

**UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS - UNISINOS
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM
NÍVEL MESTRADO**

JULIA KONZEN MOREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO PARA QUANTIFICAÇÃO DE
NÍVEIS DE LACTATO COM APLICAÇÃO PARA DETECÇÃO DE RISCO DE
SEPSE**

Porto Alegre

2021

JULIA KONZEN MOREIRA

DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO PARA QUANTIFICAÇÃO DE NÍVEIS
DE LACTATO COM APLICAÇÃO PARA DETECÇÃO DE RISCO DE SEPSE

Trabalho de Conclusão apresentado(a) como
requisito para obtenção do título de Mestre em
Cuidado em saúde, pelo Programa de Pós-
Graduação em Enfermagem da Universidade do
Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS

Orientador(a): Prof(a) Dr. Priscila Schimdt Lora

Porto Alegre

2021

M838d

Moreira, Julia Konzen.

Desenvolvimento de um dispositivo para quantificação de níveis de lactato com aplicação para detecção de risco de sepse / por Julia Konzen Moreira. – 2021.

46 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) — Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Porto Alegre, RS, 2021.

“Orientadora: Dra. Priscila Schimdt Lora”.

1. Point-of-care. 2. Lactato. 3. Biomarcador. 4. Sepse.
I. Título.

CDU: 616.94:616-071

DEDICATÓRIA

Dedico as mais de 10 mil palavras descritas a seguir a você que se encontrará em alguma das próximas linhas: obrigada por você ter cuidado de mim durante esse tempo, pelo teu colo, pelo seus dotes gastronômicos, por me colocar para dormir, pela carona, por me fazer companhia e por me manter acordada. Obrigada pelos inúmeros favores, pelas dicas, por me ensinar, por provar que eu estava errada e até mesmo por me lembrar quando eu esquecia os motivos de estar aqui. Obrigada pelo seu tempo, por sentar do meu lado, por ler cada linha, por escrever comigo e por cada super ideia. Obrigada pela sua presença e pelo seu amor. Obrigada por entender minhas ausências e desculpa te fazer sentir tanta saudade (eu também senti). Obrigada por vibrar, dançar, cantar e gritar comigo quando tudo dava certo ou ficar e continuar quando o mundo desabava. Obrigada por acreditar e por sentir comigo. Obrigada por ser meu lar!

Com amor, Julia Konzen Moreira.

RESUMO

A sepse é a doença que mais mata no mundo todo e atinge milhões de pessoas a cada ano, também possui altos índices de mortalidade que estão associados ao atraso no diagnóstico devido a centralização e complexidade dos exames laboratoriais. O lactato sanguíneo é considerado um biomarcador de identificação de risco de sepse quando somado aos demais critérios que compõe o consenso SEPSE-3 amplamente adotado no mundo.

Atualmente para detectar esse biomarcador é necessário estruturas laboratoriais, equipamentos, reagentes, insumos e profissionais habilitados. Essa complexidade atrasa a identificação de risco de sepse e dificulta o monitoramento dos pacientes, também a falta de acesso ao exame de lactato em países de baixa a média renda vai além da sua inexistência em ambientes extra hospitalares. Por isso a disponibilidade e utilização de testes detecção de níveis de lactato a partir de dispositivos portáteis *point-of-care* (POC) permite um resultado rápido que agiliza a tomada de decisão dos profissionais de saúde e impacta na redução nas taxas de morbimortalidades dos pacientes.

O presente trabalho se refere ao desenvolvimento de um produto tecnológico desenvolvido no contexto do Mestrado Profissional em Enfermagem em parceria com o Instituto de Semicondutores (ITT Chip), ambos pertencentes à UNISINOS. A pesquisa desenvolveu um dispositivo para detectar o nível de lactato através de reação enzimática e detecção de sinal elétrico com potencial de aplicação no atendimento aos pacientes com risco de sepse.

Neste trabalho foram produzidos seis dispositivos através de diferentes dimensões do design, utilizando substrato de papel fotográfico e lâmina de silício. Materiais condutivos como Alumínio, Tinta de Nanopartículas de Prata, Ouro e Grafeno foram depositados sobre os substratos através de métodos de deposição manual, serigrafia, impressão, transferência térmica e microfabricação. Todas as construções produzidas foram caracterizadas e submetidas a medidas elétricas para diferenciar as concentrações de lactato através da mudança da corrente elétrica detectada por cronoamperometria a partir de uma reação de oxirredução.

Os dispositivos construídos com o método de microfabricação, utilizando ouro como material condutivo apresentaram melhor capacidade para diferenciar concentrações de lactato com base no aumento da corrente elétrica em relação ao aumento de concentração de lactato. Sendo assim, é possível prospectar que, após um estudo de validação clínica com amostras biológicas, essa tecnologia terá aplicabilidade no cenário de atendimento aos pacientes com suspeita de sepse ou outras doenças consideradas tempo-dependentes para detectar os níveis séricos de lactato.

Palavras-chaves: Point-of-care, lactato, biomarcador, sepse, dispositivo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 Objetivos	8
1.1.1 Objetivo geral	8
1.1.2 Objetivos específicos	8
1.2 Justificativa	8
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
2.1 Metabolismo do lactato	10
2.2 Hiperlactemia associada à sepse	11
2.3 Métodos de detecção de lactato	13
2.3.1 Método padrão ouro espectrofotométrico	14
2.3.2 Dispositivos para determinações a ponta de dedo	14
2.4 Metodologia elétrica para mensurar lactato	17
3 METODOLOGIA	21
3.1 Construção do dispositivo	21
.....	22
3.1.1 Materiais	22
3.1.2 Fabricação dos dispositivos	23
3.1.3 Descrição da construção	24
3.2 Experimentos para prova de conceito	25
3.2.1 Escolha dos eletrodos para reação enzimática	25
3.2.2 Reação enzimática	26
3.3 Aspectos éticos	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Resultado das construções	27
4.2 Resultado das medidas elétricas	29
4.2.1 Caracterização com PBS	29
4.2.2 Caracterização com solução de lactato padrão	30
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	34
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICE A – RECEITA SÍNTESE 3.3 – PVP E EG	41
APÊNDICE B – RECEITA DO PDMS	42

APÊNDICE C – PREPAROS DA SOLUÇÃO PBS	43
APÊNDICE D – IMAGENS DOS EQUIPAMENTOS	44

1 INTRODUÇÃO

O lactato é um produto da via glicolítica anaeróbica, onde o envolvimento do oxigênio não é necessário para sua produção. Esse metabólito é fundamental para a manutenção glicêmica em situação de baixa energética celular, sendo responsável pela ativação da gliconeogênese via ciclo de Cori (ANDERSEN et al., 2014). Sua produção é fisiológica na maioria dos tecidos, com produção em larga escala no músculo esquelético, mais especificamente nas fibras musculares de contração rápida. Essa produção é contínua e equilibrada, o que mantém níveis sanguíneos de lactato em torno de 1,5 mmol/L em indivíduos saudáveis (DRABEN, 2018).

No entanto, níveis séricos elevados de lactato são observados em alterações metabólicas como na disfunção mitocondrial, insuficiência oxidativa e hipóxia, ou seja, quando há baixa quantidade de oxigênio nos mais diversos tecidos que geralmente é associada a anormalidades de perfusão. Essa condição é frequente em pacientes com sepse, por exemplo, considerados criticamente doentes. (HAAS *et al.*, 2016).

A relação do aumento da produção de lactato na sepse é consequência do fornecimento de oxigênio prejudicado, alterado ou de um desequilíbrio geral entre sua oferta e as necessidades teciduais metabólicas. (DRABEN, 2018). Ainda, a elevação do lactato sanguíneo é considerada como um biomarcador de risco de sepse quando somada aos demais critérios que compõe o consenso SEPSE-3, publicado em 2016 pela *New England Journal of Medicine* e amplamente adotado no mundo. (LEVY; EVANS; RHODES, 2018).

A efetividade da mensuração do nível desse biomarcador para suspeita de risco de sepse foi verificada em um estudo observacional publicado pelo *Intensive Care Med.* O estudo avaliou 14.040 pacientes, sendo que 412 tinham pelo menos uma determinação no nível de lactato considerada grave (> 10 mmol/L) durante a internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). (HAAS *et al.*, 2016).

A elevação nos níveis de lactato também foi associada a uma maior taxa de mortalidade nos pacientes avaliados pelo escore *National Early Warning Score* (NEWS), utilizado para determinar a gravidade clínica. Pacientes com pontuação NEWS superior a 4 foram divididos em dois grupos, um que indicava nível de lactato sanguíneo inferior a 2 mmol/L e outro entre 2 mmol/L e 4 mmol/L. O segundo grupo, cujo nível de concentração de lactato mostrou-se superior, apresentou maior mortalidade (21% versus 16%). (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2018a, 2018b).

A falta de acesso ao exame de lactato em países de baixa a média renda vai além da sua inexistência em ambientes extra hospitalares. Conforme apontado pela literatura, o diagnóstico de choque séptico não pode ser realizado em alguns desses países usando as definições do SEPSE-3 pela indisponibilidade da determinação dos níveis de lactato sanguíneo. (WHO, 2018a, 2018b).

Ainda é um desafio importante na gestão de sepse a triagem e diagnóstico pré-hospitalar conforme publicado na *International Journal of Infectious Diseases*. (RELLO; LEBLEBICIOGLU, 2016). O acolhimento e classificação de risco nesses serviços usualmente contam com a presença da equipe de enfermagem. Os profissionais da saúde (enfermagem e demais) têm acesso a poucas informações (temperatura corporal, pressão arterial e alterações cardíacas e respiratórias) para fazer o reconhecimento precoce e estratificação de risco da sepse. Biomarcadores sanguíneos como lactato não estão frequentemente disponíveis fora dos ambientes hospitalares, locais onde as primeiras manifestações de sepse e choque devem ser identificadas para que as tomadas de decisões sejam antecipadas. (RELLO; LEBLEBICIOGLU, 2016).

Por outro lado, a disponibilidade e utilização de testes de nível de lactato a partir de dispositivos portáteis, também chamados de *point-of-care* (POC), tem aumentado em todo o mundo, especialmente em emergências, uma vez que são simples e de fácil execução. Além disso, esse tipo de dispositivo permite o resultado rápido agilizando a tomada de decisão. (EDWARD *et al.*, 2019).

Hoje a detecção de lactato nos laboratórios de análises clínicas acontece, na maior parte das vezes, por reações enzimáticas que tem detecção por absorbância (luz). No entanto, esse método é difícil de reproduzir em dispositivos POC. Em contrapartida, a detecção elétrica é uma alternativa viável e acurada para a quantificação da troca de elétrons que acontece na reação enzimática. Sendo assim, é utilizada na mensuração da concentração de lactato através da reação enzimática nos citados dispositivos. (WALKER, 2009).

Disponibilizar a mensuração de lactato no ponto de atendimento em ambientes pré-hospitalares, ou na atenção primária, permite que encaminhamento de casos graves seja mais ágil e mais rápido, contribuindo para decisões compartilhadas pela equipe de saúde e impactando em taxas morbimortalidades reduzidas. (MORRIS *et al.*, 2017).

Com base no proposto, é evidente que a determinação do nível de lactato por dispositivos POC em casos suspeitos de risco de sepse contribui para qualificação do cuidado, redução da mortalidade e melhor qualidade de vida dos pacientes. Contudo, esses equipamentos ainda não apresentam um custo acessível para países de baixa e média renda, como o Brasil,

mas a elaboração local da tecnologia pode facilitar o acesso a ela. Assim, a presente pesquisa investe no desenvolvimento de um dispositivo POC para detectar o nível de lactato com potencial de aplicação no atendimento aos pacientes com risco de sepse.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver um dispositivo capaz de detectar o nível de lactato através de reação enzimática e detecção de sinal elétrico.

1.1.2 Objetivos específicos

Foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- a) comprovar o funcionamento do dispositivo através de prova de conceito;
- b) investigar substratos, materiais condutivos e design dos eletrodos na fabricação do dispositivo

1.2 Justificativa

O esforço da pesquisa é investir no desenvolvimento de um dispositivo biocompatível para monitorar as propriedades elétricas de reação enzimática pela transformação do lactato em ácido láctico em amostras. A detecção de níveis séricos de lactato representa um importante parâmetro na avaliação de suspeita de risco de sepse e outras doenças consideradas agravos tempo-dependente. Sendo assim, a determinação de lactato rápida e portátil pode ser uma ferramenta a contribuir na tomada de decisão clínica, pois um teste laboratorial de boa acurácia gera maior assertividade nas intervenções da equipe de saúde.

Na sequência, o desenvolvimento dessa tecnologia possibilita a implementação do dispositivo POC no atendimento pré-hospitalar, o que agiliza a tomada de decisão e impacta na redução da morbimortalidade, conseqüentemente repercutindo na gestão do cuidado em saúde nesse cenário. Ainda que existam no mercado outros produtos destinados a esse propósito, o elevado custo (preço médio de R\$1.200,00 do leitor e R\$25,00 cada tira teste) e a falta de validação no cenário brasileiro dificulta o uso em larga escala no país. Sendo assim, a atuação

da indústria local na produção desses dispositivos, com validações locais, pode impactar em melhores ferramentas para o cuidado em saúde.

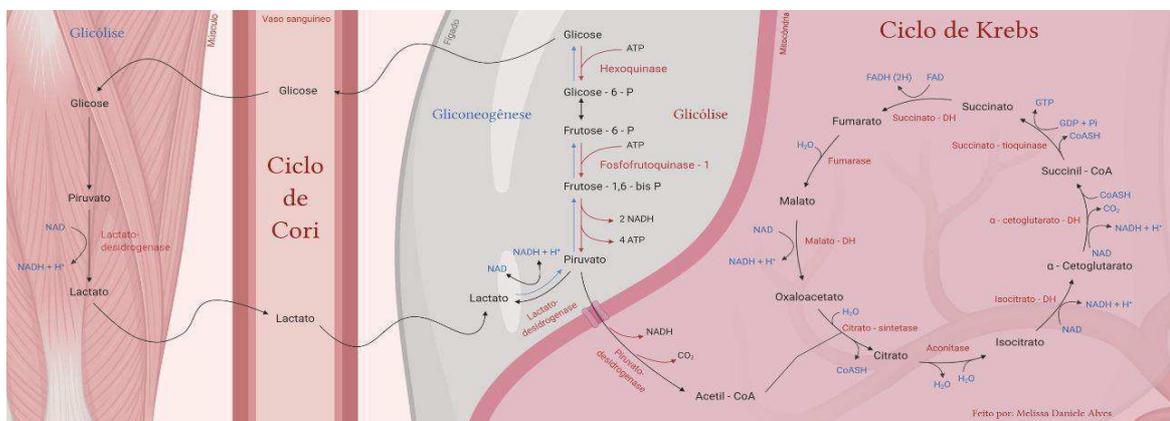
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A fundamentação teórica que embasa esse projeto descreve o contexto do metabolismo do lactato, a hiperlactemia associada à sepse, método padrão ouro para detecção de lactato em laboratórios clínicos, dispositivos de lactato *point-of-care* comerciais, desenvolvimento de biossensores e suas vantagens na aplicação em cenários de urgência e emergência.

2.1 Metabolismo do lactato

O substrato energético mais utilizado pelo corpo humano é a glicose. A sua quebra em piruvato e posterior oxidação ocorre pela glicólise aeróbia, onde observamos o oxigênio sendo o receptor final de elétrons. Essa ativação ocorre em duas etapas: a primeira no citosol da célula, onde uma molécula de glicose é degradada em duas moléculas de piruvato, produzindo trifosfato de adenosina (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), um intermediário oxidativo importante; e segunda etapa na mitocôndria, onde o piruvato citosólico é convertido em Acetil-CoA e disponibilizado na matriz mitocondrial para seguir o Ciclo de Krebs e Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE), produzindo aproximadamente de 30 a 32 moles de ATP por mol de glicose. Figura 1. Todo esse processo oxidativo é regulado pela disponibilidade de oxigênio celular, pois a produção de ATP é dependente da presença do oxigênio como receptor final dos elétrons na CTE.

Figura 1 – Metabolismos do lactato sem envolvimento de oxigênio e com envolvimento de oxigênio



Fonte: Elaborado por Alves (2020), com base em Nelson e Cox (2004, p. 569, 639, 948).

Contudo, quando ocorre qualquer tipo de restrição na disponibilidade de oxigênio celular, o metabolismo dispara uma regulação energética, onde ativa a glicólise anaeróbia, ou seja, produção aumentada de lactato em decorrência da restrição de oxigênio e conseqüentemente inibição da CTE. Nessa via, a enzima lactato-desidrogenase (LDH), utiliza o NADH para a redução do piruvato a lactato, que logo após é liberado no sangue, produzindo apenas 2 moles de ATP por mol de glicose. (HAAS *et al.*, 2016).

Esse mecanismo pode ser observado em alta velocidade em tecidos como músculo esquelético e cardíaco, nos quais o lactato, liberado na corrente sanguínea, é captado pelo fígado e utilizado para sintetizar glicose através da gliconeogênese, que volta para circulação sanguínea. A circulação de lactato e glicose entre os tecidos periféricos e o fígado é chamada de Ciclo de Cori. Ambas as rotas podem ocorrer simultaneamente, dependendo da demanda e da fisiologia de cada tecido. (BLOHM; LAI; NEAVYN, 2017).

Neste sentido, a produção de lactato é uma parte da homeostasia do metabolismo. Ela ocorre em todas as células do corpo humano, com a maior produção nos músculos pelas fibras de contrações rápidas, nos eritrócitos e durante o metabolismo de carboidratos. A síntese de lactato não envolve o uso de oxigênio, mesmo ele podendo estar presente e disponível na célula. (HAAS *et al.*, 2016). Em condições fisiológicas, os níveis de produção de lactato são de aproximadamente 1,5 mmol/L em indivíduos saudáveis. (DRABEN, 2018).

Na ausência de doença, níveis elevados de lactato no sangue podem estar associados ao exercício físico ou pode ser resultado de fornecimento de oxigênio prejudicado, alterado ou um desequilíbrio geral entre a oferta de oxigênio e as necessidades teciduais de consumo que, quando aumentada, pode ser quantificada em $\geq 2,0$ mmol/L em pacientes doentes. (DRABEN, 2018).

2.2 Hiperlactemia associada à sepse

A sepse atinge mais de 30 milhões de pessoas em todo o mundo a cada ano. Essa ocorrência está aumentando a uma taxa anual de 1,5%, tornando-se uma preocupação global significativa na área da saúde. (WHO, 2018a, 2018b). Dados apontam que, no Brasil, uma média de 600 mil novos casos de sepse surgem por ano com aproximadamente 16% de mortalidade. Ainda, a sepse é a principal causa de morte nas UTI's e de óbito tardio hospitalar, chegando em torno de 60% dos casos no país. (SILVA; SOUZA, 2018). O custo mediano de UTI para o sistema de saúde é de US\$9.632 por paciente, o que foi evidenciado em um estudo brasileiro realizado em 21 UTI's de hospitais privados e públicos. (TANIGUCHI *et al.*, 2014).

A causa médica mais comum de hiperlactatemia é hipóxia tecidual, como é o caso de sepse grave, convulsão ou trauma. Níveis séricos elevados de lactato, entre outras representações, ocorrem em situações patológicas como na disfunção mitocondrial e hipóxia, que são associadas a anormalidades de perfusão frequentes em pacientes criticamente doentes. (BLOHM; LAI; NEAVYN, 2017).

Sob condições patológicas, as células produzirão ATP pela decomposição da glicose via glicólise anaeróbica sem envolvimento de oxigênio, convertendo piruvato em lactato ao invés de acetil-CoA. Sendo assim, na sepse o piruvato é produzido mais rapidamente do que pode ser transformado em acetil-CoA pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase mitocondrial (PDH), que regula essa conversão nas mitocôndrias. A função da PDH foi relacionada como prejudicada na sepse. (GARCIA-ALVAREZ; MARIK; BELLOMO, 2014). Isso aumenta a concentração celular de piruvato, que por sua vez eleva a produção de lactato por um efeito de massa. (GARCIA-ALVAREZ; MARIK; BELLOMO, 2014).

Também existe uma relação entre hipóxia tecidual e a produção aumentada de lactato, já que ocorre a redução dos componentes da liberação sistêmica de oxigênio (nível de hemoglobina, saturação de oxigênio e débito cardíaco). Além disso, dados clínicos indicam a relação entre a baixa concentração de oxigênio e o aumento dos níveis de lactato. (BAKKER; NIJSTEN; JANSEN, 2013; FRIEDMAN *et al.*, 1998; OSPINA-TASCÓN; MADRIÑÁN-NAVIA, 2015).

Esse fenômeno está presente na fase inicial de ressuscitação de uma doença crítica, sugerindo que a ressuscitação volêmica melhora um estado de consumo de oxigênio dependente do suprimento e, portanto, a hiperlactatemia, pressupondo que o aumento macro do fluxo sanguíneo pode incrementar o transporte convectivo de oxigênio para os tecidos. Dessa forma mantém-se a respiração celular e, conseqüentemente, a função dos órgãos. (BAKKER; NIJSTEN; JANSEN, 2013; FRIEDMAN *et al.*, 1998; OSPINA-TASCÓN; MADRIÑÁN-NAVIA, 2015).

Como a troca de oxigênio ocorre na microcirculação, alterações na perfusão microcirculatória também podem resultar em disponibilidade limitada de oxigênio.

A sepse é uma doença que envolve desregulação do processo inflamatório normal, caracterizada por uma liberação descontrolada de mediadores pró-inflamatórios que, junto a descarga de toxinas de bactérias, pode induzir lesão tecidual generalizada ou desvio micro circulatório. Como consequência, a entrega de oxigênio é insuficiente para a célula, aumentando assim os níveis de lactato na corrente sanguínea. Sendo assim, a ressuscitação volêmica melhora a perfusão circulatória e tem sido correlacionada a uma redução nos níveis

de lactato em pacientes com choque séptico. (BAKKER; NIJSTEN; JANSEN, 2013; RHODES *et al.*, 2017).

Os níveis elevados de lactato no sangue têm sido relacionados à morbimortalidade. Em uma recente avaliação de tecnologia em saúde sobre a avaliação dos níveis de lactato em pacientes críticos, foi mostrado que tanto no departamento de emergência quanto nas UTI's os níveis de lactato sanguíneo têm um lugar na estratificação de risco. Não apenas as medições pontuais estão relacionadas ao resultado, mas também a duração e a área sob a curva do aumento dos níveis de lactato estão relacionadas à morbidade (falência de órgãos) e à mortalidade em diferentes grupos de pacientes. (BAKKER; NIJSTEN; JANSEN, 2013).

Além disso, há evidências de disfunção mitocondrial na sepse sendo que essa pode ocorrer através de diversos mecanismos. Dentre os mais relacionados estão a inibição reversível do complexo da cadeia transportadora de elétrons, inibição oxidativa da desidrogenase mitocondrial e desacoplamento da respiração celular. Todos os citados podem resultar em hipóxia, não pela deficiência de oxigênio e sim pela dificuldade de sua absorção mitocondrial. (SALOMÃO *et al.*, 2019; YIN *et al.*, 2019).

Um estudo avaliou a relação da disfunção mitocondrial na sepse através da biopsia de músculo esquelético de 28 pacientes gravemente enfermos. As concentrações de ATP encontradas foram significativamente menores nos 12 pacientes com sepse, que posteriormente morreram, do que nos outros 16 sépticos que sobreviveram. As baixas concentrações de ATP foram diretamente relacionadas com a disfunção mitocondrial que prejudica a sua produção celular. O resultado dessa investigação indica uma correlação direta entre disfunção mitocondrial e um maior índice de mortalidade por sepse. (BREALEY MRCP *et al.*, 2002).

Uma meta-análise de 647 pacientes demonstra uma evidência moderada de redução da mortalidade quando usada uma estratégia de detecção de lactato precoce em comparação com o cuidado habitual. (RHODES *et al.*, 2017). O reconhecimento prévio do quadro é de extrema importância para o início imediato do tratamento. Conforme demonstrado por estudo publicado no *New England Journal of Medicine*, cada hora de atraso no início da intervenção faz o risco de mortalidade aumentar em 9%. (RHODES *et al.*, 2017).

2.3 Métodos de detecção de lactato

A detecção de lactato sanguíneo é realizada atualmente através de um método padronizado.

2.3.1 Método padrão ouro espectrofotométrico

O princípio do método utilizado atualmente para detecção dos níveis de lactato é o espectrofotométrico enzimático. Utilizando kits comerciais, é possível mensurá-lo com diferentes reações. Em uma delas, ele é oxidado em ácido pirúvico pela lactato desidrogenase (LDH) usando NAD, que é reduzido a NADH. Este, por sua vez, absorve 340 nm da luz emitida pelo espectrofotômetro, sendo a quantidade absorvente diretamente proporcional à concentração de lactato na amostra analisada. De outra forma, essa mensuração pode ser feita através da medição de H_2O_2 gerado a partir de oxidação aeróbia com uso de oxigênio do lactato pela lactato oxidase (LOx). O corante resultante (cor rosa) absorve 520 nm da luz emitida, que é diretamente proporcional à quantidade de lactato. (PUNDIR *et al.*, 2016).

A detecção da reação enzimática por espectrofotometria envolve a absorção da luz pelas soluções. Tal concentração da substância absorvente é proporcional à quantidade de luz absorvida. Diferentes comprimentos de onda podem ser detectados nesses equipamentos, variando do infravermelho ao ultravioleta e atravessando a faixa do visível. (WORSFOLD; ZAGATTO, 2017).

Para realizar a mensuração do nível de lactato pelo método de reação enzimática detectada por espectrofotometria, é necessária a coleta por venopunção em tubo fluoretado, centrífuga para a separação do plasma (analito utilizado na quantificação), kit comercial de reagente para reação enzimática de lactato, banho maria para aquecimento amostral de 37 °C, pipeta, cronômetro, fotômetro capaz de medir exatidão de absorbância em 550 nm (530 nm a 570 nm) e profissionais habilitados. (LAB TESTE, 2016). O custo do teste para os pacientes ou sistema de saúde no Brasil fica na faixa de R\$11,54, podendo sofrer ajustes conforme o laboratório de análises clínicas. O tempo até a liberação do laudo com o resultado do nível do marcador pode chegar a 4h. (TABELA...2020).

2.3.2 Dispositivos para determinações a ponta de dedo

Os dispositivos *point-of-care* permitem uma aquisição de informações mais eficaz porque derrubam os dois principais desafios da relação entre a mensuração do lactato e os quadros de sepse: tempo e espaço. Isso porque essas soluções proporcionam a obtenção de diagnósticos rápidos e podem ser realizadas em quase todos os lugares, possibilitando uma tomada de decisão mais assertiva e antecipada nos quadros clínicos de hiperlactemia. Em casos onde o atendimento otimizado é iniciado tardiamente, os dispositivos POC poderiam acelerar

os processos, conseqüentemente modificando os desfechos dos pacientes, principalmente em naqueles com suspeita de sepse, a doença que mais mata no mundo todo. (REDDY *et al.*, 2018).

Dois estudos comprovaram que o uso de POCs reduz o tempo do resultado da mensuração do nível de lactato no ponto de atendimento. Uma das investigações citadas demonstrou redução significativa com média de 122 a 34 minutos para obter o resultado. Na outra, foi possível adquirir um resultado de lactato em <1 hora quando aplicado teste no ponto de atendimento. (MORRIS *et al.*, 2017). Em estudo comparativo, a introdução da medição de lactato utilizando dispositivos POC reduziu o tempo de disponibilidade dos resultados para 88 minutos em relação ao laboratório de análises clínicas. Conseqüentemente, a redução significativa no tempo para detectar o nível de lactato impactou no período necessário para administração de fluidos intravenosos, diminuição das taxas de admissão na UTI e mortalidade hospitalar de 19% para 6% em pacientes com suspeita de sepse. (SINGER *et al.*, 2014).

Tratando de mortalidade, um estudo com POC em um aero móvel para transporte de pacientes evidenciou que os sobreviventes tiveram um nível médio de lactato de 5,1 mmol/L e os não sobreviventes apresentaram um valor médio de 8,6 mmol/L. (MULLEN *et al.*, 2014).

Para avaliar a efetividade dos POCs com aplicação de mensuração de lactato, foi publicado um estudo de centros médicos que tinham pelo menos um resultado de nível de lactato usando o analisador i-Stat dentro de 1h da chegada ao Serviço de Emergência. O número médio dos 387 pacientes inscritos foi de $3,2 \pm 3,6$ mmol/L. Duzentos e cinco (53%) apresentaram lactato ≥ 2 mmol/L (elevado). Com isso, a investigação concluiu que o nível de lactato parece ser um teste para alertar os profissionais de pacientes críticos com risco de sepse quando combinado a um POC. A tecnologia POC, portanto, é menos invasiva e agiliza intervenções pela capacidade de detectar o nível do analito mais rápido que a técnica usada no laboratório de análises clínicas. (EDWARD *et al.*, 2019). Quando comparada a métodos laboratoriais de mensuração, de acordo com estudo sobre ABL90, i-STAT e StatStrip, demonstra boa concordância de resultado. (TOLAN *et al.*, 2017).

Comercialmente é possível encontrar dispositivos ou biossensores eletroquímicos que mensuram o nível de lactato como, por exemplo, StatStrip Xpress® e Accutrend Plus Roche®, indicados para uso hospitalar e controle doméstico. Como o lactato é o principal indicador de condicionamento com uso de oxigênio para atletas e treinadores, servindo como preditor chave de desempenho, alguns desses dispositivos são destinados somente ao monitoramento de desempenho esportivo, excluindo a utilização em sistemas de saúde.

Figura 2 – Point-of-Care para detecção de lactato StatStrip Xpress®



Fonte: Nova Biomedical (2019).

Figura 3 – Point-of-Care para detecção de lactato Accutrend Plus Roche®



Fonte: Roche Diagnostics (2021).

No quadro 1 estão representadas tecnologias que medem o nível de lactato sanguíneo disponíveis comercialmente. As especificações descritas consideram suas aplicações de uso, tipo de amostra utilizada e tempo de entrega do resultado do nível do analito. Seguem os principais dispositivos encontrados na literatura para detecção de lactato.

Quadro 1 – *Point-of-care* comercial para mensurar nível de lactato

Produto	Aplicação	Amostra	Tempo do resultado	Referência
StatStrip Xpress® Medidores de lactato	Detecta e monitora níveis de lactato	0,6 µl de sangue capilar	13 segundos	https://www.novabio.us/pt/statstrip-lactate/index.php
Accutrend® Plus system	Detecta e monitora lactato e outros biomarcadores	15–50 µL de sangue capilar	60 segundos	https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/accutrend-plus.html#productSpecs
Lactate Scout 4	Monitora o desempenho esportivo	0,2 µl de sangue capilar,	10 segundos	https://www.ekfdiagnostics.com/lactate-scout.html
Lactate Plus Meter	Monitora o desempenho esportivo	Não descreve	13 segundos	https://novabiomedical.com/lactateplusmeterstore/
I-stat	Cartuchos para marcadores	2 a 3 gotas de sangue	2 minutos	https://www.pointofcare.abott/us/en/offerings/istat/istat-handheld
ABL90 (RA-diômetro, Bronshoj, Dinamarca)	Análise de gases sanguíneos, incluindo lactato	65µL	35 segundos	https://www.radiometer.pt/pt-pt/produutos-e-solu%C3%A7%C3%B5es/an%C3%A1lises-de-gases-no-sangue/analizador-de-gases-no-sangue-abl90-flex

Fonte: Elaborado pela autora.

2.4 Metodologia elétrica para mensurar lactato

Os biossensores podem apresentar diferentes formas de funcionamento e são capazes de medir mudança de densidade, colorimétrica e fluorescência, mas os biossensores eletroquímicos são integrados a transdutores que medem a oxidação ou a redução de um analito.

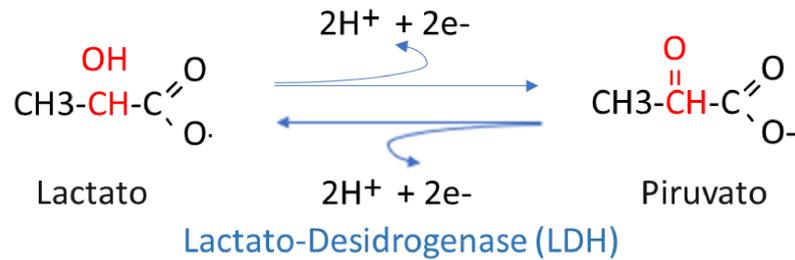
(WALKER, 2009). Estes são construídos por um sistema de reconhecimento (que usualmente envolve uma enzima com adequada especificidade pelo analito) e um transdutor responsável por identificar o sinal elétrico decorrente da reação química (enzima-substrato). O uso da detecção elétrica tem como principal característica uma maior sensibilidade analítica. (WALKER, 2009).

Para detectar o lactato através de reações enzimáticas, usualmente são utilizadas lactato oxidase (LOD) e lactato desidrogenase (LDH) nos dispositivos eletroquímicos. Tanto a LOD quanto a LDH catalisam a oxidação do lactato em piruvato. Em um biossensor à base de LDH, a catalização depende da presença do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). Essa abordagem tem algumas vantagens, pois não depende do oxigênio e é mais seletiva do que LOD para lactato. Por outro lado, os inconvenientes incluem a instabilidade do reagente e a alta reversibilidade da reação entre lactato e ácido pirúvico na presença de coenzima NADH. (CHAN, *et al* 2017).

A oxidação e a redução são dependentes, pois, respectivamente, há perdas e ganhos de elétrons de uma para outra. Durante a desidrogenação, dois elétrons e dois íons hidrogênio (o equivalente a dois átomos de hidrogênio) são removidos do carbono do lactato, formando piruvato. Nas células, a reação é catalisada pela lactato-desidrogenase, e os elétrons são transferidos para o cofator dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NAD). Essa reação é totalmente reversível porque o piruvato pode ser reduzido pela transferência dos elétrons do cofator. (NELSON; COX, 2014).

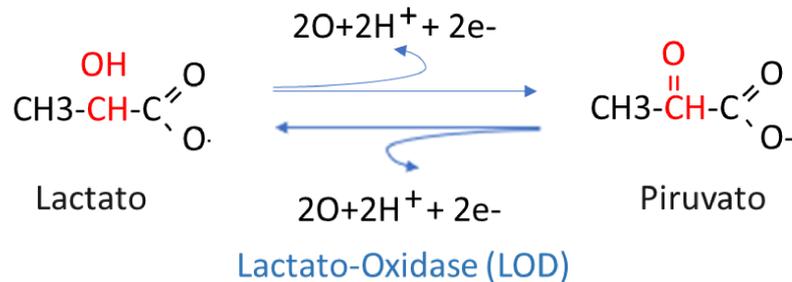
A lactato oxidase (LOD) é amplamente utilizada em biossensores de lactato por causa de sua reação simples, sendo ela a responsável por catalisar a oxidação do lactato em piruvato. Na presença de O₂ dissolvido, a enzima pode ser reoxidada, libertando H₂O₂. Este último produto pode ser oxidado na superfície do eletrodo restaurando a concentração anterior de O₂ e resultando em uma corrente proporcional à quantidade de lactato dissolvido. Reações químicas e eletroquímicas envolvidas por enzimas podem ser resumidas pelas figuras abaixo. (ROMERO *et al.*, 2010).

Figura 4 – Reação de oxidação-redução por LDH



Fonte: Adaptada de Nelson e Cox (2014).

Figura 5 – Reação de oxidação-redução por LDH



Fonte: Adaptada de Nelson e Cox (2014).

Legenda: Essa movimentação de elétrons é o que será identificado pelo transdutor, sendo proporcional à concentração de lactato na amostra.

Um dos mecanismos de operação dos POCs existentes para detectar lactato é baseado na geração de íons (CH_3COO^- , H^+ e HCO_3^-) resultantes da oxidação de L-lactato a partir da reação enzimática por lactato oxidase ou lactato desidrogenase. Consequentemente, essas cargas podem ser monitoradas por medições elétricas. (CHAN, *et al.*, 2017).

Quando a transferência de carga da ligação entre enzima e analito ocorre, é possível determinar a taxa de transferência de elétrons. Isso, por sua vez, depende do consumo de oxidantes e produção de redutor perto da superfície do eletrodo, o que pode estar diretamente ligado a proporcionalidade de um marcador investigado, como o lactato, por exemplo. (MALHOTRA; PANDEY, 2017).

Na literatura são apresentados biossensores eletroquímicos desenvolvidos a partir de um transdutor que mede um sinal resultante de reações enzimáticas (íons). Essa mensuração pode ocorrer através de medida de cronoamperometria cuja função é avaliar a mudança de corrente

elétrica no tempo. O referido método tem demonstrado uma forte relação linear entre a corrente medida e concentrações de analitos, principalmente em reações de oxirredução. (WALKER, 2009).

Por isso o esforço do presente trabalho foi desenvolver dispositivos para detectar os níveis de lactato, para isso foram realizadas fabricação de eletrodos utilizando material condutivo e avaliada a mudança dos íons na solução contendo lactato. Dessa maneira foi possível mensurar o nível de lactato aplicando uma perturbação elétrica nos eletrodos e avaliando o comportamento da corrente elétrica com uso de equipamentos Potenciostato e Parameter Analyzer. A enzima lactato oxidase foi responsável pela conversão de lactato para piruvato e os íons gerados nessa reação alteram a corrente elétrica pela modificação de cargas na superfície do eletrodo. Para fins de prova de conceito, foi avaliado a correlação entre as correntes geradas e as concentrações de lactato.

3 METODOLOGIA

O presente trabalho se refere ao desenvolvimento de um produto tecnológico desenvolvido no contexto do Mestrado Profissional em Enfermagem em parceria com o Instituto de Semicondutores (ITT Chip), ambos pertencentes à UNISINOS. Ele tem aplicabilidade no cuidado em enfermagem, pois agiliza a tomada de decisão do profissional nas condições que envolvem alterações do nível de lactato sérico, como na sepse. Por fim, ressalta-se que o produto oriundo desse projeto está alinhado ao *Cuidado em Saúde e em Enfermagem*, linha de pesquisa do referido programa de Pós-Graduação, e é um produto de inovação tecnológica em saúde com potencial de depósito de propriedade intelectual.

3.1 Construção do dispositivo

Os dispositivos foram projetados através de diferentes designs, substratos, materiais condutivos, métodos de deposição com base na literatura e na experiência prévia do grupo. (FERNANDES *et al.*, 2020; SCHUCK *et al.*, 2021. Além disso, foram submetidos a experimentos para determinar as concentrações de lactato através de medidas elétricas. A figura 6 apresenta o fluxo de metodologia utilizado nesse projeto. Os códigos no fluxo indicam as seções correspondentes de cada item da metodologia.

Figura 6 – Fluxo metodológico dos dispositivos



Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.1 Materiais

Para produção dos dispositivos, utilizou-se Papel fotográfico EPSON A4 210 x 297 mm e Lâminas de Silício como substratos. Os materiais condutivos escolhidos foram tinta de nanopartículas de prata desenvolvido por um grupo parceiro (FERNANDES *et al.*, 2020), alumínio em ribbon (Metallograph®), alvo de ouro com diâmetro de 6 polegadas Microchemicals® e Óxido de grafeno em pasta (2DM) (Apêndice A). Como materiais isolantes para construção do delimitador da amostra, utilizou-se vinil e PDMS (polidimetilsiloxano) (Apêndice B).

Os reagentes utilizados para os experimentos de caracterização e prova de conceito foram: solução de PBS pH 7,4 (Apêndice C) e Kit de Lactato Enzimático comercial da marca Labtest® contendo, no Monoreagente, reagente 1 com tampão 50 mmol/L pH 7,2, 4-aminoantipirina $\geq 0,05$ mmol/L peroxidase ≥ 1000 U/L e conservantes, reagente 2 com tampão 50mmol/L Ph 7,2, lactato oxidase ≥ 1000 U/L, N-etyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-metyllaniline (TOOS) $\geq 1,5$ mmol/L e conservante e solução padrão de lactato com 40mmol/L.

3.1.2 Fabricação dos dispositivos

Os eletrodos dos dispositivos foram projetados no software AutoCad® e CleWin® com diferentes dimensões apresentadas na Figura 7.

Figura 7 – Design utilizado para construções



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: A figura representa o design utilizado para as construções

No quadro abaixo estão apresentadas todas as condições que variaram na construção dos dispositivos utilizados no estudo.

Quadro 2 – Quadro de dispositivos desenvolvidos

Código da construção do eletrodo	Design e dimensões do dispositivo	Material condutivo	Substrato	Deposição	Delimitador da amostra analisada	Equipamento de Medição	Tensão aplicada	Medição	Amostra
1.0		Tinta de nanopartícula de prata	Papel Fotográfico	Sul de tinta com pipeta	Vinil	Potenciostato Autolab	1V	i	Ácido Lático
1.1		Tinta de nanopartícula de prata	Papel Fotográfico	Dimatix	Vinil	Potenciostato Autolab	1V	i	Ácido Lático
2.0		Alumínio	Papel Fotográfico	Zebra	Vinil	Potenciostato Autolab	1V	i	Ácido Lático
3.0		Ouro	Wafer de silício	Sputtering	Vinil	Parameter analyzer	0,6V	i	Ácido Lático
3.1		Ouro	Wafer de silício	Sputtering	PDMS	Parameter analyzer	0,6V	i	Ácido Lático e Ácido Lático com LOX
4.0		Óxido de Grafeno	Papel Fotográfico	Serigrafia	Vinil	Parameter analyzer	0,6V	i	Ácido Lático

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda de Símbolos: i: corrente, LOX: lactato oxidase, PDMS: polidimetilsiloxano, V: volt

Nota: Os designs 1.0, 1.1, 2.0 e 4.0 possuem comprimento de 2,5 cm, altura 0,5 cm e espaçamento entre eletrodos de 1 mm. Já os designs 3.0 e 3.1 apresentam comprimento de 1,2 cm, altura 0,3 cm e espaçamento entre eletrodos de 0,5 mm.

3.1.3 Descrição da construção

Na construção 1.0 o design dos eletrodos foi delimitado com cera através de impressora Colorcube® em substrato de papel fotográfico brilhante premium e em seguida 5 uL de tinta de nanopartículas de prata foram depositados na área sem cera. A cura do material depositado foi feita a 100 °C por 1 hora. As câmaras de depósito de amostra foram padronizadas pelo uso de vinil recortado por uma plotadora de corte Graphtec® CE 60000-40 com velocidade 10 cm/s, aceleração 1 e pressão 27, sendo depois alinhadas sobre o par de eletrodos. Houve repetição do procedimento para as construções 1.1, 2.0, 3.0 e 4.0.

Na construção 1.1 manteve-se o mesmo material condutivo, substrato e processo de cura. A diferença foi a deposição do material condutivo, realizado com o equipamento Dimatix® DMP 2850.

Na construção 2.0 o material condutivo dos eletrodos foi transferido usando um ribbon de alumínio através da Impressora de Etiquetas Térmica Zebra® ZT230 em papel fotográfico com velocidade 2.5 cm/s e intensidade de transferência de 30.

Para fabricação dos eletrodos na construção 3.0, empregou-se a técnica de microfabricação *lift off*, que consiste na realização de aberturas no fotorresiste conforme a geometria desejada e posterior depósito do metal. O processo finalizou com a remoção do fotorresiste. Como substrato, foi utilizada uma lâmina de Silício contendo uma camada fina de Dióxido de Silício (SiO₂) para isolar os eletrodos do Silício. Após uma limpeza inicial, o fotorresiste foi depositado com o uso de um *spin coater*. Em seguida, foi pré-curado (*soft bake*) por alguns minutos para evaporar solventes e melhorar a adesão ao substrato antes da exposição, feita com um equipamento de gravação direta (*maskless*), cujo comprimento de onda é de 385 nm, disponível no laboratório. A remoção das áreas não expostas pela luz foi feita por meio de um processo químico. Para isso utilizou-se uma solução (reveladora) que dissolve o fotorresiste não exposto. A etapa de metalização consistiu na deposição de uma fina camada de metal por meio de *sputtering*. Finalizou-se processo com a remoção completa do fotorresiste, que também foi realizado por um processo químico com solução indicada pelo fabricante do fotorresiste.

Na construção 3.1 os eletrodos foram fabricados usando a mesma técnica 3.0 de microfabricação *lift off*. Padronizou-se, porém, as câmaras de depósito de amostra pelo uso de PDMS recortado por um Cortador Circular Patch 6 mm, em seguida alinhando-as sobre o par

de eletrodos após passar por um tratamento de superfície com Plasma de Oxigênio durante 1 minuto com 100W e 100 sccm.

Na construção 4.0 os eletrodos foram definidos utilizando uma tela de serigrafia e pasta de óxido de grafeno sobre um substrato de papel fotográfico.

3.1.4 Caracterização dos dispositivos

Os dispositivos foram caracterizados através da medição da corrente de uma solução PBS pH 7,4 usando um equipamento Autolab® PGSTAT30 Potenciostat/Galvonstatic Metrohm e uma Analisadora de Parâmetros Keithley® 4200A-SCS com aplicação de diferentes tensões para cada material condutivo conforme descrito no Quadro 2. Os valores de corrente obtidos com a solução tampão foram considerados como o valor zero, denominado “branco”.

3.2 Experimentos para prova de conceito

Caracterizações que auxiliaram na escolha da melhor construção foram feitas antes da realização da reação enzimática nos dispositivos. Assim, em soma a caracterização com PBS foi realizado outra com soluções padrão de lactato, descritas a seguir no item 3.2.1.

3.2.1 Escolha dos eletrodos para reação enzimática

Para determinar a construção que melhor detecta diferentes concentrações de lactato, realizou-se também a caracterização dos dispositivos com a solução padrão de lactato presente no kit comercial. Para isso, ocorreu a mensuração da corrente elétrica aplicando diferentes tensões (de acordo com a construção). Nos designs 1.0, 1.1, 2.0 e 4.0 foi adicionado um volume de 10 μL e nos designs 3.0 e 3.1 de 4 μL . Esse ajuste foi feito conforme a redução de tamanho do dispositivo.

O dispositivo que em 60 segundos de leitura de corrente elétrica apresentou uma resposta de concentração foi selecionado para a próxima etapa (determinação da reação de lactato enzimático).

3.2.2 Reação enzimática

Para o experimento de detecção da reação enzimática, foi adicionado 3 μL do reagente de trabalho e 1 μL da solução padrão de lactato na câmara do delimitador de amostra do dispositivo. As medições de corrente foram realizadas a partir da aplicação de uma tensão de 0,6 V durante 120 segundos.

3.3 Aspectos éticos

O presente trabalho não envolve seres humanos de forma direta ou indiretamente e por isso é isento de encaminhamento ao Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos. O benefício previsto da pesquisa é a geração de um dispositivo para detecção da concentração de lactato de baixo custo e fácil execução, que tem potencial de atender situações de urgência e emergência ou beira de leito e ambientes extra hospitalares.

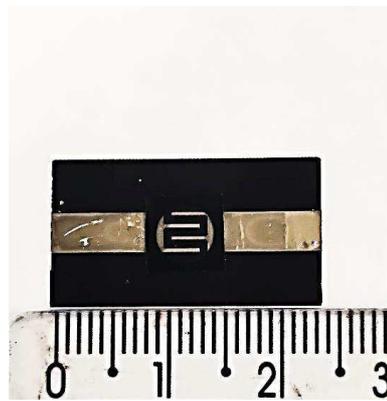
4 RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os resultados dos dispositivos desenvolvidos quanto a sua construção e medidas elétricas para prova de conceito.

4.1 Resultado das construções

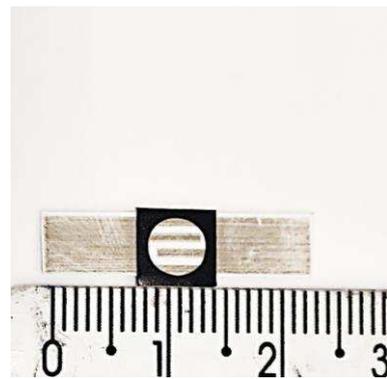
As fotos apresentadas nas figuras abaixo ilustram os dispositivos desenvolvidos no presente trabalho.

Figura 8 – Dispositivo de tinta de Nanopartículas de Prata com construção 1.0



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9 – Dispositivo de tinta de Nanopartículas de Prata com construção 1.1



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 10 – Dispositivo de Alumínio com construção 2.0



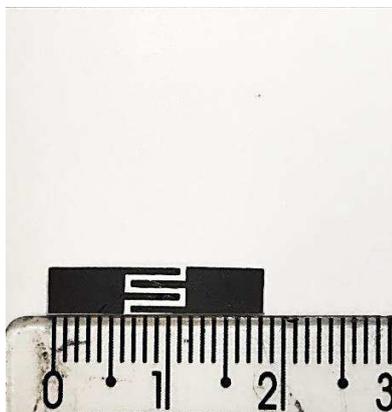
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 8 – Dispositivo de Ouro com construção 3.0 e 3.1



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9 – Dispositivo de Grafeno com construção 4.0.



Fonte: Elaborada pela autora.

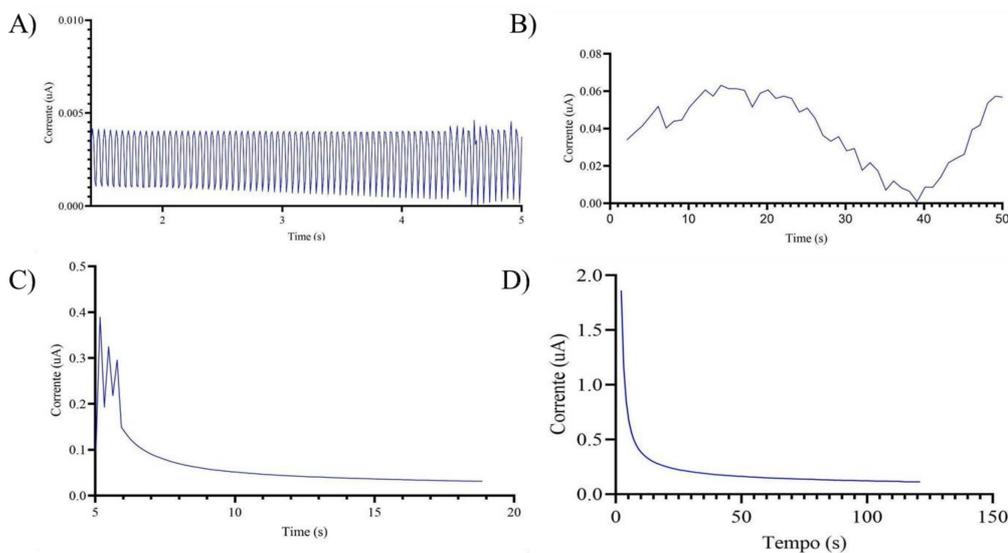
4.2 Resultado das medidas elétricas

Experimentos com PBS, solução de lactato padrão e reação enzimática utilizando os dispositivos desenvolvidos estão descritos.

4.2.1 Caracterização com PBS

Os gráficos da Figura 13 representam o resultado da corrente no tempo após a aplicação de uma tensão elétrica. Os experimentos foram realizados com a adição de uma solução de PBS pH 7,4. A determinação da corrente elétrica foi realizada através da aplicação de um potencial elétrico de 1V em todos os eletrodos construídos, exceto nos dispositivos de Ouro e Grafeno, nos quais foi aplicado um potencial de 0,6 V.

Figura 10 – Caracterização dos dispositivos com PBS



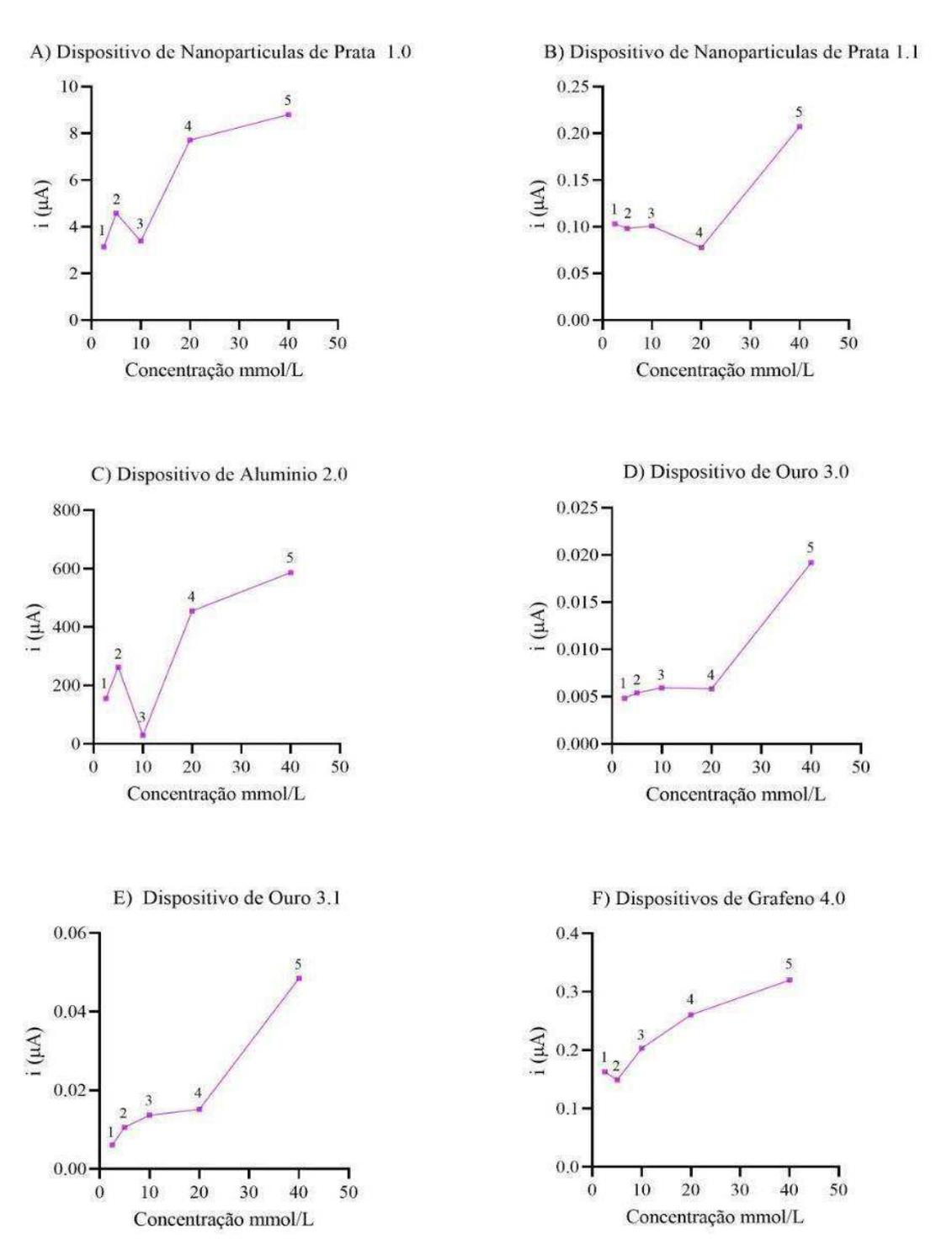
Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: A figura representa a medição da corrente elétrica de PBS em eletrodos construídos com materiais condutivos diferentes. Os correspondentes são: A) Nanopartículas de Prata, B) Alumínio, C) Ouro e D) Grafeno. Os eixos x e y dos gráficos estão em escalas diferentes porque as medidas de corrente elétrica foram variadas por tensões e equipamentos (Quadro 2).

4.2.2 Caracterização com solução de lactato padrão

Os gráficos da figura 14 representam o resultado da corrente no tempo em 60 segundos após a aplicação de uma tensão elétrica. Os experimentos foram realizados com a adição de 10uL de amostra em todos designs, exceto os dispositivos de Ouro 3.1 e 3.2 que foram realizados com adição de 4uL. A determinação da corrente elétrica resultou da quantia de elétrons disponíveis na amostra e da aplicação de um potencial elétrico de 1V em todos os eletrodos construídos, exceto nos materiais de Ouro e Grafeno que foi aplicado ou 0,6 V.

Figura 14 – Caracterização dos dispositivos com solução de lactato padrão



Fonte: Elaborada pela autora.

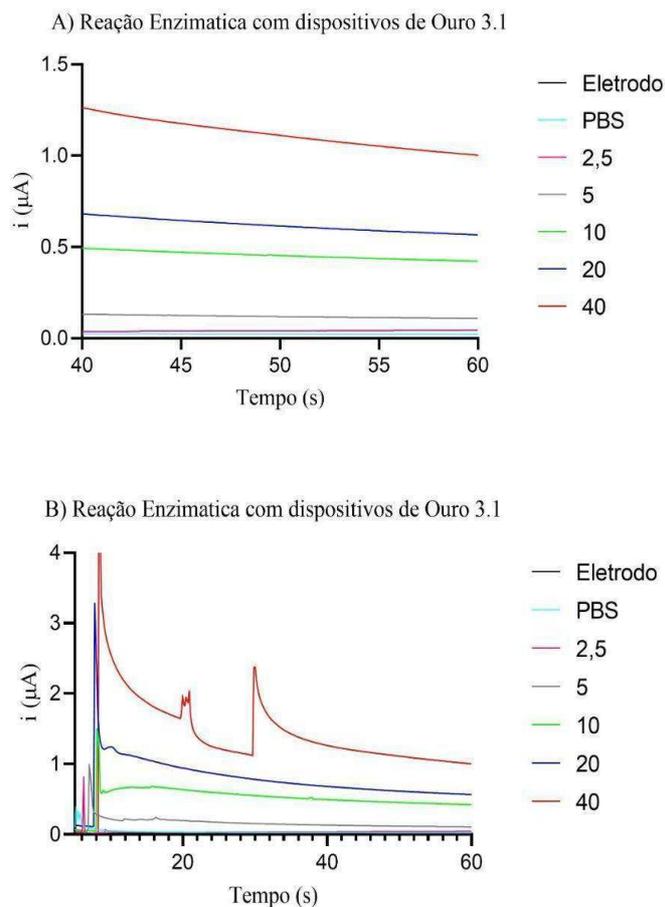
Legenda: Cada ponto no gráfico representa a medição da corrente elétrica em 60 segundos de leitura por diferentes concentrações de solução padrão de lactato. Portanto: (1) 2,5 mmol/L, (2) 5mmol/L, (3) 10mmol/L, (4) 20 mmol/L e (5) 40 mmol/L em eletrodos construídos com materiais condutivos diferentes e A) Dispositivo de tinta de Nanopartículas de Prata com construção 1.0 B) Dispositivo de tinta de Nanopartículas de Prata com construção 1.1 C) Dispositivo de Alumínio com construção 2.0 D)

Dispositivo de Ouro com construção 3.0 E) Dispositivo de Ouro com construção 3.1 F) Dispositivo de Grafeno com construção 4.0. Os eixos x e y dos gráficos estão em escalas diferentes porque as medidas de corrente elétrica foram variadas por tensões e equipamentos de aplicação (Quadro2).

4.2.3 Medidas de corrente a partir de reação de lactato enzimática

A reação enzimática foi realizada na construção 3.2 conforme os pré-requisitos estabelecidos na metodologia. O gráfico da figura 15 representa o resultado da corrente no tempo após a aplicação de uma tensão elétrica de 0,6 V com adição de 3uL de Reagente de trabalho contendo a enzima LOX e 1uL de amostra de Ácido Lático com concentrações diferentes em mmol/L.

Figura 15 – Corrente elétrica de Reação Enzimática com diferentes concentrações de lactato nos eletrodos de Ouro



Fonte: Elaborada pela autora.

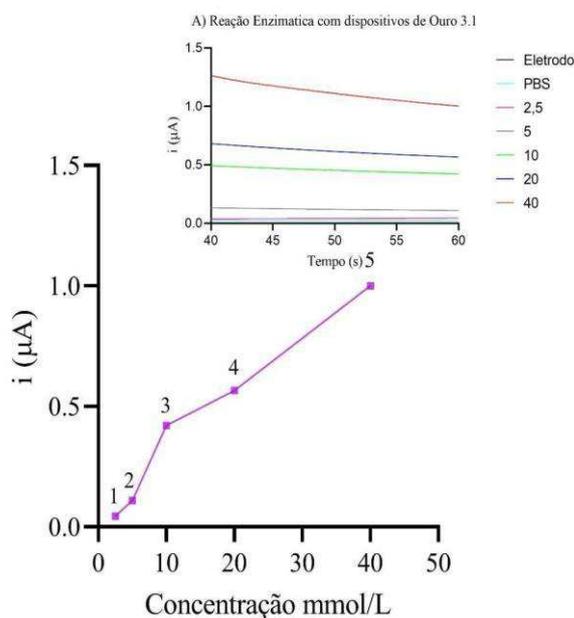
Nota: Foi aplicada uma tensão de 0,6V através de agulhas no eletrodo em ouro utilizando um equipamento Analisador de Parâmetros e a corrente foi mensurada durante o tempo. As linhas no gráfico

indicam as respectivas concentrações conforme legenda. O gráfico A) demonstra a medição da corrente elétrica de 40 segundos a 60 segundos e o gráfico B) demonstra a visão ampliada da medição.

O gráfico da figura 16 representa o resultado da corrente no tempo em 60 segundos. Também demonstra a medição da corrente elétrica de 40 segundos a 60 segundos após a aplicação de uma tensão elétrica de 0,6 V em eletrodos de Ouro com adição de 3uL de Reagente de trabalho contendo a enzima LOX e 1 uL de amostra de Ácido Lático com concentrações diferentes em mmol/L.

Figura 16 – Corrente elétrica em 60 segundos de Reação enzimática nos eletrodos de Ouro

A) Reação Enzimática com dispositivos de ouro 3.1



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Cada ponto no gráfico representa a medição da corrente elétrica em 60 segundos com concentrações de solução padrão de lactato (1) 2,5 mmol/L, (2) 5mmol/L, (3) 10mmol/L, (4) 20 mmol/L e (5) 40 mmol/L em eletrodos de Ouro, construção 3.1.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O lactato é um produto do metabolismo anaeróbico e serve como um importante biomarcador laboratorial. (ANDERSEN *et al.*, 2014). Na presença de baixos níveis de oxigênio, os níveis séricos de lactato aumentam. Sua medição é frequentemente utilizada em contexto hospitalar para identificar doenças críticas, assim como o risco de sepse. (HAAS *et al.*, 2016; HOWICK *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a determinação dos níveis desse biomarcador atualmente é centralizada em laboratórios de patologia clínica que demandam um fluxo de funcionamento complexo e acarretam em um longo tempo entre a solicitação do teste e a obtenção do resultado. (EDWARD *et al.*, 2019). Os citados fatores atrasam as tomadas de decisão e intervenções da equipe de saúde, impactando diretamente nos índices de morbimortalidade. Com base no exposto, a disponibilidade de dispositivos *point-of-care* vem se tornando cada vez mais essencial ao serviço de saúde, pois eles fornecem uma maneira rápida e simples de verificar parâmetros laboratoriais, consequentemente contribuindo para decisões compartilhadas pela equipe envolvida. (EDWARD *et al.*, 2019; HOWICK *et al.*, 2014).

Os dispositivos *POC* disponíveis no mercado que realizam a mensuração do lactato sanguíneo são caros, o que dificulta a inclusão da tecnologia no sistema de saúde de países com baixa e média renda. (EDWARD *et al.*, 2019). Outra barreira para implantação é a preocupação com a precisão diagnóstica justamente pela escassez de estudos de validação clínica e usabilidade. (HOWICK *et al.*, 2014). Esse cenário motivou o desenvolvimento de dispositivos que fossem acessíveis ao sistema de saúde brasileiro, capazes de detectar, de forma precisa, diferentes concentrações de lactato.

Assim, foram utilizados diferentes materiais condutivos (Quadro 2) para construção dos dispositivos do presente estudo. Os que foram elaborados com ouro (dispositivos 3.1) apresentaram melhor condutividade entre as construções e consequentemente a melhor capacidade para diferenciar concentrações de lactato tanto em solução padrão quanto em reação enzimática.

Também foram utilizados diferentes métodos de deposição dos materiais. A construção 1.0 utilizou um método manual de depósito que impossibilita o controle da espessura do material condutivo, além de apresentar dificuldade de reprodutibilidade na construção e consequentemente nos resultados. Na construção do dispositivo 1.1, não alcançamos os resultados reportados na literatura a respeito do equipamento Dimatix®, que o descreve como uma boa alternativa para o depósito do material condutivo. (JENKINS *et al.*, 2015).

O método de deposição de Transferência térmica na construção de 2.0, utilizando o equipamento Zebra®, apresenta vantagem na produção em larga escala (LIU *et al.*, 2020) e por isso foi utilizado como estratégia na metodologia do presente estudo, buscando uma alternativa na construção dos eletrodos. Não foi possível atingir o objetivo de detectar diferentes concentrações de lactato de forma linear.

Por isso incluiu-se no estudo o método de microfabricação avançada com *lift off* (HAJIAN *et al.*, 2019), que agregou reprodutibilidade e padronização na construção dos dispositivos 3.0 e 3.1. Cabe ressaltar que a desvantagem método é o custo final elevado. Para a pesquisa, utilizando essa técnica e ouro como material condutivo estimamos um custo de R\$25,00 por dispositivo.

Com o objetivo de diminuir custos, em comparação com a metodologia de microfabricação, foram construídos dispositivos com o método de serigrafia 4.0 e pasta de grafeno, que apresentam o valor estimado de R\$5,00 reais por dispositivo. (GABARDO; SOLEYMANI, 2016). Porém, essa construção, assim como as demais (1.0, 1.1, 2.0 e 2.1), não demonstrou a mesma sensibilidade para diferenciar concentrações de lactato quando comparados com os dispositivos de microfabricação (3.0 e 3.1).

Outro fator impactante para obter resultados sensíveis nas medidas elétricas é o design, em especial o tamanho dos dispositivos e espaçamento entre os eletrodos. (WEI *et al.*, 2019). Quanto menor o espaçamento dos eletrodos, melhor é a transferência de elétrons pela amostra, o que aumenta a sensibilidade do sinal decorrente da reação eletroquímica. (WALKER, 2009). Contudo, o tamanho do dispositivo está associado ao método de deposição utilizado em sua construção. Alguns métodos de fabricação não permitem deposição homogênea e controlada em tamanhos menores. Assim, apenas nas construções 3.0 e 3.1 foi possível trabalhar com um espaçamento entre os eletrodos de 0,5 mm devido ao método de microfabricação.

Atualmente, existem diversos métodos para mensurações elétricas utilizadas nos biossensores, como por exemplo a voltametria cíclica, impedância e cronoamperometria. (WALKER, 2009). Nesse estudo o método escolhido para mensurar diferentes concentrações de lactato, e detectar a reação enzimática, foi a cronoamperometria devido a sua fácil execução e também ao fato de ser reportada em estudos anteriores com o mesmo objetivo. (CURRANO *et al.*, 2018; JIA *et al.*, 2013; PALMISANO; DE BENEDETTO; ZAMBONIN, 1997; ROMERO *et al.*, 2010).

Para mensuração da cronoamperometria (corrente elétrica no tempo), foi aplicado um potencial igual ou maior do que 0,6 V (variando conforme as construções) devido ao alto potencial

elétrico necessário para detecção de lactato e, principalmente, de peróxido de hidrogênio, produto liberado nessa reação enzimática. (JIA *et al.*, 2013).

Como etapa preliminar à utilização dos dispositivos, é necessário realizar a caracterização dos mesmos a fim de avaliar a condutividade e definir o “branco” da reação. (FERNANDES *et al.*, 2020; SCHUCK *et al.*, 2021). Nesse estudo ela feita utilizando soluções de PBS e padrão de lactato, o que auxiliou na escolha do melhor dispositivo considerando o material, método de deposição e design. Como resultado da caracterização de PBS, a corrente gerada é utilizada como um branco de reação. (SCHUCK *et al.*, 2021). A partir da caracterização com PBS, foi possível observar que as construções 1.0 e 1.1 apresentaram instabilidades da corrente, que são demonstradas como ruídos na medição. Isso pode ser justificado pelo método de deposição do material condutivo não padronizado.

A segunda caracterização foi realizada para diferenciar concentrações de lactato. A hipótese apresentada na literatura descreve que a maior concentração de lactato na solução apresentará uma maior corrente elétrica. (JIA *et al.*, 2013). A relação corrente/concentração de lactato foi linear no dispositivo 3.1, mas não foi possível diferenciar concentrações intermediárias nas demais construções. Assim, essa construção foi utilizada para a etapa de reação enzimática.

A partir da reação enzimática, foi possível identificar o comportamento elétrico das concentrações de lactato, sendo elas 2,5 mmol/L, 5 mmol/L, 10 mmol/L, 20 mmol/L e 40 mmol/L, estando esses resultados de acordo com achados prévios encontrados na literatura. (CURRANO *et al.*, 2018; JIA *et al.*, 2013; ROMERO *et al.*, 2010).

No presente estudo foi utilizado o kit comercial de determinação enzimática de lactato LabTest® cujo benéfico é a reação enzimática padronizada. Ele foi escolhido porque utiliza a enzima lactato oxidase, que apresenta uma vantagem em relação a lactato desidrogenase por ser uma reação não reversível. (CHAN *et al.*, 2017; ROMERO *et al.*, 2010). Esse kit originalmente é confeccionado para ter a leitura da reação enzimática por espectrofotometria, que avalia a intensidade de cor da solução. Também é indicado um tempo de incubação (tempo prévio da leitura) de 5 minutos. Contudo, avaliamos a medida elétrica resultante da reação enzimática e observamos que 60 segundos é o tempo necessário para detectar as trocas de elétrons decorrentes da reação enzimática entre o analito e as enzimas presentes do kit comercial.

Apesar de a enzima fixada representar uma vantagem técnica na comercialização dos dispositivos point-of-care por potencializar a detecção do sinal biológico (CURRANO *et al.*, 2018; JIA *et al.*, 2013; SCHUCK *et al.*, 2021), optou-se por um caminho diferente no presente

estudo. Isso porque o uso de kits comerciais enzimáticos não fixados abre a possibilidade de se obter uma plataforma que sirva para mais de uma reação enzimática, podendo incluir a detecção de outros biomarcadores.

Por fim, esse projeto alcançou o objetivo de construir um dispositivo a partir de estudos de materiais condutivos que é capaz de detectar níveis de lactato a partir da diferença de corrente elétrica obtida por uma reação enzimática de um kit comercial. Sendo assim, é possível prospectar que, após um estudo de validação clínica com amostras biológicas, ele terá aplicabilidade no cenário de atendimento aos pacientes com suspeita de sepse ou outras doenças consideradas tempo-dependentes para detectar os níveis séricos de lactato. Ainda são necessários estudos adicionais e análise de interferentes biológicos que possam impactar nessa mensuração para aprimorar o desenvolvimento do dispositivo.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo apresenta algumas perspectivas tecnológicas no seu desenvolvimento, dentre elas a utilização de novos métodos de detecção do sinal elétrico para diferenciar as concentrações de lactato e a inclusão de um sistema de referência para aprimorar a medida elétrica.

A portabilidade de equipamentos que meçam a reação enzimática nos dispositivos desenvolvidos e a pré fixação dos reagentes necessários para mensuração do analito são essenciais para uma validação clínica nos serviços de saúde, bem como comprovação da sensibilidade e especificidade do produto.

REFERÊNCIAS

- BAKKER, Jan; NIJSTEN, Maarten W.N.; JANSEN, Tim C. Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients. **Annals of Intensive Care**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–8, 2013.
- BLOHM, Eike; LAI, Jeffrey; NEAVYN, Mark. Drug-induced hyperlactatemia. *Clinical Toxicology*, [s. l.], v. 55, n. 8, p. 869–878, 2017.
- CHAN, Deni. et al. L-lactate selective impedimetric bienzymatic biosensor based on lactate dehydrogenase and pyruvate oxidase. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 231, p. 209–215, 2017.
- CURRANO, Luke. J. *et al.* Wearable Sensor System for Detection of Lactate in Sweat. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- DRABEN, Lether. Hyperlactatemia and patient outcomes after pediatric cardiac surgery. **Critical Care Nurse**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. e1–e7, 2018.
- EDWARD, Uwezo *et al.* The utility of point of care serum lactate in predicting serious adverse outcomes among critically ill adult patients at urban emergency departments of tertiary hospitals in Tanzania. **Tropical Medicine and Health**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 1–13, 2019.
- FERNANDES, Iara J. *et al.* Silver nanoparticle conductive inks: synthesis, characterization, and fabrication of inkjet-printed flexible electrodes. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.
- FRIEDMAN, Gilberto *et al.* Oxygen supply dependency can characterize septic shock. **Intensive Care Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 118–123, 1998.
- GABARDO, C. M.; SOLEYMANI, L. Deposition, patterning, and utility of conductive materials for the rapid prototyping of chemical and bioanalytical devices. **Analyst**, [s.l.] v. 141, n. 12, p. 3511–3525, 2016.
- GARCIA-ALVAREZ, Mercedes; MARIK, Paul; BELLOMO, Rinaldo. Sepsis-associated hyperlactatemia. **Critical Care**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 1–11, 2014.
- HAAS, Sebastian A. *et al.* Severe hyperlactatemia, lactate clearance and mortality in unselected critically ill patients. **Intensive Care Medicine**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 202–210, 2016.
- HOWICK, Jeremy. *et al.* Current and future use of point-of-care tests in primary care: An international survey in Australia, Belgium, The Netherlands, the UK and the USA. **BMJ Open**, [s.l.], v. 4, n. 8, 2014.
- JENKINS, G. *et al.* Printed electronics integrated with paper-based microfluidics: new methodologies for next-generation health care. **Microfluidics and Nanofluidics**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 251–261, 2015.

JIA, Wenzhao *et al.* Electrochemical tattoo biosensors for real-time noninvasive lactate monitoring in human perspiration. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 85, n. 14, p. 6553–6560, 2013.

LAB TESTE. **Lactato enzimático**: instruções de uso. Ref.: 138. Minas Gerais: Lab Teste, 2016. Disponível em: https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Lactato_Enzim%C3%A1tico_138_Port.pdf. Acesso em: 11 jan. 2020.

LEVY, Mitchell M.; EVANS, Laura E.; RHODES, A. The surviving sepsis campaign bundle: 2018 update. **Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 997–1000, 2018.

MALHOTRA, Bansi D.; PANDEY, Chandra M. **Biosensors: Fundamentals and Applications**. Reino Unido: Smithers Information Ltd., 2017

MORRIS, Elizabeth *et al.* Point-of-care lactate testing for sepsis at presentation to health care: A systematic review of patient outcomes. **British Journal of General Practice**, [Reino Unido], v. 67, n. 665, p. e859–e870, 2017.

MULLEN, Marie *et al.* Use of point-of-care lactate in the prehospital aeromedical environment. **Prehospital and Disaster Medicine**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 200–203, 2014.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Nova York: W. H. Freeman and Company, 2014.

NOVA BIOMEDICAL. **StatStrip® and StatStrip Xpress® Medidores de lactato**. [S.I.]: Nova Biomedical, 2019. Disponível em: <https://www.novabiomedical.com/pt/statstrip-lactate/index.php>. Acesso em: 11 jan. 2020.

PUNDIR, Chandra S.; NARWAL, Vinay; BATRA, Bhawna. Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, [s.l.], v. 86, p. 777–790, 2016.

OSPINA-TASCÓN, Gustavo A.; MADRIÑÁN-NAVIA, Humberto. Should microcirculation monitoring be used to guide fluid resuscitation in severe sepsis and septic shock? **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [São Paulo], v. 27, n. 2, p. 92–95, 2015.

REDDY, B. *et al.* Point-of-care sensors for the management of sepsis. **Nature Biomedical Engineering**, [California], v. 2, n. 9, p. 640–648, 2018.

RELLO, Jordi; LEBLEBICIOGLU, Hahan. Sepsis and septic shock in low-income and middle-income countries: need for a different paradigm. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 48, p. 120–122, 2016.

RHODES, Andrew *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. **Intensive Care Medicine**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 304–377, 2017.

ROCHE DIAGNOSTICS. **Accutrend® Plus**. [S.I.]: Roche Diagnostics, 2021. Disponível em: [systemhttps://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/accutrend-](https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/accutrend-)

plus.html#productSpecs. Acesso em: 14 jan. 2021.

ROMERO, Marcelo Ricardo *et al.* Amperometric biosensor for direct blood lactate detection. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 82, n. 13, p. 5568–5572, 2010.

SALOMÃO, R. *et al.* Sepsis: Evolving concepts and challenges. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brasil, v. 52, n. 4, p. 1–14, 2019.

SCHUCK, Ariadna *et al.* A Graphene-Based Enzymatic Biosensor Using a Common-Gate Plasma Samples. **Sensors**, [s.l.], p. 12–15, 2021.

SILVA, Ana Paula Ribeiro Marques da; SOUZA, Hugo Viana de. Sepse: importância da identificação precoce pela enfermagem. **Revista Pró-UniverSUS**, [Vassouras], v. 9, n. 1, p. 47–50, 2018.

SINGER, Adam J. *et al.* ED bedside point-of-care lactate in patients with suspected sepsis is associated with reduced time to iv fluids and mortality. **The American Journal of Emergency Medicine**, [s. l.], v. 32, n. 9, p. 1120–1124, 2014.

TABELA de preço. *In:* MedCon Saúde. São Paulo, 2020. Disponível em: <http://www.medconsaude.com.br/Home/TabelaPrecosLaboratorios/1>. Acesso em: 10 jan. 2020.

TANIGUCHI, Leandro U. *et al.* Sepsis-related deaths in Brazil: An analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. **Critical Care**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 1–7, 2014.

TOLAN, Nicole V. *et al.* Analytical performance of three whole blood point-of-care lactate devices compared to plasma lactate comparison methods and a flow-injection mass spectrometry method. **Clinical Biochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 4–5, p. 168–173, 2017.

VAFAlEE, M. *et al.* Gold-Plated Electrode with High Scratch Strength for Electrophysiological Recordings. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019. Disponível em: Gold-Plated Electrode with High Scratch Strength for Electrophysiological Recordings | Scientific Reports.

WEI, Xiao-Yu *et al.* Low-voltage electrical cell lysis using a microfluidic device. **Biomedical Microdevices**, [s.l.], v. 21, n. 1, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Sepsis**. [Genebra]: WHO, 2018a. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>. Acesso em: 23 de jan. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Sepsis Technical Expert Meeting**. Suíça: World Health Organization, 2018b. (WALKER, 2009)

WORSFOLD, Paul J.; ZAGATTO, Elias Ayres Guidetti. **Spectrophotometry: Overview**. 3. ed. Amsterdã: Elsevier, 2017.

APÊNDICE A – RECEITA SÍNTESE 3.3 – PVP E EG

Materiais:

1. Grafeno
2. Polivinilpirrolidona (PVP)
3. Etilenoglicol (EG)

Preparo:

1. Colocar 25ml de EG num béquer
2. Colocar no agitador (1500 rpm)
3. Adicionar 0,25g de PVP
4. Deixar agitando por duas horas
5. Adicionar 5,0g de grafeno
6. Deixar agitando por mais 2 horas
7. Ultrassom 1 hora
8. Sonicação 80% de potência por 30 minutos.

APÊNDICE B – RECEITA DO PDMS

Materiais:

1. 40g de PDMS
2. 4g do agente de cura
3. Placa de Petri

Preparo:

1. Pesar os dois compostos e os misturar
2. Transfira a mistura para uma placa de Petri
3. Deixar a placa com o PDMS no vácuo por 1 hora para retirada das bolhas
4. Colocar a placa de Petri com o PDMS na estufa a 80°C por, no mínimo, 1 hora
5. Ao sair da estufa o PDMS já deve estar rígido e no formato do molde, podendo ser retirado da placa de Petri e utilizado.

APÊNDICE C – PREPAROS DA SOLUÇÃO PBS

Preparo da solução de PBS concentrado

1. Em pedaços de alumínio, pesar 41 g de NaCl, 1,775 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 5,25 g de Na_2HPO_4 .
2. Diluir os sólidos em 500 mL de água ultrapura.
3. Transferir a solução para um recipiente adequado e devidamente rotulado.

Preparo da solução de PBS diluído

1. A diluição do PBS concentrado é realizada sempre considerando o volume de PBS concentrado como 10% da solução.

Assim, para um volume final de solução igual a 400 mL:

2. Coletar 40 mL da solução de PBS concentrado e transferir para o frasco medidor com tampa
3. Adicionar 360 mL de água ultrapura.
4. Agitar.
5. Transferir a solução para um recipiente adequado e devidamente rotulado.

APÊNDICE D – IMAGENS DOS EQUIPAMENTOS



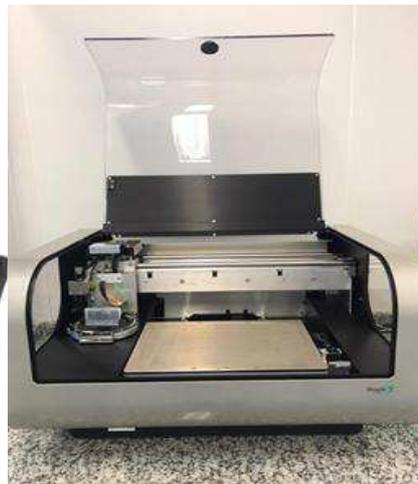
Impressora colorqueb



Plotadora de corte Graphtec



Impressora Térmica Zebra



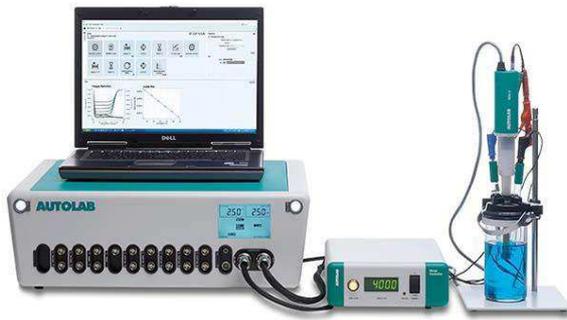
Equipamento Dimatix



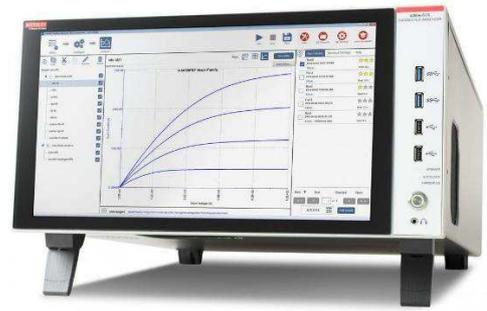
Equipamento Sputtering



Tela para Serigrafia



Equipamento Autolab



Equipamento Parameter Analyzer.