
Biossensores eletroquímicos em tiras de aço inoxidável com deposição de antimônio para detecção de ureia

Electrochemical biosensors in stainless steel strips with antimony deposition for urea detection

Vinícius José Gomes Formiga Barros¹, Kleilton Oliveira Santos¹, Wladymyr Jefferson Bacalhau de Sousa¹, Márcio José Batista Cardoso^{2*}, Rodrigo José da Silva Lima¹, Marcus Vinícius Lia Fook¹

RESUMO

A insuficiência cardíaca congestiva, a desidratação severa e a pressão alta são algumas complicações relacionadas a doenças renais que afetam a população mundial, podendo ser relacionada com os níveis de ureia no corpo. O procedimento tradicional usado para diagnosticar a taxa de ureia no corpo envolve métodos invasivos de análises clínicas que requerem tempo para a obtenção de um resultado. Os biossensores são uma alternativa promissora para diagnosticar a taxa de ureia de forma rápida, precisa, de baixo custo e com o mínimo de invasões. Sendo assim, o estudo desenvolverá um biossensor eletroquímico utilizando tiras de aço inoxidável com deposição de antimônio revestida com diferentes membranas poliméricas (quitosana e acetato de celulose) para a detecção da ureia. Foram avaliadas as propriedades de sensibilidade, faixa de linearidade, período de estabilidade, seletividade, repetibilidade e reprodutibilidade dos biossensores. Constatou-se que foram sensíveis à ureia com período de estabilidade inferior a 150 segundos, faixa de resposta linear entre 0 - 10 mmol/mL e seletividade em presença de creatinina. Em relação a repetitividade e reprodutibilidade os preparados com membranas de acetato de celulose possuem uma melhor uniformidade. O estudo mostra que os biossensores desenvolvidos com acetato de celulose e quitosana, são eficazes e representativos em uma considerável faixa de concentração de ureia.

Palavras-chave: Biossensor; Ureia; Antimônio; Quitosana; Acetato de Celulose;

ABSTRACT

Congestive heart failure, severe dehydration, and high blood pressure are some complications related to kidney disease that affect the world's population, and can be related to levels of urea in the body. The traditional procedure used to diagnose the rate of urea in the body involves invasive clinical testing methods that require time to obtain a result. Biosensors are a promising alternative for diagnosing urea levels quickly, accurately, cheaply, and with minimal invasion. Therefore, the study will develop an electrochemical biosensor using antimony deposition stainless steel strips coated with different polymeric membranes (chitosan and cellulose acetate) for the detection of urea. The properties of sensitivity, linearity range, stability period, selectivity, repeatability and reproducibility of the biosensors were evaluated. They were found to be sensitive to urea with a stability period of less than 150 seconds, linear response range between 0 - 10 mmol/mL and selectivity in presence of creatinine. Regarding repeatability and reproducibility the ones prepared with cellulose acetate membranes have better uniformity. The study shows that the biosensors developed with cellulose acetate and chitosan, are effective and representative in a considerable range of urea concentration.

Keywords: Biosensor; Urea; Antimony; chitosan; Cellulose acetate.

¹Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, Brasil

²Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

*E-mail: marcio.cardoso@academico.ufpb.br

INTRODUÇÃO

Dados do Impact Report of World Kidney Day 2020, estima-se que 850 milhões de pessoas no mundo tenham doenças renais por diferentes causas, e prevê que até 2040 será a quinta principal causa de mortes prematura em todo mundo (IMPACT REPORT, 2020). A doença renal crônica (DCR) vem aumentando em todo o mundo, no Brasil de acordo com dados do Ministério da Saúde em 2022 a DRC é uma condição que afeta aproximadamente 1,5% dos brasileiros.

A DRC também conhecida como insuficiência renal crônica, é uma patologia causada por alteração estrutural renal bilateral, progressiva e irreversível que ocasiona redução da capacidade de filtração glomerular (MEDEIROS et al., 2014).

A função metabólica renal é determinada pela quantidade de ureia no sangue e na urina, que embora não tenha boa especificidade para diagnosticar alterações na função renal, ela é mais sensível a alterações primárias nas condições renais e é, portanto, um indicador importante nos casos que a envolvem (RAMOS; MARINI, 2014).

Os níveis crescentes de ureia no sangue ocorrem em casos de insuficiência renal aguda ou crônica, insuficiência cardíaca congestiva, desidratação severa, aumento do catabolismo proteico, perda muscular e alguns medicamentos também podem causar aumento da ureia (ABENSUR, 2011; SOARES, 2011).

A determinação da taxa de ureia no corpo humano é realizada testes laboratoriais clínicos sendo: o enzimático colorimétrico em urina e o teste de nitrogênio uréico no sangue (NUS), em ambos casos é realizado um procedimento laboratorial com profissionais especializados (CAMPOS, 2016; PARDINI, 2003).

De modo a otimizar os diagnósticos os biossensores são dispositivos analíticos capazes de identificar substâncias específicas, seja qualitativa, quantitativamente ou ambas, utilizadas em uma variedade de aplicações, como detecção rápida de vírus, bactérias, câncer, armas químicas e biológicas, água, solo e alimentos (CALIL; SILVA, 2011; UYGUN; SEZGINTÜRK, 2011).

A construção de biossensores para detecção de ureia é extremamente importante para a saúde, pois a ureia é uma substância monitorado no sangue como um indicador da função renal, e um alto nível causa insuficiência renal (LAKARD et al., 2004; SAHNEY; PURI; ANAND, 2005).

Hsiung et al. (2009, 2010) desenvolveu um biossensor de ureia em estado sólido formado por um substrato multicamadas, onde os resultados são bons na medição de pH

e íons de amônia. Posteriormente em 2010 desenvolveu um biossensor potenciométrico para a detecção de ureia e creatinina, formados por um substrato contendo dois eletrodos sensores, um eletrodo de referência e um referência no substrato, e uma estrutura de embalagem separando os eletrodos adjacentes, onde a resposta é destacada (HSIUNG et al., 2009, 2010).

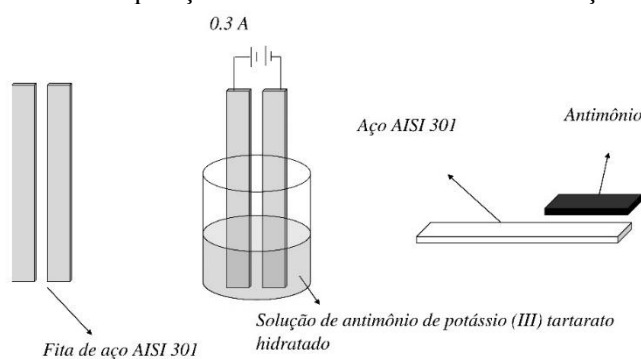
Diante do exposto o presente trabalho busca desenvolver um biossensores eletroquímico em tiras de aço inoxidável com deposição antimônio revestida com diferentes membranas poliméricas (quitosana e acetato de celulose) para a detecção de ureia, avaliando suas propriedades em termos de faixa de linearidade, sensibilidade, período de estabilidade, seletividade, repetibilidade e reprodutibilidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizados reagentes químicos de grau analítico e materiais: ureia (60,06 g/mol), antimônio de potássio (III) tartarato hidratado (613,83 g/mol), enzima urease (tipo III, 15.000-50.000 unidade/g), acetato de celulose (massa molar ~ 30000) e tampão fosfato salino (PBS) todos da Sigma Aldrich, quitosana de média massa molar obtido de CERTBIO (GA 90%,), e tiras de aço inoxidável (AISI 301), lâmina de vidro para microscópio.

No processo de fabricação de biossensores, tiras de aço inoxidável foram cortadas com dimensões de 5 mm de largura por 50 mm de comprimento, e então uma seção de aproximadamente 20 mm de comprimento foi mergulhada em uma solução de antimônio de potássio (III) tartarato hidratado e uma corrente de 0,3 A (ampères) foi aplicada através de uma fonte, durante 3 minutos, para eletrodeposição sobre o antimônio, conforme Figura 1, procedimento adaptado de Rozum e Koncki (2006) (ROZUM; KONCKI, 2006).

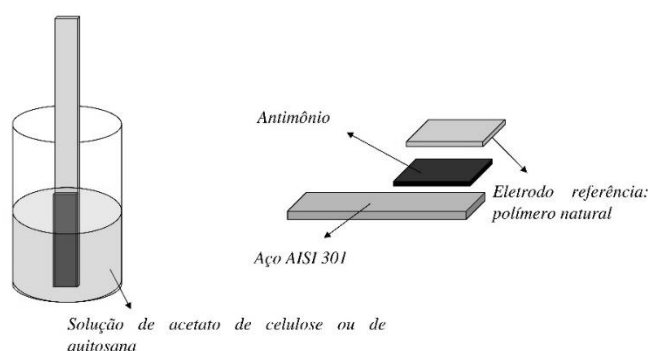
Figura 1 – Eletrodeposição de óxido de antimônio sobre aço inoxidável.



Fonte: Autores (2022).

Posteriormente, para obtenção do eletrodo de referência foram revestidos com camadas de polímeros naturais (acetato de celulose ou quitosana) pelo método de imersão. Para tal, foram mergulhados por 30 segundos em uma solução de acetato de celulose em acetona 1% (m/V), removidas e deixadas até a evaporação completa do solvente, conforme Figura 2. Procedimento semelhante foi realizado para revestimento do eletrodo de referência com quitosana, utilizando uma solução de quitosana 1% (m/V) em ácido acético 1% (V/V).

Figura 2 – Revestimento do eletrodo referência pelo método de imersão.



Fonte: Autores (2022).

Para obtenção do eletrodo sensor, foram realizados os procedimentos descritos para o eletrodo referência, com uma única modificação: as soluções de acetato de celulose e quitosana continham uma concentração de 10 mg/mL de enzima urease. Por fim, foram construídos os biossensores colocando os eletrodos sensor e de referência em paralelos sobre uma lâmina de vidro de laboratório a uma distância de aproximadamente 2 mm.

Conforme as variações dos polímeros utilizados foram obtidas duas categorias de biossensores denominados na Tabela 1, onde se tem as abreviações empregadas na pesquisa.

Tabela 1 - Abreviações dos biossensores empregadas na pesquisa.

Variações dos biossensores	Abreviatura
Biossensor com membrana quitosana	Biossensor A
Biossensor com membrana de acetato de celulose	Biossensor B

Fonte: Autores (2022).

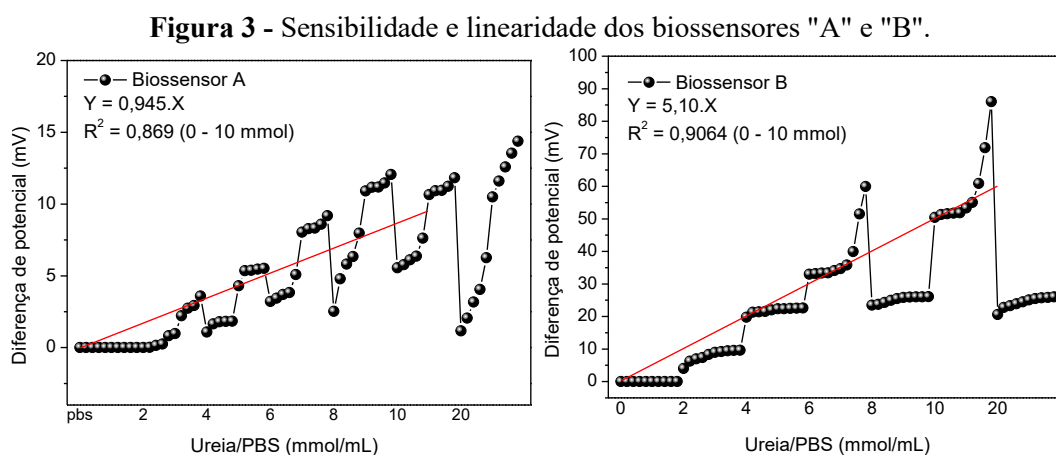
As propriedades dos biossensores foram avaliadas em termos de faixa de linearidade, período de estabilidade, sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade e repetibilidade. Estas propriedades foram medidas por uma unidade de aquisição, comutação e registro de dados, modelo 34970A, da *Keysight Technologies* avaliando a

diferença potencial (ddp) obtida em resposta à concentração de ureia, em uma faixa de concentração de 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 20 mmol/mL em tampão PBS. Para obter as medidas de seletividade, foi adicionada creatinina nas soluções com diferentes concentrações de ureia. Procedimento adaptado de Alqasaimeh, Heng e Ahmad (2007), Rodrigues (2014) e Rozum e Koncki (2006) (ALQASAIMAH; HENG; AHMAD, 2007; RODRIGUES, 2014; ROZUM; KONCKI, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No desenvolvimento de biossensores, a sensibilidade é um dos parâmetros de otimização essencial para sua aplicação, definido como a mudança na magnitude do sinal de "saída" do biossensor como uma resposta à mudança de concentração de uma espécie química específica.

Os gráficos da Figura 3 mostram as variações das respostas em milivolts (mV) em função da concentração de ureia em (mmol/ml) para os biossensores "A" e "B", nos quais se verifica que o aumento da concentração de ureia causa alterações na resposta, indicando que o biossensor apresenta sensibilidade à concentração de ureia, esta sensibilidade foi de 0,945 e 5,10 mV para os biossensores "A" e "B", na faixa de 0 -10 mmol respectivamente. Entretanto, estas mudanças não parecem ser linearmente estáveis em toda a faixa de concentração. Com relação às membranas poliméricas de acetato de celulose e quitosana, verifica-se que ambas são viáveis para uso como veículo de imobilização, no entanto, para as membranas de acetato de celulose, observou-se uma maior estabilidade na sensibilidade das respostas.



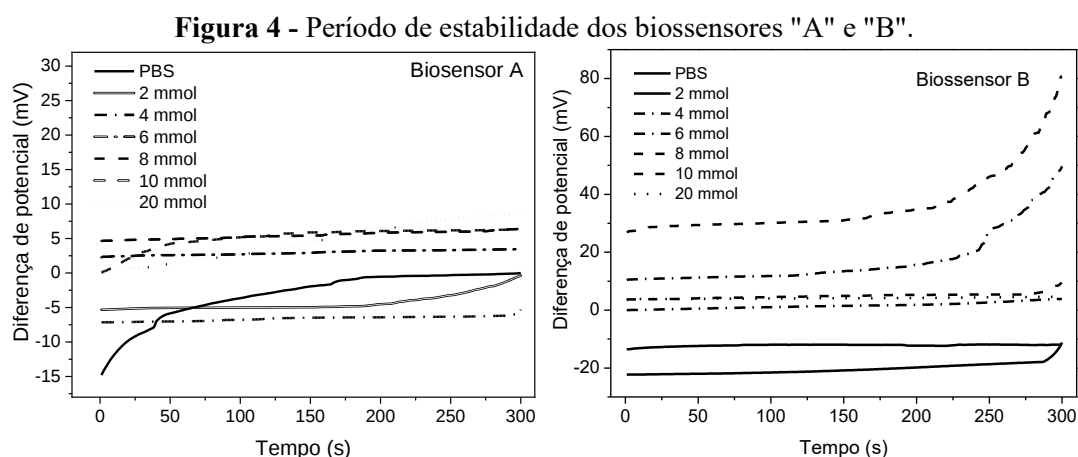
Fonte: Autores (2022).

A fim de determinar o intervalo de linearidade dos biossensores, foram feitos cálculos nas curvas de resposta dos biossensores em diferentes regiões de linearidade, e foi avaliado qual deles apresentou a melhor relação entre a concentração de ureia e a diferença potencial e os coeficientes de correlação mais elevados.

Os gráficos da Figura 3 mostram as curvas de resposta com as linhas de regressão em diferentes pontos da curva e observa-se que a melhor faixa de linearidade ocorre de 0 a 10 mmol/ml de ureia e nesta faixa o coeficiente de correlação é de 0,869 e 0,9064 para biossensores "A" e "B", respectivamente.

De acordo com Melo (2008) correlação um coeficiente superior a 0,9 indica uma boa linearidade do sistema. Assim, o biossensor com membrana de acetato de celulose mostrou uma melhor sensibilidade, entretanto, as faixas de linearidade entre as duas membranas eram as mesmas (MELO, 2008).

O período de estabilidade indica o tempo necessário para estabilizar a resposta da "diferença potencial", ou seja, para ter um valor estável. A Figura 4 mostra as curvas do período de estabilidade dos biossensores, nas quais se verifica que as respostas permaneceram constantes com pequenas variações para cada uma das concentrações de ureia (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 20 mmol/mL em PBS) utilizadas. Eles permaneceram estáveis na faixa entre os anos 50 e 200, para biossensores "A" e "B", sendo este o período de estabilidade do biossensor.

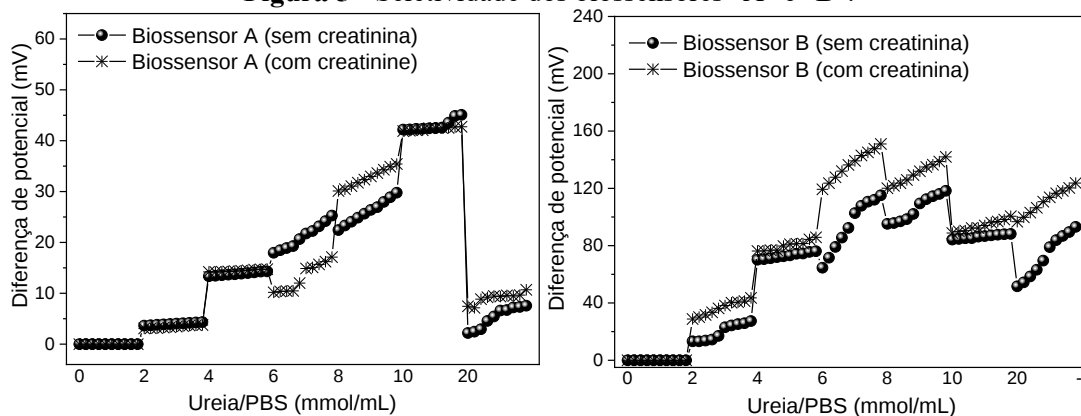


Fonte: Autores (2022).

A seletividade de um biossensor ideal implica que ele só deve responder a mudanças na concentração do analito alvo sem ser influenciado pela presença de outras espécies químicas em solução. Os gráficos da Figura 5 mostram variações nas respostas

(em mV) em função da concentração de ureia (mmol/mL) com e sem a presença de creatinina para biossensores "A" e "B". Verifica-se que a presença do espécime químico "creatinina" altera minimamente os valores dos biossensores, indicando uma boa seletividade para a ureia, principalmente para o biossensor "A".

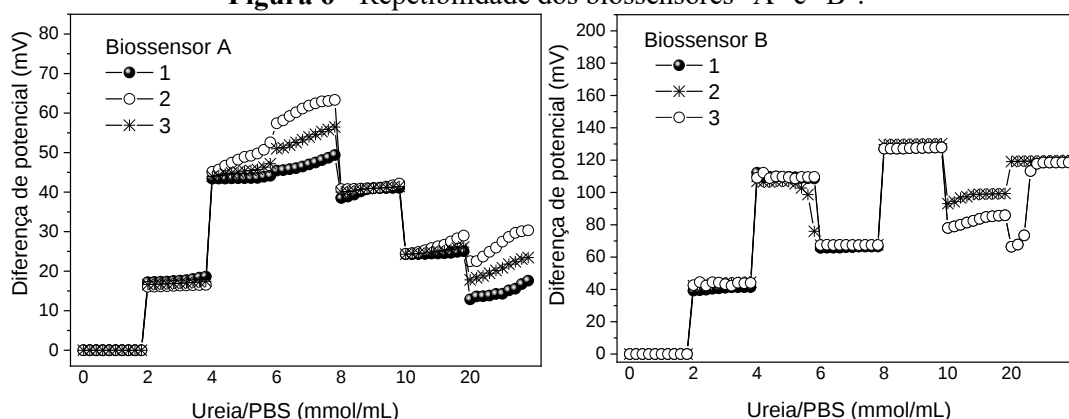
Figura 5 - Seletividade dos biossensores "A" e "B".



Fonte: Autores (2022).

A repetibilidade avalia se o mesmo biossensor possui respostas similares sob as mesmas condições de avaliação. Os gráficos da Figura 6 mostram as variações das respostas em função da concentração de ureia para biossensores "A" e "B" em 3 medidas. Foi verificado que os valores das respostas permaneceram com uma pequena variação em cada uma das medidas realizadas para os biossensores "A" e "B".

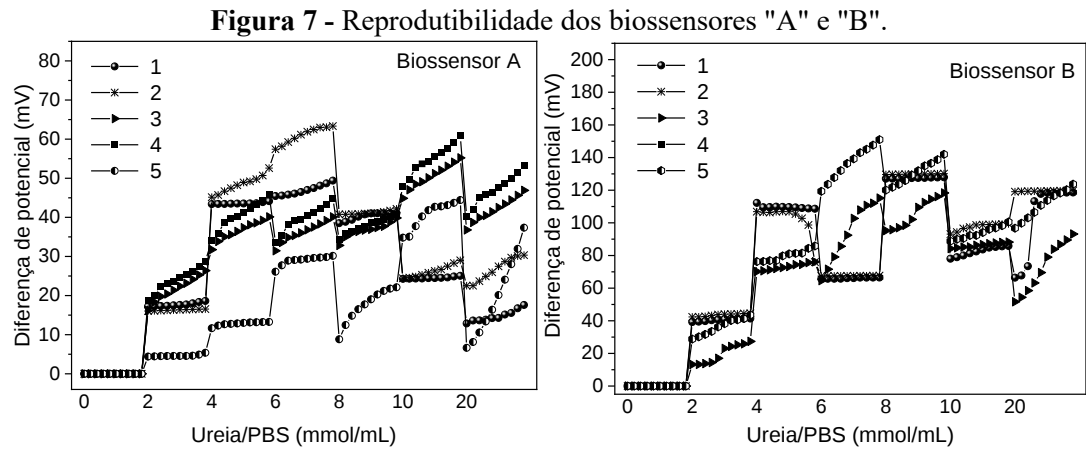
Figura 6 - Repetibilidade dos biossensores "A" e "B".



Fonte: Autores (2022).

A reprodutibilidade significa que biossensores com o mesmo procedimento de preparação e parâmetros e condições analíticas apresentam respostas semelhantes. Os gráficos da Figura 7 mostram as curvas respostas em função da concentração de ureia

para uma reprodução de 5 biossensores do tipo "A" e 5 do tipo "B". Observou-se que os valores das respostas para as 5 reproduções dos biossensores tiveram uma variação considerável, mostrando uma boa reprodutibilidade. Na região de linearidade, para os biossensores A (de 0-10 mmol), observou-se que a sensibilidade média e o coeficiente de correlação foram respectivamente $(7,701 \pm 2,35)$ e $(0,9588 \pm 0,022)$. Nos biossensores B (de 0-8 mmol), observou-se que a sensibilidade média e o coeficiente de correlação foram respectivamente $(17,7737 \pm 3,06)$ e $(0,9507 \pm 0,032)$.



Fonte: Autores (2022).

A Tabela 2 mostra uma análise comparativa dos resultados das propriedades dos biossensores "A" e "B", na qual é possível verificar que o biossensor com revestimento de membrana de acetato de celulose forneceu o melhor conjunto de propriedades.

Tabela 2 - Resultados das propriedades dos biossensores "A" e "B".

Biossensor	A	B
Período de estabilidade ou tempo de resposta (s)	50	50
Variação potencial na região linear (mV)	12	60
Linearidade e faixa de sensibilidade (mmol/mL)	0 - 10	0 – 10
Sensibilidade (mV)	0,945	5,100
Equação linear	$y = 0,945x$ 0,8690	$y = 5,100x$ 0,9064
Coeficiente de Correlação (R2)	Boa	Boa
Seletividade	Regular	Boa
Repetibilidade	Regular	Boa

Fonte: Autores (2022).

CONCLUSÕES

O biossensor com membrana de acetato de celulose apresentou uma sensibilidade maior, mesma faixa de linearidade que o biossensor com membrana de acetato de quitosana e mesmo período de estabilidade.

Quanto à seletividade, ambos os biossensores, com membrana de acetato de quitosana e com membrana de acetato de celulose, foram seletivos, com algumas pequenas variações na presença de creatinina.

A repetibilidade e reprodutibilidade dos biossensores mostrou uma menor variação com as membranas de acetato de celulose, que apresentaram maior sensibilidade. Os resultados obtidos na caracterização das propriedades do biossensor - sensibilidade, faixa de linearidade, período de estabilidade, seletividade, repetibilidade e reprodutibilidade - foram aceitáveis para biossensores com revestimento de quitosana e acetato de celulose, indicando que ambos poderiam ser usados para detecção de ureia.

Outros estudos para melhorar o desempenho desses biossensores, incluindo modificações das membranas (espessura da membrana, uso de plastificantes) e o procedimento de imobilização, serão realizados.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPG-CEMatUFCG), ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste - CERTBIO/UAEMA/CCT pela colaboração experimental. Em memória do professor e pesquisador Dr. Ramdayal Swarnakar.

REFERÊNCIAS

ABENSUR, Hugo. **Biomarcadores na Nefrologia**. [S. l.]: Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2011.

ALQASAMEH, Muawia Salameh; HENG, Lee Yook; AHMAD, Musa. A Urea Biosensor from Stacked Sol-Gel Films with Immobilized Nile Blue Chromoionophore and Urease Enzyme. **Sensors**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 2251–2262, 2007.

CALIL, Simone Saad; SILVA, Paulo Roberto Queiroz da. **Biossensores : estrutura , funcionamento e aplicabilidade**. [S. l.], 2011. Disponível em: [http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE SAAD CALIL PAULO](http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO)

ROBERTO QUEIROZ.pdf. Acesso em: 5 jul. 2017.

CAMPOS, Ludmilla Parreiras. Análise - Uréia. **Www.Goldanalisa.Com.Br**, [s. l.], p. 2, 2016. Disponível em: www.goldanalisa.com.br.

HSIUNG, Shen-Kan *et al.* **Potentiometric Biosensor and the Forming Method Thereof**. 2010/0025265. Concessão: 2010.

HSIUNG, Shen-Kan *et al.* **Solid-State Urea Biosensor**. 2009/0022629. Concessão: 2009.

IMPACT REPORT. Impact report - World Kidney Day 2020. In: , 2020. **World Kidney Day 2020**. [S. l.: s. n.], 2020. p. 1–16. Disponível em: [https://energypedia.info/wiki/EnDev_Report_on_Impacts%0Afile:///V:/HALO/HALO Staff/Longmuir/New Literature B/ParticipAction 2015 Impact-Report_ENG_FINALweb.pdf](https://energypedia.info/wiki/EnDev_Report_on_Impacts%0Afile:///V:/HALO/HALO%0AStaff/Longmuir/New%20Literature/B/ParticipAction%202015%20Impact-Report_ENG_FINALweb.pdf).

LAKARD, Boris *et al.* Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 1641–1647, 2004.

MEDEIROS, Nayara Heloíza *et al.* A Insuficiência Renal Crônica e suas Interferências no Atendimento Odontológico - Revisão de Literatura. **Revista Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 232–242, 2014.

MELO, Ariana F. Desenvolvimento preliminar de um Biossensor em zinático para determinação de taninos hidrolisáveis. [s. l.], p. 104, 2008.

PARDINI, Hermes. **Manual de exames: Instituto de Patologia clínica**. [S. l.: s. n.], 2003. *E-book*. Disponível em: <http://www.vetlaboratorio.com.br/vetlab.php?mID=37&iID=65&bid=143>.

RAMOS, Graziela; MARINI, Danyelle Cristine. Exames bioquímicos relacionados a alterações renais. **Foco**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 11–27, 2014.

RODRIGUES, Adriana. **Deposição, Caracterização e Aplicação de Filmes Nanoestruturados de ZnO: Biossensores de Glicose e Ureia**. 2014. 1–116 f. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2014.

ROZUM, Beata; KONCKI, Robert. A Very Simple Biosensing System for Educational Purposes. **Chemical Analytical - Warsaw**, [s. l.], v. 977, n. 51, p. 977–985, 2006.

SAHNEY, Rachana; PURI, B. K.; ANAND, S. Enzyme coated glass pH-electrode: Its fabrication and applications in the determination of urea in blood samples. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 542, n. 2, p. 157–161, 2005.

SOARES, Juliana Coatrini. Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol. [s. l.], 2011.

UYGUN, Zo; SEZGINTÜRK, Mk. Biosensors for Cancer Biomarkers. In: **BIOSENSORS - EMERGING MATERIALS AND APPLICATIONS**. [S. l.]: Intech, 2011. p. 499–544.

Recebido em: 03/07/2022

Aprovado em: 05/08/2022

Publicado em: 10/08/2022