

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

Vinícius José Gomes Formiga Barros

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR ENZIMÁTICO E ELETROQUÍMICO
PARA DETECÇÃO DE UREIA**

Campina Grande – PB

2017

Vinícius José Gomes Formiga Barros

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR ENZIMÁTICO E ELETROQUÍMICO
PARA DETECÇÃO DE UREIA**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Campina Grande – PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

- B277d Barros, Vinícius José Gomes Formiga.
Desenvolvimento de biossensor enzimático e eletroquímico para detecção de ureia / Vinícius José Gomes Formiga Barros. – Campina Grande, 2017.
69 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2017.
- "Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook".
Referências.
1. Biossensor. 2. Insuficiência Renal. 3. Ureia. 4. Urease I. Fook, Marcus Vinícius Lia. II. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande (PB). III. Título.

CDU 621.357(043)

VITAE DO CANDIDATO

Vinícius José Gomes Formiga Barros

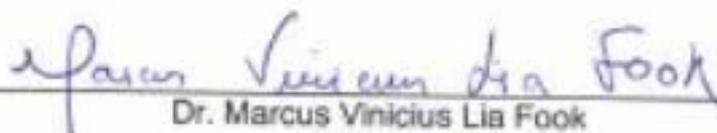
- Graduado em Medicina pela Universidade Federal de Campina Grande (1992).
- Especialização em Anestesiologia pela Sociedade Brasileira de Anestesiologia / Associação Médica Brasileira (1995).

VINÍCIUS JOSÉ GOMES FORMIGA BARROS

DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR ENZIMÁTICO E ELETROQUÍMICO
PARA DETECÇÃO DE UREIA

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

Aprovado em: 28/12/2017



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



Dr. Wladimir Jefferson Bacalhau de Sousa
Examinador Externo
CERTBIO/UFCG



Dr.ª Rita de Cássia Alves Leal
Examinadora Externa
CERTBIO/UFCG



Dr. Gemires de Araújo Neves
Examinador Interno
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG

Ao Senhor Deus, dedico este trabalho.
A minha esposa, filhos, enteada e irmãos.
Em memória dos meus pais e meu irmão.
A todas as pessoas que acreditaram no meu
potencial, me incentivaram e contribuíram
no desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Os resultados que apresentamos de pesquisa e trabalho do mestrado, são frutos da participação de várias pessoas. Ao longo da vida, inúmeras, contribuíram para minha formação acadêmica, meu caráter e cidadania. Não se trata de um esforço individual, e sim, uma construção múltipla por entes queridos essenciais na minha trajetória pessoal e profissional, presente e passado. Alguns, infelizmente, já não se encontram por perto, mas continuam estimulando e torcendo pelo nosso esforço. Faço aqui alguns agradecimentos especiais.

A **Deus**, pela vida, saúde, confiança e força para superar todos os obstáculos em nossa estrada e, oportunizar ao nosso caminho, pessoas maravilhosas que contribuíram em momentos cruciais da nossa jornada.

A **Deus**, também agradeço a oportunidade do reencontro com o **Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook**, outrora, meu professor de química no 1º ano científico que muito contribuiu na minha formação acadêmica.

Aos meus pais, *In Memoriam*, **Ruy Formiga Barros e Maria Ilzanete Gomes Formiga Barros**, pelo apoio, esforço, amor, dedicação e formação pessoal.

A minha esposa **Tânia Coeli Menezes de Oliveira** pelo amor, carinho, ajuda, motivação e incentivo em mais neste desafio.

Ao meu irmão, *In Memoriam*, **Antônio Gomes Formiga Barros** que sempre me motivou e acreditou no meu potencial, pelos seus conselhos, suas fortes cobranças, ensinamentos, carinho e ajuda.

Aos meus filhos **Angélica Dias Meirelles Formiga Barros, Antônio Lucas Dias Meirelles Formiga Barros, Rafael Menezes Formiga Barros** e enteada **Livia Menezes Escorel**, pelo apoio, carinho e compreensão as minhas constantes ausências.

Aos meus irmãos **Francisco Bergson Gomes Formiga Barros, Múria Gomes Formiga Barros e Mirela Gomes Formiga Barros**, pela vibração e união familiar.

A minha sogra **Iara Coeli Menezes de Oliveira**, pela amizade, companheirismo, incentivo e apoio familiar.

Ao Prof. Dr. **Márcio José Batista Cardoso**, meu co-orientador, que tive a oportunidade de conhecer e trabalhar, ao qual sem ele esse trabalho não seria possível, pela sua ajuda, disponibilidade e ensinamentos que me motivaram. Sempre disposto em ajudar, respeitando nossas limitações individuais, com sabedoria e humildade.

Ao amigo **Pedro Cordeiro de Sá Filho**, por todo apoio empregado, pela ajuda, conselhos e incentivo na realização deste trabalho.

Aos professores **Dr^a Rita de Cássia Alves Leal Cruz e Dr. Wladymyr Jefferson Bacalhau de Sousa**, membros da banca examinadora do seminário de mestrado, pela disponibilidade, gentileza e contribuições sugeridas.

A todos que fazem o CERTBIO da UFCG, **Klaydson Farias, Maria Roberta, Hugo Yves, Glória, Antônio, Lívia, Paulinha, Sérgio, Dailma, Otto, Pedro e Tania**, cada um contribuiu, direta ou indiretamente, para que a realização desse trabalho fosse possível.

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

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.*

Arthur Schopenhauer

"A persistência é o menor caminho do êxito".

Charles Chaplin

RESUMO

As doenças causadas pelo mau funcionamento dos rins e das vias urinárias variam com o tipo de patologia e com a parte do sistema afetado, sendo a insuficiência renal uma das doenças que provoca o aumento de toxinas no sangue, como a ureia. O método clínico para quantificar a ureia no corpo é realizado apenas em laboratórios, tem custos e é um procedimento, relativamente, demorado. Dispositivos que diminuam custos, tempo e aumentem o acesso de paciente a um diagnóstico rápido, tal como os biossensores é uma necessidade da sociedade. Diante do exposto, o objetivo dessa pesquisa foi desenvolver biossensor enzimático e eletroquímico para detecção de ureia. Para tal foi produzida tinta de antimônio e grafite, realizada imobilização de enzima e utilizada à técnica de serigrafia para produzir o biossensor. Sendo caracterizado por difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura, avaliação de aderência, condutividade elétrica, avaliação de pH, sensibilidade e faixa de linearidade e teste com amostra clínicas. A difração de raios X confirmou as fases cristalinas presentes nas tintas produzidas. Na microscopia eletrônica de varredura verificou-se a morfologia das partículas e que esta é constituída por uma distribuição de partículas de tamanhos entre 1 e 40 μm . A avaliação de aderência mostrou que as partículas da tinta de antimônio como a de grafite possuem uma boa interação com o suporte. A condutividade da tinta de antimônio é menor que a de grafite, no entanto, se adequam bem para aplicação desejada. O pH das soluções de soro com diferentes concentrações de ureia variou entre (6,3 e 6,88), e que durante as medidas de bioresposta esses valores variam entre (7,56 e 8,88). O biossensor apresentou sensibilidade nas concentrações de 0 a 20mmol/L, no entanto, para concentrações entre 10 e 20mmol/L os valores não foram consideráveis. A faixa de linearidade do biossensor é de 0 a 10mmol/L e que os testes clínicos pelo método padrão apresentaram-se similares aos obtidos com os biossensores desenvolvidos. Nos testes com amostras clínicas, utilizando sangue total, os biossensores mostraram respostas satisfatórias, obtendo valores de conversão para taxa de ureia similares aos apresentados nos testes clínicos tradicional, comprovando a eficácia e a possibilidade de utilização do biossensor com amostra de sangue total, sem qualquer preparo.

Palavras-chave: Biossensor. Insuficiência Renal. Ureia. Urease.

ABSTRACT

The diseases caused by the malfunction of the kidneys and urinary tract vary with the type of pathology and the part of the affected system, with renal failure being one of the diseases that causes the increase of toxins in the blood, such as urea. The clinical method for quantifying urea in the body is performed only in laboratories, has costs and is a relatively time-consuming procedure. Devices that reduce costs, time and increase patient access to rapid diagnosis, such as biosensors is a necessity of society. In view of the above, the objective of this research was to develop enzymatic and electrochemical biosensor for the detection of urea. For that, antimony and graphite paint were produced, enzyme immobilization was performed and the screen printing technique was used to produce the biosensor. It is characterized by X-ray diffraction, scanning electron microscopy, adhesion evaluation, electrical conductivity, pH evaluation, sensitivity and linearity range and clinical sample testing. X-ray diffraction confirmed the crystalline phases present in the inks produced. Scanning electron microscopy showed the morphology of the particles and that the particle size was between 1 and 40 μm in size. The adhesion evaluation showed that the antimony ink particles such as graphite have a good interaction with the support. The conductivity of the antimony paint is less than that of graphite, however, they are well suited for the desired application. The pH of the serum solutions with different urea concentrations varied between (6.3 and 6.88), and that during the bioresponse measures these values vary between (7.56 and 8.88). The biosensor presented sensitivity at concentrations of 0 to 20 mmol / L, however, for concentrations between 10 and 20 mmol / L, the values were not significant. The range of linearity of the biosensor is 0 to 10mmol / L and that the clinical tests by the standard method were similar to those obtained with the developed biosensors. In the clinical samples tests using whole blood, the biosensors showed satisfactory responses, obtaining urea conversion values similar to those presented in the traditional clinical tests, proving the efficacy and the possibility of using the biosensor with a whole blood sample without any preparation.

Keywords: Biosensor. Renal insufficiency. Urea. Urease.

PUBLICAÇÕES

BARROS, V. J. G. F.; LIMA, R. J. S.; FOOK, M. V. L.; FARIAS, K. A. S.; VASCONCELOS, J. S.; CARDOSO, M. J. B. Biossensor Eletroquímico com Imobilização da Urease em Membranas Poliméricas, 2017. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR 10 2017 018590 7. Data de depósito: 30/08/2017. Depositante/Titular: Universidade Federal de Campina Grande.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sistema urinário.	19
Figura 2 - Corte transversal do Rim	20
Figura 3 - Corte transversal do Glomérulo	21
Figura 4 – Ureteres e suas três partes	21
Figura 5 - Partes constituintes da Bexiga	22
Figura 6 - Ilustração da dificuldade de filtração renal	25
Figura 7 - Classificação dos Biossensores quanto ao elemento biológico	27
Figura 8 - Classificação dos Biossensores quanto ao transdutor.....	28
Figura 9 - Reação de hidrólise da ureia catalisada pela urease.....	33
Figura 10 - Fórmula química da ureia	35
Figura 11 – Fatores de riscos que podem levar a insuficiência renal.....	36
Figura 12 – Fluxograma para obtenção do pó antimônio	41
Figura 13 - Preparação da tinta de antimônio	42
Figura 14 - Preparação da tinta condutora de grafite	42
Figura 15 - Imobilização da enzima na membrana de acetato de celulose e na tinta de antimônio.....	43
Figura 16 - Etapas de montagem do protótipo do biossensor com a formação do eletrodo sensor e referência.....	44
Figura 17 - Difratoograma de raios X do pó de antimônio	47
Figura 18 - Difratoograma de raios X da tinta de antimônio.	48
Figura 19 - Difratoograma de raios X da tinta de grafite.....	49
Figura 20 – Imagens do pó de antimônio com ampliações de 1000X, 5000X e 10000X respectivamente.....	51
Figura 21 - Imagens da tinta de antimônio com ampliações de 1000X, 5000X e 10000X respectivamente.....	52
Figura 22 – Espectro de EDS X do pó e da tinta de antimônio.	52
Figura 23 - Curva de Sensibilidade do Biossensor.....	58
Figura 24 - Curva de Linearidade do Biossensor	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Materiais, reagentes e equipamentos utilizados para a preparação do biossensor.....	39
Tabela 2 - Parâmetros cristalográficos do pó e da tinta de antimônio.....	49
Tabela 3 - Valores de concentração de massa de tinta de antimônio.....	53
Tabela 4 - Condutividade elétrica da tinta de antimônio.....	55
Tabela 5 - Valores de pH das soluções de ureia em soro fisiológico ante e durante as medidas de bioresposta.	56
Tabela 6 - Relação da Concentração em mmol/L com mg/dL de ureia.....	57
Tabela 7 - Valores de concentrações de ureia no sangue por teste clínico padrão.	59
Tabela 8 - Valores de bioresposta dos biossensores e concentrações em mmol/L e mg/dL.	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Sistema Urinário.....	19
2.1.1 Insuficiência Renal.....	24
2.1.2 Epidemiologia da Doença Renal Crônica	26
2.2 Biossensores.....	26
2.2.1 Biossensor eletroquímico	29
2.2.2 Transdutor	30
2.2.3 Elemento Biológico	31
2.2.4 Polímeros	34
2.2.5 Ureia	35
2.3 Estado da Arte	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Local da Pesquisa	39
3.2 Materiais e Reagentes.....	39
3.3 Metodologia.....	40
3.3.1 Preparação das Amostras	40
3.3.1.1 Obtenção do pó antimônio	40
3.3.1.2 Preparação da tinta de antimônio	41
3.3.1.3 Preparação da tinta de antimônio	42
3.3.1.4 Imobilização da Enzima Urease.....	43
3.3.1.5 Montagem dos Protótipos de Biossensores	43
3.3.2 Caracterização.....	45
3.3.2.1 Difração de Raios X (DRX)	45

3.3.2.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	45
3.3.2.3	Avaliação da Aderência das Partículas da Tinta de Antimônio e Grafite	45
3.3.2.4	Condutividade Elétrica	45
3.3.2.5	Avaliação do pH	46
3.3.2.6	Sensibilidade e Faixa de Linearidade	46
3.3.2.7	Teste com Amostras Clínicas	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO PARCIAIS	47
4.1	Difração de Raios X (DRX)	47
4.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV/EDS)	50
4.3	Avaliação da Aderência das Partículas da Tinta Antimônio e Grafite	53
4.4	Condutividade Elétrica	54
4.5	Avaliação do pH	56
4.6	Sensibilidade e Faixa de Linearidade	57
4.7	Teste com Amostras Clínicas	59
5.	5. CONCLUSÃO	61
6.	6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	62
7.	REFERÊNCIAS	63
8.	ANEXO	68

1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas pelo mau funcionamento dos rins e das vias urinárias, variam com o tipo de patologia e a parte do sistema afetado, denominadas doenças renais. A insuficiência renal é uma dessas doenças e provoca o aumento de toxinas no sangue, levando sérios riscos à saúde. A ureia é um destes resíduos, que, em quantidades fora da faixa ideal pode representar um sinal precoce de doença renal.

Os métodos de diagnósticos para identificar o paciente com doenças renais, são: avaliação da taxa de filtração glomerular (TFG); o exame sumário de urina (EAS) e exames de imagem, como a ultrassonografia, tomografia e ressonância magnética dos rins e das vias urinárias, sendo métodos precisos, porém demorados e de alto custo.

Dispositivos de diagnóstico de baixo custo, fácil manuseio e inclusão social, fazendo do resultado precoce uma ferramenta de planejamento preventivo das doenças crônicas são uma necessidade e os biossensores representam estes dispositivos. Os biossensores são dispositivos analíticas utilizadas nas mais diversas áreas de aplicações: na medicina, controle de processos, segurança alimentar, monitoramento ambiental, defesa e segurança pessoal, isso decorre de suas características vantajosas face aos métodos convencionais, existindo uma elevada ausência de tais dispositivos no mercado mundial.

Dentre os diferentes tipos de biossensores, os eletroquímicos se destacam em relação: baixo custo, precisão, portabilidade, manuseio, miniaturização e tempo de análise rápido (Liu, 2012; Moreira *et al.*, 2010; Oliveira e Pereira, 2016).

O registro de patentes e estudos de biossensores para detecção de ureia é em diferentes condições bem extenso, tais como: biossensor de ureia para monitoramento de hemodiálise, biossensor eletroquímico em tiras teste com quatro novos recursos para análise de fluídos, biossensores potenciométricos para detecção de ureia e creatinina e o método de formação Thereof, entre outros, entretanto, não há no mercado mundial um biossensor comercial, existindo diversas lacunas (Crismore *et al.*, 2001; Glass, 1999; Hsiung *et al.*, 2010).

A taxa de ureia tem importância para análise clínica, indústria alimentícia, cosméticos e avaliação ambiental, sendo realizadas por métodos convencionais (Singh *et al.*, 2008).

Em cirurgias, a aferição da taxa de ureia dos pacientes é de extrema importância para diagnóstico precoce e/ou monitoramento da função renal, visto que, no sofrimento renal, é a primeira taxa que se altera. Hoje, o exame é realizado apenas por teste clínicos laboratoriais, acarretando demora no diagnóstico e, conseqüentemente, prejuízo ao tratamento precoce. Outro ponto de relevância e motivação é a utilização deste biossensor durante procedimentos de hemodiálise, monitorando, continuamente, as taxas de ureia durante todo o procedimento. Diante do exposto, nosso objetivo foi o desenvolvimento de biossensor enzimático e eletroquímico para detecção de ureia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistema Urinário

O sistema urinário também pode ser chamado de excretor ou excretório (Figura 1). Compreendem os dois rins que produzem a urina, os dois ureteres ou ductos, que transportam a urina para a bexiga, onde fica armazenada por algum tempo, e a uretra, através da qual é expelida do corpo (Moraes, de e Colicigno, 2007; Sobotta, 2014).

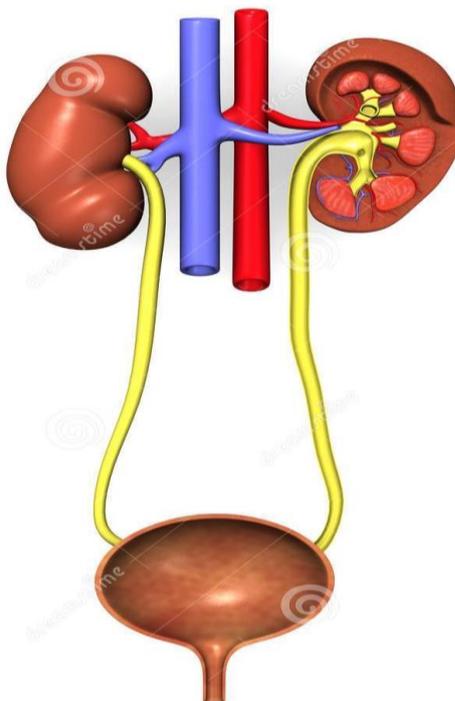


Figura 1 – Sistema urinário (Sobotta, 2014).

O sistema urinário tem como órgãos principais os rins, e estes por sua vez, têm múltiplas funções no organismo que são: excreção de produtos indesejáveis do metabolismo e de substâncias químicas estranhas; regulação do equilíbrio de água e eletrólitos; regulação da osmolalidade dos líquidos corporais e da concentração de eletrólitos; regulação da pressão arterial; regulação do equilíbrio ácido-base; secreção, metabolismo e excreção de hormônios e gliconeogênese (Guyton, Hall e Guyton, 2006; Sobotta, 2014).

Os rins situam-se na região dorsal do corpo, atrás do peritônio e anterior aos músculos lombares, possuem forma semelhante a um grão de feijão, medindo de 11 a 13 cm de comprimento, 5 a 7,5 cm de largura, 2,5 a 3 cm de espessura e pesa de 125 a 170g (homem) e 115g (mulher). Os rins são responsáveis pela absorção, reabsorção e excreção de água e metabólitos produzidos pelo organismo livrando-os de elementos tóxicos, entre eles a ureia (Guyton *et al.*, 2003).

Cada rim, pode ter de 1 a 4 milhões de néfrons, que são as células unidades funcionais dos rins, responsáveis pela filtração do sangue. É uma estrutura tubular que possui, em uma das extremidades, uma dilatação chamada cápsula renal (cápsula de Bowman), onde no seu interior existe uma rede de capilares sanguíneos denominado de glomérulos renais (glomérulo de Malpighi). A este conjunto denomina-se corpúsculo renal (Figura 2 e 3). Todos os dias os dois rins filtram cerca de 120 a 150 litros de sangue para produzir de 1 a 2 litros de urina (Guyton *et al.*, 2003).

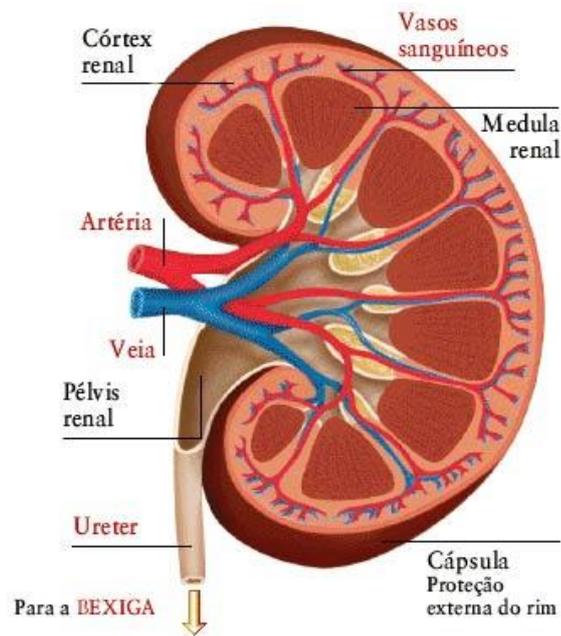


Figura 2 - Corte transversal do Rim (Sobotta, 2014).

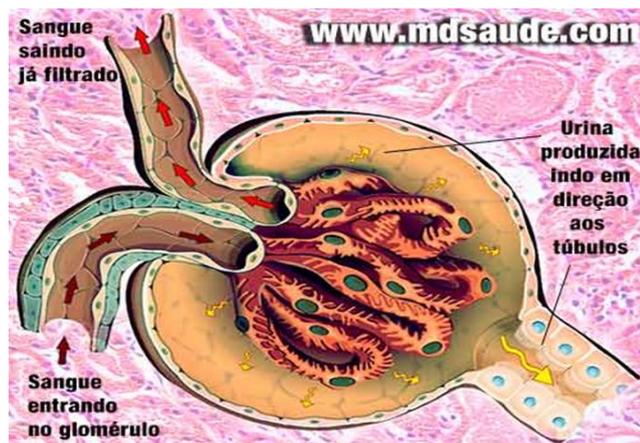


Figura 3 - Corte transversal do Glomérulo (Saude, 2017)

Os ureteres são dois tubos musculares que tem a função de conduzir a urina produzida pelos rins até o órgão que irá armazená-la. Os ureteres são capazes de realizar contrações rítmicas denominado peristaltismo. A urina se move ao longo dos ureteres em resposta à gravidade e ao peristaltismo (Hansen, 2015).

Órgãos pouco calibrosos, os ureteres, Figura 4, têm menos de 6 mm de diâmetro e 25 a 30 cm de comprimento, sendo dividido em três partes: pelve renal esta é formada, pela junção dos cálices renais maiores, a parte mais dilatada de todo o ureter; abdominal, esta se prolonga da pelve renal até onde o ureter deixa a cavidade abdominal e entra na pelve e a pélvica que se estende desde o início da cavidade pélvica até a bexiga (Hansen, 2015; Sobotta, 2014).

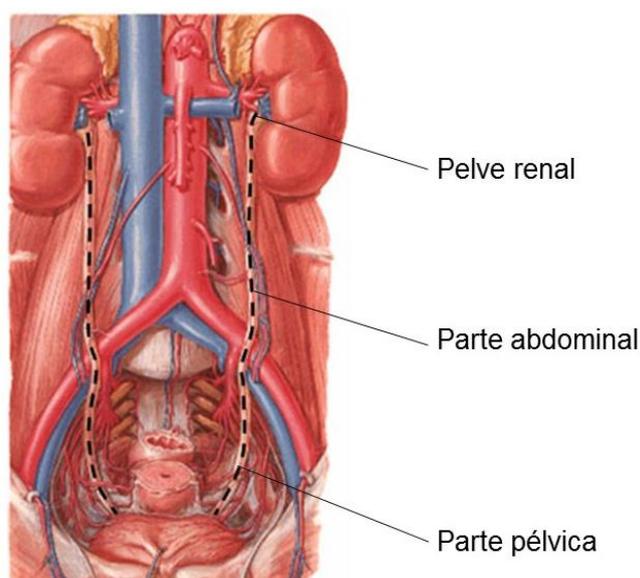


Figura 4 – Ureteres e suas três partes (Caneta, 2015).

A bexiga é uma vesícula de musculatura lisa cuja função é de armazenar a urina produzida nos rins. Quando vazia, a bexiga está localizada inferiormente ao peritônio e posteriormente à sínfise púbica: quando cheia, ela se eleva para a cavidade abdominal. Este órgão possui grande capacidade de distensão, no homem ela é um pouco maior, tem a capacidade aproximada de 500 a 700 ml, enquanto que a mulher sua capacidade de armazenar a urina é menor, cerca de 350 a 500ml (Hansen, 2015; Netter, 2011; Sobotta, 2014).

As principais partes da Bexiga são: úraco ou ligamento umbilical mediano; ápice; corpo; trígono; colo e o fundo como pode ser observado na Figura 5. No interior da bexiga existem três orifícios independentes que formam o trígono da bexiga: dois óstios ureterais – estes orifícios são formados pela entrada do ureter na bexiga e um óstio interno da uretra – início da uretra, é a abertura pela qual a urina deixa a bexiga para ser eliminada (Netter, 2011).

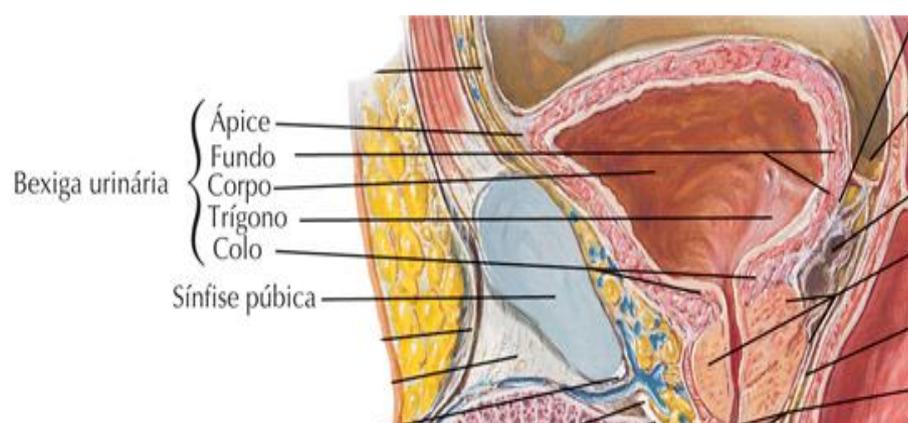


Figura 5 - Partes constituintes da Bexiga (Netter, 2011).

A uretra é um tubo ou canal membranoso que conduz a urina da bexiga para o meio externo, sendo revestida por mucosa que contém grande quantidade de glândulas secretoras de muco. A uretra se abre para o exterior através do óstio externo da uretra. A uretra é o único órgão que é diferente entre os sexos, isso porque a uretra masculina participa do sistema urinário e genital, ou seja, serve tanto para a eliminação da urina quanto para a ejaculação, enquanto que nas mulheres, a uretra tem função exclusiva de eliminar a urina (Tortora, 2016).

Na mulher, a uretra se inicia no interior da bexiga, atravessa o esfíncter (controla a micção) e se abre no pudendo através do óstio externo da uretra, mede cerca 5 centímetros. Já nos homens a uretra se inicia no interior da bexiga, atravessa

a próstata, o esfíncter e todo o corpo esponjoso do pênis, abrindo-se no óstio externo da uretra localizado na glândula do pênis, pode chegar a medir 25 centímetros (Sobotta, 2014; Tortora, 2016).

As principais doenças causadas pelo mau funcionamento dos rins e das vias urinárias são: nefrite; infecção urinária; cálculo renal; obstrução urinária; insuficiência renal aguda; insuficiência renal crônica; tumores renais; doenças multisistêmicas; doenças congênitas, hereditárias e nefropatias tóxicas (Nunes *et al.*, 2010; Petroianu, Alberti e Neto, 2001; Seguro, Yu e Burdmann, 2000; Silva *et al.*, 2016; Skare, Holler e Alves, 2009).

A nefrite é uma manifestação frequente no lúpus eritematoso sistêmico (LES), tendo uma prevalência de 40 a 75%, caracteriza-se pela presença de albumina e sangue na urina, edema e hipertensão (Skare, Holler e Alves, 2009).

Infecção Urinária é a presença de microorganismos na urina, e sua prevalência varia com o sexo e idade dos pacientes, que se queixa de dor, ardência e urgência para urinar e o volume urinado torna-se pequeno e frequente, tanto de dia como de noite. A urina é turva e mal cheirosa podendo surgir sangue no final da micção. Nos casos em que a infecção atingiu o rim, surge febre, dor lombar e calafrios, além de ardência e urgência para urinar (Hachul *et al.*, 2015; Muller, Santos e Corrêa, 2008);

O cálculo renal ou urolitíase é uma massa ou agregado cristalino sólido que se forma nos rins a partir de sais minerais presentes na urina. A cólica renal, com dor no flanco e costas é muito característica, quase sempre com sangue na urina e em certos casos pode haver eliminação de pedras (Petroianu, Alberti e Neto, 2001).

Obstrução Urinária ocorre quando há um impedimento da passagem da urina pelos canais urinários, por cálculos, aumento da próstata, tumores, estenoses de ureter e uretra (Seguro, Yu e Burdmann, 2000).

Insuficiência Renal Aguda é causada por uma agressão repentina ao rim, por falta de sangue ou pressão para formar urina ou obstrução aguda da via urinária. A principal característica é a total ou parcial ausência de urina (Nunes *et al.*, 2010).

Insuficiência Renal Crônica surge quando o rim sofre a ação de uma doença que deteriora irreversivelmente a função renal, apresentando-se com retenção de ureia, anemia, hipertensão arterial, entre outros (Silva *et al.*, 2016).

Os tumores renais são um tipo histológico de câncer que ocorre no rim e pode ser acometido de tumores benignos e malignos. As queixas são de massas palpáveis

no abdômen, dor, sangue na urina e obstrução urinária (Valdair F. Muglia e Prando, 2015);

2.1.1 Insuficiência Renal

A insuficiência renal é a incapacidade dos rins em desempenhar sua função de filtração, reabsorção, homeostase e funções metabólicas, acarretando o aumento de toxinas no sangue. A ureia é um destes resíduos, que, em quantidades acima de 45mg/dl nos adultos ou 18 mg/dl em crianças, pode representar um sinal precoce de doença renal (Junior, 2004; Nunes *et al.*, 2010).

A doença renal pode se apresentar de forma aguda ou crônica. Insuficiência Renal Aguda (IRA) é 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 Insuficiência Renal Crônica (IRC), os rins perdem esta capacidade de filtração, de forma lenta, progressiva e irreversível. A doença possui elevada taxa de mortalidade e representa um grave problema de saúde pública com repercussões financeiras sérias ao Sistema Único Nacional de Saúde. Nesta fase, inicia um trabalho de preparação dos doentes para aceitarem a diálise (Medeiros *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2016).

De acordo com as Diretrizes Clínicas para o cuidado ao paciente com Doença Renal Crônica (DRC) do Sistema Único de Saúde, a doença renal crônica (DRC) é um termo geral para alterações heterogêneas que afetam tanto a estrutura quanto a função renal, com múltiplas causas e múltiplos fatores de prognóstico (Clinemge, 2015; Ministério da Saúde Brasil, 2014).

A doença renal crônica consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível da função dos rins (glomerular, tubular e endócrina). As doenças renais estão entre as causas mais importantes de óbito e incapacidade em diversos países do mundo. As doenças renais graves podem ser divididas em duas categorias principais: (1) insuficiência renal aguda, na qual os rins subitamente param de funcionar de modo total ou quase total, mas que podem em um período futuro recuperar o funcionamento quase normal, e (2) insuficiência renal crônica, na qual ocorre perda progressiva da função de um número crescente de néfrons que, de modo gradual, vão diminuindo a função geral dos rins (Guyton, Hall e Guyton, 2006; Junior, 2004).

Os recursos diagnósticos utilizados para identificar o paciente com DRC 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 (Ministério da Saúde Brasil, 2014).

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, 2004; Naghettini *et al.*, 2012).

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 terapia. É um grave problema de saúde pública, acomete milhares de pessoas no Brasil e no mundo. O estudo da função e dos diversos processos patológicos renais tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, principalmente no campo do desenvolvimento de testes que auxiliem os médicos a estabelecer um diagnóstico precoce, classificar a doença de base, obter prognóstico seguro e monitorar terapêutica medicamentosa. (Sodré, Costa e Lima, 2007).

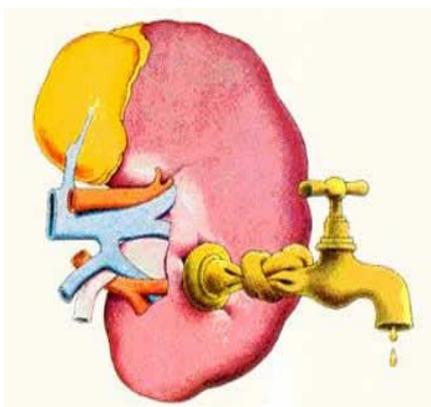


Figura 6 - Ilustração da dificuldade de filtração renal (Ponto de Equilíbrio, 2010).

2.1.2 Epidemiologia da Doença Renal Crônica

Segundo dados do Ministério da Saúde a doença renal atinge 10% da população mundial e afeta pessoas de todas as idades e raças. A estimativa é que a enfermidade afete um em cada cinco homens e uma em cada quatro mulheres com idade entre 65 e 74 anos (Ministério da Saúde e da Agência Brasil, 2015).

No Brasil, cerca de 15 milhões de pessoas tem alguma disfunção renal, o número é duas vezes maior que a 10 anos, desse total 95 mil estão em estado grave, dependendo de hemodiálise ou na fila de transplante e os casos vem crescendo no ritmo de 10% ao ano, a prevalência de doença renal crônica é de 50/100.000 habitantes. A cada ano, segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia, mais de 100 mil brasileiros têm insuficiência renal e fazem hemodiálise, 70% descobrem a doença tardiamente e 15% é a taxa de mortalidade. O custo anual com terapia renal é de mais de 2 bilhões por ano. A fila de brasileiros, esperando por um transplante renal já ultrapassa 35.000 (Nefrologia, 2014, 2017).

O diagnóstico precoce da insuficiência renal aguda pode representar a cura da doença e/ou evitar sua cronicidade e a utilização de dispositivos que possibilite obter essas respostas rápidas e precisas estão sendo constantemente estudados e aprimorados. Os biossensores compreende a classe desses dispositivos que traz a facilidade de uso tanto em ambiente hospitalar como domiciliar. Atualmente, dispomos de inúmeros dispositivos biossensores incorporados a medicina, diagnóstico de câncer, monitorização intra-operatória e controle hormonal (Kazemi-Darsanaki *et al.*, 2012)

2.2 Biossensores

A história dos biossensores na medicina se inicia em meados de 1916, entretanto, comprovado, surgiu em 1962 quando foi produzido o primeiro biossensor, conhecido como "eletrodo enzimático", devido as tiras enzimáticas que servem como material biocatalíticos, este pequeno dispositivo foi utilizado para detectar os níveis de glicose no sangue e monitorá-la, controlando o diabetes (Kazemi-Darsanaki *et al.*, 2012).

Sensoriamento biológico é uma ferramenta fundamental para a compreensão de sistemas vivos, mas também encontra aplicação prática na medicina, descoberta

de medicamentos, controle de processos, segurança alimentar, monitoramento ambiental, de defesa e de segurança pessoal. Há uma ausência evidente de sensores, adequadamente potentes, para química corporal, residindo aí as oportunidades reais de progresso de biossensores (Tiwari e Turner, 2014).

A pesquisa em biossensores é multidisciplinar, sendo portando fundamental para o desenvolvimento de uma determinada aplicação profissional de diferentes áreas tais como: engenharias (elétrica, química, ciências dos materiais etc.), química, física, biologia, medicina entre outras (Bahadir e Sezgintürk, 2015; Calil e Silva, 2011).

Os biossensores são utilizados nas diferentes áreas tais como: laboratório de pesquisas, biodefesa, meio ambiente, indústrias de processos, diagnósticos e em point of care, devido as suas propriedades de respostas rápidas, precisas, seletivas e o menor custo (Desmet *et al.*, 2015; Furtado *et al.*, 2008)

Os biossensores são dispositivos analíticos formados pela combinação de um elemento biológico e um transdutor, utilizadas nas mais diversas aplicações, isso decorre de suas características vantajosas face aos métodos convencionais laboratoriais (Oliveira e Pereira, 2016). Sendo classificados de acordo com o elemento biológico ou transdutor utilizado no seu desenvolvimento conforme ilustrado na Figura 7 e 8 (Malhotra e Turner, 2003; Singh *et al.*, 2008).

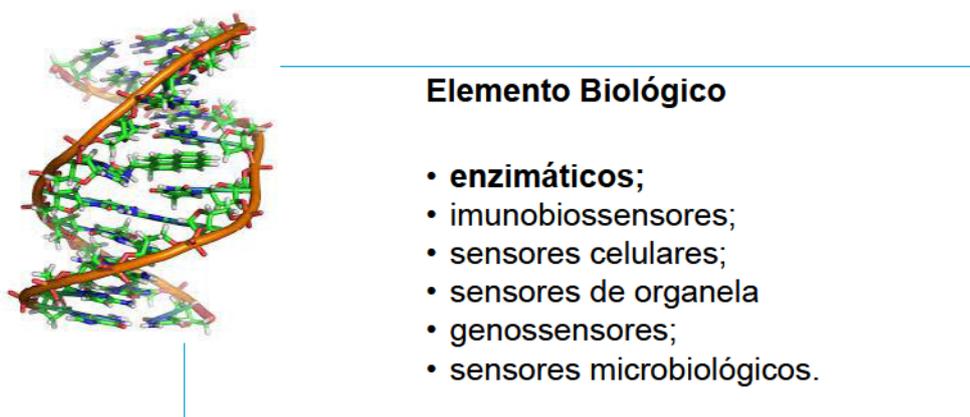


Figura 7 - Classificação dos Biossensores quanto ao elemento biológico (Malhotra e Turner, 2003; Oliveira *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2008).

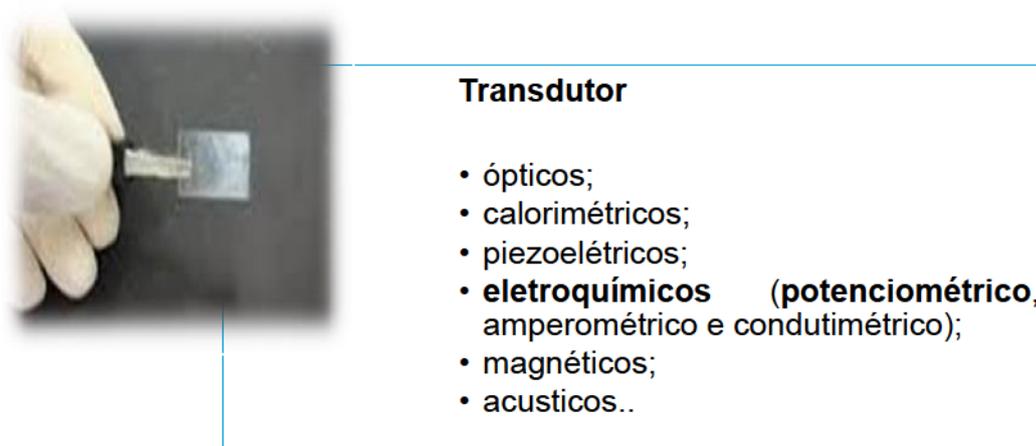


Figura 8 - Classificação dos Biossensores quanto ao transdutor (Malhotra e Turner, 2003; Oliveira *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2008).

Biossensores enzimáticos: usam enzimas como elementos biológico, como é o caso da 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 (Calil e Silva, 2011; Moreira *et al.*, 2010).

Imunobiossensores: são biossensores que monitoram as interações do par anticorpo-antígeno, nas quais o anticorpo ou o antígeno são imobilizados na superfície do transdutor. Podem facilitar a regeneração do componente imobilizado, maximizando, assim, o uso do reagente, que no caso dos dispositivos convencionais pode ser utilizado apenas uma única vez. A sensibilidade de um imunobiossensor depende da afinidade e da especificidade da ligação e do ruído do sistema transdutor. Entre os analitos que podem ser investigados pelos imunobiossensores estão os hormônios (esteroides e hormônios pituitários), drogas, vírus, bactérias e poluentes ambientais (Porfírio, Giarola e Pereira, 2016; Santana *et al.*, 2017).

Biossensores celulares: utilizam microrganismos, as células são incorporadas à superfície de um eletrodo, sendo o princípio de operação muito semelhante aos biossensores enzimáticos, contudo apresentam custo reduzido, maior atividade catalítica e estabilidade (Moreira *et al.*, 2010).

Biossensores ópticos: se baseiam em mudanças nas propriedades ópticas das substâncias, com finalidade de monitorar a concentração do analito. Entre as propriedades ópticas que podem ser utilizadas estão: absorção, índice de refração,

fluorescência, fosforescência, refletividade e comprimento de onda. Entre as vantagens desses biossensores estão o seu tamanho reduzido, a velocidade de resposta, a facilidade de integração, imunidade a ruído eletromagnético, boa biocompatibilidade e não-necessidade de elementos ativos na biocamada (Calil e Silva, 2011; Moreira *et al.*, 2010).

Biossensores acústicos: são baseados na propriedade da piezo-eletricidade que os cristais anisotrópicos. Quando é aplicada uma tensão alternada a este biossensor, o cristal oscila com uma determinada frequência, sendo tal frequência associada à massa e às constantes elásticas do cristal (Moreira *et al.*, 2010).

Biossensores calorimétricos: usam o calor gerado por reações catalisadoras de enzimas exotérmicas para medir a concentração do analito. As mudanças de temperatura são geralmente determinadas por termopares de alta sensibilidade (Nirschl, Reuter e Vörös, 2011).

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 (Oliveira *et al.*, 2015).

2.2.1 Biossensor eletroquímico

Dentre os diferentes tipos de biossensores os eletroquímicos destacam-se devido tais dispositivos oferecem vantagens como simplicidade, baixo custo, a possibilidade de miniaturização que o torna de fácil manuseio, portátil, são precisos e, ainda, possui o tempo de análise reduzido (Liu, 2012; Oliveira e Pereira, 2016).

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 (Monosik *et al.*, 2012).

Sendo esses biossensores constituídos por: analito, bioreceptor; transdutor e o detector/processador, dos quais os componentes fundamentais são o bioreceptor e o transdutor (Calil e Silva, 2011).

Dependendo do princípio de medição, os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos em: amperométrico, potenciométrico e condutimétrico (Bahadir e Sezgintürk, 2015; Marinho *et al.*, 2016; Porfírio, Giarola e Pereira, 2016).

Os biossensores amperométricos se baseiam em reações de oxidação e redução, que envolve um determinado analito para medição de suas concentrações, essas reações geram um fluxo de corrente entre os eletrodos, sendo essa corrente gerada sobre um potencial constante (Marinho *et al.*, 2016)

Os biossensores condutimétricos se baseiam na medição da condutância da solução contendo o analito gerada por reações catalíticas, que produzem ou consomem espécies químicas que alteram a condutividade global da solução (Melo, 2008).

Os biossensores potenciométrico, 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 (Malhotra e Turner, 2003).

2.2.2 Transdutor

O transdutor tem a função converter o sinal físico gerada pela interação entre o elemento biológico e o analito alvo em um outro sinal de forma mensurável. De acordo com o princípio de energia envolvida na transdução, sendo 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) (Atta; Galal; Ali, 2011; Chaubey; Malhotra, 2002; Skladal *et al.*, 2010).

Os transdutores eletroquímicos 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 (Porfírio, Giarola e Pereira, 2016; Souza, De, Machado e Avaca, 2003).

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, níquel, cobre, antimônio, ligas etc.), poliméricos (polianilina – PANI, polipirrol, politiofeno etc.), cerâmicos (titanato de bário, titanato zirconato de chumbo, óxido de zinco etc.) (Ansari *et al.*, 2010; Okafor *et al.*, 2008; Soares, 2011).

Os metais são materiais condutores caracterizados por diversas grandezas, dentre as quais se destacam: 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 avaliados se são capazes de desempenhar as funções que lhe são atribuídas (Callister, W. D. e Rethwisch, 2009; Shackelford, 2008).

O antimônio é empregado como transdutor no desenvolvimento de biossensores nos mais diversos tipos de aplicação tais como: metais pesados, ureia, creatinina, pH entre outros, devido suas 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, seja na forma de macro, micro ou de nanopartículas (Chan, 2012; Marinho *et al.*, 2016; Silwana *et al.*, 2015).

O antimônio (Sb) é um semimetal e o quarto elemento do grupo 15 da tabela periódica (antigo grupo 5A). Possui quatro estados de oxidação Sb (V), Sb (III), Sb (0), e Sb (III). O antimônio e seus compostos apresentam várias propriedades que podem ser utilizados em diversas aplicações. 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 (Ungureanu *et al.*, 2015).

2.2.3 Elemento Biológico

O elemento biológico tem a função de reconhecer e interagir seletivamente com o analito, resultando na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas que são detectadas e medidas pelo transdutor. Podendo ser o elemento biológico um micro-organismo, anticorpos, ácidos nucleicos, células, organelas, enzimas, proteínas entre outros que são fixados no transdutor por diferentes técnicas (Oliveira e Pereira, 2016; Porfírio, Giarola e Pereira, 2016).

O mecanismo de interação entre o elemento biológico e o analito pode ocorrer por biocatálise ou bioafinidade, definindo os biossensores em biocatalíticos e de bioafinidade. Os biossensores biocatalíticos se baseiam nas reações catalisadas pelo componente biológico, três estratégias podem ser utilizadas, considerando-se que um ou mais analitos reagem na presença do elemento de reconhecimento biológico, e produzem um ou mais produtos. 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. Os biossensores de bioafinidade se baseiam através da ligação química entre o material biológico e o analito formando um composto estável (Calil e Silva, 2011; Furtado *et al.*, 2008).

O bioreceptor ou elemento biológico é um componente de extrema importância para a fabricação dos biossensores propiciando alta sensibilidade e seletividade (Hansen, 2011). Existindo vários componentes biológicos com potencial a serem utilizados em sistemas de biossensores, tais como: enzimas, anticorpos, receptores, ácidos nucleicos, células, bactérias (Calil e Silva, 2011; Soares, 2011).

A uréase é uma enzima altamente eficiente, amplamente distribuída na natureza, dependente de níquel, cuja função catalítica é a hidrólise de ureia, e tem sido utilizada, sobretudo, quando extraída das sementes de leguminosas e de várias bactérias e fungos, produzindo duas moléculas de amônia e uma de ácido carbônico Figura 99. São sintetizados por numerosos organismos, incluindo plantas, bactérias, algas, invertebrados e fungos, e também ocorrer em solos como uma enzima do solo (Carlini, 2014; Krajewska, 2009).

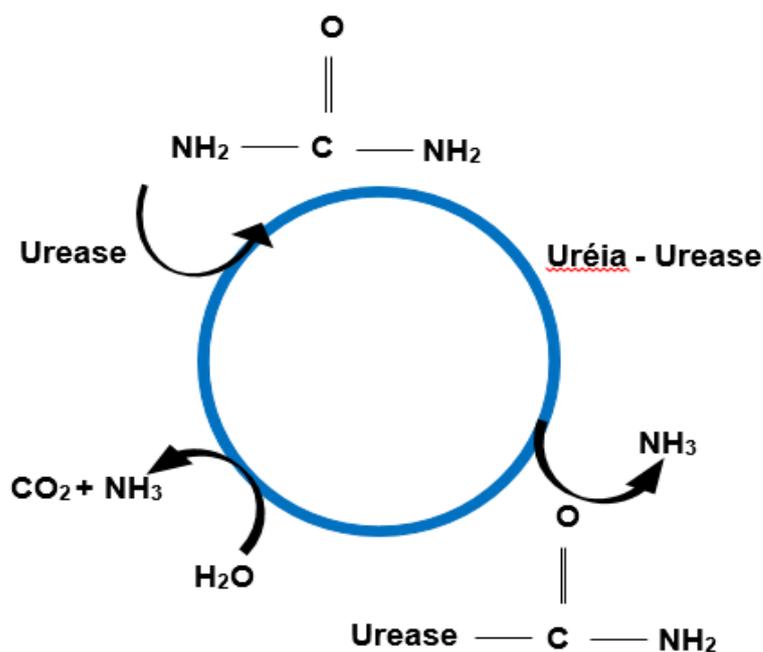


Figura 9 - Reação de hidrólise da ureia catalisada pela urease (Fonte: Própria).

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, 2014; Oliveira, 2011).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma ferramenta importante para a estabilização da enzima, permite a reutilização e reduz a inativação por influência da temperatura e solventes, o que pode ser atrativo para o setor industrial (Bezerra, Bassan e Monti, 2017; Mendes *et al.*, 2011).

O processo de imobilização da enzima pode induzir a dois fatores: primeiro a quantidade de enzima imobilizada, está relacionada com a área de superfície/volume da matriz e, segundo, a porosidade da matriz que proporciona a rápida difusão da solução para a enzima imobilizada e afetam diretamente o desempenho dos biossensores enzimáticos (Mozaffari *et al.*, 2014).

Os métodos utilizados mais empregados na imobilização enzimática são: adsorção física ou química; encapsulamento; oclusão em gel; ligação covalente e ligação covalente cruzada (Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi, 2004; Oliveira, 2011).

Diversos materiais são empregados para imobilização dos elementos biológicos, entretanto, as matrizes poliméricas como: gelatinas, poliacrilamida, colágeno, triacetato de celulose e alginato são as mais utilizadas no desenvolvimento dos biossensores enzimáticos, devido suas propriedades físico-químicas, biológicas e disponibilidade (Mendes *et al.*, 2011).

2.2.4 Polímeros

Os polímeros são macromoléculas constituídas pela repetição de pequenas e simples unidades químicas, denominadas de monômeros. São compostos tanto orgânicos quanto inorgânicos, naturais ou sintéticos de alta massa molar (da ordem de 10^4 a 10^6 g/mol), caracterizados por seu tamanho, estrutura química e interações intra e intermoleculares (Shackelford, 2008).

Sendo classificados em relação à estrutura química, quanto a estrutura química do mero: cadeia carbônica ou heterogêneas; número de diferentes meros presentes: copolímero ou homopolímero; forma da cadeia polimérica: linear, ramificado, ligações cruzadas e rede; configuração da cadeia: cabeça-cabeça e cabeça-cauda; isomerismo geométrico: cis e trans; estéreo isomerismo: sindiotática, isotática e atática. Quanto ao comportamento mecânico podem ser termoplásticos, termorrígidos ou elastômeros; e quando ao método de preparação, os polímeros podem ser de adição ou cadeia e polímeros de condensação ou etapa (Callister, W. D. e Rethwisch, 2009; Shackelford, 2008).

A utilização de polímeros na área de ciência e tecnologia de biossensores tem crescido significativamente devida suas vantagens, tais como: disponibilidade, diversidade, facilidade de síntese, possibilidade de incorporação de diferentes espécies dopantes e a imobilização de biomoléculas (Oliveira *et al.*, 2013).

O acetato de celulose é um polímero de origem natural muito utilizado no desenvolvimento de biossensores, sendo um dos derivados da celulose de grande importância comercial (Edgar *et al.*, 2001; Hurk, Van Den e Evoy, 2015; Steinmeier, 2004). Os polímeros naturais são polímeros derivados de plantas e animais, tais como: borracha, algodão, lã, couro; seda; proteínas, enzimas, amido e a celulose (Callister, W. D. J. e Rethwisch, 2009).

Entre as funções dos polímeros nos biossensores estão o seu uso como intermediários nos processos de interação receptor/analito e na transdução do sinal

para melhorar o tempo de resposta, a sensibilidade e o limite de detecção (Oliveira *et al.*, 2013).

2.2.5 Ureia

A ureia ou carbamida 10 é um composto orgânico, cristalino, incolor, tóxica, formada principalmente no fígado, filtrada pelos rins e eliminada na urina e no suor, composto por duas moléculas do grupo funcional amina (-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 (Jha, Topkar e D'Souza, 2008; Nelson e Cox, 2014).

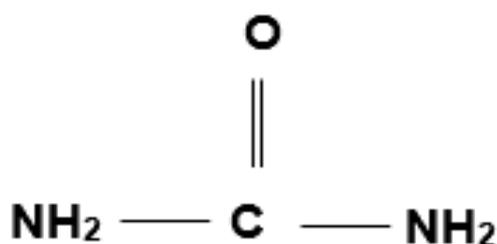


Figura 10 - Fórmula química da ureia (Fonte: Própria).

A determinação de ureia é de grande importância para áreas como análise clínica, indústria alimentícia, cosméticos e avaliação ambiental. Na área clínica, a ureia é quantificada em testes patológicos de sangue e urina; na indústria alimentícia, analisa-se ureia em leite, já que por se tratar de um constituinte não natural, sua presença pode significar adulteração do mesmo. Os valores de referência da ureia no adulto variam entre 15 e 45mg/dL e nas crianças, entre 05 e 18 mg/dL, e suas alta taxa no organismo pode ser um sinal, precoce, de que os rins não estão funcionando adequadamente (Singh *et al.*, 2008).

Ureia detém uma função importante no metabolismo dos compostos contendo azoto na urina dos mamíferos. A função metabólica renal é determinada pela quantidade de ureia no sangue, ocasionando sérios riscos à saúde, a Figura 11 mostra

alguns fatores de riscos que podem levar ao aparecimento da insuficiência renal (György *et al.*, 2010).

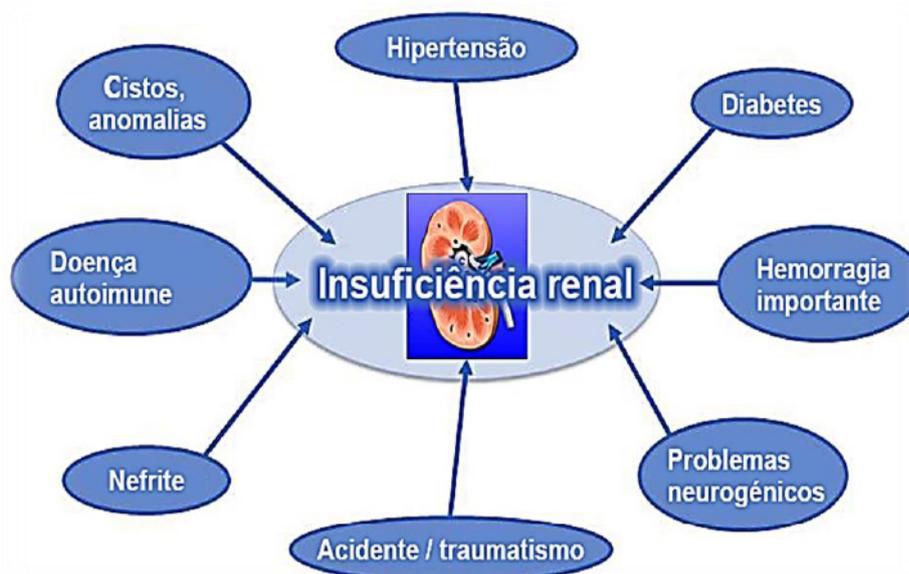


Figura 11 – Fatores de riscos que podem levar a insuficiência renal (Clinemge, 2015).

2.3 Estado da Arte

A insuficiência renal é uma doença grave, quando aguda, pode ser reversível se diagnosticada precocemente, considerada uma das principais complicações nas unidades de terapia intensiva, acomete grande quantidade de pacientes na UTI, quando crônica, possui elevados índices de morbidade e mortalidade, superando outras patologias como câncer de mama, útero e próstata (Silva *et al.*, 2016).

Mais de 120 mil brasileiros têm insuficiência renal e fazem hemodiálise, a cada ano, segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia, anualmente, 21 mil pessoas entram nesse grupo. É uma doença silenciosa, afeta jovens e idosos, nos seus diversos tipos, podendo levar a hemodiálise, sendo necessário realização de exames periódicos para que qualquer problema seja detectado precocemente (Castro, 2017).

Alguns cuidados são essenciais, para que o paciente fique bem antes, durante e após cirurgias, por isso realizar um check-up incluindo exames laboratoriais e clínicos como eletrocardiograma, eletroencefalograma, dosagem de açúcar no sangue, hemograma completo, dosagem da ureia e creatinina, coagulação, entre

outros. Segundo o sistema American Society of Anesthesiologists – ASA a função renal deve ser avaliada considerando-se o grau da cirurgia e a idade do paciente (Sebastião Dos Santos e Kemp, 2011).

Na atualidade, o diagnóstico da insuficiência renal é realizado através de exames de sangue, exames de urina, exames de imagem ou biópsia renal. Os exames mais comuns para triagem e diagnóstico são as aferições das taxas de ureia e creatinina no sangue. Os níveis destes elementos aumentam quando diminui a filtração glomerular, indicando um má funcionamento renal. De longe, são os primeiros indicadores da doença, entretanto, a taxa de ureia é a primeira que se eleva e propicia uma suspeição precoce da patologia.

O exame para quantificar a dosagem de ureia, no sangue ou na urina, é realizado em laboratórios próprios ou laboratórios de hospitais e clínicas. O método mais utilizado é o colorimétrico e enzimático de 2 pontos ou ponto fixo. A ureia é hidrolisada pela urease à íons amônio e CO_2 . Os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de ureia na amostra.

O sistema enzimático-colorimétrico utiliza concentrações otimizadas de reagentes, principalmente a urease, permitindo operar com cinética de ordem zero até uma concentração de 300 mg/dL.

A Saúde Pública requer métodos de diagnóstico de baixo custo, fácil manuseio e inclusão social, fazendo do resultado precoce uma ferramenta de planejamento preventivo das doenças crônicas, bem como, menor custo com tratamentos.

O desenvolvimento e utilização de um Biossensor para detecção da ureia no sangue ou na urina de seres humanos deve trazer inúmeros benefícios como praticidade, acessibilidade, portabilidade, baixo custo, monitoramento e rapidez no resultado de exames.

O Brasil é um país continental com enormes desigualdades sociais, a falta de acesso a resultados rápidos é um fator complicador no diagnóstico, acompanhamento e tratamento de pacientes com quadro de doenças renais. Em muitos casos os hospitais são distantes do domicílio, não possuem laboratórios próprios, retardando o tratamento/acompanhamento de pacientes com possível diagnóstico de patologia renal.

Aferição simples da ureia na beira do leito das emergências, internações, cirurgias, ou mesmo, domiciliar, traria enorme contribuição a medicina e a saúde pública, principalmente, com o diagnóstico precoce, indicativo de déficit da filtração renal, propiciando condutas precoces de salva guarda a vida.

Glass (1999) confeccionou um biossensor de ureia para monitoramento de hemodiálise, o dispositivo consiste em um sensor eletroquímico capaz de detectar e quantificar ureia em fluidos resultantes de procedimentos de hemodiálise.

Paek e colaboradores (2007) desenvolveram tiras de membranas para biossensores em sistemas de teste point-of-care. A presente invenção refere-se a um biossensor para testes de point-of-care (POCT), cuja sensibilidade de detecção foi melhorada através da inclusão das tiras de membrana em sistema de ensaio cromatográfico, no processo de fluxo cruzado sucessivo para a reação imunológica e enzimática.

Hsiung e colaboradores (2009) desenvolveram um biossensor de ureia de estado sólido, formado por um substrato contendo várias camadas, sendo uma eletricamente condutora, uma para medição de pH e outra de medição de íons de amônio. Este biossensor apresentou uma precisão de medição superior a outras técnicas.

Hsiung e colaboradores (2010) desenvolveram biossensores potenciométricos para detecção de ureia e creatinina e o método de formação thereof. O dispositivo é formado por um substrato contendo dois eletrodos sensores, um eletrodo de referência e um eletrodo de referência interno ao substrato, e uma estrutura de embalagem que separa os eletrodos adjacentes. Os eletrodos sensores podem conter a enzima urease ou creatinina amidohidrolase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste - CERTBIO, localizado na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Os testes com amostras clínicas foram realizados no laboratório do Hospital Alberto Urquiza Wanderley – Unimed em João Pessoa.

3.2 Materiais e Reagentes

Os materiais, reagentes e equipamentos utilizados para o processo de obtenção do pó de antimônio, preparação da tinta de antimônio e tinta de grafite, formação dos eletrodos sensor e referência e testes de biorespostas dos biossensores estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Materiais, reagentes e equipamentos utilizados para a preparação do biossensor.

Materiais
• Vidrarias de laboratório: Béquer, balão, vidro de relógio, bastão.
• Fita de aço inox 301 – DES-TA-CO;
• Lâmina de Vidro
• Papel Fotográfico Adesivo
Reagentes
• Hidroxietilcelulose - Dow Chemical;
• Acetado de Celulose – Mn ~ 30000– Sigma Aldrich;
• Água destilada;
• Acetona P.A.
• Álcool Metílico P.A. CH ₃ OH - NEON;
• Álcool etílico 99,8% P.A. CH ₃ CH ₂ OH - NEON;
• Tartarato de Potássio e Antimônio (III) Hidratado – C ₈ H ₄ K ₂ O ₁₂ Sb ₂ . xH ₂ O – PM = 613.83 g/mol – Sigma Aldrich;

-
- Enzima Urease - Sigma Aldrich, Urease from *Carnivalia ensiformis* (Jack Bean), Type III, powder, 15,000-50,000 units/g solid; U1500/20KU;
-
- Ureia – PM = 60,06g/mol – CH₄N₂O – Sigma Aldrich;
-
- Pó grafite comercial – Vonder;
-
- Cloreto de Magnésio hexahidratado P.A. - Mg₂Cl.6H₂O;
-

Fonte: Própria.

3.3 Metodologia

3.3.1 Preparação das Amostras

A preparação do biossensor eletroquímico enzimático foi realizada em cinco etapas: (I) obtenção do pó de antimônio a partir do tartarato de potássio e antimônio; (II) preparação da tinta de antimônio (III) preparação da tinta condutora de grafite; (IV) imobilização da enzima urease na membrana polimérica e (V) montagem dos protótipos de biossensores.

3.3.1.1 Obtenção do pó antimônio

Uma solução aquosa de tartarato de potássio e antimônio (III) hidratado (C₈H₄K₂O₁₂Sb₂.xH₂O) foi preparada solubilizando em água destilada, depois por meio do processo de eletrodeposição a 0.5 amperes em fita de aço inox foi obtido um pó de partículas de antimônio, este foi centrifugado, separado o precipitado da solução de tartarato e colocado em estufa a aproximadamente 90°C para secar, posteriormente o pó seco foi macerado e peneirado em malha 325 mesh.

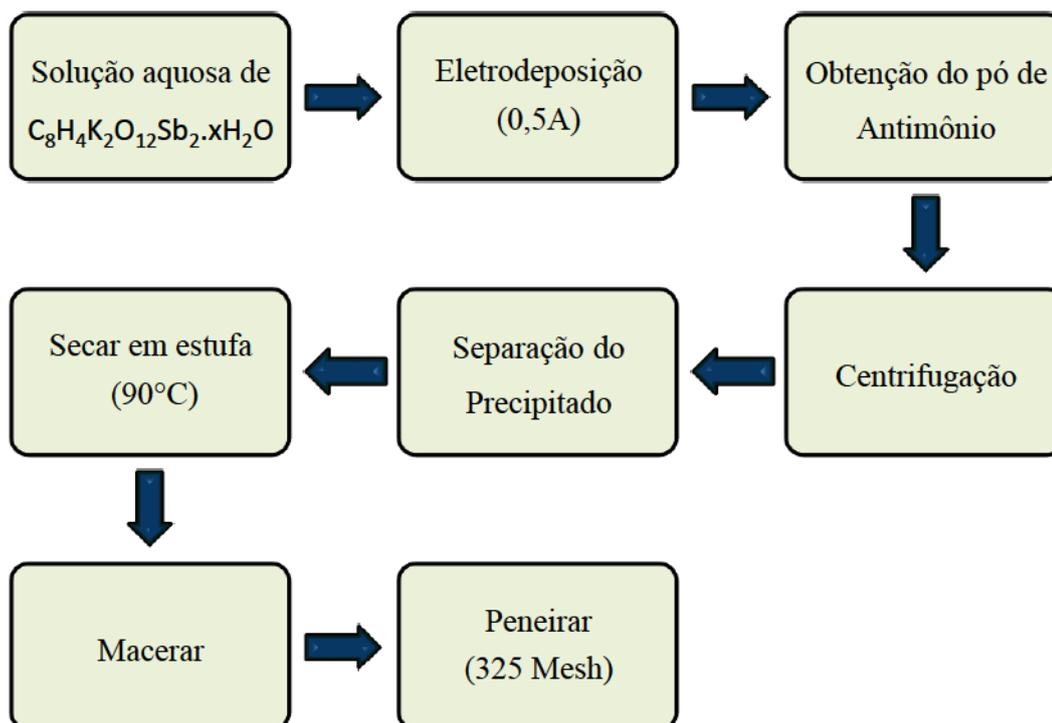


Figura 12 – Fluxograma para obtenção do pó antimônio (Fonte: Própria).

3.3.1.2 Preparação da tinta de antimônio

O pó de antimônio seco e peneirado (1g) foi misturado a uma solução de hidroxietilcelulose 2% (M/V) e acetona P.A. na proporção de (1:1) e homogeneizado em vortex e deixado evaporar o solvente até atingir uma viscosidade desejada para formação de uma tinta com partículas de antimônio (Figura 13). A solução de hidroxietilcelulose 2% (W/V) utilizada na composição da tinta foi preparada pela solubilização do pó de hidroxietilcelulose em uma solução de (1:1 água – álcool etílico) em temperatura ambiente.

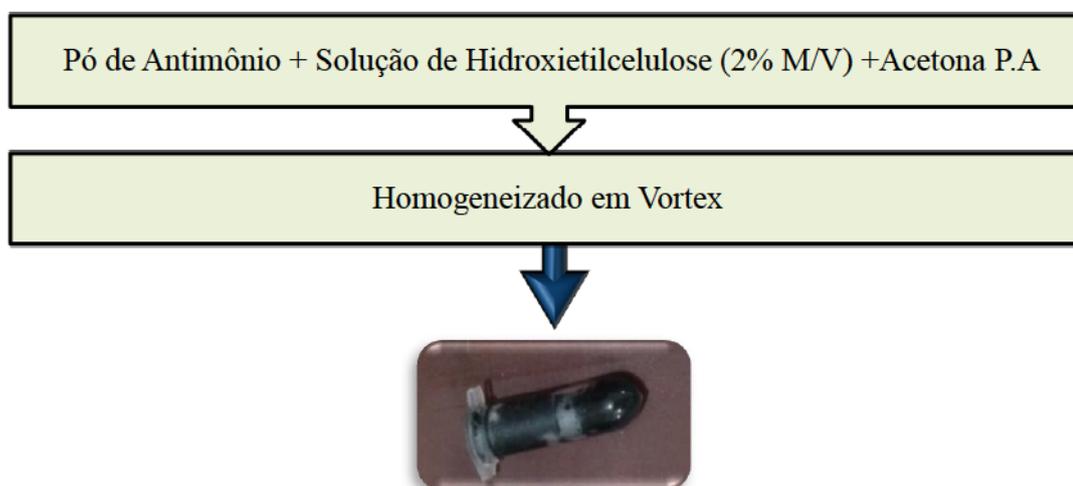


Figura 13 - Preparação da tinta de antimônio (Fonte: Própria).

3.3.1.3 Preparação da tinta de antimônio

A preparação da tinta condutora de grafite (Figura 14), (1g) do pó de grafite comercial foi seco, peneirado e misturado a uma solução de hidroxietilcelulose 2% (M/V) e acetona P.A. na proporção de (1:1) e adicionado (1g) de cloreto de magnésio hexahidratado, sendo posteriormente homogeneizado em vortex até atingir uma viscosidade desejada para formação de uma tinta com partículas de carbono.

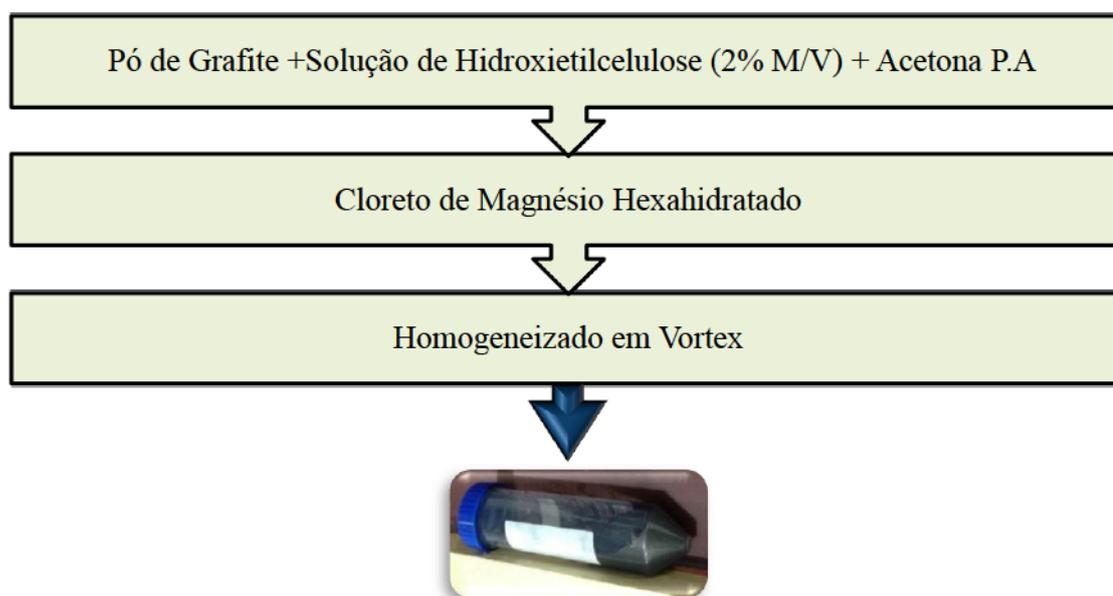


Figura 14 - Preparação da tinta condutora de grafite (Fonte: Própria).

3.3.1.4 Imobilização da Enzima Urease

A enzima urease foi imobilizada em duas partes na formação do eletrodo sensor, a fim de melhorar as respostas, dentro da tinta de antimônio e na membrana polimérica de acetato de celulose que recobre a tinta de antimônio com enzima na sua estrutura interna.

A concentração de enzima urease imobilizada foi de 10mg/mL, tanto na membrana polimérica de acetato de celulose como na tinta de antimônio.

A membrana de acetato de celulose foi formada por meio da solubilização do acetato de celulose em acetona P.A. na concentração de 1% M/V, e nesta foi incorporado a enzima urease e homogeneizada em vortex por 5 minutos. Para incorporação da enzima na tinta de antimônio foi colocado a enzima na tinta na concentração de 10mg/mL e homogeneizado em vortex por 5 minutos. O fluxograma da Figura 15 ilustra as duas etapas de imobilização da enzima.

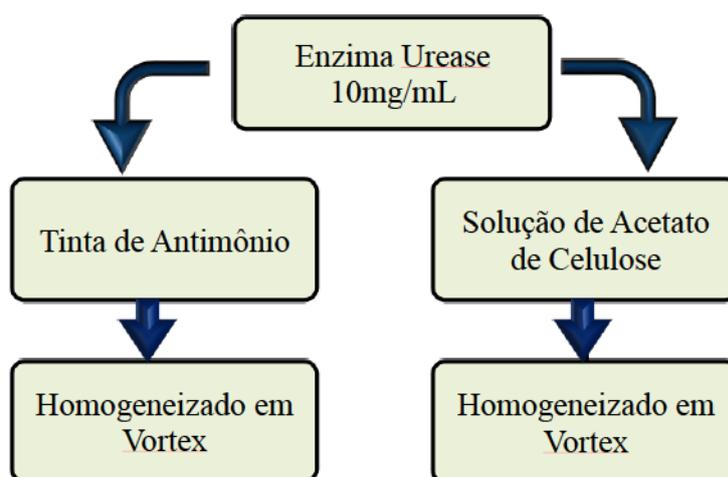


Figura 15 - Imobilização da enzima na membrana de acetato de celulose e na tinta de antimônio (Fonte: Própria).

3.3.1.5 Montagem dos Protótipos de Biossensores

A montagem dos protótipos de biossensores foi realizada pela montagem do eletrodo sensor e referencia, utilizando a técnica de serigrafia sobre a superfície suporte, este, montado com um papel fotográfico adesivo resistente à água, colado em lâminas de vidro lisa para microscopia, formando várias camadas.

As seguintes etapas foram empregadas para montagem do eletrodo sensor: Inicialmente foi realizado a serigrafia da tinta de grafite sobre o suporte e deixado secar formando a primeira camada, posteriormente foi realizado a serigrafia da tinta de antimônio com enzima sobre a primeira camada (superfície de grafite) e deixado secar formando a segunda camada (superfície de antimônio com enzima) e por fim, foi produzido uma terceira camada com a formação de um membrana polimérica de acetato de celulose com enzima urease pela técnica de evaporação do solvente, colocado sobre a segunda camada.

O eletrodo referência foi construído seguindo as mesmas etapas do eletrodo sensor, no entanto, neste não existe a presença da enzima na tinta de antimônio e na membrana de acetato de celulose conforme o fluxograma da Figura 16.

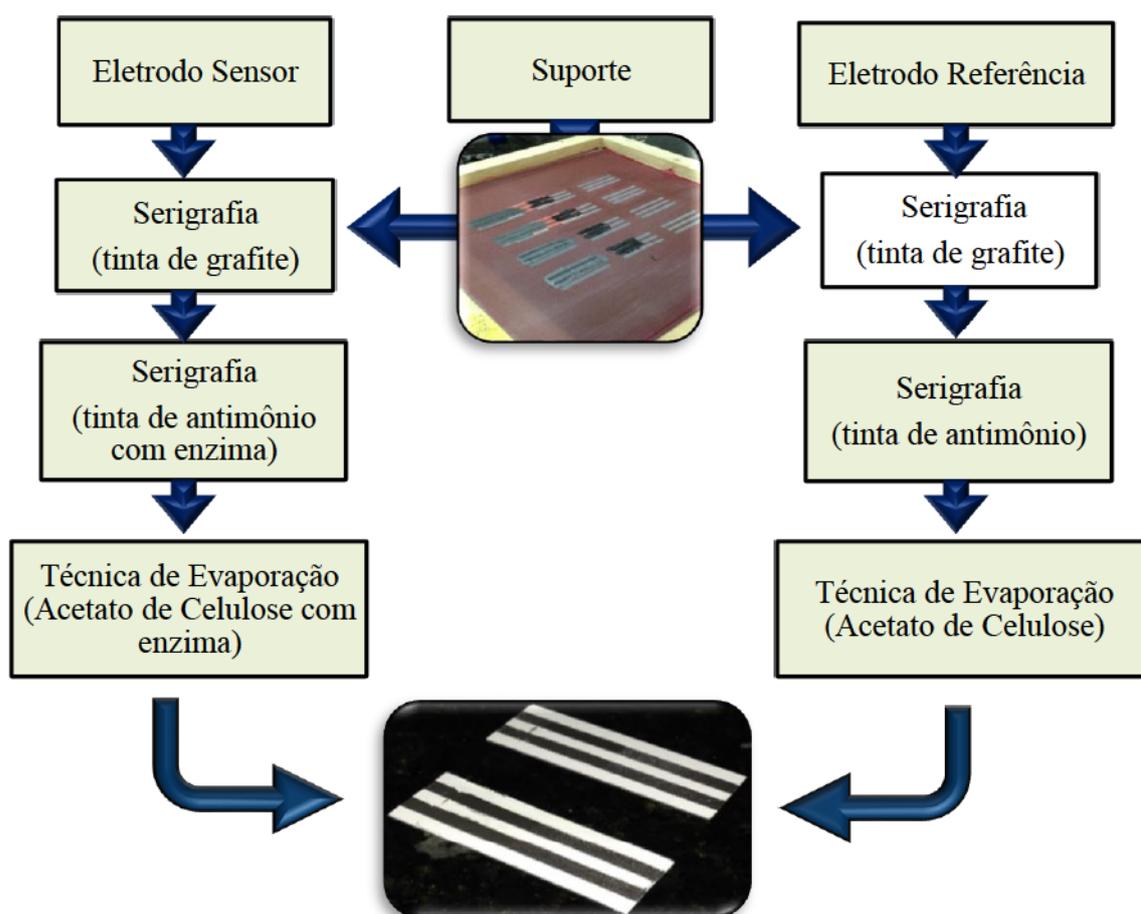


Figura 16 - Etapas de montagem do protótipo do biossensor com a formação do eletrodo sensor e referência (Fonte: Própria).

3.3.2 Caracterização

3.3.2.1 Difração de Raios X (DRX)

As análises de difração de raios-X foram conduzidas a temperatura ambiente em aparelho XRD-7000 Shimadzu, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), tensão de 40kV e corrente 30mA. A caracterização por DRX foi realizada a fim de determinar fases e estruturas cristalinas, suas respectivas concentrações e tamanho de cristalitos do pó e da tinta de antimônio e grafite no intervalo de 20 a 70° a 2°/min.

3.3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização por MEV foi realizada em um Microscópio Eletrônico de Varredura fabricado pela Phenon, modelo Pro, com aumento máximo de 100000x, resolução < 10nm, 5KV e 10KV. Foram realizadas imagens com magnificações de 1000X, 5000X e 10000X, das camadas de antimônio utilizado na montagem do biossensor para observar a morfologia do pó e tinta de antimônio, bem como, dispersão das partículas.

3.3.2.3 Avaliação da Aderência das Partículas da Tinta de Antimônio e Grafite

Para validar a resistência de cola da tinta de antimônio e grafite na superfície suporte para montagem do biossensor, a tinta foi colocada na superfície de um papel fotográfico adesivo a prova de água com dimensões de aproximadamente (2X2 cm) pelo processo de serigrafia, deixado secar e pesado, posteriormente, foi colado uma fita durex sobre a superfície da tinta seca e removida, então pesado novamente e avaliado a quantidade de massa perdida pelo processo.

3.3.2.4 Condutividade Elétrica

A verificação da condutividade elétrica da tinta de antimônio e de grafite foi realizada com um multímetro digital ET-1649 – Minipa, sendo medidos a resistência

elétrica da camada da tinta de antimônio e grafite depositada sobre a superfície do substrato suporte e, posteriormente, calculado a condutividade elétrica.

3.3.2.5 Avaliação do pH

A verificação do pH foi realizada por meio de um pH-metro digital de bancada e, para avaliar o pH das amostras de soro fisiológico com as diferentes concentrações de ureia para verificar a estabilidade das soluções antes e durante as medidas de potencial elétrico de resposta dos biossensores.

3.3.2.6 Sensibilidade e Faixa de Linearidade

A determinação da sensibilidade, linearidade do biossensor de ureia foi medida por um multímetro digital avaliando a diferença de potencial (ddp) obtida em resposta à concentração de ureia, numa faixa de concentração de 2; 4; 6; 8, 10 e 20 mmols de ureia em soro fisiológico. E com os dados obtidos criar uma tabela referência da variação de ureia em soro, com respostas em milivolts e sua relação em mg/dl.

3.3.2.7 Teste com Amostras Clínicas

Para validar a resposta do biossensor foi determinado a concentração de ureia em amostras biológicas (sangue), por um procedimento padrão de análise clínica, utilizando o método colorimétrico e enzimático de 2 pontos ou ponto fixo, onde o sistema utiliza concentrações otimizadas de reagentes, principalmente a urease, permitindo operar com cinética de ordem zero até uma concentração de 300 mg/dL e pelo biossensor desenvolvido (Adaptado de: ALQASAIMAH, 2007; SINGH, 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO PARCIAIS

4.1 Difração de Raios X (DRX)

Na Figura 17 é observado o perfil de difração típico de material cristalino do pó de antimônio onde constata que o mesmo apresenta apenas uma fase cristalina com os picos de difração em aproximadamente 28°, 40°, 43°, 52°, 59°, 66° e 68° que condiz com o perfil do antimônio metálico e está de acordo com o banco de dados *Inorganic Crystal Structure Database* – ICSD e Cardoso, 2016.

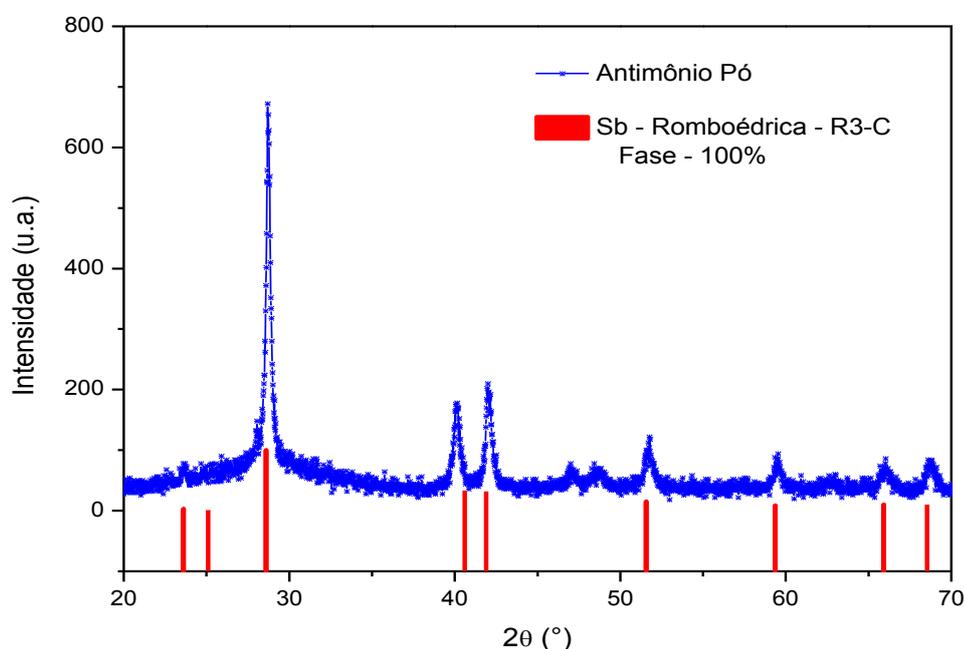


Figura 17 - Difratograma de raios X do pó de antimônio (Fonte: Própria).

A tinta de antimônio também foi caracterizada por difração de raios X, para tal, foi colocada em um porta-a-amostra de vidro do equipamento uma pequena quantidade da tinta e deixado secar em um dessecador e, posteriormente, realizado o ensaio de difração. Na Figura 18 é observado o perfil de difração da tinta de antimônio e neste observa-se que esta apresenta duas fases cristalinas com os picos de difração de raios X em aproximadamente 28°, 40°, 43°, 52°, 59°, 66° e 68° que condiz com o perfil do antimônio metálico e em 26°, 33°, 35°, 46°, 55° e 57° que é característico do perfil de difração do óxido de antimônio Sb_2O_3 , e, está de acordo com o banco de dados *Inorganic Crystal Structure Database* – ICSD e Cardoso, 2016.

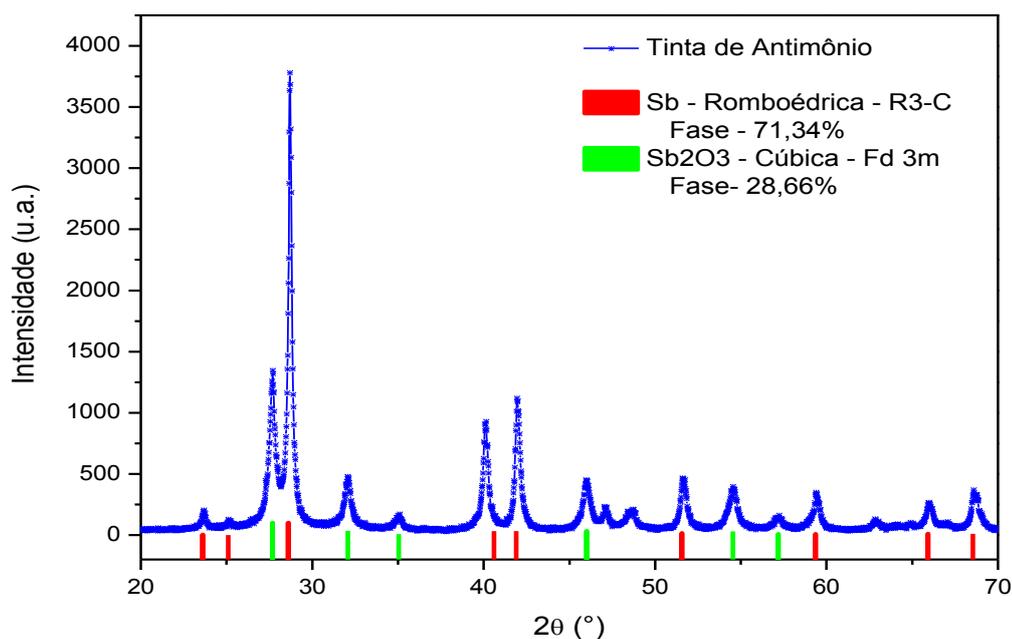


Figura 18 - Difratograma de raios X da tinta de antimônio (Fonte: Própria).

A formação do óxido de antimônio na tinta de antimônio é provavelmente devido a oxidação que ocorre pela reação com a solução aquosa polimérica, no entanto, a presença do óxido de antimônio na preparação da tinta é algo consideravelmente bom para o desenvolvimento do biossensor, visto que os óxidos metálicos são mais estáveis e também são abordados por Rozum e Koncki, 2006 a formação de óxido de antimônio durante a preparação de biossensores.

Na Tabela 2 são ilustrados os parâmetros cristalográficos obtidos pelo método de Rietveld (RIETVELD, 1969) utilizando o programa General System Analyzer Structure (GSAS) do pó e da tinta de antimônio. O valor do fator de confiança do refinamento R_{wp} para amostra de tinta de antimônio foi de 16,14% o que é um bom resultado para amostra com mais de uma fase cristalina, já para a amostra do pó de antimônio o valor foi de 23,5%, neste caso, não se teve um bom resultado, contudo, essa amostra apresenta uma maior quantidade de amorfo o que pode ter contribuído para este resultado.

Tabela 2 - Parâmetros cristalográficos do pó e da tinta de antimônio.

	Tinta de Antimônio		Pó de Antimônio
Sistema Cristalino	Cúbica	Romboédrica	Romboédrica
Grupo Espacial:	Fd-3m	R-3m	R-3m
Parâmetros de rede	Sb₂O₃	Sb	Sb
a (Å):	11,1519	4,3070	4,3070
b (Å):	11,1519	4,3070	4,3070
c (Å):	11,1519	11,2730	11,2730
Alfa (°):	90,0000	90,0000	90,0000
Beta (°):	90,0000	90,0000	90,0000
Gama (°):	90,0000	120,0000	120,0000
Rwp	16,14%		23,5%

Fonte: Própria.

O grafite foi utilizado na montagem do biossensor para conduzir as cargas elétricas geradas durante as medidas de biorespostas dos biossensores. Neste, foi realizada a difração de raios X para verificar a estrutura do carbono presente na tinta de grafite. A Figura 19 mostra o perfil de difração do carbono onde observa-se que a uma fase cristalina com pico bem intenso em aproximadamente 27° que é o pico característico do carbono do grafite estando de acordo com o banco de dados *Inorganic Crystal Structure Database* – ICSD, este perfil corrobora com Costa 2015 que mostra os picos do grafite na sua pesquisa de síntese e caracterização do óxido de grafite como precursor de folhas de grafeno.

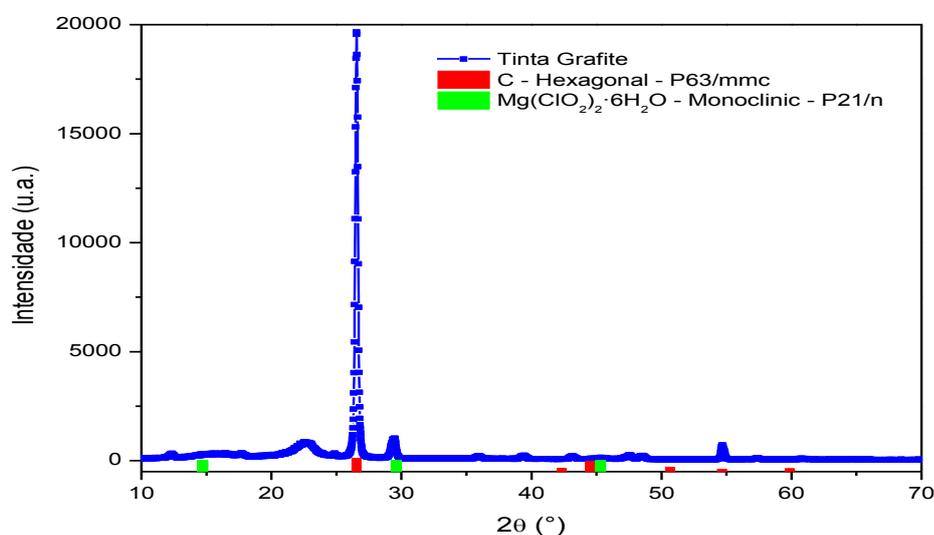


Figura 19 - Difratograma de raios X da tinta de grafite (Fonte: Própria).

A confirmação da estrutura cristalina do carbono é um fator crucial no desenvolvimento dos biossensores e circuitos eletrônicos, como este é utilizado como meio de condução elétrica. Trabalhos como o de Santos 2017 mostram a formação de eletrodos impressos construídos por serigrafia utilizando negro de fumo que é uma fuligem constituída de carbono sendo utilizada como material condutor. Já a revisão de Correia 2017 mostra o diamante, é um material constituído de carbono que devido suas ligações covalentes torna-se um isolante elétrico (Correia, Dantas e Andrade, 2017; Santos *et al.*, 2017).

A fim de melhorar as propriedades elétricas do carbono foi incorporada a estrutura o cloreto de magnésio hexahidratado, que é um reagente utilizado nos géis condutores, na Figura 19, observa-se um pico de baixa intensidade em aproximadamente 30° característico desse reagente de acordo com o banco de dados *Inorganic Crystal Structure Database – ICSD*.

4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV/EDS)

A caracterização por microscopia eletrônica de varredura foi realizada no pó de antimônio e na tinta de antimônio com magnitude de 1000X, 5000X e 10000X. Na Figura 20 são ilustradas as imagens do pó de antimônio antes de ser peneirado onde é possível observar na micrografia com 1000X de magnificação, a formação de aglomerados de partículas de antimônio pelo processo de eletrodeposição e estes possuem diferentes tamanhos, variando de 1µm a 40µm de diâmetro.

Com as magnificações de 5000X e 10000X verifica-se que os aglomerados de partículas de antimônio são constituídos de partículas com grande variação de tamanhos chegando a 1 µm e estas possuem formas arredondadas, irregulares e também exibem uma superfície rugosa, isso provavelmente pelo processo de crescimento das partículas.

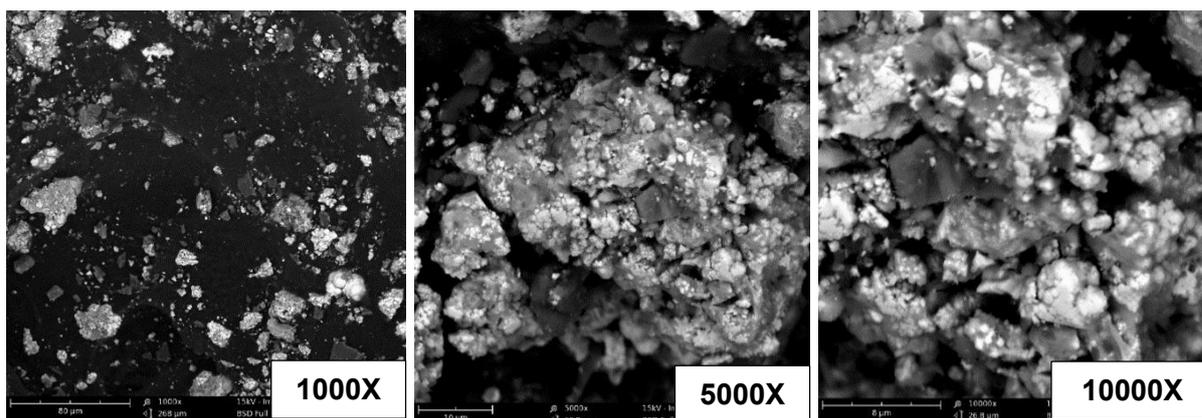


Figura 20 – Imagens do pó de antimônio com magnificações de 1000X, 5000X e 10000X respectivamente (Fonte: Própria).

A formação dessas partículas propicia a produção da tinta de antimônio para utilização no desenvolvimento dos biossensores, já que o processo empregado para formação dos eletrodos é por serigrafia que é um processo de deposição aplicado na formação de filmes finos e neste é necessário que as partículas tenham dimensões pequenas. Costa 2015 mostra dentre diversas técnicas a serigrafia aplicada no desenvolvimento de eletrodos impressos e para tal fez a utilização de partículas com tamanhos médios de 24 nanômetros.

As micrografias da tinta de antimônio são ilustradas na Figura 21, onde visualizada na micrografia de 1000X de magnificação uma aglomeração das partículas de antimônio com a formação de uma superfície com vazios, ou seja, formação de um filme irregular, este perfil de superfície foi formado devido à concentração de partículas de antimônio na tinta polimérica e pelo tamanhos o que não permitiu a união por completo das partículas durante a evaporação do solvente presente na tinta para formação do filme uniforme. Trabalhos como o de Santos 2016 e Costa 2015 mostra a superfície de eletrodos preparados sobre substratos, nesses observam-se a formação de filmes uniformes.

No entanto, no desenvolvimento deste trabalho a formação da superfície irregular é interessante, visto que, em uma das etapas pretende-se imobilizar a enzima na tinta de antimônio e para ocorrer a catalise pela interação entre a enzima e o analito é necessário a que tenha presença de vazios para passagem da solução com o analito.

Com as magnificações de 5000X e 10000X é possível visualizar a formação dos vazios entre as partículas de antimônio que são unidas entre si por uma membrana polimérica.

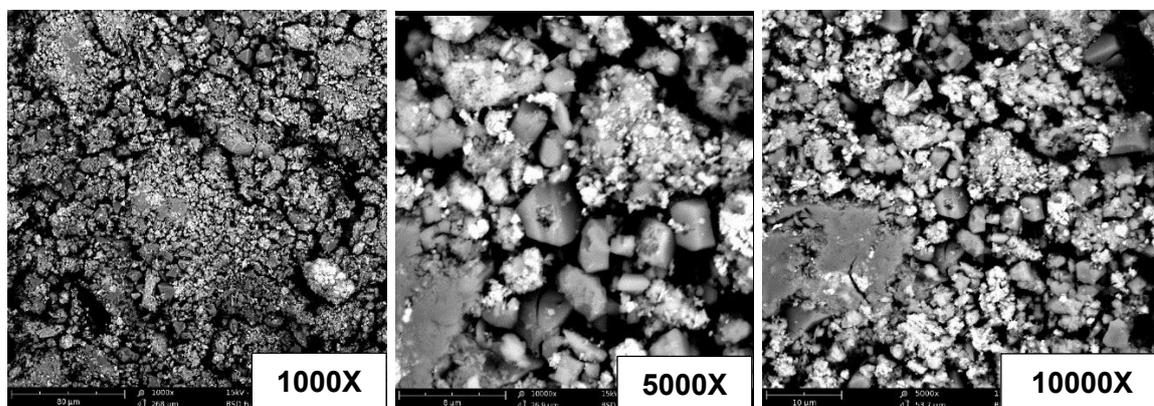


Figura 21 - Imagens da tinta de antimônio com magnificações de 1000X, 5000X e 10000X respectivamente (Fonte: Própria).

Na Figura 22 é observado a média de 5 pontos da espectroscopia por dispersão de energia de raios X pontual das amostras do pó e tinta de antimônio, ambas amostras apresentaram os mesmos elementos antimônio – Sb e potássio – K com valores de concentrações aproximadamente iguais.

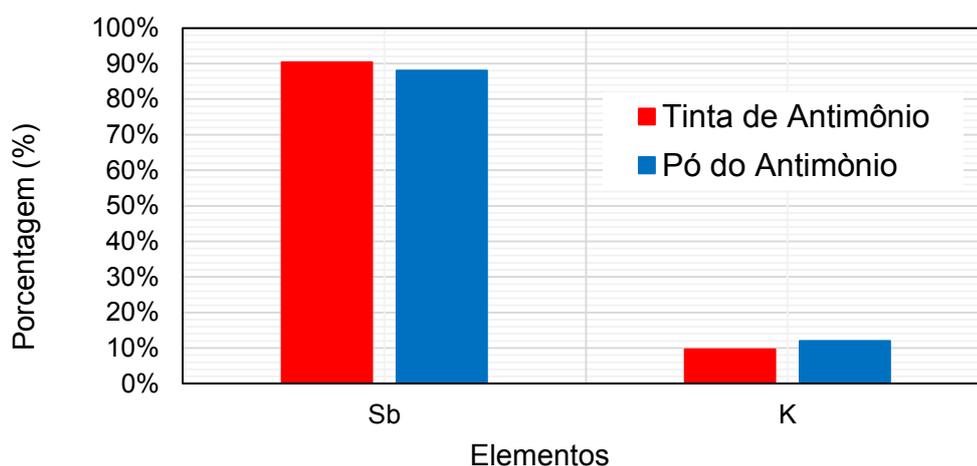


Figura 22 – Espectro de EDS X do pó e da tinta de antimônio (Fonte: Própria).

Como o processo de obtenção das partículas de antimônio foi por meio de uma solução tartarato de potássio e antimônio (III) hidratado é provável a presença de impureza de potássio em pequena quantidade que precipita junto com antimônio

eletrodepositado. Como a espectroscopia por dispersão de energia de raios X é pontual mesmo fazendo uma média de 5 pontos de partículas numa imagem de MEV com 3000 X de magnificação é possível verificar a presença de potássio, essas partículas eram esperadas já que é um elemento presente na solução utilizada para obter as partículas de antimônio.

4.3 Avaliação da Aderência das Partículas da Tinta Antimônio e Grafite

A avaliação da aderência das partículas da tinta de antimônio e grafite sobre a superfície suporte, utilizada para montagem do biossensor, estão ilustradas na

Tabela 3, onde pode observar os valores das concentrações de massas pesadas sobre o papel fotográfico adesivo inicial e final (após realização do teste de aderência) da tinta de antimônio e de grafite e da variação de massa (perda de massa pelo teste de aderência).

Tabela 3 - Valores de concentração de massa de tinta de antimônio

Tinta de antimônio			
	Massa Inicial (mg)	Massa Final (mg)	Variação (%)
Média	72,60	69,47	3,9
Tinta de Grafite			
	Massa Inicial (mg)	Massa Final (mg)	Variação (%)
Média	63,63	61,73	3,06

Fonte: Própria.

Analisando os dados da Tabela 3, pode-se observar que as amostras de tinta de antimônio são unidas fortemente a superfície do substrato e há apenas remoção de pequena quantidade de material, estas informações são significantes visto que o mesmo irá manter imobilizado tanto a enzima como o antimônio que são componentes importantes no desenvolvimento do biossensor. Em relação a tinta de grafite também se verifica a forte aderência sobre a superfície suporte utilizado para montagem do biossensor.

Em ambas as tintas desenvolvidas ocorrem à remoção na mesma proporção com variação mínima, isso ocorre, pois ambas são preparadas com os mesmos reagentes, com mudança apenas do elemento que destingi as tintas antimônio e grafite, essa variação mínima presente deve-se provavelmente ao tamanho das partículas do antimônio e grafite.

A forte aderência entre a tinta de antimônio e de grafite e a superfície do substrato, é um importante fator que pode alterar as propriedades do biossensor, pois os eletrodos, sensor e referencia, produzidos com as tintas de antimônio e grafite irão entrar em contanto com soluções com a presença do analito que se deseja identificar e a fraca aderência podem provocar a remoção das camadas dos eletrodos ou remoção da enzima do eletrodo sensor provocando alterações de respostas como perda total do sinal produzido.

Problemas relacionados a fraca aderência do antimônio sobre o eletrodo de aço inox e como isso afeta nas propriedades dos biossensores eletroquímicos enzimáticos para detecção de ureia, foi observado no trabalho de Cardoso (2016).

4.4 Condutividade Elétrica

Um requisito no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos é a suas propriedades elétricas, seja de condução elétrica, resistência, impedância e condutância. A condutividade elétrica das tintas de antimônio e grafite sobre a superfície do substrato suporte papel fotográfico adesivo são mostrados na Tabela 3, onde observamos que os valores médios da resistência, resistividade e condutividade elétrica para as diferentes tintas produzidas. A resistividade ρ foi calculada de acordo com a equação 1:

$$R = \rho \cdot \frac{l}{A} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

ρ é a resistividade eléctrica (em ohm metros, Ωm);

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

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

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

A medida de resistividade foi calculada com

Foi calculada a resistência das tintas de antimônio e grafite entre dois pontos a uma distância de 1cm de um filme de área da secção de aproximadamente 0,007cm² e a partir deste calculado a resistividade ilustrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Condutividade elétrica da tinta de antimônio.

	Resistência Elétrica (Ω)	Resistividade $\rho = [\Omega.m]$	Condutividade Elétrica ($\sigma = 1/\rho$) (Ωm^{-1})
Tinta de Antimônio	5200	3,64E-05	2,75E+04
Tinta de Grafite	1750	1,23E-05	8,16E+04

Fonte: Própria.

A tinta de antimônio apresentou valores mais elevados de resistência elétrica, consequentemente uma menor condutividade, esses valores eram esperados, visto que o antimônio é um semi-metal e sua resistividade é de (4E-7 $\Omega.m$), sendo menor que a apresentada pela tinta, o que era esperado devido provavelmente pela formação de defeitos na morfologia da tinta observado no MEV, da formação de oxido de antimônio observado na caracterização por DRX e também pela concentração de partículas de antimônio na composição da tinta.

No entanto sua utilização como transdutor nos biossensores deve-se a sua estabilidade em uma ampla faixa de pH 2-12 e relação quase linear da força eletromotriz (f.e.m) discutidas nos trabalhos de Chan 2012 e Marinho 2016. Como o biossensor eletroquímico para ureia desenvolvido nesse trabalho utiliza a urease e esta provoca a catalise da ureia que produzir íons que altera o pH do meio, o transdutor feito com antimônio é ideal para o dispositivo.

A condutividade da tinta de grafite foi de 81600 (Ωm^{-1}) maior que a do grafite que é 76920 (Ωm^{-1}), isso mesmo provavelmente pela incorporação do cloreto de magnésio hexahidratado na composição da tinta que tem a função de melhorar a condutividade elétrica. Dessa forma a tinta de grafite possibilita uma melhor condução das cargas elétricas (ddp) gerada pela diferença entre os eletrodos sensor e referência.

Os valores de condutividade elétrica da tinta de antimônio e de grafite obtidas, adequa-se para aplicação no biossensor eletroquímico enzimático, de forma a permitir respostas satisfatórias.

4.5 Avaliação do pH

Os valores do pH das amostras de soro fisiológico puro e com as diferentes concentrações de ureia empregadas para avaliação de sensibilidade e faixa de linearidade dos biossensores produzidos, são ilustrados na Tabela 5, neste pode-se verificar os respectivos valores para antes e durante as medidas de potencial elétrico de resposta dos biossensores.

Tabela 5 - Valores de pH das soluções de ureia em soro fisiológico ante e durante as medidas de bioresposta.

Soluções	pH antes	pH durante medida
Soro puro	6,30	7,56
2mmol/L de ureia	6,32	7,73
4mmol/L de ureia	6,69	7,90
6mmol/L de ureia	6,69	8,77
8mmol/L de ureia	6,72	8,84
10mmol/L de ureia	6,73	8,85
20mmol/L de ureia	6,88	8,88

Fonte: Própria.

Os resultados do pH antes de iniciar as medidas de diferença de potencial dos biossensores mostram uma estabilidade das soluções, o que era esperado, visto que o analito (ureia) encontra-se estável na solução. E quando é iniciado o processo de medida da diferença de potencial verifica uma mudança do pH, de acordo com a concentração de ureia presente, quanto maior a concentração de ureia maior é o pH da solução, esta mudança de pH era esperada já que quando na presença do sensor há uma reação de catalise provocada pela reação da ureia com a urease imobilizada no eletrodo sensor.

Essa alteração do pH durante a análise de bioresposta mostra que o biossensor possui resposta em relação a concentração de ureia e confirma a presença da enzima urease imobilizada entre as camadas do eletrodo sensor (tinta de antimônio e membrana polimérica de acetato de celulose). No entanto, o aumento do pH não é

proporcional com o aumento da concentração de ureia na solução, fato que não é interessante para o desenvolvimento do biossensor.

4.6 Sensibilidade e Faixa de Linearidade

A sensibilidade do biossensor é observado pela curva de concentração em mmol/L e mg/dL em função da diferença de potencial (ddp) gerada, conforme a Figura 23, onde observamos que os biossensores são sensíveis a uma faixa de concentração de (0 a 20 mmol/L), ou seja, de (0 a 120 mg/dL), como pode ser observado na Tabela 6 que mostra as relações nas concentrações de mmol/L com mg/dL. Entretanto, acima de 10mmol/L os valores de bioresposta tem variações mínimas o que dificulta análises com concentrações acima desse nível, sendo necessário mais ajustes para otimizar as respostas e minimizar os erros inerente a detecção rápida por biossensores para concentrações superiores a 10 mmol/L.

Tabela 6 - Relação da Concentração em mmol/L com mg/dL de ureia.

Concentração	mmol/L	mg/dL
Soro Fisiológico – SF	0	0
SF + ureia	2	12,01
	4	24,02
	6	36,04
	8	48,05
	10	60,06
	20	120,12

Fonte: Própria.

Contudo na faixa de 2 a 10mmol/L temos uma resposta crescente e proporcional ao aumento da concentração de ureia, nesta faixa torna-se um ponto de interesse para o desenvolvimento do biossensor, visto que, a ureia é o analito que busca-se identificar e quantificar, apresenta-se no corpo humano em quantidades menores que 45 mg/dL, nos adultos, ou 18 mg/dl, em crianças, e acima deste valor pode representar um sinal precoce de doença renal (Junior, 2004; Nunes *et al.*, 2010)

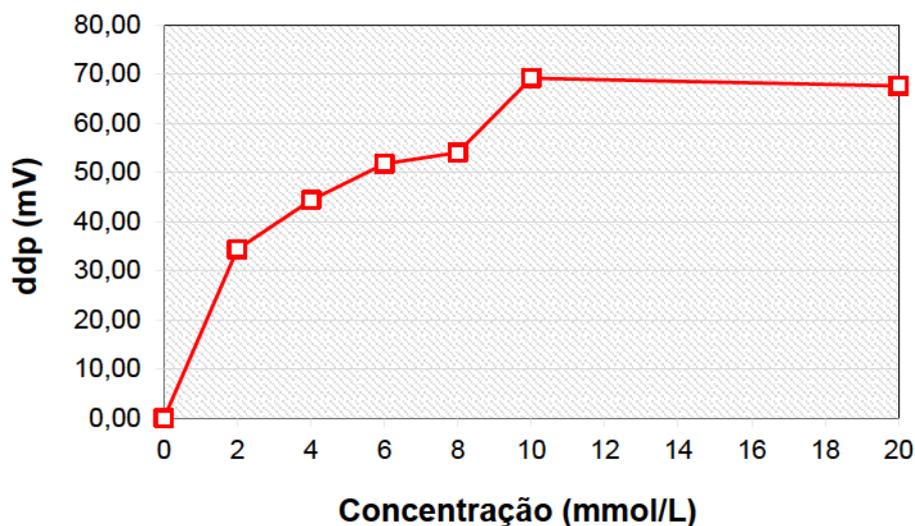


Figura 23 - Curva de Sensibilidade do Biossensor (Fonte: Própria).

A faixa de linearidade do biossensor foi determinada a partir da curva de sensibilidade do biossensor, como pode ser observado na Figura 24, neste, verificamos a faixa de linearidade de 0 a 10 mmol/L. A equação linear média gerada mostra que o biossensor tem uma linearidade aceitável e com sensibilidade de aproximadamente 7,6 vezes.

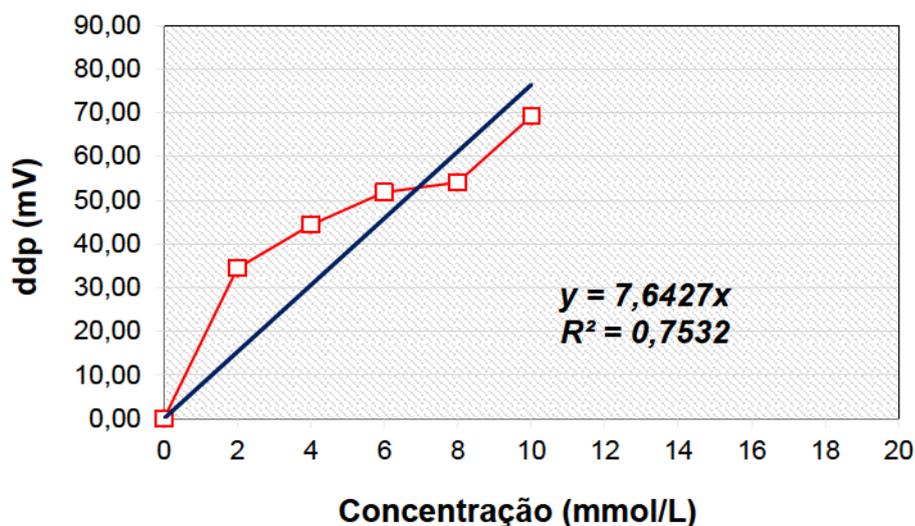


Figura 24 - Curva de Linearidade do Biossensor (Fonte: Própria).

Ambas as curvas geradas de sensibilidade e faixa de linearidade foram com base em dados estatísticos de 5 biossensores e os testes foram realizados entre 2 e 3 vezes para cada biossensor, isso com o intuito de se obter uma curva de calibração com menor erro.

Os testes de sensibilidade e faixa de linearidade obtidas, são propriedades avaliadas em diversos tipos de biossensores, e estes mostram o crescimento linear do sinal resposta em função a concentração do analito que se deseja identificar e quantificar, como pode ser observado em diversas pesquisas como a de Silva e colaboradores de biossensores amperométrico para determinação de peróxido de hidrogênio em leite.

4.7 Teste com Amostras Clínicas

Os testes clínicos para determinação de concentração de ureia no sangue foram realizados em três pacientes adultos por um procedimento padrão de análise clínica, o método colorimétrico e o enzimático UV, no Hospital Alberto Urquiza Wanderley – Unimed em João Pessoa, pelo laboratório COOPERLAB, os resultados das concentrações são apresentados na Tabela 7 e seguem em documento anexo, onde constatamos os valores em mg/dL de ureia presentes em cada um dos pacientes que encontram-se dentro do valor de referência para adultos que é entre 15 e 45 mg/dL.

Tabela 7 - Valores de concentrações de ureia no sangue por teste clínico padrão.

Concentração mmol/L	mg/dL
Paciente A	34
Paciente B	35
Paciente C	27

Fonte: Própria.

A concentração de ureia também foi determinada utilizando os biossensores eletroquímicos enzimáticos, por meio da medida de diferença de potencial, obtida com um multímetro digital, este procedimento foi realizado em uma amostra biológica (sangue) sem qualquer preparo da amostra, ou seja, foi colocada após coleta direta de sangue total dos mesmos pacientes. Na Tabela 8 é observado os valores da resposta

dos biossensores em milivolts e a conversão em concentração por mmol/L e mg/dL. O valor de concentração de ureia foi calculado com base na equação linear média gerada a partir das curvas de faixa de linearidade para 5 biossensores produzidos.

Tabela 8 - Valores de bioresposta dos biossensores e concentrações em mmol/L e mg/dL.

	Biossensor		
	mV	mmol/L	mg/dL
Paciente A	44,1	5,77	34,65
Paciente B	44,4	5,71	34,89
Paciente C	2,00	0,26	1,70

Fonte: Própria.

Comparando, os resultados de concentração obtidos pelo método tradicional e pelos biossensores desenvolvidos, verificou-se uma variação inferior a 2%. O biossensor utilizado no paciente C aparentemente não apresentou resposta, o que pode ser atribuído a alguns fatores, tais como: preparação do biossensor, como este é feito em várias etapas, pode ter ocorrido falha em alguma delas, principalmente na imobilização da enzima; outro ponto importante que pode ter afetado nessa resposta pode ser a utilização do agente anticoagulante adicionado na amostra que apresentou erro.

O agente anticoagulante é utilizado nos testes clínicos padrões, contudo, no teste com os biossensores não queremos sua utilização, pois o teste é para ser realizado com o sangue total, sem preparo.

Durante os testes com amostras clínicas nos biossensores foram observados fatores que devem ser ajustados para melhorar as respostas tais como: a viscosidade de sangue e a distância entre os eletrodos referência e sensor presentes no biossensor. Ainda deve-se salientar que para termos uma confirmação mais significativa é necessária realizar mais teste comparativos entre as respostas dos biossensores com o método tradicional.

5. CONCLUSÃO

As caracterizações por difração de raios X das características morfológicas dos protótipos dos biossensores indicam a boa uniformidade da superfície formada e a presença de cada camada na formação do biossensor.

Os protótipos apresentaram uma boa aderência das partículas antimônio como a de grafite, o que favoreceu o desenvolvimento dos protótipos e garante a estabilidade no desenvolvimento dos biossensores. A condução elétrica das tintas de antimônio e grafite utilizadas para o desenvolvimento do protótipo dos biossensores mostraram-se satisfatórias para aplicação desejada.

Em relação ao potencial hidrogênico (pH) das soluções utilizadas para os testes dos biossensores mostram que durante a análise há um aumento do pH, que também é um efeito esperado devido às reações de catalise da ureia pela enzima uréase. Essa alteração do pH também comprova a imobilização da enzima entre as camadas do eletrodo sensor (tinta de antimônio e membrana polimérica de acetato de celulose).

Os testes com os protótipos dos biossensores mostram que os mesmos são eficazes, tendo uma sensibilidade e faixa de linearidade que se encontra dentro de uma faixa de interesse para aplicação em testes clínicos. Os testes com amostras clínicas (sangue) nos biossensores mostraram respostas de ddp, tendo valores na conversão para taxas de ureia similares aos apresentados no teste clínico tradicional, comprovando a eficácia e possibilidade de utilizar o biossensor com amostra de sangue total, sem qualquer preparo.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar um estudo estatístico e comparativo entre os resultados de teste clínico tradicional e com os biossensores.
- Miniaturizar os biossensor, mudar a forma dos eletrodos e alterar a quantidade de eletrodo referência e sensor.

7. REFERÊNCIAS

- ANSARI, A. A.; ALHOSHAN, M.; ALSALHI, M. S.; ALDWAYYAN, A. S. Nanostructured Metal Oxides Based Enzymatic Electrochemical Biosensors. **Biosensors**, n. February, p. 23–47, 2010.
- BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Electrochemical biosensors for hormone analyses. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 62–71, 2015.
- BEZERRA, T. M. DE S.; BASSAN, J. C.; MONTI, R. **Processo de obtenção de um suporte sólido para imobilização de enzimas, suporte sólido de fibra de coco verde, processo de imobilização de enzimas e derivado obtido**. Brasil, 2017.
- CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. DA. **Biossensores : estrutura , funcionamento e aplicabilidade**. Disponível em: <[http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE SAAD CALIL PAULO ROBERTO QUEIROZ.pdf](http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf)>. Acesso em: 5 jul. 2017.
- CALLISTER, W. D. J.; RETHWISCH, D. G. **Materials Science and Engineering: An Introduction**. 8. ed. [s.l.] LTC, 2009.
- CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Materials Science and Engineering: An Introduction**. p. 992, 2009.
- CANETA, A. P. E. **Sistema urinário**. Disponível em: <<https://www.anatomia-papel-e-caneta.com/sistema-urinario/>>. Acesso em: 25 nov. 2017.
- CARDOSO, M. J. B. **DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO EM FITAS E AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA UREÁSE EM MEMBRANAS POLIMÉRICAS NATURAIS PARA DETECÇÃO DE UREIA**. [s.l.] Universidade Federal de Campina Grande, 2016.
- CARLINI, C. **Ureases – aspectos estruturais**. Disponível em: <<https://laneurotox.net.br/?categoria=ureases-aspectos-estruturais>>. Acesso em: 10 jul. 2017.
- CASTRO, A. Doença renal crônica leva mais de 120 mil brasileiros para hemodiálise. **Jornal Senado**, p. 2017, 2017.
- CHAN, K. M. Quantitative Chemistry Experimental Technique (I) pH Measurement by Antimony Electrode. **La Chimica nella Scuola XXXIV**, n. August, p. 75–88, 2012.
- CLINEMGE. **Causas da insuficiência renal**. Disponível em: <<http://www2.clinemge.com.br:45590/clinemge/Conteudo.aspx?ID=42>>. Acesso em: 8 nov. 2017.
- CORREIA, E. D. S.; DANTAS, J. D. M.; ANDRADE, J. E. DE. Considerações acerca dos conceitos de condutores, isolantes e semicondutores nos livros de Ensino Médio sob um olhar da teoria de bandas de energia. **Scientia Plena**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2017.
- COSTA, C. B.; SILVA, D. P. DA; SENNA, L. F.; CESAR, D. V. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO ÓXIDO DE GRAFITE COMO PRECURSOR DE FOLHAS DE GRAFENO. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 14156–14163, 2015.
- CRISMORE, W. F.; SURRIDGE, N. A.; MCMINN, D. R.; BODENSTEINER, R. J.; DIEBOLD, E. R.; DELK, R. D.; BURKE, D. W.; HO, J. J.; EARL, R. K.; HEALD, B. A.

Electrochemical Biosensor Test Strip Unide States, 2001.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros** Química Nova. **Anais...**2004

EDGAR, K. J.; BUCHANAN, C. M.; DEBENHAM, J. S.; RUNDQUIST, P. A.; SEILER, B. D.; SHELTON, M. C.; TINDALL, D. Advances in cellulose ester performance and application. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 26, n. 9, p. 1605–1688, 2001.

FURTADO, R. F.; DUTRA, R. O. A. F.; ALVES, C. R.; PIMENTA, M. G. R.; GUEDES, M. I. F. Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos. **Embrapa ...**, p. 14, 2008.

GLASS, R. S. **Urea Biosensor for Hemodialysis Monitoring** United State, 1999.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; TUAN, D. X. A.; COQUERY, S. **Précis de physiologie médicale**. [s.l.] Piccin, 2003.

GYÖRGY, E.; SIMA, F.; MIHAILESCU, I. N.; SMAUSZ, T.; HOPP, B.; PREDOI, D.; SIMA, L. E.; PETRESCU, S. M. Biomolecular urease thin films grown by laser techniques for blood diagnostic applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30, n. 4, p. 537–541, 2010.

HACHUL, M.; SIMONATO, N. S.; FILHO, P. H. G.; MENDONÇA, R. R.; OLIVEIRA, S. G. DE. Infecção do trato urinário complicada. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 72, n. 9, p. 383–387, 2015.

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

HANSEN, J. T. **Netter Anatomia Clínica**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2015.

HSIUNG, S.-K.; CHOU., J.-C.; SUN, T.-P.; CHOU, N.-H.; PAN, C.-W. **Solid-State Urea Biosensor** United States, 2009.

HSIUNG, S.-K.; CHOU, N.; CHOU., J.-C.; SUN, T.-P. **Potentiometric Biosensor and the Forming Method Thereof** United States, 2010.

HURK, R. VAN DEN; EVOY, S. A Review of Membrane-Based Biosensors for Pathogen Detection. **Sensors**, v. 15, p. 14045–14078, 2015.

JHA, S. K.; TOPKAR, A.; D'SOUZA, S. F. Development of potentiometric urea biosensor based on urease immobilized in PVA-PAA composite matrix for estimation of blood urea nitrogen (BUN). **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 70, n. 6, p. 1145–1150, 2008.

JUNIOR, J. E. R. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n. 1, p. 1–3, 2004.

KAZEMI-DARSANAKI, R.; AZIZADEH, A.; NOURBAKHS, M.; RAEISI, G.; AZIZOLLAHIALIABADI, M. Biosensors: functions and applications. **Journal of Biology and Today's World**, v. 2, n. 1, p. 20–23, 2012.

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

LIU, C. C. Electrochemical based biosensors. **Biosensors**, v. 2, n. 3, p. 269–272, 2012.

MALHOTRA, B. D.; TURNER, A. P. F. **Advances in Biosensors: Perspectives in Biosensors**. 5. ed. USA: JAI, 2003.

MARINHO, T. M. A.; CARDOSO, M. J. B.; EULÁLIO, H. Y. C.; LEITE, M. D. R.; LIMA, R. J. S.; SWARNAKAR, R.; FOOK, M. V. L. Imobilização de urease com a quitosana pelo método de gotejamento sobre um eletrodo transdutor amperométrico. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 1, p. 25–29, 2016.

MEDEIROS, N. H.; NEVES, R. R. A.; AMORIM, J. N. C.; MENDONÇA, S. M. S. DE. A Insuficiência Renal Crônica e suas Interferências no Atendimento Odontológico - Revisão de Literatura. **Revista Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 26, n. 3, p. 232–242, 2014.

MELO, A. F. Desenvolvimento preliminar de um Biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis. p. 104, 2008.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. DE; CASTRO, H. F. DE; GIORDANO, R. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE E DA AGÊNCIA BRASIL. **Doença renal crônica atinge 10% da população mundial**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2015/03/doenca-renal-cronica-atinge-10-da-populacao-mundial>>. Acesso em: 1 dez. 2012.

MONOSIK, R.; STREDANSKY, M.; LUSPAI, K.; MAGDOLEN, P.; STURDIK, E. Amperometric glucose biosensor utilizing FAD-dependent glucose dehydrogenase immobilized on nanocomposite electrode. **Enzyme and microbial technology**, v. 50, n. 4–5, p. 227–232, abr. 2012.

MORAES, C. A. DE; COLICIGNO, P. R. C. Estudo morfofuncional do sistema renal. **Anuário da Produção Acadêmica Docente**, v. 1, n. 1, p. 161–167, 2007.

MOREIRA, C. S.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H.; NETO, A. G. B.; LOUREIRO, F. C. C. L. **Biosensores : Tecnologia e Aplicações** Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação [online]. **Anais...2010**

MOZAFFARI, S. A.; RAHMANIAN, R.; ABEDI, M.; AMOLI, H. S. Urea impedimetric biosensor based on reactive RF magnetron sputtered zinc oxide nanoporous transducer. **Electrochimica Acta**, v. 146, p. 538–547, 2014.

MULLER, E. V.; SANTOS, D. F. DOS; CORRÊA, N. A. B. Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no laboratório de análises clínicas da Universidade Paranaense-Umuarama-PR. **Rev. bras. anal. clin**, p. 35–37, 2008.

NAGHETTINI, A. V.; SALGADO, C. M.; FREITAS, J. S.; SALGADO, L. M. R. Identificando fatores de risco para desenvolvimento de Doença Renal Crônica entre escolares. **Jornal brasileiro de nefrologia**, v. 34, n. 3, p. 278–282, 2012.

NEFROLOGIA, S. B. DE. **Maior Consumo de Sal no Inverno Aumenta Índice de Doenças Renais**. Disponível em: <<https://sbn.org.br/maior-consumo-de-sal-no-inverno-aumenta-indice-de-doencas-renais/>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

____. **Dia Mundial do Rim com ações em Campos - Sociedade Brasileira de**

Nefrologia. Disponível em: <<https://sbn.org.br/dia-mundial-do-rim-com-acoes-em-campos/>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: W. H. Freeman and Company, 2014.

NETTER, F. H. **Netter Atlas de Anatomia Humana**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2011.

NIRSCHL, M.; REUTER, F.; VÖRÖS, J. Review of transducer principles for label-free biomolecular interaction analysis. **Biosensors**, v. 1, n. 3, p. 70–92, 2011.

NUNES, T. F.; BRUNETTA, D. M.; LEAL, C. M.; PISI, P. C. B.; RORIZ-FILHO, J. S. **Condutas em enfermagem de clínica médica de hospital de média complexidade** Insuficiência renal aguda Acute. **Anais...**2010

OKAFOR, C.; GROOMS, D.; ALOCILJA, E.; BOLIN, S. Fabrication of a novel conductometric biosensor for detecting Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis antibodies. **Sensors**, v. 8, p. 6015–6025, 2008.

OLIVEIRA, A. E. F.; PEREIRA, A. C. Biossensores e a Indústria Alimentar - Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1311–1333, 2016.

OLIVEIRA, D. P. C. DE; RIBEIRO, F. W. P.; BECKER, H.; LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. BIOSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO NA ENZIMA TIROSINASE PARA A DETERMINAÇÃO DE FENOL EM EFLUENTES. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 924–931, 2015.

OLIVEIRA, J. E.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C.; MEDEIROS, E. S.; QUÍMICA, I. DE; BRÁSILIA, U. DE; UNIVERSITÁRIO, C.; RIBEIRO, D. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. **Revista eletrônica de materiais e processos**, v. 8.1, p. 1–11, 2013.

OLIVEIRA, N. M. P. DE. **Biossensor Para Detecção Do Antigénio**. [s.l.] Universidade de Aveiro, 2011.

PETROIANU, A.; ALBERTI, L. R.; NETO, J. E. DE O. Artigo Original Dados Epidemiológicos Da Litíase Renal , Em Hospital De Referência , Em Belo Horizonte , Minas Gerais. **Artigo Original**, v. 34, n. 3, p. 85–88, 2001.

PONTO DE EQUILÍBRIO. **Insuficiência renal; paralisação além dos rins**. Disponível em: <<http://pontoterapeutico.blogspot.com.br/2010/08/insuficiencia-renal-paralisacao-alem.html>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

PORFÍRIO, F. F. O.; GIAROLA, J. D. F.; PEREIRA, A. C. Biossensores e Bebidas - Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. XX, n. Xx, 2016.

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

SANTANA, L. K. L.; RICARDO, P. C.; SERUDO, R. L.; LASMAR, M. L.; SANTOS, M. C. DOS. Imunossensores eletroquímicos e suas aplicações. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 1, p. 31–41, 2017.

SANTOS, S. M. V. DOS; OLIVEIRA, P. R. DE; OLIVEIRA, M. C. DE; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO, L. H. Eletrodos impressos construídos por serigrafia utilizando negro de fumo como material condutor. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 626–640, 2017.

SAUDE, M. **O QUE É UMA GLOMERULONEFRITE**. Disponível em:

<file:///C:/Users/Marcio/Downloads/O QUE É UMA GLOMERULONEFRITE » MD.Saúde.html>. Acesso em: 2 dez. 2017.

SEBASTIÃO DOS SANTOS, J.; KEMP, R. Fundamentos básicos para a cirurgia e cuidados perioperatórios. **Medicina**, v. 44, n. 1, p. 2–17, 2011.

SEGURO, A.; YU, L.; BURDMANN, E. Insuficiência renal aguda. **Fisiopatologia renal**. ..., p. 65–71, 2000.

SHACKELFORD, J. F. **Introdução à Ciências dos Materiais para Engenheiros**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2008.

SILVA, C. M. S. DA; SILVA, D. DE A. N.; SILVA, G. G. P.; MAIA, L. F. DOS S.; OLIVEIRA, T. S. DE. Insuficiência renal aguda : principais causas e a intervenção de enfermagem em UTI. **Revista Científica de Enfermagem**, v. 6, p. 48–56, 2016.

SILWANA, B.; HORST, C. VAN DER; IWUOHA, E.; SOMERSET, V. Synthesis, characterisation and electrochemical evaluation of reduced graphene oxide modified antimony nanoparticles. **Thin Solid Films**, v. 592, p. 124–134, 2015.

SINGH, M.; VERMA, N.; GARG, A. K.; REDHU, N. Urea biosensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 134, p. 345–351, 2008.

SKARE, T. L.; HOLLER, A. P.; ALVES, P. C. Associação entre anticorpos antifosfolípidos e fator reumatóide em pacientes com nefrite lúpica: um estudo de 187 casos. **Arq Catarin Med**, v. 38, n. 2, p. 46–51, 2009.

SOARES, J. C. Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol. 2011.

SOBOTTA, J. **Atlas d'anatomie**. [s.l.] HF Ullmann, 2014.

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

SOUZA, D. DE; MACHADO, S. A S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

STEINMEIER, H. Chemistry of cellulose acetylation. **Macromolecular Symposia**, v. 208, p. 49–60, 2004.

TORTORA, G. J. **Corpo Humano : Fundamentos de Anatomia e Fisiologia**. 10. ed. [s.l.] ARIMED, 2016.

UNGUREANU, G.; SANTOS, S.; BOAVENTURA, R.; BOTELHO, C. Arsenic and antimony in water and wastewater: Overview of removal techniques with special reference to latest advances in adsorption. **Journal of Environmental Management**, v. 151, p. 326–342, 2015.

VALDAIR F. MUGLIA; PRANDO, A. Carcinoma de células renais: classificação histológica e correlação com métodos de imagem. **Radiologia Brasileira**, v. 48, n. 3, p. 166–174, 2015.

8. ANEXO



RA: 0280532809 Atendimento: *
 Pedido: * Data/Hora Emissão: 09/12/2017 12:45:53
 Hora Laudo: 12:07:25 Hora Coleta: 09/12/2017
 Sr(a): VINICIUS JOSE GOMES F BARROS
 Dr(a): PRESTADOR PADRÃO/999999
 Local: LABORATORIO DE ANALISES - HP
 Convenio: CORTESIA D.N:24/02/1968
 Data Solic: 09/12/2017
 Idade: 49 ANOS Sexo: M

UREIA 34,0

Valor de Referência: mg/dL
 Adulto: 15,0 a 45,0 mg/dl
 1 a 13 anos 8 a 36
 Até 12 meses 2 a 36

Método: ENZIMÁTICO COLORIMÉTRICO
 Reagente: BIOSYSTEMS LOTE:20183 Val:06/2018

Método: ENZIMÁTICO UV
 Material: SORO

Liberado por: Dra. Wanessa Maria C. Moraes CRBM-PB - 3300



RA: 0280532808 **Atendimento:** *
Pedido: * **Data/Hora Emissão:** 09/12/2017 12:45:41
Hora Laudo: 12:09:01 **Hora Coleta:** 09/12/2017
Sr(a): MARCIO JOSE BATISTA CARDOSO
Dr(a): PRESTADOR PADRÃO/99999
Local: LABORATORIO DE ANALISES - HP
Convenio: CORTESIA D.N:25/10/1983
Data Solic: 09/12/2017
Idade: 34 ANOS **Sexo:** M

UREIA 35,0

Valor de Referência:
Adulto: 15.0 a 45.0 mg/dl
1 a 13 anos 8 a 36
Até 12 meses 2 a 34

mg/dL

Metodo: ENZIMATICO COLORIMETRICO
Reagente: BIOSYSTEMS LOTE:20183 Val:06/2018

Metodo: ENZIMÁTICO UV
Material: SORO

Liberado por: Dra. Wanessa Maria C. Morais CRBM-PB - 3300



RA: 0280532807 **Atendimento:** *
Pedido: * **Data/Hora Emissão:** 09/12/2017 12:45:32
Hora Laudo: 12:10:22 **Hora Coleta:** 09/12/2017
Sr(a): ATHILA RENAN
Dr(a): PRESTADOR PADRÃO/99999
Local: LABORATORIO DE ANALISES - HP
Convenio: CORTESIA D.N:22/10/1987
Data Solic: 09/12/2017
Idade: 30 ANOS **Sexo:** M

UREIA**27,0**

Valor de Referência:
Adulto: 15.0 a 45.0 mg/dl
1 a 13 anos 8 a 36
Até 12 meses 2 a 34

mg/dL

Metodo: ENZIMATICO COLORIMETRICO
Reagente: BIOSYSTEMS LOTE:20183 Val:06/2018

Metodo: ENZIMÁTICO UV
Material: SORO

Liberado por: Dra. Wanessa Maria C. Morais CRBM-PB - 3300