel, lowBatteryInfo e drawBatteryLevel

```

void setup() {
  Serial.begin(9600);

  pinMode(tab_button, INPUT); // Botão tab
  pinMode(select_button, INPUT); // Botão select
  pinMode(read_battery_level, INPUT); // Entrada analógica para medir o
nível da bateria
  pinMode(read_sensor, INPUT);

  tft.initR(INITR_BLACKTAB);
  tft.fillScreen(ST7735_WHITE); // Preenche a tela com pixels brancos
  tft.setTextWrap(false); // Não deixar que o texto passe do tamanho da
tela

  // Desenhar a logo do laboratório
  drawLogo(2000); // Duração em milissegundos

  // Verificar se o nível da bateria é suficiente
  if (getBatteryLevel() <= 0) {
    // Informar que a bateria está fraca

    lowBatteryInfo();
  } else {
    // Girar molécula
    drawMolecule(1, 1); // Quantidade de giros, velocidade

    // Criar o menu
    drawMainMenu(false, true); // Desenha o menu de seleção dos analitos
  }
}

```

Função setup

- Função loop

```

void loop() {
  if (counter == 300000) {
    counter = 0;
  } else {
    counter += 1;
  }

  // Verificar se o nível da bateria é suficiente
  if (getBatteryLevel() <= 0) {
    // Informar que a bateria está fraca
    lowBatteryInfo();
    delay(5000);
  } else {
    // Rodar o sistema
    tab_button_state = detectButtonPress(tab_button, tab_button_state);
    select_button_state = detectButtonPress(select_button,
select_button_state);

    // Verificar se o botão select foi pressionado para mudar de menu
    if (select_button_state) {
      // tft.println(current_menu);
      delay(100);
      if (current_menu == 0) {
        current_menu = 1;
      } else if (current_menu == 1) {
        current_menu = 2;
      }
    }
  }
}

```

```

        loading_result = true;
    } else {
        current_menu = 0;
    }
    first_render = true;
    counter = 0;
} else {
    first_render = false;
}

drawBatteryLevel();

if (current_menu == 0) {
    // Lógica do Menu principal
    if (tab_button_state) {
        change_state = true;
        if (active_selection == (sizeof(analytes)/sizeof(analytes[0])) - 1)
        (
            active_selection = 0;
        } else {
            active_selection += 1;
        }
    } else {
        change_state = false;
    }
    drawMainMenu(change_state, first_render);
} else if (current_menu == 1) {
    // Lógica da tela do sensor
    if (tab_button_state) {
        current_menu = 0;
        first_render = true;
        counter = 0;
        delay(100);
        drawMainMenu(change_state, first_render);
    } else {
        drawSensorScreen(change_state, first_render);
    }
} else {
    // Lógica da tela do resultado
    if (tab_button_state) {
        current_menu = 1;
        first_render = true;
        counter = 0;
        delay(100);
        drawSensorScreen(change_state, first_render);
    } else {
        if (loading_result) {

            drawMolecule(1, 1);
        }
        drawResultScreen(first_render);
        loading_result = false;
    }
}

```

Função loop